Herstellung, Charakterisierung und Einsatz von

Anti-Zona pellucida-Protein 2-Peptid-Antiseren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von **Wolfgang Hägele**
aus Künzelsau

Gießen 1998

Aus dem Medizinischen Zentrum für Dermatologie und Andrologie
Hautklinik
Abteilung Allgemeine Dermatologie und Andrologie
Leiter: Prof. Dr. Schill
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: PD Dr. Hinsch

Gutachter: Prof. Dr. Künzel

Tag der Disputation: 29.9.1998

Inhalt

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Befruchtung

Die Befruchtung von Eizellen stellt das Ergebnis komplexer Interaktionen von Spermatozoen und Oozyten dar. Von entscheidender Bedeutung ist dabei die Imprägnation, das aktive Eindringen des Spermatozoenkerns in die Eizelle. Dieser Vorgang ist in Abb. 1 schematisch dargestellt und beginnt mit der festen Bindung des Spermatozoons an die die Eizelle umgebende Zona pellucida [197]. In der Regel erfolgt diese Bindung nur an Oozyten der gleichen Spezies, was eine Speziesspezifität des Befruchtungsvorganges gewährleistet [208]. Durch die Bindung wird die akrosomale Reaktion im Spermatozoon ausgelöst [16, 162]. Das Akrosom ist im vorderen Kopfbereich des Spermatozoons lokalisiert und stellt ein mit proteolytischen Enzymen angefülltes Hohlorganell dar. Während der akrosomalen Reaktion verschmilzt die äußere akrosomale Membran mit der Plasmamembran des Spermatozoons und führt zur Freisetzung der im Akrosom enthaltenen Enzyme [163]. Die einsetzende Hydrolyse von Zona pellucida-Strukturen ermöglicht es dem Spermatozoon, die Zona pellucida zu penetrieren und an die Eizelle zu binden [29, 154, 177].

Die wahrscheinlich durch Integrine vermittelte Fusion der Spermatozoenmembran mit der Plasmamembran der Oozyte [25, 70, 71, 138] löst mehrere biochemische Reaktionen aus, die die Penetration und Fusion weiterer Spermatozoen mit der Eizelle verhindern und einen Schutz vor Mehrfachbefruchtung darstellen [47, 86, 208]. Zum einen wird durch die Inkorporation der Spermatozoenmembran [126] das Oolemm innerhalb weniger Minuten [168, 176] mit einem noch nicht geklärten Mechanismus so verändert, daß Spermatozoen nicht mehr binden können [12, 203]. Zum anderen führt die einsetzende Reaktion der cortikalen Granula zu einem Spermatozoenblock der Zona pellucida. Die mit proteolytischen Enzymen, wie z.B. N-Acetylglucosaminidase [131], angefüllten Granula verschmelzen mit der Plasmamembran der Oozyte und geben ihren Inhalt nach außen frei. Der Vorgang beginnt an der Fusionsstelle des Spermatozoons und schreitet allseitig fort. Enzymatisch bedingt verändert sich darauf die Zona pellucida biochemisch so, daß sie verhärtet und undurchdringbar für weitere Spermatozoen wird [11]. Der Einbau weiterer, bisher nicht identifizierter Glykoproteine in die Zona pellucida nach der Exozytose der cortikalen Granula wird ebenfalls diskutiert [8]. Eine Depolarisierung des Oolemms, die bei Seeigeln eine Mehrfachbefruchtung verhindert, konnte im Säugermodell, der Maus, nicht nachgewiesen werden [96]. Ein einzelner elektrischer Impuls führt jedoch zu einem Block der Spermatozoenpenetration im Rindermodell [174].

Kopf und Schwanz des befruchtenden Spermatozoons befinden sich im Ooplasma. Die Fusion von Spermatozoon und Oozyte führt zur Aktivierung der Eizelle. Darunter versteht man die bereits erwähnte Exozytose der cortikalen Granula, die Vollendung der Meiose, die Bildung des weiblichen Vorkerns und die DNA-Synthese in den Vorkernen als Grundlage für die Verschmelzung der Vorkerne (Konjugation) [208]. Der Vorgang der von Spermatozoen induzierten Eizellaktivierung wird von G-Proteinen gesteuert, von Guaninnukleotid-bindenden Regulatorproteinen, die als Signaltransduktionsmoleküle ubiquitär in Zellen vorkommen [133].

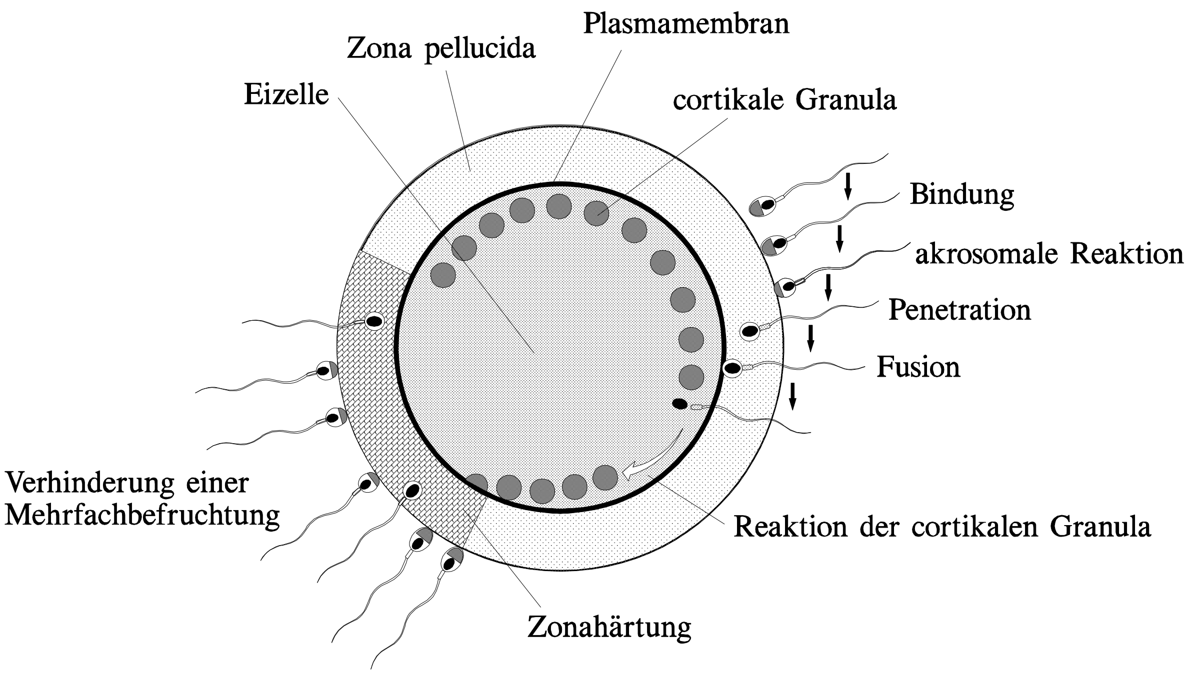


Abb.1: Die einzelnen Schritte der Imprägnation sind von rechts oben im Uhrzeigersinn schematisch dargestellt. Nach [192].

1.2 Das Spermatozoon

1.2.1 Aufbau

Das Spermatozoon ist eine frei und aktiv bewegliche Zelle und besteht aus Kopf und Schwanz (Abb. 2) [135]. Der Kopf bildet die Hauptmasse und besitzt beim Menschen eine Länge von ca. 5,5µm und eine Breite von ca. 3µm [175], beim Rind ungefähre Abmessungen von 8µm x 4,5µm x 1µm [159]. Er enthält den Zellkern sowie das im vorderen Bereich lokalisierte Akrosom. Diese Zellorganelle ist von der äußeren und inneren akrosomalen Membran umschlossen und enthält mehrere proteolytische Enzyme, wie z.B. Akrosin, Hyaluronidase und Kollagenase-ähnliche Substanzen [57]. Sie kann somit als großes Lysosom bezeichnet werden [4] und ist für die Penetration des Spermatozoons durch die Zona pellucida der Eizelle von entscheidender Bedeutung [169, 182]. Die Kopfform der Spermatozoen ist in verschiedenen Spezies unterschiedlich. Während z.B. beim Mensch der Spermatozoenkopf die Form eines Rotationsellipsoids besitzt, ist er beim Rind abgeflacht, bei Maus und Ratte hakenförmig [159, 206].

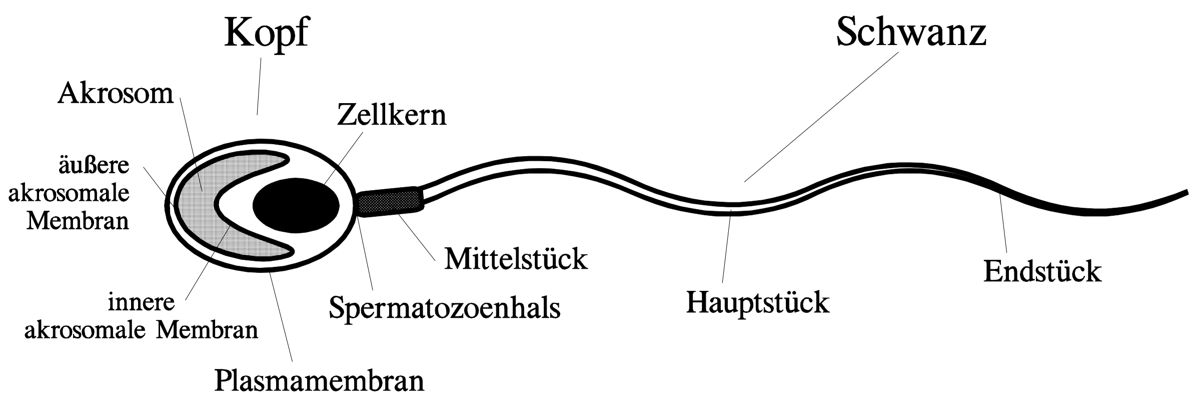


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Spermatozoons mit seinen Hauptbestandteilen.

Der Schwanz des Spermatozoons enthält ein zentrales, mikrotubuläres Axonem und besteht aus vier Teilabschnitten [149]. Der Spermatozoenhals stellt die Verbindung von Spermatozoenkopf und -schwanz dar. Im Mittelstück sind randständig die energieproduzierenden zytoplasmatischen und mitochondrialen Apparate lokalisiert [150]. Das Axonem wird im Hauptstück von einer filamentösen Struktur umgeben, die als fibröse Hülle bezeichnet wird [63, 145]. Im Endstück sind nicht mehr alle Strukturen des Zytoskeletts (z.B. fibröse Hülle, äußere Mantelfasern) nachweisbar. Der Schwanz ist für die aktive Bewegung des Spermatozoons verantwortlich und besitzt beim Menschen eine Länge von ca. 55µm, beim Rind von ca. 63µm, bei Maus und Ratte von über 100µm [57, 159].

1.2.2 Kapazitation und akrosomale Reaktion

Frisch ejakulierte, motile Spermatozoen besitzen noch nicht die Fähigkeit, an eine Zona pellucida zu binden und eine Eizelle zu befruchten. Diese Eigenschaften erlangt das Spermatozoon während eines sich an die Ejakulation anschließenden Reifungsprozesses, der als Kapazitation bezeichnet wird und erstmals von Austin [6, 7] und Chang [37, 38] experimentell nachgewiesen wurde. In vivo vollzieht sich dieser Prozeß im weiblichen Genitaltrakt. In Anwesenheit von Albumin und Energielieferanten, wie z.B. Glucose, Laktat oder Pyruvat, lassen sich auch in vitro Spermatozoen kapazitieren, wobei die Dauer je nach Spezies zwischen einigen Minuten und mehreren Stunden variiert [44, 99, 208].

Während des Calcium- und cAMP-abhängigen [68, 108], im Ablauf noch nicht vollständig aufgeklärten Kapazitationsvorganges kommt es zu einer Vielzahl von Modifikationen im Spermatozoon [83, 95, 134]. Die Änderung der Ionenverhältnisse führt zu einer De- bzw. Hyperpolarisierung der Spermatozoenmembran [66, 69, 209]. Das ursprünglich lineare Bewegungsmuster von Goldhamsterspermatozoen wird sinusoidal [205]. Histochemische und ultrastrukturelle Charakteristika verändern sich, z.B. wird eine extrazelluläre Glykoproteinhülle von der Plasmamembran des Spermatozoenkopfes entfernt [152, 198]. Diese Hülle enthält u.a. ein Akrosom-stabilisierendes

Protein epididymalen Ursprungs [146, 199] und Glykoproteine, die als Dekapazitationsfaktoren bezeichnet werden und experimentell eine Bindung von kapazitierten Spermatozoen an Oozyten verhindern können [5, 156].

Kapazitierte Spermatozoen binden mit ihrer Plasmamembran an Rezeptormoleküle der Zona pellucida und induzieren damit die akrosomale Reaktion [16, 163]. Dieser Vorgang erfolgt in der Regel speziesspezifisch, jedoch nicht ausschließlich, z.B. kann solubilisierte Zona pellucida der Maus die akrosomale Reaktion in menschlichen Spermatozoen auslösen [110]. Als entscheidende Moleküle werden auf Seite der Oozyte das ZP3-Protein [20] und auf Seite der Spermatozoenmembran verschiedene Polypeptide, wie z.B. ein 95kDa schweres Protein (Zona Rezeptor Kinase), diskutiert [31, 114, 164]. Die äußere akrosomale Membran verschmilzt mit der Plasmamembran des Spermatozoons, vermutlich vermittelt durch bestimmte Fusionsproteine, wie beispielsweise das Spermatozoenprotein sp50 bei Meerschweinchen [89]. Dabei werden enzymreiche Vesikel gebildet, deren Inhalt nach außen durch Exozytose abgegeben wird [103]. Die durch die Zona pellucida induzierte akrosomale Reaktion ist Calcium- und Chlorid-abhängig [68, 128, 206] und wird dabei durch eine G-Protein-modulierte Signaltransduktionskette gesteuert [58, 102, 190]. Ein in mehreren Säugerspezies konserviertes, intraakrosomales Protein, SP-10, ist dabei funktionell von großer Bedeutung, da Antikörper gegen SP-10 die akrosomale Reaktion kapazitierter Spermatozoen verhindern [43]. Das im Akrosom enthaltene Akrosin/Proakrosin soll im weiteren für die sekundäre Bindung des Spermatozoons an die Zona pellucida verantwortlich sein [97, 163, 188] und ermöglicht zusammen mit den anderen proteolytischen Enzymen die Penetration des Spermatozoons durch die Zona pellucida [29, 136]. Dabei entsteht ein dünner, scharf abgegrenzter Penetrationskanal. Die akrosomale Reaktion der Spermatozoen kann auch artefiziell durch verschiedene chemische Substanzen, wie Calcium-Ionophor oder Progesteron, ausgelöst werden, wobei die Kapazitation der Spermatozoen die Voraussetzung darstellt [180, 208].

1.3 Die Eizelle

1.3.1 Aufbau

Die Eizelle ist eine kugelförmige, zytoplasmareiche Zelle (Abb. 3) und besitzt beim Menschen während der Ovulation einen Durchmesser von 120-150µm [30]. Ungefähr gleich groß sind die Oozyten von Schwein und Rind [99], während sie bei der Maus nur eine Größe von ca. 80µm erreicht [62].
Das Ooplasma besitzt beim Menschen ein Volumen von ca. 0,8 x $10^6 \mu m^3$ [129]. Darin sind neben Zellkern und Zellorganellen, wie z.B. Ribosomen, Mitochondrien, Golgi-Apparat, auch die bereits erwähnten, enzymreichen cortikalen Granula gelegen. Diese sind ca. 2µm von der Plasmamembran entfernt lokalisiert [47]. Die primäre Oozyte beendet kurz vor der Ovulation ihre erste Reifeteilung, wobei das Polkörperchen entsteht. Während des Eisprungs beginnt der Zellkern mit der zweiten Reifeteilung, verharrt jedoch in der Metaphase bis zum Eindringen eines Spermatozoons in die Oozyte [135].

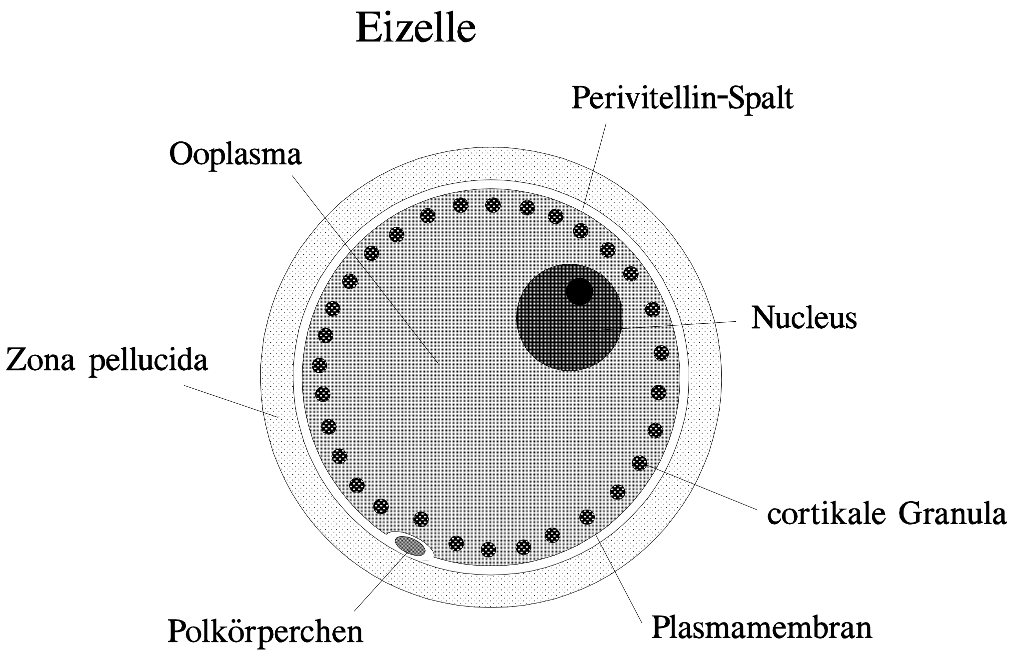


Abb. 3: Schematische Darstellung einer Eizelle mit Zona pellucida und ihrer Hauptbestandteile.

Die unbefruchtete Eizelle wird, abgetrennt durch den beim Menschen ca. 4,2µm breiten Perivitellin-Spalt, von der Zona pellucida umgeben [45, 129]. Diese besitzt neben einer mechanischen Schutzfunktion noch wesentliche Bedeutung bei der speziesspezifischen Spermatozoenbindung, der Induktion der akrosomalen Reaktion und der Verhinderung einer Mehrfachbefruchtung [142, 196].

1.3.2 Zona pellucida

Die Zona pellucida ist eine extrazelluläre, durchscheinende Glykoprotein-Hülle, die die Eizelle vollständig umgibt und von den umgebenden Follikel- und Kumuluszellen abgrenzt [208]. Ein Kontakt der Oozyte über Mikrovilli zu Ausläufern der Kumulus-zellen wird aber hinsichtlich interzellulärer Kommunikation diskutiert [196]. Die Dicke der Zona pellucida variiert zwischen den einzelnen Spezies. Sie reicht von 1-2µm beim Opossum, über 5µm bei der Maus, 16µm beim Schwein und 22µm beim Menschen bis zu 27µm beim Rind [51, 52]. Licht- und elektronenmikroskopische Studien ergaben, daß die Zona pellucida nicht homogen aufgebaut ist, sondern unterschiedliche Schichten besitzt [53]. Die äußere Oberfläche beim Goldhamster zeigt beispielsweise ein gefenstertes Muster, während die innere Schicht morphologisch dicht erscheint [151]. Die Zona pellucida stellt demnach eine hoch organisierte Matrix dar.

Je nach Spezies besteht die Zona pellucida aus zwei bis fünf Glykoproteinen unterschiedlicher Molekularmassen. In Maus, Ratte, Kaninchen und Mensch wurden drei Glykoproteine nachgewiesen [14, 53, 127, 171, 172]. Bei Katze wurden zwei, bei Schwein vier unterschiedliche Glykoproteine identifiziert [84, 87, 127]. Bei Rind werden drei bis fünf Glykoproteinklassen diskutiert [13, 79, 143]. Im am besten untersuchten Modell, der Maus, werden die unterschiedlichen Glykoproteine Zona pellucida-Protein 1 (ZP1), Zona pellucida-Protein 2 (ZP2) und Zona pellucida-Protein 3 (ZP3) genannt [208]. Die cDNAs der Zona pellucida-Proteine wurden von Harris et al. [82] als ZPA für ZP2, ZPB für ZP1 und ZPC für ZP3 bezeichnet. Ihre jeweiligen Molekularmassen sind auf Grund von abweichender post-translationaler Glyko-silierung und Sulfidierung heterogen und liegen bei 185-200kDa (ZP1), 120-140kDa

(ZP2) und 83kDa (ZP3) [59]. Alle drei Proteine besitzen N- und O-gebundene Oligosaccharidketten und werden vermutlich während der Eizellreifung zumindest bei der Maus von der Oozyte selbst synthetisiert [17, 18, 61, 73, 167]. Sie liegen in der Zona pellucida in einer sich wiederholenden Filamentstruktur verknüpft vor (Abb. 4). Dabei bilden 15nm große ZP2-ZP3-Dimere lange Ketten aus, die untereinander durch das ZP1-Molekül verknüpft sind [74]. ZP1, ZP2 und ZP3 besitzen dabei zueinander ein molares Verhältnis von 1:10:10 [17, 173, 194]. Tong et al. [184] beschrieben, daß ZP2 und ZP3 in der Mausoozyte zwar unabhängig voneinander biosynthetisiert werden, aber nur gemeinsam in die Zona pellucida-Matrix eingebaut werden können.

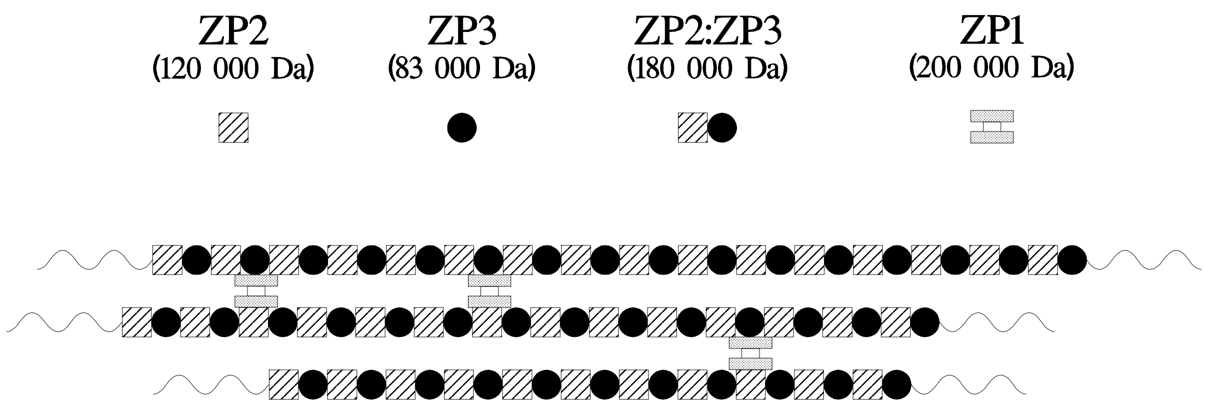


Abb. 4: Schematische Darstellung der Filamentanordnung der Glykoproteine innerhalb einer Maus-Zona pellucida. Nach [194].

Als Glykokonjugate der Zona pellucida-Proteine wurden im Rind u.a. Mannose und β-Galaktose identifiziert [100, 178]. Molekulargenetische Untersuchungen haben ergeben, daß die verantwortlichen Gene der Zona pellucida-Glykoproteine im Tierreich hoch konserviert sind. Selbst in Fischspezies können entsprechende Gene nachgewiesen werden, die für ein Ei-Vitellin-Hüll-Polypeptid kodieren [39, 60, 122, 137].

1.3.2.1 Zona pellucida-Protein 1 (ZP1)

ZP1 liegt in der Zona pellucida als ein über Disulfidbrücken verknüpftes Homodimer vor. Im Mausmodell besitzt ein Monomer die Molekularmasse von 130kDa [17]. ZP1 verknüpft die ZP2-ZP3-Filamente miteinander und formt bzw. stabilisiert damit die Zona pellucida-Matrix [74].
Harris et al. [82] identifizierten das verantwortliche Gen in mehreren Spezies. Sie fanden dabei eine Übereinstimmung der DNA-Sequenzen von über 69%. Beim Menschen besteht das ZP1-Gen aus 12 Exons mit einer Größe von 79-190bp, unterteilt von 11 Introns, die eine Länge von 83-3500bp besitzen. Das Maus-ZP1-Gen wurde erstmals von Epifano et al. [60] beschrieben. Es handelt sich dabei um ein Gen, das aus 12 Exons mit einer Größe von 82-464bp besteht und auf dem Chromosom Nr. 19 lokalisiert ist. Die Homologie in den Aminosäuresequenzen der ZP1-Proteine liegt zwischen 60 und 68%. Das menschliche ZP1-Protein besteht dabei aus 540 Aminosäuren.

1.3.2.2 Zona pellucida-Protein 2 (ZP2)

Die Ergebnisse mehrerer Untersuchungen lassen vermuten, daß es sich bei ZP2 um den sekundären Rezeptor der Spermatozoenbindung handelt [21, 22]. ZP2 bindet dabei bevorzugt an die innere akrosomale Membran bereits akrosomreagierter Spermatozoen. Ein gegen ZP2 gerichteter monoklonaler Antikörper verhindert die Bindung von Spermatozoen über die innere akrosomale Membran an die Zona pellucida im Mausmodell, die sogenannte sekundäre Bindung. Die Spermatozoenbindung über die Plasmamembran (primäre Bindung) bleibt davon unbeeinflußt [55, 56]. Zudem setzen Anti-ZP2-Antikörper die Bindung von solubilisiertem, radioaktiv markiertem ZP2 an die innere akrosomale Membran akrosomreagierter Spermatozoen herab [21]. Die Beobachtung, daß die sekundäre, nicht aber die primäre Bindung ebenfalls durch Trypsin-Inhibitoren blockiert werden kann, läßt den Schluß zu, daß es sich bei der sekundären Spermatozoenbindung um den ersten Schritt der Penetration durch die

Zona pellucida handelt [22]. Als ZP2-Ligand auf Seite des Spermatozoons wird Akrosin/Proakrosin angenommen. Diese Trypsin-ähnliche Protease kommt auf der inneren und äußeren akrosomalen Membran vor und soll ZP2 als endogenes Substrat besitzen [183, 188]. Lo-Leggio et al. [118] wiesen nach, daß die Zona pellucida beim Schwein den Umwandlungsprozeß von Proakrosin zu β-Akrosin entscheidend beeinflußt. Jedoch sind, zumindest im Mausmodell, auch genetisch veränderte Spermatozoen ohne Akrosin in der Lage, Oozyten zu befruchten [1, 9]. Der genaue molekulare Vorgang der sekundären Spermatozoen-Eizell-Bindung ist noch nicht bekannt. Jedoch spielen hochmolekulare Mannose/Hybrid-Oligosaccharidketten eine wesentliche Rolle bei der Bindung von ZP2 an bestimmte Lektine [187].

ZP2 ist auch entscheidend an der Verhinderung einer Mehrfachbefruchtung beteiligt. Im Mausmodell gelangt nach Auslösung der Reaktion der cortikalen Granula eine durch Exozytose freigesetzte, 21-34kDa schwere Proteinase über den Perivitellin-Spalt in die Zona pellucida. Dieses als ZP2-Proteinase bezeichnete Enzym führt zu einer Veränderung des ZP2-Moleküls, welches nun als $ZP2_f$ bezeichnet wird [132]. Das ursprüngliche ZP2 besitzt eine Molekularmasse von 120kDa, während das partiell hydrolysierte $ZP2_f$ eine Molekularmasse von 90kDa aufweist [19]. Dieses Molekül ist über Disulfidbrücken mit einem 23kDa schweren Spaltprodukt verbunden und in der Zona pellucida verankert. Sind mehr als 16% aller ZP2-Moleküle proteolytisch verändert, verhärtet die Zona pellucida und wird für Spermatozoen undurchdringbar. Die Proteolyse setzt wahrscheinlich nahe des Amino- oder Carboxy-Endes des Glykoproteins an. Die Bindung von monoklonalen Anti-ZP2-Antikörpern wird jedoch nicht beeinflußt [132]. Die ZP2-$ZP2_f$-Konversion ist Acetylcholin-abhängig und von G-Proteinen gesteuert [201]. Die Verhärtung der Zona pellucida führt bei der Maus zu einer Reduktion der penetrierenden Spermatozoen um 85% und geht mit einer gesteigerten Widerstandsfähigkeit gegen enzymatische und chemische Substanzen, wie z.B. Trypsin, einher [40, 78]. Downs et al. [46] fanden heraus, daß fetales Kälberserum die Umwandlung von ZP2 in $ZP2_f$ während der Reifung von Mausoozyten in vitro hemmt, wobei der Proteinase-Inhibitor Fetuin als entscheidende Substanz diskutiert wird [170].

Die cDNA-Sequenzen der ZP2-Gene von Maus und Mensch sind bekannt, ebenso die entsprechenden Sequenzen weiterer Spezies [82, 115, 116]. Die Übereinstimmung der cDNA-Sequenzen liegt zwischen 69 und 89%. Das menschliche ZP2-Gen besteht aus 19 Exons mit einer Größe von 45-190bp und 18 Introns mit 74-3000bp. Es ist auf dem Chromosom Nr. 16 lokalisiert [59], während das entsprechende Gen bei der Maus auf Chromosom Nr. 7 liegt [121]. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der bisher untersuchten Spezies weisen eine Homologie von 54-83% auf. Die ZP2-Moleküle sind zwischen 676 und 745 Aminosäuren lang, wobei das menschliche Zona pellucida-Protein 2 die längste Aminosäuresequenz besitzt.

1.3.2.3 Zona pellucida-Protein 3 (ZP3)

Bei ZP3 handelt es sich um den primären Rezeptor für Spermatozoen [163, 208]. Im Mausmodell wurden experimentell mit biochemisch isoliertem ZP3-inkubierte Spermatozoen an ihrer Eizellbindung gehindert [16]. Ebenso sind Oozyten von Mäusen, die durch eine genetische Mutation nicht in der Lage sind, ZP3 zu synthetisieren, nicht befruchtbar, da das Zona pellucida-Netzwerk insgesamt nicht aufgebaut werden kann [155]. Radioaktiv markiertes ZP3 bindet an die Plasmamembran akrosomintakter Spermatozoen, nicht jedoch an akrosomreagierte Spermatozoen. Dabei weist die Plasmamembran am Kopf des Spermatozoons zwischen 10000 und 50000 Bindungsstellen für ZP3 auf, während im Schwanzbereich keine Bindungsstellen nachweisbar sind [21]. Für die Rezeptoraktivität des ZP3 werden O-gebundene Serin/Threonin-ähnliche Oligosaccharide verantwortlich gemacht, da eine Inkubation der Spermatozoen mit diesen auf dem ZP3-Molekül lokalisierten Oligosacchariden zu einer Hemmung der Spermatozoen-Zona pellucida-Bindung führt, während die akrosomale Reaktion dadurch nicht induziert wird [117, 195]. Dafür spricht ebenfalls, daß ein gegen die Polypeptidkette des ZP3-Moleküls gerichteter monoklonaler Antikörper die Rezeptorfunktion nicht beeinflußt [64, 65]. Das vermutlich relevante Oligosaccharid hat eine Molekularmasse von 3900Da und besitzt mindestens einen terminal α-gebundenen Galaktoserest [23, 65]. Als Ligand auf Seite des Spermatozoons wird ein 56kDa schweres Protein diskutiert, das als sp56 bezeichnet wird [24, 27, 195]. Allerdings besitzen auch andere Proteine im Bereich des Akrosoms des Mausspermatozoons, wie z.B. Mannosidase oder Phosphotyrosylsubstrate, eine noch nicht genau erforschte Bindungskapazität an Zona pellucida-Proteine [140, 208].

Eine weitere Funktion des ZP3-Moleküls besteht in der Induktion der akrosomalen Reaktion gebundener Spermatozoen [20, 163]. Dabei ist jedoch auch die Intaktheit der ZP3-Polypeptidkette Voraussetzung [64]. ZP3-Fragmente, die durch Proteolyse hergestellt wurden und an die Plasmamembran des Spermatozoons binden, sind erst dann in der Lage, die akrosomale Reaktion auszulösen, wenn sie, z.B. über eine Antikörperbindung, wieder miteinander verknüpft werden [112]. Kopf und Gerton [103] gingen davon aus, daß ZP3 zwei getrennte Bindungsstellen aufweist, eine für die primäre Spermatozoenbindung, eine andere für die Auslösung der akrosomalen Reaktion (Abb. 5). Ein 95kDa schweres Protein mit Tyrosinkinase-Aktivität wird als Spermatozoenligand angenommen, der die akrosomale Reaktion triggert und als Zona Rezeptor Kinase (ZRK) bezeichnet wird [32, 54, 113, 165]. Inwieweit ZRK allerdings die ihr zugeschriebene physiologische Rolle bei der akrosomalen Reaktion spielt, wird zur Zeit kontrovers diskutiert [28, 166, 186].

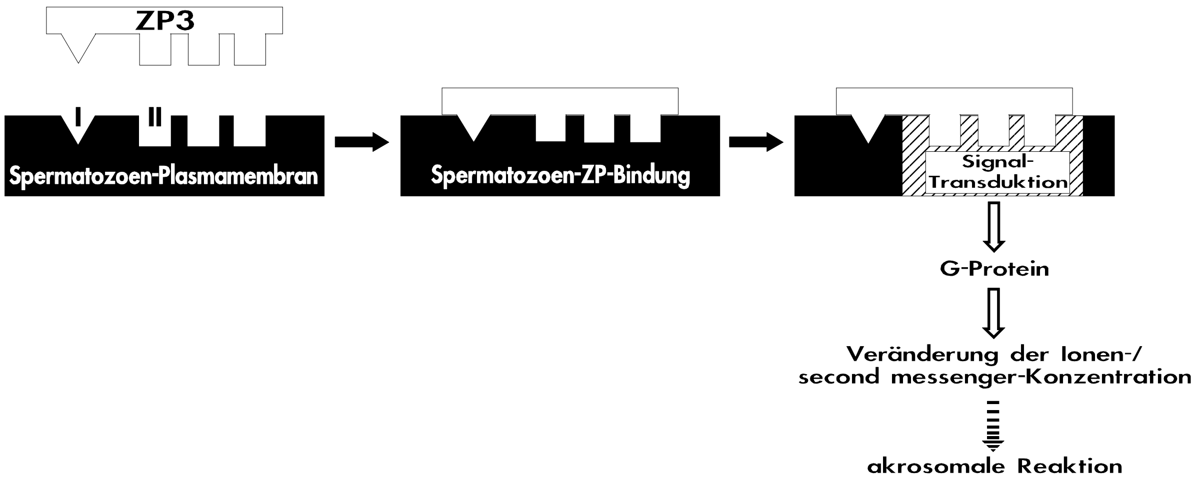


Abb. 5: Modell zur Spermatozoen-Zona pellucida-Interaktion. ZP3 besitzt zwei miteinander verknüpfte Rezeptormoleküle: I für die primäre Spermatozoen-Zona pellucida-Bindung; II für die Induktion der akrosomalen Reaktion. Modifiziert nach [103].

Während der Aktivierung der Oozyte und nach stattgefundener Reaktion der cortikalen Granula kommt es zu einer Modifikation von ZP3 zu $ZP3_f$, möglicherweise durch eine Glykosidase aus den cortikalen Granula [193]. Dabei ist im Mausmodell weder eine Änderung der Molekularmasse von 83kDa noch eine Abweichung des isoelektrischen Punktes nachweisbar. Gereinigtes $ZP3_f$ besitzt jedoch keine Fähigkeit mehr, an Spermatozoen zu binden und die akrosomale Reaktion zu induzieren [16]. Es werden allerdings nicht alle ZP3-Moleküle modifiziert, was die Beobachtung erklärt, daß Spermatozoen auch an die Zona pellucida bereits befruchteter Eizellen binden können und dort die akrosomale Reaktion ausgelöst wird [191].
Die cDNA-Sequenz des primären Spermatozoenrezeptors ZP3 wurde in mehreren Spezies identifiziert, wobei eine Nucleotidsequenzhomologie zwischen 70 und 85% ermittelt wurde [35, 36, 82]. Das menschliche ZP3-Gen besitzt eine Größe von 18300bp und besteht aus 8 Exons [36]. Es ist auf dem Chromosom Nr. 7 lokalisiert und besitzt auf demselben Chromosom ein partielles Duplikat, das POM-ZP3 genannt wird und für ein verkürztes ZP3-Protein codiert [189]. Das ZP3-Gen der Maus befindet sich dagegen auf dem Chromosom Nr. 5 [121]. Die Aminosäuresequenzen der untersuchten Spezies stimmen zu 63-84% überein. Die Glykoproteine sind zwischen 415 und 426 Aminosäuren lang, das menschliche ZP3-Protein besteht aus 424 Aminosäuren [82].

1.4 Klinische Relevanz

1.4.1 Diagnostik und Therapie

Nach den Erhebungen der Volkszählung von 1988 waren in der damaligen Bundesrepublik Deutschland etwa 1,4 Millionen Ehen kinderlos, wovon mehr als 400000 Paare als ungewollt kinderlos bezeichnet werden müssen. Maier [125] geht davon aus, daß im deutschsprachigen Raum 10-15% aller Partnerschaften ungewollt kinderlos bleiben. Dies ist zu jeweils 40% auf männliche, z.B. erektile Dysfunktion, Ejakulationsstörungen sowie subnormale Anzahl oder Qualität der Spermatozoen, bzw. auf weibliche Infertilität, wie fehlende Follikulogenese, insuffiziente Lutealfunktion, abnormale Tubenfunktion oder verminderte Eizellqualität, zurückzuführen, zu 20% auf beiderseitige Unfruchtbarkeit [81].

Aufgrund des schwerwiegenden Leidensdruckes der betroffenen Personen hat die Weltgesundheitsorganisation männliche und weibliche Infertilität als eigenständige Krankheiten definiert, die als solche behandlungsbedürftig sind. Dabei besitzt die andrologische und gynäkologische Abklärung mit sich anschließender rationaler Therapie der infertilen Patienten größte Bedeutung [81].

Die ursächlichen Faktoren der idiopathischen Infertilität betreffend der Gametenfunktion könnten sich in drei Kategorien einteilen lassen: Spermatozoenfaktor, Eizellfaktor und unbekannter Faktor [41, 93]. Die Qualität eines Ejakulates wird anhand der wesentlichen Parameter des Spermiogramms ermittelt, der Menge und Konzentration der Spermatozoen, der progressiven Motilität und Morphologie [200]. Zur Überprüfung der Funktionalität der Spermatozoen stehen Funktionstests zur Verfügung, wie z.B. der Akrosintest, die Induktion der akrosomalen Reaktion (ARIC) oder der Hemizona Assay. Bestehen in einem Ejakulat funktionelle oder morphologische Abnormalitäten der Samenzellen, wird von einem Spermatozoenfaktor ausgegangen. Die Qualität der Oozyte wird im Wesentlichen morphologisch beurteilt, die Funktionalität und Integrität der Eizellen und der umgebenden Zona pellucida kann klinisch zum heutigen Zeitpunkt nur bedingt getestet werden [144]. Eine durch Oozyten bedingte Infertilität liegt in der Regel bei einer morphologisch auffälligen Eizelle vor. In der Gruppe der unbekannten Faktoren lassen sich weder bei den Spermatozoen noch bei den Oozyten pathologische Auffälligkeiten nachweisen, dennoch kommt es zu keiner Fertilisierung der Eizellen. Möglicherweise könnten dabei u.a. auch immunologische Prozesse von Bedeutung sein. So berichten Clarke et al. [42] über eine primäre Infertilität durch Anti-Spermatozoen-Antikörper im weiblichen Genitaltrakt.

Grundlage für eine exakte Diagnostik bildet das Verstehen der physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge, die zur Infertilität führen. Nur mit dem Verständnis der elementaren Abläufe der Befruchtung läßt sich eine kausale Therapie verfolgen. Die Entwicklung von Antikörpern gegen Zona pellucida-Proteine ist die Basis zur Einführung eines diagnostischen Markers für die Überprüfung der Funktionalität, Integrität und Reife der Zona pellucida [90, 93, 144]. Dieser Marker kann eine weitere

Hilfe im ärztlichen Entscheidungsprozeß dafür sein, welche Form der assistierten Reproduktion indiziert und vielversprechend ist. Neben einer homologen intrauterinen Insemination (IUI), einer konventionellen In vitro-Fertilisation (IVF) und einem intratubaren Gametentransfer (GIFT) stehen weitere moderne Techniken der assistierten Fertilisierung zur Verfügung, z.B. die partielle Zona-Dissektion (PZD), das Zona-Drilling (ZD), die subzonale Spermatozoeninjektion (SUZI) und die intrazytoplasmatische Spermatozoeninjektion (ICSI) [3, 72].

1.4.2 Immunkontrazeption

Das Wissen um die physiologischen Interaktionen von Spermatozoen und Oozyten und das Herstellen von Antikörpern gegen definierte Antigene bilden aber auch gleichzeitig die Basis für eine relativ neue Forschungsrichtung, die Immunkontrazeption. In Hinblick auf eine individuelle Familienplanung, aber auch auf die zu erwartende Weltbevölkerungsentwicklung, fördert die Weltgesundheitsorganisation seit den siebziger Jahren die Erforschung der immunologischen Fruchtbarkeitsregulierung [181]. Ziel ist die Entwicklung eines kontrazeptiven Impfstoffs, der sich aus spezifischen Spermatozoen-, Zona pellucida- oder Hormon-Antigenen ableitet und sowohl sichere Schwangerschaftsverhütung als auch völlige Reversibilität und möglichst geringe Nebenwirkungen gewährleistet [34, 59, 141]. Aufgrund ihrer physiologischen Funktion als primärer bzw. sekundärer Spermatozoenrezeptor scheinen die Zona pellucida-Proteine 3 und 2 als Antigene zur Erforschung eines kontrazeptiven Vaccins geeignet zu sein [33, 98]. Man erhofft sich durch die Antikörperblockade der Rezeptormoleküle eine vollständige Behinderung der Spermatozoen-Eizell-Interaktion und damit eine artefizielle Infertilität, die nach Absinken des Antikörpertiters reversibel ist.
Mehrere Studien an Tiermodellen zeigen, daß eine aktive Immunisierung mit Zona pellucida-Bestandteilen zur Herabsetzung der Befruchtungsfähigkeit führt [2, 130, 160, 161]. Neben linearen ZP3-Peptidsequenzen wurden auch rekombinante ZP3-Moleküle bezüglich ihrer immunogenen Potenz überprüft [101, 147]. Mahi-Brown und Moran [124] untersuchten ein synthetisch hergestelltes, menschliches ZP3-Peptid, das zur

Immunisierung von Makaken eingesetzt wurde. Nach Immunisierung mit einem rekombinanten humanen ZP3-Molekül trat jedoch bei Marmoset-Affen neben der Immuninfertilität eine ovarielle Dysfunktion auf [148]. Eine Herabsetzung der Fertilität bei Mäusen durch eine orale Immunisierung gelang Zhang et al. [210]. Das eingesetzte Vaccin besteht aus einem attenuierten Salmonellenstamm, der ein murines ZP3-Molekül produziert.

Die Identifizierung von Zona pellucida-Bestandteilen, die eine funktionelle Bedeutung in der Spermatozoen-Eizell-Interaktion besitzen, stellt eine wichtige Grundlage der Immunkontrazeption dar. So identifizierten z.B. Gupta et al. [76, 77] sowie Hasegawa et al. [85] und Koyama et al. [104] Epitope des primären bzw. sekundären Spermatozoenrezeptors beim Schwein, die für die Spermatozoenbindung an die Zona pellucida verantwortlich sind. Nach wie vor besteht die Aufgabe in der Entwicklung eines kontrazeptiven Vaccins, das gegen das Zona pellucida-Protein 2 bzw. 3 gerichtet ist, zu keiner immunologischen Schädigung der ovariellen Oozyten, keiner Autoimmun-Oophoritis oder gestörten Ovarfunktion führt und somit in mehreren Säugerspezies reversibel eingesetzt werden kann [33, 98].

1.5 Zielstellung der Arbeit

Diese Arbeit hatte die Herstellung polyklonaler Antikörper gegen synthetische ZP2-Peptide zum Ziel. Mit Hilfe dieser Antikörper sollte ZP2 biochemisch charakterisiert, histochemisch lokalisiert und gegebenenfalls die Funktion definierter ZP2-Domänen bestimmt werden. Die Antikörper sollten als Marker für die Präsenz von ZP2 eingesetzt werden und dazu beitragen, physiologische und pathophysiologische Vorgänge, die bei der Penetration des Spermatozoons durch die Zona pellucida von Bedeutung sind, zu erkennen und zu verstehen.

Anhand bekannter molekularbiologisch isolierter cDNA-Stränge und den daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen sollten Peptide synthetisiert werden, die entweder identisch in ZP2 mehrerer Spezies oder nur in humanem ZP2 vorkommen. Durch

Immunisierung von Kaninchen mit den entsprechenden Peptiden sollten Antiseren gewonnen werden, die Antikörper gegen die jeweiligen ZP2-Domänen enthalten.

Arbeitshypothesen waren:

1. daß das Antiserum, das gegen das in verschiedenen Spezies identisch vorkommende Peptid gerichtet ist, sein ZP2-Antigen in den Zonae pellucidae mehrerer Säugerarten erkennt, während das gegen ein humanspezifisches ZP2-Peptid gerichtete Antiserum nur menschliche Zona pellucida detektiert, und
2. daß nur in einer Spezies vorkommende ZP2-Domänen Bedeutung für die Spezies-spezifität haben, und daß homologe Sequenzbereiche für speziesübergreifende Funktionen relevant sind.

Nach Bestimmung der ZP2-Antikörper-Titer gegen ihr synthetisches Peptid im ELISA sollte immunhistochemisch mit Ovarien unterschiedlicher Spezies untersucht werden, ob Anti-ZP2-Antikörper an die Zonae pellucidae verschiedener Säuger binden und das entsprechende antigene Epitop auch im ZP2-Protein erkennen.

Mit Hilfe einer elektrophoretischen Auftrennung von Eizell- und Zona pellucida-Proteingemischen in einem SDS-Polyacrylamid-Gel sollte weiterhin getestet werden, ob und welche Proteine mit welchen Molekularmassen von Anti-ZP2-Antiseren detektiert werden.

In einem weiteren Test, dem Hemizona-Antikörper-Bindungstest, sollte überprüft werden, ob die hergestellten Antiseren nicht nur biochemisch veränderte Epitope erkennen, wie z.B. nach SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese oder nach immunhistochemischen Untersuchungen, sondern auch an natives, nicht denaturiertes Zona pellucida-Protein binden können.

Zur Identifizierung funktionell bedeutsamer ZP2-Domänen sollte ein In vitro-Test, der Kompetitions-Hemizona-Assay, eingesetzt werden. Es sollte überprüft werden, ob nach Inkubation von Zonae pellucidae mit Anti-ZP2-Antiseren die Spermatozoen-bindungsfähigkeit an die Zona pellucida verringert ist oder nicht. Somit sollte den durch die Anti-ZP2-Antikörper erkannten Epitopen eine funktionelle Bedeutung bei der Spermatozoen-Eizell-Interaktion zugeordnet werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Hersteller und Lieferfirmen

(1) American Dade, Miami, Florida, USA
(2) Amersham, Little Chatfort, Großbritannien
(3) Becton Dickinson AcuteCare, Franklin Lakes, New Jersey, USA
(4) Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, New Jersey, USA
(5) Bio-Rad, München
(6) B. Braun, Melsungen
(7) Charles-River GmbH, Sulzfeld
(8) Dako GmbH, Hamburg
(9) Diener, über Kretschmer Labortechnik, Gießen
(10) Eppendorf, Hamburg
(11) Eurobio, Raunheim
(12) Glaswerk Wertheim, Wertheim
(13) Hecht, Kiel-Hassee
(14) Heraeus, Hanau
(15) Hero, Berlin
(16) Janke & Kunkel Labortechnik, Staufen
(17) Jouan GmbH, Unterhaching
(18) Kabe, Nümbrecht
(19) Kalensee, Gießen
(20) Knick GmbH & Co, Berlin
(21) Leitz, Bensheim
(22) Leybold-Heraeus, Hürth
(23) Lucerne, Oakland, CA, USA
(24) Menzel-Gläser, Braunschweig

(25) Merck, Darmstadt

(26) Millipore Corporation, Bedford, Maryland, USA

(27) Nunc, Kamstrup, Dänemark

(28) Pharmacia, Upsalla, Schweden

(29) Riedel-de Haen, Seelze

(30) Roth, Karlsruhe

(31) Schütt, Göttingen

(32) Serva, Heidelberg

(33) Sigma Diagnostics, Taufkirchen

(34) Spectrum Medical, Houston, Texas, USA

(35) Titertek-Dynatech, Denkendorf

(36) Vogel, Gießen

(37) WU, Mainz

(38) Zeiss, Frankfurt

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid/Bis (5)

Abstandhalter für Gel-Elektrophorese-Platten (5)

Ammoniumpersulfat (25)

Biotinylierter Gel-Elektrophorese-Standard (5)

Coomassie-Blau R 250 (32)

Corbit-Balsam (13)

Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat (25)

Deckgläser (24)

DAB (3,3’-Diaminobenzidin) (33)

Dialyseschlauch (34)

EDC (1-Ethyl-3-(3.Dimethylaminopropyl)-Carbodiimide) (33)

Einmalkanüle Microlance 3 (3)

Einmalspritzen 10 ml (6)

Eisessig (25)

Ethanol (29)

Freundsches Adjuvans, komplett und inkomplett (33)

Gelatine (25)

L-Glutamin-Lösung 200mM (33)

Glycerin (25)

Glycin (30)

Mayers saures Hämalaun (33)

Natrium-Hepes (Na-N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethan Sulfonsäure) (32)

Immobilon™-PVDF-Transfermembranen für Protein-(Western-) Blotting (26)

Isopropanol (25)

Kaliumdihydrophosphat (25)

KLH (Keyhole Limpets (Megathura crenulata) Hemocyanin) (33)

physiologische Kochsalzlösung (6)

Küvetten (12)

LMW (low molecular weight)-Calibration Kit für Elektrophorese (28)

Luer-Lock-Spritzen (15)

Magnesiumchlorid-Hexahydrat (25)

β-Mercaptoethanol (33)

Methanol (29)

MicroWell-Immuno-Module, Polysorb F-16 mit mittelaffiner Proteinbindungskapazität und Maxisorb F-20 mit hochaffiner Proteinbindungskapazität (27)

Mikroklingen 45° Beaver^{R} (3)

Mikropipetten SMI Capillaries-D (1)

Milchpulver (23)

Mineralöl (33)

Natriumacetat (25)

Natriumchlorid (30)

di-Natriumhydrophosphat (25)

Nutrient Mixture F-10 HAM (33)

Objektträger (24)

OPD (o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid) (33)

Ovalbumin (33)

Paraffin (36)

Pasteur-Kapillarpipetten (37)

Penicillin/Streptomycin-Lösung (11)

Petrischalen 60x15mm, 100x20mm (4)

Poly-L-Lysin-Lösung (33)

Ponceau S (33)

PVP (Polyvinylpyrolidon) (33)

Pyonin Y (33)

Rasierklingenhalter (9)

Reagenzglas Falcon[R] 2095 (4)

Reaktionsgefäße 1,5ml (10)

Rinderserumalbumin Fraktion V (33)

Bard-Parker[R] Einmalskalpell (3)

Salzsäure (25)

SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat) (33)

Temed (N,N,N',N'-Tetramethylendiamin) (5)

Tris/HCl (Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid) (25)

Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat) (33)

Wasserstoffperoxid (25)

Xylol (25)

Zählkammer nach Neubauer (19)

Zitronensäuremonohydrat (25)

2.1.3 Eingesetzte Antikörper

Anti-Kaninchen-Immunglobuline vom Schwein (8)

Avidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (5)

Meerrettich-Peroxidase-markierte Anti-Kaninchen-Gesamtimmunglobuline (2)

Peroxidase-Anti-Peroxidase-Immunkomplex vom Kaninchen (8)

2.1.4 Medien und Pufferlösungen

Chromalaun-Gelatine:

1g Gelatine

0,1g Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat

260ml Aqua dest.

Coomassie-Blau-Färbelösung:

0,25% w/v Coomassie-Blau

10% v/v Eisessig

45% v/v Methanol

45% v/v Aqua dest.

Entfärbelösung für Coomassie-Blau:

10% v/v Eisessig

45% v/v Methanol

45% v/v Aqua dest.

Fixierer für Silberfärbung:

10% v/v Eisessig

50% v/v Methanol

40% v/v Aqua dest.

HAM’s F-10 Kulturmedium:

1l Nutrient Mixture F-10 HAM

5ml L-Glutamin-Lösung 200mM

1% v/v Penicillin/Streptomycin-Lösung

0,3% w/v Rinderserumalbumin Fraktion V

pH 7,4

Hyperosmolare Salzlösung:

1,5M Magnesiumchlorid-Hexahydrat

0,1% w/v PVP

40mM Natrium-Hepes

pH 7,4

Laufpuffer:

190mM Glycin

0,1% w/v SDS

25mM Tris/HCl

pH 8,3

Methacarn-Fixierlösung:

60% v/v Methanol

30% v/v Chloroform

10% v/v Eisessig

Natriumacetatpuffer:

50mM Natriumacetat

pH 6,0, eingestellt mit Eisessig

PBS (Phosphate-buffered saline):

120mM Natriumchlorid

4mM Kaliumdihydrophosphat

10mM di-Natriumhydrophosphat

pH 7,4

Probenpuffer:

1% w/v SDS

1,3M Glycerin

5% v/v β-Mercaptoethanol

0,01% w/v Pyonin Y

50mM Tris/HCl

pH 6,8

Sammelgel (6%ig):

1,33ml 30% w/v Acrylamid

3,33ml Sammelgelpuffer

1,92ml Aqua dest.

17µl Temed

50µl 10% w/v Ammoniumpersulfat

Sammelgelpuffer:

0,2% w/v SDS

250mM Tris/HCl

pH 6,8

Substratpuffer:

0,2M di-Natriumhydrophosphat

0,1M Zitronensäuremonohydrat

pH 5,0

TPBS (Phosphate-buffered saline mit Tween):

0,05% v/v Tween 20 in PBS

pH 7,4

Trenngel (10%ig):

4,2ml 30% w/v Acrylamid

6,2ml Trenngelpuffer

2,0ml Aqua dest.

17µl Temed

50µl 10% w/v Ammoniumpersulfat

Trenngelpuffer:

0,2% w/v SDS

750mM Tris/HCl

pH 8,8

Western-Blot-Puffer:

250mM Glycerin

0,01% w/v SDS

20% v/v Methanol

40mM Tris/HCl

2.1.5 Geräte

Aldo-Xer-Geltrockner (31)

Axioskop mit Fotoeinheit MC 80 (38)

Begasungsbrutschrank (14)

Digital-pH-Meter 761 Calimatic (20)

Gel-Elektrophoresekammer Mini-Protean II™ (5)

IKAMAG^R RET-Magnetrührer (16)

IKA^R-Schüttler MTS 4 (16)

Inverses Mikroskop Axiovert 100 mit elektrischer Mikromanipulationseinheit (38)

Lyovac GT 2 (22)

Mikrotom 1212 nach Minot (21)

Minifuge RF, Rotor BS4402/A (14)

Mini-Trans-Blot™-Kammer (5)

Multiscan MCC Elisa-Reader^R (35)

Power Supply 1000/500™ (5)

Stereomikroskop Wild-Heerbrugg (21)

Trockenschrank (17)

2.1.6 Versuchstiere

Als Versuchstiere zur Herstellung von Antiseren dienten sechs Monate alte, weibliche weiße Neuseeländer-Kaninchen (7).

2.1.7 Ausgewählte Peptide

Mit Hilfe des Computerprogramms Predict wurden die Aminosäuresequenzen der ZP2-Proteine von Mensch und Maus [115, 116] auf ihre mögliche Immunogenität hin untersucht [105] und zwei Bereiche mit rechnerisch hoher immunogener Potenz ausgewählt (Abb. 6). Es waren dies zum einen ein Sequenzabschnitt, der identisch in Mensch- und Maus-ZP2 vorkommt und als homolog bezeichnet werden kann, und zum anderen eine humane Aminosäuresequenz, die von der murinen stark abweicht.
Anhand dieser Sequenzen wurden in Kooperation mit Dr. Krause, Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Marburg,

Peptid 20 mit der in Mensch und Maus **homologen** Aminosäuresequenz

Asp-Pro-Asn-Ile-Lys-Leu-Val-Leu-Asp-Asp-Cys-Trp-Ala-Thr-Ser

(Nummern 535-549 der humanen Aminosäurenreste [115, 116])

und Peptid 26 mit der **humanspezifischen** Sequenz

Ser-Tyr-Pro-Asp-Asn-Ser-Tyr-Gln-Gln-Pro-Tyr-Gly-Glu

(in der menschlichen Aminosäurensequenz Nummern 499-511 [115, 116])

nach der Merrifield-Methode [10] synthetisiert.

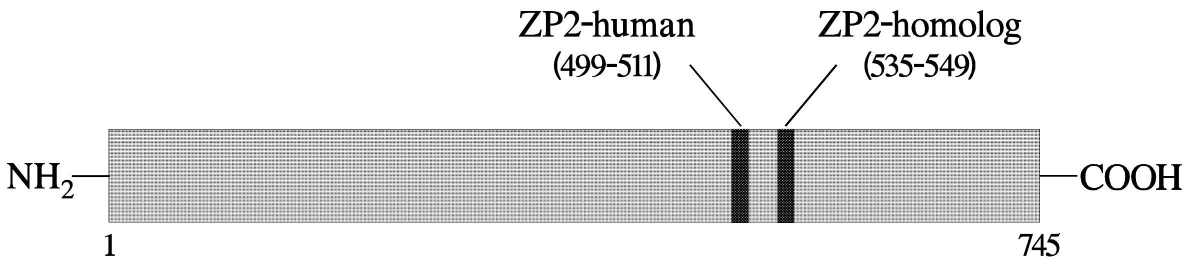


Abb. 6: Skizze der Aminosäuresequenz des menschlichen ZP2-Glykoproteins mit Angabe der ausgewählten homologen und humanspezifischen Bereiche. In Klammern angegeben sind die Nummern der Aminosäurereste innerhalb des Proteins [115, 116].

2.2 Methoden

2.2.1 Immunisierung und Gewinnung von Antiseren

Je 5mg der synthetisierten Peptide wurden in 0,5ml Aqua dest. aufgenommen. Danach wurden je 10mg KLH in 1,5ml Aqua dest. und 5mg EDC in 0,5ml Aqua dest. langsam dazugegeben und auf einem Magnetrührer 1h vermischt. Anschließend wurden weitere 5mg EDC in 0,5ml Aqua dest. hinzugefügt, und die Lösung bei Raumtemperatur über Nacht stehen gelassen. Um freies, ungekoppeltes EDC aus der konjugierten Antigenlösung zu entfernen, wurde abschließend die Reaktionslösung in einen semipermeablen Dialyseschlauch der Firma Spectrum Medical gefüllt und dreimal für je 5h bei 4°C gegen 5l Aqua dest. dialysiert.

Zur Immunisierung der Kaninchen wurde das Peptid-KLH-Konjugat mit komplettem Freundschem Adjuvans im Verhätnis von 1:2 (v/v) emulgiert. Die stabile Wasser-in-Öl-Emulsion wurde durch wechselseitiges Aufziehen in zwei miteinander verbundenen Luer-Lock-Spritzen hergestellt. Pro Kaninchen wurde 1mg Antigenkonjugat paravertebral intrakutan appliziert.

Die Auffrischungen wurden mit einer Emulsion aus Peptid-KLH-Konjugat und inkomplettem Freundschem Adjuvans durchgeführt. Dabei erfolgte die erste Auffrischung 4 Wochen nach Immunisierung und alle weiteren Auffrischungen in 4-Wochen-Abständen mit je 1mg Antigen-KLH-Komplex pro Tier.

Zur Kontrolle des Antikörpergehaltes im Blutserum wurde vor der Immunisierung und je 2 Wochen nach einer Immunisierung durch Punktion der Ohrrandvene Blut gewonnen. Weitere Auffrischungen erfolgten abhängig vom Titeranstieg und Titerverlauf. Das Blut wurde 4h bei Raumtemperatur stehengelassen und der Überstand anschließend bei 10000facher Erdanziehungskraft für 7min zentrifugiert. Das Serum wurde mit Hilfe des Enzyme-linked immunoabsorbent assays (ELISA) auf Gehalt an Anti-Peptid-Antikörpern hin untersucht und der Antikörpertiterverlauf ermittelt. Die Lagerung der gewonnenen Antiseren erfolgte bei -20°C.

2.2.2 Gewinnung von Eizellen aus Rinder- und Schweineovarien

Die Eierstöcke wurden geschlechtsreifen Tieren kurz nach der Schlachtung im Schlachthof Gießen entnommen und in physiologischer Kochsalzlösung bei 4°C transportiert. Die Aufbereitung der Eizellen erfolgte ca. 90min nach Schlachtung der Tiere. Nach Punktion von 4-7mm großen Ovarfollikeln und gründlichem Spülen mit physiologischer Kochsalzlösung wurde der Follikelinhalt unter einem Stereomikroskop bei Raumtemperatur untersucht. Die gewonnenen Eizellen wurden in PBS umgesetzt und mit einer ausgezogenen Mikropipette durch mehrmaliges Aufziehen und Ausspülen mechanisch von umgebenden Kumuluszellen befreit. Der Durchmesser der Mikropipette war dabei um die Hälfte größer als der einer Eizelle. Die freipräparierten

Eizellen wurden dann entweder direkt in einem Versuch eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung in hyperosmolarer Salzlösung bei 4°C gelagert.

2.2.3 Gewinnung von humanen Eizellen

Menschliche Post mortem-Ovarien wurden von Prof. S. Oehninger, The Jones Institute for Reproductive Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Eastern Virginia Medical School Norfolk, Virginia, USA, zur Verfügung gestellt.
Das ovarielle Gewebe wurde in HAM's F-10 Kulturmedium gelegt und in ca. 5mm große Stücke zerkleinert. Nach 24h in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C und mit 5% CO_2 wurde das Gewebe unter einem Stereomikroskop untersucht und enthaltene Eizellen separiert. Diese wurden abschließend durch Aufziehen und Ausspülen in einer Mikropipette, die im Durchmesser um die Hälfte größer war als eine Oozyte, von den umgebenden Kumuluszellen mechanisch befreit. Die gewonnenen Eizellen wurden bei 4°C in einer hyperosmolaren Salzlösung gelagert [106], wodurch die Oozyten ihre Befruchtungsfähigkeit verloren und somit in späteren Versuchen eine Befruchtung ausgeschlossen war.
Außerdem wurden von Prof. S. Oehninger überzählige, unbefruchtete Eizellen aus dem In vitro-Fertilisationsprogramm zur Verfügung gestellt, die sonst verworfen worden wären. Sie wurden in hyperosmolare Salzlösung transferiert und bei 4°C aufbewahrt. Das Einverständnis der Patientinnen lag vor; den ethischen und juristischen deutschen und US-amerikanischen Vorgaben wurde folgegeleistet.

2.2.4 Isolierung der Zona pellucida

Durch mehrmaliges Aufziehen und Ausspülen der Eizelle in einer Mikropipette, deren Durchmesser kleiner war als der einer Eizelle, wurde die Zona pellucida mechanisch eröffnet. Durch den aufgetretenen Defekt wurde das Ooplasma und der Kern der

Eizelle ausgewaschen. Die Zona pellucida wurde in PBS gespült, lyophilisiert und bis zum Einsatz in einem Immuno-Blot bei -80°C aufbewahrt.

2.2.5 Herstellung von Zona pellucida-Hälften (Hemizonae)

Eine Eizelle wurde mit Hilfe eines inversen Mikroskops mit elektrischer Mikromanipulationseinheit exakt halbiert. Durch mehrmaliges Spülen mit einer Mikropipette in HAM's F-10 Kulturmedium wurden die zwei Zona pellucida-Hälften von Ooplasma und Eizellkernresten getrennt. Die so gewonnenen Hemizonae wurden direkt in Bindungsversuchen eingesetzt oder in hyperosmolarer Salzlösung bei 4°C gelagert.

2.2.6 Ovariengewinnung von Maus, Ratte und Meerschweinchen

Die Ovarien 6 Wochen alter Mäuse wurden zur Herstellung von Paraffinschnitten entnommen und in physiologischer Kochsalzlösung kurzzeitig bei 4°C gelagert. Die Eierstöcke von Ratten und Meerschweinchen wurden vom Hygiene-Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung gestellt.

2.2.7 Herstellung von Paraffinschnitten aus Ovarien

Die Ovarien der verschiedenen Spezies wurden in einer Methacarn-Fixierlösung [158] 24h lang fixiert und danach in 96% Ethanol und Isopropanol für je 4h dehydriert. Anschließend wurden sie 12h lang in Xylol entfettet und in flüssiges Paraffin bei 60°C für 8h eingebettet. Nach abschließendem Aushärten des Gewebes für 12h bei 4°C wurden mit einem Mikrotom nach Minot Paraffinschnitte mit einer Schnittdicke von 4-6µm angefertigt und auf einen mit Chromalaun-Gelatine beschichteten Objektträger getrocknet.

2.2.8 Charakterisierung der Anti-ZP2-Antiseren

2.2.8.1 Titrierung und Titerbestimmung im Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA)

Um die Produktion spezifischer Antikörper im Serum nachzuweisen, wurde das ELISA-Testsystem (Abb. 7) angewandt. Die synthetischen Peptide wurden in Aqua dest. gelöst und je 1,5µg Peptid in ein Loch eines MicroWell-Immuno-Moduls mit mittelaffiner bzw. hochaffiner Proteinbindungskapazität pipettiert. Nach 24h in einem Trockenschrank bei 37°C wurden die Module je zweimal für 5min mit TPBS und einmalig mit PBS gewaschen und kräftig ausgeschlagen.

Die MicroWell-Immuno-Module mit mittelaffiner bzw. hochaffiner Proteinbindungskapazität wurden mit 1% (w/v) Rinderserumalbumin-PBS für 1h präinkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Mit dem zu testenden Anti-ZP2-Antiserum wurde eine absteigende Verdünnungsreihe mit 1% (w/v) Rinderserumalbumin-PBS vorbereitet und jeweils 100µl in eine Vertiefung gegeben. Nach 1h auf einem Schüttler bei Raumtemperatur folgten wieder 3 Waschschritte.

Als Zweitantikörper wurden mit Meerrettich-Peroxidase markierte Anti-Kaninchen-Gesamtimmunglobuline der Firma Amersham in einer Verdünnung von 1:3000 in 1% (w/v) Rinderserumalbumin-PBS eingesetzt. Je 100µl Antikörperverdünnung pro Vertiefung wurden für 1h zur Inkubation auf einem Schüttler belassen und erneut ausgewaschen. Abschließend wurden 100µl Reaktionssubstrat (0,5mg/ml OPD gelöst in Substratpuffer mit 0,03% (v/v) Wasserstoffperoxid) pro Vertiefung einpipettiert. OPD ist ein Chromogen, das von dem Enzym Peroxidase in eine wasserlösliche, bräunliche Substanz umgewandelt wird. Die Farbreaktion wurde nach 20min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur mit 50µl 3M Salzsäure abgestoppt. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 492nm mit einem Multiscan MCC ELISA-Reader^{R} bestimmt.

Der Antikörpertiter wurde definiert durch den Extinktionswert des Antiserums, der bei größtmöglicher Verdünnung über dem doppelten Maximalwert des entsprechenden Präimmunserums lag.

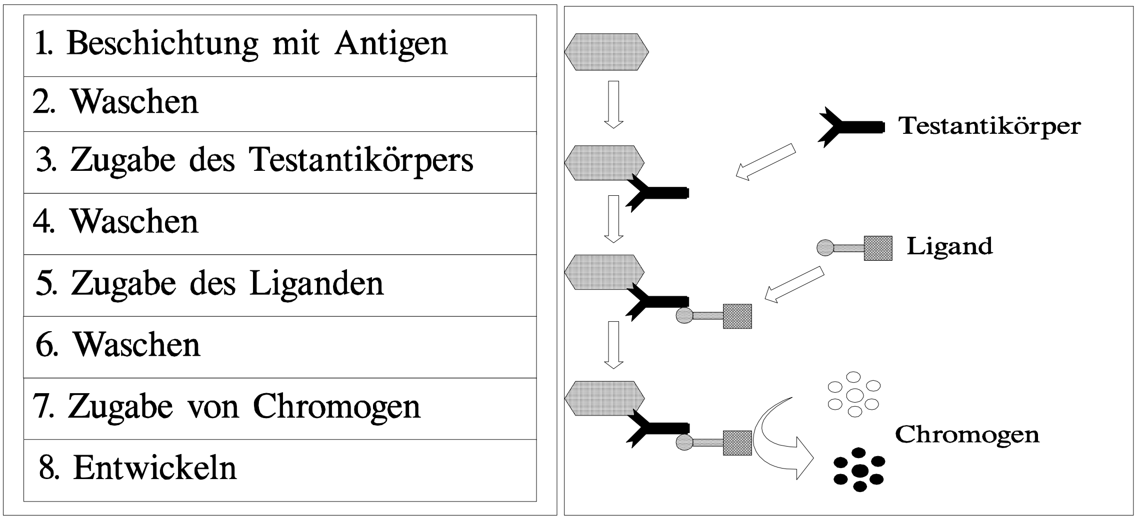


Abb. 7: Der ELISA-Test (Enzyme-linked immunoabsorbent assay). Nach [157].

2.2.8.2 Immunhistochemie auf Paraffinschnitten

Die auf Objektträgern fixierten Paraffinschnitte aus Ovarien verschiedener Spezies wurden mit Xylol entparaffiniert. Anschließend wurden sie schonend gewässert, indem die Objektträger durch eine absteigende Alkoholreihe geführt wurden. Nach 5minütigem Waschen in PBS wurden die Ovarschnitte mit einer 3% (v/v) Wasserstoffperoxid-Lösung für 15min überschichtet, um die endogenen Peroxidasen in den Geweben zu inaktivieren. Nach einem erneuten Waschschritt in PBS wurden die Schnitte 30min lang mit einer 1% (w/v) Milchpulver-PBS-Lösung präinkubiert. Dadurch sollten unspezifische Antikörperbindungen an Proteine verhindert werden.
Anschließend wurden die Anti-ZP2-Antiseren bzw. das Präimmunserum in einer Verdünnung von 1:50 mit 1% (w/v) Rinderserumalbumin-PBS auf die Ovarschnitte pipettiert. Die folgende, einstündige Inkubation wurde bei Raumtemperatur in einer

feuchten Kammer durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen der Schnitte mit PBS für je 5min wurde der Zweitantikörper aufgetragen. Es handelte sich hierbei um Anti-Kaninchen-Immunglobuline vom Schwein der Firma Dako in einer Verdünnung von 1:100 in PBS mit 1% (w/v) Rinderserumalbumin. Nach 30min wurde der Zweitantikörper entfernt, die Gewebeschnitte gewaschen und mit einem Peroxidase-Anti-Peroxidase-Immunkomplex, 1:100 verdünnt, für 30min inkubiert.

Nach erneuten Waschschritten wurden die Objektträger für 20min in eine Küvette mit Substratlösung (200mg/l DAB in Natriumacetat-Puffer mit 0,03% (v/v) Wasserstoffperoxid) gestellt. DAB ist ein Chromogen und wird von dem Enzym Peroxidase in ein wasserunlösliches, bräunlich sichtbares Farbprodukt umgewandelt. Nach intensivem Waschen in PBS und Aqua dest. für je 10min wurden die Gewebeschnitte für 5min mit Mayers saurem Hämalaun überschichtet, um eine Gegenfärbung der Zellkerne zu erzielen. Die Ovarschnitte wurden gründlich mit Leitungswasser gespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und nach Entfettung in Xylol mit Corbit-Balsam eingedeckt. Abschließend wurde die Färbungsintensität der Zona pellucida und des Ooplasmas bewertet.

2.2.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Durch eine diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli [107] wurden zu testende Proteingemische elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurden 10%ige Trenngele sowie 6%ige Sammelgele zur optimalen Auftrennung der Proteine eingesetzt. Zwei Glasscheiben (12x15cm) einer Mini-Protean Gel-Elektrophoresekammer wurden mit Methanol entfettet und die entsprechenden Distanzstäbe mit 0,75mm Dicke eingelegt. Die Platten wurden in einen Ständer mit Gummiboden eingespannt, um den unteren Spalt abzudichten. Nach Einfüllen des Trenngels in den Zwischenraum, den die beiden Glasplatten bildeten, wurde das Gel mit Isopropylalkohol überschichtet, um ein Austrocknen des Gels zu verhindern. Nach 1h war das Trenngel polymerisiert. Der Alkohol wurde abgegossen und der Spalt mit Aqua dest. gespült. Sofort nach Einfüllen des Sammelgels wurde ein

Gelkamm mit 0,75mm Dicke und 10 Geltaschen eingesetzt. Nach 30min Polymerisation wurde der Kamm entfernt, die Platten in eine Elektrophoresekammer eingespannt und mit Laufpuffer überschichtet.
Jeweils 20 isolierte Zonae pellucidae und 20 Eizellen mit Zonae pellucidae vom Rind wurden lyophylisiert, in 22µl Probenpuffer aufgenommen und für 4min gekocht. Die Proben wurden in die Geltaschen gefüllt. Die Farbfront wurde von dem roten Farbstoff Pyonin Y gebildet, der in dem Probenpuffer enthalten war. Als Molekulargewichtsmarker wurden ein biotinylierter Gel-Elektrophorese-Standard der Firma Bio-Rad mit 200kD, 116kD, 97kD, 66kD, 45kD, 31kD und 24kD sowie ein LMW (low molecular weight)-Calibration Kit für Elektrophorese der Firma Pharmacia mit 94kD, 67kD, 43kD, 30kD, 20kD und 14kD eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100V pro Gel durchgeführt. Nach 45min wurde das Gel entnommen und die aufgetrennten Proteingemische auf eine Immobilon™-Membran elektrotransferiert.

2.2.8.4 Immuno-Blot

Zur immunbiochemischen Detektion von in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinen wurde ein Immuno-Blot mit Peroxidase-Anti-Peroxidase-Immunkomplex und dem Chromogen DAB als Nachweismethode durchgeführt.

2.2.8.4.1 Western-Blot

Die in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihren Molekularmassen aufgetrennten Proteine wurden durch das Western-Blot-Verfahren auf Immobilon™-PVDF-Membranen der Firma Millipore elektrotransferiert [185]. Das im Western-Blot-Puffer befindliche Gel wurde blasenfrei auf die nach den Herstellerangaben entsprechend vorbereitete Immobilon™-PVDF-Membran gelegt, mit zwei feuchten

Filterpappen und Kunststoffscheiben umgeben und in einer Halterung in die Western-Blot-Kammer eingehängt. Der Elektrotransfer wurde 70min lang bei einer konstanten Spannung von 35V pro Gel durchgeführt. Anschließend wurden die Immobilon™-Membranen entnommen, 10min in Filterpapier getrocknet und über 10min mit einer 2%igen Ponceau S-Lösung gefärbt. Ein Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Immobilon™-Membran konnte nach Auswaschen des überschüssigen Farbstoffes mit Aqua dest. durch die Rotfärbung der Proteinbanden auf der Immobilon™-Membran nachgewiesen werden. Zur Kontrolle, ob die aufgetrennten Proteine vollständig elektrotransferiert wurden, wurde mit dem Gel eine Coomassie-Blau-Färbung durchgeführt. Dazu wurden die Gele für 30min in eine 0,25%ige Coomassie-Blau-Färbelösung gelegt. Nach anschließender 16stündiger Entfärbung mit Entfärbelösung waren keine oder nur sehr geringgradig blau gefärbte Proteinbanden zu erkennen, was für einen nahezu kompletten Transfer der Proteine sprach. Die Immobilon™-Membranen wurden anschließend zur immunbiochemischen Identifizierung der Proteine eingesetzt oder bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.2.8.4.2 Immunbiochemische Identifizierung von Proteinen

Die Immobilon™-Membranen mit den aufgetrennten Proteinen wurden für 30min in Methacarn-Fixierlösung fixiert, 5min mit Aqua dest. gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur in 0,2% (v/v) Tween 20/PBS gelegt.

Nach 2h wurden die Immobilon™-Membranen für 1h mit den zu testenden Anti-ZP2-Antiseren inkubiert, die zuvor mit 0,2% (v/v) Tween 20 in PBS 1:50 bzw. 1:100 verdünnt wurden. Danach wurden die Immobilon™-Membranen dreimal für 10min in dem beschriebenen TPBS-Puffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Als Zweitantikörper wurden Anti-Kaninchen-Immunglobuline vom Schwein der Firma Dako eingesetzt, die 1:1000 in PBS mit 0,2% (v/v) Tween 20 verdünnt waren und für 30min auf den Immobilon™-Membranen belassen wurden. Nach erneuten, wie oben beschriebenen Waschschritten wurden die Immobilon™-Membranen mit dem Peroxidase-Anti-Peroxidase-Immunkomplex von Dako in einer Verdünnung von 1:1000 in 0,2% (v/v) Tween 20/PBS für 30min inkubiert und anschließend wieder dreimal in 0,2% (v/v) Tween 20/PBS gewaschen.

Die Immobilon™-Membranstreifen mit den elektrotransferierten Proteinstandards wurden statt einem Erstantikörper, dem Zweitantikörper und dem Peroxidase-Anti-Peroxidase-Immunkomplex einem Avidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat der Firma Bio-Rad in einer Verdünnung von 1:3000 für 75min ausgesetzt und entsprechend dreimal je 10min gewaschen.

Als Substratlösung diente 200mg/l DAB in Natriumacetat-Puffer mit 0,03% (v/v) Wasserstoffperoxid, die nach 20minütiger Inkubation der Immobilon™-Membranen die spezifisch mit Anti-ZP2-Antikörpern detektierten Proteinbanden braun sichtbar machte. Abschließend wurden die Immobilon™-Membranen 10min in Aqua dest. gewaschen und archiviert.

2.2.8.5 Hemizona-Antikörper-Bindungstest

Die Hemizonae wurden durch je 15maliges Aufziehen und Ausspülen mit einer Mikropipette in HAM’s F-10 Kulturmedium gewaschen. Anschließend wurden sie auf einem mit Poly-L-Lysin-Lösung beschichteten Objektträger so angetrocknet, daß die Schnittfläche der Hemizonae unten zu liegen kamen. Die Rehydrierung erfolgte mit PBS für 20min bei Raumtemperatur, ebenso die sich anschließenden Schritte. In einer feuchten Kammer wurden dann die halbierten Zonae pellucidae mit einer 3%igen (w/v) Rinderserumalbumin-PBS-Lösung für 2h präinkubiert. Nach Entfernen dieser Lösung wurden 30µl des zu testenden Antiserums auf eine Zona pellucida-Hälfte gegeben, wobei die korrespondierende Hemizona mit der gleichen Menge des Präimmunserums inkubiert wurde. Die Anti-ZP2-Antiseren wurden dazu mit 1%iger (w/v) Rinderserumalbumin-PBS 1:25 bzw. 1:100 verdünnt und für 1h bei Raumtemperatur auf der Hemizona belassen. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5min in PBS wurden 30µl des Zweitantikörpers auf jede Zona pellucida-Hälfte pipettiert. Dabei handelte es sich um Anti-Kaninchen-Immunglobuline vom Schwein der Firma Dako in einer Verdünnung von 1:100 mit 1%iger (w/v) Rinderserumalbumin-PBS. Nach 30min wurden die Objektträger dreimal mit PBS für je 5min gewaschen. Anschließend wurden 30µl einer Peroxidase-Anti-Peroxidase-Immunkomplex-Lösung, 1:100 mit 1%iger (w/v) Rinderserumalbumin-PBS verdünnt, auf jede Hemizona gegeben und für 30min inkubiert. Nach erneuten Waschschritten wurden die Objektträger für 20min in eine Glasküvette mit Reaktionssubstrat (200mg/l DAB in Natriumacetat-Puffer mit 0,03% (v/v) Wasserstoffperoxid) gestellt. Daraufhin wurden die Hemizonae gründlich mit PBS und Aqua dest. gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe schonend entwässert und nach Entfetten in Xylol mit Corbit-Balsam eingedeckt. Abschließend wurde mit Hilfe eines Axioskops der Firma Zeiss die Braunfärbung der Zona pellucida-Hälften beurteilt, die als Nachweis spezifischer Antikörper nach stattgefundener DAB-Peroxidase-Reaktion fungierte.

Durch zwei unabhängige Untersucher wurde ohne Kenntnis der Zugehörigkeit zur Test- oder Kontroll-Gruppe die Färbungsintensität in einer Skala von 0 bis 10 bewertet. Innerhalb der verbundenen Versuchsanordnung erfolgte die statistische Auswertung mit einem Zwei-Stichproben-t-Test unter Zuhilfenahme des Software-Programmes GraphPad InStat tm. Da die Kontroll-Gruppe keine spezifische Anfärbung zeigte und somit als Ausgangswert diente, konnte eine einseitige Analyse gewählt werden. Die Nullhypothese (H_0) ging davon aus, daß es zu keiner Veränderung der Färbungsintensität der Hemizonae durch die Inkubation mit Anti-ZP2-Antikörpern kommt. Ergab die statistische Analyse für H_0 eine Wahrscheinlichkeit $P<0,05$, so wurde die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese (H_1) angenommen. Die vermehrte Anfärbung der Hemizonae in der Test-Gruppe wurde als statistisch signifikant gewertet.

In Abb. 8 ist der Ablauf des Hemizona-Antikörper-Bindungstest durch ein Flußdiagramm zusammengefaßt schematisch dargestellt.

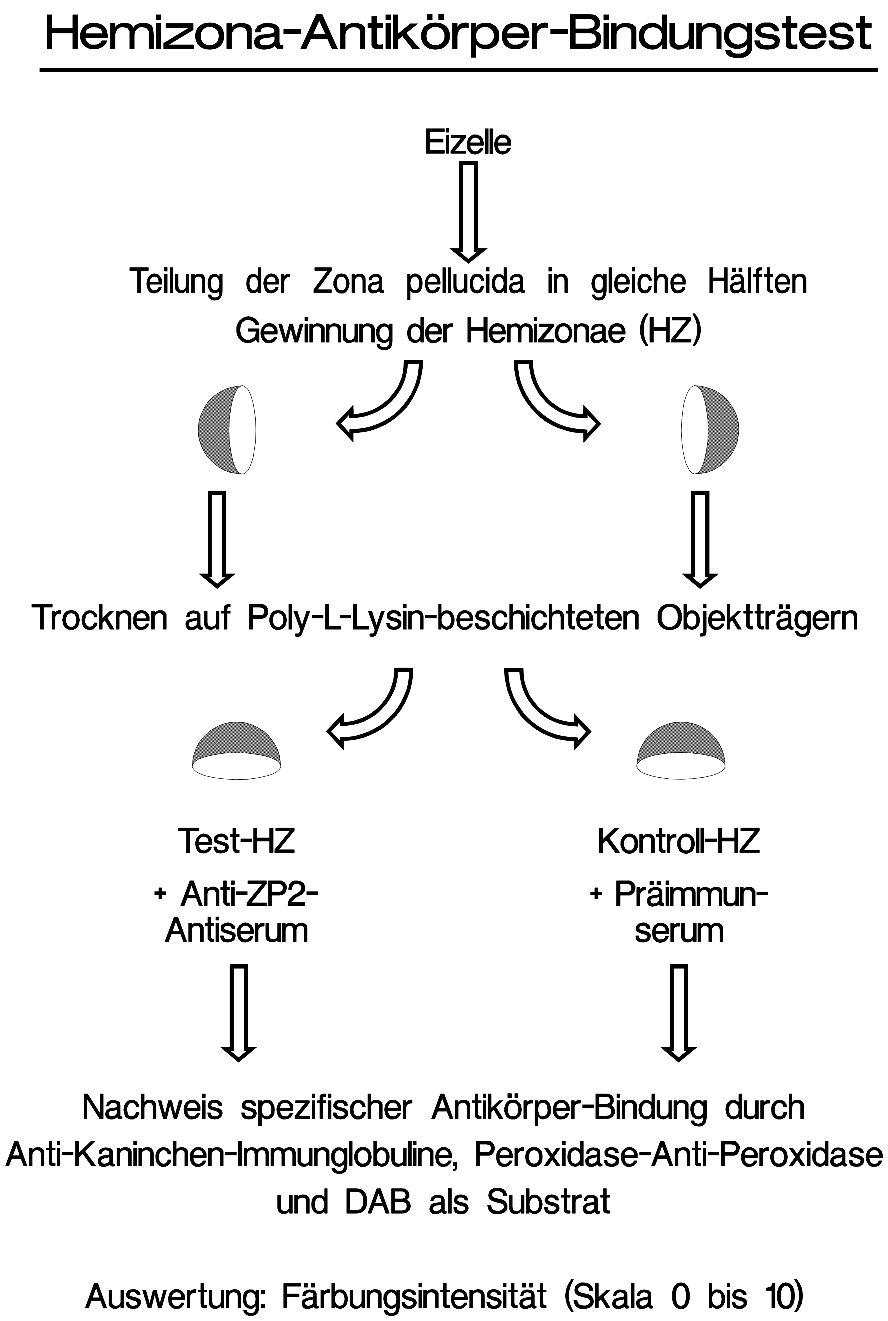


Abb. 8: Schematische Darstellung des Hemizona-Antikörper-Bindungstests.

2.2.9 Funktionelle Spermatozoenbindungstudien mit dem Kompetitions-Hemizona-Assay

Beim Kompetitions-Hemizona-Assay handelt es sich um eine modifizierte Form des Hemizona-Assays. Letzterer wurde von Burkman et al. [31] für das menschliche System entwickelt und ermöglicht es, das Bindungsverhalten von Spermatozoen eines Patienten mit dem von Spermatozoen eines gesichert fertilen Spenders zu vergleichen. Dabei wird eine Hemizona mit dem Patientenejakulat inkubiert, während die korrespondierende Hälfte dem Ejakulat des fertilen Spenders ausgesetzt wird. Abschließend werden die gebundenen Spermatozoen ausgezählt (siehe Abb. 9) und somit geprüft, ob das Bindungsvermögen der Patientenspermatozoen dem der Spender-spermatozoen entspricht.

Beim Kompetitions-Hemizona-Assay werden hingegen beide Hemizonae mit dem identischen Ejakulat eines gesichert fertilen Spenders inkubiert, wobei eine Zona pellucida-Hälfte zuvor mit einem Anti-ZP2-Antiserum behandelt wurde. Das experimentelle Design des humanen Hemizona-Assays wurde in Anlehnung an ein In vitro-Fertilisationsprogramm für Rinder [26] an das bovine System adaptiert.

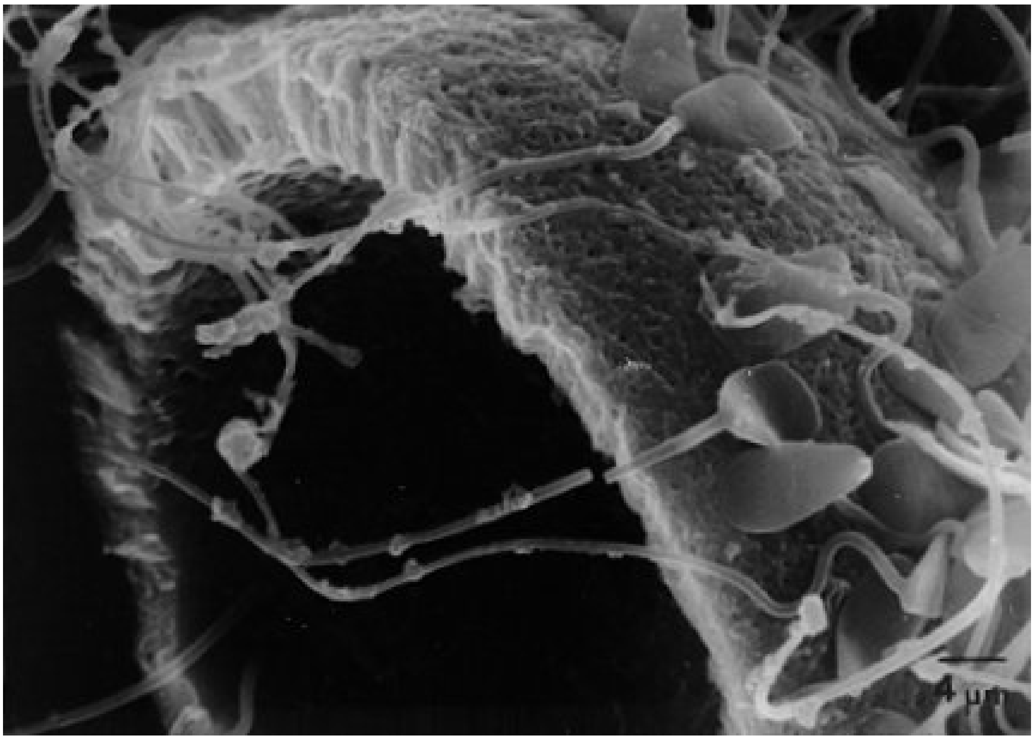


Abb. 9: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer bovinen Hemizona mit an der konvexen Außenseite gebundenen Rinder-Spermatozoen.

2.2.9.1 Vorbereitung der Spermatozoensuspension

Es wurde kryokonserviertes Ejakulat eines Bullen der Zentralbesamungsstation Gießen eingesetzt, das in 200µl Portionen mit jeweils 20 Millionen Spermatozoen in flüssigem Stickstoff gelagert wurde. Pro Versuchsansatz wurden zwei Spermaportionen in einem Wasserbad bei 38,5°C aufgetaut, mit 6ml vorgewärmtem HAM's F-10 Kulturmedium verdünnt und für 5min bei 500facher Erdanziehungskraft zentrifugiert. Das Sediment wurde nochmals mit 6ml Medium verdünnt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Das so gewonnene Sediment wurde mit HAM's F-10 auf 1,5ml aufgefüllt. Die Anzahl der in der Suspension enthaltenen Spermatozoen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurde die Suspension mit Kulturmedium so verdünnt, daß 500000 motile Spermatozoen/ml enthalten waren. Die Spermatozoen-suspension wurde in einem Begasungsbrutschrank bei 38,5°C 3h lang mit 5% CO_2 begast, um die Kapazitation der Spermatozoen zu ermöglichen.

2.2.9.2 Inkubation der Hemizonae

Die Zona pellucida-Hälften wurden mit einer Mikropipette je 15-mal in HAM's F-10 Kulturmedium durch Aufsaugen und Ausspülen gewaschen. Eine Hemizona wurde anschließend mit 100µl Antiserum, das in HAM's F-10 1:30 verdünnt war, in einem Brutschrank bei 38,5°C und mit 5% CO_2-Gehalt inkubiert. Die korrespondierende Hälfte wurde als Kontrolle in einen 100µl Tropfen, der nur Medium oder ein anderes Anti-ZP2-Antiserum in einer 1:30 Verdünnung enthielt, pipettiert und in den Brutschrank gestellt. Um einen Flüssigkeitsverlust durch Verdunstung zu vermeiden, wurden die die Hemizonae enthaltenden Tropfen mit Mineralöl überschichtet. Nach 2h Inkubation wurden beide Hemizonae mit einer Mikropipette entnommen und jeweils 15-mal in HAM's F-10 gewaschen.

2.2.9.3 Coinkubation und Ermittlung des Hemizona-Indexes

Sowohl die mit dem zu testenden Antiserum inkubierte Hemizona als auch die zur Kontrolle unbehandelte bzw. mit einem anderen Antiserum inkubierte korrespondierende Hälfte wurden in je einen Tropfen mit 100µl der vorbereiteten Spermatozoensuspension transferiert und mit Mineralöl bedeckt. Die Coinkubation wurde in einem Begasungsbrutschrank bei 38,5°C und mit 5% CO_2-Gehalt durchgeführt. Nach 4h wurden beide Zona pellucida-Hälften mit einer Mikropipette, deren Durchmesser etwa dem einer Hemizona entsprach, jeweils 15-mal gewaschen. Die beim Aufsaugen und Ausspülen aufgetretenen Scherkräfte waren dabei so groß, daß locker oder nur oberflächlich gebundene Spermatozoen abgespült wurden. Nur sehr fest gebundene Spermatozoen verblieben an der Hemizona und wurden unter einem inversen Mikroskop ausgezählt. Die Ergebnisse wurden ohne Kenntnis der jeweiligen Vorbehandlung der Hemizonae von zwei voneinander unabhängigen Untersuchern ermittelt. Zur Interpretation der Ergebnisse wurde der Hemizona-Index errechnet, der definiert ist als 100-mal dem Quotienten aus der Anzahl der Spermatozoen, die an die mit Antiserum inkubierte Hemizona gebunden haben, und der Zahl der an die korrespondierende Kontroll-Hälfte gebundenen Spermatozoen.

Kommt es zu keiner Beeinflussung des Bindungsverhaltens durch die Anti-ZP2-Antikörper, so liegt der Hemizona-Index bei 100 (Nullhypothese H_0). Da die Auswirkungen der Antikörper-Inkubation nicht vorhersehbar bzw. einschränkbar waren, wurde zur statistischen Analyse der Hemizona-Indices ein zweiseitiger t-Test gewählt und mit dem Computerprogramm GraphPad InStat tm durchgeführt. Lag die Wahrscheinlichkeit für H_0 $P<0{,}05$, so wurde die Nullhypothese verworfen. Stattdessen wurde von einer statistisch signifikanten Beeinflussung der Spermatozoenbindung an die Hemizonae ausgegangen (Alternativhypothese H_1). Ein Hemizona-Index <100 sprach für eine Verminderung, >100 für eine Erhöhung der Spermatozoenbindungskapazität.

Der Ablauf des Kompetitions-Hemizona-Assay ist in Abb. 10 durch ein Flußdiagramm schematisch zusammengefaßt.

Abschließend wurden beide Hemizonae auf einem mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger mit der Schnittfläche nach unten angetrocknet und der Hemizona-Antikörper-Bindungstest (entsprechend 2.2.8.5) durchgeführt.

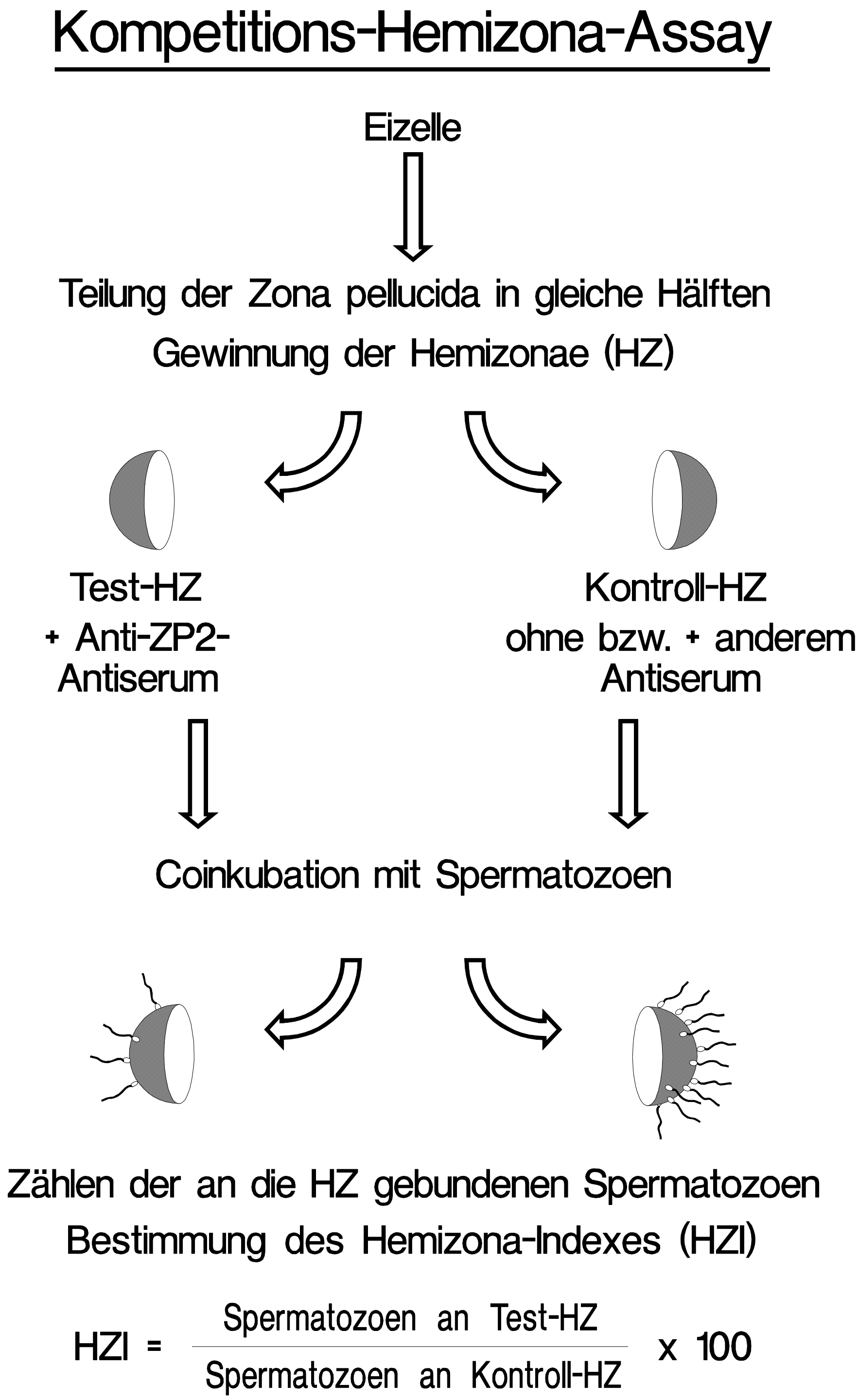


Abb. 10: Schematische Darstellung des Kompetitions-Hemizona-Assays.

3 Ergebnisse

3.1 Eingesetzte, synthetisch hergestellte Peptide

Die cDNA-Sequenz und die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen des ZP2-Proteins verschiedener Spezies sind bekannt [82, 115, 116]. Mit einer Computeranalyse wurden Peptidsequenzen ermittelt, die im menschlichen Modell als potentiell immunogen bewertet wurden. Entsprechend dieser Sequenzen wurden zwei Peptide synthetisch hergestellt. Zum einen weist Peptid 20 eine Aminosäuresequenz auf, die eine sehr große Übereinstimmung innerhalb der unterschiedlichen Spezies besitzt (Tab. I), d.h. einen homologen Bereich darstellt.

Tab. I: Vergleich der humanen ZP2-Aminosäuresequenz (homologes Peptid 20, Aminosäurereste Nr. 535-549) mit entsprechenden ZP2-Aminosäuresequenzen anderer Spezies

Mensch	Asp	Pro	Asn	Ile	Lys	Leu	Val	Leu	Asp	Asp	Cys	Trp	Ala	Thr	Ser
Maus	Asp	Pro	Asn	Ile	Lys	Leu	Val	Leu	Asp	Asp	Cys	Trp	Ala	Thr	Ser
Schwein	Asp	Pro	Asn	Ile	Lys	Leu	Val	Leu	Asp	Asp	Cys	Trp	Ala	Thr	Ser
Katze	Asp	Pro	Asn	Ile	Lys	Leu	Val	Leu	Asp	Asp	Cys	Trp	Ala	Thr	***Pro***
Hund	Asp	Pro	Asn	Ile	Lys	Leu	Val	Leu	Asp	Asp	Cys	Trp	Ala	Thr	***Pro***
Kanin-chen	Asp	Pro	Asn	Ile	Lys	Leu	***Ala***	Leu	Asp	Asp	Cys	Trp	Ala	Thr	Ser

Hervorgehoben sind die von der humanen ZP2-Peptidsequenz abweichenden Aminosäurereste [82, 115, 116].

Zum anderen zeigt Peptid 26 größere Abweichungen in den entsprechenden Aminosäuresequenzresten nichtmenschlicher Spezies (Tab. II) und ist damit als speziesspezifisch definiert. Die eingesetzte ZP2-Peptidsequenz kommt nicht in den in Tab. II aufgeführten Spezies sondern nur im humanen ZP2-Protein vor. Über die ZP2-Aminosäuresequenzen in anderen Spezies, wie z.B. die des bovinen ZP2, war zum Zeitpunkt der Untersuchungen nichts bekannt.

Tab. II: Vergleich der humanen ZP2-Aminosäuresequenz (humanspezifisches Peptid 26, Aminosäurereste Nr. 499-511) mit entsprechenden Aminosäuresequenzen anderer Spezies

Mensch	Ser	Tyr	Pro	Asp	Asn	Ser	Tyr	Gln	Gln	Pro	Tyr	Gly	Glu
Maus	***Thr***	Tyr	Pro	Asp	***Gln***	Ser	Tyr	Gln	***Arg***	Pro	Tyr	***Arg***	***Lys***
Schwein	***Thr***	Tyr	Pro	Asp	Asn	***Ala***	Tyr	***Leu***	Gln	Pro	Tyr	Gly	***Asp***
Katze	***Thr***	Tyr	Pro	Asp	***Lys***	Ser	Tyr	***Leu***	Gln	Pro	Tyr	Gly	Glu
Hund	***Thr***	Tyr	Pro	Asp	***Lys***	Ser	Tyr	***Leu***	***Arg***	Pro	Tyr	Gly	***Asp***
Kanin-chen	***Thr***	Tyr	Pro	Asp	***Glu***	Ser	Tyr	Gln	Gln	Pro	Tyr	***Arg***	***Val***

Hervorgehoben sind die von der humanen ZP2-Peptidsequenz abweichenden Aminosäurereste [82, 115, 116].

Die synthetisch hergestellten Peptide mit homologer bzw. humanspezifischer Aminosäuresequenz wurden jeweils zur Immunisierung weißer Neuseeländer Kaninchen und im ELISA zur Adsorption in MicroWell-Immuno-Modulen mit mittelaffiner und hochaffiner Bindungskapazität verwendet.

3.2 Gewonnene Anti-ZP2-Antiseren

Die Anti-ZP2-Antiseren, die gegen die **homologe** Peptidsequenz mit der hohen Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der verschiedenen Spezies (Peptid 20) gerichtet sind, werden als **AS ZP2-20** und **AS ZP2-21** bezeichnet.

Die gegen das Peptid mit **humanspezifischer** Aminosäuresequenz (Peptid 26) gerichteten Anti-ZP2-Antiseren werden **AS ZP2-26** bzw. **AS ZP2-27** genannt.

3.3 Bestimmung der Anti-ZP2-Antikörpertiter im ELISA

Zwei Wochen nach der ersten Auffrischung wurde der Antikörpergehalt der Antiseren orientierend im ELISA bestimmt. Die Bewertung der Antikörperbindung an das adsorbierte Peptid wurde im Vergleich zu den entsprechenden Präimmunseren als Negativkontrollen durchgeführt.

Die Extinktionswerte der Titrationsreihen gemessen bei einer Wellenlänge von 492nm in Abhängigkeit vom Verdünnungsfaktor sind in Abb. 11 und 12 dargestellt. Die unterschiedliche Immunreaktivität gegenüber den synthetischen Peptiden zwischen Anti-ZP2-Antiseren und den Präimmunseren im ELISA ist deutlich zu erkennen. Die Antigenerkennung der gewonnenen Antiseren ist titrationsabhängig. Bei den Negativkontrollen hingegen liegen keine Abhängigkeiten der Extinktionswerte von den Verdünnungsstufen vor. Die Extinktionswerte der Präimmunseren liegen nur unwesentlich über dem Leerwert.

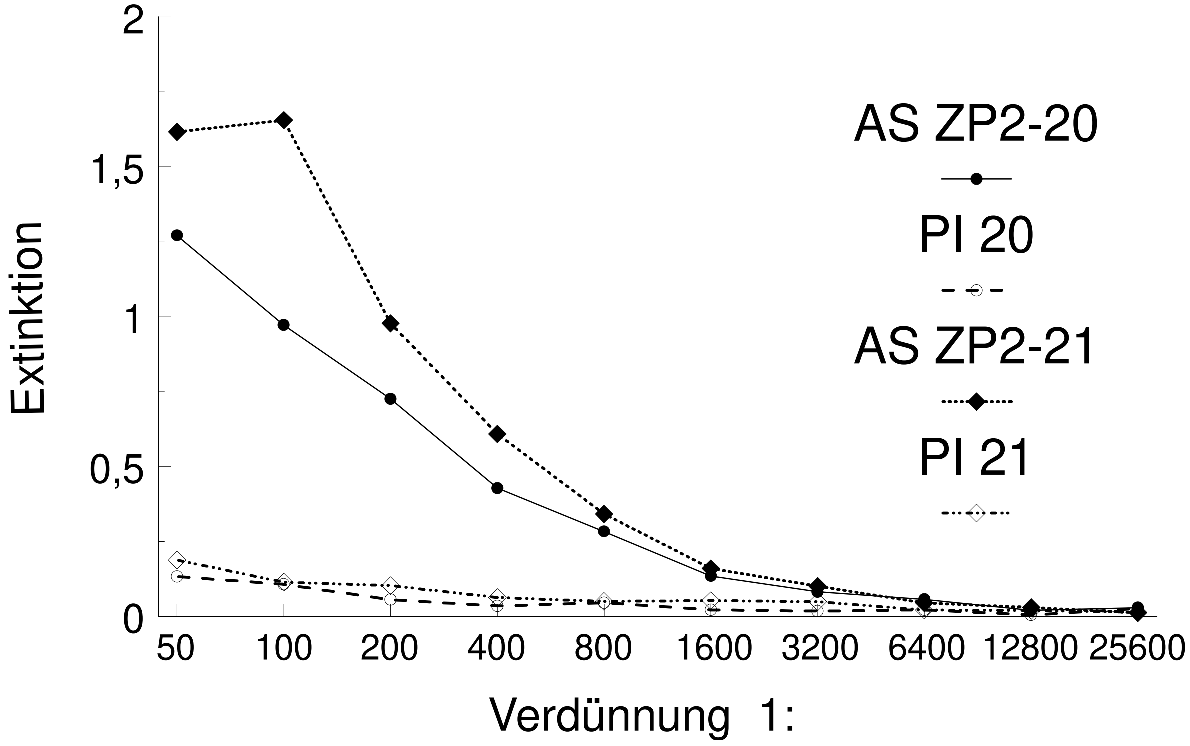


Abb. 11: Abhängigkeit der Extinktionswerte bei 492nm (Ordinate) von den Verdünnungsstufen (Abszisse) der Anti-ZP2-Antiseren AS ZP2-20 und AS ZP2-21 und der entsprechenden Präimmunseren PI 20 bzw. PI 21. Eingesetzt wurden 1,5µg Peptid 20 pro Vertiefung in Immuno-Modulen mit hochaffiner Bindungskapazität.

Bei den Antiseren liegt das Maximum der Immunreaktivität von AS ZP2-26 und AS ZP2-27 mit dem Peptid 26 deutlich höher als das der Antiseren AS ZP2-20 oder AS ZP2-21 mit dem Peptid 20. Aus diesem Grund wurden bei AS ZP2-20 und AS ZP2-21 Immuno-Module mit hochaffiner Peptid-Bindungskapazität eingesetzt. Bei AS ZP2-26 und AS ZP2-27 waren Module mit mittelaffiner Bindungskapazität zur Titerbestimmung ausreichend. Der Abfall der Extinktionskurven bei den Antiseren AS ZP2-20 und AS ZP2-21 verläuft etwas flacher als bei AS ZP2-26 und AS ZP2-27, die Maximalwerte der Extinktionen liegen bei AS ZP2-20 und AS ZP2-21 trotz des Einsatzes hochaffiner Immuno-Module deutlich niedriger. AS ZP2-20 weist bei einer Verdünnung von 1:400 eine Extinktion unter 0,5 auf; AS ZP2-21 erreicht diesen Wert bei einer Verdünnung von 1:800. Die Anti-ZP2-Peptid-Antikörpertiter liegen bei AS ZP2-20 bei 1:800, bei AS ZP2-21 bei 1:400. Im Gegensatz dazu werden Extinktionswerte unter 0,5 bei dem Antiserum AS ZP2-26 erst ab einer Verdünnung von

1:6400, bei AS ZP2-27 ab 1:3200 erreicht. Die Antikörpertiter wird bei AS ZP2-26 mit 1:6400 errechnet, der Titer des Antiserums AS ZP2-27 liegt bei 1:3200.

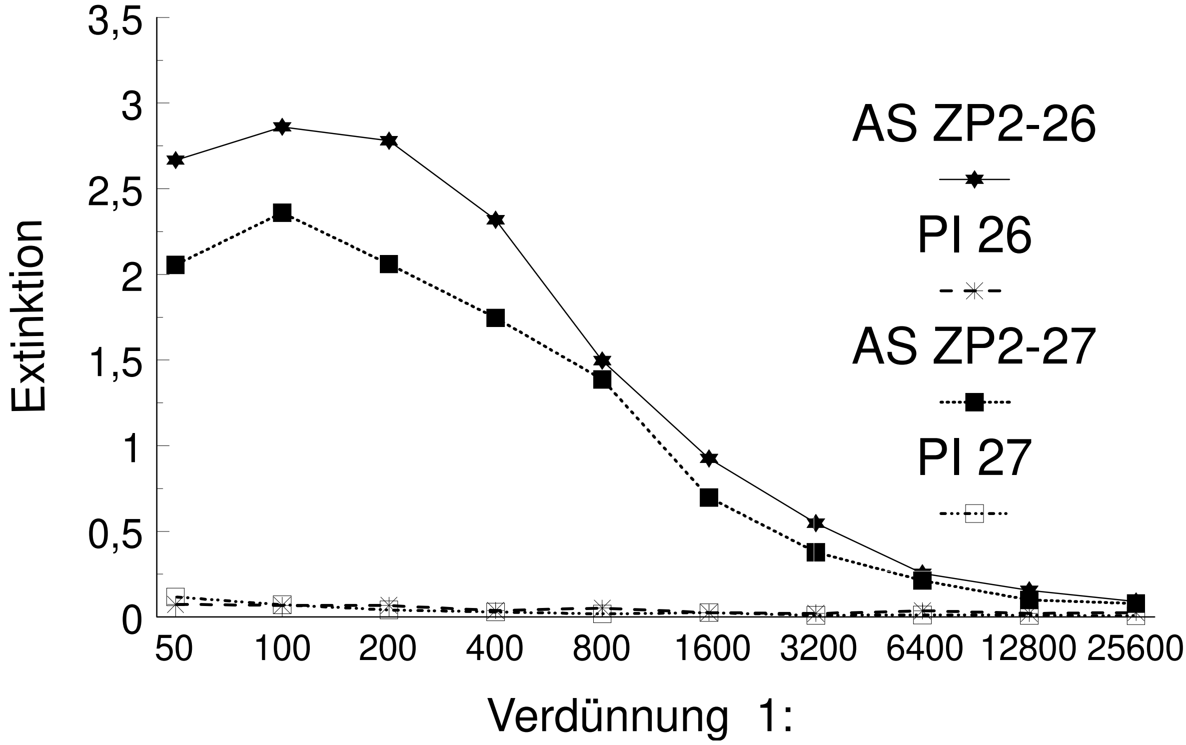


Abb. 12: Abhängigkeit der Extinktionswerte bei 492nm (Ordinate) von den Verdünnungsstufen (Abszisse) der Anti-ZP2-Antiseren AS ZP2-26 und AS ZP2-27 und der entsprechenden Präimmunseren PI 26 bzw. PI 27. Eingesetzt wurden 1,5µg Peptid 26 pro Vertiefung in Immuno-Modulen mit mittelaffiner Bindungskapazität.

Um Kreuzreaktionen auszuschließen, wurden die Anti-ZP2-Antiseren im ELISA mit nicht relevanten synthetischen Peptiden getestet und die Extinktionswerte ermittelt. Alle zu testenden Anti-ZP2-Peptid-Antiseren zeigen ausschließlich eine Bindung an ihr entsprechendes Antigen, Kreuzreaktionen können nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

3.4 Immunhistochemische Identifizierung von ZP2 auf Paraffinschnitten

Zur weiteren Charakterisierung der gewonnenen Anti-ZP2-Antiseren wurden diese auf fixierten Paraffinschnitten aus Ovarien verschiedener Säugerspezies eingesetzt. Dabei wurden Ovargewebeschnitte von Rind, Mensch, Schwein, Maus, Meerschweinchen und Ratte jeweils mit den Antiseren AS ZP2-20 und AS ZP2-21 sowie mit den Antiseren AS ZP2-26 und AS ZP2-27 inkubiert. Als Negativkontrollen dienten Präimmunseren. Alle Seren wurden in einer Verdünnung von 1:50 in PBS mit 1% (w/v) Rinderserumalbumin eingesetzt. Nach Zugabe von Anti-Kaninchen-Immunglobulinen vom Schwein, einem Peroxidase-Anti-Peroxidase-Immunkomplex und DAB als Substrat kam es an den Stellen von Antigen-Antikörper-Reaktionen zu einer ausgeprägten Braunfärbung.

Auf Paraffinschnitten aus Rinderovarien zeigen die eingesetzten Seren folgendes Färbeverhalten:
Das Anti-ZP2-Antiserum AS ZP2-20, das gegen die Aminosäuresequenz mit sehr hoher Übereinstimmung in verschiedenen Säugerspezies gerichtet ist, markiert die Zona pellucida und führt zu einer positiven Anfärbung (Abb. 13A, Nr. 1). Deutlich braun angefärbt sind ebenso Strukturen, die strahlenartig in das umgebende ovarielle Gewebe ziehen (mit ← markiert). Die Inkubation mit AS ZP2-21 führt gleichfalls zu einer positiven Reaktion der Zona pellucida nach Immunperoxidase-Reaktion (nicht gezeigt).
Eine stark positive Reaktion von AS ZP2-26 mit der Zona pellucida ist auf Rinderovarschnitten zu verzeichnen (Abb. 13A, Nr.2), obwohl das Antiserum gegen eine als humanspezifisch definierte Aminosäuresequenz gerichtet ist. Hingegen kommt es nach Einsatz von AS ZP2-27, das gegen das identische humanspezifische Peptid gerichtet ist, aber in einem anderen Kaninchen generiert wurde, zu keiner nachweisbaren Reaktion mit Zonabestandteilen (nicht gezeigt). Das Präimmunserum PI 20 (Abb. 13A, Nr. 3) und das Präimmunserum PI 26 (nicht gezeigt) weisen keine Anfärbung der Zona pellucida auf. Immunreaktionen im Bereich des Ooplasmas oder anderer Strukturen des

Ovars werden mit keinem der eingesetzten Anti-ZP2-Peptid-Antiseren oder Kontrollseren beobachtet.

Auf Paraffinschnitten menschlicher Ovarien stellt sich die Zona pellucida nach Inkubation mit dem Anti-ZP2-Antiserum AS ZP2-20 als stark braun gefärbter Ring dar (Abb. 13A, Nr.4). Wie auch beim bovinen Ovarschnitt werden Ausläufer, die in das umliegende Gewebe ziehen, von AS ZP2-20 markiert (←), jedoch ist die Intensität der Färbung beim Menschen schwächer und die gefärbten Strukturen etwas weniger stark ausgeprägt. Im Gegensatz zu bovinen Oozyten wird das Ooplasma der menschlichen Eizellen homogen bräunlich angefärbt. Die menschliche Zona pellucida zeigt nach dem Einsatz von AS ZP2-21 eine stark positive Reaktion, wobei das Ooplasma ungefärbt bleibt (nicht gezeigt).
Das Antiserum AS ZP2-26, das gegen die humanspezifische Aminosäuresequenz gerichtet ist, führt zu einer sehr stark positiven Reaktion auf der humanen Zona pellucida (Abb. 13A, Nr. 5). Insbesondere hier, aber auch auf anderen Schnitten, erscheint die Zona pellucida als bilamellärer oder multilamellärer Ring angefärbt. Auch AS ZP2-27 zeigt eine positive Braunfärbung der Zona pellucida, jedoch ist die lamelläre Struktur weniger stark ausgeprägt (nicht gezeigt). Das Ooplasma weist in beiden Fällen keine spezifische Färbung auf. Die als Negativkontrollen eingesetzten Präimmunseren PI 20 (Abb. 13A, Nr. 6) und PI 26 (nicht gezeigt) führen weder auf der Zona pellucida noch im Ooplasma zu einer Farbreaktion.

Auf Paraffinschnitten aus Schweineovarien ist die Zona pellucida sowohl mit AS ZP2-20 als auch mit AS ZP2-26 als stark braun gefärbter Ring um die Eizelle zu erkennen (Abb. 13A, Nr. 7 und 8). Auch hier zeigt sich, daß AS ZP2-26 die Zona pellucida als multilamellären Ring markiert. In Analogie zum Rinderovar kommt es ebenfalls beim Schwein zu einer Bindung von AS ZP2-26-Antikörpern an die Zona pellucida, obwohl dieses Antiserum gegen ein als humanspezifisch bezeichnetes Peptid gerichtet ist. Das Ooplasma wird von keinem der beiden Anti-ZP2-Antiseren erkannt. Die Antiseren AS ZP2-21 und AS ZP2-27 (nicht gezeigt) sowie die Präimmunseren PI 20 (Abb. 13A, Nr.

9) und PI 26 führen im porcinen Ovar weder im Ooplasma noch auf der Zona pellucida zu einer Anfärbung.

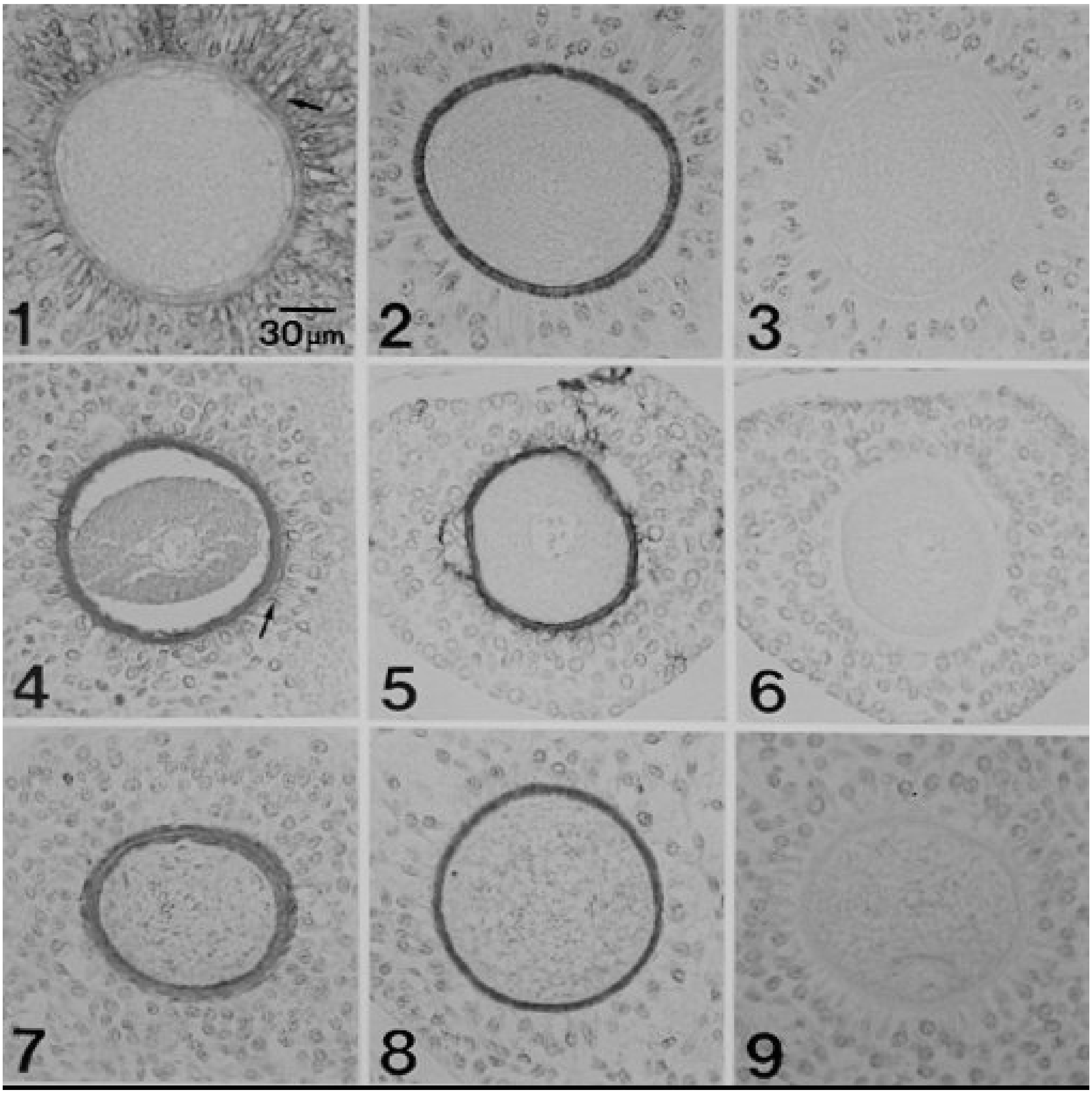


Abb. 13, Teil A: Immunreaktivität der Anti-ZP2-Antiseren AS ZP2-20 (1, 4, 7) und AS ZP2-26 (2, 5, 8) sowie des Präimmunserums PI 20 (3, 6, 9) auf Ovargewebeschnitten von Rind (1, 2, 3), Mensch (4, 5, 6) und Schwein (7, 8, 9).

Auf Mausovarschnitten markieren AS ZP2-20-Antikörper sowohl die Zona pellucida als auch das Ooplasma und führen zu einer starken Braunfärbung beider Strukturen (Abb. 13B, Nr. 10). Nach Inkubation mit AS ZP2-21 zeigt sich nach Immunperoxidase-Reaktion eine stark positive Markierung der Zona pellucida und eine positive Anfärbung des Ooplasmas (nicht gezeigt).

Mit den gegen die humanspezifische Aminosäuresequenz gerichteten Antiseren AS ZP2-26 (Abb. 13B, Nr. 11) und AS ZP2-27 (nicht gezeigt) kommt es zu keiner Immunreaktion mit Maus-Zona pellucida oder mit Maus-Ooplasma. Das Präimmunserum PI 20 (Abb. 13B, Nr. 12) führt zu keiner Färbung der untersuchten Strukturen des ovariellen Gewebes.

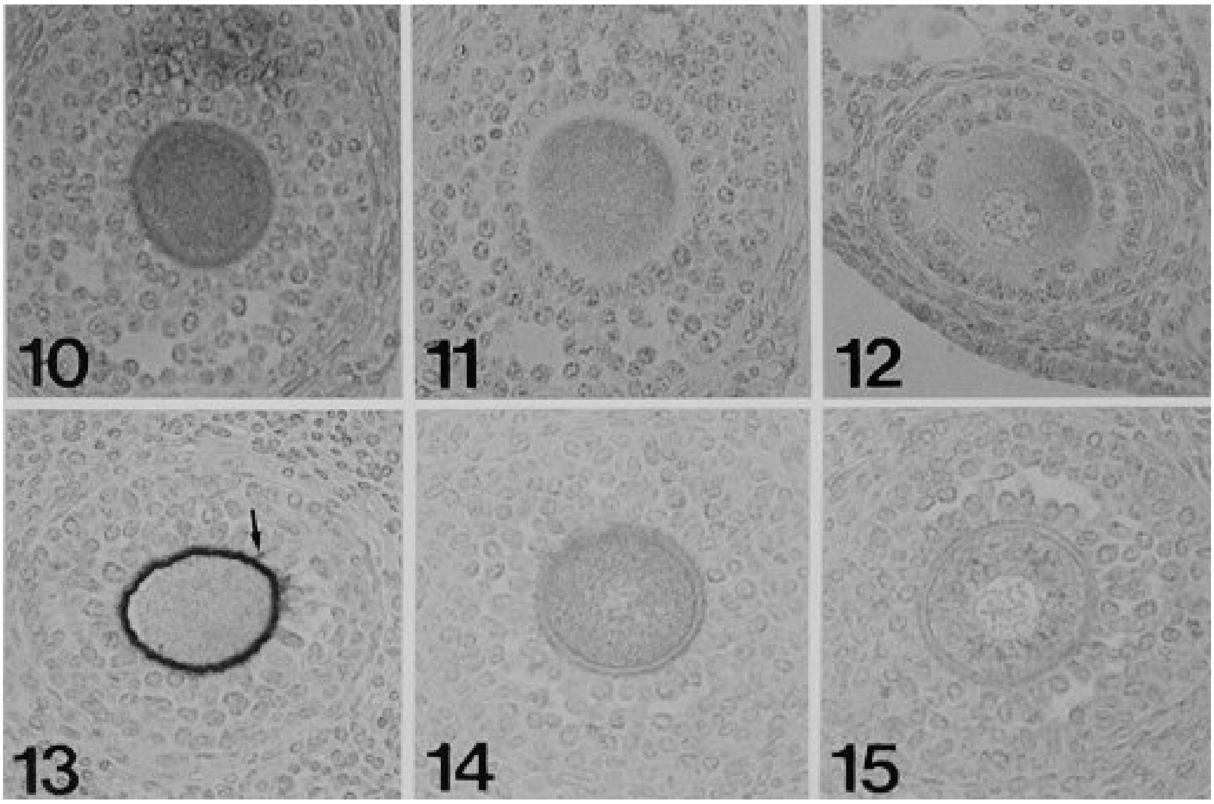


Abb. 13, Teil B: Immunreaktivität der Anti-ZP2-Antiseren AS ZP2-20 (10, 13) und AS ZP2-26 (11, 14) sowie des Präimmunserums PI 20 (12, 15) auf Ovargewebeschnitten von Maus (10, 11, 12) und Meerschweinchen (13, 14, 15).

Der Einsatz von AS ZP2-20 auf Paraffinschnitten von Meerschweinchenovarien führt zu einer sehr starken Braunfärbung der Zona pellucida (Abb. 13B, Nr. 13). Ebenfalls bräunlich angefärbt werden kleinere, ausläuferartige Strukturen (mit ← markiert). Die Antiseren AS ZP2-21 (nicht gezeigt), AS ZP2-26 (Abb. 13B, Nr. 14) und AS ZP2-27 (nicht gezeigt) zeigen keine Anfärbung der Zona pellucida. Das als Negativkontrolle eingesetzte Präimmunserum PI 20 führt ebenfalls zu keiner spezifischen Farbreaktion (Abb. 13B, Nr. 15). Weder die eingesetzten Anti-ZP2-Peptid-Antiseren noch die Kontrollseren reagieren mit Proteinen im Bereich des Ooplasmas der Meerschweincheneizelle.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen an Paraffinschnitten durch Ovarien verschiedener Spezies sind in Tab. III zusammengefaßt.
Das Anti-ZP2-Antiserum AS ZP2-20, das gegen eine homologe, speziesübergreifende Aminosäuresequenz gerichtet ist, identifiziert die Zona pellucida in Ovarien von Rind, Mensch, Schwein, Maus, Meerschweinchen und Ratte. Zudem werden insbesondere bei Rind-, Mensch- und Meerschweinchen-Ovarien Strukturen angefärbt, die ausläuferartig in das die Eizelle umgebende Ovarialgewebe ziehen. Auch im Bereich des Ooplasmas kann mit AS ZP2-20 bei Mensch-, Maus- und Ratten-Eizellen eine Braunfärbung beobachtet werden.
Die Inkubation von Gewebeschnitten aus dem Ovar mit AS ZP2-21 führt zu einer Darstellung der Zona pellucida bei Rind, Mensch und Maus. Das Ooplasma auf Mausovarschnitten weist ebenfalls eine positive Anfärbung auf. Zona pellucida-Strukturen von Schwein, Meerschweinchen und Ratte werden nicht identifiziert, ebensowenig das Ooplasma von Rind, Mensch, Schwein, Meerschweinchen und Ratte.
Durch das Antiserum AS ZP2-26, das gegen eine als humanspezifisch ausgewählte Aminosäuresequenz gerichtet ist, wird die Zona pellucida bei Mensch, aber auch bei Rind und Schwein braun dargestellt. In Ovarien von Maus, Meerschweinchen und Ratte kommt es zu keiner Färbung der Zona pellucida. Das Ooplasma wird in keinem der untersuchten Ovargewebeschnitte markiert.

Das Antiserum AS ZP2-27 reagiert nur mit humaner Zona pellucida. Weder im menschlichen Ooplasma noch in Strukturen der Ovarien anderer Spezies zeigen sich nach der Immunperoxidase-Methode eine Braunfärbung.
Die Präimmunseren PI 20 und PI 26 zeigen in keinem Ovarschnitt der verschiedenen Spezies eine Immunreaktion mit der Zona pellucida bzw. dem Ooplasma.

Tab. III: Immunhistochemische Reaktionen von Anti-ZP2-Peptid-Antiseren auf Paraffinschnitten von Ovarien verschiedener Spezies

	Rind		Mensch		Schwein		Maus		Meer-schweinchen		Ratte	
	ZP	O	ZP	O	ZP	O	ZP	O	ZP	O	ZP	O
AS ZP2-20	+	-	++	+	++	-	++	++	+++	-	+	+
AS ZP2-21	+	-	++	-	-	-	++	+	-	-	-	-
AS ZP2-26	+++	-	+++	-	++	-	-	-	-	-	-	-
AS ZP2-27	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Präimmun-seren 20/26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: positive Reaktion; ++: stark positive Reaktion; +++: sehr stark positive Reaktion;
-: negative Reaktion; ZP: Zona pellucida; O: Ooplasma.

3.5 Elektrophoretische Proteinauftrennung mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteinbestandteile von je 20 isolierten Zonae pellucidae und 20 kompletten Eizellen vom Rind wurden unter reduzierenden Bedingungen mit einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsprechend ihrer Molekularmassen elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem Western-Blot-Verfahren auf Immobilon™-Membranen elektrotransferiert. Mit Hilfe der mitgeführten Gel-Elektrophorese-Standards können die Ponceau S-gefärbten Proteinbanden bestimmten Molekularmassen zugeordnet werden.

Im Proteingemisch aus bovinen Eizellen zeigt sich eine deutlich angefärbte Bande bei ca. 63kDa sowie sehr schwach dargestellte Polypeptide mit Molekularmassen im Bereich zwischen 82kDa und 98kDa (Abb. 14, Spur a). In Rinder-Zonae pellucidae kann nur eine sehr schwach gefärbte, kaum erkennbare Proteinbande bei ungefähr 63kDa visualisiert werden (Abb. 14, Spur b).

3.6 Immunbiochemische Identifizierung von Zona pellucida-Proteinen

Nach Einsatz der Anti-ZP2-Antiseren können in Proteingemischen aus bovinen Zonae pellucidae und Eizellen durch einen Vergleich mit den apparenten Molekularmassen mitgeführter Proteinstandards immunreaktiven Polypeptidbanden bestimmte Molekularmassen zugeordnet werden.
Im Proteinextrakt aus bovinen Eizellen kann mit dem Antiserum AS ZP2-20 eine intensiv markierte, breite Proteinbande zwischen 70kDa und 80kDa nachgewiesen werden (Abb. 14, Spur c). Weitere, deutlich markierte und relativ gut fokusierte Banden werden bei ca. 16kDa und ca. 28kDa detektiert. Wesentlich schwächere Immunreaktionen erfolgen mit Polypeptiden in den Bereichen von ca. 97kDa, 91kDa, 67kDa und 62kDa (Abb. 14, Spur c). Mit dem Antiserum AS ZP2-26 wird im Proteinextrakt boviner Eizellen ebenfalls ein Polypeptid mit einer apparenten Molekularmasse von ca. 70-80kDa markiert (Abb. 14, Spur e), wobei die Intensität der Anfärbung schwächer und die Bandenbreite geringer sind als bei AS ZP2-20. Zusätzlich wird eine Proteinbande bei ca. 36kDa deutlich angefärbt. Wesentlich schwächere Reaktionen mit AS ZP2-26 sind mit Polypeptiden zwischen 45kDa und 62kDa zu verzeichnen (Abb. 14, Spur e).
Zur Kontrolle der Spezifität der Antiseren wurden die Präimmunseren (hier exemplarisch PI 20 gezeigt) auf den Proteinextrakten boviner Eizellen eingesetzt (Abb. 14, Spur g). Nach langer Expositionsdauer mit dem Farbsubstrat zeigen sich mehrere, schwach angefärbte, meist gut fokusierte Banden mit apparenten Molekularmassen, die zum Teil auch den schwach angefärbten Banden der mit AS ZP2-20 und AS ZP2-26 behandelten Western-Blots entsprechen. Die Farbreaktionen sind in den Bereichen von

70-80kDa und ca. 28kDa mit dem Präimmunserum PI 20 entweder nicht zu sehen oder wesentlich schwächer als nach Einsatz von AS ZP2-20 oder AS ZP2-26 (Abb. 14, Spur g).

In Proteinextraktionen aus bovinen Zonae pellucidae zeigt sich nach Inkubation mit AS ZP2-20 eine breite, intensiv angefärbte Bande mit einer Molekularmasse von ca. 70-80kDa (Abb. 14, Spur d). Diese entspricht dem Bereich der immunreaktiven Bande, die auch im Proteinextrakt boviner Eizellen inklusive Zonae pellucidae detektiert wird. Ebenso zeigt sich eine deutliche Immunreaktion bei ca. 28kDa (Abb. 14, Spur d). Das Antiserum AS ZP2-26 führt ebenfalls zu einer Immunreaktion im Zona pellucida-Extrakt bei einer apparenten Molekularmasse von ca. 70-80kDa (Abb. 14, Spur f). Diese ist im Vergleich zur Anfärbung nach Inkubation mit AS ZP2-20 etwas schwächer und schmaler ausgeprägt. Weitere Proteinbanden werden von AS ZP2-26 in bovinen Zonae pellucidae nicht markiert. Das Präimmunserum (PI 20) führt zu keiner Reaktion mit Polypeptiden aus Proteinextrakten boviner Zonae pellucidae (Abb. 14, Spur h).

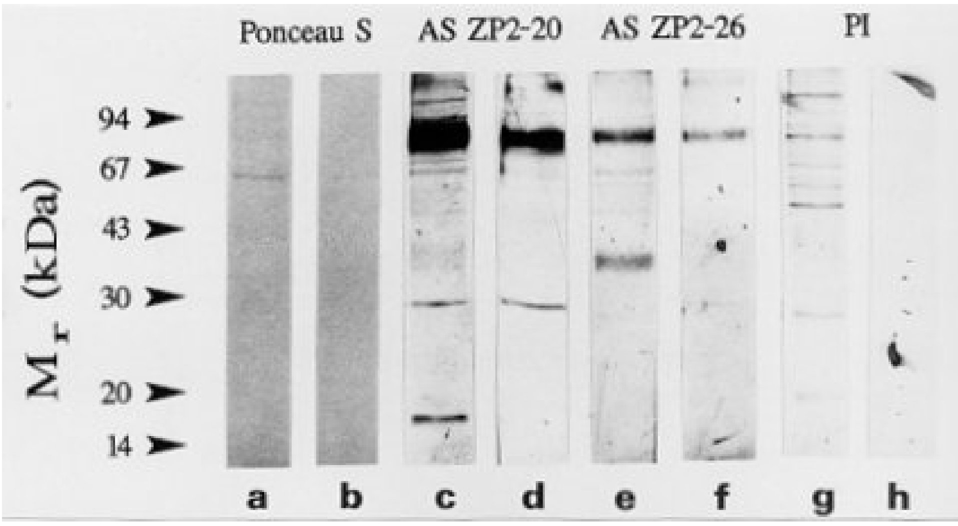


Abb. 14: Immuno-Blots mit Proteinextrakten aus bovinen Eizellen (Spuren a, c, e, g) und Zonae pellucidae (Spuren b, d, f, h) mit Anti-ZP2-Peptid-Antiseren. Zum Nachweis elektrotransferierter Proteine dient die Ponceau S-Färbung (Spuren a und b). Zum Nachweis immunreaktiver Proteine wurden AS ZP2-20 (Spuren c und d) sowie AS ZP2-26 (Spuren e und f) verwendet. Als Negativkontrolle dient Präimmunserum PI 20 (Spuren g und h).

3.7 Färbeverhalten im Hemizona-Antikörper-Bindungstest

Mit den Anti-ZP2-Antikörpern und Hemizonae von Rind (Abb. 15A, Nr. 1-4), Mensch (Abb. 15B, Nr. 5-8) und Schwein (Abb. 15C, Nr. 9-12) wurde die Bindung von Antikörpern an natives Zona pellucida-Protein untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind exemplarisch in Abb. 15 fotografisch dargestellt und in den Tabellen IV-VI zusammengefaßt und statistisch ausgewertet. Bei der mikroskopisch-morphologischen Beurteilung der Ergebnisse fallen linienartige Strukturen, Risse und eine inhomogene, am Rand intensivere Anfärbung der Zona pellucida-Hälften auf, die wahrscheinlich durch Trocknungs- und Rehydrierungsvorgänge bedingt sind.

Das Antiserum AS ZP2-20, das gegen das homologe Peptid 20 gerichtet ist, führt nach Immunperoxidase-Reaktion zu einer Braunfärbung von Rinder-Hemizonae (Abb. 15A, Nr. 1). Die durchschnittliche Färbungsintensität wird mit 3,6 beurteilt. Die korrespondierenden Hälften, die mit dem Präimmunserum inkubiert sind, zeigen eine deutlich schwächere Anfärbung (Abb. 15A, Nr. 2) mit einem Mittelwert von 1,3. Der Mittelwert der Differenzen in der Immunfarbreaktion zwischen den Test- und Kontroll-Hälften liegt bei 2,3. In der statistischen Auswertung mit einem einseitigen t-Test innerhalb einer verbundenen Versuchsanordnung ergibt sich ein P-Wert von 0,0004 (Tab. IV). Die Nullhypothese wird somit abgelehnt und ein höchst signifikanter Unterschied im Färbeverhalten der Test- und Kontroll-Hemizonae angenommen.

Die bovinen Hemizonae, die mit dem als anti-ZP2-human definierten Antiserum AS ZP2-26 inkubiert sind, zeigen ebenfalls eine intensive Farbreaktion nach Antikörperbindung an Zona pellucida-Antigen (Abb. 15A, Nr. 3). Der Durchschnittswert liegt bei 5,4. Im Gegensatz dazu erreicht das Präimmunserum auf den korrespondierenden Zona pellucida-Hälften nach DAB-Peroxidase-Reaktion nur einen Wert von durchschnittlich 2,3 (Abb. 15A, Nr. 4). Der Mittelwert der Färbungsunterschiede beträgt 3,1. Der statistisch errechnete P-Wert (<0,0001) führt zur Ablehnung der Nullhypothese und zur Beurteilung des Unterschiedes als höchst signifikant (Tab. IV).

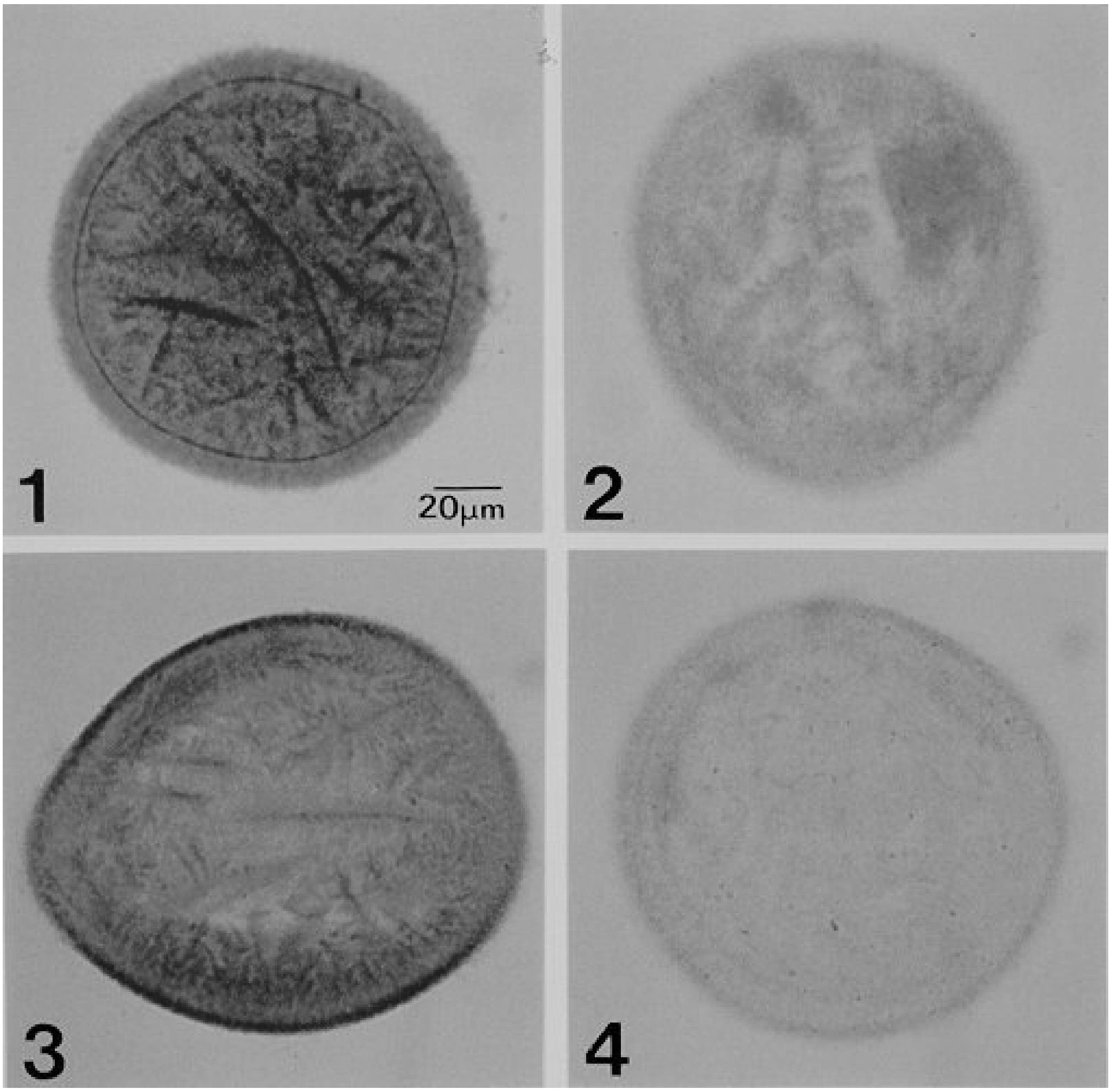


Abb. 15, Teil A: Hemizona-Antikörper-Bindungstest mit bovinen Zona pellucida-Hälften. Nach Einsatz von Antiserum AS ZP2-20 (Nr. 1), Präimmunserum PI 20 (Nr. 2) sowie AS ZP2-26 (Nr. 3) und Präimmunserum PI 26 (Nr. 4) wird die Antikörperbindung an die Hemizonae durch das Immun-Peroxidase-Verfahren visualisiert.

Tab. IV: Hemizona-Antikörper-Bindungstest mit Rinder-Hemizonae

Anti-ZP2-Antiserum	Test-HZ	Kontroll-HZ	$\Delta_{\text{Test-Kontrolle}}$	P-Wert+	Anzahl
AS ZP2-20	3,6±1,3#	1,3±1,1#	2,3±1,0#	0,0004	7
AS ZP2-26	5,4±0,5#	2,3±0,5#	3,1±0,7#	<0,0001	7

Die Intensität der Färbungen wird in einer Skala von 0 (keine Färbung) bis 10 (sehr starke Färbung) bewertet.
+ errechnet mit einem einseitigen t-Test für verbundene Stichproben;
# Mittelwert ± Standardabweichung; HZ: Hemizonae; Δ: Differenz.

Menschliche Hemizonae zeigen nach Inkubation mit den Anti-ZP2-Antiseren im Hemizona-Antikörper-Bindungstest nach Immunperoxidase-Reaktion folgendes Färbeverhalten: AS ZP2-20 führt auf den Test-Hälften zu einer Braunfärbung (Abb. 15B, Nr. 5) mit einem Durchschnittswert von 2,8. Die korrespondierenden Hemizonae, die mit dem entsprechenden Präimmunserum inkubiert sind, sind deutlich schwächer angefärbt (Abb. 15B, Nr. 6) und werden mit durchschnittlich 0,8 bewertet. Die Differenz in der Färbungsintensität zwischen Test- und Kontroll-Hälften liegt durchschnittlich bei 2,0. Statistisch errechnet sich ein P-Wert von <0,0001, weshalb ein höchst signifikanter Intensitätsunterschied angenommen wird (Tab. V).

Antiserum AS ZP2-26 markiert ebenfalls die menschlichen Test-Hemizonae (Abb. 15B, Nr. 7). Es wird ein Wert von durchschnittlich 4,8 errechnet. Die Kontroll-Hemizonae, die mit dem Präimmunserum inkubiert sind, zeigen nur eine sehr schwache Anfärbung (Abb. 15B, Nr. 8) mit einem gemittelten Wert von 0,9. Der Mittelwert der Differenzen liegt bei 3,9. Der Unterschied in den Intensitäten der Anfärbungen wird innerhalb der verbundenen Versuchsanordnung mit einem einseitigen t-Test statistisch untersucht, wobei sich ein P-Wert <0,0001 ergibt (Tab. V). H_0 wird unter dieser Bedingung abgelehnt und ein höchst signifikanter Unterschied im Färbeverhalten von Test- und Kontroll-Hälften angenommen.

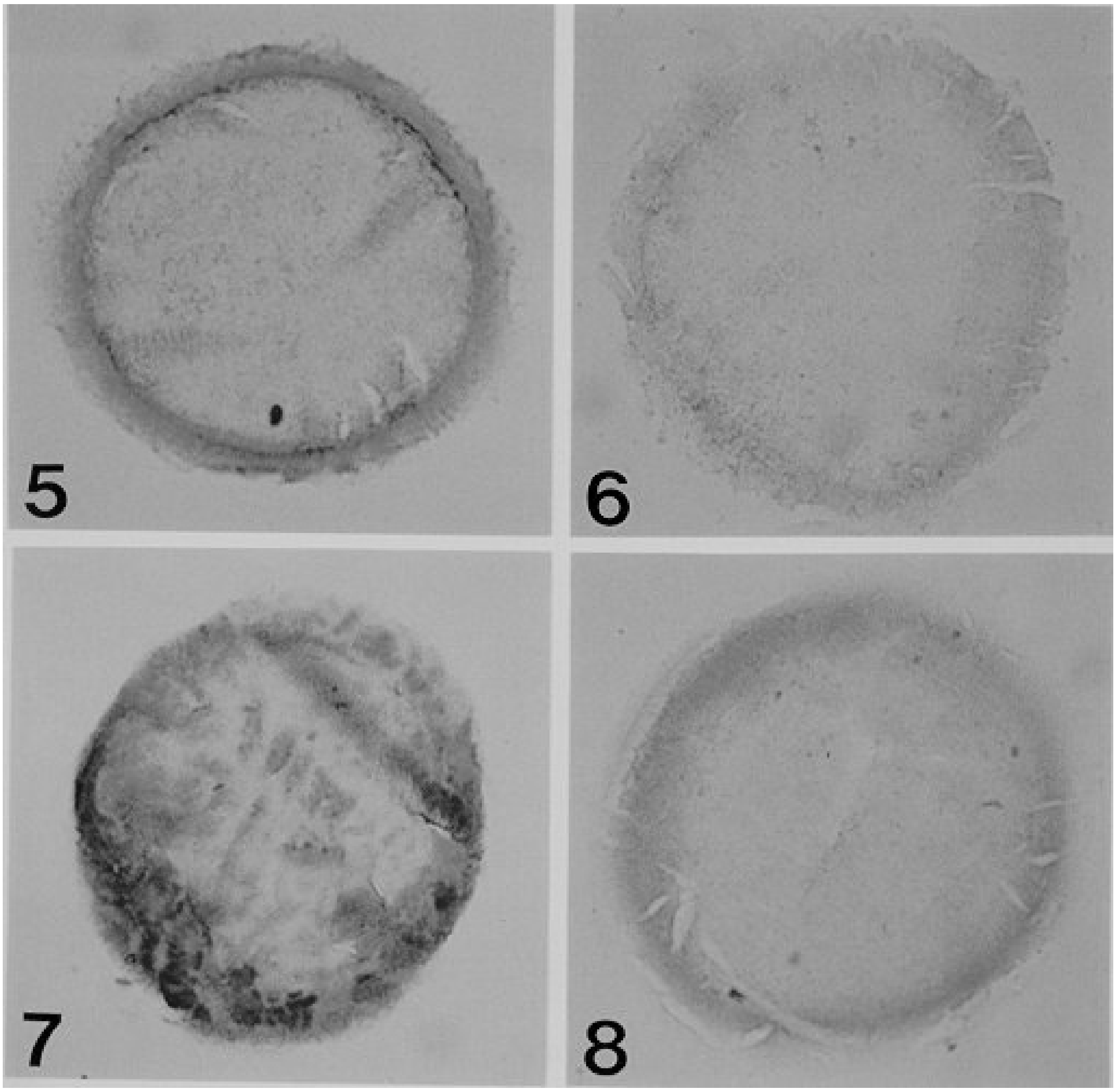


Abb. 15, Teil B: Hemizona-Antikörper-Bindungstest mit humanen Zona pellucida-Hälften. Nach Einsatz von Antiserum AS ZP2-20 (Nr. 5), Präimmunserum PI 20 (Nr. 6) sowie AS ZP2-26 (Nr. 7) und Präimmunserum PI 26 (Nr. 8) wird die Antikörperbindung an die Hemizonae durch das Immun-Peroxidase-Verfahren visualisiert.

Tab. V: Hemizona-Antikörper-Bindungstest mit humanen Hemizonae

Anti-ZP2-Antiserum	Test-HZ	Kontroll-HZ	$\Delta_{Test-Kontrolle}$	P-Wert+	Anzahl
AS ZP2-20	2,8±0,6#	0,8±0,8#	2,0±0,9#	<0,0001	10
AS ZP2-26	4,8±0,4#	0,9±0,9#	3,9±1,3#	<0,0001	9

Die Intensität der Färbungen wird in einer Skala von 0 (keine Färbung) bis 10 (sehr starke Färbung) bewertet.
+ errechnet mit einem einseitigen t-Test für verbundene Stichproben;
# Mittelwert ± Standardabweichung; HZ: Hemizonae; Δ: Differenz.

Hemizona-Protein vom Schwein wird von Antiserum AS ZP2-20 erkannt und braun angefärbt (Abb. 15C, Nr. 9). Dabei wird ein durchschnittlicher Score von 5,2 erreicht. Die Kontroll-Hälften (Abb. 15C, Nr. 10) zeigen nach Inkubation mit dem Präimmunserum einen Score, der im Mittelwert mit 2,6 bewertet wird. Die durchschnittliche Differenz von Test- und Kontroll-Hälften liegt bei 2,6 (Tab. VI). Es wird ein höchst signifikanter Unterschied angenommen, nachdem statistisch ein P-Wert von 0,0002 errechnet und folglich H_0 abgelehnt werden kann.

Das Anti-ZP2-Antiserum AS ZP2-26 führt im Hemizona-Antikörper-Bindungstest nach Immunperoxidase-Reaktion zu einer Braunfärbung von Schweine-Hemizonae (Abb. 15C, Nr. 11). Dabei wird durchschnittlich ein Score von 5,4 ermittelt. Das Präimmunserum zeigt auf den korrespondierenden Hälften eine schwächere Anfärbung (Abb. 15C, Nr. 12) mit einem Durchschnittswert von 1,4. Der mittlere Unterschied der Farbintensitäten liegt bei 4,0. In der verbundenen Versuchsanordnung ergibt ein einseitiger t-Test einen P-Wert von 0,0001 (Tab. VI). Dies führt zur Verwerfung von H_0 und Bewertung der Anfärbungen als höchst signifikant unterschiedlich.

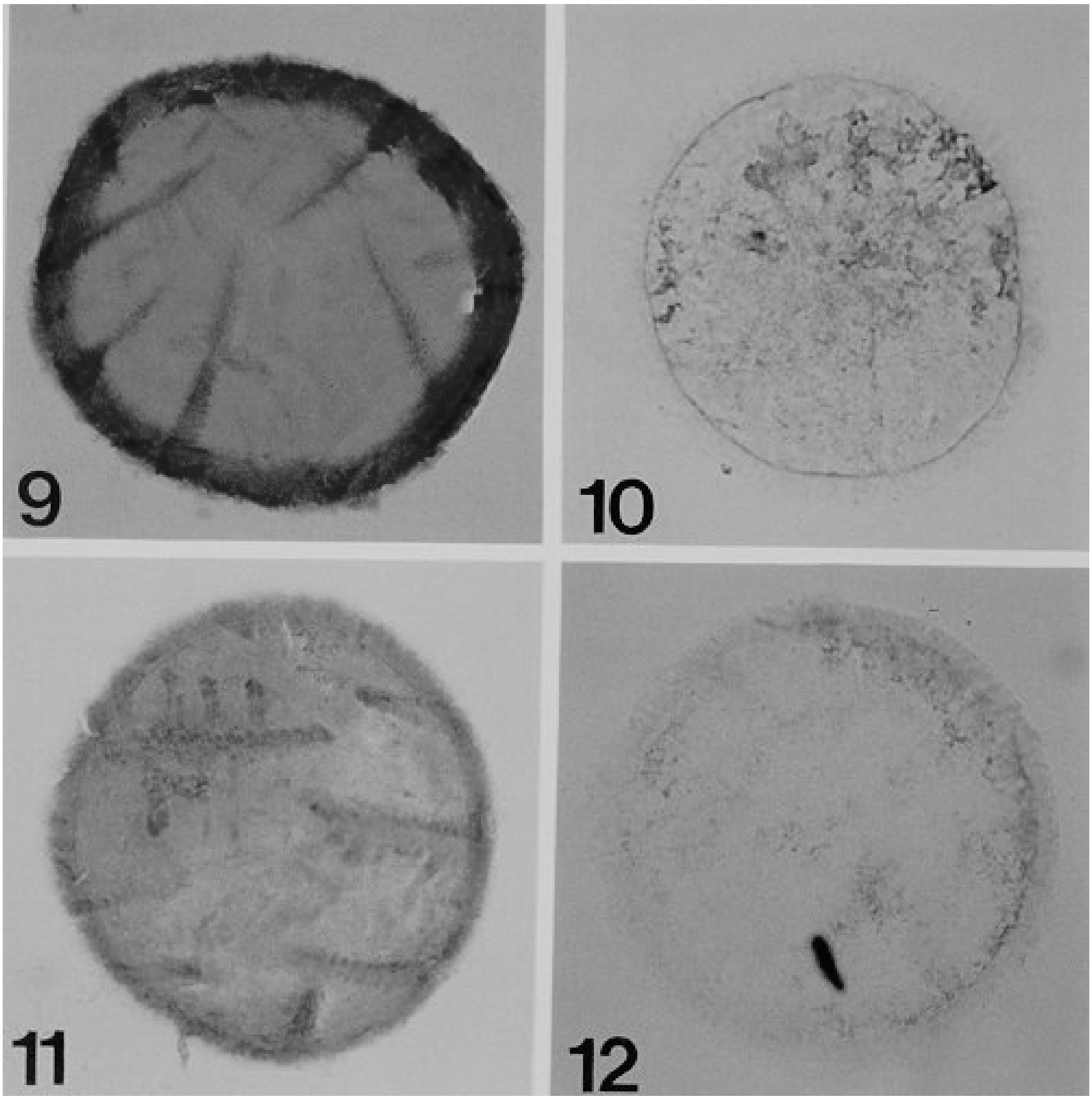


Abb. 15, Teil C: Hemizona-Antikörper-Bindungstest mit porcinen Zona pellucida-Hälften. Nach Einsatz von Antiserum AS ZP2-20 (Nr. 9), Präimmunserum PI 20 (Nr. 10) sowie AS ZP2-26 (Nr. 11) und Präimmunserum PI 26 (Nr. 12) wird die Antikörperbindung an die Hemizonae durch das Immun-Peroxidase-Verfahren visualisiert.

Tab. VI: Hemizona-Antikörper-Bindungstest mit Schweine-Hemizonae

Anti-ZP2-Antiserum	Test-HZ	Kontroll-HZ	$\Delta_{\text{Test-Kontrolle}}$	P-Wert^{+}	Anzahl
AS ZP2-20	5,2±0,8$^{\#}$	2,6±0,5$^{\#}$	2,6±0,5$^{\#}$	0,0002	5
AS ZP2-26	5,4±0,5$^{\#}$	1,4±0,5$^{\#}$	4,0±0,7$^{\#}$	0,0001	5

Die Intensität der Färbungen wird in einer Skala von 0 (keine Färbung) bis 10 (sehr starke Färbung) bewertet.
$^{+}$ errechnet mit einem einseitigen t-Test für verbundene Stichproben;
$^{\#}$ Mittelwert ± Standardabweichung; HZ: Hemizonae; Δ: Differenz.

Im Hemizona-Antikörper-Bindungstest binden sowohl AS ZP2-20-Antikörper, die gegen die Aminosäuresequenz mit sehr hoher Übereinstimmung in verschiedenen Spezies gerichtet sind, als auch AS ZP2-26-Antikörper, die gegen die human-spezifische Aminosäuresequenz gerichtet sind, an biochemisch unbehandelte Hemizonae von Rind, Mensch und Schwein. In allen drei Spezies sind signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle zu erkennen.

3.8 Funktionelle Spermatozoenbindungsstudien mit dem Kompetitions-Hemizona-Assay

Um zu klären, ob die Bindung von Anti-ZP2-Peptid-Antiseren an die Zona pellucida die Spermatozoen-Zona pellucida-Interaktion beeinflußt, wurde der Kompetitions-Hemizona-Assay eingesetzt. Bei der Durchführung der Testreihen fiel auf, daß nach Bindung der Spermatozoen an die Hemizonae eine Veränderung der Konsistenz der Hemizonae zu verzeichnen ist; im Vergleich zu unbehandelten Zona pellucida-Hälften erscheinen die Test- und Kontroll-Hemizonae rigider und weniger verformbar.
Nach Inkubation der Test-Hemizonae mit dem Antiserum AS ZP2-20 werden nach dem durchgeführten Kompetitions-Hemizona-Assay durchschnittlich 24,1 gebundene Spermatozoen pro Zona pellucida-Hälfte gezählt. Auf den Kontroll-Hälften, die nicht

mit Serum behandelt sind, befinden sich im Durchschnitt noch 49,4 Spermatozoen. Der mittlere Hemizona-Index aller untersuchten Zonae pellucidae liegt bei 50,9. Die Analyse des mittleren Hemizona-Indexes zum Bezugswert 100, bei dem auf Test- und Kontroll-Hemizonae gleich viele Spermatozoen gebunden hätten, mit einem zweiseitigen t-Test ergibt einen P-Wert <0,0001 (Tab. VII). Aufgrund der statistischen Auswertung wird die Nullhypothese abgelehnt und davon ausgegangen, daß die Inkubation der Zona pellucida-Hälften mit AS ZP2-20-Antikörpern die Spermatozoenbindung an die Test-Hemizonae höchst signifikant herabsetzt.

Tab. VII: Boviner Kompetitions-Hemizona-Assay mit Antiserum AS ZP2-20

Anti-ZP2-Antiserum	Anzahl der gebundenen Spermatozoen an die Test-HZ	Anzahl der gebundenen Spermatozoen an die Kontroll-HZ	Durchschnitt der HZI	P-Wert$_{HZI}$*	Anzahl
AS ZP2-20	24,1±11,6#	49,4±21,9#	50,9±14,7#	<0,0001	18

* errechnet mit einem zweiseitigen t-Test für unverbundene Stichproben;
# Mittelwert ± Standardabweichung; HZ: Hemizonae; HZI: Hemizona-Indices.

Die Inkubation von Hemizonae mit Antiserum AS ZP2-26 führt im Kompetitions-Hemizona-Assay zu keiner Herabsetzung der Spermatozoenbindung an die Zona pellucida. Auf den mit AS ZP2-26 behandelten Zona pellucida-Hälften werden durchschnittlich 38,0 fest gebundene Spermatozoen gezählt, auf den Kontroll-Hemizonae im Mittel jeweils 37,2. Der mittlere Hemizona-Index liegt bei 98,5. Zum Bezugswert 100 errechnet sich ein P-Wert von 0,75 (Tab. VIII). Die Nullhypothese, die davon ausgeht, daß die Inkubation von Hemizonae mit dem Antiserum AS ZP2-26 keinen Einfluß auf die Spermatozoenbindungskapazität hat, kann damit nicht abgelehnt werden.

Tab. VIII: Boviner Kompetitions-Hemizona-Assay mit Antiserum AS ZP2-26

Anti-ZP2-Antiserum	Anzahl der gebundenen Spermatozoen an die Test-HZ	Anzahl der gebundenen Spermatozoen an die Kontroll-HZ	Durchschnitt der HZI	P-Wert$_{HZI}$*	Anzahl
AS ZP2-26	38,0±21,5[#]	37,2±18,3[#]	98,5±14,5[#]	0,75	10

* errechnet mit einem zweiseitigen t-Test für unverbundene Stichproben;
[#] Mittelwert ± Standardabweichung; HZ: Hemizonae; HZI: Hemizona-Indices.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden Kompetitions-Hemizona-Assays durchgeführt, bei denen eine Hälfte der Rinder-Zona pellucida mit AS ZP2-20 und die korrespondierende Hälfte mit AS ZP2-26 inkubiert worden sind. Mit diesen Untersuchungen können die Antiseren AS ZP2-20 und AS ZP2-26 direkt miteinander verglichen werden. Nach Coinkubation mit bovinen Spermatozoen und Bestimmung der jeweils gebundenen Spermatozoenzahl werden die erhobenen Daten mit einem zweiseitigen t-Test statistisch ausgewertet. An die mit AS ZP2-20 inkubierten Hemizonae binden im Durchschnitt 34,4 Spermatozoen, während an den mit AS ZP2-26 inkubierten korrespondierenden Zona pellucida-Hälften im Mittel 54,6 gebundene Spermatozoen gezählt werden können. Durchschnittlich liegt der Hemizona-Index bei 62,2. Zum Bezugswert 100 errechnet sich ein P-Wert <0,0001 (Tab. IX), was zur Ablehnung der Nullhypothese führt. Das eingesetzte Anti-ZP2-Antiserum AS ZP2-20 führt damit zu einer herabgesetzten Spermatozoenbindung der getesteten Hemizonae im Vergleich zu den mit AS ZP2-26 inkubierten Zona pellucida-Hälften.

Nach Auszählung der gebundenen Spermatozoen an den Hemizonae wurde mit den in Kompetitions-Hemizona-Assays eingesetzten Rinder-Zona pellucida-Hälften ein Hemizona-Antikörper-Bindungstest durchgeführt, um eine tatsächliche Bindung von Anti-ZP2-Antikörpern an die Zona pellucida-Hälften nachzuweisen.

Tab. IX: Boviner Kompetitions-Hemizona-Assay mit AS ZP2-20 und AS ZP2-26 im direkten Vergleich

Anzahl der gebundenen Spermatozoen an mit AS ZP2-20 inkubierten HZ	Anzahl der gebundenen Spermatozoen an mit AS ZP2-26 inkubierten HZ	Durchschnitt der HZI	P-Wert$_{HZI}$*	Anzahl
34,4±13,8#	54,6±16,7#	62,2±8,6#	<0,0001	8

* errechnet mit einem zweiseitigen t-Test für unverbundene Stichproben;
# Mittelwert ± Standardabweichung; HZ: Hemizonae; HZI: Hemizona-Indices.

Die Bindung von AS ZP2-20-Antikörpern an die Hemizonae im Hemizona-Antikörper-Bindungstest nach Kompetitions-Hemizona-Assay kann mit einer Braunfärbung der bovinen Zona pellucida-Hälften (Abb. 16, Nr. 1) mit einem mittleren Score von 3,1 nachgewiesen werden. Die Kontroll-Hälften sind deutlich weniger angefärbt (Abb. 16, Nr. 2) und weisen einen Durchschnittswert von 1,5 auf. Der Mittelwert der Differenzen liegt bei 1,6. Statistisch wird ein P-Wert <0,0001 errechnet (Tab. X). Die Nullhypothese wird abgelehnt und ein höchst signifikanter Unterschied zwischen Test- und Kontroll-Hälften angenommen.

Die im Zuge der Kompetitions-Hemizona-Assays mit AS ZP2-26 inkubierten Rinder-Hemizonae zeigen nach Immunperoxidase-Reaktion ebenfalls eine deutliche Braunfärbung der Zonae pellucidae (Abb. 16, Nr. 3). Der Mittelwert wird mit 4,8 errechnet. Die Kontroll-Hemizonae (Abb. 16, Nr. 4) werden mit einem Score von durchschnittlich 1,2 bewertet. Der mittlere Unterschied der Scores beträgt 3,6. Der P-Wert wird mit <0,0001 errechnet (Tab. X). Die Nullhypothese (H_0) wird abgelehnt und von einem statistisch höchst signifikanten Unterschied ausgegangen.

Tab. X: Boviner Hemizona-Antikörper-Bindungstest nach Kompetitions-Hemizona-Assay mit AS ZP2-20 und AS ZP2-26

Anti-ZP2-Antiserum	Test-HZ	Kontroll-HZ	$\Delta_{Test-Kontrolle}$	P-Wert+	Anzahl
AS ZP2-20	3,1±0,6#	1,5±0,9#	1,6±0,7#	<0,0001	13
AS ZP2-26	4,8±0,9#	1,2±0,4#	3,6±1,1#	<0,0001	10

Die Intensität der Färbungen wird in einer Skala von 0 (keine Färbung) bis 10 (sehr starke Färbung) bewertet.
+ errechnet mit einem einseitigen t-Test für verbundene Stichproben;
# Mittelwert ± Standardabweichung; HZ: Hemizonae; Δ: Differenz.

Beim direkten Vergleich der Antikörperbindung von AS ZP2-20 und AS ZP2-26 an korrespondierende Hemizonae wird bei beiden Antiseren eine Braunfärbung der Zona pellucida-Hälften nach Immunperoxidase-Reaktion beobachtet. Dabei erreichen die mit AS ZP2-20 inkubierten Hälften (Abb. 16, Nr. 5) einen durchschnittlichen Score von 3,1, die mit AS ZP2-26 inkubierten Hemizonae (Abb. 16, Nr. 6) werden im Durchschnitt mit 5,3 bewertet. Der Mittelwert der Differenzen liegt bei 2,1. Innerhalb der verbundenen Versuchsanordnung wird ein zweiseitiger t-Test durchgeführt und ein P-Wert von 0,001 errechnet (Tab. XI). Der Unterschied der ermittelten Scores wird nach Ablehnung der Nullhypothese als statistisch hoch signifikant angenommen.

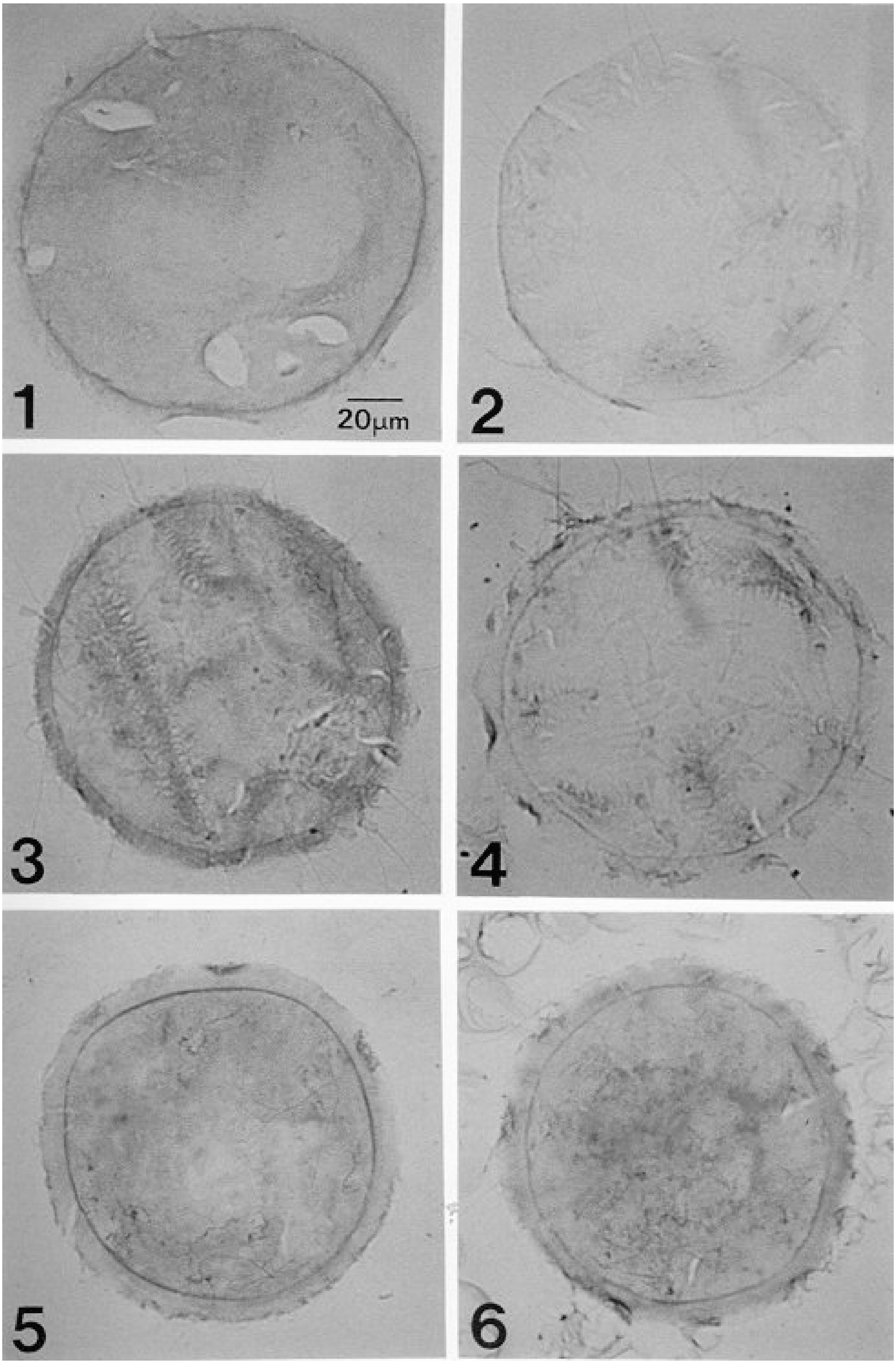
Tab. XI: Direkter Vergleich der Anti-ZP2-Peptid-Antiseren im bovinen Hemizona-Antikörper-Bindungstest nach Kompetitions-Hemizona-Assay

mit AS ZP2-20 inkubierte HZ	mit AS ZP2-26 inkubierte HZ	$\Delta_{AS\ ZP2-20/26}$	P-Wert+	Anzahl
3,1±1,0#	5,3±0,9#	2,1±1,1#	0,001	8

Die Intensität der Färbungen wird in einer Skala von 0 (keine Färbung) bis 10 (sehr starke Färbung) bewertet.
+ errechnet mit einem zweiseitigen t-Test für verbundene Stichproben;
# Mittelwert ± Standardabweichung; HZ: Hemizonae; Δ: Differenz.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß AS ZP2-26-Antikörper im Vergleich mit AS ZP2-20-Antikörpern mit höherer Affinität, ermittelt durch die Höhe der Färbescores, an die Zona pellucida binden. Trotz schwächerer Bindung der AS ZP2-20-Antikörper an die Hemizonae beeinflussen diese Antikörper und nicht AS ZP2-26-Antikörper die Spermatozoen-Zona pellucida-Interaktion negativ.

S. 73:
Abb. 16: Boviner Hemizona-Antikörper-Bindungstest mit AS ZP2-20 und AS ZP2-26 nach Kompetitions-Hemizona-Assay. Nach Einsatz von Antiserum AS ZP2-20 (Nr. 1), Präimmunserum PI 20 (Nr. 2) sowie AS ZP2-26 (Nr. 3) und Präimmunserum PI 26 (Nr. 4) wird die Antikörperbindung an die Hemizonae durch das Immun-Peroxidase-Verfahren visualisiert. Der direkte Vergleich der beiden Anti-ZP2-Peptid-Antiseren bezüglich ihrer Bindung an Hemizonae ist in Nr. 5 (AS ZP2-20) und Nr. 6 (AS ZP2-26) gezeigt.


1
20μm
2
3
4
5
6

4 Diskussion

Ziel der Untersuchungen war es, Antiseren gegen definierte Domänen des Säuger-ZP2-Proteins herzustellen und die Antikörper immunbiochemisch und immunhistochemisch zu charakterisieren. Mit Hilfe eines neu entwickelten bovinen Kompetitions-Hemi-zona-Assays sollte überprüft werden, ob die den Antikörpern entsprechenden Epitope für die Spermatozoen-Eizell-Interaktion von funktioneller Bedeutung sind.

Zur Detektion von ZP2-Protein in Ovarien verschiedener Säugetierspezies wurden hochspezifische Antikörper als Marker hergestellt. Antiseren, die ZP2-Protein erkennen, wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit an Trägerprotein gekoppelten synthetischen ZP2-Peptiden gewonnen. Unter Verwendung dieser Antikörper ist es möglich, ZP2-Protein in den Zonae pellucidae verschiedener Gewebe nachzuweisen.

Der Einsatz synthetischer Peptide als Antigen hat sich gegenüber gereinigten Zona pellucida-Proteinen aus mehreren Gründen als vorteilhaft erwiesen:

1. Im Gegensatz zu Antikörpern gegen gereinigte Proteine reagieren Antiseren gegen definierte synthetische Peptide meist hochspezifisch mit ihren entsprechenden Antigenen.
2. Eine Besonderheit von Antiseren gegen synthetische Peptide aus hochkonservierten ZP2-Protein-Epitopen (AS ZP2-20-Antikörper) besteht darin, daß diese Antikörper ZP2-Proteine von Spezies detektieren können, die bisher noch nicht als ZP2-Protein gereinigt und deren ZP2-cDNA noch nicht mit gentechnologischen Methoden isoliert worden sind.
3. Synthetische Peptide können mit einem sehr hohen Reinheitsgrad und, im Vergleich zu der aufwendigen biochemischen Anreicherung von nur geringen Mengen Zona pellucida-Proteinen, mit wesentlich geringerem Arbeitsaufwand reproduzierbar hergestellt werden.
4. Fast alle bisher beschriebenen polyklonalen Antiseren gegen gereinigte ZP2-Proteine detektieren mehrere unterschiedliche Epitope. Da eine Kontamination mit anderen Zona pellucida-Proteinen auch in hoch angereicherten ZP2-Protein-

Präparationen nicht auszuschließen ist, kreuzreagieren polyklonale Antiseren häufig mit anderen Zona pellucida-, Eizell- oder Kumuluszell-Proteinen.

5. Der Vorteil gegenüber polyklonalen Antiseren gegen rekombinante Proteine liegt darin, daß Antikörper gegen synthetische Peptide einzelne, definierte Epitope erkennen, wogegen Antikörper gegen das Gesamtprotein eine Fülle von Epitopen erkennen können. Aussagen über die physiologische Bedeutung einer bestimmten linearen Proteindomäne können somit in der Regel nur mit Anti-Peptid-Antikörpern gemacht werden. Eine solche Spezifität gegenüber bestimmten Epitopen könnte theoretisch nur mit monoklonalen Antikörpern erreicht werden. Hier sind jedoch die Epitope, die von den jeweiligen Klonen detektiert werden, nicht vorherzusagen.

Für die Spezifität von Antikörpern ist neben der linearen Aminosäuresequenz auch die Konformation und Ladung des synthetischen Peptides von Bedeutung [123]. Synthetische Peptide sollten daher eine ausreichende Anzahl an Aminosäureresten aufweisen, damit das Peptid der Konformation des nativen Proteins zumindest zum Teil entspricht. Der Austausch einer Aminosäure in dem zur Immunisierung verwendeten Peptid kann eine erheblich verminderte oder auch verstärkte Antikörperproduktion zur Folge haben. Die Spezifität und Affinität von Antikörpern gegen synthetische Peptide werden durch die Auswahl der Aminosäuresequenz ebenfalls entscheidend beeinflußt. Der Unterschied in einer einzigen Aminosäure kann Veränderungen der Spezifität der polyklonalen Antikörper gegen das entsprechende Protein bedingen.

Im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen wurden erstmals Kaninchen-Antiseren gegen definierte Epitope des ZP2-Proteins hergestellt. Synthetische Peptide aus bekannten ZP2-Aminosäuresequenzen [115, 116] dienten dabei als Immunogene. Titerverläufe wurden im ELISA bestimmt. Diese weisen nach den Immunisierungen und Auffrischungen ansteigende Extinktionswerte auf. Trotz identischem Immunisierungsprotokoll zeigen die immunisierten Tiere aber individuelle Unterschiede in der Antikörperproduktion. Zum einen werden Unterschiede im Antikörpertiter beobachtet.

Zum anderen kann auch eine interindividuell variierende Qualität der produzierten Antikörper festgestellt werden: Kaninchen, die mit dem identischen synthetischen Peptid unter gleichen Bedingungen immunisiert wurden, generieren offensichtlich Antikörper gegen unterschiedliche Epitope. So detektiert Antiserum AS ZP2-26 ZP2-Protein in humanen, porcinen und bovinen Eizellen, wohingegen AS ZP2-27 ausschließlich humane Zonae pellucidae markiert. Somit ist nicht allein die Auswahl der Aminosäuresequenz von Bedeutung, sondern auch die Prozessierung und Präsentation des Antigens und die Generierung von Antikörpern durch das Versuchstier. Trotz identischer Behandlung der Kaninchen mit den gleichen Antigenen kann die Immunantwort ganz individuell verlaufen [92]. Da Vor- und Nachteile der Immunkontrazeption mit Zona pellucida-Antigenen in der Literatur ausgiebig diskutiert werden [53, 98, 161], hat diese Beobachtung in Hinblick auf die Entwicklung eines Zona pellucida-Vaccins Bedeutung. Generell wird von einem Kontrazeptivum eine sichere, vom Wirkmechanismus aus gesehene nachvollziehbare, immunologische oder pharmakologische Kontrazeption erwartet. Eine immunologische Schwangerschaftsverhütung erscheint nur dann sinnvoll, wenn eine gesicherte und zielgerichtete Antikörperproduktion gewährleistet ist. Wie hier im Kaninchen gezeigt, so berichten ebenfalls Lou et al. [119] im Mausmodell und Paterson et al. [147] bei Marmoset-Affen, daß nicht alle mit identischen ZP3-Peptiden immunisierten Tiere mit einer Antikörperproduktion auf die Peptide reagieren und nicht in jedem Fall ein Antikörpertiter erreicht wird, der die Fertilität signifikant und dauerhaft zuverlässig herabsetzt. Eine große interindividuelle Streubreite betreffend der Antikörperproduktion und der Antigenprozessierung könnte einen immunkontrazeptiven Ansatz mit ZP2-Antigenen im humanen System grundsätzlich in Frage stellen. Desweiteren zeigen mehrere Studien an Tiermodellen, daß eine vollständige Reversibilität einer Immunkontrazeption nur erreicht wird, wenn Peptidvaccine eingesetzt werden, die ausschließlich aus B-Zell-Epitopen bestehen [59, 98]. T-Zell-Epitope induzieren eine zelluläre Immunantwort, die zu einer destruktiven Entzündung des Ovars führt und dies irreversibel schädigt [120].

Durch Antiserum AS ZP2-20 kann immunhistochemisch ZP2 in Spezies nachgewiesen werden, deren Aminosäuresequenzen noch nicht bekannt sind (Rind, Ratte, Meerschweinchen). AS ZP2-20, das gegen eine homologe Aminosäuresequenz gerichtet ist, reagiert mit den Zonae pellucidae aller getesteter Spezies. Jedoch zeigen sich im Anfärbemuster speziesspezifische Unterschiede: Mensch-, Schwein-, Meerschweinchen- und Maus-Zonae pellucidae weisen eine stark positive Immunreaktion auf. Vergleichsweise schwach ist die Markierung an Rinder- und Ratten-Zonae pellucidae. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnten speziesspezifische Unterschiede in der Glykosylierung der ZP2-Proteine sein. Durch eine sterische Behinderung von Zuckerketten an den Epitopen oder an epitopnahen Bereichen könnte eine Antikörperbindung beeinträchtigt werden. Andererseits könnte die unterschiedliche immunhistochemische Anfärbbarkeit auch auf speziesspezifische Unterschiede im Aufbau des Zona pellucida-Netzwerkes zurückzuführen sein. Es ist durchaus vorstellbar, daß bestimmte antigene Epitope des ZP2-Proteins je nach Spezies unterschiedlich stark exponiert werden. Somit könnte es zu einer Maskierung oder Demaskierung von Epitopen und damit zu voneinander abweichenden Anfärbemustern kommen.

Im Ooplasma von Mensch-, Maus- und Rattenoozyten kann mit AS ZP2-20 immunreaktives Material nachgewiesen werden. Grund für eine Immunreaktion im Bereich des Ooplasmas könnte in den Eizellen befindliches ZP2 oder deren Vorstufen sein. Diese Resultate könnten im Einklang stehen mit den Ergebnissen von Takagi et al. [179], die mit einem monoklonalen Antikörper gegen Schweine-ZP3 immunreaktives Material sowohl in der Zona pellucida als auch im Ooplasma nachweisen können. Ebenso wird von Dunbar et al. [53] bei Schwein und Mensch Zona pellucida-Material in Oozyten lokalisiert.

Durch Antiserum AS ZP2-20 werden in Ovarschnitten von Rind, Mensch und Meerschweinchen ausläuferartige Strukturen der Zonae pellucidae in das umliegende Kumulusgewebe beobachtet. Insbesondere im Rinderovar sind lange, deutlich markierte Ausläufer zu sehen.

Zwei in der Literatur kontrovers diskutierte Gründe für Zona pellucida-Proteine außerhalb der Eizelle könnten diese Beobachtung erklären. Zum einen könnte es sich bei diesen Strukturen um ZP2-Protein oder um Abbauprodukte von ZP2 handeln, die in der Umgebung der Eizelle zu liegen kommen. In der Maus kann mit gentechnologischen Methoden eindeutig nachgewiesen werden, daß zumindest ZP3-Protein ausschließlich in der Eizelle und in keinem anderen Gewebe exprimiert wird [17, 18]. Analog wird von Shimizu et al. [173] die Oozyte als alleiniger Ursprungsort der Zona pellucida angenommen. Zum anderen wird diskutiert, daß Kumulus- und Granulosazellen Zona pellucida-Proteine de novo synthetisieren. Andere Arbeitsgruppen zeigen im Kaninchenmodell, daß Zona pellucida-Proteine auch in Kumuluszellen in vitro transkribiert, translatiert und sezerniert werden [111, 204]. Grootenhuis et al. [75] lokalisieren ZP3-Moleküle in den Granulosazellen von Kaninchen, Marmoset- und Rhesusaffen und Menschen und vermuten einen Zusammenhang mit der pathologischen Veränderung von Ovarien nach aktiver Immunisierung mit Zona pellucida-Bestandteilen. Der genaue Ursprung und die Funktion der epitoptragenden Ausläufer in Ovarien von Mensch, Rind und Meerschweinchen sind aber zur Zeit noch unbekannt.

Zum Zeitpunkt der Herstellung der Anti-ZP2-Antiseren waren nur die humane und die murine ZP2-Aminosäuresequenz bekannt. Zur Generierung eines "humanspezifischen" ZP2-Antiserums wurde ein Sequenzbereich ausgewählt, der sich in möglichst vielen Aminosäureresten von der respektiven Maus-ZP2-Sequenz unterscheidet. Das gegen die humane Aminosäuresequenz gerichtete Antiserum AS ZP2-26 reagiert erwartungsgemäß intensiv mit menschlichen Zonae pellucidae. Allerdings wird von diesem Antiserum (im Gegensatz zu AS ZP2-27) auch die Zona pellucida des Rindes und des Schweines deutlich markiert. Da die Aminosäuresequenz des bovinen ZP2-Proteins nicht bekannt ist, könnte davon ausgegangen werden, daß die bovine ZP2-Aminosäuresequenz eine ähnliche Aminosäuresequenz beinhaltet. Die porcine ZP2-Aminosäuresequenz ist mittlerweile publiziert worden [82] und unterscheidet sich in vier Aminosäureresten von der respektiven humanen Sequenz. Die abweichenden Aminosäurereste scheinen im Gegensatz zu AS ZP2-27 keinen Einfluß auf die Epitoperkennung von AS ZP2-26 zu besitzen. Dieser Befund deutet auf die Existenz zweier Epitope in dem als Antigen verwendeten synthetischen Peptid hin.

Die Zonae pellucidae von Maus, Meerschweinchen und Ratte zeigen immunhistochemisch keine Anfärbung durch AS ZP2-26 oder AS ZP2-27. Die ZP2-Aminosäuresequenzen von Meerschweinchen und Ratte sind noch nicht bekannt. Die Sequenz der Maus unterscheidet sich von der humanen Aminosäurenanordnung in fünf Positionen. Dabei sind zum Teil andere Aminosäurereste ausgetauscht als in der ZP2-Sequenz des Schweines. Die Unterschiede in der Aminosäuresequenz der Maus sind ausreichend, um, wie erwartet, zumindest in dieser Spezies und evtl. allgemein auch bei Nagern eine Kreuzreaktion auszuschließen.

In humanen, porcinen und bovinen Ovarien ist die immunhistochemische Anfärbung der Zonae pellucidae mit AS ZP2-26 wesentlich stärker als die vergleichbare Reaktion mit AS ZP2-20. Ursache hierfür könnte zum einen eine höhere Affinität des Antiserums AS ZP2-26 für ZP2-Protein sein. Diese Annahme wird auch durch die höheren Extinktionswerte im ELISA unterstützt. Zum anderen ist auch möglich, daß die durch die Antiseren detektierten Epitope in den Zonae pellucidae unterschiedlich stark exponiert und somit für eine Antikörperbindung mehr oder weniger zugänglich sind.

Zu weiteren immunbiochemischen und funktionellen Untersuchungen mit Anti-ZP2-Peptid-Antikörpern wurden die zwei Antiseren eingesetzt, AS ZP2-20 und AS ZP2-26, deren Titerverläufe im ELISA und Ergebnisse in den immunhistochemischen Experimenten am erfolgversprechendsten waren.

Für die folgenden immunbiochemischen Charakterisierungen der Anti-ZP2-Antiseren und die Identifizierung von ZP2-Protein in Proteingemischen wurden Immuno-Blots durchgeführt.

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Glykosylierungsmuster zeigen die Zona pellucida-Proteine eine starke Heterogenität betreffend ihrer Laufeigenschaften in Polyacrylamid-Gelen [59]. Zona pellucida-Glykoproteine stellen sich als breite, schlecht fokusierte Banden dar. Deshalb ist es in der Regel sehr problematisch, Zona pellucida-Proteine aufgrund ihrer apparenten Molekularmassen in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese genau zu definieren [50].

Im Immuno-Blot mit bovinen Eizellen und Zonae pellucidae werden sowohl von AS ZP2-20 als auch von AS ZP2-26 eine breite, z.T. flächig ausgezogene Bande im Molekularmassenbereich zwischen 70 und 80kDa detektiert. Hervorzuheben ist, daß durch AS ZP2-20 und AS ZP2-26 jeweils unterschiedliche Epitope des ZP2-Proteins detektiert werden. Somit ist davon auszugehen, daß es sich bei dem markierten bovinen

Zona pellucida-Protein auch tatsächlich um das in Mensch und Maus nachgewiesene Genprodukt von ZP2 handelt. Die Bestimmung der apparenten Molekularmasse des bovinen ZP2-Proteins unterstützt die Annahme, daß es sich bei dem von Noguchi et al. [143] unter reduzierenden Bedingungen beschriebenen 78kDa schweren Zona pellucida-Glykoprotein beim Rind, bzw. bei dem von Bercegeay et al. [13] als ZP1 bezeichneten 70-80kDa schweren bovinen Zona pellucida-Protein sehr wahrscheinlich um das dem Mensch und Maus analoge ZP2-Protein handelt. Es ist jedoch einschränkend festzustellen, daß die Ergebnisse einzelner Immuno-Blots mit Anti-ZP2-Peptid-Antiseren nicht immer identisch waren. So sind z.B. bei Immuno-Blots mit anderen Molekulargewichtsmarkern und einer anderen Detektionsmethode (Chemilumineszenz) von der gleichen Arbeitsgruppe andere apparente Molekularmassen für ZP2 (ca. 67kDa) ermittelt worden (Hinsch et al., unveröffentlichte Ergebnisse).

Im Vergleich zum Präimmunserum werden durch AS ZP2-20 und AS ZP2-26 in geringem Maße auch weitere Proteinbanden mit niedrigeren Molekularmassen detektiert. Es könnte sich hierbei um proteolytische Spaltprodukte von ZP2 handeln, die entweder präparationsbedingt entstanden sind oder physiologischerweise durch die Eizelle abgebaut wurden. Da diese Abbauprodukte ausschließlich entweder durch AS ZP2-20 oder durch AS ZP2-26 erkannt werden, läßt sich vermuten, daß die proteolytischen Fragmente jeweils nur das durch das entsprechende Antiserum detektierte Epitop enthalten.

Mit Hilfe von polyklonalen Antiseren gegen synthetische ZP2-Peptide gelang es somit zum ersten Mal, ein bovines Zona pellucida-Protein immunbiochemisch eindeutig als ZPA-Genprodukt zu identifizieren. Dieses Molekül entpricht dem Maus- und Mensch-ZP2-Protein. Durch diese hochspezifischen Marker kann jetzt auch (von methodischen Problemen abgesehen) posttranslational-modifiziertes ZP2-Protein im Immuno-Blot identifiziert und Veränderungen der apparenten Molekularmassen des ZP2-Proteins nachgewiesen, zugeordnet und dokumentiert werden.

Um eine eventuelle funktionelle Bedeutung der von den Anti-ZP2-Antiseren erkannten Epitope bestimmen zu können, wurden Spermatozoenbindungsstudien an isolierten Zonae pellucidae durchgeführt. Da die Zonae pellucidae von Oozyten inter- und intraindividuell zum Teil erhebliche Differenzen in ihrer Bindungskapazität für

Spermatozoen wie auch für Anti-Zona pellucida-Antikörper aufweisen [67, 94, 144], ist es notwendig, über eine interne Negativkontrolle im experimentellen Design zu verfügen. Methodisch wird dieses Problem durch die Entwicklung des Kompetitions-Hemizona-Assays im bovinen System mit dem Einsatz zweier gleich großer Hemizonae aus einer Eizelle gelöst. Mit diesem Versuchsaufbau können nun etwaige Veränderungen im Spermatozoenbindungsverhalten mit großer Wahrscheinlichkeit auf die vorherige Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern zurückgeführt werden.

Nach Etablierung dieses validen, aussagekräftigen Testsystems im Rindermodell wurde untersucht, ob die hergestellten Anti-ZP2-Antikörper funktionell die Spermatozoen-Zona pellucida-Bindung beeinflussen. Die im Kompetitions-Hemizona-Assay gewonnenen Testergebnisse zeigen, daß an mit AS ZP2-20 inkubierte Hemizonae signifikant weniger Spermatozoen fest binden als an die unbehandelten korrespondierenden Hälften. Auch der direkte Vergleich von AS ZP2-20-Antikörpern und AS ZP2-26-Antikörpern (beide Antiseren erkennen ZP2-Protein, sind aber gegen unterschiedliche Domänen gerichtet) ergibt, daß AS ZP2-20-Antikörper die Spermatozoen-Zona pellucida-Interaktion negativ beeinflussen. Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß das von AS ZP2-20 erkannte Epitop, das sich als eine lineare Aminosäuresequenz der ZP2-Protein-„backbone“ darstellt, sehr wahrscheinlich funktionelle Bedeutung für die Spermatozoenbindung an die Zona pellucida hat. Auch Antiserum AS ZP2-26, das eine andere ZP2-Domäne erkennt, markiert intensiv sein entsprechendes Epitop, aber die mit AS ZP2-26-Antikörpern behandelten Hemizonae weisen keine unterschiedlichen Bindungskapazitäten zu den internen Kontrollen auf. Der von AS ZP2-26 detektierte Bereich scheint demnach keine Bedeutung für die durch ZP2 vermittelte, sekundäre Bindung von Spermatozoen an die Zona pellucida zu besitzen. Allerdings kann eine funktionelle Bedeutung dieser Zona pellucida-Domäne auch nicht völlig ausgeschlossen werden, da glykosylierte Domänen des ZP2-Proteins durch Antikörper gegen synthetische Peptide nicht erfaßt werden können.

Die gegen unterschiedliche synthetische Peptide gerichteten Anti-ZP2-Antiseren binden an unterschiedliche Domänen des ZP2-Moleküls. Einerseits könnte es durch die Inkubation mit AS ZP2-20 zu einer direkten Blockierung des funktionellen Epitops gekommen sein, andererseits wäre auch eine Beeinflussung der Spermatozoen-Zona

pellucida-Interaktion durch eine sterische Behinderung des Antikörpermoleküls möglich, die nur indirekt die eigentlich relevante Domäne in ihrer funktionellen Integrität beeinträchtigt [85, 88, 153]. Im Gegensatz zu den Versuchen von Prasad et al. [153], die nach Fragmentierung der die Bindung hemmenden Antikörper gegen ein 55kDa schweres Zona pellucida-Protein im Kaninchenmodell keine signifikante Herabsetzung der Spermatozoenbindung mehr feststellen können, bleibt die Hemmung der Spermatozoen-Zona pellucida-Interaktion nach Einsatz von Fab_2-Fragmenten des Antiserums AS ZP2-20 erhalten (Hinsch et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Nach Herstellung von Fab_2-Fragmenten durch Pepsin-katalysierte limitierte Proteolyse von IgG-Antikörpern aus dem Antiserum AS ZP2-20 mit Hilfe des ImmunoPure® Fab Preparation Kit der Firma Pierce, Rockford, IL, USA, wurden die Fragmente analog zu den Versuchen mit intakten Immunglobulinen eingesetzt. Nach Inkubation der Hemizonae mit den Antikörperfragmenten wurde das Spermatozoen-Bindungsverhalten der Hemizonae mit der internen, unbehandelten Kontrolle verglichen. Auch in diesem Versuchsansatz ergibt sich eine als statistisch signifikant bewertete Hemmung der Spermatozoen-Zona pellucida-Interaktion nach Inkubation mit Fab_2-Fragmenten aus AS ZP2-20 (mittlerer Hemizona-Index=35,99±20,15, P=0,0006, n=6). Mit diesem experimentellen Ansatz kann eine sterische Behinderung relevanter ZP2-Domänen, die dem AS ZP2-20-Epitop entsprechen, zwar nicht ausgeschlossen werden, jedoch macht die relativ geringe Größe des AS ZP2-20-Antikörperfragmentes eine solche unspezifische Interaktion mit einer anderen funktionell bedeutsamen Domäne eher unwahrscheinlich.
Die Hemmung der Spermatozoen-Zona pellucida-Bindung durch AS ZP2-20-Antikörper ist im Mittel nicht höher als 50%. Ähnliche Ergebnisse sind von Gupta et al. [76] im porcinen Modell publiziert. Auch hier wird beschrieben, daß es durch monoklonale Antikörper zum Teil nur zu einer ca. 50% Behinderung der Spermatozoen-Zona pellucida-Bindung kommt. Das Fehlen einer generellen Blockade könnte mit einer unzureichenden Menge an Antikörpermolekülen oder mit einer zu geringen Affinität der Immunglobuline zu erklären sein. Ebenso könnte es auch möglich sein, daß für die sekundäre Bindung der Spermatozoen mehrere unterschiedliche Epitope des ZP2-Proteins verantwortlich sind. Nach der Blockierung eines Epitops durch AS ZP2-20 würden dann noch weitere Domänen für die sekundäre Bindung der Spermato-

zoen zur Verfügung stehen. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen kann nicht geklärt werden, inwieweit spezifische Bindungsstellen für die ZP2-Akrosin/Proakrosin-Interaktion durch die Antikörper blockiert werden. Diese Fragestellung wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Die Inhibition der Sekundärbindung durch AS ZP2-20 könnte sich folgendermaßen erklären lassen: Nach Primärbindung und induzierter akrosomaler Reaktion wird eine lockere, zweite Anheftung der Spermatozoen an die Zona pellucida postuliert [22]. Erst danach soll eine feste, sekundäre Bindung des Spermatozoons an die Zona pellucida stattfinden. Die Inkubation der Zona pellucida mit AS ZP2-20 verhindert diesen Schritt durch Blockierung eines funktionell wichtigen Epitops und führt zum Ablösen der nur locker gebundenen, motilen Spermatozoen. Diese Überlegungen decken sich mit den Beobachtungen von Hasegawa et al. [84, 85]. Nach Inkubation mit Antiseren, die gegen Zona pellucida-Proteine des Schweines gerichtet sind, findet diese Arbeitsgruppe eine signifikante Hemmung der Spermatozoen-Eizell-Bindung. Jedoch wird in einem Teil der Experimente nicht das initiale Bindungsstadium des Spermatozoons an die Zona pellucida blockiert, sondern erst eine sich anschließende sekundäre Interaktion gehemmt.

Gegenstand zukünftiger Untersuchungen müßte nun sein, das Akrosom der abgeschwommenen und der an die Zona pellucida gebundenen Spermatozoen zu untersuchen, um den durch die Antikörper ausgelösten Hemmechanismus genauer charakterisieren zu können. Würde die oben diskutierte Hypothese zutreffen, so müßte ein Großteil der Spermatozoen, die mit der Zona pellucida in Kontakt gekommen sind, ZP3-Protein vermittelt akrosomreagiert sein, aber nicht mit dem ZP2-Protein interagieren, also auch nicht mehr sekundär an die Zona pellucida binden können.

Bei der Auswertung der Kompetitions-Hemizona-Assays fällt auf, daß die Zonae pellucidae mit gebundenen Spermatozoen nach 4h in ihrer Konsistenz verändert sind. Sie weisen eine geringere Elastizität auf als zu Beginn der Assays. Die Zonahärtung soll laut Barros und Yanagimachi [11] durch die Reaktion der cortikalen Granula induziert werden. Da aber alle Eizellbestandteile entfernt sind, müssen andere Mechanismen zu dieser Veränderung der Konsistenz führen. Einerseits ist denkbar, daß es durch unphysiologische chemische Prozesse (z.B. auf Grund eines nicht optimalen

Mediums) zu dieser Veränderung kommt. Andererseits ist es auch möglich, daß Bestandteile der akrosomalen Matrix oder andere Proteine aus der Spermatozoen-kopfregion möglicherweise enzymatisch zu einem Umbau und damit zu einer Verhärtung des Zona pellucida-Netzes führen. Weiterhin könnten Antigen-Antikörper-Interaktionen die Rigidität des Zona pellucida-Netzwerkes verändern. Die Ursache für diese Beobachtung ist unbekannt und erfordert zur Klärung dieses Sachverhaltes weitere Untersuchungen.

Um die Inhibition der Spermatozoenbindung im Kompetitions-Hemizona-Assay auf die Inkubation mit AS ZP2-20 zurückführen zu können, mußte nachgewiesen werden, daß die Anti-ZP2-Antikörper auch tatsächlich an das native ZP2-Protein der Hemizonae binden. Die an die Hemizona gebundenen Antikörper werden im Hemizona-Antikörper-Bindungstest nachgewiesen. Mit Hilfe dieser Experimente ist es möglich, ein möglicherweise unterschiedliches Bindungsverhalten oder -muster von Anti-ZP2-Antikörpern an nativen, chemisch nicht modifizierten Zonae pellucidae der Eizellen zu untersuchen. Nach der Inkubation mit Anti-ZP2-Antiseren färben sich die Hemizonae nach Immunperoxidase-Reaktion deutlich stärker an als die entsprechenden unbehandelten Negativkontrollen. Allerdings sind, ähnlich wie bei den immunhistochemischen Untersuchungen an Gewebsschnitten aus Ovarien, unterschiedliche Färbeverhalten sowohl zwischen den Antiseren als auch speziesspezifische Unterschiede in der Intensität und dem Muster der Markierung festzustellen. Beispielsweise ist nach Immunperoxidase-Reaktion die Intensität der Anfärbung der bovinen Hemizonae mit AS ZP2-26 wesentlich stärker als die mit AS ZP2-20. Somit ist festzustellen, daß, trotz funktioneller Beeinträchtigung des Spermatozoen-Zona pellucida-Bindungsverhaltens durch AS ZP2-20-Antikörper, die Affinität dieser Immunglobuline für ihr Antigen wesentlich geringer ist als die der funktionell inaktiven, aber offensichtlich hochaffinen AS ZP2-26-Antikörper.

In diesen Experimenten zeigt sich auch wiederholt, daß die Hemizonae besonders im Randbereich intensiv angefärbt sind, wogegen sich das Zentrum schwächer angefärbt darstellt. Dieses differenzierte Bindungsverhalten könnte dadurch entstehen, daß antigene Epitope im Schnittbereich der Zonae pellucidae besonders stark erkannt werden können. Bedingt durch die mechanische Manipulation könnte es zu einer Desintegration des Zona pellucida-Netzwerkes und zur Demaskierung antigener Epitope kommen. Allerdings wäre in diesem Zusammenhang auch ein rein optisches Phänomen zu diskutieren, das durch Projektionen der halbkugelig auf Objektträgern angetrockneten Hemizonae entsteht. Überlagerungseffekte oder Summationsphänomene könnten ursächlich für diese Beobachtung verantwortlich sein.

Zudem fällt bei der Auswertung der Hemizona-Antikörper-Bindungstests auf, daß vor allem bei den Versuchsreihen mit bovinem Material nur ca. 80% der Zonae pellucidae durch Anti-ZP2-Peptid-Antikörper anfärbbar sind. Diese Beobachtung könnte auf den Einsatz von Oozyten mit unterschiedlichen Maturationsstadien zurückzuführen sein. Diese Eizellen könnten posttranslational modifizierte Epitope aufweisen, die nicht exponiert oder demaskiert sind und somit von den Anti-ZP2-Antiseren nicht erkannt werden können. Aber auch nach Maturation der Oozyten, die gemäß eines publizierten bovinen In vitro-Fertilisationsprotokolls [15] durchgeführt wurde und zu einem einheitlichen Reifegrad (Metaphase II) geführt hat, ist die Intensität der Antikörperbindung an das ZP2-Protein der Hemizonae sehr unterschiedlich. Dieses Phänomen spiegelt sich auch in den z.T. relativ hohen Standardabweichungen der Mittelwerte der Färbungsintensitäten (Scores) wider. Bei einem Teil der in vitro maturierten Eizellen ist keine Bindung von Antikörpern an die Zonae pellucidae festzustellen. Daraus läßt sich schließen, daß maturierte Eizellen individuell unterschiedliche Zonae pellucidae besitzen können. Dieses Phänomen könnte evtl. durch die Auswahl des Schlachttieres bedingt sein, dem das Ovar entnommen wurde. Die Reproduktion und Bildung funktionell intakter Eizellen bei Rindern wird stark vom Alter und Umweltfaktoren, wie z.B. Klima, Bestallung und Ernährung, beeinflußt [109, 139]. Es kann daher vermutet werden, daß manche Rinder aus diesen Gründen (evtl. endokrinologisch bedingt) nicht in der Lage sind, intakte Zonae pellucidae auszubilden. Die Zuordnung der Ovarien sowie die Herkunft der einzelnen Rinder und damit die Einflußfaktoren konnten jedoch rückwirkend vom Schlachthof aus nicht ermittelt werden. Antikörper gegen ZP3-Peptide können als Marker für die funktionelle Integrität der Zonae pellucidae zumindest im humanen Modell eingesetzt werden [93]. Analog zu den hergestellten Anti-ZP3-Antikörpern könnten möglicherweise auch gegen ZP2 gerichtete Antiseren Informationen über die Zona pellucida-Integrität [144] liefern und klären, ob das ZP2-

Molekül funktionell intakt vorhanden ist. Ducibella et al. [48] publizierten, daß es bei humanen Oozyten, die in der In vitro-Fertilization nicht befruchtbar sind, zum Teil eine spontane Reaktion der cortikalen Granula eingetreten ist und die Zona pellucida biochemisch verändert ist. Somit könnten die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen so zu erklären sein, daß die Zonae pellucidae bestimmter Tiere post-translational modifiziertes ZP2 beinhalten und dieses Protein auf Grund proteolytischer Modifikationen von den Anti-ZP2-Antiseren nicht mehr als Antigen erkannt werden kann.

Windt et al. [202] haben in der Spezies Maus gezeigt, daß der HZA als experimentelles Modell eingesetzt werden kann, um die Inhibition der Spermatozoenbindung an Zonae pellucidae zu untersuchen. Folglich könnte der im Rahmen dieser Dissertation entwickelte bovine Kompetitions-Hemizona-Assay als Testmodell dienen, das kontrazeptive Potential gewonnener Antiseren und Substanzen zu untersuchen [91].

Die gute Verfügbarkeit boviner Gameten bei Schlachttieren bzw. bei Besamungsstationen könnte den Einsatz und die Tötung von Labortieren zum Studium der Spermatozoen- und Eizellfunktionen oder -Interaktionen wesentlich verringern. Auch ethischen Bedenken bei der Verwertung humaner Gameten könnte durch den Einsatz des bovinen Kompetitions-Hemizona-Assays entgegengetreten werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen sollten dazu geeignet sein, zum Verständnis der komplexen Vorgänge der Spermatozoen-Zona pellucida-Interaktion beizutragen. Neue Erkenntnisse über molekulare Mechanismen der Fertilisierung sind die Grundlage für das Verständnis der Physiologie und eine daraus abgeleitete, rationale pharmakologische Intervention im Reproduktionsgeschehen. Beispielsweise könnten mit synthetisch hergestellten ZP2-Peptiden immunkontrazeptive Studien durchgeführt werden, um eine weitere Möglichkeit der individuellen Familienplanung zur Verfügung stellen zu können.

Das bovine Modell ist ein nützliches und praktikables System, dessen Ergebnisse möglicherweise auch auf den Menschen zu übertragen sind [91]. Die Anwendung des Rindermodells wäre somit sowohl in der Ursachenerforschung bei unerfülltem Kinderwunsch als auch bei der Überprüfung reproduktionstoxikologischer Fragestellungen denkbar [81]. Anti-ZP2-Peptid-Antiseren könnten in Analogie zu Anti-ZP3-Antiseren [90, 144] in weiterführenden Studien eingesetzt werden, um die Integrität und Funktionsfähigkeit der Zonae pellucidae von Patientinnen mit unerfülltem Kinderwunsch zu überprüfen. Ziel wäre es, mit einem auf Anti-ZP2-Antikörpern basierenden Testsystem die Entscheidung für eine rationale Therapie (z.B. IUI, IVF oder ICSI) bei unerfülltem Kinderwunsch zu erleichtern.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Antiseren gegen synthetische ZP2-Peptide hergestellt. Die Anti-ZP2-Peptid-Antiseren wurden eingesetzt, um ZP2-Protein immunbiochemisch und immunhistologisch zu identifizieren. Desweiteren wurden die Antikörper zum Nachweis funktionell relevanter Domänen des ZP2-Proteins verwendet. Synthetische ZP2-Peptide wurden anhand bekannter molekularbiologisch isolierter cDNA-Stränge und den daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen hergestellt.

Nach Auswahl und Synthese von ZP2-Aminosäuresequenzen, die entweder humanspezifisch oder speziesübergreifend (homolog) sind, konnten in Kaninchen hochtitrige Antiseren generiert werden. Die Anti-ZP2-Peptid-Antiseren AS ZP2-20 und AS ZP2-21 (Antigen: homologes ZP2-Peptid) sowie AS ZP2-26 und AS ZP2-27 (Antigen: humanes ZP2-Peptid) erkennen im ELISA das jeweilige ZP2-Peptid, das als Antigen eingesetzt wurde. Bei der Bestimmung der ZP2-Antikörpertiter gegen ihr synthetisches Peptid zeigt sich titrationsabhängig der Gehalt an spezifischen Anti-ZP2-Antikörpern gegenüber den Präimmunseren, wobei keine Kreuzreaktionen der Anti-ZP2-Peptid-Antiseren mit anderen Peptiden festzustellen waren.

Mit Hilfe der Anti-ZP2-Antikörper wurde das Zona pellucida-Protein 2 (ZP2) auf Paraffinschnitten aus den Ovarien von Rind, Mensch, Schwein, Maus, Meerschweinchen und Ratte identifiziert. Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigen, daß AS ZP2-20 Zona pellucida-Protein in Ovarien aller untersuchten Spezies detektiert. Nach Einsatz von AS ZP2-21 kommt es zu einer Immunreaktion mit Zona pellucida-Proteinen von Rind, Mensch und Maus. Obwohl AS ZP2-26 gegen ein humanes ZP2-Peptid gerichtet ist, reagieren die Antikörper mit Zona pellucida-Proteinen im humanen, bovinen und porcinen Ovar. Zona pellucida-Proteine von Nagetierovarien werden nicht erkannt. AS ZP2-27 markiert ausschließlich Zona pellucida-Protein im humanen Ovar. Die entsprechenden Präimmunseren führen zu keiner Anfärbung in den getesteten Ovarien. Diese Ergebnisse zeigen, daß Antiseren gegen synthetische ZP2-Peptide auch mit Zona pellucida-Protein reagieren.

Durch Immuno-Blots mit Anti-ZP2-Peptid-Antiseren und extrahierten bovinen Eizellproteinen konnte demonstriert werden, daß die Antiseren AS ZP2-20 und AS ZP2-26 mit breiten, immunreaktiven Proteinbanden mit identischen apparenten Molekularmassen (70-80kDa) reagieren. Diese Ergebnisse bestätigen die Literaturangaben, in denen das bovine ZP2-Protein als ein Glykoprotein mit einer Masse von 70-80kDa beschrieben wird.

Mit Hilfe des Hemizona-Antikörper-Bindungstests konnte nachgewiesen werden, daß AS ZP2-20- und AS ZP2-26-Antikörper an natives, biochemisch nicht modifiziertes Zona pellucida-Protein von Rind, Mensch und Schwein binden. Im Vergleich zu den mit Präimmunseren behandelten, korrespondierenden Hemizonae kommt es zu einer deutlichen Immun-Peroxidase-Reaktion der mit Anti-ZP2-Peptid-Antikörper behandelten Test-Hemizonae.

Der bovine Kompetitions-Hemizona-Assay wurde als In vitro-Testsystem zur Identifizierung funktionell relevanter Domänen eingesetzt. Nach Einsatz von Antiserum AS ZP2-20 konnte ein ZP2-Protein-Epitop identifiziert werden, das sehr wahrscheinlich für die Spermatozoen-Zona pellucida-Bindung von Bedeutung ist. Im Vergleich zu Kontrollseren (AS ZP2-26 und Präimmunseren) ist nach Vorbehandlung der Hemizonae mit AS ZP2-20-Antikörpern die Anzahl der gebundenen Spermatozoen um etwa die Hälfte herabgesetzt.

Die hier vorgestellten Untersuchungen zeigen, daß Antikörper gegen synthetische ZP2-Peptide als spezifische Marker für ZP2-Protein eingesetzt werden können. Außerdem sind Antikörper gegen definierte ZP2-Protein-Domänen als Hilfsmittel für Untersuchungen physiologischer Abläufe der Spermatozoen-Eizell-Interaktion geeignet.

6 Literaturliste

[1] Adham, I.M., Nayernia, K., Engel, W.: Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. Mol Reprod Dev (46), 370-376, 1997.

[2] Aitken, R.J., Paterson, M., Braude, P., Thillai Koothan, P.: Evaluation of glycosylated and deglycosylated porcine zona antigens for contraceptive efficacy in vivo and in vitro, in: N.J. Alexander, D. Griffin, J.M. Spieler, G.M.H. Waites (eds.): Gamete Interaction: Prospects for Immuncontraception. Wiley-Liss, New York, 1990, 277-292.

[3] Al Hasani, S., Küpker, W., Diedrich, K.: Männliche Subfertilität und therapeutische Möglichkeiten der assistierten Reproduktion, in: F.H. Fischl (ed.): Kinderwunsch. In Vitro Fertilisierung und Assistierte Reproduktion - Neue Erkenntnisse und Therapiekonzepte. Möglichkeiten, Erfüllbarkeit und Machbarkeit in unserer Zeit. Krause & Pachernegg GmbH, Wien, 1995, 145-162.

[4] Allison, A.C., Hartree, E.F.: Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. J Reprod Fertil (21), 501-515, 1970.

[5] Aonuma, S., Mayumi, T., Suzuki, K., Noguchi, T., Iwai, M., Okabe, M.: Studies on sperm capacitation. I. The relationship between a given sperm-coating antigen and a sperm capacitation phenomenon. J Reprod Fertil (35), 425-432, 1973.

[6] Austin, C.R.: Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Aust J Sci Res [B] (4), 581-596, 1951.

[7] Austin, C.R.: Capacitation of spermatozoa. Int J Fertil (12), 25-31, 1967.

[8] Avilés, M., Jaber, L., Castells, M.T., Kan, F.K.W., Ballesta, J.: Modifications of the lectin binding pattern in the rat zona pellucida after in vivo fertilization. Mol Reprod Dev (44), 370-381, 1996.

[9] Baba, T., Azuma, S., Kashiwabara, S., Toyoda, Y.: Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. J Biol Chem (269), 31845-31849, 1994.

[10] Barany, G., Merrifield, R.B.: Solid-phase peptide synthesis, in: E. Gross, J. Meienhofer, (eds.): The Peptide, Vol. 2A. Academic press, New York, 1979, 1-284.

[11] Barros, C., Yanagimachi, R.: Induction of the zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material. Nature (233), 268-269, 1971.

[12] Barros, C., Yanagimachi, R.: Polyspermy-preventing mechanisms in the golden hamster egg. J Exp Zool (180), 251-266, 1972.

[13] Bercegeay, S., Allaire, F., Jean, M., L'Hermite, A., Bruyas, J.F., Renard, N., Tainturier, D., Barrière, P.: La zone pellucide bovine: différences de composition macromoléculaire entre ovocytes, prétraités ou non à l'A 23187, et embryons. Reprod Nutr Dev (33), 567-576, 1993.

[14] Bercegeay, S., Jean, M., Lucas, H., Barrière, P.: Composition of human zona pellucida as revealed by SDS-PAGE after silver staining. Mol Reprod Dev (41), 355-359, 1995.

[15] Berg, U., Brem, G.: In vitro production of bovine blastocysts by in vitro maturation and fertilization of oocytes and subsequent in vitro culture. Zuchthyg (24), 134-139, 1989.

[16] Bleil, J.D., Wassarman, P.M.: Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. Cell (20), 873-882, 1980.

[17] Bleil, J.D., Wassarman, P.M.: 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, 1980.

[18] Bleil, J.D., Wassarman, P.M.: Synthesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture in vitro. Proc Natl Acad Sci USA (77), 1029-1033, 1980.

[19] Bleil, J.D., Beall, C.F., Wassarman, P.M.: Mammalian sperm-egg interaction: fertilization of mouse eggs triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein, ZP2. Dev Biol (86), 189-197, 1981.

[20] Bleil, J.D., Wassarman, P.M.: Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. Dev Biol (95), 317-324, 1983.

[21] Bleil, J.D., Wassarman, P.M.: Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm. J Cell Biol (102), 1363-1371, 1986.

[22] Bleil, J.D., Greve, J.M., Wassarman, P.M.: Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. Dev Biol (128), 376-385, 1988.

[23] Bleil, J.D., Wassarman, P.M.: Galactose at the nonreducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity. Proc Natl Acad Sci USA (85), 6778-6782, 1988.

[24] Bleil, J.D., Wassarman, P.M.: Identification of a ZP3-binding protein on acrosome-intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking. Proc Natl Acad Sci USA (87), 5563-5567, 1990.

[25] Blobel, C.P., Wolfsberg, T.G., Turck, C.W., Myles, D.G., Primakoff, P., White, J.M.: A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. Nature (356), 248-252, 1992.

[26] Bondioli, K.R., Wright, R.W.: In vitro fertilization of bovine oocytes by spermatozoa capacitated in vitro. J Anim Sci (57), 1001-1005, 1983.

[27] Bookbinder, L.H., Cheng, A., Bleil, J.D.: Tissue- and species-specific expression of sp56, a mouse sperm fertilization protein. Science (269), 86-89, 1995.

[28] Bork, P.: Sperm-egg binding protein or proto-oncogene? Science (271) 1431-1432, 1996.

[29] Brown, C.R., Cheng, W.T.K.: Limited proteolysis of the porcine zona pellucida by homologous sperm acrosin. J Reprod Fertil (74), 257-260, 1992.

[30] Bucher, O., Wartenberg, H.: Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, 11. Auflage. Verlag Hans Huber, Bern, 1989, 520-531.

[31] Burkman, L.J., Coddington, C.C., Franken, D.R., Kruger, T.F., Rosenwaks, Z., Hodgen, G.D.: The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. Fertil Steril (49), 688-697, 1988.

[32] Burks, D.J., Carballada, R., Moore, H.D.M., Saling, P.M.: Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. Science (269), 83-86, 1995.

[33] Castle, P.E., Dean, J.: Molecular genetics of the zona pellucida: implications for immunocontraceptive strategies. J Reprod Fertil (50, Suppl.), 1-8, 1996.

[34] Castle, P.E., Whaley, K.J., Hoen, T.E., Moench, T.R., Cone, R.A.: Contraceptive effect of sperm-agglutinating monoclonal antibodies in rabbits. Biol Reprod (56), 153-159, 1997.

[35] Chamberlin, M.E., Dean, J.: Genomic organization of a sex specific gene: the primary sperm receptor of the mouse zona pellucida. Dev Biol (131), 207-214, 1989.

[36] Chamberlin, M.E., Dean, J.: Human homolog of the mouse sperm receptor. Proc Natl Acad Sci USA (87), 6014-6018, 1990.

[37] Chang, M.C.: Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. Nature (168), 697-698, 1951.

[38] Chang, M.C.: Development of fertilizing capacity of rabbit spermatozoa in the uterus. Nature (175), 1036-1037, 1955.

[39] Chang, Y.S., Wang, S.C., Tsao, C.C., Huang, F.L.: Molecular cloning, structural analysis, and expression of carp ZP3 gene. Mol Reprod Dev (44), 295-304, 1996.

[40] Choi, T.S., Mori, M., Kohmoto, K., Shoda, Y.: Beneficial effect of serum on the fertilizability of mouse oocytes matured in vitro. J Reprod Fertil (79), 565-568, 1987.

[41] Clark, G.F., Patankar, M.S., Hinsch, K.-D., Oehninger, S.: New concepts in human sperm-zona pellucida interaction. Hum Reprod (10, Suppl. 1) 31-37, 1995.

[42] Clarke, G.N., Liu, D.Y., Baker, H.W.: Immunoinfertility: a case study with implications for immunocontraception. Arch Androl (35), 21-27, 1995.

[43] Coonrod, S.A., Herr, J.C., Westhusin, M.E.: Inhibition of bovine fertilization in vitro by antibodies to SP-10. J Reprod Fertil (107), 287-297, 1996.

[44] Dalvit, G.C., Miragaya, M.H., Chavez, M.G., Beconi, M.T.: Energy requirement of bovine spermatozoa for in vitro capacitation. Theriogenology (44), 1051-1058, 1996.

[45] Dandekar, P., Mate, K.E., Talbot, P.: Perivitelline space of marsupial oocytes: extracellular matrix of the unfertilized oocyte and formation of a cortical

granule envelope following the cortical reaction. Mol Reprod Dev (41), 368-373, 1995.

[46] Downs, S.M., Schroeder, A.C., Eppig, J.J.: Serum maintains the fertilizability of mouse oocytes matured in vitro by preventing the hardening of the zona pellucida. Gam Res (15), 115-122, 1986.

[47] Ducibella, T.: Mammalian egg cortical granules and the cortical reaction, in: P.M. Wassarman (ed.): Elements of Mammalian Fertilization, Volume I. CRC Press, Inc., Boca Raton, 1991, 205-231.

[48] Ducibella, T., Dubey, A., Gross, V., Emmi, A., Penzias, A.S., Layman, L., Reindollar, R.: A zona biochemical change and spontaneous cortical granule loss in eggs that fail to fertilize in in vitro fertilization. Fertil Steril (64), 1154-1161, 1995.

[49] Dunbar, B.S., Raynor, B.D.: Characterization of porcine zona pellucida antigens. Biol Reprod (22), 941-954, 1980.

[50] Dunbar, B.S., Liu, C., Sammons, D.W.: Identification of three major proteins of porcine and rabbit zonae pellucidae by high resolution two-dimensional gel electrophoresis: comparison with serum, follicular fluid, and ovarian cell proteins. Biol Reprod (24), 1111-1124, 1981.

[51] Dunbar, B.S.: Morphological, biochemical, and immunochemical characterization of the mammalian zona pellucida, in: J.F. Hartmann (ed): Mechanism and Control of Animal Fertilization. Academic Press, New York, 1983, 139-157.

[52] Dunbar, B.S., Prasad, S.V., Timmons, T.M.: Comparative structure and function of mammalian zonae pellucidae, in: B.S. Dunbar, M.G. O'Rand (eds): A Comparative Overview of Mammalian Fertilization. Plenum Press, New York, 1991, 97-114.

[53] Dunbar, B.S., Avery, S., Lee, V., Prasad, S., Schwahn, D., Schwoebel, E., Skinner, S., Wilkins, B.: The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology, and developmental expression. Reprod Fertil Dev (6), 331-347, 1994.

[54] Duncan, A.E., Fraser, L.R.: Cyclic AMP-dependent phosphorylation of epididymal mouse sperm proteins during capacitation in vitro: identification of a M_r 95000 phosphotyrosine-containing protein. J Reprod Fertil (97), 287-299, 1993.

[55] East I.J., Mattison, D.R., Dean, J.: Monoclonal antibodies to the major protein of the murine zona pellucida: effects on fertilization and early development. Dev Biol (104), 49-56, 1984.

[56] East, I.J., Gulyas, B.J. Dean, J.: Monoclonal antibodies to the murine zona pellucida protein with sperm receptor activity: effects on fertilization and early development. Dev Biol (109), 268-273, 1985.

[57] Eddy, E.M., O'Brien, D.A.: The spermatozoon, in: E. Knobil, J.D. Neill (eds.): The Physiology of Reproduction, Second Edition. Raven Press, Ltd., New York, 1994, 29-78.

[58] Endo, Y., Lee, M.A., Kopf, G.S.: Evidence for the role of a guanine nucleotide-binding regulatory protein in the zona pellucida-induced mouse sperm acrosome reaction. Dev Biol (119), 210-216, 1987.

[59] Epifano, O., Dean, J.: Biology and structure of the zona pellucida: a target for immuncontraception. Reprod Fertil Dev (6), 319-330, 1994.

[60] Epifano, O., Liang, L.-F., Dean, J.: Mouse ZP1 encodes a zona pellucida protein homologous to egg envelope proteins in mammals and fish. J Biol Chem (270), 27254-27258, 1995.

[61] Epifano, O., Liang, L.F., Familari, M., Moos, M.C., Dean, J.: Coordinate expression of the three zona pellucida genes during mouse oogenesis. Development (121), 1947-1956, 1995.

[62] Eppig, J.J.: Mammalian oocyte development in vivo and in vitro, in: P.M. Wassarman (ed.): Elements of Mammalian Fertilization, Volume I. CRC Press, Inc., Boca Raton, 1991, 57-76.

[63] Fawcett, D.W.: The mammalian spermatozoon. Dev Biol (44), 394-436, 1975.

[64] Florman, H.M., Bechtol, K.B., Wassarman, P.M.: Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm. Dev Biol (106), 243-255, 1984.

[65] Florman, H.M., Wassarman, P.M.: O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. Cell (41), 313-324, 1985.

[66] Florman, H.M., Lemos, J.R., Arnoult, C., Oberdof, J.A., Zeng, Y.: Exo(cyto)tic ion channels in mammalian sperm, in: P. Fénichel, J. Parinaud (eds.): Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM (236) / John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge, 1995, 179-189.

[67] Franken, D.R., Coddington, C.C., Burkman, L.J., Oosthuizen, W.T., Oehninger, S.C., Kruger, T.F., Hodgen, G.D.: Defining the valid hemizona assay: accounting for binding variability within zonae pellucidae and within semen samples from fertile males. Fertil Steril (56), 1156-1161, 1991.

[68] Fraser, L.R.: Cellular biology of capacitation and the acrosome reaction. Hum Reprod (10, Suppl. 1) 22-30, 1995.

[69] Fraser, L.R.: Mechanisms regulating capacitation and the acrosome reaction, in: P. Fénichel, J. Parinaud (eds.): Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM (236) / John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge, 1995, 17-33.

[70] Fusi, F.M., Vignali, M., Busacca, M., Bronson, R.A.: Evidence for the presence of an integrin cell adhesion receptor on the oolemma of unfertilized human oocytes. Mol Reprod Dev (31), 215-222, 1992.

[71] Fusi, F.M., Vignali, M., Gailit, J., Bronson, R.A.: Mammalian oocytes exhibit specific recognition of the RGD (Arg-Gly-Asp) tripeptide and express oolemmal integrins. Mol Reprod Dev (36), 212-219, 1993.

[72] Gordts, S., Vercruyssen, M., Roziers, P., Bassil, S., Demylle, D., Donnez, J., Campo, R.: Recent developments in assisted fertilization. Hum Reprod (10, Suppl. 1) 107-114, 1995.

[73] Greve, J.M., Salzmann, G.S., Roller, R.J., Wassarman, P.M.: Biosynthesis of the major zona pellucida glycoprotein secreted by oocytes during mammalian oogenesis. Cell (31), 749-759, 1982.

[74] Greve, J.M., Wassarman, P.M.: Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. J Mol Biol (181), 253-264, 1985.

[75] Grootenhuis, A.J., Philipsen, H.L.A., Debreetgrijsbach, J.T.M., van Duin, M.: Immunocytochemical localization of ZP3 in primordial follicles of rabbit, marmoset, rhesus monkey, and human ovaries using antibodies against human ZP3. J Reprod Fertil (50, Suppl.), 43-54, 1996.

[76] Gupta, S.K., Yurewicz, E.C., Afzalpurkar, A., Rao, K.V.S., Gage, D.A., Wu, H., Sacco, A.G.: Localization of epitopes for monoclonal antibodies at the N-terminus of the porcine zona pellucida glycoprotein pZPC. Mol Reprod Dev (42), 220-225, 1995.

[77] Gupta, S.K., Chadha, K., Harris, J.D., Yurewicz, E.C., Sacco, A.G., Kolluri, S.K., Afzalpurkar, A.: Mapping of epitopes on porcine zona pellucida-3α by monoclonal antibodies inhibiting oocyte-sperm interaction. Biol Reprod (55), 410-415, 1996.

[78] Gwatkin, R.B.L.: Fertilization mechanisms in man and mammals. Plenum Press, New York, 1977.

[79] Gwatkin, R.B.L., Andersen, O.F., Williams, D.T.: Large scale isolation of bovine and pig zonae pellucidae: chemical, immunological, and receptor properties. Gam Res (3), 217-231, 1980.

[80] Hägele, W., Eberl, M., Köhn, F.-M., Hinsch, E., Schill, W.-B., Hinsch, K.-D.: The platinum salt $[Pt(NH_3)_4]Cl_2$ affects the acrosome reaction and sperm-zona pellucida binding. Hum Reprod (12, Abstr. Book 1) 132, 1997.

[81] Haidl, G., Schill, W.-B.: Andrologische Untersuchungsmethoden und Therapieprinzipien beim männlichen Sterilitätsfaktor. Gynäkologe (23), 203-208, 1990.

[82] Harris, J.D., Hibler, D.W., Fontenot, G.K., Hsu, K.T., Yurewicz, E.C., Sacco, A.G.: Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. DNA Sequence (4), 361-393, 1994.

[83] Harrison, R.A.P.: Capacitation mechanisms and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. Reprod Fertil Dev (8), 581-594, 1996.

[84] Hasegawa, A., Koyama, K., Isojima, S.: Isolation of four major glycoprotein families (ZP1, ZP2, ZP3, ZP4) of porcine zona pellucida and characterization of

antisera raised to each glycoprotein family. Acta Obst Gynaec Jpn (43), 221-226, 1991.

[85] Hasegawa, A., Yamasaki, N., Inoue, M., Koyama, K., Isojima, S.: Analysis of an epitope sequence recognized by a monoclonal antibody MAb-5H4 against a porcine zona pellucida glycoprotein (pZP4) that blocks fertilization. J Reprod Fertil (105), 295-302, 1995.

[86] Hatanaka, Y., Nagai, T., Tobita, T., Nakano, M.: Changes in the properties and composition of the zona pellucida of pigs during fertilization in vitro. J Reprod Fertil (95), 431-440, 1992.

[87] Hedrick, J.L., Wardrip, N.J.: Isolation of the zona pellucida and purification of its glycoprotein families from pig oocytes. Analyt Biochem (157), 63-70, 1986.

[88] Henderson, C.J., Hulme, M.J., Aitken, R.J.: Contraceptive potential of antibodies to the zona pellucida. J Reprod Fertil (83), 325-343, 1988.

[89] Hernández, E.O., Roa-Espitia, A.L., Trejo, J.C., Mújica, A.: Sperm protein (sp50) binds to acrosome and plasma membranes in a Ca^{2+}-dependent manner: possible role in acrosome reaction. Mol Reprod Dev (43), 366-375, 1996.

[90] Hinsch, E., Hinsch, K.-D.: Generation of antisera against mouse and human synthetic ZP3 peptides. Andrologia (28, Suppl. 1) 9-14, 1996.

[91] Hinsch, E., Ponce, A.A., Hägele, W., Hedrich, F., Müller-Schlösser, F., Schill, W.-B., Hinsch, K.-D.: A new combined in-vitro test model for the identification of substances affecting essential sperm functions. Hum Reprod (12), 1673-1681, 1997.

[92] Hinsch, K.-D., Hinsch, E., Aumüller, G., Tychowiecka, I., Schultz, G., Schill, W.-B.: Immunological identification of G protein α- and β-subunits in tail membranes of bovine spermatozoa. Biol Reprod (47), 337-346, 1992.

[93] Hinsch, K.-D., Hinsch, E., Meinecke, B., Töpfer-Petersen, E., Pfisterer, S., Schill, W.-B.: Identification of mouse ZP3 protein in mammalian oocytes with antisera against synthetic ZP3 peptides. Biol Reprod (51), 193-204, 1994.

[94] Hinsch, K.-D., Hinsch, E., Pfisterer, S., Schill, W.-B., Gibbons, W.E., Hodgen, G.D., Oehninger, S.: Anti-ZP3 antibodies binding to the human zona pellucida: effect of oocyte-storage conditions. Am J Reprod Immunol (32), 146-151, 1994.

[95] Holt, W.V.: The sperm plasma membrane, in: P. Fénichel, J. Parinaud (eds.): Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM (236) / John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge, 1995, 1-15.

[96] Jaffe, L.A., Sharp, A.P., Wolf, D.P.: Absence of an electrical polyspermy block in the mouse. Dev Biol (96), 317-323, 1983.

[97] Jansen, S., Quigley, M., Reik, W., Jones, R.: Analysis of polysulfate-binding domains in porcine proacrosin, a putative zona adhesion protein from mammalian spermatozoa. Int J Dev Biol (39), 501-510, 1995.

[98] Jones, W.R.: Gamete immunology. Hum Reprod (9, Suppl. 2) 107-124, 1994.

[99] Kanitz, W.: Biologische Grundlagen der Fruchtbarkeit beim weiblichen Rind. Züchtungskunde (66), 413-427, 1994.

[100] Katsumata, T., Noguchi, S., Yonezawa, N., Tanokura, M., Nakano, M.: Structural characterization of the N-linked carbohydrate chains of the zona pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs. Euro J Biochem (240), 448-453, 1996.

[101] Kaul, R., Afzalpurkar, A., Gupta, S.K.: Strategies for designing an immunocontraceptive vaccine based on zona pellucida synthetic peptides and recombinant antigen. J Reprod Fertil (50, Suppl.), 127-134, 1996.

[102] Kopf, G.S., Woolkalis, M.J., Gerton, G.L.: Evidence for a guanine nucleotide-binding regulatory protein in invertebrate and mammalian sperm: identification by islet-activating protein catalyzed ADP-ribosylation and immunochemical methodes. J Biol Chem (261), 7327-7331, 1986.

[103] Kopf, G.S., Gerton, G.L.: The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction, in: P.M. Wassarman (ed.): Elements of Mammalian Fertilization, Volume I. CRC Press, Inc., Boca Raton, 1991, 153-203.

[104] Koyama, K., Hasegawa, A., Inoue, M., Taya, T., Tsubamoto, H., Yamasaki, N.: Studies on the epitope of pig zona pellucida recognized by a fertilization blocking monoclonal antibody. J Reprod Fertil (50, Suppl.), 135-142, 1996.

[105] Krchnak, V., Mach, O., Maly, A.: Computer prediction of potential immunogenic determinants from protein amino acid sequence. Anal Biochem (165), 200-207, 1987.

[106] Kruger, T.F., Oehninger, S., Franken, D.R., Hodgen, G.D.: Hemizona assay: use of fresh versus salt-stored human oocytes to evaluate sperm binding potential to the zona pellucida. J In Vitro Fert Embryo Transf (8), 154-156, 1991.

[107] Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. Nature (227), 680-685, 1970.

[108] Leclerc, P., de Lamirande, E., Gagnon, C.: Cyclic adenosine 3´,5´mono-phosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. Biol Reprod (55), 684-692, 1996.

[109] Lee, C.N.: Environmental stress effects on bovine reproduction. Vet Clin North Am Food Anim Pract (9), 263-273, 1993.

[110] Lee, M.A., Trucco, G.S., Bechtol, K.B. Wummer, N., Kopf, G.S., Blasco, L., Storey, B.T.: Capacitation and acrosome reaction in human spermatozoa monitored by chlortetracycline fluorescence assay. Fertil Steril (48), 649-658, 1987.

[111] Lee, V.H., Dunbar, B.S.: Development expression of the rabbit 55kDa zona pellucida protein and messenger RNA in ovarian follicles. Dev Biol (155), 371-382, 1993.

[112] Leyton, L., Saling, P.: Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. J Cell Biol (108), 2163-2168, 1989.

[113] Leyton, L., Saling, P.: 95kDa sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. Cell (57), 1123-1130, 1989.

[114] Leyton, L., LeGuen, P., Bunch, D., Saling, P.M.: Regulation of mouse gamete interaction by a sperm tyrosine kinase. Proc Natl Acad Sci USA (89), 11692-11695, 1992.

[115] Liang, L.-F., Chamow, S.M., Dean, J.: Oocyte-specific expression of mouse ZP-2: developmental regulation of the zona pellucida genes. Mol Cell Biol (10), 1507-1515, 1990.

[116] Liang, L.-F., Dean, J.: Conservation of mammalian secondary sperm receptor genes enables the promoter of the human gene to function in mouse oocytes. Dev Biol (156), 399-408, 1993.

[117] Litscher, E.S., Juntunen, K., Seppo, A., Penttila, L., Niemela, R., Renkonen, O., Wassarman, P.M.: Oligosaccharide constructs with defined structures that inhi-

bit binding of mouse sperm to unfertilized eggs in vitro. Biochemistry (34), 4662-4669, 1995.

[118] Lo-Leggio, L., Williams, R.M., Jones, R.: Some effects of zona pellucida glycoproteins and sulfated polymers on the autoactivation of boar sperm proacrosin and activity of beta-acrosin. J Reprod Fertil (100), 177-185, 1994.

[119] Lou, Y.H., Ang, J., Thai, H., McElveen, M.F., Tung, K.S.K.: A zona pellucida 3 peptide vaccine induces antibodies and reversible infertility without ovarian pathology. J Immunol (155), 2715-2720, 1995.

[120] Lou, Y.H., Bagavant, H., Ang, J., McElveen, M.F., Thai, H., Tung, K.S.K.: Influence of autoimmune ovarian disease pathogenesis on ZP3 contraceptive vaccine design. J Reprod Fertil (50, Suppl.), 159-163, 1996.

[121] Lunsford, R.D., Jenkins, N.A., Kozak, C.A., Liang, L.-F., Silan, C.M., Copeland, N.G., Dean, J.: Genomic mapping of murine Zp-2 and Zp-3, two oocyte-specific loci encoding zona pellucida proteins. Genomics (6), 184-187, 1990.

[122] Lyons, C.E., Payette, K.L., Price, J.L., Huang, R.-C.: Expression and structural analysis of a teleost homolog of a mammalian zona pellucida gene. J Biol Chem (268), 21351-21358, 1993.

[123] Maelicke, A., Plumer-Wilk, R., Fels, G., Spencer, S.R., Engelhard, M., Veltel, D., Conti-Tronconi, B.M.: Epitope mapping employing antibodies raised against short synthetic peptides: a study of the nicotinic acetylcholine receptor. Biochemistry (28), 1396-1405, 1989.

[124] Mahi-Brown, C.A., Moran, F.: Response of cynomolgus macaques to immunization against a synthetic peptide from the human zona pellucida. J Med Primatol (24), 258-270, 1995.

[125] Maier, B.: Ethische Wertvorstellungen zu assistierter Fortpflanzungshilfe und Reproduktionsmedizin im deutschsprachigen Raum, in: F.H. Fischl (ed.): Kinderwunsch. In Vitro Fertilisierung und Assistierte Reproduktion - Neue Erkenntnisse und Therapiekonzepte. Möglichkeiten, Erfüllbarkeit und Machbarkeit in unserer Zeit. Krause & Pachernegg GmbH, Wien, 1995, 15-27.

[126] Maleszewski, M., Kimura, Y., Yanagimachi, R.: Sperm membrane incorporation into oolemma contributes to the oolemma block to sperm penetration:

evidence based on intracytoplasmic sperm injection experiments in the mouse. Mol Reprod Dev (44), 256-259, 1996.

[127] Maresh, G.A., Dunbar, B.S.: Antigenic comparison of five species of mammalian zonae pellucidae. J Exp Zool (244), 299-307, 1987.

[128] Melendrez, C.S., Meizel, S.: Studies of porcine and human sperm suggesting a role for a sperm glycine receptor/Cl^- channel in the zona pellucida-initiated acrosome reaction. Biol Reprod (53), 676-683, 1995.

[129] Michelmann, H.W., Bogdan, A., Hinney, B.: Micromorphometry and spermatozoa binding patterns of fertilized and unfertilized human oocytes after in-vitro fertilization. Hum Reprod (10), 3154-3160, 1995.

[130] Millar, S.E., Chamow, S.M., Baur, A.W., Oliver, C., Robey, F., Dean, J.: Vaccination with a synthetic zona pellucida peptide produces long-term contraception in female mice. Science (246), 935-938, 1989.

[131] Miller, C.C., Fayrer-Hosken, R.A., Timmons, T.M., Lee, V.H., Caudle, A.B., Dunbar, B.S.: Characterization of equine zona pellucida glycoproteins by polyacrylamide gel elektrophoresis and immunological techniques. J Reprod Fertil (96), 815-825, 1992.

[132] Moller, C.C., Wassarman, P.M.: Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. Dev Biol (132), 103-112, 1989.

[133] Moore, G.D., Kopf, G.S., Schultz, R.M.: Complete mouse egg activation in the absence of sperm by stimulation of an exogenous G protein-coupled receptor. Dev Biol (159), 669-678, 1993.

[134] Moore, H.D.M.: Modification of sperm membrane antigens during capacitation, in: P. Fénichel, J. Parinaud (eds.): Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM (236) / John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge, 1995, 35-43.

[135] Moore, K.L.: Embryologie. Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen, 2. Auflage. F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1985, 19-20.

[136] Morales, P., Llanos, M.: Role of the acrosome reaction in egg vestments and plasma membrane penetration, in: P. Fénichel, J. Parinaud (eds.): Human sperm

acrosome reaction. Colloque INSERM (236) / John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge, 1995, 133-149.

[137] Murata, K., Sasaki, T., Kasumasu, S., Iuchi, I., Enami, J., Yasumasu, I., Yamagami, K.: Cloning of cDNAs for the precursor protein of a low-molecular-weight subunit of the inner layer of the egg envelope (chorion) of the fish *Oryzias latipes*. Dev Biol (167), 9-17, 1995.

[138] Myles, D.G., Kimmel, L.H., Blobel, C.P., White, J.M., Primakoff, P.: Identification of a binding site in the disintegrin domain of fertilin required for sperm-egg fusion. Proc Natl Acad Sci USA (91), 4195-4198, 1994.

[139] Nadeau, J.D.: L'importance des facteurs nutritionnels en pathologie de la reproduction bovine. Can Vet J (9), 77-84, 1968.

[140] Naz, R.K.: Role of membrane tyrosine kinases in human sperm function, in: P. Fénichel, J. Parinaud (eds.): Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM (236) / John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge, 1995, 245-255.

[141] Naz, R.K., Sacco, A., Singh, O., Pal, R., Talwar, G.P.: Development of contraceptive vaccines for humans using antigens derived from gametes (spermatozoa and zona pellucida) and hormones (human chorionic gonadotrophin): current status. Hum Reprod Update (1), 1-18, 1995.

[142] Nichols, J., Gardner, R.L.: Effect of damage to the zona pellucida on development of preimplantation embryos in the mouse. Hum Reprod (4), 180-187, 1989.

[143] Noguchi, S., Yonezawa, N., Katsumata, T., Hashizume, K., Kuwayama, M., Hamano, S., Watanabe, S., Nakano, M.: Characterization of the zona pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs. Biochim Biophys Acta (1201), 7-14, 1994.

[144] Oehninger, S., Hinsch, E., Pfisterer, S., Veeck, L.L., Kolm, P., Schill, W.-B., Hodgen, G.D., Hinsch, K.-D.: Use of a specific zona pellucida (ZP) protein 3 antiserum as a clinical marker for human ZP integrity and function. Fertil Steril (65), 139-145, 1996.

[145] Oko, R.: Comparative analysis of proteins from the fibrous sheath and outer dense fibers of rat spermatozoa. Biol Reprod (39), 168-182, 1988.

[146] Oliphant, G., Reynolds, A.B., Thomas, T.S.: Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. Am J Anat (174), 269-289, 1985.

[147] Paterson, M., Wilson, M.R., van Duin, M., Aitken, J.R.: Evaluation of the contraceptive potential of recombinant marmoset ZP3 and an immunodominant marmoset ZP3 peptide. J Reprod Fertil (Abstr. Series 18), 30, 1996.

[148] Paterson, M., Wilson, M.R., van Duin, M., Aitken, R.J.: Evaluation of zona pellucida antigens as potential candidates for immunocontraception. J Reprod Fertil (50, Suppl.), 175-182, 1996.

[149] Pedersen, H.: Further observations on the fine structure of the human spermatozoon. Z Zellforsch (123), 305-315, 1972.

[150] Phillips, D.M.: Mitochondrial disposition in mammalian spermatozoa. J Ultrastruct Res (58), 144-154, 1977.

[151] Phillips, D.M., Shalgi, R.M.: Surface properties of the zona pellucida. J Exp Zool (213), 1-8, 1980.

[152] Piko, L.: Immunological phenomena in the reproductive process. Int J Fertil (12), 377-383, 1967.

[153] Prasad, S.V., Wilkins, B., Skinner, S.M., Dunbar, B.S.: Evaluating zona pellucida structure and function using antibodies to rabbit 55kDa ZP protein expressed in baculovirus expression system. Mol Reprod Dev (43), 519-529, 1996.

[154] Propping, D., Tauber, P.F., Zaneveld, L.J.D.: Fertilization and implantation, in: H. Ludwig, P.F. Tauber (eds.): Human Fertilization. Thieme, Stuttgart, 1978, 1-123.

[155] Rankin, T., Familari, M., Lee, E., Ginsberg, A., Dwyer, N., Blanchettemackie, J., Drago, J., Westphal, H., Dean, J.: Mice homozygous for an insertional mutation in the ZP3 gene lack a zona pellucida and are infertile. Development (122), 2903-2910, 1996.

[156] Reddy, J.M., Stark, R.A., Zaneveld, J.D.: A high molecular weight antifertility factor from human seminal plasma. J Reprod Fertil (57), 437-446, 1979.

[157] Roitt, I.M., Brostoff, J., Male, D.K.: Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Thieme, Stuttgart, 1987, 286.

[158] Romeis, B.: Mikroskopische Technik, 16. Auflage. R. Oldenbourg Verlag, München, 1968, 47-180.

[159] Rüsse, I., Sinowatz, F.: Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. Parcy, Berlin/Hamburg, 1991, 18-32.

[160] Sacco, A.G.: The zona pellucida: current status as a candidate antigen for contraceptive vaccine development. Am J Reprod Immunol Microbiol (15), 122-130, 1987.

[161] Sacco, A.G., Yurewicz, E.C.: Assessment of synthetic peptides from porcine zona glycoproteins ZP3α and ZP3β for contraceptive vaccine development, in: G.P. Talwar, K.V.S. Rao, V.S. Chauhan (eds.): Recombinant and synthetic vaccines. Narosa Publishing House, New Delhi, 1994, 283-290.

[162] Saling, P.M., Sowinski, J., Storey, B.T.: An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zonae pellucidae in vitro: sequential relationship to the acrosome reaction. J Exp Zool (209), 229-238, 1979.

[163] Saling, P.M.: Mammalian sperm interaction with extracellular matrices of the egg. Oxf Rev Reprod Biol (11), 339-388, 1989.

[164] Saling, P.M.: How the egg regulates sperm function during gamete interaction: facts and fantasies. Biol Reprod (44), 246-251, 1991.

[165] Saling, P.M., Burks, D.J., Carballada, M.R., Dowds, C.A., Leyton, L., McLeskey, S.B., Robinson, A., Tomes, C.N.: Sperm interaction with the zona pellucida: the role of ZRK, in: P. Fénichel, J. Parinaud (eds.): Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM (236) / John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge, 1995, 85-104.

[166] Saling, P.M., Carballada, M.R., Burks, D.J., Moore, H.D.M.: Sperm-egg binding protein or proto-oncogene? Science (271) 1434-1435, 1996.

[167] Salzmann, G.S., Greve, J.M., Roller, R.J., Wassarman, P.M.: Biosynthesis of the sperm receptor during oogenesis in the mouse. EMBO J (2), 1451-1456, 1983.

[168] Sato, K.: Polyspermy-preventing mechanisms in mouse eggs fertilized in vitro (1). J Exp Zool (210), 353-359, 1979.

[169] Schill, W.-B., Töpfer-Petersen, E., Heissler, E.: The sperm acrosome: functional and clinical aspects. Hum Reprod (3), 139-145, 1988.

[170] Schroeder, A.C., Schultz, R.M., Kopf, G.S., Taylor, F.R., Becker, R.B., Eppig, J.J.: Fetuin inhibits zona pellucida hardening and conversion of ZP2 to $ZP2_f$ during spontaneous mouse oocyte maturation in vitro in the absence of serum. Biol Reprod (43), 891-897, 1990.

[171] Shabanowitz, R.B., O'Rand, M.G.: Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs. J Reprod Fertil (82), 151-161, 1988.

[172] Shabanowitz, R.B., O'Rand, M.G.: Molecular changes in the human zona pellucida associated with fertilization and human sperm receptor. Ann NY Acad Sci, 621-632, 1988.

[173] Shimizu, S., Tsuji, M., Dean, J.: In vitro synthesis of three sulfated glycoproteins of murine zonae pellucidae by oocytes grown in follicle culture. J Biol Chem (258), 5858-5863, 1983.

[174] Soloy, E., Srsen, V., Pavlok, A., Hyttel, P., Thomsen, P.D., Procházka, R., Kubelka, M., Smith, S.D., Høier, R., Motlik, J., Greve, T.: The block against sperm penetration in parthenogenetically activated bovine oocytes. J Reprod Fertil (Abstr. Series 18), 7, 1996.

[175] Stevens, R.W.: Basic spermatozoon anatomy and physiology for the clinican, in: A.A. Acosta, R.J. Swanson, S.B. Ackerman, T.F. Kruger, J.A. van Zyl, R. Menkveld (eds.): Human Spermatozoa in Assisted Reproduction. Williams & Wilkins, Baltimore, 1990, 1-23.

[176] Stewart-Savage, J., Bavister, B.D.: Time course and pattern of cortical granule breakdown in hamster eggs after sperm fusion. Mol Reprod Dev (30), 390-395, 1991.

[177] Storey, B.T.: Interactions between gametes leading to fertilization: the sperm`s view. Reprod Fertil Dev (7), 927-942, 1995.

[178] Supplizi, A.V., Monaci, M., Stradaioli, G., Greve, T., Parillo, F.: Identification of glycoconjugates in the zona pellucida of in vitro matured and tubal unfertilized bovine oocytes by lectin histochemistry. Anim Reprod Sci (43), 99-111, 1996.

[179] Takagi, J., Dobashi Araki, M.D.Y., Imai, Y., Hiroi, M., Tonosaki, A., Sendo, F.: The development of porcine zona pellucida using monoclonal antibodies: II. Electron microscopy. Biol Reprod (40), 1103-1108, 1989.

[180] Talbot, P., Summers, R.G., Hylander, B.L., Keough, E.M., Franklin, L.E.: The role of calcium in the acrosome reaction: An analysis using ionophore A23187. J Exp Zool (198), 383-392, 1976.

[181] Talwar, G.P.: Immuno-contraception. Curr Opin Immunol (6), 698-704, 1994.

[182] Töpfer-Petersen, E., Cechova, D., Henschen, A., Steinberger, M., Friess, A.E., Zucker, A.: Cell biology of acrosomal proteins. Andrologia (22, Suppl. 1), 110-121, 1990.

[183] Töpfer-Petersen, E., Calvete, J.J.: Molecular mechanisms of the interaction between sperm and the zona pellucida in mammals: studies on the pig. Int J Androl (18, Suppl. 2), 20-26, 1995.

[184] Tong, Z.B., Nelson, L.M., Dean, J.: Inhibition of zona pellucida gene expression by antisense oligonucleotides injected into mouse oocytes. J Biol Chem (270), 849-853, 1995.

[185] Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. J Proc Natl Acad Sci USA (76), 4350-4354, 1979.

[186] Tsai, J.-Y., Silver, L.M.: Sperm-egg binding protein or proto-oncogene? Science (271) 1432-1434, 1996.

[187] Tulsiani, D.R.P., Nagdas, S.K., Cornwall, G.A., Orgebin-Crist, M.-C.: Evidence for the presence of high-mannose/hybrid oligosaccharide chain(s) on the mouse ZP2 and ZP3. Biol Reprod (46), 93-100, 1992.

[188] Urch, U.A.: Biochemistry and function of acrosin, in: P.M. Wassarman (ed.): Elements of Mammalian Fertilization, Volume I. CRC Press, Inc., Boca Raton, 1991, 233-248.

[189] van Duin, M., Polman, J.E., Verkoelen, C.C., Bunschoten, H., Meyerink, J.H., Olijve, W., Aitken, R.J.: Cloning and characterization of the human sperm receptor ligand ZP3: evidence for a second polymorphic allele with a different

frequency in the Caucasian and Japanese populations. Genomics (14), 1064-1070, 1992.

[190] Ward, C.R., Storey, B.T., Kopf, G.S.: Selective activation of Gi1 and Gi2 in mouse sperm by the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. J Biol Chem (269), 13254-13258, 1994.

[191] Wassarman, P.M., Bleil, J.D., Florman, H.M., Greve, J.M., Roller, R.J., Salzmann, G.S., Samuels, F.G.: The mouse egg's receptor for sperm: What is it and how does it work? Cold Spring Harb Symp Quant Biol (50), 11-19, 1985.

[192] Wassarman, P.M.: Early events in mammalian fertilization. Annu Rev Cell Biol (3), 109-142, 1987.

[193] Wassarman, P.M.: The biology and chemistry of fertilization. Science (235), 553-560, 1987.

[194] Wassarman, P.M.: Zona pellucida glycoproteins. Annu Rev Biochem (57), 415-442, 1988.

[195] Wassarman, P.M.: Mouse gamete adhesion molecules. Biol Reprod (46), 186-191, 1992.

[196] Wassarman, P.M., Albertini, D.F.: The mammalian ovum, in: E. Knobil, J.D. Neill (eds.): The Physiology of Reproduction, Second Edition. Raven Press, Ltd., New York, 1994, 79-122.

[197] Wassarman, P.M.: Towards molecular mechanisms for gamete adhesion and fusion during mammalian fertilization. Curr Opin Cell Biol (7), 658-664, 1995.

[198] Weinman, D.E., Williams, W.L.: Mechanism of capacitation of rabbit spermatozoa. Nature (203), 423-424, 1961.

[199] Wendy, T.S., Wilson, L., Reynold, A.B., Oliphant, G.: Chemical and physical characterization of rabbit sperm acrosome stabilizing factor. Biol Reprod (35), 691-703, 1986.

[200] WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion, 3. Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1993, 3-23.

[201] Williams, C.J., Schultz, R.M., Kopf, G.S.: Role of G proteins in mouse egg activation: Stimulatory effects of acetylcholine on the ZP2 to $ZP2_f$ conversion

and pronuclear formation in eggs expressing a functional m1 muscarinic receptor. Dev Biol (151), 288-296, 1992.

[202] Windt, M.-L., Franken, D.R., de Beer, P.M., Bouic, P.J.D., Kruger, T.F.: The hemizona assay (HZA) as an experimental model to evaluate the inhibiton of sperm binding to the murine zona pellucida by isolated zona pellucida protein. Andrologia (23), 209-212, 1991.

[203] Wolf, D.P.: The block to sperm penetration in zona-free mouse eggs. Dev Biol (64), 1-10, 1978.

[204] Wolgemuth, D., Celenza, J., Dunbar, B.S.: Formation of the rabbit zona pellucida and its relationship to ovarian follicular development. Dev Biol (106), 1-14, 1984.

[205] Yanagimachi, R.: The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. J Reprod Fertil (23), 193-196, 1970.

[206] Yanagimachi, R., Usui, N.: Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. Exp Cell Res (89), 161-174, 1974.

[207] Yanagimachi, R.: Mechanisms of fertilization in mammals, in: L. Mastroianni, J.D. Biggers (eds.): Fertilization and embryonic development in vitro. Plenum Press, New York, 1981, 81-187.

[208] Yanagimachi, R.: Mammalian fertilization, in: E. Knobil, J.D. Neill (eds.): The Physiology of Reproduction, Second Edition. Raven Press, Ltd., New York, 1994, 189-317.

[209] Zeng, Y., Clark, E.N., Florman, H.M.: Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. Dev Biol (171), 554-563, 1995.

[210] Zhang, X., Lou, Y.-H., Koopman, M., Doggett, T., Tung, K.S.K., Curtiss, R.: Antibody responses and infertility in mice following oral immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* expressing recombinant murine ZP3. Biol Reprod (56), 33-41, 1997.

Anhang

Tabellarischer Lebenslauf

Name	:	Hägele
Vorname	:	Wolfgang
geb.	:	03.04.1970
Geburtsort	:	Künzelsau
Familienstand	:	verheiratet
Ehegattin	:	Sabine Heppner, Lehrerin für Geschichte und Ev. Theologie an Gymnasien
Wohnort	:	Struthstraße 23, 35394 Gießen-Rödgen
Tel.:	:	0641/48754
Konfession	:	evangelisch
Schulische Ausbildung:		1976-1980 Grundschule Künzelsau
		1980-1989 Ganerben Gymnasium Künzelsau
Schulabschluß	:	12.05.1989 Allgemeine Hochschulreife
Studium der Humanmedizin	:	1989-1997 an der Justus-Liebig-Universität Gießen
		27.08.1992 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
		01.04.1996 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
		06.05.1997 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Beruflicher Werdegang	:	seit 01.06.1997 Arzt im Praktikum am Zentrum für Dermatologie und Andrologie Gießen

Danksagung

Ich danke herzlich Herrn PD Dr. Hinsch für die ausgezeichnete Betreuung meiner Dissertationsarbeit, für die fruchtbaren Diskussionen und die Einführung in die Welt der Wissenschaft. Mein ganz besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Hinsch, die mich in das methodisch-wissenschaftliche Arbeiten einwies, immer für Fragen offen war und helfend einsprang, wenn es die Situation erforderte. Beide haben es verstanden, aus unterschiedlichen Individuen eine homogene, leistungsfähige Arbeitsgruppe zu formen, die meinen beruflichen und wissenschaftlichen Werdegang geprägt hat.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Dr. Schill, der durch die Bereitstellung von Forschungsmitteln und einem Arbeitsplatz an seiner Klinik zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen hat. Zudem brachte er meiner Arbeit immer großes Interesse entgegen und ermöglichte es mir, meine Daten national und international auf mehreren Kongressen zu präsentieren.

Dr. Müller-Schlösser von der Besamungsunion Hessen und Frau Torius-Erler vom Schlachthof Gießen stellten mir großzügig und hilfsbereit die bovinen Ejakulate und Ovarien zur Verfügung. Ich möchte ihnen an dieser Stelle herzlich dafür danken.

Ich möchte mich auch bei Sabine Gröger für die unermüdliche Hilfe in allen Belangen der Laborarbeit bedanken; sie stand mir immer helfend zur Seite, wenn es nötig war. Ebenso sei auf diesem Wege Jana Böhm, Annika Brummer, Regina Deiß und Frau Erb für die anhaltende Unterstützung gedankt.

Nicht zuletzt bin ich auch meiner Familie dankbar. Allen voran meiner Frau Sabine, die mich stets interessiert unterstützte und motivierte, obwohl sie am meisten entbehren musste, sowie meinen Eltern Gisela und Erich Hägele, die mir durch ihre Erziehung und Unterstützung mein Studium erst ermöglicht haben. Meinen allerliebsten Dank an Euch alle.