Herstellung, Charakterisierung und Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen ein synthetisches ZP2-Peptid

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

vorgelegt von Sabine Elisabeth Gröger
aus Marburg-Wehrda

Gießen 2003

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

Leiter: Prof. Dr. W.-B. Schill
des Universitätsklinikums

Gutachter: Prof. Dr. Hinsch
Gutachter: Prof. Dr. Meinhardt

Tag der Disputation: 14. 04.2004

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig 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.

Abkürzungen

Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CC	Kumuluszelle
cDNA	copy DNA
HZ	Hemizona
HZI	Hemizona-Index
KHZA	Kompetitions-Hemizona-Assay
mAk	monoklonaler Antikörper
mab	monoclonal Antibody
mRNA	messenger RNA
RT-Reaktion	Reverse-Transkriptase-Reaktion *(=Reverse Transkription)*
OC	Oozyte
OP	Ooplasma
PBS	Phosphat-buffered-saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
TBS	Tris-buffered-saline
v/v	Volume per volume
w/v	Weight per volume
ZP	Zona pellucida
ZP2	Zona pellucida 2-Protein

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG 5

1.1 Grundlagen der Imprägnation 5

1.2 Die Eizelle 7

1.2.1 Aufbau 7

1.2.2 Zona pellucida (ZP) 8

1.2.2.1 Zona pellucida-Protein 1/B (ZP1/B) 10

1.2.2.2 ZP-Protein 2/A (ZP2/A) 11

1.2.2.3 Zona pellucida-Protein 3/C (ZP3/C) 12

1.3 Das Spermatozoon 15

1.3.3 Aufbau 15

1.3.4 Kapazitation und akrosomale Reaktion 16

1.4 Klinische Relevanz 17

1.5 Zielstellung der Arbeit 19

2 MATERIALIEN UND METHODEN 21

2.1 Materialien 21

2.1.1 Hersteller und Lieferfirmen 21

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien 22

2.1.3 Eingesetzte Immunreagenzien 26

2.1.3.1 Medien und Pufferlösungen 26

2.1.3.2 Verwendete Kits 29

2.1.4 Geräte 30

2.1.5 Versuchstiere 31

2.1.6 Ausgewählte Peptide 31

2.2 Methoden 32

2.2.1 Kopplung vom Peptid an KLH: 32

2.2.2 Immunisierung: 32

2.2.3 Herstellung monoklonaler Antikörper 33

2.2.3.1 In vivo Zellfusion 33

2.2.3.2 In-vitro Zellfusion: 34

Inhaltsverzeichnis

2.2.3.3 Klonierung:....36
2.2.4 Nachweis von zirkulierenden Antikörpern mittels Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA):.... 37
2.2.5 Affinitätschromatographische Reinigung von monoklonalen Antikörpern aus Zellüberstand.... 38
2.2.6 Herstellung von Paraffinschnitten aus Ovarien.... 39
2.2.7 Immunhistochemie auf Paraffinschnitten.... 39
2.2.8 Funktionelle Spermatozoenbindungstudien mit dem Kompetitions-Hemizona-Assay (KHZA).... 40
2.2.8.1 Gewinnung von Eizellen aus Rinderovarien....41
2.2.8.2 Maturation....41
2.2.8.3 Herstellung von ZP-Hälften (Hemizonae pellucidae, HZs)....42
2.2.8.4 Vorbereitung der Spermatozoensuspension....42
2.2.8.5 Vorbereitung der Hemizonae....42
2.2.8.6 Koinkubation und Ermittlung des Hemizona-Indexes (HZI)....43
2.2.8.7 Statistische Auswertung der Ergebnisse des Hemizonae-Assay....45
2.2.9 Immunfluoreszenz mit bovinen, humanen und Maus-Eizellen.... 45
2.2.10 Immuno-Blot.... 46
2.2.10.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese....46
2.2.10.2 Western-Blot....46
2.2.10.3 Immunbiochemische Identifizierung von Proteinen....47
2.2.11 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper.... 48
2.2.12 In vivo Fertilisierungsversuche immunisierter Mäuse.... 49
2.2.13 Histologische Aufarbeitung der Ovarien der immunisierten Mäuse.... 49
2.2.14 Herstellung von Schnittpräparaten für die Immunelektronen mikroskopie.... 49
2.2.15 Immunogoldreaktion mit Ultradünnschnitten.... 50
2.2.16 Genexpression der Zona pellucida Glykoproteine.... 51
2.2.16.1 Isolierung von mRNA aus B6D2F1 Maus-Material....51
2.2.16.2 Reverse Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion)....53
2.2.16.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)....53
2.2.16.4 Oligonukleotid-Primer....54
2.2.16.5 PCR....55
2.2.16.6 Gelelekektrophorese der PCR-Produkte....56
2.2.16.7 Sequenzierung der PCR-Produkte....56

3 ERGEBNISSE 57

3.1 Eingesetztes, synthetisch hergestelltes Peptid 57

3.1.1 Immunisierung von Balb-C Mäusen:..... 57

3.1.2 Nachweis von Anti-ZP2-1 Peptidantikörpern im Mausserum..... 57

3.1.3 Zellfusionen von Myelomzellen und Milzzellen aus mit ZP2-1 immunisierten Mäusen (In vivo Zellfusionen)..... 60

3.1.4 Zellfusionen von Milzzellen unbehandelter Mäuse mit ZP2-1 Antigen präsentierenden Support-Zellen (In vitro Zellfusion)..... 61

3.2 Antikörpernachweis in Hybridomzellkulturüberständen mittels des Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) 61

3.3 Reinigung und Konzentrierung von monoklonalen Antikörpern über immobilisierte Peptide 62

3.4 Bestimmung der Immunglobulin-Klassen der monoklonalen Antikörper des mAk 24/4 C..... 63

3.5 Immunhistochemische Identifizierung von ZP2-Protein in Paraffinschnitten von humanen und bovinen Ovarien durch den Einsatz des monoklonalen Antikörpers mAk ZP2-20 (Klon 24/4 C) 65

3.6 Immunfluoreszenzuntersuchungen mit mAk 24/4 C 68

3.7 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper im Immunoblot 70

3.7.1 Elektrophoretische Proteinauftrennung der Zona pellucida Proteine von humanen und bovinen Eizellen..... 70

3.7.2 Immunbiochemische Identifizierung der Zona pellucida-Proteine..... 70

3.8 Funktionelle Spermatozoenbindungsstudien mit dem Kompetitions-Hemizona-Assay (KHZA) im bovinen Modell 71

3.9 Immunisierung weiblicher C213 - F1 Mäuse mit ZP2 Peptid 73

3.9.1 Konzeptionserfolg..... 73

3.9.2 Histologische Untersuchung der Ovarien nach Immunisierung 74

3.10 Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen an Ovarien von Marmoset-Monkey und Maus bzw. an humanen und bovinen Eizellen mit dem monoklonalen Antikörper mAk 24/4 C 75

3.11 Darstellung der Expression Zona pellucida 2-Protein kodierender Gene. 77

3.11.1 RT-PCR zur Darstellung der mRNA-Expression der Zona pellucida in Ovar, Oozyten und Kumulus-Zellen der Maus 78

3.11.2 Sequenzierung der PCR-Fragmente 79

4 DISKUSSION 81

5 ZUSAMMENFASSUNG 94

6 SUMMARY 95

7 LITERATURVERZEICHNIS: 96

8 ANHANG 113

1. Einleitung

1.1 Grundlagen der Imprägnation

Komplexe Interaktionen zwischen Spermatozoen und Oozyten stellen die Voraussetzung für eine erfolgreiche Imprägnation, das aktive Eindringen des Spermatozoenkerns in die Eizelle, dar. Dieser Vorgang ist in Abb. 1 schematisch dargestellt. Der erste Schritt ist hierbei die Bindung der Spermatozoen an die Zona pellucida (ZP), welche die Oozyte umgibt (Wassarman et al., 1995). In der Regel erfolgt diese Bindung nur an Oozyten der gleichen Spezies und scheint mit Einschränkungen die Speziesspezifität des Befruchtungsvorganges zu gewährleisten (Yanagimachi, 1994). Im vorderen Kopfbereich des Spermatozoons ist das Akrosom lokalisiert, das ein mit proteolytischen Enzymen angefülltes Hohlorganell darstellt. Durch die Bindung an die Zona pellucida wird die akrosomale Reaktion im Spermatozoon ausgelöst (Saling et al., 1979; Bleil und Wassarman, 1980a). Hierbei verschmilzt die äußere akrosomale Membran mit der Plasmamembran des Spermatozoons. In Folge dessen kommt es zur Vesikelbildung und letztendlich zur Auflösung der Membran. Die im Akrosom enthaltenen Enzyme werden auf diesem Weg freigesetzt (Saling et al., 1989). Diese Enzyme unterstützen durch ihre Eigenschaften die Penetration der Zona pellucida durch das Spermatozoon und ermöglichen so dessen Bindung an die Eizelle (Propping et al., 1978; Storey, 1995; Brown und Cheng, 1992).

Die durch Integrine und Fertiline vermittelte Fusion der Spermatozoenmembran mit der Plasmamembran der Oozyte (Blobel et al., 1992; Fusi et al., 1992, 1993; Myles et al., 1994) löst mehrere biochemische Reaktionen aus, die die Penetration und Fusion weiterer Spermatozoen mit der Eizelle verhindern und einen Schutz vor Mehrfachbefruchtung darstellen (Ducibella 1991; Hatanaka et al., 1992; Yanagimachi, 1994). Auf Seiten der Eizelle spielen Integrine und auf Seiten der Spermatozoen ADAM-Proteine (A Disintegrin A Metalloprotease) eine Rolle, die A Disintegrin und A Metalloprotease Domänen beinhalten. Bisher sind über 30 Mitglieder der ADAM-Proteinfamilie bekannt. Bei 5 ADAM-Proteinen ist eine Interaktion mit Integrinen auf der Eizelloberfläche beschrieben (Evans, 2001). Unter anderem wurde die funktionelle Bedeutung von ADAM2 (=Fertilin β) (Bigler et al., 2000), ADAM1 (=Fertilin α) (Wong et al., 2001) und ADAM3 beschrieben (Takahashi et al., 2001). Nach Penetration des Oolemmmas ist die sogenannte „Cortical Granule Reaction“ für den Befruchtungsvorgang von entscheidender Bedeutung. Sie ist Teil

des Polyspermieblockes. Die mit proteolytischen Enzymen angefüllten Granula geben bei diesem Vorgang ihren enzymatisch wirksamen Inhalt nach außen ab. Die freigesetzten Enzyme bedingen eine partielle Hydrolyse der Zona pellucida Proteine, woraufhin diese verhärtet und undurchdringbar wird für weitere Spermatozoen (Barros und Yanagimachi, 1971). Der Einbau neuer Glykoproteine in die Zona pellucida nach der Exozytose der kortikalen Granula wird ebenfalls diskutiert (Avilés et al., 1996). Eine Depolarisierung des Oolemms, die bei Seeigeln eine Mehrfachbefruchtung verhindert, konnte im Säugermodell, z.B. der Maus, nicht nachgewiesen werden (Jaffe et al., 1983). Ein einzelner elektrischer Impuls führt durch Auslösung der „Cortical Granule Reaction“ in der Rinder-Eizelle zur Penetrationsblockade der Spermatozoen (Soloy et al., 1996). Die Hauptmechanismen des Polyspermieblockes variieren bei den unterschiedlichen Säugerspezies. So beruht er z.B. beim Menschen und Hamster hauptsächlich auf der Zona pellucida Veränderung, ausgelöst durch die „Cortical Granule Reaction“. Bei der Maus, der Ratte und beim Meerschweinchen scheint vordergründig eine Veränderung der Plasmamembran der Eizelle dafür verantwortlich zu sein. Beim Kaninchen z.B. sind dagegen beide Mechanismen gleichermaßen von Bedeutung.

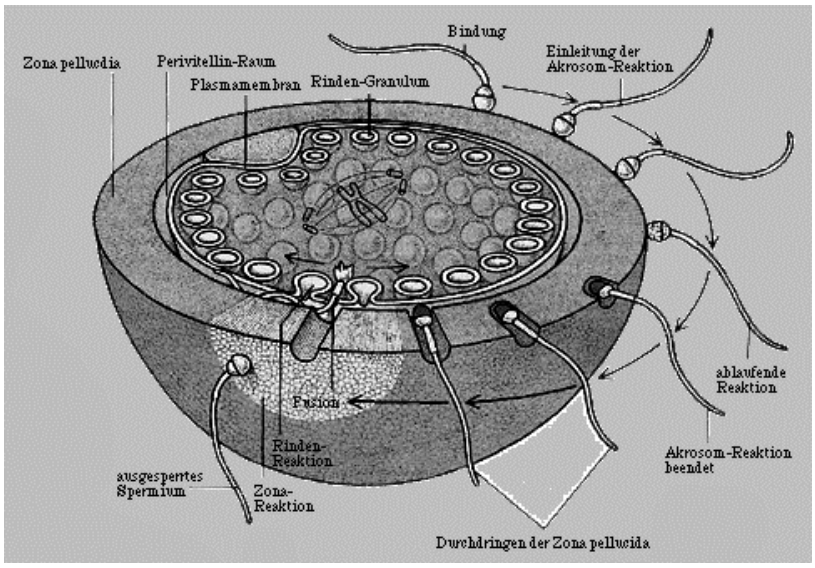

Abb.1: Die einzelnen Schritte der Imprägnation sind von rechts oben im Uhrzeigersinn schematisch dargestellt.

Die Fusion von Spermatozoon und Oozyte führt zur Aktivierung der Eizelle. Diese Aktivierung beinhaltet die bereits erwähnte Exozytose der kortikalen Granula, die Vollendung der Meiose, die Bildung des weiblichen Vorkerns und die DNA-Synthese in den Vorkernen. Sie stellt damit die Grundlage für die Verschmelzung der Vorkerne (Konjugation) dar (Yanagimachi, 1994). Diese Spermatozoen-induzierte Eizellaktivierung wird von G-Proteinen (Guaninnukleotid bindende Regulatorproteine) gesteuert, die als Signaltransduktionsmoleküle ubiquitär in Zellen vorkommen (Moore et al., 1993).

1.2 Die Eizelle

1.2.1 Aufbau

Die Eizelle ist eine kugelförmige, zytoplasmareiche Zelle (Abb. 2). Beim Menschen beträgt ihr Durchmesser zum Zeitpunkt der Ovulation 120-150 µm. Ähnlich groß ist sie beim Rind und beim Schwein (Kanitz, 1994), während die Eizelle der Maus einen Durchmesser von ca. 80 µm aufweist (Eppig, 1991). Das Volumen der menschlichen Eizelle wird mit ca. 0,8 x $10^6 \mu m^3$ angegeben (Michelmann et al., 1995). Neben Zellkern und Zellorganellen wie Ribosomen, Mitochondrien, Golgi-Apparat sind auch die bereits erwähnten, enzymreichen kortikalen Granula enthalten. Diese sind ca. 2 µm von der Plasmamembran entfernt lokalisiert (Ducibella, 1991).

Von den Oogonien durchläuft ein gewisser Anteil der Zellen eine Entwicklung vom Primordialfollikel über den Primär- und den Sekundär- zum Tertiärfollikel, von denen nur einzelne zum sprungreifen Tertiärfollikel heranreifen. Dabei wird erst kurz vor der Ovulation die erste Reifeteilung beendet, wobei das Polkörperchen entsteht. Während der Ovulation beginnt im Zellkern die zweite Reifeteilung, verharrt jedoch in der Metaphase bis zum Zeitpunkt des Eindringens eines Spermatozoons in die Oozyte (Moore, 1985). Im Maus Ovar dauert das Wachstum der Eizelle bis zur vollen Größe etwa 2 bis 3 Wochen. Die Eizellen in voll ausgebildeten Graaf`schen Follikeln vollenden die erste Reduktionsteilung kurz vor ihrer Ovulation. Ovulierte Eizellen unterlaufen im Ovidukt eine Entwicklung bis zur Metaphase II der Meiose, in der sie bis zur Fertilisation verharren (Wassarman und Albertini, 1994).

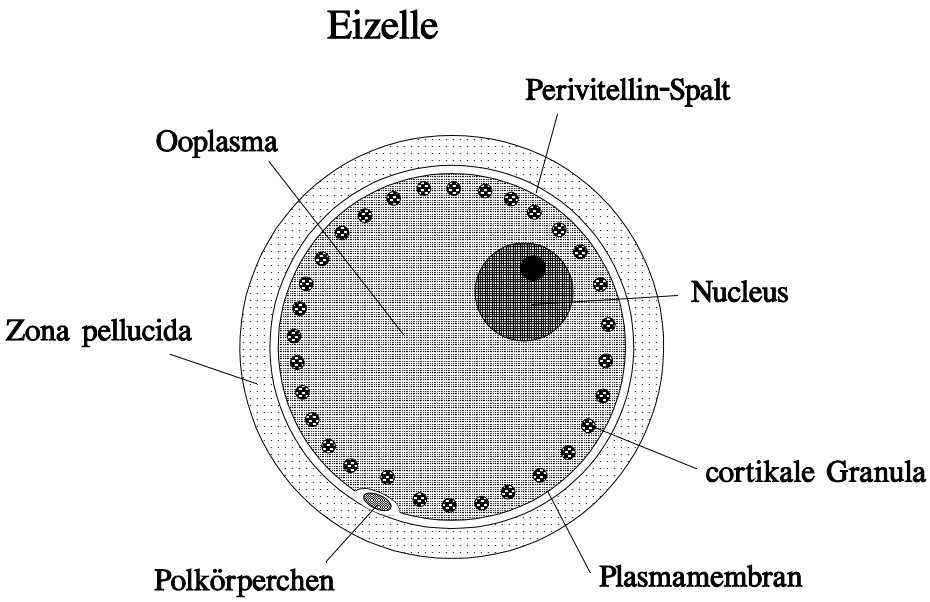

Abb. 2: Schematische Darstellung einer Eizelle mit Zona pellucida und ihrer Hauptbestandteile.

1.2.2 Zona pellucida (ZP)

Die Zona pellucida umgibt, abgetrennt durch den bei der menschlichen Eizelle ca. 4,2 µm breiten Perivitellin-Spalt, extrazellulär die Oozyte (Dandekar et al., 1995; Michelmann et al., 1995). Sie besitzt neben einer mechanischen Schutzfunktion eine wesentliche Bedeutung bei der Interaktion des Spermatozoon mit der Eizelle, wie die Gewährleistung der speziesspezifischen Spermatozoenbindung, die Induktion der akrosomalen Reaktion und die Verhinderung einer Mehrfachbefruchtung (Nichols und Gardner, 1989; Wassarman und Albertini, 1994). Sie besteht aus netzartig verbundenen Glykoproteinen und bildet so eine extrazelluläre Matrix. Sie grenzt die Eizelle von den sie umgebenden Kumuluszellen ab (Yanagimachi, 1994). Über Ausläufer der Kumuluszellen sowie Microvilli der Oozyte ist ein Kontakt zum Austausch von Informationen und Stoffwechselprodukten mit dem Follikel vorhanden (Wassarman und Albertini, 1994). Diese Interaktion spielt eine wichtige Rolle bei der Follikulogenese und der späteren Entwicklung der Eizelle. So zeigt ein Fehlen des ZP3-Genes bei *ZP3*-Null Mäusen nicht nur das völlige Fehlen des Aufbaus einer Zona pellucida sondern auch eine Beeinträchtigung der Follikulogenese und eine gestörte Weiterentwicklung von Zona-freien fertilisierten Eizellen. Ähnliche, aber

weniger gravierende Störungen zeigen sich bei *ZP2*-Null Mäusen. Der geringste Einfluss zeigt sich bei *ZP1*-Null Mäusen (Rankin et al., 2001).

Die Dicke der Zona pellucida unterscheidet sich speziesabhängig. Sie beträgt ca. 7 µm bei der Maus, 22 µm beim Menschen und 27 µm beim Rind (Dunbar, 1983; Dunbar et al., 1991). Sie ist, gemäß licht- und elektronenmikroskopischen Studien, eine aus verschiedenen Schichten aufgebaute hoch organisierte Matrix (Dunbar et al., 1994). Je nach Spezies besteht die Zona pellucida aus 2 bis 4 Glykoproteinen unterschiedlicher Molekularmassen. In der Maus, der Ratte, dem Kaninchen und dem Menschen wurden drei Glykoproteine nachgewiesen (Maresh und Dunbar, 1987; Shabanowitz und O'Rand, 1988a, b; Dunbar et al., 1994). Bei der Katze wurden 2, bei Schwein 4 unterschiedliche Glykoproteine identifiziert (Maresh und Dunbar, 1987; Hedrick und Wardrip, 1986; Hasegawa et al., 1991). Die 4 Glykoproteine der Zona pellucida beim Schwein sind 3 Glykoproteinfamilien zuzuordnen und entstehen durch unterschiedliche Glykosilierung bzw. proteolytische Spaltung an unterschiedlichen Stellen des Glykoproteins. Hierbei sind ZP1, ZP2 und ZP4 der ZPA-Familie zuzuordnen. ZP3α entspricht ZPB und ZP3 entspricht ZPC (Hedrick und Wardrip, 1986; Harris et al., 1994). Beim Rind werden drei bis fünf Glykoproteinklassen diskutiert (Gwatkin et al., 1980; Bercegeay et al., 1993; Noguchi et al., 1994). Im am besten untersuchten Modell, der Maus, werden die unterschiedlichen Glykoproteine als ZP-Protein 1 oder ZPB (ZP1/B), ZP-Protein 2 oder ZPA (ZP2/A) und ZP-Protein 3 oder ZPC (ZP3/C) bezeichnet (Harris et al., 1994; Yanagimachi, 1994). Sie werden post-translational unterschiedlich glykosiliert und sulfatiert. Aus diesem Grunde variieren sie in ihren molaren Massen. Bei der Maus weist ZP1/B eine molare Masse von 185-200 kDa auf, ZP2/A eine molare Masse von 120-140 kDa und ZP3/C von 83 kDa auf (Epifano und Dean, 1994). Alle drei Proteine besitzen N- und O-gebundene Oligosaccharidketten. Sie werden während der Eizellreifung von der Oozyte synthetisiert (Bleil und Wassarman, 1980b,c; Greve et al., 1982; Salzmann et al., 1983; Epifano et al., 1995b). Je nach Spezies werden Zona pellucida Proteine auch von den Kumuluszellen gebildet (Prasad, Dunbar et al, 2000). Neuere Studien zeigten, dass bei Mensch und Maus keine Zona-Pellucida-Protein Synthese in den Granulosazellen nachgewiesen werden konnte (Eberspaecher et al., 2001). Die Struktur der Zona pellucida ist aus repetitierenden, 15nm großen ZP2/A-ZP3/C-Dimer- Ketten aufgebaut, die untereinander durch das ZP1/B-Molekül quervernetzt werden (Greve und

Wassarman, 1985). ZP1/B, ZP2/A und ZP3/C haben dabei zueinander ein molares Verhältnis von 1:10:10 (Bleil und Wassarman, 1980b; Shimizu et al., 1983; Wassarman, 1988). Nach Tong et al. (1995) werden ZP2/A und ZP3/C in der Mausoozyte zwar unabhängig voneinander biosynthetisiert, können aber nur gemeinsam in die Zona pellucida-Matrix eingebaut werden.

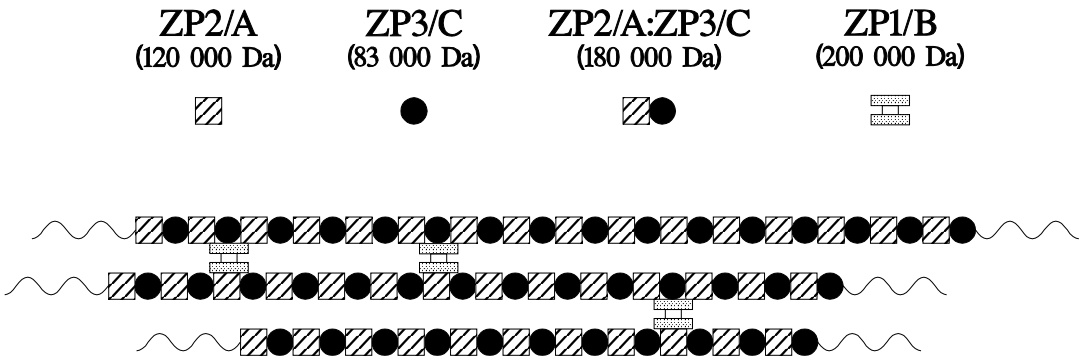

Abb. 3: Schematische Darstellung der Filamentanordnung der Glykoproteine innerhalb einer Maus Zona pellucida. Nach Wassarman, 1988.

Die verantwortlichen Gene der Zona pellucida Glykoproteine sind nach molekulargenetischen Untersuchungen in den Säugerspezies hoch konserviert. Auch bei Nichtsäugern (bestimmte Fischspezies, z.B. dem Karpfen) konnten entsprechende Gene nachgewiesen werden, die für ein Ei-Vitellin-Hüll-Polypeptid kodieren (Lyons et al., 1993; Epifano et al., 1995a; Murata et al., 1995; Chang et al., 1996).

1.2.2.1 Zona pellucida-Protein 1/B (ZP1/B)

ZP1/B, das die ZP2/A-ZP3/C-Filamente miteinander quervernetzt, und damit der Zona pellucida-Struktur Stabilität verleiht (Greve und Wassarman, 1985), liegt als ein über Disulfidbrücken verknüpftes Homodimer vor. Im Mausmodell besitzt das Monomer eine Molekularmasse von 130kDa (Bleil und Wassarman, 1980b). Harris et al. (1994) fanden eine Übereinstimmung der DNA-Sequenzen des verantwortlichen Gens von über 69% in mehren verschiedenen Spezies. Beim Menschen ist das Gen auf Chromosom 11 lokalisiert und besteht aus 12 Exons mit einer Größe von 79-190 bp, unterteilt von 11 Introns mit einer Länge von 83-3500 bp. Auf dem Chromosom Nr. 19 lokalisiert ist das Maus-ZP1/B-Gen, das aus 12 Exons mit einer Größe von 82-464 bp besteht (Epifano et al., 1995). Das menschliche ZP1/B-Protein besteht

aus 540 Aminosäuren, das ZP1/B der Maus aus 623 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenzen der ZP1/B-Proteine zeigen eine Homologie von 60 bis 68%.

1.2.2.2 ZP-Protein 2/A (ZP2/A)

Die cDNA-Sequenzen der ZP2/A-Gene von Maus, Mensch und anderen Spezies sind bekannt (Harris et al., 1994; Liang et al., 1990; Liang und Dean, 1993). Sie weisen Übereinstimmungen zwischen 69% und 89% auf. Das menschliche ZP2/A-Gen besteht aus 19 Exons von 45-190 bp und 18 Introns von 74-3000 bp Länge. Es ist auf dem Chromosom Nr. 16 lokalisiert (Epifano und Dean, 1994), während das entsprechende Gen bei der Maus auf Chromosom Nr. 7 nachgewiesen wurde (Lunsford et al., 1990). Es besteht aus 18 Exons von 45-190 bp und 17 Introns von 81-1490 bp Länge. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der untersuchten Spezies weisen eine Homologie von 54-83% auf. Die ZP2/A-Moleküle sind zwischen 676 und 745 Aminosäuren lang, wobei das menschliche am größten ist (Mensch: 745 AS, Maus: 713 AS).

Die Funktion des ZP2/A liegt mehreren Untersuchungen zufolge in der sekundären Spermatozoenbindung, in der es als Rezeptor fungiert (Bleil und Wassarman, 1986; Bleil et al., 1988). Der komplementäre Bindungspartner ist dabei Proakrosin/Akrosin. Die Bindung findet statt über eine starke ionische Interaktion zwischen polysulfatierten Gruppen auf dem ZP2/A Molekül und basischen Resten an Proakrosin/Akrosin. Dieses stellt eine Trypsin-ähnliche Protease dar und ist lokalisiert auf der inneren und äußeren Akrosomenmembran (Howes et al.,2001). ZP2/A bindet bevorzugt an die innere akrosomale Membran bereits akrosomreagierter Spermatozoen. Dies konnte in Studien mit humanem rekombinantem ZP2-Protein gezeigt werden (Tsubamoto et al., 1999). Der genaue molekulare Vorgang der sekundären Spermatozoen-Eizell-Bindung ist noch nicht vollständig bekannt. Es wurde berichtet, dass Lektine an ZP2/A binden und die Spermatozoen-Eizell-Interaktion beeinflussen können (Tulsiani et al., 1992). Ein gegen ZP2/A gerichteter monoklonaler Antikörper verhindert im Mausmodell die sekundäre Bindung von Spermatozoen an die Zona pellucida; dabei bleibt die primäre Spermatozoenbindung über ZP3/C davon unbeeinflusst (East et al., 1984, 1985). Da die sekundäre, nicht aber die primäre Bindung ebenfalls durch Trypsin-Inhibitoren blockiert werden können, ist der Schluss zulässig, dass es sich bei der sekundären Spermatozoenbindung um den ersten Schritt der Penetration durch die

ZP handelt (Bleil et al., 1988).) Lo-Leggio et al. (1994) wiesen nach, dass die ZP beim Schwein den Umwandlungsprozess von Proakrosin zu β-Akrosin entscheidend beeinflusst. Jedoch sind auch genetisch veränderte Spermatozoen ohne Akrosin in der Lage, Oozyten zu befruchten (Baba et al., 1994).) So zeigte sich in Untersuchungen mit Akrosin „knock-out" Mäusen, dass deren Spermatozoen fähig waren, Maus-Zona pellucida zu durchdringen und die Oozyten zu fertilisieren. Sie waren allerdings in der Fertilisierungsrate gegenüber Akrosin exprimierenden, normalen Spermatozoen benachteiligt (Adham et al., 1997).

Eine weitere wichtige Funktion des ZP2/A ist die Beteiligung an der Verhinderung einer Mehrfachbefruchtung. Im Mausmodell ist die ZP2/A-ZP2/A_f-Konversion, die Acetylcholin-abhängig und G-Protein gesteuert ist, (Williams et al., 1992) untersucht worden. Dabei gelangte nach Exozytose der kortikalen Granula ein 21-34 kDa großes, als ZP2/A-Proteinase bezeichnetes Enzym über den Perivitellin-Spalt in den Bereich der Zona pellucida. Dieses Enzym hydrolysiert das 120 kDa schwere ZP2/A in ein 90 kDa schweres ZP2/A_f (Bleil et al., 1981 ; Moller und Wassarman, 1989) welches über Disulfidbrücken mit einem 23 kDa großen Spaltprodukt verbunden und in der ZP verankert ist. Sind mehr als 16% aller ZP2/A-Moleküle proteolytisch umgebaut, verhärtet sich die Zona pellucida, was als „Zona-hardening" bezeichnet wird. Sie wird widerstandsfähiger gegen enzymatische und chemische Substanzen wie z.B. Trypsin. Die Rate der penetrierenden Spermatozoen wird um 85% reduziert (Choi et al., 1987; Gwatkin, 1977). Der proteolytische Prozess setzt wahrscheinlich nahe des Amino- oder Carboxy-Endes am Glykoprotein an. Die Bindung von monoklonalen Anti-ZP2/A-Antikörpern an das enzymatisch degradierte ZP-Protein wird jedoch nicht beeinflusst (Moller und Wassarman, 1989). Nach Downs et al. (1986) hemmt fetales Kälberserum die Umwandlung von ZP2/A in ZP2/A_f während der Reifung von Mausoocyten in vitro. Für diesen Vorgang wird Fetuin als entscheidende Substanz diskutiert (Schroeder et al., 1990).

1.2.2.3 Zona pellucida-Protein 3/C (ZP3/C)

Das menschliche, auf Chromosom Nr. 7 lokalisierte, ZP3/C-Gen besitzt eine Größe von 18300 bp und besteht aus 8 Exons (Camberlin und Dean, 1990). Das Genprodukt besteht aus 424 Aminosäuren. Auf demselben Chromosom findet sich ein partielles Duplikat, das POM-ZP3/C, das ein verkürztes Protein (van Duin et al.,

1992) codiert. Das ZP3/C-Gen der Maus befindet sich auf dem Chromosom Nr. 5 (Lunsford et al., 1990). Es besteht aus 424 Aminosäuren, mit 8 Exons von 92-338 bp Länge und 7 Introns von 125-2320 bp Länge (Kinloch et al. 1988 ; Chamberlin and Dean 1989). Die cDNA-Sequenz wurde in mehreren Spezies identifiziert, wobei eine Sequenzhomologie zwischen 70% und 85% ermittelt werden konnte (Chamberlin und Dean, 1989; 1990; Harris et al., 1994). Die Aminosäuresequenzen der untersuchten Spezies stimmen zu 63-84% überein. ZP3/C Glykoproteine sind zwischen 415 und 426 Aminosäuren lang. Das menschliche ZP3-Protein besitzt 424 Aminosäuren (Harris et al., 1994).

ZP3/C wird als der primäre Spermatozoenrezeptor bezeichnet (Saling, 1989; Yanagimachi, 1994). Die Plasmamembran am Kopf des Spermatozoons weist zwischen 10.000 und 50.000 Bindungsstellen für ZP3/C auf. Im Schwanzbereich wurden keine ZP3 Bindungsstellen nachgewiesen (Bleil und Wassarman, 1986). Durch Vorbehandlung mit aufgereinigtem solubilisiertem ZP3/C Protein konnten im Mausmodell Spermatozoen an der Eizellbindung gehindert werden (Bleil und Wassarman, 1980a). Radioaktiv markiertes ZP3/C bindet nur an die Plasmamembran akrosomintakter Spermatozoen, nicht jedoch an die akrosomreagierter Spermatozoen. Genetisch veränderte Oozyten, die nicht in der Lage sind, ZP3/C zu synthetisieren (ZP3 „knock-out“ Mäuse), können nicht befruchtet werden (Rankin et al., 1996). Eine Inkubation der Spermatozoen mit auf dem ZP3/C-Molekül lokalisierten O-gebundenen Serin/Threonin-ähnliche Oligosacchariden führt zu einer Hemmung der Spermatozoen-ZP-Bindung. Die akrosomale Reaktion wird dadurch nicht induziert (Litscher et al., 1995; Wassarman, 1992). Ein gegen die Polypeptidkette des ZP3/C-Moleküls gerichteter monoklonaler Antikörper beeinflusst die Rezeptorfunktion nicht (Florman et al., 1984; Florman und Wassarman, 1985). Ein als relevant angesehenes Oligosaccharid hat eine Molekularmasse von 3900 Da und besitzt mindestens einen terminal α-gebundenen Galaktoserest (Bleil und Wassarman, 1988; Florman und Wassarman, 1985). Sein vermuteter Ligand auf Seite des Spermatozoons ist ein 56kDa großes Protein, das als sp56 bezeichnet wird (Bleil und Wassarman, 1990; Wassarman, 1992; Bookbinder et al., 1995). Allerdings besitzen auch andere in der Zellmembran des Mausspermatozoons befindliche Moleküle wie z.B. Mannosidase oder Proteine mit Phosphotyrosinresten eine Bindungskapazität an ZP-Proteine (Naz, 1995; Yanagimachi, 1994). Das ZP3/C Protein hat mit der Induktion der akrosomalen

Reaktion an die Eizelle locker gebundener Spermatozoen eine wichtige Funktion inne (Bleil und Wassarman, 1983; Saling, 1989). Das Auslösen der Akrosomreaktion setzt jedoch die Intaktheit der ZP3/C-Polypeptidkette voraus (Florman et al., 1984). Durch proteolytisch entstandene Bruchstücke des ZP3-Proteins, die an die Plasmamembran des Spermatozoons banden, waren erst dann in der Lage, die akrosomale Reaktion auszulösen, wenn sie wieder miteinander verknüpft wurden, z.B. über eine Antikörperbindung (Leyton und Saling, 1989a). Nach Berechnungen von Kopf und Gerton (1991) weist ZP3/C zwei getrennte Bindungsstellen auf, eine für die primäre Spermatozoenbindung, eine andere für die Auslösung der akrosomalen Reaktion (Abb. 5). Als Spermatozoenligand wird ein 95 kDa großes Protein mit Tyrosinkinase-Aktivität diskutiert, das die akrosomale Reaktion triggert und als Zona Rezeptor Kinase (ZRK) bezeichnet wird (Leyton und Saling, 1989b; Duncan und Fraser, 1993; Burks et al., 1995; Saling et al., 1995). Die Relevanz dieses Proteins für das Auslösen der Akrosomreaktion wird allerdings kontrovers diskutiert (Bork, 1996).

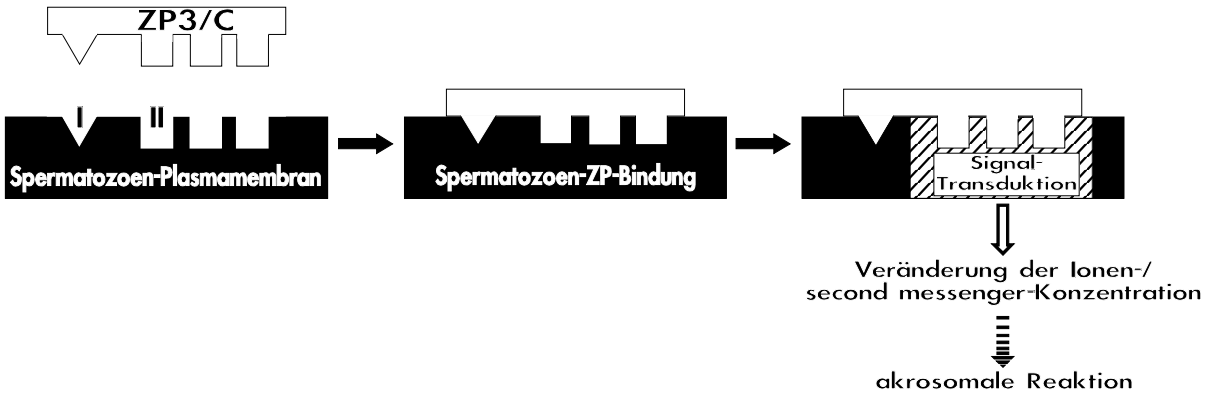

Abb. 4: Modell zur Spermatozoen-ZP-Interaktion. ZP3/C besitzt zwei miteinander verknüpfte Rezeptormoleküle: I für die primäre Spermatozoen-ZP-Bindung; II für die Induktion der akrosomalen Reaktion. Modifiziert nach Kopf und Gerton, 1991.

Nach der „cortical granule reaction“ der Eizelle kommt es zu einer Modifikation von ZP3/C zu ZP3/C_f. Die Strukturveränderung des Proteins wird möglicherweise durch eine Glykosidase aus den kortikalen Granula hervorgerufen (Wassarman, 1987a). Dabei ist im Mausmodell weder eine Änderung der Molekularmasse von 83 kDa, noch eine Abweichung des isoelektrischen Punktes nachweisbar. Gereinigtes ZP3/C_f besitzt jedoch keine Fähigkeit mehr, Spermatozoen zu binden und die akrosomale

Reaktion zu induzieren (Bleil und Wassarman, 1980a). Es werden allerdings nicht alle ZP3/C-Moleküle der Zona pellucida modifiziert, was die Beobachtung erklärt, dass Spermatozoen auch an die ZP bereits befruchteter Eizellen binden können und dort die akrosomale Reaktion induziert wird (Wassarman et al., 1985). Neueste Studien zeigten, dass bei Herstellung von ZP3/C „knock-out“ Mäusen in denen das humane ZP3-Gen eingeschleust und exprimiert wurde, Maus-Spermatozoen ein unverändertes Bindungsverhalten zeigen, wohingegen humane Spermatozoen nicht an die chimäre Zona pellucida binden (Rankin et al. 1998). Diese unerwarteten Ergebnisse zeigen, dass die Komplexität der Spermatozoen-Zona pellucida Interaktion noch längst nicht definitiv aufgeklärt ist.

1.3 Das Spermatozoon

1.3.3 Aufbau

Das Spermatozoon ist eine frei und aktiv bewegliche Zelle. Es besteht aus Kopf und Schwanz (Abb. 5). Der Kopf enthält den Zellkern sowie das im vorderen Bereich lokalisierte Akrosom. Er bildet die Hauptmasse mit einer Größe 5,5 µm mal 3 µm beim Menschen (Stevens, 1990) und 8 µm x 4,5 µm x 1 µm beim Rind (Rüsse und Sinowatz, 1991). Der Kopf von Maus-Spermatozoen ist hakenförmig. Das Akrosom, ein von der äußeren und inneren akrosomalen Membran gebildetes Kompartiment, enthält mehrere proteolytische Enzyme wie Akrosin, Hyaluronidase und Kollagenase-ähnliche Substanzen (Eddy und O’Brien, 1994). Es entspricht somit einem großen Lysosom (Allison und Hartree, 1970), das während der Penetration des Spermatozoons durch die Zona pellucida eine wesentliche Rolle spielt.

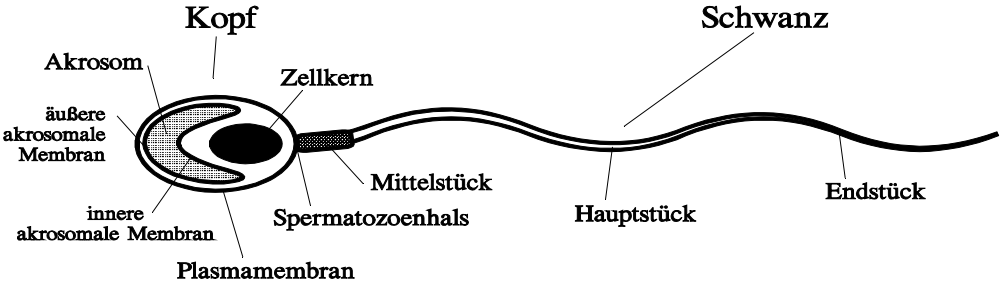

Abb. 5: Schematische Darstellung eines Spermatozoons mit seinen Hauptbestandteilen.

Der Schwanz des Spermatozoons ist für die aktiven Bewegungen des Spermatozoons verantwortlich, enthält ein zentrales, mikrotubuläres Axonem und besteht aus vier Teilabschnitten, dem Spermatozoenhals, dem Hauptstück, dem Mittelstück und dem Endstück (Pedersen, 1972). Er ist beim Menschen ca. 55 µm, beim Rind ca. 63 µm (Rüsse und Sinowatz, 1991) und bei Maus und Ratte über 100 µm lang (Eddy und O'Brien, 1994).
Der Spermatozoenhals verbindet Spermatozoenkopf und -schwanz miteinander. Das Mittelstück enthält randständig die zytoplasmatischen Energie produzierenden Mitochondrien (Phillips, 1977). Das Axonem wird im Hauptstück von einer filamentösen Struktur umgeben, der fibrösen Hülle (Fawcett, 1975; Oko, 1988). Im Endstück sind nicht mehr alle Strukturen des Zytoskeletts nachweisbar, da sie auf unterschiedlichen Längenabschnitten enden.

1.3.4 Kapazitation und akrosomale Reaktion

Frisch ejakulierte, motile Spermatozoen müssen zunächst einen Reifungsprozess, die sogenannte Kapazitation, durchlaufen. Dabei erlangen sie die Fähigkeit, an die Zona pellucida zu binden und eine Eizelle zu befruchten (Austin 1951, 1967 und Chang 1951, 1955). In vivo vollzieht sich dieser Prozess im weiblichen Genitaltrakt. In Anwesenheit von Albumin und Energielieferanten wie Glucose, Laktat oder Pyruvat lassen sich auch in vitro Spermatozoen kapazitieren, wobei die Dauer je nach Spezies zwischen einigen Minuten und mehreren Stunden variiert (Kanitz, 1994; Yanagimachi, 1994; Dalvit et al., 1996).
Während des Calcium- und cAMP-abhängigen (Fraser, 1995a; Leclerc et al., 1996), im Ablauf noch nicht vollständig aufgeklärten Kapazitationsvorganges, kommt es zu multiplen Veränderungen im Spermatozoon (Holt, 1995; Moore, 1995; Harrison, 1996). Kapazitierte Spermatozoen binden mit ihrer Plasmamembran an Rezeptormoleküle der Zona pellucida. Durch das Zona pellucida Protein 3 wird die akrosomale Reaktion ausgelöst (Bleil und Wassarman, 1980a; Saling, 1989). Dieser Vorgang erfolgt in der Regel speziesspezifisch, jedoch nicht ausschließlich, z.B. kann solubilisierte Zona pellucida der Maus die akrosomale Reaktion in menschlichen Spermatozoen induzieren (Lee et al., 1987). Dabei kommt es über Ionen-Kanäle zu einem verstärktem intrazellulären Calcium-Ionen Influx (Darszon et al, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass bei der Auslösung der akrosomalen Reaktion Progesteron einen Einfluss hat (Kirkman-Brown et al, 2000), (Kobori et al, 2000). Bei

der durch die Zona pellucida induzierten, Calcium- und Chlorid-abhängigen akrosomalen Reaktion verschmilzt die äußere akrosomale Membran mit der Plasmamembran des Spermatozoons (Yanagimachi und Usui, 1974; Fraser, 1995a; Melendrez und Meizel, 1995). Vermutlich wird dies durch bestimmte Fusionsproteine vermittelt und durch eine GTP-bindende Protein-Signaltransduktionskette gesteuert (Kopf et al., 1986; Endo et al., 1987; Ward et al., 1994). Hierbei ist eine Phosphoinositide-3-Kinase involviert, die zu einer Abnahme der Tyrosin-Phosphorylierung führt (Fisher et al, 1998). Die Reaktion mündet in die Bildung enzymreicher Vesikel, deren Inhalt nach außen durch Exozytose abgegeben wird (Kopf und Gerton, 1991).

1.4 Klinische Relevanz

Zwei wichtige Gesichtspunkte, bei denen das Verstehen des Ablaufes des komplexen Vorganges der Befruchtung von entscheidender Bedeutung ist, sollten hierbei bedacht werden. 1.: Es ist in zunehmendem Maße die Möglichkeit zu einer immunologisch bedingten Kontrazeption ins Zentrum des Interesses gerückt, ein Themengebiet, welches seit einigen Jahren intensiv erforscht wird. Ziel ist die Entwicklung eines kontrazeptiven Impfstoffs, der sich aus spezifischen Zona pellucida-Antigenen ableitet und sowohl sichere Schwangerschaftsverhütung, als auch völlige Reversibilität und möglichst geringe Nebenwirkungen gewährleistet (Epifano und Dean, 1994; Naz et al., 1995; Castle et al., 1997). In mehreren Studien wurde bereits gezeigt, dass bei Einsatz von Zona pellucida Glycoproteinen als Antigen autoimmunologisch bedingte Fertilitätsminderungen oder Unfruchtbarkeit bei entsprechenden Versuchstieren erreicht wurde (Sacco, 1987; Millar et al., 1989; Aitken et al., 1990; Sacco und Yurewicz, 1994). Diese ging allerdings einher mit einer Autoimmun-Oophoritis und führte zur irreversiblen Zerstörung auch schon sehr früher Follikelstadien. Die entzündliche Reaktion mit Destruktion wird durch die T-Zell induzierte zelluläre Immunantwort ausgelöst (Lou et al., 1996), die entsprechenden Antigenstrukturen sind also T-Zell Epitope. Der Einsatz von geeigneten Peptid-Vaccinen gegen B-Zell Epitope ist hierbei erfolgversprechender (Epifano und Dean, 1994; Jones, 1994, Gupta et al, 1997). Die Identifizierung von Zona pellucida Bestandteilen, die eine funktionelle Bedeutung in der Spermatozoen-Eizell-Interaktion besitzen, stellt eine wichtige Grundlage der Immunkontrazeption dar. So identifizierten z.B. Gupta et al. (1995, 1996) sowie Hasegawa et al. (1995) und

Koyama et al. (1996) Epitope der Zona pellucida Proteine beim Schwein, die für die Spermatozoenbindung an die Zona pellucida verantwortlich sind. Mittels Peptid-Antikörpern gegen ein synthetisches ZP2-Peptid konnten Hägele et al. (1998) die funktionelle Relevanz einer ZP2-Protein Domäne zeigen. Verstärkt gehen die Bemühungen in Richtung auf die Identifikation von B-Zell und T-Helfer-Zell Epitopen der Zona pellucida, welche zu zirkulierenden Antikörpern mit kontrazeptivem Effekt aber nicht zur Destruktion der ovariellen Strukturintegrität führen. Betrachtet man die Ergebnisse verschiedener Studien auf diesem Gebiet, so lässt sich zusammenfassend sagen, dass eine sehr große Variationsbreite innerhalb der verschiedenen Spezies bezüglich der Immunantwort auf Vaccination mit Zona pellucida Proteinen zu verzeichnen ist (Dunbar et al., 2001), die weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet nötig macht.

2.: Es sind Kenntnisse über die komplexen pathophysiologischen Vorgänge von großer Bedeutung für eine genauere Diagnostik und eventuelle Behandlungsmöglichkeiten im Bereich der Infertilität. Die Anzahl von Paaren mit ungewollter Kinderlosigkeit steigt in zunehmendem Maße. Maier (1995) geht davon aus, dass im deutschsprachigen Raum 10-15% aller Partnerschaften ungewollt kinderlos bleiben. Dies ist zu jeweils 40% auf männliche bzw. weibliche Infertilität zurückzuführen, zu 20% auf beiderseitige Unfruchtbarkeit (Haidl und Schill, 1990).

Die ursächlichen Faktoren der idiopathischen Infertilität, die auf Gametenfunktionen zurückzuführen sind, lassen sich in drei Kategorien einteilen: Spermatozoenfaktor, Eizellfaktor und unbekannter Faktor (Hinsch et al., 1994a; Clark et al., 1995). Die Qualität eines Ejakulates wird anhand der wesentlichen Parameter des Spermiogramms ermittelt, wie Menge und Konzentration der Spermatozoen, die Progressivmotilität und die Morphologie (WHO, 1999). Zur Überprüfung der Funktionalität der Spermatozoen stehen Funktionstests wie z.B. der Akrosintest oder der Hemizona Assay zur Verfügung. Bestehen in einem Ejakulat Abnormalitäten, wird von einem Spermatozoenfaktor ausgegangen. Die Oozyte wird nur morphologisch beurteilt, die Funktionalität und Integrität der Eizellen und der umgebenden ZP kann klinisch zum heutigen Zeitpunkt nicht direkt diagnostiziert werden. In der Gruppe der unbekannten Faktoren lassen sich weder bei den Spermatozoen, noch bei den Oozyten pathologische Auffälligkeiten nachweisen, dennoch kommt es zu keiner Fertilisierung. Möglicherweise sind dabei immunologische Prozesse von Bedeutung. So berichteten Clarke et al. (1995) über

eine primäre Infertilität durch Anti-Spermatozoen-Antikörper im weiblichen Genitaltrakt. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass in einer untersuchten Gruppe von infertilen Männern, zum Teil mit einer morphologisch nicht erklärbaren Infertilität, eine relativ große Anzahl Antikörper aufwies, die gegen Spermatozoen-Antigene gerichtet waren. Diese Antikörper waren sowohl im Serum als auch im Seminalplasma nachweisbar (Paradisi et al, 1996). Sowohl bei der Frau als auch beim Mann können im Serum und/oder den Urogenitalsekreten vorhandene, gegen Spermatozoenantigene gerichtete Antikörper die Fertilität beeinflussen (Domagala et al, 1996). Dabei scheint es eine Assoziation zur homozygoten Exprimierung bestimmter HLA-Antigene zu geben (Omu et al, 1999). Aufgrund des schwerwiegenden Leidensdruckes der betroffenen Personen hat die Weltgesundheitsorganisation männliche und weibliche Infertilität als eigenständige Krankheiten definiert, die als solche behandlungsbedürftig sind. Die Entwicklung von Antikörpern gegen ZP-Proteine ist die Basis zur Einführung eines diagnostischen Markers für die Überprüfung der Funktionalität, Integrität und Reife der ZP (Hinsch et al., 1994a; Hinsch und Hinsch, 1996; Oehninger et al., 1996). Dieser stellt eine weitere Hilfe im ärztlichen Entscheidungsprozeß dar, welche Form der assistierten Reproduktion indiziert und vielversprechend ist. Neben einer homologen intrauterinen Insemination (IUI), einer konventionellen In vitro-Fertilisation (IVF) und einem intratubaren Gametentransfer (GIFT), stehen weitere moderne Techniken der assistierten Fertilisierung zur Verfügung, von denen die intrazytoplasmatische Spermatozoeninjektion (ICSI) (Al Hasani et al., 1995; Gordts et al., 1995) derzeit die erfolgversprechendste ist.

1.5 Zielstellung der Arbeit

Diese Arbeit hatte die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen ein synthetisches ZP2/A-Peptid zum Ziel, die die Identifizierung und Charakterisierung eines definierten ZP2/A-Epitopes in der ZP verschiedener Säugerspezies ermöglichen. Mit immunhistochemischen Methoden sollten die gewonnenen Antikörper näher charakterisiert werden. Auf Paraffinschnitten aus Ovarien unterschiedlicher Spezies sollte untersucht werden, ob Anti-ZP2/A-Antikörper gegen ein konserviertes Epitop an die Zona pellucida verschiedener Säugerspezies binden und das entsprechende antigene Epitop im ZP2/A-Protein erkennen. Auf ultrastruktureller Ebene war geplant, immunhistologische Studien mittels der Immunogold-Methode durchzuführen.

Mit Hilfe einer elektrophoretischen Auftrennung von Eizell-Proteingemischen in einem SDS-Polyacrylamid-Gel sollte weiterhin getestet werden, ob und welche Proteine mit welchen Molekularmassen von dem Anti-ZP2/A-Antikörper detektiert werden.

Mittels Immunfluoreszenz mit Oozyten war zu überprüfen, ob die gewonnenen Antikörper nicht nur biochemisch veränderte Epitope erkennen, wie z.B. nach SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese oder immunhistochemischen Untersuchungen, sondern auch an natives, nicht denaturiertes ZP-Protein binden.

Zur Beurteilung von funktionellen Gesichtspunkten ist der Kompetitions-Hemizona-Assay (KHZA) geeignet. Hiermit sollte festgestellt werden, ob nach einer Inkubation der Zona pellucida mit den monoklonalen Antikörpern die Spermatozoenbindungsfähigkeit beeinflusst wird. Zur Verifizierung immunologischer Ergebnisse war geplant, den de novo Syntheseort der Zona pellucida Proteine im Mausmodell mit Hilfe der RT-PCR zu identifizieren. Hierbei sollten Ovarhomogenate, isolierte Eizellen und isolierte Kumuluszellen eingesetzt werden. Die Herstellung hochspezifischer Anti-ZP2/A-Antikörper gegen definierte antigene Domänen des ZP2/A-Proteins sollten als Marker für ZP2/A dazu beitragen, physiologische und pathophysiologische Vorgänge, die bei der Penetration des Spermatozoons durch die ZP von Bedeutung sind, zu erkennen und zu verstehen. Diese Untersuchungen könnten eine Grundlage zur Erarbeitung neuer Möglichkeiten zur Kontrazeption einerseits und zur Erkennung und Behandlung von Fertilitätsstörungen andererseits bieten.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Hersteller und Lieferfirmen

(1) American Dade, Miami, Florida, USA
(2) Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
(3) Becton Dickinson AcuteCare, Franklin Lakes, New Jersey, USA
(4) Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, New Jersey, USA
(5) Bio Cell, Cardiff, UK
(6) Biomeda, Foster City, CA
(7) Bio-Rad, München
(8) BioWhittaker, Walkersville, Maryland,USA
(9) Biozym Diagnostik GmbH, Olderdorf
(10) B. Braun, Melsungen
(11) Charles-River GmbH, Sulzfeld
(12) Diener, über Kretschmer Labortechnik, Gießen
(13) Eppendorf, Hamburg
(14) Eurobio, Raunheim
(15) GeneCraft, Münster
(16) Gibco BRL, Karlsruhe
(17) Glaswerk Wertheim, Wertheim
(18) Greiner Labortechnik, Frickenhausen
(19) Hecht, Kiel-Hassee
(20) Heraeus, Hanau
(21) Hero, Berlin
(22) Janke & Kunkel Labortechnik, Staufen
(23) Jouan GmbH, Unterhaching
(24) Kabe, Nümbrecht
(25) Kalensee, Gießen
(26) Knick GmbH & Co, Berlin
(27) Kontes, New Jersey, USA
(28) Leitz, Bensheim
(29) Leybold-Heraeus, Hürth
(30) LKB ; Bromma, Schweden

(31) London Resin Company Ltd, Berkshire, England, UK
(32) Lucerne, Oakland, CA, USA
(33) Menzel-Gläser, Braunschweig
(34) Merck, Darmstadt
(35) Millipore Corporation, Bedford, Maryland, USA
(36) MJ Research, INC, Watertown, Massachusetts, USA
(37) Natutec, Frankfurt
(38) Nunc, Kamstrup, Dänemark
(39) Pan-Biotech, Aidenbach
(40) PeqLab, Erlangen
(41) Pharmacia, Upsalla, Schweden
(42) Plano, Marburg
(43) Polaroid GmbH, Offenbach
(44) Quiagen, Hilden
(45) Reichert, Nußloch
(46) Riedel-de Haen, Seelze
(47) Roth, Karlsruhe
(48) Schütt, Göttingen
(49) Seromed, Biochrom KG, Berlin
(50) Serva, Heidelberg
(51) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
(52) Spectrum Medical, Houston, Texas, USA
(53) Titertek-Dynatech, Denkendorf
(54) Vogel, Gießen
(55) WAK-Chemie, Bad Soden
(56) WU, Mainz
(57) Zeiss, Frankfurt

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid/Bis (7)

Abstandhalter für Gel-Elektrophorese-Platten (7)

Agarose ultrapure (16)

Ammoniumpersulfat (7)

Biotinylierter Gel-Elektrophorese-Standard (7)

Borsäure (51)
Bromphenolblau (51)
Calciumchlorid (34)
Cell Scrapers (4)
Cell Strainer (4)
Citronensäuremonohydrat (34)
Coomassie-Blau R 250 (50)
Corbit-Balsam (19)
Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat (34)
CPG MPG Guanidine Direct mRNA Purification Kit (37)
Cryoserve DMSO (55)
Deckgläser (33)
DAB (3,3'-Diaminobenzidin) (51)
Dialyseschlauch (46)
EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimide) (51)
EDTA (Titriplex 3) (34)
Einmalkanüle Microlance 3 (10)
Einmalspritzen 10 ml (10)
Eisessig (35)
Ethanol (46)
Ethidiumbromid (47)
Fötales Kälberserum (51)
Gelatine (34)
Gel Mount (6)
Gewebekulturflaschen, 50 ml und 250 ml (18)
L-Glutamin-Lösung 200 mM (51)
Glycerin (34)
Glycin (47)
Mayers saures Hämalaun (34)
Natrium-Hepes (Na-N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethan Sulfonsäure) (51)
HAT-Medium (55)
Hybridoma-Medium (55)
Immobilon™-P PVDF-Membranen (35)
Immunisierungsmedium (55)

Isopropanol (34)
Kaliumchlorid (34)
Kaliumdihydrogenphosphat (34)
KLH (Keyhole Limpet (Megathura crenulata) Hemocyanin) (51)
physiologische Kochsalzlösung (10)
Küvetten (17)
LR-White Acrylic Resin (31)
Luer-Lock-Spritzen (21)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (34)
β-Mercaptoethanol (51)
Methanol (46)
MicroWell-Immuno-Module, Maxisorb F-20 mit hochaffiner Bindungskapazität (38)
Mikroklingen 45° Beaver^{R} (3)
Mikropipetten SMI Capillaries-D (1)
Milchpulver (32)
Mineralöl (51)
Multiwell^{TM} 48-Well Zellkukturplatten (4)
Myeloma-Growth-Medium (55)
Natriumacetat (34)
Natriumchlorid (47)
di-Natriumhydrogenphosphat (34)
dNTP's 100 mM (15)
Nunclon^{TM} 24-Well Zellkulturplatten (38)
Nunclon^{TM} 96-Well Zellkulturplatten (38)
Nutrient Mixture HAM mit Hepes (51)
Objektträger (33)
Omniscript RT-Kit (44)
OPD (o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid) (51)
Panscript DNA Polymerase (39)
Pasteur Einwegpipetten, steril (4)
Paraffin (54)
Pasteur-Kapillarpipetten (56)
PCR Softtubes 0,5 ml (9)
PCR Tubes 0,2 ml (13)

PEG (Polyethylen-Glycol)-Fusionsmedium (55)

Penicillin/Streptomycin-Lösung (51)

Petrischalen 60x15 mm, 100x20 mm (4)

Plating-Medium (55)

Polaroid Sofortbildfilm Typ 667 (43)

Poly-L-Lysin-Lösung (51)

Ponceau S (51)

PVP (Polyvinylpyrolidon) (51)

Pyronin Y (51)

Rasierklingenhalter (12)

Reagenzglas Falcon^{R} 2095 (4)

Reaktionsgefäße 1,5 ml (13)

Rinderserumalbumin Fraktion V (51)

RNAse OUT (16)

Bard-Parker^{R} Einmalskalpell (3)

Salzsäure (34)

SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat) (51)

Splenocyte-Medium (55)

Support-Cell-Medium (55)

Temed (N,N,N',N'-Tetramethylendiamin) (7)

Titer Max Adjuvant (51)

Tris-Base (47)

Tris/HCl (Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid) (47)

Trypanblue-Stain 0,4%(v/v) (16)

Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat) (51)

UltraCulture Zellkulturmedium (8)

UltraDoma Hybridomamedium (8)

UM MA HC FUJI Medical X-Ray Filme (FUJI)

Vitro-Feed Supplement (55)

Wasserstoffperoxid (34)

Xylol (34)

Zählkammer nach Neubauer (25)

2.1.3 Eingesetzte Immunreagenzien

Anti-Maus-IgG-Biotin-Konjugat (51)
Anti-Maus-IgM-Biotin-Konjugat (51)
Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (51)
Streptavidin-Goldkonjugat, 20 nm Partikelgröße (5)
Avidin-FITC-Konjugat (51)

2.1.3.1 Medien und Pufferlösungen

Cacodylat-Puffer:	4,28 g Cacodylsäure-Natriumsalz 100 ml Aqua dest pH 7.4 mit NaOH
Chromalaun-Gelatine:	1g Gelatine 0,1g Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat 260ml Aqua dest.
Coomassie-Blau-Färbelösung:	0,25% w/v Coomassie-Blau 10% v/v Eisessig 45% v/v Methanol 45% v/v Aqua dest.
Eizell-Blot-Puffer:	100 mMTris/HCL 25 mM EDTA 5% w/v SDS 12% v/v Glycerol 0,01% w/v Pyronin Y 5% v/v β-Mercaptoethanol
Entfärbelösung für Coomassie-Blau:	10% v/v Eisessig 45% v/v Methanol 45% v/v Aqua dest.

Fixierer für Immunogoldreaktionen:	0,1 % Glutardialdehyd 4,0 % Paraformaldehyd ad 0,1 M Cacodylatpuffer
Fixierer für Silberfärbung:	10% v/v Eisessig 50% v/v Methanol ad Aqua dest
HAM's-Hepes Kulturmedium:	1l Nutrient Mixture HAM mit Hepes 5 ml L-Glutamin-Lösung 200 mM 1% v/v Penicillin/Streptomycin-Lösung 0,3% w/v Rinderserumalbumin Fraktion V pH 7,4
Hyperosmolare Salzlösung:	1,5 M Magnesiumchlorid-Hexahydrat 0,1% w/v PVP 40 mM Natrium-Hepes pH 7,4
Laufpuffer für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese:	190 mM Glycin 0,1% w/v SDS 25 mM Tris/HCl pH 8,3
Methacarn-Fixierlösung:	60% v/v Methanol 30% v/v Chloroform 10% v/v Eisessig
Natriumacetatpuffer:	50 mM Natriumacetat pH 6,0, eingestellt mit Eisessig

PBS (Phosphate-buffered saline):	120 mM Natriumchlorid
	4 mM Kaliumdihydrogenphosphat
	10 mM di-Natriumhydrogenphosphat
	pH 7,4
Probenpuffer für SDS-Polyacryamid-Gel:	1% w/v SDS
	1,3 M Glycerin
	5% v/v β-Mercaptoethanol
	0,01% w/v Pyonin Y
	50 mM Tris/HCl
	pH 6,8
Probenpuffer (Agarosegele)	
6fach konzentriert:	0,25% (w/v) Bromphenolblau
	40% (w/w) Sucrose in aqua dest
Sammelgel (6%ig):	1,33 ml 30% w/v Acrylamid
	3,33 ml Sammelgelpuffer
	1,92 ml Aqua dest.
	17 µl TEMED
	50 µl 10% w/v Ammoniumpersulfat
Sammelgelpuffer:	0,2% w/v SDS
	250mM Tris/HCl
	pH 6,8
Substratpuffer:	0,2 M di-Natriumhydrogenphosphat
	0,1 M Citronensäuremonohydrat
	pH 5,0
TBE 5fach konzentriert:	0,45 M Tris-Borat
	0,01 M EDTA
	pH 8,0

TPBS (Phosphate-buffered saline mit Tween):	0,05% v/v Tween 20 in PBS pH 7,4
Trenngel (10%ig):	4,2 ml 30% w/v Acrylamid 6,2 ml Trenngelpuffer 2,0 ml Aqua dest. 17 µl TEMED 50 µl 10% w/v Ammoniumpersulfat
Trenngelpuffer:	0,2% w/v SDS 750 mM Tris/HCl pH 8,8
TTBS:	150 mM NaCl 25 mM Tris 0,1 % (v/v) Tween 20 pH 7,4 (HCL)
Western-Blot-Puffer:	250 mM Glycerin 0,01% w/v SDS 20% v/v Methanol 40 mM Tris/HCl

2.1.3.2 Verwendete Kits

BCA Protein Assay (Pierce)

CPG^{R} MPG Guanidine Direct mRNA Purification Kit (36):

MPG Streptavidin, 10 mg in PBS pH 7,5 mit 0,1% BSA und 0,02% Natriumazid

G1-Lösung: 1 M KCL, pH 8,0

G2-Lösung: 2 M NaCl, pH 8,0

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

G4-Lösung: 100 mM Tris-HCL, pH 7,2; 400 mM LiCl, 20 mM

EDTA, 0,5% Lauroylsarcosinat

G5-Lösung: 10 mM Tris-HCL, pH 8,0; 150 mM LiCl, 1 mM EDTA,

0,1% Lauroylsarcosinat
G6-Lösung: 2 mM EDTA, pH 8,0
G7-Lösung: β-Mercaptoethanol
Immuno Pure Antigen/Antibody Immobilization Kit (Pierce)

Omniscript RT-Kit (43): Omniscript Reverse Transkriptase 4 units/µl
RT-Puffer 10fach konzentriert
5 mM dNTP-Mix
RNAse-freies Wasser

Panscript DNA Polymerase (38): Native Taq DNA Polymerase 5 units/µl
NH_4-Puffer 10fach konzentriert: 160 mM $(NH_4)_2SO_4$,
500 mM Tris-HCL pH 8,8; 0,1% Tween 20
50 mM MgCl

ECL™ Western Blot Detection Kit (2)

2.1.4 Geräte

Aldo-Xer-Geltrockner (32)
Axioskop mit Fotoeinheit MC 80 (39)
Begasungsbrutschrank (48)
Biofuge fresco (20)
Digital-pH-Meter 761 Calimatic (26)
EasyCast Minigelsystem Modell B2 (40)
Gel-Elektrophoresekammer Mini-Protean II™ (7)
IKAMAG® RET-Magnetrührer (22)
IKA®-Schüttler MTS 4 (22)
Inverses Mikroskop Axiovert 100 mit elektrischer Mikromanipulationseinheit (57)
LKB Ultramikrotom 8800 A, Bromma, Schweden (30)
Lyovac GT 2 (29)
Mikrotom 1212 nach Minot (28)
Minifuge RF, Rotor BS4402/A (20)
Mini-Trans-Blot™-Kammer (7)
Multiscan MCC Elisa-Reader® (53)

Perltier-Thermal Cycler, PTC 200 (36)
Photoeinheit, Instant Camera, Polaroid MP4+ (43)
Power Supply 1000/500^{TM} (7)
Reichert Pyramitom, Nußloch
Stereomikroskop Wild-Heerbrugg (28)
Stereomikroskop Stemi SV 11 (57)
Transmissionselektronenmikroskop LEO 906 (57)
Trockenschrank (23)

2.1.5 Versuchstiere

Als Versuchstiere zur Herstellung von Antikörpern dienten sechs Wochen alte, weibliche Balb-C Mäuse (Charles River, Deutschland).
Für in vivo-Immunisierungsversuche wurden weibliche C230 F1 Mäuse und männliche C210 F1 Mäuse herangezogen (Herkunft: Deutsches Primatenzentrum GmbH, Göttingen).

2.1.6 Ausgewählte Peptide

Mit Hilfe des Computerprogramms Predict wurden die Aminosäuresequenzen der ZP2/A-Proteine von Mensch und Maus (Liang und Dean, 1993) auf ihre mögliche Immunogenität hin untersucht (Krchnak et al., 1987). Ein Bereich mit rechnerisch hoher immunogener Potenz wurde ausgewählt. Hierbei handelte es sich um einen homologen Sequenzabschnitt, der identisch in Mensch und Maus vorkommt.
Anhand dieser Sequenz wurde von Herrn Dr. Krause, Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Marburg, das Peptid ZP2-1 mit der in Mensch und Maus homologen Aminosäuresequenz ASP-PRO-ASN-ILE-LYS-LEU-VAL-LEU-ASP-ASP-CYS-TRP-ALA-THR-SER (Nummern 535-549 der humanen Aminosäurenreste) (Liang und Dean, 1993) nach der Merrifield-Methode (Barany und Merrifield, 1979) synthetisiert.

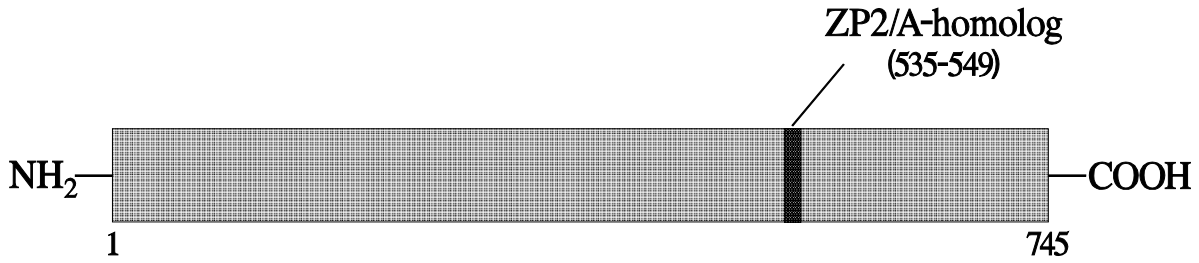

Abb. 6: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz des menschlichen ZP2/A-Glykoproteins mit Angabe des ausgewählten homologen Bereiches. In Klammern angegeben sind die Nummern der Aminosäurereste innerhalb des Proteins.

2.2 Methoden

2.2.1 Kopplung vom Peptid an KLH:

6 mg KLH wurden in 900 µl aqua dest. gelöst und 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt.

3 mg HPLC-gereinigtes ZP2-1 Peptid wurden in 300 µl aqua dest. gelöst und langsam zur KLH-Lösung dazugegeben. EDC (3 mg in 300 µl) wurde anschließend tropfenweise zugesetzt.

Danach wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt und die Lösung 1 Stunde lang bei Raumtemperatur gerührt.

Anschließend wurden nochmals 3 mg EDC gelöst in 300 µl aqua dest. dazugegeben. Diese Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur abgedunkelt und ohne zu Rühren stehen gelassen.

Am nächsten Tag wurde das Konjugat gegen 3x5 L aqua dest. über 6 Stunden lang dialysiert. Diese Lösung enthielt 0,5 µg Peptid pro µl.

Als Negativkontrolle wurde lediglich anstelle der Peptidlösung ein entsprechendes Volumen aqua dest. hinzugegeben.

2.2.2 Immunisierung:

Erstimmunisierung: Weibliche, 6 Wochen alte Balb-C Mäuse wurden mit 50 µg/Tier an mit KLH gekoppeltem Peptid immunisiert. Als Adjuvanz kam Titer Max (Sigma) im Verhältnis 1+1 gemischt in einem Endvolumen von 100 µl pro Immunisierung zum Einsatz. Die Applikation erfolgte subkutan ins Nackenfell.

Boosterungen: Es erfolgten insgesamt 3 Boosterungen, alle mit derselben Menge an Antigen und Adjuvanz jeweils 3, 5 und 7 Wochen nach der Erstimmunisierung.

Final Boost: Diesen erhielten diejenigen Mäuse, deren Milzzellen zur Fusion eingesetzt werden sollten.
Hierbei wurden 50 µg des gekoppelten Peptids ohne Zusatz von Adjuvanz steril filtriert (0,22 µm Membranfilter) und 2 Tage vor der geplanten Fusion intravenös appliziert. Die Injektion erfolgte in eine der 4 Schwanzvenen proximal nahe der Schwanzwurzel.

2.2.3 Herstellung monoklonaler Antikörper

2.2.3.1 In vivo Zellfusion

Zellkulturen für die Herstellung monoklonaler Antikörper:

Myeloma-Zellen:

Zur Verwendung kam die Myeloma-Zelllinie SP2/0-Ag14 (WAK Chemicals).
Die Zellen wurden bis zur Erlangung der entsprechenden Zelldichte (notwendige Zellzahl: 10^7) in 250 ml Zellkulturflaschen in Myeloma-Growth-Medium (WAK Chemicals) kultiviert. Während der Kultivierungsphase wurden die Myelomzellen zweimal passagiert. Die Inkubation der Zellkulturen erfolgte bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und einem CO_2-Gehalt von 5%. Am Versuchstag wurden die Zellen mittels eines Zellschabers vom Flaschenboden gelöst und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Von dieser Zellsuspension wurden 100 µl in 0,01% Trypanblau in PBS mit 1% Essigsäure gegeben und gefärbt. Nach 4-minütiger Inkubation wurde die Anzahl lebender Myelomazellen in einer Zählkammer nach Neubauer ermittelt.

Primäre Milzzellen:

Die Milzen immunisierter Mäuse wurden 2 Tage nach der letzten Antigeninjektion steril entnommen. Zur Anwendung kamen dabei die Milzen derjenigen Mäuse, die im ELISA den höchsten Antikörper-Titer im Serum aufwiesen. Die Milzzellen wurden wie folgt präpariert: Um unerwünschte Zellfusionen mit Fett- oder Bindegewebszellen zu vermeiden, wurde von den Milzen das umgebende Fettgewebe entfernt. Die sich in einer Petrischale befindlichen Milzen wurden anschließend mit einer mit 5 ml Splenozyten-Medium (WAK-Chemicals) gefüllten Spritze gut ausgespült, danach mit

einer Irisschere sorgfältig zerkleinert und mehrfach mit Splenozyten-Medium gespült. Schließlich wurde das Zellhomogenat durch ein Zellsieb in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Oberfläche des Zellsiebes wurde mit 5ml Splenozyten-Medium gespült. 100 µl Zellsuspension wurden mit 0,01% Trypanblau in PBS und 1% Essigsäure gefärbt. Nach 4-minütiger Inkubation wurden die lebenden Milzzellen in einer Zählkammer nach Neubauer ausgezählt.

Fusion:

Die beiden Zellpopulationen wurden in einem Verhältnis von $1x10^7$ Myelomazellen zu $5x\ 10^7$ bis $1x10^8$ Milzzellen zusammengegeben und 3 mal per Zentrifugation (600 g , 8 min) gewaschen. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Sediment durch mehrmaliges Klopfen gegen den unteren Teil des Röhrchens gelockert. Zum Zellsediment wurden 0,8 ml PEG- Fusionsmedium dazugegeben. Nach 75 Sekunden leichtem Resuspendieren wurden 0,5 ml HAT-Growth-Selektionsmedium (WAK-Chemicals) hinzupipettiert, dann im Minutenabstand 3 mal je 1 ml und zuletzt 5 ml des Selektionsmediums hinzugegeben.

Die fusionierten Zellen wurden einmal bei 300 x g für 4 min zentrifugiert. Das entsprechende Sediment wurde zunächst in 5 ml, dann in 30 ml Plating-Medium aufgeschwemmt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Diese Zellsupension wurde abschließend tropfenweise auf acht 48-Well-Zellkulturplatten verteilt. Die Vertiefungen der Zellkulturplatten waren schon vor Beginn der Fusion mit 0,5 ml Hat-Growth-Medium beschickt und im Begasungsbrutschrank bei 5% CO_2 inkubiert worden.

Die Platten wurden 16 Tage im Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 und 100% Wasserdampfsättigung inkubiert**.**

2.2.3.2 In-vitro Zellfusion

Bei dieser Methode werden keine Milzzellen von immunisierten Mäusen sondern sogenannte Support-Zellen, die mit dem jeweiligen Antigen inkubiert wurden, verwendet. Bei Support-Zellen handelt es sich um Antigen-präsentierende Zellen, die mit dem gewünschten Antigen in Kontakt gebracht („Priming“) wurden und das sie dann aufnehmen und präsentieren. Zu den Support-Zellen wurden dann native Maus-Milzellen gegeben, die das präsentierte Antigen aufnehmen und Antikörper dagegen bilden und sezernieren sollten.

Diese gegen das gewünschte Antigen Antikörper produzierenden Milzzellen wurden mit Maus-Myeloma-Zellen fusioniert.
Der Vorteil dieser Methode besteht in der Umgehung einer langwierigen Immunisierungszeit bei in vivo Immunisierung von Mäusen. So stehen bei Erfolg Antikörper-produzierende Hybrid-Zellklone in wesentlich kürzerer Zeit zur Verfügung, als bei der herkömmlichen Methode.

Zellkultur der Myeloma-Zellen:

Die Myeloma-Zellen der Zelllinie SP2/0-Ag14 (WAK Chemicals) wurden wie bereits unter Punkt 2.2.3.1 beschrieben kultiviert, so dass zum Zeitpunkt der Fusion eine ausreichende Anzahl Zellen zur Verfügung standen.

Support-Zellen:

Eine Woche vor der geplanten Fusion wurden die Support Zellen (WAK Chemicals) in Zellkultur etabliert. Dazu wurden sie in einem speziellen Support-Zell Medium (WAK-Chemicals) in 100 ml Zellkulturflaschen angezüchtet und 24 h inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 µg des reinen, trägerfreien ZP2-Peptid-Antigens 300 µl steril filtriertem PBS gegeben. Antigen und Support Zellen wurden 48 Stunden miteinander inkubiert.

Milzzellen:

3 Tage vor der geplanten Fusion wurde die Milz einer unbehandelten, 12 Wochen alten, weiblichen Balb C Maus, wie unter Punkt 2.2.3.1 „Primäre Milzzellen“ beschrieben, präpariert und die Milzzellen gewonnen. Milzzellen, Support-Zellen und nochmals 50 µg des reinen Antigens wurden in einem speziellen Immunisierungsmedium (WAK-Chemicals) zusammengegeben und 3 Tage inkubiert.

Fusion:

Nach 3 Tagen wurde eine Fusion der beiden Zellpopulationen durchgeführt. Die Durchführung wurde gemäß den in Punkt 2.2.3.1 „Fusion“ beschriebenen Vorgehen durchgeführt.

2.2.3.3 Klonierung:

Sechzehn Tage nach der Fusion wurden die Klone entnommen, da davon ausgegangen werden kann, dass die Inkubation in Selektionsmedium nur die Hybridomzellen überlebt haben. Optisch gut sichtbare, etwa stecknadelkopfgroße, Klone wurden in eine sterile Pasteurpipette angesaugt und in mit Hybridoma-Medium (WAK Chemicals) beschickte 24-Loch Platten übertragen.

Nachdem die Hybridomzellen etwa zwei Drittel des Zellkulturnapfes ausfüllten, wurde die Antikörperproduktion gegen das ZP2-Antigen im ELISA getestet. Bei positivem Testergebnis wurden die Hybridomzellen mehrmals passagiert und Schritt für Schritt auf größere Kulturgefäße übertragen. Das Hybridoma-Medium wurde vier Wochen später durch serumfreies Ultraculture-Medium (BioWhittaker) ersetzt. Während dieser Zeit erfolgte eine ständige Kontrolle der Antikörperproduktion durch den ELISA. Zur Herstellung monoklonaler Zelllinien wurden die Hybridomzellen, nachdem sie in einer 250 ml Kulturflasche konfluent gewachsen waren, gezählt und so verdünnt, dass ein Ansatz mit 3 Zellen pro ml zur Verfügung stand. Die Zelle wurde auf 96-Loch-Kulturplatten (100 µl/Loch) ausplattiert und bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Etwa zehn Tage nach der Klonierung waren die ersten Klone sichtbar. Die Zellkulturüberstände in den Zellkulturnäpfen, in denen sich statistisch nur ein Klon befand, wurden auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen ZP2 Peptid überprüft. Im positiven Fall wurden diese Zellen vermehrt und die Zellkulturüberstände gewonnen. Bei allen relevanten Zelllinien wurde eine zweite Klonierung (Reklonierung) durchgeführt, um sicherzustellen, dass diese Zellen nur aus einer Zelllinie hervorgegangen sind. Die Reklonierung erfolgte nach dem Beispiel der ersten Klonierung. Alle Zelllinien, die Anti-ZP2-Peptidantikörper produzierten wurden langsam über 4°C zu –80°C und schließlich in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert. Die Lösung, in der die Zellen eingefroren wurden, enthielt 50% Ultraculture Medium, 40% fötales Kälberserum und 10% Cryoserve.

Die Antikörper enthaltenden Zellüberstände wurden gewonnen und zur Lagerung zum Teil bei –20°C eingefroren, zum anderen Teil gefriergetrocknet und anschließend bei –20°C eingefroren. Als Testsystem zur Untersuchung von Antikörper enthaltenden Zellkulturüberständen wurde der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) gewählt.

2.2.4 Nachweis von zirkulierenden Antikörpern mittels Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA):

Zur Serumgewinnung wurden den immunisierten Mäusen Blut an den Schwanzvenen entnommen und zwei Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Anschließend wurde das Blut 10 min bei 14000 g zentrifugiert und das Serum gewonnen.

Der Antikörpernachweis erfolgte mit dem ELISA.

Das synthetische ZP2-Peptid wurde in Aqua dest. gelöst und 1,5 µg Peptid wurden pro Vertiefung in ein MicroWell-Immuno-Modul pipettiert. Nach 24-stündiger Inkubation in einem Trockenschrank bei 37°C wurden die Module je 2 mal über 5 min mit TPBS und einmalig mit PBS gewaschen und kräftig ausgeschlagen.

Die MicroWell-Immuno-Module mit hochaffiner Proteinbindungskapazität wurden mit 1% (w/v) Rinderserumalbumin-PBS für 1 h präinkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren. Das zu untersuchende Anti-ZP2/1 Antiserum wurde in einer absteigenden geometrischen Verdünnungsreihe (Verdünnung in 1% BSA in PBS) zu jeweils 100 µl pro Vertiefung der Module pipettiert. Zu testende Zellüberstände wurden unverdünnt in die Vertiefungen gegeben. Nach 1h Inkubation auf einem Schüttler bei Raumtemperatur folgten die bereits beschrieben 3 Waschschritte. Als Zweitantikörper und Ligand wurde 100 µl Biotin markiertes Anti-Maus-IgG (Sigma) in einer Verdünnung von 1:4000 und Streptavidin-Peroxidase (Vector) in einer Verdünnung von 1:2000 in 1% (w/v) Rinderserumalbumin-PBS eingesetzt. Abschließend wurden 100µl/Vertiefung Reaktionssubstrat (0,5 mg/ml OPD gelöst in Substratpuffer mit 0,03% (v/v) Wasserstoffperoxid) hinzugegeben. OPD ist ein Chromogen, das von dem Enzym Peroxidase in eine gelbe Farblösung umgewandelt wird. Die Farbreaktion wurde nach 20 min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur mit 50 µl 3 M Salzsäure abgestoppt. Die Extinktionswerte wurden bei einer Wellenlänge von 492 nm mit einem Multiscan MCC ELISA-Reader^{R} ermittelt.

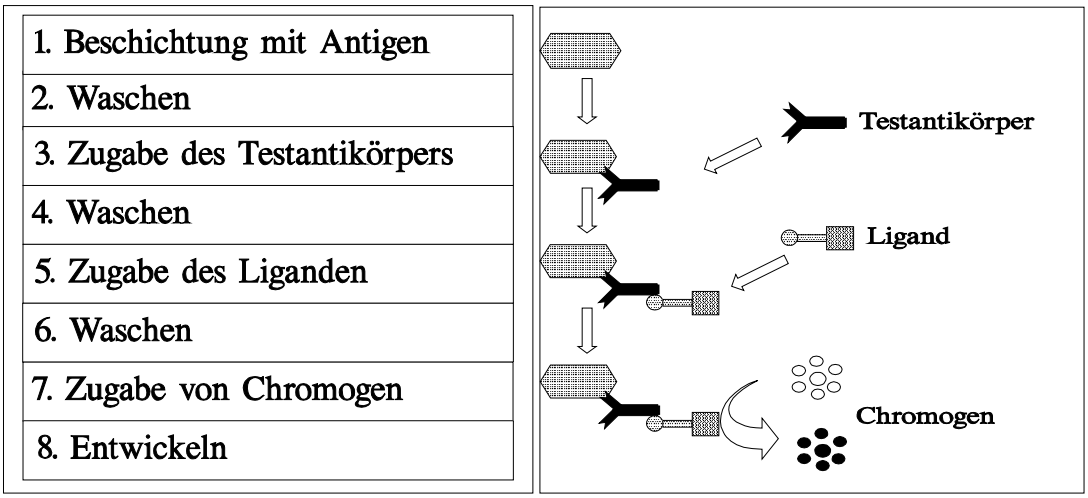

Abb.7 :Schematische Darstellung des Ablaufs eines ELISA

2.2.5 Affinitätschromatographische Reinigung von monoklonalen Antikörpern aus Zellüberstand

Die zur Antikörperreinigung benötigte Affinitätsmatrix wurde mit dem Immuno Pure Antigen/Antibody Immobilization Kit der Firma Pierce hergestellt. Zwei ml Gelvolumen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers mit Bromcyan aktiviert. Anschließend wurden 10 mg des zur Antikörperreinigung vorgesehenen Peptides ZP2-1 kovalent an die Säulenmatrix gekoppelt. Der prozentuale Anteil des an das Säulenmaterial kovalent gebundenen synthetischen Peptids wurde mittels Pierce BCA Protein Assay Reagent berechnet. Zur Antikörperreinigung wurden insgesamt 50 ml des Zellüberstandes des Hybridoma-Zellklones auf die mit Phosphatpuffer (PBS) äquilibrierte Peptid-Affinitätschromatographie-Säule gegeben und 15-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Säule mit 20 ml entgastem Phosphatpuffer pH 7,4 gewaschen. Die an das Peptid gebundenen spezifischen ZP2-1 Peptid Antikörper wurden von den Bestandteilen des Kulturzellüberstandes getrennt. Zur Elution der an die Matrix gebundenen Antikörper wurde ein 0,1 M Glycin-HCL-Puffer pH 2,8 verwendet. Die eluierten Peptidantikörper wurden in 1 ml Fraktionen portioniert in vorgepufferten (15 µl 1 M Tris, pH 7,5) Eppendorf Reaktionsgefäßen aufgefangen. Nach Einstellen des pH Wertes auf 7,5 wurden die gereinigten Fraktionen auf ihren Antikörpergehalt hin untersucht. Die Titerbestimmung der eluierten Antikörper erfolgte im ELISA.

2.2.6 Herstellung von Paraffinschnitten aus Ovarien

Die Ovarien der zur Testung eingesetzten Spezies wurden in einer Methacarn-Fixierlösung (Romeis, 1968) 24 h lang fixiert und danach in 96% Ethanol und Isopropanol für je 4 h dehydriert. Anschließend wurden sie 12 h lang in Xylol entfettet und in flüssigem Paraffin bei 60°C für 8h infiltriert. Danach wurden die Präparate in Blockform eingebettet. Nach abschließendem Aushärten des Gewebes für 12 h bei 4°C, wurden mit einem Mikrotom nach Minot Paraffinschnitte mit einer Schnittdicke von 4 µm angefertigt. Diese Schnitte wurden auf einen mit Chromalaun-Gelatine beschichteten Objektträger aufgezogen und bei 37°C über Nacht getrocknet.

2.2.7 Immunhistochemie auf Paraffinschnitten

Die auf Objektträgern fixierten Paraffinschnitte aus Ovarien der zu testenden Spezies wurden mit Xylol entparaffiniert. Anschließend wurden sie schonend gewässert, indem die Objektträger durch eine absteigende Alkoholreihe geführt wurden. Nach fünfminütigem Waschen in PBS wurden die Ovarschnitte mit einer 3% (v/v) Wasserstoffperoxid-Lösung für 15 min inkubiert, um endogene Peroxidasen zu inaktivieren. Nach einem erneuten Waschschritt in PBS wurden die Schnitte 2 Stunden lang mit einer 2% (w/v) Milchpulver-PBS-Lösung präinkubiert. Dadurch sollten unspezifische Antikörperbindungen an Proteine verhindert werden.
Anschließend wurden die Zellüberstände der jeweiligen Klone bzw. der Negativzellüberstand unverdünnt auf die Ovarschnitte pipettiert. Dazu wurde der Zellüberstand des mAk 24/4 C auf Gewebeschnitten aufgebracht und inkubiert. Als Negativkontrolle wurde Zellüberstand von nicht Antikörperproduzierenden Hybridzellen verwendet. Die folgende zweistündige Inkubation wurde bei 37°C in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen der Schnitte mit PBS für je 5 min wurde der Zweitantikörper aufgetragen. Zum Nachweis einer spezifischen Antigen-Antikörperreaktion wurde Biotin markiertes Anti-Maus-IgG eingesetzt. Es handelte sich hierbei um Anti-Maus-IgG-Biotin Konjugat der Firma Sigma in einer Verdünnung von 1:400 in PBS mit 2% (w/v) Milchpulver. Nach 30 min wurde der Zweitantikörper entfernt, die Gewebeschnitte gewaschen und mit einem Streptavidin-Peroxidase-Komplex (Sigma) in einer Verdünnung von 1:200, der zur Detektion diente, für 30 min inkubiert.
Nach erneuten Waschschritten wurden die Objektträger für 20 min in eine Küvette mit Substratlösung (200 mg/l DAB in Natriumacetat-Puffer mit 0,03% (v/v)

Wasserstoffperoxid) gestellt. Diaminobenzidin (DAB) ist ein Chromogen und wird von dem Enzym Peroxidase in ein wasserunlösliches, braunes Farbprodukt umgewandelt. Nach intensivem Waschen in PBS und Aqua dest. über je 10 min wurden die Gewebeschnitte für 5 min mit Mayers saurem Hämalaun inkubiert, um eine Anfärbung der Zellkerne zur besseren Orientierung im Gewebe zu erzielen. Die Ovarschnitte wurden gründlich mit Leitungswasser gespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in Xylol als Intermedium inkubiert und mit Corbit-Balsam eingedeckt.

2.2.8 Funktionelle Spermatozoenbindungstudien mit dem Kompetitions-Hemizona-Assay (KHZA)

Beim KHZA handelt es sich um eine modifizierte Form des Hemizona Assays (HZA). Letzterer wurde von Burkman et al. (1988) für das menschliche System entwickelt und ermöglicht es, das Bindungsverhalten von Spermatozoen eines Patienten mit dem von Spermatozoen eines gesichert fertilen Spenders zu vergleichen. Dabei wird eine Hemizona mit dem Patientenejakulat inkubiert, während die korrespondierende Hälfte dem Ejakulat des fertilen Spenders ausgesetzt wird. Abschließend werden die gebundenen Spermatozoen ausgezählt und somit geprüft, ob das Bindungsvermögen der Patientenspermatozoen dem der Spenderspermatozoen entspricht. Beim KHZA werden hingegen beide HZs mit dem identischen Ejakulat eines gesichert fertilen Spenders inkubiert, wobei eine ZP-Hälfte zuvor mit einem Anti-ZP2-1-Antikörpern behandelt wurde. Das Versuchsprotokoll des humanen HZA wurde in Anlehnung eines In vitro-Fertilisationsverfahrens für Rinder (Bondioli und Wright, 1983) an das bovine System adaptiert (siehe Abb. 8).

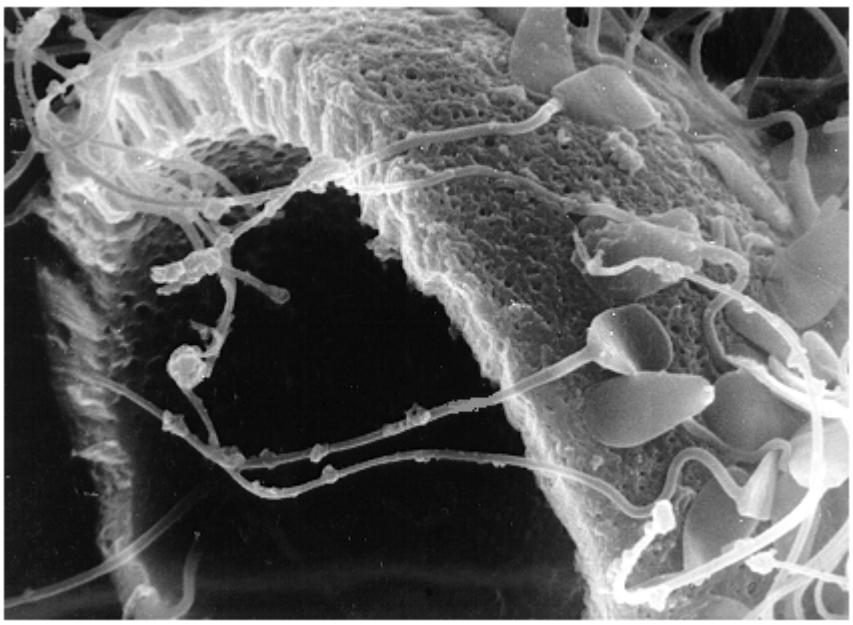

Abb. 8: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (Vergrößerung x 2500) einer bovinen HZ mit an der konvexen Außenseite gebundenen Spermatozoen.

2.2.8.1 Gewinnung von Eizellen aus Rinderovarien

Die Eierstöcke wurden geschlechtsreifen Tieren kurz nach der Schlachtung im Schlachthof Gießen entnommen und in physiologischer Kochsalzlösung transportiert. Nach Punktion von 4-7 mm großen Ovarfollikeln und gründlichem Spülen mit physiologischer Kochsalzlösung wurde der Follikelinhalt unter einem Stereomikroskop untersucht. Die gewonnenen Eizellen wurden in PBS umgesetzt und mit einer ausgezogenen Mikropipette durch mehrmaliges Aufziehen und Ausspülen mechanisch von umgebenden Kumuluszellen befreit. Der Durchmesser der Mikropipette war dabei um die Hälfte größer als der einer Eizelle. Die freipräparierten Eizellen wurden dann entweder direkt in einem Versuch eingesetzt, maturiert, oder bis zur weiteren Verwendung in hyperosmolarer Salzlösung bei 4°C gelagert.

2.2.8.2 Maturation

Hierbei wurden bovine Kumulus-Oozyten-Komplexe aus den eröffneten Follikeln entnommen, in Maturationsmedium pipettiert und über Nacht bei 38,5°C und 5% CO_2

inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Eizellen entnommen, vom umgebenden Kumulus befreit und im entsprechenden Versuch eingesetzt.

2.2.8.3 Herstellung von ZP-Hälften (Hemizonae pellucidae, HZs)

Zur Gewinnung von Hemizonae wurde eine Eizelle mit Hilfe eines inversen Mikroskops mit elektrischer Mikromanipulationseinheit exakt halbiert. Durch mehrmaliges Spülen mit einer Mikropipette in HAM's -Hepes Kulturmedium wurden Ooplasma und Eizellkernresten aus den zwei Zona pellucida Hälften entfernt. Die so gewonnenen Hemizonae wurden direkt in Bindungsversuchen eingesetzt oder in hyperosmolarer Salzlösung bei 4°C gelagert.

2.2.8.4 Vorbereitung der Spermatozoensuspension

Es wurde kryokonserviertes Ejakulat eines Spenderbullen der Zucht- und Besamungsunion Hessen e.G. eingesetzt, das in 20 0µl Portionen mit jeweils 20 Millionen Spermatozoen pro Paillette in flüssigem Stickstoff gelagert wurde. Vier Spermaportionen wurden in einem Wasserbad mit 38,5°C aufgetaut, mit 6 ml HAM's-Hepes Kulturmedium plus 0,3% bovinem Serum Albumin (BSA) verdünnt und für 5 min bei 500 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde nochmals mit 6 ml Medium verdünnt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Das so gewonnene Sediment wurde mit 500µl HAM's-Hepes mit 0,3% BSA vorsichtig ohne Aufwirbelung der Zellen überschichtet und 30 min lang im Inkubator stehen gelassen (Swim-up-Verfahren). Der Überstand wurde nach 30 min vorsichtig entnommen und in einem Begasungsbrutschrank bei 38,5°C über 3 h mit 5% CO_2 inkubiert, um die Kapazitation der Spermatozoen zu ermöglichen.
Die Anzahl der motilen Spermatozoen in der mit BSA-haltigem Medium kapazitierten Suspension wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Kulturmedium so verdünnt, dass 500.000 motile Spermatozoen/ml enthalten waren.

2.2.8.5 Vorbereitung der Hemizonae

Die Zona pellucida-Hälften wurden mit einer Mikropipette in HAM's-Hepes Zellkulturmedium durch Aufsaugen und Ausspülen gewaschen. Eine Hemizona wurde anschließend mit 20 µl Zellüberstand in einem Brutschrank mit 38,5°C und 5%

CO_2-Gehalt inkubiert. Die korrespondierende Hälfte wurde in einen 20 µl Tropfen, der nur Zellkulturmedium oder einen Zellkulturüberstand enthielt, welcher von einem nicht Antikörper produzierenden Zellklon stammte, gesetzt und in den Brutschrank gestellt. Um einen Flüssigkeitsverlust zu vermeiden, wurden die Hemizonae enthaltenden Tropfen mit Mineralöl überschichtet. Nach 2 h wurden beide Hemizonae mit einer Mikropipette entnommen und jeweils 15 mal in HAM's F-10 gewaschen.

2.2.8.6 Koinkubation und Ermittlung des Hemizona-Indexes (HZI)

Sowohl die mit dem zu testenden Antikörpern inkubierte Hemizona als auch die zur Kontrolle unbehandelte bzw. mit einem negativem Zellüberstand inkubierte korrespondierende Hälfte wurden in je einen Tropfen mit 100 µl der vorbereiteten Spermatozoensuspension transferiert und mit Mineralöl bedeckt. Die Koinkubation wurde in einem Begasungsbrutschrank mit 38,5°C und 5% CO_2-Gehalt durchgeführt. Nach 4 h wurden beide Zona pellucida-Hälften mit einer Mikropipette, deren Durchmesser genau dem einer HZ entsprach, jeweils 15 mal gewaschen. Die beim Aufsaugen und Ausspülen aufgetretenen Scherkräfte waren dabei so groß, dass locker oder nur oberflächlich gebundene Spermatozoen abgespült wurden. Nur sehr fest gebundene Spermatozoen verblieben an der HZ und wurden unter einem inversen Mikroskop ausgezählt. Zur Interpretation der Ergebnisse wurde der Hemizonae-Index errechnet. Dieser ist definiert als 100 mal dem Quotienten aus der Anzahl der Spermatozoen, die an die mit Antiserum inkubierte HZ gebunden haben und der Zahl der an die korrespondierende Kontroll-Hälfte gebundenen Spermatozoen (siehe Abb.9).

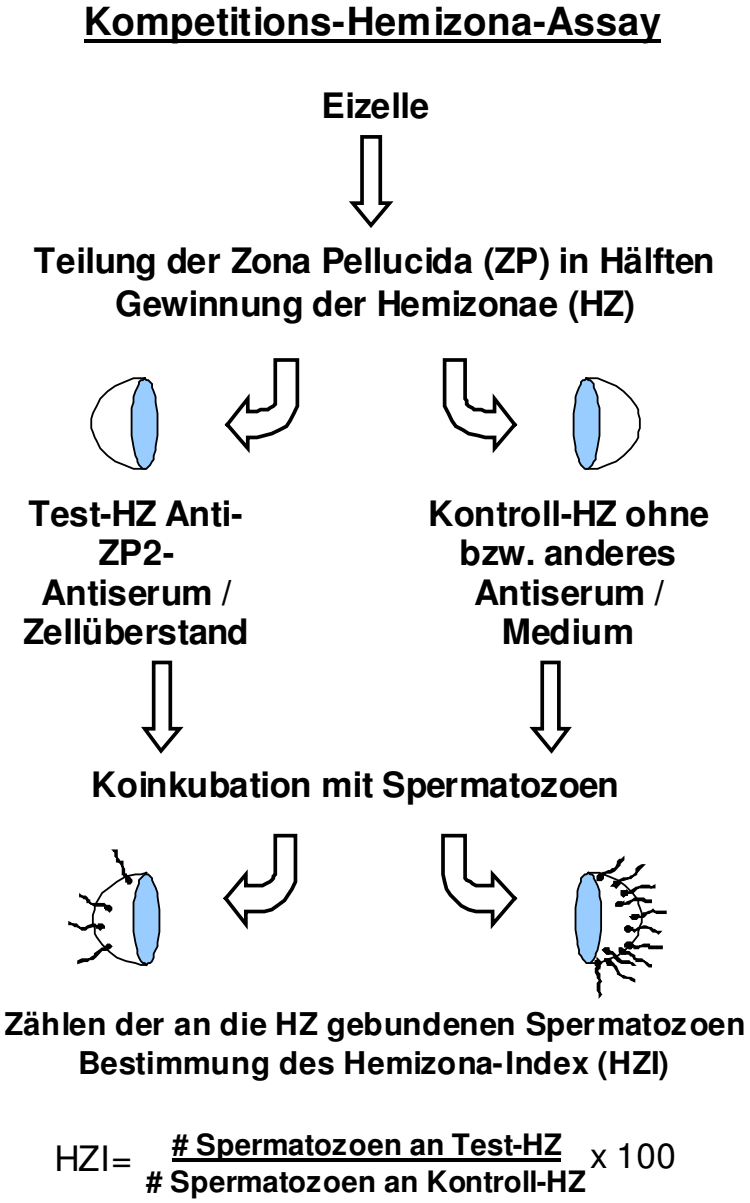

Abb. 9: Schematische Darstellung des Kompetitions-Hemizona-Assays (KHZA)

2.2.8.7 Statistische Auswertung der Ergebnisse des Hemizonae-Assay

Kommt es zu keiner Beeinflussung des Bindungsverhaltens durch die Anti-ZP2/1-Antikörper, so liegt der HZI bei etwa 100 (Nullhypothese H_0). Da die Auswirkungen der Antikörper-Inkubation nicht vorhersehbar bzw. einschränkbar waren, wurde zur statistischen Analyse der Hemizonae-Indices ein zweiseitiger t-Test gewählt und mit dem Computerprogramm GraphPad InStat™ durchgeführt. Lag die Wahrscheinlichkeit für H_0 $P<0,05$, so wurde die Nullhypothese verworfen. Stattdessen wurde von einer statistisch signifikanten Beeinflussung der Spermatozoenbindung an die HZs ausgegangen (Alternativhypothese H_1). Ein HZI<100 sprach für eine Verminderung, >100 für eine Erhöhung der Spermatozoenbindungskapazität.

2.2.9 Immunfluoreszenz mit bovinen, humanen und Maus-Eizellen

Wie unter Punkt 2.2.10.1 beschrieben wurden bovine und humane Oozyten gewonnen und vom Kumulus befreit. Zur Gewinnung von Maus Eizellen wurden die Ovarien von 10 Wochen alten, weiblichen B6D2F1 Mäusen entnommen. Die Ovarien wurden von umgebendem Fett befreit und in 0,9% NaCL gegeben. Unter stereomikroskopischer Kontrolle wurden die Follikel mit zwei feinen Kanülen eröffnet. Die freigesetzten Oozyten wurden separiert, von Kumuluszellen befreit und in 0,9% NaCL gewaschen. Des Weiteren wurden humane Eizellen von Frauen verwendet, die an einem IVF-Programm teilnahmen. Diese Eizellen konnten für die IVF nicht eingesetzt werden und wären normalerweise verworfen worden. Es handelte sich dabei um

Prophase I Eizellen, gewonnen aus antralen Follikeln. Bis zum Einsatz wurden die Oozyten in hyperosmolarer Salzlösung gelagert. Die Eizellen der zu testenden Spezies wurden in 2% Milchpulver/PBS für 30 min bei 38,5°C präinkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Danach wurden die Oozyten über 2 Stunden in dem Antikörper enthaltenden Zellüberstand bzw. in einem Negativ-Zellüberstand bei 38,5°C inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Eizellen anschließend insgesamt 15 mal mit einer Micropipette in 3 Tropfen PBS/1%BSA gewaschen.

Als Zweitantikörper wurde Biotin-konjugiertes Anti-Maus-IgG der Firma Sigma in der Verdünnung 1:400 in PBS/1%BSA verwendet, der 30 min bei Raumtemperatur mit den Eizellen inkubiert wurde.

Nach einem wie oben beschriebenen erneuten Waschvorgang, wurden die Eizellen in eine Avidin-FITC (Sigma) Lösung (30 µg/ml in 10 mM Hepes-Puffer mit 150 mM NaCl, pH 8,2) gegeben. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur in einer abgedunkelten feuchten Kammer.
Nach einem erneuten Waschvorgang in 0,1% w/v BSA/PBS wurden die Eizellen in GelMount (Biomeda) auf Objektträgern eingedeckt und die Ergebnisse unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.2.10 Immuno-Blot

Zur immunologischen Detektion von auf PVDF-Membranen elektrotransferierten Proteinen wurde ein Immunoblot mit Chemilumineszenz als Nachweismethode durchgeführt.

2.2.10.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Durch eine diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) wurden die zu untersuchenden Proteingemische unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurden 10%ige Trenngele sowie 6%ige Sammelgele zur optimalen Auftrennung der Proteine verwendet. Jeweils 10 komplette Eizellen vom Rind und Mensch wurden in 22 µl eines speziellen Eizell-Blotpuffers gegeben, intensiv gemischt und für 6 Minuten gekocht. Die Proben wurden dann in die Geltaschen (10 Eizellen pro Tasche) gefüllt.
Als Molekulargewichtsmarker wurden ein biotinylierter Gel-Elektrophorese-Standard der Firma Sigma mit 97,4 kDa, 58,1 kDa, 39,8 kDa, 29,0 kDa, 20,1 kDa und 14,3 kDa sowie ein Kaleidoskop Prestained Standard der Firma Bio Rad mit 208,0 kDa,
144,0 kDa, 87,0 kDa, 44,1 kDa, 32,7 kDa, 17,7 kDa und 7,1 kDa eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V pro Gel. Nach 45 min wurde das Gel entnommen und die aufgetrennten Proteingemische wurden auf eine PVDF-Membran transferiert.

2.2.10.2 Western-Blot

Die in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihren Molekularmassen aufgetrennten Proteine wurden in einem Western-Blot auf PVDF-Membranen (Millipore) elektrotransferiert (Towbin et al., 1979). Das im Western-Blot-Puffer

befindliche Gel wurde blasenfrei auf die nach den Herstellerangaben entsprechend vorbereitete PVDF-Membran gelegt, mit zwei feuchten Filterpappen und Kunststoffscheiben umgeben und in einer Halterung in die Western-Blot-Kammer eingespannt. Der Elektrotransfer erfolgte 70 min lang bei einer konstanten Spannung von 35 V pro Gel. Anschließend wurden die PVDF-Membranen entnommen, 10 min in Filterpapier getrocknet und 10 min mit einer 2%igen Ponceau S-Lösung gefärbt. Ein Transfer der Proteine aus dem Gel auf die PVDF-Membran konnte nach Auswaschen des überschüssigen Farbstoffes mit Aqua dest. durch die Rotfärbung der Proteinbanden auf der PVDF-Membran nachgewiesen werden. Zur Kontrolle, ob die aufgetrennten Proteine vollständig elektrotransferiert wurden, erfolgte eine Coomassie-Blau-Färbung des verwendeten Gels. Dazu wurden die Gele für 30 min in eine 0,25%ige Coomassie-Blau-Färbelösung gelegt. Nach anschließender 16-stündiger Entfärbung mit Entfärbelösung waren keine blau gefärbten Proteinbanden zu erkennen, was für einen nahezu kompletten Transfer der Proteine sprach. Die PVDF-Membranen wurden anschließend zur immunbiochemischen Identifizierung der Proteine eingesetzt oder bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.2.10.3 Immunbiochemische Identifizierung von Proteinen

Die PVDF-Membran mit den aufgetrennten Proteinen wurden für 5 min in Methanol fixiert, 5 min mit Aqua dest. gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur in 5% Teleostean-Gelatine / TTBS für eine Stunde präinkubiert.

Anschließend wurden die PVDF-Membranen über 1 h mit den zu testenden Anti-ZP2-1-Antikörpern inkubiert. Danach wurden die PVDF-Membranen 3 mal für 10 min in dem beschriebenen TTBS-Puffer gewaschen. Als Zweitantikörper wurde Anti-Maus-IgG-Biotin-Konjugat der Firma Sigma in einer Verdünnung von 1:4000 in TTBS eingesetzt. Die Inkubation erfolgte 30 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Nach erneuten, wie oben beschriebenen Waschschritten wurden die PVDF-Membranen mit dem Steptavidin-Peroxidase-Komplex der Firma Sigma in einer Verdünnung von 1:2000 in TTBS für 30 min inkubiert und anschließend wieder 3 mal in TTBS gewaschen. Die PVDF-Membranstreifen mit den elektrotransferierten biotinilierten Proteinstandards wurden statt einem Erstantikörper, dem Zweitantikörper und dem Streptavidin-Peroxidase-Komplex einem Avidin-Peroxidase-Konjugat (Bio Rad) in einer Verdünnung von 1:3000 für 30 min ausgesetzt und entsprechend 3 mal je 10 min gewaschen.

Zur Durchführung der Chemilumineszenz wurden die entsprechenden Substanzen nach den Angaben des Herstellers 1+1 gemischt, die Blot-Membranen 1 min damit überschichtet und anschließend in Saran-Wrap Folie luftblasenfrei verpackt. Zur Belichtung wurden die Membranen in lichtdichte Röntgenkassetten auf UM MA HC FUJI Medical Röntgenfilme gelegt und unterschiedlich lang exponiert. Nach Entwicklung der Filme zeigten sich die positiven Antigen-Antikörperreaktionen als bandenförmige Filmschwärzungen in den entsprechenden Molekularmassenbereichen. Abschließend wurden die PVDF-Membranen 10 min in Aqua dest. gewaschen und archiviert.

2.2.11 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper

Zur Bestimmung der Immunglobulinsubklassen wurde der Immunoblot als Testsystem verwendet. Dazu wurde der Zellüberstand zunächst nach diskontinuierlicher SDS-PAGE aufgearbeitet und die Proteine unter reduzierenden Bedingungen entsprechend ihren Molekularmassen aufgetrennt. Dazugegeben wurden jeweils gleiche Volumina Zellüberstand und doppelt konzentrierter Lämmli-Puffer mit 10 % β-Mercaptoethanol. Die Proben wurden 5 Minuten gekocht und auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die SDS-Gelelektrophorese und der sich anschließende Western-Blot wurden gemäß des in Punkt 2.2.12 beschriebenen Protokolls durchgeführt.

Zur immunbiochemischen Identifizierung wurden die PVDF- Membranen rehydriert, danach 1 mal in aqua dest. und 1 mal in PBS gewaschen. Nach einer 1-stündigen Inkubation in 5% Teleostean-Gelatine/TBS wurden als Nachweisantikörper mit Biotin markiertes Anti-Maus-IgG (1:4000, Sigma), Anti-Maus-IgM (1:4000, Sigma) und Anti-Maus-Ig (1:2000, Amersham) eingesetzt.

Die Inkubation wurde jeweils 30 Minuten bei Raumtemperatur und auf einem Rüttler durchgeführt. Um ungebundenen Zweitantikörper zu entfernen, wurden die PVDF-Membranen 2 mal für 15 min in TBS/Tween und 1 mal 15 min in TBS gewaschen. Daraufhin wurden die PVDF-Membranen in Streptavidin-Peroxidase (Vector, 1:3000) für 30 min unter Rütteln und bei Raumtemperatur inkubiert. Alle Antikörper-Verdünnungen erfolgten mit TBS-Puffer. Anschließend wurden die Membranstreifen wie zuvor beschrieben gewaschen und dem Chemilumineszenz-Verfahren zugeführt.

2.2.12 In vivo Fertilisierungsversuche immunisierter Mäuse

Um den Einfluss von induzierten Autoantikörpern gegen synthetische ZP2-Peptide auf die Fertilisierungs- und Reproduktionsrate oder eventuelle morphologische Veränderungen der Ovarien zu überprüfen, wurden Immunisierungs- und anschließend Fertilisierungsstudien in vivo durchgeführt.

Zur Immunisierung von 6 Wochen alten weiblichen C213-F1-Mäusen wurde ZP2-Peptid eingesetzt. Es wurde nach dem unter Punkt 2.2.1 beschriebenen Protokoll an KLH gekoppelt. Es erfolgte eine subkutane Applikation von 50 µg Protein pro Tier. Als Negativkontrolle wurde KLH verwendet. Die Menge an KLH entsprach der Menge des Peptid/KLH-Konjugates. Es wurden 3 Immunisierungen im Abstand von 3 Wochen durchgeführt.

Nach Ablauf von 9 Wochen wurden die immunisierten weiblichen Mäuse mit männlichen C210-Mäusen für 24 h zusammengesetzt.

Die erfolgte Kopulation wurde durch Überprüfen auf Vorhandensein eines Vaginalpfropfes festgestellt. Vierzehn Tage nach der Verpaarung wurden die Tiere getötet, die Ovarien und der Uterus entnommen und die Anzahl der entwickelten Föten ermittelt.

2.2.13 Histologische Aufarbeitung der Ovarien der immunisierten Mäuse

Alle Tiere wurden zum selben Zeitpunkt getötet, die Uterie inspiziert und die Ovarien entnommen. Zur Lichtmikroskopischen Untersuchung der Ovarienmorphologie wurden die Ovarien in Methacarn-Lösung fixiert und durch eine wie im Teil “Immunhistochemische Untersuchungen” (2.2.8) beschriebene Paraffineinbettung geführt.

Anschließend wurden 4 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt, auf Chromalaungelatine-beschichtete Objektträger gezogen, getrocknet (über Nacht bei 37°C), mit der Hämalaun-Eosin Färbung angefärbt und lichtmikroskopisch begutachtet.

2.2.14 Herstellung von Schnittpräparaten für die Immunelektronenmikroskopie

Ovarien von Marmoset-Monkey und Maus bzw. bovine und humane Eizellen, die wie unter Punkt 2.2.10.1 beschrieben gewonnen worden waren, wurden in 0,1 % Glutaraldehyd und 4 % Paraformaldehyd in 0,1 M Cacodylsäure-Natriumsalz Puffer

pH 7,2 für 24 h fixiert. Das Fixiermittel wurde entfernt durch 3 mal 5-minütige Inkubation in 0,1 M Cacodylatpuffer. Anschließend folgten Entwässerungsschritte in einer aufsteigenden Ethanolreihe beginnend mit 50 % Ethanol in aqua dest für 10 min, dann jeweils 10 min in 70 % und 96 % Ethanol. Abschließend folgten 2 mal 10 min Inkubation in 100 % Ethanol. Die Ovarien wurden mit dem Einbettmedium LR-White in aufsteigender Konzentration, erst 1/3 LR-White 2/3 absoluten Ethanol, dann LR-White – Ethanol 1:1, jeweils für 20 min, infiltriert. Die Infiltration in 100 % LR-White erfolgte über insgesamt 3 Zeiträume, 1 h, über Nacht bei 4°C und zuletzt für 2 h. Eingebettet wurden die Ovarien in Gelatinekapseln, mit LR-White aufgefüllt und über 24 h bei 60°C ausgehärtet. Um eine geeignete Schnittebene im Präparat zu finden, wurden zunächst in Folge 1 µm dicke Semidünnschnitte mit Hilfe von Glasmessern am LKB-Ultrotome 3 angefertigt, an Glasobjektträger getrocknet und damit fixiert. Eine Anfärbung der Schnitte erfolgte für 1 min mit 1%iger Toloidinblau-Lösung. Unter einem Zeiss Lichtmikroskop wurden die Schnitte beurteilt. Eine Schnittebene, die eine Eizelle in gewünschter Größe enthielt, wurde auf die entsprechende Ultradünnschnitt-Fläche mittels eines Pyramitoms getrimmt. Anschließend wurden mit dem LKB Ultramikrotom 8800 A pro Probe 3 silberfarbene Ultradünnschnitte (ca. 30-40 nm dick) angefertigt. Diese wurden auf 400 mesh hexagon Dünnsteg-Netzchen aus Nickel aufgezogen und mindestens bis zum nächsten Tag bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.15 Immunogoldreaktion mit Ultradünnschnitten

Als Untersuchungsmaterial wurden Ultradünnschnitte aus Marmoset-Ovarien, aus Maus-Ovarien, von humanen Oozyten und von bovinen Oozyten verwendet.

Die Schnittreaktion wurde in einer feuchten Kammer durchgeführt. Auf den Boden der feuchten Kammer wurden Tropfen mit der jeweiligen Inkubationslösung aufgegeben, in die die Netzchen mit den Schnitten nach oben hineingelegt wurden. Dabei hatten Antikörper-haltige Lösungen 20 µl Volumen, Lösungen zum Waschen oder Präinkubieren 50 – 100 µl Volumen.

Zur Hydrierung der Schnitte wurden diese zunächst 5 min in Tris Buffered Saline (TBS) pH 7,4 gelegt. Dann erfolgte eine 20-minütige Inkubation in 0,1 % Glycin in TBS, das eine Abdeckung von freien Aldehydgruppen bewirken soll ; anschließend folgte eine Präinkubation über 45 Minuten in 3 % fettfreiem Milchpulver in TBS zur Abdeckung möglicher unspezifischer Bindungsstellen. Danach wurden die Schnitte in

der Antikörperlösung (mAk 24/4C) bzw. in dem Kultivierungsmedium als Negativkontrolle für 75 Minuten inkubiert. Zur Entfernung von ungebundenen Antikörpern wurden die Netzchen 5 mal 3 min in TBS-Tropfen gewaschen.
Als Zweitantikörper wurde mit Biotin markiertes Anti-Maus-IgG (Sigma) in einer Verdünnung von 1:40 eingesetzt und die Netzchen 45 Minuten darin inkubiert. Danach wurden sie ebenfalls 5 mal 3 Minuten in TBS gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Streptavidin-Gold-Konjugat (20 nm Partikelgröße, Bio Cell), das 1:40 verdünnt eingesetzt wurde. Auch hier wurden die Netzchen für 45 Minuten in der Antikörperlösung belassen. Danach erfolgten wieder 5 Waschschritte für jeweils 3 Minuten. Um die Antikörperbindung zu stabilisieren, wurde nachfolgend eine Fixierung mit 1 % Glutaraldehyd in TBS für 5 Minuten durchgeführt. Nach 3 Waschritten in aqua dest. für jeweils 3 Minuten wurden die Schnitte mit 2 % Uranylacetat in Aqua dest für 20 Minuten nachkontrastiert und durch mehrmaliges Eintauchen in aqua dest gespült. Die Beurteilung der Reaktion wurde an einem Zeiss Transmissionselektronenmikroskop LEO 906 durchgeführt.

2.2.16 Genexpression der Zona pellucida Glykoproteine

Untersuchungen zur Identifizierung des mRNA Syntheseortes der Zona pellucida Glykoproteine im Ovar der Maus erfolgten durch die Darstellung der Expression der die Zona pellucida-Proteine kodierenden Gene. Dazu wurde aus einem Ovar bzw. aus isolierten Oozyten und isolierten Follikel-Zellen von weiblichen B6D2F1-Mäusen die mRNA isoliert und anschließend eine Reverse-Transkriptase-Polymrasekettenreaktion durchgeführt. Amplifizierte cDNA-Fragmente wurden charakterisiert.

2.2.16.1 Isolierung von mRNA aus B6D2F1 Maus-Material

Die mRNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des MPG Guanidine Direct mRNA Purification Kit der Firma CPG, New Jersey. Dieser ist für die direkte mRNA-Isolierung aus Zellen sowie aus tierischem und pflanzlichem Gewebe bestimmt.
100 µl 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 100 µl des Proben-Bindungs-Puffers (G1-Lösung) wurden 10 µl der biotinylierten Oligo d(T)-Lösung (800 pmol) sowie 9 0µl 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 100 µl Hybridisierung-Bindungs-Puffer (G4-Lösung) wieder in Lösung gebracht und bis zur späteren Verwendung bei Raumtemperatur belassen.

Anschließend wurden das Ovar, die Oozyten oder die Follikelzellen für die mRNA-Extraktion präpariert. Zum Einsatz kam ein Ovar bzw. 15 isolierte Oozyten und isolierte Follikel-Zellen von weiblichen B6D2F1-Mäusen. Die Bestimmung der Zellzahl war beim Einsatz der Follikelzellen bestehend aus Kumulus-/Granulosazellkomplexen nicht möglich. Es wurde zunächst die GTC- Lösung, bestehend aus 1,5 ml GTC Homogenisierungs-Puffer (G3-Lösung) und 15 µl Mercaptoethanol (G7-Lösung) hergestellt und auf Eis gekühlt. In diese wurden die Zellen bzw. das Ovar überführt und weiter behandelt. Nach ausgiebigem Mischen und ca. 5-minütiger Bearbeitung in einem Glashomogenisator (4ml) mit dazu-gehörigem 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 5 min 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 100 µl Hybridisierungs-Wasch-Puffer (G5-Lösung) gewaschen. Die Zugabe von 20 µl Freisetzungs-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 40 µl mRNA in G6-Lösung

vorlag. Die isolierte mRNA wurde im weiteren Verlauf mit 100 µl Ethanol 100% und 15 µl 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 5 min bei 13800 x g gewaschen. Nach Lufttrocknung des Pellets wurde dieses in 20 µl RNAse freiem Wasser resuspendiert. Zur Lagerung wurde vor dem Tieffrieren bei –20°C noch 1 µl (40 Units) RNase Inhibitor zum Schutz vor RNase-Aktivität hinzugegeben.

2.2.16.2 Reverse Transkriptase-Reaktion (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 1 µM und das dNTP-Gemisch 0,5 mM. Zusätzlich waren 10 Units RNase Inhibitor und 4 Units Reverse Transkriptase enthalten. Die Differenz zum Endvolumen von 20 µl wurde mit RNase freiem Wasser ausgeglichen. Die gewonnene cDNA wurde bei –20°C tiefgefroren.

2.2.16.3 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:

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

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. Durch die Amplifikation des cDNA-Fragmentes ist ein Nachweis der mRNA-Expression möglich.

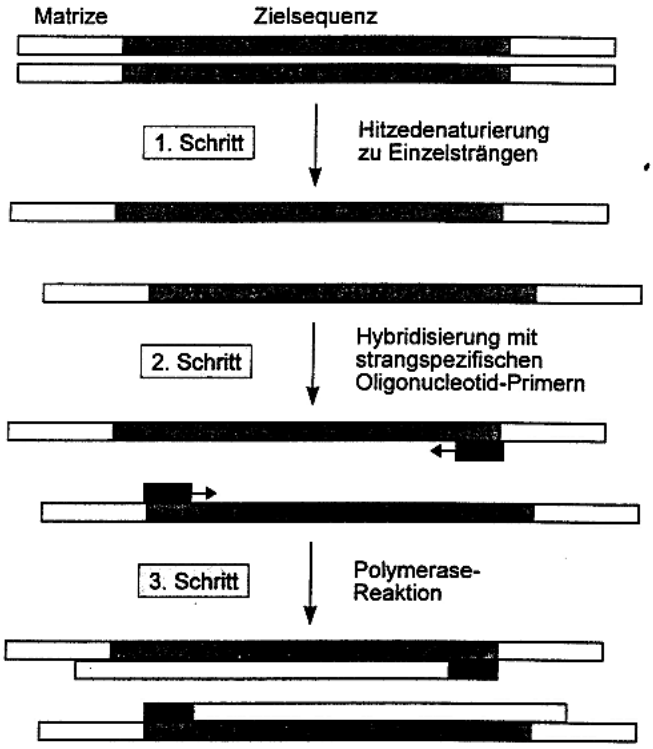

Abb. 10: Schematischer Ablauf einer Polymerasekettenreaktion (PCR). Gassen/Schrimpf (1999)

2.2.16.4 Oligonukleotid-Primer

Oligonukleotid-Primer sind kurze Nukleotidsequenzen, die als Startpunkt der DNA-Polymerase zur Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen eingesetzt werden.
Um die Amplifizierung der mRNA des Maus Zona pellucida Glykoproteins 2 zu ermöglichen, musste eine mausspezifische Primerregion der Nukleotidsequenzen ermittelt werden. Dies erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms PC/gene der Firma IntelliGenetics. Mit dem anschließenden Sequenzvergleich der Primer (Programm: DNasis der Firma Pharmacia) wurden vorhandene Homologien der Nukleotidbereiche dargestellt. Zur Vervielfältigung von ausgewählten

Sequenzbereichen der Gene wurden ebenfalls geeignete Primer hergestellt. Diese Primer wurden in Zusammenarbeit von Herrn Dr. Konrad, Institut für Anatomie und Zellbiologie der Phillips-Universität, Marburg, selbst konzipiert und von der Firma MWG-Biotech hergestellt. Die Lagerung erfolgte bei –20°C. Die eingesetzten Primer sind in Tabelle 1 aufgezeigt.

Spezies/ Gen	Primer	Primersequenz	AT (C°) errechnet	AT (C°) eingesetzt	Position	Fragmentgröße (bp)
Maus ZP2	5-M Z P2	5´-AAGTGAAGGTCTTGAGCAGG -3`	55°C	55°C	1589-1608	359 bp
	3-M Z P2	5´- TTTGTTGGCCTCTCGTTTGC -3`	55°C	55°C	1928-1947	

Tab. 1:
Eingesetzter Primer zur Amplifikation einer Sequenz aus dem Maus ZP2-Protein

2.2.16.5 PCR

Die Amplifikation der cDNA erfolgte in 0,2- und 0,5-ml-Reaktionsgefäßen von Eppendorf in einem Thermocycler mit Heizdeckel, weshalb auf eine Überschichtung der Proben mit Öl verzichtet werden konnte.

Die Proben beinhalteten 2 µl Template, 1xNH_4-Puffer, 2 mM $MgCl_2$, 0,25 mM dNTPs, je 100 pmol der Primer eines Primerpaares und 2,5 Units der Taq-Polymerase. Das fehlende Volumen zum Endvolumen von 50 µl wurde mit autoklaviertem Aqua dest. ausgeglichen. Als Kontrollen wurde für jede Primerkombination eine Blindprobe angesetzt, die statt cDNA das gleiche Volumen Aqua. dest enthielt. Jede PCR-Reaktion begann mit der Denaturierung des Templates bei 94°C für 4 min. Daran schlossen sich für jede PCR 35 Zyklen an. Ein PCR-Zyklus lief wie folgt ab:

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

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

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

2.2.16.6 Gelelekektrophorese 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 12,5 µl PCR-Produkt und 2,5 µl 6xLoading Puffer, aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1xTBE-Puffer eingesetzt. Als Größenmarker wurde ein 100 bp-Marker aufgetragen.
Die Gelelektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt und dauerte ca. 90 min. Dann wurde das Gel einem UV-Licht mit einer Wellenlänge von 366nm ausgesetzt und mit einer Polaroidkamera des Typs 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.

2.2.16.7 Sequenzierung der PCR-Produkte

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

3 Ergebnisse

3.1 Eingesetztes, synthetisch hergestelltes Peptid

Die cDNA-Sequenz und die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen des ZP2/A-Proteins verschiedener Spezies sind bekannt (Liang et al., 1990; Liang und Dean 1993; Harris et al., 1994). Mit einer Computeranalyse wurden Peptidsequenzen ermittelt, die im menschlichen Modell als potentiell immunogen bewertet wurden. Entsprechend dieser Sequenzen wurde ein Peptid synthetisch hergestellt und als Peptid ZP2-1 bezeichnet. Das Peptid wies eine Aminosäuresequenz auf, die eine sehr große Übereinstimmung innerhalb der unterschiedlichen Spezies, d.h. einen homologen Bereich darstellte besaß (Tab. 2).

Mensch	Asp	Pro	Asn	Ile	Lys	Leu	Val	Leu	Asp	Asp	Cys	Trp	Ala	Thr	Ser
Maus	Asp	Pro	Asn	Ile	Lys	Leu	Val	Leu	Asp	Asp	Cys	Trp	Ala	Thr	Ser
Schwein	Asp	Pro	Asn	Ile	Lys	Leu	Val	Leu	Asp	Asp	Cys	Trp	Ala	Thr	Ser
Katze	Asp	Pro	Asn	Ile	Lys	Leu	Val	Leu	Asp	Asp	Cys	Trp	Ala	Thr	*Pro*
Hund	Asp	Pro	Asn	Ile	Lys	Leu	Val	Leu	Asp	Asp	Cys	Trp	Ala	Thr	*Pro*
Kanin-chen	Asp	Pro	Asn	Ile	Lys	Leu	*Ala*	Leu	Asp	Asp	Cys	Trp	Ala	Thr	Ser

Tab. 2

Die ausgewählte Aminosäuresequenz zeigt eine sehr hohe Übereinstimmung von menschlichem ZP2/A-Peptid mit den entsprechenden Aminosäuresequenzen anderer Tierspezies. Hervorgehoben sind die von der humanen Sequenz (Aminosäurerestnummern 535-549) abweichenden Aminosäurereste.

3.1.1 Immunisierung von Balb-C Mäusen:

Es wurden 8 weibliche Balb-C Mäuse mit dem an KLH gekoppelten ZP2-1 Peptid immunisiert. Als Negativkontrolle wurden 2 Tiere mit KLH immunisiert.

3.1.2 Nachweis von Anti-ZP2-1 Peptidantikörpern im Mausserum

Die Titerbestimmungen der polyklonalen Antiseren aus mit ZP2-1 Peptid immunisierten Mäusen, deren Milzzellen zur Fusion eingesetzt werden sollten, erfolgte im ELISA. Der Titer wurde definiert als diejenige Verdünnung von

Antikörpern, bei der die Extinktion über dem doppelten Extinktionswert der entsprechenden Negativkontrolle lag. Titrationskurven von Seren der 3 Mäuse, die in Fusionen eingesetzt wurden, sind in Abbildung 11 wiedergegeben. Die Seren der Mäuse wurden 2 Wochen nach der dritten Immunisierung gewonnen.

Anti-ZP2-1 Peptidantikörper konnten in Seren von 5 Mäusen nachgewiesen werden. Drei immunisierte Mäuse zeigten keine Antikörper-Produktion. Die Titer des Antiserums der Maus ZP2-1/1 wurde bei einer Verdünnung von 1:800 (Abb.11, A) und die der Mäuse ZP2-1/4 (Abb. 11, B) und ZP2-1/6 (Abb. 11, C) bei einer Verdünnung von 1:1600 ermittelt. Diese Tiere wurden für spätere Fusionen eingesetzt. Der Titer der Antiseren der Mäuse ZP2-1/2, ZP2-1/3, ZP2-1/9 und ZP2-1/10 lag bei einer Verdünnung von 1:200 bzw. bei 1:100 bei Antiserum ZP2-1/11 (nicht zu Fusionen verwendet).

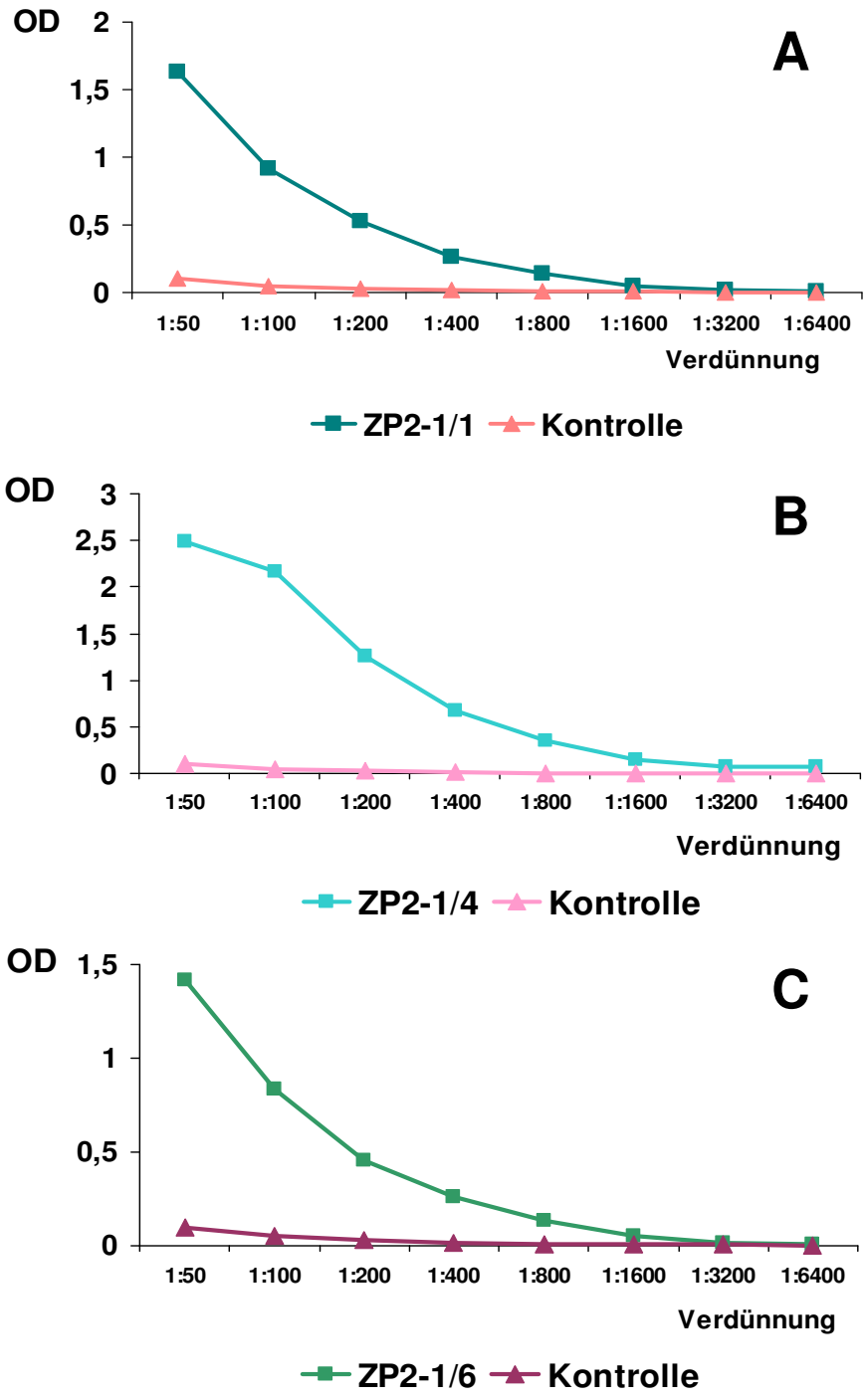

Abb.11

Nachweis der ZP2-Peptid-Antikörper-Titer der 3 zu Zellfusionen eingesetzten Mäuse. Die Verdünnungen der Antiseren sind auf der Abszisse, die optische Dichte (OD) bei 492nm ist auf der Ordinate dargestellt. Als Antigen wurden pro Kavität 1,5 µg des synthetischen ZP2-Peptids eingesetzt. ***A****: Titrationskurve der Maus ZP2-1 ;* ***B****: Titrationskurve der Maus ZP2-1/4 ;* ***C****: Titrationskurve der Maus ZP2-1/6 . Als Zweit-Antikörper-System dienten Biotin markierte Anti-Maus-IgG (Sigma) in einer Verdünnung von 1:4000 und Streptavidin-Peroxidase (Vector) in einer Verdünnung von 1:2000.*

3.1.3 Zellfusionen von Myelomzellen und Milzzellen aus mit ZP2-1 immunisierten Mäusen (In vivo Zellfusionen)

Zur Zellfusion wurden die immunisierten Mäuse getötet und die Milzen entnommen. Die daraus gewonnenen Milzzellen wurden zur Produktion spezifischer monoklonaler Antikörper mit den SP2/0-Ag14 Myelomzellen fusioniert. Aus 3 Fusionen konnten 112 Hybridom-Zellkolonien gewonnen werden. Die Überstände dieser Zellklone wurden im ELISA auf den Gehalt spezifischer anti-ZP2-1 Antikörper untersucht. In 80 Hybridom-Zellkulturüberständen konnten im ELISA keine Antikörper nachgewiesen werden. In 32 Überständen von Hybridom-Zellkolonien wurden Antikörper sezerniert, die spezifisch mit ZP2-1 Peptid-Antigen reagierten. Von diesen zeigten 4 Zellklone ein für die Kultivierung ausreichendes Wachstum. Die anderen 28 Hybridom-Zellkolonien zeigten nur geringes Wachstum und starben im Laufe der Zeit ab. Von den 4 wachstumsstabilen Zellklonen stellten 2 die Antikörperproduktion ein. Von diesen beiden Zellkolonien wurde einer einmal rekloniert, da die erhaltenen Antikörper aus den Zellüberständen in verschiedenen Testsystemen eher schwache Bindungsreaktionen zeigten. Der andere Zellklon (bezeichnet als 24) wurde zweimal rekloniert. Aus der 1. Reklonierung konnten 6 Antikörper sezernierende Zellklone erhalten werden (bezeichnet als 24/1-24/6). Von diesen wurde einer, bezeichnet als 24/4, ausgewählt und zur zweiten Reklonierung herangezogen. Die 2. Reklonierung ergab 5 Subklone, bezeichnet als 24/4 A-24/4 E.

Der Zellüberstand der 2. Reklonierung 24/4 C wurde für alle aufgeführten Untersuchungen eingesetzt. Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über die erhaltenen Zellklone und ihre Weiterverarbeitung. Der Klon 24/4 C erhielt später aus labortechnischen Gründen die Bezeichnung mAk ZP2-20.

Anzahl der Zellfusionen	Anzahl der Ak-produ-zierenden Klone	davon stabiles Wachstum	davon kontinuier-liche AK-Produktion	davon 2 x rekloniert	Anzahl Subklone 1. Reklonierung	Anzahl Subklone 2. Reklonierung
3	32	4	2	1	6	5

Tab.3:
Übersicht über die Anzahl der erhaltenen Zellklone

3.1.4 Zellfusionen von Milzzellen unbehandelter Mäuse mit ZP2-1 Antigen präsentierenden Support-Zellen (In vitro Zellfusion)

Zur Zellfusion wurden die Milzzellen von unbehandelten Mäusen und Antigen-präsentierende Support-Zellen eingesetzt. Die Support-Zellen wurden mit dem ZP2-1 Peptid-Antigen behandelt, um dieses als Antigen zu präsentieren. Aus zwei durchgeführten Fusionen wurden 10 Hybridom-Zellkolonien erhalten, von denen aber keine anti-ZP2-1 spezifische Antikörper produzierte.

3.2 Antikörpernachweis in Hybridomzellkulturüberständen mittels des Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Zum Nachweis spezifischer monoklonaler Antikörper in Zellkulturüberständen wurde der ELISA angewandt. Die von den heranwachsenden Zelllinien produzierten und in den Zellüberstand sezernierten Antikörper wurden im ELISA mit ZP2-1 Peptid als Antigen (1,5 µg/Vertiefung) geprüft. In der Abbildung 12 werden die Extinktionen der in die Zellkulturüberstände sezernierten Antikörper der Hybridomzelllinien gegenübergestellt. Gezeigt sind der stabil wachsende und Antikörper produzierende Hybridoma-Zellklon 24, der aus der 1. Reklonierung entstandene und erneut reklonierte Zellklon 24/4 so wie die nach 2. Reklonierung entstandenen Subklone 24/4 A – 24/4 C. Der Subklon 24/4 C wurde in den folgenden Untersuchungen eingesetzt.

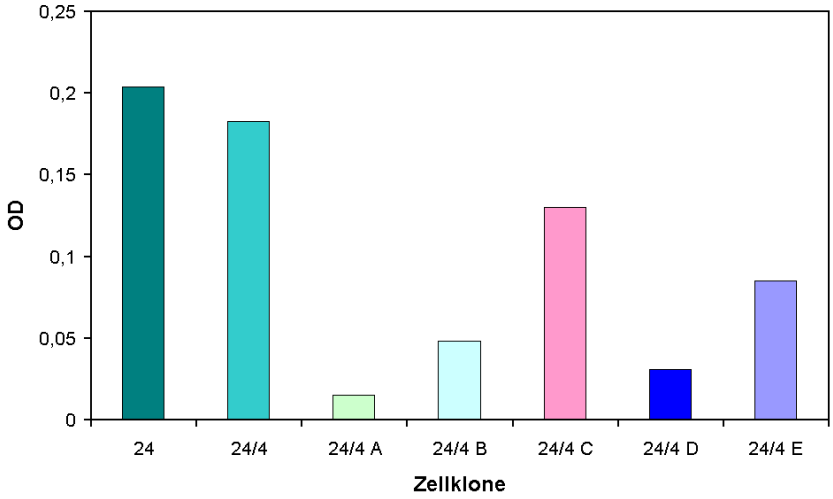

Abb. 12:
Darstellung der Antikörperproduktion der erhaltenen Zellklone mittels ELISA.
1. Balken = Klon, 2. Balken = 1. Reklonierung, 3. – 7. Balken = 2. Reklonierung
Nachweis von spezifischen monoklonalen Antikörpern in Hybridoma-Zellüberständen im ELISA. ZP2-1 Peptid (1,5 µg/Vertiefung) wurde an Kunststoffmodule adsorbiert. Diese wurden mit Zellkulturüberständen verschiedener Hybridomzellkolonien inkubiert. Spezifisch gebundene Antikörper wurden mit Biotin markierten Anti-Maus-IgG (1:2000 verdünnt) und Streptavidin-Peroxidase (1:4000 verdünnt) nachgewiesen. Die Extinktion wurde gemessen bei 492 nm. Der erste Balken (24) zeigt den anti-ZP2-1 Antikörper produzierenden stabil wachsenden Klon 24 an, der 2. Balken (24/4) den weitergeführten Klon 24/4 aus der 1. Reklonierung, die Balken 3 – 7 (24/4 C – 24/4 E) zeigen die erhaltenen Klone der 2. Reklonierung.

3.3 Reinigung und Konzentrierung von monoklonalen Antikörpern über immobilisierte Peptide

Die affinitätschromatographische Isolierung der Antikörper erfolgte mittels Säulenchromatographie über an eine Matrix kovalent gebundenes immobilisiertes ZP2-1 Peptid. Das Säulenvolumen betrug 2 ml, Fraktionen zu jeweils 1 ml wurden gewonnen. Die gereinigten Antikörper wurden anschließend im ELISA auf ihren Antikörper-Gehalt untersucht.

Aus dem Zellüberstand des Zellklons 24/4C konnten keine Antikörper aufgereinigt werden. Das jeweilige Eluat wies im ELISA keine spezifischen Anti-ZP2-1 Antikörper auf.

3.4 Bestimmung der Immunglobulin-Klassen der monoklonalen Antikörper des mAk 24/4 C

Nach der Selektion und Kultivierung der Zellklone, die monoklonale Antikörper gegen ZP2-1 Peptid produzierten, erfolgten Bestimmungen der Immunglobulinklassen der monoklonalen Antikörper. Die Untersuchungen wurden mittels immunbiochemischer Identifizierung durchgeführt. Die Immunglobulin-Klasse der im Zellüberstand enthaltenen monoklonalen Antikörper wurde ermittelt, indem die PVDF-Membranen mit verschiedenen Zweitantikörpern inkubiert wurden, die gegen unterschiedliche Immunglobulin-Klassen gerichtet waren, nämlich Biotin markierten Anti-Maus-IgG (Fab spezifisch), Anti-Maus-IgM (µ-chain spezifisch) und Anti-Maus Gesamtimmunglobulin (polyvalent, erfasst IgG, IgM, IgA und IgD). Die Detektion der Antikörperbindung erfolgte mittels eines Streptavidin-Peroxidase Komplexes. Die Antigen-Antikörperreaktion wurde im Chemilumineszenzverfahren sichtbar gemacht. Die Abbildung 13 zeigt die Antigen-Antikörperreaktion mittels Chemilumineszenz. Die Spuren 1, 3 und 5 zeigen gelelektrophoretisch aufgetrennten Zellüberstand des mAk ZP2-20 (Klon 24/4C). Die Spuren wurden mit Zweitantikörpern inkubiert, die gegen verschiedene Immunglobulin-Klassen gerichtet sind. Neben dem Antikörperhaltigen Zellüberstand wurde jeweils reines Zellkulturmedium (Ultraculture) als Negativkontrolle unter denselben Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt, mit den verschiedenen Zweitantikörpertypen inkubiert und analog zu dem Zellüberstand dem Chemilumineszenzverfahren zugeführt (Spur 2,4 und 6). In Spur 1 und 2 sind die Bindungsreaktionen des Anti-Maus-Gesamtimmunglobulin gezeigt. Es zeigte sich eine deutlich fokussierte Bande bei einem Molekulargewicht von 25 kDa in dem aufgetrennten Hybridoma- Zellüberstand (Abb. 13, Spur 1). Im Zellkulturmedium konnte keine Immunreaktion nachgewiesen werden (Abb. 13, Spur 2). Die Antikörperreaktion mit Anti-Maus-IgG (Fab spezifisch) ist in Spur 3 und 4 aufgezeigt. Auch hier konnte im Zellüberstand eine deutliche, fokussierte Bande bei 25 kDa nachgewiesen werden (Abb. 13, Spur 3). Das Zellkulturmedium wies keine Bindungsreaktion mit dem Anti-Maus-IgG auf (Abb. 13, Spur 4). Spur 5 und 6 zeigen Zellüberstand (Abb. 13 Spur 5) und Zellkulturmedium (Abb. 13, Spur 6) die mit Anti-Maus-IgM (µ-Ketten spezifisch) inkubiert worden waren. In beiden Spuren konnte keine Immunreaktion nachgewiesen werden.

Insgesamt ergaben die Untersuchungen, dass im Zellüberstand 24/4 C mit großer Wahrscheinlichkeit Antikörper der Subklasse IgG (hier: Leichte Kette) nachgewiesen

werden konnten. Unterstützt wurde diese Vermutung durch die Tatsache, dass der in ELISA, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz eingesetzte mit Biotin markierte Anti-Maus IgG zu positiven Bindungsreaktionen mit den monoklonalen Antikörpern führte.

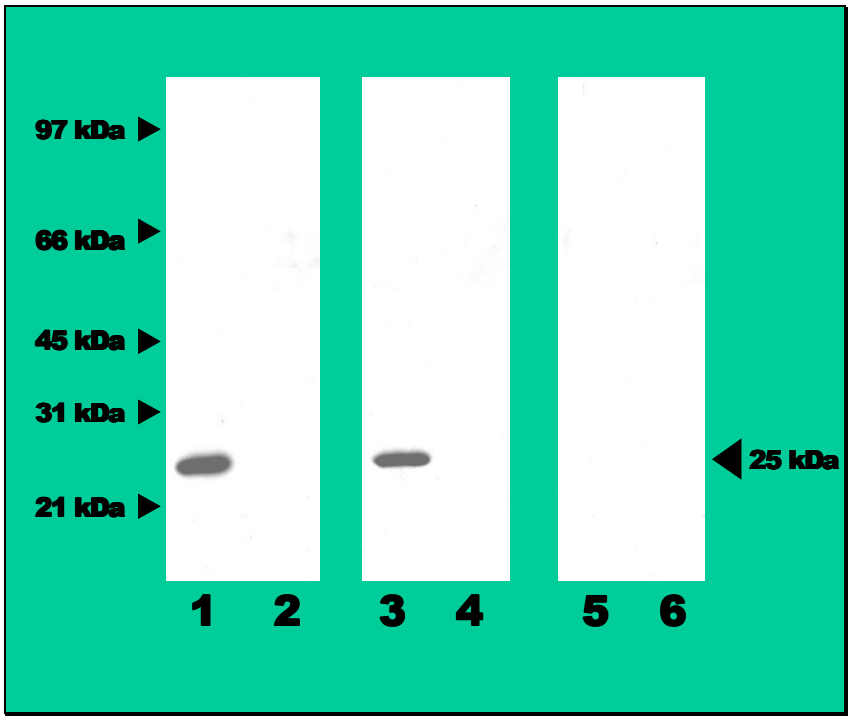

Abb. 13

*Bestimmung der Immunglobulin-Klasse der monoklonalen Antikörper im Immunoblot-Verfahren. Pro Spur wurden jeweils 10µl Zellüberstand eingesetzt. Als Zweitantikörper wurden mit Biotin markierte Anti-Maus-Ig (Spur 1 und 2), Anti-Maus-IgG (Spur 3 und 4) und Anti-Maus-IgM (Spur 5 und 6) jeweils in einer Verdünnung von 1:4000 eingesetzt. Zur Detektion der Antikörperbindung diente Streptavidin-Peroxidase (1:2000 verdünnt). Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mit dem Chemilumineszenzverfahren. Apparente Molekularmassen von Standardproteinen sind links aufgeführt. Spur **1**, **3** und **5** : Zellüberstand des monoklonalen Antikörpers . Spur **2**, **4** und **6**: Ultraculture-Zellkulturmedium.*

3.5 Immunhistochemische Identifizierung von ZP2-Protein in Paraffinschnitten von humanen und bovinen Ovarien durch den Einsatz des monoklonalen Antikörpers mAk ZP2-20 (Klon 24/4 C)

Zur Darstellung der spezifischen Bindung des mAk 24/4 C auf Gewebeschnitten wurden bovine und humane Ovarschnitte in immunhistochemischen Untersuchungen eingesetzt. Dabei wurde als Detektionsreagenz ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat mit Diaminobenzidin als Substrat benutzt. Dieses zeigt als Ausdruck einer positiven Antigen-Antikörperreaktion eine Braunfärbung der entsprechenden Strukturen im Gewebe.

In humanen Ovarschnitten konnte in Eizellen, die sich im Übergang vom Sekundär- zum Tertiärfollikel befanden, eine deutliche, homogene Braunfärbung der Zona pellucida gezeigt werden (Abb. 14 A, ZP, Pfeil). Das Ooplasma war weniger stark angefärbt (Abb. 14 A, OP).

Im Bereich der Kumuluszellen, die der Oozyte direkt anlagen, trat eine sehr dezente Braunfärbung auf (Abb. 14 A, CC). Eizellen, die sich in frühen Stadien (Primordial-, Primärfollikeln) befanden, zeigten eine deutliche, homogene Braunfärbung des Ooplasmas (Abb. 14 C, OC, Pfeile).

In den entsprechenden Negativkontrollen konnte bis auf eine schwach bräunlich-gelbliche Untergrundfärbung im Bereich der Zona pellucida der Eizellen aus Sekundär-Tertiärfollikeln (Abb. 14 B, ZP, Pfeilspitze) keinerlei spezifische Braunfärbung im Ooplasma und den Kumuluszellen festgestellt werden (Abb. 14 B, OP und CC). Eizellen, die sich in frühen Stadien (Primordial-, Primärfollikeln) befanden, wiesen ebenfalls keine Spezifische Anfärbung auf (Abb. 14 D, C, Pfeilspitzen).

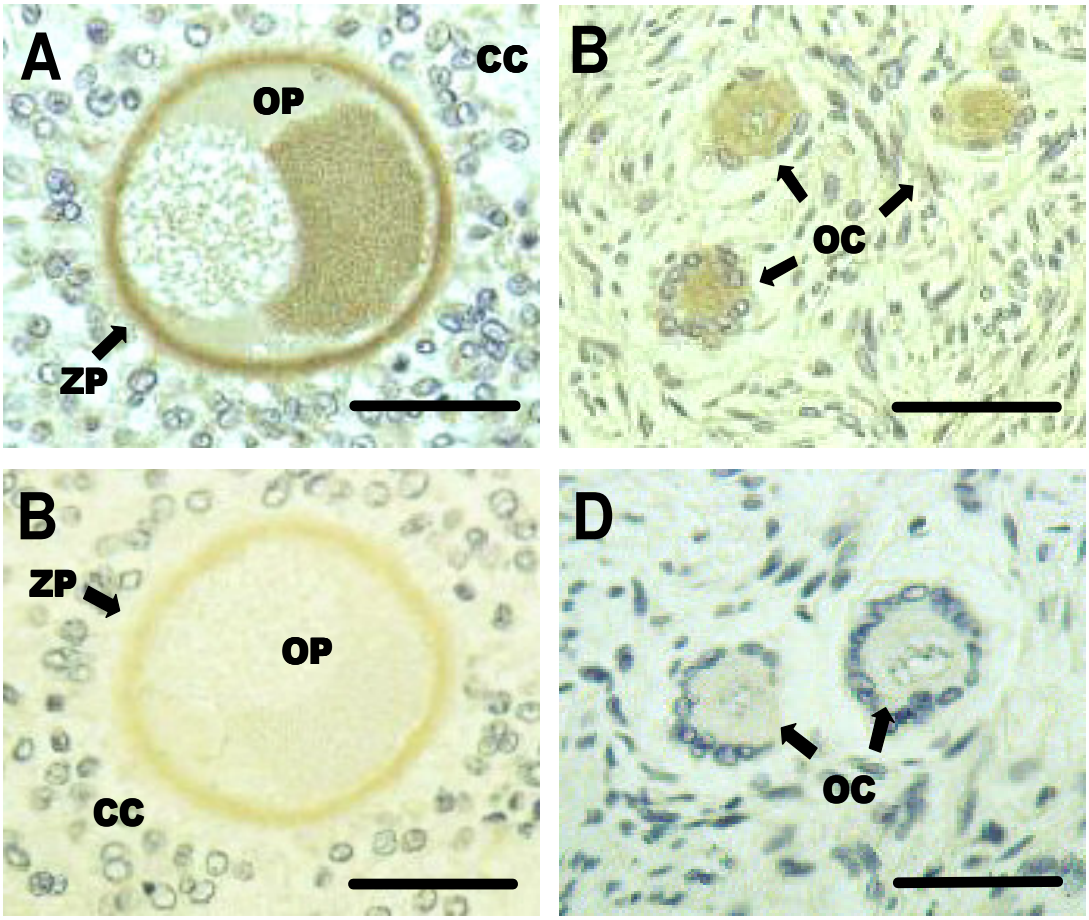

Abb. 14
Nachweis von immunreaktivem ZP2-Protein im humanen Ovar durch monoklonalen Anti-ZP2-Peptid-Antikörper.
***A** und **B** = Oocyte aus Sekundär/Tertiärfollikel, **C** und **D** = Primär-/Primordialfollikel. **A** und **C** wurden mit dem Antikörper mAk 24/4 C (unverdünnter Zellüberstand) inkubiert und **B** und **D** mit unverdünntem Zellüberstand von nicht Antikörper-produzierenden Zellklonen. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte durch die Immun-Peroxidase-Reaktion mit Biotin markierten Anti-Maus-IgG, 1:400 verdünnt, und Streptavidin-Peroxidase-Konjugat, 1:200 verdünnt. **ZP** = Zona pellucida, **OP** = Ooplasma, **CC** = Kumuluszellen. Messbalken 50 µm.*

In bovinen Ovarschnitten zeigte sich eine deutliche, homogene Braunfärbung der Zona pellucida in Eizellen von Sekundär/Tertiärfollikeln (Abb. 15 A, ZP, Pfeil). Das Ooplasma dagegen war schwächer markiert (Abb. 15 A, OP). Die umgebenden Zellen des Kumulus Oophorus zeigten ebenfalls eine sichtbare Anfärbung des Zytoplasmas, die sich zum Teil in Form von Ausläufern, die in den Kumulus Oophorus hineinragten, darstellte (Abb. 15 A, CC). Auch das Ooplasma der Eizellen

in Primordialfollikeln zeigte eine leichte, homogen verteilte Braunfärbung (Abb. 15 C, OC). In der zugehörigen Negativkontrolle konnte keine spezifische Braunfärbung der Zona pellucida (Abb.15 B, ZP, Pfeilspitze) oder des Ooplasmas (Abb. 15 B, OP) der Eizellen aus Sekundär-/Tertiärfollikeln gezeigt werden. Auch die umgebenden Kumuluszellen zeigten keinerlei Anfärbung (Abb. 15 B, CC). Ebenso konnte in Oozyten der Primordial-/Primärfollikel keine Antigen-Antikörperreaktion nachgewiesen werden (Abb. 15 D, OC).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass eine deutliche spezifische Antigen-Antikörperreaktion auf den Ovarschnitten nach Einsatz des mAk 24/4 C nachgewiesen werden konnte. Diese wurde in den Zonae pellucidae von Eizellen aus Sekundär-/Tertiärfolliken in humanen und bovinen Ovarschnitten nachgewiesen. Das Ooplasma und die umgebenden Kumuluszellen wiesen eine dezente Anfärbung in humanen und etwas stärker in bovinen Ovarschnitten auf. Ebenso konnte eine spezifische Antikörperbindung des mAk 24/4 C in Ooplasmen von Primordial-/Primärfollikeln sowohl in humanen als auch in bovinen Ovarschnitten dargestellt werden.

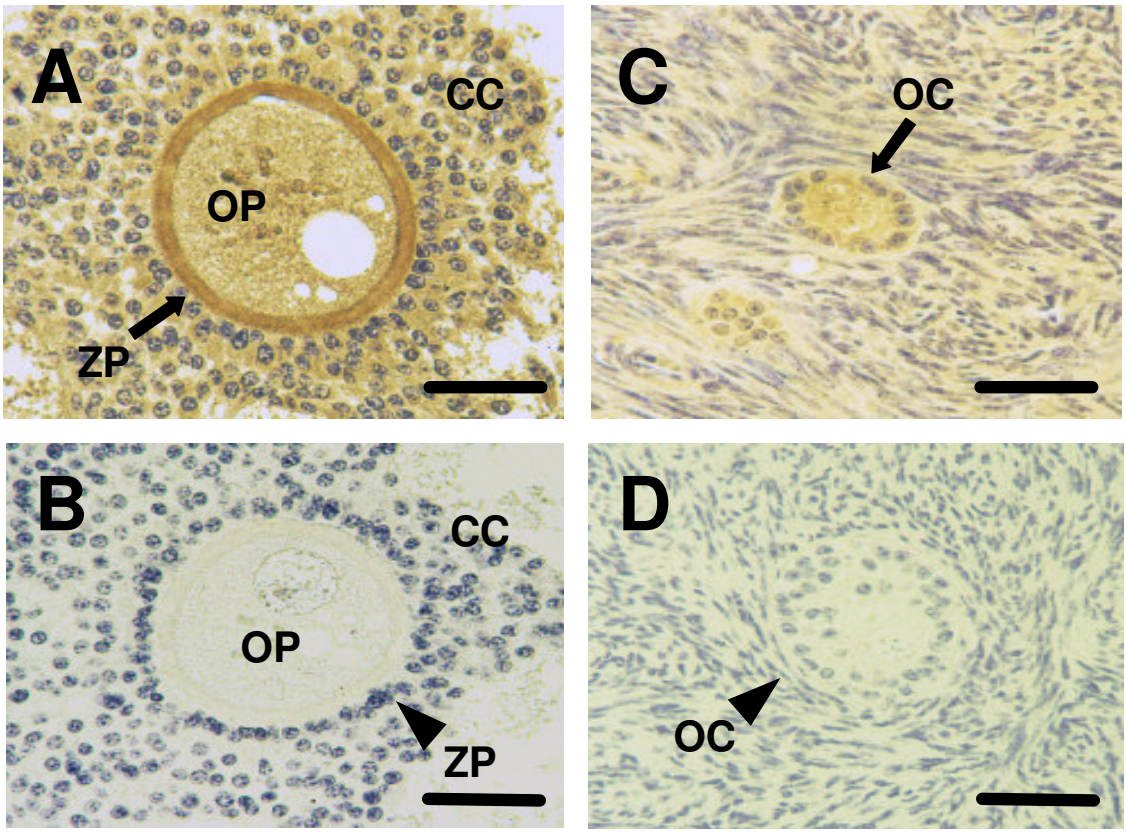

Abb. 15
Nachweis von immunreaktivem ZP2-Protein im Ovar vom Rind durch monoklonalen Anti-ZP2-Peptid-Antikörper.
***A** = Oozyte aus Sekundär/Tertiärfollikel, **C** = Oozyte aus Primärfollikel. **A** + **C** = mit monoklonalem Antikörper mAk 24/4 C (unverdünnt) Zellüberstand inkubiert; **B** = Oozyte aus Sekundär-/Tertiärfollikel, **D** = Oozyte aus Primärfollikel, **B** + **D** = mit Zellüberstand von nicht Antikörper-produzierenden Zellklonen (unverdünnt) inkubiert. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte durch die Immun-Peroxidase-Reaktion mit Biotin markiertem Zweitantikörper (1:400 verdünnt) und Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (1:200 verdünnt). **ZP** = Zona pellucida, **OP** = Ooplasma, **CC** = Kumuluszellen, **OC** = Oozyten. Meßbalken= 50 µm.*

3.6 Immunfluoreszenzuntersuchungen mit mAk 24/4 C

Aufschluss über die Antigen-Antikörperreaktion zwischen mAk 24/4 C und seinem Antigen im nativen Zustand sollten indirekte Immunfluoreszenzuntersuchungen an bovinen, humanen und Maus- Eizellen geben. Spezifische Antikörperbindungen stellten sich unter dem Mikroskop (Axioskop MC 80, Zeiss) als grüne Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 495 nm dar. Sowohl humane (Abb. 16 A, ZP, Pfeil) als auch bovine Eizellen (Abb. 16 C, ZP, Pfeil), die mit den monoklonalen Antikörpern inkubiert wurden, zeigten eine intensive grüngelbe Fluoreszenz der Zona pellucida. Das Ooplasma von humanen Oozyten stellte sich als eine starke, zum Teil

ungleichmäßig verteilte Fluoreszenz dar (Abb. 16 A). Bei bovinen Oozyten war hingegen eine gleichmäßig verteilte, kompakt wirkende Fluoreszenz des Ooplasmas sichtbar (Abb. 16 C). Maus-Eizellen wiesen ein schwächere aber noch gut erkennbare grüne Fluoreszenz der Zona pellucida auf (Abb. 16 E, ZP, Pfeil). Als noch etwas ausgeprägter fluoreszierend zeigte sich das Ooplasma von Maus-Oozyten (Abb. 16 E). In mit Zellkulturmedium inkubierten Eizellen konnte weder in humanen (Abb. 16 B, ZP, Pfeil) noch in bovinen (Abb.16 D, ZP, Pfeil) Eizellen eine Fluoreszenz der Zona pellucida nachgewiesen werden. Ebensowenig zeigte sich in Maus-Eizellen in der Kontrolle eine Immunreaktivität (Abb. 16 F, ZP, Pfeil). Das Ooplasma von humanen Eizellen stellte sich als gelblich-orange fluoreszierend dar (Abb. 16 C). Keine Fluoreszenz war im Ooplasma von bovinen Oozyten (Abb. 16 D) und Maus-Eizellen (Abb. 16 F) nach Einsatz von Zellkulturmedium nachweisbar.

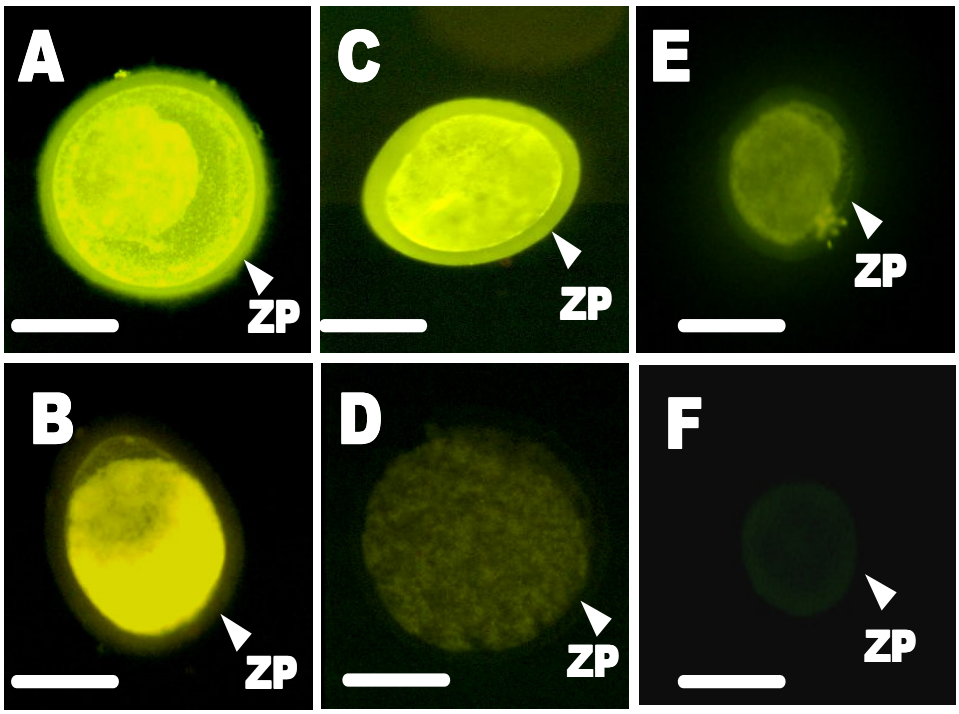

Abb.16
Immunfluoreszenzoptischer Nachweis von Bindungsstellen monoklonaler Antikörper an humanen, bovinen und Maus-Eizellen. Die Eizellen wurden in unverdünntem Zellüberstand 24/4 C bzw. mit Zellkulturmedium als Negativkontrolle inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mit Biotin markierten Anti-Maus IgG (1:400 verdünnt) und Avidin-FITC 30 µg/ml) fluoreszenzoptisch sichtbar gemacht. ***A*** *und* ***B****: Humane Eizellen;* ***C*** *und* ***D*** *= Bovine Eizellen;* ***E*** *und* ***F*** *= Maus-Eizellen.* ***A*** *,* ***C*** *und* ***E*** *= mit monoklonalem Antikörper mAk 24/4 C inkubierte Eizellen;* ***B, D*** *und* ***F*** *= mit Zellkulturmedium inkubierte Eizellen.* ***ZP*** *= Zona pellucida. Pfeil zeigt auf Zona pellucida. Meßbalken = 50 µm.*

3.7 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper im Immunoblot

3.7.1 Elektrophoretische Proteinauftrennung der Zona pellucida Proteine von humanen und bovinen Eizellen

Die Proteinbestandteile von humanen und bovinen Eizellen wurden unter reduzierenden Bedingungen mit einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mittels des Western-Blot-Verfahrens auf PVDF-Membranen elektrotransferiert.

3.7.2 Immunbiochemische Identifizierung der Zona pellucida-Proteine

Die Darstellung der Antigen-Antikörperreaktion erfolgte über ein Chemilumineszenz – Verfahren (Abbildung 17).

Nach Auftragen des Proteingemisches boviner Eizellen und deren Elektrotransfers konnten nach Einsatz von mAk ZP2-20 (Klon 24/4 C) spezifische Antigen-Antikörper Reaktionen nachgewiesen werden. Es konnte eine deutliche, relativ schmale Bande bei einer apparenten Molekularmasse von 65 kDa identifiziert werden (Abb. 17, Spur 1). Zwei weitere, deutlich schwächere und etwas weniger stark fokussierte Banden befanden sich bei einer apparenten Molekularmasse von etwa 31 und 107 kDa (Abb. 17, Spur 1). Nach Einsatz von reinem Zellkulturmedium als Negativkontrolle konnte keine Antigen-Antikörper Reaktion nachgewiesen werden (Abb. 17, Spur 2).

Ein Proteingemisch humaner Eizellen wurde ebenfalls eingesetzt. Durch mAk 24/4 C konnte auch hier der Nachweis einer spezifischen Antigen-Antikörper Reaktion erbracht werden. Eine gut fokussierte und eindeutig identifizierbare Bande konnte bei einer apparenten Molekularmasse von etwa 64 kDa sichtbar gemacht werden (Abb. 17, Spur 3). Nach Verwendung des reinen Zellkulturmediums als Negativkontrolle konnte keine Immunreaktion beobachtet werden (Abb. 17, Spur 4).

Unter Verwendung des mAk 24/4 C-Antikörpers konnte sowohl in humanen, als auch in bovinen Eizellextrakten eine immunreaktive Proteinbande mit einer apparenten Molekularmasse von ca. 64 und 65 kDa nachgewiesen werden. Dies entspricht den in der Literatur angegebenen Daten für humanes bzw. bovines ZP2-Protein.

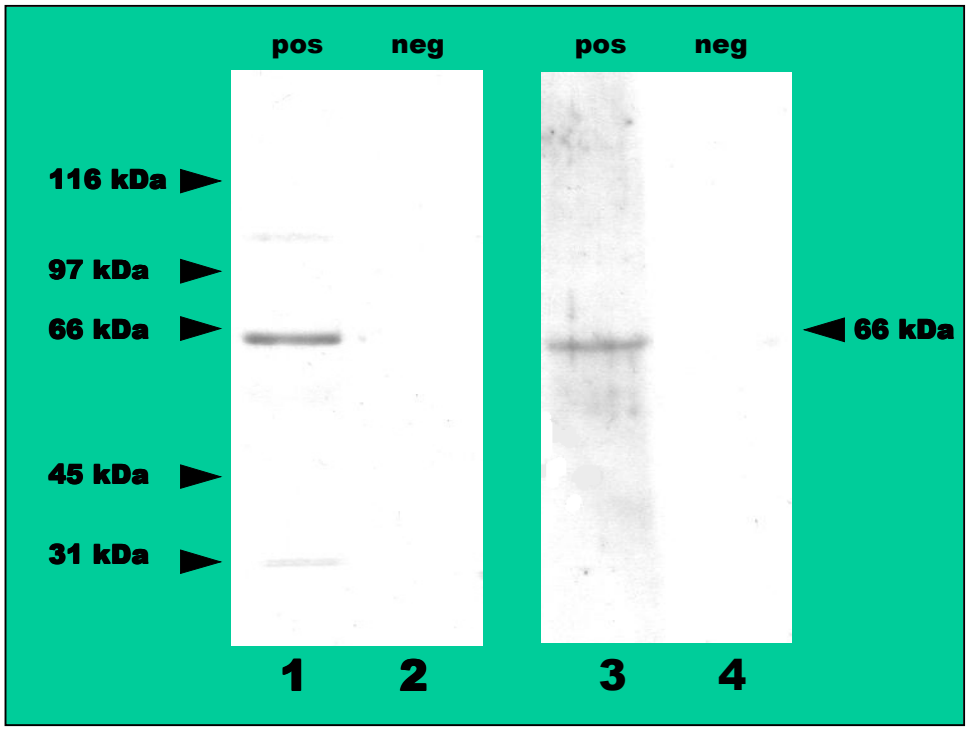

Abb.17
Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers ZP2-20 (Klon 24/4 C) gegen synthetisches ZP2-1 Peptid im Immuno-Blot-Verfahren mit humanen und bovinen Eizellproteinen. Pro Spur wurden jeweils 10 in Probenpuffer solubilisierte humane bzw. bovine Oozyten unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt, auf PVDF-Membranen elektrotransferiert und mit dem monoklonalen Anti-ZP2-Peptid-Antikörper bzw. mit Zellkulturmedium als Negativkontrolle inkubiert: ***1:*** *Bovine Eizellproteine mit monoklonalem Antikörper inkubiert;* ***2:*** *Bovine Eizellproteine mit Zellkulturmedium als Negativkontrolle;* ***3:*** *Humane Eizellproteine mit monoklonalem Antikörper inkubiert;* ***4:*** *Humane Eizellproteine mit Zellkulturmedium als Negativkontrolle. Als Zweit-Antikörper-System wurden Biotin markierte Anti-Maus-IgG (1:4000 verdünnt) und Streptavidin-Peroxidase(1:2000 verdünnt) eingesetzt. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mit dem Chemilumineszenzverfahren. Apparente Molekularmassen von Standardproteinen sind links aufgeführt.*

3.8 Funktionelle Spermatozoenbindungsstudien mit dem Kompetitions-Hemizona-Assay (KHZA) im bovinen Modell

Um zu klären, ob die Bindung von Anti-ZP2-Antikörpern an die Zona pellucida die Spermatozoen-Zona pellucida Interaktion beeinflusst, wurde der Kompetitions-Hemizona-Assay eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengefasst dargestellt. Das Epitop des Proteins ZP2/A, gegen das der mAk 24/4 C gerichtet ist, sollte damit hinsichtlich seiner funktionellen Bedeutung bei der Spermatozoenbindung näher charakterisiert werden. Aus ethischen und

labortechnischen Gründen wurden nur HZs und Spermatozoen von Rindern eingesetzt und auf den Einsatz humanen Zellmaterials verzichtet.

Nach Inkubation der bovinen Test-Hemizonae mit mAk ZP2-20 (Klon 24/4C, unverdünnter Zellkulturüberstand) wurden nach Abschluss des Kompetitions-Hemizona-Assays durchschnittlich 59 gebundene Spermatozoen pro Zona pellucida-Hälfte gezählt. Auf den Kontrollhälften, die mit dem antikörperfreien Zellkulturmedium behandelt wurden, fanden sich im Durchschnitt 85 fest gebundene Spermatozoen. Der mittlere Hemizona-Index aller untersuchten Zonae pellucidae lag bei 67. Die Analyse des mittleren Hemizona-Indexes zum Bezugswert 100 wurde durchgeführt mittels einem zweiseitigen t-Test. Der Bezugswert 100 stellt den Wert des Hemizona-Indexes dar, der erreicht würde, wenn an Test- und Kontroll-Hemizonae gleich viele Spermatozoen gebunden hätten. Der zweiseitige t-Test ergab einen P-Wert von 0,004. Dieser stellt einen statistisch hochsignifikanten Wert dar. Aufgrund dieser statistischen Auswertung wurde die Nullhypothese somit abgelehnt und davon ausgegangen, dass die Inkubation der Zona pellucida-Hälften mit mAk ZP2-20 (Klon 24/4 C) anti-ZP2-Antikörpern die Spermatozoenbindung an die Test-Hemizonae im Vergleich zur Bindung an die Kontroll-Hemizonae herabsetzt.

Zusammenfassend konnte in funktionellen Spermatozoenbindungsstudien mit dem KHZA ein hemmender Einfluss von mAk ZP2-20 (Klon 24/4 C) Antikörpern auf die Bindung der Spermatozoen an die Zona pellucida nachgewiesen werden.

Antikörper	Anzahl der gebundenen Spermatozoen an die Test-HZ	Anzahl der gebundenen Spermatozoen an die Kontroll-HZ	Durchschnitt der HZI	$P\text{-Wert}_{HZI}$*	n
MAk 24/4C	$58,6 \pm 21,0^{\#}$	$84,9 \pm 22,9^{\#}$	$67,3 \pm 13,3^{\#}$	0,004	14

Tab.4
Boviner Kompetitions-Hemizona-Assay mit mAk 24/4 C Antikörpern
** errechnet mit einem zweiseitigen t-Test für unverbundene Stichproben;*
 # Mittelwert ± Standardabweichung; HZ=Hemizonae; HZI=Hemizona-Indices;
n=Anzahl der im Kompetitions-Hemizona-Assay eingesetzten Zonae pellucidae

3.9 Immunisierung weiblicher C213 - F1 Mäuse mit ZP2 Peptid

3.9.1 Konzeptionserfolg

Zur Untersuchung der Auswirkung einer Immunisierung mit synthetischem ZP2-Peptid wurden insgesamt 26 weibliche 6 Wochen alte C213 - F1 Mäuse herangezogen. Die Tiere wurden in 2 Gruppen aufgeteilt mit je 13 Testtieren und 13 Kontrolltieren und wie in Materialien und Methoden beschrieben immunisiert. Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die weiblichen Tiere mit männlichen C210 Tieren verpaart. Nach 14 Tagen wurden die Tiere getötet, die Ovarien und Uterie entnommen und die Anzahl der entwickelten Föten ausgezählt. In der Gruppe der Testtiere konnte bei 6 Tieren keine Konzeption festgestellt werden, bei 2 Tieren betrug die Anzahl der Föten 2 bzw.1, bei einem Tier waren die Föten in ihrer zeitlichen Entwicklung retardiert. Die restlichen Test-Mäuse wiesen eine Anzahl von 8 oder mehr Föten auf. In der Kontrollgruppe konnte bei 2 Tieren keine Konzeption festgestellt werden. Bei allen anderen Kontrollmäusen waren mindestens 8 oder mehr Föten zu beobachten.

	Testtiere	**Kontrolltiere**
Anzahl der Mäuse	**13**	**13**
Keine Föten	**6**	**4**
1-2 Föten	**2**	**0**
Anzahl Retardierter Föten	**1**	**0**
Mehr als 8 Föten	**5**	**9**

Tab. 5
Konzeptionserfolg nach in vivo Fertilisierung von Mäusen mit und ohne Immunisierung von ZP2-1 Peptid.
ZP2-1 = ZP2-1 Peptid und KLH immunisierte Mäuse ; control = KLH immunisierte Mäuse als Negativkontrolle.

3.9.2 Histologische Untersuchung der Ovarien nach Immunisierung

Die mikroskopische Untersuchung der von den immunisierten Tieren entnommenen und histologisch aufgearbeiteten Ovarien ergab keine Hinweise auf morphologische Alterationen in der Testgruppe. Alle Ovarien, sowohl die der Test- als auch die der Kontrolltiere zeigten eine normale, altersgerechte Morphologie. Zeichen von Inflammation oder Destruktion waren nicht zu erkennen (Abb. 18). Die Sekundär-/Tertiärfollikel von mit ZP2-1 immunisierten Mäusen zeigten eine regelrechte Gewebestruktur, exemplarisch dargestellt in Abb. 18, A. Auch in Primordial-/Primärfollikeln konnten keine pathologischen Veränderungen nachgewiesen werden (Abb. 18, B). In den Ovarschnitten von mit KLH immunisierten Mäusen waren weder in Sekundär-/Tertiärfollikeln (Abb. 18, C) noch in Primordial-/Primärfollikeln (Abb. 18, D) pathologische Veränderungen der Morphologie festzustellen.
Zusammenfassend ergaben die Untersuchungen an mit ZP2-Peptid immunisierten weiblichen Mäusen eine tendenzielle Einschränkung der Konzeptionsrate ZP2-1 behandelter Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe. Hierbei resultierte aus der Immunisierung weder bei ZP2-1 immunisierten Mäusen noch bei KLH immunisierten Mäusen eine pathologische Veränderung der Ovarmorphologie.

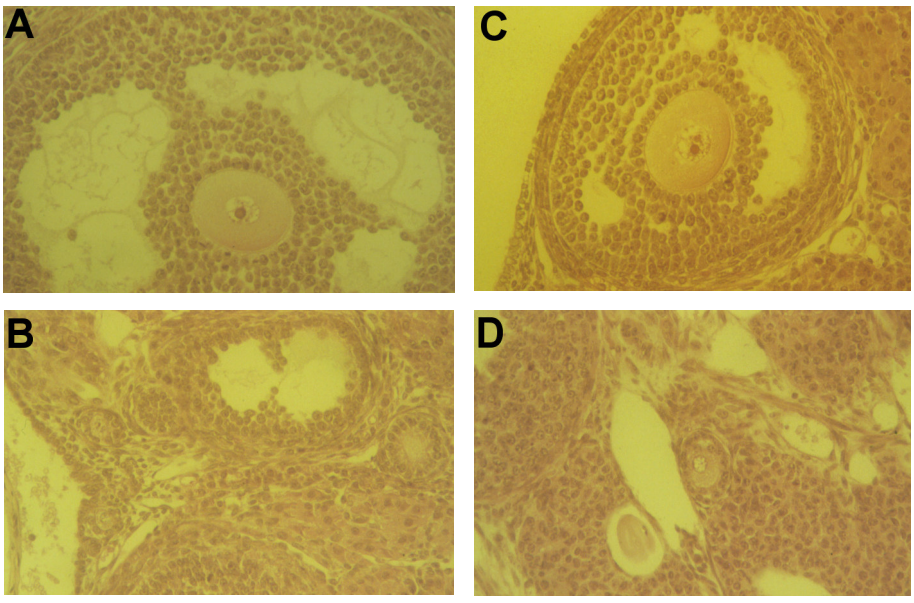

Abb. 18
Exemplarische Darstellung der histologischen Untersuchung von Ovarien mit ZP2-1 Peptid immunisierten und Kontrollmäusen. ***A*** *+* ***C*** *= Sekundär-/Tertiärfollikel;* ***B*** *+* ***D*** *= Primordial-/Primärfollikel.* ***A*** *+* ***B*** *= Ovarschnitte eines mit ZP2-1 immunisierten Tieres.* ***C*** *+* ***D*** *= Ovarschnitte einer mit KLH behandelten Maus als Negativkontrolle. Die Ovarschnitte wurden mit einer Hämalaun-Eosin Färbung angefärbt.*

3.10 Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen an Ovarien von Marmoset-Monkey und Maus bzw. an humanen und bovinen Eizellen mit dem monoklonalen Antikörper mAk 24/4 C

Marmoset-Monkey Ovarien und Maus-Ovarien von geschlechtsreifen Tieren, bzw. humane Oozyten und bovine Oozyten wurden für eine immunelektronenmikroskopische Untersuchung präpariert. Diese aus den Präparaten hergestellte Ultradünnschnitte wurden einer Immunreaktion mit dem monoklonalen Antikörper mAk 24/4 C unterzogen. Dabei wurden Anti-Maus-IgG Biotin-Konjugate als Zweitantikörper und Streptavidin mit 20 nm Goldpartikeln als Konjugat zur Detektion eingesetzt. In der anschließenden Untersuchung in einem Zeiss LEO 906 Transmissionselektronenmikroskop wurde die Goldpartikel-Verteilung als Ausdruck der Immunreaktion beurteilt. Auf Ultradünnschnitten aus Maus-Ovar, humanen Eizellen und bovinen Eizellen konnte keine spezifische Antigen Antikörperreaktion nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Der Nachweis einer spezifischen Bindung der monoklonalen Antikörper gelang lediglich in Ultradünnschnitten die aus Marmoset-Monkey Ovarien gewonnen wurden (Abb. 19). Bei Einsatz des monoklonalen Antikörpers mAk 24/4 C auf Marmoset-Monkey Ovarschnitten konnte eine Antikörper-Antigenreaktion in Form einer dichten, homogen wirkenden Anlagerung von Goldpartikeln auf der gesamten Zona pellucida Breite nachgewiesen werden (Abb. 19, A, ZP). Das Ooplasma zeigte eine deutlich geringere Dichte an Goldpartikeln. Diese lagen verstreut und konnten keiner bestimmten Struktur zugeordnet werden (Abb. 20, A, OP). Eine deutlich höhere Dichte an Goldpartikeln als das Ooplasma zeigten die unmittelbar an der Zona pellucida anliegenden Kumuluszellen (Abb. 20, A, CC). Die Partikeldichte der Kumuluszellen nahm nach peripher ab. Bei Einsatz von Ultraculture-Zellkulturmedium als Negativkontrolle konnte keine Immunreaktion nachgewiesen werden. Die Zona pellucida (Abb. 19, B, ZP) wie auch das Ooplasma (Abb. 20, B, OP) und die Kumuluszellen (Abb. 20, B, CC) erwiesen sich als frei von Goldpartikeln.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in immunelektronenoptischen Studien eine Bindung des monoklonalen Antikörpers mAk 24/4 C an die Zona pellucida und in geringerem Maße am Ooplasma und den umgebenden Kumuluszell-Strukturen im Marmoset-Monkey Ovar gezeigt werden konnte. Keine Antigen Antikörperreaktion wurde im Maus-Ovar sowie in humanen und bovinen Oozyten

beobachtet. Hierbei ist zu bedenken, dass die Aufbereitung von Geweben für immunelektronenmikroskopische Untersuchungen einen Kompromiss zwischen Strukturerhaltung und Antigenerhaltung darstellt. Die Nachweisbarkeit eines Antigens kann allerdings durch die Aufbereitung des Gewebes verlorengehen.

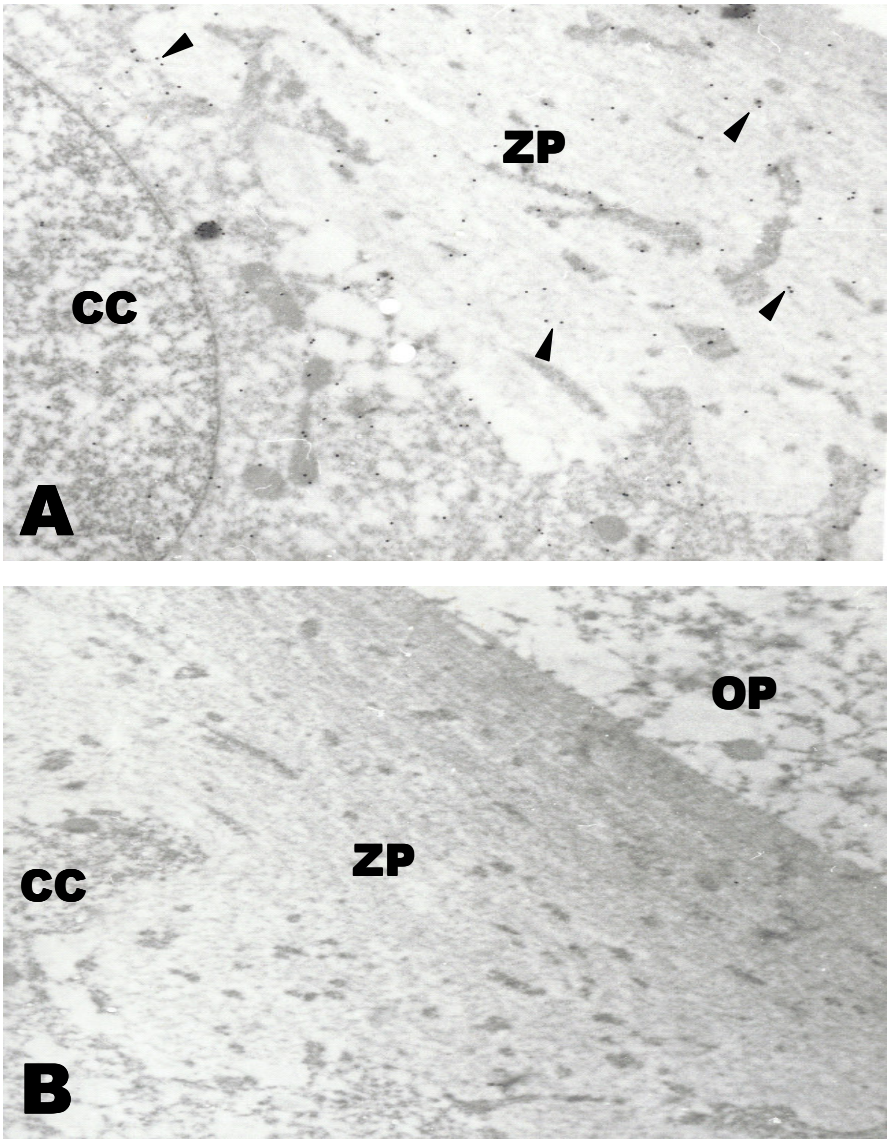

Abb.19
*Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen mit Marmoset-Monkey Ovarialgewebe und dem monoklonalen Anti-ZP2-Antikörper mAk 24/4 C. Ultradünnschnitte aus Marmoset-Monkey Ovar wurden mit dem unverdünntem antikörperhaltigen Zellüberstand = **A** bzw. mit Zellkulturmedium als Negativkontrolle = **B** inkubiert. Als Zweitantikörper wurde Biotin markiertes Anti-Maus-IgG in einer Verdünnung von 1:40 und goldmarkiertes (20 nm) Streptavidin in einer Verdünnung von 1:40 eingesetzt. **ZP** = Zona pellucida ; **OP** = Ooplasma ; **CC** = Kumuluszellen ; Pfeilköpfe = Goldpartikel; 40.000 fache Vergrößerung.*

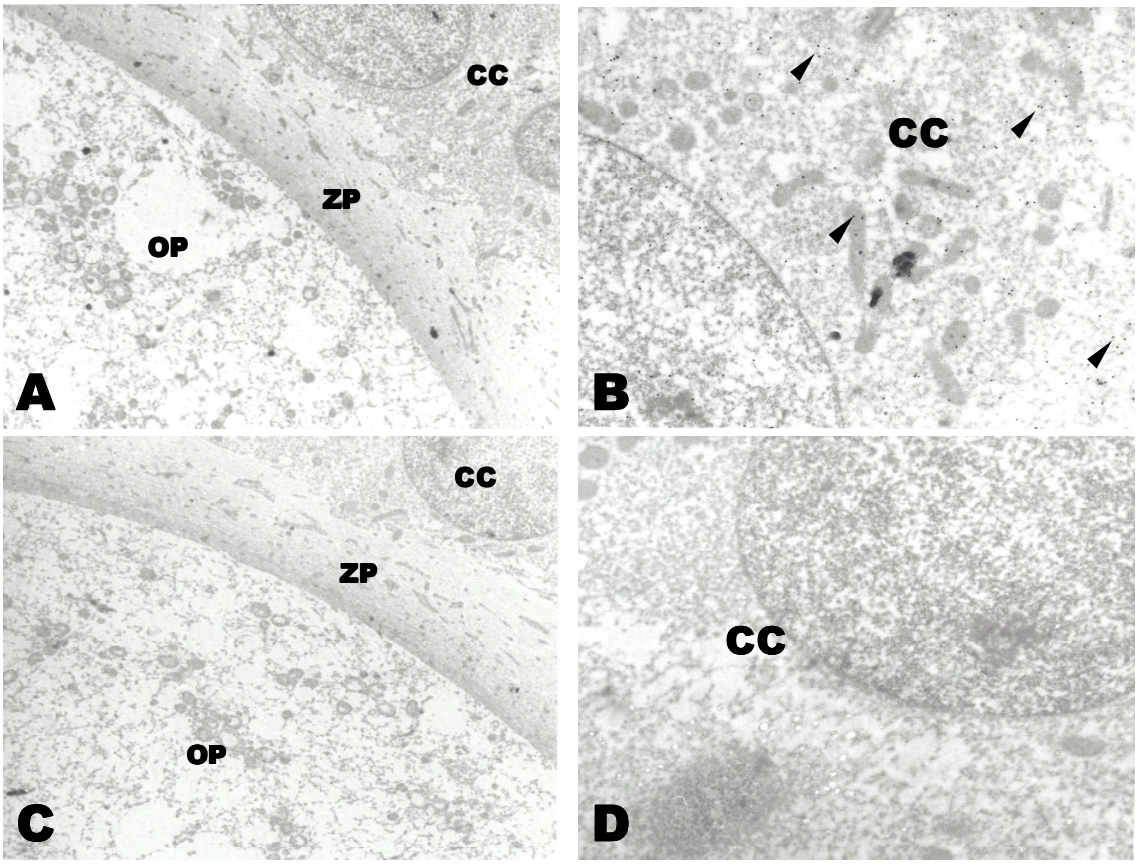

Abb.20
*Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen mit Marmoset-Monkey Ovarialgewebe und dem monoklonalen Anti-ZP2-Antikörper mAk 24/4 C. Ultradünnschnitte aus Marmoset-Monkey Ovar wurden mit dem unverdünntem antikörperhaltigen Zellüberstand = **A** + **B** bzw. mit Zellkulturmedium als Negativkontrolle = **C** + **D** inkubiert. Als Zweitantikörper wurden Biotin-markierte Anti-Maus-IgG in einer Verdünnung von 1:40 und goldmarkiertes (20 nm) Streptavidin in einer Verdünnung von 1:40 eingesetzt. **A** + **C** = 4000 fache Vergrößerung. **B** und **D** = Ausschnitt aus Kumuluszelle, 40.000 fache Vergrößerung ; **ZP** = Zona pellucida ; **OP** = Ooplasma; **CC** = Kumuluszellen ; Pfeilköpfe = Goldpartikel*

3.11 Darstellung der Expression Zona pellucida 2-Protein kodierender Gene

Nach Isolierung der mRNA aus Ei- und Follikelzellen bzw. Ovargewebe von B6D2F1-Mäusen wurde die Reverse-Transkriptase-Reaktion zur Herstellung der komplementären cDNA durchgeführt. Die gewonnene cDNA diente als Template der folgenden PCR. Durch Einsatz eines Spezies spezifischen Primers (Tab.2) wurden ausgesuchte cDNA-Fragmente amplifiziert und im Agarosegel dargestellt. Die vervielfältigten cDNA-Sequenzsabschnitte stellten sich im Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel unter UV-Licht als sichtbare Bande dar. Zur ersten Abschätzung, ob es sich bei den PCR-Banden um das gesuchte cDNA-Teilstück handelte, diente die

Bestimmung der Fragmentgröße mit Hilfe eines 100-Basenpaarmarkers, der ebenfalls im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt war. Die Identifizierung der PCR-Produkte erfolgte mittels Sequenzierung (Firma MWG Biotech). Das Vorhandensein der gesuchten cDNA-Sequenzabschnitte zeigte eine aktive Expression des entsprechenden Zona pellucida-Protein kodierenden Genes.

3.11.1 RT-PCR zur Darstellung der mRNA-Expression der Zona pellucida in Ovar, Oozyten und Kumulus-Zellen der Maus

Insgesamt wurden aus je 15 Oozyten, Gewebehomogenat von 1 Ovar und isolierten Kumulus-/Granulosazellgemischen die mRNA isoliert. Davon ausgehend wurde nach Herstellung des komplementären cDNA-Stranges die Polymerase-kettenreaktion durchgeführt und ein cDNA-Fragment amplifiziert.

Mit Hilfe der originalen Nukleotidsequenz und der Position des spezifischen Primers konnte die Größe des zu amplifizierenden Fragmentes berechnet werden. Erwartet wurde für das ZP2-Amplifikationsprodukt eine Größe von 360 bp.

Im Agarosegel zeigte sich nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte, dass alle erhaltenen Amplifikationsprodukte im errechneten Größenbereich von 360 bp lagen. 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. 21 dargestellt.

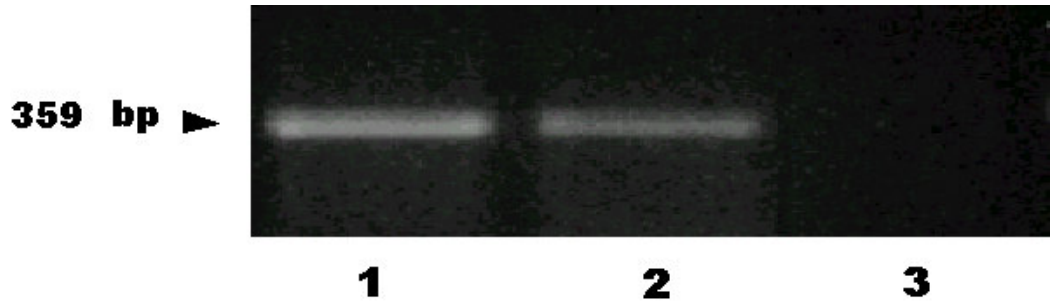

Abb. 21: Resultate der RT-PCR im Agarosegel
Im linken Bildrand ist die Größenmarkierung von 359 bp gezeigt. In Spur 1 ist das ZP2-Amplifikat aus isolierten Eizellen dargestellt. Spur 2 zeigt das ZP2-Amplifikat aus Ovargewebe und in Spur 3 ist das Amplifikat aus Kumulus-/Granulosazellkomplexen aufgetragen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass zusätzlich zum Proteinnachweis des Zona pellucida-Proteins 2 auch mRNA nachgewiesen werden konnte, und zwar sowohl in Oozyten als auch in Ovar-Gewebshomogenat, nicht jedoch in Kumuluszell-/Granulosazellgemischen.

3.11.2 Sequenzierung der PCR-Fragmente

Zur Überprüfung, ob es sich bei den dargestellten PCR-Fragmenten tatsächlich um Teilbereiche der Nukleotidsequenz des Zona pellucida 2-Protein kodierenden Genes 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 tatsächlich um Teilbereiche der DNA-Sequenz des Zona pellucida 2 Glykoproteins der Maus handelte.

Beide Stränge der cDNA-Sequenz des PCR-Produktes mit einer Größe von ca. 360 bp wurden in ihrer Nukleotidabfolge gezeigt. Der Vergleich des in Abb. 22 gezeigten Plus-Stranges, der durch Kettenverlängerung des 5´-MZP2-Primer gebildet wurde, mit der Originalsequenz der Datenbank ergab hierbei eine Übereinstimmung der Nukleotidabfolge von 99%. Im Verlauf der Strangsynthese war es zum Einbau eines differierenden Nukleotides gekommen, so dass ein Mismatch vorlag.

Die Sequenzierung des Plus-Stranges ergab eine Stranglänge von 300 bp. Das Mismatch lag an Position 34 des Plus-Stranges, die der Position 1680 der Originalsequenz entspricht (Abb. 22). Dieses Ergebnis kann als Nachweis gewertet werden, dass das Zona pellucida 2 Protein aktiv in der Eizelle bzw. in Eizell-haltigen Gewebshomogenaten synthetisiert wird, nicht jedoch in Kumulus-/Granulosa-zellgemischen.

Abb. 22: Sequenzvergleich des Plus-Stranges mit der Originalsequenz

```
A: 1    ggcaacttcttctgaggacccggcctctgcgcc**c**cagtggcagattgtcatggatggctg 60
        ||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||
B: 1647 ggcaacttcttctgaggacccggcctctgcgcc**t**cagtggcagattgtcatggatggctg 1706


A: 61   tgaatatgaactggacaactaccgcactactttccacccagctggctcctctgcagccca 120
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B: 1707 tgaatatgaactggacaactaccgcactactttccacccagctggctcctctgcagccca 1766


A: 121  ttccggtcactaccagaggtttgatgtgaagacttttgcctttgtatcagaggcacgggg 180
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B: 1767 ttccggtcactaccagaggtttgatgtgaagacttttgcctttgtatcagaggcacgggg 1826


A: 181  gctctccagcctgatctacttccactgcagtgccttgatctgtaaccaagtctctcttga 240
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B: 1827 gctctccagcctgatctacttccactgcagtgccttgatctgtaaccaagtctctcttga 1886


A: 241  ctcccctctgtgctctgtgacttgccctgcatcactgaggagcaaacgagaggccaacaa 300
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B: 1887 ctcccctctgtgctctgtgacttgccctgcatcactgaggagcaaacgagaggccaacaa 1946
```

A: Sequenzierte Nukleotidabfolge des kodierenden Stranges

B: Nukleotidsequenz der Datenbank

Missmatch hervorgehoben durch Fettdruck

4 Diskussion

Das ZP2 Protein spielt bei der Befruchtung der Eizelle eine wesentliche Rolle. Zumindest im Maus Modell konnte gezeigt werden, dass ZP2 für die sekundäre, feste Bindung des Spermatozoons an die Zona pellucida verantwortlich ist (Bleil und Wassarman, 1986; Bleil et al., 1988, Howes und Jones, 2001). Ziele der Dissertation waren 1. die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung einer definierten Domäne des ZP2 Proteins, 2. die Überprüfung, in wie weit das die ZP2 Domäne repräsentierende synthetische ZP2 Peptid zu kontrazeptiven Zwecken eingesetzt werden kann, 3. die Lokalisation von ZP2 Protein und ZP2 mRNA mit Hilfe von Antikörpern gegen das ZP2 Peptid und der PCR. Für die funktionellen Studien zur Bedeutung des ZP2-Epitops wurde ein immunologischer Ansatz gewählt.

Es wurden monoklonale Antikörper gegen ein synthetisches ZP2 Peptid hergestellt. Der Einsatz synthetischer Peptide als Antigen hat gegenüber biochemisch gereinigten Zona pellucida Proteinen folgende Vorteile: 1. Synthetische Peptide können mit einem sehr hohen Reinigungsgrad und im Vergleich zu der aufwendigen biochemischen Anreicherung von nur geringen Mengen von Zona pellucida Proteinen, mit wesentlich geringerem Arbeitsaufwand bei gleich bleibender Qualität hergestellt werden. 2. Mit Antikörpern gegen ein ZP2 Epitop, das hochkonserviert und somit in vielen Spezies identisch ist, kann ZP2 Protein auch in Ovarien von Tieren nachgewiesen werden, deren ZP2 cDNA Sequenz noch nicht bekannt ist bzw. deren ZP2 Proteine noch nicht bis zur Homogenität gereinigt worden sind. 3. Der Vorteil von Antikörpern, die gegen synthetische Peptide gerichtet sind, besteht auch darin, dass einzelne definierte Epitope erkannt werden, wogegen Antikörper gegen das Gesamtprotein eine Vielfalt von unterschiedlichen Epitopen erkennen können. Bei monoklonalen Antikörpern, die ein definiertes Epitop erkennen, müsste bei Einsatz von Zona pellucida Protein als Immunogen ein aufwendiges Epitop-Mapping durchgeführt werden, um die entsprechende Proteindomäne zu identifizieren. Nur dann können Aussagen über die physiologische Bedeutung einer bestimmten linearen Proteindomäne gemacht werden. Es wurden aus zwei Gründen monoklonale Antikörper gegen ein synthetisches ZP2 Peptid hergestellt: 1. Es ist bekannt, dass auch in polyklonalen Antiseren gegen ein synthetisches Peptid unterschiedliche Antikörper gegen verschiedene Sequenzabschnitte des synthetischen Peptides generiert werden. Es ist davon auszugehen, dass verschiedene Klone unterschiedliche Sequenzabschnitte detektieren (Hinsch et al.

1989). Bei monoklonalen Antikörpern ist davon auszugehen, dass Antikörper, die von einem Klon produziert werden, alle ein und dasselbe Epitop markieren. 2. Ein weiterer Vorteil monoklonaler Antikörper besteht darin, dass monoklonale Antikörper zwar in der Regel ein und dasselbe Epitop erkennen, aber unterschiedliche Klone verschiedene Affinitäten zu ihrem Antigen aufweisen. Antikörper mit unterschiedlichen Affinitäten können verschiedene Eigenschaften haben ; z.B. können hochaffine Antikörper gut für immunhistochemische Zwecke und mittel- bzw. niedrigaffine Antikörper manchmal besser für die Anreicherung von ZP2 Protein über die Affinitätschromatographie eingesetzt werden.

Im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen wurden zwei Immunisierungsprotokolle zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern eingesetzt.

Die in vitro Fusion hat den Vorteil, ein langwieriges Immunisierungsprotokoll, das mindestens 12 bis 18 Wochen in Anspruch nimmt, zu umgehen. Hierbei werden in vitro spezielle Antigen präsentierende Zellen (Support Zellen) mit dem jeweiligen Antigen inkubiert (Priming). Diese Zellen sind dazu geeignet, das entsprechende Antigen nativen Maus Milzzellen zu präsentieren. In der Hoffnung, Antikörper produzierende Milzzellen zu generieren, wird dann eine Fusion mit Maus Myelomzellen durchgeführt. Ein solches Verfahren ist in ca. 1 Woche bis 10 Tagen abzuschließen. Leider führte im Rahmen dieser Arbeit diese Methode nicht zu dem gewünschten Erfolg. Bei der Durchmusterung Antikörper produzierender Hybridoma Klone konnten keine Zellen identifiziert werden, die Antikörper gegen das eingesetzte Immunogen, das ZP2 Peptid, produziert haben. Aus diesem Grunde wurde auf die zeitlich aufwendigere konventionelle Methode der in vivo Immunisierung zurückgegriffen. Mit dieser Methode konnten Anti-ZP2-Peptidantikörper sezernierende Hybridomaklone gewonnen werden. Es wurde ein Subklon hergestellt, der konstant Anti-Maus-IgG gegen das synthetische ZP2 Peptid produzierte. Diese Antikörper konnten erfolgreich für immunbiochemische, immunhistochemische und funktionelle Studien eingesetzt werden. Mithilfe des ELISA wurde der monoklonale Antikörper mAk ZP2-20 selektiert, der spezifisch das korrespondierende synthetische ZP2 Peptid erkannte. Der als 24/4 C bezeichnete Klon wird des Weiteren als mAk ZP2-20 benannt. Für die weiteren geplanten Untersuchungen war es jedoch von großer Wichtigkeit zu zeigen, dass die Antikörper nicht nur das synthetische Peptid sondern auch das ZP2 Protein erkennen. In einer vorangegangenen Publikation konnte gezeigt werden, dass ein polyklonales Kaninchen Antiserum gegen das

synthetische ZP2-Peptid mit ZP2 Protein im Immunoblot reagierte. Diese polyklonalen Antiseren reagierte spezifisch auch mit Zona pellucida Protein im menschlichen Ovar (Hinsch et al., 1998). Im Rahmen der hier vorgelegten Dissertationsarbeit konnte gezeigt werden, dass der monoklonale Antikörper gegen das spezifische ZP2 Epitop, mAk ZP2-20, Antigene in bovinen und humanen Eizellen erkannte. Eingesetzt wurden lysierte Proteine aus bovinen und humanen Oozyten, die im Immunoblot mit dem monoklonalen Antikörper getestet wurden. Der Antikörper erkannte in bovinen Eizellen ein Antigen mit einer apparenten Molekularmasse von 64 kDa ; in humanen Oozyten wurde ein 65 kDa Polypeptid detektiert. Die Herkunft von zwei weniger intensiv markierten Banden bei 107 kDa und 31 kDa ist nicht klar. Diese Beobachtung könnte mit einer unspezifische Bindung des monoklonalen Antikörpers an nicht relevante Proteine zu erklären sein. Ein anderer Grund für diesen Befund könnte aber sein, dass das 107 kDa Protein ein nicht glykosiliertes Vorläuferprotein von ZP2 ist, während das 31 kDa Protein ein proteolytisches Fragment des bovinen ZP2 Proteins darstellt. Polyklonale Antiseren gegen gereinigte Schweine-Zona pellucida Proteine reagieren in der Regel mit breiten, weit auseinander gezogenen Zona pellucida Protein Banden (Topper et al., 1997). Der Antikörper mAk ZP2-20 erkannte im Gegensatz dazu scharfe und gut fokussierte Proteinbanden. Aufgrund dieses Ergebnisses konnte angenommen werden, dass der monoklonale Antikörper gegen das synthetische ZP2 Peptid lediglich das lineare ZP2 Protein Epitop erkennt. Die sterische Behinderung von glykosilierten Aminosäureresten des ZP2 Proteins könnte die Bindung von mAk ZP2-20 an das Protein beeinträchtigen. In humanen Oozyten konnte eine einzelne, sehr gut fokussierte Proteinbande bei etwa 64 kDa identifiziert werden. Isoliertes menschliches ZP2-Protein hat eine apparente Molekularmasse von 64 - 78 kDa (Shabanowitz et al., 1988). Diese relativ niedrige apparente molekulare Masse des immunoreaktiven Polyeptids, wie auch seine fokussierte Erscheinung im Immunoblot, kann auch im humanen System ein Hinweis dafür sein, dass mAk ZP2 20 nur mit wenig oder nicht glykosiliertem ZP2 Protein reagiert. Diese Überlegung wird durch die Tatsache bestärkt, dass das ZP2-20 Peptid (Aminosäurereste 541 – 555, DDNIKLVLDDCWATS) zwei mögliche O-Glykosilierungsstellen an den Positionen 14 und 15 (unterstrichen) enthält. Diese Glykosilierungsstellen könnten die Detektion von glykosiliertem ZP2 Protein durch Anti-ZP2 Peptidantikörpern über eine sterische Beeinträchtigung bedingen. N-Glykosilierungen im Bereich der ZP2-20

Peptidsequenz sind eher unwahrscheinlich ; es konnte aber für bovines ZP2 Protein experimentell gezeigt werden, dass ein Asparaginrest, der sehr nahe der ZP2 Peptidsequenz auf der Position 538 der ZP2-Sequenz lokalisiert ist und N-glykosiliert wird, zu finden ist (Ikeda et al., 2002). In diesem Zusammenhang ist es interessant festzustellen, dass Untersuchungen mit dem polyklonalen Kaninchen ZP2-Antiserum gegen das identische synthetische Peptid, das für die Generierung des monoklonalen Antikörpers eingesetzt wurde, eine eher breitere Bande bei 72 kDa erkannte (Hinsch et al., 1998). Dieses immunreaktive Polypeptid ist höchstwahrscheinlich identisch mit der Fraktion des 64 – 68 kDa menschlichen ZP2 Proteins, dass von Shabanowitz und O`Rand 1988 beschrieben wurde. Nach der Identifizierung von ZP2 Protein in humanen und bovinen Eizell-Lysaten wurde nun untersucht, ob die Antikörper auch natives, nicht denaturiertes, bovines und humanes ZP2 Protein erkennen. Zu diesem Zweck wurden Immunfluoreszenz Untersuchungen mit murinen, humanen und bovinen Eizellen durchgeführt. Im Vergleich zur Negativkontrolle konnte gezeigt werden, dass die Antikörper offensichtlich mit einem Polypeptid im Bereich der Zona pellucida von allen drei getesteten Spezies reagieren. Hierbei waren unterschiedliche Fluoreszenzmuster und Fluoreszenzintensitäten speziesabhängig festzustellen. Unspezifische Reaktionen mit dem Präimmunserum fanden sich insbesondere in der humanen Eizelle. Die Zona pellucida wurde jedoch im Vergleich zur Kontrolle eindeutig erkannt. Relativ schwach war die Reaktion des monoklonalen Antikörpers mit der Zona pellucida isolierter Mauseizellen. Besonders eindrucksvoll war im Vergleich zur Kontrolle die Bindung des monoklonalen Antikörpers an die Zona pellucida der bovinen Eizelle. Allerdings wurde auch hier zentral die Eizelle markiert. Ähnliche Resultate mit polyklonalen Antiseren gegen die Zona pellucida des Schweines bzw. gegen synthetische ZP3 Peptide wurden in anderen Untersuchungen beschrieben (Dunbar und Raynor, 1980, Hinsch et al., 1994,).

In diesen Arbeiten konnte unter anderem gezeigt werden, dass Antiseren, die gegen mit Detergenz solubilisierter porciner Zona pellucida gerichtet sind, eine eher uniforme Fluoreszenz der Schweine Zona pellucida aufwiesen. Antikörper gegen intakte und hitzebehandelte Zona pellucida zeigten eine wesentlich stärkere Fluoreszenz am äußeren Ende der Zona pellucida. Diese Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass die Behandlung der Zona pellucida mit Detergenz immunogene Epitope verändert haben könnte und somit die unterschiedlichen

Färbemuster zu erklären sind. Untersuchungen mit Antiseren gegen synthetisches ZP3 Peptid (AS ZP3-5 und AS ZP3-6) zeigten auch spezies-spezifische Unterschiede im Anfärbemuster. AS ZP3-5 zeigte eine starke Immunfluoreszenzmarkierung der menschlichen Zona pellucida am äußeren Rand der Eizelle. Eine schwächere Fluoreszenz konnte im inneren Bereich der Oozyte festgestellt werden. Verglich man dieses Färbeverhalten mit dem von Schweineoozyten, so zeigte sich dort die Zona pellucida als ein schmaler und fokussiert abgegrenzter Ring im Vergleich zur menschlichen Eizelle. Im Zentrum der Eizelle konnte hier keine Fluoreszenz festgestellt werden. Der Einsatz eines ZP3 Peptidantiserums gegen ein anderes synthetisches Peptid (AS ZP3-6) wies dagegen eine weniger uniforme Immunfluoreszenz auf. In menschlichen Oozyten fand sich ein intensiver homogener Ring im Bereich der gesamten Zona pellucida. Zentral war hier in der Oozyte keine Immunfluoreszenz sichtbar. In der Zona pellucida vom Schwein zeigte AS ZP3-6 dagegen einen schmalen scharfen Ring im Bereich des inneren Anteils der Zona pellucida. Es ist somit davon auszugehen, dass durch Behandlung der Eizellen, oder aber auch individuell für jede Spezies bedingt, das Detektionsmuster von Zona pellucida Proteinen in Eizellen von Säugetieren unterschiedlich ist. Dieses scheint unabhängig vom ZP2 oder ZP3 Protein zu sein.

Zur Lokalisation von ZP2-Proteinen im bovinen und humanen Ovar durch mAk ZP2-20 wurden feingewebliche Schnitte aus den Eierstöcken dieser Spezies angefertigt. Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, immunhistologische Untersuchungen an Mausovarien durchzuführen. Dieses lag hauptsächlich daran, dass bei der Detektion spezifisch gebundener Antikörper an ihre Antigene in den Negativkontrollen mit Präimmunserum eine so starke unspezifische Bindung festzustellen war, dass im Mausovar Unterschiede der Anfärbung von mAk ZP2-20 Antikörpern und Negativkontrolle nicht gefunden werden konnten. Die immunhistologischen Untersuchungen an humanen und bovinen Ovarialschnitten zeigten, dass der monoklonale Antikörper mAk ZP2-20 mit der Zona pellucida humaner und boviner Eizellen reagierte. Zu einem geringeren Ausmaß wurde auch das Ooplasma von Sekundär- und Tertiärfollikeln erkannt. In primären und bovinen humanen Follikeln zeigte sich ein unterschiedliches Färbemuster. Hier war eine intensive Immunreaktion im Bereich des Ooplasmas festzustellen. Die Zona pellucida wurde als schmale zirkuläre Struktur erkannt. Es ist bekannt, dass die *de novo* Synthese von ZP2 Proteinen während der Oogenese erfolgt (Wassarman et

al.,1990). Aus diesem Grund ist es nicht überraschend, dass antigenes ZP2 Protein im Ooplasma von Primärfollikeln detektiert wurde. Bei diesem Material handelt es sich sehr wahrscheinlich um ZP2 Protein das während der Oogenese intrazellulär synthetisiert und transportiert wird.

Ähnliche Resultate konnten von anderen Arbeitsgruppen in vorangegangenen Untersuchungen erhoben werden. Mithilfe von monoklonalen Antikörpern gegen porcines Zona pellucida Protein konnte gezeigt werden, dass Zona pellucida Proteine im Ooplasma zu finden sind (Takagi et al., 1998). Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch mit Antikörpern gegen synthetische ZP3 Peptide, die sowohl in der Zona pellucida als auch im Ooplasma von Schweineoozyten immunoreaktives Material darstellen konnten.

Neben der Zona pellucida und dem Ooplasma wurde bovines ZP2 Protein auch in Follikelzellen gefunden, die die Eizelle umgeben. Auch in humanen Follikelzellen konnte ZP2 Protein nachgewiesen werden ; die Färbung war in Relation zu bovinen Follikelzellen zwar relativ schwach aber deutlich über dem Hintergrund. Betreffend des Nachweises von ZP Protein in anderen Zellen als der Eizelle wird diese Beobachtung durch elektronenmikroskopische Studien unterstützt, die in Ratten- und Schweineovarien durchgeführt wurden (Takagi et al., 1989). Diese Studie konnte zeigen, dass ZP3 Protein in Follikelzellen dieser Spezies immun-elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden konnte. Zwei in der Literatur kontrovers diskutierte Gründe für das Vorkommen von Zona pellucida Proteinen außerhalb der Eizelle könnte den im Rahmen dieser Dissertation erhobenen Befund erklären. Bei der Maus konnte mit gentechnologischen Methoden eindeutig nachgewiesen werden, dass zumindest ZP3 Protein ausschließlich in der Eizelle und in keinem anderen Gewebe exprimiert wird (Bleil und Wassarmann 1980a, Bleil und Wassarmann 1980b). Analog wurde von Shimizu et al. (1983) die Oozyte als alleiniger Ursprungsort der Zona pellucida angenommen. Es könnte sich hiermit bei diesem immunreaktiven Material um Zona pellucida Proteine oder um deren Abbauprodukte handeln, die in der Umgebung der Eizelle zu liegen kommen und/oder von den Kumuluszellen aufgenommen werden. In anderen Spezies als der Maus wurde aber auch gezeigt, dass Kumuluszellen und Granulosazellen Zona pellucida Proteine de novo synthetisieren. Im Kaninchenmodell konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass Zona pellucida Proteine auch in Kumuluszellen in vitro transkribiert, translatiert und sezerniert werden (Lee und Dunbar 1993, Wohlgemuth

1984). Grootenhuis et al. (1996) lokalisierten ZP3 Moleküle in Granulosazellen von Kaninchen, Marmoset- und Rhesusaffen, sowie von Menschen und brachten diese Beobachtung in Zusammenhang mit der bekannten Destruktion der Ovarien durch immunologische Phänomene nach aktiver Immunisierung der Tiere mit Zona pellucida Proteinen. Untersuchungen von Totzauer et al. (1998) wiesen mittels polyklonaler Antikörper ZP1 und ZP3 Protein im bovinen fötalen Ovar wie auch in Follikelzellen nach. Die Autoren folgerten daraus, dass beide, Eizelle und Follikelzelle, an der Bildung der Zona pellucida beteiligt sind. Unterschiedliche Orte der Zona pellucida Protein Synthese können aufgrund von spezies-spezifischen Eigenschaften und/oder Unterschieden in der Spezifität von Antikörpern oder RNA-Sonden erklärt werden. Das im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene ZP2 Antigen, das in humanen und bovinen Follikelzellen nachgewiesen werden konnte, könnte somit auch phagozytiertes oder abgebautes ZP2 Protein sein, das ursprünglich von der Oozyte synthetisiert wurde. Mit Hilfe der Immunelektronenmikroskopie wurde daraufhin die ultrastrukturelle Verteilung von ZP2 Protein im Marmoset Monkey Ovar untersucht. Die gleichmäßige, homogene Verteilung der Goldpartikel auf der Zona pellucida der Marmoset Monkey Ovar Ultradünnschnitte entspricht dem Bild der homogenen Braunfärbung der Zona pellucida von humanen und bovinen Ovarienschniten in der Immunhistochemie. Auch der relativ dichte Besatz mit Goldpartikeln in den Kumulus-Zellen korreliert gut mit dem Bild, das in der Immunhistochemie gefunden wurde. Dieses zeigte sich vor allem in bovinen Ovarien, und könnte unter anderem als Ausdruck einer de-novo-Synthese von Zona pellucida 2 Proteinen in den Kumulus-Zellen gewertet werden. Aber auch Stoffwechsel-prozesse von Zona pellucida 2 Proteinen im Rahmen von Ab- und Umbauprozessen könnte diesen Befund erklären.

Im Rahmen der Dissertation wurde weiterhin untersucht, ob ZP2 mRNA in Maus Kumuluszellen und in Maus Eizellen nachzuweisen ist. Diese Untersuchungen dienten als Vorversuche zum Nachweis von ZP mRNA in Follikelzellen anderer Spezies, wie z.B. im Menschen und im Rind. Dieses ist allerdings nicht Gegenstand der hier vorgelegten Dissertation. In den hier gezeigten Experimenten konnten erfolgreich Primer für den Nachweis von ZP2 mRNA durch die RT-PCR konstruiert werden. Sowohl im Ovargewebe als auch in isolierten Eizellen konnten ZP2 Amplifikate dargestellt werden. In Kumulus-/Granulosazellkomplexen konnte aber keine ZP2 mRNA detektiert werden. Eine Sequenzierung der entsprechenden PCR

Fragmente ergab, dass es sich bei dem Amplifikat im Ovar und in der Eizelle um Teilbereiche der Nukleotidsequenz des Zona pellucida 2 Protein kodierenden Genes handelte. Diese Ergebnisse unterstützen die schon diskutierte Oozyten spezifische Expression von Maus Zona pellucida mRNA.

Die Ergebnisse zeigen, dass nicht nur Maus ZP3 sondern auch Maus ZP2 Eizell-spezifisch exprimiert wird.

In einer Studie zur Lokalisation von ZP3 Protein konnte gezeigt werden, dass ZP3 Protein in sternförmigen Ausläufern von der Eizelle aus in die umgebende Kumulusmasse zu beobachten war (Hinsch et al., 1994). Man könnte hier spekulieren, dass diese Ausläufer die Penetration des Spermatozoons durch die Kumulusmasse erleichtern können und sie somit die Eizelle finden, erkennen und an der Zona pellucida binden können. Ein anderer möglicher Grund könnte darin bestehen, dass Zona pellucida Proteine in Follikelzellen zur Stabilisierung des Kumulus Oophorus beitragen. Rankin et al. (1996) zeigten, dass ZP3 knock out Mäuse nicht nur einen kompletten Verlust der Zona pellucida Matrix, sondern auch eine völlige Desorganisation des Kumulus Oophorus Komplexes aufwiesen. Hier wurde diskutiert, dass die Abwesenheit von Zona pellucida Matrix eine hinreichende Kumulusorganisation verhindern.

Zusammenfassend kann aus den hier dargestellten Daten und den bereits von anderen Arbeitsgruppen publizierten Ergebnissen gesagt werden, dass der Ort der Zona pellucida Protein Synthese noch kontrovers zu diskutieren ist. Allerdings könnte eine Erklärung für das Phänomen unterschiedlicher Lokalisation von ZP Proteinen in spezies-spezifischen Unterschieden liegen.

In bereits vorausgegangenen Studien wurde das synthetische ZP2 Peptid, das Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen ist, als Antigen zur Immunisierung von Kaninchen verwendet (Hinsch et al., 1998). Die daraus gewonnenen polyklonalen Antiseren wurden mit verschiedenen Testsystemen hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften untersucht. Ebenso wurde mittels funktioneller Tests ermittelt, ob eine Bindung der Antiseren Einfluss nimmt auf die Bindung von Spermatozoen an die Zona pellucida. Dabei erwies sich zum einen, dass die gewonnenen Antiseren an die Zona pellucida verschiedenen Säugerspezies banden und diese in verschiedenen Testsystemen markieren konnten. Zum anderen zeigte sich im Rindermodell eine Hemmung der Spermatozoenbindung an die Zona pellucida, wenn diese vorher mit den Antiseren behandelt worden war. Diese

Ergebnisse ließen darauf schließen, dass die verwendete Sequenz im Zona pellucida 2 Molekül im Rahmen der Bindung der Spermatozoen eine Rolle spielt.

Um eine eventuelle funktionelle Bedeutung des von dem monoklonalen Anti-Zona pellucida-Antikörper erkannten Epitops bestimmen zu können, wurden Spermatozoenbindungsstudien an isolierten Zonae pellucidae durchgeführt. Da die Zonae pellucidae von Oozyten inter- und intraindividuell zum Teil erhebliche Differenzen in ihrer Bindungskapazität für Spermatozoen wie auch für anti-Zona pellucida-Antikörper aufweisen (Franken et al., 1991; Hinsch et al., 1994; Oehninger et al., 1996), ist eine interne Negativkontrolle im experimentellen Design von großer Bedeutung. Methodisch wurde dieses Problem durch die Entwicklung des Kompetitions-Hemizona-Assay mit dem Einsatz zweier gleich großer Hemizonae aus einer Eizelle gelöst. Mit diesem Versuchsaufbau können mögliche Veränderungen im Spermatozoenbindungsverhalten mit großer Wahrscheinlichkeit auf die vorherige Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern zurückgeführt werden.

Windt et al. (1991) haben bei der Spezies Maus gezeigt, dass der HZA als experimentelles Modell eingesetzt werden kann, um Veränderungen der Spermatozoenbindung an Zonae pellucidae zu untersuchen. Auch der bovine Kompetitions-Hemizona-Assay konnte als Testmodell eingesetzt werden, um das kontrazeptive Potential gewonnener anti-ZP2-Antiseren und anderer Substanzen zu untersuchen (Hinsch et al., 1997). Das Rindersystem wurde als Modell ausgewählt, da sich das Maus-Modell als zu störanfällig erwies. Außerdem kann mit Anwendung dieser Testmethode das Opfern von Versuchstieren vermieden werden. Bovine Gameten sind sehr gut verfügbar (Gameten von Schlachttieren bzw. Besamungsstationen). Dieses Vorgehen im bovinen System verringert generell den Einsatz und die Tötung von Labortieren zum Studium der Spermatozoen- und Eizellfunktionen oder –Interaktionen. Auch ethischen Bedenken bei dem routinemäßigen Einsatz von humanen Gameten kann durch den bovinen Kompetitions-Hemizona-Assay entgegengetreten werden.

Der Kompetitions-Hemizona-Assay konnte schon in vorhergehenden Studien im Rahmen einer Dissertation im bovinen System erfolgreich etabliert und validiert werden (Hinsch et al., 1998). Auch in der hier vorgestellten Studie zeigte der Assay sich als geeignet, eine funktionelle Beeinflussung der Spermatozoen-Zona pellucida-Bindung durch den monoklonalen Antikörper zu untersuchen.

Diskussion

Die im Kompetitions-Hemizona-Assay gewonnenen Ergebnisse mit dem monoklonalen Anti-ZP2-Antikörper zeigten, dass an mit mAk 24/4 C inkubierten bovinen Hemizonae signifikant weniger Spermatozoen fest banden als an die mit Zellkulturmedium behandelten korrespondierenden Hälften (Negativkontrollen). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass das von mAk 24/4 C erkannte Epitop, das sich als eine lineare Aminosäuresequenz des ZP2-Protein-„backbones“ darstellt, sehr wahrscheinlich eine funktionelle Bedeutung für die Spermatozoenbindung an die Zona pellucida hat. Im Rahmen von vorhergehenden Untersuchungen wurden polyklonale Antiseren gegen das auch in der hier vorgestellten Arbeit verwendete synthetische ZP2 Peptid generiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die polyklonalen Anti-ZP2 Peptidantiseren im Kompetitions-Hemizona-Assay eine Hemmung der Spermatozoenbindung um im Durchschnitt 50 -60 % bewirkten. Die Hemmung der Spermatozoen-Zona pellucida-Bindung durch den monoklonalen Antikörper war im Mittel nicht höher als 50-60%. Ähnliche Ergebnisse wurden von Gupta et al. (1995) im porcinen Modell publiziert. Hier wurde beschrieben, dass es durch monoklonale Antikörper zum Teil nur zu einer ca. 50%igen Behinderung der Spermatozoen-Zona pellucida Bindung kam. Das Fehlen einer gänzlichen Blockade könnte mit einer unzureichenden Menge an Antikörpermolekülen oder mit einer zu geringen Affinität der Immunglobuline zu erklären sein. Ebenso könnte es auch möglich sein, dass für die sekundäre Bindung der Spermatozoen mehrere unterschiedliche Epitope des ZP2-Proteins verantwortlich sind. Nach der Blockierung des einen Epitops durch mAk ZP2-20 (Klon 24/4 C) würden dann noch weitere Domänen für die sekundäre Bindung der Spermatozoen zur Verfügung stehen. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen konnte dieser Fragestellung nicht weiter nachgegangen werden. Sie wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Die Inhibition der Sekundärbindung durch mAk ZP2-20 könnte folgendermaßen erklärt werden: Zuerst kommt es zu einer lockeren Primärbindung an die Zona pellucida durch welche die akrosomale Reaktion der Spermatozoen induziert wird (Bleil et al., 1988). Erst danach soll eine feste, sekundäre Bindung des Spermatozoons an die Zona pellucida stattfinden. Die Inkubation der Zona pellucida mit mAk ZP2-20 verhindert den Schritt der sekundären, festen Bindung durch Blockierung eines funktionell wichtigen Epitops und führt zum Ablösen der nur locker gebundenen, motilen Spermatozoen. Diese Überlegungen decken sich mit den Beobachtungen von Hasegawa et al. (1991, 1995). Nach Inkubation mit Antiseren,

die gegen Zona pellucida-Proteine des Schweines gerichtet waren, fand diese Arbeitsgruppe eine signifikante Hemmung der Spermatozoen-Eizell-Bindung. Jedoch wurde in einem Teil der Experimente nicht das initiale Bindungsstadium des Spermatozoons an die Zona pellucida blockiert, sondern erst die sich anschließende sekundäre Interaktion gehemmt.

Die wichtige Rolle, die den Zona pellucida Proteinen beim Vorgang der Fertilisation zukommt, hat sie zum Ziel verschiedenster Studien gemacht, die Immunkontrazeption zum Thema haben. Die Vor- und Nachteile der Immunkontrazeption mit Zona pellucida-Antigenen werden in der Literatur zur Zeit ausgiebig diskutiert (Jones, 1994; Sacco et al., 1994, Dunbar et al., 2001). Von einem Kontrazeptivum wird eine sichere, vom Wirkmechanismus aus gesehen nachvollziehbare immunologische oder pharmakologische Wirkung erwartet. Eine immunologische Kontrazeption ist deshalb nur sinnvoll bei Gewährleistung einer gesicherten und zielgerichteten Antikörperproduktion. Lou et al., (1995) zeigten im Maus-Modell und Paterson et al. (1996) bei Marmoset-Affen, dass nicht alle mit identischen ZP3-Peptiden immunisierten Tiere mit einer Antikörperproduktion gegen die Peptide reagierten und nicht in jedem Fall ein Antikörpertiter gegen das ZP Antigen erreicht wurde, der die Fertilität signifikant und dauerhaft zuverlässig herabsetzte. Antikörperproduktion und der Antigenprozessierung zeigen offensichtlich eine große interindividuelle Streubreite. Dies könnte einen immunkontrazeptiven Ansatz mit ZP-Antigenen grundsätzlich in Frage stellen. Neben linearen ZP3/C-Peptidsequenzen wurden auch rekombinante ZP3/C-Moleküle bezüglich ihrer immunogenen Potenz überprüft (Kaul et al., 1996; Paterson et al., 1996a). Mahi-Brown und Moran (1995) untersuchten ein synthetisch hergestelltes Peptid der menschlichen ZP, das zur Immunisierung von Makaken eingesetzt wurde. Nach Immunisierung mit einem rekombinanten humanen ZP3/C-Molekül trat jedoch bei Marmoset-Affen neben der Immuninfertilität eine ovarielle Dysfunktion auf (Paterson et al., 1996b). Eine Herabsetzung der Fertilität bei Mäusen durch eine orale Immunisierung gelang Zhang et al. (1997). Das eingesetzte Vaccin bestand aus einem attenuierten Salmonellenstamm, der ein murines ZP3/C-Molekül produzierte. Des Weiteren zeigten mehrere Studien an Tiermodellen, dass eine vollständige Reversibilität einer Immunkontrazeption nur erreicht wurde, wenn Peptidvaccine eingesetzt wurden, die ausschließlich aus B-Zell-Epitopen bestanden (Epifano & Dean, 1994; Jones, 1994). T-Zell-Epitope induzierten eine zelluläre

Immunantwort, die zu einer destruktiven Entzündung des Ovars führte und dieses irreversibel schädigte (Lou et al., 1996). Um also eine Destruktion der Follikel zu verhindern und Reversibilität zu garantieren, müssen B-Zell Epitope gefunden werden, die ausschließlich zur Ausbildung einer Antikörper-Antwort führen, die dann ihrerseits durch Bindung an ihr Antigen nativ eine Bindung der Spermatozoen an die Zona pellucida verhindern. Zur Zeit sind die Forschungsaktivitäten auf ein Vaccin gerichtet, das gegen reine B-Zell-Epitope des ZP-Protein 2 bzw. 3 gerichtet ist. Es soll zu keiner immunologischen Schädigung der ovariellen Oozyten führen, keine Autoimmun-Oophoritis oder gestörte Ovarfunktionen induzieren und in mehreren Säugerspezies reversibel eingesetzt werden können (Jones, 1994; Castle und Dean, 1996). Bezüglich des Maus-Zona pellucida 2 Moleküls gelang es Sun et al (1999), ein solches B-Zell Epitop zu identifizieren und als Vaccine einzusetzen, die eine Antikörper-Produktion induzierte. Im Primaten Zona pellucida 3 Protein konnte ein Epitop identifiziert und eine ZP3 Peptidvaccine hergestellt werden, die im Marmoset Affen zur Bildung von Antikörpern führte. Diese Antikörper banden exklusiv an Zona pellucida in Gewebsschnitten von humanen und Marmoset Affen Ovarien, und sie induzierten keine Zerstörung der Ovarmorphologie. Die Fertilität der immunisierten Tiere war in vivo nicht beeinträchtigt, jedoch führten die Antikörper zu einer Hemmung der humanen Spermien-Eizell-Interaktion von 60 % in vitro (Paterson et al., 2002). Hasegawa et al. immunisierten Kaninchen mit ZPA/2-Peptiden mit Sequenzen von Mensch, Schwein und Kaninchen. Die erhaltenen Antiseren wurden in Spermatozoen-Zona pellucida Bindungsstudien der jeweiligen Spezies eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass die Antiseren gegen die Mensch und die Kaninchen spezifischen Sequenzen die ZP-Spermien Bindung spezies-spezifische hemmten, das Antiserum gegen die Sequenz vom Schwein jedoch nicht (Hasegawa et al., 2002*).*

Die hier dargestellten Ergebnisse werfen die Frage auf, welche Auswirkungen autoimmunreaktive Antikörper gegen das synthetische ZP2 Peptid in vivo haben können und inwieweit es als Vaccine für eine immunolgisch bedingte Kontrazeption eingesetzt werden kann. Aus diesem Grunde wurden weibliche F1 Mäuse mit dem Peptid, gekoppelt an ein Trägerprotein, immunisiert. Eine Negativkontroll-Gruppe wurde nur mit dem Trägerprotein immunisiert, um auszuschließen, dass eventuelle Effekte schon allein von Antikörpern gegen das Trägerprotein verursacht wurden. Alle Tiere wurden dann verpaart und die Anzahl und Entwicklungsstufen der

entstandenen Föten überprüft. Bei 6 der 13 mit ZP2-Peptid immunisierten Tiere waren keine Föten vorhanden, bei 2 weiteren nur ein oder 2 Föten im Uterus und bei einem Tier waren die Föten entwicklungsretardiert. Bei Mäusen im geschlechtsreifen Alter ist dies ein sehr außergewöhnliches Ergebnis, da normalerweise von einer sehr hohen Fertilisierungsrate ausgegangen werden kann. So zeigten auch 9 von 13 Negativkontroll-Tieren eine Anzahl von 8 oder mehr zeitgerecht entwickelten Föten.
Somit kann man von einem vielversprechenden Ansatz sprechen, an dem sich weitergehende Studien als lohnend erweisen könnten. In der nachfolgenden histologischen Untersuchung der Ovarien der immunisierten Tiere zeigte sich, dass die Immunisierung zu keinerlei morphologischen Veränderungen geführt hatte. Die Ovarien waren, wie die der Kontrolltiere auch, altersgerecht gestaltet und zeigten keine Zeichen von Gewebszerstörung oder Inflammation. Es ist deswegen nicht anzunehmen, dass die Beeinträchtigung der Fertilisierung durch eine ovarielle Zerstörung zustande kam.
In den vorgestellten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das ZP2-20 Peptid eine wichtige Rolle bei der sekundären Bindung des Spermatozoons an die Zona pellucida spielt. Diese ZP2 Domäne könnte von immunkontrazeptiver Bedeutung für die Bindung von Spermatozoen an die Zona pellucida sein, wenn dieses Epitop mittels Antikörper ausgeschaltet wird.
Allerdings waren die erhobenen Ergebnisse aufgrund der relativ geringen Anzahl an eingesetzten Versuchstieren nicht statistisch signifikant.
Die vorgestellten Untersuchungen sind als erster Ansatz zum Verständnis der Bedeutung einer spezifischen ZP2 Domäne zu betrachten. Weitere Untersuchungen müssen erfolgen, um sich einen Einsatz des Peptides als Immunkontrazeptivum vorstellen zu können. Im Hinblick darauf, dass die in dieser Arbeit hergestellten Antikörper gegen das ZP2 Peptid Epitop keine 100%ige sondern nur eine ca. 60%ige Bindungshemmung der Spermatozooen bewirkte, ist zu überlegen, ob der Einsatz von verschiedenen synthetischen Peptiden aus dem ZP2 und/oder ZP3 Protein als Vaccine eine zuverlässige Immunkontrazeption gewährleisten kann.

5 Zusammenfassung

Das Zona pellucida 2 (ZP2) Protein ist im Maussystem für die feste, sekundäre Bindung des Spermatozoons an die Zona pellucida der Eizelle von Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein monoklonaler Antikörper (mAk) gegen ein synthetisches ZP2 Peptid hergestellt. Dieser Antikörper wurde eingesetzt, um das ZP2-Protein immunbiochemisch, immunhistologisch und funktionell zu untersuchen. MAk ZP2-20 (Klon 24/4 C), der gegen ein synthetisches Peptid gerichtet ist, das speziesübergreifend (homolog) in ZP2 Proteinen vorkommt, konnte erfolgreich hergestellt werden. Immunhistochemische, immunelektronenmikroskopische und Immunfluoreszenz Untersuchungen zeigten, dass mAk ZP2-20 ZP2 Protein von verschiedenen Spezies detektierte. In Untersuchungen zur Expression der ZP2 kodierenden Gene mittels RT-PCR konnte eine mRNA Expression in murinen Eizellen und Ovargewebe gezeigt werden. In Kumulus-/Granulosazellgemischen konnte keine mRNA Expression nachgewiesen werden. Immunoblots zeigten, dass ZP2-20 mit einem 64 / 65 kDa Polypeptid reagierte, das menschlichen bzw. bovinen ZP2-Proteinen entspricht. Nach Einsatz von mAk ZP2-20 konnte im Kompetitions-Hemizona-Assay eine ZP2-Protein-Domäne identifiziert werden, die für die Spermatozoen-Zona pellucida Bindung von Bedeutung ist: Nach Vorbehandlung der Hemizonae mit monoklonalen ZP2-Peptid-Antikörpern war die Anzahl der gebundenen Spermatozoen deutlich herabgesetzt. Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, dass die durch das ZP2-Peptid repräsentierte ZP2-Domäne für die feste Bindung von Samenzellen an die Zona pellucida von Bedeutung ist. Im Rahmen von Fertilitätsstudien in der Maus mit ZP2-20 Peptid als mögliche Vaccine im Vergleich zu Kontrollen, zeigte sich tendenziell eine Hemmung der Fertilität. Eine Beeinträchtigung der strukturellen Integrität des ovarialen Gewebes konnte nicht beobachtet werden. Die Untersuchungen zeigen, dass der monoklonale Antikörper mAk ZP2-20 gegen synthetisches Zona pellucida 2 Peptid als spezifische Marker für Zona pellucida Protein eingesetzt werden kann. Außerdem ist dieser Antikörper für Untersuchungen physiologischer Abläufe der Spermatozoen-Eizell-Interaktion geeignet. Die Bedeutung der Ergebnisse für Diagnostik und Therapie in der Reproduktionsmedizin sowie als Grundlage für innovative Konzepte im Bereich der Entwicklung von Kontrazeptiva wird sich in der Zukunft zeigen.

6 Summary

In the mouse, the Zona pellucida 2 protein is responsible for the tight, secondary binding of spermatozoa to the Zona pellucida of the oocyte. In this dissertation monoclonal antibodies (mab) against a synthetic ZP2 peptide were generated. Monoclonal antibody ZP2-20 (clone 24/4 C) was used to identify ZP2 protein applying immunochemical, immunohistological and functional methods. The antibodies are directed against a synthetic peptide that is homologous in many mammalian ZP2 proteins. Immunohistochemistry, immunomicroscopy and immunofluorescence showed that mab ZP2-20 detected ZP2 protein in oocytes of different species. It also could be demonstrated that the expression of ZP2 mRNA occurs in murine oocytes and ovary tissue. However, in cumulus-/granulosa cell complexes, no ZP2 mRNA could be detected. Immunoblots revealed that ZP2-20 antibodies reacted with a 64 kDa and a 65 kDa polypeptide in human and bovine oocytes, respectively. In the bovine competitive hemizona assay mab ZP2-20 clearly inhibited binding of spermatozoa to the Zona pellucida. From the results obtained it can be concluded that the ZP2 peptide represents a ZP2 domain that is involved in the process of sperm-Zona pellucida interaction. Fertility studies with mice that where immunized with the ZP2-20 peptide tended to result in a decrease of fertility without affecting the morphological integrity of the ovary. From the data elaborated in this dissertation it can be concluded that mab ZP2-20 is a specific marker for Zona pellucida protein. Furthermore, this antibody can be used for the evaluation of the physiology of sperm-egg interaction. The results obtained might contribute to the understanding of crucial physiological events occuring during sperm-ZP2 interaction and provide a basis for novel immuno contraceptive approaches in humans and animals.

7 Literaturverzeichnis:

(1) Adham, I.M., Nayernia, K., Engel, W.: Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. Mol. Reprod. Dev.(3), 370-376, 1997.

(2) Aitken, R.J., Paterson, M., Braude, P., Thillai Koothan, P.: Evaluation of glycosylated and deglycosylated porcine zona antigens for contraceptive efficacy in vivo and in vitro, in: N.J. Alexander, D. Griffin, J.M. Spieler, G.M.H. Waites (eds.): Gamete Interaction: Prospects for Immuncontraception. Wiley-Liss, New York, 1990.

(3) Al Hasani, S., Küpker, W., Diedrich, K.: Männliche Subfertilität und therapeutische Möglichkeiten der assistierten Reproduktion, in: F.H. Fischl (ed.): Kinderwunsch. In Vitro Fertilisierung und Assistierte Reproduktion - Neue Erkenntnisse und Therapiekonzepte. Möglichkeiten, Erfüllbarkeit und Machbarkeit in unserer Zeit. Krause & Pachernegg GmbH, Wien, 1995.

(4) Allison, A.C., Hartree, E.F.: Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. J Reprod Fertil (21), 501-515, 1970.

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

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

(7) Avilés, M., Jaber, L., Castells, M.T., Kan, F.K.W., Ballesta, J.: Modifications of the lectin binding pattern in the rat Zona pellucida after in vivo fertilization. Mol Reprod Dev (44), 370-381, 1996.

(8) 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.

(9) Barany, G., Merrifield, R.B.: Solid-phase peptide synthesis, in: E. Gross, J. Meienhofer, (eds.): The Peptide, Vol. 2A. Academic press, New York, 1979.

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

(11) Bercegeay, S., Allaire, F., Jean, M., L'Hermite, A., Bruyas, J.F., Renard, N., Tainturier, D., Barrière, P.: La zone pellucide bovine: différences de composition macromoléculaire entre ovocytes, prétraités ou non à l'A 23187, et embryons. Reprod Nutr Dev (33), 567-576, 1993.

(12) Bigler, D., Takahashi, Y., Chen, M.S., Almeida, E.A., Osbourne, L., White, J.M.: Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM2 (fertilin beta) and murine eggs. Role of the alpha(6) integrin subunit. Journal of Biological Chemistry 275(16), 11576-11584, 2000.

(13) 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), 873-882, 1980a.

(14) 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, 1980b.

(15) Bleil, J.D., Wassarman, P.M.: Synthesis of Zona pellucida proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture in vitro. Proc Natl Acad Sci USA (77), 1029-1033, 1980c.

(16) 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, ZP2. Dev Biol (86), 189-197, 1981.

(17) 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.

(18) Bleil, J.D., Wassarman, P.M.: Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm. J Cell Biol (102), 1363-1371, 1986.

(19) 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.

(20) Bleil, J.D., Wassarman, P.M.: Galactose at the nonreducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg Zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity. Proc Natl Acad Sci USA (85), 6778-6782, 1988.

(21) Bleil, J.D., Wassarman, P.M.:Identification of a ZP3-binding protein on acrosome-intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking. Proc Natl Acad Sci USA (87), 5563-5567, 1990.

(22) 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.

(23) Bondioli, K.R., Wright, R.W.,Jr.: In vitro fertilization of bovine oocytes by spermatozoa capacitated in vitro. J Anim Sci (57), 1001-1005, 1983.

(24) Bookbinder, L.H., Cheng, A., Bleil, J.D.: Tissue- and species-specific expression of sp56, a mouse sperm fertilization protein. Science (269), 86-89, 1995.

(25) Bork, P.: Sperm-egg binding protein or proto-oncogene? Science (271), 1431-1432, 1996.

(26) Brown, C.R., Cheng, W.T.K.: Limited proteolysis of the porcine Zona pellucida by homologous sperm acrosin. J Reprod Fertil (74), 257-260, 1992.

(27) Burkman, L.J., Coddington, C.C., Franken, D.R., Kruger, T.F., Rosenwaks, Z., Hodgen, 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.

(28) 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.

(29) Castle, P.E., Dean, J.: Molecular genetics of the Zona pellucida: implications for immunocontraceptive strategies. J Reprod Fertil (Suppl.), 1-8, 1996.

(30) Castle, P.E., Whaley, K.J., Hoen, T.E., Moench, T.R., Cone, R.A.: Contraceptive effect of sperm-agglutinating monoclonal antibodies in rabbits. Biol Reprod (56), 153-159, 1997.

(31) Chamberlin, M.E., Dean, J.: Genomic organization of a sex specific gene: the primary sperm receptor of the mouse Zona pellucida. Dev Biol (131), 207-214, 1989.

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

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

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

(35) Chang, Y.S., Wang, S.C., Tsao, C.C., Huang, F.L.: Molecular cloning, structural analysis, and expression of carp ZP3 gene. Mol Reprod Dev (44), 295-304, 1996.

(36) Clark, G.F., Patankar, M.S., Hinsch, K.-D., Oehninger, S.: New concepts in human sperm-Zona pellucida interaction. Hum Reprod (10) Suppl. 1, 31-37, 1995.

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

(38) Dandekar, P., Mate, K.E., Talbot, P.: Perivitelline space of marsupial oocytes: extracellular matrix of the unfertilized oocyte and formation of a cortical granule envelope following the cortical reaction. Mol Reprod Dev (41), 368-373, 1995.

(39) Darszon, A., Labarca, P., Nishigashi, T., Espinosa, F.: Ion channels in sperm physiology. Physiol Rev (2), 481-510, 1999.

(40) Domagala, A., Kasprzak, M., Kurpisz, M.: Immunologic response against spermatozoa in the human genital tract. Ginekol Pol (6), 304-308, 1996.

(41) 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.

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

(43) Dunbar, B.S., Raynor, B.D.: Characterization of porcine Zona pellucida antigens. Biol Reprod (22), 941-954, 1980.

(44) 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, 1983.

(45) 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, 1991.

(46) 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.

(47) Dunbar, B.S., Prasad, S., Carino, C., Skinner, S.M.: The ovary as an immune target. Journal of Soc. Gynecol. Investigation (1 Suppl. Proceedings), 43-48, 2001.

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

(49) East I.J., Mattison, D.R., Dean, J.: Monoclonal antibodies to the major protein of the murine Zona pellucida: effects on fertilization and early development. Dev Biol (104), 49-56, 1984.

(50) East, I.J., Gulyas, B.J. Dean, J.: Monoclonal antibodies to the murine Zona pellucida protein with sperm receptor activity: effects on fertilization and early development. Dev Biol (109), 268-273, 1985.

(51) Eberspaecher, U., Becker, A., Bringmann, P., van der Merwe, L., Donner, P.: Immunohistochemical localization of Zona pellucida proteins ZPA, ZPB und ZPC in human, Cynomolgus monkey and mouse ovaries. Cell Tissue Res (2), 277-287, 2001.

(52) 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, 1994.

(53) El-Mestrah, M., Castle, P.E., Borossa, G., Kan, F.W.: Subcellular distribution of ZP1, ZP2 and ZP3 glycoproteins during folliculogenesis and demonstration of their topographical disposition within the zona matrix of mouse ovarian oocytes. Biology of Reproduction (4), 866-876, 2002.

(54) Endo, Y., Lee, M.A., Kopf, G.S.: Evidence for the role of a guanine nucleotide-binding regulatory protein in the Zona pellucida-induced mouse sperm acrosome reaction. Dev Biol (119), 210-216, 1987.

(55) Epifano, O., Dean, J.: Biology and structure of the Zona pellucida: a target for immuncontraception. Reprod Fertil Dev (6), 319-330, 1994.

(56) Epifano, O., Liang, L.-F., Dean, J.: Mouse ZP1 encodes a Zona pellucida protein homologous to egg envelope proteins in mammals and fish. J Biol Chem (270), 27254-27258, 1995a.

(57) Epifano, O., Liang, L.F., Familari, M., Moos, M.C., Dean, J.: Coordinate expression of the three Zona pellucida genes during mouse oogenesis. Development (121), 1947-1956, 1995b.

(58) 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, 1991.

(59) Evans, J.P.: Fertilin beta and other ADAMs as integrin ligands. Insights into cell adhesion and fertilization. Bioessays (7), 628-639, 2001

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

(61) Fisher, H.M., Brewis, I.A., Barrat C.L., Cookr, I.D., Moore, H.D.: Phosphoinositide 3-kinase is involved in the induction of the human sperm acrosome reaction downstream of tyrosine phosphorylation. Mol Hum Reprod (9), 849-855, 1998.

(62) 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.

(63) Florman, H.M., Wassarman, P.M.: O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. Cell (41), 313-324, 1985.

(64) Franken, D.R., Coddington, C.C., Burkman, L.J., Oosthuizen, W.T., Oehninger, S.C., Kruger, T.F., Hodgen, G.D.: Defining the valid hemizona assay: accounting for binding variability within zonae pellucidae and within semen samples from fertile males. Fertil Steril (56), 1156-1161, 1991.

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

(66) Fusi, F.M., Vignali, 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.

(67) Gordts, S., Vercruyssen, M., Roziers, P., Bassil, S., Demylle, D., Donnez, J., Campo, R.: Recent developments in assisted fertilization. Hum Reprod (10) Suppl. 1, 107-114, 1995.

(68) Greve, J.M., Salzmann, G.S., Roller, R.J., Wassarman, P.M.: Biosynthesis of the major Zona pellucida glycoprotein secreted by oocytes during mammalian oogenesis. Cell (31), 749-759, 1982.

(69) 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.

(70) Grootenhuis, A.J., Philipsen, H.L.A., Debreetgrijsbach, J.T.M., van Duin, M.: Immunocytochemical localization of ZP3 in primordial follicles of rabbit, marmoset, rhesus monkey, and human ovaries using antibodies against human ZP3. J Reprod Fertil (Suppl.), 43-54, 1996.

(71) Gupta, S.K., Yurewicz, E.C., Afzalpurkar, A., Rao, K.V.S., Gage, D.A., Wu, H., Sacco, A.G.: Localization of epitopes for monoclonal antibodies at the N-terminus of the porcine Zona pellucida glycoprotein pZPC. Mol Reprod Dev (42), 220-225, 1995.

(72) Gupta, S.K., Chadha, K., Harris, J.D., Yurewicz, E.C., Sacco, A.G., Kolluri, S.K., Afzalpurkar, A.: Mapping of epitopes on porcine Zona pellucida-3 alpha by monoclonal antibodies inhibiting oocyte-sperm interaction. Biol Reprod (55), 410-415, 1996.

(73) Gupta, S.K., Jethanandani, P., Afzalpurkar, A., Kaul, R., Santhanam, R.: Prospects of Zona pellucida glycoproteins as immunogen for contraceptive vaccine. Hum Reprod Update (4), 311-324, 1997.

(74) Gwatkin, R.B.L., Andersen, O.F., Williams, D.T.: Large scale isolation of bovine and pig zonae pellucidae: chemical, immunological, and receptor properties. Gam Res (3), 217-231, 1980.

(75) Haidl, G., Schill, W.-B.: Andrologische Untersuchungsmethoden und Therapieprinzipien beim männlichen Sterilitätsfaktor. Gynäkologe (23), 203-208, 1990.

(76) 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 Sequence (4), 361-393, 1994.

(77) Harrison, R.A.P.: Capacitation mechanisms and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. Reprod Fertil Dev (8), 581-594, 1996.

(78) Hasegawa, A., Koyama, K., Isojima, S.: Isolation of four major glycoprotein families (ZP1, ZP2, ZP3, ZP4) of porcine Zona pellucida and characterization of antisera raised to each glycoprotein family. Acta Obst Gynaec Jpn (43), 221-226, 1991.

(79) Hasegawa, A., Yamasaki, N., Inoue, M., Koyama, K., Isojima, S.: Analysis of an epitope sequence recognized by a monoclonal antibody MAk-5H4 against a porcine Zona pellucida glycoprotein (pZP4) that blocks fertilization. J Reprod Fertil (105), 295-302, 1995.

(80) Hasegawa, A., Hamada, Y., Shigeta, M., Koyama, K.: Contraceptive potential of synthetic peptides of Zona pellucida protein (ZPA). Journal of Reproductive Immunology (1-2), 91-108, 2002.

(81) Hatanaka, Y., Nagai, T., Tobita, T., Nakano, M.: Changes in the properties and composition of the Zona pellucida of pigs during fertilization in vitro. J Reprod Fertil (95), 431-440, 1992.

(82) Hedrick, J.L., Wardrip, N.J.: Isolation of the Zona pellucida and purification of its glycoprotein families from pig oocytes. Analyt Biochem (157), 63-70, 1986.

(83) Henderson, C.J., Hulme, M.J., Aitken, R.J.: Contraceptive potential of antibodies to the Zona pellucida. J Reprod Fertil (83), 325-343, 1988.

(84) Hinsch, K.D., Tychowiecka, I., Gausepohl, H., Frank, R., Rosenthal, W., Schultz, G.: Tissue distribution of beta 1- and beta 2-subunits of regulatory guanine nucleotide-binding proteins. Biochem Biophys Acta (1), 60-70, 1989.

(85) Hinsch, K.-D., Hinsch, E., Meinecke, B., Töpfer-Petersen, E., Pfisterer, S., Schill, W.-B.: Identification of mouse ZP3 protein in mammalian oocytes with antisera against synthetic ZP3 peptides. Biol Reprod (51), 193-204, 1994a.

(86) Hinsch, E., Hinsch, K.-D.: Generation of antisera against mouse and human synthetic ZP3 peptides. Andrologia (28) Suppl. 1, 9-14, 1996.

(87) Hinsch, E., Ponce, A.A., Hägele, W., Hedrich, F., Müller-Schlösser, F., Schill, W.-B., Hinsch, K.-D.: A new combined in-vitro test model for the identification of substances affecting essential sperm functions. Hum Reprod (12), 1673-1681, 1997.

(88) Hinsch, E., Hägele, W., van der Ven, H., Oehninger, S., Schill, W.B., Hinsch, K.D.: Immunological identification of Zona pellucida 2 (ZP2) protein in human oocytes. Andrologia (4-5), 281-287, 1998.

(89) Hinsch, E., Hägele, W., Bohle, R.M., Schill, W.B., Hinsch, K.D.: Evaluation of ZP2 domains of functional importance with antisera against synthetic ZP2 peptides. J Reprod Fertil (2), 245-251, 1998.

(90) Holt, W.V.: The sperm plasma membrane, in: P. Fénichel, J. Parinaud (eds.): Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM (236) / John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge, 1995.

(91) Howes, E., Pascal, J.C., Engel, W., Jones, R.: Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin, a mechanism for secondary binding of sperm to the Zona pellucida during fertilization. J Cell Sci (Pt 22), 4127-4136, 2001.

(92) Howes, L., Jones, R.: Interactions between Zona pellucida glycoproteins and sperm proacrosin/acrosin during fertilization. J. Reprod. Immunol. (53), 181-192, 2002.

(93) Ikeda, K., Yonezawa, N., Naoi, K., Katsumata, T. Hamano, S., Nakano, M.: Localization of N-linked carbohydrate chains in glycoprotein ZPA of the bovine egg Zona pellucida. Eur J Biochem (17), 4257-4266, 2002.

(94) Jaffe, L.A., Sharp, A.P., Wolf, D.P.: Absence of an electrical polyspermy block in the mouse. Dev Biol (96), 317-323, 1983.

(95) Jones, W.R.: Gamete immunology. Hum Reprod (9), Suppl. 2, 107-124, 1994.

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

(97) Kinloch, R.A., Roller, R.J., Fimiani, C.M., Wassarmann, D.A., Wassarman, P.M.: Primary structure of the mouse sperm receptor polypeptide determined by genomic cloning. Proc Natl Sci USA (17), 6409-6413, 1988.

(98) Kirkman-Browm, J.C., Bray, C., Stewart, P.M., Barrat, C.L., Publicover, S.J.: Biphasic evaluation of [CA(2+)] (i) in individual human spermatozoa exposed to progesterone. Dev Biol (2), 326-335, 2000.

(99) Kobori, H., Miyazaki, S., Kuwabara, Y.: Characterization of intracellular Ca (2+) increase in response to progesterone and cyclic nucleotides in mouse spermatozoa. Biol Reprod (1), 113-120, 2000.

(100) Kopf, G.S., Woolkalis, M.J., Gerton, G.L.: Evidence for a guanine nucleotide-binding regulatory protein in invertebrate and mammalian sperm: Identification by islet-activating protein catalyzed ADP-ribosylation and immunochemical methodes. J Biol Chem (261), 7327-7331, 1986.

(101) 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, 1991.

(102) Koyama, K., Hasegawa, A., Inoue, M., Taya, T., Tsubamoto, H., Yamasaki, N.: Studies on the epitope of pig Zona pellucida recognized by a fertilization blocking monoclonal antibody. J Reprod Fertil (Suppl.), 135-142, 1996.

(103) Krchnak, V., Mach, O., Maly, A.: Computer prediction of potential immunogenic determinants from protein amino acid sequence. Anal Biochem (165), 200-207, 1987.

(104) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. Nature (227), 680-685, 1970.

(105) 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.

(106) Lee, M.A., Trucco, G.S., Bechtol, K.B. Wummer, N., Kopf, G.S., Blasco, L., Storey, B.T.: Capacitation and acrosome reaction in human spermatozoa monitored by chlortetracycline fluorescence assay. Fertil Steril (48), 649-658, 1987.

(107) Lee, V.H., Dunbar, B.S.: Development expression of the rabbit 55 kDa Zona pellucida protein and messenger RNA in ovarian follicles. Dev Biol (155), 371-382, 1993.

(108) Leyton, L., Saling, P.: Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. J Cell Biol (108), 2163-2168, 1989a.

(109) Leyton, L., Saling, P.: 95 kDa sperm proteins binds ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. Cell (57), 1123-1130, 1989b.

(110) 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.

(111) 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.

(112) 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.

(113) Lo-Leggio, L., Williams, R.M., Jones, R.: Some effects of Zona pellucida glycoproteins and sulfated polymers on the autoactivation of boar sperm proacrosin and activity of beta-acrosin. J Reprod Fertil (100), 177-185, 1994.

(114) Lou, Y.H., Ang, J., Thai, H., McElveen, F., Tung, K.S.K.: A Zona pellucida 3 peptide vaccine induces antibodies and reversible infertility without ovarian pathology. J Immunol (155), 2715-2720, 1995.

(115) Lou, Y.H., Bagavant, H., Ang, J., McElveen, M.F., Thai, H., Tung, K.S.K.: Influence of autoimmune ovarian disease pathogenesis on ZP3 contraceptive vaccine design. J Reprod Fertil (Suppl.), 159-163, 1996.

(116) Lunsford, R.D., Jenkins, N.A., Kozak, C.A., Liang, L.-F., Silan, C.M., Copeland, N.G., Dean, J.: Genomic mapping of murine Zp-2 and Zp-3, two oocyte-specific loci encoding Zona pellucida proteins. Genomics (6), 184-187, 1990.

(117) Lyons, C.E., Payette, K.L., Price, J.L., Huang, R.-C.: Expression and structural analysis of a teleost homolog of a mammalian Zona pellucida gene. J Biol Chem (268), 21351-21358, 1993.

(118) Mahi-Brown, C.A., Moran, F.: Response of cynomolgus macaques to immunization against a synthetic peptide from the human Zona pellucida. J Med Primatol (24), 258-270, 1995.

(119) Maier, B.: Ethische Wertvorstellungen zu assistierter Fortpflanzungshilfe und Reproduktionsmedizin im deutschsprachigen Raum, in: F.H. Fischl (ed.): Kinderwunsch. In Vitro Fertilisierung und Assistierte Reproduktion - Neue Erkenntnisse und Therapiekonzepte. Möglichkeiten, Erfüllbarkeit und Machbarkeit in unserer Zeit. Krause & Pachernegg GmbH, Wien, 1995.

(120) Maresh, G.A., Dunbar, B.S.: Antigenic comparison of five species of mammalian zonae pellucidae. J Exp Zool (244), 299-307, 1987.

(121) Melendrez, C.S., Meizel, S.: Studies of porcine and human sperm suggesting a role for a sperm glycine receptor/Cl^- channel in the Zona pellucida-initiated acrosome reaction. Biol Reprod (53), 676-683, 1995.

(122) Michelmann, H.W., Bogdan, A., Hinney, B.: Micromorphometry and spermatozoa binding patterns of fertilized and unfertilized human oocytes after in-vitro fertilization. Hum Reprod (10), 3154-3160, 1995.

(123) Millar, S.E., Chamow, S.M., Baur, A.W., Oliver, C., Robey, F., Dean, J.: Vaccination with a synthetic Zona pellucida peptide produces long-term contraception in female mice. Science (246), 935-938, 1989.

(124) Moller, C.C., Wassarman, P.M.: Characterization of a proteinase that cleaves Zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. Dev Biol (132), 103-112, 1989.

(125) Moore, K.L.: Embryologie. Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen, 2. Auflage. F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1985.

(126) Moore, G.D., Kopf, G.S., Schultz, R.M.: Complete mouse egg activation in the absence of sperm by stimulation of an exogenous G protein-coupled receptor. Dev Biol (159), 669-678, 1993.

(127) Moore, H.D.M.: Modification of sperm membrane antigens during capacitation, in: P. Fénichel, J. Parinaud (eds.): Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM (236) / John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge, 1995.

(128) Murata, K., Sasaki, T., Kasumasu, S., Iuchi, I., Enami, J., Yasumasu, I., Yamagami, K.: Cloning of cDNAs for the precursor protein of a low-molecular-weight subunit of the inner layer of the egg envelope (chorion) of the fish *Oryzias latipes*. Dev Biol (167), 9-17, 1995.

(129) 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 USA (91), 4195-4198, 1994.

(130) Naz, R.K.: Role of membrane tyrosine kinases in human sperm function, in: P. Fénichel, J. Parinaud (eds.): Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM (236) / John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge, 1995.

(131) Naz, R.K., Sacco, A., Singh, O., Pal, R., Talwar, G.P.: Development of contraceptive vaccines for humans using antigens derived from gametes (spermatozoa and Zona pellucida) and hormones (human chorionic gonadotrophin): current status. Hum Reprod Update (1), 1-18, 1995.

(132) Nichols, J., Gardner, R.L.: Effect of damage to the Zona pellucida on development of preimplantation embryos in the mouse. Hum Reprod (4), 180-187, 1989.

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

(134) 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.

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

(136) Omu, A.E., al-Quattan, F., Ismail, A.A., al-Taher, S., al-Busiri, N.: Relationship between unexplained infertility and human leukocyte antigens and expression of circulating autogeneic an allogeneic antisperm antibodies. Clin Exp Obst Gynecol (3-4), 199-202, 1999.

(137) Paradisi, R., Bellavia, E., Pession, A., Venturoli, S., Flamigni, C.: Characterization of human sperm antigens reacting with sperm antibodies from autologous serum and seminal plasma in an infertile population. Biol Reprod (1), 54-61, 1996.

(138) Paterson, M., Wilson, M.R., van Duin, M., Aitken, J.R.: Evaluation of the contraceptive potential of recombinant marmoset ZP3 and an immunodominant marmoset ZP3 peptide. J Reprod Fertil (Abstr. Series 18), 30, 1996a.

(139) Paterson, M., Wilson, M.R., van Duin, M., Aitken, R.J.: Evaluation of Zona pellucida antigens as potential candidates for immunocontraception. J Reprod Fertil (Suppl.), 175-182, 1996b.

(140) Paterson, M., Wilson, M., Jennings, Z., van Duin, M., Aitken, J.: Design and evaluation of a ZP3 peptide vaccine in a homologous primate model. Mol Hum Reprod, (4), 342-352, 1999.

(141) Paterson, M., Jennings, Z.A., Wilson, M.R., Aitken R.J.: The contraceptive potential of ZP3 and ZP3 peptides in a primate model. Journal of Reproductive Immunology, (1-2), 99-107, 2002.

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

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

(144) Propping, D., Tauber, P.F., Zaneveld, L.J.D.: Fertilization and implantation, in: H. Ludwig, P.F. Tauber (eds.): Human Fertilization. Thieme, Stuttgart, 1978.

(145) Rankin, T., Familari, M., Lee, E., Ginsberg, A., Dwyer, N., Blanchettemackie, J., Drago, J., Westphal, H., Dean, J.: Mice homozygous for an insertional mutation in the ZP3 gene lack a Zona pellucida and are infertile. Development (122), 2903-2910, 1996.

(146) Rankin,T., Tong, Z., Castle, P., Lee, E., Gore-Langton, R., Nelson, L., Dean, J.: Human ZP§ restores fertility in ZP3 null mice without affecting order-specific sperm binding. Development (13), 2414-2424, 1998.

(147) Rankin, T.L., O´Brian, M., Lee, E., Wigglesworth, K., Eppig, J., Dean, J.: Defective zonae pellucidae in ZP2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. Development (7), 1119-1129, 2001.

(148) Romeis, B.: Mikroskopische Technik, 16. Auflage. R. Oldenbourg Verlag, München, 1968.

(149) Rüsse, I., Sinowatz, F.: Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. Parcy, Berlin/Hamburg, 1991.

(150) Sacco, A.G.: The Zona pellucida: current status as a candidate antigen for contraceptive vaccine development. Am J Reprod Immunol Microbiol (15), 122-130, 1987.

(151) Sacco, A.G., Yurewicz, E.C.: Assessment of synthetic peptides from porcine zona glycoproteins ZP3 alpha and ZP3 beta for contraceptive vaccine development, in: G.P. Talwar, K.V.S. Rao, V.S. Chauhan (eds.): Recombinant and synthetic vaccines. Narosa Publishing House, New Delhi, 1994.

(152) 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.

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

(154) 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, 1995.

(155) Salzmann, G.S., Greve, J.M., Roller, R.J., Wassarman, P.M.: Biosynthesis of the sperm receptor during oogenesis in the mouse. EMBO J (2), 1451-1456, 1983.

(156) 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 ZP2 to $ZP2_f$ during spontaneous mouse oocyte maturation in vitro in the absence of serum. Biol Reprod (43), 891-897, 1990.

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

(158) Shabanowitz, R.B., O'Rand, M.G.: Molecular changes in the human Zona pellucida associated with fertilization and human sperm receptor. Ann NY Acad Sci, 621-632, 1988b.

(159) Shimizu, S., Tsuji, M., Dean, J.: In vitro synthesis of three sulfated glycoproteins of murine zonae pellucidae by oocytes grown in follicle culture. J Biol Chem (258), 5858-5863, 1983.

(160) Soloy, E., Srsen, V., Pavlok, A., Hyttel, P., Thomsen, P.D., Procházka, R., Kubelka, M., Smith, S.D., Høier, R., Motlik, J., Greve, T.: The block against sperm penetration in parthenogenetically activated bovine oocytes. J Reprod Fertil (Abstr. Series 18), 7, 1996.

(161) Stevens, R.W. III: Basic spermatozoon anatomy and physiology for the clinican, 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, 1990.

(162) Storey, B.T.: Interactions between gametes leading to fertilization: the sperm`s view. Reprod Fertil Dev (7), 927-942, 1995.

(163) Stoyka, B., Domagala, A., Kurpisz, M.: Molecular targets for immunocontraception. Arch Immunol Ther Exp, (1), 45-49, 2003.

(164) Sun, W., Lou, Y.H., Dean, J., Tung, K.S.: A contraceptive peptide vaccine targeting sulphated glycoprotein ZP2 of the mouse Zona pellucida. Biol Reprod (4), 900-907, 1999.

(165) Takagi, J., Dobashi Araki, M.D.Y., Imai, Y., Hiroi, M., Tonosaki, A., Sendo, F.: The development of porcine Zona pellucida using monoclonal antibodies: II. Electron microscopy. Biol Reprod (40), 1103-1108, 1989.

(166) Takahashi, Y., Bigler, D., Ito, Y., White, J.M.: Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 3 and murine eggs: Role of beta 1 integrin-associated protein CD9, CD81 and CD98. Mol Biol Cell (4), 809-820, 2001.

(167) Tong, Z.B., Nelson, L.M., Dean, J.: Inhibition of Zona pellucida gene expression by antisense oligonucleotides injected into mouse oocytes. J Biol Chem (270), 849-853, 1995.

(168) Topper, E.K:, Kruijt, L., Calvete, J., Mann, K., Töpfer-Petersen, E., Woelders, H.: Identification of bovine Zona pellucida glycoproteins. Mol Reprod Dev (3), 344-350, 1997.

(169) Totzauer, I., Kolle, S., Sinowatz, F., Plendl, J., Amselgruber, W., Töpfer-Petersen, E.: Localization of the zona glycoproteins ZPB (ZP3 alpha) and ZPC (ZP3 beta) in the bovine ovary during pre- and postnatal development. Anat Anz (1), 37-43, 1998.

(170) Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. J Proc Natl Acad Sci USA (76), 4350-4354, 1979.

(171) Tsubamoto, H., Hasegawa, A., Nakata, Y., Naito, S., Yamasaki, N., Koyama, K.: Expression of recombinant Zona pellucida protein 2 and its binding capacity to speermatozoa. Biol Reprod, (6), 1649-1654, 1999.

(172) Tulsiani, D.R.P., Nagdas, S.K., Cornwall, G.A., Orgebin-Crist, M.-C.: Evidence for the presence of high-mannose/hybrid oligosaccharide chain(s) on the mouse ZP2 and ZP3. Biol Reprod (46), 93-100, 1992.

(173) van Duin, M., Polman, J.E., Verkoelen, C.C., Bunschoten, H., Meyerink, J.H., Olijve, W., Aitken, R.J.: Cloning and characterization of the human sperm receptor ligand ZP3: evidence for a second polymorphic allele with a different frequency in the Caucasian and Japanese populations. Genomics (14), 1064-1070, 1992.

(174) Ward, C.R., Storey, B.T., Kopf, G.S.: Selective activation of Gi1 and Gi2 in mouse sperm by the Zona pellucida, the egg's extracellular matrix. J Biol Chem (269), 13254-13258, 1994.

(175) Wassarman, P.M., Bleil, J.D., Florman, H.M., Greve, J.M., Roller, R.J., Salzmann, G.S., Samuels, F.G.: The mouse egg's receptor for sperm: What is it and how does it work? Cold Spring Harb Symp Quant Biol (50), 11-19, 1985.

(176) Wassarman, P.M.: The biology and chemistry of fertilization. Science (235), 553-560, 1987a.

(177) Wassarman, P.M.: Zona pellucida glycoproteins. Annu Rev Biochem (57), 415-442, 1988.

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

(179) 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, 1994.

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

(181) Wassarman, P.M.: Fertilization in animals. Dev Genet (2), 83-86, 1999.

(182) WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion, 4. Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1999.

(183) Williams, C.J., Schultz, R.M., Kopf, G.S.: Role of G proteins in mouse egg activation: Stimulatory effects of acetylcholine on the ZP2 to $ZP2_f$ conversion and pronuclear formation in eggs expressing a functional m1 muscarinic receptor. Dev Biol (151), 288-296, 1992.

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

(185) Wolgemuth, D., Celenza, J., Dunbar, B.S.: Formation of the rabbit Zona pellucida and its relationship to ovarian follicular development. Dev Biol (106), 1-14, 1984.

(186) Yanagimachi, R., Usui, N.: Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. Exp Cell Res (89), 161-174, 1974.

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

(188) Zhang, X., Lou, Y.-H., Koopman, M., Doggett, T., Tung, K.S.K., Curtiss, R.: Antibody responses and infertility in mice following oral immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* expressing recombinant murine ZP3. Biol Reprod (56), 33-41, 1997.

8 Anhang

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten	
Name	Gröger
Vornamen	Sabine, Elisabeth
Geburtsdatum/-ort	06.02.1970, Marburg-Wehrda
Anschrift	35394 Gießen, Adalbert-Stifter-Straße 1
Schulbildung	
08/1976 - 06/1980	Grundschule in Gladenbach-Mornshausen
08/1980 - 06/1989	Freiherr vom Stein Gesamtschule Gladenbach Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Berufsausbildung	
09/1989 – 10/1991	Ausbildung zur Medizinisch technischen Laboratoriums-assistentin in der staatlichen Lehranstalt für Medizinisch Technische Assistenten am Klinikum der Justus-Liebig-Universität in Gießen Abschluss: Staatsexamen
Berufliche Tätigkeit	
11/1991 - 04/ 1996	Tätigkeit als Medizinisch Technische Laboratoriums-assistentin im Reproduktionsbiochemischen Forschungs-labor im Zentrum für Dermatologie und Andrologie der JLU Gießen
04/1996 – 05/2003	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
11/1999 – 10/2002	Mitgliedschaft als Kollegiatin im DFG Graduiertenkolleg „Zell-Zell Interaktion im Reproduktionsgeschehen“
03/1998	Absolvierung der Ärztlichen Vorprüfung
03/2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2002 – 03/2003	Medizinisch Praktisches Jahr an der JLU Gießen
05/2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Anhang

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Elvira Hinsch und Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Hinsch für die ausgezeichnete Betreuung während meiner Dissertation, sowohl in wissenschaftlicher wie auch in menschlicher Hinsicht, und die stete Bereitschaft zur Unterstützung, Ratschlag und Hilfestellung im Rahmen der Doktorarbeit und darüber hinaus.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. W.-B. Schill für die Bereitstellung sämtlicher für die Dissertation notwendiger Räumlichkeiten, Geräte und Materialien.

Herzlichen Dank an alle Mitarbeiter des Labors Dres. Hinsch der Reproduktionsbiochemie für ihre freundliche Unterstützung und ihren Rat, insbesondere Wolfgang Hägele, Jana Böhm, Viviana Aires, Lutz Konrad, Anika Brummer und Katja Bogner.

Ich danke Frau Dr. Penelope Nayudu und Nicole Umland vom Deutschen Primatenzentrum in Göttingen.

Ich danke meinen Eltern für ihre Geduld.