

3 Ergebnisse

3.1 Peptide

Die Aminosäuresequenzen der Peptide, die zur Gewinnung von Antikörpern eingesetzt wurden, sind aus bekannten, molekularbiologisch identifizierten cDNA-Sequenzen, die das Zona pellucida 3 (ZP3) Protein verschiedener Spezies kodieren, abgeleitet worden.

Durch Auswahl und Verwendung geeigneter synthetischer ZP3 Peptide zur Immunisierung gelang es, eine breite Palette von Antisera zu erhalten. Die Charakterisierung der Antisera erfolgte durch ELISA, Immunhistochemie, Immunfluoreszenz und durch Immunoblot. Die gewonnenen Antisera sind entweder gegen eine homologe ZP3 Aminosäureteilsequenz, die in der ZP3 Aminosäuresequenz von Mensch, Maus und Hamster vorkommt, gerichtet, oder sie erkennen eine spezies-spezifische (Maus) ZP3 Aminosäuresequenz.

Folgende Sequenzen wurden zur Herstellung der Antisera gegen ZP3 ausgewählt (Ein-Buchstaben Code).

Antiserum AS ZP3-2 (mausspezifisch)	T-P-S-P-L-P-D-P-N-S-S-P-Y-H-F-I-V-D-F
Antiserum AS ZP3-5 (homolog)	P-I-E-C-R-Y-P-R-Q-G-N-V-S-S
Antiserum AS ZP3-6 (homolog)	D-V-T-V-G-P-L-I-F-L

Die Maus ZP3 Peptidantiseren wurden als AS ZP3-2 a bis c bezeichnet. Die ZP3 Peptidantiseren, die gegen homologe Teilsequenzen bei Mensch, Maus und Hamster hergestellt wurden, sind als AS ZP3-5 a bis c bzw. AS ZP3-6 a und b benannt worden. Dabei sind die Antisera AS ZP3-5 und AS ZP3-6 gegen zwei synthetische Peptide von verschiedenen, jedoch jeweils homologen Domänen der Aminosäuresequenz des Maus-, Mensch- und Hamster-Zona pellucida 3 Protein gerichtet.

Pro Peptid wurden 3 Kaninchen immunisiert; vom Peptid ZP3-2 und ZP3-5 konnten Antiseren aus 3 Tieren, von Peptid ZP3-6 konnten aus 2 Tieren gewonnen werden. Das dritte Kaninchen ist aus unbekanntem Gründen verendet.

3.2 Antikörpernachweis mit Hilfe des enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Zum Nachweis von Antikörpern gegen synthetische ZP3-Peptide wurden die Kaninchenantiseren mit dem Peptid, das als Antigen eingesetzt wurde, im ELISA getestet. Die Bewertung der Antikörperbindung an das adsorbierte Peptid erfolgte im Vergleich zu den entsprechenden Präimmunseren als Negativkontrollen.

In den Abbildungen 8-10 sind die Extinktionswerte im Verhältnis zum Verdünnungsfaktor der gewonnenen Antikörper dargestellt. Auf der Abszisse wurde der Verdünnungsfaktor der Antiseren, auf der Ordinate die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 492 nm aufgetragen. Im ELISA (Abb. 8, 9 und 10) ist der Unterschied in der Bindung an das Antigen zwischen Antikörpern aus Antiseren und den nicht relevanten Antikörpern aus Präimmunseren gegenüber dem adsorbierten synthetischen Peptid deutlich zu erkennen. Während die Antigenerkennung der Antiseren titrationsabhängig war, konnte eine solche Abhängigkeit für das eingesetzte Präimmunserum nicht nachgewiesen werden.

Alle getesteten Antiseren zeigten eine verdünnungsabhängige Antikörperbindung an das entsprechende Antigen. Der höchste Extinktionswert konnte bei dem Antiserum AS ZP3-6 a (Abb. 10) gemessen werden. Im Vergleich dazu zeigten die Antiseren AS ZP3-2 (Abb. 8) und AS ZP3-5 (Abb. 9) bei gleicher Verdünnungsstufe (1:200) geringere Extinktionswerte. Das Antiserum AS ZP3-6 a und die Antiseren AS ZP3-2 a,b und c zeigten einen schnelleren und steileren Extinktionsabfall als AS ZP3-5 a,b und c. Bei den Kontrollseren wurde bei allen Verdünnungsstufen ein konstant niedriger Extinktionswert gemessen. Um eventuelle unspezifische Kreuzreaktionen mit anderen synthetischen ZP3-Peptiden auszuschließen, wurden die Antiseren im ELISA mit anderen synthetischen ZP3-Peptiden als Antigen getestet. Dabei konnte bei keinem der getesteten Antiseren eine unspezifische Kreuzreaktion

mit nicht relevanten synthetischen ZP3-Peptiden nachgewiesen werden. Die Extinktionswerte lagen hier im Bereich der Präimmunseren (nicht gezeigt).

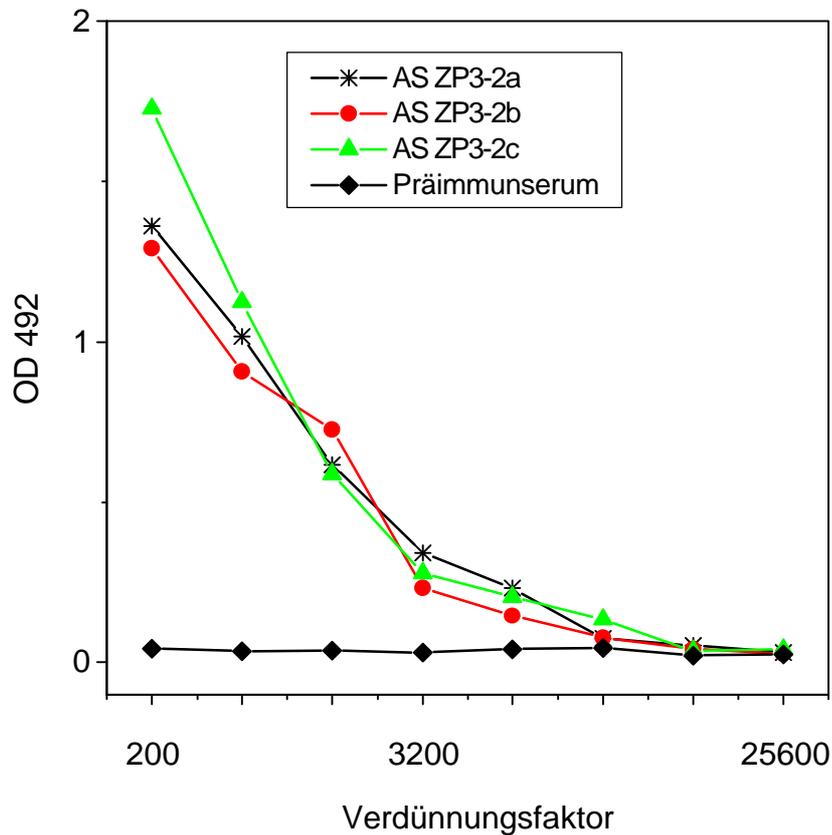


Abb.8 Nachweis von anti-ZP3-Antikörpern im ELISA.

Synthetisches ZP3-2 Peptid wurde an 96 Loch Kunststoffmodule (1,5µg/Loch) adsorbiert und mit Kaninchen Antiseren (AS) inkubiert. Spezifisch gebundene Antikörper wurden mit Peroxidase markiertem anti-Kaninchen IgG Antikörper (1:3000 verdünnt) und OPD als Farbreagenz nachgewiesen. Auf der Abszisse ist der Verdünnungsfaktor der Antiseren, auf der Ordinate die Extinktion bei 492 nm angegeben. Als Negativkontrolle diente ein Präimmunserum.

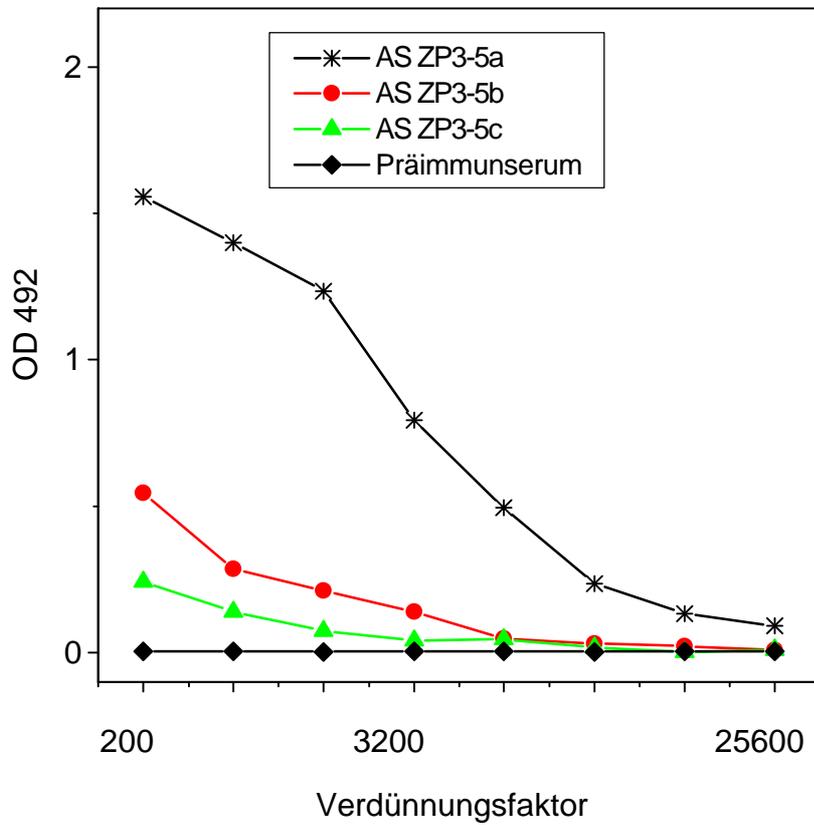


Abb.9 Nachweis von anti-ZP3-Antikörpern im ELISA.

Synthetisches ZP3-5 Peptid wurde an 96 Loch Kunststoffmodule (1,5µg/Loch) adsorbiert und mit Kaninchen Antiseren (AS) inkubiert. Spezifisch gebundene Antikörper wurden mit Peroxidase markiertem anti-Kaninchen IgG Antikörper (1:3000 verdünnt) und OPD als Farbreagenz nachgewiesen. Auf der Abszisse ist der Verdünnungsfaktor der Antiseren, auf der Ordinate die Extinktion bei 492 nm angegeben. Als Negativkontrolle diente ein Präimmunserum.

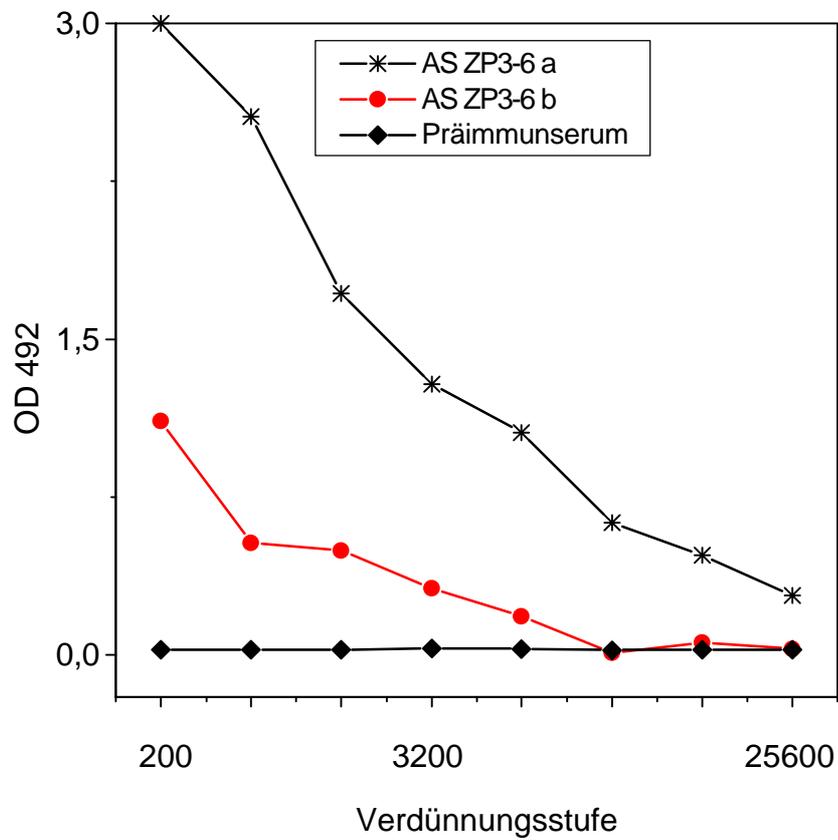


Abb.10 Nachweis von anti-ZP3-Antikörpern im ELISA.

Synthetisches ZP3-6 Peptid wurde an 96 Loch Kunststoffmodule (1,5µg/Loch) adsorbiert und mit Kaninchen Antiseren (AS) inkubiert. Spezifisch gebundene Antikörper wurden mit Peroxidase markiertem anti-Kaninchen IgG Antikörper (1:3000 verdünnt) und OPD als Farbreagenz nachgewiesen. Auf der Abszisse ist der Verdünnungsfaktor der Antiseren, auf der Ordinate die Extinktion bei 492 nm angegeben. Als Negativkontrolle diente ein Präimmunserum.

3.3.1 Reinigung und Konzentrierung der gewonnenen Antikörper über immobilisierte synthetische Peptide

In den gewonnenen Antiseren befinden sich neben spezifischen Antikörpern auch Serumproteine und nicht relevante Immunglobuline. Um unspezifische Reaktionen mit nicht relevanten Antikörpern oder anderen Proteinen in empfindlichen Testsystemen zu vermeiden, wurden anti-ZP3-Peptidantikörper isoliert und konzentriert.

Die Affinitätschromatographische Isolierung der Antikörper erfolgte mittels Säulenchromatographie über an eine Matrix kovalent gebundene immobilisierte synthetische Peptide. Das Säulenvolumen betrug 2 ml, Fraktionen zu jeweils 1 ml wurden gewonnen.

In der Regel wurden die Fraktionen 2-6 vereinigt, in denen sowohl der Hauptproteinanteil als auch die größte Antikörperaktivität zu finden war. Nach dieser Affinitätschromatographischen Auftrennung standen etwa 4 ml gereinigte Antikörper mit einem Proteingehalt von ca. 0,2 mg/ml zur Verfügung, die bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt wurden.

Die gereinigten Antikörper wurden anschließend im ELISA auf ihre Bindungsfähigkeit an ihr synthetisches Peptid überprüft und der Titer der jeweiligen Charge bestimmt.

3.3.2 Reinigung und Konzentrierung von Antikörpern über eine Protein A-Säule

Die Affinitätschromatographische Isolierung von IgG erfolgte mittels Säulenchromatographie über an einer Matrix immobilisiertes Protein A, das aus *S.aureus* gewonnen wird. In der Regel wurden die Fraktionen 2-8 vereinigt. In diesen Fraktionen fanden sich die höchsten Proteinkonzentration und die stärkste Reaktivität von Antikörpern gegen das synthetische Peptid. Nach Elution mit 0,1M Glycin-HCl Puffer, pH 2,8 wurde die Antikörperlösung mit 0,1M NaOH neutralisiert, um eine Denaturierung der Antikörper zu verhindern und ihre funktionelle Integrität zu bewahren. Nach Affinitätschromatographischer Auftrennung standen etwa 4 ml gereinigte IgG Antikörper einem Proteingehalt von 4 mg/ml zur Verfügung. Die Antikörper wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.3.3 Bestimmung der Titer über immobilisierte synthetische Peptide isolierte anti ZP3 Antikörper im ELISA

Die Anreicherung von anti ZP3 Peptid Antikörpern aus den Antiseren wurden im ELISA mit synthetischem ZP3-6 Peptid als Antigen nachgewiesen. Als Negativkontrolle dienten Präimmunseren oder gereinigte Kaninchen IgG. Die Titrationskurven der gereinigten Antikörper wiesen einen typischen sigmoidalen Verlauf auf (nicht gezeigt). Es zeigte sich eine verdünnungsabhängige Reduktion der Bindung der vereinigten Fraktionen der an synthetisches Peptid gebundenen Antikörper der Antiseren AS ZP3-2, AS ZP3-5 und AS ZP3-6. Präimmunseren bzw. gereinigte Kaninchen IgG waren gegenüber dem ZP3-2, ZP3-5 und ZP3-6 Peptid nicht reaktiv.

3.3.4 Bestimmung der Titer der über Protein A isolierten IgG Antikörper im ELISA

Die Titerbestimmung der über Protein A-Sepharose angereicherten anti ZP3 Peptid IgG erfolgte im ELISA. Als Negativkontrollen wurde Präimmunserum oder gereinigte Kaninchen IgG eingesetzt. Auch hier zeigten die Titrationskurven einen für Antikörperbestimmungen typischen sigmoidalen Verlauf (nicht gezeigt). Bei einem Verdünnungsfaktor von 80 konnte bei den vereinigten Fraktionen der Antikörper der Antiseren im Vergleich zur Negativkontrolle eine deutlich höherer Extinktion nachgewiesen werden.

3.4 Antikörperreaktionen auf fixierten Ovargewebeschnitten

Die gewonnenen anti ZP3-Antiseren wurden an fixierten Ovargewebeschnitten verschiedener Spezies immunhistochemisch charakterisiert. Zum Einsatz kam Antiserum AS ZP3-2, das gegen eine ausschließlich in der Maus vorkommende Aminosäuresequenz des Zona pellucida 3 Proteins gerichtet ist. Antiseren AS ZP3-5 und AS ZP3-6 detektieren ZP3-5 und ZP3-6

Peptid, zwei unterschiedliche Aminosäureteilsequenzen, die in der Aminosäuresequenz des humanen, murinen und Hamster Zona pellucida 3 Proteins zu finden sind.

Die Bindung der anti ZP3 Peptidantikörper an die Zona pellucida der Eizelle wurde an Ovargewebeschnitten von Maus, Hamster, Ratte, Rind, Schwein und Mensch getestet.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Bindung von anti ZP3 Antikörpern mit ZP Proteinen verschiedener Spezies

Antiseren	Aminosäure sequenz	Maus	Ratte	Hamster	Schwein	Rind	Mensch
		ZP/O	ZP/O	ZP/O	ZP/O	ZP/O	ZP/O
AS ZP3-2	Maus	++/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
AS ZP3-5	Homolog	+++	+++/-	+++	+/+++	+++	+/+
AS ZP3-6	Homolog	+++	+/-	+/+	-/-	-/-	+++

Tab.1

ZP = Zona pellucida O = Ooplasma

- = negative Reaktion, + = schwach positive Reaktion,

++ = deutlich positive Reaktion, +++ = stark positive Reaktion

Während das mausspezifische Antiserum AS ZP3-2 ausschließlich mit der Zona pellucida der Mauseizelle reagierte, detektierte Antiserum AS ZP3-5, das gegen eine konservierte ZP3 Aminosäuresequenz gerichtet ist, die Zona pellucida der Maus, der Ratte, des Hamsters und in geringem Maße auch die Zona pellucida des Menschen. Bei der Eizelle des Schweines war eine außerordentlich kräftige Reaktion im Ooplasma der Eizelle zu erkennen. Die Schweine Zona pellucida stellte sich vergleichsweise schwach dar. AS ZP3-6 reagierte hauptsächlich mit der Zona pellucida der Mauseizelle und der menschlichen Eizelle.

In den Abbildungen 11 und 12 sind die unterschiedlichen immunhistochemischen Anfärbungsmuster an der Zona pellucida verschiedener Säugereizellen mit anti ZP3 Antiseren im Detail dargestellt.

3.4.1 Antiserum AS ZP3-2

Antiserum AS ZP3-2, das gegen eine mausspezifische ZP3 Aminosäuresequenz gerichtet ist, erkannte ausschließlich die Zona pellucida an Maus Ovarschnitten (Abb.11/1). Die Zona pellucida erschien hier als kräftig gefärbter, dunkelbrauner Ring, der die Eizelle umgibt. Keine Reaktion war im Ooplasma selbst oder an den umgebenden Kumuluszellen erkennbar. In Abb.11/2 ist anhand eines Hamsterovarschnittes beispielhaft dargestellt, daß mausspezifische AS ZP3-2 Antikörper selbst an die Zona pellucida einer sehr artverwandten Spezies nicht binden. Hier zeigte sich die Zona pellucida als zart hellgrauer, leicht bräunlich gefärbter Ring. AS ZP3-2 Antikörper reagierten auch nicht mit der Zona pellucida von Ratte, Rind, Schwein und Mensch (nicht gezeigt).

3.4.2 Antiserum AS ZP3-5

Antiserum AS ZP3-5, das gegen eine homologe ZP3 Aminosäureteilsequenz von Maus, Hamster und Mensch ZP3-Protein gerichtet ist, reagierte mit der Zona pellucida bei allen getesteten Spezies. An der Zona pellucida der Eizelle des Schweines stellte sich eine positive Reaktion dar. Diese war jedoch nur als zarte Braunfärbung zu sehen, wogegen sich bei den anderen Spezies, Maus, Ratte, Hamster und Rind die Zona pellucida in Form eines intensiv dunkelbraun gefärbten Ringes zeigte.

Im Vergleich dazu war mit Antiserum AS ZP3-2, das spezifisch gegen Maus ZP3 Protein gerichtet ist, bei der Eizelle der Maus nach Inkubation mit AS ZP3-5 eine positive, aber

insgesamt wesentlich schwächere Immunreaktion an der Zona pellucida nachzuweisen (Abb.11/4).

An der Zona pellucida der Maus (Abb.11/4), des Schweins (Abb.12/1), des Rindes (Abb.12/4) und des Menschen (Abb.12/7) ließen sich zwei unterschiedlich stark angefärbten lamellären Schichten unterscheiden: eine äußere Schicht, die eine wesentlich intensivere und uneinheitliche Braunfärbung zeigte und eine innere Schicht mit einer schwächer ausgeprägten, eher homogenen Braunfärbung.

Die Zona pellucida des Hamsters wies ein kräftiges, dunkelbraunes und eher uniformes Erscheinungsbild im proximalen Teil der Zona pellucida auf; der eizellnahe Teil zeigte eine homogene hellbraune Färbung (Abb.11/10).

Bei der Eizelle der Ratte stellte sich die Zona pellucida als intensiv tief braun und einheitlich angefärbter Ring dar (Abb.11/7).

Auffallend waren in den Gewebeschnitten von Ratte (Abb.11/7), Rind (Abb.12/4) und Mensch (Abb.12/7) sternförmige immunhistochemisch angefärbte Ausläufer. Diese gingen von der Zona pellucida aus und reichten bis zu den umgebenden Kumuluszellen hin.

Mit Ausnahme des Rattenooplasma konnte in allen getesteten Spezies eine leichte, bräunliche Anfärbung des Ooplasmas beobachtet werden. Im Ooplasma des Schweineovars wurde sogar eine außerordentlich kräftige, dunkelbraune, schollige Reaktion nachgewiesen bei relativ schwacher Immunreaktion an der Zona pellucida (Abb.12/1).

3.4.3 Antiserum AS ZP3-6

Antiserum AS ZP3-6, das wie AS ZP3-5 gegen eine homologe Aminosäureteilsequenz des Maus, Hamster und Mensch ZP3-Proteins gerichtet ist, zeigte ein unterschiedliches Anfärbungsmuster der Zona pellucida in den getesteten Spezies. AS ZP3-6 wies eine intensive Reaktion mit der menschlichen Zona pellucida auf (Abb.12/8). Die immunhistochemische Reaktion stellte sich als ein einheitlich, tief braun angefärbter Ring um

die Eizelle dar. Ausläufer mit immunreaktiven Material am äußeren Rand der Zona pellucida waren zwar vorhanden, aber schwächer ausgeprägt als bei Antiserum AS ZP3-5 (Abb.12/7). In den Schnitten von Maus (Abb.11/5), Ratte (Abb.11/8) und Hamster (Abb.11/11) Ovarien war nur eine sehr schwache Immunreaktion im Bereich der Zona pellucida nachzuweisen. Dabei wurde hauptsächlich der innere Rand der Zona pellucida leicht braun angefärbt. AS ZP3-6 Antikörper haben unter den gewählten immunhistochemischen Bedingungen nicht an die Zona pellucida des Schweine- (Abb.12/2) und des Rinderovarschnittes (Abb.12/5) gebunden. Ebenfalls zeigte sich im Ooplasma der Ratte (Abb.11/8), des Schweines (Abb.12/2) und des Rindes (Abb.12/5) keine Anfärbung, wogegen das Ooplasma von Maus (Abb.11/5), Hamster (Abb.11/11) und Mensch (Abb.12/8) eine schwach positive Reaktion aufwies. Durch Anfärbung der Zona pellucida in den Gewebeschnitten konnte morphologisch sehr deutlich die unterschiedliche Schichtdicke der Zona pellucida bei den verschiedenen Spezies gezeigt werden. Bei einigen Spezies (Ratte, Maus und Mensch) wurde eine schwache Reaktion im Bereich der Kumuluszellen, die die Zona pellucida umgeben, beobachtet. Auffallend waren in diesen Gewebeschnitten, ähnlich wie bei AS ZP3-5, sternförmige, immunreaktive Ausläufer, die von der Zona pellucida ausgingen und im Bereich der die Eizelle umgebenden Kumuluszellen nachzuweisen waren.

Die Gewebsspezifität der Antiseren wurde auf Gewebeschnitten anderer Organe der Maus getestet. Untersucht wurden Eileiter, Gebärmutter, Niere, Nebenniere, Leber, Herz, Skelettmuskel, Gehirn, Milz, Lunge, Magen, Dünn- und Dickdarm. Dabei zeigte sich bei keinem der Antiseren eine Immunreaktion mit Antigen in Gewebeschnitten dieser Organe (nicht gezeigt).

3.4.4 Kontrollexperimente

In weiteren Kontrollexperimenten wurde die Bindung von anti-ZP3 Antikörper an ZP3 Protein durch Zugabe der korrespondierenden Peptide "blockiert", gegen die die Antiseren gerichtet sind. Das Antiserum wurde vor dem Auftragen auf den Gewebeschnitt mit seinem Antigen (synthetisches Peptid) inkubiert.

Als weitere Negativkontrolle wurden die Gewebeschnitte mit dem entsprechenden Präimmuns serum inkubiert.

Wie aus den Abbildungen 11/3, 11/6, 11/9, 11/12, 12/3, 12/6 und 12/9 ersichtlich, war keine Bindung unspezifischer Antikörper an der Zona pellucida detektierbar.

Die Spezifität der gewonnenen Antiseren wurde desweiteren durch Antikörper, die über eine affinitätschromatographische Säule (siehe 3.3.) gereinigt und dann auf den Gewebeschnitten eingesetzt wurden, nachgewiesen. Es zeigte sich hier eine deutlich positive Reaktion affinitätschromatographisch gereinigter Antikörper mit Zona pellucida 3 Protein in der Zona pellucida (nicht gezeigt). Da sich kein qualitativer oder quantitativer Unterschied in der Immunantwort bei dem Einsatz von affinitätsgereinigten Antikörpern und Antiseren darstellte, wurden in der Regel keine gereinigten Antikörper, sondern Antiseren in den nun folgenden Testsystemen eingesetzt.

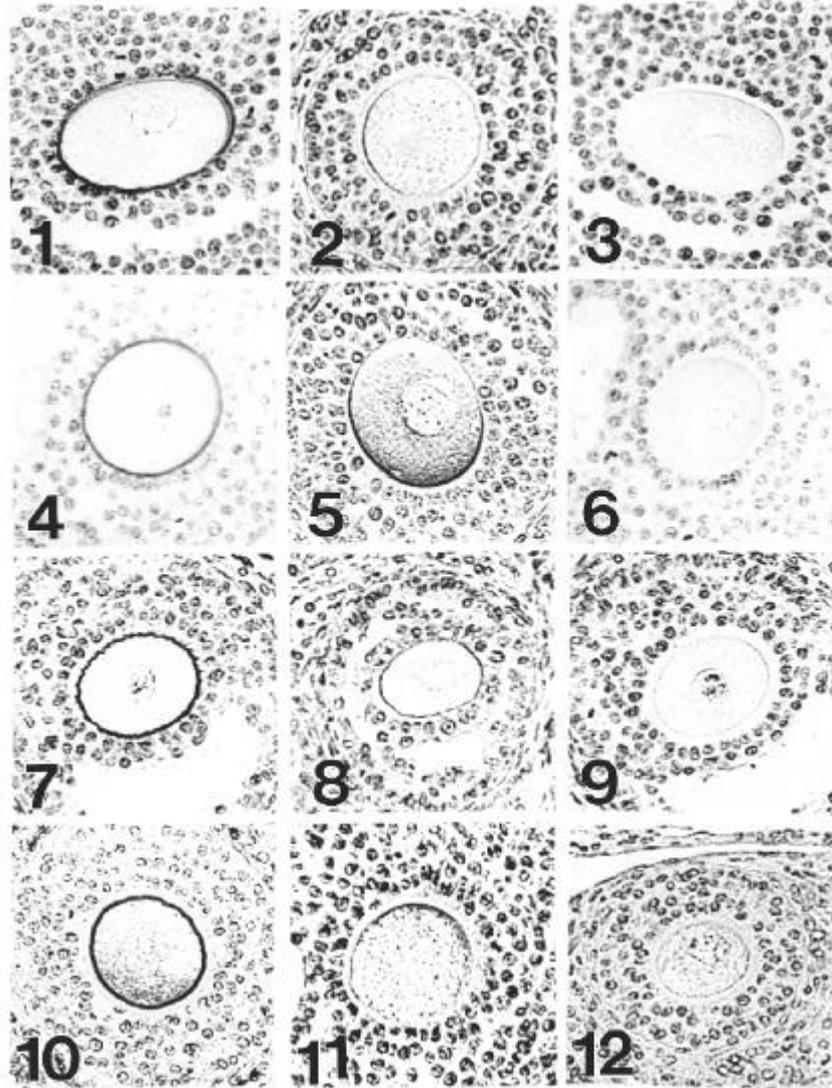


Abb.11

Immunhistochemische Darstellung von ZP3 Protein in Ovargewebeschnitten verschiedener Säugetierspezies. Dargestellt sind Follikel aus Gewebeschnitten von Maus (1, 3-6), Hamster (2, 10-12) und Ratten Ovarien (7-9). Das Gewebe wurde Methacarn fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Gewebeschnitte wurden mit AS ZP3-2 (1,2), ZP 3-5 (4, 7, 10) und AS ZP 3-6 (5, 8, 11) in einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Als Kontrollexperiment erfolgte eine Inkubation der Gewebeschnitte mit Präimmunserum, 1:200 verdünnt (3, 6, 9, 12). Spezifisch gebundene Antikörper wurden durch das Immun-Peroxidase-System und DAB als Farbreagenz nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit Hämalaun gegengefärbt. (Originalvergrößerung x 500)