

Herstellung, Charakterisierung und Einsatz von anti-Zona pellucida Protein 3
Peptidantiseren

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

vorgelegt von Susanne Charlotte Martha Pfisterer
aus Stuttgart

Giessen 1999

Aus dem Medizinischen Zentrum für Dermatologie und Andrologie
Hautklinik
Abteilung Allgemeine Dermatologie und Andrologie

Leiter: Prof. Dr. Dr. W.-B. Schill
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen

Gutachter: PD Dr. Hinsch
Gutachter: Prof. Dr. Weidner

Tag der Disputation: 22.November 1999

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Spermatozoen-Eizell-Interaktion

1.2 Das Spermatozoon

1.2.1 Der Aufbau des Spermatozoons

1.2.2 Kapazitation und Akrosomreaktion

1.2.3 Spermatozoen Rezeptor

1.3 Die Eizelle

1.3.1 Der Aufbau der Eizelle

1.3.2 Zona pellucida

1.3.2.1 Zona pellucida Protein 1 (ZP1)

1.3.2.2 Zona pellucida Protein 2 (ZP2)

1.3.2.3 Zona pellucida Protein 3 (ZP3)

1.4 Zielstellung

2 Material und Methoden

2.1 Hersteller und Lieferfirmen

2.2 Chemikalien

2.3 Antikörper

2.4 Geräte

2.5 Versuchstiere

2.6 Peptide

2.6.1 Immunisierung und Gewinnung von Antiseren

2.6.2 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) zur Titerbestimmung

2.7 Reinigung und Konzentrierung von Antikörpern

- 2.7.1** Affinitätschromatographische Reinigung von Immunglobulinen über immobilisierte synthetische Peptide
- 2.7.2** Isolierung der IgG-Fraktion aus Kaninchenserum mittels Säulenchromatographie an Protein A-Sepharose
- 2.8** Proteinbestimmung
- 2.9** Gewinnung von Ovarien und Eizellen
 - 2.9.1** Schweine Eizellen
 - 2.9.2** Maus Eizellen
 - 2.9.3** Humane Eizellen
- 2.10** Isolierung der Zona pellucida
 - 2.10.1** Mechanische Isolierung von Schweine und Maus Zona pellucida
 - 2.10.2** Isolierung von Maus Zona pellucida durch Percoll-Gradientenzentrifugation
- 2.11** Paraffinschnitte aus Ovarien
- 2.12** Humane Hemizonae pellucidae
- 2.13** Charakterisierung der Antiseren
 - 2.13.1** Immunhistochemie mit Paraffinschnitten
 - 2.13.2** Immunhistochemie an humanen Hemizonae
 - 2.13.3** Indirekter Immunfluoreszenztest an isolierten Eizellen
- 2.14** SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
 - 2.14.1** Coomassie-Blau-Färbung
- 2.15** Immunoblot
 - 2.15.1** Western-Blot
- 2.16** Immunbiochemische Identifizierung von Proteinen
- 2.17** Chemilumineszenzverfahren
- 2.18** Entfernen gebundener Antikörper von der Nitrozellulosemembran

- 3 Ergebnisse**
- 3.1** Peptide
- 3.2** Antikörpernachweis mit Hilfe des enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
- 3.3.1** Reinigung und Konzentrierung der gewonnenen Antikörper über immobilisierte synthetische Peptide
- 3.3.2** Reinigung und Konzentrierung von Antikörpern über eine Protein A-Säule
- 3.3.3** Bestimmung der Titer über immobilisierte synthetische Peptide isolierte anti ZP3 Antikörper im ELISA
- 3.3.4** Bestimmung der Titer der über Protein A isolierten IgG Antikörper im ELISA
- 3.4** Antikörperreaktionen auf fixierten Ovargewebeschnitten
- 3.4.1** Antiserum AS ZP3-2
- 3.4.2** Antiserum AS ZP3-5
- 3.4.3** Antiserum AS ZP3-6
- 3.4.4** Kotrollexperimente
- 3.5.1** Antikörperreaktionen an humanen Hemizonae
- 3.5.2** Antikörperreaktionen an humanen Hemizonae nach Inkubation mit Spermatozoen
- 3.6** Indirekte Immunfluoreszenz
- 3.6.1** Antiserum AS ZP3-5
- 3.6.2** Antiserum AS ZP3-6
- 3.6.3** Negativkontrolle
- 3.7** Einsatz der Peptidantiseren im Immunoblot und Chemilumineszenzverfahren
- 3.7.1** Antiserum AS ZP3-5
- 3.7.2** Antiserum AS PO

6

4 **Diskussion**

5 **Zusammenfassung**

6 **Literaturverzeichnis**

7 **Anhang**

Abkürzungen

AS	Antiserum
BSA	Rinderserumalbumin
DAB	Diaminobenzidin
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)Carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
g	Erdbeschleunigung
HCG	Human chorionic gonadotropine
IgG	Immunglobulin G
KLH	Keyhole limpet haemocyanin
OD	Optische Dichte
OPD	O-Phenylendiamin Dihydrochlorid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
PMSG	Pregnant mare's serum gonadotropine
PVP	Polyvinylpyrrolidin
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	Tetrametylendiamin
TPBS	Tween-PBS
TRIS	Tetra-(hydroxymethyl) aminomethan
TWEEN 20	Polyoxiethylensorbitanmonolaurat
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
ZP	Zona pellucida

1 Einleitung

Internationale Untersuchungen haben ergeben, daß ungewollte Kinderlosigkeit häufig auf männliche Infertilität zurückzuführen ist. Sie erzeugt bei den betroffenen Patienten oft einen schwerwiegenden Leidensdruck. Aus diesem Grund hat die WHO die männliche Infertilität als eigenständige Krankheit bezeichnet, die auch als solche behandlungsbedürftig ist. Nach den Erhebungen der Volkszählung von 1988 sind in der Bundesrepublik etwa 1,4 Millionen Ehen kinderlos; mehr als 400 000 Paare aus dieser Gruppe müssen als ungewollt kinderlos bezeichnet werden. Wenn man weiter berücksichtigt, daß die Ursache hierfür in ca. 40% der Fälle beim Mann und in weitem 20% bei beiden Partnern zu suchen ist, geht aus diesen Zahlen hervor, welche klinische Relevanz eine effektive andrologische und gynäkologische Abklärung mit einer sich daran anschließenden möglichst rationalen Therapie hat (Haidl, G. und Schill, W.- B., 1990).

Grundlagen für die Krankheitsbekämpfung bilden einerseits das Verstehen der physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge, die zur Infertilität führen, und andererseits die damit verbundene exakte kausale Diagnostik.

1.1 Grundlagen der Spermatozoen-Eizell-Interaktion

Im Jahre 1875 beschrieb der deutsche Anatom und Biologe Oskar Hertwig zum ersten Mal das Verschmelzen des männlichen und weiblichen Kerns in der Eizelle. Seit diesem Zeitpunkt kristallisierten sich immer mehr weitere Schritte des kompletten Befruchtungsvorgangs heraus.

Die ersten Untersuchungen wurden vor allem an wirbellose Meerestieren wie am Seeigel und an Seesternen vorgenommen. Die Eier dieser Spezies werden außerhalb des weiblichen Organismus im Seewasser befruchtet; somit waren die Voraussetzungen zur Beobachtung der Spermatozoen- Eizell- Interaktion im Labor relativ leicht durchzuführen.

Seit den späten fünfziger Jahren wurden Testmodelle mit Gameten von Säugetieren entwickelt und verbessert, die eine *in vitro* Befruchtung und somit eingehende Untersuchungen der Interaktion zwischen Spermatozoon und Eizelle ermöglichten. Nach dem heutigen Stand der Wissenschaft läuft der Besamungsvorgang wie auf nachfolgender Skizze dargestellt ab.

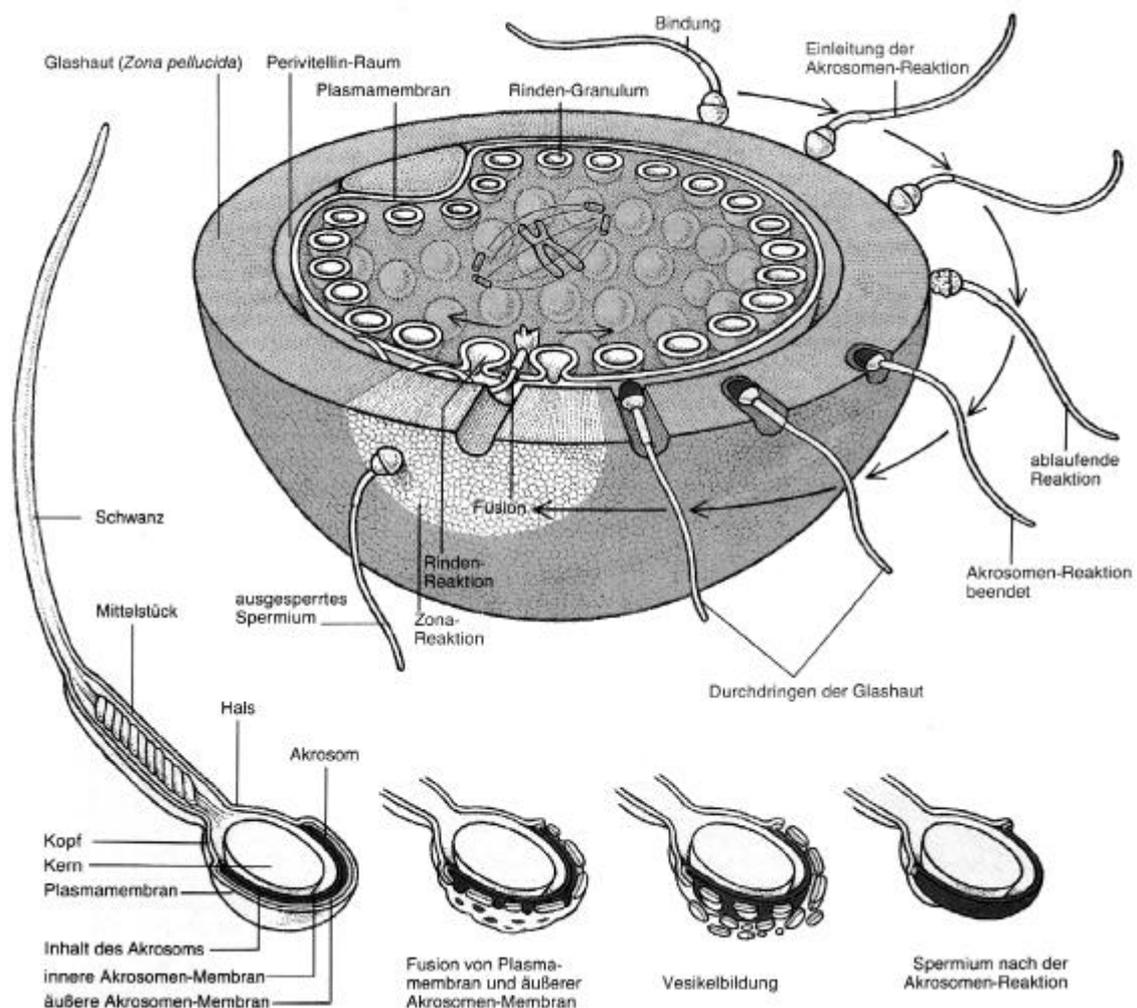


Abb.1. Die einzelnen Schritte des Besamungsvorgangs (Spektrum der Wissenschaft 2.1989)

Nach Erreichen der Eizelle heften sich die Spermatozoen zunächst locker (Anheftung), dann relativ fest (Bindung) an die Glashaut (Zona pellucida; nach lateinisch pellucida, durchscheinend) der Eizelle, die die äußere Schutzhülle bildet. Das Spermatozoon interagiert in der Regel nur mit der Eizelle der gleichen Spezies und gewährleistet somit die Speziespezifität des Befruchtungsvorganges (Yanagimachi, 1994). Nachdem ein Spermium an die Zona pellucida gebunden hat, läuft die Akrosomreaktion ab (Saling et al., 1979; Bleil und Wassarman, 1980a). Das Akrosom (nach griechisch akron, Spitze) kann man als ein großes Lysosom bezeichnen und liegt im vorderen Abschnitt des Spermienkopfes, direkt unter der umhüllenden Plasmamembran; es ist reich an proteolytischen Enzymen. Während der Akrosomreaktion verschmilzt die Plasmamembran des Spermatozoons mit der äußeren akrosomalen Membran und bildet kleine Vesikel, die im weiteren Verlauf abgestreift werden. Durch diesen Vorgang werden die im Akrosom enthaltenen Enzyme freigesetzt, die dem Spermatozoon das Durchdringen (Penetration) der Zona pellucida ermöglichen (Propping et al., 1978).

Das Spermatozoon kann dann den perivitellinen Raum erreichen und wahrscheinlich über Integrine (Blobel et al., 1992; Myles et al., 1994), die an der Umschlagfalte am Äquatorialesegment lokalisiert sind, mit der Plasmamembran der Eizelle (Oolemm) verschmelzen (Fusion) (Fusi et al., 1992, 1993). Die Verschmelzung beider Gameten löst eine Reihe von biochemischen Reaktionen aus, die die Penetration und Fusion weiterer Spermatozoen verhindern und somit einen Schutz vor Mehrfachbefruchtung darstellen (Ducibella, 1991; Yanagimachi, 1994). Durch einen noch nicht geklärten Mechanismus wird das Oolemm innerhalb weniger Minuten (Sato, 1979; Stewart-Savage und Bavister, 1991) biochemisch so modifiziert, daß keine weiteren Spermatozoen binden können (Barros und Yanagimachi 1972; Wolf, 1978). Weiterhin wird durch die Reaktion der kortikalen Granula ein Spermatozoenblock induziert. Dabei findet eine Verschmelzung der mit proteolytischen Enzymen ausgestatteten kortikalen Granula mit der Plasmemembran der Eizelle statt. Durch diesen sehr wahrscheinlich über einen Ca^{++} -Ionen Influx vermittelten exozytotischen Prozeß wird der Inhalt der Granula nach außen abgegeben. Von der Bindungsstelle des Spermatozoons an das Oolemm setzt sich dieser Vorgang nach allen Seiten hin weiter fort. Durch diese

biochemische Veränderung der Zona pellucida (Zona Reaktion) wird sie "gehärtet" (Hardening) und für weitere Spermatozoen undurchdringlich (Barros und Yanagimachi, 1971). Eine Depolarisierung des Oolemm, die bei Seeigeln eine Mehrfachbefruchtung verhindert, konnte im Säugermodell, z.B. der Maus, nicht nachgewiesen werden (Jaffe et al., 1983). Nach der Fusion des besamenden Spermatozoons befinden sich Kopf und Schwanz im Ooplasma der Eizelle und führt zur ihrer Aktivierung. Darunter versteht man die Exozytose der kortikalen Granula, die Vollendung der Meiose, die Bildung des weiblichen Vorkerns und die DNA-Synthese in den Vorkernen als Grundlage für die Verschmelzung der Vorkerne (Befruchtung) (Yanagimachi, 1994). Der Vorgang der Spermatozoen induzierten Eizellaktivierung wird von G-Proteinen gesteuert (Moore et al., 1993). Es handelt sich hier um Guaninnukleotid bindende Regulatorproteinen, die als Signaltransduktionsmoleküle ubiquitär in Zellen vorkommen.

1.2 Das Spermatozoon

1.2.1 Der Aufbau des Spermatozoons

Das Spermatozoon wird in einen Kopf-, Mittelstück- und Schwanzbereich aufgegliedert. Ein großer Anteil wird vom Kopf gebildet, der z.B. beim Menschen eine Länge von etwa 5,5µm und eine Breite von etwa 3µm hat (Stevens, 1990). Im Kopf sind der Zellkern und das Akrosom lokalisiert, welches von einer äußeren und inneren akrosomalen Membran umschlossen wird. Das Akrosom kann als ein großes Lysosom (Allison und Hartree, 1970) betrachtet werden. In ihm sind proteolytische Enzyme wie Akrosin, Hyaluronidase, Esterasen und ähnliche Substanzen (Eddy und O'Brien, 1994) enthalten, die das Durchdringen des Spermatozoons durch die Zona pellucida ermöglichen. Der Spermatozooenkopf unterschiedlicher Spezies zeigt verschiedene Formen; beim Menschen besitzt er die Form eines Rotationsellipsoids, beim Rind ist er abgeflacht (Rüsse und Sinowatz, 1991), bei Maus und Ratte hakenförmig (Yanagimachi, 1981).

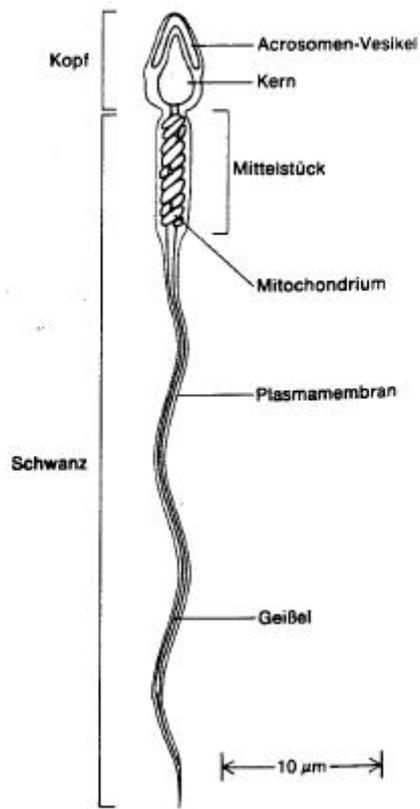


Abb.2: Schematische Darstellung eines Spermatozoons

Der Schwanz des Spermatozoons dient der aktiven Bewegung und hat beim Menschen eine Länge von etwa 55µm, beim Rind etwa 63µm (Rüsse und Sinowatz, 1991), bei Maus und Ratte von über 100µm (Eddy und O'Brien, 1994). Er ist in vier Teilabschnitte (Spermienhals, Mittelstück, Hauptstück und Endstück) gegliedert und hat ein zentrales, mikrotubuläres Axonem mit umgebenden Mantelfasern (outer dense fibers) (Pedersen, 1972; Irons und Clermont, 1982; Henkel et al.,1992). Das Mittelstück stellt mit seinem zytoplasmatischen mitochondrialen Apparat den Energielieferanten dar (Phillips,1977).

1.2.2 Kapazitation und Akrosomreaktion

Frisch ejakulierte, motile Spermatozoen sind noch nicht in der Lage, an die Zona pellucida zu binden und eine Eizelle zu befruchten. Zunächst müssen sie einen Reifungsprozeß, die sogenannte Kapazitation, durchlaufen; dieser Prozeß wurde erstmals von Austin (1951, 1967) und Chang (1951, 1955) experimentell belegt. Die Kapazitation findet in vivo im weiblichen Genitaltrakt statt und konnte auch in vitro erreicht werden (Yanagimachi, 1994). Der Zeitraum bis zur Vollendung der Kapazitation zeigt je nach Spezies deutliche Unterschiede. Bei Maus-, Katzen- und menschlichen Spermatozoen beträgt sie etwa eine Stunde, bei Kaninchen- oder Rinderspermatozoen mehrere Stunden (Yanagimachi, 1994; Kanitz, 1994). Der noch nicht vollständig geklärte Kapazitationsprozeß führt zu vielen Veränderungen im Spermatozoon (Holt, 1995; Moore, 1995; Harrison und Gadella, 1995). So konnte Yanagimachi (1970) zeigen, daß das zunächst lineare Bewegungsmuster bei Goldhamsterspermatozoen in ein sinusoidales (hyperaktives) Muster übergeht. Veränderte Ionenverhältnisse (Ca^{++} -Influx) führen zu einer Depolarisierung der Spermatozoenmembran (Fraser, 1995; Florman et al., 1995). Nach Veränderungen im Bereich der extrazellulären Glykoproteinhülle der Plasmamembran des Spermatozoenkopfes können histochemisch und ultrastrukturell Veränderungen nachgewiesen werden (Weinman und Williams, 1961; Piko, 1967). In dieser Hülle sind Proteinase hemmende Proteine (Boettger-Tong et al., 1992), Akrosom-stabilisierende Proteine epididymalen Ursprungs (Oliphant et al., 1985; Thomas et al., 1986) sowie Glykoproteine, die als Dekapazitationsfaktoren bezeichnet werden (Aonuma et al., 1973; Reddy et al., 1979), beschrieben worden.

Die Akrosomreaktion ist der Endpunkt dieses obligatorischen Reifungsprozesses des Spermatozoons; als Konsequenz kommt es zur Durchdringung der Zona pellucida und zur Fusion der Gameten (Yanagimachi, 1988). Kapazitierte Spermatozoen binden mit einem in der Plasmamembran bisher noch nicht eindeutig identifizierter Molekül über einen noch nicht genau bekannten Kohlenhydraterkennungsmechanismus an definierte Oligosaccharidstrukturen der Zona pellucida. Mori et al. (1993) wiesen nach, daß in Gegenwart von D-Mannose und D-Fructose die Spermatozoenpenetration komplett verhindert

wird. Sie vermuteten, daß D-Mannose der Zona pellucida an einen entsprechenden plasmamembranständigen Rezeptor des Spermatozoons bindet, D-Fructose dagegen als stabilisierender Faktor bei der Akrosomreaktion fungiert. Die akrosomale Exozytose und die damit verbundene Freisetzung proteolytischer Enzyme wird nach Anlagerung des Spermatozoons an die Zona pellucida induziert (Saling et al., 1979; Bleil und Wassarman, 1980a). Dieser Vorgang ist in der Regel speziesspezifisch, jedoch kann z.B. solubilisierete Zona pellucida der Maus die Akrosomreaktion in menschlichen Spermatozoen auslösen (Lee et al., 1987). Die durch die Zona pellucida ausgelöste Akrosomreaktion wird durch eine GTP-bindende Protein regulierte Signaltransduktionskette gesteuert (Kopf et al., 1986; Endo et al., 1987; Karnik et al., 1992; Lee et al., 1992; Ward et al., 1994).

Für die sekundäre, feste Bindung des Spermatozoons an die Zona pellucida wird das im Akrosom enthaltene Akrosin/Proakrosin verantwortlich gemacht (Urch, 1991); mittels des Akrosins und weiteren proteolytischen Enzymen kann das Spermatozoon die Zona pellucida durchdringen (Morales und Llanos, 1995). Dadurch bildet sich ein feiner Penetrationskanal (Yanagimachi, 1994).

Durch verschiedene chemische Substanzen wie Calcium-Ionophor, Lysolecithin und Progesteron kann die akrosomale Reaktion ausgelöst werden; Voraussetzung ist jedoch immer eine stattgefundene Kapazitation (Talbot et al., 1976; Ohzu und Yanagimachi, 1982; Yanagimachi, 1994).

Einen wesentlichen Anteil an der klinischen Diagnostik hat die funktionelle Spermadiagnostik, bei der insbesondere akrosomale Funktionstests, Akrosinbestimmungen und die Akrosomreaktion erfaßt werden. Die Bestimmung der akrosomalen Reaktion ist ein wesentlicher Parameter zur Erfassung der Befruchtungsfähigkeit einer Spermatozoenpopulation. Der Verlauf der akrosomalen Reaktion kann zytochemisch (Triple-Stain-Technik) durch transmissionselektronenmikroskopische Studien, durch die Verwendung von Antikörpern gegen akrosomale Antigene oder durch fluoreszierende Lektine erfaßt werden. Dabei sind morphologisch und funktionell deutliche Unterschiede zwischen fertilen und infertilen Männern zu beobachten.

1.2.3 Spermatozoen Rezeptor

Im Mausmodell wird für die Spermatozoon-Eizell Bindung und Induktion der akrosomalen Reaktion auf der Seite der Zona pellucida das ZP3-Protein (Bleil und Wassarman, 1983), auf der Seite der Spermatozoenmembran ein 95 kDa Protein verantwortlich gemacht (Saling, 1991; Leyton et al., 1992), welches auch beim Menschen identifiziert werden konnte (Burks et al., 1995). Leyton und Saling (1989) berichteten, daß bei der Maus das 95 kDa Spermatozoenprotein gereinigtes Maus Zona pellucida 3 Protein bindet und daß dieses 95 kDa Protein nach Bindung an ZP3 als Tyrosinkinasesubstrat dient. Diese Ergebnisse werden zur Zeit kontrovers diskutiert, denn Kalab et al. (1994) identifizierten ein akrosomales 95 kDa Spermatozoon Plasmamembranprotein der Maus als HKI (Hexokinase Typ I aus dem Gehirn von Ratten). Allerdings reagierte das menschliche 95 kDa Spermatozoen Protein nicht mit Hexokinase-Antikörpern, dafür jedoch mit Antikörpern gegen Phosphotyrosin. Das Antigen ist in der akrosomalen Region des menschlichen Spermatozoons lokalisiert (Burks et al., 1995). Die Tyrosinphosphorylierung im Spermatozoon ist ein wichtiger Fertilisierungsschritt. Blockierung der Proteinkinaseaktivität verhindert die Akrosomreaktion und damit die Fertilisierung (Leyton et al., 1992). Das 95 kDa Protein stellt bei Mensch (Yanagimachi, 1994) und Maus (Leyton et Saling, 1989) das Protein mit dem höchsten Phosphotyrosingehalt dar. Peterson et al. (1991) identifizierten in Membranen von Schweinespermatozoen ein integrales Plasmamembranprotein (APZ), an das Zona pellucida Proteine des Schweines binden. Die apparente Molekularmasse des Proteins liegt bei etwa 42 kDa.

Bleil und Wassarman (1990) konnten mit Hilfe von Photoaffinitätsexperimenten nachweisen, daß bei der Maus das Zona pellucida 3 Protein an ein 56 kDa Protein im Akrosom des Mausspermatozoons bindet. Dieses Protein ist nur in den Spermatozoenköpfen lokalisiert, und eine Bindung von ZP3 Protein findet nur bei Spermatozoen statt, in denen noch keine Akrosomreaktion abgelaufen ist. Cheng et al. (1995) bestätigen diese Ergebnisse mit Hilfe von immunhistochemischen Untersuchungen. Sie isolierten ein 56 kDa Spermatozoenoberflächenprotein bei der Maus, sp56. Dieses Protein besitzt eine hohe Affinität für das Zona pellucida 3 Protein der Maus und wird für die Spermatozoen-

Eizellerkennung verantwortlich gemacht. Das 56 kDa Protein ist in der Maus für die Spezies-Spezifität der Spermatozoon-Eizellbindung verantwortlich. Die Präsenz dieses Proteins im Spermatozoon der Maus entscheidet über die Bindung des Spermatozoons an die Zona pellucida der Maus (Bookbinder et al., 1995). Allerdings besitzen auch andere Substanzen des Mausspermatozoons, wie Galactosyltransferase, Mannosidase, Sialyltransferase (Yanagimachi, 1994) oder Proteine mit Phosphotyrosinresten (Naz, 1995) eine hohe Bindungskapazität für Zona pellucida 3 Protein.

Die Arbeitsgruppe um Dostalova et al. (1995) untersuchten die Funktion der Spermatozoen-adhäsine AWN und AQN des Schweines. Diese befinden sich in den Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen und auf epididymalen, ejakulierten sowie kapazitierten Spermatozoen. Sie vermuten, daß einige Subtypen dieser Adhäsine für die Kapazitation wie auch für die Erkennung und Bindung der Gameten verantwortlich sind.

Zusammenfassend muß jedoch festgestellt werden, daß insbesondere speziesspezifische Unterschiede die Erstellung eines einheitlichen Konzepts der Spermatozoon Zona pellucida Interaktion erheblich erschweren.

1.3 Die Eizelle

1.3.1 Der Aufbau der Eizelle

Die Eizelle ist eine kugelförmige und zytoplasmareiche Zelle. Während der Ovulation hat die menschliche Eizelle einen Durchmesser von 120-150 µm (Bucher und Wartenberg, 1989).

Die Oozyten von Rind und Schwein haben einen etwa gleichgroßen Durchmesser (Kanitz, 1994), der der Mauseizelle beträgt 80 µm (Eppig, 1991).

Im Ooplasma befinden sich der Zellkern, die Zellorganellen wie Ribosomen, Mitochondrien und der Golgi-Apparat, sowie die kortikalen Granula. Der Abstand der kortikalen Granula von der Plasmamembran beträgt etwa 2 µm (Ducibella, 1991). Kurze Zeit vor der Ovulation ist die erste Reifeteilung der Eizelle abgeschlossen, das Polkörperchen ist entstanden. Die

zweite Reifeteilung findet während der Ovulation statt, bis zur Befruchtung der Eizelle mit der Samenzelle verbleibt sie in der Metaphase (Moore, 1985).

Die Eizelle wird von der Zona pellucida umgeben und von ihr durch den perivitellinen Spalt getrennt. Die Zona pellucida stellt zum einen ein Hindernis für die Befruchtung dar, zum anderen aber ein kompliziertes biologisches Schutz- und Sicherungssystem (Nichols und Gardner, 1989): sie trägt zur Speziesspezifität bei der Befruchtung bei und schützt die Eizelle vor Mehrfachbefruchtung (Wassarman und Albertini, 1994).

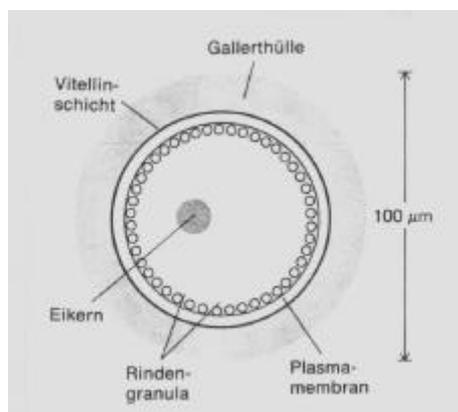


Abb.3: Schematische Darstellung einer Eizelle

1.3.2 Zona pellucida

Die Zona pellucida ist eine extrazelluläre, relativ dicke, durchscheinende Glykoprotein-Hülle, die die Eizellen der Säugetiere umgibt. Sie umhüllt Oolemm der Eizelle und separiert die Eizelle von den umgebenden Follikel- und Kumuluszellen (Yanagimachi, 1994). Ein Kontakt der Oocyte über Mikrovilli zu Ausläufern der Kumuluszellen wird hinsichtlich interzellulärer Kommunikation diskutiert (Wassarman und Albertini, 1994). Die Dicke der Zona pellucida variiert je nach Spezies zwischen 2 µm und 30 µm. Bei der Maus hat sie eine Dicke von 5 µm, 13 µm beim Menschen, 16 µm beim Schwein und beim Rind bis zu 27 µm (Dunbar, 1983; Dunbar et al., 1991). Die Zona pellucida stellt ein loses Maschenwerk von Fibrillen dar, das

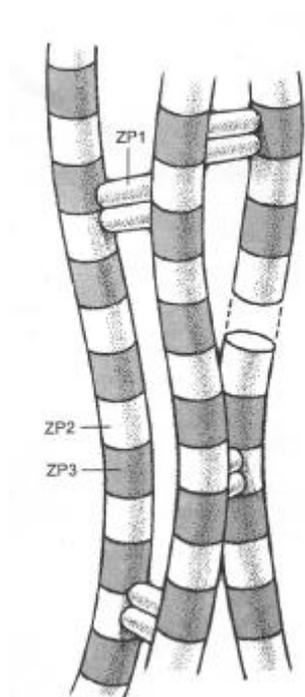
eine Barriere für Spermatozoen bildet, aber für Immunglobulin und andere große Makromoleküle durchgängig ist (Wassarman, 1988). In früheren Untersuchungen galt die Struktur der Zona pellucida als relativ homogen (Guraya, 1974; Dumont und Brummett, 1985). Morphologische Untersuchungen, wie zum Beispiel die Elektronenmikroskopie oder immunhistologische Studien, zeigten jedoch, daß die Zona pellucida nicht einheitlich aufgebaut ist, sondern unterschiedliche Schichten besitzt (Dunbar et al., 1994). Die äußere Oberfläche beim Goldhamster beispielsweise zeigt ein gefenstertes Muster, während die innere Schicht morphologisch dicht erscheint (Phillips und Shalgi, 1980).

Kontroverse Meinungen bestehen bezüglich des Syntheseortes der Zona pellucida Proteine. Früheren morphologischen und histochemischen Untersuchungen zufolge soll die Zona pellucida einiger untersuchter Spezies von den Follikelzellen gebildet werden (Guraya, 1974). Allerdings zeigten neuere biochemische, immunologische und gentechnologische Untersuchungen, daß diese Glykoproteine, zumindest im Mausmodell, ausschließlich von der Eizelle gebildet werden (Flechon et al., 1984; Wassarman, 1987 b, 1988; Dietl, 1989). Dunbar et al. (1994) wiesen nach, daß beim Kaninchen auch von Granulosazellen Zona pellucida Proteine gebildet werden.

Die Zona pellucida besteht je nach Spezies aus zwei bis vier Glykoproteinen unterschiedlicher Molekularmassen. Bei Maus, Hamster, Ratte, Kaninchen und Mensch wurden drei Glykoproteine nachgewiesen (Maresh und Dunbar, 1987; Shabanowitz und O'Rand, 1988; Araki et al., 1992; Miller et al., 1992), während bei der Katze nur zwei, bei Schwein (Koyama et al., 1991) und Rind (Bercegeay et al., 1993) vier Glykoproteinklassen diskutiert werden. Die beschriebenen Glykoproteinklassen der Zona pellucida basieren auf ihren biochemischen Eigenschaften oder werden durch immunologische Marker definiert. Harris und Mitarbeiter (1994) unterteilten aufgrund gentechnologischer Erkenntnisse die Zona pellucida in ZPA (ZP2), ZPB (ZP1) und ZPC (ZP3) Proteine. Die Subklassen unterscheiden sich in der Länge der cDNA, wobei ZPA die größte und ZPC die kleinste Länge der cDNA aufweist.

Die Maus Zona pellucida, das am besten untersuchte Modell, besteht aus drei Glykoproteinen, die als Zona pellucida Protein 1 (ZP1, ZPB), Zona pellucida Protein 2 (ZP2, ZPA) und Zona pellucida Protein 3 (ZP3, ZPC) bezeichnet werden. Der Grundbaustein der Maus Zona

pellucida stellt eine aus 15 nm großen ZP2-ZP3 Hetero-Dimeren zusammengesetzte Einheit dar, die mehrere hundert Mal linear aneinandergereiht ist. Diese fädigen Strukturen werden durch ZP1 Moleküle, die aus zwei identischen durch Disulfidbrücken verbundenen Polypeptidketten bestehen, verbunden (Greve und Wassarman, 1985). ZP1, ZP2 und ZP3 besitzen dabei ein molares Verhältnis zueinander von 1:10:10 (Bleil und Wassarman, 1980b; Shimizu et al., 1983; Wassarman, 1988).



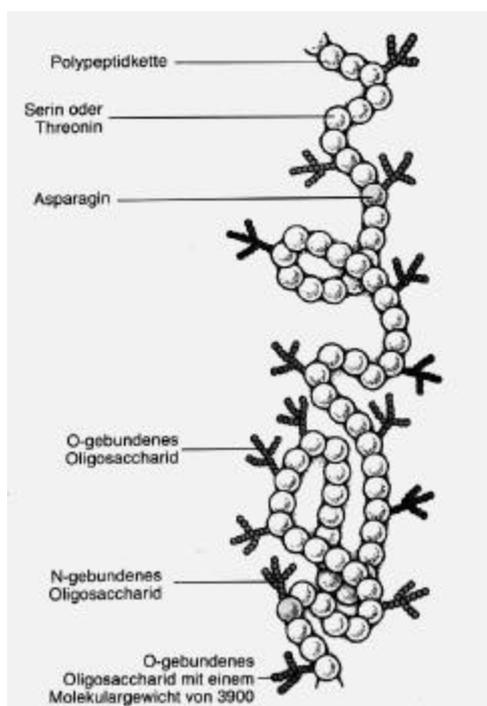
Das als ZP3 bezeichnete Molekül ist eine Hauptkomponente der Filamente, die sich zur Zona pellucida zusammenlagern. Es handelt sich bei ihm um ein Glykoprotein, ein Polypeptid mit Zuckerseitenketten. Vereint mit einem anderen Glykoprotein ZP2, bildet es die sich wiederholenden Grundbausteine der Filamente. Ein weiteres Glykoprotein, ZP1, verknüpft die Fadenmoleküle (nach Wassarman, 1989).

Abb. 4

Die Molekularmassen der drei Glykoproteine der Maus Zona pellucida sind aufgrund abweichender post-translationaler Glykosylierung und Sulfidierung heterogen und liegen unter nicht reduzierten Bedingungen bei 185-200 kDa (ZP1), 120-140 kDa (ZP2) und 83 kDa (ZP3) (Epifano und Dean, 1994).

An der Polypeptidkette der ZP Proteine sitzen in Form kleiner Seitenäste zahlreiche kurze Ketten einfacher Zucker, sogenannte Oligosaccharide. Drei oder vier davon sind N-glykosidisch gebundene Oligosaccharide, d.h. sie sind an einem Stickstoffatom der Aminosäure

Asparagin kovalent gebunden. Eine relativ große Zahl von den Oligosacchariden ist O-glykosidisch gebunden, d.h. über ein Sauerstoffatom der Aminosäuren Serin oder Threonin. Die Oligosaccharide kommen in vielen Varianten vor. ZP3-Moleküle haben z.B. je nach Spezies unterschiedliche Sequenzen von Zuckerketten (Bleil und Wassarman, 1980b,c; Greve et al., 1982; Roller und Wassarman, 1983; Florman und Wassarman, 1985; Philpott et al., 1987).



Im Mausmodell ist ZP3 das Rezeptormolekül, das die Spermien bindet. Es wird auch für die Induktion der Akrosomreaktion verantwortlich gemacht. Für die Spermienbindung sind die vom Polypeptidrückgrad abgehenden Zuckerketten wesentlich: die O-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide mit einem Molekulargewicht von etwa 3900 (sie sind an einem Sauerstoffatom der Aminosäure Serin und Threonin gebunden). Diese Zuckerketten sollen auch, zusammen mit der Polypeptidkette von ZP3, bei der Induktion der Akrosomreaktion von Bedeutung sein (nach Wassarman, 1989).

Abb. 5

1.3.2.1 Zona pellucida Protein 1 (ZP1)

Das Zona pellucida Protein 1 verknüpft die ZP2-ZP3 Filamente miteinander und formt bzw. stabilisiert somit die Zona pellucida Matrix (Greve und Wassarman, 1985). Das ZP1 liegt in

der Zona pellucida als ein über Disulfidbrücken verknüpftes Homodimer vor. Im Mausmodell beträgt die Molekularmasse eines Monomers 130 kDa (Bleil und Wassarman, 1980 b).

In mehreren Spezies konnten Harris et al. (1994) das entsprechende Gen identifizieren. Dabei zeigten sich über 69 % Übereinstimmungen der DNA-Sequenzen. Beim Menschen besteht das Gen aus 12 Exons mit einer Größe von 79-190 bp, unterteilt von 11 Introns, die eine Länge von 83-3500 bp besitzen. Die Homologie der Aminosäuresequenzen liegt zwischen 60-68 %. Das menschliche ZP1 besteht aus 540 Aminosäuren.

1.3.2.2 Zona pellucida Protein 2 (ZP2)

Das Zona pellucida Protein 2 wird, zumindest im Mausmodell, als sekundärer Rezeptor bei der Spermatozoenbindung bezeichnet (Bleil und Wassarman, 1986; Bleil et al., 1988). ZP2 bindet an die innere akrosomale Membran bereits akrosomreagierter Spermatozoen (Mortillo und Wassarman, 1991). Bleil und Wassarman (1986) konnten zeigen, daß ein gegen ZP2 gerichteter monoklonaler Antikörper die sekundäre Spermatozoenbindung über die innere Akrosomenmembran im Mausmodell verhinderte, die primäre Spermatozoenbindung jedoch nicht beeinflußt wurde. Weiterhin wurde durch diesen Antikörper die Bindung von solubilisierten, radioaktiv markiertem ZP2 an die innere akrosomale Membran akrosomreagierter Spermatozoen herabgesetzt. Da durch Trypsin Inhibitoren eine Blockierung der sekundären, nicht aber der primären Bindung möglich war, folgerte Bleil (1988), daß es sich bei der sekundären Spermatozoenbindung um den ersten und ZP3 unabhängigen Schritt der Penetration des Spermatozoons durch die Zona pellucida handelt. Als Ligand für ZP2 auf der Seite des Spermatozoons wird Akrosin/Proakrosin angenommen. Diese Trypsin ähnliche Protease wurde auf der inneren und äußeren akrosomalen Membran nachgewiesen und soll ZP2 als endogenes Substrat besitzen (Töpfer-Petersen et al., 1995; Urch, 1991). Lo-Leggio et al. (1994) wiesen nach, daß Zona pellucida Proteine des Schweines einen entscheidenden Einfluß auf den Umwandlungsprozeß von Proakrosin zu β -Akrosin ausüben. Der genaue molekulare Vorgang der sekundären Spermatozoen-Eizell Bindung ist

noch nicht bekannt. Eine wichtige Rolle bei der Bindung von ZP2 an Lektin (Tulsiani et al., 1992) werden hierbei hochmolekularen Mannose/Hybrid Oligosaccharidketten zugeschrieben. Weiterhin spielt ZP2 durch das sog. "Zona hardening" eine Rolle bei der Verhinderung einer Polyspermie (Wassarman, 1992). Im Mausmodell wird nach dem Auslösen der Reaktion der kortikalen Granula eine 21-34 kDa große Proteinase in den perivitellinen Spalt und die Zona pellucida mittels Exozytose freigegeben. Dieses Enzym wird als ZP2 Proteinase bezeichnet und führt zu einer Veränderung des ZP2-Moleküls (Moller und Wassarman, 1989) und wird nun als ZP2_f bezeichnet. Die Molekularmasse des ZP2 Proteins beträgt 120 kDa, die des partiell hydrolysierten ZP2_f 90 kDa (Bleil et al., 1981). Dieses ist über Disulfidbrücken mit einem 23 kDa großen Spaltprodukt verbunden und in der Zona pellucida verankert. Sobald mehr als 16 % aller ZP2-Moleküle proteolytisch umgebaut sind, verhärtet sich die Zona pellucida und keine weiteren Spermatozoen können sie durchdringen. Die ZP2-ZP2_f-Konversion ist Acetylcholin abhängig und induzierbar und wird über ein Pertussis-Toxin insensitive G-Protein moduliert (Williams et al., 1992). Nach Verhärtung der Zona pellucida der Maus können nur noch etwa 15% der Spermatozoen das Netzwerk penetrieren (Choi et al., 1987); desweiteren wurde nachgewiesen, daß dadurch die Zona widerstandsfähiger gegenüber enzymatischen und chemischen Substanzen wie Trypsin, Pronase, Mercaptoethanol (Gwatkin, 1977) und Chymotrypsin (De Felici und Siracusa, 1982) wird. Downs et al. (1986) konnten zeigen, daß fetales Kälberserum die Umwandlung von ZP2 in ZP2_f während der Reifung von Mausoozyten in vitro hemmt, wobei hauptsächlich Fetuin eine wichtige Rolle spielen soll (Schroeder et al., 1990).

Das ZP2 Gen von Maus und Mensch ist inzwischen kloniert und sequenziert, so daß auch hier die Primärstrukturen zur Verfügung stehen (Liang et al., 1990; Liang und Dean, 1993). Auch die Sequenzen weiterer Spezies (z.B. Mensch und Kaninchen) sind inzwischen bekannt (Harris et al., 1994). Dabei findet sich eine Übereinstimmung in den cDNA-Sequenzen bei etwa 69 bis 89 %. Die Homologie in den Aminosäuresequenzen liegt bei 54-83 %. Die ZP2-Moleküle bestehen aus 676-745 Aminosäuren, wobei das menschliche ZP2 Protein die längste Aminosäuresequenz aufweist (Harris et al., 1994). Das menschliche ZP2-Gen besteht aus 19 Exons mit einer Länge von 45-190 bp und 18 Introns mit 74-3000 bp. Es soll beim Menschen

auf dem Chromosom Nr. 16 (Epifano und Dean, 1994), bei der Maus auf dem Chromosom Nr. 7 (Lunsford et al., 1990) lokalisiert sein.

1.3.2.3 Zona pellucida Protein 3 (ZP3)

Das ZP3-Glykoprotein spielt bei der Maus eine zentrale Rolle für die primäre speziesspezifische Bindung des Spermatozoons an die Eizelle und für die Induktion der Akrosomreaktion. Über einen O-glykosidisch gebundenen Oligosaccharid des ZP3-Proteins wird die primäre Bindung und Erkennung beider Gameten vermittelt. Das Oligosaccharid hat eine Molekularmasse von 3 900 Da (Florman und Wasserman, 1985) und verfügt über mindestens einen terminal α -gebundenen Galactoserest (Bleil und Wasserman, 1988). Für die Spermatozoenrezeptorfunktion des ZP3 sind ausschließlich die Kohlenhydratanteile verantwortlich, für die Induktion der akrosomalen Reaktion die Polypeptidketten des ZP3 Proteins (Florman et al., 1984; Florman und Wasserman, 1985). Es konnte in vivo gezeigt werden, daß die Immunisierung mit einem synthetischen Peptid aus der Aminosäuresequenz des Maus ZP3-Proteins bei weiblichen Mäusen zu einer langanhaltenden Kontrazeption führte (Millar et al., 1989). Bleil und Wasserman konnten bereits 1980 am Mausmodell zeigen, daß mit isoliertem ZP3 Protein zuvor inkubierte Spermatozoen nicht mehr an eine Eizelle binden konnten (Bleil und Wasserman, 1980a). Radioaktiv markiertes ZP3 bindet an die Plasmamembran nicht akrosomreagerter Spermatozoen, jedoch nicht an solche, die bereits die Akrosomreaktion durchlaufen haben (Bleil und Wasserman, 1986). Etwa 10 000-50 000 solcher Bindungsstellen konnten im Bereich der Plasmamembran des Spermatozoenkopfes nachgewiesen werden (Bleil und Wasserman, 1986). Die Bedeutung von ZP3 für die Interaktion mit der Zona pellucida ist außerdem mit Hilfe transgener Mäuse untersucht worden. Es konnte gezeigt werden, daß Oozyten von transgenen Mäusen, die in ihrem Genom das ZP3-Gen des Hamsters tragen, in der Lage waren, Hamsterspermatozoen zu binden (Kinloch et al., 1992).

Eine weitere wichtige Funktion des ZP3-Proteins besteht in der Induktion der Akrosomreaktion gebundener Spermatozoen (Bleil und Wassarman, 1983). Bestimmte Domänen der Polypeptidkette und die strukturelle Intaktheit des Proteingerüsts sind für diese Funktion essentiell (Flormann et al., 1984; Wassarman, 1992). Wird die ZP3-Polypeptidkette durch Proteolyse in kleine Fragmente geteilt, so binden diese zwar an die Plasmamembran des Spermatozoons, die Akrosomreaktion kann jedoch erst ausgelöst werden, wenn die Fragmente beispielsweise über Antikörperbrücken miteinander verbunden werden (Leyton et al., 1989; Leyton und Saling, 1989a). Funktionelle Untersuchungen deuten darauf hin, daß ZP3 zwei unabhängige Bindungsstellen, eine für die primäre Spermatozoenbindung und eine zum Auslösen der Akrosomreaktion besitzt (Kopf und Gerton, 1991). Als korrespondierender Rezeptor des Spermatozoons wird ein 95 kDa Protein vermutet (Leyton und Saling, 1989b; Duncan und Fraser, 1993; Burks et al., 1995), das die Akrosomreaktion moduliert; dieses wird als Zona Rezeptor Kinase (ZRK) bezeichnet (Saling et al., 1995). Bookbinder et al. (1995) wiesen einen für die speziesspezifische Bindung relevanten Spermatozoenrezeptor im Mausmodell nach (sp56).

Nachdem die Reaktion der kortikalen Granula stattgefunden hat, wird das ZP3-Molekül, wahrscheinlich durch eine Glykosidase aus den kortikalen Granula, zu ZP3_f konvertiert (Wassarman, 1987a); die apparente Molekularmasse wird jedoch nicht verändert. Gereinigtes ZP3_f kann weder an Spermatozoen binden, noch die akrosomale Reaktion auslösen (Bleil und Wassarman, 1980a). Es werden aber nicht alle ZP3-Moleküle verändert; deshalb können Spermatozoen auch an bereits befruchtete Eizellen binden und akrosomreagieren (Wassarman et al., 1985).

Das ZP3 Gen ist ein im Verlauf der Evolution hochkonserviertes Gen. Die cDNA ist bei einer Reihe von Säugetieren kloniert und sequenziert worden (Chamberlain und Dean, 1989; 1990; Kinloch et al., 1990; Harris et al., 1994) und weist Sequenzhomologien von 70-85 % zwischen den einzelnen Spezies auf. Die Polypeptidketten sind zwischen 415 und 426 Aminosäureresten lang; es kodiert beim Menschen und Maus ein Protein von 424 Aminosäuren (Ringuette et al., 1988; Kinloch et al., 1990; Chamberlain und Dean, 1990). Die Aminosäuresequenzen der untersuchten Spezies stimmen zu 63-84 % überein (Harris et al.,

1994). Das ZP3-Gen weist 8 Exons auf und umfaßt bei der Maus 8.6 Kb, beim Menschen 10 Kb (Chamberlain und Dean, 1990). 1992 haben van Duin et al. berichtet, daß es im menschlichen Genom zwei ZP3-Gene gibt, die beide auf Chromosom Nr. 7 lokalisiert sind. Eines der ZP3-Gene, POM-ZP3, soll polymorph sein und durch alternatives Splicing für ein verkürztes Protein von 372 Aminosäuren kodieren. Das ZP3 Gen der Maus befindet sich auf Chromosom Nr. 5 (Lunsford et al., 1990).

Die Terminologie der Zona pellucida Proteine ZP1, ZP2, ZP3, die sich aufgrund ihrer elektrophoretischen Mobilität der Maus ZP Proteine ergeben hat, ist nicht immer direkt auf andere Spezies übertragbar. Beim Schwein können in der Elektrophorese zwei Proteinfamilien mit Molekularmassen von 55 kDa und 90 kDa nachgewiesen werden. Dabei besitzt das 55 kDa Protein offensichtlich Spermatozoenrezeptoraktivität und wurde als porcines (p) ZP3 bezeichnet. pZP3 besteht aus zwei immunologisch nicht verwandten Polypeptidketten, pZP3 α (55 kDa- α) und pZP3 β (55kDa- β), die sich elektrophoretisch nur nach partieller Hydrolyse der Oligosaccharidketten auftrennen lassen (Hedrick und Wardrip, 1987; Sacco et al., 1987). Die Spermatozoenrezeptoraktivität ist vorwiegend mit den Oligosaccharidstrukturen von pZP3 α assoziiert (Sacco et al., 1989); allerdings scheint beim Schwein die biologische Aktivität nicht so streng zugeordnet zu sein wie bei der Maus, da sowohl ZP3 β als auch das 90 kDa Protein eine signifikante inhibitorische Kapazität der Spermatozoen-Zona pellucida Bindung besitzen (Berger et al., 1989). Das ZP3 α Gen ist kloniert und sequenziert worden (Yurewicz et al., 1993); für die anderen Zona Proteine stehen Teilsequenzen zur Verfügung (Töpfer-Peterson et al., 1993; Yurewicz et al., 1993; Koyama et al., 1991), die einen Vergleich mit dem Maussystem auf der Basis der Primärstruktur erlauben. Danach gibt es folgende Analogien:

Maus	Schwein
mZP1	pZP3 α
mZP2	90kDa
mZP3	pZP3 β

Oligosaccharidseitenketten der Zona pellucida Proteine des Schweins sind bekannt. pZP3 α besitzt fünf potentielle N-Glykosylierungstellen (Yurewicz et al., 1993), die entsprechend von Kohlenhydratanalysen alle glykosyliert sind sowie drei O-glykosidisch gebundene Oligosaccharide. Für pZP3 β errechnen sich drei N-glykosidisch und sechs O-glykosidisch gebundene Kohlenhydratseitenketten. Das 90 kDa Protein besitzt keine O-glykosidisch gebundenen Oligosaccharidketten (Hedrick und Wardrip, 1987). Dabei sind die neutralen N-glykosidisch gebundenen Seitenketten relativ kurze bi-, tri- und tetraantennäre, komplexe Zuckerketten (Noguchi et al., 1992). Die außerordentliche Heterogenität wird durch komplexe, langkettige N-glykosidisch gebundene und O-glykosidisch gebundene Oligosaccharide verursacht, die repetitierende sulfatierte Lactosamineinheiten am nicht-reduzierenden Ende der Oligosaccharidketten besitzen und zudem noch in unterschiedlichem Maße sialyliert sein können (Noguchi und Nakano, 1992; Hokke et al., 1994; Vliegenthart, 1994). Mittlerweile sind auch die N-gebundenen Kohlenhydrate von ZP2 und ZP3 der Maus beschrieben worden. Es handelt sich dabei um vorwiegend saure tri- und tetraantennäre, komplexe Oligosaccharide mit ähnlichen Strukturen wie beim Schwein (Noguchi, Nakano, 1993).

4 Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung von Antikörpern gegen synthetische Zona pellucida 3 Peptide, die zur Identifizierung und Charakterisierung definierter Zona pellucida 3 Protein Epitope geeignet sind. Aus den bisher bekannten ZP3 Aminosäuresequenzen, die aus isolierten ZP3 cDNAs verschiedener Spezies abgeleitet wurden, sollten homologe ZP3 Peptidteilsequenzen und spezies-spezifische Aminosäuresequenzen ausgewählt und die entsprechenden Peptide synthetisiert werden. Durch Immunisierung von Kaninchen mit diesen synthetischen Peptiden sollten polyklonale Antikörper gegen homologe ZP3 Domänen und Antikörper gegen spezies-spezifische (Maus) Zona pellucida 3 Aminosäuresequenzen hergestellt werden.

Die anti-ZP3 Peptid Antiseren sollten dann hinsichtlich ihrer Eigenschaften Zona pellucida Antigene immunbiochemisch und immunhistologisch identifiziert charakterisiert werden. Es sollten somit Antiseren gegen definierte ZP3 Epitope generiert werden, mit deren Hilfe es möglich ist, in verschiedenen Spezies ZP3 Protein immunbiochemisch eindeutig darzustellen und zuzuordnen. Durch den Einsatz von ZP3 Antiseren gegen homologe ZP3

Aminosäuresequenzen sollten desweiteren Zona pellucida Proteine von Spezies, deren ZP3 Aminosäuresequenzen nicht bekannt sind, immunbiochemisch identifiziert werden.

Mit immunhistochemischen Methoden sollten die gewonnenen Antikörper charakterisiert werden. An Paraffinschnitten von Ovarien verschiedener Spezies sollte untersucht werden, ob das mausspezifische Antiserum nur Maus Zona pellucida erkennt und ob die Antiseren gegen Aminosäuresequenzen, die in allen bisher bekannten ZP3 Sequenzen vorkommen, die Antigene in allen untersuchten Spezies erkennen. Ferner sollte mittels der ZP3 Antiseren gegen homologe ZP3 Aminosäuresequenzen evaluiert werden, ob die Antikörper als Marker für Zona pellucida 3 Protein in der Zona pellucida von Spezies eingesetzt werden können, deren ZP3 Aminosäuresequenz noch nicht bekannt ist.

In Immunfluoreszenzstudien sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Peptidantiseren auch natives, nicht denaturiertes Zona pellucida Protein erkennen.

Ferner sollte an geteilten humanen *Zonae pellucidae* (*Hemizonae*) überprüft werden, ob es hinsichtlich der Bindung von ZP3 Antikörpern Unterschiede gibt, wenn Spermatozoen vorher an die Hemizona gebunden waren oder nicht.

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-ZP3 Antiseren detektiert werden.

Anti-ZP3 Antikörper gegen definierte antigene Domänen des ZP3-Proteins sollten als Marker für die Präsenz von Zona pellucida Protein 3 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.

2 Material und Methoden

2.1 Hersteller und Lieferfirmen

- (1) Amersham Buchler, Braunschweig
- (2) Bio-Rad, München
- (3) Charles-River-Wiga GmbH, Sulzfeld
- (4) Dako, Hamburg
- (5) Dianova, Hamburg
- (6) Fuji, Düsseldorf
- (7) Lucerne, Oakland, CA, USA
- (8) Merck, Darmstadt
- (9) Pierce, Rodgau
- (10) Schleicher & Schüll, Dassel
- (11) Serva, Heidelberg
- (12) Sigma, Deisenhofen
- (13) Vemie Veterinär Chemie GmbH, Impfstoffwerk, Kempen
- (14) Vogel, Gießen

2.2 Chemikalien

Acrylamid/Bis (2)

Ammoniumpersulfat (12)

Benzamidin (12)

Biotinylierter Gel Elektrophorese Standard, Breitbandbereich (2)

Bovines Serumalbumin Fraktion V (BSA) (12)

Chloroform (8)

Citronensäure-Monohydrat (8)

Coomassie Blau R 250 (11)

Deoxycholat (12)

3,3'-Diaminobenzidin (12)

α -D Glucose, wasserfrei (11)

di-Natriumhydrogenphosphat (8)

DNase (12)

Earles Medium (12)

EDC (12)

EDTA (8)

Eisessig (8)

Ekluton 1500 (hCG) (13)

Glycerin (8)

Glycin (8)

Hepes (12)

Hyaluronidase Typ I-S (12)

HybondTM-C, Hybridization transfer-membranes (1)

Immuno Pure Antigen/Antibody Immobilization Kit (9)

Inkomplettes Freundsches Adjuvans (12)

Intergonan (PMSG) (13)

Kaliumdihydrogenphosphat (8)

KLH (Keyhole Limpet (Megathura crenulata) Hemocyanin) (12)

Komplettes Freundsches Adjuvans (12)

Mayers saures Hämalaun (12)

β -Mercaptoethanol (12)

Methanol (8)

Mi-Ma Röntgenfilmplatten für Mammographie (6)

Milchpulver, entfettet trocken (7)

Natriumchlorid (8)

O-Phenylendiamin Dihydrochlorid Tabletten (12)

Paraffin (14)

Percoll[®] (12)

PMSF (12)

Ponceau S (12)

Protein Assay Farbreagenz (2)

Protein Standard I (2)

PVP (Polyvinylpyrolidon) (12)

Pyonin Y (12)

SDS (Sodiumdodecylsulfat) (12)

Silicon Lösung (11)

Silver Stain Kit (2)

Surfact Amps NP-40 Nonidet P40 (9)

Temed (Tetrametylethylendiamin) (12)

Triethanolamin (8)

Tris/HCL (Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid (11)

Trypsin inhibitor Typ II-L: Lima Bean (12)

Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaurat) (12)

Wasserstoffperoxid (8)

Xylol (8)

2.3 Antikörper

Anti-Kaninchen Ig vom Schwein (4)

Anti-Kaninchen Ig, Meerrettich Peroxidase-konjugiert (vom Esel) (1)

Anti-Kaninchen IgG, FITC-konjugiert (von Ziege) (11)

Cy3TM-konjugierter affinitätsgereinigter anti-Kaninchen-IgG (H+L) (vom Esel) (5)

Peroxidase-Anti-Peroxidase Immunkomplex, Kaninchen (4)

Anti-Kaninchen IgG (H+L), Meerrettich Peroxidase konjugiert (von Ziege) (2)

2.4 Geräte

Aldo-Xer-Geltrockner, Schütt, Göttingen

Digital-pH-Meter 761 Calimatic, Knick GmbH & Co, Berlin

MicrofugeTM 12, Beckman, Kalifornien, USA

Mikroskop, Zeiss, Frankfurt

Mikrotiterplattenschüttler, Titertec-Dynatech, Denkendorf

Mikrotom 1212 nach Minot, Leitz, Bensheim

Mini-Protean IITM Gel-Elektrophoresekammer, Bio-Rad, München

Mini-Trans BlotTM Kammer, Bio-Rad, München

Multiscan MCC Elisa Reader, Titertec-Dynatech, Denkendorf

Power Supply 1000/500TM, Bio-Rad, München

Stereomikroskop, Wild Heerbrugg, Leitz, Bensheim

Suprafuge22, Rotor HFA 2250, Heraeus, Hanau

2.5 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden ca. 3 Monate alte weibliche weiße Neuseeländer-Kaninchen und 7-8 Wochen alte weibliche NMRI-Mäuse und 4 Wochen alte weibliche Balb/c Mäuse eingesetzt. Die Tiere wurden von der Firma Charles-River-Wiga GmbH, Sulzfeld, bezogen.

2.6 Peptide

Die cDNA Sequenz des ZP3 Proteins ist bei mehreren Spezies (z.B. Hamster, Maus, Mensch und Krallenaffen) bekannt (Kinloch et al., 1990; Chamberlin et al., 1990, Harris et al., 1994).

Aus dieser Aminosäuresequenz wurden verschiedene Teilsequenzen ausgewählt, die zum einen nur in der Maus vorkamen, zum anderen in allen bisher bekannten ZP3

Aminosäuresequenzen zu finden waren. Abb.6 zeigt die Primärstruktur des murinen und des humanen ZP3 Polypeptids (Ein-Buchstaben Code).

Synthetische ZP3 Peptide wurden von Herrn Dr. Brüller, Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Marburg, nach der Merrifield-Methode synthetisiert (Barany et al., 1979).

Zur Auswahl der synthetischen Peptide wurde ein Computerprogramm (Predict) eingesetzt, das potentielle immunogene Determinanten von Protein-Aminosäuresequenzen rechnerisch ermittelt (Krchnak et al., 1987).

h M E L S Y R L F I C L L L W G S T E L C Y P Q P L W L L Q G
 m M A S S Y F L F L C L L L C G G P E L C N S Q T L W L L P G

h G A S H P E T S V Q P V L V E C Q E A T L M V M V S K D L F
 m G T P T P V G S S S P V K V E C L E A E L V V T V S R D L F

h G T G K L I R A A D L T L G P E A C E P L V S M D T E D V V
 m G T G K L V Q P G D L T L G S E G C Q P R V S V D T D V V

h R F E V G L H E C G N S M Q V T D D A L V Y S T F L L H D P
 m R F N A Q L H E C S S R V Q M T K D A L V Y S T F L L H D P

h R P V G N L S I V R T N R A E I P I E C R Y P R Q G N V S S ZP3-5
 m R P V S G L S I L R T N R V E V P I E C R Y P R Q G N V S S

h Q A I L P T W L P F R T T V F S E E K L T F S L R L M E E N
 m H P I Q P T W V P F R A T V S S E E K L A F S L R L M E E N

h W N A E K R S P T F H L G D A A H L Q A E I H T G S H V P L
 m W N T E K S A P T F H L G E V A H L Q A E V Q T G S H L P L

h R L F V D H C V A T P T P D Q N A S P Y H T I V D F H G
 m Q L F V D H C V A T P S P L P D P N S S P Y H F I V D F H G ZP3-2

h C L V D G L T D A S S A F K V P R P G P D T L Q F T V D V F
 m C L V D G L S E S F S A F Q V P R P R P E T L Q F T V D V F

h H F A N D S R N M I Y I Y C H L K V T L A E Q D P D E L N K
 m H F A N S S R N T L Y I T C H L K V A P A N Q I P D K L N K

h A C S F S K P S N S W F P V E G P A D I C Q C C N K G D C G
 m A C S F N K T S Q S W L P V E G D A D I C D C C S H G N C S

h T P S H S R R Q P H V M S Q W S R S A S R N R R H V T E E A
 m N S S S S Q F Q I H G P R Q W S K L V S R N R R H V T D E A

h D V T V G P L I F L D R R G D H E V E Q W A L P S D T S V V ZP3-6
 m D V T V G P L I F L G K A N D Q T V E G W T A S A Q T S V

h L L G V G L A V V V S L T L T A V I L V L T R R C R T A S H
 m A L G L G L A T V A F L T L A A I V L A V T R K C H S S S Y

h P V S A S E
 m L V S L P Q

Abb. 6: Primärstruktur des ZP3 Polypeptids bei Mensch und Maus im Ein-Buchstaben Code

h = Human m = Maus

2.6.1 Immunisierung und Gewinnung von Antiseren

Je 5 mg der verwendeten Peptide wurden in 0,5 ml H₂O aufgenommen und zu 10 mg KLH, gelöst in 1,5 ml H₂O, gegeben. Dann wurden 5 mg EDC (in 0,5 ml H₂O) unter Rühren langsam hinzugegeben. Nach einstündigem Rühren wurden weitere 5 mg EDC (in 0,5 ml H₂O) zu der Reaktionslösung gegeben. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde das Konjugat in einen Dialyseschlauch gefüllt und 3 mal je 1,5 Stunden gegen jeweils 5 l destilliertes Wasser bei 4°C dialysiert, um freies EDC zu entfernen. Die konjugierte Antigenlösung wurde mit komplettem Freund'schen Adjuvans im Verhältnis von 1:2 (v/v) emulgiert. Eine stabile Wasser in Öl-Emulsion wurde durch wechselseitiges Aufziehen in zwei miteinander verbundenen Luer-Lock-Spritzen hergestellt. Bei der Erstimmunisierung wurde 1mg emulgiertes Konjugat in komplettem Freund'schen Adjuvans pro Kaninchen a 100µl entlang des Rückens intrakutan appliziert. Die erste Auffrischung (mit 1mg Peptid/KLH-Konjugat) erfolgte 4 Wochen nach der Erstimmunisierung, die zweite Auffrischung (mit 0,5mg Peptid/KLH-Konjugat) 4 Wochen darauf, wobei das Peptid/KLH-Konjugat jeweils mit inkomplettem Freund'schem Adjuvans emulgiert wurde. Pro Peptid wurden 3 Kaninchen immunisiert.

Als Negativkontrolle und zur Verlaufskontrolle des Antikörpertiters wurden den Kaninchen vor der Erstimmunisierung und 4 und 8 Wochen danach durch Punktion der Ohrdrandvene Blut entnommen. Das Blut wurde zur Serumgewinnung zwei Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen und anschließend 5 min. bei 12 400 x g zentrifugiert. Der Nachweis spezifischer Antikörper erfolgte mittels des ELISA.

2.6.2 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) zur Titerbestimmung

Als Nachweissystem der Antikörperproduktion gegen die synthetischen Peptide und zum Titerverlauf wurde der ELISA eingesetzt. Die entsprechenden Peptide wurden in aqua dest. gelöst, 100µl dieser Lösung (1,5µg Peptid) pro Vertiefung in ein 96-Loch Kunststoffmodul

(mittelfine Proteinbindungskapazität) gegeben. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C im Trockenschrank wurden die Module zweimal in TPBS und einmal in PBS pH 7,4 gewaschen, um nicht adsorbiertes, überschüssiges Antigen zu entfernen. Nach kräftigem Ausschlagen der Module wurden 100µl der zu testenden Antiseren in adäquaten Verdünnungen in PBS mit 1% BSA einpipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Rüttler inkubiert. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift wie oben beschrieben. Nach gründlichem Ausschlagen der Module wurden Peroxidase markierte anti-Kaninchen-IgG Antikörper (1:3000 in 1%-iger PBS/BSA Lösung verdünnt) in einem Volumen von 100µl pro Vertiefung pipettiert. Die Platten wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Rüttler geschüttelt. Im Anschluß an einen dritten Waschschrift wurden pro Vertiefung 100µl Reaktionssubstrat (OPD, 0,5mg/ml, gelöst in Substratpuffer, plus 0.03% H₂O₂, f.c.) hinzugefügt. Nach 20 minütigem Schütteln bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 3 M HCL abgestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 492 nm in einem Multiscan MCC ELISA Reader^R gemessen.

PBS Puffer, pH 7.4	120 mM Natriumchlorid 4 mM Kaliumdihydrophosphat 10 mM di-Natriumhydrophosphat
TPBS Puffer, pH 7.4	0,05% v/v Tween 20 in PBS
Substratpuffer, pH 4	0.2 M di-Natriumhydrophosphat 0.1 M Citronensäure

2.7 Reinigung und Konzentrierung von Antikörpern

2.7.1 Affinitätschromatographische Reinigung von Immunglobuline über immobilisierte synthetische Peptide

Die zur Antikörperreinigung benötigten Affinitätsmatrix wurde mit dem Immuno Pure Antigen/Antibody Immobilization Kit hergestellt. 2 ml Gelvolumen Sepharose 4B wurden entsprechend den Angaben des Herstellers mit Bromcyan aktiviert. Anschließend wurden 10 mg des zur Antikörperreinigung vorgesehenen Peptides kovalent an die Säulenmatrix gekoppelt. Der prozentuale Anteil des an das Säulenmaterial kovalent gebundenen synthetischen Peptids wurde mittels Pierce`s BCA Protein Assay Reagent berechnet. Zur Antikörperreinigung wurden jeweils 2ml des zuvor 10 min. bei 10 000 x g zentrifugierten Antiserums auf die mit Phosphatpuffer (PBS) äquilibrierte Peptid-Affinitätschromatographie-Säule gegeben und 15-30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Säule mit 20 ml entgastem Phosphatpuffer, pH 7,4 gewaschen. Die an das Peptid gebundenen spezifischen ZP3 Peptid Antikörper wurden somit von dem Serum getrennt. Zur Elution der an die Matrix gebundenen Immunglobuline wurde ein 0,1M Glycin-HCl Puffer, pH 2,8 verwendet. Die eluierten Peptidantikörper wurden in 1 ml Fraktionen portioniert in vorgepufferten (15µl 1M Tris, pH 7,5) Eppendorf Reaktionsgefäßen aufgefangen. Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde mit Hilfe des Bio-Rad Proteinassay in 96 Loch-Mikrotiterplatten bestimmt (siehe 2.8). Nach Einstellen des pH Wertes auf 7,5 wurden die gereinigten Antikörperfraktionen mit annähernd gleichem Proteingehalt vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Die Titerbestimmung der eluierten Antikörper erfolgte im ELISA.

2.7.2 Isolierung der IgG-Fraktion aus Kaninchenserum mittels Säulenchromatographie an Protein A-Sepharose

Zur IgG-Isolierung aus Antiseren wurde eine Protein A-Sepharose Affinitätschromatographiesäule verwendet (Forsgen und Sjoquist, 1966; Langone, 1982). Protein A von *Staphylococcus aureus* wurde kovalent an eine Sepharose 4-CLB gekoppelt. Der Mechanismus zur Anreicherung von Antikörpern beruht auf einer hohen Affinität zwischen dem aus *Staphylococcus aureus* gewonnenen Protein A und dem F_C- Teil von Immunglobulinen (IgG) Molekülen.

Die Gewinnung der IgG Fraktionen aus den Antiseren, die Proteinbestimmungen sowie die Titerbestimmungen der eluierten IgG erfolgten im wesentlichen wie unter 2.7.1 beschrieben.

2.8 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der gereinigten Antikörperfraktionen fand nach der Methode von Bradford statt (Bradford, 1976). Zur Anwendung kam ein Proteinassay der Firma Bio-Rad. Als Standard diente Rindergammaglobulin mit einem Proteingehalt von 1,4 mg/ml. Die Proteinbestimmung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die photometrische Messung wurde 15 min. nach dem Vermischen von Probe und Farbreagenz bei einer Wellenlänge von 620 nm durchgeführt. Die Messung erfolgte mit einem Titertech-Gerät direkt in den Mikrotiterplatten.

2.9 Gewinnung von Ovarien und Eizellen

2.9.1 Schweine Eizellen

Die Ovarien stammten von ca. 6-9 Monaten alten gesunden Schweinen, die vom Schlachthof Gießen zur Verfügung gestellt wurden. Die Ovarien wurden gekühlt transportiert und innerhalb von 2 Stunden zur Eizellgewinnung weiterverarbeitet. Zur Gewinnung von Schweine Eizellen wurden die Follikel frischer Ovarien punktiert. Die Follikelgröße betrug durchschnittlich 5-8 mm. Nach gründlicher Spülung der punktierten Follikel mit isotonischer Kochsalzlösung wurde der Follikelinhalt unter einem Stereomikroskop beurteilt und die darin befindlichen Eizellen mit einer silikonisierten, ausgezogenen Pasteurpipette aufgesaugt. Die Eizellen wurden anschließend in einem PBS-Puffer unter Zusatz von 2 mM Na-Citrat und 2 mM EDTA aufgenommen. Das Abtrennen der die Eizellen umgebenden Kumuluszellen (Denudieren) erfolgte durch mehrmaliges Aufziehen der Eizellen mit einer siliconisierten, fein ausgezogenen Pasteurpipette. Dabei war der Durchmesser der Pasteurpipette nur geringfügig größer als der der Eizelle. Die von Kumuluszellen befreiten Eizellen wurden bis zu ihrer Weiterverwendung in PBS Puffer bei -80°C aufbewahrt.

2.9.2 Maus Eizellen

Zur Gewinnung von Mauseizellen dienten 7-8 Wochen alte NMRI-Mäuse (Charles-River-Wiga-GmbH ,Sulzfeld). Die Superovulation wurde durch eine i.p. Injektion von 10 IE PMSG und einer 48 Stunden danach erfolgten i.p. Injektion von 10 IE hCG induziert. Die Mäuse wurden 14 Stunden nach der letzten Injektion durch cervicale Dislokation getötet. Nach Präparation von Ovar und Salpinx wurde die erweiterte Ampulla unter dem Stereomikroskop dargestellt und eröffnet. Die ausgetretenen Kumulusmassen mit den darin befindlichen Eizellen wurden zur Denudierung in 0,1% Hyaluronidase (w/v) in Earles-Medium transferiert. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Eizellen durch wiederholtes

Aufziehen in einer Pasteurpipette von den Kumulusmassen befreit, in frischem Earles-Medium durch mehrmaliges Aufsaugen gewaschen und in PBS Puffer bis zu ihrer Weiterverwendung bei -80°C aufbewahrt.

2.9.3 Humane Eizellen

Nach vorherigem Befragen der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität, die die geplanten Untersuchungen positiv begutachtete, wurden die Untersuchungen mit menschlicher Zona pellucida durchgeführt. Bei den Eizellen handelte es sich um überzählige, nicht befruchtete Eizellen aus dem in-vitro Fertilisationsprogramm, die verworfen worden wären. Die Eizellen wurden in HAM's F-10 Kulturmedium im Inkubator bei 37°C mit 5 % CO_2 aufbewahrt. Nach Zugabe von 0,1% Hyaluronidase (w/v) in HAM's F-10 Kulturmedium wurden die Eizellen von den Kumulusmassen getrennt. Nach mehreren Waschschritten in PBS Puffer wurden die Eizellen (Metaphase I oder II) bei 4°C in einer hyperosmolaren Salzlösung gelagert, wodurch die Eizellen ihre Befruchtungsfähigkeit verloren und somit in späteren Versuchen eine akzidentelle Befruchtung ausgeschlossen wurde.

HAM's F-10 Kulturmedium, pH 7,4

1 l Nutrient Mixture F-10 HAM
 5 ml L-Glutamin Lösung 200 mM
 1% v/v Penicillin/Streptomycin Lösung
 0,3% w/v Rinderserumalbumin Fraktion V

Hyperosmolare Salzlösung, pH 7,4

1,5 M Magnesium Chlorid Hexahydrat
 0,1% w/v Polyvinylpyrolidon
 40 mM Natrium-Hepes

2.10 Isolierung der Zona pellucida

2.10.1 Mechanische Isolierung von Schweine und Maus Zona pellucida

Isolierte Eizellen wurden mit einer silikonisierten Pasteurpipette, deren Durchmesser kleiner war als die Eizelle selbst, mehrmals aufgezogen. Dadurch wurde die Zona pellucida mechanisch eröffnet und die Eizelle konnte durch den entstandenen Spalt austreten. Die so separierten Zonae pellucidae wurden gesammelt und mehrmals in PBS Puffer gewaschen. Anschließend wurden sie in PBS Puffer gesammelt, lyophilisiert und bei -80°C gelagert.

Zona pellucida 3 Proteine, die aus der ZP von Schweineeizellen gewonnen wurden, wurden von Frau Prof. Dr. Töpfer-Petersen, Hannover, zur Verfügung gestellt. Bei diesen porcinen Zona pellucida Proteinen handelte es sich um gereinigte, mit biochemischen Methoden enzymatisch partiell deglykosylierte Proteinfractionen, die als $\text{ZP3}\alpha$ und $\text{ZP3}\beta$ bezeichnet werden (Töpfer-Petersen et al., 1993).

2.10.2 Isolierung von Maus Zona pellucida durch Percoll-Gradientenzentrifugation

Diese Methode diente zur Gewinnung quantitativer Proteinmengen an Maus Zonae pellucidae. Vierzig 4 Wochen alte weibliche Balb/c Mäuse wurden durch cervicale Dislokation getötet. Die gewonnenen Ovarien wurden zunächst in 4 ml Homogenisationspuffer (HB-Puffer) gesammelt. Nach Zugabe von 4 mg Lima Bean Trypsin Inhibitor, 40 μl DNase (Stocklösung 25mg/ml) und 40 μl Hyaluronidase (Stocklösung 25mg/ml) wurden die Ovarien mit einem Dounce-Homogenisator (Stempel A) durch 20-maliges Auf- und Abbewegen des Stempels homogenisiert. Nach Hinzufügen von 40 μl Nonidet-P 40 und 4 μl PMSF (Stocklösung 100mM in Ethanol) wurde das Gewebe erneut homogenisiert (20 mal). Zu dem Ansatz wurden 200 μl Deoxicholat (20% w/v) gegeben und mit Stempel B 20 mal homogenisiert.

Zur Herstellung des Percollgradienten wurden 6,48 ml Percoll, 1% PVP (gelöst in H₂O) und 2,52 ml HB Puffer (2-fach konzentriert) vermischt. Das Ovarienhomogenat wurde mit einer Pasteurpipette auf die Percolllösung geschichtet. Durch eine Zentrifugation über 65 min. bei 4°C bei 50 000 x g im Festwinkelrotor (HFA 2250) in einer Suprafuge 22 stellte sich der Percollgradient ein und die Bestandteile des Homogenats wurden nach ihrer Dichte aufgetrennt. Die Zona pellucida stellte sich nach der Zentrifugation als ein 1,5-2 mm breiter opaleszenter, heller Ring im oberen Drittel des Gradienten dar und wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Die gewonnenen Maus Zonae pellucidae wurden in einem "freeze and thaw" Puffer (FT-Puffer) zu gleichen Volumenanteilen gemischt. Die Zona pellucida Suspension wurde dann 3 mal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Danach wurde die Zona pellucida Suspension 1 mal in FT-Puffer und 1 mal in HB-Puffer bei 10 000 x g für 15 min. gewaschen, portioniert und bei -80°C gelagert.

Homogenisationspuffer (HB-Puffer)

25 mM Triethanolamin
 150 mM NaCl
 1 mM MgCl₂*6H₂O
 1 mM CaCl₂*2H₂O

Freeze-Thaw Puffer (FT-Puffer)

119.37 mM NaCl
 4.78 mM KCL
 1.70 mM CaCl₂*2H₂O
 1.19 mM KH₂PO₄
 1.19 mM MgSO₄*7H₂O
 60 U/ml Pen/Strep
 25 mM NaHCO₃
 10 mM Hepes
 5.6 mM Glucose
 0.02% BSA

0.2% NP-40
10 mM EDTA
1 mM PMSF
10 µg/ml LBTI
1% Polyvinylpyrrolidone

2.11 Paraffinschnitte aus Ovarien

Säugerovarien (Mensch, Schwein, Rind, Hamster, Ratte und Maus) wurden in Methacarn-Fixans, bestehend aus 6 Teilen Methanol, 3 Teilen Chloroform und einem Teil Eisessig über 24 Stunden fixiert (Romeis 1989). Anschließend wurden die Ovarien über 4 Stunden in 96% Ethanol, dann über 4 Stunden in 100% Isopropanol dehydriert und abschließend 12 Stunden lang in Xylol entfettet. Nach Fixierung wurden die Ovarien über 8 Stunden bei 60°C in flüssiges Paraffin eingebettet und zum Aushärten für weitere 12 Stunden bei 4°C gelagert. Von dem so vorbereiteten Gewebe wurden Paraffinschnitte (Schnittdicke 4-6µm) mit einem Leitz-Ultramikrotom hergestellt.

2.12 Humane Hemizonae pellucidae

Menschliche Hemizonae pellucidae und menschliche Ovarien wurden von Prof. Oehninger, The Jones Institute for Women`s Health, Eastern Virginia Medical School Norfolk, Virginia, USA, zur Verfügung gestellt.

Die Eizellen wurden aus menschlichen Eierstöcken post mortem gewonnen und in HAM´s F-10 Kulturmedium zerkleinert. Die gewonnenen Eizellen wurden in einer hyperosmolaren Salzlösung bei 4°C gelagert und konnten über mehrere Monate aufbewahrt werden. Zur weiteren Verwendung wurden die Oozyten in PBS Puffer gewaschen und von den umgebenden Kumuluszellen mechanisch befreit. Die Denudierung der Eizelle wurde

dadurch erreicht, daß die Oozyte mehrfach durch eine Glaspipette gesaugt wurde; der Durchmesser der Pipette darf nur wenig größer sein als der Durchmesser einer Eizelle. Die Oozyten wurden anschließend mit Hilfe eines Mikromanipulators (Narishige) und eines inversen Mikroskops in zwei gleiche Hälften geteilt und durch mehrmaliges Spülen vom Oolemm und Ooplasma getrennt.

Anschließend wurde ein Teil der Hemizona Paare dem Hemizona Assay zugeführt (Burkman 1988). In diesem Test werden Patientensperma und Sperma von einem fertilen Spender betreffend der Spermatozoen-Zona pellucida Bindung verglichen. Eine Hemizona wird mit Spermatozoen eines fertilen Spenders, die entsprechende Hemizona mit Patientenspermatozoen inkubiert. Abschließend werden die an die Hemizona gebundenen Spermatozoen gezählt und miteinander verglichen. Die jeweiligen Hemizonae wurden nach Beendigung des Hemizona Assays auf mit Polylysin beschichtete Objektträger verbracht und bei Raumtemperatur getrocknet.

Ein weiterer Teil der Hemizonapaare wurde ohne Zusatz von Spermatozoen in Medium inkubiert, auf Polylysin beschichtete Objektträger gegeben und getrocknet.

Die Eizellen befanden sich in der Regel im Reifegrad der Metaphase I oder II.

HAM's F-10 Kulturmedium, pH 7,4

11 Nutrient Mixture F-10 HAM
 5 ml L-Glutamin Lösung 200 mM
 1% v/v Penicillin/Streptomycin Lösung
 0,3% w/v Rinderserumalbumin
 Fraktion V

Hyperosmolare Salzlösung, pH 7,4

1,5 M Magnesium Chlorid Hexahydrat
 0,1% w/v Polyvinylpyrolidon
 40 mM Natrium-Hepes

2.13 Charakterisierung der Antiseren

2.13.1 Immunhistochemie mit Paraffinschnitten

Die hergestellten Paraffinschnitte von Ovarien verschiedener Spezies wurden zunächst mit Xylol entparaffiniert. Zur schonenden Wässerung der Schnitte wurden diese zunächst einer absteigenden Alkoholreihe (100% Isopropanol, 96%, 80%, 70%, 50% Ethanol) zugeführt. Nachdem die Schnitte in PBS Puffer gewaschen worden waren, wurden sie zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase für 15 min. mit 3% Wasserstoffperoxid überschichtet. Im Anschluß daran wurden die Schnitte wieder in PBS Puffer gewaschen. Um unspezifische Protein-Protein-Interaktionen zu verhindern, folgte eine 30-minütige Präinkubation in 1% Milchpulver/PBS (w/v). Dann wurde das Antiserum in einer Verdünnung von 1:200 in PBS mit 1% Milchpulver (w/v) auf einen Schnitt gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer wurden die Schnitte 3 mal für 5 min. mit PBS Puffer gewaschen. Danach wurde der Zweitantikörper (anti-Kaninchen Immunglobulin) in einer Verdünnung von 1:100 in 1% Milchpulver/PBS (w/v) für 30 min. aufgetragen. Der Zweitantikörper ist ein sogenannter Brückenantikörper, der gegen den Erstantikörper gerichtet ist und im molaren Überschuß eingesetzt wurde. Nach ausgiebigem Waschen mit PBS Puffer folgte dann eine 30 minütige Inkubationszeit mit einem Peroxidase-anti-Peroxidase Immunkomplex (PAP-Kaninchen), ebenfalls in einer Verdünnung von 1:100 in 1% Milchpulver/PBS (w/v) für 30 min. Die PAP diente der Darstellung des Erstantikörpers über den Zweit- oder Brückenantikörper, wobei sich der PAP-Immunkomplex an die Bindungswalenz des Zweitantikörpers lagert. Nach mehrmaligem Waschen in PBS Puffer wurden die Gewebeschnitte in eine DAB-haltige Substratlösung verbracht (Diaminobenzidin, 200 mg/l in Natriumacetatpuffer, pH 6,0). Zum Starten der Reaktion wurde 0,03% (f.c.) Wasserstoffperoxid eingesetzt. DAB ist ein Chromogen, das durch Wasserstoffperoxid und dem Enzym Meerrettich Peroxidase zu einem wasserunlöslichen, bräunlichen Farbprodukt umgesetzt wird. Die Inkubationszeit mit DAB betrug 20 min. Danach wurden die Schnitte zuerst in PBS Puffer, dann in aqua dest. für jeweils 5 min. gewaschen. Zur Gegenfärbung der

Zellkerne wurden die Schnitte mit Hämalaun für 5 min. gefärbt. Nach 10 min. Spülen in Leitungswasser stellten sich die Zellkerne blau dar. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe wurden die Schnitte entwässert (50%, 70%, 80%, 96% Ethanol, 100% Isopropanol) und nach Entfettung mit Xylol mit Corbit-Balsam eingedeckt.

Zur Abklärung inwieweit ZP3 Antiseren spezifisch ihr Antigen detektieren, wurden zwei Kontrollexperimente durchgeführt: 1. Die Schnitte wurden mit einem Präimmunserum in gleicher Verdünnung wie das Antiserum inkubiert, 2. Die Bindung der eingesetzten Antikörper an ZP3 Protein wurde mit dem synthetischen ZP3 Peptid blockiert, gegen das sie gerichtet sind. Dazu wurde das entsprechende Antiserum (1:200 verdünnt) vor dem Auftragen auf den Paraffinschnitt mit dem jeweiligen synthetischen Peptid (5 µg/ml) für 2 Stunden inkubiert. Wenn alle Antikörper mit dem Antigen abgesättigt sind, können diese folglich nicht mehr an ZP3 Protein binden.

Alle Inkubationschritte erfolgten bei Raumtemperatur und in einer feuchten Kammer.

2.13.2 Immunhistochemie an humanen Hemizonae

Die humanen Hemizonae (auf mit Polylysin beschichteten Objektträgern fixiert) wurden 3 mal für 5 min. bei Raumtemperatur mit PBS Puffer gewaschen. Es folgte eine 2 stündige Präinkubation in 3% BSA/PBS (w/v) Puffer, um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu verhindern. Dann wurde das Serum in einer Verdünnung von 1:100 in 3% BSA/PBS (w/v) auf die entsprechende Hemizonae gegeben. Die eine Hälfte der Zona pellucida wurde mit dem Antiserum, die korrespondierende Hemizona mit dem Präimmunserum als Negativkontrolle inkubiert. Aus jeder Eizelle konnte somit eine Test-Hemizona und eine Kontroll-Hemizona als interne Kontrolle gewonnen werden. Nach einer einstündigen Inkubation wurden die Hemizonae in PBS Puffer gewaschen (3 mal für 5 min. in 3% BSA/PBS w/v). Dann wurde der Zweitantikörper, ein anti-Kaninchen Immunglobulin, 1:100 in 3% BSA/PBS w/v verdünnt, für 30 min. aufgetragen. Es folgte ein weiterer Waschschrift (3 mal für 5 min. in 3% BSA/PBS w/v), dem sich die Inkubation mit Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP-Kaninchen) in

einer Verdünnung von 1:100 in 3% BSA/PBS (w/v) anschloß. Nach 30 min. wurden die Hemizonae gewaschen (3mal für 5 min. in 3% BSA/PBS w/v) und dann mit der DAB-haltigen Substrat-lösung für etwa 20 min. inkubiert. Zum Starten der Reaktion wurde 0,03% f.c. Wasserstoff-peroxid zugegeben. Spezifisch gebundene Antikörper wurden durch die Peroxidase-anti-Peroxidase Methode und DAB als Substrat nachgewiesen. Abschließend wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit Corbit-Balsam eingedeckt (siehe auch 2.13.1.).

Eingesetzt wurden Hemizonae, die den Hemizona Assay durchlaufen hatten, sowie Hemizonae, die nicht mit Spermatozoen inkubiert wurden.

Alle Inkubationschritte erfolgten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur.

2.13.3 Indirekter Immunfluoreszenztest an isolierten Eizellen

Unbehandelte, denudierte Schweineeizellen und menschliche Eizellen wurden in PBS Puffer in Falcon Kulturgewebsschalen für 20 min. gewaschen. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation der Eizellen mit den entsprechenden ZP3 Antiseren (1:100 verdünnt in 3% BSA/PBS w/v). Als Negativkontrolle wurden die Eizellen mit einem Präimmunserum in gleicher Verdünnung wie das Antiserum inkubiert und wie im Folgenden beschrieben weiter behandelt.

Nach dem Entfernen nicht gebundener Antikörper durch Waschen der Eizellen in PBS Puffer (2 mal 10 min.) wurden die Eizellen mit dem Zweitantikörper inkubiert. Eingesetzt wurden FITC-markierte anti-Kaninchen-IgG (1:160 verdünnt in 3% BSA/PBS w/v) oder Cy-3 konjugierte anti-Kaninchen-IgG (1:600 verdünnt in 3% BSA/PBS w/v) Antikörper. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur folgten wie oben aufgeführte Waschschrte.

Abschließend wurden die Eizellen auf einen Objektträger transferiert, mit Eindeckmittel (PBS/Glycerin, im Verhältnis 1:1) überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt. Unter einem Fluoreszenzmikroskop konnte die Bindung der Antikörper an ihr entsprechendes

Antigen durch indirekte Immunfluoreszenzmarkierung nachgewiesen werden (FITC bei 450-490 nm, Cy-3 bei 546 nm).

2.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteingemische wurden elektrophoretisch durch ein diskontinuierliches, denaturierendes Gelelektrophoresesystem nach Laemmli (Laemmli 1970) aufgetrennt. Zur optimalen Auftrennung der Proteine wurden 7,5%-ige und 10%-ige Trenngele, sowie 6%-ige Sammelgele eingesetzt.

Zwischen zwei mit Methanol entfetteten Glasscheiben (12 x 15 cm) einer Mini-Protean Gel-Elektrophorese-Kammer wurden zwei Distanzstäbe (Spacer, 0,75 mm Dicke) eingelegt und mit den dafür vorgesehenen Halterungen fixiert. Das Trenngel wurde anschließend in den Zwischenraum, den beide Glasplatten bildeten, gegossen und mit Propanol überschichtet, um ein Austrocknen während der Polymerisation zu verhindern. Nach Abschluß des Polymerisationsprozesses (1 Stunde) wurde der Alkohol abgegossen und das Trenngel mit aqua dest. gespült. Das Sammelgel wurde anschließend eingegossen und ein Gelkamm (10 Taschen, 0,75 mm dick) zwischen die Glasplatten geschoben. Der Gelkamm wurde nach dem Polymerisieren des Gels entfernt und das Sammelgel mit Laufpuffer überschichtet. Die in Probenpuffer aufgenommenen Proteine wurden über 4 min. gekocht und nach dem Abkühlen mit einer Hamiltonspritze in die Geltaschen gefüllt. Dem Probenpuffer wurde β -Mercaptoethanol (5% v/v) hinzugefügt, unter nicht reduzierenden Bedingungen wurde kein Mercaptoethanol hinzugegeben. Zur Bestimmung der apparenten Molekularmassen der aufgetrennten Proteine im Westernblot wurden biotinylierte Standardproteine eingesetzt: Myosin (200 kD), β Galactosidase (116.25 kD), Phosphorylase B (97.4 kD), BSA (66.2 kD), Ovalbumin (45 kD), Carboanhydrase B (31 kD), Sojabohne Trypsin Inhibitor (21.5 kD), Lysozym (14.4 kD) und Aprotinin (6.5 kD). Die Elektrophorese erfolgte über einen Zeitraum von einer Stunde bei einer konstanten Spannung von 200 V. Nach Beendigung der

Elektrophorese wurde das aufgetrennte Proteingemisch mit Coomassie-Blau-Färbung sichtbar gemacht oder auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

Probenpuffer, pH 6,8	1% w/v SDS 1,3 M Glycerin 5% v/v β -Mercaptoethanol 0,01% w/v Pyronin Y 50 mM Tris
Trenngelpuffer, pH 8,8	0,2% w/v SDS 750 mM Tris/HCL
Sammelgelpuffer, pH 6,8	0,2% w/v SDS 250 mM Tris/HCL
Laufpuffer, pH 8.3	0,1% w/v SDS 190 mM Glycin 25 mM Tris

Trenngel (10%ig)	4,2 ml 30% w/v Acrylamid 6,2 ml Trenngelpuffer 2,0 ml Aqua dest. 17 µl Temed 50 µl 10% w/v Ammonium- persulfat
Trenngel (7,5%ig)	3,15 ml 30% w/v Acrylamid 6,2 ml Trenngelpuffer 3,05 ml Aqua dest. 17 µl Temed 50 µl 10% w/v Ammonium- persulfat
Sammelgel (6%ig)	1,33 ml 30% w/v Acrylamid 3,33 ml Sammelgelpuffer 1,92 ml Aqua dest. 17 µl Temed 50 µl 10% w/v Ammonium- persulfat

2.14.1 Coomassie-Blau-Färbung

Zur Anfärbung der Proteinbanden wurden die Gele nach der Elektrophorese in einer 0,25% igen Coomassie-Blau Lösung über einen Zeitraum von 1 Stunde gefärbt. Die Entfärbung der Gele erfolgte in Entfärbelösung unter Schütteln über 16 Stunden bei

Raumtemperatur. Zur Adsorption des gelösten Farbstoffes wurde ein Schaumstoffstück zugegeben. Nach Entfärbung der Gele und Waschen mit aqua dest. wurden diese auf einem Gelrockner getrocknet, photographiert und archiviert.

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.

2.15 Immunoblot

2.15.1 Western-Blot

Durch einen Western Blot wurden die in der SDS-Gelelektrophorese nach ihren Molekularmassen aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran elektrotransferiert (Towbin et al. 1979). Dafür wurde das im Western-Blot-Puffer befindliche Gel blasenfrei auf eine feuchte Nitrozellulosemembran gelegt, mit zwei feuchten Filterpappen umgeben und zwischen zwei Schaumstoffscheiben gelegt. Diese wurden zwischen zwei Kunststoffscheiben gepreßt und in eine Mini-Protean Western-Blot-Kammer eingelegt. Nach dem Elektrotransfer über 1 Stunde und einer Spannung von 35 V pro Gel wurden die Nitrozellulosemembranen entnommen, getrocknet und anschließend 10 min. in einer 2%igen Ponceau S Lösung gefärbt.

Nach Auswaschen des überschüssigen Farbstoffes mit aqua dest. konnte ein regelrechter Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran überprüft und photodokumentiert werden. Die Nitrozellulosemembran wurde entweder sofort zum Immunoblotting weiter-verwendet oder bei Raumtemperatur getrocknet und aufbewahrt. Um festzustellen, ob die aufgetrennten Proteine quantitativ aus dem Polyacrylamidgel eluiert worden waren, wurden eventuell im Gel verbliebenen Proteine zur Kontrolle mit Coomassie-Blau gefärbt.

Western Blot Puffer	250 mM Glycerin
	0,01% w/v SDS
	20% v/v Methanol
	40 mM Tris/HCL

2.16 Immunbiochemische Identifizierung von Proteinen

Die Nitrozellulosemembranen mit den darauf befindlichen Proteinen wurden zur Abdeckung unspezifischer Antikörperbindungsstellen in PBS mit 3% Ovalbumin (w/v) über Nacht bei 4°C präinkubiert. Das Färbereagenz Ponceau S war nach der Präinkubation herausgewaschen und störte nicht den nachfolgenden Versuchsverlauf. Die weiteren Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Antiseren wurden in 0,3% Ovalbumin/PBS (w/v) in einer Verdünnung von 1:200 über eine Stunde mit den auf Nitrozellulosemembranen transferierten Proteinen inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurden die Membranen 2 mal für 15 min. in TPBS Puffer und 2 mal für 10 min. in PBS Puffer gewaschen. Durch eine anschließende zweite Präinkubation mit 3% Ovalbumin in PBS wurden wiederum unspezifische Bindungsstellen für den Zweitantikörper maskiert. Zur Sichtbarmachung spezifisch gebundener Antikörper

wurden Meerrettich-Peroxidase-markierte anti-Kaninchen Ig Antikörper (1:3000 mit 0,3% Ovalbumin/PBS verdünnt) eingesetzt und über 1 Stunde mit der Nitrozellulosemembran inkubiert. Durch anschließende Waschschriffe (zweimal in TPBS und zweimal in PBS, Gesamtdauer 50 min.) wurden nicht gebundene Zweitantikörper entfernt. Die Nitrozellulosemembran wurde dann zur Detektion gebundener Antikörper dem Chemilumineszenzverfahren zugeführt.

2.17 Chemilumineszenzverfahren

Zum Nachweis Peroxidase markierter gebundener Antikörper diente das Chemilumineszenzverfahren. Das Substrat ECL (Amersham) wurde entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet. Die Komponenten des Substrates enthalten eine Wasserstoffperoxidlösung und ein zyklisches Diacylhydrazid (Luminol). Die Nitrozellulosemembran wurde für 1 min. mit diesem Substrat überschichtet.

Abb. 7 zeigt schematisch die Reaktion, die der Chemilumineszenz zugrunde liegt. Das Peroxidasekonjugat setzt das Luminol mit Hilfe von Wasserstoffperoxid um. Das Luminol geht dabei auf ein chemisch angeregtes Energieniveau über, das es durch Emission von Licht wieder verläßt.

Die Nitrozellulosemembran wurde nach Überschichtung mit Substrat in Klarsichtfolie verpackt und auf geeignetes Filmmaterial (Mi-Ma Röntgenfilmpplatten, Fuji) aufgelegt. Die Röntgenfilme wurden je nach Intensität der Reaktion zwischen 1 min. und 30 min. belichtet und abschließend entwickelt und fixiert.

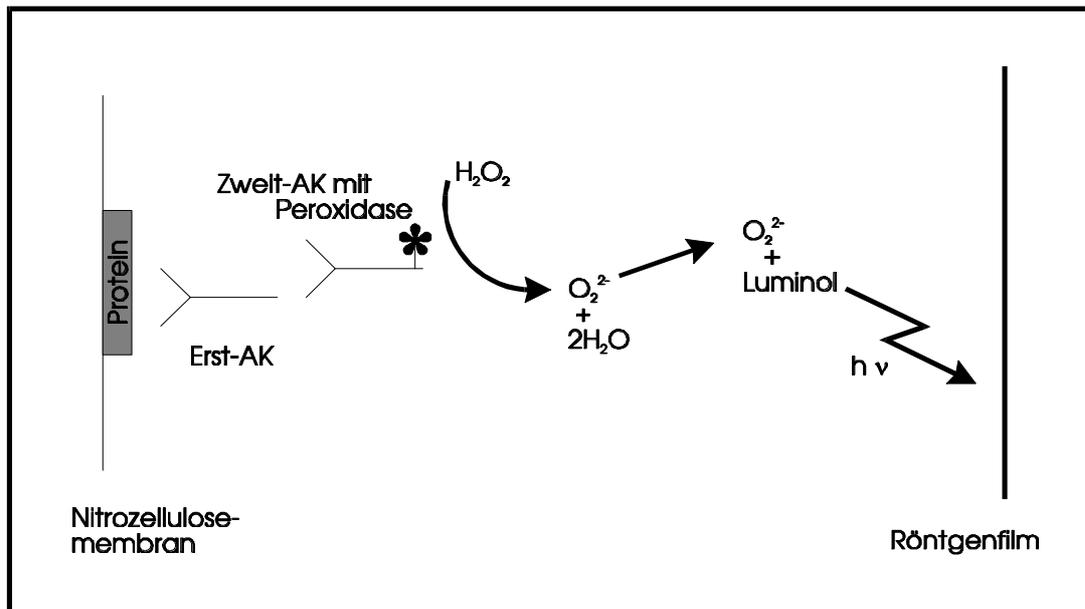


Abb. 7 : Schematische Darstellung der Chemilumineszenz nach Amersham, verändert.

AK = Antikörper

2.18 Entfernen gebundener Antikörper von der Nitrozellulosemembran

Durch Entfernen gebundener Antikörper von der Nitrozellulosemembran konnte das Immunoblotverfahren mehrfach mit derselben Membran und anderen Antisera wiederholt werden. Hierzu wurden die Nitrozellulosemembranen mit TPBS gewaschen, um das Substrat zu entfernen. Zur Ablösung der Antikörperkomplexe von den detektierten Polypeptiden wurde die Membran 30 min. lang bei 50°C in einem Puffer inkubiert, der als "Stripping-Puffer" bezeichnet wird. Dieser Puffer enthält als Detergenz SDS und als reduzierende Substanz β -Mercaptoethanol, die zur Ablösung gebundener Erst- und Zweitantikörper von dem Protein führen. Abschließend wurden die Nitrozellulosemembranen in TPBS- und PBS-Puffer gewaschen. Sie konnten über mehrere Tage bei 4°C gelagert und wiederverwendet werden.

Stripping-Puffer, pH 6,8

100 mM β -Mercaptoethanol

2% w/v SDS

62,5 mM Tris/HCL