

Das Zusammenspiel der Proteasen Akrosin und Ovastacin
bei der Härtung der *Zona pellucida*

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von:

MICHAEL KUSKE

geboren am 27.07.1990 in Altdorf b. Nürnberg

Mainz, den 26.03.2020

Gutachter:

Dekan: Prof. Dr.

1. Berichterstatter: Prof. Dr.

2. Berichterstatter: Prof. Dr.

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2020

„Ergründe, wie die Dinge selbst sind, indem du sie zerlegst in Stoff, Ursache, Zweck.“

-MARCUS AURELIUS-

Zusammenfassung

Die *Zona pellucida* umgibt die Eizellen von Säugetieren und ist in der Maus aus den *Zona pellucida* Proteinen 1-3 aufgebaut. Diese Proteine vermitteln vor der Befruchtung den ersten Kontakt von Spermium und Eizelle. Nach der Befruchtung verhindert die *Zona pellucida* die Passage weiterer Spermien und schützt die Entwicklung des frühen Embryos.

Ovastacin ist eine zinkabhängige Metalloproteinase der Astacinfamilie. Es wird direkt nach der Befruchtung aus den Kortikalgranula der Säugereizelle freigesetzt und spaltet spezifisch das *Zona pellucida* Protein 2 (ZP2), wodurch der Spermienrezeptor zerstört wird. Gleichzeitig verhärtet diese extrazelluläre Matrix und schützt somit den Embryo auf seinem Weg in den Uterus. Ovastacin wird als inaktives Zymogen exprimiert und liegt in den kortikalen Granula als Gemisch von inaktivem Zymogen und aktiviertem, reifem Ovastacin vor. Als Aktivatoren wurden Serinproteasen mit tryptischer Spezifität, wie z.B. Plasmin identifiziert.

Die Regulation der Ovastacinaktivität ist essenziell für die Fruchtbarkeit. Einerseits verursacht der Verlust des endogenen Ovastacin-Inhibitors Fetuin-B eine verfrühte Härtung der *Zona pellucida* und führt so zu weiblicher Infertilität. Andererseits weisen Ovastacin-defiziente Mäuse um 50% verkleinerte Wurfgrößen auf.

Akrosin ist eine Trypsin-ähnliche Serinproteinase aus dem Akrosom von Spermien. Es wird im Zuge der Akrosomreaktion, die in der Nähe der Eizelle stattfindet, freigesetzt. Die Funktion des Akrosins konnte auch vier Jahrzehnte nach seiner Entdeckung nicht abschließend aufgeklärt werden. Die Ablation des Enzyms vermindert die Befruchtungsfähigkeit von Mäusespermien, führt aber nicht zur Unfruchtbarkeit. Akrosin wird mit der Lyse der *Zona pellucida* assoziiert sowie mit der Bindung der Spermien an die *Zona pellucida* über Zuckerreste.

Hier sollte untersucht werden, ob sich die drei Proteine Ovastacin, Akrosin und Fetuin-B untereinander beeinflussen und welche Veränderungen sie in der *Zona pellucida* verursachen.

Ich konnte zeigen, dass Akrosin rekombinantes Ovastacin aktivieren kann, sodass es in die Lage versetzt wird, sein natives Substrat ZP2 zu prozessieren. Akrosin selbst spaltet alle drei *Zona pellucida* Proteine, bevorzugt jedoch ZP2 und zwar an einer ähnlichen Position wie Ovastacin. Die Spermienbindung wird durch den Akrosinschnitt nicht verhindert. Aktives rekombinantes Ovastacin und Akrosin erhöhen beide die Resistenz der *Zona pellucida* gegen Abbau durch α -Chymotrypsin. Akrosin ist außerdem in der Lage, rekombinantes Fetuin-B zu spalten. Das proteolytisch prozessierte Protein inhibiert Ovastacin mindestens 10-mal schlechter als die ungespaltene Kontrolle.

In der Summe geben die Ergebnisse neuen Einblick in die Regulation der Veränderungen der *Zona pellucida* nach der Befruchtung. Es werden neue physiologisch relevante Möglichkeiten zur Regulation der Ovastacinaktivität aufgezeigt, die sich aus dem Zusammenspiel von Akrosin und Fetuin-B und der Aktivierung von Ovastacin durch Akrosin ergeben.

Abstract

The *zona pellucida* surrounds the mammalian egg and consists in mice of the *zona pellucida* proteins 1-3. These proteins confer the first contact of sperm and egg before fertilization. After fertilization the *zona pellucida* blocks sperm passage and protects development of the early embryo.

Ovastacin is a zinc dependent metalloproteinase of the astacin family. It is released instantaneously after fertilization from the cortical granules of the mammalian egg and specifically cleaves *zona pellucida* protein 2 (ZP2), which destroys the sperm receptor. At the same time this extracellular matrix “hardens” and by this protects the embryo on its way to the uterus. Ovastacin is expressed as a zymogen and stored in cortical granules as a mixture of inactive zymogen and active, mature ovastacin. Serinproteinases with trypsin-like specificity like e.g. plasmin have been identified as activators.

Regulation of ovastacin activity is essential for fertility. On one hand, loss of its endogenous inhibitor fetuin-B and the resulting premature “hardening” of the *zona pellucida* causes female infertility. On the other hand, ovastacin-deficient mice show litter size reduction by 50 %.

Acrosin is a trypsin-like serine proteinase found in the acrosome of sperm. It is released during the acrosome reaction, which takes place in the vicinity of the oocyte. Even four decades after discovery the function of acrosin is not conclusively elucidated. Ablation of the enzyme reduces fertilization capability of mouse sperm, but does not cause infertility. It is associated with lysis of the *zona pellucida* and sperm-binding to the *zona pellucida* using sugar residues.

In this work interplay between the three proteins ovastacin, acrosin and fetuin-B and their effect on the *zona pellucida* is to be examined.

I have shown here that acrosin can activate recombinant ovastacin, which then is capable of cleaving its native substrate ZP2. Acrosin itself cleaves all three *zona pellucida* proteins. ZP2 is cleaved preferably and in its N-terminal region. The cleavage occurs therefore at a similar position as the cleavage caused by ovastacin. Cleavage by acrosin does not interfere with sperm binding. Both active recombinant ovastacin and acrosin increase the resistance of the *zona pellucida* against degradation by α -chymotrypsin. Acrosin is furthermore able to cleave recombinant fetuin-B. The proteolytically processed protein inhibits ovastacin at least ten times less than the untreated control.

Together these findings provide insight in the regulation of the changes in the *zona pellucida* after fertilization. New physiologically relevant possibilities for regulation of ovastacin activity through the interplay of acrosin and fetuin-B and through activation of ovastacin by acrosin have been shown.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	i
Abstract.....	iii
Abbildungsverzeichnis.....	viii
Tabellenverzeichnis.....	x
Formelverzeichnis.....	x
1. Einleitung.....	1
1.1. Gametogenese.....	1
1.1.1. Spermiogenese.....	1
1.1.1.1. Akrosom und Akrosomreaktion.....	3
1.1.2. Oogenese.....	3
1.1.2.1. Entstehung der Kortikalgranula.....	4
1.1.2.2. <i>Zona pellucida</i>	5
1.2. Befruchtung.....	7
1.2.1. Spermien-Ei-Interaktion.....	8
1.2.2. Kortikalreaktion.....	8
1.3. Für die Fortpflanzung relevante Proteasen.....	10
1.3.1. Ovastacin.....	10
1.3.2. Akrosin.....	16
1.4. Fragestellung.....	18
2. Material und Methoden.....	19
2.1. Geräte und Materialien.....	19
2.2. Chemikalien.....	19
2.3. Verwendete Proteine.....	20
2.3.1. Antikörper.....	20
2.3.2. Akrosin.....	21
2.3.3. Rekombinante Proteine.....	21
2.3.4. Reinigung der rekombinanten Proteine.....	22
2.4. Proteinbiochemie.....	23

2.4.1.	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen durch UV/Vis Spektroskopie	23
2.4.2.	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen mit BCA und Kupfer	23
2.4.3.	Proteintrennung in der Na-dodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
2.4.4.	Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue	25
2.4.5.	<i>Western blot</i> und immunologischer Nachweis mit Chemielumineszenz.	25
2.4.6.	Signalquantifizierung von gefärbten SDS-Gelen und Membranen.....	26
2.5.	Enzymkinetik.....	26
2.5.1.	Allgemeiner Versuchsaufbau.....	27
2.5.2.	Aktivierung von Proovastacin.....	28
2.5.3.	Hemmkinetik von Fetuin-B nach Spaltung durch Akrosin	28
2.6.	Versuche mit murinen Eizellen und Spermien.....	29
2.6.1.	Tiere	29
2.6.2.	Superovulation der Spendermäuse.....	29
2.6.3.	Vorbereitung der Medien und Geräte	30
2.6.4.	Präparation der Eizellen.....	32
2.6.5.	Präparation und Kapazitation der Spermien	32
2.6.6.	Präparation der <i>Zonae pellucidae</i>	32
2.6.7.	Eizellen im Transmissionselektronenmikroskop.....	33
2.6.8.	Inkubation von Eizellen und <i>Zonae</i> mit Spermien und Proteasen.....	34
2.6.9.	<i>Zona pellucida</i> Abbau mit α -Chymotrypsin.....	35
2.7.	Bioinformatik.....	36
2.7.1.	Alignments.....	36
2.7.2.	Strukturmodelle.....	36
3.	Ergebnisse	37
3.1.	Alignment und Homologiemodell von β -Akrosin aus Maus und Eber	37
3.2.	Quantifizierung der Ovastacinmenge pro Eizelle.....	39
3.3.	Nachweis von Ovastacin in Eizellen durch Transmissionselektronenmikroskopie	42
3.4.	Isofluran verursacht die parthenogenetische Aktivierung von Eizellen.....	44

3.5.	Rekombinantes Ovastacin spaltet natives <i>Zona pellucida</i> Protein 2	46
3.6.	Spermien setzen Akrosin ins Kapazitationsmedium frei	48
3.7.	Akrosin schneidet rekombinantes Fetuin-B	48
3.8.	Akrosin aktiviert rekombinantes Proovastacin	51
3.9.	Akrosin schneidet <i>Zona pellucida</i> Proteine	54
3.10.	Akrosin und Ovastacin im Gemisch verzögern den Abbau der <i>Zona pellucida</i> 61	
4.	Diskussion	63
4.1.	Vergleich von Akrosin aus Maus und Schwein	63
4.2.	Aktivierung von Eizellen durch Isofluran	64
4.3.	Eine Eizelle enthält ca. 1,25 fmol Ovastacin	66
4.4.	Wirkung von Ovastacin auf die <i>Zona pellucida</i>	66
4.5.	Enthalten sämtliche Kortikalgranula Proovastacin?	68
4.6.	Akrosin verlängert die Degradationszeit der <i>Zona pellucida</i>	68
4.7.	Akrosin ist ein möglicher <i>in vivo</i> Aktivator des Proovastacins	70
4.8.	Akrosin schwächt die Wirksamkeit von Fetuin-B	71
4.9.	Schwankungen in der Signalintensität der <i>Zona pellucida</i> Proteine	73
4.10.	Akrosin prozessiert den N-Terminus des <i>Zona pellucida</i> Proteins 2	73
4.11.	Funktionelle Beziehung zwischen Ovastacin, Fetuin-B und Akrosin	75
4.12.	Ausblick	76
5.	Literaturverzeichnis	77
6.	Anhang	89
6.1.	Weitere Daten	89
6.2.	DNS-, Proteinsequenzen und Plasmidkarten	95
6.3.	Proteinparameter	97
6.4.	Verwendete Proteinmarker	98
6.5.	Verwendete Abkürzungen	99
6.6.	Verwendete Einheiten	101
6.7.	Hersteller- / Firmenverzeichnis	101

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines murinen Spermiums.	2
Abbildung 2: Schematischer Ablauf der Eizellreifung.	3
Abbildung 3: Schema der <i>Zona pellucida</i> Fibrillen.	5
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Domänenaufbaus der murinen <i>Zona pellucida</i> Proteine.	5
Abbildung 5: Schematischer Ablauf der Befruchtung.	7
Abbildung 6: Einordnung von Ovastacin in die Proteasensystematik.	10
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Multidomänenaufbaus von Ovastacin.	11
Abbildung 8: 3D-Homologiemodell der katalytischen Domäne von murinem <i>Ovastacin</i>.	12
Abbildung 9: Schema der ZP2-medierten <i>Zona pellucida</i> Bindung.	13
Abbildung 10: Komplex aus Fetuin-B und Astacin.	14
Abbildung 11: Struktur von Eber β-Akrosin.	16
Abbildung 12: Domänenaufbau von Akrosin.	16
Abbildung 13: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit untersuchten Beziehungen der einzelnen Proteine und der <i>Zona pellucida</i>.	18
Abbildung 14: Schematischer Fluoreszenzverlauf einer enzymkinetischen Messung.	27
Abbildung 15: Alignment von β-Akrosin aus Maus und Schwein.	37
Abbildung 16: Homologiemodell der schweren Kette von murinem β-Akrosin.	38
Abbildung 17: Reinheit von rekombinantem Ovastacin.	39
Abbildung 18: Mengenvergleich von rekombinantem Ovastacin und Ovastacin aus Eizellen.	40
Abbildung 19: Detektion von Ovastacin in Eizellen mit anti-Proovastacin Antikörper.	42
Abbildung 20: Detektion von Ovastacin in Eizellen mit anti-Ovastacin-Propeptid Antikörper.	43
Abbildung 21: Vergleich des α-chymotryptischen <i>Zona</i>-Abbaus von wildtypischen Eizellen aus durch Isofluran oder Genickbruch getöteten Tieren.	44
Abbildung 22: Unbefruchtete Zweizellembryonen nach Isofluran-Anwendung.	45
Abbildung 23: Immundetektion von <i>Zona pellucida</i> Protein 2 in mit rekombinantem Ovastacin behandelten Eizellen.	46
Abbildung 24: Auswirkung von Proovastacin und Ovastacin auf die <i>Zona</i>-Abbauzeit.	47
Abbildung 25: Immundetektion von Akrosin nach der Spermienkapazitation.	48
Abbildung 26: Akrosin spaltet Fetuin-B.	50

Abbildung 27: Aktivierung von Proovastacin mit Akrosin.	51
Abbildung 28: Nachweis der Aktivierung von Proovastacin mit Akrosin durch SDS-PAGE und Western blot.	53
Abbildung 29: Akrosin- und spermienbehandelte <i>Zonae pellucidae</i> nach Immundetektion in 3D Darstellung.	55
Abbildung 30: Akrosin- und spermienbehandeltes <i>Zone pellucida</i> Protein 2 nach Immundetektion.	56
Abbildung 31: Aufnahmen von <i>Zonae</i> nach Behandlung mit Akrosin oder Spermien.	57
Abbildung 32: Vergleich von reduzierten/nicht reduzierten <i>Zonae</i> nach Spaltung durch Akrosin.	58
Abbildung 33: Auswirkung von Akrosin auf die Spermienbindung.	59
Abbildung 34: Sequenzielle Behandlung von ZP2 mit Ovastacin und Akrosin.	60
Abbildung 35: Auswirkung von Akrosin und Proovastacin auf die Abbauphase der <i>Zona pellucida</i> in <i>Astl^{-/-}</i> Eizellen.	61
Abbildung 36: Auswirkung von Akrosin und endogenem Ovastacin auf die Abbauphase der <i>Zona pellucida</i> in wildtypischen Eizellen.	62
Abbildung 37: Strukturformel von Isofluran (A) und Avertin (B).	64
Abbildung 38: Schematische Darstellung des funktionellen Dreiecks.	75
Abbildung 39: Akrosin- und spermienbehandelte <i>Zonae pellucidae</i> nach Immundetektion.	89
Abbildung 40: Rundumsicht zu Abbildung 16.	90
Abbildung 41: Qualitätsabschätzung des murinen β-Akrosin Modells.	91
Abbildung 42: Alignment von Akrosin aus Maus und Schwein.	92
Abbildung 43: Eichgerade der Ovastacinmenge aus Abbildung 18.	92
Abbildung 44: Einzelabbildungen des Composites aus Abb. 25.	93
Abbildung 45: Substratumsätze der Hemmkinetik von akrosinbehandeltem Fetuin-B.	93
Abbildung 46: Messdaten der IC₅₀ Bestimmung von Fetuin-B.	94
Abbildung 47: Vergleich der Aktivität von Ovastacin vor und nach Aktivierung. 94	
Abbildung 48: DNS- und Proteinsequenz des murinen Ovastacinkonstruktes. ... 95	
Abbildung 49: Plasmidkarte und Nucleotid- bzw. Aminosäure -Sequenz von FB_WT_4.	96
Abbildung 50: Vektorkarte von pFastBack™1 der Firma Life Technologies.	97
Abbildung 51: Verwendete Marker.	98

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte mit Modellbezeichnung und Hersteller	19
Tabelle 2: Verbrauchsmaterial mit Hersteller	19
Tabelle 3: Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien	20
Tabelle 4: Verwendete Antikörper	20
Tabelle 5: Dialysepuffer der Proteinreinigung	22
Tabelle 6: Puffer der Proteinbestimmung mit BCA	23
Tabelle 7: Gebrauchslösungen der SDS-PAGE	24
Tabelle 8: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele	25
Tabelle 9: Zusammensetzung der Coomassiefärbelösung nach Kang et al.	25
Tabelle 10: Puffer und Material für den <i>Western blot</i>	25
Tabelle 11: Puffer der Enzymkinetik	27
Tabelle 12: Primer der Genotypisierungs-PCR	29
Tabelle 13: PCR-Programm der Genotypisierung	29
Tabelle 14: Zusammensetzung des HTF-Mediums	31
Tabelle 15: Zusammensetzung des TYH-Mediums	31
Tabelle 16: Puffer für die Transmissionselektronenmikroskopie	33
Tabelle 17: Bestimmung der Ovastacinreinheit	39
Tabelle 18: Messwerte der Ovastacinsignalstärke und Berechnung der Ovastacinmenge pro Eizelle	41
Tabelle 19: Proteinparameter der verwendeten Proteine	97
Tabelle 20: Liste der verwendeten Abkürzungen	99
Tabelle 21: Ein und Dreibuchstabencode der 20 kanonischen proteinogenen Aminosäuren	100
Tabelle 22: Liste der verwendeten Einheiten	101
Tabelle 23: Hersteller mit Kontaktadresse und Internetseite	101

Formelverzeichnis

Formel 1: Lambert-Beer'sches Gesetz	23
Formel 2: Berechnung der Umsatzgeschwindigkeit	26

1. Einleitung

Die geschlechtliche Fortpflanzung bei Säugetieren und die damit einhergehende genetische Rekombination erhöht die Anpassungsfähigkeit an veränderliche Lebensbedingungen. Die Neukombination von Allelen erhöht die Chance für das Auftreten neuer Merkmalskombinationen, unabhängig vom Auftreten zufälliger Mutationen. Die innere Befruchtung und das Austragen des Embryos innerhalb des Körpers ist ein weiterer Vorteil, der den Säugetieren weitgehende Unabhängigkeit von speziellen Umweltbedingungen, etwa aquatischer Habitate verschafft. Jedoch erfordert diese Art der Anpassungen spezifische Merkmale bei den Säugern. Die weiblichen Geschlechtsgänge müssen mit Flüssigkeit gefüllt sein, damit die Spermien Eizelle schwimmen können. Auch müssen die Spermien fähig sein die Eizellen im weiblichen Genitaltrakt zu finden und zu erkennen. Diese Vorteile und die Anpassungen die nötig sind, um sie zu erhalten, haben die Entwicklung der Säugetiere zu den heute zu beobachtenden Organen, Zellaufbauten und Mechanismen geführt. Eine wichtige Barriere für Spermien auf dem Weg zu einer befruchteten Eizelle ist die *Zona pellucida* genannte Eihülle. Spermien müssen an diese Hülle andocken und sie anschließend durchdringen, damit *in vivo* Befruchtung stattfinden kann. Danach verhindert diese Barriere das Eindringen weiterer Spermien. Auch der Schutz des sich entwickelnden Embryos auf dem Weg zum Uterus ist eine Funktion dieser Glykoproteinhülle. Dieser Funktionswechsel der *Zona pellucida* von der Bindung der Spermien und Passierbarkeit hin zu einer Spermienbarriere und zur Zunahme der Widerstandsfähigkeit gegen äußere Einflüsse wird durch Proteolyse verursacht. In dieser Arbeit werden biochemische und zellphysiologische Zusammenhänge analysiert, welche die Eigenschaften der Eihülle verändern. Im Fokus stehen die Proteasen Ovastacin aus der Eizelle und Akrosin aus dem Spermium.

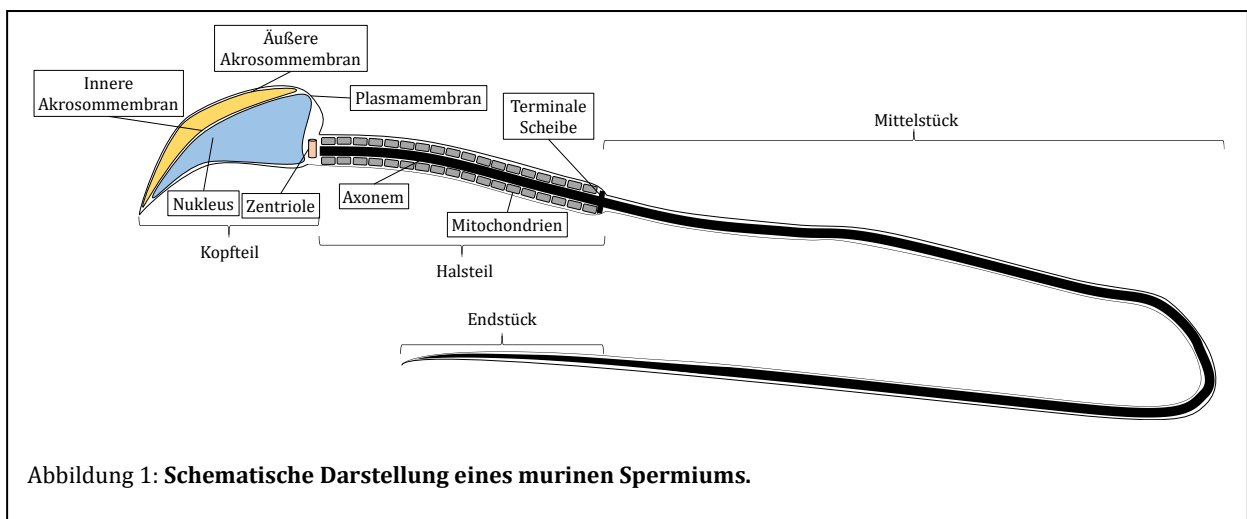
1.1. Gametogenese

Die Gametogenese der Säuger beginnt sehr früh in der Embryonalentwicklung. Zellen wandern aus der inneren Zellmasse der Blastula in die Genitalleiste und werden zu Urkeimzellen. Aus diesen bildet sich später die Gonadenanlage. Die Urogenade ist unterteilt in Medulla und Kortex (Sitz der Urkeimzellen) und entwickelt sich abhängig vom Geschlecht des jeweiligen Tieres.

1.1.1. Spermiogenese

Im Rahmen der Hodenbildung (vgl. BLÜM, 1985) wandern unter dem Einfluss des Testis-determinierenden Faktors (TDF) die Urkeimzellen in die Medulla ein und der Kortex wird größtenteils zurückgebildet. Aus der Medulla bilden sich Gewebenischen, in denen sich die Spermatogonien (männliche Ursamenzellen) ansiedeln und die *Tubuli*

seminiferi, in denen die Spermien transportiert und modifiziert werden. Die diploiden Spermatogonien durchlaufen mehrere mitotische Teilungen, aus denen im letzten Schritt die Spermatozyten erster Ordnung hervorgehen. In diesem diploiden Zustand findet bereits ein Teil der Proteinexpression für die fertigen Spermien statt. Dies hat zur Folge, dass auch Proteine, die nur auf einem Allel kodiert sind, in allen Spermien zu finden sind. Die Spermatozyten erster Ordnung durchlaufen die erste Reifeteilung und bilden so die Spermatozyten zweiter Ordnung, auf diese folgt die zweite Reifeteilung und die haploiden Spermatiden entstehen. Zu diesem Zeitpunkt sind die Spermien jedoch noch nicht befruchtungsfähig. Sie werden in das Lumen der *Tubuli seminiferi* abgegeben und dort noch weiter modifiziert. Vor allem wird die Protein- und Fettzusammensetzung der äußeren Membran verändert. Bis zur Ejakulation werden sie dann in den Nebenhoden gelagert. Erst im weiblichen Genitaltrakt erlangen die Spermien Befruchtungskompetenz. Dies geschieht durch die Kapazitation der Spermien, die auf dem Weg zur Eizelle stattfindet (AUSTIN, 1952). Dabei verändert sich die Lipidzusammensetzung und damit die Oberflächenstruktur der äußeren Spermienmembran, was für eine erfolgreiche Akrosomreaktion notwendig ist. Hauptsächlich Cholesterin wird aus der Spermienmembran entfernt, was die Membran versteift (siehe CROSS, 1998). Abbildung 1 zeigt die schematische Darstellung eines Spermiums.

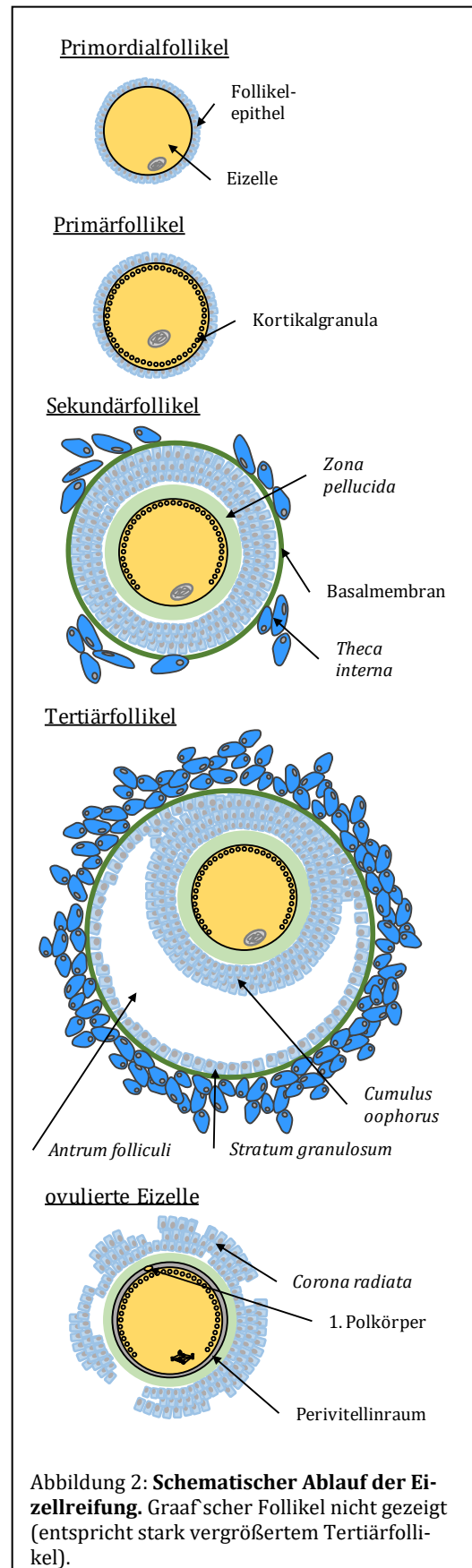


1.1.1.1. Akrosom und Akrosomreaktion

Das Akrosom ist ein aus dem Golgiapparat abgeleitetes Vesikel, das in der Spitze des reifen Spermiums liegt. Es enthält Proteasen, die für die Auflösung der extrazellulären Matrix der Eizellen verantwortlich sind. Die sogenannte Akrosomreaktion umfasst das Verschmelzen der Akrosommembran mit der Plasmamembran des Spermienkopfes und das Freisetzen des Akrosominhalts. Die Akrosomreaktion kann scheinbar zu unterschiedlichen Zeiten und an unterschiedlichen Orten im weiblichen Genitaltrakt stattfinden. Als ein möglicher Auslöser für die Akrosomreaktion wurde *Zona pellucida* Protein 3 (O'TOOLE ET AL., 2000) aber auch der die Eizellen umgebende *Cumulus oophorus* (JIN ET AL., 2011) identifiziert. Allgemein gültig ist, dass die Akrosomreaktion stattgefunden haben muss, bevor die Spermien mit der Eizelle verschmelzen können um diese zu befruchten (BEDFORD, 2011).

1.1.2. Oogenese

Bilden sich Ovarien (vgl. BLÜM, 1985), degeneriert die Medulla und die Urkeimzellen verbleiben im Kortex. Alle aus den weiblichen Urkeimzellen hervorgegangenen Oogonien befinden sich bei der Geburt im Diplotän der Prophase der ersten Reifeteilung. Dies hat zur Folge, dass die Anzahl der weiblichen Eizellen bereits bei der Geburt begrenzt wird. Die Eizellen ruhen bis zum Eintritt in die Geschlechtsreife, in deren Rahmen das Gonadotropin-releasing-Hormon aus dem Hypothalamus die Ausschüttung von Hypophysenhormonen auslöst. Dies führt in der Adenohypophyse zur Freisetzung von follikelstimulierendem Hormon (FH) und luteinisierendem



Hormon (LH), die Follikelreifung und Eisprung verursachen. Der Follikel in dem die Oozyte liegt, durchläuft bei der Reifung mehrere Stadien (siehe Abbildung 2). Im Primordialfollikel ist die Eizelle von einem einschichtigen, flachen Follikelepithel umgeben, dessen Zellen im Primärfollikel kubisch werden. In diesem Stadium tauchen erstmals die Kortikalgranula auf (siehe 1.1.2.1). Im Sekundärfollikel ist das Follikelepithel zwei oder mehrschichtig. In diesem Stadium bildet sich die *Zona pellucida* (siehe 1.1.2.2). Während der weiteren Reifung zum Tertiärfollikels bildet sich eine Höhlung im Follikel, das *Antrum folliculi*. Dieses füllt sich mit dem *Liquor folliculi*, der vom *Stratum granulosum* abgegeben wird, das den Follikel auskleidet. Die Eizelle sitzt nun in einem ins Follikelinnere vorspringenden Zellhaufen von Granulosazellen, die in diesem Zustand *Cumulus oophorus* genannt werden. Beim Eisprung aus dem reifen Graaf'schen Follikel verlässt die Oozyte im *Cumulus oophorus* das Ovar und gelangt am *Infundibulum* in den Ovidukt. Nach der Ovulation beginnt die zweite Reifeteilung der Oozyte, die bis zur Befruchtung in der Metaphase II arretiert ist und erst nach der Plasmogamie, dem Verschmelzen der beiden Gameten zur Zygote, fortgesetzt wird. Ab diesem Zeitpunkt beginnt die Embryonalentwicklung.

1.1.2.1. Entstehung der Kortikalgranula

Die Kortikalgranula entstammen dem Golgiapparat der entstehenden Eizelle und werden exklusiv in Eizellen hergestellt. Sie tauchen ab dem späten Primärfollikelstadium erstmals auf und werden bis zum Eisprung gebildet (PIRES ET AL., 2013). Die Granula akkumulieren in der Peripherie der Eizelle und werden dort von einem Netz aus Actinmolekülen an Ort und Stelle gehalten (DENG ET AL., 2003). Die Kortikalgranula der Maus sind ca. 0,2-0,6 μM im Durchmesser und liegen bis ca. 2 μM unterhalb des Oolemmas (NICOSIA ET AL., 1977). Ovulierte Eizellen enthalten ca. 4500 Kortikalgranula. Diese sind gleichmäßig unter dem Oolemma verteilt, sparen aber den Bereich um die maternale DNS aus (NICOSIA ET AL., 1977). Diese kortikalgranulafreie Domäne wird verursacht durch die maternale DNS. Die Granula in diesem Bereich werden teils verschoben oder exocytiert (DENG ET AL., 2003).

1.1.2.2. Zona pellucida

Die *Zona pellucida* ist die extrazelluläre Matrix, welche die Eizellen von Säugetieren umgibt. Sie besteht bei Säugetieren aus bis zu vier hoch glykosylierten Proteinen (*Zona pellucida* Protein 1-4) (siehe FAHRENKAMP ET AL., 2020). Diese bilden zusammen die extrazelluläre Matrix der Eizelle. Die *Zona* ist wichtig für die Interaktion von Spermien und Eizellen und muss *in vivo* für eine erfolgreiche Befruchtung vom Spermium durchdrungen werden. Der filamentöse Aufbau (Abbildung 3) gibt der *Zona* Struktur und Festigkeit (GREVE & WASSARMAN, 1985). Bei Mäusen, mit denen in dieser Arbeit die Daten gewonnen wurden, gibt es die ZP 1-3. Protein 4 ist ein Pseudogen, das nur transkribiert wird (LEFIÈVRE ET AL., 2004). Die Filamente bestehen vermutlich aus Heterodimeren der Proteine ZP2 und 3 die von ZP1 Homodimeren quervernetzt werden (WASSARMAN ET AL., 2004). Die *Zona pellucida* wird während der Eizellenreifung hergestellt. Die Proteine werden exprimiert und posttranslational glykosyliert (BOJA ET AL., 2003). Ein Schema des Domänenaufbaus ist in Abbildung 4 dargestellt. Die Proteine werden C-Terminal an ihrer Furinschnittstelle beschnitten, dies geschieht entweder im *trans-Golgi* Netzwerk oder am Oolemma (siehe FAHRENKAMP ET AL., 2020). Daraufhin setzen sie sich extrazellulär über die ZP-Domänen zur *Zona pellucida*

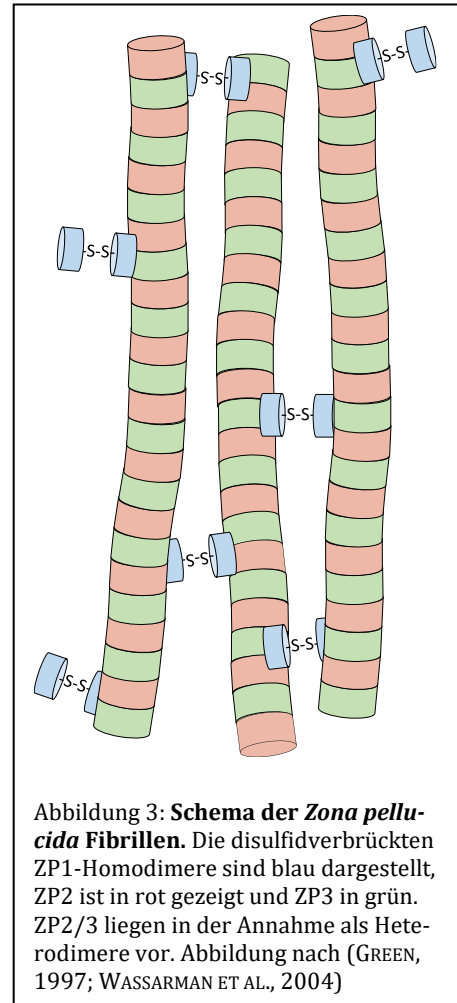


Abbildung 3: **Schema der *Zona pellucida* Fibrillen.** Die disulfidverbrückten ZP1-Homodimere sind blau dargestellt, ZP2 ist in rot gezeigt und ZP3 in grün. ZP2/3 liegen in der Annahme als Heterodimere vor. Abbildung nach (GREEN, 1997; WASSARMAN ET AL., 2004)

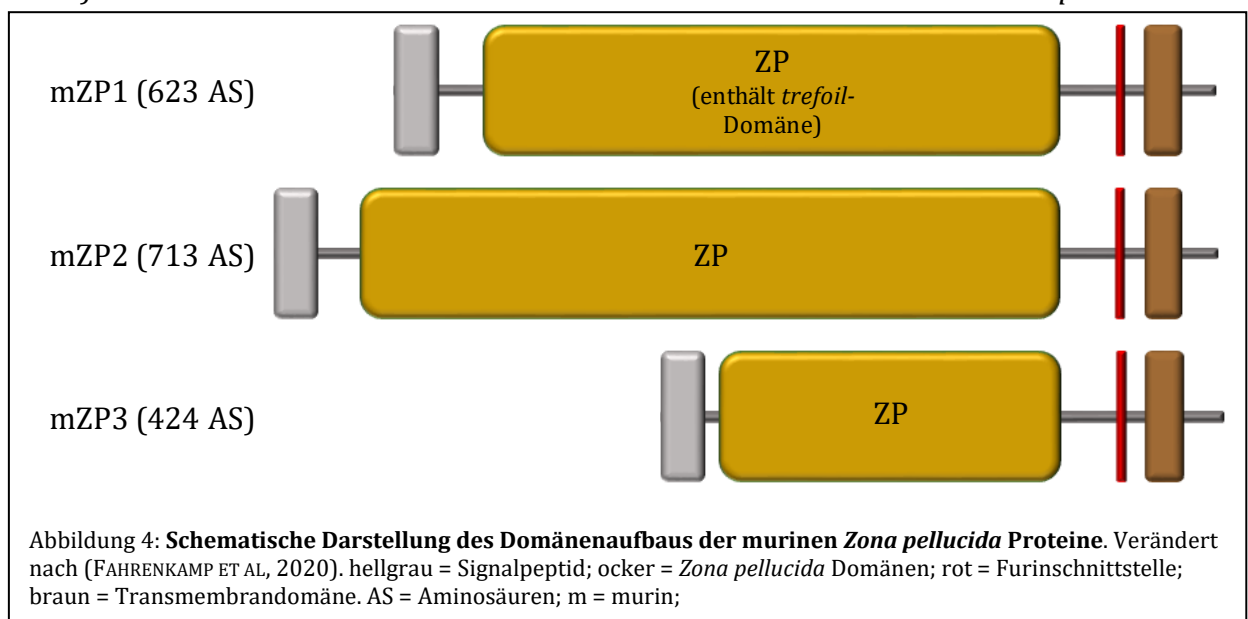
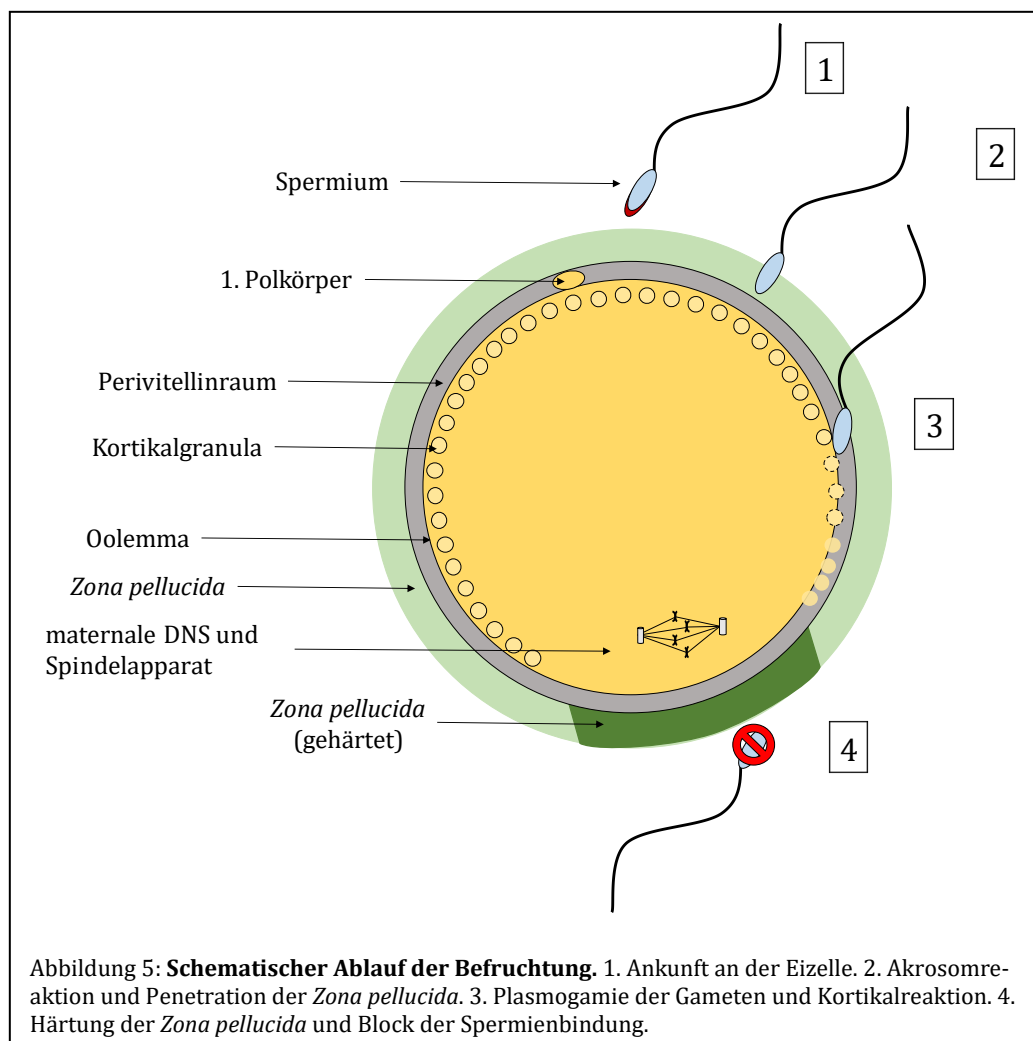


Abbildung 4: **Schematische Darstellung des Domänenaufbaus der murinen *Zona pellucida* Proteine.** Verändert nach (FAHRENKAMP ET AL., 2020). hellgrau = Signalpeptid; ocker = *Zona pellucida* Domänen; rot = Furinschnittstelle; braun = Transmembrandomäne. AS = Aminosäuren; m = murin;

zusammen (JOVINE ET AL., 2004). Die *Zona pellucida* ist wichtig, sowohl für die Befruchtung als auch für die ersten Schritte der Embryonalentwicklung. Vor der Befruchtung ermöglicht sie die Spermienbindung (BLEIL & WASSARMAN, 1980). Nach der Befruchtung verhindert sie das Eindringen weiterer Spermien (BRADEN ET AL., 1954) und schützt auch den sich entwickelnden Embryo vor Resorption (RANKIN ET AL., 1999). Sie ist also essenziell für die Fruchtbarkeit von Säugetieren.

1.2. Befruchtung

Bei Mäusen findet die Befruchtung im Bereich der *Ampulla* der Eileiter statt (Abbildung 5). Im ersten Schritt durchdringt das Spermium den sogenannten *Cumulus oophorus*. Darunter versteht man ein Netzwerk aus Hyaluronsäure und darin eingebetteten Zellen, das die Oozyte sowohl im ovarialen Follikel als auch noch nach der Ovulation umgibt. Diese Matrix wird in der Maus mit der Hilfe von Hyaluronidasen wie HYAL5 und SPAM1 durchdrungen (KIMURA ET AL., 2009). Dann tritt das Spermium mit der *Zona pellucida* in Kontakt (siehe 1.2.1). Das Spermium bindet an die *Zona pellucida* und durchdringt diese. Wenn das Spermium den Perivitellinraum erreicht, bindet es an das Oolemma und verschmilzt mit der Eizelle. Das Eindringen des Spermiums löst die Kortikalreaktion (siehe 1.2.2) der Eizelle aus. Die Kortikalreaktion setzt Agenzien in den Perivitellinraum frei, die eine Härtung der *Zona pellucida* verursachen. Die so veränderte *Zona* unterstützt keine weitere Spermienbindung mehr.



1.2.1. Spermien-Ei-Interaktion

Voraussetzung für eine erfolgreiche, natürliche Befruchtung ist die räumliche Nähe von Spermium und Ei. Diese Nähe ist jedoch nicht ausreichend. Die beiden Zellen müssen auch in physischen Kontakt treten, um die Plasmogamie zu ermöglichen. Die erste Interaktion der Spermien mit dem Ei ist der Kontakt mit der *Zona pellucida*. Hier finden mehrere Bindungen statt. Eine ist die beschriebene Bindung von Spermien an *Zona pellucida* Protein 2 (AVELLA ET AL., 2014). Auch verschiedene Zucker auf den einzelnen *Zona pellucida* Proteinen werden als Liganden für Spermien vermutet (z.B. BLEIL & WASSARMAN, 1988; MILLER ET AL., 1992). Auf der Seite der Spermien sind als zuckerbindende Lectine die β -1,4-Galactosyltransferase (MILLER ET AL., 1992) und Akrosin (näheres 1.3.2) bekannt. Allerdings wird eine erfolgreiche Befruchtung weder durch den Verlust der Zucker, noch durch den Verlust der zuckerbindenden Proteine verhindert (ASANO ET AL., 1997; BABA ET AL., 1994; GAHLAY ET AL., 2010; THALL ET AL., 1995). Der spermienständige Bindungspartner für ZP2 ist noch immer unbekannt. Hier wird deutlich, dass vermutlich nur wenige der vorhandenen Interaktionen absolut essenziell sind und sich die vorhandenen Systeme redundant unterstützen können. Eine der wenigen essenziellen Interaktionen besteht bei der Bindung an das Oolemma. Die Interaktion des Eizellproteins „Juno“ und seines spermienständigen Partners „Izumo“. Juno ist ein GPI-verankertes Membranprotein, das im Oolemma sitzt (BIANCHI ET AL., 2014). Weibliche Juno *knockout* Tiere sind infertil. Das Protein ist kurz nach der Befruchtung nicht mehr am Oolemma nachweisbar. Es ist aber nicht bekannt welcher Faktor für den als „shedding“ bezeichneten Vorgang verantwortlich ist. Izumo ist ein Protein aus der Immunoglobulin-Superfamilie, das auf der Innenseite der Akrosommembran sitzt (INOUE ET AL., 2005). Hier sind ausschließlich die männlichen Tiere im *knockout* infertil. Kommt die Interaktion von Juno und Izumo normal zustande, können die Gameten fusionieren und lösen so die Kortikalreaktion aus.

1.2.2. Kortikalreaktion

Die Kortikalreaktion findet direkt nach der Plasmogamie statt. Verursacht wird die Ausschüttung der Kortikalgranula durch Ca^{2+} -Oszillationen. Diese Oszillationen werden wiederum durch Phospholipase C ζ (PLC ζ), ein Spermienenzym, ausgelöst (NOZAWA ET AL., 2018). PLC ζ katalysiert in der Oozyte die Umsetzung von Phosphatidylinositolbisphosphat zu Diacylglycerin und Inositoltriphosphat (IP3). IP3 bindet an Ca^{2+} -Kanäle des endoplasmatischen Retikulums (ER), die sich dadurch öffnen und Ca^{2+} -Ionen in das Cytoplasma entlassen (siehe PUTNEY & TOMITA, 2012). Der Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Cytoplasma veranlasst das Verschmelzen der Kortikalgranula mit dem Oolemma. Dabei nutzen die Kortikalgranula auf für sekretorische Vesikel typische Weise

SNAREs (*soluble NSF-attachment protein receptors*, siehe LIU, 2011) und entlassen ihren Inhalt in den Perivitellinraum. Der exakte Inhalt der Granula ist noch nicht beschrieben (siehe LIU, 2011). Im Zusammenhang mit der Kortikalreaktion findet die Entfernung des Rezeptors Juno statt. Dieser Rezeptor ist, wie oben erwähnt, essenziell für die Verschmelzung der Keimzellen. Dieser Vorgang ist somit eine definitiver Polyspermielock. Ob eine Protease aus den Granula oder eine andere Protease für das „shedding“ von Juno verantwortlich ist, ist nicht geklärt. Die Exozytose der Kortikalgranula löst eine als „Zona hardening“ beschriebene Veränderung der *Zona pellucida* aus (DE FELICI ET AL., 1985; GULYAS & SCHMELL, 1980). Diese „Härtung“ beschreibt die Veränderung der *Zona* in Hinblick auf die gesteigerte mechanische Widerstandskraft und auf die gesteigerte Resistenz gegen proteolytischen Abbau, sowie gegen die Auflösung durch erniedrigten pH-Wert (GWATKIN, 1964; PAPI ET AL., 2010).

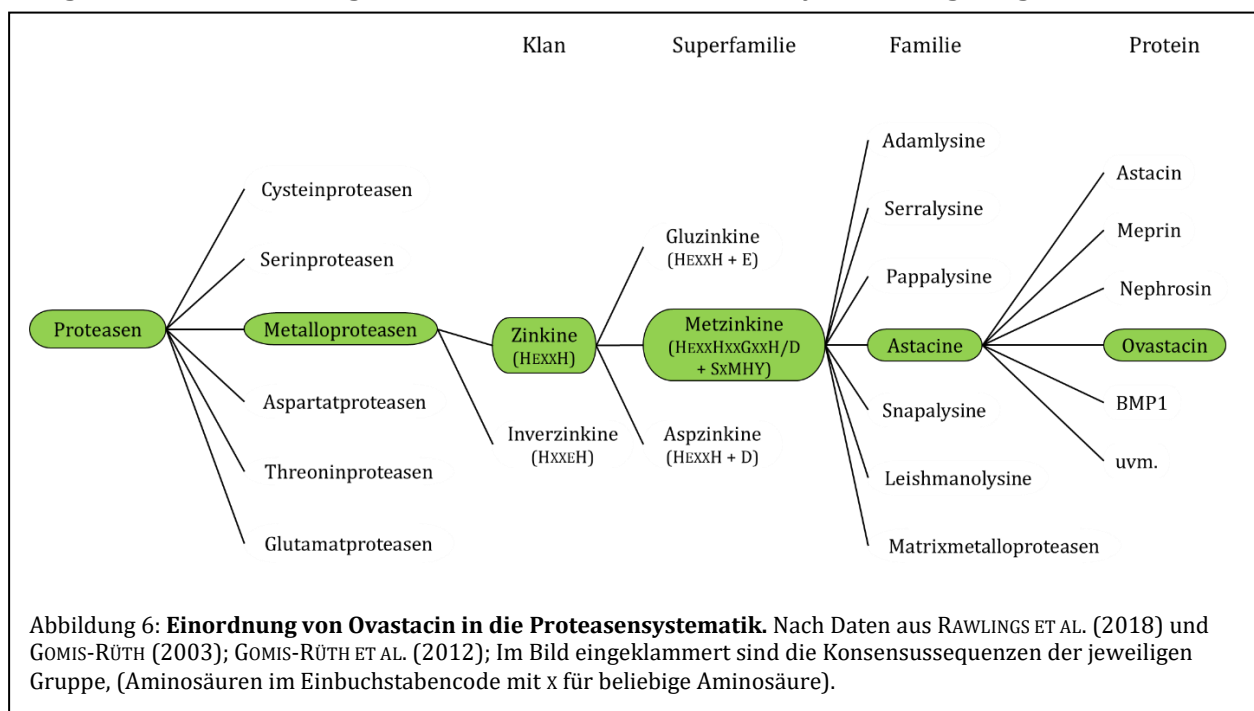
1.3. Für die Fortpflanzung relevante Proteasen

Proteasen können nach dem Aufbau ihrer aktiven Zentren in unterschiedliche Klassen eingeordnet werden. Außerdem können Proteasen durch die Position der proteolytischen Spaltung beschrieben werden. Gemeinsam ist allen Proteasen, dass sie das Oxyanion im tetraedrisch koordinierten Kohlenstoffatom des Übergangszustandes bei der Peptidhydrolyse stabilisieren. Durch die Stabilisierung dieses energetisch sehr ungünstigen Zustandes wird die statistische Wahrscheinlichkeit eines Peptidkettenbruchs an genau dieser Stelle stark erhöht. Proteasen nehmen teil an sehr vielen Prozessen in biologischen Systemen, bekannterweise Verdauung und Blutgerinnung aber auch an vielen anderen Stellen wie der Freisetzung von Signalstoffen, dem Knochenaufbau und der in dieser Arbeit im Mittelpunkt stehenden Befruchtung. Eine Fehlregulation von Proteasen äußert sich in verschiedenen Krankheitsbildern (LÓPEZ-OTÍN & BOND, 2008), wie z.B. Hämophilie B (Faktor IX-Mangel).

1.3.1. Ovastacin

Einordnung

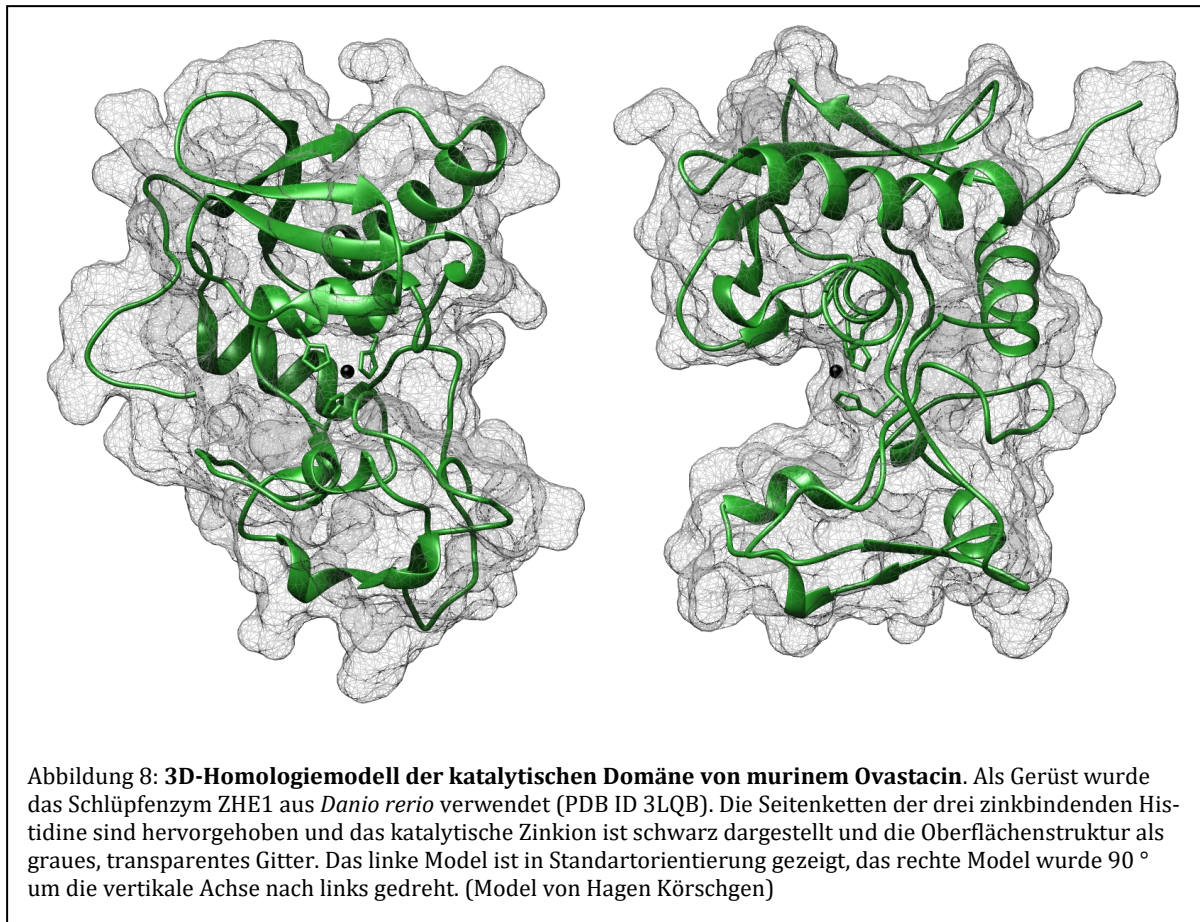
Die zur Familie der Astacine gehörende Protease Ovastacin wurde 2004 entdeckt (QUESADA ET AL., 2004). Die Astacine gehören innerhalb der Metallopeptidasen zu den Metzinkinen (BODE ET AL., 1993; GOMIS-RÜTH, 2003; STÖCKER & BODE, 1995). Sie enthalten alle ein katalytisch essenzielles Zink-Ion, dessen Liganden in einen hochkonservierten Sequenzabschnitt eingebettet sind. Charakteristisch ist zudem der sogenannte Methionin-Turn, welcher als fünften Zinkliganden einen Tyrosinrest positioniert. In Abbildung 6 ist die Einordnung von Ovastacin in die Proteasensystematik gezeigt.



Aufbau

Ovastacin (UniProt#: Q6HA09) ist ein Multidomänenprotein (Schema siehe Abbildung 7). Es wird mit einem aminoterminalen Signalpeptid (Aminosäuren 1-23) translatiert, welches die Translokation in das Golgi System und in den sekretorischen Pfad der Eizelle verursacht. Darauf folgt das Propeptid (Aminosäuren 24-89), welches Ovastacin in einem inaktiven Latenzzustand hält, bis es proteolytisch abgespalten wird. Außerdem enthält es das Sequenz-Motiv $^{52}\text{DKDIPAINQGLIS}^{64}$, welches die Einlagerung von Ovastacin in die kortikalen Granula vermittelt (XIONG ET AL., 2017). Es folgt die katalytische Domäne (Aminosäurereste 90- 283) mit der in Abbildung 6 gezeigten Zink-bindenden Konsensussequenz und dem Methionin-*turn*. Die dreidimensionale Struktur der Proteasedomäne wurde an der bekannten Röntgenkristallstruktur eines „*hatching*-Enzyms“ („Schlüpfenzym“) aus dem Zebrafisch *Danio rerio* modelliert (Abbildung 8). „*Hatching*-Enzyme“ sind eine Subfamilie der Astacin-Proteasen in welche Ovastacin phylogenetisch eingeordnet wurde (QUESADA ET AL., 2004). Die 3D-Struktur zeigt den tiefen Spalt mit dem katalytisch aktiven Zentrum, an dessen Grund das essentielle Zink-Ion verankert ist. Der C-Terminus von Ovastacin (Aminosäurereste 284- 435) ist zwischen verschiedenen Säugerspezies hochvariabel. Bis heute konnte dieser Domäne noch keine spezifische Funktion zugewiesen werden (WESTPHAL 2013; QUESADA ET AL., 2004). Allerdings verbleibt diese Domäne nach der Kortikalreaktion am Oolemma. Daraus wurde geschlossen, dass Ovastacin vor der Kortikalreaktion eventuell membran-assoziiert sein könnte (KÖRSCHGEN ET AL., 2017; PIRES ET AL., 2013).



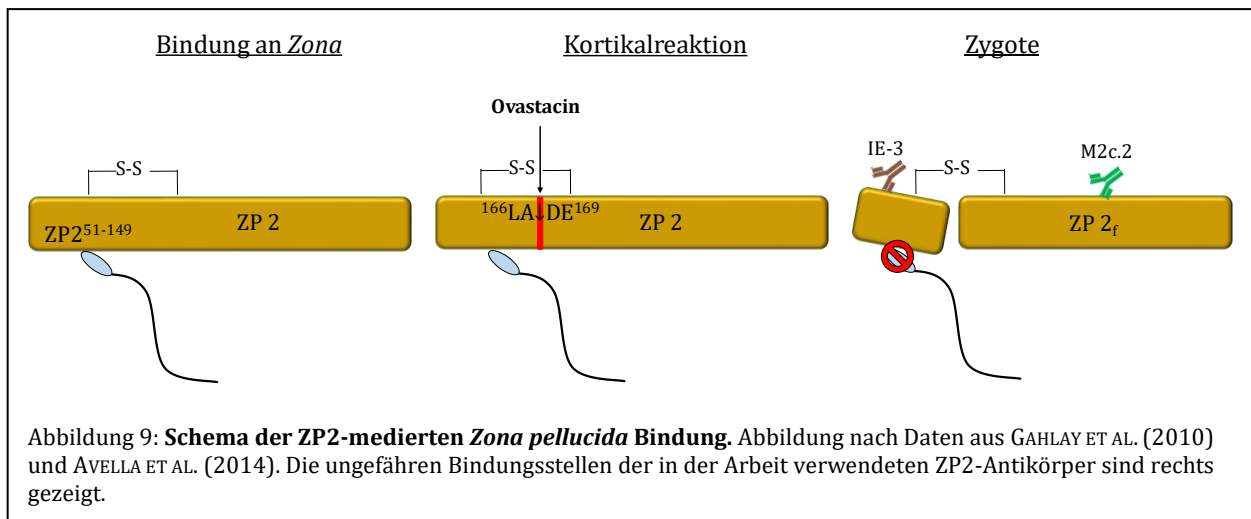


Funktion

Ovastacin wird im Verlauf der Eizellreifung als Zymogen (Proovastacin) exprimiert und in den kortikalen Granula der Eizellen gelagert. Es ist erstmals ab dem Übergang zum Sekundärfollikel in Eizellen nachweisbar (PIRES ET AL., 2013). Die Aktivierung erfolgt mindestens teilweise innerhalb der Eizelle (KÖRSCHGEN ET AL., 2017), die verantwortliche Protease und der genaue Ort der Aktivierung sind jedoch unbekannt. Außerhalb der Eizelle sind Serinproteasen Kandidaten für die Aktivierung von Proovastacin. *In vitro* wurde bereits gezeigt, dass rekombinantes Proovastacin sich mit Plasmin aktivieren lässt, welches auch *in vivo* in der Oviduktflüssigkeit vorkommt (KARMILIN ET AL., 2019). Außerdem werden auch der „*tissue type plasminogenactivator*“ (tPA) und der „*urokinase type plasminogenactivator*“ (uPA) als potenzielle aktivierende Enzyme diskutiert. Beide kommen in Eizellen vor (COY ET AL., 2012; HUARTE ET AL., 1985). Auch Akrosin, auf das an nachfolgender Stelle genauer eingegangen wird (1.3.1), ist als Trypsin-ähnliche Serinprotease ein Kandidat für die Aktivierung.

Die einzige bisher gezeigte Funktion von Ovastacin ist die Konversion des *Zona pellucida* Proteins 2 (ZP2) in seine prozessierte Form ZP2_f (BURKART ET AL., 2012) (siehe Abbildung 9). Die Proteolyse verändert die Eigenschaften der *Zona pellucida*. So wird die

Bindung von Spermien an die *Zona* durch die Erzeugung von ZP2_f ausgeschaltet (BURKART ET AL., 2012). Außerdem nimmt die Widerstandsfähigkeit der *Zona* gegen proteolytische Degradation zu (KÖRSCHGEN ET AL., 2017). Zu Beginn wurde dieser Vorgang als „langsamer“ Polyspermieblock verstanden (BURKART ET AL., 2012). Neuere Ergebnisse legen aber nahe, dass die Konversion von ZP2 zu ZP2_f keine Rolle für das Auftreten von Polyspermie spielt, denn die Zahl regulärer Zweizellembryonen in *Ovastacin*^{-/-}-Mäusen bleibt unverändert. Allerdings verursacht der Verlust der *Ovastacin*-Aktivität eine Verringerung der durchschnittlichen Wurfgröße um 50 % (KÖRSCHGEN ET AL., 2017). Der Effekt der fehlenden Aktivität von *Ovastacin* tritt hier jedoch erst nach dem Blastulastadium der Embryonen auf. Vermutlich ist der Verlust der Robustheit bedingt durch die weichere, empfindlichere *Zona* verantwortlich. Schließlich muss der reife Embryo vor der Implantation in den Uterus die Passage durch den Eileiter überstehen.



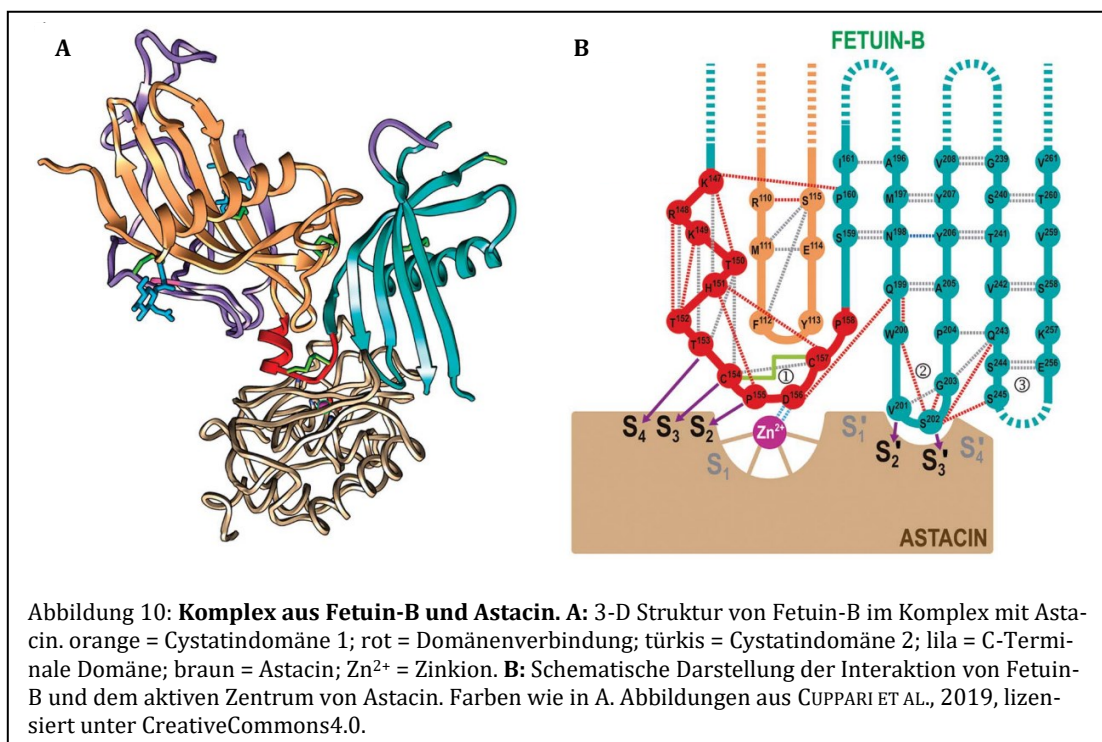
Obwohl *Ovastacin* in den Kortikalgranula gelagert wird, können kleine Mengen schon vor der Befruchtung die Eizelle verlassen. Dies geschieht beispielsweise bei der Entstehung der oben beschriebenen kortikalgranulafreie Domäne. Dadurch wird ein kleiner Teil von ZP2 schon vor der Befruchtung prozessiert (KÖRSCHGEN ET AL., 2017), was zwar zu einer teilweisen Verhärtung der *Zona* führt, aber keinen negativen Effekt auf die Fruchtbarkeit der Eizellen hat, da eine vorzeitige komplette *Zona*-Härtung durch den in der Follikelflüssigkeit vorhandenen *Ovastacin*-Inhibitor Fetuin-B (siehe nächster Abschnitt) verhindert wird. Wird diese kleine Menge *Ovastacin* nicht inhibiert, wie in Fetuin-B-defizienten Mäusen, so tritt komplette weibliche Infertilität ein (DIETZEL ET AL., 2013). Hier kommt es vorzeitig zu einer kompletten Konversion von ZP2 zu ZP2_f und das Eindringen des ersten Spermiums wird unterbunden.

Ovastacin wird auch mit dem sprunghaften Anstieg der extrazellulären Zinkkonzentration bei der Kortikalreaktion in Verbindung gebracht. Diese sogenannten „*zinc-sparks*“ treten nicht auf, wenn *Ovastacin* nicht vorhanden oder katalytisch inaktiv ist

(QUE ET AL., 2017). Die Funktion der „zinc-sparks“ ist im Detail noch unbekannt. Allerdings führt die Zugabe von exogenem Zink zu Eizellen zu einer Veränderung der Struktur der *Zona pellucida* (QUE ET AL., 2017). Eine weitere vermutete, aber nicht bewiesene Funktion von Ovastacin ist seine Eigenschaft als oolemmaler Spermienrezeptor (PIRES ET AL., 2013). Hier wurde angenommen, dass ein Teil der katalytischen Domäne als Transmembrandomäne fungiert und dass der extrazelluläre Anteil von Ovastacin (C-Terminus) über *sperm lysozyme like protein 1* (SLLP1) an Spermien bindet. In der Arbeit von KÖRSCHGEN ET AL. (2017) wurde gezeigt, dass der C-Terminale Teil von Ovastacin tatsächlich nach der Befruchtung am Oolemma verbleibt. Möglicherweise hat dieser Teil des Proteins eine Funktion für die Spermienbindung.

Inhibition von Ovastacin durch Fetuin-B

Die Inhibition von Ovastacin durch Fetuin-B ist inzwischen mechanistisch aufgeklärt. Fetuin-B ist ein in der Leber hergestelltes Plasmaprotein, das zur Superfamilie der Cystatine gehört. Es besteht aus drei Domänen, diese sind die Cystatindomänen 1 und 2 sowie die C-Terminale Domäne die irregulär gefaltet ist (CUPPARI ET AL., 2019; siehe LEE ET AL., 2009). Im Komplex mit dem prototypischen Astacin, der namensgebenden Protease dieser Proteinfamilie (siehe Abbildung 10), zeigt sich, dass die Aminosäuresequenz ¹⁵⁴CPDC¹⁵⁷ im Verbindungsstück zwischen Domäne 1 und 2 von Fetuin-B mit seinem Aspartatrest das Zinkion im aktiven Zentrum von Astacin bindet und so die Aktivität unterbindet (CUPPARI ET AL., 2019). Weiterhin interagieren Aminosäurereste an der Spitze einer haarnadelförmigen Schlaufe der Domäne 2 mit der substratbindenden Region der Protease und festigen so den Enzym/Inhibitor-Komplex.

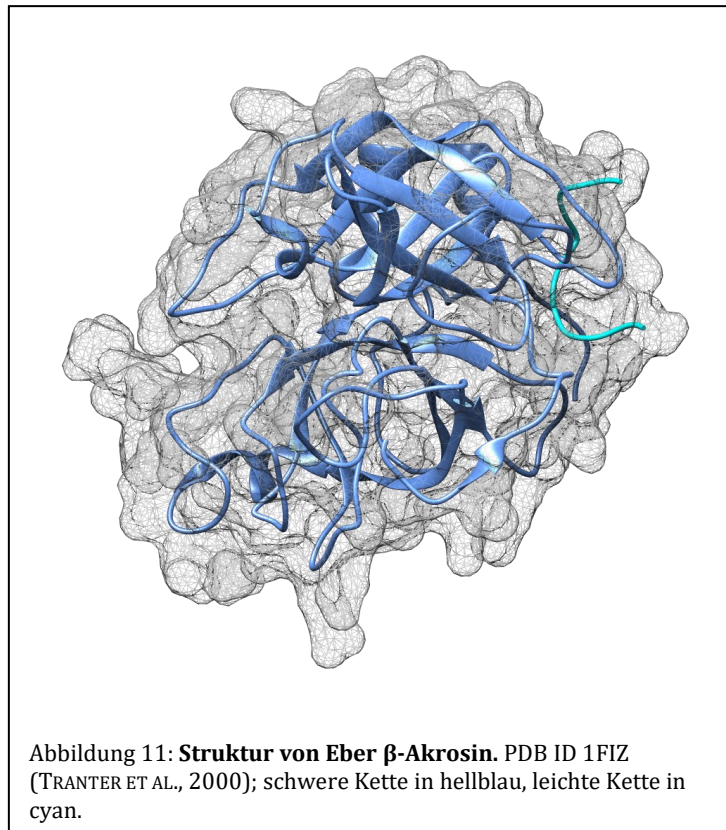


Die Aminosäuren von Fetuin-B sparen bei der Bindung an Astacin die S₁' Substratbindungstelle aus (hier würde der Aminosäurerest, der den Neo-N-Terminus des gespaltenen Proteins bilden würde, binden). Daher kann als Inhibitor gebundenes Fetuin-B nicht wie ein Substrat geschnitten werden (CUPPARI ET AL., 2019). Da die aktiven Zentren von Ovastacin und Astacin im Aufbau sehr ähnlich sind und Fetuin-B *in vitro* beide Enzyme sehr stark hemmt ($K_{i\text{Astacin}} \approx 100 \text{ pM}$; $K_{i\text{Ovastacin}} \approx 50 \text{ pM}$), kann man davon ausgehen, dass der Hemmmechanismus bei beiden Proteasen ähnlich oder gleich funktioniert (CUPPARI ET AL., 2019). Fetuin-B verhindert auf diese Weise, dass z.B. bei der Neuverteilung der Kortikalgranula im Verlauf der Eizellreifung (siehe LIU, 2011) freigesetztes Ovastacin vor der Befruchtung ZP2 in großem Ausmaß modifiziert (siehe STÖCKER ET AL., 2014).

1.3.2. Akrosin

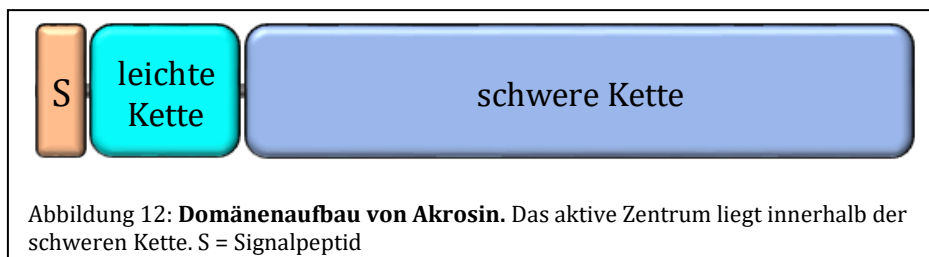
Einordnung und Aufbau

Akrosin ist eine Serinprotease mit Trypsin-ähnlicher Spezifität (MEROPS: S01.223). Erstmals wurde es als Trypsin-ähnliches Enzym aus den Spermien von Kaninchen beschrieben (ZANEVELD ET AL., 1969). Hier wurde auch schon die Fähigkeit zu Proteolyse der *Zona pellucida* gezeigt. Es spaltet endoproteolytisch ausschließlich C-Terminus von Arginin und Lysin (SCHIESSLER ET AL., 1975). Die Struktur des Akrosins (*Sus scrofa*) wurde durch Kristall-



strukturanalyse aufgeklärt (TRANTER ET AL. (2000), siehe Abbildung 11). Es zeigt sich die für Serinproteasen typische Anordnung der katalytischen Triade aus Serin, Histidin und Aspartat. Akrosin kommt im Akrosom von Spermien vor und ist ein Marker der zur Bestimmung der Spermienqualität herangezogen werden kann (CHAUDHURY ET AL., 2005). Wie Ovastacin wird Akrosin als Zymogen exprimiert und erst später in seine aktive Form überführt. Im Gegensatz zu Ovastacin aktiviert sich Akrosin selbst, wenn der umgebende pH-Wert ca. pH 5,5 überschreitet (BABA ET AL., 1989; BROWN, 1983). Bei der Aktivierung wird zuerst das N-Terminale Propeptid und auch die „leichte“ Kette, die über zwei Disulfidbrücken verbunden bleibt (TRANTER ET AL., 2000), durch intramolekulare Spaltung abgetrennt. Die strukturellen Änderungen bei der Aktivierung gleichen denen des Trypsins. Bei beiden Enzymen dringt der N-Terminus des aktiven Enzyms (immer Ile-Ile; Ile-Val oder Val-Val) in den aktiven Spalt ein und bildet dort eine Salzbrücke mit einem konserviertem Aspartat (nicht mit dem der katalytischen Triade)(TRANTER ET AL., 2000). Dieser bei den Serinproteasen konservierter Vorgang wurde passend zum Kontext der Arbeit „*molecular sexuality*“ getauft (BODE & HUBER,

1976). Danach wird am C-Terminus mehrfach durch intermolekulare Spaltung weiterprozessiert (BABA ET AL., 1989).

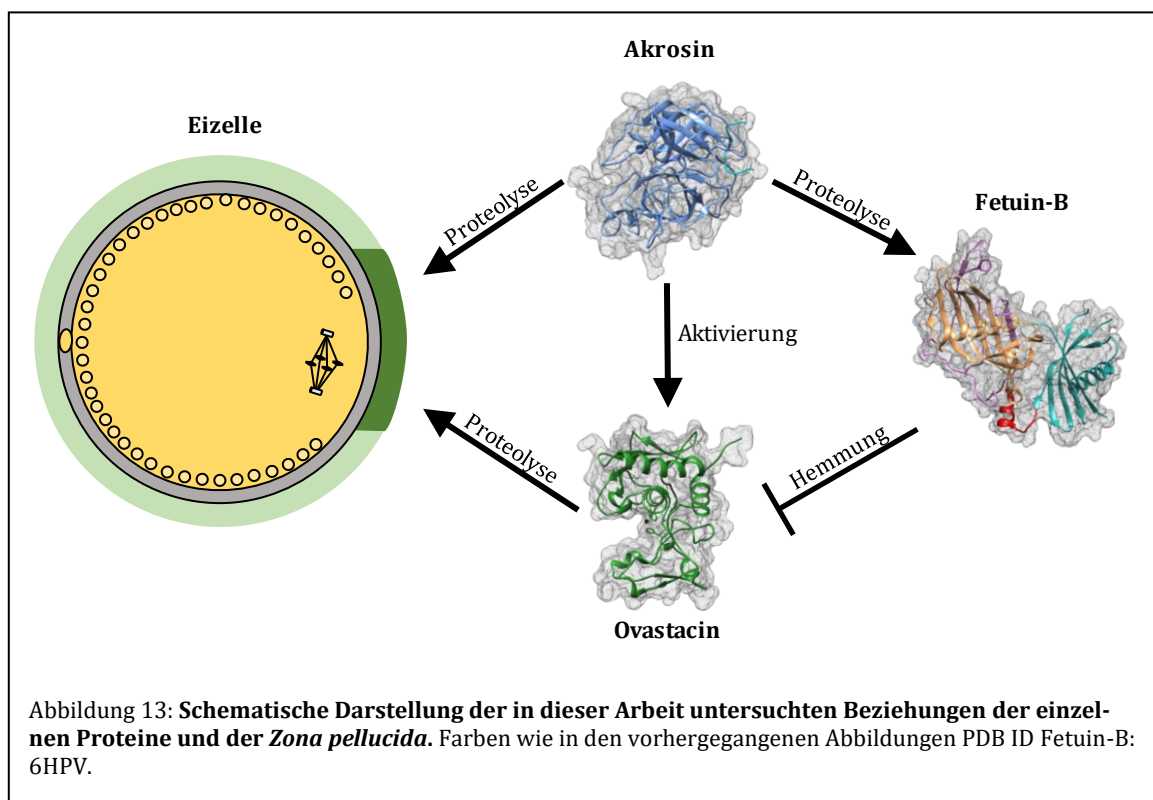


Funktion

Die Funktion von Akrosin ist bislang noch nicht grundlegend aufgeklärt worden. Ursprünglich wurde als Hauptfunktion die Lyse der Ei-umgebenden extrazellulären Matrices angesehen. Dies schließt den *Cumulus*, die *Corona radiata* und die *Zona pellucida* ein (BROWN, 1982). Daher wurde vermutet, dass Akrosin proteolytisch den Weg für das Spermium durch die Eihülle freimacht. Spätere Studien zeigten, dass die Proteolyse der *Zona* ein limitierter Prozess ist und nicht die vollständige Lyse der *Zona pellucida* zur Folge hat (DUNBAR ET AL., 1985; URCH ET AL., 1985a). Jedoch führte die Entwicklung von Methoden zum spezifischen Gen *knockout* zur Erkenntnis, dass Männchen ohne das Akrosin (*ACR*^{-/-}) ihre Fertilität behalten. Allerdings haben Akrosin^{-/-} Spermien gegenüber wild-typ Spermien bei der *in vitro*-Fertilisation einen gravierenden Nachteil und schaffen es nicht in der Konkurrenzsituation Eizellen zu befruchten (ADHAM ET AL., 1997; BABA ET AL., 1994). Auch scheint eine Kooperativität mit anderen Serinproteasen und Hyaluronidasen zu bestehen. Werden nämlich gleichzeitig mehrere seminale Serinproteasen genetisch entfernt, so sind die entsprechenden männlichen Tiere *in vitro* unfruchtbar und *in vivo* eingeschränkt befruchtungsfähig („subfertil“). Der *knockout* einzelner Proteasen verursacht dagegen allenfalls Subfertilität (KAWANO ET AL., 2010; ZHOU ET AL., 2012). Eine weitere für Akrosin postulierte Funktion ist die sekundäre Bindung von Spermien an die *Zona pellucida*, wobei Akrosin an spezifische Zuckerseitenketten der *Zona pellucida* binden soll (FURLONG ET AL., 2005; HOWES ET AL., 2001; TÖPFER-PETERSEN ET AL., 1990). Diese Lectin-Eigenschaft ist funktional unabhängig von der Proteaseaktivität (TÖPFER-PETERSEN & HENSCHEN, 1988). Auch die Verteilung des bei der Akrosomreaktion freigesetzten Akrosominhalts ist eine für Akrosin beschriebene Funktion (YAMAGATA ET AL., 1998). Es fehlen jedoch bislang die präzise Lokalisierung für konkrete, Akrosin-spezifische Schnittstellen in Proteinen der *Zona pellucida*. Auch der Effekt auf die Eigenschaften von Proteolyse durch Akrosin auf die *Zona pellucida* ist nicht erforscht. Somit ist die präzise Wirkungsweise der Protease Akrosin im Zusammenspiel mit anderen Partnern im Befruchtungskontext noch völlig im Dunklen.

1.4. Fragestellung

Offenbar bestehen hinsichtlich der Interaktionen einzelner Proteasen und ihrer Substrate, Agonisten, Inhibitoren und sonstiger Bindungspartner im Kontext der Befruchtung noch viele unbeantwortete Fragen. In dieser Arbeit sollen insbesondere die Wechselwirkungen der Proteine Ovastacin, Akrosin und Fetuin-B untereinander und mit der *Zona pellucida* aufgeklärt werden. Eine schematische Darstellung des Szenarios ist in Abbildung 13 gezeigt. Es soll z.B. getestet werden, ob Akrosin als Aktivator von Ovastacin fungieren kann und ob das in der Arbeitsgruppe hergestellte rekombinante Ovastacin tatsächlich in der Lage ist ZP2 zu prozessieren. Außerdem soll überprüft werden, ob Akrosin die Eigenschaft von Fetuin-B als Inhibitor des Ovastacins beeinflussen kann. Da bereits bekannt ist, dass Akrosin in der *Zona pellucida* schneidet, sollte die präzise Schnittstelle der Proteolyse weiter eingegrenzt werden und die Auswirkungen auf die *Zona* analysiert werden. Hierzu sollten anders als in früheren Studien geringere Konzentrationen gewählt und die Inkubationszeiten verkürzt werden, um die physiologischen Verhältnisse besser abzubilden.



2. Material und Methoden

2.1. Geräte und Materialien

Die für die Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 1 aufgeführt. Eine Liste der häufig benutzten Verbrauchsmaterialien findet sich in Tabelle 2. Weitere Materialien sind jeweils in den zugehörigen Methoden beschrieben.

Tabelle 1: **Verwendete Geräte mit Modellbezeichnung und Hersteller**

Gerät	Modellbezeichnung	Hersteller
Autoklav	Varioclav H+P	Thermo Fisher Scientific Inc., USA-Waltham
Brutschrank	HERAcell 150i	Thermo Fisher Scientific Inc., USA-Waltham
Gelelektrophorese-apparatur	Mini PROTEAN Tetra Cell	BioRad Laboratories GmbH, D-München
Horizontale Blotapparatur	Unbekannt	Biotec Fischer, D-Reiskirchen
Netzgerät	PowerPac™ HC	BioRad Laboratories GmbH, D-München
Osmometer	3MO	Advanced Instruments Inc., USA-Norwood
pH-Meter	765	Knick Elektronische Messgeräte GmbH, D-Berlin
Reinstwasseranlage	Milli-Q	Merck Millipore, D-Darmstadt
Sterilbank	Holten Lamin Air	Jouan Nordic A/S, DK-Allerød
Geldoku automatisch	FUSION-FX7 SPECTRA	Vilber Lourmat GmbH, D-Eberhardzell

Tabelle 2: **Verbrauchsmaterial mit Hersteller**

Material	Hersteller
0,5 ml/1,0 ml/2 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG, D-Sarstedt
15 ml/50 ml Falcons	Sarstedt AG, D-Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt AG, D-Sarstedt
Objektträger	Thermo Fisher Scientific Inc., USA-Waltham
Retransferpipetten (Innendurchmesser 115-124 µm) Präparationspipetten (Innendurchmesser 58-62 µm)	BioMedical Instruments, D-Zöllnitz
Dulbecco's Phosphate buffered saline	Sigma-Aldrich, D-Taufkirchen
Petrischalen (TC-60)	Sarstedt AG, D-Sarstedt

2.2. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den in Tabelle 3 aufgeführten Firmen bezogen. Die für die Kulturmedien der Oozyten und Spermien verwendeten

Chemikalien und das Mineralöl wurden von Sigma-Aldrich bezogen und waren zell- bzw. embryokulturgetestet.

Tabelle 3: **Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien**

Bezugsfirma
AppliChem GmbH, D-Darmstadt
Carl Roth GmbH, D-Karlsruhe
Serva Elektrophoresis GmbH, D-Heidelberg
Sigma Aldrich, D-Taufkirchen

2.3. Verwendete Proteine

2.3.1. Antikörper

Die in der Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die beiden gegen Proovastacin und Ovastacin-Propeptid gerichteten Antikörper wurden durch den Pineda Antikörperservice (D-Berlin) hergestellt. Der polyklonale Kaninchen anti-Proovastacin Antikörper wurde durch Immunisierung mit rekombinantem Ovastacin erstellt (HILDEBRAND 2008) und mittels einer HiTrap Protein G Säule (Ge Healthcare,

Tabelle 4: **Verwendete Antikörper.** Verdünnungen soweit nicht anders spezifiziert für Verwendung nach *Western blot* angegeben. AK = Antikörper; ZP1-3 = *Zona pellucida* Protein 1-3; MMP = Magermilchpulver; EM = Elektronenmikroskop

Antikörper mit Eigenschaften	Antigen	Verdünnung und Puffer
anti-Proovastacin-AK, polyklonal	Gesamte Sequenz von Proovastacin	1:10000 in TBS-T mit 7,5% MMP (1:100 für EM)
anti-Ovastacin-Propeptid-AK, polyklonal	CSTSVPEGFTPEGSPVFQDK	1:2000 in TBS-T mit 7,5% MMP (1:100 für EM)
anti-Ovastacin-Pro-Kat-AK, polyklonal	Propeptid und katalytische Domäne von Ovastacin	1:100 in TBS-T mit 7,5% MMP
anti-Akrosin-AK, monoklonal	Akrosin (<i>Sus scrofa</i>)	1:3000 in PBS-T mit 1 % BSA
anti-ZP1-AK (M1.4, RANKIN ET AL., 1998), monoklonal	murines ZP 1	1:10 in PBS-T
anti-ZP2-AK (IE3, EAST & DEAN, 1984), monoklonal	murines ZP 2 (N-Terminal)	1:10 in PBS-T
anti-ZP2-AK (M2c.2, RANKIN ET AL., 2003), monoklonal	murines ZP 2 (C-Terminal)	1:1000 in PBS-T
anti-ZP3-AK (IE-10, EAST ET AL., 1985), monoklonal	murines ZP 3	1:10 in PBS-T
anti-goat- α -rabbit-AK, polyklonal, an Peroxidase gekoppelt	Kaninchen IgG	1:7500 in TBS-T mit 7,5% MMP
anti-goat- α -mouse-AK, polyklonal, an Peroxidase gekoppelt	Mäuse IgG	1:7500 in TBS-T mit 7,5% MMP
anti-goat- α -rat-AK, polyklonal, an Peroxidase gekoppelt	Ratten IgG	1:7500 in TBS-T mit 7,5% MMP
anti-goat- α -rabbit-goldgekoppelt, polyklonal, 1,4 nm Goldpartikel	Kaninchen IgG	1:200 für EM in IG-Puffer

D-München) nach Herstellerangaben nachgereinigt (WESTPHAL 2016), um die IgG Fraktion zu erhalten. Der anti-Ovastacin-Propeptid Antikörper ist ein Peptidantikörper aus Kaninchen gegen die synthetische Aminosäurefolge 34-53 (CSTSVPEGFT-PEGSPVFQDK) von murinem Ovastacin (Uniprot: Q6HA09, HILDEBRAND 2013). Der anti-Ovastacin-Propeptid-katalytische Domäne Antikörper (anti-Ovastacin-Pro-Kat-Antikörper) wurde durch Präabsorption des anti-Proovastacin Antikörpers mit rekombinantem Ovastacin-C-Terminus erhalten (WESTPHAL 2016). Der anti-Akrosin Antikörper ist kommerziell erhältlich (SAB4700774, Sigma-Aldrich, D-Taufkirchen). Die Antikörper gegen die einzelnen murinen *Zona pellucida* Proteine (ZP) entstammen Hybridomazell-Überständen aus Ratten (Methode in KAVINSKY ET AL., 1982 beschrieben) und wurden von Dagmar Wachten (Uni-Klinik Bonn) und Jurrien Dean (NIH-Bethesda) zur Verfügung gestellt. Die sekundären peroxidasegekoppelten Antikörper, die gegen die IgGs der unterschiedlichen Arten gerichtet sind, stammen von Dianova (D-Hamburg). Der goldgekoppelte Antikörper (Kat# 2004 Nanoprobes, USA-Yaphank) ist gegen Kaninchen IgGs gerichtet und trägt einen 1,4 nm Goldpartikel.

2.3.2. Akrosin

Gereinigtes Akrosin aus dem Hausschwein (*Sus scrofa domesticus*) wurde uns freundlicherweise von Willi Jahnen-Dechent (RWTH-Aachen) zur Verfügung gestellt. Es wurde nach der Methode von MÜLLER-ESTERL & FRITZ, 1981 gereinigt und lyophilisiert. Verkürzt dargestellt wird ein saurer Extrakt aus Spermien gewonnen, der dann über verschiedene chromatographische Methoden aufbereitet wird. Das Endergebnis ist reines aktives β -Akrosin.

2.3.3. Rekombinante Proteine

Die verwendeten Proteine wurden nach einem Standardprotokoll von mehreren Personen unserer Arbeitsgruppe gereinigt. Da die Herstellung der rekombinanten Proteine nicht kernbestandteil der Arbeit ist wird die Methode hier nur verkürzt dargestellt. Murines Fetuin-B und Proovastacin wurden beide in High Five™ Insektenzellen (Ovarzellen aus *Trichoplusia ni*; BTI-TN-5B1-/HighFive 4 CCLV-RIE 305; Friedrich-Löffler-Institut, D-Greifswald) exprimiert und aus dem Zellüberstand gewonnen. Die High Five™ Zellen wurden über das Bac-toBac® Baculovirus-Expressionssystem (Life Technologies, Invitrogen) infiziert. Ausführlichere Informationen zur folgenden Kurzanleitung sind dem „Bac-to-Bac Expression System“ Handbuch von Invitrogen zu entnehmen. Zuerst wurde die DNS-Sequenz des jeweiligen Proteins (Plasmidkarten siehe 6.2) in den pFastBac Vektor integriert. Dann wurden DH10Bac (*Escherichia coli* die das Bacmid tragen) per Hitzeschock mit dem Vektor transformiert. Hier erfolgte auch die Transposition des Vektors in die Viren-DNS. Das resultierende Bacmid wurde aus den

Bakterien gereinigt. Mit dem Bacmid wurden SF9-Insektenzellen (Ovarzellen aus *Spo-doptera frugiperda*; Sf9 CCLV RIE 203; Friedrich-Löffler-Institut, D-Greifswald) unter Verwendung des X-treme GENE HP DNA Transfection Reagent (Roche, D-Mannheim) transfiziert. Die Viren wurden über maximal fünf Zellpassagen in SF9-Zellen amplifi-ziert und die High Five™ Zellen bei einer Dichte von ca. $1,6 \cdot 10^6$ Zellen/ml mit einer *Multiplicity of infection* von ca. 3 infiziert. Die Expression erfolgte für 72 h bei 27 °C.

2.3.4. Reinigung der rekombinanten Proteine

Zentrifugation, Fällung und Dialyse

Nach der Expression wird im ersten Schritt der Überstand durch Zentrifuga-tion für 10 min bei 600 xg. von den Insek-tenzellen befreit. Die Proteine wurden aus dem zellfreien Überstand durch die

schrittweise Zugabe von Ammoniumsulfat ((NH₄)SO₄) bis zu einer Sättigung von 60% (\cong 390 g/l), gefällt. Dieser Schritt erfolgte unter langsamem Rühren bei 4 °C und der Ansatz wurde nach Zugabe des gesamten Ammoniumsulfates über Nacht weiterge-rührt. Der entstandene Niederschlag wurde durch Zentrifugation in zwei Schritten für 1,5 und 0,5 Stunden bei ca. 13000 xg und 4 °C in einem SLA-300 Rotor abgetrennt. Nach jedem Schritt wurde das entstandene Pellet im jeweiligen Dialysepuffer (siehe Tabelle 5) aufgenommen. Die Menge des Puffers entspricht insgesamt 10% des Zellkulturüber-standvolumens.

Am Ende wurden die Proteine in einen Dialyseschlauch mit 14 kDa Ausschlussgröße gegeben und solange bei 4 °C gegen das ca. 10fache Volumen des jeweiligen Dialyse-puffers dialysiert bis sich die Osmolarität im Vergleich zum frischen Puffer angeglichen hatte (typischerweise nach 4-5maligen Pufferwechsel). Das Dialysat wurde am Ende sterilfiltriert (0,45 µm), um die Bearbeitung auf der Säule zu erleichtern

Affinitätschromatographie

Proovastacin wurde über den angefügten Strep-*tag* über eine Säule mit dem Strep-Ta-ctin®-Material (IBA Lifesciences, D-Göttingen) gereinigt. Hierzu wurde das Dialysat über die mit Dialysepuffer equilibrierte Säule gegeben. Im nächsten Schritt wurde die Säule so lange mit Puffer (entspricht HTF-Medium ohne BSA, Phenolrot und Antibio-tika, siehe Tabelle 14) gewaschen, bis die OD_{280nm} konstant nahe Null war. Die Elution erfolgt mit dem gleichen Puffer, dem 2,5 mM D-Desthiobiotin zugesetzt wurde. Die Elu-tionsfraktionen wurden gesammelt, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -20 °C ge-lagert. Die Säule wurde nach Herstellerangaben regeneriert und in 30% Ethanol bei 4 °C bis zur nächsten Verwendung gelagert.

Tabelle 5: **Dialysepuffer der Proteinreinigung**

Dialysepuffer	Zusammensetzung
Fetuin-B	100 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7,8 (@ 4°C)
Proovastacin	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 (@ 4°C)

Fetuin-B wurde über die Interaktion des His-tag mit Nickel gereinigt, welches an Nitrietriessigsäure (Ni-NTA) gebunden ist. Das Dialysat wurde auf 25 mM Imidazol eingestellt und über die mit dem Ni-NTA-Agarose (Quiagen, D-Hilden) beladene Säule gegeben. Diese war ebenso mit Fetuin-B-Dialysepuffer der 25 mM Imidazol enthielt voreingestellt. Die Säule wurde dann mit Dialysepuffer der 50 mM Imidazol enthielt gewaschen bis die OD_{280nm} konstant nahe Null ist. Die Proteine wurden dann mit Dialysepuffer der 200 mM Imidazol enthielt eluiert. Die ersten fünf Elutionsfraktionen wurden vereinigt und mit einem Amicon Ultra 15 ml (Merck, D-Darmstadt) mit 30 kDa Ausschlussgröße nach Herstellerangaben gegen Fetuin-B-Dialysepuffer umgepuffert (mindestens 1000facher Verdünnungsfaktor der Imidazolkonzentration wurde erreicht). Die Ni-NTA-Säule wurde gewaschen und in 30% Ethanol bis zur nächsten Verwendung gelagert.

2.4. Proteinbiochemie

2.4.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen durch UV/Vis Spektroskopie

Für die gelösten Proteine wurde ein Spektrum im Wellenlängenbereich des Lichts von 240 nm bis 350 nm erstellt. Die Extinktion bei der Wellenlänge 320 nm wurde vom Wert bei 280 nm subtrahiert und das Ergebnis mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes (siehe Formel 1) in die Konzentration umgerechnet. Die verwendeten Extinktionskoeffizienten wurden theoretisch mit Hilfe des Onlinetools *ProtParam* (<https://web.expasy.org/protparam/>) und der jeweiligen Proteinsequenz bestimmt (siehe Tabelle 19).

Formel 1: **Lambert-Beer'sches Gesetz.**

$$E_{\lambda} = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I_1} \right) = \epsilon_{\lambda} \times c \times d$$

I_0 : Intensität des einfallenden Lichtes
 I_1 : Intensität des transmittierten Lichtes
 c : Stoffmengenkonzentration
 ϵ_{λ} : dekadischer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ
 d : Schichtdicke der Küvette in cm

2.4.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen mit BCA und Kupfer

Dieser Art der Bestimmung liegen die Arbeiten von SMITH ET AL., 1985 und REDINBAUGH & TURLEY, 1986 zugrunde. Die Messung des Proteingehalts mit Bichinchonsäure (BCA) ist nützlich, wenn die photometrische Messung z.B. aufgrund einer heterogenen Proteinlösung ohne einheitlichen Extinktionskoeffizienten zu fehleranfällig wird. Für die Messung wurde eine Eichgerade mit einer Lösung von bovinem Serumalbumin (BSA) erstellt. BSA wurde im gleichen Puffer, in dem

Tabelle 6: **Puffer der Proteinbestimmung mit BCA.**

Lösung	Zusammensetzung
Bichinchonsäurepuffer	2 % (w/v) Na ₂ CO ₃ 0,16 % (w/v) Na-Tartrat 0,4 % (w/v) NaOH 0,95 % (w/v) NaHCO ₃ 1 % (w/v) Bichinchonsäure (di-Kaliumsalz-trihydrat)
Kupferlösung	4 % (w/v) CuSO ₄ x 5H ₂ O

die zu messenden Probe vorlag, gelöst und verdünnt. Je 10 µl der jeweiligen BSA-Verdünnung der untersuchten Probe wurden in eine durchsichtige Mikrotiterplatte geben und mit 200 µl eines Gemisches aus 50 Teilen Bichinchonsäurepuffer und einem Teil Kupferlösung (siehe Tabelle 6) versetzt. Die Platte mit den Proben wurde dann 30 min bei 37 °C abgedeckt inkubiert. Die resultierenden Färbungen wurden bei 562 nm in einem Varioskan® Flash 3001 mit der SkanIt Software 2.4.3RE (Thermo-Fisher, D-Schwerte) gemessen. Alle Proben wurden als Triplets gemessen. Die Messwerte der BSA-Konzentrationen wurden gegen ihre Extinktion aufgetragen und die Regression dieser Punkte wurde bestimmt. Die resultierende Funktion wurde genutzt, um aus der Extinktion der Probe die Konzentration zu berechnen.

2.4.3. Proteintrennung in der Na-dodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um Proteingemische nach Größe aufzutrennen oder um die apparente Größe eines Proteins zu bestimmen, wurde die diskontinuierliche Na-dodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI, 1970 durchgeführt. Wurde unter reduzierenden Bedingungen gearbeitet, wurden die Proben vor der SDS-PAGE mit ½ des Probenvolumens Probenpuffer (siehe Tabelle 7) mit Dithioerythryol (DTT) versetzt und für 5 min bei 98 °C gekocht. Bei nicht reduzierenden Bedingungen wurde der gleiche Puffer ohne DTT verwendet. Die Gele bestanden aus einem kurzen Sammelgel mit 3,8 % Acrylamidgehalt und einem Trenngel mit 12 % Acrylamidgehalt. Die Elektrophorese wurde bei 180 V für 55 min in einer mit Laufpuffer gefüllten Kammer durchgeführt. Die benötigten Puffer sind in Tabelle 7 angegeben und die Zusammensetzung der Gele in Tabelle 8 .

Tabelle 7: **Gebrauchslösungen der SDS-PAGE.**

Lösung	Zusammensetzung
Probenpuffer (3fach konzentriert)	200 mM Tris-HCl, 25 % (v/v) Glycerin, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 10 % (w/v) SDS, 120 mM DTT, pH 6,8
Laufpuffer	25 mM Tris, 192mM Glycin, 0,02 % (w/v) SDS, pH 8,3
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, 0,4 % (w/v) SDS, pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, 0,4 % (w/v) SDS, pH 6,8
Tetramethylethyldiamin	10 % (v/v) in H ₂ O
Ammoniumpersulfat	10 % (v/v) in H ₂ O

Tabelle 8: **Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.** Menge ist für zwei Gele angegeben.

Lösung	Trenngel 12% Acrylamid	Sammelgel 3,8 % Acrylamid
Trenn/ Sammelgelpuffer	2 ml	1 ml
H ₂ O	2,68 ml	2,44 ml
Rotiphorese® Gel 30 (Carl Roth, D-Karlsruhe)	3,2 ml	506 µl
Tetramethylethylendiamin (siehe Tabelle 7)	60 µl	30 µl
Ammoniumpersulfat (siehe Tabelle 7)	60 µl	30 µl

2.4.4. Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue

Zum unspezifischen Sichtbarmachen von Proteinen in SDS-Gelen wurde die Coomassiefärbung nach KANG ET AL. (2002) verwendet. Die Gele wurden nach der Elektrophorese in H₂O_{reinst} für 2 x 10 min auf einem Schüttler gewaschen. Danach wurden die Gele mindestens zwei Stunden oder bis zum gewünschten Kontrast in der Färbelösung (siehe Tabelle 9) inkubiert. Da es sich um eine hintergrundfreie Färbung handelt, konnten die Gele danach direkt mit Leuchttisch, Kamera und der BioDoc Analyse 2,0 DBA U-464 Software (Biometra, D-Göttingen) aufgenommen werden.

Tabelle 9: **Zusammensetzung der Coomassiefärbelösung nach Kang et al.**

Puffer	Zusammensetzung
Färbelösung	0,02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G 250, 5 % (w/v) Aluminiumsulfat-Hydrat, 2 % (v/v) ortho-Phosphorsäure, 10 % (v/v) Ethanol

2.4.5. Western blot und immunologischer Nachweis mit Chemielumineszenz

Zum spezifischen Sichtbarmachen von Proteinen wurden die Antikörper aus 2.3.1 verwendet. Zuerst müssen dafür die Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) übertragen werden. Für diesen Zweck wurde ein *Western blot*

Tabelle 10: **Puffer und Material für den Western blot.**

Puffer und Material	Zusammensetzung/ Eigenschaften
Kathodenpuffer	25 mM Tris, 40 mM Glycin, 20 % (v/v) Ethanol, pH 8
Anodenpuffer	300 mM Tris-HCl, 20 % (v/v) Ethanol, pH 10,4
PVDF-Membran (Merck, D-Darmstadt)	0,45 µm Porengröße
Whatman-Papier (Whatman, GB-London)	0,34 mm dick

mit dem *semi-dry* Verfahren nach KYHSE-ANDERSEN (1984) angewendet. Das SDS Gel wurde kathodenseitig mit vier Lagen in Kathodenpuffer (siehe Tabelle 10) getränkten Whatman-Papier unterlegt. Auf der Seite der Anode wurde eine PVDF-Membran auf das Gel gelegt, die zuvor für zehn Sekunden in Ethanol eingelegt wurde. Auf die Membran folgten dann wiederum vier Lagen Whatman-Papier, die mit Anodenpuffer vollgesogen waren. Der *Western blot* wurde für eineinhalb Stunden bei konstanten 20 V durchgeführt.

Die Proteine auf der Membran wurden dann mit dem passenden Antikörperpaar sichtbar gemacht. Dafür wurde die Membran bei einem polyklonalen ersten Antikörper mit einer 10 %igen Magermilchpulverlösung und bei einem monoklonalen Antikörper mit einer 3 %igen BSA-Lösung für mindestens eine Stunde inkubiert. Daraufhin folgt die Inkubation mit dem ersten Antikörper (siehe Tabelle 4) für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C auf einem Taumler. Vor der Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurde dreimal 5 min mit Puffer ohne Detergens und danach dreimal mit detergenshaltigem Puffer gewaschen. Der zweite Antikörper wurde für eine Stunde bei RT inkubiert. Zuletzt wurde noch dreimal mit detergensfreiem Puffer gewaschen. Die Signaldetektion erfolgte am FusionFX7 Spectra-Gerät (Vilber Lourmat, D-Eberhardzell) mit dem Clarity™ Western ECL Substrat (BioRad, D-München).

2.4.6. Signalquantifizierung von gefärbten SDS-Gelen und Membranen

Die Signale wurden mit der FusionFX Software (Vilber Lourmat, D-Eberhardzell) quantifiziert. Die Rohaufnahmen der Gele oder Membranen wurden in der Software geöffnet und digital ausgerichtet und der Bildausschnitt festgelegt. Die Messbereiche sind zwischen miteinander verglichenen Signalen immer gleich breit und hoch sowie in der korrespondierenden Position. Die FusionFX Software misst das Volumen unterhalb der Peaks in einer arbiträren Einheit. Für Coomassie gefärbte Gele wird eine Spur ohne Probe gemessen und als Hintergrund abgezogen. Reinheit wurde angegeben als Anteil einer oder mehrerer Banden am gesamten Signal.

2.5. Enzymkinetik

Mit dieser Methode wurde der Erfolg der Aktivierung von Proovastacin mithilfe von Akrosin bestimmt und die Hemmung von Ovastacin durch Fetuin-B vor und nach Prozessierung von Fetuin-B durch Akrosin verglichen. Gemessen wurde die Veränderung der Fluoreszenz eines FRET-Substrates (*Förster Resonanz Energie Transfer*), das aus einem Donor

Formel 2: **Berechnung der Umsatzgeschwindigkeit**

$$v = [S] \times \frac{m}{\Delta F}$$

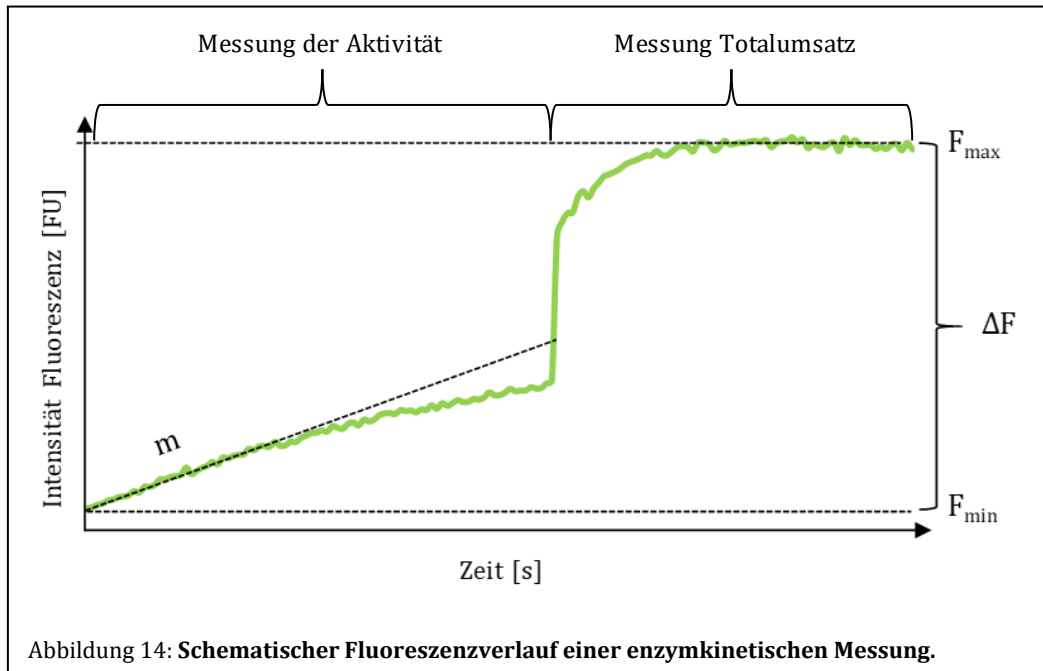
v = Umsatzgeschwindigkeit in M/s

S = Substratkonzentration

m = Steigung der Regressionsgeraden

ΔF = Differenz von Start und Endfluoreszenz

und Akzeptor Fluorophor besteht, die durch ein kurzes Polypeptid zusammengehalten werden. Das Substrat wird über die Sequenz der Peptidkette spezifisch für bestimmte Proteasen. Durch die in der Länge des Polypeptides definierte räumliche Nähe wird die Fluoreszenz des Donors erst messbar, wenn die Peptidkette getrennt wird. Daher ist unter geeigneten Bedingungen die Zunahme der Fluoreszenz ein Maß für die Enzymaktivität. Ein schematischer Verlauf einer Messung ist in Abbildung 14 gezeigt.



Aus der initialen Steigung lässt sich mit Formel 2 die Substratumsatzgeschwindigkeit in einem Ansatz berechnen. Diese lässt sich dann wiederum zwischen verschiedenen Ansätzen vergleichen, um Aussagen über den Erfolg der Aktivierung oder Hemmung zu machen.

2.5.1. Allgemeiner Versuchsaufbau

Alle Ansätze hatten ein Endvolumen von 100 μl . Alle Messungen wurden bei 37 $^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Die verwendeten Puffer (siehe Tabelle 11) wurden alle durch 0,45 μm

Tabelle 11: Puffer der Enzymkinetik.

Puffer	Zusammensetzung
Assaypuffer	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % Brij-35, pH 7,4 @37 $^{\circ}\text{C}$
Akrosinpuffer	100 mM NaCl, 100 mM Glycin, 0,01 % Octyl- β -glucopyranosid, pH 3

Filter sterilfiltriert. Das Substrat Acetyl-RE(Edans)-DR-Norleucin-VGDDPY-K(Dabcy)-NH₂ (Biosyтан, D-Berlin) war in Dimethylsulfoxid gelöst und wurde in Assaypuffer auf ca. 50 μM verdünnt. Die Messung erfolgte in einem Spektralfluorimeter Varioskan®

Flash 3001 mit der SkanIt Software 2.4.3.RE (Thermo-Fisher, D-Schwerte) bei einer Exitationswellenlänge von 350 nm und einer Messwellenlänge von 520 nm in einer schwarzen FluroNunc™ 96-Well Platte (Thermo-Fisher). Proovastacin wurde entweder direkt vor dem Versuch aktiviert und verwendet oder im Voraus aktiviert. Es wurde dann in flüssigen Stickstoff eingefroren und vor dem Versuch aufgetaut und einmal verwendet. Eventuelle Reste wurden verworfen. Die gewünschte Menge des aktiven Ovastacins wurde mit den jeweiligen Zusätzen (siehe jeweilige Messung) gemischt, mit Assaypuffer auf 60 µl aufgefüllt und in ein Well der Platte gegeben. Die Platten wurden dann abgedeckt für 8 min bei 37 °C temperiert, danach wurden 40 µl Substratlösung (Endkonzentration ca. 20 µM) zugegeben und so die Messung gestartet. Nach der Messung wurde der Totalumsatz des Substrates durch Zugabe von 1 µl Proteinase K (20 mg/ml in Assaypuffer) pro Well bestimmt.

2.5.2. Aktivierung von Proovastacin

Bei der Aktivierung von Proovastacin durch humanes Plasmin (Hematologic Technologies, USA-Essex) wurden zu der gewünschten Menge Proovastacin (bis zu 4 µM) 10 % der Proovastacinstoffmenge Plasmin gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Den Proben wurde dann cComplete™ Inhibitor EDTA-free (Merck, D-Darmstadt) zugesetzt, sodass im Endansatz 2 mg/ml Inhibitor erreicht wurden. Dieses Gemisch wurde dann für fünf Minuten auf Eis inkubiert.

Mit Akrosin (gelöst in Akrosinpuffer siehe Tabelle 11) wurden verschiedene Stoffmengenverhältnisse und Zeiten getestet. In der jeweiligen Abbildung sind Zeiten und Mengen angegeben. Die Aktivierung wurde bei 37 °C durchgeführt und danach wurde cComplete™ Inhibitor EDTA-free zugesetzt, sodass im Endansatz 2 mg/ml Inhibitor erreicht wurden. Dieses Gemisch wurde dann für fünf Minuten auf Eis inkubiert.

2.5.3. Hemmkinetik von Fetuin-B nach Spaltung durch Akrosin

Die Hemmstärke von Fetuin-B wurde vor und nach Proteolyse durch Akrosin untersucht. Dazu wurde zu Fetuin-B ein Zehntel seiner Stoffmenge Akrosin zugesetzt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf einer Stunde wurde eine Probe von Fetuin-B für die Untersuchung im SDS-Gel und in der Enzymkinetik untersucht. Der verbleibenden Menge Fetuin-B wurde wiederum ein Zehntel Akrosin zugefügt und für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Das Vorgehen wurde noch einmal wiederholt. Als Kontrollen wurde der gleiche Ansatz ohne Fetuin-B und ein weiterer Ansatz ohne Akrosin für die gleiche Zeit und mit dem gleichen Puffergemisch inkubiert. Akrosin und Fetuin-B lagen in den Puffern aus Tabelle 11 und Tabelle 5 vor. Das resultierende, mit Akrosin behandelte, Fetuin-B wurde im Vergleich mit den Kontrollen und unbehandeltem Fetuin-B in ihrer Hemmwirkung auf Ovastacin untersucht. Die Konzentrationen

von Fetuin-B und Ovastacin sind in der Abbildung angegeben. Es wurden mit GraFit® 4 (Erithacus Software, Sussex-UK) IC₅₀ Graphen für die verschiedenen Ansätze erstellt und verglichen.

2.6. Versuche mit murinen Eizellen und Spermien

2.6.1. Tiere

Für die Versuche wurden Tiere FVB/N-Stammes verwendet (TAKETO ET AL., 1991). Der Name leitet sich ab aus der besonderen Anfälligkeit für den *friend virus B*, der bei Mäusen Leukämie verursacht. Diese Tiere eignen sich gut für Analysen im Befruchtungskontext (TAKETO ET AL., 1991). Außerdem wurden Ovastacin-defiziente Mäuse des FVB-Stammes BURKART ET AL., 2012 verwendet. Diese Tiere wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Jurrien Dean (NIH, USA-Bethesda) zur Verfügung gestellt und in unserer Arbeitsgruppe weitergezüchtet. Um den Genotyp der verwendeten Tiere sicherzustellen, wurden die FVB-Wildtyp Tiere in Stichproben und die Ovastacin defizienten Tiere generell genotypisiert. Dies wurde mit dem *AccuStart II PCR Genotyping Kit* von Quanta bio (USA-Beverly) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die verwendeten Primer und das PCR Protokoll sind in Tabelle 12 und Tabelle 13 angegeben.

Tabelle 12: **Primer der Genotypisierungs-PCR.**

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Allel
Primer 1	GAC ATC CCC GCA ATT AAC C	Astl-Wildtyp
Primer 2	GAG GAC TGG GTC CAT CTG AG	gemeinsam
Primer 3	CGC CTT CTT GAC GAG TTC	Astl-Knockout

Tabelle 13: **PCR-Programm der Genotypisierung.**

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]
Initiale Denaturierung	94 °C	60 s
Denaturierung	94 °C	20 s
Annealing	60 °C	20 s
Elongation	72 °C	120 s
Finale Elongation	72 °C	120 s

↻ 30x

2.6.2. Superovulation der Spendermäuse

Durch Superovulation sollte zum einen die Anzahl der nutzbaren Oozyten pro Weibchen erhöht und damit der Tierverbrauch gesenkt werden und zum anderen konnte durch die Wahl des Zeitpunkts der Hormonbehandlung und damit der Ovulation der

Versuchsaufbau zuverlässig geplant werden. Die Superovulation wurde durch intraperitoneale Gabe von „*pregnant mare's serum gonadotropin*“ (Intergonan®, Intervet GmbH, D-Unterschleißheim, PMSG) und „*human chorionic gonadotropin*“ (Ovogest®, Intervet GmbH, hCG) ausgelöst. PMSG führt durch seine dem follikelstimulierenden Hormon ähnliche Wirkung zu einer Reifung von Follikeln. Die Gabe von hCG imitiert einen starken Anstieg des luteinisierenden Hormons und löst so den Eisprung aus (siehe GARDENER ET AL. 2004).

Es wurden weibliche Mäuse im Alter von 6-10 Wochen hormonbehandelt. Die Gabe von 10 IU (international Units) PMSG in physiologischer Salzlösung (150 mM NaCl, pH=7,4) erfolgte um 17:00 eines gewählten Tages, die Injektion von 5 IU hCG in physiologischer Salzlösung fand 48 h später statt. Die ovulierten Oozyten wurden 13-15 h nach der hCG-Gabe geerntet.

2.6.3. Vorbereitung der Medien und Geräte

Die Behandlung der Oozyten von der Entnahme erfolgte in *human-tubal-fluid*-Medium (HTF-Medium, Zusammensetzung siehe Tabelle 14). Zur Kapazitation der Spermien wurde modifiziertes Krebs-Ringer Medium (TYH-Medium, siehe Tabelle 15) TAKEO & NAKAGATA, 2011 verwendet. Die Medien wurden jeweils maximal zwei Tage vor Gebrauch steril angesetzt. Zur Herstellung der Medien wurde H₂Oreinst. verwendet. Beim Ansetzen der Medien wurden bovines Serumalbumin (BSA) in 5 ml und Natriumhydrogencarbonat in 10 ml H₂Oreinst. vorgelöst. Die anderen Komponenten lagen als Stammlösungen (Konzentration siehe jeweilige Tabelle) vor. Daraufhin wurde die Osmolarität der Medien bestimmt. Sie lag bei HTF 290-310 mOsm. Medien mit anderen Osmolaritäten wurden verworfen. Zuletzt wurden die Medien durch einen Filter von 0,2 µm Porengröße sterilfiltriert. Die Medien wurden dann vor Gebrauch in benötigter Tropfenzahl und -größe in Petrischalen gegeben und mit Mineralöl (M5310, Sigma-Aldrich) überschichtet, um verdunstungsbedingte Osmolaritätsänderungen zu verhindern. Die vorbereiteten Medientropfen wurden dann mindestens fünf Stunden im Brutschrank bei 37 °C mit wasserdampfgesättigter Atmosphäre und einem Luft-CO₂-Gehalt von 5% äquilibriert. Außerdem wurden alle Inkubationsschritte in diesem Brutschrank durchgeführt. Um den Abfall der Medientemperatur während der Manipulation außerhalb des Brutschrankes zu verringern, wurden die Schalen auf einem beheizbaren Arbeitstisch (auf 37 °C eingestellt) abgestellt und auch der Tisch des Binokulars wurde beheizt. Als Binokular wurde ein Olympus SZX 10 mit 1.25x planapochromaten Objektiv verwendet, das zur Dokumentation mit der Olympus SC50 Kamera ausgestattet war. Als Software wurde CellSens Standard von Olympus verwendet.

Tabelle 14: **Zusammensetzung des HTF-Mediums.**Die grün hinterlegten Stoffe wurden frisch abgewogen. Osmolarität zwischen 290-310 mOsm

Stoff	Molekulargewicht [g/mol]	Endkonzentration Medium [mM]	Stammlösung [g/l]	für 50 ml Medium benötigte Stammlösung	Einheit
NaCl	58,44	101,61	296,9	1000	µl
KCl	74,55	4,69	87,5	200	µl
MgSO ₄ x7 H ₂ O	246,47	0,20	24,5	100	µl
KH ₂ PO ₄	136,09	0,40	13,5	200	µl
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	147,01	5,14	188,75	200	µl
NaHCO ₃	84,01	25,00		105	mg
Glucose	180,16	2,78	250,0	100	µl
Na-Lactat (60% w/w)				170	µl
Na-Pyruvat	110,04	0,34	92,5	20	µl
Penicillin G	372,48	0,20	75,0	50	µl
Streptomycin	728,69	0,07	50,0	50	µl
BSA				200	mg
Phenolrot (0,5%solution)				20	µl

Tabelle 15: **Zusammensetzung des TYH-Mediums.**Die grün hinterlegten Stoffe wurden frisch abgewogen.

Stoff	Molekulargewicht [g/mol]	Endkonzentration Medium [mM]	Stammlösung [g/l]	für 50 ml Medium benötigte Stammlösung	Einheit
NaCl	58,44	120	296,9	1181,0	µl
KCl	74,55	5	87,5	213,0	µl
MgSO ₄ x7 H ₂ O	246,47	1,2	24,5	603,6	µl
KH ₂ PO ₄	136,09	1,2	13,5	604,8	µl
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	147,01	1,7	188,8	66,2	µl
NaHCO ₃	84,01	25,00		105,0	mg
Glucose	180,16	5,55	250,0	200,0	µl
Methyl-β-Cyclodextrin				49,2	mg
Na-Pyruvat	110,04	0,5	92,5	29,7	µl
Penicillin G	372,48		75,0	50,0	µl
Streptomycin	728,69		50,0	50,0	µl
Polyvinylalkohol				50,0	mg

2.6.4. Präparation der Eizellen

Die Weibchen wurden entweder mit dem Narkosemittel Isofluran oder durch Genickbruch getötet. Bei der Tötung mit Isofluran werden die Tiere zuerst mit Isofluran betäubt und dann durch eine Überdosis des Narkosemittels getötet. Die Bauchhöhle wurde eröffnet und die beiden *Ampullae* aus den Ovidukten präpariert. Die *Ampullae* wurden dann in das Mineralöl überführt und unter optischer Kontrolle direkt an der Stelle des Cumulus-Oozyten Verbundes (COV) aufgerissen. Der herausquellende COV wurde dann in den HTF-Tropfen überführt. Die Cumulus Zellen wurden entfernt durch Inkubation der COV für maximal 5 min in 0,3 mg/ml Hyaluronidase (H4272, Sigma-Aldrich, D-Taufkirchen) in HTF-Medium. Danach wurden die Eizellen fünfmal durch 150 µl HTF gewaschen.

2.6.5. Präparation und Kapazitation der Spermien

Die Männchen wurden mit dem Narkosemittel Isofluran getötet. Die Bauchhöhle wurde eröffnet und die beide *Caudae epididymidis* präpariert. Die möglichst fettfreien *Caudae* wurden in das Mineralöl überführt und entlang der konvexen Seite mit einem Skalpell aufgeschnitten. Die Gewebestücke wurde dann in 90 µl TYH-Medium überführt und nach 5 min wieder entfernt. Die ausgeschwommenen Spermien kapazitieren darauf noch für 55 min Minuten. Eine genau zeitliche Abstimmung ist nötig, da die Kapazitationszeit von 60 min genau eingehalten werden muss.

2.6.6. Präparation der *Zonae pellucidae*

Um Einflüsse der Eizellen auf die *Zona pellucida* während der Dauer eines Versuchs zu unterbinden, wurden die *Zonae* ab präpariert. Die gewonnenen Eizellen wurden dazu in einen Tropfen HTF-Medium überführt, der zusätzlich 2 µM rekombinantes Fetuin-B und 1,1 mg/ml cOmplete™ Inhibitor EDTA-free (Merck, D-Darmstadt) enthielt. Die Eizellen wurden in diesem Medium schnell in eine Glaspipette mit 60 µm Innendurchmesser (siehe Tabelle 2) eingesaugt und wieder in das Medium abgelegt. Dabei rissen die *Zonae* auf und die Eizellen wurden herausgedrückt. Die nun zellfreien *Zonae* wurden in einen frischen Tropfen HTF-Medium mit 2 µM Fetuin-B und 1,1 mg/ml cOmplete™ Inhibitor EDTA-free überführt, während weitere Eizellen präpariert wurden. Bevor die *Zonae* weiter inkubiert wurden, wurden sie fünfmal in 150 µL HTF-Medium gewaschen.

2.6.7. Eizellen im Transmissionselektronenmikroskop

Die präparierten Oozyten (siehe 2.6.4) wurden mit 0,1 % Glutaraldehyd und 3 % Paraformaldehyd in TEM-PBS (Puffer für die Färbung siehe Tabelle 16) für 3 h bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Danach wurden die Eizellen in 2 % (w/v) *low melt* Agar eingebettet und durch eine Ethanolreihe (bis 96 % unvergällt) dehydriert. Dann wurden sie in *LR White Resin* (London Resin Company, UK-Reading) eingebettet, welches mit UV-Licht (350 nm) für ca. 60 h gehärtet wurde. Danach wurden ca. 60-70 nm dicke Schnitte auf einem Ultracut E (Leica microsystems, D-Wetzlar) angefertigt, die auf Polyvinylbutyral beschichteten Nickelnetzen gesammelt wurden. Die Schnitte wurden dann für drei bis fünf Minuten bei RT mit einer gesättigten Natriumperjodatlösung angeätzt. Nach 10 min in einer 0,1 % Tween20 in TEM-PBS (siehe Tabelle 16) Lösung wurden die Schnitte mit 50 mM NH₄Cl in TEM-PBS für 10 min abgesättigt. Blockiert wurde dann mit 0,5 % (w/v) Kaltwasserfisch-Gelatine und 0,1 % (w/v) Ovalbumin (beide Sigma-Aldrich) in TEM-PBS für mindestens 30 min. Nach der Färbung mit den primären Antikörpern (anti-Proovastacin Antikörper und anti-Ovastacin-Propeptid Antikörper siehe Tabelle 4, beide 1:100 in IG-Puffer (siehe Tabelle 16) für 60 h bei 4 °C wurden die Schnitte einmal mit PBS und zweimal mit IG-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären, goldgekoppelten Antikörper (siehe Tabelle 4) erfolgte für zwei Stunden in IG-Puffer bei RT. Nach der Färbung erfolgte ein Fixierungsschritt mit 1 % (v/v) Glutaraldehyd in TEM-PBS für 10 min. Die Schnitte wurden über Nacht luftgetrocknet und die Silberverstärkung nach DANCHEV, 1981 durchgeführt. Zusammengefasst wurde in dieser Methode Silbersalz an den Goldpartikeln reduziert. Zuletzt wurden die Schnitte für 8 min bei RT mit 2 % (w/v) Uranylacetat in 50 % Ethanol im Dunkeln und dann mit einem Bleicitratpuffer für 2 min bei RT im Dunkeln kontrastiert. Die Schnitte wurden dann mit einem FEI Tecnai 12 BioTwin Transmissionselektronenmikroskop aufgenommen.

Tabelle 16: Puffer für die Transmissionselektronenmikroskopie.

Puffer	Zusammensetzung
TEM-PBS	137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM NaH ₂ PO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,3
Immunogold (IG)-Puffer	0,1 % Ovalbumin, 0,5 % Kaltwasserfisch-Gelatine, 0,01 % Tween20, 500 mM NaCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,3
Bleicitratpuffer	6,8 mM Pb(C ₆ H ₅ O ₇) ₂ , 9 mM Pb(NO ₃) ₂ , 8 mM Pb(CH ₃ COO) ₂ , 6,8 mM Na ₃ (C ₆ H ₅ O ₇), 0,1 M NaOH

2.6.8. Inkubation von Eizellen und *Zonae* mit Spermien und Proteasen

Für die Inkubation mit Spermien wurden deren Konzentration in Spermien/ml vorher mit einem Hämozytometer bestimmt. Dazu wurden 5 µl des Kapazitationsansatzes mit 5 µl H₂O_{reinst} verdünnt und mit 10 µl Gibco™ 0,4 % Trypanblaulösung (Thermo Fisher Scientific, D-Schwerte) gemischt. Nach Ablauf der Kapazitationszeit wurden die Spermien zu den *Zonae* in HTF-Medium gegeben, sodass eine Endkonzentration von 10⁶ Spermien/ml erreicht wurde. Die Inkubation wurde für eine Stunde durchgeführt. Danach wurden die *Zonae* dreimal durch 150 µl PBS mit 0,1 % Polyvinylalkohol gewaschen, in Probenpuffer (siehe Tabelle 7) aufgenommen und für 5 min bei 98 °C gekocht.

Akrosin (ca. 10 µM gelöst in Akrosinpuffer (siehe Tabelle 11)) wurde zu den *Zonae* gegeben, die in einem 150 µl Tropfen HTF-Medium vorlagen. Es wurde eine Konzentration von 150 nM Akrosin eingestellt und für eine Stunde inkubiert. Danach wurden die *Zonae* dreimal in 150 µl PBS mit 0,1 % Polyvinylalkohol gewaschen, in Probenpuffer (siehe Tabelle 7) aufgenommen und für 5 min bei 98 °C gekocht.

Für die Inkubation mit Ovastacin wurde dieses frisch vor dem Versuch mit Plasmin aktiviert. Das Vorgehen ist in 2.5 beschrieben, mit dem Unterschied, dass alle Verdünnungen mit HTF-Medium erstellt wurden. Das aktivierte Ovastacin wurde zu *Zonae* oder Eizellen gegeben, sodass eine Endkonzentration von 1 µM erreicht wurde. Die Inkubation dauerte eine Stunde. Danach wurden die *Zonae* oder Eizellen dreimal in 150 µl PBS mit 0,1 % Polyvinylalkohol gewaschen, in Probenpuffer (siehe Tabelle 7) aufgenommen und für 5 min bei 98 °C gekocht.

Falls Inkubationen sequenziell hintereinander durchgeführt wurden, wurden die *Zonae* vorher in einen frischen Tropfen HTF-Medium überführt. Als Kontrollen wurden jeweils die Puffer mit den Zusätzen verwendet, in denen die Proteasen/Spermien vorlagen. Auch nicht aktiviertes Proovastacin wurde als Kontrolle verwendet.

2.6.9. Zona pellucida Abbau mit α -Chymotrypsin

Ein Maß für die Konversion von *Zona pellucida* Protein 2 ist die Resistenz der *Zona pellucida* gegenüber proteolytischer Degradation (GWATKIN, 1964, GULYAS & YUAN, 1985). Je länger die notwendige Zeit zum Auflösen der *Zona pellucida*, desto höher der Anteil an prozessiertem *Zona pellucida* Protein 2. Die Eizellen für diesen Versuch wurden wie unter 2.6.4 beschrieben gewonnen. Vor dem Verdau wurden die Eizellen mit den jeweiligen Agenzien inkubiert. Die Dauer und die Konzentration sind in den jeweiligen Abbildungen beschrieben. Die Inkubationen erfolgten immer in HTF-Medium. Das Ca^{2+} -Ionophor A23187 (C7522, Sigma-Aldrich, D-Taufkirchen) lag als 2,5 mM Stammlösung in Dimethylsulfoxid vor. Ovastacin wurde, wie unter 2.5.2 beschrieben, mit Plasmin aktiviert, allerdings wurden alle Verdünnungen in HTF-Medium erstellt. Proovastacin wurde vor der Zugabe genauso behandelt, nur wurde kein Plasmin zugegeben. Akrosin lag in Akrosinpuffer (siehe Tabelle 11) mit ca. 10 μM vor. Vor dem Verdau wurden die Eizellen zweimal durch 200 μl PBS mit 0,1 % Polyvinylalkohol gewaschen. α -Chymotrypsin (C4129, Sigma-Aldrich, D-Taufkirchen) wurde frisch als 2 mg/ml Lösung in PBS mit 0,1 % Polyvinylalkohol und 1 mM CaCl_2 angesetzt. Die Eizellen wurden schnell in einem 100 μl Tropfen der α -Chymotrypsin-Lösung gewaschen und in einen zweiten Tropfen umgesetzt. Die Dokumentation erfolgte unter einem Stereomikroskop (siehe 2.6.3) und wurde gestartet, sobald die Eizellen in den ersten Tropfen mit α -Chymotrypsin gegeben wurden. Es wurden zwei Bilder pro Minute aufgenommen.

In der Auswertung wurde die Zeit bis zum Verschwinden der *Zona pellucida* für jede Eizelle dokumentiert und als „Boxplot“ dargestellt. Einzelne Versuche wurden mit dem Mann-Whitney-U Test auf signifikante Unterscheidung getestet.

2.7. Bioinformatik

2.7.1. Alignments

Um Akrosin aus *Sus Scrofa* und *Mus Musculus* zu vergleichen, wurden Alignments der Proteinsequenzen angefertigt. Für die Alignment wurde das BLAST Online-Tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) verwendet (ALTSCHUL ET AL., 1997, 2005). Die Sequenz von murinem Akrosin ist in der Datenbank UniProt (www.uniprot.org) unter P23578 abgelegt, die von Eber Akrosin unter P08001. Es wurden einmal die gesamten Sequenzen der Proteine verglichen und außerdem die Sequenz der Eber β -Akrosin Struktur, die mit der PDB ID: 1FIZ auf www.rcsb.org abgelegt ist, mit der korrespondierenden Sequenz von murinem Akrosin.

2.7.2. Strukturmodelle

Um Homologiemodelle zu erstellen, wurde die Online-Ressource SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) verwendet (BENKERT ET AL., 2011; BERTONI ET AL., 2017; GUX ET AL., 2009; WATERHOUSE ET AL., 2018). Die Struktur von Eber β -Akrosin (PDB ID: 1FIZ) wurde als Grundlage genutzt. Von murinem Akrosin wurde die für diesen Bereich äquivalente Sequenz als zu modellierende Sequenz angegeben (siehe Alignment Abbildung 15). Es wurde ohne die „*light chain*“ von murinem Akrosin modelliert. Das resultierende Modell wurde im pdb-Format heruntergeladen und mit UCSF Chimera Version 1.14 (PETTERSEN ET AL., 2004, <http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera>) dargestellt.

3. Ergebnisse

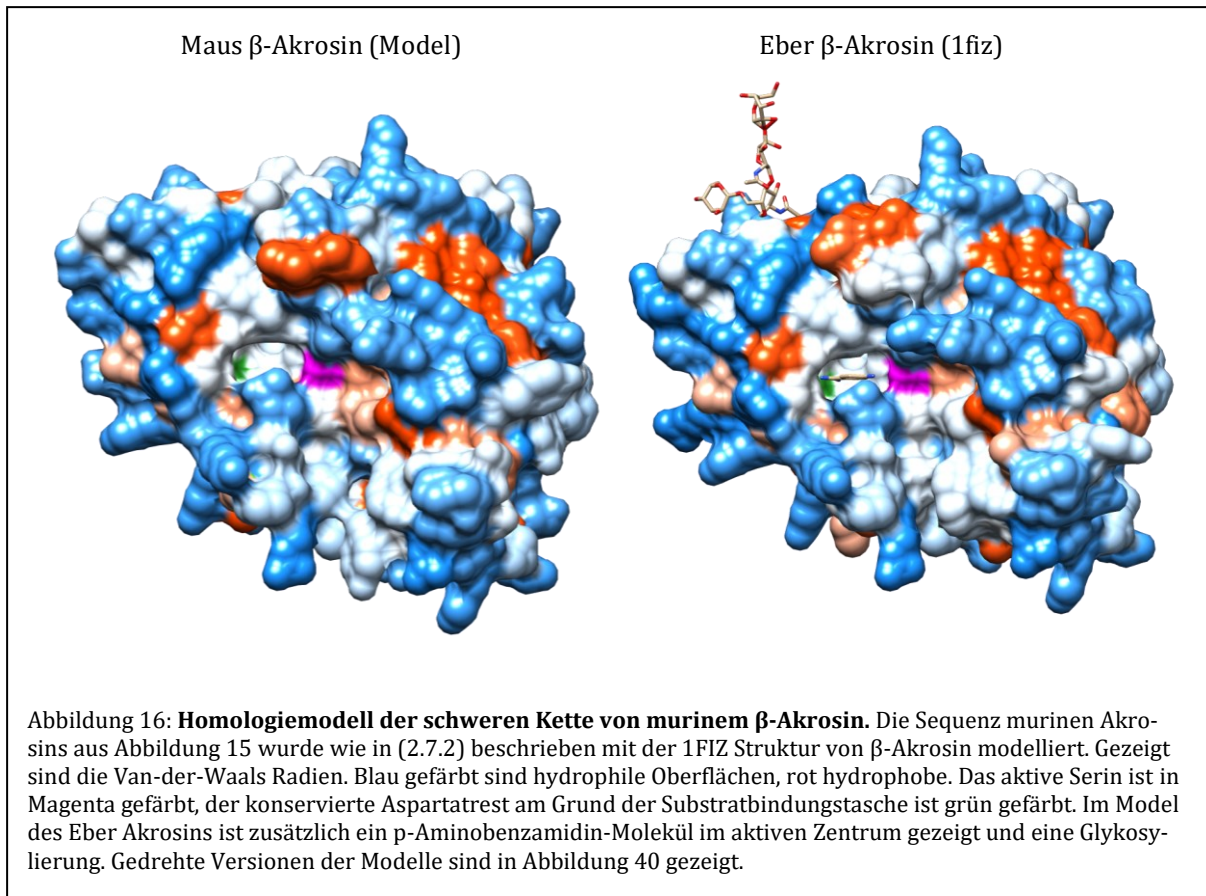
3.1. Alignment und Homologiemodell von β -Akrosin aus Maus und Eber

Die Proteinsequenzen von Eber β -Akrosin und dem Aminosäuren-Abschnitt 19-302 von murinem Akrosin sind zu 75 % identisch und zu 84 % ähnlich, ohne dass Lücken in der Sequenz auftauchen (Abbildung 15). Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind konserviert, ebenso wie das für die Substratbindung wichtige Aspartat. Außerdem sind diese Aminosäuren in stark konservierte Bereiche eingebettet. Das Alignment über die gesamte Sequenz der beiden Proteine (Abbildung 42 Anhang) zeigt eine etwas geringere Sequenzidentität von 65 %. Die größten Unterschiede zeigen sich im C-Terminalen, prolinreichen Bereich der Proteine, der im aktiven β -Akrosin nicht mehr vorhanden ist.

Identisch:214/284(75%), Ähnlich:240/284(84%), Gaps:0/284(0%)			
	leichte Kette	schwere Kette	
Eber-Akrosin: 16	RDNATCDGPGCLRFRQKLESGMRVVGMSAEPGAWPMMVSLQIFMYHNNRRYHTCGGILL		75
Maus-Akrosin: 19	+DN TCDGPGCLRFRQ ++G R+V G SA+ GAWPMMVSLQIF HN+RRYH CGG LL		78
Eber-Akrosin: 76	NSHWVLTAAHCFKNNKKVTDWRLIFGANVWGSNKPVKPPLQERFVEEIIHEKYVSGL		135
Maus-Akrosin: 89	NSHWVLTAAHCFDNKKKVYDWRVLFGAQEIEYGRNKPVEPQQERYVQKIVIHEKYNVVT		138
Eber-Akrosin: 136	EINDIALIKITPPVPCGPFIFGPGCLPQFKAGPPRAPQTCWVTGWGYLKEKGPRTSPTLQE		195
Maus-Akrosin: 139	EINDIALIKITPPVCG FIGP CLP FKAGPP+ P TC+VTGWGY+KEK PR SP L E		198
Eber-Akrosin: 196	ARVALIDLELCNSTRWYNGRIRSTNVCAGYPRGKIDTCQGDSSGGPLMCRDRAENTFVVVG		255
Maus-Akrosin: 199	ARV LIDL+LCNST+WYNGR+ STNVCAGYP GKIDTCQGDSSGGPLMCRD ++ FVVVG		258
Eber-Akrosin: 256	ITSWGVCARAKRPGVYTSTWPYLNWIASKIGSNALQMVQLGTP		299
Maus-Akrosin: 259	ITSWGVCARAKRPGVYTATWDYLDWIASKIGPNALHLIQATP		302

Abbildung 15: **Alignment von β -Akrosin aus Maus und Schwein.** Es wurden die korrespondierenden Aminosäuren aus murinem Akrosin mit der Aminosäuresequenz der β -Akrosin Struktur aus TRANTER ET AL., (2000) (PDB ID 1FIZ) align. Das Alignment über die gesamten Sequenzen ist in Abbildung 42 gezeigt. Rot eingerahmt sind die Aminosäuren der katalytischen Triade, grün das Aspartat am Grund der Substratbindungstasche. UniProt# murin: P23578; Schwein: P08001

Die Frontalansicht des aktiven Zentrums von β -Akrosin aus *Sus scrofa* und dem generierten Modell von murinem β -Akrosin sind sich sehr ähnlich (Abbildung 16). Die Lage des in Magenta gefärbten aktiven Serinrests und des in grün gehaltenen Aspartatrests am Boden der Substratbindetasche sind in vergleichbarer Lage zueinander. Auch die Verteilung von hydrophilen (blau) und hydrophoben (rot) Flächen in und um den aktiven Spalt ergibt ein ähnliches Muster. Unterschiede werden eher auf der Rückseite der Proteine sichtbar. Hier (Abbildung 40 Anhang) überlappt das Muster der Oberflächeneigenschaften nicht mehr.



3.2. Quantifizierung der Ovastacinmenge pro Eizelle

Um die *in vivo* vorliegenden Mengen der relevanten Proteine abzuschätzen zu können wurde die Menge von Ovastacin in Eizellen gegen eine bekannte Menge rekombinantes

Ovastacin im *Western blot* aufgetragen um die Menge von Ovastacin pro Eizelle annähernd zu quantifizieren.

Im ersten Schritt wurde die Reinheit von Ovastacin bestimmt. Es wurden vier verschiedene Mengen Ovastacin aufgetragen, um sicherzustellen, dass bei niedriger Proteinmenge keine falsch hohe Reinheit berechnet wird, falls einzelne Proteinbanden unter die Sensitivitätsgrenze der Methode fallen. In der Coomassiefärbung der Proben zeigt sich eine Vielzahl von Banden (siehe Abbildung 17). Der für Ovastacin relevante Bereich

beginnt kurz unter der 40 kDa Markerbande und reicht bis ca. zur 50 kDa Markerbande. Die betreffende Region ist in den Spuren mit einem kleinen grünen Kasten eingrahmt. In diesem Bereich sind zwei nahe zusammenliegende Banden zu erkennen.

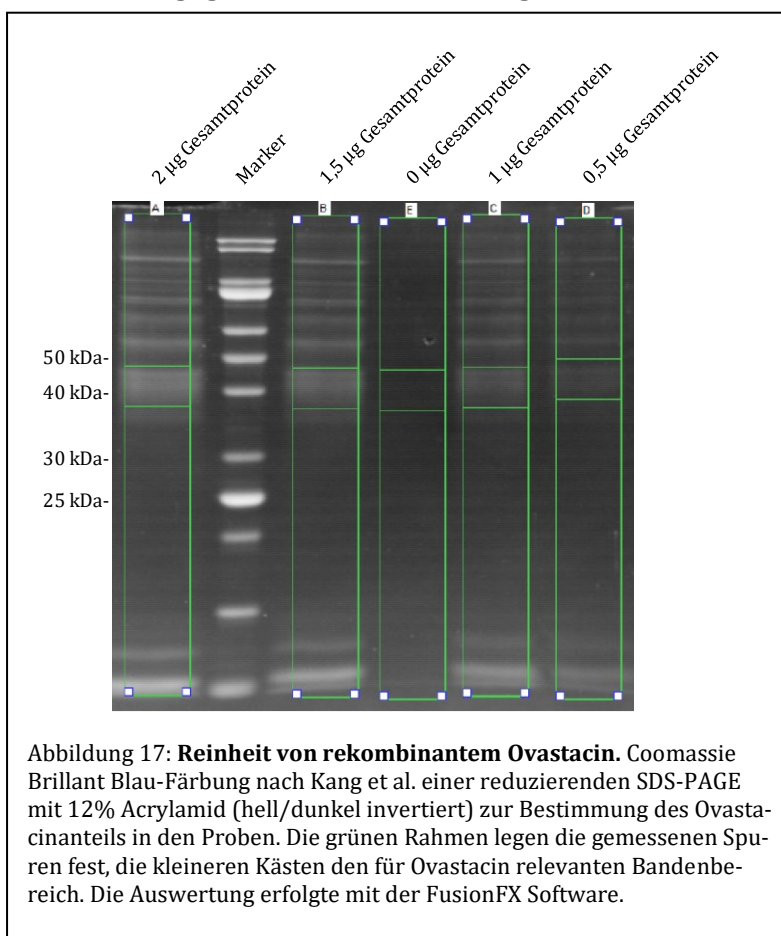


Abbildung 17: **Reinheit von rekombinantem Ovastacin.** Coomassie Brilliant Blau-Färbung nach Kang et al. einer reduzierenden SDS-PAGE mit 12% Acrylamid (hell/dunkel invertiert) zur Bestimmung des Ovastacinanteils in den Proben. Die grünen Rahmen legen die gemessenen Spuren fest, die kleineren Kästen den für Ovastacin relevanten Bandenbereich. Die Auswertung erfolgte mit der FusionFX Software.

Tabelle 17: **Bestimmung der Ovastacinreinheit.** Werte mit FusionFX Software in Abbildung 17 gemessen.

	Gesamt [AU]	Abzüglich E (Kontrolle) [AU]	Anteil [%]	Rein- heit [%]	Ovastacin- bereich [AU]	Abzüglich E (Kon- trolle) [AU]	Anteil [%]
A (2 µg Protein)	2707087	877626	100	18,74	289665	164456	100
B (1,5 µg Protein)	2361545	532084	60,6	20,65	235059	109850	66,8
C (1 µg Protein)	2206699	377238	43,0	17,56	191450	66241	40,3
D (0,5 µg Protein)	2037144	207683	23,7	20,35	167464	42255	25,7
E (0 µg Protein)	1829461				125209		
Mittelwert				19,32 ± 1,25			

Die Spuren wurden mit der FusionFX Software ausgewertet. Bei der Berechnung der Reinheit (Angaben in %; siehe Tabelle 17) zeigte sich nur ein geringer Unterschied zwischen den verschiedenen Probenmengen, daher wurde der Mittelwert der vermessenen Proben als Reinheit angenommen. Dieser betrug $19,32 \pm 1,25$ % und ist die Grundlage für die in Abbildung 18 angegebenen Ovastacinmengen.

Die quantitative Immunodetektion von Ovastacin ist in Abbildung 18 gezeigt. Die Proben wurden mit dem anti-Ovastacin-Pro-Kat Antikörper gefärbt. Im rekombinanten Ovastacin ist neben den Banden zwischen 40 und 50 kDa auch eine Bande über 50 kDa zu erkennen. Da diese Bande in der Probe der Eizellen nicht auftaucht, wurde sie nicht in die Mengenbestimmung mit einbezogen. Für die Signalstärke der Antikörperfärbung im Westerblot wurde mithilfe verschiedener Mengen rekombinanten Ovastacins eine Eichgerade erstellt (Abbildung 43). Eine Probe von Eizellen mit unbekannter Ovastacinmenge wurde dann anhand dieser Eichgeraden bestimmt. Die Eizellprobe liegt mit ca. 2,5 ng im Bereich der Eichgeraden. Alle Proben wurden im gleichen Versuch gemessen, um Schwankungen in der Stärke der Färbung oder in der Effizienz der Übertragung auf die Membran soweit wie möglich auszuschließen. Die Berechnung durch die Gleichung der ermittelten Regression ergibt eine Menge von etwa 1,25 fmol pro Eizelle.

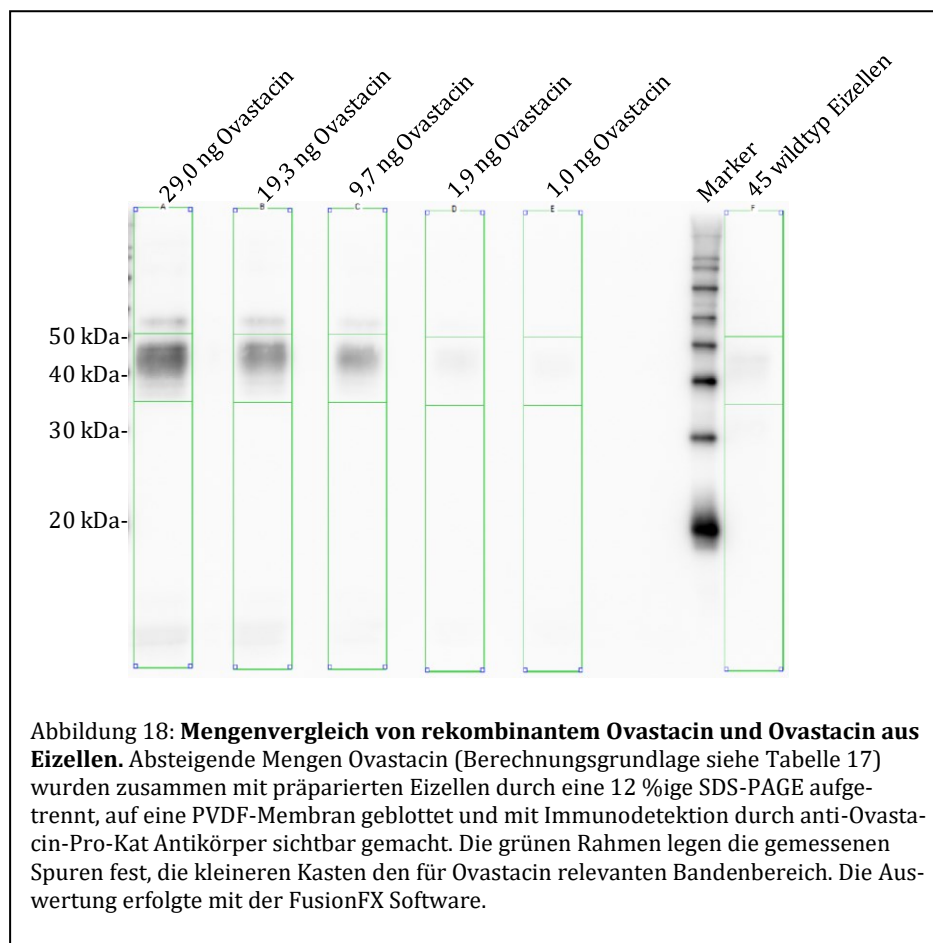
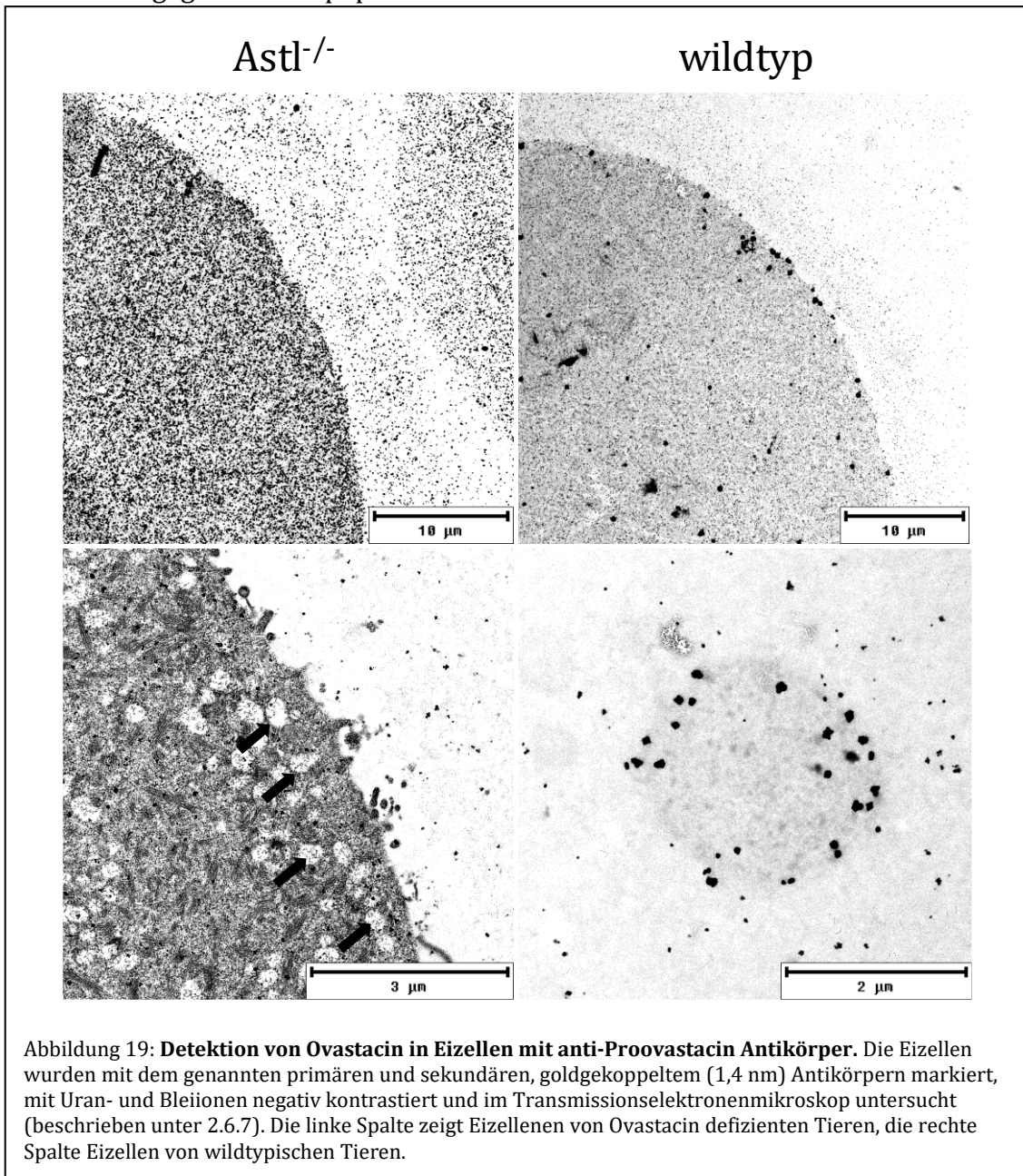


Tabelle 18: **Messwerte der Ovastacinsignalstärke und Berechnung der Ovastacinmenge pro Eizelle.** Die in Abbildung 43 ermittelte Regressionsgleichung wurde der Berechnung zugrunde gelegt.

Ovastacin [ng]	Signalvolumen [AU]	
29	143437392	
19,3	86474947	
9,7	52506246	
1,9	12467758	
1	9295802	
45 wildtyp Eizellen	16659167	
Ovastacin pro 45 Eizellen [g]	Ovastacin pro Eizelle [g]	Ovastacin pro Eizelle [mol]
$2,53 \cdot 10^{-9}$	$5,63 \cdot 10^{-11}$	$1,25 \cdot 10^{-15}$

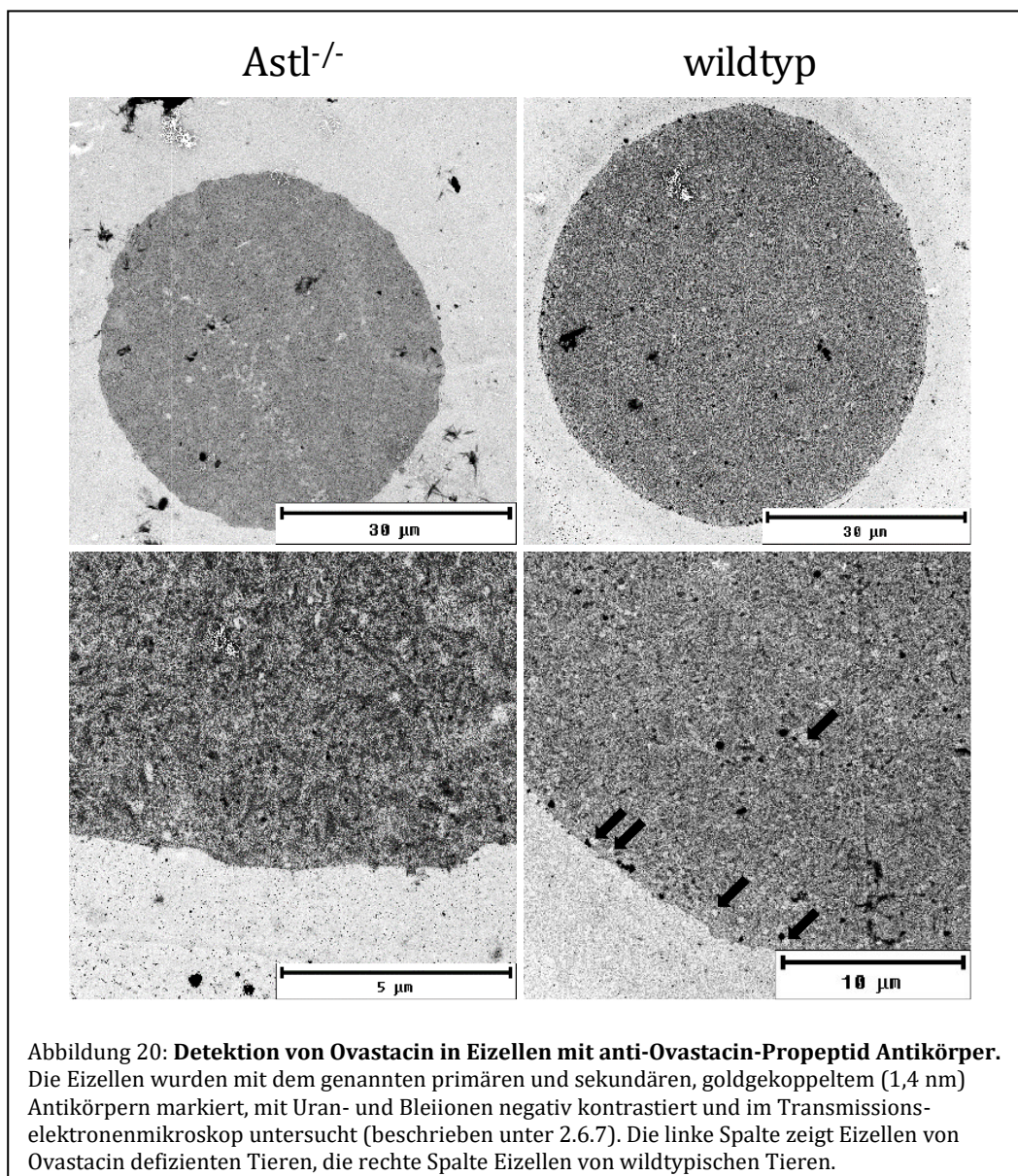
3.3. Nachweis von Ovastacin in Eizellen durch Transmissionselektronenmikroskopie

Um die Lokalisation von Ovastacin, die bereits durch Immunfluoreszenzmikroskopie gezeigt wurde (BURKART ET AL., 2012; KÖRSCHGEN ET AL., 2017), auf subzellulärer Ebene höher auflösend darzustellen, wurden Dünnschnitte von Eizellen des Wildtyps und *Astl*^{-/-} Eizellen im Transmissionselektronenmikroskop untersucht. Es wurden zwei polyclonale Antikörper verwendet, einer gerichtet gegen das gesamte Protein, der andere ausschließlich gegen das Propeptid von Ovastacin.



In Abbildung 19 sind die Ergebnisse der Färbung mit dem anti-Proovastacin Antikörper gezeigt. In den Übersichtsaufnahmen (obere Zeile) zieht sich in den *Astl*^{-/-} Aufnahmen ein Signalschleier über die gesamte Eizelle, der so nicht im Wildtyp auftritt. Im

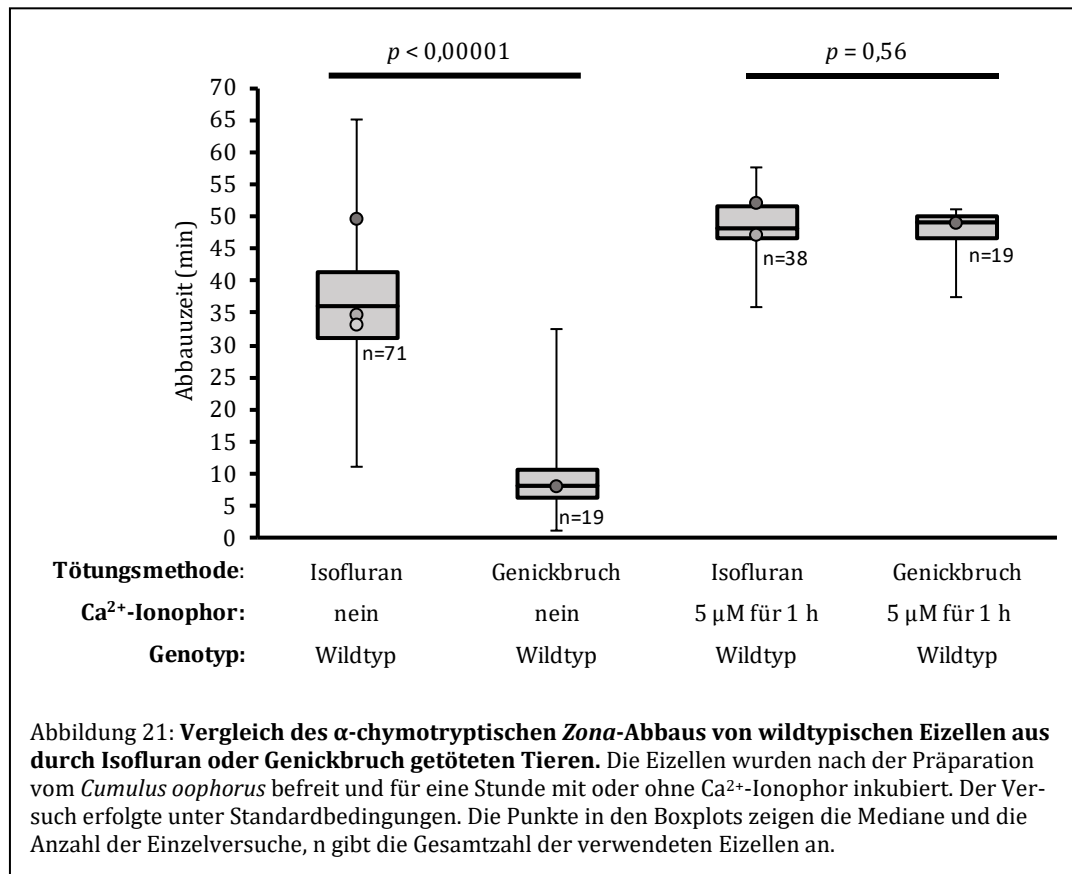
Wildtyp zeigt sich die Markierung hauptsächlich direkt unterhalb des Oolemmas und vereinzelt im Inneren der Eizelle. In den höher aufgelösten Aufnahmen (untere Reihe) sind im *Astl*^{-/-} helle Bereiche erkennbar (schwarze Pfeile), die nicht vom Antikörper markiert wurden. Im Wildtyp konnte leider nur die Aufnahme eines Eizellpols analysiert werden. Hier sind wieder die Signale wie im Übersichtsbild sichtbar, jedoch sind keine vesikulären Strukturen zu sehen, die sich mit der nicht markierten Kontrolle im *Ovastacin*-KO vergleichen ließen.



In der Markierung mit dem gegen das Propeptid gerichteten Antikörper (siehe Abbildung 20) zeigt sich ein vergleichbares Bild. In den *Astl*^{-/-} Eizellen zeigt sich unspezifische Markierung verteilt über die gesamte Eizelle. Das Signal im Wildtyp tritt direkt am Oolemma und vereinzelt im Inneren der Eizelle auf. Im Wildtyp sind aber auch Granula erkennbar, die nicht vom Antikörper gefärbt wurden (schwarze Pfeile).

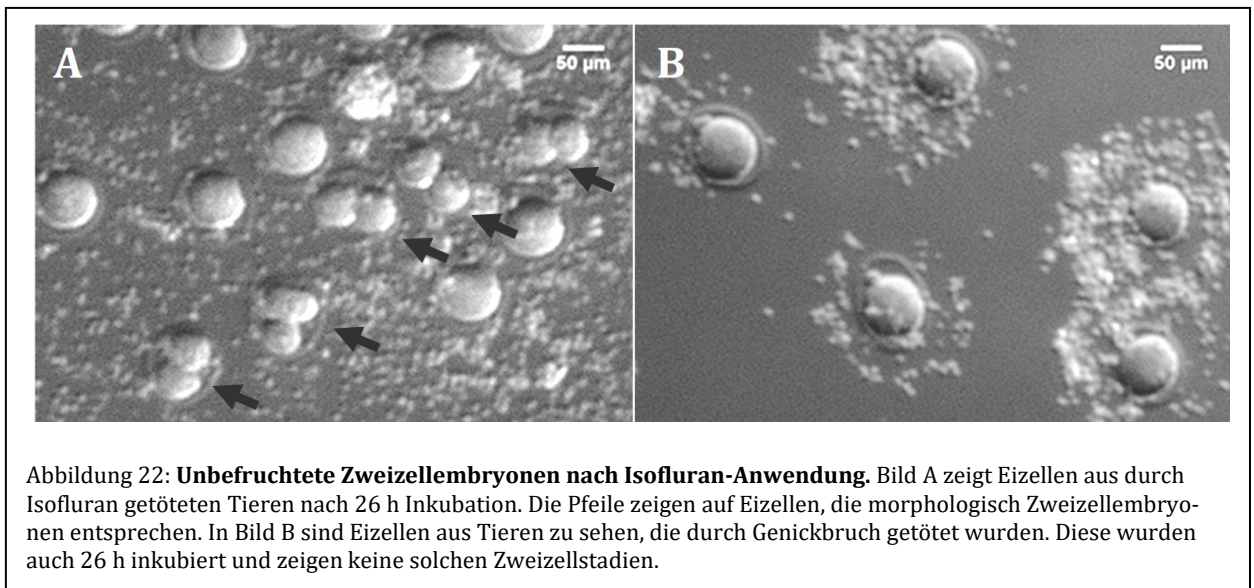
3.4. Isofluran verursacht die parthenogenetische Aktivierung von Eizellen

Im Zuge der Gewinnung der Eizellen werden die Spendertiere getötet. Dafür setze ich zu Beginn der Arbeit das Narkosemittel Isofluran ein. Bei der Anwendung dieser Methode zeigten sich jedoch Auffälligkeiten bei den gewonnenen Eizellen.



Bei Eizellen aus durch Isofluran getöteten Tieren wurde, im Test der *Zona pellucida* Robustheit mit α -Chymotrypsin, eine deutliche Erhöhung der Degradationszeit festgestellt (siehe Abbildung 21). Der Median liegt hier bei 36 Minuten und die einzelnen Werte sind breit verteilt. Im Vergleich liegt der gemessene Median der Abbauzeit von Eizellen aus durch Genickbruch getöteten Tieren bei nur 8 Minuten und ist deutlich signifikant. Die maximale Zeitdauer für den *Zona*-Abbau, die durch die Stimulation der Eizellen durch Ca²⁺-Ionophor erreicht wird, unterscheidet sich jedoch nicht signifikant.

Ein weiterer Unterschied war das Auftauchen von Zweizellstadien in Ansätzen, denen keine Spermien zugesetzt waren. Die unbefruchteten Zweizell-Embryonen traten wiederum nur bei Eizellen auf, die aus mit Isofluran getöteten Tieren stammten. In Abbildung 22 sind Beispiele für diese scheinbaren Embryonen (A) zu sehen. Im Vergleich dazu sind ebenso lange inkubierten Eizellen aus durch Genickbruch getöteten Tieren in (B) gezeigt. Was neben dem Vorkommen von morphologischen Zweizellern auffällt, ist die deutlich gleichmäßigere Dispersion des die Eizellen umgebenden *Cumulus oophorus* in Teilabbildung A.



3.5. Rekombinantes Ovastacin spaltet natives *Zona pellucida* Protein 2

Um die Wirksamkeit von rekombinantem Ovastacin gegen natives ZP2 zu testen, wurde Proovastacin wie unter 2.5.2 beschrieben aktiviert, zu Eizellen des Ovastacin-*knockouts* gegeben und für 1 h inkubiert. Als Kontrollen wurden nicht aktiviertes Proovastacin, der Aktivierungsansatz ohne Proovastacin und aktiviertes Ovastacin zusammen mit dem Inhibitor Fetuin-B verwendet. Der *Western blot* mit dem anti-ZP2 Antikörper IE-3 zeigt folgendes (Abbildung 23). Das Signal auf der Höhe von 120 kDa in der Probe mit aktivem Ovastacin verschwindet fast vollständig. In keiner der Kontrollen ist dies der Fall. Lediglich in der Probe mit nicht aktiviertem Proovastacin tauchen im Bereich 20-40 kDa Fragmente auf, die sich auch in der Probe mit aktivem Ovastacin zeigen. Diese Fragmente sind in der Kontrolle mit Fetuin-B sowie in der Kontrolle ohne Proovastacin nicht sichtbar.

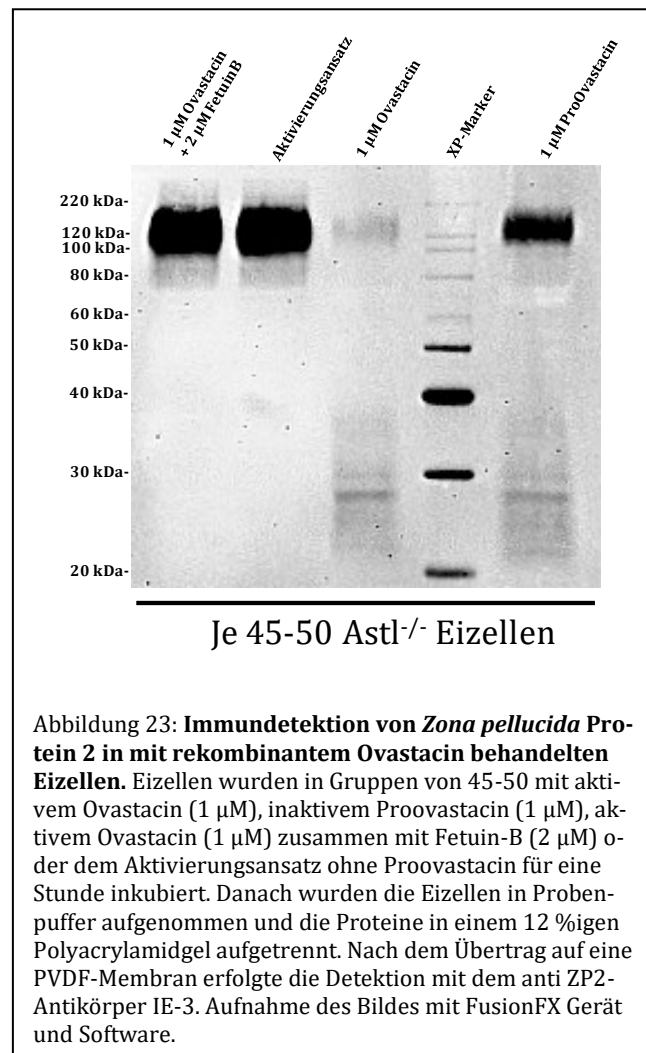
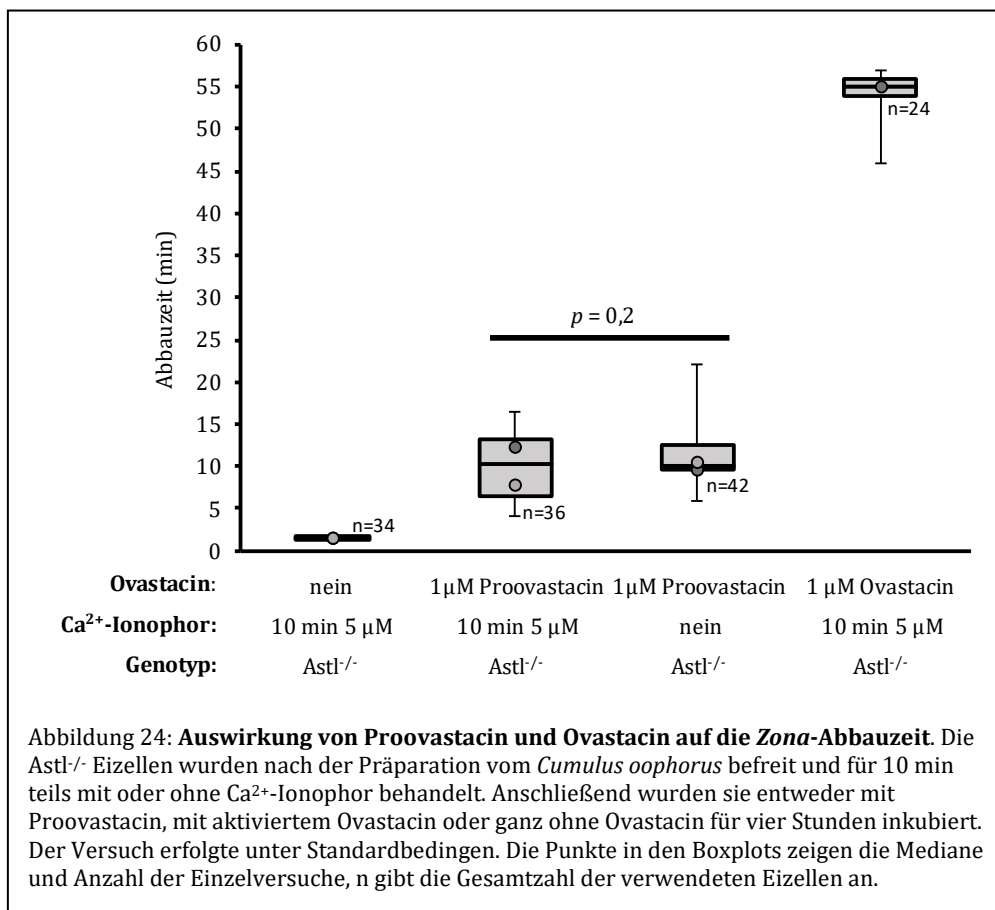


Abbildung 23: **Immundetektion von *Zona pellucida* Protein 2 in mit rekombinantem Ovastacin behandelten Eizellen.** Eizellen wurden in Gruppen von 45-50 mit aktivem Ovastacin (1 µM), inaktivem Proovastacin (1 µM), aktivem Ovastacin (1 µM) zusammen mit Fetuin-B (2 µM) oder dem Aktivierungsansatz ohne Proovastacin für eine Stunde inkubiert. Danach wurden die Eizellen in Probenpuffer aufgenommen und die Proteine in einem 12 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Übertrag auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion mit dem anti ZP2-Antikörper IE-3. Aufnahme des Bildes mit FusionFX Gerät und Software.

Zur weiteren Verifizierung dieses Effekts wurden auch *Zona*-Degradations Versuche (Abbildung 24) durchgeführt. In Deckung mit Abbildung 23 zeigte sich eine große Zunahme der Degradationszeit, wenn aktiviertes Ovastacin anwesend war und eine kleinere Zunahme, wenn Proovastacin anwesend war. Diese Zunahme war nicht signifikant abhängig vom Ca^{2+} -Ionophor-bedingten Aktivierungszustand der Eizellen (vgl. mittleren beiden Boxplots in Abbildung 24).



3.6. Spermien setzten Akrosin ins Kapazitationsmedium frei

Zum Nachweis von Akrosin in kapazitierten Spermien und im Kapazitationsmedium aktivierter Spermien erfolgte die Detektion mit anti-Akrosin Antikörper. In Abbildung 25 ist in der Eber β -Akrosin Probe eine deutliche Bande bei 38 kDa zu erkennen. Im Kapazitationsmedium aktivierter Spermien sind zwei starke Banden auf Höhe von ca. 55 kDa und 29 kDa sichtbar. Knapp über der 29 kDa Bande ist eine weiter schwache Bande zu erkennen.

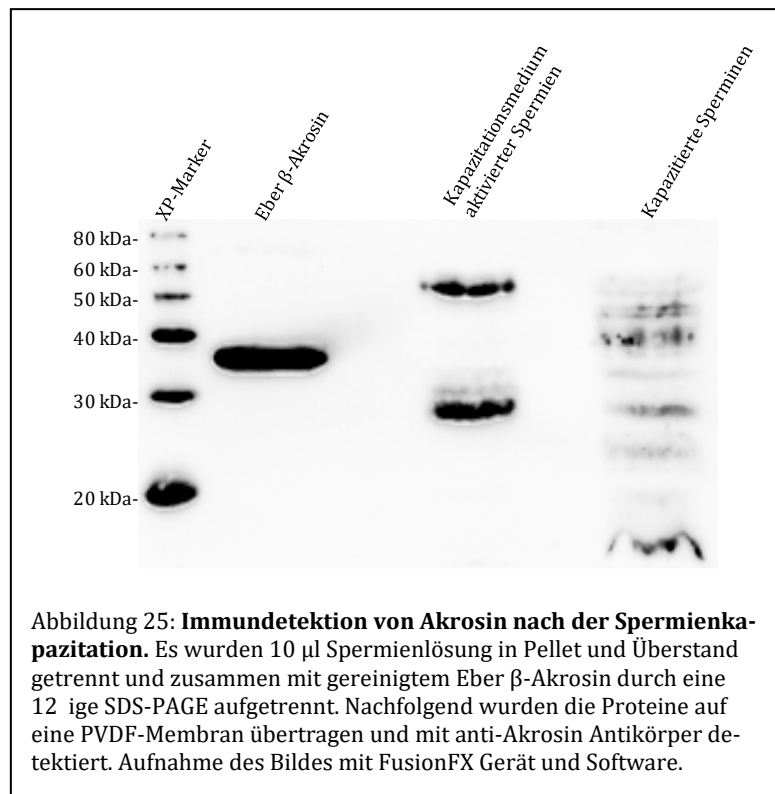


Abbildung 25: **Immundetektion von Akrosin nach der Spermienkapazitation.** Es wurden 10 μ l Spermienlösung in Pellet und Überstand getrennt und zusammen mit gereinigtem Eber β -Akrosin durch eine 12 ige SDS-PAGE aufgetrennt. Nachfolgend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und mit anti-Akrosin Antikörper detektiert. Aufnahme des Bildes mit FusionFX Gerät und Software.

In den kapazitierten Spermien selbst ist eine Vielzahl von Banden sichtbar, die alle ähnlich hohe Intensität haben.

3.7. Akrosin schneidet rekombinantes Fetuin-B

Ein weiterer möglicher Punkt, an dem Akrosin in die Befruchtung eingreifen kann, ist die Hemmung von Ovastacin durch Fetuin-B. In vorangegangenen Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass Fetuin-B von tryptischen Serinproteasen gespalten werden kann. Daher wurden Fetuin-B und Akrosin bei 37 °C zusammen inkubiert. Da Akrosin bei neutralem pH sukzessiv seine Aktivität verliert (POLAKOSKI ET AL., 1973), wurde dem Ansatz im Stundentakt frisches Akrosin zugesetzt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 26. Die verschiedenen Färbungen beruhen auf Falschfarben, grün steht für die Färbung durch Coomassie, rot für die Färbung mit dem anti-Fetuin-B Antikörper.

Akrosin spaltet Fetuin-B in distinkte Banden (siehe Abbildung 26 (A)). Nach einer Stunde ist in den reduzierten Proben das Ausgangsprotein bei 55 kDa (sichtbar als gelbe Überlagerung in allen drei Kontrollen) nicht mehr sichtbar. In der mit Akrosin inkubierten Probe sind in der „grünen“ Coomassiefärbung drei deutliche Banden auf (29/ 33/ 36 kDa), in der Färbung mit dem anti-Fetuin-B Antikörper zwei Banden

(25/ 29 kDa) erkennbar. In der zugehörigen Kontrolle ist in der Coomassiefärbung eine starke Bande mit 55 kDa zu sehen, in der Antikörperfärbung ist diese Bande auch die deutlichste. Es tauchen zusätzlich mehrere kleinere Banden auf. Dieses Muster bleibt über die drei Stunden Inkubationszeit nahezu identisch (vgl. Kontrollen nach 1, 2 und 3 Stunden). Nach einer Versuchszeit von zwei Stunden ist die 36 kDa Bande der Coomassiefärbung fast verschwunden, die 33 kDa Bande dafür etwas heller sichtbar und die 29 kDa nahezu unverändert. In der Färbung durch den anti-Fetuin-B Antikörper ist die 25 kDa Bande nun deutlich stärker sichtbar und die 29 kDa Bande nur noch schwach sichtbar. Nach drei Stunden Inkubationszeit mit Akrosin ist in der mit Coomassie gefärbten Probe wieder eine starke dritte Bande auf ca. 35 kDa sichtbar, die Banden bei 33 und 29 kDa sind etwa so stark wie in den vorherigen Proben. Der anti-Fetuin-B Antikörper liefert hier kein Signal mehr.

In den nicht reduzierten Proben zeigen sich in den beiden Kontrollen Signale von Antikörper und Coomassiefärbung bei ca. 55 kDa bei ca. 160 kDa und mehrere Banden oberhalb 200 kDa. In der Probe, die für eine Stunde mit Akrosin inkubiert wurde, sind diese hochmolekularen Banden größtenteils verschwunden. Die Bande bei 165 kDa ist noch vorhanden, zusätzlich tritt eine deutliche Bande bei 110 kDa auf. An der mit weißem Stern markierten Stelle sind mit der Coomassiefärbung drei Banden um 35 kDa sichtbar, diese werden aber fast vollständig von einer vertikalen Linie aus Signal überdeckt. Bei einer Inkubationszeit von drei Stunden sind alle Signale über 200 kDa verschwunden. Das Signal bei 110 kDa ist nur noch sehr schwach sichtbar. Es treten in der Coomassiefärbung die gleichen drei Banden um 35 kDa auf, die in der für eine Stunde inkubierten Probe sichtbar sind.

Im Vergleich der Hemmstärke der mit Akrosin behandelten Fetuin-B Proben (siehe Abbildung 26 (B)) zeigt sich, dass bei 37 °C ohne Akrosin inkubierten Kontrollen ähnliche IC_{50} Werte anzeigen wie die nicht behandelte Kontrolle. Die unbehandelte Kontrolle hat einen IC_{50} von $1,52 \pm 0,12$ nM, die für eine Stunde inkubierte Kontrolle $1,30 \pm 0,07$ nM und die drei Stunden inkubierte Kontrolle $1,83 \pm 0,23$ nM. Im Gegensatz dazu liegt der IC_{50} der von einer Stunde mit Akrosin inkubierten Fetuin-B bei $2,71 \pm 0,34$ nM und der IC_{50} der für drei Stunden mit Akrosin inkubierten Fetuin-B Probe lässt sich bei den gewählten Konzentrationen nicht mehr aussagekräftig analysieren (GraFit®).

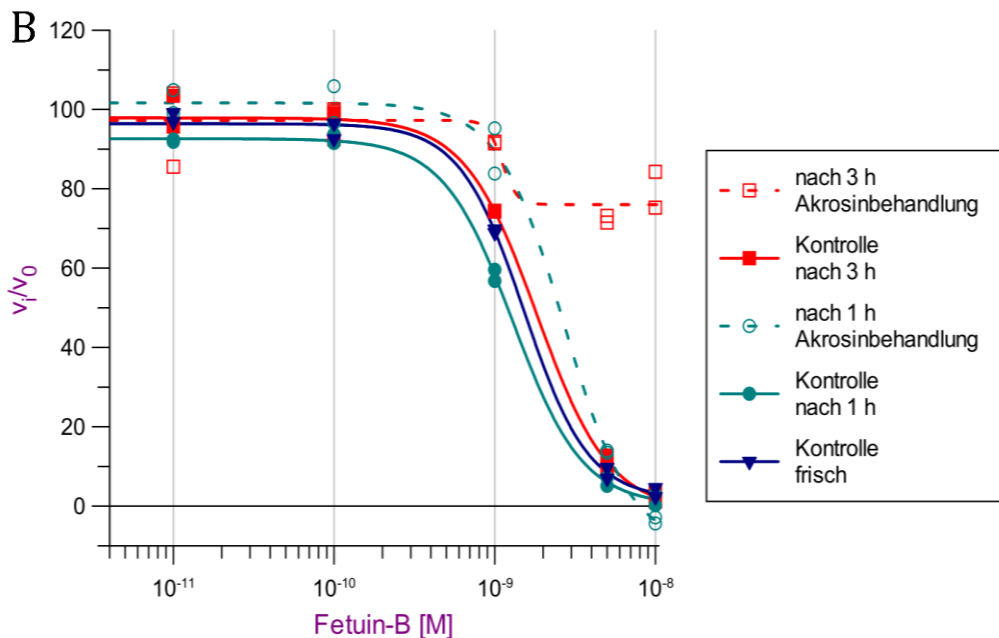
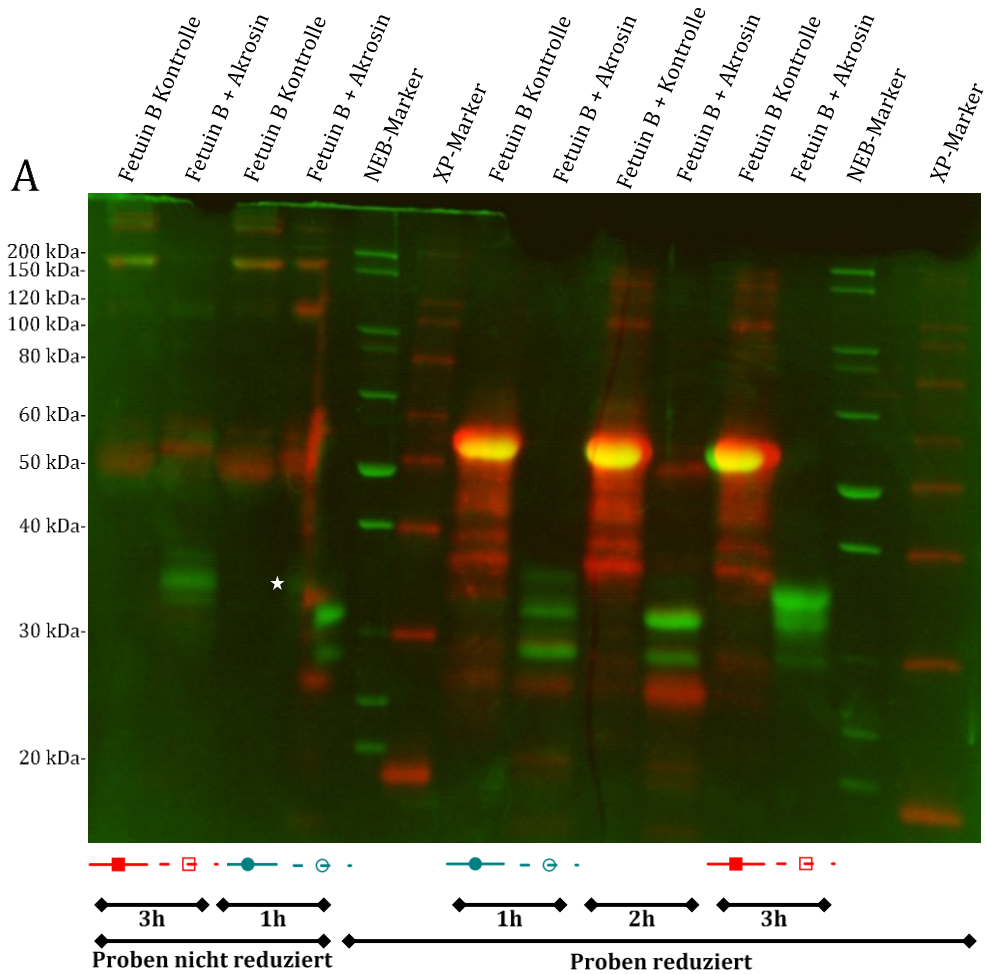
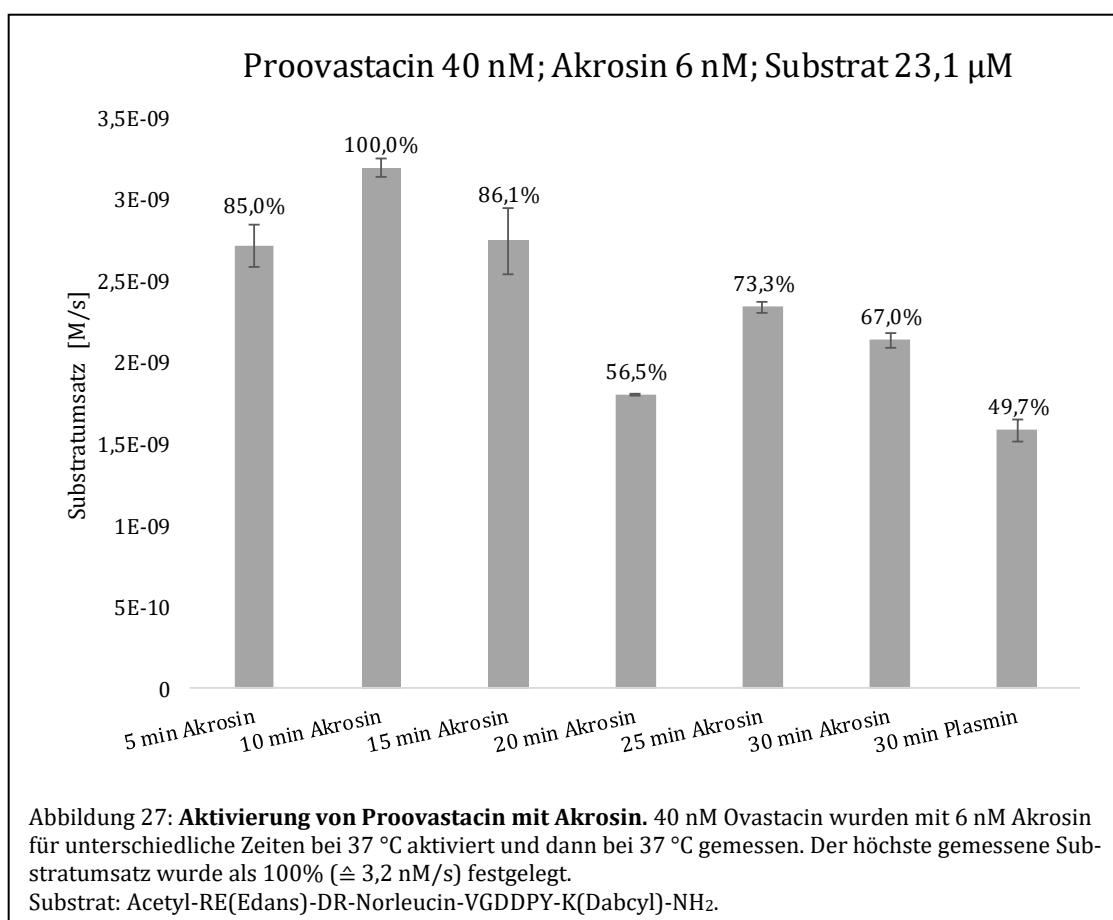


Abbildung 26: **Akrosin spaltet Fetuin-B.** (A) Die Proteolyse von Fetuin-B durch Akrosin ist unter 2.5.3 beschrieben. Es wurden je Bahn 2 µg Fetuin-B aufgetragen. Die Proben wurden durch eine 12%ige SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Das Gel wurde nach dem Blotting mit Coomassie gefärbt (2.4.4), was den grün gefärbten Banden entspricht. Die Membran wurde mit dem Antikörper gegen Fetuin-B gefärbt (2.4.5), was den roten Banden entspricht. Aufnahme des Bildes mit FusionFX Gerät und Software. (B) IC₅₀ Bestimmung ausgewählter Inkubationszeitpunkte von Fetuin-B. Die Messung wurde wie unter 2.5.3 beschrieben durchgeführt.

3.8. Akrosin aktiviert rekombinantes Proovastacin

Da Akrosin und Ovastacin zur gleichen Zeit am gleichen Ort auftreten, wurde überprüft, ob *in vitro* eine gegenseitige Beeinflussung auftritt. Da bereits bekannt ist, dass Proovastacin von Trypsin-ähnlichen Serinproteasen aktiviert wird (KARMILIN ET AL., 2019), war dies der erste Ansatzpunkt. In Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) wurde das optimale Proovastacin/Akrosin-Verhältnis für die Aktivierung bestimmt. Danach wurde die beste Dauer der Aktivierung ermittelt. Wie in Abbildung 27 zu sehen, ergab sich eine optimale Zeit von 10 min Aktivierung in diesem Ansatz, mit einem gemessenen Substratumsatz von 3,2 nM/s. Bei längerer Aktivierung verringert sich die gemessene Aktivität wieder graduell. Die Aktivierung mit Akrosin für 10 min führte im Vergleich zur bisherigen Aktivierungsmethode mit Plasmin ($\cong 1,6$ nM/s) zu einer Aktivitätssteigerung von 100%.



Die Aktivierung wurde auch in Bezug auf die Veränderung der Größen von aktiviertem und unbehandeltem Ovastacin untersucht. In Abbildung 28 wurde Ovastacin, das wie für Abbildung 27 aktiviert wurde, durch SDS-PAGE analysiert. Die Gele wurden entweder Coomassie-gefärbt oder nach dem *Western blot* mit Antikörpern gegen das gesamte Protein (anti-Proovastacin Antikörper) bzw. gegen das Propeptid von Ovastacin (anti-Ovastacin-Propeptid Antikörper) gefärbt. Im Coomassie-gefärbten Gel (A) gibt es eine deutliche Änderung im Vergleich zur unbehandelten Probe. Die beiden starken Banden bei 55 und 45 kDa verschwinden vollständig, dafür tauchen in den aktivierten Proben vier neue Banden auf. Die erste Bande (1) bei knapp unter 40 kDa wird mit steigender Aktivierungsdauer schwächer. Die zweite Bande (2) bei ca. 35 kDa bleibt über die steigende Aktivierungszeit konstant. Die dritte Bande knapp darunter (*) bleibt auch konstant und liegt auf der gleichen Höhe wie die höchste Bande in der Akrosinprobe. Die vierte Bande (4) auf Höhe von ca. 27 kDa hat die höchste Intensität bei 10 und 15 min und nimmt dann leicht ab.

Nach der Färbung mit dem anti-Proovastacin Antikörper (B) zeigt sich ein ähnliches Bild. In der unbehandelten Ovastacin-Kontrolle tauchen zwei starke Banden bei 55 und 45 kDa auf, die der Aktivierung mit Akrosin verschwinden. In den aktivierten Proben gibt es bis zu drei Banden. Die erste Bande (1) mit einer Größe von knapp 40 kDa taucht in allen Aktivierungszeiten auf und wird mit zunehmender Zeit schwächer. Die zweite Bande (2) liegt bei ca. 35 kDa, ist nach 5 min am stärksten, nimmt dann an Intensität ab und ist nach 20 min fast nicht mehr sichtbar. Die dritte Bande (3) bei ca. 29 kDa ist bei 10 min stärker als bei 5 min und nimmt dann graduell leicht ab.

In der Färbung mit dem anti-Ovastacin-Propeptid Antikörper (C) tauchen in der unbehandelten Ovastacinprobe wieder die beiden Banden bei 55 und 45 kDa auf. Nach der Aktivierung mit Akrosin ist nur noch eine Bande sichtbar (1). Sie liegt auf knapp 40 kDa und wird mit zunehmender Aktivierungszeit schwächer.

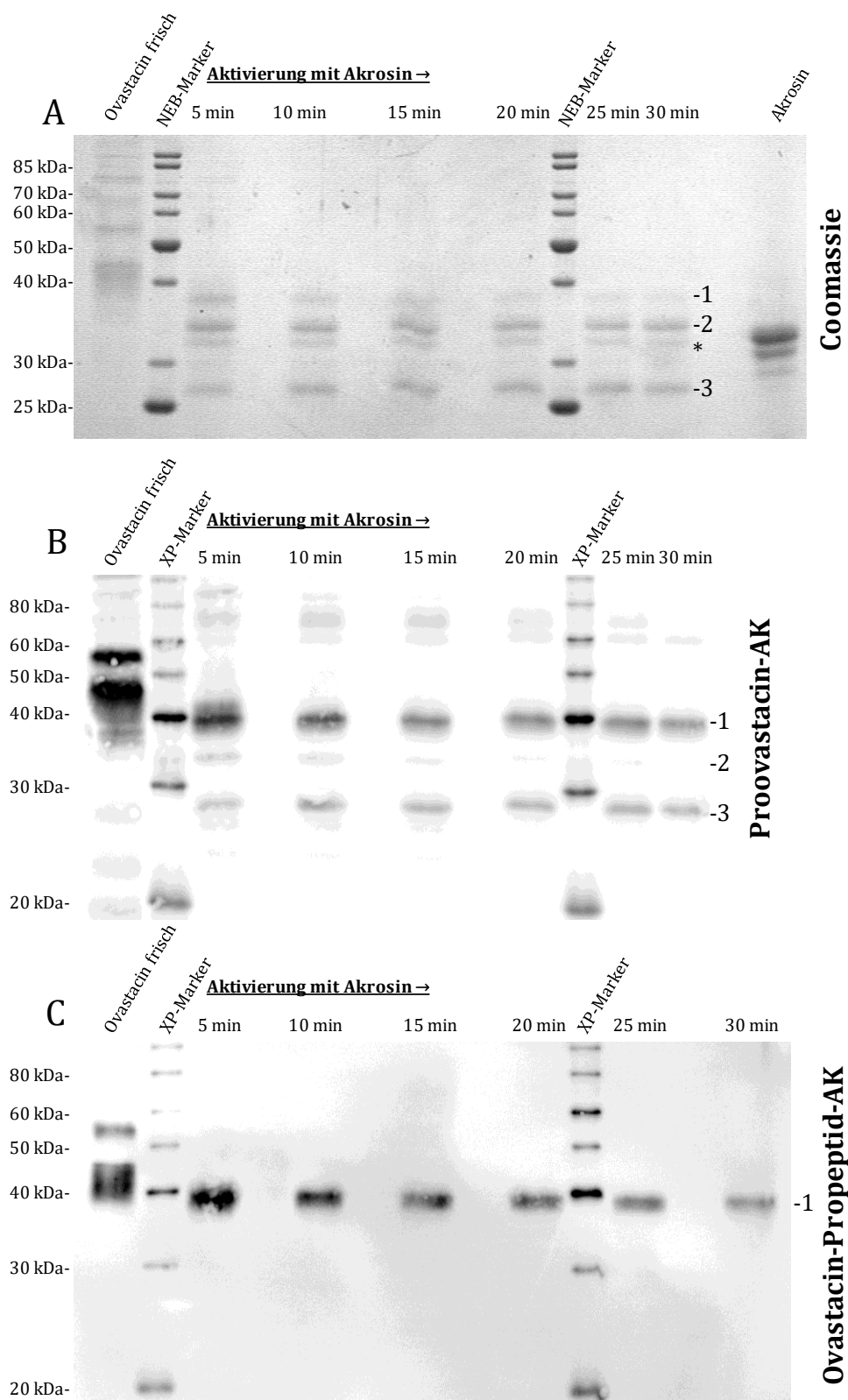
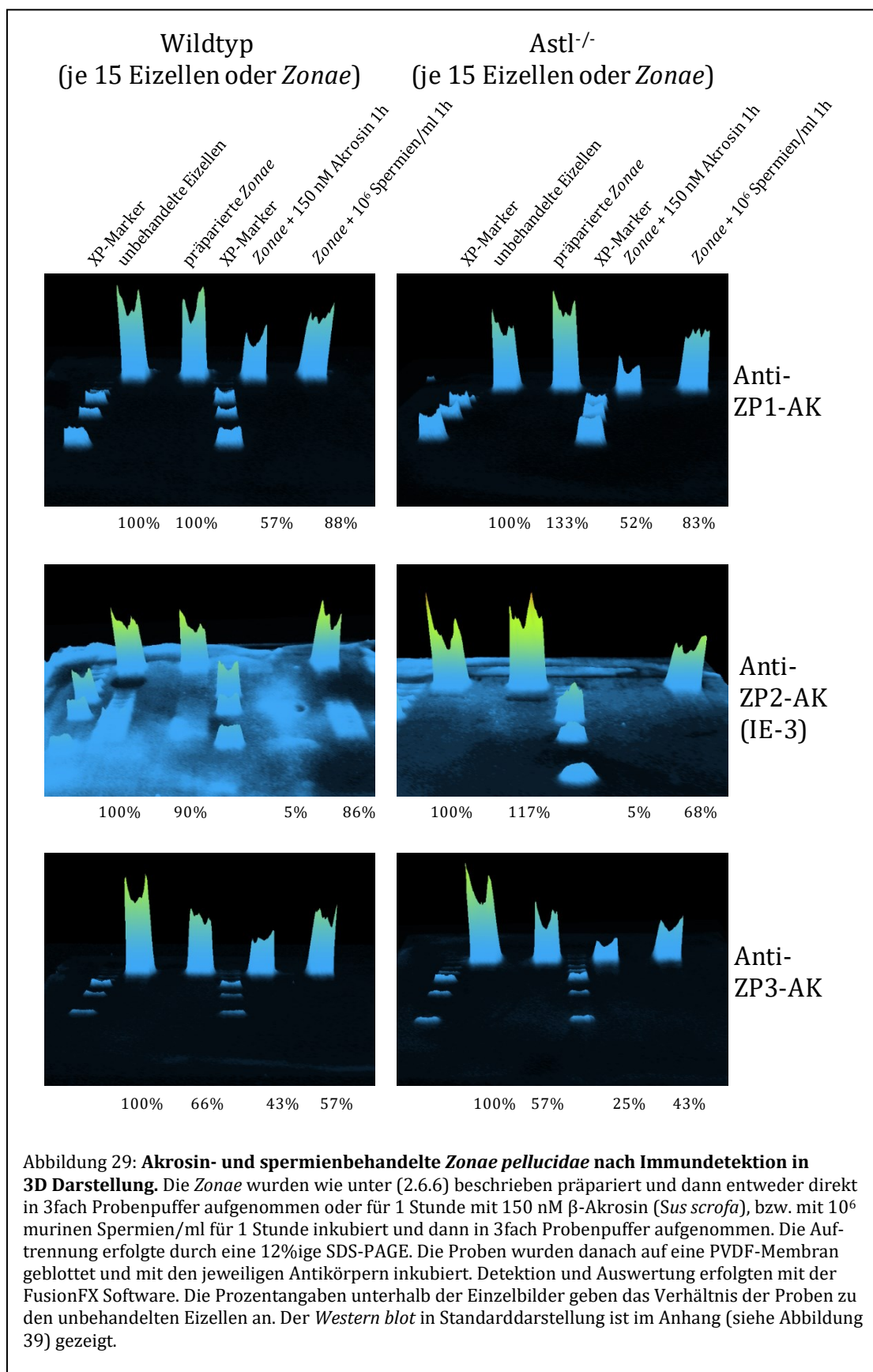


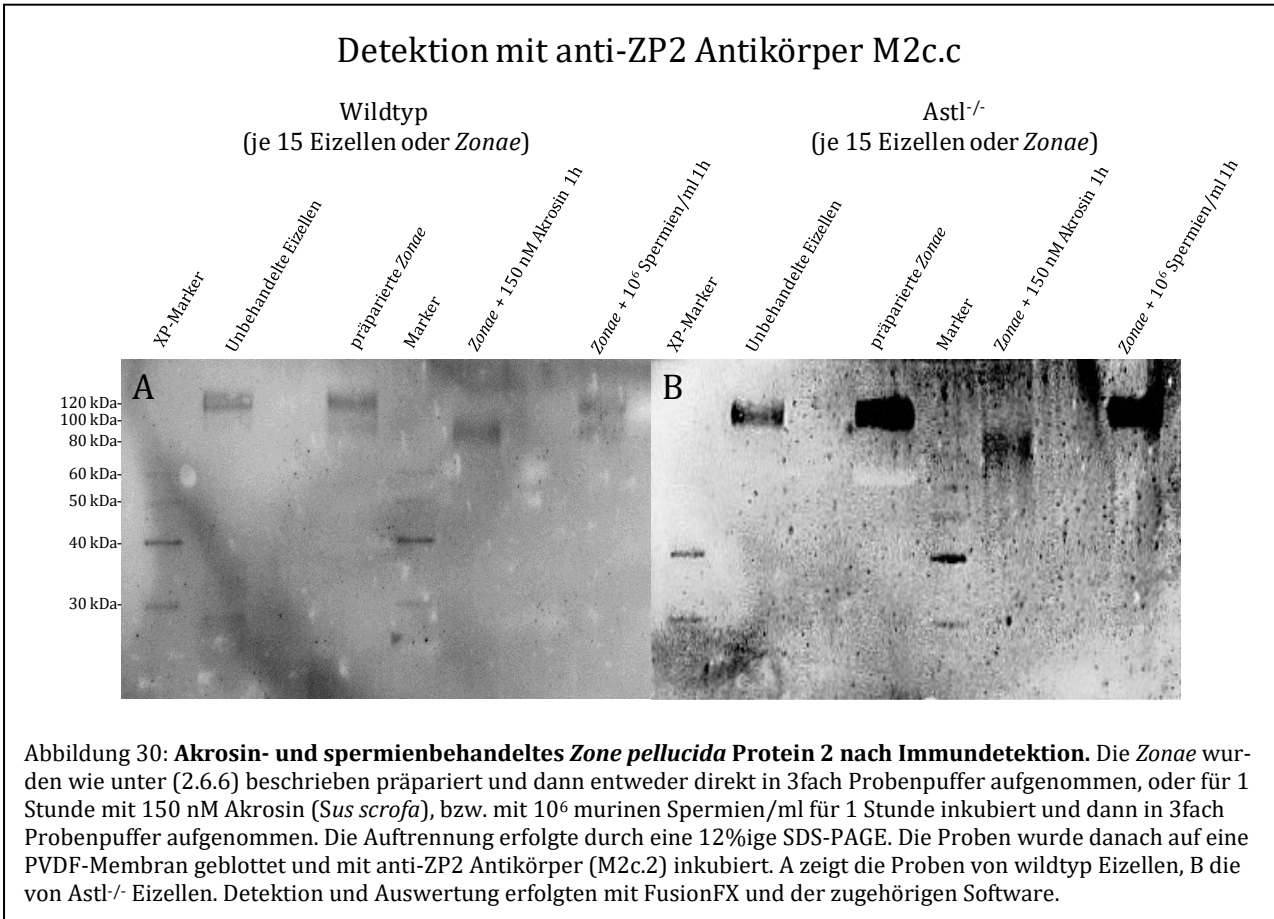
Abbildung 28: Nachweis der Aktivierung von Proovastacin mit Akrosin durch SDS-PAGE und Western blot. Ovastacin wurde im gleichen Verhältnis wie in Abbildung 27 mit Akrosin aktiviert. Anschließend wurden die Proben in 3fach Probenpuffer aufgenommen und gekocht. Es wurden je Bahn 2 µg Protein aufgetragen. Die Proben wurden durch eine 12%ige SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran (B/C) übertragen. Das Gel (A) wurde mit Coomassie gefärbt (2.4.4), Gel (B) wurde nach dem Blotting mit anti-Proovastacin Antikörper und Gel (C) mit anti-Ovastacin-Propeptid Antikörper detektiert. Aufnahme der Bilder mit FusionFX Gerät und Software.

3.9. Akrosin schneidet *Zona pellucida* Proteine

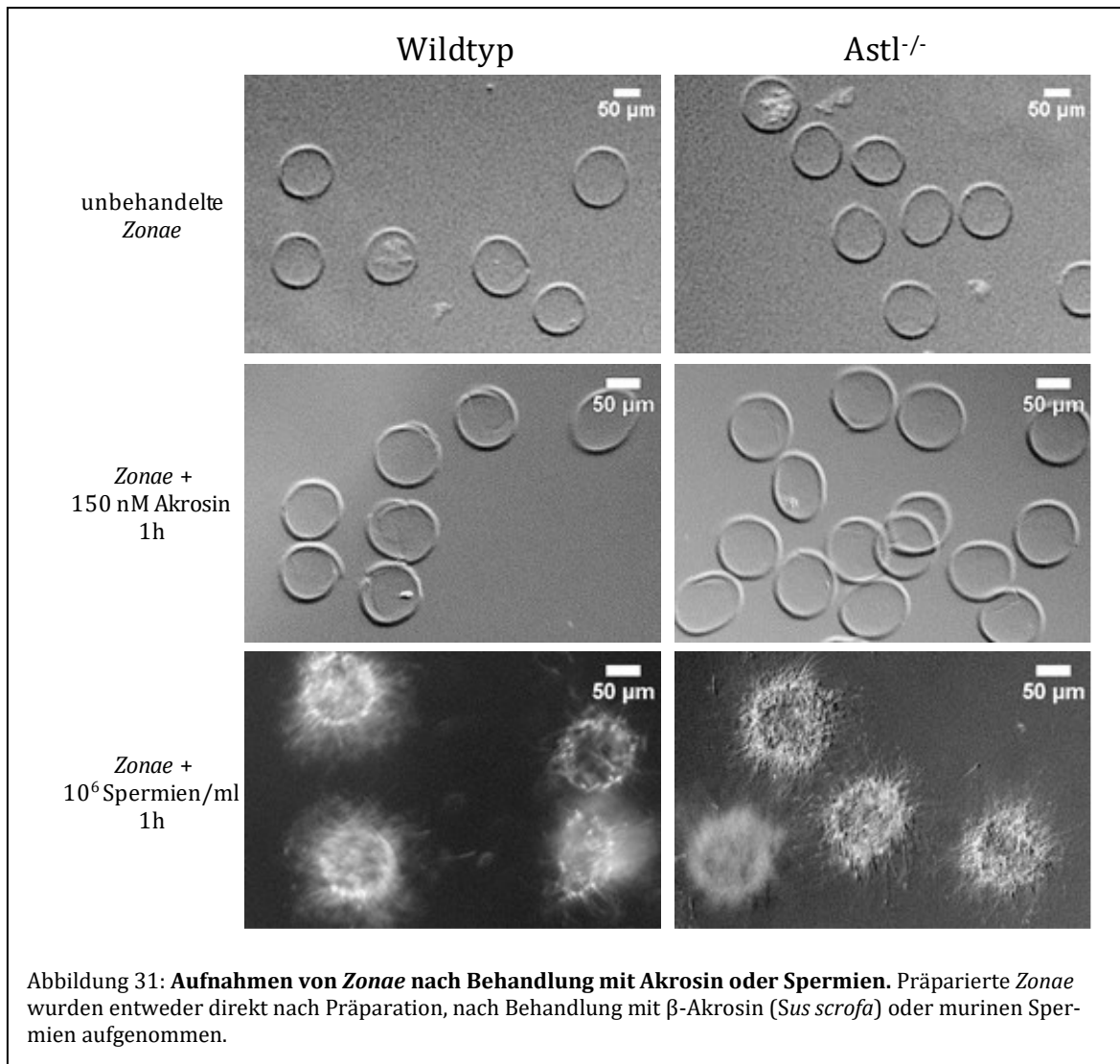
Dass Akrosin in der Lage ist, *Zona pellucida* Proteine proteolytisch zu spalten, ist in der Literatur beschrieben (STAMBAUGH & BUCKLEY, 1968; URCH ET AL., 1985a). Allerdings liegen keine Informationen darüber vor, welches der *Zona pellucida* Proteine an welcher Stelle geschnitten wird. Um hier konkreteren Aufschluss zu erhalten wurden präparierte Eihüllen mit gereinigtem Akrosin aus *Sus scrofa* oder mit murinen Spermien behandelt und mit nicht behandelten Eizellen und *Zonae* verglichen. Dazu wurden die in der Immundetektion gemessenen Signale mit der FusionFX Software als 3D-Modelle dargestellt und die Volumina dieser Strukturen gemessen und verglichen. Wie in Abbildung 29 zu sehen ist, hat die gewählte Menge und Inkubationszeit von Akrosin eine Wirkung auf alle drei *Zona pellucida* Proteine. In ZP1 und 3 sinkt das gemessene Signal auf 57% oder weniger ab. Bei ZP2 ist nur noch ein Restsignal von 5% messbar, jedoch ist kein typischer „Signalhügel“ mehr sichtbar. In der Behandlung mit den Spermien zeigt sich der gleiche Trend zur Signalabnahme (um 12-57%). Allerdings ist er hier weniger deutlich als im Test mit zugesetztem Akrosin. Die Signalabnahme durch Akrosin/Spermien tritt außerdem unabhängig vom Genotyp der Spendertiere auf (vgl. linke und rechte Seite von Abbildung 29).



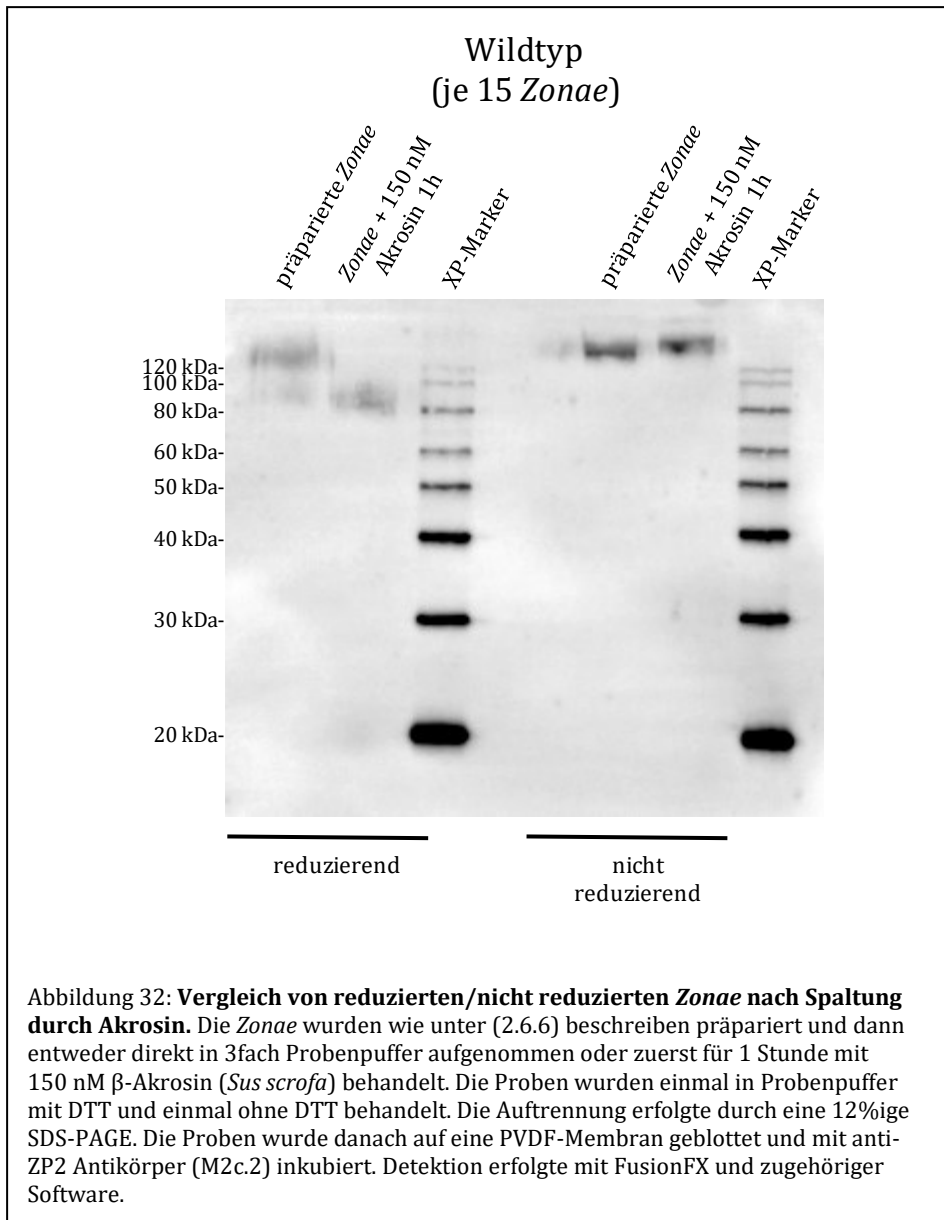
Um den Abbau von ZP2 weiter zu untersuchen, wurde ein weiterer Antikörper verwendet, der spezifisch den C-Terminalen Anteil des Proteins erkennt. Wie in Abbildung 30 zu sehen, verschwindet die obere Bande sowohl nach Behandlung mit Akrosin im Wildtyp (A) als auch im *Ovastacin-knockout* (B) vollständig.



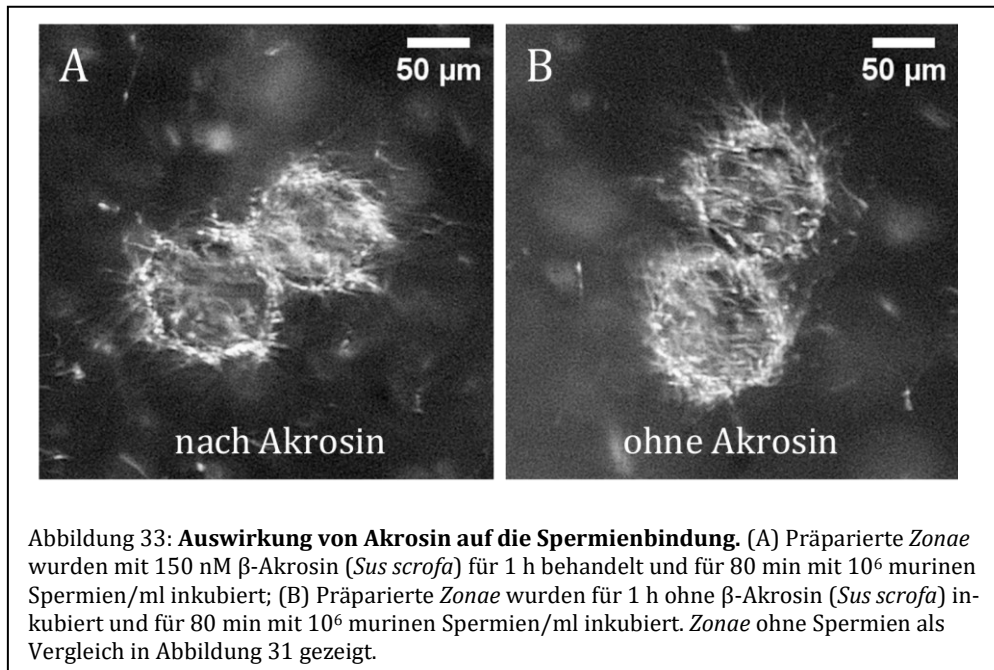
Im Gegensatz zu Abbildung 29 tritt jedoch eine neue Bande auf Höhe von ca. 90 kDa auf. Im Wildtyp (A) sind außerdem noch in der Probe der präparierten *Zonae* und der *Zonae* nach Spermienbehandlung eine Bande von ca. 90 kDa auf. Diese liegt aber scheinbar nicht auf exakt der gleichen Höhe wie die Bande in der Akrosin behandelten Probe. In den spermienbehandelten Proben ist die Signalabnahme der oberen Bande ähnlich wie in Abbildung 29 nicht so deutlich sichtbar. Da ein Effekt auf die *Zona pellucida* Proteine in den Immundetektionen sichtbar war, wurden auch die *Zonae* selbst makroskopisch untersucht (Abbildung 31). Die unbehandelten *Zonae* unterscheiden sich in dieser Art der Detektion nicht von denen nach Akrosinbehandlung. In beiden Proben sind Risse in den *Zonae* sichtbar. Es ist auch kein Unterschied zwischen den beiden verwendeten Genotypen sichtbar. Die Behandlung mit Spermien weist im Ergebnis auch keinen Unterschied zwischen Wildtyp und *Astl*^{-/-} auf. Die Spermienbindung bleibt bei beiden erhalten.



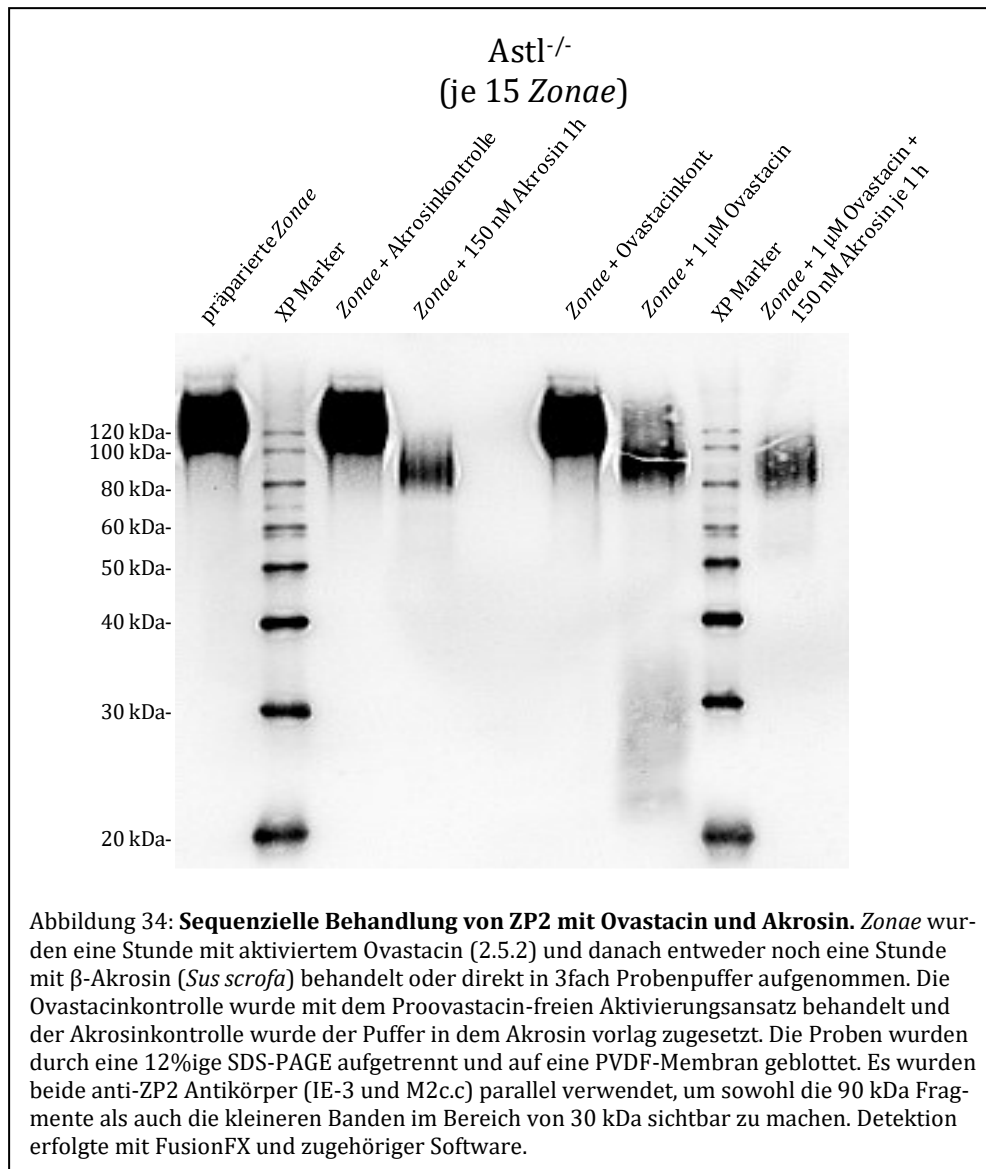
Da trotz der in der Immundetektion sichtbaren Proteolyse die *Zonae* intakt blieben, wurde außerdem untersucht, ob von Akrosin freigesetzte ZP2-Fragmente mit dem restlichen Protein verbunden bleiben. Dazu wurden die Proben zum Vergleich unter reduzierenden Bedingungen und unter nicht reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet (Abbildung 32). Unreduziert gab es mit dem anti-ZP2 Antikörper M2c.c keine Veränderung der Bande im Vergleich zur nicht behandelten Kontrolle. Unter reduzierenden Bedingungen verändert sich die Bande wie für Abbildung 30 beschrieben.



Da die Proteolyse von ZP2 durch Ovastacin die Spermienbindung verhindert und Akrosin im selben Bereich des Proteins schneidet wurde die Auswirkung auf die Spermienbindung getestet. In Abbildung 33 (A) wird deutlich, dass Akrosin die Spermienbindung nicht negativ beeinflusst, da kein sichtbarer Unterschied zur nicht mit Akrosin behandelten Kontrolle besteht.

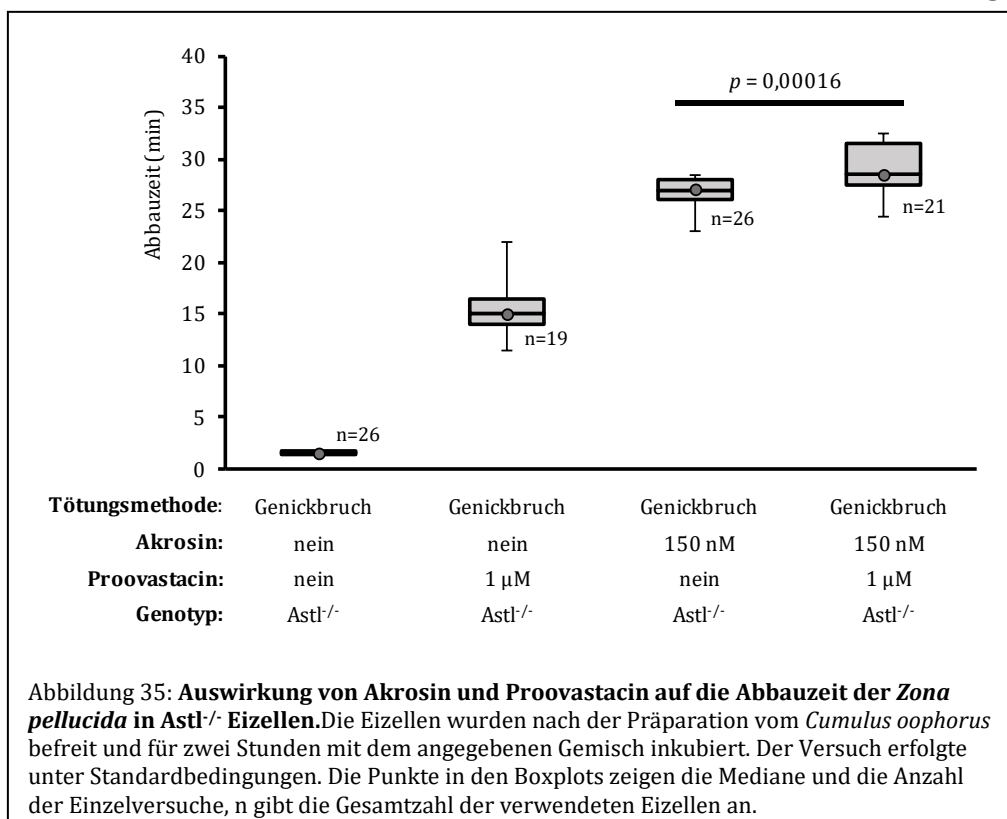


Eine weitere Frage war, ob die Reihenfolge der Behandlung mit Ovastacin und Akrosin die Prozessierung von *Zona pellucida* Protein 2 beeinflusst. Hierzu wurden präparierte *Zonae* sequenziell mit Ovastacin und Akrosin inkubiert. In Abbildung 34 zeigt sich, dass Akrosin bereits durch Ovastacin hydrolysiertes *Zona pellucida* Protein 2 noch weiter prozessiert. Wie im Vergleich mit der durch Ovastacin behandelten Probe zu sehen verschwinden die Signale um ca. 30 kDa, wenn durch Ovastacin gespaltenes *Zona pellucida* Protein 2 mit Akrosin behandelt wird. Außerdem ist interessant, dass die Proteolyse durch Ovastacin nahezu das gleiche 90 kDa große Fragment wie Akrosin aus *Zona pellucida* Protein 2 herstellt.

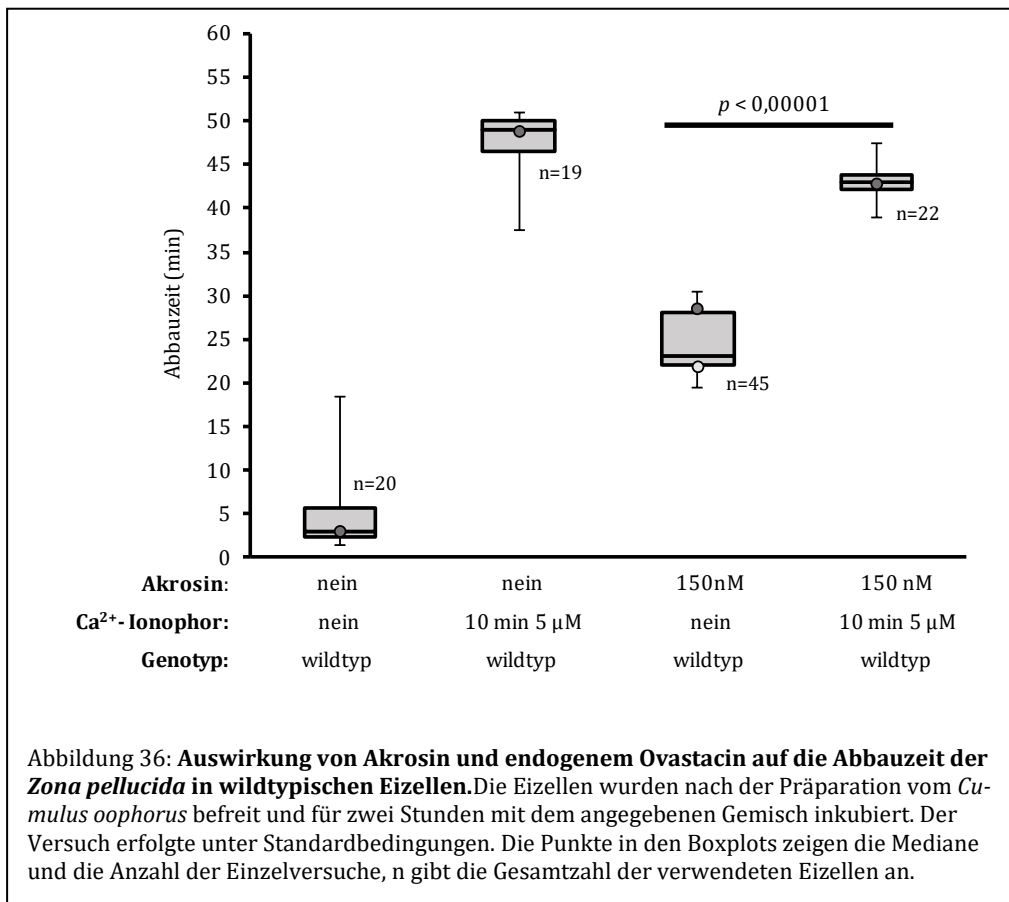


3.10. Akrosin und Ovastacin im Gemisch verzögern den Abbau der *Zona pellucida*

Um die Kooperativität von Proovastacin und Akrosin in Bezug auf die Degradationszeit der *Zona pellucida* durch α -Chymotrypsin zu testen, wurden die entsprechenden Ansätze in *Astl*^{-/-} Eizellen gemessen (siehe Abbildung 35). Bereits bei zweistündiger Inkubation mit Proovastacin stieg die Abbauzeit im Vergleich zur Kontrolle an (Median von 1 min auf 15 min). Die Zugabe von 150 nM Akrosin erhöhte die Zeit bis zur Auflösung der *Zonae* noch stärker auf 27 min im Median. Beim gleichzeitigen Einsatz von Proovastacin und Akrosin wurde ein Median von 28,5 min errechnet. Der Unterschied zwischen Akrosin und dem Gemisch aus Proovastacin und Akrosin ist signifikant.



In Abbildung 36 ist ein ähnlicher Versuchsaufbau mit wildtypischen Eizellen gezeigt. Ovastacin wurde hier nicht von außen zugegeben, sondern endogenes Ovastacin wurde aus den Eizellen durch Stimulation mit Ca^{2+} -Ionophor freigesetzt. Der Median der unbehandelten Probe liegt mit drei Minuten bereits höher als in der Kontrolle der *Astl^{-/-}* Eizellen (siehe Abbildung 35) und die Verteilung der einzelnen Messwerte ist deutlich breiter. Die Zugabe von Akrosin erhöht den Median auf 23 Minuten. Die Behandlung mit Ca^{2+} -Ionophor steigert diesen nochmal auf 49 Minuten. In der Koinkubation mit Akrosin und Ca^{2+} -Ionophor wurde ein Median von 43 Minuten gemessen. Auch hier ist der Unterschied zwischen der exklusiven Zugabe von Akrosin und der gleichzeitigen Gabe von Akrosin und Ca^{2+} -Ionophor signifikant.



4. Diskussion

Die im Feld der Säugetier-Reproduktionsbiologie über Jahrzehnte gewonnenen Daten stammen aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Tierarten. Teilweise standen wirtschaftliche Interessen im Vordergrund, etwa im Fall von Forschung an Rindern und Schweinen. In der Grundlagenforschung werden Tiere mit kürzeren Generationszeiten wie Mäuse und Ratten bevorzugt, wenn es zum Beispiel darum geht, genetische Modifikationen vorzunehmen. Außerdem steht aus medizinischer Sicht der Mensch im Zentrum des Interesses. In der Summe wurden viele Erkenntnisse in unterschiedlichen Säugerspezies gewonnen, die sich in großen Teilen decken, aber manchmal artspezifische Besonderheiten darstellen, ohne dass dieser Fakt bekannt wäre. Da im Rahmen meiner Doktorarbeit nicht die Möglichkeit bestand, alle bisherigen Ergebnisse im hier verwendeten Modellorganismus Maus zu verifizieren, sollen die in der einschlägigen Literatur verfügbaren Ergebnisse äquivalent abwägend für die Auswertung der hier gewonnenen Daten verwendet werden. Dies schließt die Möglichkeit nicht aus, dass manche Spezifika anderer Organismen in der Maus eventuell nicht existieren. Beispielsweise ist das Gen, welches das menschliche *Zona pellucida* Protein 4 kodiert, bei der Maus ein Pseudogen (LEFIÈVRE ET AL., 2004).

4.1. Vergleich von Akrosin aus Maus und Schwein

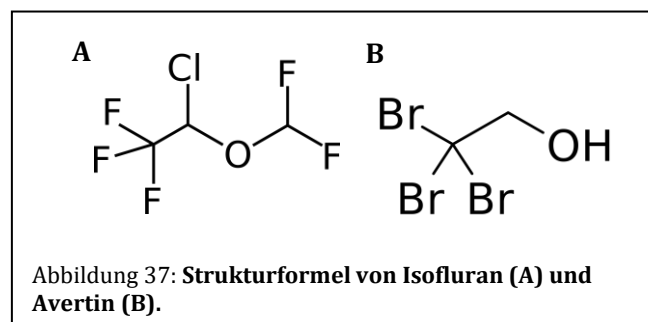
Da aus Gründen der Mengenverfügbarkeit Akrosin aus *Sus scrofa* anstatt aus der Maus verwendet wurde, soll hier diskutiert werden, ob die Proteasen funktionell äquivalent sind. Im Vergleich der Sequenzen der beiden Akrosine zeigt sich, dass sich die größten Unterschiede nicht im katalytisch aktiven Teil der Proteine, sondern im C-Terminalen Teil finden (siehe Abbildung 15 und Abbildung 42). Dieser Bereich wird bei der Aktivierung von Eber Akrosin entfernt und taucht im aktiven β -Akrosin nicht auf (siehe PDB ID 1FIZ bzw. TRANTER ET AL., 2000). Da der monoklonale Antikörper gegen Akrosin im *Western blot* sowohl das murine Akrosin mit ca. 29 kDa als auch das Eber β -Akrosin mit 38 kDa (Abbildung 25) erkennt, kann davon ausgegangen werden, dass im murinen Akrosin ein größerer Teil der variablen, prolinreichen C-Terminalen Region entfernt wird und der Sequenzunterschied sich dadurch verkleinert. Die katalytische Triade liegt auch im Akrosin aus Mäusen vor und die umgebenden Aminosäuren ähneln sich ebenso in der Anordnung stark denen des Eber β -Akrosins. Es gibt im Sequenzvergleich keine Hinweise auf einen funktionellen Unterschied der beiden Proteasen.

Ein ähnliches Bild zeigt sich im Vergleich der Eber β -Akrosinstruktur (PDB ID 1FIZ) mit dem generierten Homologiemodell des Maus β -Akrosins. Die durch SWISS-MODEL generierte Struktur weist einen QMEAN von -2,06 auf. Dieser Wert zeigt ein akzeptables Strukturmodell an (0 = perfekt, -4 = schlecht). Auch der Ramachandranplot legt eine

verlässliche Struktur nahe, da die meisten gemessenen Φ und Ψ Winkel des Peptidrückgrats innerhalb der erlaubten Bereiche liegen (Abbildung 41). Die aktiven Zentren beider Strukturmodelle sind topologisch fast deckungsgleich. Auch die Verteilung der verschiedenen Oberflächeneigenschaften hat ein ähnliches Muster (Abbildung 16). Unterschiede zeigen sich eher auf der dem aktiven Zentrum abgewandten „Rückseite“ der Modelle (Abbildung 40). Hier ragen im murinen Model häufiger hydrophobe Seitenketten nach außen. Das kann im Fehlen der leichten Kette begründet sein, die nicht mit modelliert wurde. Möglicherweise ist dieser Unterschied aber auch ein Grund für die der Speziespezifität, die über die Bindung an Zuckerreste hergestellt werden könnte. Unterschiede in der Oberfläche von Akrosin können zu einer veränderten Erkennung von bestimmten Zuckern führen. So könnte Akrosin aus unterschiedlichen Arten unterschiedliche Zucker erkennen und damit Speziespezifität vermitteln. Insgesamt zeigen sich sowohl in der Sequenz als auch in der modellierten Struktur von murinem Akrosin im Vergleich zu seinem Gegenstück dem Schwein keine Gründe, warum die Proteasefunktion stark voneinander abweichen sollte.

4.2. Aktivierung von Eizellen durch Isofluran

Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, waren nach der Tötung von Mäusen durch Isofluran überraschenderweise Embryonen im Zweizellstadium vorhanden. Das Anästhetikum Isofluran ist ein mehrfach fluorierter und einfach chlorierter Ether aus der



Gruppe der Flurane (siehe Abbildung 37). Es wird von der *world health organisation* (WHO) als essentielles Inhalationsnarkotikum (Stand 2015) geführt (WHO, 2015). Ein Hinweis, dass Isofluran für das Auftreten von Zweizellembryonen verantwortlich sein könnte, war die Literatur zu einem strukturähnlichen Narkosemittel namens Avertin (Tribrommethanol) (KAUFMAN, 1975). Hier wurde eine parthenogenetische Aktivierung von murinen Eizellen in Abhängigkeit des Zeitpunktes der Avertingabe beschrieben (KAUFMAN, 1975). Außerdem wurde von anderen Autoren eine negative Auswirkung von Isofluran auf die makroskopisch bestimmte Eizellqualität im Vergleich zur Tötung durch zervikale Dislokation gezeigt (ROUSTAN ET AL., 2012).

Isofluran wirkt auf verschiedene Rezeptoren von Neurotransmittern, wie z.B. GABA_A- und Glycin-Rezeptoren (GRASSHOFF & ANTKOWIAK, 2006) und auf bestimmte Kalium- und Kalziumkanäle, wie beispielsweise in Muskelzellen koronarer Arterien von Hunden (BULJUBASIC ET AL., 1992). Im Zusammenhang mit der Eizellaktivierung besonders wichtig erscheint auch der durch Inositoltriphosphat (IP3) regulierte Kalziumkanal. Dieser

Kalziumkanal, den Isofluran öffnen kann (JOSEPH ET AL., 2014), kommt im glatten Endoplasmatischen Retikulum (ER) vor und regelt dort den Kalziumausstrom aus dem ER ins Cytosol. Dieser Signalweg wird auch in der natürlichen Aktivierung von Eizellen angesprochen, nachdem IP₃ durch die vom befruchtenden Spermium eingebrachte Phospholipase C ζ generiert wurde (siehe Einleitung 1.2.2).

Weitere Relevanz erhalten diese Kenntnisse dadurch, dass Isofluran in der Humanmedizin als Narkosemittel bei der Gewinnung von Eizellen für alle *assisted reproductive techniques* (ART) eingesetzt werden kann. Mit nur einer Ausnahme (WILHELM ET AL., 2002) zeigte sich in den Vergleichsstudien keine besondere, tendenziell negative Auswirkung von Isofluran (BEILIN ET AL., 1999; BEN-SHLOMO ET AL., 1999; HAMMADEH ET AL., 1999). Isofluran wird hier immer zusammen mit anderen Narkosemitteln verabreicht, was eine genaue Eingrenzung des Effekts erschwert. Auch zu beachten ist der Zeitpunkt der Isoflurangabe. In der Humanmedizin werden Eizellen typischerweise vor dem Eisprung durch Ovar-/Follikelpunktion gewonnen. Wenn ein Zusammenhang der Wirkmechanismen von Isofluran und Avertin besteht, kann die in Bezug auf die Eizellentwicklung frühere Gabe von Isofluran seine Wirkung deutlich verändern. (KAUFMAN, 1975) bestimmte 13 Stunden nach dem Eisprung als Zeitpunkt mit der maximalen Eizellaktivierungsrate von Avertin. Außerdem wurden in dieser Studie nicht letale Dosen von Avertin verwendet. Im Gegensatz dazu wurde in den hier durchgeführten Versuchen mit einer tödlichen Menge gearbeitet. In der Humanmedizin wird mit nicht letalen Dosen gearbeitet, was es wiederum retrospektiv erschwert, den Anteil von Isofluran am Ergebnis der Studien zu ermitteln.

Im weiteren Entwicklungsverlauf scheint die Isoflurangabe toxisch für murine Embryonen zu sein. Die direkte Zuführung von Isofluran in die Luft der Inkubationskammer von *in vitro* kultivierten Embryonen führte zu einer Abnahme der Entwicklungsrate zu Blastozyten um ca. 30 % (CHETKOWSKI & NASS, 1988). Auch wenn Serum von mit Isofluran narkotisierten humanen Patienten zu *in vitro* kultivierten murinen Embryonen gegeben wurde, sank die Entwicklungsrate dieser Embryonen (MATT ET AL., 1991). In der gleichen Studie war auch die IVF-Befruchtungsrage in der mit Isofluran betäubten Patientengruppe geringer.

4.3. Eine Eizelle enthält ca. 1,25 fmol Ovastacin

Um die Verlässlichkeit der erhaltenen Menge von 1,25 fmol Ovastacin pro Eizelle abschätzen zu können, wurde der Wert mit anderen Methoden der Mengenermittlung verglichen. Eine Möglichkeit ist die Messung der „zinc sparks“ zugrunde zu legen, die einen Zink Efflux aus der Eizelle im Verlaufe der Befruchtung beschreiben (KIM ET AL., 2011). Da Ovastacin eine zinkabhängige Metalloproteinase ist und die „zinc sparks“ in Ovastacin defizienten Eizellen ausbleiben (*supplements* zu TOKUHIRO & DEAN, 2018), ist es möglich, dass die von den Eizellen ausgestoßene Zinkmenge größtenteils aus dem an Ovastacin gebundenen Zink stammt. Die murinen Eizellen stoßen ca. 20 fmol bei der Aktivierung aus KIM ET AL., 2010, wovon ca. 1 fmol an der *Zona pellucida* angereichert wird (QUE ET AL., 2017). Diese Werte geben zumindest denselben Größenordnungsbereich der Ovastacinmenge wieder und stützen sich so gegenseitig. Bei den hier angegebenen Publikationen muss jedoch die Art der Datenerhebung diskutiert werden. Laut MARET (2015) eignen sich die verwendeten fluoreszierenden Zink-Chelatoren nur bedingt dazu, quantitative Aussagen zu treffen, da Zink-Ionen sich in biologischen Systemen in einem Gleichgewicht zwischen gebundenem und freiem Zustand bewegen und der Eingriff der Chelatoren in dieses Gleichgewicht das Ergebnis verfälschen kann. Die von mir durchgeführte Messung ist abhängig davon ob die Menge von Ovastacin pro Eizelle konstant ist und ob 45 Eizellen dementsprechend ausreichen, um Schwankungen zu mitteln. Da die Quantifizierung auf einem *Western blot* und nicht zwischen verschiedenen durchgeführt wurde sollte die Abweichung durch die Färbung selbst gering sein.

WESTPHAL (2013) errechnete ca. 1 fmol Ovastacin, basierend auf der Grundannahme, dass es sich bei 50% des bei der Kortikalreaktion freigesetzten Proteins (100 pg) (GREEN, 1997) tatsächlich um Ovastacin handelt.

Alle drei verwendeten Schätzmethode geben einen ähnlichen Ovastacingehalt pro Eizelle an. Die Daten sind nützlich, um die physiologischen Verhältnisse von Proteinen zueinander besser einordnen zu können.

4.4. Wirkung von Ovastacin auf die *Zona pellucida*

Rekombinantes Ovastacin ist in der Lage, das physiologische Substrat ZP2 zu spalten. Dies demonstrieren die Daten in Abbildung 23 und Abbildung 24, die Versuche mit Ovastacin-defizienten Eizellen zeigen. In Abbildung 23 verschwindet die ZP2 Bande auf Höhe von 120 kDa in der Probe mit 1 μ M aktiviertem Ovastacin nahezu komplett. In Abbildung 24 dokumentiert durch die starke Zunahme des Zeitbedarfs (ca. 55 min) für die komplette Degradation der *Zona*. Dies deckt sich mit den physiologisch sichtbaren Verhältnissen wie sie in (KÖRSCHGEN ET AL., 2017) festgestellt wurden. Interessant ist die sichtbare Zunahme der Bandenfragmente in der Probe mit nicht aktiviertem

Proovastacin, die in beiden Kontrollen nicht auftreten. Ein ähnlicher Effekt ist bei der Degradation der *Zona* sichtbar. Hier ist in Ansätzen mit Proovastacin eine Zunahme der für die Degradation der *Zona* notwendigen Zeit sichtbar, die aber deutlich schwächer als in der Probe mit aktivem Ovastacin ausfällt. Gleichzeitig macht es keinen Unterschied, ob das Ca^{2+} -Ionophor A23187 eingesetzt wurde oder nicht. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass außerhalb der Eizellen ein Agens vorhanden ist, das Proovastacin in seine aktive Form überführen kann. Theoretisch ist auch eine geringe intrinsische Aktivität von Proovastacin denkbar, die durch andere aktivierende Proteasen während der Expression oder Reinigung von Ovastacin verursacht wurde. Nicht aktiviertes Proovastacin zeigte im fluoreszenzbasierten Enzymtest nur $1,9 \pm 1\%$ Aktivität im Vergleich zu mit Plasmin aktiviertem Ovastacin (siehe Abbildung 47).

Aus früheren Studien ist bekannt, dass Ovastacin von verschiedenen Trypsin-ähnlichen Serinproteasen aktiviert werden kann (KARMILIN ET AL., 2019). Eine dieser Proteasen ist der *tissue type plasminogen activator* (tPA). In unbefruchteten Eizellen von *Sus scrofa* wurde gezeigt, dass tPA und *urokinase type plasminogen activator* (uPA) sowohl im Bereich des Oolemma als auch in der *Zona pellucida* vorliegen (COY ET AL., 2012). Die Enzyme werden nach der Befruchtung freigesetzt. Auch bei Ratten findet eine Freisetzung von tPA bei der Aktivierung der Eizellen durch Spermien oder ein Ca^{2+} -Ionophor statt (ZHANG ET AL., 1992). In Mäusen und Ratten wird tPA während der Eizellreifung hergestellt und ist in der Lage Plasminogen zu aktivieren (HUARTE ET AL., 1985). Diese Studien legen nahe, dass tPA sowohl innerhalb als auch außerhalb der Eizellen vorliegt. Daher war es unerwartet, dass kein Unterschied in der Zunahme der *Zona pellucida* Degradationszeit zwischen mit Ca^{2+} -Ionophor aktivierten und nicht aktivierten Ovastacin-defizienten Eizellen sichtbar ist. Wie in der Arbeit von KARMILIN ET AL., (2019) gezeigt wurde, aktiviert tPA *in vitro* alleine Proovastacin ca. 10 mal schlechter als die Kombination aus Plasminogen und tPA. Die Ausschüttung von tPA während der Kortikalreaktion hat in den Versuchen keine messbare Auswirkung auf die Ovastacinaktivität. Eine Begründung kann die vorhandene Plasminogenmenge im Versuch sein. Plasminogen wird bei Mäusen hormonabhängig im weiblichen Genitaltrakt angereichert (FINLAY ET AL., 1983). In Schweinen und Rindern reichert sich Plasminogen am Oolemma und in der *Zona pellucida* an (MONDÉJAR ET AL., 2012). Bei der Präparation der Eizellen werden geringe Mengen Oviduktflüssigkeit (z.B. im Perivitellinraum und in der Hyaluronsäurematrix des *Cumulus oophorus*) und das eventuell an die *Zona* gebundene Plasminogen verschleppt. Das eröffnet die Möglichkeit, dass die sichtbare Aktivierung von rekombinant zugesetzten Proovastacin nicht von der vorhandenen Menge tPA begrenzt wird, sondern von der Menge Plasminogen die mit Eizellen in den Medientropfen verschleppt wird. Dies gilt für den Fall, dass vor der Kortikalreaktion ausrei-

chend extrazellulärer tPA vorhanden ist, um alles Plasminogen vollständig zu aktivieren. Wäre Plasminogen tatsächlich limitierend, so würde dies erklären, warum die durch Eizellaktivierung zusätzlich freigesetzte tPA Menge zu keiner stärkeren *Zona*-Härtung im Vergleich zu den nicht aktivierten Eizellen führt. Wäre dies der Fall, so müsste durch die Hemmung der beteiligten Serinproteasen deren Anteil an der *Zona*-Härtung deutlich werden. Dafür wären jedoch wesentlich spezifischere Hemmstoffe als die verwendeten (Pefabloc SC und cOmplete EDTA-free) erforderlich, da diese zu starke *off-target* Effekte zeigen und die Messung verfälschen (Daten nicht gezeigt).

4.5. Enthalten sämtliche Kortikalgranula Proovastacin?

Im Elektronenmikroskop werden sowohl mit dem anti-Proovastacin Antikörper als auch mit dem anti-Ovastacin-Propeptid Antikörper Signale im Bereich des Oolemmas von wildtypischen Eizellen detektiert (Abbildung 19 und Abbildung 20). Die negative Kontrastierung durch Bleicitrat und Uranylacetat macht auch die Membranen der Zellkompartimente sichtbar. Neben mit Goldpartikeln markierten Granula liegen auch unmarkierte Vesikel vor. Dies lässt es möglich erscheinen, dass mehrere Typen von Kortikalgranula existieren, die sich in ihrer Beladung mit Ovastacin unterscheiden. Es wurden bereits zwei Arten von kortikalen Granula als „*light*“ und „*dark*“ beschrieben (NICOSIA ET AL., 1977). Inwiefern sich diese Einordnung mit den durch gegen Ovastacin gerichteten Antikörpermarkierung deckt, ließ sich hier nicht abschließend klären.

Zwischen den Markierungen durch die unterschiedlichen Antikörper ist in den im Transmissionselektronenmikroskop gemachten Aufnahmen kein Unterschied in relativer Position und Häufigkeit der gefärbten Granula erkennbar. KÖRSCHGEN ET AL. (2017) haben gezeigt, dass ein Teil des Ovastacins schon aktiv in Eizellen vorliegt. Es findet sich hier kein Hinweis darauf, dass Proovastacin und seine aktive Form getrennt in unterschiedlichen Subpopulationen von Kortikalgranula vorliegen. Für eine definitive Einschätzung wäre eine gleichzeitige Markierung mit beiden hier verwendeten Antikörpern sinnvoll.

4.6. Akrosin verlängert die Degradationszeit der *Zona pellucida*

Die Behandlung durch Akrosin verlängert die nötige Zeitspanne für die Degradation der *Zona* durch α -Chymotrypsin im Vergleich zu unbehandelten Eizellen beider verwendeter Genotypen deutlich (siehe Abbildung 35 und Abbildung 36). Allerdings hat die Behandlung durch Akrosin, sowohl in wildtypischen als auch in Ovastacin-defizienten Eizellen keinen Einfluss auf die maximal durch Ovastacin verursachte *Zona pellucida* Degradationszeit. Die Härtung der *Zona pellucida* durch Proteolyse ist eine Fra-

gestellung für sich. Die Zunahme von mechanischer Härte (PAPI ET AL., 2010), sowie chemischer und proteolytischer Resistenz (GWATKIN, 1964) durch vorausgegangene Proteolyse ist nicht intuitiv erklärbar. Da die Struktur der *Zona pellucida* noch nicht aufgeklärt ist, ist es schwer abzuschätzen, warum die Zeitdauer des *Zona*-Abbaus sich so wenig verändert, wenn zwei unterschiedliche Proteasen gleichzeitig in der *Zona pellucida* schneiden. Die Befruchtung ist mit einer Abnahme der Dicke der ZP assoziiert (CHUNG, 1971). Eine mögliche Erklärung findet sich in den oben diskutierten *Western blots*. Ovastacin und Akrosin schneiden beide im N-Terminalen Teil von ZP2. Gleichzeitig bleibt die apparente Molekülmasse von ZP2 in beiden Fällen gleich. Die sichtbare Fragmentierung des N-Terminus scheint für die Zunahme der *Zona pellucida* Abbauzeit ausreichend zu sein. Die maximale Abbauzeit ist scheinbar von der Art der Fragmentierung abhängig. Ovastacin erzeugt aus ZP2 vier Hauptfragmente (sichtbar z.B. in Abbildung 23 oder bei BURKART ET AL., 2012), möglicherweise auch nur ein Fragment mit variabler Glykosylierung (siehe FAHRENKAMP ET AL., 2020), im Gegensatz zu Akrosin, welches Fragmente produziert, die unter den gewählten Bedingungen mit beiden Antikörpern gegen ZP2 nicht sichtbar gemacht werden konnten (siehe Abbildung 34). Falls die Fragmentierung ähnlich abläuft wie bei der *Zona* von *Sus scrofa* sollten die durch Akrosin produzierten Fragmente 2-4 kDa groß sein (URCH ET AL., 1985b), was stimmig mit der nicht erfolgten Detektion von größeren Fragmenten ist. Möglich ist auch, dass Akrosin innerhalb des Epitops des Antikörpers schneidet und so die Detektion verhindert. Diese Möglichkeit deckt sich mit der Beobachtung, dass sich die apparente Molekülmasse von nicht reduziertem ZP2 durch Inkubation mit β -Akrosin nicht ändert. Hypothetisch ist diese Fragmentierung des N-Terminus für die Zunahme der Degradationszeit verantwortlich, unabhängig davon welche Protease die Fragmentierung verursacht. Der N-Terminus von ZP2 könnte als Abstandshalter zwischen den einzelnen Filamenten der *Zona pellucida* dienen. Durch die proteolytische Degradation dieses Abstandshalters würde die *Zona pellucida* primär kompaktiert, was zur mechanischen Versteifung führen könnte. Diese kompaktere Filamentanordnung wäre u.U. für weiteren chemischen oder enzymatischen Abbau weniger zugänglich. Dieser auch von GREEN (1997) diskutierte Mechanismus würde die beobachteten Veränderungen und den Grund für die Unabhängigkeit von der Protease erklären. Der Bereich in dem die Proteolyse stattfindet, wäre hier wichtiger als die durchführende Protease oder deren Spaltspezifität. Die Veränderung der mechanischen Eigenschaften der *Zona pellucida* durch Proteolyse wurden von Dr. Julia Floehr (RWTH-Aachen) mittels eines Nanoindenters (Gerät zur Messung von Eindringtiefe und -kraft, auf Basis der Rasterelektronenmikroskopie) gemessen. Hier zeigt sich eine Zunahme der Steifheit der *Zona pellucida* nach Behandlung durch Akrosin und Ovastacin (persönliche Mitteilung, unveröffentlicht).

4.7. Akrosin ist ein möglicher *in vivo* Aktivator des Proovastacins

Aus Abbildung 25 geht hervor, dass Spermien bei der artifiziellen Kapazitation Akrosin in ihr umgebendes Medium freisetzen. Die beiden stärksten Signale liegen auf den Höhen von ca. 55 kDa und 29 kDa. Für porcines (BABA ET AL., 1989) und humanes (SCHLEUNING ET AL., 1976) Akrosin wurde eine Aktivierung mit mehreren Schritten und möglichen Endstufen nachgewiesen, die von den jeweiligen Bedingungen der Akrosinreifung abhängig ist. Wenn die Aktivierung von murinen Akrosin ähnlich verläuft, kann vermutet werden, dass die 55 kDa Form Proakrosin darstellt und die 29 kDa Form eine oder die einzige enzymatisch aktive Variante von murinem Akrosin. Die Berechnung des Molekulargewichts von Akrosin (UniProt#: P23578) mit ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) ergab 47 kDa (ohne die beiden beschriebenen Glykosylierungen (TRANter ET AL., 2000), was die sichtbare Größe von ca. 55 kDa erklären würde). Die zahlreichen Banden in der Probe der kapazitierten Spermien können über die verschiedenen Zwischenstufen der Akrosinaktivierung erklärt werden, vor allem da keine Bande höher als 55 kDa sichtbar ist, was gegen eine unspezifische Reaktion des Antikörpers mit der Probe spricht. Allerdings kommen in Spermien auch andere Serinproteasen vor (z.B. PRSS21; Kawano et al., 2010), die eventuell mit dem Antikörper kreuzreagieren könnten. Dies spräche dafür, dass Spermien Akrosin in ihr umgebendes Medium freisetzen.

Die Aktivierungsversuche zeigen deutlich, dass Akrosin in der Lage ist, rekombinantes Proovastacin in eine enzymatisch aktive Form zu überführen (siehe Abbildung 27). Es ist auch sichtbar, dass eine zu lange Koinkubation die messbare Ovastacin-Aktivität wieder absinken lässt. Dies spricht für eine sukzessiv fortschreitende, limitierte Proteolyse von Proovastacin durch Akrosin, die mit der Entfernung des Propeptids von Proovastacin beginnt, was zur Aktivierung führt, dann aber durch weitere Spaltungen eine Beschädigung des aktiven Ovastacinproteins bewirkt. Dies bestätigt sich im Immunologischen Nachweis (Abbildung 28). Hier wird die spezifische Veränderung durch die Inkubation mit Akrosin deutlich. Je länger mit Akrosin inkubiert wird, desto schwächer wird die mit 1 markierte Bande in allen drei Teilabbildungen. Gleichzeitig ist diese Bande die einzige, die sich mit dem anti-Ovastacin-Propeptid Antikörper anfärben lässt. Die gemessene Aktivität wird aber nicht immer stärker, sondern nimmt nach 10 min Aktivierungsdauer wieder ab. Es stellt sich also scheinbar ein Gleichgewicht zwischen der Abspaltung des Propetids und der Degradierung der aus KARMILIN ET AL. (2019) bekannten mit 3 markierten 29 kDa aktiven Ovastacinbande ein. Es wird also immer mehr des Proovastacins in die aktive Form überführt, während die aktive Form durch weiter Proteolyse inaktiviert wird. Das würde erklären, warum es eine Aktivitätsspitze bei 10 min gibt, die gemessene Aktivität dann aber nur langsam absinkt. Die mit 2 markierte Bande scheint ein Zwischenprodukt der Aktivierung zu sein. Die *-

Bande ist sehr wahrscheinlich Akrosin, da sie auch nur in der Coomassie-Färbung auftaucht. Für den physiologischen Kontext stellt sich also die Frage, ob Akrosin und Proovastacin *in vivo* in für die Aktivierung tauglichen Mengenverhältnissen und in einem passenden Zeitintervall zusammen vorliegen.

Wie in Abbildung 29 in der jeweils rechten Außenspur sichtbar ist, ist der Effekt der Spermien auf die Degradation der *Zona pellucida* Proteine immer geringer als bei Einsatz von reinem Akrosin. Dieses Ergebnis zeigt sich, obwohl mit einer Spermienkonzentration von 10^6 Spermien/ml die natürliche Anzahl von Spermien pro Eizelle (bis zu 10 Spermien CUMMINS & YANAGIMACHI, 1982, MURO ET AL., 2016) um das bis zu 100fache überschritten wurde. Daher ist anzunehmen, dass unter physiologischen Umständen nur die Akrosinmenge weniger Spermien eine Eizelle erreicht. Gleichzeitig überschneidet sich das zeitliche und örtliche Vorkommen von Akrosin und Proovastacin, da Proovastacin direkt nach der Plasmogamie der Eizelle mit dem akrosintragenden Spermium freigesetzt wird. Wie groß der Anteil des von Akrosin aktivierten Proovastacins letztendlich ist, lässt sich aus den hier gewonnenen Daten nur annähernd ableiten.

4.8. Akrosin schwächt die Wirksamkeit von Fetuin-B

Akrosin schneidet Fetuin-B in distinkte Fragmente (siehe Abbildung 26 (A)). Der verwendete anti-Fetuin-B Antikörper erkennt den C-Terminalen Bereich von Fetuin-B (FLOEHR, 2011). Daher wird sichtbar, dass der C-Terminus über die Versuchsdauer sukzessive abgebaut wird und so kein Signal mehr feststellbar ist. In der Coomassiefärbung ist im Gegensatz dazu auch nach drei Stunden noch ein deutliches Signal sichtbar. Die Prozessierung verläuft also nicht im ganzen Fetuin-B Protein mit einer Fragmentierung des Proteins in kleine Stücke, sondern im Bereich der Cystatin 1 und 2 Domänen nur an bestimmten zugänglichen Stellen.

Deutliche Auswirkungen der Proteolyse durch Akrosin erkennt man auch in der nicht reduzierten Variante der Proteinauftrennung. Zuerst fällt ein methodisches Artefakt auf. Auf der rechten Seite der für eine Stunde mit Akrosin inkubierten Fetuin-B Probe zieht sich eine vertikale Linie durch die Bahn. Hier ist DTT aus der NEB-Marker Spur in die Probe diffundiert, wodurch sich das Muster an dieser Stelle der korrespondierenden reduzierten Probe angleicht. Sichtbar ist dennoch, dass die einstündige Inkubation mit Akrosin bewirkt, dass die hochmolekularen Fetuin-B Komplexe verschwinden und zwei Komplexe, die den Größen von Fetuin-B Dimer und Trimer entsprechen, bevorzugt auftreten. Nach einer Inkubation von drei Stunden mit Akrosin sind nur noch minimale Reste der Polymerisierungsstufen sichtbar. Auch das Signal auf Höhe von ca. 55 kDa ist schwächer geworden. Dafür tritt das meiste Signal der Coomassiefärbung nun bei ca. 35 kDa auf und zwar ohne, dass an dieser Stelle Signal mit dem anti-Fetuin-B Antikörper detektiert wurde. Die Banden bei 35 kDa treten auch schwächer in der

für eine Stunde inkubiert Probe auf, sind aber größtenteils durch das DTT-Artefakt überdeckt. Zur besseren Sichtbarkeit habe sind diese Banden in Abbildung 26 mit einem weißen Stern markiert. Somit scheint die C-Terminale Domäne von Fetuin-B teilweise oder ganz vom Protein entfernt worden zu sein. Das restliche Protein wird in drei Hauptfragmente gespalten. Diese Fragmente sind scheinbar nicht über Disulfidbrücken verbunden, da sie auch in den nicht reduzierten Proben als drei Fragment im Bereich von 35 kDa auftauchen. Wahrscheinlich stellen diese Fragmente unterschiedlich weit C-Terminal beschnittene Fetuin-B Subpopulationen dar, da die Summe dieser drei Fragmente größer als das Ausgangsprotein wäre. Der Verlust des C-Terminalen Proteinbereichs geht offenbar mit einer Veränderung in der intermolekularen Komplexbildung einher. Je vollständiger der Abbau des C-Terminus, desto eher wird das Monomer begünstigt. Wo genau Akrosin in Fetuin-B schneidet, kann aus denn vorliegenden Daten nicht abgelesen werden.

Die Spaltung durch Akrosin hat Konsequenzen für die inhibitorische Kapazität von Fetuin-B. Während die Kontrollen, die für die gleiche Zeit bei 37 °C ohne Akrosin inkubiert wurden, keine nennenswerte Abweichung vom IC_{50} der frischen Kontrolle zeigen, verändert sich der IC_{50} der gespaltenen Proben deutlich (siehe Abbildung 26 (B)). Der IC_{50} nach einstündiger Inkubation liegt mit 2,7 nM nahezu doppelt so hoch wie in der nicht behandelten Kontrolle. Mit der für drei Stunden inkubierten Probe lässt sich bei den gewählten Konzentrationen kein signifikanter IC_{50} bestimmen. Dies deckt sich mit den bisher erhobenen Daten (GUEVARA ET AL., 2019), da hier auch eine Zunahme des K_i von Fetuin-B um ca. das 10-fache nach Proteolyse von Fetuin-B durch Flusskrebs-Astacin (archetypische Metalloproteinase der Astacinfamilie) beobachtet wurde. Dies unterstreicht, dass die C-Terminale Domäne von Fetuin-B für Proteolyse durch beliebige Proteasen besonders empfindlich zu sein scheint (CUPPARI ET AL., 2019).

Es ist fraglich welcher Faktor für die Abnahme der inhibitorischen Kapazität von Fetuin-B gegen Ovastacin verantwortlich ist. Möglicherweise hängt der Polymerisierungszustand mit der Hemmstärke zusammen. Möglich ist auch, dass sowohl die Multimerisierung als auch die Hemmung von Ovastacin Funktionen einer grundsätzlichen Eigenschaft der C-Terminalen Domäne von Fetuin-B innerhalb des Proteins sind. Die C-Terminale Domäne ist eine sogenannte „*intrinsically disorderd region*“ (CUPPARI ET AL., 2019). Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie keine festgelegte Sekundärstruktur haben, eine solche aber bei der Bindung an einen Partner ausbilden können (siehe DYSON, 2016; OLDFIELD & DUNKER, 2014). Die resultierende Struktur ist vermutlich vom gebundenen Partner abhängig. Dieser Übergang von einer ungeordneten zu einer geordneten Form kann die Grundlage der physiologischen Funktion derartiger Regionen sein (siehe OLDFIELD & DUNKER, 2014). Dies könnte erklären, warum für Fetuin-B auch

Funktionen abseits der Befruchtungsphysiologie vermutet werden. Assoziationsstudien weisen auf mögliche Rollen im Zusammenhang mit Insulinresistenz, koronarer Herzkrankheit, nicht-alkoholischer-Fettleber und Atherosklerose hin (EL-ASHMAWY & AHMED, 2019; LI ET AL., 2019; QU ET AL., 2018; ZHU ET AL., 2017). Die beobachteten Effekte können mit einer Veränderung der Eigenschaften der C-Terminalen Region (CTR) von Fetuin-B zusammenhängen. So könnte über die CTR eine Multimerisierung des Fetuin-B vermittelt werden, die durch die Empfindlichkeit der CTR für proteolytische Spaltung variieren könnte.

Auch die Abnahme der inhibitorischen Fähigkeiten könnte in den strukturellen Eigenschaften der CTR begründet sein, die mit der N-Terminalen Cystatindomäne 1 durch eine Disulfidbrücke zusätzlich verknüpft ist (CUPPARI ET AL., 2019). Der Verlust dieser Verbindung erhöht die Freiheitsgrade zwischen den beiden Cystatin-Domänen. Diese zusätzliche Beweglichkeit könnte die Hemmwirkung beeinflussen, besonders da der CPDC-*warhead* sich im Verbindungstück zwischen den beiden Cystatin-Domänen befindet. Es muss aber auch erwähnt werden, dass der Verlust der CTR den K_i von Fetuin-B zwar verzehnfacht, das resultierende Protein aber immer noch ein sehr fest bindender Inhibitor ist (persönliche Mitteilung Dr. Hagen Körschgen, unveröffentlicht; die CTR wurde hier posttranslational über eine eingefügte Furinschnittstelle entfernt).

4.9. Schwankungen in der Signalintensität der *Zona pellucida* Proteine

In Abbildung 29 übersteigen die gemessenen Signalstärken und damit die Menge des vorhandenen jeweiligen Proteins teilweise den Wert der Kontrolleizellen. Besonders deutlich bei der Detektion von ZP1 in den präparierten *Zonae* von Ovastacin-defizienten Tieren (133 % im Vgl. zur Kontrolle). Eine mögliche Erklärung ist hier die in WASSARMAN ET AL. (2004) beschriebene Varianz der *Zona* Stärke und damit der Proteinmenge von 4,3– 8,1 μ M. Deswegen ist es möglich, dass bei der hier verwendeten relativ kleinen Anzahl von 15 *Zonae*/Eizellen pro Probe ein Ausreißer in der Proteinmenge zustande kommt.

4.10. Akrosin prozessiert den N-Terminus des *Zona pellucida* Proteins 2

Die Wechselwirkung der *Zona pellucida* Proteine mit den gegen sie gerichteten spezifischen Antikörper wird durch die Inkubation der *Zonae* mit Akrosin stark geschwächt (siehe Abbildung 29). Auch die Proben in denen Spermien zugefügt wurden zeigen eine Abnahme der Signale, die aber geringer ausfällt. Akrosin ist also in der Lage alle *Zona pellucida* Proteine der Maus zu prozessieren. Auch Spermien verursachen entweder durch ihr Akrosin oder mit anderen Proteasen einen Abbau der *Zona pellucida*. Im *Western blot* mit IE3 anti-ZP2 Antikörper (erkennt den N-Terminus; BURKART ET AL., 2012)

verschwindet das Signal auf Höhe 120 kDa nahezu vollständig, was anzeigt, dass Akrosin im N-Terminus von ZP2 schneidet und vermutlich das Epitop dieses Antikörpers zerstört. Wurde der gleiche Versuch mit dem M2c.2 anti-ZP2 Antikörper durchgeführt (siehe Abbildung 30) zeigt sich eine Abnahme der Bandengröße von 120 kDa auf ca. 90 kDa. Die Hydrolyse von ZP2 durch Akrosin ist bei den gewählten Bedingungen also nicht vollständig, sondern führt spezifisch zur Bildung dieses Fragments.

Gleichzeitig zeigt der Vergleich von akrosinbehandelten Proben die entweder reduziert oder nicht reduziert wurden (siehe Abbildung 32), dass die apparente Molekülmasse von ZP2 sich nicht ändert, wenn die Proben nicht reduziert werden. Daraus wird deutlich, dass entweder das entstehende Fragment über eine Disulfidbrücke mit den restlichen Proteinen verbunden bleiben oder eine sehr feste Proteintertiärstruktur vorliegt, die sich nicht durch Erhitzen und Zugabe von SDS lösen lässt. Auch sichtbar ist, dass der kleine Anteil von bereits vor der Befruchtung prozessiertem ZP2 (KÖRSCHGEN ET AL., 2017), bei nicht reduzierten Proben auch zu keiner Abnahme der erkennbaren Molekülgröße führt. Dies weist ebenso auf eine kovalente oder nicht kovalente starke Verbindung der durch Ovastacin verursachten Fragmente hin.

Eine weitere Beobachtung ist der Strukturverlust der durch Akrosin behandelten *Zonae* (siehe Abbildung 31). Die erste Annahme der Akrosinfunktion als Trypsin-ähnliche Protease war die Lyse der die Eizellen umhüllenden Strukturen einschließlich der *Zona pellucida* (STAMBAUGH & BUCKLEY, 1968). In den hier durchgeführten Versuchen ist aber kein Verlust der strukturellen Integrität sichtbar. Auch die Spermienbindung an die *Zona pellucida* geht nach der Behandlung durch Akrosin nicht verloren was in Abbildung 33 deutlich sichtbar ist. Daraus lässt sich ableiten, dass die Akrosinschnittstellen die eventuell innerhalb der Proteinsequenz 51-149 von ZP2 (Maus) liegen, die von AVELLA ET AL. (2014) als Bindungssequenz für Spermien identifiziert wurde, nicht die Eigenschaft der Spermienbindung ausschalten.

Auch die Vorprozessierung des N-Terminus von ZP2 durch Ovastacin scheint die Proteolyse durch Akrosin nicht zu behindern (siehe Abbildung 34). In diesem Blot wurden beide Antikörper gegen ZP2 simultan verwendet, um sowohl die N-Terminale Teil als auch den C-Terminus von ZP2 gleichzeitig sichtbar zu machen. Die von aktivem Ovastacin freigesetzten Fragmente verschwinden, wenn die Proben zuerst mit aktivem Ovastacin und dann mit Akrosin behandelt wurden.

4.11. Funktionelle Beziehung zwischen Ovastacin, Fetuin-B und Akrosin

Aufgrund der hier erhobenen Daten lässt sich ein physiologisch rationales Modell für die Interaktion der drei Proteine Ovastacin, Fetuin-B und Akrosin entziffern. Die Aufgabe von Ovastacin ist die Prozessierung des *Zona pellucida* Proteins 2 (BURKART ET AL., 2012). Dafür muss das inaktive Proovastacin zunächst in seine aktive Form Ovastacin überführt werden. Hierfür eignen sich Trypsin-ähnliche Serinproteasen (KARMILIN ET AL., 2019), die sich – wie Akrosin - dadurch auszeichnen, dass sie Peptidbindungen carboxyterminal der basischen Aminosäurereste Arginin und Lysin hydrolysieren können. Ovastacin wird in großen Mengen nach der Plasmogamie der Gameten freigesetzt, was die Anwesenheit von Akrosin durch die Anwesenheit eines Spermiums bedingt. Die Hemmung von vor der Befruchtung freigesetztem Ovastacin obliegt Fetuin-B (siehe STÖCKER ET AL., 2014), gleichzeitig darf Fetuin-B die Prozessierung von *Zona pellucida* Protein 2 nach der Befruchtung nicht verhindern, da sonst die Anzahl der Nachkommen abnimmt (KÖRSCHGEN ET AL., 2017). Hier kann wiederum Akrosin eingreifen, da

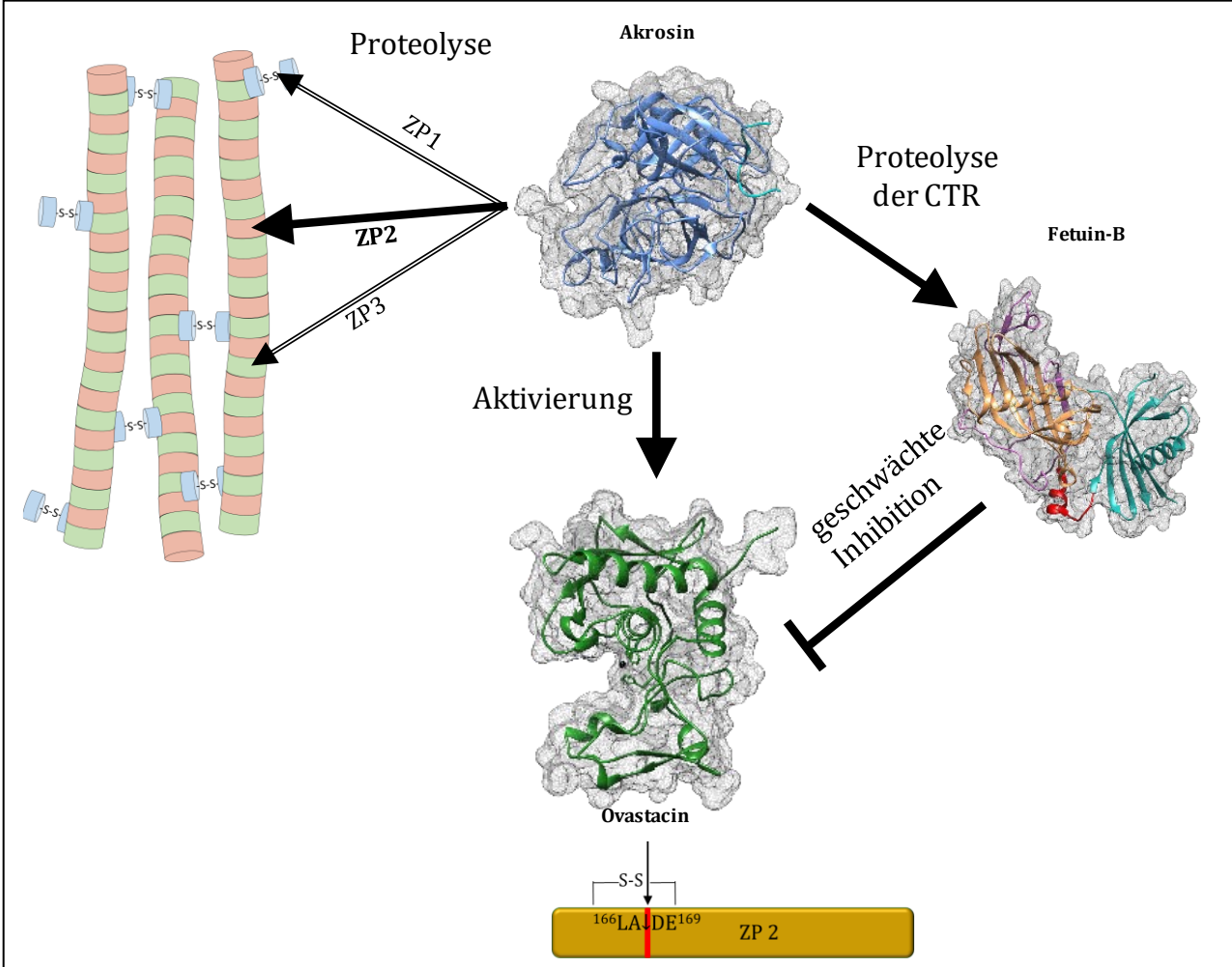


Abbildung 38: Schematische Darstellung des funktionellen Dreiecks. CTR = C-Terminale Region; ZP1-3 *Zona pellucida* Proteine 1-3

eine ausreichenden Prozessierung von Fetuin-B durch Akrosin die Wirksamkeit des Inhibitors herabsetzt. Akrosin ist also in der Lage Proovastacin zu aktivieren und gleichzeitig den Inhibitor von Ovastacin Fetuin-B in seiner Wirksamkeit einzuschränken. Dieser Eingriff von Akrosin in das Ovastacin-Fetuin-B Gleichgewicht, welches für den Erhalt der Befruchtungsfähigkeit von ovulierten Eizellen essenziell ist (DIETZEL ET AL., 2013), ist wiederum zeitlich präzise auf das Befruchtungsfenster begrenzt.

4.12. Ausblick

Die hier gewonnenen Daten bieten Anschlusspunkte für nachfolgende Forschung. Die Auswirkung von Isofluran auf die frühzeitige Aktivierung von murinen Eizellen legt nahe, diese Wirkung von Isofluran in der Humanmedizin weiter zu untersuchen, da die bisher durchgeführten Metastudien Isofluran immer bei gleichzeitiger Gabe von anderen Narkotika getestet wurde.

Die Ergebnisse zeigen, dass die murine *Zona pellucida* von Akrosin prozessiert wird. Hier wäre es wichtig, die präzisen Schnittstellen in den einzelnen *Zona pellucida* Proteinen zu detektieren. Eine massenspektroskopische Untersuchung von Akrosin-behandelten *Zonae* könnte hier Aufschluss geben. Auch die mechanischen Parameter der *Zona*-Härtung können in der Untersuchung mit Rasterkraftmikroskopie aufgeklärt werden.

Um die vorgeschlagene Wechselwirkung zwischen Akrosin und Ovastacin besser zu verstehen, könnten Akrosin- und Ovastacin-defiziente Tieren daraufhin getestet werden, ob sich die messbare Härtung der *Zona pellucida* in Abhängigkeit von den verwendeten Genotypenkombinationen der Gameten ändert. Das würde auch die Problematik des artfremden Akrosins umgehen, dass in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Die Härtung der *Zona pellucida* ist ein sehr interessantes Feld, da die *Zona* die erste Kontaktfläche der beiden Gameten darstellt. Eine Strukturaufklärung von *Zona pellucida* Protein 2 vor und nach der Prozessierung des N-Terminus durch Ovastacin und/oder Akrosin könnte den Mechanismus der Härtung besser verständlich machen. Falls die Härtung gezielt künstlich herbeigeführt werden könnte, wäre dies ein Angriffspunkt für eine nicht hormonelle Verhütungsmethode.

5. Literaturverzeichnis

- Adham, I. M., Nayernia, K., & Engel, W. (1997). Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 46(3), 370–376.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402.
- Altschul, S. F., Wootton, J. C., Gertz, E. M., Agarwala, R., Morgulis, A., Schaffer, A. A., & Yu, Y.-K. (2005). Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS Journal*, 272(20), 5101–5109.
- Asano, M., Furukawa, K., Kido, M., Matsumoto, S., Umesaki, Y., Kochibe, N., & Iwakura, Y. (1997). Growth retardation and early death of β -1,4-galactosyltransferase knockout mice with augmented proliferation and abnormal differentiation of epithelial cells. *EMBO Journal*, 16(8), 1850–1857.
- Austin, C. R. (1952). The 'Capacitation' of the Mammalian Sperm. *Nature*, 170(4321), 326–326.
- Avella, M. a., Baibakov, B., & Dean, J. (2014). A single domain of the ZP2 zona pellucida protein mediates gamete recognition in mice and humans. *The Journal of Cell Biology*, 205(6), 801–809.
- Baba, Azuma, S., Kashiwabara, S. I., & Toyoda, Y. (1994). Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *Journal of Biological Chemistry*, 269(50), 31845–31849.
- Baba, Kashiwabara, S. I., Watanabe, K., Itoh, H., Michikawa, Y., Kimura, K., Takada, M., Fukumizu, A., & Arai, Y. (1989). Activation and maturation mechanisms of boar acrosin zymogen based on the deduced primary structure. *Journal of Biological Chemistry*, 264(20), 11920–11927.
- Bedford, J. M. (2011). Site of the mammalian sperm physiological acrosome reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(12), 4703–4704.
- Beilin, Y., Bodian, C. A., Mukherjee, T., Andres, L. A., Vincent, R. D., Hock, D. L., Sparks, A. E. T., Munson, A. K., Minnich, M. E., Steinkampf, M. P., Christman, G. M., McKay, R. S. F., & Eisenkraft, J. B. (1999). The Use of Propofol, Nitrous Oxide, or Isoflurane Does Not Affect the Reproductive Success Rate following Gamete Intrafallopian Transfer (GIFT). *Anesthesiology*, 90(1), 36–41.
- Ben-Shlomo, I., Moskovich, R., Katz, Y., & Shalev, E. (1999). Midazolam/ketamine sedative combination compared with fentanyl/propofol/isoflurane anaesthesia for oocyte retrieval. *Human Reproduction*, 14(7), 1757–1759.
- Benkert, P., Biasini, M., & Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27(3), 343–350.

- Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L., & Schwede, T. (2017). Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15.
- Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D., & Wright, G. J. (2014). Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature*, 508(7497), 483–487.
- Bleil, J. D., & Wassarman, P. M. (1988). 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(18), 6778–6782.
- Bleil, Jeffrey D., & Wassarman, P. M. (1980). Mammalian sperm-egg interaction: Identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell*, 20(3), 873–882.
- Blüm, V. (1985). Vergleichende Reproduktionsbiologie der Wirbeltiere, *Springer-Verlag Berlin*.
- Bode, W., Gomis-Rüth, F.-X., & Stöcker, W. (1993). Astacins, serralyisins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins.' *FEBS Letters*, 331(1–2), 134–140.
- Bode, W., & Huber, R. (1976). Induction of the bovine trypsinogen-trypsin transition by peptides sequentially similar to the N-terminus of trypsin. *FEBS Letters*, 68(2), 231–236.
- Boja, E. S., Hoodbhoy, T., Fales, H. M., & Dean, J. (2003). Structural Characterization of Native Mouse Zona Pellucida Proteins Using Mass Spectrometry. *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), 34189–34202.
- Braden, A. W. H., Austin, C. R., & David, H. A. (1954). The reaction of the zona pellucida to sperm penetration. *Australian Journal of Biological Sciences*, 7(3), 391–410.
- Brown, C. R. (1982). Effects of ram sperm acrosin on the investments of sheep, pig, mouse and gerbil eggs. *Reproduction*, 64(2), 457–462.
- Brown, C. R. (1983). Purification of mouse sperm acrosin, its activation from proacrosin and effect on homologous egg investments. *Reproduction*, 69(1), 289–295.
- Buljubasic, N., Rusch, N. J., Marijic, J., Kampine, J. P., & Bosnjak, Z. J. (1992). Effects of Halothane and Isoflurane on Calcium and Potassium Channel Currents in Canine Coronary Arterial Cells. *Anesthesiology*, 76(6), 990–998.
- Burkart, A. D., Xiong, B., Baibakov, B., Jiménez-Movilla, M., & Dean, J. (2012). Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. *Journal of Cell Biology*, 197(1), 37–44.
- Chaudhury, K., Das, T., Chakravarty, B., & Bhattacharyya, A. K. (2005). Acrosin activity as a potential marker for sperm membrane characteristics in unexplained male infertility. *Fertility and Sterility*, 83(1), 104–109.

- Chetkowski, R. J., & Nass, T. E. (1988). Isoflurane inhibits early mouse embryo development in vitro. *Fertility and Sterility*, 49(1), 171–173.
- Chung, S. O. (1971). The Thickness and Volume Change of the Zona Pellucida Following Ovulation and Fertilization. *Yonsei Medical Journal*, 12(1), 28.
- Coy, P., Jimenez-Movilla, M., Garcia-Vazquez, F. a., Mondejar, I., Grullon, L., & Romar, R. (2012). Oocytes use the plasminogen-plasmin system to remove supernumerary spermatozoa. *Human Reproduction*, 27(7), 1985–1993.
- Cross, N. L. (1998). Role of Cholesterol in Sperm Capacitation. *Biology of Reproduction*, 59(1), 7–11.
- Cummins, J. M., & Yanagimachi, R. (1982). Sperm-egg ratios and the site of the acrosome reaction during in vivo fertilization in the hamster. *Gamete Research*, 5(3), 239–256.
- Cuppari, A., Körschgen, H., Fahrenkamp, D., Schmitz, C., Guevara, T., Karmilin, K., Kuske, M., Olf, M., Dietzel, E., Yiallourous, I., Sanctis, D. De, Goulas, T., Weiskirchen, R., Jahnen-Dechent, W., Floehr, J., Stöcker, W., Jovine, L., & Gomis-Rüth, F. X. (2019). Structure of mammalian plasma fetuin-B and its mechanism of selective metallopeptidase inhibition. *International Union of Crystallography*, 1999, 317–330.
- Danscher, G. (1981). Localization of gold in biological tissue. *Histochemistry*, 71(1), 81–88.
- De Felici, M., Salustri, A., & Siracusa, G. (1985). “Spontaneous” hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during in vitro culture. II. The effect of follicular fluid and glycosaminoglycans. *Gamete Research*, 12(3), 227–235.
- Deng, M., Kishikawa, H., Yanagimachi, R., Kopf, G. S., Schultz, R. M., & Williams, C. J. (2003). Chromatin-mediated cortical granule redistribution is responsible for the formation of the cortical granule-free domain in mouse eggs. *Developmental Biology*, 257(1), 166–176.
- Dietzel, E., Wessling, J., Floehr, J., Schäfer, C., Ensslen, S., Denecke, B., Rösing, B., Neulen, J., Veitinger, T., Spehr, M., Tropartz, T., Tolba, R., Renné, T., Egert, A., Schorle, H., Gottenbusch, Y., Hildebrand, A., Yiallourous, I., Stöcker, W., Weiskirchen, R., & Jahnen-Dechent, W. (2013). Fetuin-B, a Liver-Derived Plasma Protein Is Essential for Fertilization. *Developmental Cell*, 25(1), 106–112.
- Dunbar, B. S., Dudkiewicz, A. B., & Bundman, D. S. (1985). Proteolysis of Specific Porcine Zona Pellucida Glycoproteins by Boar Acrosin. *Biology of Reproduction*, 32(3), 619–630.
- Dyson, H. J. (2016). Making Sense of Intrinsically Disordered Proteins. *Biophysical Journal*, 110(5), 1013–1016.
- East, I. J., & Dean, J. (1984). Monoclonal antibodies as probes of the distribution of ZP-2, the major sulfated glycoprotein of the murine zona pellucida. *Journal of Cell Biology*, 98(3), 795–800.

- East, Iain J., Gulyas, B. J., & Dean, J. (1985). Monoclonal antibodies to the murine zona pellucida protein with sperm receptor activity: Effects on fertilization and early development. *Developmental Biology*, *109*(2), 268–273.
- El-Ashmawy, H. M., & Ahmed, A. M. (2019). Serum fetuin-B level is an independent marker for nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *31*(7), 859–864.
- Fahrenkamp, E., Algarra, B., & Jovine, L. (2020). Mammalian egg coat modifications and the block to polyspermy. *Molecular Reproduction and Development*, (November 2019), 1–15.
- Finlay, T. H., Katz, J., Kirsch, L., Levitz, M., Nathoo, S. A., & Seiler, S. (1983). Estrogen-stimulated uptake of plasminogen by the mouse uterus. *Endocrinology*, *112*(3), 856–861.
- Floehr, J. (2011). Die Analyse von Fetuin-B bei idiopathisch infertilen Frauen. *Masterarbeit, RWTH Aachen*.
- Furlong, L. I., Harris, J. D., & Vazquez-Levin, M. H. (2005). Binding of recombinant human proacrosin/acrosin to zona pellucida (ZP) glycoproteins. I. Studies with recombinant human ZPA, ZPB, and ZPC. *Fertility and Sterility*, *83*(6), 1780–1790.
- Gahlay, G., Gauthier, L., Baibakov, B., Epifano, O., & Dean, J. (2010). Gamete Recognition in Mice Depends on the Cleavage Status of an Egg's Zona Pellucida Protein. *Science*, *329*(5988), 216–219.
- Gomis-Rüth, F. X. (2003). Structural Aspects of the Metzincin Clan of Metalloendopeptidases. *Molecular Biotechnology*, *24*(2), 157–202.
- Gomis-Rüth, F. X., Trillo-Muyo, S., & Stöcker, W. (2012). Functional and structural insights into astacin metallopeptidases. *Biological Chemistry*, *393*(10), 1027–1041.
- Grasshoff, C., & Antkowiak, B. (2006). Effects of isoflurane and enflurane on GABAA and glycine receptors contribute equally to depressant actions on spinal ventral horn neurones in rats. *British Journal of Anaesthesia*, *97*(5), 687–694.
- Green, D. P. L. (1997). Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Reviews of Reproduction*, *2*(3), 147–156.
- Greve, J. M., & Wassarman, P. M. (1985). Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *Journal of Molecular Biology*, *181*(2), 253–264.
- Guevara, T., Körschgen, H., Cuppari, A., Schmitz, C., Kuske, M., Yiallourous, I., Floehr, J., Jahnen-Dechent, W., Stöcker, W., & Gomis-Rüth, F. X. (2019). The C-terminal region of human plasma fetuin-B is dispensable for the raised-elephant-trunk mechanism of inhibition of astacin metallopeptidases. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–13.
- Guex, N., Peitsch, M. C., & Schwede, T. (2009). Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis*, *30*(SUPPL. 1), 162–173.

- Gulyas, B. J., & Schmill, E. D. (1980). Ovoperoxidase activity in ionophore treated mouse eggs. I. Electron microscopic localization. *Gamete Research*, 3(3), 267–277.
- Gulyas, B. J., & Yuan, L. C. (1985). Cortical reaction and zona hardening in mouse oocytes following exposure to ethanol. *Journal of Experimental Zoology*, 233(2), 269–276.
- Gwatkin, R. B. L. (1964). EFFECT OF ENZYMES AND ACIDITY ON THE ZONA PELLUCIDA OF THE MOUSE EGG BEFORE AND AFTER FERTILIZATION. *Reproduction*, 7(1), 99–105.
- Hammadeh, M. E., Wilhelm, W., Huppert, A., Rosenbaum, P., & Schmidt, W. (1999). Effects of general anaesthesia vs. sedation on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 263(1–2), 56–59.
- Hildebrand, A. (2008). Expression und funktionelle Analyse von Ovastacin. *Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz*.
- Howes, E., Pascall, J. C., Engel, W., & Jones, R. (2001). Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin; a mechanism for secondary binding of sperm to the zona pellucida during fertilization. *J Cell Sci*, 114(Pt 22), 4127–4136.
- Huarte, J., Belin, D., & Vassalli, J.-D. (1985). Plasminogen activator in mouse and rat oocytes: Induction during meiotic maturation. *Cell*, 43(2), 551–558.
- Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A., & Okabe, M. (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*, 434(7030), 234–238.
- Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S. A., Chiba, K., & Hirohashi, N. (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(12), 4892–4896.
- Joseph, J. D., Peng, Y., Mak, D. O. D., Cheung, K. H., Vais, H., Foskett, K., & Wei, H. (2014). General anesthetic isoflurane modulates inositol 1,4,5-trisphosphate receptor calcium channel opening. *Anesthesiology*, 121(3), 528–537.
- Jovine, L., Qi, H., Williams, Z., Litscher, E. S., & Wassarman, P. M. (2004). A duplicated motif controls assembly of zona pellucida domain proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16), 5922–5927.
- Kang, D., Gho, Y. S., Suh, M., & Kang, C. (2002). Highly sensitive and fast protein detection with Coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 23(11), 1511–1512.
- Karmilin, K., Schmitz, C., Kuske, M., Körschgen, H., Olf, M., Meyer, K., Hildebrand, A., Felten, M., Fridrich, S., Yiallourous, I., Becker-Pauly, C., Weiskirchen, R., Jahnen-Dechent, W., Floehr, J., & Stöcker, W. (2019). Mammalian plasma fetuin-B is a selective inhibitor of ovastacin and meprin metalloproteinases. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12.

- Kaufman, M. H. (1975). Parthenogenetic activation of mouse oocytes following avertin anaesthesia. *J Embryol Exp Morphol*, 33(4), 941–946.
- Kavinsky, C. J., Clark, W. A., & Garber, B. B. (1982). Immunochemical analysis of fibronectin using monoclonal antibodies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 705(3), 330–340.
- Kawano, N., Kang, W., Yamashita, M., Koga, Y., Yamazaki, T., Hata, T., Miyado, K., & Baba, T. (2010). Mice lacking two sperm serine proteases, ACR and PRSS21, are subfertile, but the mutant sperm are infertile in vitro. *Biology of Reproduction*, 83(May), 359–369.
- Kim, A. M., Bernhardt, M. L., Kong, B. Y., Ahn, R. W., Vogt, S., Woodruff, T. K., & O'Halloran, T. V. (2011). Zinc Sparks Are Triggered by Fertilization and Facilitate Cell Cycle Resumption in Mammalian Eggs. *ACS Chemical Biology*, 6(7), 716–723.
- Kim, A. M., Vogt, S., O'Halloran, T. V., & Woodruff, T. K. (2010). Zinc availability regulates exit from meiosis in maturing mammalian oocytes. *Nature Chemical Biology*, 6(9), 674–681.
- Kimura, M., Kim, E., Kang, W., Yamashita, M., Saigo, M., Yamazaki, T., Nakanishi, T., Kashiwabara, S., & Baba, T. (2009). Functional Roles of Mouse Sperm Hyaluronidases, HYAL5 and SPAM1, in Fertilization1. *Biology of Reproduction*, 81(5), 939–947.
- Körschgen, H., Kuske, M., Karmilin, K., Yiallourous, I., Balbach, M., Floehr, J., Wachten, D., Jahnen-Dechent, W., & Stöcker, W. (2017). Intracellular activation of ovastacin mediates pre-fertilization hardening of the zona pellucida. *Molecular Human Reproduction*, 23(9), 607–616.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 10(3–4), 203–209.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lee, C., Bongcam-Rudloff, E., Sollner, C., Jahnen-Dechent, W., & Claesson-Welsh, L. (2009). Type 3 cystatins; fetuins, kininogen and histidine-rich glycoprotein. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 14(14), 2911–2922.
- Lefièvre, L., Conner, S. J., Salpekar, A., Olufowobi, O., Ashton, P., Pavlovic, B., Lenton, W., Afnan, M., Brewis, I. A., Monk, M., Hughes, D. C., & Barratt, C. L. R. (2004). Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 19(7), 1580–1586.
- Li, Z., He, C., Liu, Y., Wang, D., Lin, M., Liu, C., Shi, X., Chen, Z., Li, X., Yang, S., & Li, W. (2019). Association of Fetuin-B with Subclinical Atherosclerosis in Obese Chinese Adults. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 1–11.
- Liu, M. (2011). The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9(1), 149.

- López-Otín, C., & Bond, J. S. (2008). Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. *Journal of Biological Chemistry*, 283(45), 30433–30437.
- Maret, W. (2015). Analyzing free zinc(II) ion concentrations in cell biology with fluorescent chelating molecules. *Metallomics*, 7(2), 202–211.
- Matt, D. W., Steingold, K. A., Dastvan, C. M., James, C. A., & Dunwiddie, W. (1991). Effects of sera from patients given various anesthetics on preimplantation mouse embryo development in vitro. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, 8(4), 191–197.
- Miller, D. J., Macek, M. B., & Shur, B. D. (1992). Complementarity between sperm surface β -1,4-galactosyl-transferase and egg-coat ZP3 mediates sperm–egg binding. *Nature*, 357(6379), 589–593.
- Mondéjar, I., Grullón, L. A., García-Vázquez, F. A., Romar, R., & Coy, P. (2012). Fertilization outcome could be regulated by binding of oviductal plasminogen to oocytes and by releasing of plasminogen activators during interplay between gametes. *Fertility and Sterility*, 97(2).
- Müller-Esterl, W., & Fritz, H. (1981). Sperm Acrosin. *Methods in Enzymology*, 80(C), 621–632.
- Muro, Y., Hasuwa, H., Isotani, A., Miyata, H., Yamagata, K., Ikawa, M., Yanagimachi, R., & Okabe, M. (2016). Behavior of Mouse Spermatozoa in the Female Reproductive Tract from Soon after Mating to the Beginning of Fertilization. *Biology of Reproduction*, 94(4), 1–7.
- Nicosia, S. V., Wolf, D. P., & Inoue, M. (1977). Cortical granule distribution and cell surface characteristics in mouse eggs. *Developmental Biology*, 57(1), 56–74.
- Nozawa, K., Satouh, Y., Fujimoto, T., Oji, A., & Ikawa, M. (2018). Sperm-borne phospholipase C zeta-1 ensures monospermic fertilization in mice. *Scientific Reports*, 8(1), 1315.
- O'Toole, C. M. B., Arnoult, C., Darszon, A., Steinhardt, R. A., & Florman, H. M. (2000). Ca²⁺ Entry through Store-operated Channels in Mouse Sperm Is Initiated by Egg ZP3 and Drives the Acrosome Reaction. *Molecular Biology of the Cell*, 11(5), 1571–1584.
- Oldfield, C. J., & Dunker, A. K. (2014). Intrinsically Disordered Proteins and Intrinsically Disordered Protein Regions. *Annual Review of Biochemistry*, 83(1), 553–584.
- Papi, M., Brunelli, R., Sylla, L., Parasassi, T., Monaci, M., Maulucci, G., Missori, M., Arcovito, G., Ursini, F., & De Spirito, M. (2010). Mechanical properties of zona pellucida hardening. *European Biophysics Journal*, 39(6), 987–992.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612.

- Pires, E. S., Hlavin, C., Macnamara, E., Ishola-Gbenla, K., Doerwaldt, C., Chamberlain, C., Klotz, K., Herr, A. K., Khole, A., Chertihin, O., Curnow, E., Feldman, S. H., Mandal, A., Shetty, J., Flickinger, C., & Herr, J. C. (2013). SAS1B protein [ovastacin] shows temporal and spatial restriction to oocytes in several eutherian orders and initiates translation at the primary to secondary follicle transition. *Developmental Dynamics*, 242(12), 1405–1426.
- Polakoski, K. L., McRorie, R. A., & Williams, W. L. (1973). Boar acrosin. I. Purification and preliminary characterization of a proteinase from boar sperm acrosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 248(23), 8178–8182.
- Putney, J. W., & Tomita, T. (2012). Phospholipase C signaling and calcium influx. *Advances in Biological Regulation*, 52(1), 152–164.
- Qu, H., Qiu, Y., Wang, Y., Liao, Y., Zheng, Y., & Zheng, H. (2018). Plasma fetuin-B concentrations are associated with insulin resistance and first-phase glucose-stimulated insulin secretion in individuals with different degrees of glucose tolerance. *Diabetes and Metabolism*, 44(6), 488–492.
- Que, E. L., Duncan, F. E., Bayer, A. R., Philips, S. J., Roth, E. W., Bleher, R., Gleber, S. C., Vogt, S., Woodruff, T. K., & O'Halloran, T. V. (2017). Zinc sparks induce physiochemical changes in the egg zona pellucida that prevent polyspermy. *Integrative Biology (United Kingdom)*, 9(2), 135–144.
- Quesada, V., Sanchez, L. M., Alvarez, J., & Lopez-Otin, C. (2004). Identification and Characterization of Human and Mouse Ovastacin: A NOVEL METALLOPROTEINASE SIMILAR TO HATCHING ENZYMES FROM ARTHROPODS, BIRDS, AMPHIBIANS, AND FISH. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 26627–26634.
- Rankin, T. L., Coleman, J. S., Epifano, O., Hoodbhoy, T., Turner, S. G., Castle, P. E., Lee, E., Gore-Langton, R., & Dean, J. (2003). Fertility and Taxon-Specific Sperm Binding Persist after Replacement of Mouse Sperm Receptors with Human Homologs. *Developmental Cell*, 5(1), 33–43.
- Rankin, T. L., Tong, Z. Bin, Castle, P. E., Lee, E., Gore-Langton, R., Nelson, L. M., & Dean, J. (1998). Human ZP3 restores fertility in Zp3 null mice without affecting order-specific sperm binding. *Development*, 125(13), 2415–2424.
- Rankin, T., Talbot, P., Lee, E., & Dean, J. (1999). Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development*, 126(17), 3847–3855.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Thomas, P. D., Huang, X., Bateman, A., & Finn, R. D. (2018). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D624–D632.
- Redinbaugh, M. G., & Turley, R. B. (1986). Adaptation of the bicinchoninic acid protein assay for use with microtiter plates and sucrose gradient fractions. *Analytical Biochemistry*, 153(2), 267–271.

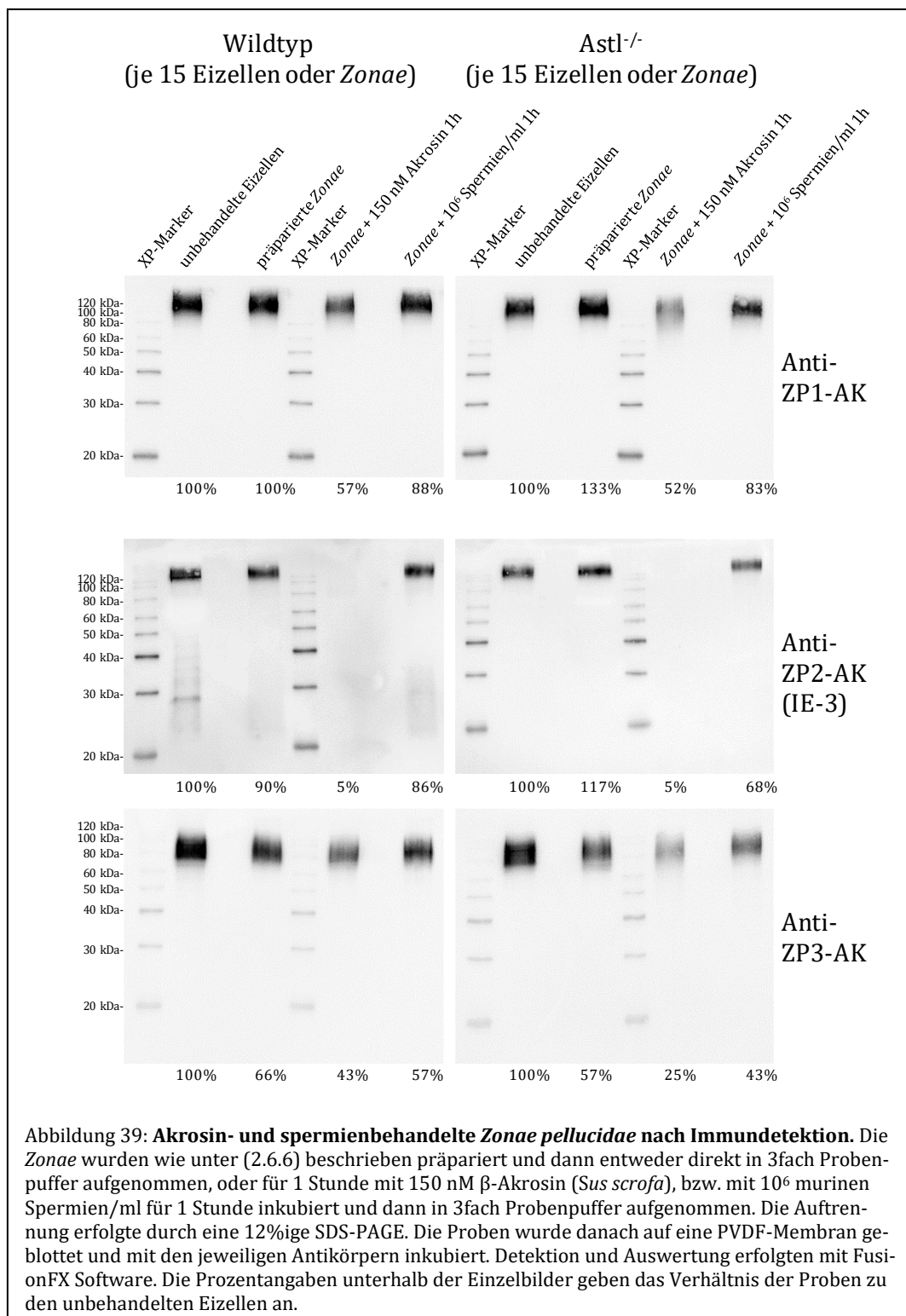
- Roustan, A., Botta, A., Berthelot-Ricou, A., Perrin, J., Courbiere, B., & Lopez, E. (2012). Evaluating methods of mouse euthanasia on the oocyte quality: cervical dislocation versus isoflurane inhalation. *Laboratory Animals*, 46(2), 167–169.
- Schiessler, H., Schleuning, W.-D., & Fritz, H. (1975). Cleavage Specificity of Boar Acrosin on Polypeptide Substrates, Ribonuclease and Insulin B-Chain. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Für Physiologische Chemie*, 356(2), 1931–1936.
- Schleuning, W.-D., Hell, R., & Fritz, H. (1976). Multiple Forms of Human Acrosin: Isolation and Properties. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Für Physiologische Chemie*, 357(1), 855–866.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85.
- Stambaugh, R., & Buckley, J. (1968). Zona Pellucida Dissolution Enzymes of the Rabbit Sperm Head. *Science*, 161(3841), 585–586.
- Stöcker, W., & Bode, W. (1995). Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. *Current Opinion in Structural Biology*, 5(3), 383–390.
- Stöcker, W., Karmilin, K., Hildebrand, A., Westphal, H., Yiallourous, I., Weiskirchen, R., Dietzel, E., Floehr, J., & Jahnen-Dechent, W. (2014). Mammalian gamete fusion depends on the inhibition of ovastacin by fetuin-B. *Biological Chemistry*, 395(10), 1195–1199.
- Takeo, T., & Nakagata, N. (2011). Reduced Glutathione Enhances Fertility of Frozen/Thawed C57BL/6 Mouse Sperm after Exposure to Methyl-Beta-Cyclodextrin1. *Biology of Reproduction*, 85(5), 1066–1072.
- Taketo, M., Schroeder, a. C., Mobraaten, L. E., Gunning, K. B., Hanten, G., Fox, R. R., Roderick, T. H., Stewart, C. L., Lilly, F., & Hansen, C. T. (1991). FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(6), 2065–2069.
- Thall, A. D., Maly, P., & Lowe, J. B. (1995). Oocyte Gal α 1,3Gal epitopes implicated in sperm adhesion to the zona pellucida glycoprotein ZP3 are not required for fertilization in the mouse. *Journal of Biological Chemistry*, 270(37), 21437–21440.
- Tokuhiro, K., & Dean, J. (2018). Glycan-Independent Gamete Recognition Triggers Egg Zinc Sparks and ZP2 Cleavage to Prevent Polyspermy. *Developmental Cell*, 46(5), 627-640.e5.
- Töpfer-Petersen, E., & Henschen, A. (1988). Zona pellucida-binding and fucose-binding of boar sperm acrosin is not correlated with proteolytic activity. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 369(1), 69–76.
- Töpfer-Petersen, E., Steinberger, M., Ebner von Eschenbach, C., & Zucker, A. (1990). Zona pellucida-binding of boar sperm acrosin is associated with the N-terminal peptide of the acrosin B-chain (heavy chain). *FEBS Letters*, 265(1–2), 51–54.

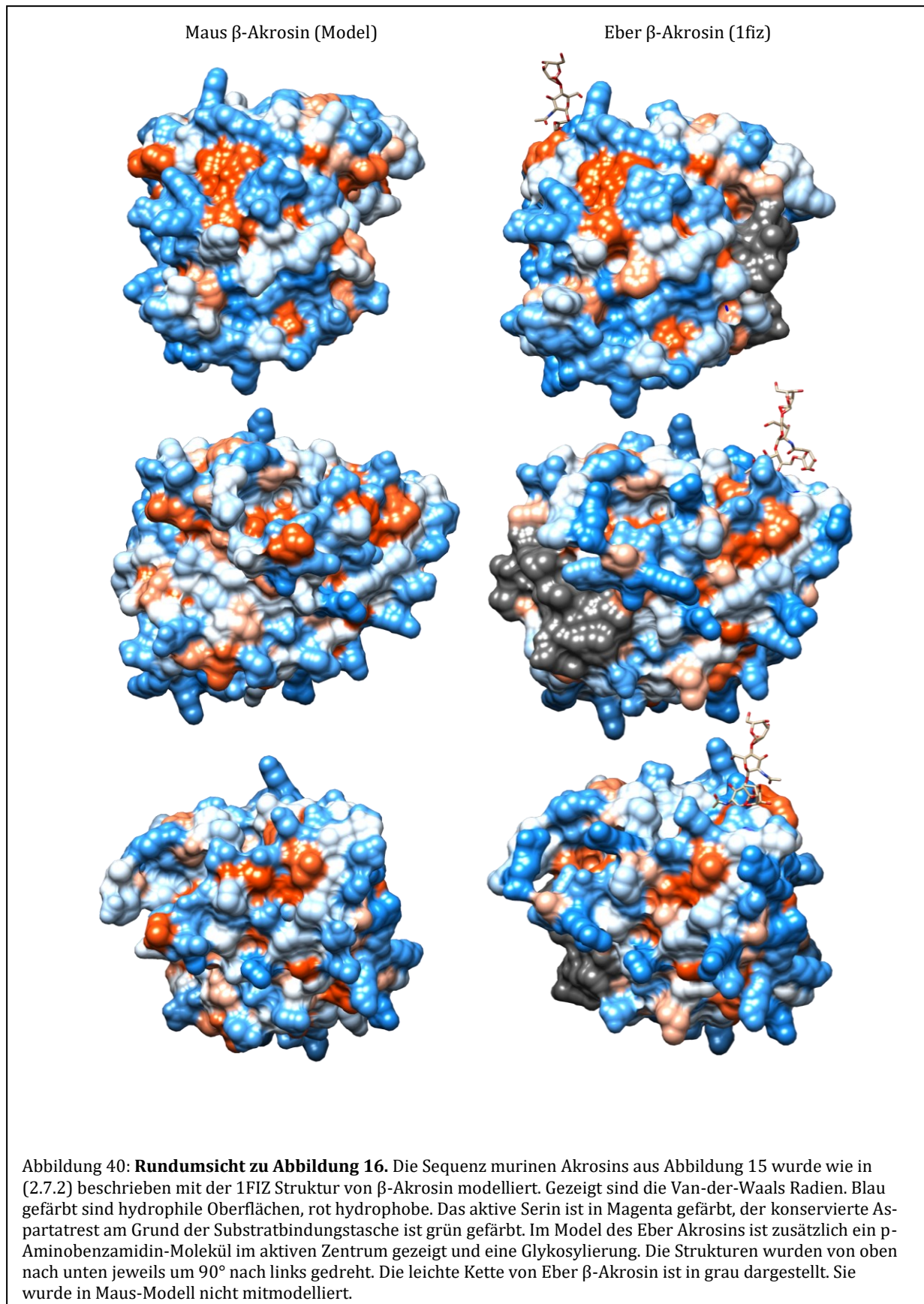
- Tranter, R., Read, J. a, Jones, R., & Brady, R. L. (2000). Effector sites in the three-dimensional structure of mammalian sperm beta-acrosin. *Structure*, 8(11), 1179–1188.
- Urch, U. A., Wardrip, N. J., & Hedrick, J. L. (1985a). Limited and specific proteolysis of the zona pellucida by acrosin. *The Journal of Experimental Zoology*, 233(3), 479–483.
- Urch, U. A., Wardrip, N. J., & Hedrick, J. L. (1985b). Proteolysis of the zona pellucida by acrosin: The nature of the hydrolysis products. *Journal of Experimental Zoology*, 236(2), 239–243.
- Wassarman, P. M., Jovine, L., & Litscher, E. S. (2004). Mouse zona pellucida genes and glycoproteins. *Cytogenetic and Genome Research*, 105(2–4), 228–234.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303.
- Westpahl, H. (2016). Aktivierung und Freisetzung von Ovastacin bei der Befruchtung des Säugereis. *Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz*.
- WHO. (2015). 19th WHO Model List of Essential Medicines. [Http://Www.Who.Int/Medicines/Publications/Essentialmedicines/En](http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en), (April), 1–43.
- Wilhelm, W., Hammadeh, M. E., White, P. F., Georg, T., Fleiser, R., & Biedler, A. (2002). General anesthesia versus monitored anesthesia care with remifentanyl for assisted reproductive technologies: effect on pregnancy rate. *Journal of Clinical Anesthesia*, 14(1), 1–5.
- Xiong, B., Zhao, Y., Beall, S., Sadusky, A. B., & Dean, J. (2017). A Unique Egg Cortical Granule Localization Motif Is Required for Ovastacin Sequestration to Prevent Premature ZP2 Cleavage and Ensure Female Fertility in Mice. *PLoS Genetics*, 13(1), 1–18.
- Yamagata, K., Murayama, K., Okabe, M., Toshimori, K., Nakanishi, T., Kashiwabara, S. I., & Baba, T. (1998). Acrosin accelerates the dispersal of sperm acrosomal proteins during acrosome reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 273(17), 10470–10474.
- Zaneveld, L. J., Srivastava, P. N., & Williams, W. L. (1969). Relationship of a trypsin-like enzyme in rabbit spermatozoa to capacitation. *Journal of Reproduction and Fertility*, 20(2), 337–339.
- Zhang, X., Rutledge, J., Khamsi, F., & Armstrong, D. T. (1992). Release of tissue-type plasminogen activator by activated rat eggs and its possible role in the zona reaction. *Molecular Reproduction and Development*, 32(1), 28–32.
- Zhou, C., Kang, W., & Baba, T. (2012). Functional Characterization of Double-knockout Mouse Sperm Lacking SPAM1 and ACR or SPAM1 and PRSS21 in Fertilization. *Journal of Reproduction and Development*, 58(3), 330–337.

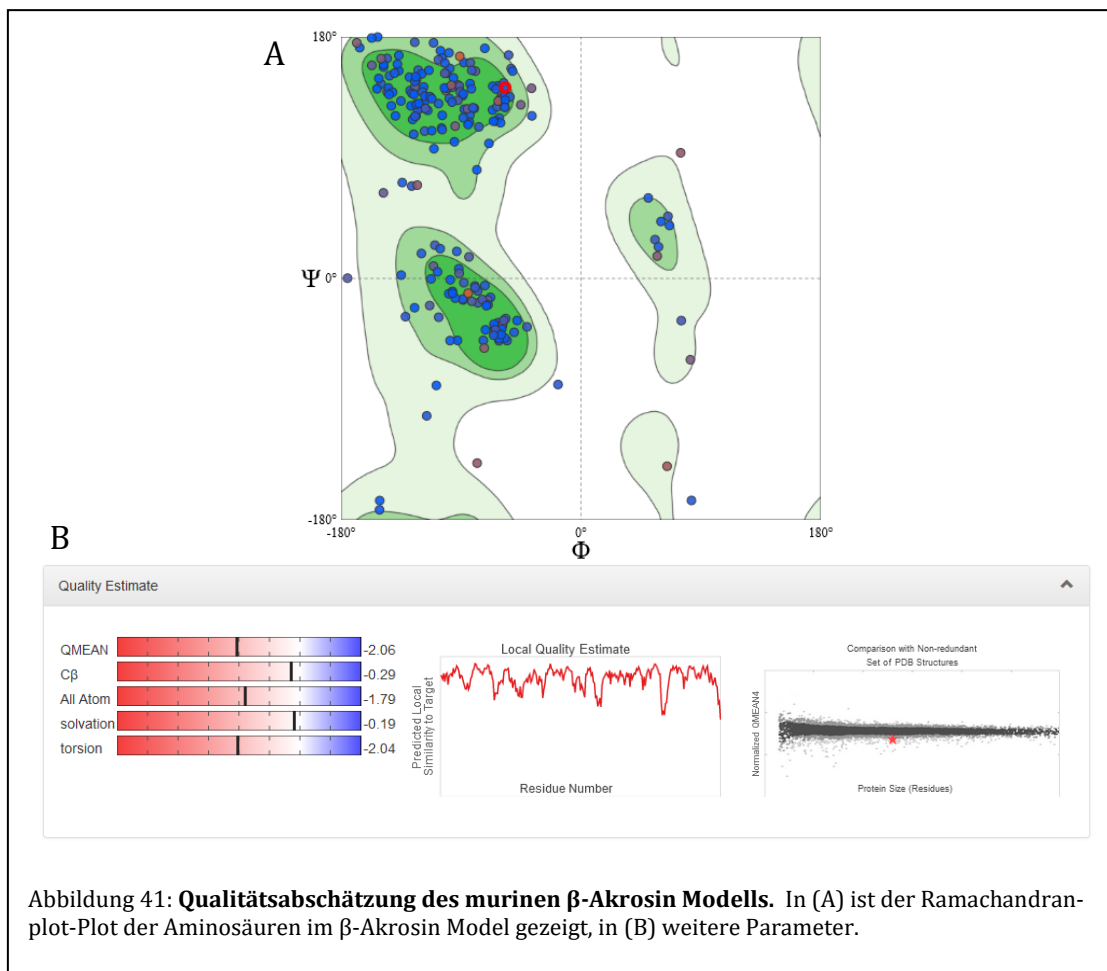
Zhu, K., Wang, Y., Shu, P., Zhou, Q., Zhu, J., Zhou, W., Du, C., Xu, C., Liu, X., & Tang, L. (2017). Increased serum levels of fetuin B in patients with coronary artery disease. *Endocrine*, 58(1), 97–105.

6. Anhang

6.1. Weitere Daten



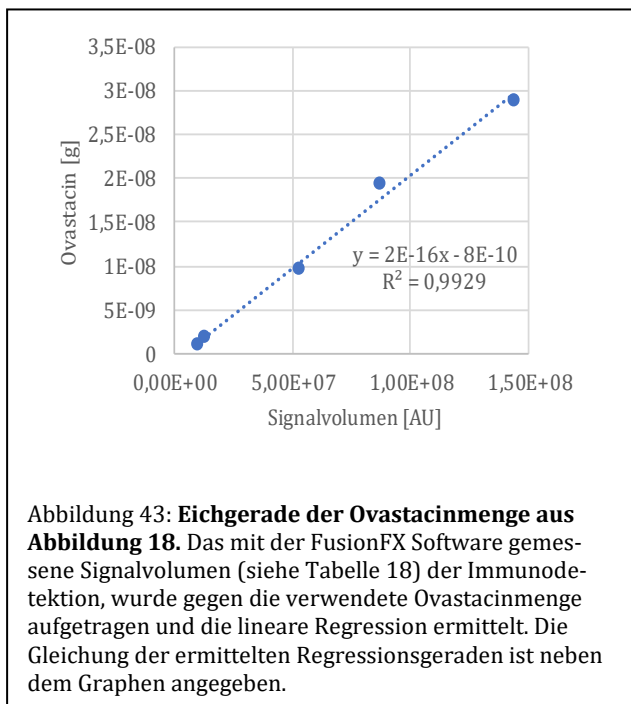




Identisch:260/402(65%), Ähnlich:295/402(73%), Gaps:11/402(2%)

	leichte Kette	schwere Kette
Eber-Akrosin: 1	MLPTAVLLVLA ⁺ SVVAARDNATCDGPGCLRFRQKLESGMRVWGGMSAEPGAWP ⁺ WMVSLQIF	MLPT +LVLAVSV A+DN TCDGPGCLRFRQ ++G R+V G SA+ GAWP ⁺ WMVSLQIF
Maus-Akrosin: 4	MLPTVAVLVLAVSVVAKDNTTCDGPGCLRFRQNSQAGTRIVSGQSAQLGAWP ⁺ WMVSLQIF	
Eber-Akrosin: 61	MYHNRRRYHTCGGILLNSHWLTA ⁺ AHCFKNKKKVDWRLIFGANEVWGSNKPVKPPLQE	HN+RRYH CGG LLNSHWLTA ⁺ AHCF NKKKV DWRL+FGA E+ +G NKPVK P QE
Maus-Akrosin: 64	TSHNSRRYHACGGSLNSHWLTA ⁺ AHCFDNKKKVYDWRLVFGAQEIEYGRNKPVKEPQQE	
Eber-Akrosin: 121	RFVEEIIHEKYVSGLEINDIALIKITPPVPCGPFIFGCLPQFKAGPPRAPQTCWVTGW	R+V++I+IHEKY E NDIAL+KITPPV CG FIGP CLP FKAGPP+ P TC+VTGW
Maus-Akrosin: 124	RYVQKIVIHEKYNVTEGNDIALLKITPPVTCGNFIGPCCLPHFKAGPPQIPHTCYVTGW	
Eber-Akrosin: 181	GYLKEKGPRTSPTLQEARVALIDLELCNSTRWYNGRIRSTNVCAGYPRGKIDTCQGDSSGG	GY+KEK PR SP L EARV LIDL+LCNST+WYNGR+ STNVCAGYP GKIDTCQGDSSGG
Maus-Akrosin: 184	GYIKEKAPRPSVLMPEARVDLIDLDCNSTQWYNGRVTSTNVCAGYPEGKIDTCQGDSSGG	
Eber-Akrosin: 241	PLMCRDRAENTFVVVGITSWGVCARAKRPGVYTSTWPLYNWIASKIGSNALQMVQLGTP	PLMCRD ++ FVVVGITSWGVCARAKRPGVYT+TW YL+WIASKIG NAL ++Q TP
Maus-Akrosin: 244	PLMCRDNVDSPFVVVGITSWGVCARAKRPGVYTATWDYLDWIASKIGNALHLIQPATP	
	prolinreiche Region	
Eber-Akrosin: 301	PRPSTAPPV--RPPSVQTPVRPPWYFQRPPGPSQQGSRPRPPAPPAPPAPPPPPPPPP	P+T P V PPS +RPPWYFQ P P + P
Maus-Akrosin: 304	HPPTTRHPMVSFHPPS----LRPPWYFQHLPSRPLYLRPLRPLLHRPSSTQTSSSLMPLL	
Eber-Akrosin: 359	PPPPPPPPQQVS----AKPPQALSAFKRLQQLIEALKGTAF	395
	PP P P + + LSFA+RLQ+LIEALK +	
Maus-Akrosin: 360	SPPTPAQPASFTIATQHMRHRTLSFARRLQRLIEALKMRTY	401

Abbildung 42: **Alignment von Akrosin aus Maus und Schwein.** Es wurden die gesamten Sequenzen von murinem Akrosin und Akrosin aus *Sus scrofa* aligniert. Rot eingerahmt sind die AS der katalytischen Triade, grün das Aspartat am Grund der Substratbindungstasche. UniProt# murin: P23578; Schwein: P08001



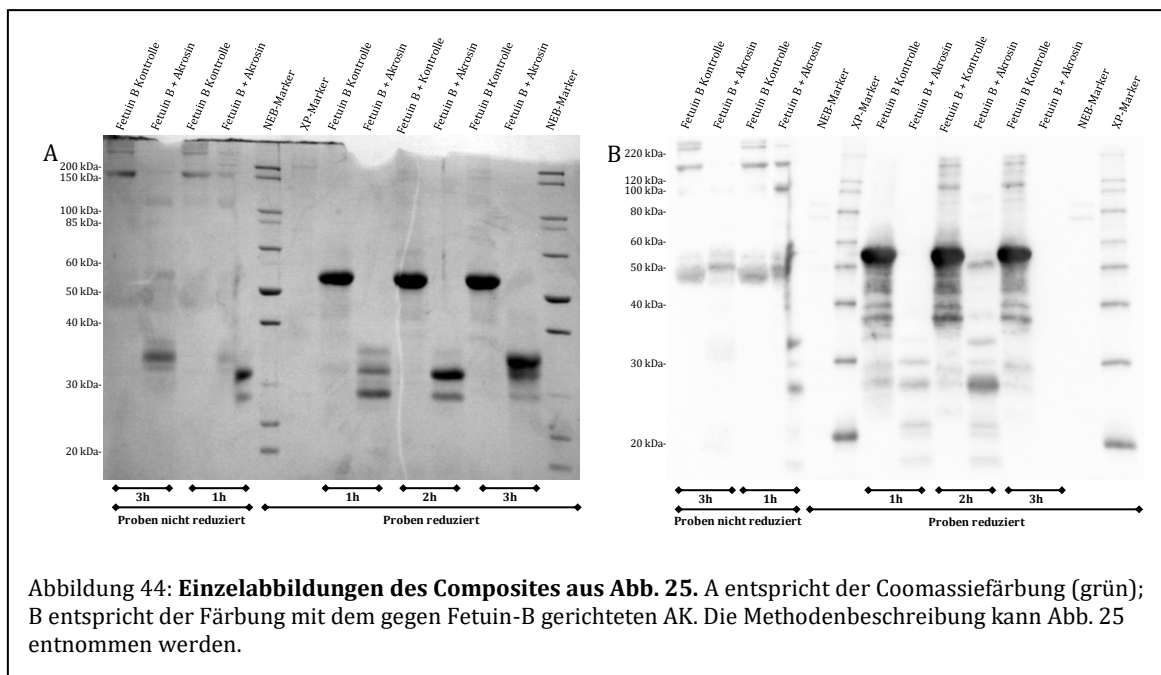


Abbildung 44: Einzelabbildungen des Composites aus Abb. 25. A entspricht der Coomassiefärbung (grün); B entspricht der Färbung mit dem gegen Fetuin-B gerichteten AK. Die Methodenbeschreibung kann Abb. 25 entnommen werden.

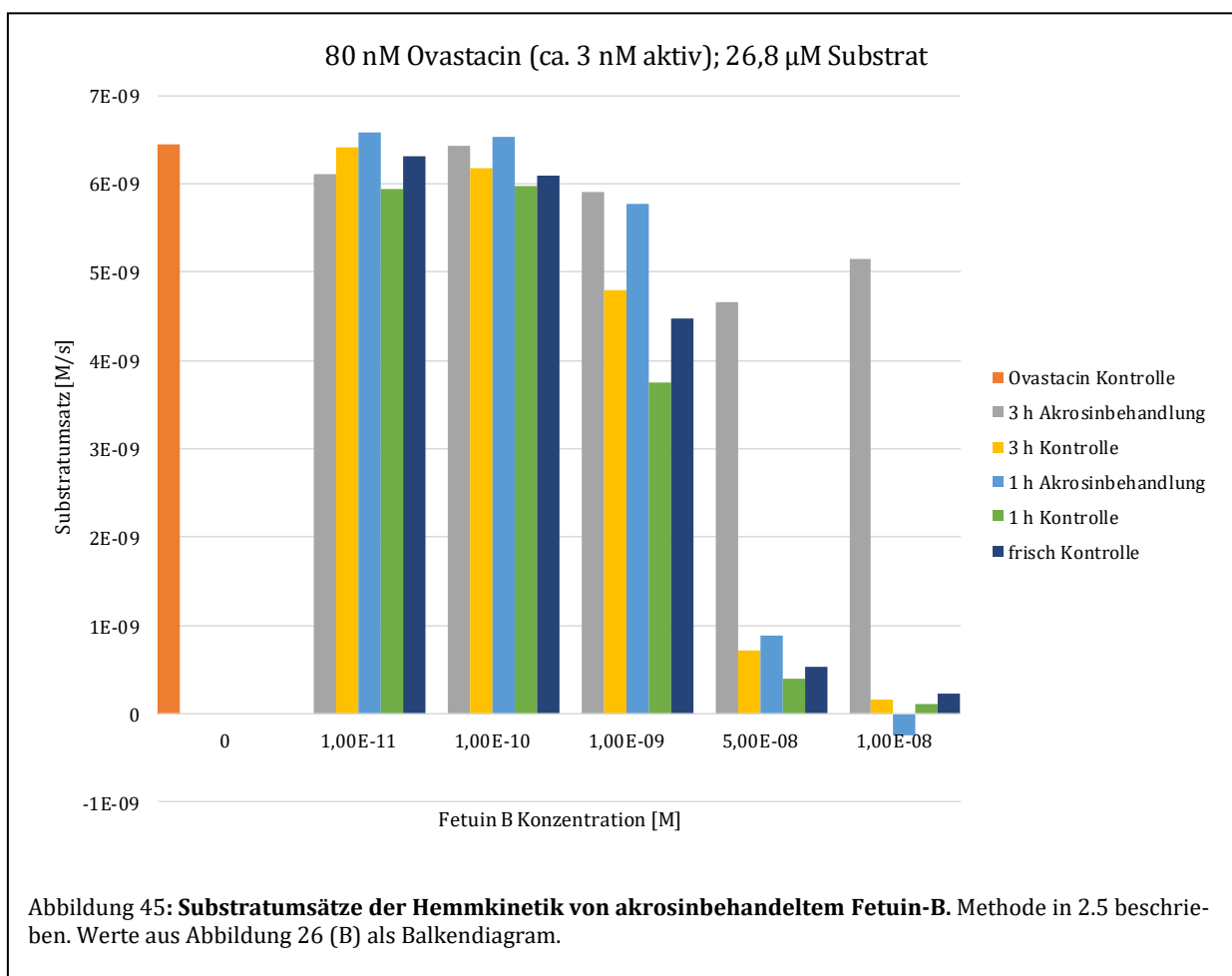
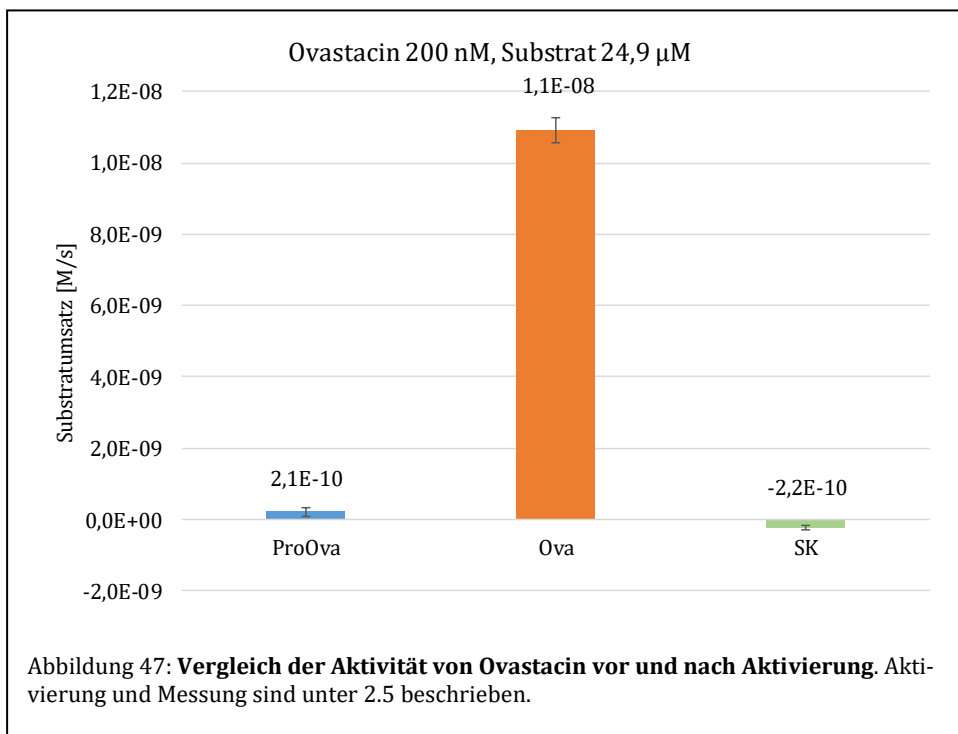
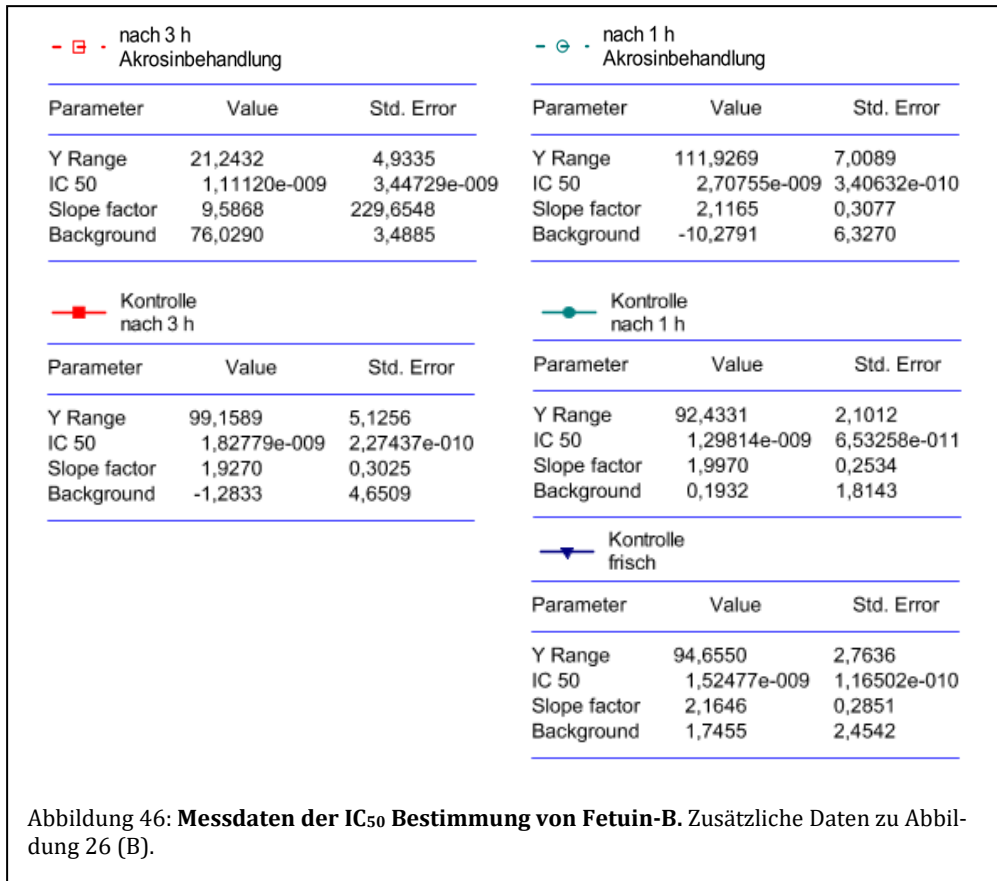


Abbildung 45: Substratumsätze der Hemmkinetik von akrosinbehandeltem Fetuin-B. Methode in 2.5 beschrieben. Werte aus Abbildung 26 (B) als Balkendiagramm.



6.2. DNS-, Proteinsequenzen und Plasmidkarten

```

1 ATGGGTATCATGGGAAGCCTGTGGCCTTGG ATATTAACATATGCTCTCCTTGCTAGGTTTG
1 M G I M G S L W P W I L T M L S L L G L
61 AGCATGGGAGCACCTCAGCATCCAGATGT TCTGGAGTCTGCAGTACCAGTGTTCAGAA
21 S M G A P S A S R C S G V C S T S V P E
121 GGCTTCACTCCTGAGGGAAGCCCGGTATTT CAGGACAAGGACATCCCCGCAATTAACCAA
41 G F T P E G S P V F O D K D I P A I N O
181 GGGCTCATCTCAGAGGAGACCCAGAAAGC AGCTTCCTGGTAGAAGGGGACATTATCCGG
61 G L I S E E T P E S S F L V E G D I I R
241 CCAAGCCCTTTCCGATTGTTGTCTAGTGACC AATAATAAATGGCCCAAGGGCGTTGGTGGC
81 P S P F R L L S V T N N K W P K G V G G
301 TTTGTGGAGATCCCCTTCTGCTTTCCAGA AAGTATGATGAACTCAGCCGCGGGTCAAT
101 F V E I P F L L S R K Y D E L S R R V I
361 ATGGATGCCTTTGCTGAGTTTGAACGTTTC ACATGCATCCGGTTTGTTCCTACCATGGT
121 M D A F A E F E R F T C I R F V A Y H G
421 CAGAGAGACTTTGTTTCCATTCTTCTATG GCGGGGTGTTTCTCTGGTGTGGGACGCAGT
141 O R D F V S I L P M A G C F S G R V I
481 GGAGGGATGCAGGTGGTGTCTTGGCACCC ACTTGTCTCCGGAAGGGCCGAGGCATTGTC
161 G G M O V V S L A P T C L R K G R G I V
541 CTACATGAGCTCATGCAGTACTTGGCTTC TGGCATGAGCATTACGGGCAGATCGGGAC
181 L H E I P F L L S R W H E H S R A D R V D
601 CGCTACATCCAAGTCAACTGGAACGAGATC CTCCCGGGCTTTGAAATCAACTTCATCAAG
201 R Y I O V N W N E I L P G F E I N F I K
661 TCACGAGTACCAATATGTTAGTTCCTAT GACTACTCATCTGTGATGCATTATGGGAGA
221 S R S T N M L V P Y D Y S S V M H Y R V I
721 TTTGCCCTCAGCTGGCGTGGGCAGCCACC ATCATAACACTCTGGACCTCCAGTGTTCAC
241 F A F S W R G O P T I I P L W T S S V H
781 ATTGGCCAGCGATGGAACCTGAGTACCTCA GATATCACCCGGGTCTGCAGGCTGTATAAC
261 I G O R W N L S T S D I T R V C R L Y N
841 TGCAGCCGGAGTGTCCCTGACTCCCACGGG AGAGGGTTTGAGGCCAGAGTGATGGAAGC
281 C S R S V P D S H G R G F E A O S D G S
901 AGCCTCACCCCTGCCTCTATATCACGTCTA CAAAGACTTCTCGAGGCACTGTCAGAGGAA
301 S L T P A S I S R L O R L L E A L S E E
961 TCTGGAAGCTCTGCCCTAGTGGCTCCAGG ACTGGAGGCCAGAGTATTGCCGGGCTTGGT
321 S G S S A P S G S R T G G O S I A G L G
1021 AACAGCCAGCAAGGATGGGAGCATCCTCCT CAGAGCACATTCAGTGTGGGAGCCTTGGCA
341 N S O O G W E H P P O S T F S V G A L A
1081 AGACCACCTCAGATGCTAGCCGATGCTTCA AAATCGGGGCCTGGAGCAGGTGCAGACAGC
361 R P P O M L A D A S K S G P G A G A D S
1141 TTGTCTCTAGAGCAGTTCCAGCTAGCCCAG GCCCCCACTGTACCTCTTGCTCTATTTCCA
381 L S L E O F O L A O A P T V P L A L F P
1201 GAAGCCAGAGACAAGCCAGCACCTATCCAA ATGTCCTTTGAGAGGCTAGCTCCACTTCCA
401 E A R D K P A P I O D A F E R L A P L P
1261 GGAGGCTGTGCACCTGGAAGTCACATTAGA GAGGTGCCAGAGACAGATCTTGAGCCAC
421 G G C A P G S H I R E V P R D R S W S H
1321 CCGCAGTTCGAAAAA
441 P O F E K

```

Abbildung 48: DNS- und Proteinsequenz des murinen Ovastacinkonstruktes. Signalpeptid; Propeptid; katalytische Domäne; C-Terminus; Strep-tag

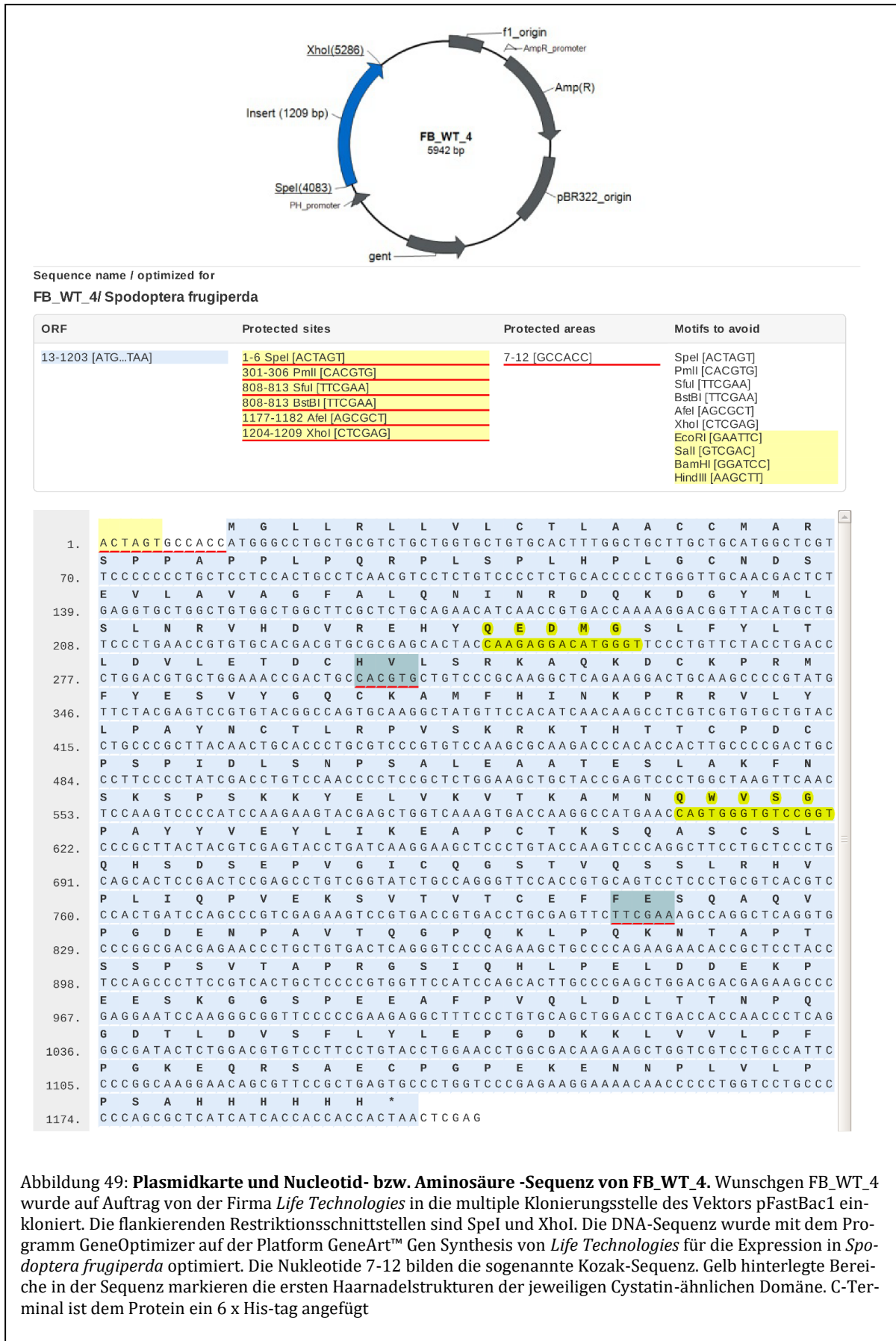
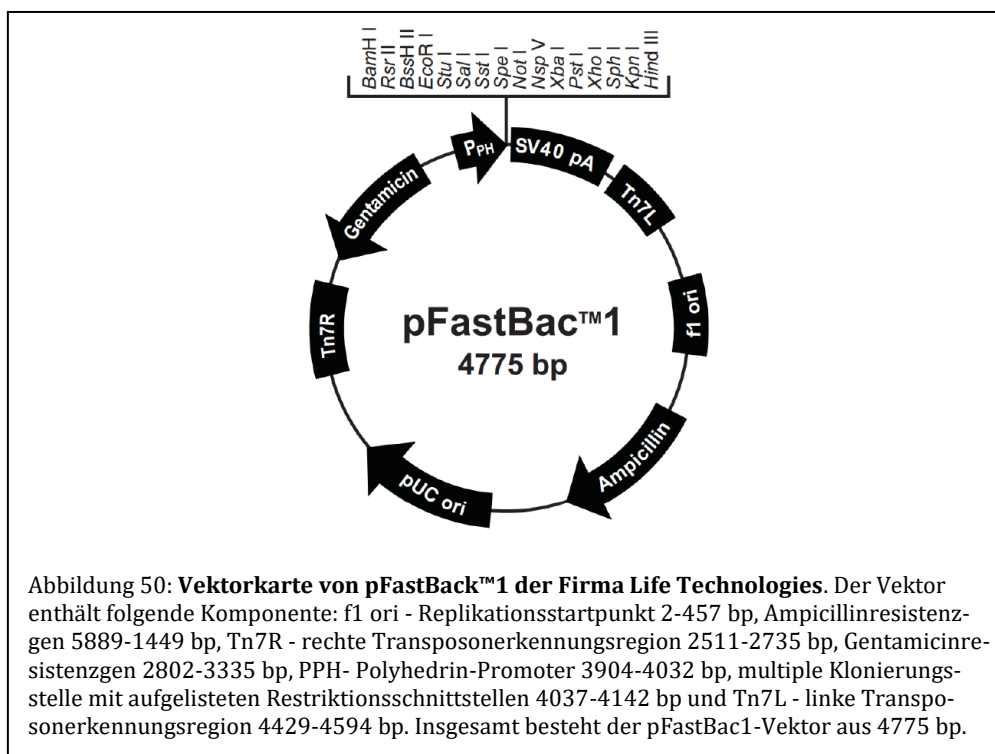


Abbildung 49: Plasmidkarte und Nucleotid- bzw. Aminosäure -Sequenz von FB_WT_4. Wunschen FB_WT_4 wurde auf Auftrag von der Firma *Life Technologies* in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pFastBac1 inkloniert. Die flankierenden Restriktionsschnittstellen sind SpeI und XhoI. Die DNA-Sequenz wurde mit dem Programm GeneOptimizer auf der Plattform GeneArt™ Gen Synthesis von *Life Technologies* für die Expression in *Spodoptera frugiperda* optimiert. Die Nukleotide 7-12 bilden die sogenannte Kozak-Sequenz. Gelb hinterlegte Bereiche in der Sequenz markieren die ersten Haarnadelstrukturen der jeweiligen Cystatin-ähnlichen Domäne. C-Terminal ist dem Protein ein 6 x His-tag angefügt

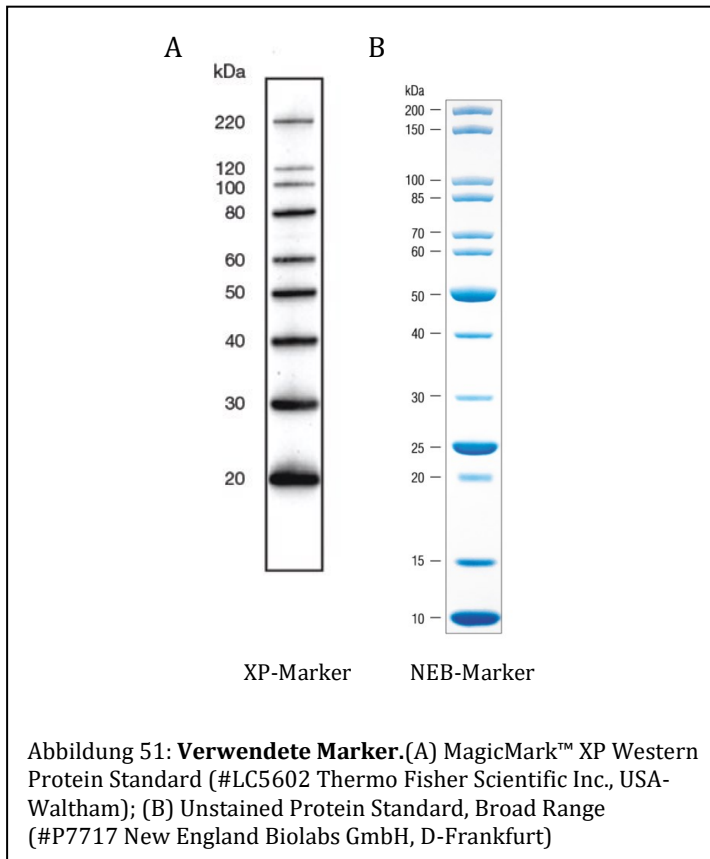


6.3. Proteinparameter

Tabelle 19: **Proteinparameter der verwendeten Proteine.** Werte wurden mit *ProtParam* (<https://web.expasy.org/protparam/>) bestimmt. Extinktionskoeffizient ($\epsilon_{280\text{nm}}$) unter der Annahme, dass alle Cys als Cystine vorliegen.

Parameter	rekombinantes murines Fetuin-B	gereinigtes β -Akrosin (Sus Scrofa)	rekombinantes murines Ovastacin
Länge (AS)	378	322	425
Gewicht	41,8 kDa (ca. 55 kDa im reduzierenden SDS-Gel)	35,7 kDa	46,5 kDa
$\epsilon_{280\text{nm}}$ [1/(M*cm)]	2413	80160	54930

6.4. Verwendete Proteinmarker



6.5. Verwendete Abkürzungen

Tabelle 20: Liste der verwendeten Abkürzungen.

α	anti
ACR	Gencode Akrosin
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
AstI	<i>Astacin like metalloendopeptidase</i> ; Gencode Ovastacin
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
COV	Cumulus Oozyten Verband
dest.	destilliert
DIC	Differentieller Interferenzkontrast
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
FVB	<i>Friend virus B</i>
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Emissionswellenlänge
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EX	Excitationswellenlänge
h	human
hCG	<i>Human chorionic gonadotropin</i>
hrp	Meerrettichperoxidase
HTF	<i>Human tubal fluid</i>
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration der halbmaximalen Hemmung
IG	Immunogold
IgG	Immunglobulin G
IP3	Inositoltriphosphat
IVF	<i>In vitro Fertilisation</i>
K _i	Dissoziationskonstante des Enzym/Inhibitor Komplexes
MMP	Magermilchpulver
Ni-NTA	Nickel-Nitriltriessigsäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerease chain reaction</i>
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen
PLC ζ	Phospholipase C zeta
PMSG	<i>pregnant mare's serum gonadotropin</i>
PVA	Polyvinylalkohol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
S	Signalpeptid
SAS1B	Ovastacin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLLP1	<i>Sperm Lysozyme-Like Protein 1</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TYH	Modifizierte Krebs-Ringer Lösung
tPA	<i>tissue(-type) plasminogen activator</i>
uPA	<i>urokinase(-type) plasminogen activator</i>
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
ZP	<i>Zona pellucida</i>
ZP1	<i>Zona pellucida</i> Protein 1
ZP2	<i>Zona pellucida</i> Protein 2
ZP2 _f	Prozessiertes <i>Zona pellucida</i> Protein 2
ZP3	<i>Zona pellucida</i> Protein 3
ZP4	<i>Zona pellucida</i> Protein 4
ZHE1	<i>Zebrafish hatching enzyme 1</i>
(-/)	<i>knockout</i>

Tabelle 21: Ein und Dreibuchstabencode der 20 kanonischen proteinogenen Aminosäuren.

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

6.6. Verwendete Einheiten

Tabelle 22: Liste der verwendeten Einheiten.

°C	Grad Celsius
μ	Mikro, 10 ⁻⁶
Da	Dalton
f	Femto (10 ⁻¹⁵)
g	Gramm
h	Stunde
k	Kilo, 10 ³
IU	International Units
l	Liter
m	Milli, 10 ⁻³ ; Meter
M	Molarität
min	Minute
mol	Mol (6,022 x 10 ²³ Teilchen)
n	Nano (10 ⁻⁹)
OD	Optische Dichte
Osm	Osmolarität
p	Piko (10 ⁻¹²)
s	Sekunde
V	Volt
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung [9,81 m/s ²]

6.7. Hersteller- / Firmenverzeichnis

Tabelle 23: Hersteller mit Kontaktadresse und Internetseite.

Hersteller	Kontakt	URL
AppliChem GmbH	Ottoweg 4, 64291 Darmstadt, D	www.applichem.com/home
BioMedical Instruments	Zur Schönen Aussicht 26, 07551 Zöllnitz, D	www.biomedical-instruments.de
Bio-Rad Laboratories GmbH	Heidemannstr. 164, 80939 München, D	www3.bio-rad.com
Biomers.net GmbH	Söflinger Str. 100, 89077 Ulm, D	www.biomers.net
BIOSYNTAN GmbH	Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin, D	www.biosyntan.de
Erithacus Software	Wilmington House, High Street, East Grinstead, West Sussex RH19 3AU, UK	www.erithacus.com
Dianova GmbH	Warburgstr. 45, 20354 Hamburg, D	www.dianova.com
GE Healthcare Inc.	Oskar-Schlemmer-Str. 11, 80807 München, D	www.gehealthcare.com
IBA Lifesciences GmbH	Rudolf-Wissell-Str. 28, 37079 Goettingen, D	www.iba-lifesciences.com
Kapa Biosystems, Inc.	200 Ballardvale Street, Wilmington, MA 01887, US	www.kapabiosystems.com
Life Technologies GmbH	Frankfurter Str. 129B, 64293 Darmstadt, D	www.lifetechnologies.com
Merck KGaA	Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt, D	www.merckmillipore.com
New England Biolabs	Brüningstr. 50, 65926 Frankfurt am Main, D	www.neb-online.de
Olympus Deutschland GmbH	Wendenstraße 14- 18, 20097 Hamburg, D	www.olympus-lifescience.com/de/
PHASE GmbH	Blücherstraße 2, 23564 Lübeck, D	www.phase-hl.com
Quanta bio	100 Cummings Center, Beverly, MA 01915, US	www.quantabio.com
Roche Diagnostics International AG	Sandhofer Straße 116, 68305 Mannheim, D	www.roche.de
Carl Roth GmbH & Co. KG	Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe, D	www.carlroth.com
Sarstedt AG	Postfach 1220, 51582 Nümbrecht, D	www.sarstedt.com
Sigma Aldrich GmbH	Eschenstr. 5, 82024 Taufkirchen, D	www.sigmaaldrich.com

Curriculum Vitae MICHAEL KUSKE

Persönliche Daten

GEBURTSDATUM / -ORT:

STAATSANGEHÖRIGKEIT:

ANSCHRIFT:

E-MAIL

Akademischer Werdegang

- | | | |
|-----------------------|--|--|
| Seit
OKT 2015 | | Promotion bei Prof. Dr. Walter Stöcker
am Institut für molekulare Physiologie
der JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ

Titel: „ <i>Das Zusammenspiel der Proteasen Akrosin und Ovastacin bei der Härtung der Zona pellucida</i> “ |
| SEP 2015 | | <i>Master of Science Biologie</i>
Abschlussarbeit: „ <i>Freisetzung und Aktivierung von Ovastacin im zellulären Kontext</i> “ |
| OKT 2013-
SEP 2015 | | Masterstudium der Biologie
an der JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ |
| SEP 2013 | | <i>Bachelor of Science Biologie</i>
Abschlussarbeit: „ <i>Immunologische Untersuchungen an Eberspermien</i> “ |
| OKT 2010-
SEP 2013 | | Bachelorstudium der Biologie
An der JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ |

Schulbildung

SEP 2001 - ALLGEMEINE HOCHSCHULREIFE
JUN 2010

SEP 1997 -
JUL 2001

Zusatzqualifikationen

-
- .

Tagungsbeiträge

JUL 2018 | Posterpräsentation im Rahmen der „*Conference on Mammalian Reproduction*“ in Lucca (Barga), Italien
organisiert von GORDON RESEARCH CONFRENCES
Titel “*Modes of ovastacin activation in vitro and in vivo*”

FEB 2018 | Vortrag im Rahmen der „*35rd Winter School on Proteinases and Inhibitors*“ in Tiers, Italien
der UNIVERSITÄT SALZBURG
Titel “*Modes of ovastacin activation in vitro and in vivo*”

FEB 2016 | Vortrag im Rahmen der „*33rd Winter School on Proteinases and Inhibitors*“ in Tiers, Italien
der *Universität Salzburg*
Titel “*The metalloprotease ovastacin is the main ligand for lens culinaris agglutinin in the cortical granules of the mammalian oocyte*”

Publikationen

- KÖRSCHGEN, H., KUSKE, M., KARMILIN, K., YIALLOUROS, I., BALBACH, M., FLOEHR, J., WACHTEN, D., JAHNEN-DECHENT, W., & STÖCKER, W. (2017). Intracellular activation of ovastacin mediates pre-fertilization hardening of the zona pellucida. *Molecular Human Reproduction*, 23(9), 607–616.
- KARMILIN, K., SCHMITZ, C., KUSKE, M., KÖRSCHGEN, H., OLF, M., MEYER, K., HILDEBRAND, A., FELTEN, M., FRIDRICH, S., YIALLOUROS, I., BECKER-PAULY, C., WEISKIRCHEN, R., JAHNEN-DECHENT, W., FLOEHR, J., & STÖCKER, W. (2019). Mammalian plasma fetuin-B is a selective inhibitor of ovastacin and meprin metalloproteinases. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12.
- GUEVARA, T., KÖRSCHGEN, H., CUPPARI, A., SCHMITZ, C., KUSKE, M., YIALLOUROS, I., FLOEHR, J., JAHNEN-DECHENT, W., STÖCKER, W., & GOMIS-RÜTH, F. X. (2019). The C-terminal region of human plasma fetuin-B is dispensable for the raised-elephant-trunk mechanism of inhibition of astacin metallopeptidases. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13.
- CUPPARI, A., KÖRSCHGEN, H., FAHRENKAMP, D., SCHMITZ, C., GUEVARA, T., KARMILIN, K., KUSKE, M., OLF, M., DIETZEL, E., YIALLOUROS, I., & SANCTIS, D. DE. (2019). Structure of mammalian plasma fetuin-B and its mechanism of selective metallopeptidase inhibition. *International Union of Crystallography*, 1999, 317–330.

Praktische Erfahrung

2015-2020 |

APRIL-JULI 2015 |

Danksagung

Herzlichen Dank an _____ für die Betreuung und die immer wertschätzende Unterstützung bei allen Problemen auf dem Weg zum Dokortitel.

Vielen Dank an _____ für die Übernahme des Zweitgutachtens und das gereinigte Akrosin, ohne dass die Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Großer Dank an _____ und _____ für die bereitgestellten Antikörper gegen die einzelnen *Zona* Proteine.

Vielen Dank an _____ für die fachliche und organisatorische Unterstützung.

Vielen Dank an _____ für Hilfe an kritischen Punkten meiner Arbeit und die richtigen Fragen zur richtigen Zeit, um mein Vorgehen noch weiter zu verbessern.

Vielen Dank an _____ und _____ für den fachlichen und methodischen Austausch.

Vielen Dank an _____ und _____ für die Übernahme so vieler essenzieller Laborarbeiten.

Vielen Dank an _____, _____, _____, _____, _____ und _____, sowie alle anderen die ich in meiner Zeit kennenlernen durfte, die es zu einem guten Gefühl gemacht haben, morgens ins Labor zu gehen.

Der größte Dank gebührt meiner Frau und meinem Sohn für die immerwährende, bedingungslose Unterstützung.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Diese Arbeit wurde bisher nicht veröffentlicht oder einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich habe keinen anderen Promotionsversuch unternommen.

, den _____

.....

(Michael Kuske)