

Untersuchungen
zur Lokalisation und Funktion von
ZP-Proteinen im Marmoset Modell

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Katja Bogner
aus Worms

Gießen, 2005

**Aus dem Medizinischen Zentrum für Dermatologie und Andrologie
Ausbildungszentrum der Europäischen Akademie für Andrologie
Leiter: Prof. Dr. Dr. W.-B. Schill
des Universitätsklinikums Gießen**

Gutachter: Prof. Dr. Hinsch

Gutachter: Prof. Dr. Beck

Tag der Disputation: 07.03.2005

meinen Eltern

Abkürzungen

Ak	Antikörper
AS	Antiserum
BMP15	Bone morphogenetic protein 15
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	copy DNA
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
EZ	Eizelle
FBS	Fötale Kälberserum
gDNA	genomische DNA
HABA	Hemizona-Antikörper-Bindungsassay
HGAPDH	Humane Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HZ	Hemizona
HZI	Hemizona-Index
K-HZA	Kompetitions-Hemizona-Assay
mRNA	messenger RNA
RT-Reaktion	Reverse-Transkriptase-Reaktion (=Reverse Transkription)
PBS	Phosphat-buffered-saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
TBS	Tris-buffered-saline
v/v	Volume per volume
w/v	Weight per volume
ZP	Zona Pellucida
ZPB	Zona Pellucida B-Protein
ZPA	Zona Pellucida A-Protein
ZPC	Zona Pellucida C-Protein

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1. Fertilisation	8
1.2. Das Spermatozoon	10
1.2.1. Morphologie und Genese	10
1.2.2. Funktionelle Aspekte	12
1.2.2.1. Kapazitation	12
1.2.2.2. Akrosomale Reaktion	12
1.3. Die Oozyte	13
1.3.1. Morphologie und Genese	13
1.3.2. Zona Pellucida	14
1.3.2.1. Zona Pellucida B-Protein (ZPB)	16
1.3.2.2. Zona Pellucida A-Protein (ZPA)	17
1.3.2.3. Zona Pellucida C-Protein (ZPC)	18
1.3.2.4. Synthese der Zona Pellucida-Proteine	20
1.4. Das Tiermodell	21
1.5. Ziele der Arbeit	22
2. Materialien und Methoden	24
2.1. Materialien	24
2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	24
2.1.2. Medien und Lösungen	29
2.1.3. Verwendete Kits	32
2.1.4. Ausgewählte Anti-ZP-Antikörper	32
2.1.5. Geräte	35
2.1.6. Versuchstiere	35
2.2. Methoden	37
2.2.1. Gewinnung von Marmoset-Eizellen	37
2.2.2. Gewinnung von Frischsperma	38

2.2.3.	Herstellung von Paraffinschnitten aus Ovarien	40
2.2.4.	Einsatz von Anti-ZPA- und Anti-ZPC-Antikörpern	40
2.2.4.1.	Immunhistochemie auf Paraffinschnitten	40
2.2.4.2.	Immunreaktion auf Ultradünnschnitten	41
2.2.4.3.	Hemizona-Antikörper-Bindungsassay (HABA)	42
2.2.5.	Funktionelle Spermatozoenbindungsstudien: Kompetitions-Hemizona-Assay (K-HZA)	45
2.2.5.1.	Aufbereitung des Ejakulates	47
2.2.5.2.	Herstellung der Spermatozoensuspension	47
2.2.5.3.	Herstellung von Hemizonae aus Marmoset-Oozyten	48
2.2.5.4.	Vorbereitung der Hemizonae	48
2.2.5.5.	Coinkubation von Hemizonae und Spermatozoen	49
2.2.6.	Expression der ZP-Gene	50
2.2.6.1.	Isolierung von mRNA aus Marmoset Ei- und Follikelzellen	50
2.2.6.2.	Reverse Transkriptasereaktion, RT-Reaktion	52
2.2.6.3.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	52
2.2.6.3.1.	Oligonukleotid-Primer	53
2.2.6.3.2.	RT-PCR	54
2.2.6.3.3.	Gelelektrophorese der PCR-Produkte	55
2.2.6.3.4.	Sequenzierung der PCR-Produkte	55
2.2.7.	Statistische Auswertung	55
2.2.7.1.	Statistische Auswertung des HABA	55
2.2.7.2.	Statistische Auswertung des K-HZA	56
3. Ergebnisse		57
3.1.	Anzahl gewonnener Zellen aus dem Ovar des Weißbüschelaffen	57
3.2.	Immunhistochemische Identifizierung von Zona Pellucida-Proteinen	59
3.3.	Immunelektronenmikroskopische Identifizierung von ZPA und ZPC	62
3.4.	Färbeverhalten im Hemizona-Antikörper-Bindungsassay (HABA)	65
3.4.1.	Unbehandelte Hemizonae	65
3.4.2.	Hemizonae nach Einsatz im K-HZA mit AS ZPA-20	66
3.4.3.	Hemizonae nach K-HZA mit mAb ZPA-20	67

3.5.	Spermatozoenbindungsstudien: Kompetitions-Hemizona-Assay	68
3.5.1.	K-HZA mit AS ZPA-20	70
3.5.2.	K-HZA mit mAb ZPA-20	71
3.5.3.	K-HZA mit direktem Vergleich der Antiseren AS ZPA-20 und AS ZPA-26	72
3.5.4.	K-HZA mit direktem Vergleich der affinitätschromatographisch gereinigten Antikörper aus AS ZPA-20 und AS ZPA-26	73
3.6.	Darstellung der Expression Zona Pellucida-Protein kodierender Gene	74
3.6.1.	RT-PCR zur Darstellung der ZP mRNA-Expression in Marmoset-Oozyten	77
3.6.1.1.	Sequenzierung der PCR-Fragmente	80
3.6.2.	RT-PCR zur Darstellung der Genexpression der Zona Pellucida-Proteine in Follikelzellen des Marmoset-Affen	84
4.	<u>Diskussion</u>	<u>88</u>
4.1.	Immunhistochemische und Immunelektronenmikroskopische Lokalisation von ZP-Proteinen im Marmoset Ovar	90
4.2.	Funktionelle Relevanz eines spezifischen ZPA-Epitopes	93
4.3.	Bindungsverhalten spezifischer Anti-ZP-Antikörper an Marmoset-Hemizonae	95
4.4.	Expression ZP-Protein kodierender Gene	96
4.5.	Die Bedeutung der Ergebnisse für die Immunkontrazeption	100
5.	<u>Zusammenfassung</u>	<u>102</u>
6.	<u>Summary</u>	<u>103</u>
7.	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>104</u>
8.	<u>Anhang</u>	<u>123</u>
8.1.	Tabellarischer Lebenslauf	123
8.2.	Danksagung	124

1. Einleitung

1.1. Fertilisation

Als Fertilisation bezeichnet man die Befruchtung der Eizelle. Die erfolgreiche Verschmelzung von männlicher und weiblicher Keimzelle ist das Resultat einer komplexen Reaktionskaskade. Von wesentlicher Bedeutung während der Spermatozoen-Eizell-Interaktion ist dabei das aktive Eindringen der Samenzelle in die Eizelle, die Imprägnation. Dazu muss das Spermatozoon im ersten Schritt an die die Eizelle umgebende Zona Pellucida binden (Wassarman, 1995). Diese Bindung induziert die akrosomale Reaktion der Samenzelle (Saling *et al.*, 1979). Während dieser akrosomalen Reaktion kommt es durch die Verschmelzung der äußeren akrosomalen Membran mit der Plasmamembran des Spermatozoons zur Freisetzung proteolytischer Enzyme, deren Aktivität die Durchwanderung der Zona Pellucida erleichtern (Zaneveld *et al.*, 1991; Tulsiani *et al.*, 1998). Akrosomreagierte Spermatozoen sind im weiteren Verlauf dazu in der Lage, die Zona Pellucida zu penetrieren und abschließend mit dem Oolemm zu fusionieren (Yanagimachi, 1994).

Eine entscheidende Rolle bei der Verschmelzung der Spermatozoenmembran und dem Plasmalemm der Eizelle spielen wahrscheinlich die Mitglieder der ADAM-Familie, die in der Plasmamembran der Samenzelle lokalisiert sind (Myles & Primakoff, 1997). Als ADAM-Familie wurde von Wolfsberg *et al.* (1995) eine Genfamilie transmembranärer Proteine bezeichnet, die eine Disintegrin- und Metalloprotease-Domäne besitzen (*A Disintegrin And Metalloprotease domain*). Eines der best untersuchtesten Proteine dieser Familie ist das Fertilin. Fertilin, auch als PH-30 bekannt, ist ein Heterodimer, das aus zwei transmembranären Untereinheiten besteht: Fertilin α und Fertilin β (Blobel *et al.*, 1992). Vor allem die Disintegrin-Domäne von Fertilin β scheint eine wesentliche Funktion während der Fusion von Spermatozoon und Oozyte inne zu haben (Myles *et al.*, 1994; Blobel, 2000). Diese konnte nämlich durch den Einsatz von Antikörpern gegen die Disintegrin-Domäne des Fertilins β (Primakoff *et al.*, 1987) oder durch Fertilin β -Peptide (Mwethera *et al.*, 1999) erfolgreich gehemmt werden. Als Rezeptor dienen auf weiblicher Seite die Integrine des Oolemm, die bestimmte Aminosäuresequenzen innerhalb ihrer Liganden zu erkennen scheinen (Fusi *et al.*, 1992; Fusi *et al.*, 1993; Shrimali&Reddy, 2000). Um eine Mehrfachbefruchtung der Eizelle zu vermeiden, kommt es durch die Fusion der inneren akrosomalen Membran des Spermatozoens mit der Plasmamembran der Eizelle zu einer

Vielzahl von biochemischen Reaktionen auf unterschiedlichen Ebenen der Gameten-Interaktion. Durch einen noch ungeklärten Mechanismus kommt es zu einer Veränderung des Oolemmas („Plasmamembran-Block“), die keine weitere Spermatozoenbindung mehr zulässt (Horvath *et al.*, 1993; Sengoku *et al.*, 1995). Voraussetzung für diese biochemische Modifikation der Plasmamembran der Eizelle ist die erfolgreiche Inkorporation der Spermatozoenmembran (Maleszewski *et al.*, 1996; Sengoku *et al.*, 1999). Neben dem „Plasmamembran-Block“ bewirkt die einsetzende Degranulation kortikaler Granula der Oozyte eine Verhärtung der Zona Pellucida („Zona-Block“), so dass diese nicht weiter von Spermatozoen penetriert werden kann (Barros & Yanagimachi, 1971). Miller *et al.* (1993) konnten zeigen, dass im Maus-Modell die Freisetzung von N-Acetylglucosaminidase dabei eine wesentliche Rolle spielt.

Neben der Reaktion zur Vermeidung einer Mehrfachbefruchtung führt die Fusion von Spermatozoon und Oozyte auch zur Aktivierung der Eizelle. Darunter wird die kortikale Degranulation, die Vollendung der Meiose, die Bildung des weiblichen Vorkerns und die DNA-Synthese in den Vorkernen der fusionierten Gameten zusammengefasst (Yanagimachi, 1994). Der Endpunkt einer erfolgreichen Fertilisation stellt dann die Verschmelzung des männlichen und weiblichen Vorkerns, die Konjugation dar. Aus zwei haploiden Gameten ist somit eine diploide Zygote entstanden (Abb. 1).

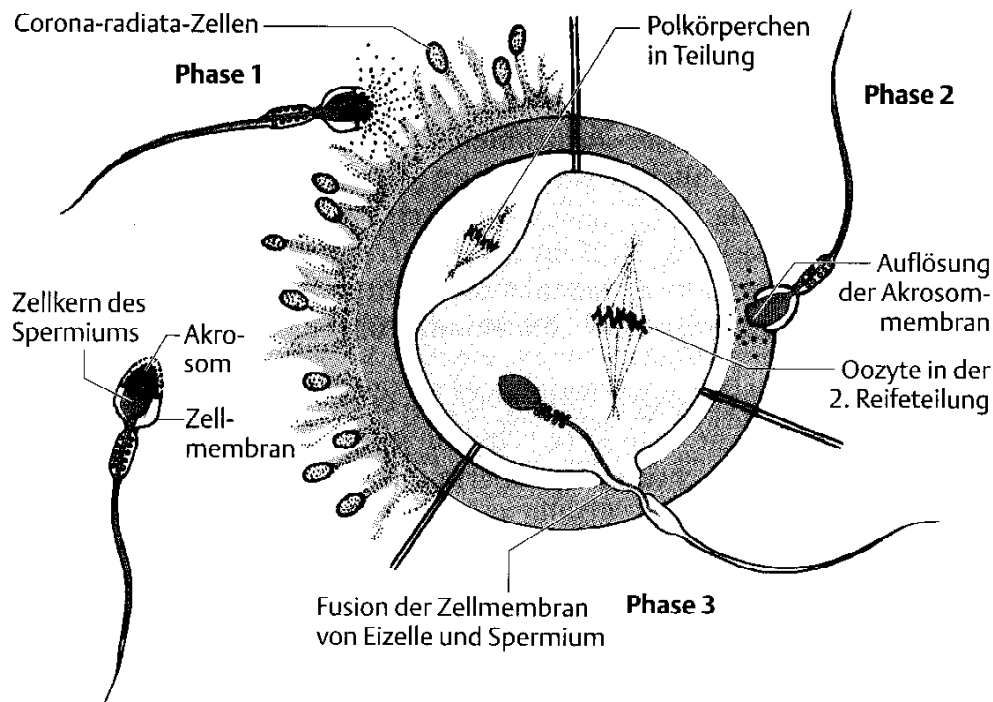


Abb. 1: Schematischer Ablauf der Fertilisation. In Phase I durchdringt das Spermatozoon die Corona radiata. In Phase II dringt es unter Auflösung des Akrosoms in die Zona Pellucida ein. In Phase III fusionieren die Zellmembranen beider Gameten miteinander (Sadler, 1998).

1.2. Das Spermatozoon

1.2.1. Morphologie und Genese

Das Spermatozoon ist die männliche Keimzelle. Es stellt sich als freie und aktiv bewegliche Zelle dar. Aufgebaut ist die Samenzelle aus einem Kopf und einem Schwanz, der weiter in einen Spermatozoenhals, ein Mittel-, Haupt- und Endstück unterteilt werden kann (Pedersen, 1972). Die Verbindung zwischen Kopf und Schwanz des Spermatozoons stellt der Spermatozoenhals dar (Abb. 2).

Für eine Vielzahl von Spezies wurden die morphologischen Gegebenheiten der Samenzelle bisher noch nicht evaluiert. Bei bereits näher charakterisierten Spezies wurde jedoch immer

die Einteilung nach obigem Modell eingehalten. Im Vergleich lassen sich allerdings zahlreiche speziespezifische Merkmale innerhalb einzelner Abschnitte feststellen. Während der Kopf in jedem Modell die Hauptmasse des Spermatozoons einnimmt, unterscheidet er sich hinsichtlich seiner Größe und Form von Spezies zu Spezies (Rüsse & Sinowatz, 1991; Stevens, 1990; Yanagimachi, 1994). Er enthält den Zellkern und das Akrosom, dem bei der Spermatozoenpenetration durch die Zona Pellucida der Eizelle eine wesentliche Bedeutung zukommt. Der Schwanz stellt das aktiv bewegliche Element des Spermatozoons dar. Im gesamten Schwanz ist zentral ein aus Mikrotubuli aufgebautes Axonem lokalisiert. Zusätzlich befindet sich im Mittelstück eine um das Axonem gelegene Mitochondrienscheide, deren Mitochondrien den Energielieferanten ATP bilden (Phillips, 1977). Im folgenden Hauptstück wird das Axonem dann von einer fibrösen Hülle umgeben (Fawcett, 1975; Oke, 1988), die im weiteren Verlauf im Endstück nicht mehr nachweisbar ist.

Die Samenzelle entwickelt sich aus einer Urkeimzelle, der Spermatogonie. Im Laufe dieser Entwicklung, der Spermatogenese, unterzieht sich die Zelle einer Reihe von mitotischen und meiotischen Teilungen. Die Anzahl dieser Zell- und Reifeteilungen ist speziesabhängig. Auch die Dauer der Spermatogenese variiert zwischen verschiedenen Arten (Millar *et al.*, 2000). Beim Menschen geht man von einer Spermatogenesedauer von 64 Tagen, bei Ratten von 50 und bei Mäusen von 35 Tagen aus (Adler, 1996). Im Vergleich dazu dauert die Spermatogenese beim Marmoset-Affen 37 Tage (Millar *et al.*, 2000).

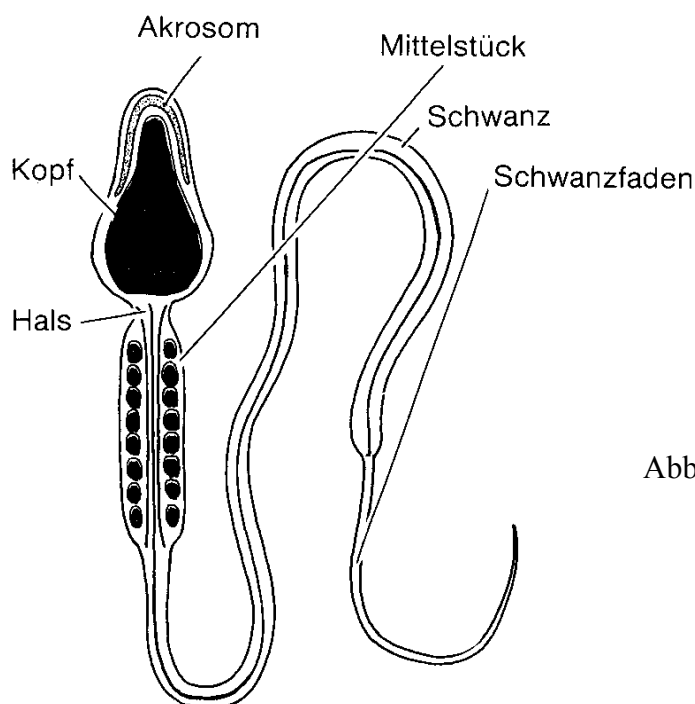


Abb. 2: Darstellung eines humanen Spermatozoons. Der Kopf besteht hauptsächlich aus dem Kern und wird apikal von dem Akrosom überzogen (Moore, 1996).

1.2.2. Funktionelle Aspekte

1.2.2.1. Kapazitation

Als Kapazitation bezeichnet man den Reifungsprozess ejakulierter Spermatozoen. Erst durch diese Reifung sind Samenzellen dazu fähig, an eine Eizelle zu binden und diese zu befruchten (Austin 1951, 1967; Chang 1951, 1955). Neben Energielieferanten wie z.B. Glucose, Laktat oder Pyruvat ist für eine Kapazitation in vitro die Anwesenheit von Albumin bei jeder Spezies obligat, wobei die Kapazitationsdauer je nach Spezies zwischen einigen Minuten und mehreren Stunden variiert (Kanitz, 1994; Yanagimachi 1994; Dalvit *et al.*, 1996).

Die genauen Mechanismen, die sich während der Kapazitation vollziehen, sind bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Diskutiert wird der Einfluss von intrazellulärem Calcium und cAMP (Fraser, 1995). Deren Anstieg innerhalb der Samenzelle soll zu einer Aktivierung verschiedener Proteinkinasen mit folgender Proteinphosphorylierung führen (Leclerc *et al.*, 1996; Breitbart & Naor, 1999; Baldi *et al.*, 2000). Des Weiteren soll es sowohl zu einer Modifizierung der Verteilung von Oberflächenproteinen als auch zu Veränderungen der Plasmamembran des Spermatozoons kommen (Baldi *et al.*, 1996). Da bisher noch kein eindeutiger Marker für einen erfolgreichen Abschluss der Kapazitation existiert, geht man davon aus, dass der Reifungsprozess der Samenzelle vollständig abgelaufen ist, sobald das Spermatozoon die akrosomale Reaktion durchlaufen kann (Morales & Llanos, 1996).

1.2.2.2. Akrosomale Reaktion

Das Akrosom befindet sich im vorderen Bereich des Spermatozoenkopfes und wird von einer inneren und äußeren Membran umschlossen. Es stellt ein Hohlorgan dar, das mit verschiedenen proteolytischen Enzymen gefüllt ist (Eddy & O'Brien, 1994). Diese sind entscheidend für die Penetration durch die Zona Pellucida. Die Freisetzung der diversen Enzyme bezeichnet man als akrosomale Reaktion, die nach Anlagerung des Spermatozoons an die Zona Pellucida ausgelöst wird (Saling *et al.*, 1979). Als physiologische Induktoren gelten Zona Pellucida C-Protein und das von Kumuluszellen sezernierte Progesteron (Patrat, 2000). Als Rezeptor für das ZPC-Protein werden spezieabhängig verschiedene Proteine auf Seiten des Spermatozoons diskutiert. Im Maus-Modell wurden als Adhäsionsproteine für ZPC die β -1,4,-Galakotsyltransferase, das murine Protein p95 und das am Spermatozoenkopf

lokalisierte sp56-Protein detektiert (Snell & White, 1996). Im Vergleich dazu wird beim Menschen ein Mannose-bindendes Protein diskutiert (Sinowatz *et al.*, 1998). Durch die Bindung von Spermatozoon und Eizelle wird eine G-Protein gesteuerte Signaltransduktionskette ausgelöst, die wiederum Calcium-abhängig verschiedene intrazelluläre Proteine, wie z. B. die Adenylcyclase, Proteinkinase, Tyrosinkinase oder auch die Phospholipase aktiviert. Dies führt letztlich zur Exozytose der im Akrosom enthaltenen Enzyme (Abou-Haila & Tulsiani, 2000).

1.3. Die Oozyte

1.3.1. Morphologie und Genese

Die weibliche Keimzelle, die Eizelle, stellt sich als kugelförmige, zytoplasmareiche Zelle dar. Die Größe variiert zum Zeitpunkt der Ovulation bei verschiedenen Säugetierarten. Während die Oozyte beim Rind etwa 120-150µm groß ist (Kanitz, 1994), erreicht die Eizelle der Maus im Durchschnitt nur eine Größe von 80µm (Eppig, 1991). Beim Menschen liegt die Eizellgröße mit 100-120µm dazwischen (Junqueira & Carneiro, 1996) und ist vergleichbar mit der des Weissbüschelaffen, *Callithrix jacchus*, von ca. 90-100µm (Gilchrist, 1996).

Neben Zellkern und zahlreichen Zellorganellen sind im Ooplasma auch die kortikalen Granula lokalisiert. Diese enthalten verschiedene Enzyme, die, wie bereits beschrieben, nach erfolgreicher Fusion von Spermatozoon und Plasmamembran der Eizelle freigesetzt werden und zur Verhärtung der Zona Pellucida führen (Barros & Yanagimachi, 1971).

Umgeben wird die Eizelle von der Zona Pellucida, einer extrazellulären Matrix, die wesentlich an der Befruchtung von Samenzelle und Oozyte beteiligt ist. Des Weiteren wird der Zona Pellucida auch eine maßgebliche Rolle beim Embryotransfer durch die Tube zugesprochen. Bei der Maus konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz spezifischer Antikörper gegen Zona Pellucida-Proteine der Tubentransport gestört war (Kim *et al.*, 2002).

Die Eizelle entwickelt sich aus der Oogonie, der weiblichen Urkeimzelle. Aus ihr entsteht zunächst die primäre Oozyte, die im weiteren Verlauf von Follikelzellen umgeben wird. Durch Zunahme der Anzahl der Follikelzellschichten um die Oozyte entwickeln sich aus Primordialfollikeln letztlich Tertiärfollikel. Bis zur Ovulation hat die primäre Oozyte die erste Reifeteilung beendet. Dadurch entstehen die sekundäre Oozyte und das Polkörperchen. Die sekundäre Oozyte beginnt zum Zeitpunkt der Ovulation mit der zweiten Reifeteilung.

Allerdings verharrt die Meiose in der Metaphase und wird erst nach Fusionierung von Spermatozoon und Eizelle beendet (Moore, 1996). In Abb. 3 ist eine schematische Darstellung einer Eizelle gezeigt.

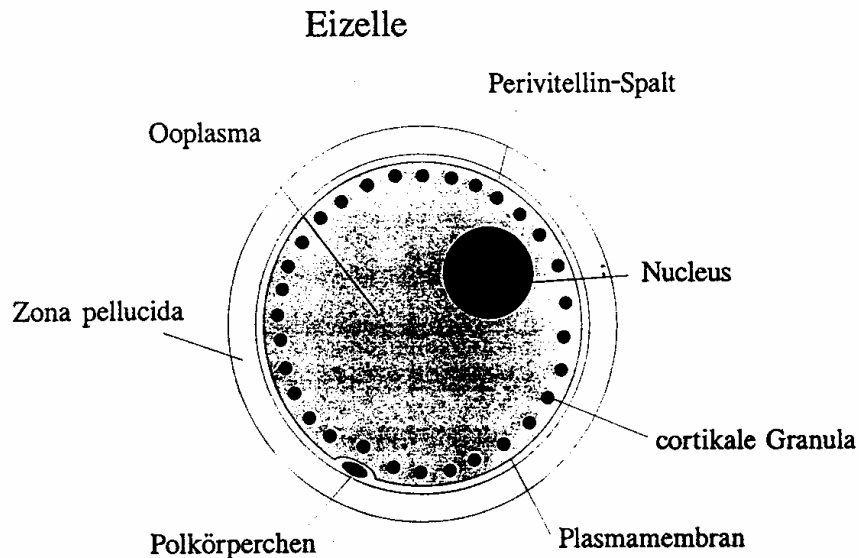


Abb. 3: Schematische Darstellung einer Eizelle (Hägele, 1998)

1.3.2. Zona Pellucida

Die Zona Pellucida ist eine klar durchscheinende Glykoprotein-Hülle. Diese umgibt die Oozyte vollständig und grenzt sie von den umliegenden Follikelzellen ab (Yanagimachi, 1994). Trotz dieser Abgrenzung wird ein Kontakt zwischen den Mikrovilli der Eizelle und Kumulus-Zellausläufern hinsichtlich einer interzellulärer Kommunikation diskutiert (Wassarman & Albertini, 1994). Die Dicke der Zona Pellucida variiert stark. Während man bei der Maus von einer Zonastärke von 5µm ausgeht, sind es beim Schwein 16µm und beim Rind sogar bis zu 27µm (Dunbar, 1983; Dunbar *et al.*, 1991). Im Vergleich dazu ist die Zona des Menschen ungefähr 13-15µm dick (De Vos & Van Steirteghem, 2000) und die des Weissbüschelaffen, als ein Vertreter nicht-menschlicher Primaten, ca. 16µm zum Zeitpunkt der Ovulation (Gilchrist, 1996). In licht- und elektronenmikroskopischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Zona Pellucida einen multilamillären Aufbau hat

(Dunbar *et al.*, 1994). Bereits 1975 konnte am Mausmodell eine Zweischichtung der Zona Pellucida unbefruchteter Eizellen demonstriert werden. Hier wurde gezeigt, dass die murine Extrazellulärmatrix aus einer dickeren inneren und dichteren äusseren Schicht aufgebaut ist (Baranska *et al.*, 1975). Ein bilaminärer Aufbau der Zona Pellucida konnte auch beim Hamster beobachtet werden (Keefe *et al.*, 1997). Im Vergleich dazu erscheint die humane Zona Pellucida nicht fertilisierter Oozyten als poröse mehrschichtige Matrix, bei der die Porengrösse in den äusseren Schichten zunimmt (Nikas *et al.*, 1994). Dies zeigt, dass es sich bei der Zona Pellucida um eine hoch organisierte extrazelluläre Matrix handelt, deren Struktur innerhalb verschiedener Spezies variiert.

Aufgebaut wird die Zona Pellucida je nach Spezies aus drei bis fünf Glykoproteinen. Während beim Rind drei bis fünf verschiedene Zona Pellucida-Proteinklassen diskutiert werden (Bercegeay *et al.*, 1993; Noguchi *et al.*, 1994; Topper *et al.*, 1997), geht man beim Schwein von vier unterschiedlichen Glykoproteinen der Zona Pellucida aus (Hedrick & Wardrip, 1986; Hasegawa *et al.*, 1991). Dagegen haben Maus und Mensch nur drei Glykoproteine (Bleil & Wassarman, 1980b; Bercegeay *et al.*, 1995). Ebenso stellt es sich für den Weissbüschelaffen, *Callithrix jacchus*, (EMBL-Datenbank Acc. Nr. Y10822, Y10767, S71825) dar. Bei den Altweltaffen wurden bei zwei Familien bislang auch drei Zona Pellucida-Proteine identifiziert, zum einen beim indischen Hutaffen (Bonnet monkey/*Macaca radiata*), zum anderen beim Langschwanzmakaken, *Cynomolgus monkey/Macaca fascicularis* (Jethanandani *et al.*, 1998; Kolluri *et al.*, 1995, Gupta *et al.*, 1997a; Paterson *et al.*, 1996).

Die Zona Pellucida der Maus wurde bisher am besten untersucht. Ihre Glykoproteine wurden Zona Pellucida A-Protein (ZPA), Zona Pellucida B-Protein (ZPB) und Zona Pellucida C-Protein (ZPC) genannt (Yanagimachi, 1994). Die Benennung der Proteine richtete sich nach der Länge der mRNA-Transkripte der jeweiligen Protein-kodierenden cDNA (Harris *et al.*, 1994). Die Proteine liegen innerhalb der Zona Pellucida in einer klar strukturierten Form vor (Abb.4). Es wird angenommen, dass sich aus wiederholenden Dimeren, bestehend aus Zona Pellucida A- und Zona Pellucida C-Protein, Filamente bilden, die ihrerseits durch homodimere Zona Pellucida B-Moleküle miteinander verknüpft sind (Green, 1997).

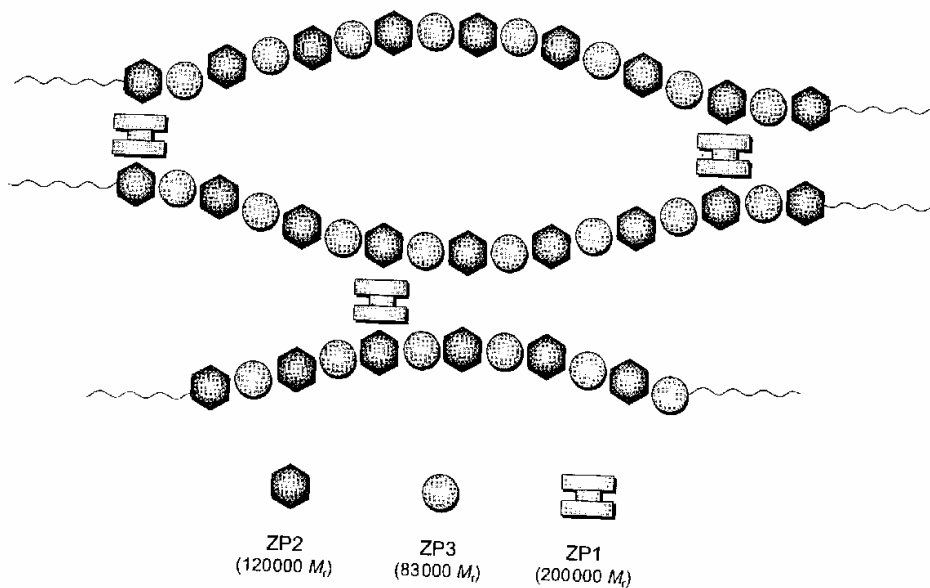


Abb. 4: Schematische Darstellung des Aufbaus der Zona Pellucida nach Wassarman (Green, 1997)

1.3.2.1. Zona Pellucida B-Protein (ZPB)

Das Zona Pellucida B-Protein liegt innerhalb der Zona Pellucida als ein über Disulfidbrücken verknüpftes Homodimer vor. Bleil & Wassarman (1980a) identifizierten das Molekulargewicht eines Monomers des Zona Pellucida B-Proteins der Maus mit 130kDa. Das Zona Pellucida B-Monomer der humanen Zona Pellucida besitzt unter reduzierten Bedingungen eine Molekularmasse von 90-110kDa (Shabanowitz & O’Rand, 1988). In ersten Untersuchungen wurde ihm eine formende und stabilisierende Funktion der Zona Pellucida zugeschrieben (Greve & Wassarman, 1985). Neuere Untersuchungen von Rankin *et al.* (1999) haben gezeigt, dass die murine Zona Pellucida auch nur durch ZPA und ZPC gebildet werden kann, ohne ZPB-Protein als Bestandteil. Morphologisch resultiert aus dieser Komposition allerdings eine stark veränderte extrazelluläre Matrix der Eizelle. Die Zona Pellucida ist dünner und weist eine grössere Fenestrierung auf. Zudem kommt es teilweise zur atypischen Depositon von Granulosa-Zellen zwischen Oolemm und Zona Pellucida. Dagegen scheint Zona Pellucida B-Protein in anderen Spezies auch funktionelle Bedeutung während der Spermatozoen-Eizell-Interaktion zu haben. Beim indischen Hutaffen, *Macaca radiata*, konnte

die Bindung von rekombinantem ZPB sowohl an kapazitierte als auch an akrosom reagierte Spermatozoen nachgewiesen werden, was schlussfolgernd ZPB-Protein als möglichen „Spermatozoenrezeptor“ präsentiert (Govind *et al.*, 2001; Gahlay *et al.*, 2002).

Das murine ZPB-Protein besteht aus 623 Aminosäuren (Epifano *et al.*, 1995). Dagegen liegt die Proteingröße verschiedener Primaten im Bereich von ca. 540 Aminosäuren. Beim Menschen sind es 540 Aminosäuren, beim Marmoset-Affe 541 Aminosäuren und beim indischen Hutaffen liegt die Proteingröße bei 539 Aminosäuren (Harris *et al.*, 1994; Kerr *et al.*, 1996; Gupta *et al.*, 1997a). Es konnte gezeigt werden, dass eine hohe Homologie zwischen den Aminosäuresequenzen des humanen Zona Pellucida B-Proteins und den beiden Affenarten vorhanden ist. Beim Marmoset-Affen wurde eine Identität der Aminosäuresequenzen von 88%, beim indischen Hutaffen von 92% gefunden.

1.3.2.2. Zona Pellucida A-Protein (ZPA)

Die cDNA-Sequenzen des ZPA-Gens von Maus und Mensch sind bekannt (Liang *et al.*, 1990; Liang & Dean, 1993), ebenso die verschiedener anderer Spezies (Harris *et al.*, 1994).

Auch beim indischen Hutaffen, *Macaca radiata*, wurde die cDNA Sequenz des Zona Pellucida A-Gens ermittelt. Die daraus resultierende Proteingröße von 745 Aminosäuren wurde mit der humanen Aminosäuresequenz von ebenfalls 745 Aminosäuren verglichen (Liang & Dean, 1993). Dieser Vergleich zeigte eine Identität von 94% der beiden Aminosäuresequenzen (Jethanandani *et al.*, 1998). Innerhalb der nicht-humanen Primaten wurde die Zona Pellucida A-Nukleotidsequenz auch beim Marmoset-Affen, *Callithrix jacchus*, identifiziert (EMBL-Datenbank Accession Nr. Y10767). Daraus leitet sich eine Proteingröße von 747 Aminosäuren ab (NCBI-Datenbank Accession Nr. CAA71740).

Bei genetisch veränderten Mäusen ohne Zona Pellucida A-Protein (Knockout-Mäuse/homozygote ZPA-Null Mäuse) wurde eine gestörte Follikulogenese und Fertilität beobachtet. Rankin *et al.* (2001) zeigten, dass bei fehlendem ZPA eine abnorme, sehr dünne Zona Pellucida in Follikeln früher Entwicklungsstadien aufgebaut wird, die allerdings in antralen Follikeln nicht mehr nachweisbar ist. Ausserdem kam es nach der Paarung von weiblichen, homozygoten ZPA-Null-Mäusen zu keiner Entwicklung von Embryonen im Zweizellstadium. Funktionell bezeichnet man das Zona Pellucida A-Protein als „sekundären Spermatozoenrezeptor“ (Bleil *et al.*, 1988). Es wurde gezeigt, dass ZPA bevorzugt an die innere akrosomale Membran bindet, die nach erfolgreicher akrosomaler Reaktion zugänglich

wird (Mortillo & Wassarman, 1991). Dies konnte auch durch den Einsatz von rekombinantem Zona Pellucida A-Protein beim Menschen gezeigt werden (Tsubamoto *et al.*, 1999). Als ein möglicher Ligand des Zona Pellucida A-Proteins wird auf Spermatozoenseite die Trypsin-ähnliche Protease Akrosin/Proakrosin angesehen (Howes *et al.*, 2001; Howes & Jones, 2002), deren Konversion von Proakrosin zu Akrosin durch den Kontakt von Spermatozoon und Zona Pellucida ausgelöst wird (Töpfer-Petersen & Cechova, 1990). Allerdings konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass Spermatozoen aus genetisch veränderten Mäusen mit gezielten Mutationen im Akrosin-kodierenden Gen murine Oozyte penetrieren und befruchten können (Adham *et al.*, 1997; Baba *et al.*, 1994). Diese Beobachtung führte zur Diskussion weiterer Liganden für das Zona Pellucida A-Protein. Beim Langschwanz-Makaken (*Macaca fascicularis*) wurde das Protein PH-20 identifiziert, das für die sekundäre Spermatozoenbindung verantwortlich zu sein scheint. Dies wurde durch den Einsatz von Anti-PH-20-Antikörper gezeigt (Yudin *et al.*, 1999). PH-20 ist ein Testis-spezifisches Protein, das sowohl in der Plasmamembran als auch nach erfolgter Akrosomreaktion in der inneren akrosomalen Membran lokalisiert wurde (Overstreet *et al.*, 1995; Myles & Primakoff, 1984). Eine weitere wichtige Funktion des Zona Pellucida A-Proteins ist die Beteiligung am Polyspermieblock. Im Mausmodell wird nach dem Eindringen eines Spermatozoons unter anderem die kortikale Degranulation mit Freisetzung verschiedenster Enzyme ausgelöst. ZPA_f, das durch die Freisetzung von Proteasen biochemisch modifizierte ZPA-Molekül (Moller & Wassarman, 1989), besitzt nur noch eine Molekularmasse von 90kDa im Gegensatz zu 120kDa des ursprünglichen Zona Pellucida A-Proteins (Bleil *et al.*, 1981). Sind mehr als 16% aller ZPA-Moleküle proteolytisch verändert, verhärtet sich die Zona Pellucida und wird durch dieses „Hardening“ undurchdringbar für Spermatozoen (Sato, 1979). Die Umwandlung von ZPA zu ZPA_f kann durch Fetuin in fetalem Kälberserum gehemmt werden (Downs *et al.*, 1986; Schroeder *et al.*, 1990). Diese Hemmung des „Zona Hardenings“ durch Fetuin konnte auch bei anderen Spezies, wie z.B. dem Pferd nachgewiesen werden (Dell'Aquila *et al.*, 1999).

1.3.2.3. Zona Pellucida C-Protein (ZPC)

Die cDNA-Sequenz des ZPC-Protein kodierenden Gens vieler Spezies ist bekannt. Die daraus resultierenden Aminosäuresequenzen weisen eine Identität von 63-84% auf (Harris *et al.*, 1994). Der direkte Vergleich des humanen und murinen Proteins, das in beiden Spezies aus

424 Aminosäuren aufgebaut ist, weist eine Übereinstimmung von 67% auf (Chamberlin & Dean, 1990). Wie auch bereits das ZPA-Protein, wurde beim Weissbüschelaffen sowie beim indischen Hutaffen auch das Zona Pellucida C-Protein identifiziert. Thillai-Koothan *et al.* (1993) zeigten, dass das ZPC-Protein beim Marmoset-Affen aus 424 Aminosäuren besteht und zu 91% identisch ist zur humanen Aminosäuresequenz. Zudem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass das Zona Pellucida C-Protein ausschliesslich in der Oozyte des Weissbüschelaffen synthetisiert wird. Beim indischen Hutaffen stellte sich ZPC ebenfalls als ein aus 424 Aminosäuren aufgebautes Glykoprotein dar. Der Sequenzvergleich zwischen Mensch und indischem Hutaffen ergab eine Homologie von 94% (Kollurie *et al.*, 1995).

Bei genetisch mutierten Mäusen, die kein Zona Pellucida C-Protein bilden, war keine Zona Pellucida um die Eizelle nachweisbar; diese homozygoten Tiere waren unfruchtbar (Rankin *et al.*, 1996).

Während der Spermatozoen-Eizell-Interaktion fungiert Zona Pellucida C-Protein als primärer Spermatozoenrezeptor (Saling, 1989; Yanagimachi, 1994). Bleil & Wassarman demonstrierten schon 1980, dass murine Spermatozoen nach Inkubation mit biochemisch isoliertem Zona Pellucida C-Protein an der Zona Pellucida-Bindung gehindert werden. Allerdings zeigten neueste Untersuchungen von Rankin *et al.* (1998), dass ZPC nicht alleine für die primäre Bindung verantwortlich sein kann. Wurde nämlich bei der Maus murines ZPC durch humanes Zona Pellucida C-Protein ersetzt, banden ausschliesslich weiterhin murine Spermatozoen an die Zona Pellucida der Maus-Eizellen.

Für die Bindungsaktivität von ZPC scheinen O-gebundene Serin/Threonin-ähnliche Oligosaccharide verantwortlich zu sein (Litscher *et al.*, 1995; Wassarman, 1992). Diese Annahme wird zudem durch Ergebnisse gestützt, die zeigten, dass es zu keiner Beeinflussung der Spermatozoenbindungsfähigkeit nach Einsatz eines monoklonalen Antikörpers gegen die Polypeptidkette des ZPC-Moleküls kam (Florman *et al.*, 1984; Florman *et al.*, 1985). Als Rezeptor auf Seite des Spermatozoons werden je nach Spezies verschiedene Proteine diskutiert, wie z.B. Galactosyltransferase oder sp56 bei der Maus; Mannose-bindendes Lectin beim Menschen und eine Gruppe von Polypeptiden mit einem Molekulargewicht von 12-16kDa, die Spermadhesine, die bei verschiedenen Spezies gefunden wurden (Sinowatz *et al.*, 1998).

Eine zweite Funktion des Zona Pellucida C-Proteins besteht in der Induktion der akrosomalen Reaktion gebundener Spermatozoen (Bleil & Wassarman, 1983; Saling, 1989). Voraussetzung dafür ist eine intakte Polypeptidkette des ZPC-Moleküls (Florman *et al.*, 1984), was durch Untersuchungen von Leyton & Saling (1989) bestätigt wurde. Dabei waren

proteolytisch hergestellte ZPC-Fragmente nach ihrer Bindung an die Spermatozoenplasmamembran erst dann in der Lage die akrosomale Reaktion auszulösen, wenn sie wieder miteinander verknüpft wurden. Das ZPC- Protein verfügt über zwei getrennte Bindungsstellen, eine für die primäre Spermatozoenbindung, die zweite für die Auslösung der akrosomalen Reaktion (Kopf & Gerton, 1991). Aufgrund dessen wird angenommen, dass auf Spermatozoenseite Proteine als ZPC-Ligand zur Induktion der akrosomalen Reaktion fungieren. Diskutiert wird hierfür ein 95kDa schweres Protein mit Tyrosinkinase-Aktivität, das die akrosomale Reaktion triggert und als Zona Rezeptor Kinase bezeichnet wird (Leyton & Saling, 1989; Duncan & Fraser, 1993; Burks *et al.*, 1995; Saling *et al.*, 1995).

1.3.2.4. Synthese der Zona Pellucida-Proteine

Der Syntheseort der Zona Pellucida-Proteine wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Viele Untersuchungen beschäftigten sich bereits mit der Identifizierung des Syntheseortes der Zona Pellucida-Proteine. Dabei wurde gezeigt, dass die Synthese der ZP-Proteine speziesspezifisch entweder in der Eizelle, den Granulosazellen oder auch in beiden Zellarten stattfindet.

Schon zu Beginn der 90er Jahre konnte festgestellt werden, dass beim Kaninchen das 55-kDa Zona Pellucida-Protein, das Pendant zum murinen ZPB-Protein, sowohl in der Oozyte als auch in Granulosazellen exprimiert wird (Lee & Dunbar, 1993). Auch bei verschiedenen anderen Spezies wurde die Beteiligung der Granulosazellen an der Synthese einzelner Zona Pellucida-Proteine demonstriert. Bei diversen Vogelspezies, wie dem Huhn und der Wachtel wurde die Expression eines Proteins vergleichbar mit dem ZPC-Protein ausschließlich in den Granulosazellen beschrieben (Waclawek *et al.*, 1998; Takeuchi *et al.*, 1999; Sasanami *et al.*, 2002). Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe von Kölle in unterschiedlichen Untersuchungen zeigen, dass mRNA sowohl von bovinem ZPC als auch von porcinem ZPB in Eizellen und Granulosazellen lokalisiert ist (Kölle *et al.*, 1996; Kölle *et al.*, 1998). Eine exklusive Expression aller drei Zona Pellucida Gene in der Eizelle konnte bisher bei der Maus nachgewiesen werden (Epifano *et al.*, 1995). Diese Ergebnisse konnten in neueren Untersuchungen von El-Mestrah *et al.* (2002) bestätigt werden.

Bei verschiedenen Primaten ist bezüglich des Syntheseortes der Zona Pellucida-Proteine noch nicht viel bekannt. Für den Langschwanzmakaken (*Macaca fascicularis*) wird eine Mitbeteiligung der Granulosazellen bei der Proteinsynthese diskutiert. Dabei konnte nur die mRNA von ZPA- und ZPC-Protein in den Granulosazellen lokalisiert werden, während die

ZPB-kodierende mRNA nur in Eizellen zu identifizieren war (Martinez *et al.*, 1996). Für den Marmoset-Affen konnte dagegen bisher nur für ein Zona Pellucida-Protein der *de-novo*-Syntheseort detektiert werden. Thillai-Koothan *et al.* (1993) demonstrierten für das ZPC-Protein die Neubildung ausschliesslich in der Eizelle. Für die anderen beiden Zona Pellucida-Proteine ist die Expression der kodierenden Gene noch nicht identifiziert.

1.4. Das Tiermodell

Der Weissbüschel-/Marmoset-Affe, *Callithrix jacchus*, gehört zur Familie der Callitrichiden (Krallenaffen), einer Unterordnung der Neuwelt- oder Breitsnasenaffen (Platyrrhini) (Abb.5). Auffällig an den Marmoset-Affen sind ihre abstehenden weissen Ohrbüschel, die auch namensgebend für die deutsche Bezeichnung waren. Des Weiteren zeichnen sie sich durch einen weissen Stirnfleck aus. Das Fell ist graubraun mit heller Querbänderung, die besonders stark am Schwanz ausgeprägt ist. Im Durchschnitt erreichen die Tiere eine Körpergrösse von ungefähr 20 cm bei einem Gewicht von ca. 300-360 g. Aufgrund dessen zählen sie zu den kleineren Vertretern der Krallenaffen.

Der natürliche Lebensraum der Weissbüschelaffen sind die Regenwälder an der Nordostküste Brasiliens. Sie leben in Gruppen von 2-13 Mitgliedern in 1-5 Hektar umfassenden Revieren. Sie sind tagaktiv und ernähren sich hauptsächlich von Baumsäften, Früchten, Blüten, Insekten und kleinen Wirbeltieren (Wolters & Immelmann, 1988).

Die Geschlechtsreife erlangen die Tiere in einem Alter von 18-20 Monaten (Abbott & Hearn, 1978). Der ovarielle Zyklus der Weibchen von 28 Tagen entspricht in etwa dem der Frau. Aufgrund der Ähnlichkeit zum Menschen, ihrer hohen Fortpflanzungsrate und der relativ einfachen Haltung der Tiere wird der Marmoset-Affe in der biomedizinischen Forschung gerne als Modell für den Menschen herangezogen.



Abb. 5: *Callithrix jacchus*, Weissbüschel-/Marmoset-Affe

1.5. Ziele der Arbeit

Die Zona Pellucida nimmt eine entscheidende Rolle bei der Spermatozoen-Eizell-Interaktion ein. Deshalb ist es von großem Interesse, Zona Pellucida Proteine im Gewebe des Ovars zu lokalisieren und deren funktionelle Bedeutung zu analysieren.

Ziel dieser Untersuchungen war die Lokalisation von Zona Pellucida Proteinen, deren Expression und funktionelle Bedeutung von Zona pellucida A-Protein bei der Spermatozoen-Zona Pellucida Interaktion. Um einen stärkeren Bezug zu humanen Bedingungen herstellen zu können, wurden die Untersuchungen am Primaten durchgeführt. Als Modell diente dabei der Marmoset-Affe, *Callithrix jacchus*.

In vorangegangenen Arbeiten wurde eine Palette von Antikörpern gegen synthetische Peptide von ZPB-, ZPA- und ZPC-Proteinen hergestellt. Mit Antikörpern, die hochkonservierte ZPB-, ZPA- und ZPC-Epitope detektieren, sollten die Zona Pellucida Proteine im Ovar des Marmoset-Affen mittels immunhistochemischer und immun-elektronenmikroskopischer Versuche identifiziert und lokalisiert werden. Im Hemizona-Antikörper-Bindungstest (HABA) sollte überprüft werden, ob Antikörper gegen synthetische Peptide auch native Zona Pellucida Proteine des Weissbüschelaffen als Antigen erkennen und somit für funktionelle *in vitro* Studien eingesetzt werden konnten.

Ein weiteres Ziel war es, den Syntheseort der Zona Pellucida Proteine mit Hilfe der RT-PCR zu bestimmen. Zum Nachweis der Expression von ZP-Proteinen sollte die mRNA aus Ei- und Follikelzellen verschiedener Follikelgrößen isoliert und die cDNA durch die reverse Transkriptasereaktion generiert werden, um dann mit geeigneten Primerpaaren für jedes Glykoprotein der Zona Pellucida entsprechende cDNA-Fragmente zu amplifizieren und darzustellen. Mit diesen Experimenten war geplant, die Genexpression der Zona Pellucida Proteine im Hinblick auf Syntheseort und Follikelstadium zu überprüfen.

Um die funktionelle Bedeutung eines bestimmten, hochkonservierten ZPA Epitopes zu ermitteln, war es ein Teilziel, den Kompetitions-Hemizona-Assay erstmals im Marmoset-Modell zu etablieren und anzuwenden. Evaluiert werden sollte mit diesem Instrument die Bindungsfähigkeit von Spermatozoen an die Zona Pellucida nach Inkubation der Hemizonae mit den Anti-ZPA-Antikörpern. Dadurch sollte eine Beurteilung der biologischen Relevanz der untersuchten Proteindomäne in Bezug auf die Fertilisation ermöglicht werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg:

Homo Oligomeric DNA d(T)

AMS GmbH, Wiesbaden:

Ambion[®] RNA later

Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA:

Beaver[®] Micro-Blade, angled 45°

Falcon[®] org. Kulturgewebsschalen mit Zentrumsvertiefung, 60x15mm

Falcon[®] Zentrifugenröhrchen 15ml; 50ml

Petrischalen 60x15mm, 100x20mm

Bio Cell, Cardiff, UK:

Immunogold konjugiertes Streptavidin, 20nm

Bio Rad, München:

100 bp Marker, Molecular Ruler

Peroxidase-konjugiertes Avidin

Biochrom KG, Berlin:

Fötale Bovines Serum

PBS Dulbeccos (1x)

Biomedica Corp., Foster City, CA:

Crystal Mount

Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf:

PCR Softtubes 0,5ml

Braun, Melsungen:

Einmalspritzen 2ml; 5ml; 10ml; 20ml

Physiologische Kochsalzlösung

DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg:

Anti-Rabbit-Immunglobuline

Peroxidase-Anti-Peroxidase-Immunkomplex, Kaninchen

Eppendorf, Hamburg:

PCR-Tubes 0,2ml

Pipettenspitzen 10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l

GeneCraft, Münster:

100mM dNTPs

GibcoBRL, Karlsruhe:

Agarose ultra Pure

RNaseOUT

L-15 Leibovitz-Medium

Glaswerk Wertheim, Wertheim:

Küvetten

Hecht, Kiel-Hassee:

Corbit-Balsam

Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenrot:

Pasteurpipetten aus Plastik, 3ml

Kalensee, Giessen:

Zählkammer nach Neubauer

Kontes, New Jersey, USA:

Glashomogenisator (4ml) mit Teflon-Pistill

London Resin Company Ltd, Berkshire, England, UK:

LR-White Acrylic Resin

Lucerne, Oakland, CA, USA:

Fettfreies Milchpulver

Menzel-Gläser, Braunschweig:

Deckgläser

Objektträger

Merck, Darmstadt:

Cacodylsäure Natriumsalz-Trihydrat

Calciumchlorid

di-Natriumhydrogenphosphat

EDTA (Titrplex III)

Essigsäure

Isopropanol

Kaliumchlorid

Kaliumdihydrogenphosphat

Magnesiumchlorid-Hexahydrat

Natriumacetat

Natriumbicarbonat

Natriumphosphat-Dihydrat

Paraformaldehyd

Phenolrot

Pikrinsäure

Uranylacetat-Dihydrat

Wasserstoff-Peroxid

Xylol

Natutec, Frankfurt:

CPG[®] MPG Guanidine Direct mRNA Purification Kit

Pan-Biotech, Aidenbach:

Panscript DNA Polymerase

PFM Produkte für Medizin AG, Köln:

Feather[®] Einmalskalpell

Pitman-Moore, Burgwedel:

Estrumate

Polaroid GmbH, Offenbach:

Polaroid Sofortbildfilm Typ 667

Qiagen, Hilden:

Omniscript RT-Kit

Riedel-de-Häen, Seelze:

Ethanol

Methanol

Trichlormethan

Roth, Karlsruhe:

Blaubrand[®] Einmal-Mikropipette mit Ringmarke

Diagnostika Objektträger mit 8 Kammern (Spotslides)

Ethidiumbromid

Glycin

Natriumchlorid

Tris-Base

Sarstedt, Nümbrecht:

Reaktionsgefäße 1,5ml; 2,0ml

Serva, Heidelberg:

Glucose

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen:

Biotinylierte Anti-Rabbit-Ig

Biotinylierte Anti-Rabbit-IgG

Borsäure

Bromphenolblau

DAB (3,3'-Diaminobenzidin)

Gentamycinsulfat

Glutaraldehyd

Hepes

Mayers saures Hämalaun

Mineralöl

Natrium-Hepes

Natriumlaktat

Natriumpyruvat

Poly-L-Lysin-Lösung

Polyvinylpyrolidon (PVP)

Rinderserumalbumin Fraktion V (BSA)

Ziegenserum

Terumo, Leuven, Belgien:

Einmalkanülen, Nr. 17, 0,55x25

Vogel, Giessen:

Paraffin

2.1.2. Medien und Lösungen

Cacodylat-Puffer:

4,28 g Cacodylsäure-Natriumsalz
100 ml Aqua dest
pH 7,4 mit NaOH

Folikeldissektionsmedium:

Leibovitz L-15 Medium
5% (v/v) FBS
0,5mM Natrium-Pyruvat
5% (v/v) Gentamycinsulfat
pH 7,4

Folikelpunktionsmedium:

Leibovitz L-15 Medium
10% (v/v) FBS
0,5mM Natrium-Pyruvat
5% (v/v) Gentamycinsulfat
pH 7,4

Hyperosmolare Salzlösung:

1,5M Magnesiumchlorid-Hexahydrat
0,1% (w/v) Polyvinylpyrolidon (PVP)
40mM Natrium-Hepes
pH 7,4

Immunfixanz:

0,1 % Glutardialdehyd
4,0 % Paraformaldehyd
ad 0,1 M Cacodylatpuffer

L-15 Leibovitz-Medium

6xProbenpuffer für PCR-Agarosegellauf (Loading buffer):

0,25% (w/v) Bromphenolblau

40% (w/v) Sucrose in A.dest

Methacarn-Lösung:

60% (v/v) Methanol

30% (v/v) Trichlormethan

10% (v/v) Essigsäure 100%

PBS (Phosphate-buffered-saline):

120mM Natriumchlorid

4mM Kaliumdihydrogenphosphat

10mM di-Natriumhydrogenphosphat

pH 7,4

Talp-Hepes-Medium-Stocklösung:

127mM Natriumchlorid

3,16mM Kaliumchlorid

2,0mM Natriumbicarbonat

0,35mM Natrium-Phosphat-Dihydrat

10,0mM Natrium-Laktat (60% Syrup)

0,5mM Magnesiumchlorid-Hexahydrat

5,0mM Hepes-Natriumsalz

5,0mM Hepes

5,0mM Glucose

0,01 mg/ml Phenolrot

Osmolarität: 290±5 mosm

Zusatz vor Gebrauch: 0,3% (w/v) BSA

0,25mM Natriumpyruvat

pH 7,3

Talp-Medium-Stocklösung:

114mM Natriumchlorid
3,16mM Kaliumchlorid
25,0mM Natriumbicarbonat
0,4mM Natrium-Phosphat-Dihydrat
10,0mM Natrium-Laktat (60% Syrup)
0,5mM Magnesiumchlorid-Hexahydrat
5,0mM Glucose
0,01mg/ml Phenolrot
Osmolarität: 290±mosm
Zusatz vor Gebrauch: 0,3% (w/v) BSA
25mM Natriumpyruvat

TBS (Tris-buffered-saline):

25mM Tris-Base
150mM Natriumchlorid
pH 7,4

5xTBE (Tris-borate/EDTA electrophoresis buffer):

0,45M Tris-Borat
0,01M EDTA
pH 8,0

2.1.3. Verwendete Kits

CPG[®] MPG Guanidine Direct mRNA Purification Kit, Natutec

MPG Streptavidin: 10mg, gelöst in PBS, pH: 7,5, 0,1% BSA, 0,02% NaN₃

G1-Lösung: 1M KCl, pH: 8,0

G2-Lösung: 2M NaCl, pH: 8,0

G3-Lösung: 4M Guanidine Thiocyanat, 100mM Tris-HCl; pH: 7,2

G4-Lösung: 100mM Tris-HCl, pH: 7,2, 400mM LiCl, 20mM EDTA,
0,5% Lauroylsarcosinat

G5-Lösung: 10mM Tris-HCl, pH: 8,0, 150mM LiCl, 1mM EDTA,
0,1% Lauroylsarcosinat

G6-Lösung: 2mM EDTA, pH: 8,0

G7-Lösung: β -Mercaptoethanol

Omniscript RT-Kit, Qiagen

Omniscript Reverse Tanskriptase 4 Units/ μ l

RT-Puffer 10x

5mM dNTP-Mix

RNase freies Wasser

PanScript DNA Polymerase, Pan-Biotech

Native Taq DNA Polymerase 5 Units/ μ l

10x NH₄-Puffer: 160mM (NH₄)₂SO₄; 500mM Tris-HCl pH 8,8;
0,1% Tween 20

50mM MgCl₂

2.1.4. Ausgewählte Anti-ZP-Antikörper

Entsprechend den Aminosäuresequenzen potentiell immunogener Domänen des Zona Pellucida B-, Zona Pellucida A- und Zona Pellucida C-Proteins wurden in vorangegangenen Arbeiten synthetische Peptide hergestellt (Hägele *et al.*, 1998; Hinsch *et al.*, 1998b, Bogner *et al.*, 2004). Sie dienten als Antigene zur Herstellung von Kaninchen-Antiseren. Die bereits näher charakterisierten polyklonalen Antiseren, sowie der gegen ein ZPA-Peptid gerichtete

monoklonale Antikörper wurden für diese Untersuchungen zur Verfügung gestellt (Hinsch *et al.*, 1998a; Hinsch *et al.*, 2003) .

Für die Herstellung eines synthetischen ZPB-Peptides wurde folgende Aminosäuresequenz gewählt: Gly-Pro-Leu-Thr-Leu-Glu-Leu-Gln-Ile-Ala-Lys-Asp-Lys (Position 313-325 der humanen ZPB-Sequenz, NCBI-Datenbank Acc.-Nr. Q12836)

Gegen die ausgewählte ZPB-Peptid-Sequenz konnten keine ZPB-Antikörper gewonnen werden, die ZPB-Protein erkennen. Aufgründessen wird im Folgenden auf diese Ausführungen verzichtet.

Ausgehend von der Aminosäuresequenz des ZPA-Proteins wurden die Peptide ZPA-1 und ZPA-4 synthetisiert.

Peptid ZPA-1 hat eine homologe Aminosäuresequenz in Mensch, Maus und Marmoset (Tab. 1). Das polyklonale Antiserum, das gegen das Peptid ZPA-1 gerichtet ist, wird als AS ZPA-20 bezeichnet. Zudem stellte die Sequenz des Peptides ZPA-1 die Grundlage zur Herstellung des monoklonalen Antikörpers mAb ZPA-20 dar.

Tab. 1: ZPA-Aminosäureteilsequenzen, homologes Peptid ZPA-1

<i>Spezies</i>	<i>Aminosäureteilsequenz</i>															<i>Position</i>
Mensch	Asp	Pro	Asn	Ile	Lys	Leu	Val	Leu	Asp	Asp	Cys	Trp	Ala	Thr	Ser	535-549
Marmoset	Asp	Pro	Asn	Ile	Lys	Leu	Val	Leu	Asp	Asp	Cys	Trp	Ala	Thr	Ser	534-548
Maus	Asp	Pro	Asn	Ile	Lys	Leu	Val	Leu	Asp	Asp	Cys	Trp	Ala	Thr	Ser	528-542

Dargestellt sind aus der cDNA des ZPA-Proteins verschiedener Spezies abgeleitete homologe Aminosäureteilsequenzen (NCBI-Datenbank Acc.-Nr. NP_003451, CAA71740, NP_035905).

Peptid ZPA-4 hat eine humanspezifische Aminosäuresequenz und weist größere Abweichungen in der Sequenzabfolge nichtmenschlicher Spezies auf (Tab. 2). Das Antiserum AS ZPA-26 ist gegen dieses Peptid gerichtet.

Tab. 2: ZPA-Aminosäureteilsequenz, humanspezifisches Peptid ZPA-4

<i>Spezies</i>	<i>Aminosäureteilsequenz</i>													<i>Position</i>
Mensch	Ser	Tyr	Pro	Asp	Asn	Ser	Tyr	Gln	Gln	Pro	Tyr	Gly	Glu	499-511
Marmoset	Ser	Tyr	Pro	<i>Gly</i>	Asn	Ser	Tyr	Gln	Gln	Pro	Tyr	<i>Glu</i>	<i>Asn</i>	498-510
Maus	<i>Thr</i>	Tyr	Pro	Asp	<i>Gln</i>	Ser	Tyr	Gln	<i>Arg</i>	Pro	Tyr	<i>Arg</i>	<i>Lys</i>	492-504

Dargestellt sind speziesspezifische Aminosäureteilsequenzen des ZPA-Proteins verschiedener Spezies. Fett und kursiv gedruckte Aminosäuren stellen die von der humanen Sequenz abweichenden Aminosäuren dar (NCBI-Datenbank Acc.-Nr. NP_003451, CAA71740, NP_035905)

Vorlage für die Herstellung des synthetischen Peptides ZPC-6 war eine Domäne des humanen Zona Pellucida C-Proteins. Die ausgesuchte Aminosäureteilsequenz stellt einen homologen Bereich dar, der sich über viele verschiedene Spezies, wie Maus, Marmoset, Kaninchen und Rind erstreckt (Tab. 3). Das gegen das Peptid ZPC-6 generierte Kaninchen-Antiserum wird als AS ZPC-6 bezeichnet.

Tab. 3: ZPC-Aminosäureteilsequenzen, Peptid ZPC-6

<i>Spezies</i>	<i>Aminosäureteilsequenz</i>											<i>Position</i>
Mensch	Asp	Val	Thr	Val	Gly	Pro	Leu	Ile	Phe	Leu		359-368
Marmoset	Asp	Val	Thr	Val	Gly	Pro	Leu	Ile	Phe	Leu		359-368
Maus	Asp	Val	Thr	Val	Gly	Pro	Leu	Ile	Phe	Leu		360-369

Homologer Aminosäuresequenzbereich (Peptid ZPC-6), abgeleitet aus der cDNA-Sequenz verschiedener Säugetierspezies (NCBI-Datenbank Acc.-Nr. AAA61336, AAB31866, NP_035906).

2.1.5. Geräte

Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz: Vortex Genie 2 TM

Bio Rad, München: Power Pac 200

Heraeus, Hanau: Begasungsbrutschrank

Biofuge fresco

Hettich GmbH & Co. KG: Hettich Universal 30F, Zentrifuge

Janke & Kunkel Labortechnik, Staufen: IKA-Combimag RCT

IKA-Schüttler MTS 4

Joun GmbH, Unterhaching: Trockenschrank

Multicept ApS, Rungsted, Dänemark: FertiCare personal, Vibrostimulator

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

Leica AG, Solms: Leica WILD M8

Leitz, Bensheim: Mikrotom 212 nach Minot

Leybold-Heraeus, Hürth: Lyovac GT2

MJ Research, INC, Watertown, Massachusetts: Perltier-Thermal Cycler, PTC 200

PeqLab, Erlangen: EasyCast Minigelsystem Modell B2

Polaroid GmbH, Offenbach: Photoeinheit, Instant Camera, Polaroid MP4+

Schröckel, Göttingen: Glasröhrchen, Ø 4-5 mm Öffnung

Zeiss, Frankfurt: Inverses Mikroskop Axiovert 100 mit elektr. Mikromanipulationseinheit

Inverses Mikroskop Axiovert 405M mit Photoeinheit

Stereomikroskop Stemi SV 11

Stereomikroskop Stemi SV 6

Axioskop mit Fotoeinheit MC 80

Transmissionselektronenmikroskop LEO 906

2.1.6. Versuchstiere

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit Gewebe und Zellen des Marmoset-Affen, *Callithrix jacchus*, durchgeführt. Die Tiere gehörten zur Versuchstier-Kolonie der Abteilung Reproduktionsbiologie des Deutschen Primatenzentrum GmbH, Göttingen. Das

Untersuchungsmaterial wurde uns freundlicherweise von Frau Dr. P. Nayudu zur Verfügung gestellt.

Zur Gewinnung von Eizellen im gleichen Zyklusstadium wurde der ovarielle Zyklus der Marmoset-Weibchen überwacht. Aus diesem Grund wurde den Weibchen zur Bestimmung der Progesteronkonzentration im Plasma ein bis zwei Mal pro Woche venöses Blut entnommen. Durch eine intramuskuläre Injektion von 0,8µg Cloprostenol (Estrumate, Pitman Moore, Burgwedel), einem Analogon des Prostaglandins PGF₂α, am 10.-16. Tag nach der Ovulation wurde dann die Luteolyse induziert (Gilchrist *et al.*, 1995).

2.2. Methoden

2.2.1. Gewinnung von Marmoset-Eizellen

Eierstöcke geschlechtsreifer Marmoset-Weibchen wurden nach Euthanasierung der Tiere im Deutschen Primatenzentrum Göttingen durch die dort tätigen Tierärzte entnommen. Die Ovariectomie erfolgte am Tag 5/6 der Follikelphase des Menstruationszyklus. Nach Entnahme der Ovarien wurden diese direkt in 37°C warmes Dissektionsmedium überführt. Zur Gewinnung der Oozyten wurden unter lichtmikroskopischer Kontrolle (Stereomikroskop Stemi SV6, Zeiss, Frankfurt) zunächst die Follikel bei einer 250fachen Vergrößerung aus der ovariellen Matrix isoliert und nach ihrer Größe sortiert. Entsprechend ihrer Größe wurde zwischen präantralen, periantralen und antralen Follikel unterschieden. Präantrale Follikel hatten definitionsgemäß einen Durchmesser $<400\mu\text{m}$. Periantrale und antrale Follikel wurden ihrer Größe nach in drei verschiedene Gruppen unterteilt: $400\text{-}599\mu\text{m}$ (periantrale Follikel), $600\text{-}999\mu\text{m}$ (kleine antrale Follikel) und $>1000\mu\text{m}$ (große antrale Follikel). Nach Überführung der Follikel in das Punktionsmedium, wurden die Eizellen aus den Follikeln isoliert, indem diese mit Einmalkanülen (Nr. 17) eröffnet wurden. Freiliegende Eizellen, deren Zuordnung zu einer bestimmten Follikelgröße nicht möglich war, wurden nach Eizellgröße unterteilt. Es wurde zwischen den Eizellgrößen $<80\mu\text{m}$, $80\text{-}100\mu\text{m}$ und $>120\mu\text{m}$ unterschieden. Alle Eizellen, die bis dahin noch von Kumuluszellen umgeben waren, wurden anschließend durch mehrmaliges Aufziehen und Ausspülen durch eine ausgezogene Glaskapillare von diesen befreit.

Sowohl Oozyten als auch Follikelzellen aus den Marmosetfollikeln wurden getrennt gesammelt. Bei den Follikelzellen handelte es sich um ein Gemisch aus Kumulus- und Granulosazellen. Je nach weiterem Verwendungszweck wurden die Zellen in unterschiedlichen Lagerungsmedien aufbewahrt. Oozyten, die dem Kompetitions-Hemizona-Assay zugeführt werden sollten, wurden in hyperosmolarer Salzlösung unter Mineralöl gelagert. Dagegen wurden Ei- und Follikelzellen, die später für die Polymerase-Kettenreaktion verwendet werden sollten, in RNA later, einer Lösung zum Schutz vor RNase-Tätigkeit aufbewahrt.

2.2.2. Gewinnung von Frischsperma

Die Spermatozoen der Marmoset-Männchen wurden durch penile Vibrostimulation (PVS) gewonnen (Küderling *et al.*, 2000). Der verfügbare Tier-Pool war darauf trainiert, bei ausreichender Stimulation zu ejakulieren. Für die Spermagewinnung wurden die Männchen am vorausgehenden Tag von ihren Partnerinnen abgetrennt, in dem sie in separate Einzelkäfige gesetzt wurden. Diese wurden dann an dem Käfig mit dem Weibchen befestigt, so daß Blickkontakt zwischen den verpaarten Tieren bestand. Ziel der Abtrennung war die Vermeidung einer Kopulation kurze Zeit vor der geplanten Gewinnung der Samenprobe.

Die Stimulation der Marmoset-Männchen erfolgte mit dem Vibrostimulator FertilCare personal der Firma Multicept ApS, Rungstedt, Dänemark, dem ein Glasröhrchen mit einem Durchmesser von 4-6mm aufgesetzt wurde (Abb. 6). Dieses wurde dem Penis des Tieres aufgesetzt und übertrug so die Vibration mit definierten Frequenzen und Amplituden. Die durch diesen Reiz ejakulierte Probe wurde in dem Glasröhrchen aufgefangen, vor Ort mit 50-100µl Talp-Hepes-Medium überschichtet, mit Parafilm verschlossen und bis zur weiteren Verarbeitung im Wärmeblock bei 37°C aufbewahrt.

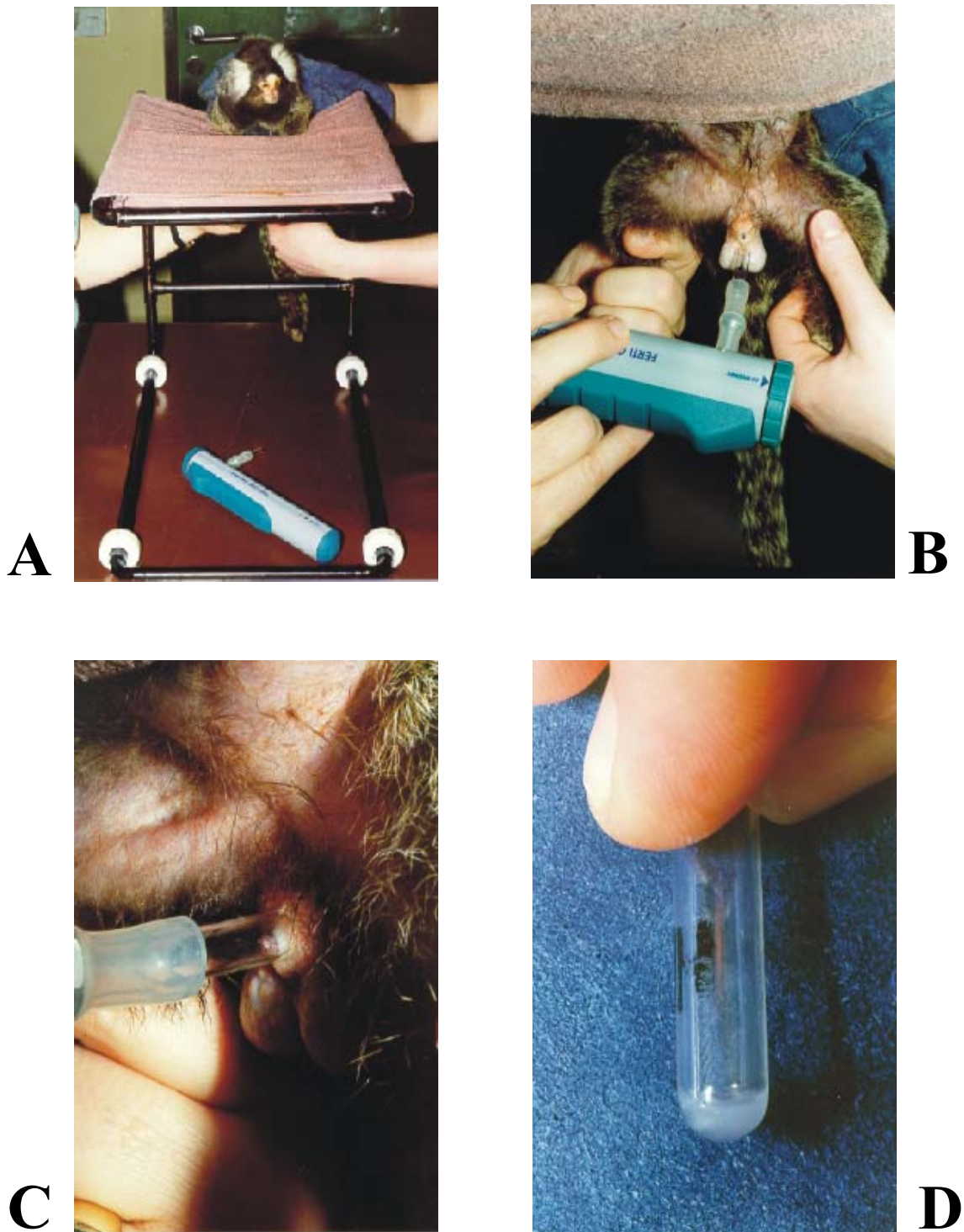


Abb. 6: Darstellung der penilen Vibrostimulation (PVS): Bild A und B zeigen die Lagerung und das Halten des Tieres, damit das männliche Genital für die Stimulation frei zugänglich ist. In Bild C ist die Stimulation des Penis dargestellt. Bei ausreichender Stimulation kommt es zur Ejakulation. Das Ejakulat wird in einem Glasröhrchen aufgefangen (Bild D).

2.2.3. Herstellung von Paraffinschnitten aus Ovarien

Etwa 3mm³ große Stücke des Marmoset Ovars wurden in Methacarn-Lösung fixiert. Nach Entfernung des Fixiermediums und anschließender Entwässerung mit 96% Ethanol sowie Isopropanol für je 3-4 Stunden wurde das Ovargewebe für 12h zur Entfettung in Xylol gelegt. Danach wurde das fixierte Gewebestück für 8-10h in flüssigem Paraffin bei 60°C belassen, um eine ausreichende Durchdringung des Gewebes zu gewährleisten. Nach Einbettung der Gewebeprobe in Paraffinblöcke und deren Aushärtung wurden die Blöckchen bei Raumtemperatur gelagert.

Mit einem Mikrotom nach Minot wurden Paraffinschnitte mit einer Schnittdicke von 4-6µm hergestellt, diese auf Objektträgern transferiert und getrocknet. Zur besseren Haftung waren die Objektträger mit Poly-L-Lysin beschichtet.

2.2.4. Einsatz von Anti-ZPA- und Anti-ZPC-Antikörpern

2.2.4.1. Immunhistochemie auf Paraffinschnitten

Auf beschichteten Objektträgern fixierte Paraffinschnitte aus Ovargewebe des Marmoset-Affen wurden zunächst für zweimal 3min in Xylol entparaffiniert. Der Entparaffinierung schloß sich die Wässerung der Schnitte an, indem diese eine absteigende Alkoholreihe durchliefen. Nach 5 minütigem Waschen in Aqua dest. erfolgte die Inkubation der Schnitte in 3% (v/v) Wasserstoffperoxid-Lösung für 15min bei Raumtemperatur in einer dunklen Küvette. Dies diente dem Zweck, endogene Peroxidasen im Ovargewebe zu inaktivieren. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindung an im Gewebe enthaltener Proteine wurden die Ovarschnitte nach einem kurzen Waschschrift von 5min in PBS, für 30min bei Raumtemperatur mit einer 1% (w/v) Milchpulver-PBS-Lösung präinkubiert. Daran schloß sich die Inkubation mit dem Erstantikörper für 1h bei Raumtemperatur an. Eingesetztes Antiserum AS ZPA-20 war 1:50, Antiserum AS ZPC-6 1:100 und das Präimmenserum als Negativkontrolle 1:50 in PBS mit 1%(w/v) Milchpulver verdünnt. Nach zweimaligem Waschen für 5min mit PBS und einmaligem 5 minütigen in 1% (w/v) Milchpulver/PBS folgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper für 30min. Dabei handelte es sich um Anti-Rabbit-Immunglobuline der Firma Dako, die 1:100 verdünnt in einer 1% (w/v) Milchpulver/PBS-Lösung verwendet wurden. Nach der Antikörperinkubation wurden die Schnitte wieder wie

bereits beschrieben gewaschen. Im Anschluß daran wurde Peroxidase-Anti-Peroxidase-Immunkomplex, 1:100 in 1% (w/v) Milchpulver/PBS verdünnt, für 30min zugegeben. Nach erneutem Waschen der Schnitte für zweimal 5min in PBS wurde DAB als Substrat der Peroxidase eingesetzt. Dazu wurden 200mg/l DAB in 15ml Natriumacetat mit 0,03% (v/v) Wasserstoffperoxid gelöst und für 20min auf das Gewebe gegeben. Die Reaktion mit der Peroxidase führte zur Entwicklung eines bräunlichen Farbproduktes, dessen Intensität später ausgewertet werden konnte. Nach Entfernung des Substrates durch erneutes zweimaliges Waschen in PBS für je 5min und anschließendem 5 minütigem in Aqua dest. wurden die Schnitte zur Darstellung der Zellkerne mit Hämalaun-Lösung für 10min gegengefärbt. Die Blaufärbung der Zellkerne stellte sich durch intensives, 10 minütiges Spülen der Objektträger mit Leitungswasser ein. Abschließend wurden die Gewebsschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, mit Xylol entfettet und letztlich mit Corbit-Balsam eingedeckt. Die Beurteilung der Färbungsintensität erfolgte mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskopes.

2.2.4.2. Immunreaktion auf Ultradünnschnitten

Nach Fixierung von Marmoset Ovargewebe in Immunfixanz und dessen Einbettung in LR-White-Kunststoffharz wurden daraus ca. 70nm dicke Schnitte am Ultramikrotom hergestellt und auf Nickelnetzchen transferiert. Die Ultradünnschnitte wurden mir freundlicherweise von Frau Sabine Gröger zur Verfügung gestellt.

Alle Schritte der Immunreaktion liefen bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer ab.

Nach 5min Hydrierung des Gewebes in TBS wurden die Schnitte für 20min in einer 0,1% Glycin/TBS-Lösung inkubiert. Dann wurden sie 3mal für 3min in TBS gewaschen. An diese Waschschrte schloß sich die Präinkubation des Gewebes zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen an. Bei Gewebe, das mit Anti-ZPA-Antikörpern behandelt werden sollte, erfolgte diese in 2% (w/v) Milchpulver/TBS. Im Gegensatz dazu wurden die Ultradünnschnitte, die mit Anti-ZPC-Antikörpern inkubiert werden sollten mit einer 10% (v/v) Ziegen Serum/TBS-Lösung vorbehandelt. Dieser Präinkubation schloss sich die Inkubation der Gewebeschnitte im Primärantikörper für 90min an. Als Erstantikörper wurde Anti-ZPA-Antiserum AS ZPA-20 (1:10 in einer TBS-Lösung mit 10% (v/v) Ziegen Serum verdünnt) oder Anti-ZPC-Antiserum AS ZPC-6 (1:5 in einer 1% (v/v) Ziegen Serum/TBS-Lösung verdünnt) eingesetzt. Als Kontrolle wurde das Präimmunserum in entsprechender Verdünnung eingesetzt. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde 5mal für 3min

in TBS gewaschen. Im Anschluß daran erfolgte die Inkubation der Ultradünnschnitte mit dem Zweitantikörper an. Bei dem mit AS ZPA-20 behandelten Gewebe wurde ein Verstärkersystem gewählt. Dazu wurden die Schnitte zunächst für 30min in einer 10% (v/v) Ziegen Serum/TBS-Lösung mit 1:20 verdünntem biotinylierten Anti-Rabbit-IgG belassen. Nach einem Waschschrift in TBS für 3mal 3min erfolgte die Behandlung für 30min mit Streptavidin-Gold, 1:40 verdünnt in 10% (v/v) Ziegen Serum/TBS. Bei den mit Anti-ZPC-Antikörpern inkubierten Gewebeschnitten war aufgrund der höheren Affinität der Antikörper die Anwendung eines Verstärkersystems nicht nötig. Hier wurde deshalb direkt ein mit Goldpartikel konjugierter Zweitantikörper eingesetzt. Dieser Anti-rabbit-IgG-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:20 in 1% (v/v) Ziegen Serum/TBS für 60min eingesetzt.

Zur Entfernung überschüssiger Antikörper bzw. Streptavidin-Gold wurde ein erneuter Waschschrift für 3mal 3min an die Zweitantikörperinkubation angeschlossen. Zur Nachfixierung wurde das Gewebe mit 1% (v/v) Glutaraldehyd/TBS-Lösung für 5min behandelt. Dann wurden die Schnitte 2mal für 3min in TBS und danach 3mal für 3min in Aqua dest. gespült. Abschließend erfolgte die Kontrastierung des Gewebes mit Uranylacetat für 20min in einer 2-5%igen wässrigen Lösung. Die Begutachtung der Immunreaktion erfolgte nach Darstellung der Goldpartikel mit dem Elektronenmikroskop (Transmissionselektronenmikroskop LEO 906, Zeiss, Frankfurt).

2.2.4.3. Hemizona-Antikörper-Bindungsassay (HABA)

Zum Nachweis einer vorhanden spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion an den Marmoset-Hemizonae wurde der Hemizona-Antikörper-Bindungsassay durchgeführt (Abb. 7).

In verschiedenen Versuchsansätzen wurden sowohl unbehandelte Zona Pellucida-Hälften als auch Hemizonae nach deren Einsatz im Kompetitions-Hemizona-Assay verwendet. Die bereits in den Bindungsstudien eingesetzten Test-Hemizonae waren zum einen mit Antiserum AS ZPA-20, zum anderen mit dem monoklonalen Anti-ZPA-Antikörper mAb ZPA-20 behandelt worden. Als Kontrolle dienten die mit Präimmenserum, oder im Falle des monoklonalen Antikörpers mit dem Kulturmedium, behandelten korrespondierenden Zona Pellucida-Hälften. Nach 15 minütiger Rehydrierung in PBS wurden die schon behandelten Hemizonae im weiteren Verlauf des Hemizona-Antikörper-Bindungsassays direkt mit dem Zweitantikörper inkubiert.

Die auf Spotslides getrockneten, unbehandelten Hemizonae wurden ebenfalls für 15min in PBS rehydriert. Dieser und alle folgenden Versuchsschritte fanden bei Raumtemperatur statt. Es schloss sich eine einstündige Präinkubation in einer feuchten Kammer mit einer 1% (w/v) Rinderserumalbumin-PBS-Lösung an. Anschließend wurden die Test-Hälften mit Anti-ZPA-Antiserum AS ZPA-20, das 1:30 in PBS mit 1% (w/v) BSA verdünnt war, für eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Kontroll-Hälften wurden mit Präimmenserum in entsprechender Verdünnung behandelt. Nach dreimaligem Waschen für je 5min in PBS folgte die Inkubation der korrespondierenden Zona Pellucida-Hälften mit dem Zweitantikörper. Zur Verstärkung des Farbsignals wurden zunächst biotinylierte anti-Rabbit-Immunglobuline der Firma Sigma eingesetzt. Diese waren 1:500 in 1% (w/v) BSA/PBS verdünnt. Danach wurde 1000fach verdünntes, Peroxidase-konjugiertes Avidin, auf die Hemizonae gegeben. Beide Schritte vollzogen sich für 30min in einer feuchten Kammer. Zur Farbentwicklung wurde im Anschluß DAB als Substrat der Peroxidase nach Vorschrift zugegeben. Die Umsetzung von DAB durch die gebundenen Peroxidasen resultierte in einer lichtmikroskopisch sichtbaren Braunfärbung. Abschließend wurden die Hemizonae auf den Spotslides mit Crystal Mount-Eindeckmedium eingedeckt.

Hemizona-Antikörper-Bindungs-Assay (HABA)

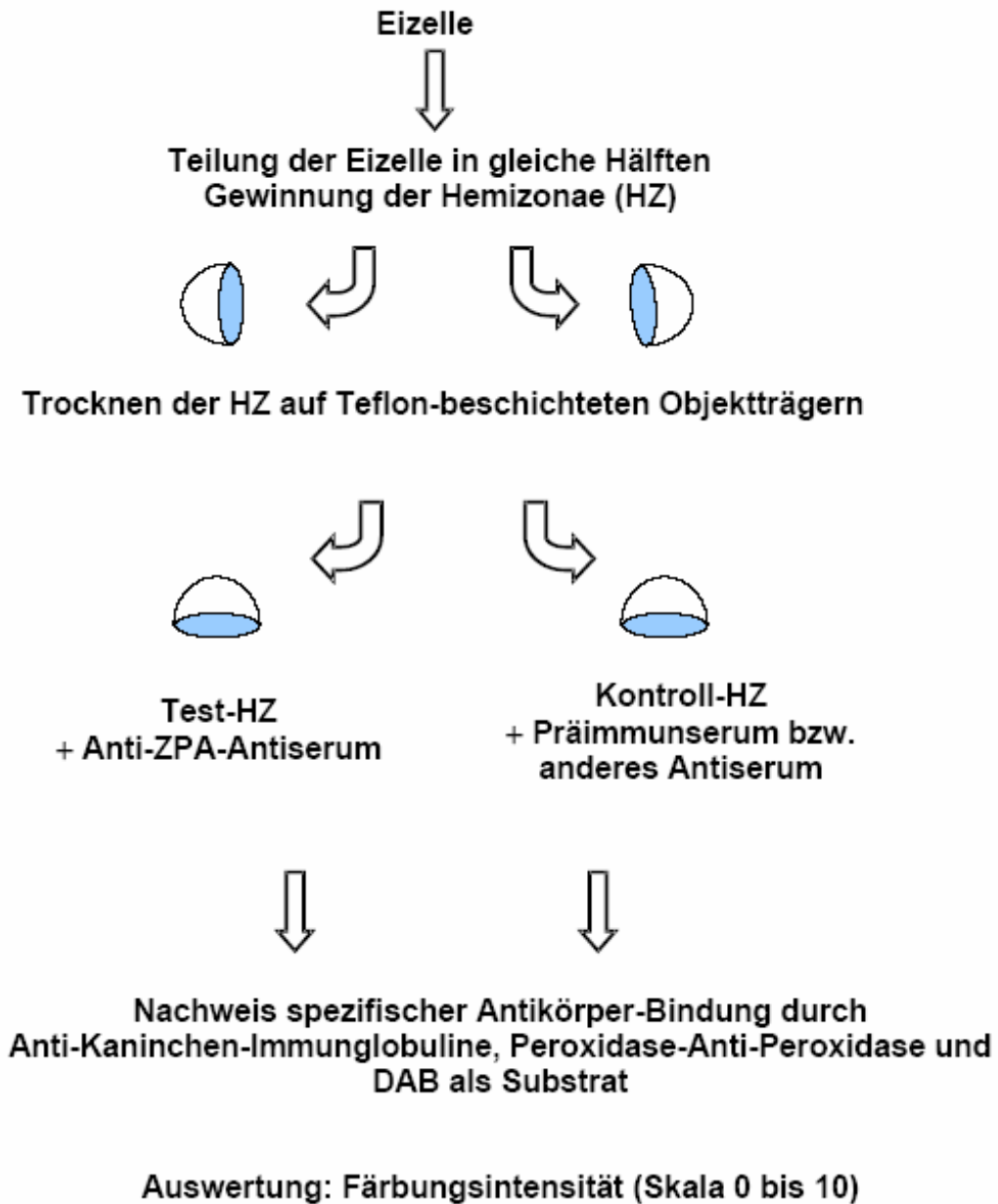


Abb. 7: Schematische Darstellung des Hemizona-Antikörper-Bindungsassays

2.2.5. Funktionelle Spermatozoenbindungsstudien:

Kompetitions-Hemizona-Assay (K-HZA)

Der Kompetitions-Hemizona-Assay stellt eine modifizierte Art des Hemizona-Assays dar (Burkman *et al.* 1988). Der Hemizona-Assay dient dazu, die Bindungsfähigkeit von Patientenspermatozoen an die Zona Pellucida mit der von gesichert fertilen Spendern zu vergleichen. Die fest gebundenen Spermatozoen pro Hemizona werden ausgezählt und nach Berechnung des Hemizona-Indexes das Bindungsvermögen der Patientenspermatozoen beurteilt. Im Gegensatz dazu werden beim Kompetitions-Hemizona-Assay beide korrespondierenden Zona Pellucida-Hälften mit Spermatozoen eines gesichert fertilen Spenders inkubiert, nachdem zuvor die Hemizonae mit einem Antiserum bzw. einem Präimmunserum vorbehandelt wurden (Oehninger *et al.*, 1996; Hinsch *et al.*, 1998), (Abb. 8). Für diese Untersuchungen wurde entweder eine Hemizona mit einem Anti-ZPA-Antiserum und die korrespondierende Hälfte mit einem Präimmunserum, oder die zusammengehörenden Zona Pellucida-Hälften mit unterschiedlichen Anti-ZPA-Antisera inkubiert. Nach Auszählung der gebundenen Spermatozoen und Ermittlung des Hemizona-Indexes war es somit möglich, den Einfluss des verwendeten Antiserums auf die Spermatozoenbindungsfähigkeit zu erfassen. Zur Etablierung dieser Testmethode im Marmoset-Modell mußten die Bedingungen dafür in Vorversuchen optimiert und an dieses Tiermodell angepasst werden.

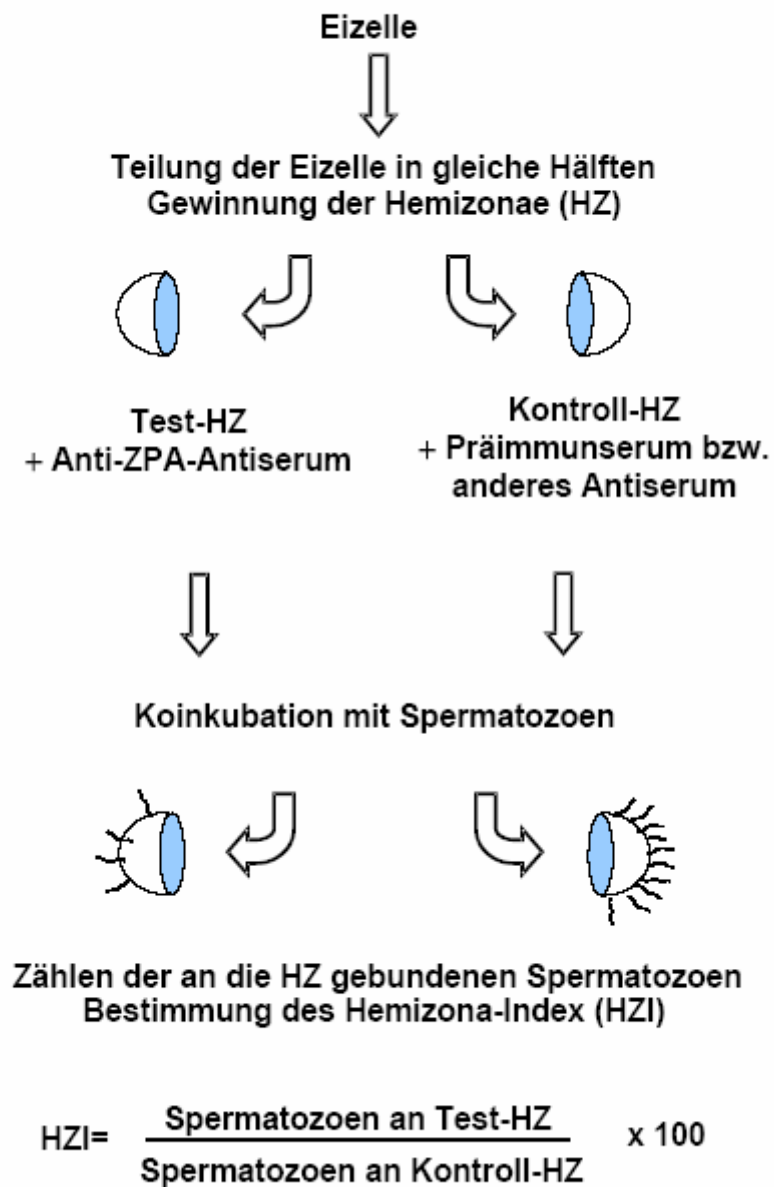
Kompetitions-Hemizona-Assay (HZA)

Abb. 8: Schematische Darstellung des Kompetitions-Hemizona-Assays

2.2.5.1. Aufbereitung des Ejakulates

Das gewonnene Ejakulat wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit weiteren 100-150µl Talp-Hepes-Medium verdünnt, so daß letztlich eine Verdünnung des Ejakulates in 200µl Medium vorlag. Nach Abnahme von je 5µl der Suspension zur Bestimmung der Motilität und der Gesamtzahl der Spermatozoen wurde die Probe für 10 min bei 350 x g gewaschen. Benutzt wurde eine spezielle Zentrifuge der Firma Hettich, Tuttlingen, mit verzögerter Anlaufphase zur Minimierung der Scherkräfteinwirkung auf die Spermatozoen. Während dessen wurde lichtmikroskopisch die Motilität bestimmt, indem bei 20facher Vergrößerung der Anteil der motilen Spermatozoen von unabhängigen Betrachtern grob geschätzt wurde. Danach wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die Gesamtzahl der Spermatozoen berechnet und durch die vorherige Einschätzung der Motilität die Anzahl der motilen Spermatozoen der gesamten Suspension errechnet. Dem Waschschrift folgte die Überschichtung des Sediments mit 100µl Talp-Medium. Talp-Medium war zuvor im Brutschrank auf 37°C erwärmt und auf einen stabilen pH-Wert kalibriert worden. Die Suspension wurde anschließend zur Kapazitation für 2h bei 37°C und 5,5% CO₂ in den Inkubator gestellt. Nach der Kapazitation wurde wie oben beschrieben erneut die Motilität und die Gesamtzahl der im Überstand befindlichen Spermatozoen ermittelt. Bei geringer Dichte und starkem Abfall der Motilität wurde das Sediment resuspendiert und danach die Probe ein weiteres Mal bezüglich der Spermatozoendichte und deren Motilität ausgewertet.

2.2.5.2. Herstellung der Spermatozoensuspension

Nach Kapazitation der Spermatozoen wurde die Spermatozoenmotilität und die Gesamtspermatozoenzahl der Probe bestimmt (Punkt 2.2.5.1). Je nach Dichte wurde eine Verdünnung in Talp-Medium mit zusätzlich 2mM Calciumchlorid hergestellt, so daß eine Endkonzentration von 1 Mio motile Spermatozoen/ml Suspension vorlag. In dieser Suspension erfolgte die Coinkubation von Spermatozoen und Hemizonae.

2.2.5.3. Herstellung von Hemizonae aus Marmoset-Oozyten

Marmoset-Oozyten, die im Kompetitions-Hemizona-Assay eingesetzt wurden, waren zum Erhalt der physiologischen Eigenschaften der Zona Pellucida in hyperosmolarer Salzlösung bei 4°C gelagert worden. Es wurden Eizellen aus 600-999µm großen Follikeln oder aber mit einem Zelldurchmesser von >120µm verwendet.

Zur Gewinnung der Hemizonae wurden die Oozyten zunächst durch mehrmaliges Waschen in Leibovitz-Medium mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FBS) von der hyperosmolarer Salzlösung befreit. Danach wurden sie unter einem inversen Mikroskop mit zugehöriger elektrischer Mikromanipulationseinheit in zwei Hälften geteilt. Die verbleibenden Eizellreste wurden durch mehrmaliges Aufsaugen und Ausspülen der Oozytenhälften in einer Mikropipette, deren Durchmesser etwa dem der Oozytenhälften entsprach, entfernt. Dieser Waschschritt erfolgte in Leibovitz-Medium mit 0,3% (w/v) Rinderserumalbumin. Die gesäuberten Zona-Hälften wurden entweder direkt im Kompetitions-Hemizona-Assay eingesetzt oder bis zur späteren Verwendung in einem Tropfen hyperosmolarer Salzlösung bei 4°C gelagert. Um das Verdunsten des Lagerungsmediums, und somit das Austrocknen der Hemizonae zu vermeiden, wurden die Hemizonae enthaltenden Tropfen mit Mineralöl überschichtet.

2.2.5.4. Vorbereitung der Hemizonae

In hyperosmolarer Salzlösung gelagerte Hemizonae wurden durch mehrmaliges Aufsaugen und Ausspülen in einer Mikropipette mit Leibovitz-Medium mit 0,3% (w/v) BSA gewaschen. Die Inkubation der Hemizonae in den anti-ZPA-Antikörpern erfolgte für 2h bei 37°C und 5,5% CO₂. Dazu wurden die Hemizonae in 100µl Tropfen der Antikörperlösung oder des Präimmunerums transferiert, die dann zum Schutz vor Verdunstung mit Mineralöl überschichtet wurden.

Eingesetzt wurden:

1. Anti-ZPA-Antiseren AS ZPA-20 und AS ZPA-26, jeweils 1: 30 in einer 0,3% (w/v) BSA/Leibovitz-Lösung verdünnt. Als Kontrolle wurden die korrespondierenden Hemizonae in der entsprechenden Präimmunserumverdünnung inkubiert.
2. Affinitätschromatographisch aufgereinigte AS ZPA-20- und ZPA-26-Antikörper. Die lyophilisierten Antikörper wurden 1:1 in einer 0,3% (w/v) BSA/Leibovitz-Lösung rehydriert.
3. der monoklonale Anti-ZPA-Antikörper mAb ZPA-20 (5fach konzentriert). Die Kontrollgruppe wurde mit 5fach konzentriertem Kulturmedium behandelt.

Nach Antikörperinkubation wurden die Hemizonae in Leibovitz/0,3% (w/v) BSA 15 mal gewaschen. Dazu wurden pro Hemizona 5 Tropfen Waschmedium vorbereitet. Nach Übertragung der behandelten Zona Pellucida-Hälften in den ersten Tropfen Medium, wurden diese in den Tropfen 2, 3 und 4 exakt fünfmal gewaschen und zum Schluss in den 5. Tropfen Waschmedium übertragen. Anschließend wurden die gewaschenen Hemizonae in die vorbereitete Spermatozoensuspension transferiert.

2.2.5.5. Coinkubation von Hemizonae und Spermatozoen

Nach der Inkubation der Hemizonae mit dem entsprechenden Antikörper und nach Kapazitation der Spermatozoen wurden die Zona Pellucida-Hälften in je einen 100µl Tropfen Spermatozoensuspension mit definierter Spermatozoenzahl (1 Mio motile Spermatozoen/ml Suspension) transferiert und mit Mineralöl überschichtet. Die Coinkubation erfolgte für 4h bei 37°C und 5,5% CO₂. Anschließend wurden die Hemizonae in frisches Waschmedium, bestehend aus Leibovitz-Medium/0,3% (w/v) BSA überführt. Zur Entfernung locker gebundener Spermatozoen wurden die Zona Pellucida-Hälften, entsprechend dem unter 2.2.5.4 definierten Bedingungen gewaschen. Benutzt wurden dazu enge Mikropipetten, deren Durchmesser etwa dem Durchmesser der Hemizonae entsprachen. Die Anzahl festgebundener Spermatozoen wurde ermittelt und anschließend der Hemizona-Index (HZI) mit nachfolgender Formel berechnet.

$$\text{HZI} = \frac{\text{Anzahl der gebundenen Spermatozoen an der Test-Hemizona}}{\text{Anzahl der gebundenen Spermatozoen an der Kontroll-Hemizona}} \times 100$$

Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zona Pellucida-Hälften in einem Tropfen PBS auf mit Teflon beschichteten Spotslides übertragen, und mit der Schnittfläche aufsitzend auf den Objektträgern getrocknet.

2.2.6. Expression der ZP-Gene

Untersuchungen zur Identifizierung des mRNA-Syntheseortes der drei Glykoproteine der Zona Pellucida im Ovar des Weissbüschelaffen erfolgten durch die Darstellung der Expression der die Zona Pellucida-Proteine kodierenden Gene. Dazu wurden beim Marmoset sowohl aus Eizellen als auch aus Follikelzellen unterschiedlicher Follikelstadien die mRNA isoliert und anschließend eine Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt. Im Anschluß daran wurden die amplifizierten cDNA-Fragmente näher charakterisiert.

2.2.6.1. Isolierung von mRNA aus Marmoset Ei- und Follikelzellen

Die mRNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des MPG Guanidine Direct mRNA Purification Kit der Firma CPG, New Jersey.

100µl der MPG Streptavidin-Suspension wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Diese wässrige Suspension besteht aus superparamagnetischen, komplett porösen Glaspartikeln, an deren Oberfläche Streptavidin kovalent gebunden ist. Mit dem magnetic particle separator (3-in-1 MPS) wurde dann eine magnetische Trennung der Suspension herbeigeführt, indem sich die Streptavidin-gebundenen Teilchen an die Gefäßwand anlagerten, und der Überstand abgezogen werden konnte. Die magnetische Trennung schloß sich allen Schritten der mRNA-Isolierung an. Nach dreimaliger Resuspendierung der Partikel mit je 100µl des Proben-Bindungs-Puffers (G1-Lösung) wurden 10µl der biotinylierten Oligo d(T)-Lösung (800pmol) sowie 90µl der G1-Lösung zugegeben. Zur Bindung der biotinylierten Oligo d(T) an das Streptavidin wurde die Suspension ausgiebig gemischt. Nach dreimaligen Waschen durch die jeweilige Resuspendierung der Teilchen mit dem Proben-Wasch-Puffer (G2-Lösung) wurden die Oligo d(T)-gebundenen Streptavidin-Partikel mit 100µl Hybridisierung-Bindungs-Puffer (G4-Lösung) wieder in Lösung gebracht und bis zur späteren Verwendung bei Raumtemperatur belassen.

Anschließend wurden die Oozyten oder die Follikelzellen für die mRNA-Extraktion präpariert. Dazu wurde zunächst die GTC- Lösung, bestehend aus 1,5ml GTC Homogenisierung-Puffer (G3-Lösung) und 15µl Mercaptoethanol (G7-Lösung) hergestellt und auf Eis gekühlt. In diese wurden die Zellen überführt und weiter behandelt. Zur Standardisierung wurden stets 7 Eizellen der definierten Follikelgrößen (<400µm, 400-599µm, 600-999µm und >1000µm) oder aber der Eizellgrößen (<80µm, 80-100µm und >120µm) zur Isolierung der mRNA eingesetzt. Beim Einsatz der Follikelzellen bestehend aus Kumulus-/Granulosazellkomplexen war die exakte Bestimmung der Zellzahl nicht möglich. Man kann jedoch davon ausgehen, dass in jeder Probe mindestens 100 Follikelzellen enthalten waren. Nach ausgiebigem Mischen und ca. 5 minütiger Bearbeitung in einem Glashomogenisator (4ml) mit dazugehörigem Teflon-Pistill der Firma Kontes (New Jersey, USA) folgte die Zugabe des doppelten Volumens an G4-Lösung. Dann wurde die Lösung einige Male durch eine Kanüle Nr. 17 (Terumo, Leuven/Belgien) gezogen. Einwirkende Scherkräfte führten zur Freilegung und Zerkleinerung der störenden genomischen DNA.

Die homogenisierte Lösung wurde bei 4°C und 8200 x g für 5min zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich auch die mRNA befand, wurde dann auf die zuvor vorbereiteten Streptavidin-Partikel pipettiert. Unter ausgiebigem Mischen vollzog sich die Hybridisierung der mRNA mit den gebundenen Oligo d(T)s bei Raumtemperatur. Die Teilchen wurden dreimal mit je 100µl Hybridisierungs-Wasch-Puffer (G5-Lösung) gewaschen. Die Zugabe von 20µl Freisetzung-Solution (G6-Lösung) bewirkte nach 2 minütiger Erwärmung der Lösung auf 65°C im Wasserbad die Freisetzung der mRNA von den Oligo d(T)s. Nach magnetischer Trennung der Streptavidin-Partikel konnte die sich im Überstand befindliche mRNA abgezogen werden. Dieser letzte Schritt der mRNA-Gewinnung wurde insgesamt zweimal durchgeführt, so dass letztlich ein Endvolumen von 40µl mRNA in G6-Lösung vorlag.

Die isolierte mRNA wurde im weiteren Verlauf mit 100µl Ethanol 100% und 15µl Natrium-Acetat gemischt. Es folgte eine Fällung über 20min bei -80°C. Die Probe wurde dann für 30min bei 4°C bei 13800 x g zentrifugiert. Das sich bildende Sediment wurde noch einmal mit 100 µl Ethanol 70% für 5min bei 13800 x g gewaschen. Nach Lufttrocknung des Sediments wurde es in 20µl RNase freiem Wasser resuspendiert. Zur Lagerung wurde vor dem Tieffrieren bei -20°C noch 1µl (40 Units) RNase Inhibitor zum Schutz vor RNase-Aktivität hinzugegeben.

2.2.6.2. Reverse Transkriptasereaktion, RT-Reaktion

Ziel der reversen Transkriptasereaktion war die Herstellung einer cDNA ausgehend von der isolierten mRNA. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz für 1h bei 37°C im PCR-Cycler inkubiert: mRNA 50% (v/v), RT-Puffer 1x, Oligo (dT)-Primer 1µM und das dNTP-Gemisch 0,5mM. Zusätzlich waren 10 Units RNase Inhibitor und 4 Units Reverse Transkriptase enthalten. Die Differenz zum Endvolumen von 20µl wurde mit RNase freiem Wasser ausgeglichen. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C tiefgefroren.

2.2.6.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) bietet die Möglichkeit, ausgewählte DNA-Sequenzbereiche spezifisch und schnell zu vervielfältigen. Dazu ist es nötig, die DNA-Doppelhelix durch starkes Erhitzen auf 95°-100°C zu denaturieren. Als Startpunkt der DNA-Polymerase müssen sich im nächsten Schritt spezifische Primer anlagern. Primer sind kurze Oligonukleotide, die komplementär zu den flankierenden Bereichen der zu amplifizierenden Zielsequenz sind. Ihre Anlagerung erfolgt spezifisch bei der sogenannten Annealing-Temperatur (AT), die sich nach der Schmelztemperatur T_m der Oligonukleotide richtet. Diese läßt sich folgendermaßen berechnen:

$$T_m = [\text{Gehalt (A+T)} \times 2^\circ\text{C}] + [\text{Gehalt (C+G)} \times 4^\circ\text{C}] - 5$$

Allerdings sind die so kalkulierten Temperaturen nur grobe Richtlinien. Die exakte Temperatur zur Primeranlagerung muß für jedes Primerpaar experimentell evaluiert werden. Ausgehend von den gebundenen Primern ist im weiteren Verlauf der PCR eine Kettenverlängerung und somit Neusynthese des Komplementärstranges durch die DNA-Polymerase möglich. Mehrfache Wiederholungen dieser Vorgänge führen zur exponentiellen Vervielfältigung der Zielsequenz (Abb. 9).

Besonderheit der RT-PCR ist das Vorliegen eines neu synthetisierten cDNA-Stranges als Matrize für die Polymerasekettenreaktion, welcher komplementär zum isolierten mRNA-Strang ist. Die Amplifikation des cDNA-Fragmentes gilt als Nachweis für mRNA-Expression.

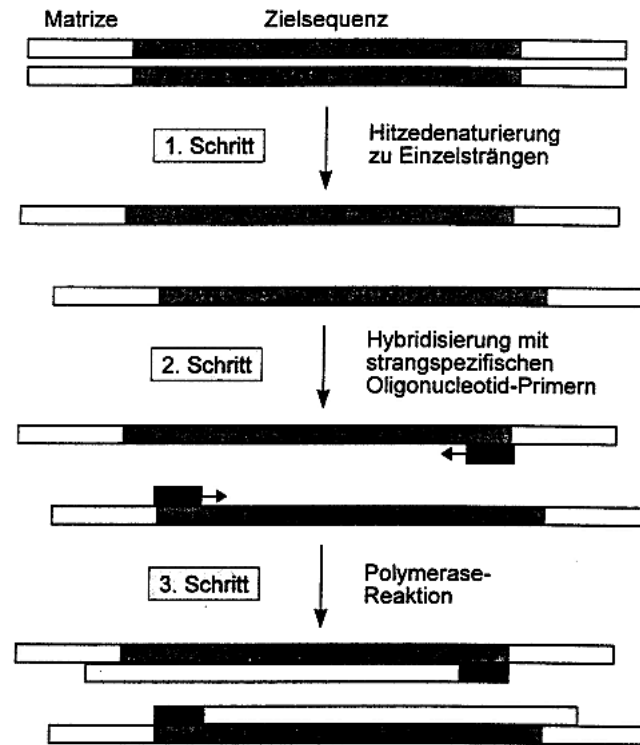


Abb. 9: Schematischer Ablauf einer Polymerasekettenreaktion (PCR).
Gassen/Schrimpf (1999)

2.2.6.3.1. Oligonucleotid-Primer

Oligonucleotid-Primer sind kurze Nucleotidsequenzen, die als Startpunkt der DNA-Polymerase zur Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen eingesetzt werden.

Mit Hilfe des Computerprogramms PC/gene der Firma IntelliGenetics wurden für die Amplifizierung ausgesuchter cDNA-Fragmente sowohl der ZP-Proteine als auch der Kontrollen spezifische Primerregionen ausgewählt.

Für alle drei Zona Pellucida Protein kodierenden Gene wurde jeweils ein Marmoset spezifisches Primerpaar synthetisiert. Zur Überprüfung einer erfolgreichen cDNA-Synthese wurde die Amplifizierung eines „house-keeping-genes“ angestrebt. Als Positivkontrolle der Methode diente im Marmoset Modell die humane Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (HGAPDH). Um eine eventuelle Kontamination der mRNA-Probe mit genomischer DNA zu überprüfen, wurde ein zusätzliches Intron überspannendes Primerpaar ausgehend von der Sequenz der humanen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

konstruiert (HIGAPDH). Als weitere Kontrolle wurden Primer zur Vervielfältigung einer cDNA-Sequenz des Eizell-spezifischen Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP 15) hergestellt.

Alle konstruierten Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG synthetisiert. Ihre Lagerung erfolgte bei -20°C .

2.2.6.3.2. RT-PCR

Die Amplifikation der cDNA erfolgte in 0,2- und 0,5-ml-Reaktionsgefäßen der Firma Eppendorf in einem Thermocycler mit Heizdeckel.

Die Proben beinhalteten $2\mu\text{l}$ Template, $1\times\text{NH}_4$ -Puffer, 2mM MgCl_2 , $0,25\text{mM}$ dNTPs, je 100pmol der Primer eines Primerpaares und $2,5$ Units der Taq-Polymerase. Das fehlende Volumen zum Endvolumen von $50\mu\text{l}$ wurde mit autoklaviertem Aqua dest. ausgeglichen.

Als Kontrollen wurde für jede Primerkombination eine Blindprobe angesetzt, die statt cDNA das gleiche Volumen Aqua. dest enthielt. Zudem wurde zur Überprüfung möglicher gDNA-Kontaminationen auch mRNA anstelle von cDNA in einer PCR-Reaktion eingesetzt.

Jede PCR-Reaktion begann mit der Denaturierung des Templates bei 94°C für 4min . Daran schlossen sich für jede PCR 35 Zyklen an. Ein PCR-Zyklus lief wie folgt ab:

1. Denaturierung bei 94°C für 45sec
2. Primerannealing bei der jeweiligen Annealing-Temperatur für 45sec
3. Kettenverlängerung durch die DNA-Polymerase bei 72°C für 90sec

Beim letzten Zyklus erfolgte der Schritt der Kettenverlängerung bei 72°C für 5min .

Die PCR-Produkte wurden anschließend elektrophoretisch in einem Agarose-Gelsystem getrennt, identifiziert und danach bei -20°C eingefroren.

2.2.6.3.3. Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Die Darstellung der amplifizierten PCR-Fragmente entsprechend ihrer Größe erfolgte im Agarosegel. Dazu wurde 1,5% (w/v) Agarose in 1xTBE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlung mit 0,01% (v/v) Ethidiumbromid versetzt. Nach Polymerisation des Gels folgte die Elektrophorese. Es wurden 15µl Probe, zusammengesetzt aus 12,5µl PCR-Produkt und 2,5µl 6xLoading Puffer, aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1xTBE-Puffer eingesetzt. Als Größenmarker wurde ein 100 bp-Marker aufgetragen.

Die Gelelektrophorese wurde bei 100V durchgeführt und dauerte ca. 90min. Dann wurde das Gel einem UV-Licht mit einer Wellenlänge von 366nm ausgesetzt und mit einer Polaroidkamera des Types Instant Camera, Polaroid MP4+ (Polaroid GmbH, Offenbach) fotografiert. Abschließend wurde die Größe vorhandener PCR-Fragmente durch den Vergleich mit dem 100 bp-Marker annähernd bestimmt.

2.2.6.3.4. Sequenzierung der PCR-Produkte

Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde von der Firma MWG Biotech durchgeführt. Entsprechend der Vorgabe der Firma MWG Biotech mussten dazu 20ng cDNA/100 Nukleotiden des jeweiligen PCR-Fragmentes lyophilisiert werden. Das so vorbereitete PCR-Produkt wurde dann zusammen mit den eingesetzten Primern (10µl in einer Konzentration von 10pmol) und einem Photo des Agarose-Gellaufs zur Sequenzierung eingeschickt.

2.2.7. Statistische Auswertung

2.2.7.1. Statistische Auswertung des HABA

Die quantitative Bewertung der abgelaufenen Antigen-Antikörper-Reaktion im Hemizona-Antikörper-Bindungsassay erfolgte durch die Auswertung der Intensität der Braunfärbung der Zona Pellucida-Hälften. Dazu wurde die Farbreaktion der Hemizonae von zwei unabhängigen Gutachtern ohne Kenntnis der Zugehörigkeit der Zona Pellucida-Hälften zur Test- oder Kontrollgruppe in einer Skala von 0 bis 10 bewertet. Die statistische Analyse erfolgte mit

einem Zwei-Stichproben-t-Test mit Hilfe des Computerprogramms GraphPad InStat. Da die Kontrollgruppe keine spezifische Farbreaktion zeigte, konnte diese als Ausgangswert genommen werden. Aus diesem Grund wurde eine einseitige Analyse verwendet. Die Nullhypothese H_0 ging davon aus, daß der Einsatz von Anti-ZPA-Antikörpern keinen Einfluss auf die Färbungsintensität der Hemizonae hatte. Eine Wahrscheinlichkeit $P < 0,05$ für H_0 führte zur Verwerfung der Nullhypothese und Annahme der Alternativhypothese H_1 , die von einer verstärkten Farbreaktion der mit Anti-ZPA-Antikörper behandelten Hemizonae ausging.

2.2.7.2. Statistische Auswertung des K-HZA

Bei der Auswertung des Kompetitions-Hemizona-Assays deutet ein Hemizona-Index im Bereich von 100 auf keinen signifikanten Unterschied der Spermatozoenbindungsfähigkeit an Test- und Kontroll-Hemizona hin. In diesem Fall kann man davon ausgehen, daß der Einsatz von Anti-ZPA-Antikörpern keinen Einfluss auf die Spermatozoenbindungsfähigkeit der Zona Pellucida hat (Nullhypothese H_0). Da die Auswirkungen der Hemizona-Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern nicht vorhersehbar und daher auch nicht einzuschränken waren, wurde zur statistischen Analyse der Hemizona-Indices ein zweiseitiger t-Test gewählt. Die statistische Analyse wurde mit dem Computerprogramm GraphPad InStat durchgeführt. Betrug die Wahrscheinlichkeit der Nullhypothese H_0 $P < 0,05$, wurde diese verworfen. Ein solches Ergebnis sprach für einen statistisch signifikanten Einfluss der Anti-ZPA-Antikörper auf die Bindungskapazität der Spermatozoen an die Hemizonae (Alternativhypothese H_1). Ein erhöhter Hemizona-Index weist auf ein gesteigertes Bindungsvermögen, ein erniedrigter Hemizona-Index auf ein gehemmtes Bindungsvermögen der Spermatozoen an die mit Antiserum inkubierten Zona Pellucida-Hälften hin.

3. Ergebnisse

3.1. Anzahl gewonnener Zellen aus dem Ovar des Weißbüschelaffen

Versuche der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Nayudu aus der reproduktionsbiologischen Abteilung des Primatenzentrums Göttingen und unserer Arbeitsgruppe wurden möglichst parallel geplant, um unnötige Tierversuche zu vermeiden. Insgesamt wurde im Untersuchungszeitraum bei 5 Tieren eine Ovariectomie durchgeführt. Ein Teil der gewonnenen Oozyten und Follikelzellen wurden für die beschriebenen Experimente zur Verfügung gestellt, während das übrige Material für Versuche der Göttinger Arbeitsgruppe genutzt wurde.

Für unsere Experimente wurden letztlich insgesamt 530 Marmoset Eizellen unterschiedlicher Eizellgröße und aus verschiedenen grossen Follikeln gewonnen (Abb. 10).

Davon standen 120 Oozyten für den Einsatz in den funktionellen Studien zur Verfügung. Sie wurden in Gruppen unterschiedlicher Eizellgröße (Eizellgröße $<80\mu\text{m}$; $>120\mu\text{m}$) und verschiedener Follikelgröße (Follikelgröße $400\text{-}599\mu\text{m}$; $600\text{-}999\mu\text{m}$; $>1000\mu\text{m}$) eingeteilt. Die übrigen 410 Eizellen wurden verwendet, um die Expression der Zona Pellucida Glykoprotein kodierenden Gene zu überprüfen. Hier fand ebenfalls eine Unterteilung in verschiedene Gruppen statt. Es wurde sowohl in Gruppen unterschiedlicher Eizellgröße (Eizellgröße $<80\mu\text{m}$; $80\text{-}100\mu\text{m}$; $>120\mu\text{m}$) als auch in Eizellgruppen aus unterschiedlich grossen Follikeln (Follikelgröße $<400\mu\text{m}$; $400\text{-}599\mu\text{m}$, $600\text{-}999\mu\text{m}$ und $>1000\mu\text{m}$) unterteilt. Neben den Oozyten wurden auch Follikelzellen aus Follikeln unterschiedlicher Größe gesammelt. Die Follikelzellen umfassten Kumuluszellen und Granulosazellen. Die Differenzierung der beiden Zellarten, sowie deren Anzahl konnten nicht bestimmt werden. Insgesamt wurden aus jeder verfügbaren Follikelgröße Follikelzellen isoliert und aufbewahrt. Anzahl und Gruppenzuordnung der gewonnenen Ei- und Follikelzellen ist in Tab.4 zusammengestellt.

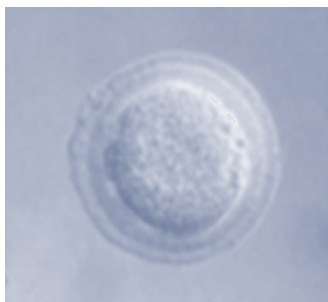


Abb. 10: Marmoset Oocyte aus einem antralen Follikel

Tab. 4: Anzahl der isolierten Ei- und Follikelzellen

Datum	Marmoset Eizellen in hyperosmolarer Salzlösung				Marmoset Eizellen in RNA later							Marmoset Follikelzellen in RNA later				
	G1	G3	G5	G6	G7	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G4	G5	G6	G7
05.07.2000	—	—	—	17	10	—	—	—	—	21	9	—	—	—	✓	✓
16.08.2000	—	—	—	11	—	—	20	30	6	11	14	8	—	✓	✓	✓
21.08.2000	10	—	—	6	—	30	30	60	14	16	7	3	✓	✓	✓	—
30.08.2000	—	10	—	17	6	19	50	40	9	18	17	11	—	✓	✓	✓
12.03.2001	—	19	9	5	—	—	10	20	7	6	8	4	✓	✓	✓	—
insgesamt	10	29	9	56	16	49	110	150	36	72	55	26				

G1- G7: Follikel- bzw. Eizellgrößen:

G1= Eizellgröße <80µm; G2= Eizellgröße zwischen 80-100µm; G3= Eizellgröße >120µm

G4= Zellen aus präantralen Follikeln <400µm; G5= Zellen aus Follikeln <400-599µm;

G6= Zellen aus Follikeln zwischen 600-999µm; G7= Zellen aus Follikeln >1000µm

Haken (✓) = erhaltene Follikelzellen

3.2. Immunhistochemische Identifizierung von Zona Pellucida-Proteinen

Die Antikörpergenerierung gegen einen homologen Sequenzbereich des ZPB-Protein war nicht erfolgreich. Es konnten keine spezifischen Antikörper gewonnen werden.

Zum Nachweis von Zona Pellucida A-Protein und Zona Pellucida C-Protein im Marmoset Ovar wurde das Antiserum AS ZPA-20 und das Antiserum AS ZPC-6 auf Paraffinschnitten eingesetzt. Als Kontrolle diente die Behandlung der Gewebeschnitte mit den entsprechenden Präimmunseren. Nach Zugabe von Anti-Kaninchen-Immunglobulinen als Zweitantikörper, gefolgt von Peroxidase-Anti-Peroxidase-Immunkomplex und DAB als Substrat, konnte die Immunreaktion visualisiert werden. Die Intensität der Braunfärbung war Maßstab für die Stärke der Antigen-Antikörper-Reaktion (Abb. 11).

Antikörper des Anti-ZPA-Antiserums AS ZPA-20 führten zur eindeutigen Anfärbung ovarieller Strukturen. Abhängig vom Follikulogenesestadium war allerdings ein deutlicher Unterschied bezüglich der Lokalisation von ZPA-Protein innerhalb der Zona Pellucida und der Follikelzellen zu verzeichnen (Abb. 11, A, A1-A3). Während bei Primordialfollikeln in der umliegenden Zellschicht nur vereinzelt ZPA-Protein detektiert werden konnte (Abb. 11, A1, I) färbte sich in Primärfollikeln bereits die sich formende Zona Pellucida, das Ooplasma und auch die angrenzende Follikelzellschicht (Abb. 11, A1, II). Dieses Färbemuster konnte auch bei Follikeln späterer Entwicklungsstadien beobachtet werden. In präantralen Follikeln zeigte sich eine positive Immunreaktion ebenfalls innerhalb der Zona Pellucida, dem Ooplasma und den umliegenden Follikelzellen (Abb. 11, A2, III; A3, IV). Sowohl in kleinen präantralen Follikeln (Abb. 11, A2, III) als auch in grossen präantralen Follikeln (Abb. 11, A3, IV) stellte sich die Zona Pellucida als homogener, braun gefärbter Ring als Zeichen der Immunreaktion dar. Eine geringe aber deutlich über der Hintergrundfärbung liegende Anfärbung wurde auch im Ooplasma der Eizellen dieser Follikel beobachtet (Abb. 11, A1-A3, Stern). Zudem zeigte sich eine intensive Antigen-Antikörper-Reaktion in den Follikelzellen der frühen und späten präantralen Follikel (Abb. 11, A2, A3).

Zur Kontrolle der Spezifität der Anti-ZPA-Antikörperbindung und zur Lokalisation von Zona Pellucida C-Protein wurden Ovarschnitte mit Antiserum AS ZPC-6 inkubiert. ZPC-Protein konnte in Marmoset Oozyten eindeutig detektiert werden (Abb. 11, B). Mit Ausnahme der Primordialfollikel wurde ZPC-Protein vor allem innerhalb der Zona Pellucida gefunden (Abb. 11, B, B1-B3). Sowohl in Primärfollikeln (Abb. 11, B1, II) als auch in kleinen (Abb. 11, B2, III) und grossen präantralen Follikeln (Abb. 11, B3, IV) konnte ZPC-Protein lokalisiert

werden; ebenso stellte es sich in kleinen antralen Follikeln dar (Abb. 11, B3, V). Die Zona Pellucida färbte sich in diesen Follikelstadien als ausgeprägter brauner Ring. Im Vergleich zum Färbemuster von ZPA-Antikörper wurde beim Einsatz von AS ZPC-6 eine geringere Immunreaktion innerhalb des Ooplasmas beobachtet (Abb. 11, B2, B3, Stern). Auch innerhalb der umliegenden Follikelzellen wurde im Vergleich zur Lokalisation von ZPA-Protein nur wenig ZPC-Protein detektiert. In Primordialfollikeln (Abb. 11, B1, I), Primärfollikeln (Abb. 11, B1, II) und kleinen präantralen Follikeln (Abb. 11, B2, III) konnte eine schwache Färbung erkannt werden, die für eine geringe Menge an ZPC-Protein innerhalb der Follikelzellen dieser Stadien spricht. Dagegen zeigte sich in grossen präantralen und kleinen antralen Follikeln die Follikelzellen eine nur sehr diskrete, allerdings über dem Niveau der Kontrollexperimente liegende Immunreaktion (Abb. 11, B3, IV und V).

Die Kontrollschnitte, die mit Präimmunserum behandelt wurden, zeigten weder in der Zona Pellucida noch innerhalb des Ooplasmas und der Follikelzellen eine spezifische Färbung (Abb. 11, C, C1-C3).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch das Anti-ZPA-Antiserum AS-ZPA-20 Zona Pellucida A-Protein eindeutig im Ovar des Marmoset-Affen identifiziert werden konnte. Ebenfalls klar zu lokalisieren war Zona Pellucida C-Protein durch das Antiserum AS ZPC-6 im Ovargewebe.

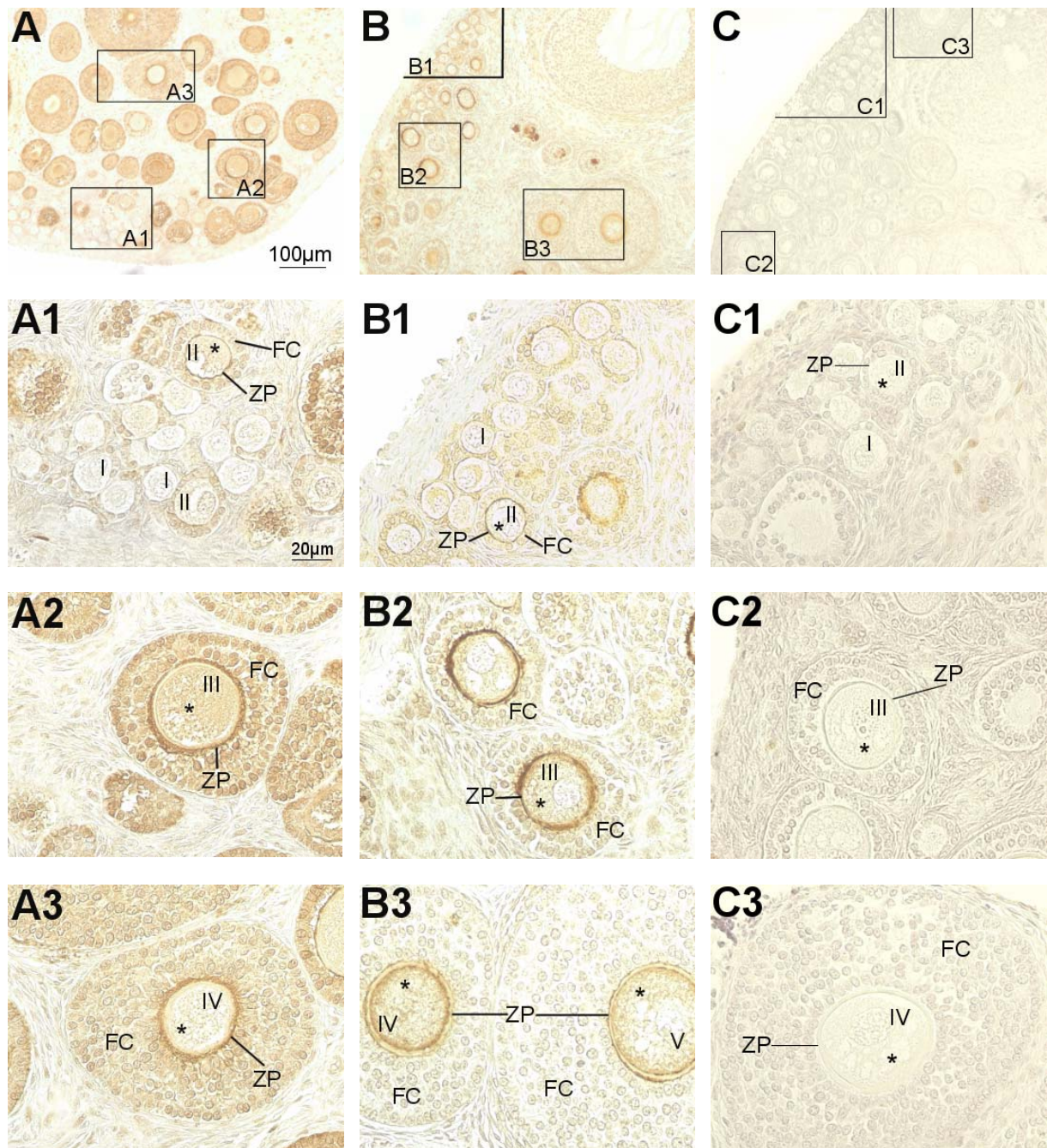


Abb: 11:

Immunhistochemische Detektion von Zona Pellucida-Protein in Ovargewebe des Weissbüschelaffen durch Anti-ZP-Peptid-Antiseren.

Eingesetzt wurden die Antiseren AS ZPA-20 in einer Verdünnung von 1:50 (A, A1-A3), AS ZPC-6 in einer Verdünnung von 1:100 (B, B1-B3), und das Präimmenserum in einer Verdünnung von 1:50 (C, C1-C3). Als Nachweissystem für die Antikörperbindung diente das Peroxidase-Anti-Peroxidase-System und DAB als Substrat.

ZP = Zona Pellucida, FC = Follikelzellen, I = Primordialfollikel, II = Primärfollikel, III = kleiner präantraler Follikel, IV = grosser präantraler Follikel, V = kleiner antraler Follikel, * = Ooplasma.

3.3. Immunelektronenmikroskopische Identifizierung von ZPA und ZPC

Zur ultrastrukturellen Lokalisation von ZPA-Protein und ZPC-Protein im Marmoset Ovar wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen mit dem Anti-ZPA-Antiserum AS ZPA-20, dem Anti-ZPC-Antiserum AS ZPC-6 und dem Präimmunserum durchgeführt. Die Darstellung der Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgte durch Goldpartikel, die an den Zweitantikörper gekoppelt waren.

Ultradünnschnitte aus Ovargewebe des Marmoset-Affen wurden mit Antiserum AS ZPA-20 und Antiserum AS ZPC-6 inkubiert. Als Negativkontrolle diente die Behandlung mit dem Präimmunserum. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 dargestellt. Sowohl bei Verwendung des Anti-ZPA-Antiserums (Abb. 12, A, D, G) als auch bei Verwendung des Anti-ZPC-Antiserums (Abb. 12, B, E, H) konnte eine deutliche Goldmarkierung beobachtet werden. Im Vergleich dazu wurde bei der Inkubation der Ultradünnschnitte mit dem Präimmunserum keine spezifische Goldmarkierung festgestellt (Abb. 12, C, F, I). Der Erhalt der Gewebsstrukturen war durch die relativ schwache Fixierung nicht optimal. Aufgrund dessen war eine eindeutige Zuordnung der Immunogold-Partikel zu bestimmten Ultrastrukturen der Zellen nicht möglich. Durch Einsatz von Antiserum AS ZPA-20, das gegen einen homologen Aminosäuresequenzbereich des ZPA-Proteins in Mensch, Maus und Marmoset gerichtet ist, kam es zu einer deutlichen Antigen-Antikörper-Reaktion im Bereich der Zona Pellucida. Die Immunreaktion zeigte sich durch eine intensive Markierung der Zona Pellucida in Form der Goldpartikel (Abb. 12, D, Pfeil). Bei einer geringen Vergrößerungsstufe (Übersichtsaufnahme) war eine homogene Verteilung der Markierung innerhalb der Struktur der Zona Pellucida zu erkennen (Abb. 12, A), die sich auch in höherer Vergrößerung bestätigte (Abb. 12, D). Am Übergang zu den angrenzenden Kumuluszellen war keine Einschränkung der Immunreaktion zu beobachten. Auch in diesem Bereich war eine deutlich positive Reaktion nach Einsatz von AS ZPA-20 sichtbar. Diese positive Immunreaktion an der Kontaktstelle von Zona Pellucida und innerster Kumuluszellschicht setzte sich auch innerhalb des Zytoplasmas der Kumuluszellen fort. Es konnte eine eindeutige Antigen-Antikörper-Reaktion mit AS ZPA-20 in den Kumuluszellen dargestellt werden (Abb. 12, G, Pfeil). Im Vergleich zur Markierung der Zona Pellucida war zwar eine geringere Goldpartikeldichte erkennbar, die Verteilung der gebundenen Goldpartikel lag allerdings deutlich über dem Kontrollwert des Präimmunserums.

Antiserum AS ZPC-6 richtet sich gegen ein Peptid, dessen Sequenz identisch ist zu einem homologen Aminosäurebereich des ZPC-Proteins bei Mensch, Maus und Marmoset. Sein

Einsatz resultierte in einer eindeutig positiven Reaktion, wobei sich die Goldmarkierung hier fast ausschließlich im Bereich der Zona Pellucida befand (Abb. 12, E, Pfeil). Auffällig war, daß es zu keiner homogenen Verteilung der Immunogold-Partikel innerhalb der Zona Pellucida kam. Bereits im Überblick ließ sich eine stärkere Markierung der inneren Anteile der Zona Pellucida erkennen (Abb. 12, B). Bei stärkerer Vergrößerung konnte dies bestätigt werden. Während im inneren Bereich der Zona Pellucida die stärkste Immunreaktion nachweisbar war (Abb. 12, E, Pfeil), nahm diese im äusseren Bereich fast vollständig ab (Abb. 12, E, Stern). Die geringe Goldmarkierung könnte im Zusammenhang mit Kontaktstellen zwischen Zona Pellucida und Kumuluszellen stehen. Es konnte nämlich in diesem Areal die Verzahnung von Zona Pellucida und der innersten Kumuluszellschicht durch Zellausläufer der Kumuluszellen gezeigt werden (Abb. 12, E, Punkt). Im Inneren der Kumuluszellen fanden sich ganz vereinzelt Goldkörnchen (Abb. 12, H). Diese Reaktion war vergleichbar mit der des Präimmunserums. Aufgrund dessen wurde nicht von einer spezifischen Antikörperbindung ausgegangen.

Nur eine geringgradige Hintergrundmarkierung zeigte sich durch Einsatz des Präimmunserums in den Kontrollexperimenten (Abb. 12, C, F, I). Die Markierung der Zona Pellucida und umliegender Kumuluszelle durch AS ZPA-20, sowie AS ZPC-6 waren folglich durch spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen bedingt. Aufgrund dessen kann von einem eindeutigen Nachweis von ZPA-Protein und ZPC-Protein durch die verwendeten Antiseren im Marmoset Ovar ausgegangen werden.

Die Lokalisation von ZPA- und ZPC-Protein konnte mit Hilfe der Immunelektronenmikroskopie bestätigt werden. Beide eingesetzten Antiseren sind demnach auch im Marmoset Modell für den Nachweis und zur Lokalisation von Zona Pellucida-Protein verwendbar.

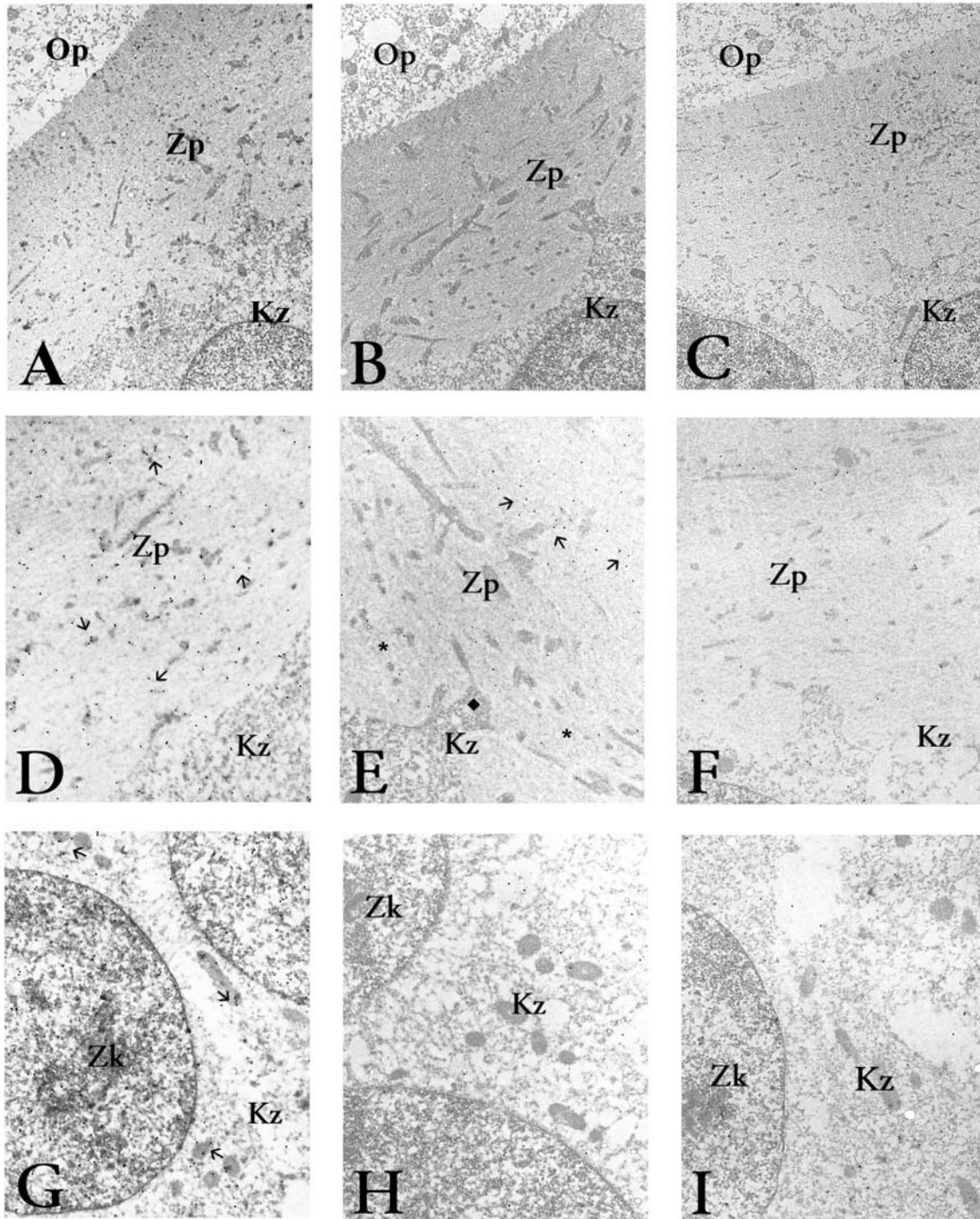


Abb. 12:

Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen mit Anti-ZPA-Peptid- und Anti-ZPC-Peptid-Antikörpern auf Ovarschnitten des Weissbüschelaffen.

Frisches Ovargewebe des Marmoset-Affen wurde mit Immunfixanz fixiert und in LR-White eingebettet. Ultradünnschnitte wurden mit den Antiseren AS ZPA-20 (A, D, G), AS ZPC-6 (B, E, H) und dem Präimmunserum (C, F, I) inkubiert. Zur Detektion der an ZP-Protein gebundenen Antikörper wurden mit 20nm grossen Goldpartikeln markierte Anti-Kaninchen-IgG eingesetzt. Op=Ooplasma, Zp=Zona Pellucida; Kz=Kumuluszellen, Zk=Zellkern, Pfeil: Goldpartikel; ◆: Kumuluzellausläufer; ★: Kumuluszell-nahes Areal der Zona Pellucida. Vergrösserungsfaktoren: A, B, C x 3597; D, E, F, G, H, I x 10000.

3.4. Färbeverhalten im Hemizona-Antikörper-Bindungsassay (HABA)

3.4.1. Unbehandelte Hemizonae

Der Hemizona-Antikörper-Bindungsassay (HABA) diente zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit der Anti-ZPA-Peptid-Antikörper an natives Zona Pellucida A-Protein. Untersucht wurden Hemizonae, die von Marmoset-Oozyten gewonnen worden waren. Die Intensität der Antikörperbindung an die Zona Pellucida wurde durch die Bewertung der Braunfärbung nach der Immun-Peroxidase-Reaktion ermittelt (Score 1-10). Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tab. 5 zusammengefasst.

Das Anti-ZPA-Antiserum AS ZPA-20 führte zu einer geringen Braunfärbung der Hemizonae des Marmoset-Affen. Durchschnittlich wurde eine Färbungsintensität von 1,95 ermittelt. Die mit Präimmenserum inkubierten korrespondierenden Hemizonae zeigten ebenfalls eine geringe Färbung mit einem Mittelwert von 1,70. Die Differenz der Farbreaktion zwischen Test- und Kontroll-Hemizonae ergab einen Durchschnittswert von 0,95. Die statistische Analyse mit einem einseitigen t-Test für verbundene Stichproben ergab einen P-Wert von 0,36. Aufgrund dessen konnte die Nullhypothese H_0 , die von keinem signifikanten Unterschied im Färbeverhalten der korrespondierenden Zona Pellucida-Hälften ausgeht, nicht verworfen werden.

Tab.5: Hemizona-Antikörper-Bindungstest mit frisch gewonnenen Hemizonae aus Marmoset-Oozyten

Anti-ZPA-Antiserum	Test-HZ	Kontroll-HZ	$\Delta_{\text{Test-Kontrolle}}$	P-Wert*	Anzahl (n)
AS ZP2-20	1,95±0,32 [#]	1,70±0,58 [#]	0,95±0,46 [#]	0,36	5

Die Intensität der Färbungen wird in einer Skala von 0 (keine Färbung) bis 10 (sehr starke Färbung) bewertet.

* errechnet mit einem einseitigen t-Test für verbundene Stichproben

[#] Mittelwert±SEM; HZ: Hemizonae; Δ : Differenz

Nach Untersuchung der Antikörperbindungsfähigkeit an natives Zona Pellucida Glykoprotein un behandelter Hemizonae sollte in weiteren Untersuchungen die Bindungskapazität der Anti-ZPA-Peptid-Antikörper an die Zona Pellucida nach deren Einsatz im Kompetitions-Hemizona-Assay beurteilt werden. Dazu wurden Hemizonae, die zuvor in funktionellen Spermatozoenbindungsstudien eingesetzt worden waren, der Immun-Peroxidase-Reaktion unterzogen.

3.4.2. Hemizonae nach Einsatz im K-HZA mit AS ZPA-20

Marmoset-Hemizonae, die im Kompetitions-Hemizona-Assay mit Anti-ZPA-Antiserum AS ZPA-20 inkubiert worden waren, zeigten eine relativ schwache Braunfärbung. Der Mittelwert der Farbreaktion lag bei 1,94. Die korrespondierenden Zona Pellucida-Hälften, die in den Spermatozoenbindungsversuchen mit Präimmunserum behandelt worden waren, wiesen ebenfalls eine geringe Färbeintensität mit einem mittlerer Score von 1,31 auf. Daraus ergab sich für die Differenz der Färbung zwischen Test- und Kontroll-Hemizonae ein Mittelwert von 0,86. Nach statistischer Auswertung der Daten mit einem einseitigen t-Test innerhalb einer verbundenen Versuchsanordnung wurde ein P-Wert von 0,06 ermittelt. Dieses Ergebnis zeigte keinen signifikanten Unterschied der Braunfärbung der Zona Pellucida-Hälften (Tab. 6).

Tab. 6: Hemizona-Antikörper-Bindungstest mit Hemizonae nach Einsatz im Kompetitions-Hemizona-Assay

Anti-ZPA-Antiserum	Test-HZ	Kontroll-HZ	$\Delta_{\text{Test-Kontrolle}}$	P-Wert*	Anzahl (n)
AS ZPA-20	1,94±0,34 [#]	1,31±0,27 [#]	0,86±0,30 [#]	0,056	9

Die Intensität der Färbungen wird in einer Skala von 0 (keine Färbung) bis 10 (sehr starke Färbung) bewertet.

* errechnet mit einem einseitigen t-Test für verbundene Stichproben

[#] Mittelwert±SEM; HZ: Hemizonae; Δ : Differenz

3.4.3. Hemizonae nach K-HZA mit mAb ZPA-20

Hemizonae aus Marmoset-Oozyten, die im Kompetitions-Hemizona-Assay mit dem monoklonalen Anti-ZPA-Peptid-Antikörper mAb ZPA-20 inkubiert worden waren, zeigten ein ähnliches Färbeverhalten zu den mit AS ZPA-20 inkubierten Hemizonae. Der Antikörper markierte die Test-Hemizonae ebenfalls nur schwach, obgleich stärker als das polyklonale Anti-ZPA-Antiserum AS ZPA-20. Es konnte ein Mittelwert von 2,13 berechnet werden. Die Kontroll-Hemizonae, die mit reinem Kulturmedium inkubiert worden waren, waren mit einem Score von 1,81 gering gefärbt. Für die Differenz zwischen Test- und Kontroll-Hälften der Zonae Pellucidae wurde ein mittlerer Wert von 1,19 errechnet. Aufgrund des geringen Stichprobenumfanges war keine Normalverteilung gegeben, so dass keine statistische Analyse möglich war. Der Vergleich der Mittelwerte von Test- und Kontroll-Hemizonae deutete aber darauf hin, dass auch der Einsatz des monoklonalen Anti-ZPA-Antikörpers keine deutlich unterschiedliche Färbungsintensität der Test- und Kontrollgruppe nach sich zog (Tab. 7).

Tab. 7: Hemizona-Antikörper-Bindungstest mit Hemizonae nach Einsatz im Kompetitions-Hemizona-Assay

Anti-ZPA-Antikörper	Test-HZ	Kontroll-HZ	$\Delta_{\text{Test-Kontrolle}}$	Anzahl (n)
mAb ZPA-20	2,13±0,38 [#]	1,81±0,66 [#]	1,19±0,24 [#]	4

Die Intensität der Färbungen wird in einer Skala von 0 (keine Färbung) bis 10 (sehr starke Färbung) bewertet.

[#] Mittelwert±SEM; HZ: Hemizonae; Δ : Differenz

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, dass die Anti-ZPA-Antikörper, die gegen eine homologe Aminosäuresequenz in Maus, Mensch und Marmoset gerichtet sind, nur relativ schwach an die Zona Pellucida der Marmoset-Eizellen banden. Trotz einer relativ geringen Anzahl verfügbarer korrespondierender Zona Pellucida-Hälften konnte dieses Bindungsverhalten tendenziell in allen Untersuchungen beobachtet werden. Scheinbar

unabhängig davon war, ob die Hemizonae vor der Immun-Peroxidase-Reaktion bereits im Kompetitions-Hemizona-Assay eingesetzt worden waren, oder ob unbehandeltes Zona Pellucida-Protein vorlag. In statistisch auswertbaren Untersuchungen waren keine signifikanten Unterschiede der mit Antikörper inkubierten Test-Hemizonae zu den Kontrollhälften erkennbar.

3.5. Spermatozoenbindungsstudien: Kompetitions-Hemizona-Assay

Zur Überprüfung des Einflusses von Anti-ZPA-Antikörpern auf die Spermatozoen-Eizell-Interaktion im Marmoset Modell wurde erstmals der Kompetitions-Hemizona-Assay etabliert. Dabei wurde die Anzahl der gebundenen Spermatozoen pro Hemizona ermittelt (Abb. 13).

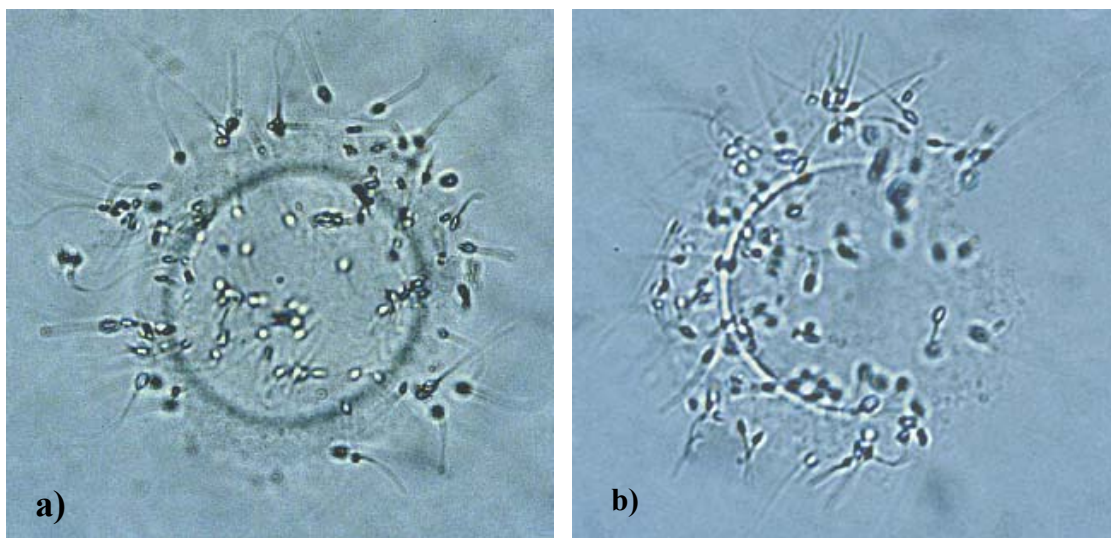


Abb. 13:

Kompetitions-Hemizona-Assay mit Oozyten und Spermatozoen des Weißbüschelaffen, *Callithrix jacchus*.

Darstellung der Spermatozoenbindung an die mit Antiserum AS ZPA-20 inkubierte Test-Hemizona (a) bzw. an die mit Präimmunsereum inkubierte Kontroll-Hemizona (b). Die Seren wurden in einer 1:30 verdünnten 0,3% (w/v) BSA/Leibovitz-Lösung eingesetzt.

Originalvergrößerung: 40x

In Vorversuchen zum Kompetitions-Hemizona-Assay fiel auf, dass die Spermatozoenbindung von der Dauer der Lagerung der Marmoset-Eizellen in hyperosmolarer Salzlösung abhing. Es konnte eine drastische Abnahme der Anzahl gebundener Spermatozoen pro Eizelle bei Verlängerung der Lagerungsdauer in hyperosmolarer Salzlösung beobachtet werden (Abb. 14).

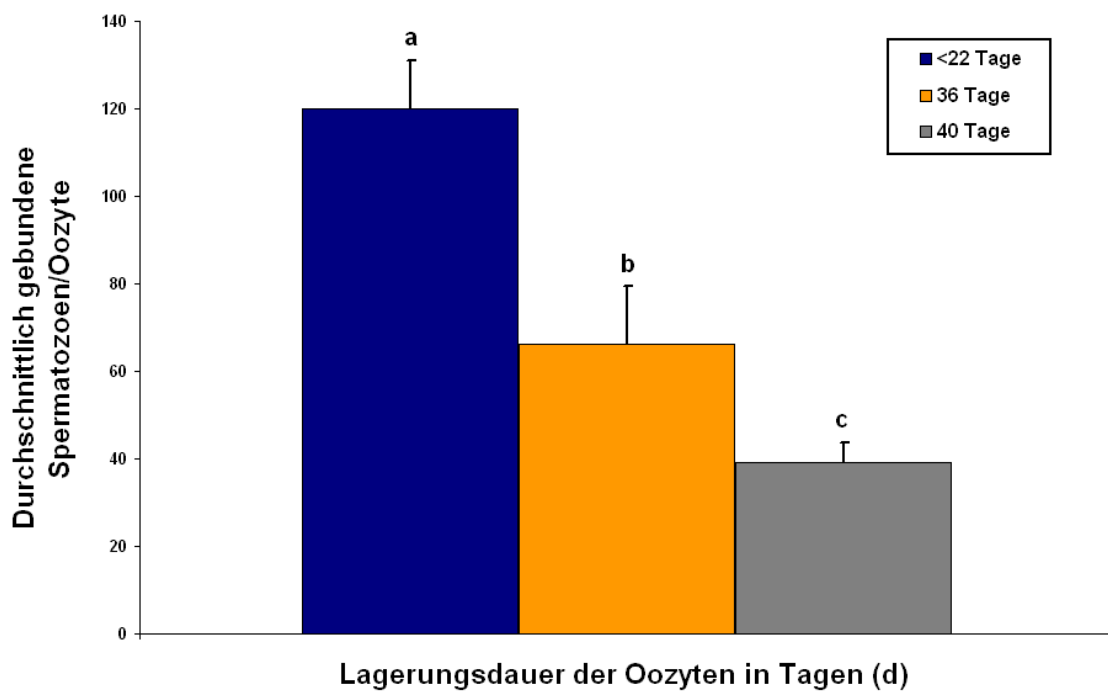


Abb. 14:

Beeinflussung der Spermatozoenbindungskapazität durch die Lagerungsdauer der Oozyten in hyperosmolarer Salzlösung (a=innerhalb von 22 Tagen; b=innerhalb von 36 Tagen; c=innerhalb von 40 Tagen)

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. a vs. b $P < 0,01$; a vs. c $P < 0,001$

Waren die Oozyten (n=13) weniger als 22 Tage im Lagerungsmedium aufbewahrt worden, banden durchschnittlich 120 Spermatozoen an eine Marmoset-Eizelle (Abb. 14, a). Verlängerte sich die Aufbewahrungszeit der Eizellen in hyperosmolarer Salzlösung auf 36 Tage (n=7), nahm die Anzahl der gebundenen Spermatozoen stark ab. An diese waren im Durchschnitt nur noch 66 Spermatozoen gebunden (Abb. 14, b). Nach statistischer Auswertung der Ergebnisse mit Hilfe eines Tukey-Test (GraphPad InStat) zeigte sich eine signifikante Abnahme der Spermatozoenbindung bei Verlängerung der Oozytenlagerung in hyperosmolarer Salzlösung ($P < 0,01$). Ein hoch signifikantes Ergebnis konnte sogar bei Verlängerung der Eizell-Lagerungszeit auf 40 Tage beobachtet werden ($P < 0,001$). Hier konnten letztlich nur noch 39 fest gebundene Spermatozoen im Durchschnitt an den Eizellen (n=7) gezählt werden.

Diese Abhängigkeit der Spermatozoenbindungsfähigkeit von der Oozytenlagerung in hyperosmolarer Salzlösung hatte allerdings keinen Einfluss auf die Aussagekraft des Kompetitions-Hemizona-Assays, da dieser die Bindungskapazität der Spermatozoen an die korrespondierenden Zona Pellucida-Hälften einer Oozyte vergleicht (interne Kontrolle).

Nach Optimierung der Lagerzeit der Oozyten wurde anschließend der Kompetitions-Hemizona-Assay mit den entsprechenden Antiseren durchgeführt.

3.5.1. K-HZA mit AS ZPA-20

Nach Inkubation der Test-Hemizonae mit dem Antiserum AS ZPA-20 konnten im Durchschnitt 51,4 gebundene Spermatozoen an den Zona Pellucida-Hälften nachgewiesen werden. An die korrespondierenden Zona Pellucida-Hälften, die als interne Kontrolle mit einem Präimmenserum inkubiert wurden, banden durchschnittlich 53,4 Spermatozoen. Der sich daraus ergebende mittlere Hemizona-Index betrug 99,3. Die Analyse des mittleren Hemizona-Indexes zum Bezugswert 100 mit einem unverbundenen zweiseitigen t-Test ergab eine Wahrscheinlichkeit P von 0,86 (Tab. 8). Aufgrund dieser statistischen Analyse konnte die Nullhypothese, die davon ausgeht, dass an Test- und Kontrollhemizonae trotz unterschiedlicher Inkubation gleich viele Spermatozoen binden, nicht verworfen werden. Die Beibehaltung der Nullhypothese besagt, dass der Einsatz des Antiserums AS ZPA-20 keinen Einfluss auf die Spermatozoenbindungsfähigkeit hatte.

Tab. 8: Kompetitions-Hemizona-Assay mit AS ZPA-20

Anti-ZPA-Antiserum	Anzahl der gebundenen Spermatozoen an die Test-HZ	Anzahl der gebundenen Spermatozoen an die Kontroll-HZ	Durchschnitt der HZI	P-Wert _{HZI} *	Anzahl der (n)
AS ZPA-20	51,4 ± 5,3 [#]	53,4 ± 5,7 [#]	99,3 ± 4,0 [#]	0,86	23

* errechnet mit einem zweiseitigen t-Test für unverbundene Stichproben

[#] Mittelwert ± SEM; HZ: Hemizonae; HZI: Hemizona-Indices; EZ: Eizelle

3.5.2. K-HZA mit mAb ZPA-20

Um eventuell störende Einflüsse durch den Einsatz von polyklonalen Antikörper (Antiseren) zu vermeiden, wurde in einem weiteren Versuchsansatz der monoklonale Antikörper mAb ZPA-20 eingesetzt. Hierbei lag die Zahl der gebundenen Spermatozoen im Durchschnitt bei 19,0 Spermatozoen nach Antikörperinkubation der Test-Hemizonae. An die Kontroll-Hemizonae, die mit dem reinen Kulturmedium behandelt waren, banden durchschnittlich 18,4 Spermatozoen. Aus den Werten aller Zona Pellucida-Hälften wurde im Mittel ein Hemizona-Index von 103,1 errechnet. Zum Bezugswert 100, bei dem an Test- und Kontroll-Hemizonae gleich viele Spermatozoen gebunden hätten, ergab die statistische Analyse einen Wahrscheinlichkeitswert P von 0,74 (Tab. 9), somit war kein statistisch signifikanter Einfluss des mAb ZPA-20 auf das Bindungsverhalten der Spermatozoen an die Zona Pellucida nachzuweisen.

Tab. 9: Kompetitions-Hemizona-Assay mit dem monoklonalen Anti-ZPA-Antikörper mAb ZPA-20

Anti-ZPA-Antikörper	Anzahl der gebundenen Spermatozoen an die Test-HZ	Anzahl der gebundenen Spermatozoen an die Kontroll-HZ	Durchschnitt der HZI	P-Wert _{HZI} *	Anzahl der EZ (n)
mAb ZPA-20	19,0±3,5 [#]	18,4±3,4 [#]	103,1±9,2 [#]	0,74	5

* errechnet mit einem zweiseitigen t-Test für unverbundene Stichproben

[#] Mittelwert±SEM; HZ: Hemizonae; HZI: Hemizona-Indices; EZ: Eizelle

3.5.3. K-HZA mit direktem Vergleich der Antiseren AS ZPA-20 und AS ZPA-26

Der Vergleich von Antiserum AS ZPA-20 und AS ZPA-26, das gegen das humanspezifische Peptid 26 gerichtet ist, zeigte keinen Unterschied in der Spermatozoenbindung. Wurden die Hemizonae mit AS ZPA-20 inkubiert, banden im Durchschnitt 15,5 Spermatozoen. An den korrespondierenden Hemizonae, die mit AS ZPA-26 inkubiert worden waren, konnten noch 16,0 Spermatozoen nachgewiesen werden. Es wurde von allen Zonae Pellucidae ein durchschnittlicher Hemizona-Index von 96,8 ermittelt. Da nur eine sehr geringe Anzahl von Hemizonae für diesen Versuchsansatz zur Verfügung stand, war eine Normalverteilung der Werte als Grundlage der statistischen Auswertung nicht gegeben. Aufgrund dessen war die statistische Analyse der Werte nicht möglich. Der Vergleich der Mittelwerte von Test und Kontrolle und auch des Mittelwertes der Hemizona-Indices ließ tendenziell keinen Unterschied der Spermatozoenbindungskapazität, der mit verschiedenen Anti-ZPA-Antiseren inkubierten Hemizonae erkennen (Tab. 10).

Tab. 10: Direkter Vergleich von AS ZPA-20 und AS ZPA-26 im Kompetitions-Hemizona-Assay

Anzahl der gebundenen Spermatozoen an die mit <u>AS ZPA-20</u> inkubierten Hemizonae	Anzahl der gebundenen Spermatozoen an die mit <u>AS ZPA-26</u> inkubierten Hemizonae	Durchschnitt der HZI	Anzahl der EZ (n)
15,5±2,2 [#]	16±2,2 [#]	96,8±7,8 [#]	4

[#] Mittelwert±SEM; HZI: Hemizona-Indices; EZ: Eizelle

3.5.4. K-HZA mit direktem Vergleich der affinitätschromatographisch gereinigten Antikörper aus AS ZPA-20 und AS ZPA-26

Um eine mögliche unspezifische Antigenblockade durch im Serum enthaltener Immunglobuline zu vermeiden, wurden auch affinitätschromatographisch gereinigte Antikörper eingesetzt. Die affinitätschromatographisch angereicherten Antikörper der Antiseren AS ZPA-20 und AS ZPA-26 wurden ebenfalls direkt miteinander verglichen (Tab. 11). Auch hier kam es zu keiner Beeinflussung der Spermatozoenbindung an die Zona Pellucida-Hälften. An die Test-Hemizonae, die mit den gereinigten Antikörpern des AS ZPA-20 inkubiert waren, banden im Mittel 25,0 Spermatozoen. Im Vergleich dazu zeigte die Inkubation der Kontroll-Hälften mit den gereinigten Antikörpern des AS ZPA-26 keinen Einfluss auf die Spermatozoenbindungskapazität. Im Durchschnitt banden an diese Hemizonae 24,3 Spermatozoen. Es errechnete sich ein mittlerer Hemizona-Index von 99,5. Aufgrund der geringen Anzahl verfügbarer Marmoset-Eizellen konnte auch dieses Experiment nur mit einem sehr kleinen Stichprobenumfang durchgeführt werden. Aber auch hier ließen sich sowohl durch den Vergleich der Mittelwerte der korrespondierenden Zona Pellucida-Hälften, als auch durch den Vergleich des Mittelwertes der Hemizona-Indices mit dem Bezugswert 100 keine Zeichen einer Beeinflussung der Spermatozoenbindungsfähigkeit an die Hemizonae erkennen.

Tab. 11: Kompetitions-Hemizona-Assay im direkten Vergleich zwischen den affinitätschromatographisch gereinigten Antikörpern der Antiseren AS ZPA-20 und AS ZPA-26

Anzahl der gebundenen Spermatozoen an die mit <u>affi-gereinigten Ak des AS ZPA-20</u> inkubierten Hemizonae	Anzahl der gebundenen Spermatozoen an die mit <u>affi-gereinigten Ak des AS ZPA-26</u> inkubierten Hemizonae	Durchschnitt der HZI	Anzahl der EZ (n)
25,0±5,6 [#]	24,3±3,7 [#]	99,5±7,9 [#]	4

[#] Mittelwert±SEM; HZI: Hemizona-Indices; EZ: Eizelle

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass kein Einfluss der Spermatozoenbindungs-fähigkeit an die Zona Pellucida nach Einsatz der Anti-ZPA-Antikörper zu beobachten war. Sowohl die Antiseren AS ZPA-20 und AS ZPA-26, als auch die affinitätschromatographisch aufgereinigten Antikörper hatten keinerlei Effekte auf die Spermatozoen-Eizell-Interaktion im Marmoset Modell. Selbst der Einsatz des monoklonalen Anti-ZPA-Antikörper mAb ZPA-20, der gegen das gleiche Protein-Epitop gerichtet ist wie AS ZPA-20, hatte keine Veränderung der Spermatozoenbindungs-fähigkeit an den Zona Pellucida-Hälften zur Folge.

3.6. Darstellung der Expression Zona Pellucida-Protein kodierender Gene

Nach Isolierung der mRNA aus Ei- und Follikelzellen wurde die Reverse-Transkriptase-Reaktion zur Herstellung der komplementären cDNA durchgeführt. Die gewonnene cDNA diente als Template der folgenden PCR. Durch Einsatz Spezies spezifischer Primer wurden ausgesuchte cDNA-Fragmente amplifiziert und im Agarosegel dargestellt. Die eingesetzten Marmoset-Primer sind in Tab. 12 aufgelistet.

Die vervielfältigten cDNA-Sequenzabschnitte stellten sich im Ethidiumbromid haltigen Agarosegel unter UV-Licht als sichtbare Bande dar. Zur ersten Abschätzung, ob es sich bei den PCR-Banden wirklich um das gesuchte cDNA-Teilstück handelte, diente die Bestimmung

der Fragmentgröße mit Hilfe eines 100-Basenpaarmarkers, der ebenfalls im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt war. Letztlich konnte aber nur durch die Sequenzierung der PCR-Produkte die eindeutige Identifizierung erfolgen. Der Nachweis der gesuchten cDNA-Sequenzabschnitte der Zona Pellucida-Proteine war der Beweis einer aktiven Expression der Zona Pellucida-Protein kodierenden Gene.

Tab. 12: Auflistung der eingesetzten Primer

Spezies/Gen	Primer	Primersequenz	AT (°C) errechnet	AT (°C) eingesetzt	Position	Fragmentgrösse (bp)
Marmoset ZPB	5-HCZPB	5'-CCAGTGGTGAAGTTGCTTCCG-3'	57°C	56°C	1149-1168	465bp
	3-HCZPB	5'-GGCTTGGAGTAGAATCATGG-3'	55°C	56°C	1594-1613	
Marmoset ZPA	5-CZPA	5'-ATGACTGCTGGGCAACGTCC-3'	59°C	59°C	1649-1668	362bp
	3-CZPA	5'-CAACAGGAGAAATGGGTCCCG-3'	59°C	59°C	1991-2010	
Marmoset ZPC	5-BZPC	5'-AATGCCCTGGTGTACAGCAC-3'	57°C	61°C	333-351	388bp
	3-BZPC	5'-TGGAAGTCCACGATGGTGTG-3'	57°C	61°C	701-720	
HGAPDH	5-HGAPDH	5'-CGTCTTCACCACCATGGAGA-3'	57°C	59°C	375-394	300bp
	3-HGAPDH	5'-CGGCCATCACGCCACAGTTT-3'	59°C	59°C	655-674	
HIGAPDH	5-HIGAPDH	5'-GGCTCCCACCTTCTCAT-3'	56°C	59°C	4039-4056	241bp
	3-HAGPDH	5'-CGGCCATCACGCCACAGTTT-3'	59°C	59°C	4250-4279	
BMP15	5-BMP15	5'-CATTCACTGGGTACATGCT-3'	55°C	63°C	193-212	237bp
	3-BMP15	5'-TAGTTGGAGATGATGGCGGT-3'	55°C	63°C	410-429	

3.6.1. RT-PCR zur Darstellung der ZP mRNA-Expression in Marmoset-Oozyten

Insgesamt wurden aus je sieben Oozyten unterschiedlicher Follikelstadien (Follikel < 400 µm, 400-599 µm, 600-999 µm und > 1000 µm) und Eizellgrößen (EZ < 80 µm, 80-100 µm und > 120 µm) die mRNA isoliert. Davon ausgehend wurde nach Herstellung des komplementären cDNA-Stranges die Polymerasekettenreaktion durchgeführt. In jeder Eizellgruppe wurde mit Hilfe der selbst konzipierten, Marmoset spezifischen Primern für jedes Zona Pellucida-Glykoprotein ein cDNA-Fragment amplifiziert.

Als Positivkontrolle diente zur Überprüfung der Testmethode die Amplifizierung eines cDNA-Fragments eines „House-Keeping-Gens“. In unseren Untersuchungen wurde dafür die humane Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (HGAPDH), deren mRNA in fast jeder Zelle exprimiert wird, eingesetzt.

Mit Hilfe der originalen Nukleotidsequenz und der Position der spezifischen Primer konnte die Größe des zu amplifizierenden Fragmentes berechnet werden. Erwartet wurde für das ZPB-Amplifikationsprodukt eine Größe von 465 bp, für das zu vervielfältigende ZPA-Fragment eine Größe von 362 bp und für das ZPC-cDNA-Fragment eine Länge von 388 bp. Für die Positivkontrolle HGAPDH wurde eine Größe des Amplifikats von 300 bp kalkuliert.

Im Agarosegel zeigte sich nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte, dass ausgehend von der mRNA aus Eizellen verschiedener Größe und Follikelstadien alle erhaltenen Amplifikationsprodukte im errechneten Größenbereich lagen: das ZPB-Fragmente war ca. 460 bp groß, das ZPA-Produkt hatte eine Größe von ca. 360 bp und das ZPC-Amplifikat stellte sich mit einer Länge von ca. 390 bp dar. Die vervielfältigte HGAPDH-Sequenz hatte ca. 300 bp.

Als Negativkontrolle wurden Polymerasekettenreaktionen durchgeführt, bei denen im Versuchsansatz das Template (cDNA) durch Wasser ersetzt wurde. Die übrigen Versuchsbedingungen blieben identisch. Bei diesen Proben wurden keine Sequenzbereiche amplifiziert (nicht gezeigt).

Die Resultate der RT-PCR sind im Folgenden in Abb. 15 und 16 dargestellt.

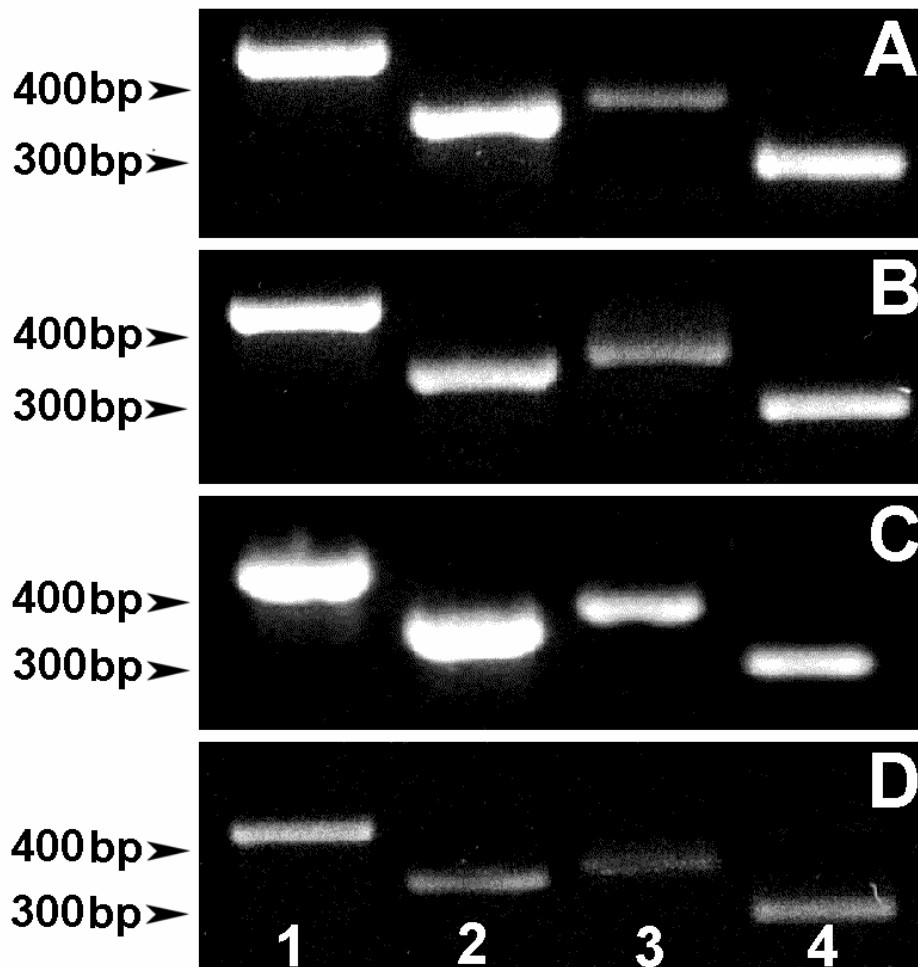
❖ mRNA-Expression in Eizellen aus definierten Follikelgrößen

Abb. 15:

Genexpression von ZPA, ZPB und ZPC in Marmoset Eizellen aus definierten Follikelgrößen.

Gezeigt sind PCR-Fragmente nach Einsatz der cDNA von Marmoset Eizellen aus Follikeln mit einem Durchmesser von (A) $<400\mu\text{m}$ (präantrale Follikel), (B) $400\text{--}599\mu\text{m}$ (periantrale Follikel), (C) $600\text{--}999\mu\text{m}$ (kleine antrale Follikel) und (D) $>1000\mu\text{m}$ (große antrale Follikel).

Spur 1: ZPB-Fragment mit 465 bp; Spur 2: ZPA-Fragment mit 362 bp; Spur 3: ZPC-Fragment mit 388 bp; Spur 4: HGAPDH-Fragment mit 300 bp.

Am linken Bildrand ist die Markierung der Basenpaargröße gezeigt.

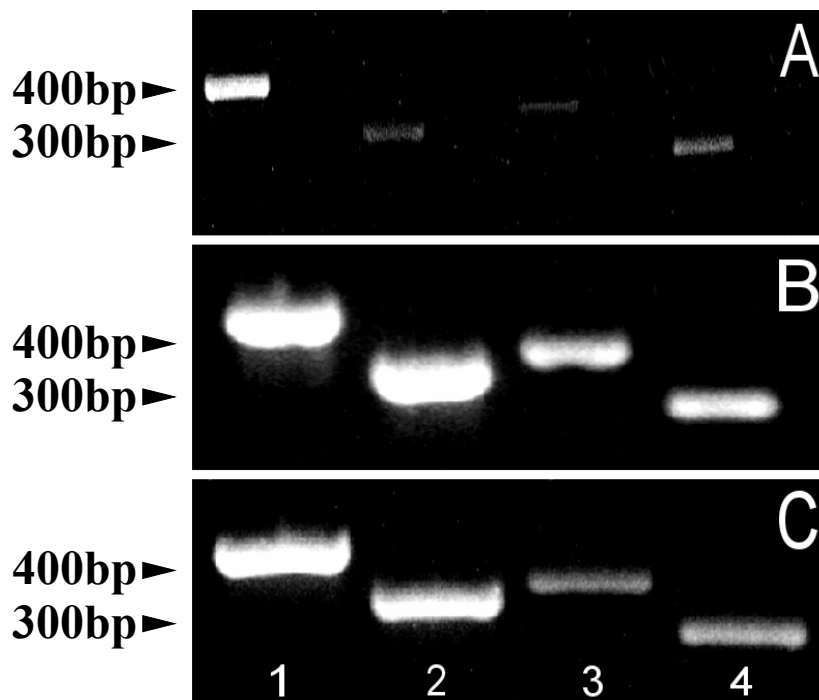
❖ mRNA-Expression in Oozyten mit einer definierten Zellgröße

Abb. 16:

ZPA, ZPB und ZPC Genexpression in Marmoset Eizellen definierten Zellgrössengrößen. Gezeigt sind die Amplikons nach Einsatz der cDNA von Marmoset Eizellen mit einer Zellgröße von (A) $<80\mu\text{m}$, (B) $80-100\mu\text{m}$ und (C) $>120\mu\text{m}$.

Spur 1: ZPB-Fragment mit 465 bp; Spur 2: ZPA-Fragment mit 362 bp; Spur 3: ZPC-Fragment mit 388 bp; Spur 4: HGAPDH-Fragment mit 300 bp.

Am linken Bildrand ist die Markierung der Basenpaargröße gezeigt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die aktive Proteinsynthese der Zona Pellucida-Proteine durch Nachweis der mRNA-Expression in den Eizellen verschiedener Zell- und auch verschiedener Follikelgrößen nachgewiesen werden konnte.

Die Intensität der Genexpression scheint innerhalb der verschiedenen Entwicklungsstufen der eingesetzten Oozyten unterschiedlich ausgeprägt. Die Beurteilung der Expressionsstärke erfolgte in diesem Stadium der Experimente nur auf Grund der Ausprägung der Bandenstärke im Agarosegel. Bezogen darauf scheint es, dass in allen Entwicklungsstadien der Eizelle ZPC im Vergleich zu ZPB und ZPA in geringerem Maße exprimiert wird. Dagegen war die Bandenstärke der PCR-Fragmente von ZPA und ZPC in fast allen Stadien annähernd gleich, was auf eine Genexpression in ähnlichem Ausmass hinweisen könnte. Ausnahme dieser

Beobachtungen waren die Ergebnisse sehr kleiner Eizellen (<80µm). Hier deuten die Bandenstärken der PCR-Produkte im Agarosegel auch auf einen Unterschied der Genexpression zwischen ZPB und ZPA hin. Um eine exakte Aussage über die Expressionsstärke der ZP-kodierenden Gene machen zu können ist der Einsatz der quantitativen RT-PCR für weitere Versuche notwendig. Dies wird Gegenstand von Folgearbeiten sein.

3.6.1.1. Sequenzierung der PCR-Fragmente

Zur Überprüfung, ob es sich bei den dargestellten PCR-Fragmenten tatsächlich um Teilbereiche der Nukleotidsequenz der die Zona Pellucida-Proteine kodierenden Gene handelte, wurden die PCR-Produkte nach ihrer Aufbereitung der Firma MWG Biotech zur Sequenzierung zugesandt.

Die Sequenzierung der amplifizierten PCR-Fragmente zeigte, dass es sich ohne Zweifel um Teilbereiche der DNA-Sequenzen der Zona Pellucida Glykoproteine des Weissbüschelaffen handelte. Somit war eindeutig nachgewiesen, dass die Proteine der Zona Pellucida in verschiedenen Wachstums- und Entwicklungsstufen der Eizelle von dieser aktiv synthetisiert wurden.

◆ Sequenzierergebnis des ZPB-Fragmentes

Das PCR-Produkt mit der Größe von ca. 460 bp zur Darstellung des Zona Pellucida B-Proteins wurde sequenziert. Von beiden Stränge der amplifizierten cDNA-Zielsequenz wurde ausgehend von dem jeweiligen Primer die Nukleotidabfolge dargestellt. Der Vergleich der Sequenzen beider Stränge mit der in der Datenbank eingetragenen Nukleotidfolge des Zona Pellucida B-Proteins ergab jeweils eine Übereinstimmung von 99%.

Der sequenzierte Plus-Strang, ausgehend vom 5'-HCZPB-Primer hatte eine Länge von 434 bp. Innerhalb dessen lag ein mismatch (= anderes Nukleotid im Vergleich zum Original) vor (Abb. 17).

Abb. 17: Sequenzvergleich des Plus-Stranges mit der Originalsequenz

```

A: 4   cccatttacgtggaggtctccatccttcacagaacagacccccacctagagctgttcctg 63
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B: 1173 cccatttacgtggaggtctccatccttcacagaacagacccccacctagagctgttcctg 1232

A: 64   catcagtgctgggcgacaccagcacagacccccctgagtcggccacagtggcccatcctg 123
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B: 1233 catcagtgctgggcgacaccagcacagacccccctgagtcggccacagtggcccatcctg 1292

A: 124  gtaaagggatgcccttacaccggagacaactatcagacccagctgatcccagtcagaaa 183
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B: 1293 gtaaagggatgcccttacaccggagacaactatcagacccagctgatcccagtcagaaa 1352

A: 184  gccttggaaactgccatttcctcacaccaccagcgcttcagcatcttcaccttcagcttg 243
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B: 1353 gccttggaaactgccatttcctcacaccaccagcgcttcagcatcttcaccttcagcttg 1412

A: 244  gtggaccctacatctgtgaagcaggcccttaggggaccgggtgatctgactgcagcgtg 303
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B: 1413 gtggaccctacatctgtgaagcaggcccttaggggaccgggtgatctgactgcagcgtg 1472

A: 304  tcagtctgccagcctgctgagccaccgtcctgtgtggtaacctgtcctgacctcagccga 363
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B: 1473 tcagtctgccagcctgctgagccaccgtcctgtgtggtaacctgtcctgacctcagccga 1532

A: 364  agaagaagaaattctgacaccagttttcagaacactactgctagtgtttctagcaaaggc 423
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B: 1533 agaagaagaaattctgacaccagttttcagaacactactgctagtgtttctagcaaaggc 1592

A: 424  cccatgattctact 437
      ||||||||||||||||
B: 1593 cccatgattctact 1606

```

A: Sequenzierte Nukleotidabfolge des Plus-Stranges

B: Nukleotidsequenz der Datenbank (NCBI-Datenbank Acc.-Nr.: Y10822)

Mismatch hervorgehoben durch Fettdruck

◆ *Sequenzierergebnis des ZPA-Fragmentes*

Der Nachweis der aktiven Synthese des Zona Pellucida A-Proteins stellte sich durch Gewinnung einer vervielfältigten cDNA-Zielsequenz durch die RT-PCR dar. Beide Stränge der cDNA-Sequenz des PCR-Produktes mit einer Größe von ca. 360 bp wurden in ihrer

Nukleotidabfolge gezeigt. Der Vergleich des Plus-Stranges, der durch Kettenverlängerung des 5'-CZPA-Primer gebildet wurde, mit der Originalsequenz der Datenbank ergab eine Übereinstimmung der Nukleotidabfolge von 100%.

Die Sequenzierung des Plus-Stranges ergab eine Stranglänge von 309 bp (Abb. 18).

Abb. 18: Sequenzvergleich des Plus-Stranges mit der Originalsequenz

```

A: 4   ggaacattggtgtggatggctgtgcatacaacctggacaactacctgactaccttccatc 63
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B: 1697 ggaacattggtgtggatggctgtgcatacaacctggacaactacctgactaccttccatc 1756

A: 64   cagtcggctcctccgtgacctatcctgatcactatcagaggtttgacgtgaaggcttttg 123
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B: 1757 cagtcggctcctccgtgacctatcctgatcactatcagaggtttgacgtgaaggcttttg 1816

A: 124  cctttgtatcagaagcccacatgctctctaggatggcttacttccactgcagtgtcttaa 183
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B: 1817 cctttgtatcagaagcccacatgctctctaggatggcttacttccactgcagtgtcttaa 1876

A: 184  tctgcaatcgactctctcctgactcccctctgtggtctgtgacctgccctgtgtcatcta 243
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B: 1877 tctgcaatcgactctctcctgactcccctctgtggtctgtgacctgccctgtgtcatcta 1936

A: 244  ggcacaagcgagccacaggaaccaatgaagcaaaaacaatgacagtcagtcctccggggac 303
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B: 1937 ggcacaagcgagccacaggaaccaatgaagcaaaaacaatgacagtcagtcctccggggac 1996

A: 304  ccattctcc 312
      |||||||||
B: 1997 ccattctcc 2005

```

A: Sequenz des neu synthetisierten Plus-Stranges

B: Originalsequenz aus der Datenbank (NCBI-Datenbank Acc.-Nr.: Y10767)

◆ Sequenzierungsergebniss des ZPC-Fragmentes

Nach Amplifizierung eines cDNA-Teilbereichs der Nukleotidsequenz des Zona Pellucida C-Proteins stellte sich das erhaltene PCR-Produkt als ca. 390 bp großes Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung dar. Nach Sequenzierung der cDNA-Stränge konnte bei beiden eine 100%ige Übereinstimmung mit der Originalsequenz des Zona Pellucida C-Proteins festgestellt werden.

Der Plus-Strang ausgehend vom 5'-BZPC-Primer hatte eine Länge von 351 bp. Im Vergleich mit der eingetragenen Nukleotidsequenz des Zona Pellucida C-Proteins zeigte sich eine komplette Übereinstimmung (Abb. 19).

Abb. 19: Sequenzvergleich des Plus-Stranges mit der Originalsequenz

```

A: 1   ccgccctgtgggaaacctgtccatcgtgaggactaaccgcgagagattcccatcgagtg 60
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B: 370 ccgccctgtgggaaacctgtccatcgtgaggactaaccgcgagagattcccatcgagtg 429

A: 61   ccgctaccccaggcggggcaatgtgagcagccaggccatccttcccacctggctgccctt 120
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B: 430 ccgctaccccaggcggggcaatgtgagcagccaggccatccttcccacctggctgccctt 489

A: 121  caggaccacggtggttctcagaggagaagctgactttctctctgcgctgatggaggagaa 180
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B: 490  caggaccacggtggttctcagaggagaagctgactttctctctgcgctgatggaggagaa 549

A: 181  ctggagcactgagaagaggaccctaccttccacctgggagatgtggcccacctccaggc 240
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B: 550  ctggagcactgagaagaggaccctaccttccacctgggagatgtggcccacctccaggc 609

A: 241  agaaatccacactggcagccacgtgccactgcggtatattgtggaccactgtgtggccac 300
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B: 610  agaaatccacactggcagccacgtgccactgcggtatattgtggaccactgtgtggccac 669

A: 301  gccaacaccagaccagaatgcctccccttatcacaccatcgtggacttcca 351
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B: 670  gccaacaccagaccagaatgcctccccttatcacaccatcgtggacttcca 720

```

A: Sequenz des Plus-Stranges

B: Original Nukleotidsequenzbereich des ZPC-Proteins (NCBI-Datenbank Acc.-Nr.: S71825)

3.6.2. RT-PCR zur Darstellung der Genexpression der Zona Pellucida-Proteine in Follikelzellen des Marmoset-Affen

Aus Follikeln unterschiedlicher Größe wurden Follikelzellen gesammelt. Dabei handelte es sich um Zellkomplexe aus Kumulus- und Granulosazellen, die nicht näher differenziert werden konnten. Eine Bestimmung der Anzahl der eingesetzten Zellen zur mRNA-Isolierung war nicht möglich. Es sollte die Fragestellung beantwortet werden, ob Zona Pellucida-Protein auch in Follikelzellen des Ovars des Weissbüschelaffen exprimiert wird oder nicht. Es wurde nur ein qualitativer Nachweis angestrebt. Der mRNA-Isolierung folgte die RT-PCR wie bereits zuvor beschrieben. Eingesetzt wurden Follikelzellen aus präantralen Follikeln (<400µm), periantralen Follikeln mit einer Größe von 400-599µm, kleinen antralen Follikeln mit einem Durchmesser von 600-999µm und >1000µm großen antralen Follikeln.

Entsprechend dem Einsatz von Eizellen wurde ausgehend von der mRNA aus Follikelzellen des Marmoset-Affen für ZPB ein Fragment mit einer Größe von 465 bp, ein 362 bp grosses ZPA-Amplikat und für ZPC eine vervielfältigte cDNA-Sequenz von 388 bp erwartet. Als Positivkontrolle diente auch hier die Amplifikation eines 300 bp grossen Fragmentes des „House-keeping-Gens“ HGAPDH.

Mit Hilfe der eingesetzten Primer konnte auch bei den Follikelzellen jeder eingesetzten Follikelgröße für jedes ZP-Protein das berechnete cDNA-Fragment amplifiziert werden (Abb. 20): ZPB-Amplikat mit ca. 460 bp (Abb.20, Spur 1), das ZPA-Amplikat mit ca. 360 bp (Abb. 20, Spur 2) und das ZPC-Fragment mit ca. 390 bp (Abb. 20, Spur 3). Ebenfalls im Bereich der errechneten Größe lag das cDNA-Fragment der Positivkontrolle HGAPDH mit ca. 300 bp (Abb. 20, Spur 4).

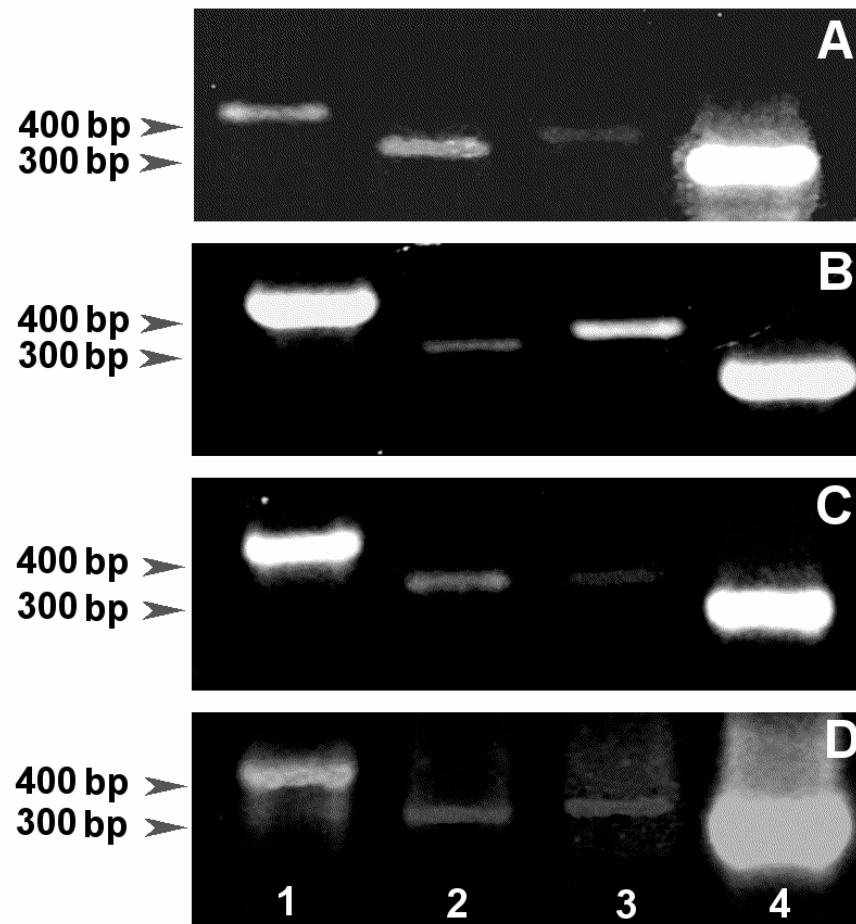


Abb. 20:

Darstellung der Genexpression von ZPA, ZPB und ZPC in Marmoset Follikelzellen aus definierten Follikelgrößen.

Gezeigt sind PCR-Amplikons nach Einsatz der cDNA von Follikelzellen aus Follikeln mit einem Durchmesser von (A) $<400\mu\text{m}$ (präantrale Follikel), (B) $400-599\mu\text{m}$ (periantrale Follikel), (C) $600-999\mu\text{m}$ (kleine antrale Follikel) und (D) $>1000\mu\text{m}$ (große antrale Follikel).

Spur 1: ZPB-Fragment mit 465 bp; Spur 2: ZPA-Fragment mit 362 bp; Spur 3: ZPC-Fragment mit 388 bp; Spur 4: HGAPDH-Fragment mit 300 bp.

Am linken Bildrand ist die Markierung der Basenpaargröße gezeigt.

Neben der Positivkontrolle HGAPDH wurden noch weitere Kontrollen eingesetzt. Bei einer Verunreinigung der Probe mit genomischer DNA wurde ein Fragment von 240 bp durch den Einsatz der HIGAPDH-Primer erwartet. Des Weiteren sollte die Vervielfältigung eines 237 bp grossen Fragmentes des BMP 15-Gens eine mögliche Kontamination der Probe mit Eizellbestandteilen aufzeigen. Die Ergebnisse sind exemplarisch für Follikelzellen mit einer Follikelgrösse von 600-999 μ m in Abb. 21 dargestellt.

Nach Einsatz des HIGAPDH-Primers wurde ein Amplikon im berechneten Bereich nachgewiesen, sodass man von einer Kontamination der Probe mit gDNA ausgehen musste (Abb. 21, Block A, Spur 5). Dagegen kam es zu keiner Vervielfältigung eines BMP15-Fragmentes, was eine Verunreinigung der Probe mit Eizellbestandteilen ausschliesst (Abb. 21, Block A, Spur 6).

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde neben der cDNA auch mRNA als Template in der PCR eingesetzt (Abb. 21, Block B). Die Elektrophorese zeigte, dass hierbei kein ZP-Fragment amplifiziert wurde (Abb. 21, Block B, Spur 7, 8, 9); zudem waren keine Banden bei den Kontrollen von gDNA und Eizellbestandteilen sichtbar (Abb. 21, Block B, Spur 11, 12). Einzig für HGAPDH kam es zur Amplifizierung eines Fragmentes mit ebenfalls einer Grösse von ca. 300 bp (Abb. 21, Block B, Spur 10). Die Negativkontrollen, bei denen Aqua dest. als Template in der PCR diente, blieben alle ohne Amplikons (Abb. 21, Block C).

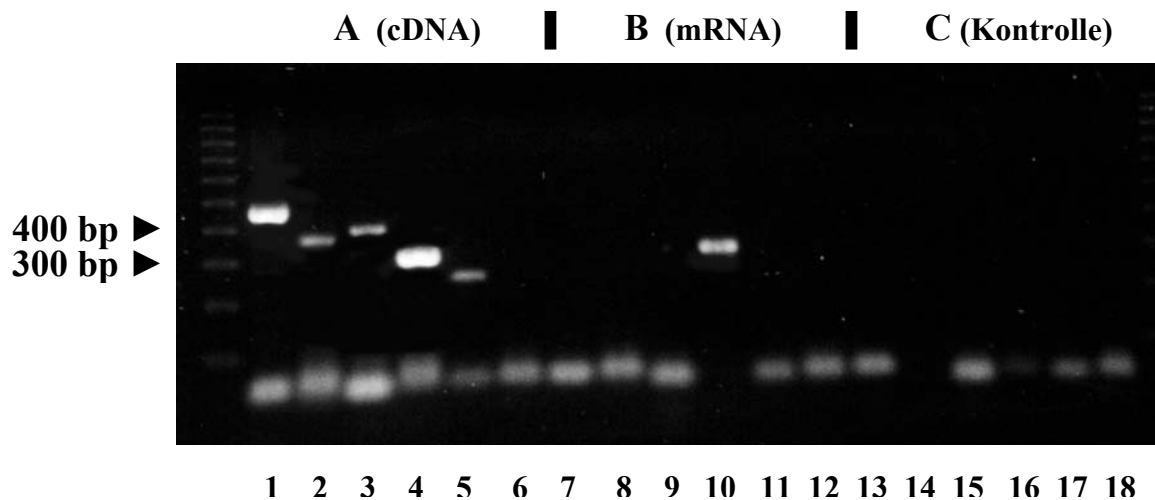


Abb. 21:

Darstellung der PCR-Produkte im Agarosegel (1,5%ig gefärbt mit Ethidiumbromid) nach Einsatz von cDNA, gewonnen von Follikelzellen aus Follikeln zwischen 600-999 μ m

Block A: Einsatz von cDNA als Template

Block B: Einsatz von mRNA als Template

Block C: Einsatz von Aqua dest. als Template

Spur 1, 7, 13 : ZPB-Amplifikat

Spur 2, 8, 14 : ZPA-Amplifikat

Spur 3, 9, 15 : ZPC-Amplifikat

Spur 4, 10, 16: HGAPDH-Amplifikat; Positivkontrolle

Spur 5, 11, 17: HIGAPDH-Amplifikat; Kontrolle von gDNA-Kontamination

Spur 6, 12, 18: BMP 15-Amplifikat; Kontrolle von Eizell-Kontamination

Am linken Bildrand ist die Basenpaarmarkierung von 300 bp und 400 bp dargestellt.

Abschließend kann festgestellt werden, dass es in Follikelzellen des Marmoset-Affen in jedem untersuchten Entwicklungsstadium zur Expression der ZP-Protein kodierenden Gene kam. Allerdings wurde auch deutlich, dass die Proben neben mRNA auch gDNA enthielten. Diese Kontamination mit gDNA lässt jedoch nicht an den Resultaten bezüglich der Genexpression der ZP-Proteine zweifeln, da die ZP-Primer alle Intron-überspannend konstruiert waren und auf gDNA-Ebene deren Fragmente im 3-4 kb Bereich liegen. Zudem wurden Polymerasekettenreaktionen durchgeführt, bei denen gDNA als Matrize eingesetzt wurde. In diesen Untersuchungen wurden keine Fragmente im erwarteten Größenbereich von 400-500 bp auf mRNA-Ebene amplifiziert (nicht gezeigt). Dies verdeutlicht, dass die erhaltenen Amplifikate nur durch mRNA als Ausgangspunkt der RT-PCR entstehen konnten.

4. Diskussion

Die hier dargestellten Untersuchungen dienten dazu, Zona Pellucida-Proteine im Ovar des Marmoset-Affen zu lokalisieren und ihren *de-novo*-Syntheseort zu identifizieren. Des Weiteren sollte in funktionellen Studien die physiologische Relevanz eines ausgewählten Epitopes des Zona Pellucida A-Proteins evaluiert werden.

Grundlegende Vorarbeiten für die Dissertationsarbeit

In vorausgegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe sind, ausgehend von den bekannten Aminosäuresequenzen des Zona Pellucida B-, Zona Pellucida A- und des Zona Pellucida C-Proteins Peptidsequenzen ausgewählt und Antikörper gegen diese Domänen hergestellt worden. Sowohl Spezies-spezifische Sequenzbereiche als auch in Säugerspezies homologe, hochkonservierte Sequenzen dienten als Grundlage zur Auswahl und Herstellung synthetischer Peptide, die als Antigene zur Immunisierung von Kaninchen und Herstellung von monoklonalen Antikörpern eingesetzt wurden.

Die gewonnenen Antikörper wurden mittels immunhistochemischer und immunbiochemischer Untersuchungen charakterisiert. Außerdem wurde der Einfluss der Antiseren auf die Spermatozoenbindungsfähigkeit an die Zona Pellucida untersucht. Die Antiseren gegen das ZPB Peptid reagierten zwar mit dem synthetischen Peptid, das als Antigen eingesetzt wurde, erkannten aber nicht das ZPB-Protein; deshalb konnten diese Antiseren in den sich anschließenden Experimenten nicht als Marker für das ZPB Polypeptid eingesetzt werden.

Es zeigte sich, dass sowohl Antiserum AS ZPA-20, das gegen das Peptid ZPA-1 gerichtet ist, als auch Antiserum AS ZPA-26, das sich gegen Peptid ZPA-4 richtet, als Marker für die immunologische Detektion von Zona Pellucida A-Protein in humanen Gewebsschnitten eingesetzt werden konnte (Hinsch *et al.*, 1998). Zudem konnte festgestellt werden, dass beide Antiseren sowohl an humane als auch an bovine Hemizonae banden (Hinsch *et al.*, 1998a; Hinsch *et al.*, 1997). Diese beiden Anti-ZPA-Peptid-Antiseren wurden auch in funktionellen Studien zur Evaluierung physiologisch relevanter ZPA-Domänen bei der Spermatozoen-Zona Pellucida-Bindung eingesetzt. Das Antiserum AS ZPA-20 reduzierte die Spermatozoenbindung an die Zona Pellucida sowohl bei Einsatz von bovinen als auch von humanen Gameten signifikant, während es durch AS ZPA-26 zu keiner Beeinflussung der Spermatozoenbindungsfähigkeit an die Zona Pellucida kam (Hinsch *et al.*, 1997, Hinsch *et al.*, 1998a).

In weiteren Studien wurde gefunden, dass das Antiserum AS ZPC-6, das sich gegen eine hochkonservierte Aminosäuresequenz des Zona Pellucida C-Proteins verschiedener Spezies richtet, sein Antigen sowohl in nativen Oozyten als auch in fixierten Gewebeschnitten des Ovars verschiedener Säugerarten detektiert. Sehr stark ausgeprägt war die Antigen-Antikörperreaktion im humanen Ovar; aber auch beim Einsatz von isolierten humanen Eizellen und Oozyten des Schweins fanden sich deutlich positive Reaktionen (Hinsch *et al.*, 1994). Zudem erwies sich das Anti-ZPC-Peptid Antiserum AS ZPC-6 als Marker für funktionsdefiziente Zona Pellucidae. Durch diese Antikörper konnte erstmals ein kausaler Zusammenhang zwischen immunbiochemisch defekter Zona Pellucida und fehlender Fertilisierungsfähigkeit von Eizellen, die erfolglos in IVF-Programmen eingesetzt wurden, demonstriert werden (Oehninger *et al.*, 1996). Allerdings hatte die Behandlung von humanen Eizellen mit dem Antiserum AS ZPC-6 keinen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit von Spermatozoen an die Zona Pellucida (Hinsch *et al.*, 1999).

Hintergrund für diese Arbeiten war ursprünglich die Suche nach für die Spermatozoen-Eizell Interaktion funktionell relevanten Domänen der Zona Pellucida-Proteine. Die Identifizierung dieser Proteinbereiche ist im Hinblick auf mögliche immunkontrazeptive Ansätze von großer Bedeutung.

Im Hinblick auf das steigende Interesse an molekularen Grundlagen der Zona Pellucida Proteine war dieses wissenschaftliche Projekt konzipiert, um neue Erkenntnisse über die Zona Pellucida bildenden Glykoproteine des Weissbüschelaffen zu erlangen. Dazu wurde einleitend ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der eingesetzten Peptide mit den Aminosäuresequenzen der Zona Pellucida Proteine des Marmoset-Affen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die hochkonservierten Peptidsequenzen von ZPA-1 und ZPC-6 auch homolog zu den entsprechenden Teilbereichen des Marmoset ZPA- bzw. ZPC- Proteins waren. Dagegen wurde durch den Sequenzvergleich deutlich, dass das human spezifische Peptid ZPA-4, das als Antigen zur Herstellung des Anti-ZPA-Antiserum AS ZPA-26 eingesetzt wurde, deutliche Unterschiede in der Aminosäureabfolge des Zona Pellucida A-Proteins des Weissbüschelaffen aufwies.

Es sollte nun überprüft werden, ob die mit Hilfe der Anti-ZPA- und Anti ZPC-Antiseren in verschiedenen Spezies gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der ZP Proteinlokalisierung und der funktionellen Bedeutung der untersuchten Epitope auch auf den Weissbüschelaffen übertragen werden können.

4.1. Immunhistochemische und Immunelektronenmikroskopische Lokalisation von ZP-Proteinen im Marmoset Ovar

Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten, dass die Kaninchen-Antiseren AS ZPA-20 und AS ZPC-6 die entsprechenden Zona Pellucida-Epitope auch auf Gewebeschnitten des Marmoset Ovars erkennen. Die Detektion von ZPA-Protein in der Zona Pellucida und in den Follikelzellen war abhängig vom Entwicklungsstadium der Follikel. Außerdem war eine positive Immunreaktion innerhalb des Ooplasmas in allen Stadien der Follikulogenese deutlich zu erkennen. Das immunhistochemische Detektionsmuster des Zona Pellucida A-Proteins durch das Antiserum AS ZPA-20, das gegen das hochkonservierte Zona Pellucida A- Epitop gerichtet ist, ist vergleichbar mit den Resultaten, die mittels elektronenmikroskopischer Studien im Ovar des Weissbüschelaffen erhoben wurden. Diese Ergebnisse werden durch Publikationen unterstützt in denen gezeigt wurde, dass bei anderen Affenarten wie auch dem Menschen ZPA-Protein im Zytoplasma der Eizelle in Abhängigkeit vom Follikelstadium nachgewiesen werden kann. Eberspaecher *et al.* (2001) zeigte mittels Immunhistochemie, dass beim Menschen in Primordialfollikeln Zona Pellucida A-Protein im Zytoplasma von Eizellen lokalisiert ist, während in späteren Entwicklungsstadien ZPA-Protein nur noch innerhalb der Zona Pellucida nachzuweisen wurde. Im Unterschied dazu wurde beim Langschwanzmakaken (*Macaca fascicularis*) mit Hilfe eines Antikörpers gegen rekombinantes humanes ZPA-Protein auch in Sekundär- und Tertiärfollikeln ZPA-Protein im Ooplasma detektiert (Martinez *et al.*, 1996). Diese Resultate deuten darauf hin, dass Spezies-spezifische Unterschiede für die variable zytoplasmatische Detektion von ZPA-Protein in Abhängigkeit des Follikelstadiums verantwortlich sind.

Neben der Anfärbung der Zona Pellucida und des Ooplasmas kommt es durch AS ZPA-20 auch zur Detektion von antigenem Material in den umliegenden Kumuluszellen der Eizelle. Der Nachweis von ZPA-Protein in Kumuluszellen ist sowohl in den immunzytochemischen als auch immun-elektronenmikroskopischen Untersuchungen deutlich positiv. Für das Vorhandensein von ZPA-Protein in Kumuluszellen können verschiedene Hypothesen diskutiert werden. Zum einen besteht prinzipiell die Möglichkeit, dass innerhalb der Kumuluszellen Zona Pellucida-Protein synthetisiert wird (Sinowatz *et al.*, 2001). Zum anderen könnten Kumuluszellen auch das durch die Eizelle produzierte ZPA-Protein durch einen endozytotischen Prozess inkorporiert haben, um es dort zu speichern bzw. abzubauen. Als dritte Möglichkeit muss noch die Kreuzreaktivität des eingesetzten Antikörpers mit

anderen in der Kumuluszelle lokalisierten Proteinen in Betracht gezogen werden. Aufgrund der Ergebnisse bezüglich der Expression der ZPB, ZPA und ZPC kodierenden Gene mittels RT-PCR (siehe Diskussion unten) wird die Hypothese unterstützt, die annimmt, dass eine *de novo* Synthese von Zona Pellucida Proteinen innerhalb der Follikelzellen des Marmoset-Affen stattfindet.

Auch Zona Pellucida C-Protein war im Marmoset Ovar immunhistochemisch nachzuweisen. Das Peptid ZPC-6, gegen das das Antiserum AS ZPC-6 gerichtet ist, war homolog zu dem entsprechenden Aminosäureteilerbereich des Marmoset Zona Pellucida C-Proteins.

AS ZPC-6 detektiert, unabhängig vom Entwicklungsstadium, ZPC-Protein innerhalb der Zona Pellucida und, schwächer ausgeprägt, im Ooplasma und in den umliegenden Follikelzellen. Während sich die Zona Pellucida immunhistochemisch als einheitlich gefärbter Ring darstellt, zeigt sich immun elektronenmikroskopisch eine stärkere ZPC-Proteindeposition im inneren Anteil der Zona Pellucida. Eine unterschiedliche Verteilung von ZPC-Protein konnte bereits elektronenmikroskopisch im Maus Modell beobachtet werden (Hinsch *et al.*, 1999). Diese vergleichbaren Resultate könnten ein Hinweis dafür sein, dass in bestimmten Spezies die Zona pellucida in mehreren Schichten aufgebaut ist. In verschiedenen Spezies wurden bereits bilamellare Strukturen der Zona Pellucida beschrieben. Neben Katze (Andrews *et al.*, 1992), Maus (Baranska *et al.*, 1975), Hamster (Keefe *et al.*, 1997), Schwein (Dunbar *et al.*, 2001b), Kaninchen (Dunbar *et al.*, 2001b) und Mensch (Nikas *et al.*, 1994), zeigt auch der Aufbau der Zona Pellucida des Marmoset-Affen morphologisch eine deutlich bilamellare Struktur (Gilchrist *et al.*, 1997). Diese besonderen strukturellen Eigenschaften der Zona Pellucida können durch die hier beobachtete unterschiedliche Proteinverteilung erklärt werden.

Die Beobachtung, dass der innere Anteil der Zona Pellucida durch AS ZPC-6 stärker markiert wird, wirft Fragen bezüglich der funktionellen Bedeutung der Marmoset Zona Pellucida und ihrer Proteine auf. Unter der Annahme, dass das Zona Pellucida C-Protein, analog zum Mausmodell, auch beim Weißbüschelaffen der primäre Spermatozoenrezeptor ist, erscheint die dargestellte Proteinverteilung im inneren Anteil der Zona Pellucida teleologisch als wenig sinnvoll. Betrachtet man allerdings Gesichtspunkte der Speziespezifität kann die Hypothese aufgeworfen werden, dass die Deposition von Zona Pellucida C-Protein in inneren Anteilen der Zona Pellucida als Barriere für das Eindringen speziesfremder Samenzellen in die Eizelle dient. Ein weiterer Hinweis dafür, dass ZPC im Marmoset nicht unbedingt der primäre Spermatozoenrezeptor sein muß, könnten Beobachtungen von Fertilisierungsstudien der Arbeitsgruppe von Dr. Nayudu des Primatenzentrums Göttingen sein. Hier konnte gezeigt werden, dass Spermatozoen nach ihrer Inkubation mit der Eizelle bevorzugt am Übergang von

äußerer zur inneren Zona Pellucida Schicht fest gebunden werden (Abb. 22). Dies könnte beim Marmoset für eine Interaktion bereits akrosomreagerter Spermatozoen mit dem ZPC-Protein sprechen; dieses spricht eher für eine alternative ZPC-Protein Funktion im Sinne des „sekundären Spermatozoenrezeptors“.



Abb. 22:
Marmoset-Eizelle aus Fertilisierungsstudien von Dr. Nayudu, Göttingen. Spermatozoen sind fest gebunden zwischen innerer und äußerer Zona Pellucida Schicht.

In der Literatur wurde die Lokalisation von Zona Pellucida C-Protein beim Marmoset-Affen bisher nur von Grootenhuis *et al.* (1996) beschrieben. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass ZPC-Protein in der Zona Pellucida aller Follikelklassen, einschließlich der Primordialfollikel, zu finden ist, während in frühen Entwicklungsstadien sogar in Granulosazellen ZPC-Protein detektiert werden konnte. In dieser Studie wurde jedoch keine Aussage über eine mögliche Proteinverteilung innerhalb der Zona Pellucida gemacht.

Die positive Immunreaktion im Ooplasma könnte, ebenso wie bei Zona Pellucida A-Protein, durch vorhandenes Protein oder dessen Vorstufen zurückzuführen sein. Zona Pellucida C-Protein konnte in verschiedenen Studien in der Eizelle dargestellt werden. In einer elektronenmikroskopischen Studie Untersuchung konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass ZPC innerhalb der Eizelle an vesikulären Strukturen sowie des Golgi-Apparates lokalisiert ist (Aviles *et al.*, 2000).

4.2. Funktionelle Relevanz eines spezifischen ZPA-Epitopes

Zur Bestimmung der funktionellen Bedeutung der von den Anti-ZPA-Peptid-Antiseren erkannten Epitope wurden Spermatozoenbindungsstudien an isolierten Zonae Pellucidae durchgeführt. Es ist bekannt, dass die Spermatozoenbindungskapazität von Oozyten erheblich variieren kann. Der im Rahmen dieser Dissertation eingesetzte Hemizona-Assay gilt als ein valides Testsystem zur Beurteilung der Spermatozoenbindung an die Zona Pellucida; durch den Einsatz gleich großer Hemizonae einer Eizelle können Unterschiede bei der Spermatozoenbindung erkannt und Unterschiede individueller Zonae Pellucidae weitgehend ausgeschlossen werden. Die interne Kontrolle durch eine korrespondierende Hemizona bietet die Möglichkeit, bei Untersuchungen trotz eines relativ kleinen verfügbaren Stichprobenumfangs statistische Signifikanzen zu erreichen (Burkman *et al.*, 1988). Neben dem humanen, murinen und bovinen Modell wurde dieses funktionelle Testsystem auch erfolgreich bei unterschiedlichen Primaten etabliert (Windt *et al.*, 1991; Hinsch *et al.*, 1998a; Oehninger *et al.*, 1989; Pu *et al.*, 1994; Mahony *et al.*, 2000).

Zur Evaluierung der funktionellen Relevanz eines ZPA-Epitopes im Marmoset-Modell wurde in dieser Arbeit der Kompetitions-Hemizona-Assay erstmals erfolgreich aufgebaut und zu wissenschaftlichen Zwecken eingesetzt. Im Rahmen erster Versuche zur Etablierung und Optimierung der Methode im Marmoset-Modell fiel erstmals auf, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen Spermatozoenbindungskapazität und der Dauer der Lagerung von Oozyten in hyperosmolarer Salzlösung bestand. Es zeigte sich, dass die Verlängerung der Eizelllagerung mit einer Abnahme der Spermatozoenbindungsfähigkeit an die Zona Pellucida assoziiert war. Die verwendete hyperosmolare Salzlösung bestehend aus Magnesiumchlorid, Polyvinylpyrrolidon und Hepes, wurde bereits 1979 als mögliches Konservierungsmedium für Oozyten verschiedener Spezies beschrieben. Damalige Beobachtungen zeigten allerdings keinen Hinweis auf Veränderungen der biochemischen Eigenschaften der Extrazellulärmatrix oder der Bindungskapazität von Spermatozoen an die Zona Pellucida bei humanen Oozyten (Yanagimachi *et al.* 1979). Auch Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen bestätigten diese Ergebnisse. Der direkte Vergleich verschiedener Lagerungsmedien wies bei humanen Eizellen auf keine Beeinträchtigung der Spermatozoenbindung hin (Franken *et al.*, 1989; Hinsch *et al.*, 1994a). Konträre Resultate, die die Ergebnisse mit Marmoset Zonae Pellucidae bestätigen, wurden von Hammit *et al.* (1993) publiziert. Hier wurde ein schädigender Effekt durch die Lagerung in Salzlösung beschrieben, der zur Veränderung in Form und Aufbau der humanen Zona Pellucida führte. Ebenfalls negativ wirkte sich die Verwendung von

hyperosmolarer Salzlösung bei Eizellen des Hundes aus. Hier konnte eine deutliche Abnahme der gebundenen Spermatozoen pro Eizelle sowie ein Rückgang der Penetrationsrate verzeichnet werden (Mastromonaco *et al.*, 2002). Unter Berücksichtigung der bisher veröffentlichten Publikationen und der hier erhobenen Ergebnisse scheint es, abhängig von der untersuchten Spezies, unterschiedlich ausgeprägte funktionelle und biochemische Auswirkungen der Eizellaufbewahrung in hyperosmolarer Salzlösung auf die Zona Pellucida zu geben. Im Vergleich zu anderen Spezies scheint sich diese Form der Lagerung negativ auf die Integrität der Zona Pellucida des Marmoset-Affen auszuwirken.

Die im Kompetitions-Hemizona-Assay gewonnenen Resultate mit Anti-ZPA-Peptid-Antiseren zeigen, dass es durch AS ZPA-20 zu keiner Beeinflussung der Spermatozoenbindung an der Zona Pellucida kam. Im Durchschnitt banden etwa gleich viele Spermatozoen sowohl an die mit Antiserum AS ZPA-20 inkubierten Hemizonae als auch an die unbehandelten korrespondierenden Zona Pellucida-Hälften. Diese Beobachtung kann durch verschiedene Faktoren bedingt sein. Trotz der Ergebnisse, dass die eingesetzten Antiseren in anderen Tiermodellen die Spermatozoe-Eizell Interaktion hemmen, ist es möglich, dass das untersuchte ZPA-Epitop aufgrund speziesspezifischer Unterschiede keine funktionelle Relevanz im Marmoset hat. Ebenso kann es sein, dass die Antikörper das native antigene Epitop „*in vivo*“ nicht erkennen und sich nicht anlagern können. Möglich könnte dies aufgrund der zweidimensionalen Faltung des Proteins oder innerhalb der dreidimensionalen Struktur der Zona Pellucida sein, so dass das Epitop nicht in linearer Form wie bei dem als Antigen eingesetzten synthetischen Peptids präsent ist. In diesem Fall wäre keine Aussage über die etwaige funktionelle Bedeutung des ZPA-Epitopes beim Marmoset möglich. Eine weitere Erklärung für die gewonnenen Daten kann auch ein unzureichendes Eindringen der Anti-ZPA-Peptid-Antikörper in die Zona Pellucida sein, das in einer fehlenden Antigen-Antikörper-Reaktion resultiert. Diese ungenügende Annäherung an das ZPA-Epitop könnte durch sterische Behinderungen verursacht werden. Zum einen ist es denkbar, dass die Antikörper aufgrund des dreidimensionalen Aufbaus der Marmoset Zona Pellucida nicht durch das Maschenwerk dringen können; zum anderen ist auch eine Behinderung der Antigen-Antikörper Reaktion durch Anlagerung anderer im polyklonalen Antiserum enthaltene Proteine zu bedenken. Eine eventuelle biochemische Modifikation des Epitopes aufgrund der Lagerung der Eizellen in hyperosmolarer Salzlösung und daraus resultierender fehlender Antigenerkennung durch die Antikörper erscheint unwahrscheinlich. Eine solche Veränderung wäre dann zu vermuten, wenn es bei Eizellen, die nur kurz in Salzlösung

aufbewahrt worden wären, zu einer Bindungshemmung der Spermatozoen an die mit AS ZPA-20 inkubierten Hemizonae gekommen wäre. Diese negative Beeinflussung hätte dann mit zunehmender Lagerungszeit zurückgehen müssen, so dass der fehlende Einfluss der Antikörper darauf zurückzuführen gewesen wäre. Ein solches Phänomen wurde allerdings nicht beobachtet. Die Aufbewahrung der Eizellen in Salzlösung hatte vielmehr eine Reduktion der gebundenen Spermatozoen an beiden Hemizonae der Eizelle zur Folge, die in keinem Zusammenhang mit der Antikörperinkubation stand.

Um abzuklären, ob der durch AS ZPA-20 detektierte Epitop im Marmosetmodell keinen Einfluss auf die Spermatozoen-Zona Pellucida Bindung hat, wurde der monoklonale Antikörper mAb ZPA-20 in weiterführenden Untersuchungen eingesetzt. Dieser Antikörper ist gegen das identische synthetische ZPA-1 Peptid gerichtet und reagiert auch mit Marmoset ZPA-Protein. Auch diese Antikörper hatten, ebenso wie das Antiserum AS ZPA-20, im Kompetitions-Hemizona-Assay keinen Einfluss auf die Spermatozoenbindungsfähigkeit im Marmoset-Modell. Diese Befunde unterstützen *prima vista* die Hypothese, dass dieses Epitop im Gegensatz zu anderen Spezies für die Bindung der Spermatozoen an die Eizelle keine Bedeutung hat. Allerdings war noch zu überprüfen, ob das ZPA-20 Epitop der Marmoset Zona Pellucida überhaupt „*in vivo*“ für die Antikörper zugänglich ist. Zur Evaluierung der Frage, ob Anti-ZPA-Antikörper an die native Marmoset Zona Pellucida binden, wurde der Hemizona-Antikörper-Bindungs-Assay (HABA) eingesetzt.

4.3. Bindungsverhalten spezifischer Anti-ZP-Antikörper an Marmoset-Hemizonae

Mit Hilfe dieses Testsystems kann nachgewiesen werden, ob Anti-ZPA-Antikörper an natives, chemisch nicht modifiziertes Zona Pellucida A-Protein binden. Aufgrund der relativen geringen Anzahl verfügbarer Marmoset Oozyten konnte der Hemizona-Antikörper-Bindungs-Assay nicht im Vorfeld durchgeführt werden, sondern erst nach Abschluss der funktionellen Studien mit verbliebenen, unbehandelten Hemizonae. Sowohl bei den mit Antiserum AS ZPA-20 inkubierten Test-Hemizonae als auch bei den korrespondierenden Zona Pellucida-Hälften war nur eine sehr schwache Antigen-Antikörper-Reaktion (Anfärbbarkeit) zu verzeichnen. Eine statistische Analyse der Ergebnisse konnte keinen signifikanten Unterschied der Antikörperbindung an die Test- oder Kontroll-Hemizonae nachweisen. Zudem wurden Hemizonae nach ihrem Einsatz im Kompetitions-Hemizona-Assay bezüglich ihrer Antikörper-Bindung überprüft. Hemizonae, die im KHZA mit

AS ZPA-20 Antiserum behandelt wurden, zeigten ebenso wie mit mAb ZPA-20 inkubierte Hemizonae nur eine schwache Farbreaktion, die nicht über der der jeweiligen Kontroll-Hemizonae lag. Dies legt die Vermutung nahe, dass sowohl Antikörper des AS ZPA-20 sowie der monoklonale Antikörper mAb ZPA-20 nicht oder nur mit geringer Affinität an ihre antigene Region im nativen Zona Pellucida A-Protein des Marmoset binden. Ursächlich dafür kann eine fehlende lineare Präsenz des Epitopes innerhalb der dreidimensionalen Struktur der Zona Pellucida von *Callithrix jacchus* sein. Ebenso möglich ist eine Behinderung der Antikörper-Passage zum Antigen aufgrund morphologischer Gegebenheiten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass aufgrund der Ergebnisse des Kompetitions-Hemizona-Assays sowie des Hemizona-Antikörper-Bindungs-Assays keine endgültige Aussage über die funktionelle Relevanz der ZPA-20 Domäne während der Spermatozoen-Eizell-Interaktion im Marmoset-Modell gemacht werden kann.

4.4. Expression ZP-Protein kodierender Gene

Die Expression der ZP-Protein kodierenden Gene wird mit Hilfe der RT-PCR dargestellt. Diese Methode hat sich als effektives Verfahren zur Bestimmung von qualitativer und quantitativer Genexpression in verschiedenen Geweben erwiesen. Die Kombination aus Reverser-Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion) und Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht prinzipiell die Detektion eines einzigen mRNA-Moleküls; allerdings hat sich in der Praxis gezeigt, dass für eine erfolgreiche mRNA-Transkription zur cDNA mehr als 10 mRNA-Kopien benötigt werden (Foyer *et al.*, 1993).

Häufiges Problem dieser Standardmethode zur Evaluierung der Genexpression ist die Probenkontamination mit genomischer DNA (gDNA), wodurch es zu falsch positiven Ergebnissen bezüglich der mRNA-Expression kommen kann. Um dieser gDNA-Verunreinigung entgegen zu wirken, gibt es zwei probate Möglichkeiten: 1) eine DNase-Behandlung der Probe während der RNA-Isolation und 2) die Konstruktion von PCR-Primern, die Intron-überspannend sind (das amplifizierte gDNA-Produkt wäre dann größer als das cDNA-Fragment, Hurteau & Spivack, 2002). Allerdings kann der Einsatz von DNase auch den Abbau mRNA bedingen, wodurch für die RT-PCR nur wenig mRNA in der Probe verbleibt. Des Weiteren kann die Konstruktion mRNA-spezifischer Primer zu falsch positiven Ergebnissen führen, wenn innerhalb der gDNA Pseudogene vorhanden sind. Pseudogene sind Sequenzen innerhalb des Genomes, die überwiegend durch Retrotransposition ausgehend von

RNA entstehen („processed pseudogenes“) und inaktiv sind (Mighell *et al.*, 2000). Pseudogene haben somit eine nahezu identische Sequenz zur entsprechenden mRNA, und könnten deshalb trotz Einsatz mRNA-spezifischer Primer gDNA-Fragmente amplifiziert werden. Für eine Reihe von Genen, einschließlich einiger „house-keeping-Gene“, wurden bereits solche Pseudogene beschrieben. Neben β -Actin ist auch für GAPDH das Auftreten von Pseudogenen bekannt (Tso *et al.*, 1985). Für die ZP-Protein kodierenden Gene sind keine Pseudogene bekannt.

In dieser Arbeit wurde als Ausgangsmaterial der RT-Reaktion mRNA benutzt, bei deren Isolation keine DNase Behandlung stattfand. Eine Überprüfung einer Kontamination der Probe mit gDNA im Hinblick auf etwaige falsch positive Ergebnisse war nur bei isolierter mRNA aus Follikelzellen nötig, da aufgrund der drei-dimensionalen Struktur des Kumulusverbandes die Anzahl der eingesetzten Follikelzellen nicht exakt bestimmt werden konnte. Approximativ wurden pro Probe etwa 100 Zellen eingesetzt. Bei Verschleppung von genomischer DNA bedeutet dies eine ebensolche Anzahl von DNA-Strängen in der Probe. Diese Menge an DNA-Strängen wäre ausreichend für die Amplifikation spezifischer Fragmente. Dagegen ist dies bei der mRNA-Isolation aus Marmoset-Eizellen nicht zu erwarten. Hier wurde für jeden Versuchsansatz die mRNA aus je 7 Kumuluszell-freien Marmoset-Eizellen extrahiert; somit wären bei einer gDNA-Kontamination maximal sieben ZP DNA-Moleküle innerhalb der Probe zu erwarten, die für eine quantitative Amplifikation von Fragmenten sehr wahrscheinlich nicht ausreichen. Zudem wurden alle eingesetzten ZP-Primer auch in der PCR-Reaktion mit reiner gDNA als Template eingesetzt. Die ZP-Primer waren alle Intron-überspannend konstruiert, so dass prinzipiell eine unterschiedliche Fragmentgröße ausgehend von cDNA bzw. gDNA erwartet wird. Da aber zum heutigen Zeitpunkt in der Literatur noch keine Angaben über etwaige ZP-Pseudogene gibt, musste überprüft werden, ob es beim Einsatz von gDNA als PCR-Template nicht doch zur Amplifikation von Fragmenten im erwarteten Größenbereich der cDNA kommt. Dies würde dann auf das Vorliegen von Pseudogenen hinweisen. Die entsprechenden Kontrollexperimente ergaben, dass nach Einsatz von gDNA als Matrize keine Vervielfältigungen von Fragmente zu beobachten waren (nicht gezeigt). Diese Daten weisen darauf hin, dass eine spezifische Amplifikation der mRNA stattfand und keine kontaminierende gDNA generiert wurde.

Bei den Untersuchungen zur mRNA-Expression der drei ZP-Proteine in Marmoset-Eizellen kann daher davon ausgegangen werden, dass der Einsatz von cDNA in der Probe die Grundlage für die Amplifikation der Fragmente war. In diesem Zusammenhang kann auch das

„House-keeping-Gen“ HGAPDH als eine valide Positivkontrolle angesehen werden. Neben dem erwarteten Amplifikat für HGAPDH wurde auch für jedes ZP-Protein ein entsprechendes cDNA-Fragment amplifiziert. Dies ist hinreichend beweisend für die Expression der ZP-Protein kodierenden Gene in den untersuchten Zellen und somit ein wichtiges Indiz für die Proteinneusynthese aller drei Zona Pellucida-Proteine innerhalb der Marmoset-Eizelle. In der Literatur ist bisher nur wenig über die Neusynthese der ZP-Proteine beim Marmoset-Affen bekannt. Einzig für das ZPC-Protein konnte die Expression innerhalb der Eizelle dargestellt werden. Die Proteinsynthese konnte allerdings nur in primären und sekundären Follikeln, nicht aber in späten präovulatorischen Follikeln demonstriert werden. (Thillai-Koothan *et al.*,1993). Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen dagegen deutlich, dass ZPC in allen Stadien der Eizellentwicklung gebildet wird. Dies ist nur ein scheinbarer Widerspruch zur Publikation von Thillai-Koothan, denn diese Arbeitsgruppe führte den Nachweis der Genexpression mit Hilfe der In-situ-Hybridisierung (ISH), die im Vergleich zu der RT-PCR Methode eine wesentlich geringere Empfindlichkeit aufweist. Auch wenn mit der alleinigen RT-PCR Methode keine definitive quantitative Aussage bezüglich der ZP Protein Genexpression in dieser Arbeit gemacht werden kann (Fehlen der quantitativen RT-PCR), weisen die Ergebnisse darauf hin, dass mit zunehmender Follikelgröße die ZP Protein Expression in den Zellen abnimmt. Auch diese Beobachtungen könnten erklären, weshalb mittels ISH die Expression des ZPC-kodierenden Genes im späten Follikelstadium nicht nachweisbar war. Außerdem gibt es Hinweise dafür, dass, abhängig vom Reifegrad des Follikels, ZPB, ZPA und ZPC mRNA unterschiedlich stark exprimiert wird. Anhand der erhaltenen Bandenstärke im Gel scheinen, bei Einsatz identischer Zellzahlen pro Probe, ZPB- und ZPA-mRNA in annähernd gleicher Menge exprimiert zu werden, während die Expression von ZPC-Protein weniger stark ausgeprägt zu sein scheint. Im Hinblick auf die zuvor beschriebenen Ergebnisse der Immunhistochemie wäre dies eine mögliche Erklärung für die Detektion unterschiedlicher ZPA und ZPC-Proteinmengen im Ooplasma. Der direkte Vergleich von ZPA- und ZPC-Protein (gemessen an der Intensität der Färbung in der Immunreaktion) wies deutlich weniger ZPC-Protein als ZPA-Protein innerhalb des Ooplasmas aus. Zudem war mit zunehmendem Follikelstadium sowohl für ZPA als auch für ZPC eine deutliche Proteinabnahme zu erkennen. Beide Beobachtungen könnten auf das beschriebene für ZP-Proteine gefundene Genexpressionsmuster zurückzuführen sein. Um eine definitive Aussage über quantitative Unterschiede der Genexpression von ZP mRNA machen zu können, ist allerdings eine Quantifizierung der Genexpression mittels Real-Time PCR zu fordern.

Auch in Follikelzellen des Marmoset-Affen wurde die mRNA-Expression von ZPB, ZPA und ZPC nachgewiesen. Der Einsatz eines speziellen Primerpaares HIGAPDH wie darauf hin, dass eine Verunreinigung der Probe mit gDNA nicht ausgeschlossen werden konnte.

Nach Einsatz von mRNA als Template der PCR könnte der Erhalt eines Amplifikates für HGAPDH, mit einer Größe entsprechend dem erwarteten cDNA-Fragment, auf die Detektion eines Pseudogenes hinweisen. Allerdings konnte aufgrund der cDNA-Spezifität der ZP-Primer von einer ebenfalls vorhandenen mRNA-Expression ausgegangen werden. Diese konnte auch dadurch bestätigt werden, dass es zu keiner Amplifikation von ZP spezifischen Fragmenten nach Einsatz von mRNA als Template kam.

Um zu überprüfen, ob die erhaltenen ZP Amplifikate auf eine Kontamination der Follikelzellen mit Material aus Eizellen zurückzuführen sind, wurde ein Marker für das Eizell-spezifische BMP15-Protein eingesetzt. Das BMP15 gehört zur Familie der „Bone morphogenetic proteins“, einer Untergruppe der TGF β -Familie. Es ist bekannt, dass BMP 15 funktionell an der Regulation der Follikulogenese und Granulosazellproliferation beteiligt ist (Braw-Tal, 2002). Bei der Maus wurde eine Eizell-spezifische Expression beschrieben (Dube *et al.*, 1998). Der Einsatz der BMP15-Primer zeigte auch beim Marmoset, dass eine Oozyten-spezifische Expression vorlag (nicht gezeigt). Somit konnten diese Primer zur Kontrolle einer eventuellen Eizell-Verunreinigung im Template, das aus Kumuluszellen gewonnen wurde, eingesetzt werden. Nach Einsatz der BMP15-Primer konnte eine Eizellkontamination der Proben klar ausgeschlossen werden.

Der Nachweis der Expression der ZP-kodierenden Gene innerhalb der Follikelzellen steht in Kontrast zu den Ergebnissen der Gruppe um Thillai-Koothan (1993). Während in dieser Publikation eine Oozyten-spezifische Expression von ZPC gezeigt wurde, konnte in der hier vorliegenden Arbeit die Neusynthese aller drei ZP-Protein in den Follikelzellen demonstriert werden. Im Hinblick auf die unterschiedlich angewandten Methoden muss die scheinbare Diskrepanz der Ergebnisse relativiert werden. Prinzipiell ist es möglich, dass in den Follikelzellen die mRNA-Expression in einem so geringen Ausmaß stattfindet, dass sie aufgrund der relativ geringen Sensitivität der Methode durch *in situ* Hybridisierung nicht detektierbar ist. Im Gegensatz zu den Marmoset-Eizellen ist jedoch eine Beurteilung der Expressionsstärke von ZP-Proteinen in Follikelzellen im Verlauf der Follikulogenese nicht möglich, weil der Einsatz von Follikelzellen und deren mRNA nicht exakt gleichzuhalten war. Somit ist ein direkter Vergleich der ZP-Protein mRNA-Expression in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums in Follikelzellen unter den gegebenen experimentellen Voraussetzungen nicht möglich.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der qualitative Nachweis der mRNA-Expression sowohl in Marmoset-Eizellen als auch in Follikelzellen des Marmoset-Affen demonstriert werden konnte. In weiterführenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe wird zur Zeit der Frage nach der Lokalisation und Quantität der *de-novo* Synthese von ZP-Proteinen im Ovar des Marmoset nachgegangen. Erste vorläufige Resultate der *in situ* Hybridisierung und Real-Time PCR zur Expression der ZP-kodierenden Gene im Ovar des Marmoset bestätigen die hier beschriebenen Ergebnisse, Beobachtungen und Hypothesen.

4.5. Die Bedeutung der Ergebnisse für die Immunkontrazeption

Die in dieser Dissertation erfolgte Lokalisation von ZP-Proteinen im Marmoset Ovar und die Identifizierung funktionell relevanter Domänen kann im Hinblick auf mögliche immunkontrazeptive Ansätze im Menschen von großer Bedeutung sein.

In verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung mit nativem oder rekombinantem Zona Pellucida Glykoproteinen, sowie davon abgeleiteten synthetischen Peptiden zu einer verminderten Fertilität oder gar zur Infertilität führt. Allerdings kam es dabei oft zu pathologischen Veränderungen des weiblichen Zyklus, dem Hormonprofil und der Follikelentwicklung im Ovar. Diese waren teilweise vorübergehend, konnten aber auch irreversibel auftreten (Dunbar *et al.*, 2001a). Durch den Einsatz von Vaccinen, ausgehend von B-Zell-Epitopen anstelle von T-Zell-Epitopen, sollen diese unerwünschten Effekte vermieden werden (Tesarik, 1995; Gupta *et al.*, 1997b).

In neueren Untersuchungen wurde die Effizienz von ZPB-Protein (=ZP1-Protein) als immunkontrazeptives Antigen bei Primaten überprüft. Martinez *et al.* (2000) zeigten, dass es nach Immunisierung von Langschwanzmakaken (*Macaca fascicularis*) und Pavianen (*Papio cynocephalus*) mit rekombinanten humanen ZPB-Protein zu einer Infertilität führte. Der Fertilitätsblock dauerte bis zu 35 Monate, wobei es während diesem Zeitraum auch kurzzeitig zur reversiblen Unterbrechung des weiblichen Menstruationszyklus kam. Die Effektivität des ZPB-Proteins als mögliches immunkontrazeptives Antigen konnte auch von Govind & Gupta (2000) dargestellt werden. Sie zeigten, dass die Immunisierung von Pavianweibchen (*Papio anubis*) mit rekombinantem ZPB-Protein des indischen Hutaffens, *Macaca radiata*, ohne Zyklusveränderungen zur Infertilität führte, so lange ausreichend hohe Antikörpertiter vorhanden waren. Dieselbe Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass monoklonale Antikörper gegen konservierte Epitope von rekombinantem ZPB-Protein des indischen Hutaffens auch beim

Menschen zur Hemmung der Spermatozoen-Zona Pellucida Bindung führen (Govind *et al.*, 2000).

Im Hinblick auf eine mögliche Immunkontrazeption wurde auch die antigene Wirkung von ZPA untersucht. Im Maus Modell wurde gezeigt, dass die Immunisierung von Mäusen mit rekombinanten ZPA-Epitopen ohne Anzeichen pathologischer Veränderungen im Ovar zur Infertilität führt (Lea *et al.* 2002). Hasegawa *et al.* (2002) wies beim Menschen einen Aminosäuresequenzbereich des ZPA-Proteins nach, der offensichtlich für die Spermatozoenbindung an der Zona Pellucida verantwortlich ist. Der Einsatz von Anti-ZPA-Antisera gegen synthetische Peptide, die diesen ZPA Sequenzbereich einschlossen, führte in Bindungsstudien zur signifikanten Abnahme gebundener Spermatozoen an der Zona Pellucida. Die Möglichkeit, ZPA-Protein als immunkontrazeptives Antigen einzusetzen, wurde auch von der Arbeitsgruppe um Koyama gezeigt. Ein rekombinantes Peptid bestehend aus der NH₂-terminalen Region der humanen ZPA-Sequenz führte nach Immunisierung von indischen Hutaffen zur Produktion von Antikörpern, die in humanen *in vitro* Studien die Spermatozoenbindung an die Oozyte signifikant herabsetzten (Koyama *et al.*, 2002).

Auch der Weissbüschelaffe wurde für verschiedene Immunisierungsstudien mit Zona Pellucida Glykoproteinen eingesetzt. Die Gruppe um Paterson & Aitken wies in einer Reihe von Studien auf die Wirkung von Zona Pellucida C-Protein als immunkontrazeptives Antigen im Marmoset Modell hin. Sie zeigten in ihren ersten Publikationen, dass der Einsatz von rekombinantem humanem ZPC-Protein zwar zur Infertilität der Weibchen führte, dafür allerdings eine ovarielle Dysfunktion in Kauf genommen werden musste. Dagegen war durch die Verwendung von humanen Zona Pellucida C-Peptiden als Antigen keine Schädigung des Ovars zu beobachten; jedoch konnte durch die Peptid-Antigene auch keine anhaltende signifikante Infertilität erzielt werden (Paterson *et al.*, 1996). In neueren Untersuchungen wurde die Antigenität eines chimären Marmoset Zona Pellucida C-Peptidvaccines überprüft. Die Immunisierung mit diesem Peptid induzierte hohe Antikörpertiter ohne auftretende pathologische Ovarveränderungen. *In vitro* Versuche haben zudem auf eine Hemmung der Spermatozoenbindung beim Menschen durch diese Antikörper hingewiesen. Allerdings konnte bei *in vivo* Untersuchungen beim Marmoset-Affen kein kontrazeptiver Effekt nach Peptidimmunisierung festgestellt werden (Paterson *et al.*, 1999; Paterson *et al.*, 2000, Paterson *et al.* 2002).

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *de-novo*-Syntheseorte der ZP-Proteine im Ovargewebe des Marmoset-Affen mittels RT-PCR bestimmt. Weiterhin konnte mit Hilfe von anti-ZP-Peptid Antikörpern ZPA- und ZPC-Protein immunhistologisch und immun-elektronenmikroskopisch im Marmoset-Ovar lokalisiert werden; ergänzend dazu wurden die den antigenen Determinanten entsprechenden ZP-Peptiddomänen funktionell auf deren Bedeutung für die Spermatozoen-Zona Pellucida Bindung hin überprüft. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass polyklonale Anti-ZP-Peptid-Antiseren, die gegen homologe Aminosäuresequenzen in verschiedenen Spezies gerichtet sind, sowohl ZPA- als auch ZPC-Protein im Marmoset Ovar detektierten. Immun-Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass das ZPA-Protein homogen innerhalb der Zona Pellucida verteilt war, während ZPC verstärkt im inneren Teil der Zona Pellucida zu finden war. Diese zweischichtige Anordnung von ZPC-Protein unterstützt die lichtmikroskopische Beobachtung, dass die Zona Pellucida des Marmoset-Affen bilamillär strukturiert ist. ZPA- und ZPC-Protein wurden auch im Ooplasma sowie in den umliegenden Kumuluszellen nachgewiesen. Auffällig war, dass die ZPA-Protein Immunreaktion innerhalb des Ooplasmas und in den umliegenden Follikelzellen im Vergleich zum ZPC-Protein deutlich stärker war. Dem Nachweis von ZP-Proteinen in Follikelzellen und den Hinweisen auf unterschiedliche ZP-Protein Verteilungsmuster in den Zellen des Marmoset Ovargewebes folgte die Beantwortung der Frage nach dem Syntheseort der ZP-Proteine. Mittels RT-PCR konnten in unterschiedlichen follikulären Entwicklungsstadien sowohl in Eizellen als auch in Follikelzellen die mRNA-Expressionen aller drei ZP-Protein kodierenden Gene nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass im Marmoset-Ovar neben den Eizellen auch Follikelzellen ZP Proteine *de novo* synthetisieren. Zur Überprüfung der funktionellen Relevanz der in der Marmoset Zona Pellucida nachgewiesenen ZPA-Epitope wurde erstmals der Kompetitions-Hemizona-Assay eingesetzt. Hier zeigte sich, dass weder polyklonale Antiseren noch monoklonale Antikörper, die gegen die untersuchten ZP Proteindomänen gerichtet sind, die Spermatozoen-Zona Pellucida Interaktion bei *Callithrix jacchus* beeinflussen.

Die im Rahmen der Dissertation erzielten Ergebnisse zur Lokalisation, Synthese und Funktion der ZP-Proteine im Marmoset-Ovar sind Grundlage für weitere Untersuchungen zur immun-kontrazeptiven Bedeutung von ZP-Proteinen und synthetischen ZP-Peptiden in Primaten.

6. Summary

This study used anti-ZP peptide antibodies to localize ZPA and ZPC-Protein expression in the marmoset ovary via immunohistochemistry and transmission electron microscopy. RT-PCR was used to identify areas of de novo protein synthesis. Furthermore, the competition hemizona assay was used for the first time in the marmoset model to investigate the functional relevance of a specific ZPA epitope during spermatozoa-oocyte interaction.

Using polyclonal anti-ZP-peptide-antisera, immunohistochemical experiments demonstrated the localization of ZPA and ZPC-Protein in ovarian sections. ZPA and ZPC-Proteins were detected in the zona Pellucida as well as in surrounding cumulus cells, whereas in the ooplasm and the follicle cells, immunostaining of ZPC-Protein was less intense compared to that of ZPA-Protein. In addition, the bilamellar structure of the marmoset zona Pellucida was visible when anti-ZPC antiserum was used in transmission electron microscopy to determine the disposition of ZPC-Protein within the zona Pellucida. These results raised the question of the localization of de novo synthesis and the functional relevance of ZP proteins in the marmoset monkey.

Therefore, mRNA was isolated from marmoset oocytes and oocyte-free follicle cells and used for RT-PCR. The mRNA expression of every ZP gene was demonstrated in oocytes as well as in follicle cells at different stages of folliculogenesis. These results make it highly likely that the de novo synthesis of ZP proteins is possible in both egg cells and follicle cells in the marmoset.

The competition hemizona assay was used in the marmoset model for the first time to evaluate the functional relevance of a specific ZPA domain during the spermatozoa-egg interaction. It was shown that the capacity of sperm binding to the marmoset zona Pellucida was not influenced by the use of the polyclonal antiserum AS ZPA-20 nor by the application of the monoclonal antibodies mAb ZPA-20, but further study is needed before a definitive statement can be made.

In conclusion, the results of this investigation deepen our understanding of the localization, distribution, and synthesis of ZP proteins as well as the physiological relevance of ZPA-Protein during the interaction of spermatozoa and oocytes in the marmoset model.

7. Literaturverzeichnis

Abbott, D.H., Hearn, J.P.: Physical, hormonal and behavioural aspects of sexual development in the marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. J Reprod Fertil (53), 155-166, 1978.

Abou-Haila, A., Tulsiani, D.R.P.: Mammalian sperm acrosom: formation, contents, and function. Arch Biochem Biophys, (379), 173-182, 2000.

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

Adler, I.D.: Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. Mutat Res (352), 169-172, 1996.

Andrews, J.C., Howard, J.G., Bavister, B.D, Wildt, D.E.: Sperm capacitation in the domestic cat (*Felis catus*) and leopard cat (*Felis bengalensis*) as studied with a salt-stored zona Pellucida penetration assay. Mol Reprod (31), 200-207, 1992.

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

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

Aviles, M., El-Mestrah, M., Jaber, L., Castells, MT., Ballesta, J., Kann, FW.: Cytochemical demonstration of modification of carbohydrates in the mouse zona Pellucida during folliculogenesis. Histochem Cell Biol (113), 207-219, 2000.

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

Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorse, L., Muratori, M., Forti, G.: Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Front Biosci* (5), 110-123, 2000.

Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Krausz, C., Forti, G.: Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: Role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Front Biosci* (1), 189-205, 1996.

Baranska, W., Konwinski, M., Kujawa, M.: Fine structure of the zona Pellucida of unfertilized egg cells and embryos. *J Exp Zool* (192), 193-202, 1975.

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

Bercegeay, S., Allaire, F., Jean, M., L'Hermite, A., Bruyas, J.F., Renard, N., Tainturier, D., Barriere, P.: The bovine zona Pellucida: differences in macromolecular composition between oocytes, pre-treated with A-23187 or not, and embryos. *Reprod Nutr Dev* (33), 567-576, 1993.

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

Bleil, J.D., Wassarman, P.M.: Structure and function of the zona Pellucida: Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona Pellucida. *Dev Biol* (76), 185-202, 1980a.

Bleil, J.D., Wassarman, P.M.: Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae Pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* (20), 837-882, 1980b.

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

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

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

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

Blobel, C.P.: Functional processing of fertilin: evidence for a critical role of proteolysis in sperm maturation and activation. *Rev Reprod* (5), 75-83, 2000.

Bogner, K., Hinsch, K.D., Nayudu, P., Konrad, L., Cassara, C., Hinsch, E.: Localization and synthesis of zona pellucida proteins in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) ovary. *Mol Hum Reprod* (10), 481-488, 2004.

Braw-Tal, R.: The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? *Mol Cell Endocrinol* (187), 11-18, 2002.

Breitbart, H., Naor, Z.: Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Rev Reprod* (4), 151-159, 1999.

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

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

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

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

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

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

Dell'Aquila, M.E., De Felici, M., Massari, S., Maritato, F., Minoia, P.: Effects of fetuin on zona Pellucida hardening and fertilizability of equine oocytes matured in vitro. *Biol Reprod* (61), 533-540, 1999.

De Vos, A., Van Steirteghem, A.: Zona hardening, zona drilling and assisted hatching: new achievements in assisted reproduction. *Cell Tiss Org* (166), 220-227, 2000.

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

Dube, J.L., Wang, P., Elvin, J., Lyons, K.M., Celeste, A. J., Matzuk, M.: The bone morphogenetic protein 15 gene is x-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol* (12), 1809-1817, 1998.

Dunbar, B.S.: Morphological, biochemical, and immunochemical characterization of the mammalian zona Pellucida, in: J.F. Hartmann (ed): *Mechanism and control of animal fertilization*. Academic Press, New York, 139-157, 1983.

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

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

Dunbar, B.S., Prasad, S., Carino, C., Skinner, S.M.: The ovary as an immune target. *J Soc Gynecol Investig* (8, Suppl.1), 43-48, 2001a.

Dunbar, B.S., Timmons, T.M., Skinner, S.M., Prasad, S.V.: Molecular analysis of a carbohydrate antigen involved in the structure and function of zona Pellucida glycoproteins. *Biol Reprod* (65), 951-960, 2001b.

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

Eberspächer, U., Becker, A., Bringmann, P., van der Merwe, L., Donner, P.: Immunohistochemical localization of zona Pellucida proteins ZPA, ZPB and ZPC in human, cynomolgus monkey and mouse ovaries. *Cell Tissues Res* (303), 277-287, 2001.

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

El-Mestrah, M., Castle, P.E., Borossa, G., Kan, F.W.: Subcellular distribution of ZPB, ZPA, and ZPC glycoproteins during folliculogenesis and demonstration of their topographical disposition within the zona matrix of mouse ovarian oocytes. *Biol Reprod* (66), 866-876, 2002.

Epifano, O., Liang, L.F., Familiar, M., Moos, M.C. Jr, Dean, J.: Coordinate expression of the three zona Pellucida genes during mouse oogenesis. *Development* (121), 1947-1956, 1995.

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

Fawcett, D.W.: The mammalian spermatozoa. *Dev Biol* (44), 394-436, 1975.

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

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

Foley, K.P., Leonard, M.W., Engel, J. D.: Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. *Trends Genet* (9), 380-385, 1993.

Franken, D.R., Burkman, L.J., Oehninger, S.C., Coddington, C.C., Veeck, L.L., Kruger, T.F., Rosenwaks, Z., Hodgen, G.D.: Hemizona assay using salt-stored human oocytes: evaluation of zona Pellucida capacity for binding human spermatozoa. *Gam Res* (22), 15-26, 1989.

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

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

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

Gahlay, G.K., Srivastava, N., Govind, C.K., Gupta, S.K.: Primate recombinant zona Pellucida proteins expressed in *Escherichia coli* bind to spermatozoa. *J Reprod Immunol* (53), 67-77, 2002.

Gassen, H.G., Schrimpf, G. (Hrsg.): *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.* 2. Auflage, Spektrum, Akademischer Verlag Heidelberg Berlin, 1999.

Gilchrist, R., Nayudu, P.L., Nowshari, M.A., Hodges, J.K.: Meiotic competence of marmoset monkey oocytes is related to follicle size and oocytes-somatic cell associations. *Biol Reprod* (52), 1234-1243, 1995.

Gilchrist, R.: The meiotic and developmental potential of marmoset monkey oocytes in vitro. Dissertation im Fachbereich Agrarwirtschaft, Universität von Göttingen, Göttingen, 1996.

Gilchrist, R.B., Nayudu, P.L., Hodges, J.K.: Maturation, fertilization, and development of marmoset monkey oocytes in vitro. *Biol Reprod* (56), 238-246, 1997.

Govind, CK., Gupta, SK.: Failure of female baboons (*Papio anubis*) to conceive following immunization with recombinant non-human primate zona Pellucida glycoprotein-B expressed in *Escherichia coli*. *Vaccine* (18), 2970-2978, 2000.

Govind, CK., Hasegawa, A., Koyama, K., Gupta, SK.: Delineation of a conserved B cell epitope on bonnet monkey (*Macaca radiata*) and human zona Pellucida glycoprotein-B by monoclonal antibodies demonstrating inhibition of sperm-egg binding. *Biol Reprod* (62), 67-75, 2000.

Govind, C.K., Gahlay, G.K., Choudhury, S., Gupta, S.K.: Purified and refolded recombinant bonnet monkey (*Macaca radiata*) zona Pellucida glycoprotein-B expressed in *Escherichia coli* binds to spermatozoa. *Biol Reprod* (64), 1147-1152, 2001.

Green, D.P.L.: Three-dimensional structure of the zona Pellucida. *Rev Reprod* (2), 147-156, 1997.

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

Grootenhuis, AJ., Philipsen, HLA., de Breet-Grijnsbach, JTM., van Duin, M.: Immunocytochemical localization of ZPC in primordial follicles of rabbit, marmoset, rhesus monkey and human ovaries using antibodies against human ZPC. *J Reprod Fertil Suppl* (50), 43-54, 1996.

Gupta, S.K., Sharma.M., Behera, A.K., Bisht, R., Kaul, R.: Sequence of complementary deoxyribonucleic acid encoding bonnet monkey (*Macaca radiata*) zona Pellucida glycoprotein ZPB and its high-level expression in *Escherichia coli*. *Biol Reprod* (57), 532-538, 1997a.

Gupta, SK., Jethanandani, P., Afzalpurkar, A., Kaul, R., Santhanam, R.: Prospects of zona Pellucida glycoproteins as immunogens for contraceptive vaccine. *Hum Reprod Update* (3), 311-324, 1997b.

Hägele, W.: Herstellung, Charakterisierung und Einsatz von Anti-Zona Pellucida-Protein 2-Peptid-Antiseren. Dissertation im Fachbereich Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität, Giessen, 1998.

Hammitt, D.G., Syrop, C.H., Walker, D.L., Bennett, M.R.: Conditions of oocyte storage and use of noninseminated as compared with inseminated, non-fertilized oocytes for the hemizona assay. *Fertil Steril* (60), 131-136, 1993.

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

Hasegawa, A., Koyama, K., Isojima, S.: Isolation of four major glycoprotein families (ZPB, ZPA, ZPC, ZP4) of porcine zona Pellucida and characterization of antisera raised to each glycoprotein family. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* (43), 221-226, 1991.

Hasegawa, A., Hamada, Y., Shigeta, M., Koyama, K.: Contraceptive potential of synthetic peptides of zona Pellucida protein (ZPA). *J Reprod Immunol* (53), 91-98, 2002.

Hedrick, J.L., Wardrip, N.J.: Isolation of the zona Pellucida and purification of its glycoprotein families from pig oocytes. *Anal Biochem* (157), 63-70, 1986.

Hinsch, KD., Hinsch, E., Meinecke, B., Töpfer-Petersen, E., Pfisterer, S., Schill, WB.: Identification of mouse ZPC-Protein in mammalian oocytes with antisera against synthetic ZPC peptides. *Biol Reprod* (51), 193-204, 1994.

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

Hinsch, E., Hägele, W., Schill, WB., Hinsch, KD.: The zona Pellucida "receptors" in: R. Ivell, AF Holstein (eds.): *The fate of the male germ cell*, Plenum Press, New York, 313-328, 1997.

Hinsch, E., Hägele, W., van der Ven, H., Oehninger, S., Schill, WB., Hinsch, KD.: Immunological identification of zona Pellucida 2 (ZPA) protein in human oocytes. *Andrologia* (30), 281-287, 1998.

Hinsch, E., Hägele, W., Bohle, R.M., Schill, W.B., Hinsch, K.D.: Evaluation of a ZPA domains of functional importance with antisera against synthetic ZPA peptides. *J Reprod Fertil* (114), 245-251, 1998a.

Hinsch, E.: Untersuchungen zur Lokalisation und Funktion von Zona Pellucida A- und Zona Pellucida C-Proteinen. *Habilitationsschrift im Fachbereich Veterinärmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, 1998b.*

Hinsch, E., Oehninger, S., Schill, WB., Hinsch, KD.: Species specificity of human and murine anti-ZPC synthetic peptide antisera and use of the antibodies for localization and identification of ZPC or ZPC domains of functional significance. *Human Reprod* (14), 419-428, 1999.

Hinsch, E., Groeger, S., Oehninger, S., Hinsch, KD.: Localization and functional importance of a conserved zona perllucida 2 protein domain in the human and bovine ovary using monoclonal anti-ZPA peptide antibodies. *Theriogenology* (60), 1331-1344, 2003.

Horvath, P.M., Kellom, T., Caulfield, J., Boldt, J.: Mechanistic studies of the plasma membrane polyspermy in mouse eggs. *Mol Reprod Dev* (34), 65-72, 1993.

Howes, E., Pascall, J.C., Engel, W., Jones, R.: Interactions between mouse ZPA glycoprotein and proacrosin; a mechanism for secondary binding of sperm to the zona Pellucida during fertilization. *J Cell Sci* (114), 4127-4136, 2001.

Howes, E., Jones, R.: Interactions between zona Pellucida glycoproteins and sperm proacrosin/acrosin during fertilization. *J Reprod Immunol* (53), 181-192, 2002.

Hurteau, G. J., Spivack, S.D.: mRNA-specific reverse transcription-polymerase chain reaction from human tissue extracts. *Anal Biochem* (307), 304-315, 2002.

Jethanandani, P., Santhanam, R., Gupta, S.K.: Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of cDNA encoding bonnet monkey (*Macaca radiata*) zona Pellucida glycoprotein-ZPA. *Mol Reprod Dev* (50), 229-239, 1998.

Jones, W.R.: Gamete immunology. *Hum Reprod* (9), 107-124, 1994.

Junqueira, L.C., Carneiro, J.: *Histologie. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*, 4. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 586-587, 1996.

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

Keefe, D., Tran, P., Pellegrine, C., Oldenbourg, R.: Polarized light microscopy and digital image processing identify a multilaminar structure of the hamster zona Pellucida. *Hum Reprod* (12), 1250-1252, 1997.

Kerr, L.E., Wilson, M.R., Aitken, R.J.: Molecular characterisation of zona Pellucida 1 (ZPB) in the marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. *J Reprod Fertil, Abstr. Ser.* 18, 29-30, 1996.

Kim, C.H., Seo, B.B., Yamanouchi, K., Kuromaru, M., Sawasaki, T., Hinsch, E., Hinsch, K.D., Naito, K., Tachi, C., Toja, H.: Essential role of ZP molecules in tubal transport of embryos in mice. *Mol Reprod Dev* (61), 327-334, 2002.

Kölle, S., Sinowatz, F., Boie, G., Totzauer, I., Amselgruber, W., Plendl, J.: Localization of the mRNA encoding the zona protein ZPC alpha in the porcine ovary, oocyte and embryo by non-radioactive in situ hybridization. *Histochem J* (28), 441-447, 1996.

Kölle, S., Sinowatz, F., Boie, G., Palma, G.: Differential expression of ZPC in the bovine ovary, oocyte and embryo. *Mol Reprod Dev* (49), 435-443, 1998.

Kolluri, S.K., Kaul, R., Banerjee, K., Gupta, S.K.: Nucleotide sequence of cDNA encoding bonnet monkey (*Macaca radiata*) zona Pellucida glycoprotein-ZPC. *Reprod Fertil Dev* (7), 1209-1212, 1995.

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

Koyama, K., Hasegawa, A., Gupta, S.K.: Prospect for immunocontraception using the NH₂-terminal recombinant peptide of human zona Pellucida protein (hZPA). *Am J Reprod Immunol* (47), 303-310, 2002.

Küderling, I., Schneiders, A., Sonksen, J., Nayudu, P.L., Hodges, J.K.: Non-invasive collection of ejaculates from the common marmoset (*Callithrix jacchus*) using penile vibrostimulation. *Am J Primatol* (52), 149-154, 2000.

Lea, IA., Widgren, EE., O'Rand MG.: Analysis of recombinant mouse zona Pellucida protein 2 (ZPA) constructs for immunocontraception. *Vaccine* (20), 1515-1523, 2002.

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

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

Leyton, L., Saling, P.: 95kDa sperm proteins bind ZPC and serves as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell* (57), 1123-1130, 1989a.

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

-
- Liang, L.F., Chamow, S.M., Dean, J.: Oocyte-specific expression of mouse ZP-2: developmental regulation of the zona Pellucida genes. *Mol Cell Biol* (10), 1507-1515, 1990.
- Liang, L.F., Dean, J.: Conservation of mammalian secondary sperm receptor genes enables the promoter of the human gene to function in mouse oocytes. *Dev Biol* (156), 399-408, 1993.
- Litscher, E.S., Juntunen, K., Seppo, A., Penttila, L., Niemela, R., Renkonen, O., Wassarman, P.M.: Oligosaccharide constructs with defined structures that inhibit binding of mouse sperm to unfertilized eggs in vitro. *Biochemistry* (34), 4662-4669, 1995.
- Mahony, M.C., Rice, K., Goldberg, E., Doncel, G.: Baboon spermatozoa-zona Pellucida binding assay. *Contraception* (61), 235-240, 2000.
- Maleszewski, M., Kimura, Y., Yanagimachi, R.: Sperm membrane incorporation into oolemma contributes to the oolemma block to sperm penetration: evidence based on intracytoplasmic sperm injection experiments in the mouse. *Mol Reprod Dev* (44), 256-259, 1996.
- Martinez, ML., Fontenot, GK., Harris, JD.: The expression and localization of zona Pellucida glycoproteins and mRNA in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Reprod Fertil Suppl* (50), 35-41, 1996.
- Martinez, ML., Harris, JD.: Effectiveness of zona Pellucida protein ZPB as an immunocontraceptive antigen. *J Reprod Fertil* (120), 19-32, 2000.
- Mastromonaco, G.F., Hay, M.A., Goodrowe, K.L.: The effects of oocyte storage and cumulus cell presence on canine zona penetration by domestic dog spermatozoa. *Theriogenology* (57), 1123-1134, 2002.
- Mighell, A.J., Smith, N.R., Robinson, P.A., Markham, A.F.: Vertebrate pseudogenes. *FEBS Lett* (468), 109-114, 2000.
- Millar, M.R., Sharpe, R.M., Weinbauer, G.F., Fraser, H.M., Saunders, P.T.K.: Marmoset spermatogenesis: organizational similarities to the human. *Int J Androl* (23), 266-277, 2000.

Miller, D.J., Gong, X., Decker, G., Shur, B.D.: Egg cortical granule N-acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy. *J Cell Biol* (123), 1431-1440, 1993.

Moller, C.C., Wassarman, P.M.: Characterization of a proteinase that cleaves zona Pellucida ZPA following activation of mouse eggs. *Dev Biol* (132), 103-112, 1989.

Moore, K.L.: Embryologie. Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen, 4. Auflage. F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 16-17, 1996.

Morales, P., Llaos, M.: Interaction of human spermatozoa with the zona Pellucida of oocyte: Development of the acrosome reaction. *Front Biosci* (1), 146-160, 1996.

Mortillo, S., Wassarman, P.M.: Differential binding of gold-labeled zona Pellucida glycoproteins mZPA and mZPC to mouse sperm membrane compartments. *Development* (113), 141-149, 1991.

Mwethera, P.G., Makokha, A., Chai, D.: Fertilin beta peptides inhibit sperm binding to zona-free eggs in a homologous baboon in vitro fertilization system. *Contraception* (59), 131-135, 1999.

Myles, D.G., Primakoff, P.: Localized surface antigens of guinea pig sperm migrate to new regions prior to fertilization. *J Cell Biol* (99), 1634-1641, 1984.

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

Myles, D.G., Primakoff, P.: Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol Reprod* (56), 320-327, 1997.

Nikas, G., Paraschos, T., Psychoyos, A., Handyside, A.H.: The zona reaction in human oocytes as seen with scanning electron microscopy. *Hum Reprod* (9), 2135-2138, 1994.

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

Oehninger, S., Scott, R.T., Coddington, C.C., Franken, D.R., Acosta, A.A., Hodgen, G.D.: Validation of the hemizona assay in a monkey model: influence of oocyte maturational stages. *Fertil Steril* (51), 881-885, 1989.

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

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

Overstreet, J.W., Lin, Y., Yudin, A.I., Meyers, S.A., Primakoff, P., Myles, D.G., Katz, D.F., Vandervoort, C.A.: Location of the PH-20 protein on acrosome-intact and acrosome-reacted spermatozoa of cynomolgus macaques. *Biol Reprod* (52), 105-114, 1995.

Paterson, M., Wilson, M.R., van Duin, M., Aitken, R.J.: Evaluation of zona Pellucida antigens as potential candidates for immuncontraception. *J Reprod Fertil Suppl* (50), 175-182, 1996.

Paterson, M., Wilson, MR., Jennings, ZA., van Duin, M., Aitken, RJ.: Design and evaluation of a ZPC peptide vaccine in a homologous primate model. *Mol Hum Reprod* (5), 342-352, 1999.

Paterson, M., Jennings, ZA., van Duin, M., Aitken, RJ.: Immuncontraception with Zona Pellucida Proteins. *Cells Tissues Organs* (166), 228-232, 2000.

Paterson, M., Jennings, ZA., Wilson MR., Aitken RJ.: The contraceptive potential of ZPC and ZPC peptides in a primate model. *J Reprod Immunol* (53), 99-107, 2002.

Patrat, C., Serres, C., Jouannet, P. : The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol Cell* (92), 255-266, 2000.

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

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

Primakoff, J.P., Hyatt, H., Tredick-Kline, J.: Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *J Cell Biol* (104), 141-149, 1987.

Pu, X.C., Ji, W., Z., Yang, S.C., Chen, J.C., Zou, R.J., Shang, E.Y.: Correlation of zona-binding with oocyte maturation and sperm motility in rhesus monkeys by hemizona assay. *Mol Reprod Dev* (39), 25-29, 1994.

Rankin, T., Familari, M., Lee, E., Ginsberg, A., Dwyer, N., Blanchette-Mackie, J., Drago, J., Westphal, H., Dean, J.: Mice homozygous for an insertional mutation in the ZPC gene lack a zona Pellucida and are infertile. *Development* (122), 2903-2910, 1996.

Rankin, T.L., Tong, Z.B., Castle, P.E., Lee, E., Gore-Langton, R., Nelson, L.M., Dean, J.: Human ZPC restores fertility in ZPC null mice without affecting order-specific sperm binding. *Development* (125), 2415-2424, 1998.

Rankin, T., Talbot, P., Lee, E., Dean, J.: Abnormal zonae Pellucidae in mice lacking ZPB result in early embryonic loss. *Development* (17), 3847-3855, 1999.

Rankin, T.L., O'Brien, M., Lee, E., Wigglesworth, K., Eppig, J., Dean, J.: Defective zonae Pellucidae in ZPA-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development* (128), 1119-1126, 2001.

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

Sacco, A.G., Yurewicz, E.C.: Assessment of synthetic peptides from porcine zona glycoproteins ZPC α and ZPC β for contraceptive vaccine development, in: GP.Talwar, KVS.

Rao, V.S. Chauhan (eds.): Recombinant and synthetic vaccines. Narosa Publishing House, New Delhi, 283-290, 1994.

Sadler, T.W.: Medizinische Embryologie. Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen. 9. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York, 31, 1998.

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

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

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

Sasanami, T., Pan, J., Doi, Y., Hisada, M., Kohsaka, T., Toriyama, M., Mori, M.: Secretion of egg envelope protein ZPC after C-terminal proteolytic processing in quail granulosa cells. *Eur J Biochem* (269), 2223-2231, 2002.

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

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

Sengoku K., Tamate, K., Horikawa, M., Takaoka, Y., Ishikawa, M., Dukelow, W.R.: Plsama membrane block to polyspermy in human oocytes and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil* (105), 85-90, 1995.

Sengoku, K., Tamate, K., Takaoka, Y., Horikawa, M., Goishi, K., Okada, R., Tsuchiya, K., Ishikawa, M.: Requirement of sperm-oocyte plasma membrane fusion for establishment of the plasma membrane block to polyspermy in human pronuclear oocytes. *Mol Reprod Dev* (52), 183-188, 1999.

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

Shrimale, R.K., Reddy, K.V.: Integrins and disintegrins: the candidate molecular players in sperm-egg interaction. *Indian J Exp Biol* (38), 415-424, 2000.

Sinowatz, F., Plendl, J., Kölle, S.: Protein-carbohydrate interactions during fertilization. *Acta Anat* (161), 196-205, 1998.

Sinowatz, F., Kölle, S., Töpfer-Petersen, E.: Biosynthesis and expression of zona Pellucida glycoproteins in mammals. *Cells Tissues Organs* (168), 24-35, 2001.

Snell, W.J., White, J.M.: The molecules of mammalian fertilization. *Cell* (85), 629-637, 1996.

Stevens, R.W.: Basic spermatozoon anatomy and physiology for the clinical, 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, 1-23, 1990.

Takeuchi, Y., Nishimura, K., Aoki, N., Adachi, T., Sato, C., Kitajima, K., Matsuda, T.: A 42-kDa glycoprotein from chicken egg-envelope, an avian homolog of the ZPC family glycoproteins in mammalian Zona Pellucida. Its first identification, cDNA cloning and granulosa cell-specific expression. *Eur J Biochem* (260), 736-742, 1999.

Tesarik, J.: Targeting the zona Pellucida for immunocontraception: a minireview. *Hum Reprod* (10), 132-9, 1995.

Thillai-Koothan, P., van Duin, M., Aitken, R.J.: Cloning, sequencing and oocyte-specific expression of the marmoset sperm receptor protein, ZPC. *Zygote* (2), 93-101, 1993.

Töpfer-Petersen, E., Cechova, D.: Zona Pellucida induces conversion of proacrosin to acrosin. *Int J Androl* (13), 190-196, 1990.

Topper, E.K., Kruijt, L., Calvete, J., Mann, K., Töpfer-Petersen, E., Woelders, H.: Identification of bovine zona Pellucida glycoproteins. *Mol Reprod Dev* (46), 344-350, 1997.

Tso, J.Y., Sun, X.H., Kao, T.H., Reece, K.S., Wu, R.: Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res* (13), 2485-2502, 1985.

Tsubamoto, H., Hasegawa, A., Nakata, Y., Naito, S., Yamasaki, N., Koyama, K.: Expression of recombinant human zona Pellucida protein 2 and its binding capacity to spermatozoa. *Biol Reprod* (61), 1649-1654, 1999.

Tulsiani, D.R.P., Aboz-Haila, A., Loeser, C.R., Pereira, B.M.: The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res* (240), 151-164, 1998.

Waclawek, M., Foisner, R., Nimpf, J., Schneider, W.J.: The chicken homologue of zona Pellucida protein-3 is synthesized by granulosa cells. *Biol Reprod* (59), 1230-1239, 1998.

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

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

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

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

Wolfsberg, T.G., Straight, P.D., Gerena, R.L., Huovila, A.J., Primakoff, P., Myles, D.G., White, J.M.: ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. *Dev Biol* (169), 378-383, 1995.

Wolters, J., Immelmann, K.: Krallenaffen, in: Grzimeks Enzyklopädie Säugetiere. Kindler Verlag GmbH München, 120 ff., 1988.

Yanagimachi, R., Lopata, A., Odom, C.B., Bronson, R.A., Mahi, C.A., Nicolson, G.L.: Retention of biologic characteristics of zona Pellucida in highly concentrated salt solution: The use of salt-stored eggs for assessing the fertilizing capacity of spermatozoa. *Fertil Steril* (31), 562-574, 1979.

Yanagimachi, R.: Mammalian fertilization, in: E. Knobil, J.D. Neill (eds.): *The Physiology of Reproduction*, Second Edition. Raven Press, Ltd., New York, 198-317, 1994.

Yudin, A.I., Vandervoort, C.A., Li, M.W., Overstreet, J.W.: PH-20 but not acrosin is involved in sperm penetration of the macaque zona Pellucida. *Mol Reprod Dev* (53), 350-362, 1999.

Zaneveld, L.J., De Jonge, C.J., Anderson R.A., Mack, S.R.: Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod* (6), 1265-1274, 1991.

8.2. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau PD Dr. E. Hinsch sowie Herrn PD K.D. Hinsch für die umfassende Betreuung meiner Dissertationsarbeit, ihrer immerwährenden Hilfe in allen wissenschaftlichen Belangen und den vielen fruchtbaren Diskussionen. Die Arbeit mit Ihnen machte viel Spass und gab neben der Wissenschaft viel Raum für die persönliche Weiterentwicklung.

Besonders danken möchte ich auch Frau Dr. P. Nayudu vom Deutschen Primatenzentrum in Göttingen. Unter ihrer Anleitung erfolgte die Gewinnung des Gewebes und der Zellen der Marmoset-Affen. Ausserdem möchte ich ihr für viele Denkanstösse bezüglich meiner Arbeit danken. An dieser Stelle auch herzlichen Dank an Nicole Umland vom Deutschen Primatenzentrum für ihre ständige Hilfe in allen „labortechnischen Angelegenheiten“

Ebenso vielen Dank an Herrn PD L. Konrad, der immer für Fragen offen war, mir mit Rat und Tat zur Seite stand und mich vor allem in molekularbiologischen Belangen immer wieder unterstützte.

Ein grosses Dankeschön auch an alle Mitarbeiter des Labors: Viviana, Rina, Stefan und Carolina. Besonderer Dank gilt auch Sabine Gröger. Sie führte mich in das Projekt ein, brachte mir vieles bei und half, wo sie nur konnte, vor allem bei der Vorbereitung der Transmissionselektronenmikroskopie, sowie der Herstellung und Aufnahme der Schnitte.

Zum Schluss möchte ich mich auch ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium in Giessen erst ermöglichten, zu jeder Zeit voll und ganz hinter mir standen und immer an mich geglaubt haben. Ebenso vielen Dank an meinen Bruder Matthias, der immer ein offenes Ohr für mich hatte, mich stets motiviert hat und bei Problemen immer hilfreich zur Seite stand.

Die Arbeit entstand mit freundlicher Unterstützung eines Doktorandenstipendiums im Rahmen des DFG GraduiertenKöllegs „Zell-Zell-Interaktion im Reproduktionsgeschehen“ (GK 533).

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, im November 2004