

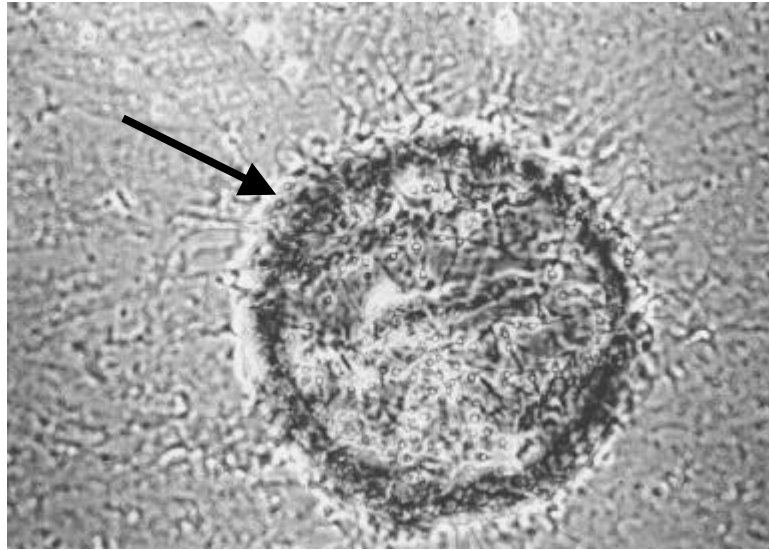
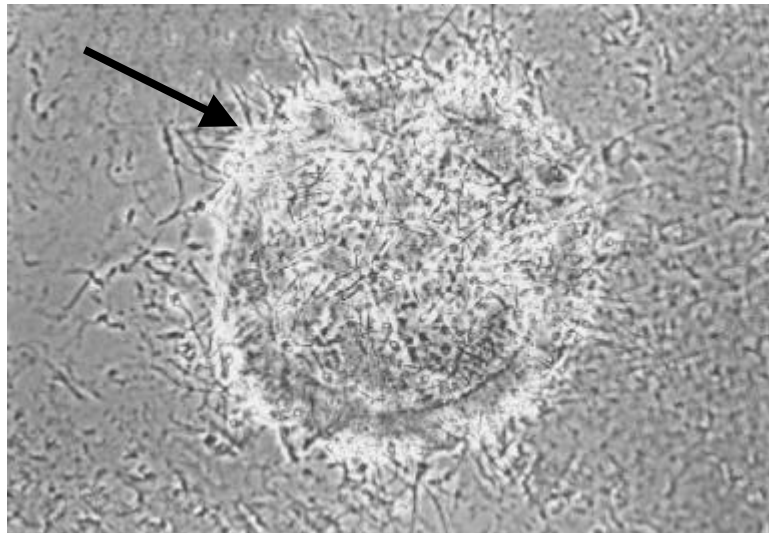
**A****B**

Abb.14

Immunhistochemische Darstellung von ZP3 Protein an humanen Hemizonae nach Hemizona Assays. Die Inkubation der korrespondierenden Hemizona einer Eizelle erfolgte mit Antiserum AS ZP 3-6 (A) bzw. mit dem entsprechenden Präimmunserum (B) (jeweils 1:100 verdünnt). Gebundene anti-ZP3 Antikörper wurden durch anti-Kaninchen-Antikörper, Peroxidase-anti-Peroxidase und Diaminobenzidin als Substrat nachgewiesen. Zahlreiche an die Zona Pellucida gebundene Spermatozoen sind gut erkennbar (Pfeil).

(Originalvergrößerung x 500)

### **3.6 Indirekte Immunfluoreszenz**

Mittels der indirekten Immunfluoreszenz wurde untersucht, ob die Antiseren natives, nicht denaturiertes Zona pellucida 3 Protein erkennen. Es sollte der Hinweis für die Lokalisation und Zugänglichkeit des Antigens unter nicht denaturierenden Bedingungen erbracht werden. Außerdem sollte die Spezifität der gewonnenen Peptidantiseren überprüft werden.

Bei diesen Experimenten wurden die Antiseren AS ZP3-5 und AS ZP3-6 eingesetzt. Die Immunfluoreszenzstudien wurden an isolierten menschlichen Eizellen oder Schweine Eizellen durchgeführt.

Als Negativkontrollen wurden Eizellen mit Präimmunseren in gleicher Verdünnung inkubiert. Die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an Schweineeizellen und menschlichen Eizellen sind in Abbildung 15 A-F dargestellt.

#### **3.6.1 Antiserum AS ZP3-5**

Nach Inkubation der humanen Eizelle mit Antiserum AS ZP3-5 konnte eine intensive Immunfluoreszenzmarkierung der Zona pellucida nachgewiesen werden. Sie zeigte sich als breiter leuchtender Ring am äußeren Rand der Eizelle. Eine wesentlich schwächere Immunfluoreszenz war im Zentrum der Eizelle zu erkennen (Abb.15 A).

Bei Schweine Eizellen stellte sich die Bindung von AS ZP3-5 Antikörpern des Antiserum AS ZP3-5 an die Zona pellucida als ein kräftiger, im Vergleich zur humanen Eizelle etwas schmalerer und besser abgegrenzter fluoreszierender Ring um die Eizelle dar (Abb.15 D). Im Vergleich zu den Eizellen, die mit Präimmunserum (Abb.15 C und F) inkubiert wurden, war die Immunfluoreszenz im inneren Teil der Schweine Eizelle nur geringfügig intensiver; die Zona pellucida wurde durch das Präimmunserum nicht markiert.

Das Zentrum der menschlichen Eizelle erschien im Vergleich zum Präimmunserum relativ intensiv durch AS ZP3-5 angefärbt (Abb. 15 A).

### **3.6.2 Antiserum AS ZP3-6**

Die Inkubation der Eizellen mit Antiserum AS ZP3-6 zeigte ein weniger einheitliches Bindungsmuster. Die Zona pellucida der menschlichen Eizelle erschien als ein äußerst schmaler Ring von intensiver und kontinuierlicher Fluoreszenz (Abb.15 B). Im zentralen Teil der Eizelle war keine Immunfluoreszenz erkennbar.

Bei Schweine Eizellen, die mit AS ZP3-6 inkubiert wurden, stellte sich die Zona pellucida als schmaler leuchtender und scharf begrenzter Ring dar. Hier war aber hauptsächlich der innere Anteil der Zona pellucida (der zur Eizelle hin liegende Teil) intensiv markiert (Abb.15 E). Der zentrale Teil der Zona pellucida wurde nicht oder nur sehr schwach markiert.

### **3.6.3 Negativkontrolle**

Auf den Abbildungen 15 C und 15 F sind Negativkontrollen gezeigt. Dargestellt sind humane und Schweine Eizellen, die unter gleichen Bedingungen wie die Antiseren mit dem entsprechenden Präimmunserum behandelt wurden. Es konnte weder bei der menschlichen Eizelle (Abb.15 C), noch bei der Schweine Eizelle (Abb.15 F) eine wesentliche Fluoreszenzmarkierung und somit keine nennenswerte spezifische Bindung von Antikörpern an die Eizelle nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, daß Zona pellucida 3 Peptid Antikörper ihr korrespondierendes Antigen im Zona pellucida 3 Protein der jeweiligen Spezies erkannten. Es wurde gezeigt, daß unter dem gewählten experimentellen Design die anti Zona pellucida 3 Antikörper spezifisch auch natives, nicht denaturiertes in der Zona pellucida befindliches ZP3 Protein erkannten.