

Abb.15 Indirekte Immunfluoreszenz zur Darstellung des ZP3-Proteins in humanen und porcinen Eizellen. Humane Eizellen (A-C) und Schweine Eizellen (D-F) wurden mit AS ZP 3-5 (A und D), mit AS ZP 3-6 (B und E) und Präimmenserum (C und F) in einer Verdünnung von 1:100 inkubiert. Zur Markierung gebundener Antikörper wurden Cy-3 konjugierter anti-Kaninchen IgG (1:600) eingesetzt.  
(Originalvergrößerung x 500).

### 3.7 Einsatz der Peptidantiseren im Immunoblot und Chemilumineszenzverfahren

Im Immunoblot sollten die Antigene, die die anti ZP3-Peptid Antikörper erkennen, betreffend ihrer apparenten Molekularmassen bestimmt werden. Eingesetzt wurden die Antiseren AS ZP3-5, AS ZP3-6 und AS PO.

Antiserum AS ZP3-6 war unter den gegebenen Immunoblotbedingungen nicht geeignet zur immunbiochemischen Identifizierung seines Antigens. Es zeigte keine Immunreaktivität mit Zona pellucida oder Eizellproteinen im Immunoblot (nicht gezeigt).

Abbildung 16 stellt einen Immunoblot dar, bei dem Antiserum AS ZP3-5 eingesetzt wurde. Dieses Antiserum richtet sich gegen einen ZP3 Sequenzabschnitt, der in Maus, Hamster und Mensch vorkommt.

Abbildung 17 zeigt einen identischen Westernblot, der mit einem polyklonalen Antiserum gegen Schweineoozyten, AS PO, inkubiert wurde. Dieses Antiserum ist gegen isolierte Schweineeizellen gerichtet.

Der sukzessive Einsatz derselben Nitrozellulosemembran mit unterschiedlichen Antiseren ist aufgrund der "Stripping" Methode möglich, bei der gebundene Antikörper von der Nitrozellulosemembran entfernt und ein weiteres Mal mit einem anderen Antiserum behandelt werden.

Auf Spur a und c (Abb.16 und 17) wurden 40 mechanisch isolierte Schweine Zonae pellucidae aufgetragen, auf Spur b und d (Abb.16 und 17) 40 Zona pellucida freie Schweineeizellen. Die Spuren a und b zeigen die aufgetrennten Proteine unter nicht reduzierenden Bedingungen, die Spuren c und d unter reduzierenden Bedingungen. Auf den Bahnen e und f (Abb.16 und 17) sind die gereinigten ZP3 $\alpha$  und ZP3 $\beta$  Proteine unter nicht reduzierenden Bedingungen dargestellt. Diese beiden Proteine wurden aus Schweine Zona pellucida 3 Protein durch partielle Deglykosylierung gewonnen. Auf der Spur g (Abb.16 und 17) wurde Maus Zona pellucida unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen. Die Maus Zonae pellucidae wurden mittels Percoll Gradienten isoliert.

### 3.7.1 Antiserum AS ZP3-5

Antiserum AS ZP3-5 (Abb.16) erkannte in isolierter Schweine Zona pellucida unter nicht reduzierenden Bedingungen eine breite immunreaktive Doppelbande im 220 kDa Bereich (Abb.16, Spur a). Unter reduzierenden Bedingungen waren diese Proteine nicht mehr detektierbar. Hier zeigte sich jedoch eine starke Immunreaktion mit Proteinen im 53 kDa Bereich sowie eine wesentlich schwächere Reaktion mit einem Polypeptid im 70 kDa Bereich (Abb.16, Spur c).

In Zona pellucida freien Schweineeizellen wurde unter nicht reduzierenden Bedingungen durch Antiserum AS ZP3-5 ein Protein erkannt, das ebenfalls eine Molekularmassen von etwa 220 kDa (Abb.16, Spur b) aufwies. Im Vergleich zu isolierter Schweine Zona pellucida stellte sich diese Reaktion etwas weniger intensiv aber stärker fokussiert dar. Zusätzlich war unter diesen Bedingungen eine schwache Bande im 110 kDa Bereich erkennbar (Abb.16, Spur b). Der Ursprung diese Polypeptids ist nicht klar. Möglicherweise stellt dieses Protein ein reduziertes Monomer (110 kDa) des 220 kDa Polypeptids (Dimer) dar.

Ähnlich wie bei isolierter Schweine Zona pellucida unter reduzierenden Bedingungen (Abb.16, Spur c), war bei Zona pellucida freien Schweineeizellen unter reduzierenden Bedingungen das 220 kDa Protein nicht mehr nachweisbar (Abb.16, Spur d); doch konnten wiederum zwei Banden im 70 kDa und 53 kDa Bereich (Abb.16, Spur d) dargestellt werden. Weiterhin war eine schwache Immunreaktion im 110 kDa Bereich (Abb.16, Spur d) wie unter nicht reduzierenden Bedingungen zu zeigen (Abb.16, Spur b).

Auffällig ist, daß das Antiserum AS ZP3-5, weder das gereinigte ZP3 $\alpha$ , noch das gereinigte ZP3 $\beta$  des Schweines im Immunoblot erkannte (Abb.16, Spur e und f).

Wie aus der Abbildung 16, Spur g ersichtlich, zeigte das Antiserum AS ZP3-5 eine starke Immunreaktion mit der Maus Zona pellucida im Molekularmassenbereich zwischen 60 und 90 kDa. Hier wurde eine breite, schlecht fokussierte Bande sichtbar.

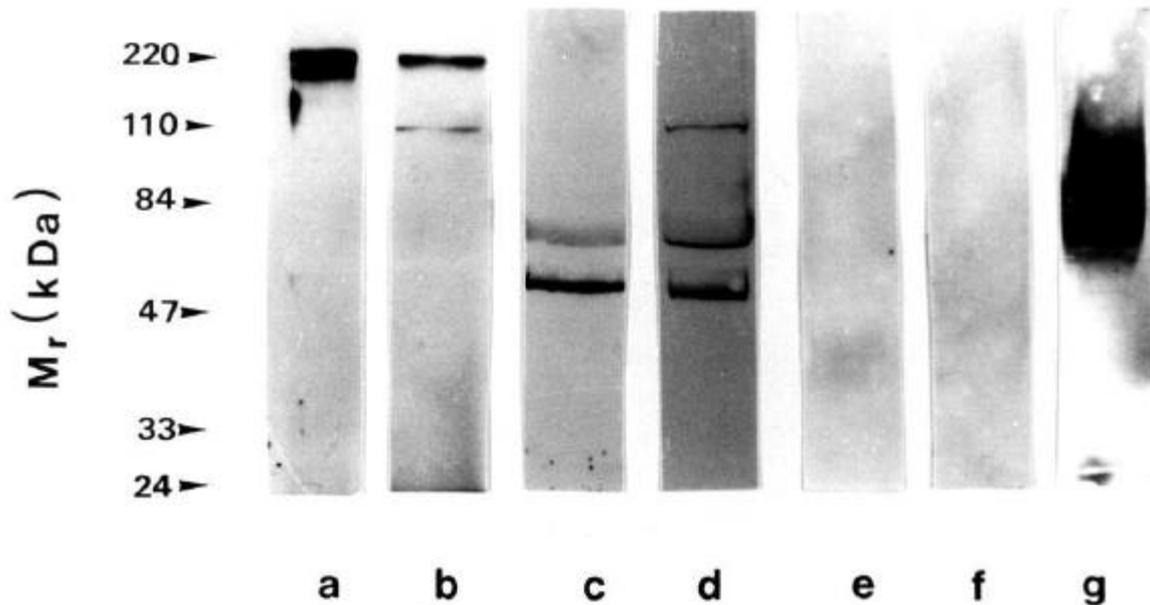


Abb.16 Immunoblot von Schweine Zona pellucida, Zona pellucida freien Schweineeizellen und Maus Zona pellucida. Im Immunoblot wurde das Antiserum AS ZP3-5 (12 $\mu$ g/ml) eingesetzt.

Auf Spur a und c wurden 40 Schweine Zonae pellucidae, auf Spur b und d 40 Zona pellucida freie Schweineeizellen aufgetragen. Spur a und b zeigen aufgetrennte Proteine unter nicht reduzierenden Bedingungen, Spur c und d unter reduzierenden Bedingungen. Auf den Spuren e und f sind die gereinigten ZP3 $\alpha$  und ZP3 $\beta$  Proteine (1 $\mu$ g/Spur) unter nicht reduzierenden Bedingungen dargestellt. Auf Spur g wurde Maus Zona pellucida (2,5 $\mu$ g/Spur) unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen. Spezifisch gebundene Antikörper wurden im Chemilumineszenzverfahren sichtbar gemacht.

### 3.7.2 Antiserum AS PO

Das gegen Schweineoozyten gerichtete Antiserum AS PO erkannte sowohl in isolierten Schweine *Zonae pellucidae* (Abb.17, Spur a) als auch in *Zona pellucida* freien Schweineeizellen (Abb.17, Spur b) unter nicht reduzierenden Bedingungen Polypeptide von verschiedenen Molekularmassen, unter anderem auch Polypeptide im 220 kDa Bereich (Abb.17, Spur a und b). Diese könnten aufgrund ihrer Laufeigenschaften identisch mit denen sein, die unter nicht reduzierenden Bedingungen sowohl von Schweine *Zona pellucida*, als auch von *Zona pellucida* freien Schweineeizellen von AS ZP3-5 (Abb.16, Spur a und b) erkannt wurden. Desweiteren war eine deutliche Reaktion im 53 kDa Bereich (Abb.17 Spur a und b) nachweisbar. Unter reduzierenden Bedingungen konnten wieder ähnliche Ergebnisse im Proteinbandenmuster zwischen isolierter Schweine *Zona pellucida* (Abb.17, Spur c) und *Zona pellucida* freien Schweineeizellen (Abb.17, Spur d) gezeigt werden. Es fanden sich Polypeptide im Molekularmassenbereich von 100 kDa, 75 kDa, 70 kDa und 53 kDa. Die quantitativ größte Menge immunreaktiven Materials war im 70 kDa Bereich zu erkennen. Eine wesentlich schwächere Reaktion trat im Bereich von 53 kDa auf. Diese beiden Proteine könnten identisch mit den durch Antiserum AS ZP3-5 nachgewiesenen Polypeptiden sein (Abb.16, Spur c und d). Die unterschiedliche Intensität der Reaktion macht deutlich, daß die beiden getesteten Antiseren zwar verschiedene Affinitäten zum Antigen besitzen, aber aufgrund der identischen Molekularmassen der erkannten Proteine möglicherweise das gleiche Antigen erkennen. Das Antiserum AS PO zeigte im Vergleich mit dem Antiserum AS ZP3-5 eine Immunreaktion mit gereinigtem ZP3 $\alpha$  als auch mit ZP3 $\beta$  (Abb.17, Spur e und f). Diese Reaktion stellte sich als eine breite und schlecht fokussierte Bande im Molekularmassenbereich von etwa 40 kDa dar. In der *Zona pellucida* der Maus konnte mit AS PO ebenfalls eine breite, aber ausgesprochen schwach markierte Proteinbande zwischen 60 und 90 kDa nachgewiesen werden (Abb.17, Spur g). Die Intensität der Markierung war wesentlich geringer als die von Antiserum AS ZP3-5 und ist auf der Abbildung kaum sichtbar. Es sollte noch darauf hingewiesen werden, daß die Ergebnisse im Immunoblot nicht immer übereinstimmend waren. Unterschiedliche Gel Systeme (7,5% und 10%ige) führten zu

unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten bestimmter Polypeptide oder auch zu Differenzen im Fokussierungsgrad einiger Proteinbanden (nicht gezeigt). Eine weitere Variable, die möglicherweise zu unterschiedlichen Ergebnissen führte, könnten auch der Reifegrad der Eizellen oder das Alter der geschlachteten Tiere gewesen sein.

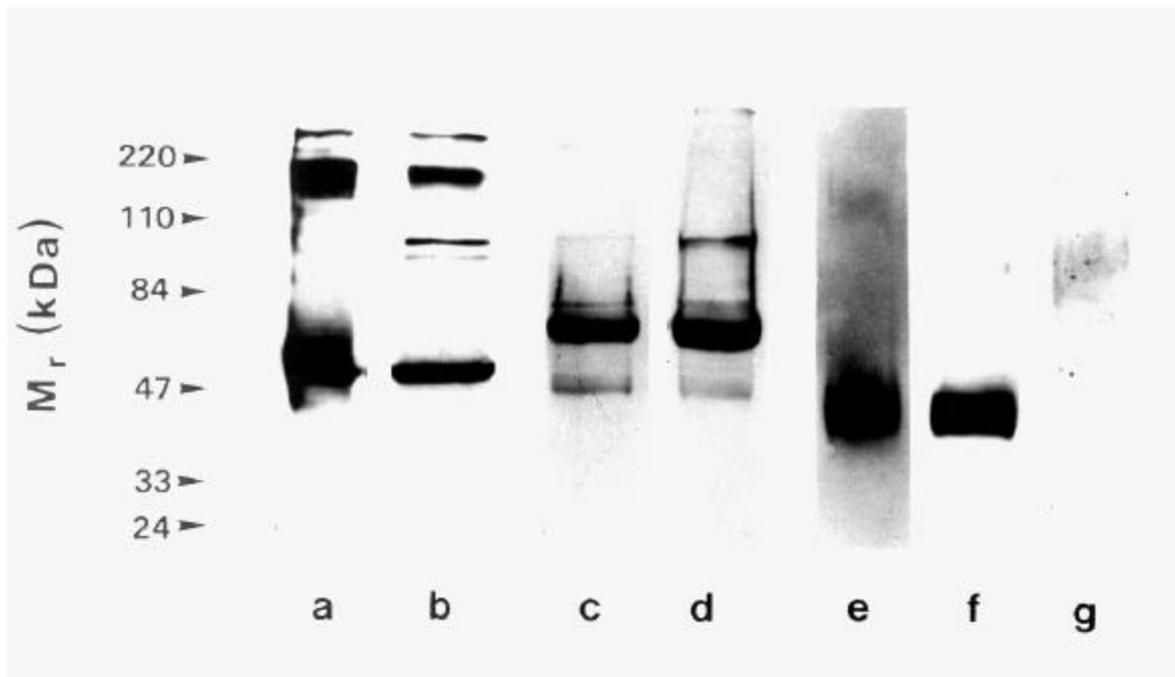


Abb.17 Immunoblot von Schweine Zona pellucida, Zona pellucida freien Schweine-eizellen und Maus Zona pellucida. Im Immunoblot wurde das Antiserum AS PO (12  $\mu\text{g/ml}$ ) eingesetzt. Auf Spur a und c wurden 40 Schweine Zonae pellucidae, auf Spur b und d 40 Zona pellucida freie Schweineeizellen aufgetragen. Spur a und b zeigen aufgetrennte Proteine unter nicht reduzierenden Bedingungen, Spur c und d unter reduzierenden Bedingungen. Auf den Spuren e und f sind die gereinigten ZP3 $\alpha$  und ZP3 $\beta$  Proteine (1 $\mu\text{g/Spur}$ ) unter nicht reduzierenden Bedingungen dargestellt. Auf Spur g wurde Maus Zona pellucida (2,5 $\mu\text{g/Spur}$ ) unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetragen. Spezifisch gebundene Antikörper wurden im Chemilumineszenzverfahren sichtbar gemacht.

## 4 Diskussion

Das Ziel der Dissertationsarbeit war, Antikörper gegen definierte Epitope der Zona pellucida 3 Proteine herzustellen und zu charakterisieren.

Zum Nachweis von Zona pellucida Protein in Ovarien unterschiedlicher Säugetierspezies wurden Antiseren durch Immunisierung von Kaninchen hergestellt. Als Antigene dienten an Trägerprotein gekoppelte synthetischen Zona pellucida 3 Peptide. Mit Hilfe dieser Antikörper sollte Zona pellucida 3 Protein in den Zonae pellucidae verschiedener Spezies nachgewiesen werden.

Als Antigene bieten synthetische Peptide gegenüber gereinigten Zona pellucida Proteinen verschiedene Vorteile:

- Im Gegensatz zu Antikörpern gegen mit biochemischen Methoden gereinigte Proteine zeigen Antiseren gegen definierte synthetische Peptide in der Regel nur Antigen-Antikörper-Reaktionen gegen das eingesetzte Peptid.
- Antikörper gegen synthetische Peptide aus hochkonservierten ZP Protein Epitopen können Zona pellucida Proteine von Spezies detektieren, die bisher noch nicht als biochemisch gereinigtes Protein vorliegen oder deren cDNA noch nicht mit gentechnologischen Methoden isoliert worden sind.
- Antikörper gegen synthetische Peptide erkennen einzelne, definierte Epitope, wogegen Antikörper gegen das Gesamtprotein eine Fülle von Epitopen erkennen. Es können damit Aussagen über die physiologische Bedeutung einer bestimmten linearen Proteindomäne gemacht werden. Eine solche Spezifität gegenüber bestimmten Epitopen könnte theoretisch nur mit monoklonalen Antikörpern erreicht werden. Hier sind jedoch die Epitope, die von den jeweiligen Klonen detektiert werden, nicht vorhersagbar.
- Eine Herstellung von synthetischen Peptiden mit einem sehr hohen Reinheitsgrad ist mit einem relativ geringen Arbeitsaufwand reproduzierbar möglich; sie können in größeren Mengen synthetisiert werden.
- Fast alle der bisher beschriebenen polyklonalen Antiseren gegen gereinigte Zona pellucida Proteine erkennen mehrere, meist nicht näher definierte Epitope. Auch bei Einsatz hoch angereicherter Protein-Präparationen kann eine Kontamination mit anderen Zona pellucida Proteinen oder mit Eizell- bzw. Kumuluszell-Proteinen und damit einhergehende unerwünschte Kreuzreaktionen nicht ausgeschlossen werden.

Die Antiseren, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden, sind gegen definierte Epitope des ZP3 Proteins gerichtet und wurden in Kaninchen gewonnen. Als Immunogene dienten

synthetische Peptide aus den bekannten ZP3 Aminosäuresequenzen. Die Antikörpertiter von je 3 Kaninchen pro Peptid wurden im ELISA bestimmt. Die Titerverläufe wiesen zeitabhängig nach Immunisierung und Boosterung ansteigende Werte auf. Keines der Antiseren kreuzreagierte mit anderen synthetischen Peptiden, was die hohe Spezifität der Antikörper für das detektierte Epitop unterstreicht; somit waren wichtige Voraussetzungen für die Generierung speziesspezifischer anti Zona pellucida Protein Antikörper gegeben. Desweiteren zeigte sich, daß trotz identischem Immunisierungsprotokoll quantitative und qualitative Unterschiede in der Antikörperproduktion individueller Tiere aufzuweisen waren. Dieses Phänomen deutete darauf hin, daß die Antigenprozessierung und eine entsprechende Immunantwort in jedem Tier unterschiedlich sein kann. So wurde im Rahmen der Herstellung geeigneter Antiseren beobachtet, daß trotz mehrerer Auffrischungen in manchen Kaninchen keine Antikörper gegen das Antigen generiert werden konnten. Andererseits erkannten bestimmte Antiseren zwar das als Antigen eingesetzte synthetische Peptid, aber nicht das entsprechende Zona pellucida Protein. Auffällig war in diesem Zusammenhang auch eine interindividuell variierende Qualität der produzierten Antikörper: Kaninchen, die mit dem identischen synthetischen Peptid unter gleichen Bedingungen immunisiert wurden, generierten offensichtlich Antikörper gegen unterschiedliche Epitope des synthetischen Peptids. Es ist somit nicht allein die Auswahl der Aminosäuresequenz von Bedeutung, sondern auch die Prozessierung und Präsentation des Antigens sowie die Generierung von Antikörpern durch das Versuchstier.

Trotz identischer Behandlung der Kaninchen mit den gleichen Antigenen kann die Immunantwort also ganz individuell verlaufen. Diese Feststellung konnte auch schon bei der Gewinnung von Antikörpern gegen synthetische Peptide aus anderen Proteinen, z.B. G-Proteine, gemacht werden (Hinsch et al., 1992). Es handelt sich hier also um eine Variable, die vom Experimentator nicht beeinflußt werden kann. Da Vor- und Nachteile der Immunkontrazeption mit Zona pellucida Antigenen in der Literatur Zeit ausgiebig diskutiert werden (Dunbar et al., 1993; Jones, 1994; Sacco et al., 1994, Afzalpurkar und Gupta 1997, Zhang et al., 1997), kann diese Beobachtung in Hinblick auf die Entwicklung einer Zona pellucida-Vaccine erhebliche Bedeutung haben. Generell wird von einem Kontrazeptivum eine sichere, vom Wirkmechanismus aus gesehene nachvollziehbare immunologische oder pharmakologische Wirkung erwartet. Eine immunologische Kontrazeption ist nur dann sinnvoll, wenn eine gesicherte und zielgerichtete Antikörperproduktion gewährleistet ist. Wie in diesen Untersuchungen im Kaninchen gezeigt, so berichteten ebenfalls Lou et al., (1995) im Maus-Modell und Paterson et al. (1996) bei Marmoset-Affen, daß nicht alle mit

identischen ZP3-Peptiden immunisierten Tiere mit einer Antikörperproduktion auf die Peptide reagierten und nicht in jedem Fall ein Antikörpertiter erreicht wurde, der die Fertilität signifikant und dauerhaft zuverlässig herabsetzte. Eine große interindividuelle Streubreite betreffend der Antikörperproduktion und der Antigenprozessierung könnte einen immunkontrazeptiven Ansatz mit ZP-Antigenen grundsätzlich in Frage stellen. Desweiteren zeigten mehrere Studien an Tiermodellen, daß eine vollständige Reversibilität einer Immunkontrazeption nur erreicht wurde, wenn Peptidvaccine eingesetzt wurden, die ausschließlich aus B-Zell-Epitopen bestanden (Epifano und Dean, 1994; Jones, 1994). T-Zell-Epitope induzierten eine zelluläre Immunantwort, die zu einer destruktiven Entzündung des Ovars führte und dies irreversibel schädigte (Lou et al., 1996).

Aufgrund eventuell in Immunseren vorhandenen unspezifischen Antikörpern, die an die Zona pellucida binden, könnten falsch positive Ergebnisse erzielt werden. Um reproduzierbare, valide Untersuchungen zu gewährleisten, wurden erfolgreich affinitätschromatographisch gereinigte Antikörper gewonnen und bei Bedarf in den Testsystemen eingesetzt.

In dieser Arbeit wurden erstmals Antikörper gegen definierte, in verschiedenen Spezies homologe ZP3 Epitope hergestellt und immunhistochemisch charakterisiert. Durch den Einsatz von Antiseren gegen Domänen, die in allen bisher sequenzierten ZP3 Proteinen vorkommen, konnte auch ZP3 Protein in der Eizelle von Spezies, deren ZP3 Aminosäuresequenz (d.h. cDNA) zum Zeitpunkt der Antikörperherstellung noch nicht mit immunologischen Methoden bekannt war, dargestellt werden.

Die anti ZP3-Peptid-Antiseren reagierten in Ovarschnitten mit Zona pellucida Protein. Diese Ergebnisse zeigten, daß Antikörper gegen relativ kurze synthetische Peptidsequenzen auch Zona pellucida Protein erkannten. Antikörper, die gegen homologe Aminosäuresequenzen gerichtet waren (AS ZP3-6, AS ZP3-5), detektierten immunhistochemisch Zona pellucida Protein in Spezies, deren ZP3-Aminosäuresequenzen seinerseits nicht bekannt waren. Die Arbeitshypothese, daß homologe Aminosäuresequenzen von Zona pellucida-Proteinen auch in Zonae pellucidae von Spezies, deren Zona pellucida Aminosäuresequenzen noch nicht bekannt sind, vorkommen, konnte erstmals experimentell nachgewiesen werden.

Die Antiseren AS ZP3-5 und AS ZP3-6 reagierten mit ihrem Antigen in Zonae pellucidae aller getesteter Spezies. Im Anfärbemuster konnten jedoch deutliche speziesspezifische

Unterschiede beobachtet werden: In menschlichen Oozyten konnte z.B. eine starke Anfärbung der Zona pellucida mit dem Antiserum AS ZP3-6 beobachtet werden, wogegen die Reaktion mit AS ZP3-5 weniger stark ausfiel. Andererseits haben Antikörper des Antiserums AS ZP3-5 besonders stark an boviner Zona pellucida und an antigenem Material in Schweineooplasmata gebunden; in beiden Fällen gab es jedoch keine Reaktion von Antiserum AS ZP3-6 Antikörpern mit immunreaktiven Proteinen dieser Zellen. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnten speziesspezifische Unterschiede in der Glykosylierung der Zona pellucida Proteine sein. Durch eine sterische Behinderung von Zuckerketten an den Epitopen oder an epitopnahen Bereichen könnte eine Antikörperbindung beeinträchtigt werden. Andererseits könnte die unterschiedliche immunhistochemische Anfärbbarkeit auch auf speziesspezifische Unterschiede im Aufbau des Zona pellucida Netzwerkes zurückzuführen sein. Es ist weiterhin vorstellbar, daß bestimmte antigene Epitope des ZP3-Proteins je nach Spezies unterschiedlich stark exponiert werden. Somit könnte es zu einer Maskierung von Epitopen und damit zu von einander abweichenden Anfärbemustern kommen. Andererseits könnten auch noch nicht vollzogene posttranslationale Modifikationen des Schweine ZP3 Proteins im Ooplasmata und die damit bessere Zugänglichkeit für die Antikörper eine Rolle für diese Beobachtung spielen. Anti-Peptid Antikörper sind gegen kontinuierliche Aminosäuresequenzen des ZP3 Proteins gerichtet und erkennen somit keine glykosylierten Bestandteile der Zona pellucida. Aus diesem Grund könnte die Affinität von Antikörpern gegen lineare Epitope für intrazelluläre, nicht glykosylierte Antigene wesentlich höher sein als für im Netzwerk integrierte und posttranslational modifizierte Proteine. Die starke Immunreaktivität in Schweineoozytenzytoplasma wäre mit einer erhöhten Synthese und Transport von ZP3 Protein während der Oogenese zu erklären. In fast allen Oozyten verschiedener Spezies, insbesondere in denen von Schweinen, wurde antigenes Material im Ooplasmata detektiert. Diese Resultate stehen im Einklang mit den Experimenten von Takagi et al. (1989), in denen ein monoklonaler Antikörper gegen Schweine Zona pellucida Proteine eingesetzt wurde. Auch hier konnte immunreaktives Material sowohl in der Zona pellucida als auch im Zytoplasma von Schweineoozyten immunhistochemisch dargestellt werden. Ebenso wurde von Dunbar et al. (1994) bei Schwein und beim Menschen Zona pellucida Material im Ooplasmata lokalisiert.

In Ovarschnitten von Ratte, Rind, und Mensch wurden durch Antikörper gegen ZP3-Protein ausläuferartige Strukturen der *Zonae pellucidae* in das umliegende Kumulusgewebe beobachtet. Zwei in der Literatur kontrovers diskutierte Gründe für *Zona pellucida* Proteine außerhalb der Eizelle könnten diese Beobachtung erklären. Bei der Maus konnte mit gentechnologischen Methoden eindeutig nachgewiesen werden, daß zumindest ZP3-Protein ausschließlich in der Eizelle und in keinem anderen Gewebe exprimiert wird (Bleil und Wassarman, 1980a; Bleil und Wassarman, 1980b). Analog wurde von Shimizu et al. (1983) die Oozyte als alleiniger Ursprungsort der *Zona pellucida* angenommen. Es könnte sich somit bei diesen Strukturen um *Zona pellucida* Proteine oder um deren Abbauprodukte handeln, die in der Umgebung der Eizelle zu liegen kommen und/oder von den Kumuluszellen aufgenommen werden. In anderen Spezies als der Maus wurde aber auch gezeigt, daß Kumulus- und Granulosazellen *Zona pellucida* Proteine *de novo* synthetisieren. Im Kaninchenmodell konnte nachgewiesen werden, daß *Zona pellucida* Proteine auch in Kumuluszellen *in vitro* transkribiert, translatiert und sezerniert werden (Lee und Dunbar, 1993; Wolgemuth et al., 1984). Grootenhuis et al. (1996) lokalisierten ZP3-Moleküle in den Granulosazellen von Kaninchen, Marmoset- und Rhesusaffen sowie vom Menschen und vermuteten einen Zusammenhang mit der Destruktion der Ovarien nach aktiver Immunisierung mit *Zona pellucida* Proteinen. Neuere Untersuchungen von Totzauer et al., 1998, wiesen mittels polyklonaler Antikörper ZPB und ZPC in bovinen foetalen Ovar- wie auch Follikelzellen nach. Die Autoren folgerten daraus, daß beide, Eizelle und Follikelzelle, an der Bildung der *Zona pellucida* beteiligt sind.

Durch die immunhistochemischen Untersuchungen konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß Antikörper, die gegen Maus-ZP3-Aminosäuresequenzen gerichtet sind (AS ZP3-2), ausschließlich murines ZP3 erkennen und keine Kreuzreaktionen gegen ZP3-Proteine anderer Spezies aufwiesen. Antiseren, die gegen synthetische ZP3-Peptide gerichtet waren, zeigten ein auffälliges bilamelläres Färbungsmuster der menschlichen und der Maus *Zona pellucida*. Die Bedeutung dieses mehrschichtigen Aufbaus der *Zona pellucida* ist bisher noch nicht geklärt. Einerseits ist die Entstehung dieses Phänomens durch Artefakte während der Präparation des Gewebes nicht auszuschließen. Andererseits könnte es sich bei der *Zona pellucida* auch um eine hoch organisierte extrazelluläre Matrix handeln, die von der Eizelle und/oder ihren umgebenden Zellen synthetisiert wird, und deren unterschiedlichen Schichten verschiedene Funktionen zuzuordnen sind. In vorangegangenen Arbeiten wurde berichtet, daß die *Zona pellucida* der Kaninchen Eizelle aus mehreren Schichten besteht, die auch

unterschiedliche physikalische und biochemische Eigenschaften besitzen (Dunbar et al., 1991; Dunbar et al., 1994).

Eine weitere Rolle von Zona pellucida Proteinen, die in die Kumulusmassen hineinreichen, könnte sein, daß diese Ausläufer die Kumulusmasse an sich stabilisieren. Rankin und Mitarbeiter (1996) haben berichtet, daß eine Insertionsmutation des ZP3-Gens der Maus einen totalen Verlust der Zona pellucida Matrix zur Folge hat. Das Fehlen der Zona pellucida geht bei Mäusen mit der Desorganisation des Kumulus Oophorus einher. In dieser Arbeit wurde diskutiert, daß die Abwesenheit der Zona pellucida Matrix dazu führen könnte, daß die Corona radiata Zellen nicht mehr zusammengehalten werden; dieses sei dann der Grund für die fehlende Organisation des Kumulus Oophorus bei diesen Tieren.

Mit den in der hier vorgelegten Arbeit beschriebenen immunhistochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Antikörper gegen Aminosäuresequenzen, die nur im Maus ZP3 Protein vorkommen, ausschließlich murines ZP3 erkennen und keine Kreuzreaktionen gegen Zona pellucida Protein anderer Spezies nachzuweisen waren. Die These, daß homologe Aminosäuresequenzen des ZP3 Proteins auch in Zonae pellucidae von Spezies, deren ZP3 Aminosäuresequenz noch nicht bekannt ist, vorkommen, konnte erstmals experimentell belegt werden.

Es ist davon auszugehen, daß während der Aufbereitung und Fixierung des Gewebes sowie bei der Herstellung von Paraffinschnitten ZP3 Protein chemisch modifiziert wird und somit eventuell "in vivo" nicht zugängliche Epitope freigelegt werden und nur so von den Antikörpern detektiert werden können. Deshalb war es von großer Bedeutung, zu untersuchen, ob auch nicht chemisch modifiziertes ZP3 Protein durch die Antiseren erkannt wird.

Aus diesem Grunde wurden indirekte Immunfluoreszenzstudien mit nicht behandelten, frischen menschlichen Eizellen und Schweineeizellen durchgeführt. Analog zu den immunhisto-chemischen Untersuchungen mit chemisch modifiziertem Gewebe waren auch in der Immunfluoreszenz unterschiedliche Färbeverhalten zwischen Antiseren AS ZP3-5 und AS ZP3-6 sowie auch speziesspezifische Unterschiede im Anfärbungsmuster festzustellen. Antiserum AS ZP3-5 zeigte eine starke Immunfluoreszenzmarkierung der menschlichen Zona pellucida am äußeren Rand der Eizelle. Eine schwächere Fluoreszenz konnte im inneren

Bereich der Oozyte festgestellt werden. Vergleich man das Färbeverhalten dieses Antiserums mit den Schweineoozyten, so zeigte sich hier die Zona pellucida als etwas schmalere und besser abgegrenzter Ring im Vergleich zur menschlichen Eizelle. Im Zentrum der Eizelle konnte hier keine wesentliche Fluoreszenz gezeigt werden.

Untersuchungen mit dem Antiserum AS ZP3-6 wiesen eine weniger uniforme Immunfluoreszenz auf. In menschlichen Oozyten ließ sich ein Ring intensiver und homogener Anfärbung durch die gesamte Zona pellucida nachweisen; im zentralen Anteil der Oozyte war keine Immunfluoreszenz sichtbar. Das ZP3-6 Epitop der Schweine Zona pellucida wurde dagegen als schmaler und scharfer Ring am inneren Anteil der Zona pellucida erkannt.

Ähnliche Resultate mit polyklonalen Antiseren gegen Zona pellucida des Schweines wurden in anderen Untersuchungen beschrieben (Dunbar und Raynor, 1980). In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß Antiseren, die gegen mit Detergens solubilisierter porciner Zona pellucida gerichtet sind, eine eher uniforme Fluoreszenz der Schweine Zone pellucida aufwiesen. Antikörper gegen intakte oder hitzebehandelte Zona pellucida zeigten eine wesentlich stärkere Fluoreszenz am äußeren Ende der Zona pellucida. Diese Ergebnisse lassen den Rückschluß zu, daß die Behandlung von Zona pellucida mit Detergens immunogene Epitope verändert haben könnte und somit die unterschiedliche Färbemuster zu erklären sind. Diese Untersuchungen unterstützen die oben diskutierte Annahme, daß die Erreichbarkeit des Antigens für die Antikörper abhängig von der Maskierung bzw. Demaskierung bestimmter Epitope sein kann.

Ein weiterer Nachweis der Bindung von anti ZP3 Peptidantikörpern erfolgte mittels an Objektträger gebundene humane Hemizona pellucida. Der Einsatz von Hemizonae und der Hemizona Antikörper Bindungstest wurden aus zwei verschiedenen Gründen aufgebaut:

1. Methodische Gründe: Anhand der Untersuchungen mit der Immunfluoreszenztechnik zeigte sich, daß im Einzelfall sowohl humane Eizellen als auch Schweineeizellen unterschiedlich intensive Antikörperbindungsverhalten aufwiesen. So fand sich in den meisten Eizellen zwar das gleiche qualitative Anfärbungsmuster, jedoch war die Stärke der Immunfluoreszenz häufig sehr unterschiedlich. Aus diesem Grunde war es notwendig, durch

die Herstellung gleich großer Hemizonae aus einer Eizelle eine interne Negativkontrolle in das experimentelle Design einzubauen. Somit konnten z.B. zwei verschiedene Seren, wie z.B. Präimmunsereum und das zu testende Antiserum eingesetzt werden und direkt miteinander verglichen werden.

2. Unter Einsatz einer internen Negativkontrolle sollte überprüft werden, ob es zu unterschiedlichen Anfärbungsmustern vor und nach Bindung von Spermatozoen an die Zona pellucida kommt.

Es wurden Hemizonae untersucht, die zur klinischen Diagnostik im Hemizona Assay eingesetzt wurden. Der Hemizona Assay wurde von Burkman et al. 1988 für das menschliche System entwickelt und ermöglicht, das Bindungsverhalten von Spermatozoen eines Patienten mit dem von Spermatozoen eines gesichert fertilen Spenders zu vergleichen. Dabei wird eine Hemizona pellucida mit dem Patientenejakulat, die korrespondierende Hälfte mit dem Spenderejakulat inkubiert. Abschließend wird die Anzahl der gebundenen Spermatozoen ausgezählt und somit geprüft, ob das Bindungsverhalten der Patientenspermatozoen dem der Spenderspermatozoen entspricht.

Eingesetzt wurden Eizellen mit vergleichbaren Reifestadien. In den vorliegenden Ergebnissen konnte gezeigt werden, daß nach Bindung von Spermatozoen an die Zona pellucida keine wesentliche Veränderung des Antikörperbindungsmusters festzustellen war. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, daß es nach Bindung von Spermatozoen an die Zona pellucida sehr wahrscheinlich zu keinen wesentlichen strukturellen Veränderungen oder Umverteilungen des durch das Antiserum AS ZP3-6 erkannten Epitops kommt. Nach Induktion der akrosomalen Reaktion an der Zona pellucida gebundener Spermatozoen könnte es durchaus durch die im Akrosom befindlichen Enzyme zu Veränderungen der Zona pellucida Struktur kommen. Das Bindungsverhalten der untersuchten ZP3 Antikörper wurde aber offensichtlich nicht verändert. Diese Befunde könnten implizieren, daß die identifizierten ZP3 Epitope keine Domäne beinhalten, die für die Wirkung von für die akrosomale Enzyme wichtigen Bereiche von Bedeutung sind.

Die Untersuchungen zeigten weiterhin, daß die immunhistochemischen Befunde betreffend der unterschiedlichen Qualität der Antigene mit den Ergebnissen des Hemizona-Antikörper-

Bindungsassays übereinstimmen. Das Antiserum AS ZP3-5, das im Ovar immunhistochemisch nur schwach an die menschliche Zona pellucida gebunden hatte, zeigte auch im Hemizona Antikörper Bindungstest nur einen geringgradig stärkeren Anfärungsgrad verglichen mit seiner internen Negativkontrolle.

Das Antiserum AS ZP3-6 hingegen, das auch in menschlichen Ovarschnitten sehr intensiv die Zona pellucida erkannte, reagierte intensiv mit menschlichen Hemizonen. Die Affinität der ZP3 Antikörper wie auch die Zugänglichkeit der durch sie erkannten Epitope ist sowohl unter chemisch modifizierten als auch unter die Zona pellucida Struktur relativ gut erhaltenden Bedingungen weitgehend stabil.

Im Hemizona-Antikörper-Bindungstest zeigte sich bei den meisten Antiseren, daß die Hemizonen insbesondere im Randbereich intensiv angefärbt waren und sich das Zentrum schwächer angefärbt darstellte. Dieses differenzierte Bindungsverhalten könnte dadurch entstehen, daß antigene Epitope im Schnittbereich der Zonen pellucidae besonders stark erkannt werden können. Bedingt durch die mechanische Manipulation könnte es zu einer Desintegration des Zona pellucida Netzwerkes und zur Demaskierung antigener Epitope kommen. Allerdings wäre in diesem Zusammenhang auch ein rein optisches Phänomen zu diskutieren, das durch Projektionen der halbkugelig auf Objektträgern angetrockneten Hemizonen entsteht. Überlagerungseffekte oder Summationsphänomene könnten ursächlich für diese Beobachtung verantwortlich sein.

Für die immunbiochemischen Charakterisierungen der anti Zona pellucida Antiseren und die Identifizierung von ZP3-Protein in Proteingemischen wurden Immunoblots durchgeführt. Generell ist festzustellen, daß Zona pellucida Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Glykosylierungsmuster auf Polyacrylamid-Gelen eine starke Heterogenität betreffend ihrer Laufeigenschaften zeigen (Epifano et al., 1994). Zona pellucida Glykoproteine stellen sich in vielen Spezies als breite, schlecht fokussierte Banden dar. Deshalb ist es in der Regel sehr problematisch, Zona pellucida Proteine aufgrund ihrer apparenten Molekularmassen in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese exakt zu definieren (Dunbar et al., 1981).

Vorausgegangene Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigten, daß die Schweine Zona pellucida aus 5 Glykoproteinen mit apparenten Molekularmassen von 92 kDa (ZP1), 69 kDa (ZP2), 55 kDa (ZP3) und 23 kDa (ZP4) bestehen soll (Koyama et al., 1991; Skinner und

Dunbar, 1986). Unter reduzierenden Bedingungen konnte demonstriert werden, daß Schweine ZP1 in zwei Untereinheiten dissoziierte und zwar in ein 69 kDa Polypeptid (ZP2) und ein 23 kDa Polypeptid (ZP4). Deglykosylierung von Schweine ZP3 Protein zeigte, daß es sich bei dem 55 kDa ZP3 Protein um zwei unterschiedliche Proteine handelt. Das partiell deglykosylierte Protein ergab ein 37 kDa Protein und wurde als ZP3 $\alpha$  bezeichnet, das 32 kDa Protein wurde ZP3 $\beta$  genannt (Yurewicz et al., 1987). Insgesamt muß beachtet werden, daß die Benennung porciner ZP Proteine eher zufällig ist und im wesentlichen auf ihren apparenten Molekularmassen in der SDS-PAGE beruht.

Antiserum ZP3-6 erkannte im Immunoblot keine porcine Zona pellucida Proteine. Dieses Ergebnis läßt den Rückschluß zu, daß nach SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese das durch das Antiserum ZP3-6 erkannte Epitop nicht mehr detektiert werden kann. Diese Ergebnisse sind mit den immunhistochemischen Untersuchungen in Einklang zu bringen. AS ZP3-6 erkannte zwar natives Schweine ZP3-Protein, aber nach chemischer Modifikation des Proteins (partielle Deglykosylierung) fand keine Bindung des Antikörpers an porcine ZP3 mehr statt.

Generell erkannte Antiserum AS ZP3-5 in Schweine Zona pellucida und Zona pellucida freien Eizellen immunreaktive Banden, die im SDS Gel relativ gut fokussiert sind. Diese Tatsache könnte den Schluß zulassen, daß das Antiserum hauptsächlich nur schlecht oder nicht glykosyliertes Zona pellucida Protein erkennt. Antiserum AS ZP3-5 ist gegen eine Peptidsequenz gerichtet, die eine potentielle N-glykosylierte Aminosäuresequenz (Asn-Val-Ser) im Bereich des N-Terminus des Schweine Zona pellucida 3 Proteins erkennt (Ringuette et al., 1988). Aus diesem Grund könnte angenommen werden, daß eine sterische Behinderung die Bindung von AS ZP3-5 Antikörpern an das glykosylierte Protein bedingt. Proteine mit höheren Molekularmassen, die durch das Antiserum ZP3-5 erkannt werden, könnten somit als nicht glykosylierte Vorläuferproteine erklärt werden, die im SDS-Gel schlecht dissoziieren oder Polymere von Zona pellucida Proteinen sind.

Immunoblots wurden mit Antiserum AS ZP3-5 an Schweine Zona pellucida unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt. AS ZP3-5 Antikörper erkannten unter nicht reduzierenden Bedingungen eine breite immunoreaktive Doppelbande im Molekularmassenbereich von 220 kDa. Unter reduzierenden Bedingungen wurde das 220 kDa Protein nicht erkannt; es zeigte sich eine schwache Reaktivität im Bereich von 70 kDa und eine starke im Bereich von 53 kDa.

Wegen des Nachweises einer kräftigen Färbung im Ooplasma nach Einsatz des Antiserums AS ZP3-5 auf Ovargewebeschnitten, wurden Immunoblots mit Proteinen von Zona pellucida freien Eizellen durchgeführt. Unter nicht reduzierenden Bedingungen zeigte sich ebenfalls im 220 kDa Molekularmassenbereich ein reaktives Protein. Unter reduzierenden Bedingungen konnten in Zona pellucida freien Eizellen die beiden Proteine im 70 und 53 kDa Bereich gezeigt werden, die schon in der Zona pellucida dargestellt wurden.

AS ZP3-5 erkennt kein gereinigtes, partiell deglykosyliertes porcines ZP3 $\beta$  Protein, aber ein 220 kDa Protein. Es ist nicht eindeutig geklärt, ob es sich bei dem immunreaktiven 220 kDa Polypeptid nur um nicht glykosyliertes ZP3 $\beta$  in Form eines Polymers, oder um ein weiteres porcines ZP Protein handelt, das bisher noch nicht identifiziert worden ist.

Zusammenfassend kann für Antiserum ZP3-5 festgestellt werden, daß es sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen sein Antigen im Immunoblot erkannte. Antigene Proteine wurden sowohl in Zona pellucida Präparationen als auch in Präparationen Zona pellucida freier Oozyten nachgewiesen. Diese Ergebnisse decken sich mit den immunhistochemischen Untersuchungen, in denen mit Antiserum AS ZP3-5 immunreaktives Protein in Zona pellucida wie auch im Ooplasma detektiert wurde. Bei dem in der Zona pellucida und dem im Ooplasma befindlichen Protein handelt es sich wahrscheinlich um sehr ähnliche Proteine, denn sowohl in reinen Zona pellucida Präparationen als auch in Zona pellucida freien Oozyten kam es offensichtlich unter reduzierenden Bedingungen zur Dissoziation eines Dimers in zwei Monomeren. Gereinigtes, partiell deglykosyliertes Schweine Zona pellucida Protein wurde allerdings auch von diesem Antiserum nicht erkannt. Diese Tatsache läßt darauf schließen, daß das Antigen durch

Modifikationen während der Trennung und Aufreinigung von ZP3 $\alpha$  und ZP3 $\beta$  so modifiziert wurde, daß für die Antikörper das Epitop nicht mehr detektierbar war.

Zur Kontrolle und zum Nachweis auch geringgradiger Mengen an Schweine Zona pellucida Proteinen wurde ein polyklonales Antiserum, AS ZPO, das gegen Schweineeizellen und somit auch gegen sämtliche Schweine Zona pellucida Proteine gerichtet ist, eingesetzt. Es zeigte sich, daß hier neben mehreren Proteinen unterschiedlicher Molekularmassen auch Proteine mit sehr ähnlichen apparenten Molekularmassen, die durch das Antiserum ZP3-5 erkannt wurden, detektiert wurden. Unter nicht reduzierenden Bedingungen zeigten die AS ZPO Antikörper eine Reaktivität mit Polypeptiden unterschiedlicher Molekularmassen, einschließlich einer breiten immunreaktiven Bande im 220 kDa Bereich. Sehr wahrscheinlich handelt es sich um das gleiche 220 kDa Protein, das auch von AS ZP3-5 erkannt wurde.

Unter reduzierenden Bedingungen zeigte sich die größte Immunreaktivität mit einem Protein im Bereich von 70 kDa, weiterhin eine im Bereich von 75 kDa und 53 kDa. Bei dem 70 kDa und dem 53 kDa Proteinen handelt es sich möglicherweise um die gleichen Proteine, die vom AS ZP3-5 unter reduzierenden Bedingungen dargestellt werden konnten. Es zeigte sich jedoch ein deutlicher Unterschied in der Stärke der Reaktion, was durch eine unterschiedliche Affinität der Antikörper bedingt sein könnte.

Das AS ZPO zeigte auch Reaktionen mit Proteinen von Zona pellucida freien Eizellen. Unter nicht reduzierenden Bedingungen reagierte das Antiserum mit verschiedenen Polypeptiden unterschiedlicher Molekularmassen, einschließlich des 220 kDa Proteins, mit dem sehr wahrscheinlich auch AS ZP3-5 Antikörper reagierten.

Unter reduzierenden Bedingungen wurden durch AS ZPO mehrere Polypeptide zwischen 53 kDa und 100 kDa erkannt. Wahrscheinlich stellen das 53 kDa und das 70 kDa Polypeptid hier die gleichen Antigene dar, die auch durch AS ZP3-5 detektiert wurden.

Im Gegensatz zu AS ZP3-5 Antikörpern reagierte Antiserum AS ZPO mit gereinigtem Schweine ZP3 $\alpha$  und ZP3 $\beta$ . Beide Proteine wurden mittels partieller Deglykosylierung von

einer 53 kDa Proteinbande abgeleitet und biochemisch aufgetrennt; sie haben eine Molekularmasse von etwa 40 kDa.

Inzwischen konnten die porcine cDNA des ZP3 $\alpha$  und ZP3 $\beta$  identifiziert werden (Harris et al., 1994). Hierbei zeigte sich, daß das ZP3 $\alpha$  homologe Sequenzen mit dem Maus ZP1 Protein aufweist und daß das ZP3 $\beta$  Protein betreffend der Aminosäuresequenz ähnlich dem Maus ZP3 Protein ist. In vorangegangenen Untersuchungen konnte durch andere Arbeitsgruppen gezeigt werden, daß Antiseren gegen gereinigtes porcines Zona pellucida 3 Protein auch mit Zona pellucida Proteinen in anderen Spezies kreuzreagieren und auch ein kontrazeptives Potential beinhalten (Millar et al., 1992; Yurewicz et al., 1987). Weitere Untersuchungen wiesen nach, daß porcine Zona pellucida 3 $\beta$  Proteine eine hohe Homologie mit dem Maus Zona pellucida 3 Protein aufwiesen (Töpfer-Petersen et al., 1993; Yurewicz et al., 1992). Es konnte gezeigt werden, daß die Aminosäuresequenz des proteolytischen Schweine ZP3 $\beta$  Peptids (Aminosäure Nr. 144-150) homolog zu der Aminosäuresequenz ist, die als synthetisches Peptid als Immunogen zur Herstellung von Antiserum ZP3-5 (Aminosäuren Nr. 137-150) eingesetzt wurde (Yurewicz et al., 1992). Neben gentechnologischen Methoden konnte also auch mit immunologischen Methoden gezeigt werden, daß die Aminosäuresequenz des Schweine ZP3 $\beta$  Proteins sehr ähnlich der Aminosäuresequenz des Maus ZP3 Proteins ist.

Weder das Antiserum AS ZP3-2 noch AS ZP3-6 reagierten im Immunoblot mit antigenen Polypeptiden aus Maus Zona pellucida. Dieses Ergebnis könnte durch eine mögliche Veränderung der durch diese Antiseren detektierten Epitope bei der Probenaufarbeitung erklärt werden.

Das Antiserum AS ZP3-5 und das Kontrollantiserum AS ZPO hingegen reagierten mit Proteinbanden im Immunoblot mit Maus Zona pellucida. AS ZP3-5 erkannte Maus ZP3 Protein als eine breite, flächige und ausgezogene Bande im Molekularmassenbereich von etwa 60-90 kDa; das anti-Schweine Oozyten Antiserum AS ZPO erkannte ebenfalls dieses Protein, jedoch war die Bindung der Antikörper an die Maus Zona pellucida weniger stark.

Die hier dargestellten äußerst komplexen und komplizierten immunbiochemischen Ergebnisse können wie folgt interpretiert und zusammengefaßt werden: Antiserum ZP3-5 reagiert mit einem 220 kDa Schweine Zona pellucida Protein, das ein ähnliches oder gleiches Epitop wie

das Maus ZP3 Protein hat. Dieses Protein beinhaltet intramolekulare Disulfidbrücken, das unter nicht reduzierenden Bedingungen nicht dissoziiert vorliegt. Unter reduzierenden Bedingungen kommt es zur Aufspaltung zweier Fragmente von 70 kDa und 53 kDa, die beide das Maus ZP3 Epitop beinhalten. Da das Antiserum AS ZP3-5, das gegen ein Maus Zona pellucida Protein gerichtet ist, das 220 kDa Protein erkennt, nicht aber das Schweine ZP3 $\beta$ , könnten die Ergebnisse so interpretiert werden, daß das 220 kDa Protein das dem Maus ZP3 homologe Schweine Zona pellucida Protein ist. Der Versuch, das Maus ZP3 Analogon im Immunoblot in porcinen Zona pellucida Proteinen eindeutig zu definieren, war allerdings nicht erfolgreich. Gentechnologische Methoden sind hier eindeutig den immunologischen Methoden überlegen.

Die im Rahmen der Doktorarbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß sich Antiseren gegen synthetische ZP3 Peptide zur Charakterisierung definierter Epitope unterschiedlicher ZP3 Protein Antigene eignen. In nachfolgenden Untersuchungen könnten diese Antikörper zur Identifizierung von Epitopen dienen, die eine funktionelle Relevanz für die Spermatozoen-Zona pellucida Interaktion besitzen. Es können z.B. Domänen, die für die Spermatozoenbindung von Bedeutung sind oder Bereiche des ZP3 Proteins, die für die Induktion der Akrosomreaktion von Bedeutung sind, identifiziert werden.

In parallelen Untersuchungen zu den hier beschriebenen Experimenten, die nicht im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurden, konnte gezeigt, daß Antiserum AS ZP3-6 als klinische Marker für die Integrität und Funktionalität der Zona pellucida eingesetzt werden konnte (Oehninger et al.,1996). Erste klinische Untersuchungen konnten zeigen, daß dieses Antiserum mit statistisch hochsignifikant als Marker für die Fertisierbarkeit humaner Eizellen aus IVF-Programmen eingesetzt werden kann.

## 5 Zusammenfassung

Zielstellung dieser Arbeit war die Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen synthetische Peptide des Zona pellucida 3 Proteins. Aus den veröffentlichten ZP3-Aminosäuresequenzen der Maus, des Menschen und des Hamsters wurden verschiedene Teilsequenzen ausgewählt und die entsprechenden Peptide synthetisiert. Zum einen wurde eine mausspezifische Teilsequenz (ZP3-2), zum anderen zwei bei Maus, Mensch und Hamster homologe Sequenzen (ZP3-5 und ZP3-6) ausgewählt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei anti ZP3 Peptidantiseren charakterisiert und eingesetzt: das mausspezifische Antiserum AS ZP3-2 und die Antiseren AS ZP3-5 und AS ZP3-6, die jeweils homologe Domänen bei Maus, Mensch und Hamster darstellten. Die gewonnenen Antiseren wurden im ELISA, in der Immunhistochemie, in der Immunfluoreszenz und im Immunoblot charakterisiert.

Im ELISA konnte eine titrationsabhängige Antigenerkennung der gewonnenen Antiseren und der affinitätschromatographisch gewonnenen Antikörper nachgewiesen werden.

In der Immunhistochemie erfolgte der Einsatz der Antiseren an fixierten Ovargewebeschnitten verschiedener Spezies. Während das mausspezifische Antiserum AS ZP3-2 ausschließlich mit der Zona pellucida der Mauseizelle reagierte, detektierte das Antiserum AS ZP3-5, das gegen eine homologe ZP3 Peptidsequenz gerichtet ist, die Zona pellucida bei Maus, Ratte, Hamster, Rind und in geringem Maß auch die Zona pellucida des Menschen. Bei der Eizelle des Schweines war eine außerordentlich kräftige Reaktion im Ooplasma der Eizelle zu erkennen, während sich die Zona pellucida nur schwach anfärben ließ. Ein weiteres Antiserum, das gegen eine homologe ZP3 Aminosäuresequenz gerichtet ist, AS ZP3-6, erkannte die Zona pellucida der Mauseizelle und der menschlichen Eizelle. Das Antiserum AS ZP3-6 wurde weiterhin an humanen Hemizonae von Metaphase II Eizellen mit Spermatozoen oder ohne vorherige Bindung von Spermatozoen eingesetzt. Nach Inkubation mit dem Antiserum war an allen Hemizonae eine deutliche Immunantwort nachzuweisen. Hierbei war hinsichtlich der Bindung der Antikörper an das ZP3 Protein qualitativ und quantitativ kein Unterschied feststellbar.

Mittels der indirekten Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, daß die Antiseren auch natives, nicht denaturiertes Zona pellucida Protein erkennen. Antiserum AS ZP3-5 zeigte an der humanen und porcinen Zona pellucida eine kräftige Immunfluoreszenzmarkierung und eine deutlich schwächere im Zentrum der Eizelle. Im Vergleich zu AS ZP3-5 stellte Antiserum AS ZP3-6 die Zona pellucida sowohl der humanen als auch der Schweine Eizelle als eher schmalen Fluoreszenzring dar. Die qualitativen Unterschiede weisen auf eine unterschiedliche Zugänglichkeit der durch die Antikörper detektierten ZP3 Epitope hin. Im Immunoblot erkannte das Antiserum AS ZP3-5 Maus Zona pellucida Protein als eine breite und ausgezogene Bande im Molekularmassenbereich von 80 kDa. Antiserum AS ZP3-5 reagierte mit einem 220 kDa Schweine Zona pellucida Protein. Unter reduzierenden Bedingungen kam es zur Aufspaltung in ein 70 kDa und 53 kDa Fragment. Nicht erkannt wurden die partiell deglykosilierten Schweine Zona pellucida Proteine ZP3 $\alpha$  und ZP3 $\beta$ . Das Antiserum AS ZP3-6 erkannte im Immunoblot keine Schweine Zona pellucida Proteine. Das gegen Schweineoozyten gerichtete Antiserum AS PO zeigte bei porcinen *Zonae pellucidae* und Zona pellucida freien Schweineeizellen ein ähnliches Proteinbandenmuster wie das Antiserum AS ZP3-5.

Die hier vorgestellten Untersuchungen zeigen, daß Antikörper gegen synthetische Zona pellucida Peptide als spezifische Marker für Zona pellucida Protein eingesetzt werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es zum ersten Mal gelungen, durch Antiseren gegen homologe Aminosäuresequenzen des ZP3 auch ZP3 Proteine aus Spezies, deren ZP3 Aminosäuresequenz nicht bekannt ist, zu identifizieren und zu lokalisieren.

## **6 Literaturverzeichnis**

**Afzalpurkar, A. and Gupta, S., K. 1997**

Identification of epitopes of monoclonal antibodies to porcine zona pellucida 3 beta glycoprotein, a homologue of the mouse/humane sperm receptor

Am. J. Reprod. Immunol. 38 (1): 26-32

**Allison, A., C. and Hartree, E., F. 1970**

Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization

J. Reprod. Fertil 21: 501-515

**Aonuma, S., Mayumi, T., Suzuki, K., Noguchi, T., Iwai, M. and Okabe, M. 1973**

Studies on sperm capacitation. I. The relationship between a given sperm-coating antigen and a sperm capacitation phenomen

J. Reprod. Fertil. 35: 425-432

**Araki, Y., Orgebin-Christ, M. C., and Tulsiani, D.R.P. 1992**

Qualitative characterization of oligosaccharide chains present on the rat zona pellucida glycoconjugates

Biol. Reprod. 46: 912-919

**Austin, C.R. 1951**

Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg

Aust. J. Sci. Res. (B) 4: 581-596

**Austin, C.R. 1967**

Capacitation of spermatozoa

Int. J. Fert. 12: 25-31

**Barros, C. and Yanagimachi, R. 1972**

Polyspermy-preventing mechanisms in the golden hamster egg

J. Exp. Zool. 180: 251-269

**Bercegeay, S., Allaire, F., Jean, M., L`Hermitte, A., Bruyas, J.F., Renard, N., Tainturier and Barriere, P 1993**

La zone pellucide bovine: differences de composition macromoleculaire entre ovocytes, penetrees ou non a l`A 23187. et embryons

Reprod Nutr. Dev. 33: 567-576

**Barros, C. and Yanagimachi, R. 1971**

Introduction of the zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material

Nature 233: 268-269

**Bentley, J.K.; Garbers, D.L.; Domino S.E.; Noland, T.D. and van Dop, C. 1986**

Spermatozoa contain a guanine nucleotide- binding protein ADP-ribosylated by pertussis toxin

Biochem. Biophys. Res. Commun. 138: 728-734

**Barany, G. and Merrieffield, R.B. 1979**

A chromatographic method for the quantitative analysis of the dithiasuccinoyl (DTS) amino-acids

Anal. Biochem. 95: 160-170

**Berger, T.M.; Davies, A.; Wardrip, N.J., and Hedrick, J.L. 1989**

Sperm binding to the pig zona pellucida and inhibition by solubilized components of the zona pellucida

J.Reprod. Fert. 86: 559-565

**Bielfeld, P.; Faridi, A; Zanefeld, L.J. and De-Jonge, C.J. 1994**

The zona pellucida- induced acrosome reaction of human spermatozoa is mediated by protein kinases

Fertil. Steril. 61: 536-541

**Bleil J.D., and Wassarman, P.M. 1990**

Identification of a ZP3-binding protein on acrosom-intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5563-5567

**Bleil, J.D. 1991**

Sperm receptors in mammalian eggs in: P.M. Wassarman (ed.): Elements of mammalian Fertilization, Volume I. CRC Press, Inc., Boca Raton

**Bleil, J.D., Beall, C.F. and Wassarman, P.M. 1981**

Mammalian sperm-egg interaction: Fertilization of mouse egg triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein ZP2

Dev. Biol. 86: 189-197

**Bleil, J.D. and Wassarman, P.M. 1986**

Autoradiographic visualization of the egg's sperm receptor bound to sperm

J. Cell. Biol. 102 (4): 1363-1371

**Bleil, J.D., Greve, J.M. and Wassarman, P.M. 1988**

Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs

Dev. Biol: 128: 376-385

**Bleil, J.D. Wassarman P.M. 1980**

Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm  
Cell 20: 873-882

**Bleil, J. D., and Wasserman P. M. 1980 a**

Synthesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture *in vitro*.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6778-6782

**Bleil, J. D., and Wasserman P. M. 1980 b**

Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida  
Dev. Biol. 76: 185-202

**Bleil, J. D., and Wasserman P. M. 1983**

Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by zona pellucida glycoprotein  
Developmental Biology 95: 317-324

**Bleil, J. D., and Wasserman P. M. 1988**

Galactose at the non reducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6778-6782

**Blobel, C. P., Wolfsberg, T. G., Turck, C. W., Myles, D.G., Primakoff, P. and White, J. M. 1992**

A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion

Nature 356: 248-252

**Boettger-Tong, H., Aarons, D., Biegler, B. Lee, T. and Poirier, G.R. 1992**

Competition between zonae pellucidae and a proteinase inhibitor for sperm binding

Biol Reprod 47: 716-722

**Bookbinder, L.H., Chen, A and Bleil, J.D. 1995**

Tissue- and species-specific expression of sp56, a mouse sperm fertilization protein

Science 269: 86-89

**Bradford, M. M. 1976**

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding

Anal Biochem. 72: 248-254

**Brucker, C., and Lipford, G.B. 1995**

The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update

Hum. Reprod: Update 1: 51-62

**Bucher, O. and Wartenberg, H. 1989**

Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, 11. Auflage. Verlag Hans Huber, Bern.

**Burkman, L.J., Coddington, C.C., Franken, D.R., Kruger, T.F., Rosenwaks, Z. and Hodgen, G.D. 1988**

The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential  
Fertil. Steril. 49: 688-697

**Burks, D.J., Carballada, R., Moore, H.D.M. and Sailing P.M. 1995**

Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization  
Science 269: 83-86

**Chamberlain, M.E. and Dean, J. 1989**

Genomic organization of a sex specific gene: the primary sperm receptor of the mouse zona pellucida  
Dev. Biol 131: 207-214

**Chamberlain, M.E. and Dean, J. 1990**

Human homolog of the mouse sperm receptor  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6014-6018

**Chang, M.C. 1951**

Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes  
Nature 168, 697-698

**Chang, M.C.1955**

Development of fertilizing capacity of rabbit spermatozoa in the uterus  
Nature 175, 1036-1037

**Cheng, A.; Le, T.; Palacios, M.; Bookbinder, L.H.; Wasserman, P.M.; Suzuki, F. and Bleil, J.D. 1994**

Sperm-egg recognition in the mouse: characterization of sp56, a sperm protein having specific affinity for ZP3

J. Cell. Biol. 125: 867-878

**Choi, T.S., Mori, M., Kohomoto, K. and Shoda, Y. 1987**

Beneficial effect of serum on the fertilizability of mouse oocytes matured in vitro

J. Reprod. Fertil. 79: 565-568

**Dietl, J., Ed. 1989**

The Mammalian Egg Coat: Structure and Function

Springer Verlag KG, Berlin

**De Felici M. and Siracusa, G. 1982**

"Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during in vitro culture

Gam. Res. 6: 107-113

**Dostalova, Z., Calvete, J.J. and Töpfer-Peterson E. 1995**

Interaction of non-aggregated boar AWN-1 and AQN-3 with phospholipid matrices. A model for coating of spermadhesins to the sperm surface

Biol. Chem. Hoppe-Seyler 376 (4): 237-242

**Downs, S.M., Schroeder, A.C. and Eppig, J.J. 1986**

Serum maintains the fertilizability of mouse oocytes matured in vitro by preventing the hardening of the zona pellucida

Gam. Res. 15: 115-122

**Dulcibella, T. 1991**

Mammalian egg cortical granules and the cortical reaction, in: P.M. Wassarman (ed.)  
Elements of Mammalian Fertilization, Volume I. CRC Press, Inc., Boca Raton, 1991

**Dumont, J.N. and Brummett, A.R. 1985**

Egg envelopes in vertebrates

Dev. Bio. 1: 235-288

**Dunbar, B.S., Liu, C. and Sammons, D. W. 1981**

Identification of three major proteins of porcine and rabbit zona pellucida by high resolution  
two dimensional gel electrophoresis: comparison with serum, follicular fluid, and ovarian cell  
proteins

Biol. Reprod. 24: 1111-1124

**Dunbar, B.S. 1983**

Morphological, biochemical, and immunochemical characterization of the mammalian zona  
pellucida, in: J.F. Hartmann (ed): Mechanism and Control of Animal Fertilization. Academic  
Press, New York

**Dunbar, B.S., Prasad, S.V., Timmons, T.M. 1991**

Comparative structure and function of mammalian zonae pellucidae, in B.S. Dunbar, M.G.  
O'Rand (eds): A Comparative Overview of Mammalian Fertilization. Plenum Press, New  
York

**Dunbar, B.S., Avery, S., Lee, V., Prasad, S., Schwahn, D., Schwoebel, E. Skinner, S. and Wilkins, B. 1994**

The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology and developmental expression

Reprod. Fertil. Dev. 6: 331-347

**Dunbar, B.S. and Raynor, B.D. 1980**

Characterization of porcine zona pellucida antigens

Biol. Reprod 22: 941-954

**Duncan, A.E. and Fraser, L.R. 1993**

Cyclic AMP-dependent phosphorylation of epididymal mouse sperm proteins during capacitation in vitro: identification of a  $M_r$  95000 phosphotyrosine-containing protein

J. Reprod. Fertil 97: 287-299

**Eddy, E.M. and O`Brian, D.A. 1994**

The spermatozoon, in E. Knobil, J.D. Neill (eds.): The Physiology of reproduction, Second edition. Raven Press, Ltd., New York

**Endo, Y. Lee, M.A. and Kopf, G.S. 1987**

Evidence for the role of a guanine nucleotide-binding regulatory protein in the zona pellucida-induced mouse sperm acrosome reaction

Dev. Biol. 119: 210-216

**Epifano, O. and Dean, J. 1994**

Biology and structure of the zona pellucida: a target for immunocontraception

Reprod. Fertil. Dev 6: 319-330

**Eppig, J.J. 1991**

Mammalian oocyte development in vivo and in vitro, in: P.M. Wassarman (ed.): Elements of Mammalian Fertilization, Volume I. CRC Press, Inc., Boca Raton

**Flechon J.E., Pavlok A., Kopecny V. 1984**

Dynamics of zona pellucida formation by the mouse oocyte. An autoradiographic study  
Biol. Cell. 51: 403-406

**Florman, H.M.; Tombes, R.M; First, N.L., and Babcock, D.F. 1989**

An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G-protein-promoted elevations of internal  $Ca^{2+}$  and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis  
Dev. Biol. 135: 133-146

**Flormann, H.M.; and Wassarman P.M. 1985**

O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity  
Cell 41: 313-324

**Florman, H.M., Bechtol, K.B. and Wassarman, P.M. 1984**

Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm  
Dev. Biol. 106: 243-255

**Florman, H.M., Lemos, J.R., Arnoult, C., Oberdof, J.A. and Zeng, Y. 1995**

Exo(cyto)tic ion channels in mammalian sperm, in: P. Fènichel, J. Parinaud (eds.): Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM (236)/ John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge

**Fraser, L.R. 1995**

Mechanisms regulating capacitation and the acrosome reaction, in: P. Fènichel, J. Parinaud (eds.): Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM (236)/ John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge

**Fusi, F.M., Vignali, M., Busacca, M. and Bronson, R.A. 1992**

Evidence for the presence of an integrin cell adhesion receptor on the oolemma of unfertilized human oocytes  
Mol. Reprod. Dev 31: 215-222

**Fusi, F.M., Vignali, M., Gailit, J. and Bronson, R.A. 1993**

Mammalian oocytes exhibit specific recognition of the RGD (Arg-Gly-Asp) tripeptide and express oolemmal integrins  
Mol. Reprod. Dev. 36: 212-219

**Gilman, A.G. 1987**

G-proteins: transducers of receptor-generated signals  
Annu. Rev. Biochem. 56: 615-649

**Greve, J.M., Salzman, G.S., Roller, R.J. and Wassarman, P.M. 1982**

Biosynthesis of the major zona pellucida glycoprotein secreted by oocytes during mammalian oogenesis  
Cell 31: 749-759

**Greve, J.M. and Wassarman, P.M. 1985**

Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat  
J. Mol. Biol. 181: 253-264

**Grootenhuis, A. J., Philipsen, H. L. A., Debreetgrjinsbach, J. T. M. and van Duin, M.  
1996**

Immunocytochemical localisation of ZP3 in primordial follicles of rabbit, marmoset, rhesus monkey, and human ovaries using antibodies against human ZP3  
J. Reprod. Fertil. 50 Suppl.:43-54

**Gulyas, B.J. and Schmell, E.D. 1981**

Sperm-egg recognition and binding in mammals, in: G. Jagiello, H. J. Vogel (eds.):  
Bioregulators of Reproduction. Academic Press, New York.

**Guraya, S. S. 1974**

Morphology, histochemistry and biochemistry of human oogenesis and ovulation. In:  
International Review of Cytology. Eds: G.H. Bourne and J.F. Danielli. Academic press New  
York: pp 121-151

**Gwatkin, R.B.L. 1977**

Fertilization mechanisms in man and mammals  
Plenum Press, New York

**Haidl, G. und Schill, W.B. 1990**

Andrologische Untersuchungsmethoden und Therapieprinzipien beim männlichen  
Sterilitätsfaktor  
Gynäkologie 23: 203-208

**Harris, J.D., Hibler, D.W., Fontenot, G.K., Hsu, K.T., Yurewicz, E.C. and Sacco, A.G. 1994**

Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: The ZPA, ZPB and ZPC gene families  
DNA Sequence 4: 361-393

**Harrison, R.A.P. and Gadella, B.M. 1995**

Membrane changes during capacitation with special reference to lipid architecture, in: P. Fènichel, J. Parinaud (eds.): Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM (236)/ John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge

**Hedrick, J.L. and Wardrip N.J. 1987**

On the macromolecular composition of the zona pellucida from porcine oocytes  
Dev. Biol. 121: 478-488

**Henkel, R., Stalf, T. and Miska, W. 1992**

Isolation and partial characterization of the outer dense fiber proteins from human spermatozoa  
Hoppe Seylers Z. Biol. Chem. 373: 685-689

**Hinsch, K.D., Hinsch, E., Aumüller, G., Tychowiecka, I., Schultz, G. and Schill, W.B. 1992**

Immunological identification of G protein  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in tail membranes of bovine spermatozoa  
Biol. Reprod. 47: 337-346

**Holt, W.V. 1995**

The sperm plasma membrane, in: P. Fènichel, J. Parinaud (eds.): Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM (236)/ John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge

**Hokke C.H.; Damm, J.B.; Penninkhof, B., Aitken. R.J., Kamerling, J.P. and Vliegthart, J.F. 1994**

Structure of the O-linked carbohydrate chains of porcine zona pellucida glycoproteins  
Eur. J. Biochem. 221: 491-512

**Irons, M.J. and Clermont, Y. 1982**

Formation of the outer dense fibers during spermiogenesis in the rat  
Anat. Rec. 202: 463-471

**Jaffe, L.A., Sharp, A.P. and Wolf, D.P. 1983**

Absence of an electrical polyspermy block in the mouse  
Dev. Biol. 96: 317-323

**Jones, W. R. 1994**

Gamete immunology  
Hum. Reprod. 9 Suppl. 2: 107-124

**Kanitz, W. 1994**

Biologische Grundlagen der Fruchtbarkeit beim weiblichen Rind  
Züchtungskunde 66: 413-437

**Kalab, P.; Visconti, P.; Leclerc, P. and Kopf, G.S. 1994**

p95, the major phosphotyrosine-containing protein in mouse spermatozoa, is a hexokinase with unique properties

J. Biol. Chem. 269: 3810-3817

**Karnik, N.S., Newman, S., Kopf, G.S. and Gerton, G.L. 1992**

Developmental expression of G protein alpha subunits in mouse spermatogenic cells; evidence that alpha i is associated with the developing acrosome

Dev. Biol. 152: 393-402

**Kinloch, R.A.; Ruiz-Seiler, B. and Wassarman, P.M. 1990**

Genomic organization and polypeptid primary structure of zona pellucida glycoprotein hZP3, the hamster sperm receptor

Dev. Biol. 142: 414-421

**Kinloch, R.A.; Mortillo, S. and Wassarman, P.M. 1992**

Transgenic mouse eggs with functional hamster sperm receptors in their zona pellucida

Development 115: 937-946

**Kopf, G.S.; Woolkalis, M.J., and Gerton G.L. 1986**

Evidence for a guanine nucleotide-binding regulatory protein in invertebrate and mammalian sperm: Identification by islet-activating protein catalyzed ADP-ribosylation and immunochemical methods

J. Biol. Chem. 261: 7327-7331

**Kopf, G.S.; Gerton, G.L.; Lee, M.A.; Woolkalis, M.J. and Endo, Y. 1987**

in: New Horizons in Sperm Cell Research (ed.: Mohri, H.)

Japan Scientific Societies Press: 297-308

**Kopf, G.S. and Gerton, G.L. 1991**

The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction, in: P.M. Wassarman (ed.):

Elements of Mammalian Fertilization, Volume I. CRC Press, Inc. Boca Raton 153-203

**Koyama, K.; Hasegawa, A, and Isoyama S. 1991**

Further characterization of the porcine zona pellucida antigen corresponding to monoclonal antibody (3A4-2G1) exclusively cross reactive with porcine and human zonae pellucidae

J. Reprod. Immunol. 19: 131-148

**Krchnak, V., Mach, O. and Maly, A. 1987**

Computer prediction of potential immunogenic determinants from protein amino acid sequence

Anal. Biochem 165: 200-207

**Laemmli, U.K. 1970**

Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4

Nature 227: 680-685

**Lee, V. H. and Dunbar, B.S. 1993**

Development expression of the rabbit 55kDa zona pellucida protein and messenger RNA in ovarian follicles

Dev. Biol. 155: 371-382

**Lee, M.A., Check, J.H. and Kopf, G.S. 1992**

A guanine nucleotide-binding regulatory protein in human sperm mediates acrosomal exocytosis induced by the human zona pellucida

Mol. Reprod. Dev. 31: 78-86

**Lee, M.A., Trucco, G.S., Bechtol, K.B., Wummer, N., Kopf, G.S, Blasco, L. and Storey, B.T. 1987**

Capacitation and acrosome reaction in human spermatozoa monitored by chlortetracycline fluorescence assay

Fertil. Steril 48: 649-658

**Leyton, L., LeGuen, P., Bunch, D. and Sailing, P.M. 1992**

Regulation of mouse gamete interaction by a sperm tyrosine kinase

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 11692-11695

**Leyton, L. Robinson, A. and Sailing, P.M. 1989**

Relationship between the M42 antigen of mouse sperm and the acrosome reaction induced by ZP3

Dev. Biol. 132: 174-178

**Leyton, L. and Sailing, P.M. 1989a**

Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction

J. Cell. Biol. 108: 2163-2168

**Leyton, L., and Sailing, P., 1989b**

95 kD sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosin kinase substrates in response to zona binding

Cell 57: 1123-1130

**Liang, L.F.; Chamow, S.M. and Dean J. 1990**

Oocyte specific expression of mouse ZP2: developmental regulation of the zona pellucida genes

Mol. Cell. Biol. 10: 1507-1515

**Liang, L.F. and Dean J. 1993**

Conservation of mammalian secondary sperm receptor genes enables the promoter of the human gene to function in mouse oocytes

Dev. Biol. 156: 399-408

**Lo-Liggio, L.; Williams, R.M. and Jones R. 1994**

Some effects of zona pellucida glycoproteins and sulfated polymers on the autoactivation of boar sperm proacrosin and activity of beta-acrosin

J. Reprod. Fertil. 100 (1): 177-185

**Lou, Y. H., Ang, J., Thai, H., McElveen, M. F. and Tung, K. S. K. 1995**

A zona pellucida 3 peptide vaccine induces antibodies and reversible infertility without ovarian pathology

J. Immunol. 155: 2715-2720

**Lou, Y. H., Bagavant, H., Ang, J., McElveen, M. F. Thai, H., and Tung, K. S. K. 1996**

Influence of autoimmune ovarian disease pathogenesis on ZP3 contraceptive vaccine design

J. Reprod. Fertil. 50 Suppl.: 159-163

**Lunsford, R.D., Jenkins, N.A., Kozak, C.A., Liang, L.F., Silan, C.M., Copeland, N.G. and Dean, J. 1990**

Genomic mapping of murine Zp-2 and Zp3, two oocyte-specific loci encoding zona pellucida proteins

Genomics 6: 184-187

**Mareh, G.A. and Dunbar, B.S. 1987**

Antigenic comparison of five species of mammalian zonae pellucidae

J. Exp. Zool. 244: 299-307

**Mendoza, C. and Tesarik, J. 1994**

Synthetic substitutes for biological materials in human sperm-zona pellucida recognition tests.

Male factors in human infertility, Series: Frontiers in endocrinology 8: 187-205

**Merril, C.R., Goldman, D., Sedman, S.A. and Ebert, M.H. 1981**

Ultrasensitive stain for proteins I<sup>n</sup> Polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins

Science 211: 1437-1443

**Millar, S.E.; Chamow, S.M., Baur, A.W.; Oliver, C.; Robey, F. and Dean J. 1989**

Vaccination with a synthetic zona pellucida peptide produces long term contraception in female mice

Science 246: 935-938

**Miller, C.C., Fayer-Hosken, R.A., Timmons, T.M., Lee, V.H., Claudle, A.B. and Dunbar, B.S. 1992**

Characterization of equine zona pellucida glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis and immunological techniques  
J. Reprod. Fertil, 96: 815-825

**Moller, C.C. and Wassarman, P.M. 1989**

Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs  
Dev. Biol. 132: 103-112

**Moore, H.D.M. 1995**

Modification of sperm membrane antigens during capacitation, in: P. Fènichel, J. Parinaud (eds.): Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM (236)/ John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge

**Moore, G.D., Kopf, G.S. and Schultz, R.M. 1993**

Complete mouse egg activation in the absence of sperm by stimulation of an exogenous G protein-coupled receptor  
Dev. Biol. 159: 669-678

**Moore, K.L. 1985**

Embryologie. Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen, 2. Auflage.  
F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

**Mori, K.; Daitoh, T.; Kamada, M.; Maeda, N.; Maegawa, M.; Hirano, K.; Irahara, M. and Aono T. 1993**

Blocking of human fertilization by carbohydrates

Mol. Reprod. Dev. 36 (3): 377-381

**Morales, P. and Llanos, M. 1995**

Role of the acrosome reaction in egg vestments and plasma membrane penetration, in: P.

Fènichel, J. Parinaud (eds.): Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM (236)/ John

Libbey Eurotext Ltd., Montrouge

**Mortillo, S. and Wassarman, P.M. 1991**

Differential binding of gold-labeled zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 to mouse sperm membrane compartments

Development 113: 141-149

**Myles, D. G., Kimmel, L. H., Blobel, C. P., White, J. M. and Primakoff, P. 1994**

Identification of a binding site in the disintegrin domain of fertilin required for sperm-egg fusion

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4195-4198

**Naz, R.K. 1995**

Role of membrane tyrosine kinases in human sperm function, in: P. Fènichel, J. Parinaud

(eds.): Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM (236)/ John Libbey Eurotext

Ltd., Montrouge

**Nichols, J. and Gardner, R.L. 1989**

Effect of damage to the zona pellucida on development of preimplantation embryos in the mouse

Hum. Reprod. 4: 180-187

**Noguchi, S.; Hatanaka, Y.; Tobita, T, and Nakano M. 1992**

Structure analysis of the N-linked carbohydrate chains of the 55 kDa glycoprotein family (pZP3) from porcine zona pellucida

Eur. J. Biochem. 204: 1089-11001

**Noguchi, S., and Nakano M. 1992**

Structure of the acidic N-linked carbohydrate chains of the 55 kDa glycoprotein family (pZP3) from porcine zona pellucida

Eur. J. Biochem. 209: 883-894

**Noguchi, S., and Nakano, M. 1993**

Structural characterization of the N-linked carbohydrate chains from mouse zona pellucida glycoproteins ZP2 and ZP3

Biochim. Biophys. Acta 1158: 217-226

**Oeninger, S., Hinsch, E., Pfisterer, S., Veck, L.L., Kolm, Schill, W.B., Hodgen, G.D. and Hinsch, K.D. 1996**

Use of a specific zona pellucida (ZP) protein3 antiserum as a clinical marker for human ZP integrity and function

Fertil. Steril. 65: 139-145

**Ohzu, E. and Yanagimashi, R. 1982**

Acceleration of acrosome reaction in hamster spermatozoa by lyssolecithin

J.Exp. Zool. 224: 259-263

**Oliphant, G., Reynolds, A.B. and Thomas, T.S. 1985**

Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction

Am. J. Anat. 174: 269-289

**Paterson, M., Wilson, M. R., van Duin, M. and Aitken, R.J. 1996**

Evaluation of zona pellucida antigens as potential candidates for immunocontraception

J. Reprod. Fertil. 50 Suppl.: 175-182

**Pedersen, H. 1972**

Further observations on the fine structure of the human spermatozoon

Zellforsch. 123: 305-315

**Peterson, R.N.; Campbell, P.; Hunt; W.B., and Bozzola, J.J. 1991**

Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis characterization of APz, a sperm protein involved in zona binding in the pig and evidence for its binding to specific zona glycoproteins

Mol- Reprod. Dev. 28: 260-271

**Phillips. D.M. 1977**

Mitochondrial disposition in mammalian spermatozoa

J. Ultrastruct. Res. 58: 144-154

**Phillips, D.M. and Shalgi, R.M. 1980**

Surface properties of the zona pellucida

J. Exp. Zool. 213: 1-8

**Philpott, C.C., Ringuette, M.J. and Dean, J. 1987**

Oocyte specific expression and developmental regulation of ZP3, the sperm receptor of the mouse zona pellucida

Dev. Biol. 121: 568-575

**Piko, L. 1967**

Immunological phenomena in the reproductive process

Int. J. Fertil. 12: 377-383

**Prasad, S.V., Mujtaba, S. and Dunbar, B.S. 1995**

Immunogenicity enhancement of recombinant rabbit 55-kilodalton zona pellucida protein expressed using the baculovirus expression system

Biol. Reprod. 52 (2): 1167-1178

**Propping, D., Tauber, P.F. and Zaneveld, L.J.D. 1978**

Fertilization and implantation, in: H.Ludwig, P.F. Tauber (eds.): Human fertilization. Thieme, Stuttgart

**Rankin, T., Familari, M., Lee, E., Ginsberg, A., Dwyer, N., Blanchettemackie, J., Drago, J., Westphal, H. and Dean, J. 1996**

Mice homozygous for an insertional mutation in the ZP3 gene lack a zona pellucida and are infertile

Development 122: 2903-2910

**Reddy, R.M., Stark, R.A. and Zaneveld, J.D. 1979**

A high molecular weight antifertility factor from human seminal plasma

J. Reprod. Fertil 57: 437-446

**Ringuette, M.J.; Chamberlain, M.E.; Baur, A.W.; Sobieski, D.A.; and Dean, J. 1988**

Molecular analysis of cDNA coding for ZP3, a sperm binding protein of the mouse zona pellucida

Dev. Biol. 127: 287-295

**Roller, R.J. and Wassarman, 1983**

Role of asparagine-linked oligosaccharides in secretion of glycoproteins of the mouse egg's extracellular coat

J. Biol. Chem. 258: 13243-13249

**Rüsse, I., Sinowatz, F. 1991**

Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. Parey, Berlin/Hamburg

**Sacco, A.G.; Pierce, D.L.; Subramanian P.D.; Yurcewicz, E.D. and Dukelow, W.R. 1987**

Ovaries remain functional in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) immunized with porcine zona pellucida 55.000 macromolecule

Biol. Reprod. 36: 481-490

**Sacco, A.G.; Yurewicz, E.D.; Subramanian, M.G. and Matzat, P.D. 1989**

Porcine zona pellucida: association of sperm receptor activity with a  $\alpha$  glycoprotein component of the  $M_r = 55.000$  family

Biol Reprod. 41: 523-32

**Sacco, A.G. and Yurewicz, E.D. 1994**

Assessment of synthetic peptides from porcine zona glycoproteins ZP3 $\alpha$  and ZP3 $\beta$  for contraceptive vaccine development, in: G. P. Talwar, K. V. S. Rao and V. S. Chauhan (eds.): Recombinant and synthetic vaccines

Narosa Publishing House, New Dehli: 283-290

**Saling, P.M. 1991**

How the egg regulates sperm function during gamete interaction: facts and fantasies

Biol. Reprod. 44: 246-251

**Saling, P.M., Sowinski, J. and Storey, B.T. 1979**

An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zona pellucida in vitro: sequential relationship to the acrosome reaction

J. Exp. Zool. (210), 353-359

**Saling, P.M., Burks, D.J. Carballada, M.R., Dowds, C.A., Leyton, L., McLeskey, S.B.****Robinson, A. and Tomes, C.N. 1995**

Sperm interaction with the zona pellucida: the role of ZRK, in: P. Fènichel, J. Parinaud (eds.):

Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM (236)/ John Libbey Eurotext Ltd.,

Montrouge

**Sato, K. 1979**

Polyspermy-preventing mechanisms in mouse eggs fertilized in vitro

Exp. Zool 210: 353-359

**Schroeder, A.C., Schultz, R.M., Kopf, G.S., Taylor, F.R., Becker, R.B. and Eppig, J.J.****1990**

Fetuin inhibits zona pellucida hardening and conversion of ZP2 to ZP2<sub>f</sub> during spontaneous mouse oocyte maturation in vitro in the absence of serum

Biol. Reprod. 43: 891-897

**Shabanowitz, R.B. and O'Rand, M.G. 1988**

Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs

J. Reprod. Fertil. 82: 151-161

**Shimizu, S., Tsuji, M. and Dean, J. 1983**

In vitro synthesis of three sulfated glycoproteins of murine zonae pellucidae by oocytes grown in follicle culture

J. Biol. Chem. 258: 5858-5863

**Skinner, S.M. and Dunbar, B.S 1986**

Species variation in the zona pellucida. In: Talwar G.P. (ed.), Immunological Approaches to Contraception and Promotion of Fertility.

New York: Plenum Press: 251-268

**Stevens, R.W. III 1990**

Basic spermatozoon anatomy and physiology for the clinician, in: A.A. Acosta, R.J. Swanson, S.B. Ackerman, T.F. Kruger, J.A. van Zyl, R. Menkveld (eds.): Human Spermatozoa in Assisted Reproduction. Williams & Wilkins, Baltimore.

**Steward-Savage, J. and Bavister, B.D. 1991**

Time course and pattern of cortical granule breakdown in hamster eggs after sperm fusion

Mol. Reprod. Dev. 30: 390-395

**Thomas, T.S., Wilson, W.L., Reynolds, A.B. and Oliphant, G. 1986**

Chemical and physical characterization of rabbit sperm acrosome stabilizing factor

Biol. Reprod. 35: 691-703

**Takagi, J., Dobashi Araki, M.D.Y., Imai, Y., Hiroi, M., Tonosaki, A. and Sendo, F. 1989**

The development of porcine zona pellucida using monoclonal antibodies: II. Electron microscopy

Biol. Reprod. 40: 1103-1108

**Talbot, P., Summers, G.R., Hylander, B.L., Keough, E.M. and Franklin, L.E. 1976**

The role of calcium in the acrosome reaction: An analysis using ionophore A23187

J. Exp. Zool. 198: 383-392

**Towbin, H., Staehlin, T. and Gordon, J. 1979**

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets:  
procedure and some applications

J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354

**Töpfer-Peterson, E.; and Calvete, J. J. 1995**

Molecular mechanisms of the interaction between sperm and the zona pellucida in mammals:  
studies on the pig

Int. J. Androl 18 Suppl. 2: 20-26

**Töpfer-Peterson, E.; Mann, K.; and Calvete; J. J. 1993**

Identification of porcine oocyte 55 kDa  $\alpha$  and  $\beta$  glycoproteins within the zona pellucida  
glycoprotein families indicates that oocyte sperm receptor activity is associated with different  
zona pellucida proteins in different mammalian species

Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374: 411-417

**Totzauer, I., Kollé, S., Sinowatz, F., Plendl, J., Amselgruber, W. and Töpfer-Petersen, E.  
1998**

Localization of the zona glycoproteins ZPB (ZP3  $\alpha$ ) and ZPC (ZP3  $\beta$ ) in the bovine  
ovary during pre- and postnatal development

Anat.-Anz. 180 (1): 37-43

**Tulsiani, D.R.P., Nagdas, S.K., Cornwall, G.A. and Orgebin.Crist, M.C. 1992**

Evidence for the presence of high-mannose/hybrid oligosaccharide chains on the mouse ZP2 and ZP3

Biol. Reprod. 46: 93-100

**Urch, U.A. 1991**

Biochemistry and function of acrosin, in: P.M. Wassarman (ed.): Elements of Mammalian Fertilization, Volume I. CRC Press, Inc., Boca Raton

**Van Duin, M; Poleman J.E.M.; Suikerbuijk R.F.; Geurts van Kessel A.H.M. and Olijve W. 1993**

The human gene for the zona pellucida glycoprotein ZP3 and a second polymorphic locus are located on chromosome 7

Cytogenet. Cell. Genet. 63: 11-113

**Van Duin, M.; Polman, J.E.M.; Verkoelen C.C.E.H.; Bunschoten H.; Meyerink, J.H.; Olijve, W. and Aitken R.J. 1992**

Cloning and characterization of the human sperm receptor ligand ZP3: evidence for a second polymorphic allele with a different frequency in the Caucasian and Japanese populations

Genomics 14: 1064-1070

**Vliegthart, J.F. 1994**

Studies on glycoprotein-derived carbohydrates

Biochem. Soc. Trans. 22: 370-373

**Ward, C.R.; Storey, B.T., and Kopf, G.S. 1992**

Activation of a G<sub>1</sub> protein in mouse sperm membranes by solubilized proteins of the zona pellucida, the egg's extracellular matrix

J. Biol. Chem. 267: 14061-1467

**Ward, C.R.; Storey, B.T., and Kopf, G.S. 1994**

Selective activation of Gi1 and Gi2 in mouse sperm by zona pellucida, the egg's extracellular matrix

J. Biol. Chem. 13254-13258

**Wassarman P.M. 1988**

Zona pellucida glycoproteins

Annu. Rev. Biochem. 57: 415-442

**Wassarman P.M. 1989**

Die Besamung des Säuger-Eies

Spektrum der Wissenschaft, Februar 1989: 96-103

**Wassarman, P. M. 1990**

Profile of a mammalian sperm receptor

Development 108:1-17

**Wassarman, P.M. 1987a**

Early events in mammalian fertilization

Annu. Rev. Cell. Biol. 3: 109-142

**Wassarman, P.M. 1987b**

The biology and chemistry of fertilization

Science 235: 535-560

**Wassarman, P.M. 1992**

Regulation of mammalian fertilization by gamete adhesion molecules. In: Spermatogenesis-Fertilization-Contraception. EDS: Nieschlag E., Habenicht U.F.,

Springer Verlag Berlin Heidelberg New York: 345-366

**Wassarman, P.M. and Albertini, D.F. 1994**

The mammalian ovum, in E. Knobil, J.D. Neill (eds.): The physiology of Reproduction, Second Edition. Raven Press, Ltd., New York.

**Wassarman, P.M., Bleil, J.D., Florman, H.M., Greve, J.M., Roller, R.J. Salzman, G.S. and Samuels, F.G. 1985**

The mouse egg's receptor for sperm: What is it and how does it work?

Cold Spring Harb. Quant. Biol. 50: 11-19

**Weinman, D.E. and Williams, W.L. 1961**

Mechanism of capacitation of rabbit spermatozoa

Nature 203: 423-424

**Williams, C.J., Schultz, R.M. and Kopf, G.S. 1992**

Role of G proteins in mouse egg activation: Stimulatory effects of acetylcholine on the ZP2 to ZP<sub>f</sub> conversion and pronuclear formation in eggs expressing a functional m1 muscarinic receptor

Dev. Biol. 151: 288-296

**Wolgemuth, D., Celenza, J. and Dunbar, B. S. 1984**

Formation of the rabbit zona pellucida and its relationship to ovarian follicular development

Dev. Biol. 106: 114

**Wolf, D.P. 1978**

The block to sperm penetration in zona-free mouse eggs

Dev. Biol 64: 1-10

**Yanagimachi, R. 1970**

The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation

J. Reprod. Fertil. 23:193-196

**Yanagimachi, R. 1981**

Mechanisms of fertilization in mammals, in: L. Mastroianni, J.D. Biggers (eds.): Fertilization and embryonic development in vitro. Plenum Press, New York

**Yanagimachi, R. (1988)**

Mammalian Fertilization

In : The Physiology of Reproduction, eds Knobil, E. and Neill, J.D.

(Raven, New York), Vol 1: 135-185

**Yanagimachi, R. (1994)**

Mammalian fertilization, in: E. Knobil, J.D. Neill (eds.): The Physiology of Reproduction, Second Edition. Raven Press, Ltd., New York

**Yurcewicz, E.C.; Hibler, D.; Fontenot, G.K. Sacco, A.G. and Harris, J. 1993**

Nucleotide sequence of cDNA encoding ZP3 $\alpha$ , a sperm binding glycoprotein from the zona pellucida of pig oocyte

Biochim. Biophys. acta 1174: 211-214

**Yurewicz, E.C.; Sacco, A.G. and Subramanian M.G. 1987**

Structural characterization of the  $M_r= 55,000$  antigen (ZP3) of porcine oocyte zona pellucida

J- Biol Chem. 262: 564-571

**Yurewicz, E. C.; Pack, B. A. and Sacco A.G. 1992**

Porcine oocyte zona pellucida  $M_r$  55 000 glycoproteins: identification of O-glycosylated domains

Mol. Reprod. Dev. 33: 182-188

**Zhang, X., Lou, YH., Koopman, M., Doggett, T., Tung, KS. and Curtiss, R., 3<sup>rd</sup> 1997**

Antibody responses and infertility in mice following oral immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* expressing recombinant murine ZP3

Biol.-Reprod. 56 (1): 33-41

## 7 Anhang

### Tabellarischer Lebenslauf

|                   |  |
|-------------------|--|
| 1. Mai 1961       | in Stuttgart geboren   |
| 1968-1972         | Besuch der Grundschule in Stuttgart  |
| 1972-1981         | Besuch des Hölderlin-Gymnasiums in Stuttgart   |
| 1981              | Allgemeine Hochschulreife  |
| 1982-1988         | Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-<br>Universität Gießen                               |
| 1988-1989         | Praktisches Jahr am Uniklinikum Gießen mit<br>Wahlfach Dermatologie und Venerologie                |
| 24.4.1989         | Ärztliche Prüfung  |
| 1989-1991         | Ärztin im Praktikum in der Hautarztpraxis<br>Dr.W. Brinkmann in Herborn                            |
| 1992-1993         | Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der reproduktions-<br>biochemischen Arbeitsgruppe PD Dr. Hinsch |
| Seit Oktober 1993 | Ärztin am Zentrum für Dermatologie und Andrologie  |

## Danksagung

Besonderen Dank schulde ich Herrn PD Dr. Hinsch für die ausgezeichnete Betreuung und die allzeit gewährte wissenschaftliche Unterstützung meiner Dissertationsarbeit.

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

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Hinsch, die mich mit viel Geschick in die methodisch-wissenschaftlichen Arbeiten einwies und jederzeit für Fragen offen war.

Ich möchte auch Frau Sabine Gröger für ihre unermüdliche Unterstützung danken, die sie mir gewährte, wann immer ich sie brauchte.

Letztlich danke ich allen, die bei der Durchführung der Arbeit behilflich waren.