

**Aktivierung und Freisetzung von Ovastacin
bei der Befruchtung des Säugetiereis,
sowie *Studien zur Lokalisation und Phylogenie***

Dissertation
zur Erlangung des Grades "Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Hagen Westphal
geboren am 11.04.1984 in Bernburg (Saale)

Mainz den 26. September 2016

Gutachter

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 01. Dezember 2016

„Life is a terminal disease, and it is sexually transmitted“
– **John Cleese** –

Abstract

The zinc-dependent astacin-metalloproteinase ovastacin is released in the course of the cortical reaction upon fertilization of the mammalian ovum. Once released ovastacin cleaves the *Zona pellucida* protein 2 (ZP2) which leads to the hardening of the *Zona pellucida*. On one hand this prevents the penetration by additional spermatozoa, on the other hand the hardened *Zona* is protecting the early embryo until implantation. The ovastacin-deficiency reduces the fecundity in mice significantly. A deficiency of its endogenous inhibitor – Fetuin-B – leads to female infertility. Thus ovastacin plays a crucial role in the proteolytic web of fertilization. There were no data available concerning the *in vivo* activation of ovastacin at the start of this project. Furthermore there was no function of its C-terminal domain published. The expression was published as oocyte-specific.

During this doctoral thesis I was able to reveal that ovastacin is already activated intracellularly and does not have to be cleaved upon release by a serine protease like other members of the astacin family of metalloproteineases. Furthermore a partial prefertilization cleavage of the *Zona pellucida* by ovastacin was confirmed. In this context the results demonstrated a retention of the C-terminal domain at the surface of the plasmalemma of the zygote. This supports a published receptor function of this enzyme.

The previously described oocyte-specific expression was extended by the thymus. *In silico* analysis regarding the phylogeny of ovastacin suggests the evolution of ovastacin from an amniotic hatching enzyme during the first appearance of the eutheria.

Zusammenfassung

Die Zink-abhängige Astacin-Metalloproteinase Ovastacin wird im Zuge der Kortikalreaktion als Folge der Befruchtung des Säugereies freigesetzt. Im Perivitellinraum prozessiert Ovastacin das *Zona Pellucida* Protein 2 (ZP2) und führt zu einer „Härtung“ der die Oocyte umgebenden *Zona pellucida*. Dies verhindert zum einen das Eindringen weiterer Spermien, zum anderen schützt die so gehärtete *Zona pellucida* den frühen Embryo bis zur Implantation im Uterus. Eine Ovastacin-Defizienz bewirkt eine signifikante Einschränkung der Fertilität in der Hausmaus. Die Defizienz des endogenen Ovastacin-Inhibitors – Fetuin-B – führt sogar zu einer vollständigen weiblichen Infertilität. Somit spielt Ovastacin eine zentrale Rolle im proteolytischen Netzwerk der Befruchtung.

Zu Beginn dieser Arbeit lagen noch keine Informationen zur *in vivo* Aktivierung von Ovastacin sowie zur Funktion der C-terminalen Domäne dieses Enzyms vor. Die Expression wurde als ausschließlich Oocyten-spezifisch beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ovastacin, zumindest teilweise, bereits intrazellulär prozessiert wird. Aktiv freigesetzt bedarf es keiner weiteren Prozessierung durch Serinproteasen, wie es im allgemeinen bei Metalloproteinasen der Astacin-Familie üblich ist. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass Ovastacin die *Zona pellucida* nicht nur nach der Befruchtung, sondern bereits davor partiell prozessiert.

In diesem Zusammenhang zeigte sich auch, dass die C-terminale Domäne nach der Fertilisation am Plasmalemma der Zygote verbleibt. Dies steht im Einklang mit einer publizierten Rezeptorfunktion dieses Proteins.

Die ursprünglich als Oocyten-spezifisch beschriebene Expression konnte um die Expression in Thymusgewebe erweitert werden.

In silico Untersuchungen zur Phylogenie von Ovastacin konnten nahelegen, dass Ovastacin erst im Zuge der Evolution der Eutheria, wahrscheinlich aus einem amniotischen *hatching* Enzym, evolvierte.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	v
Zusammenfassung	vii
Abbildungsverzeichnis	xiii
Tabellenverzeichnis	xv
1. Einleitung	1
1.1. Befruchtungsbiologie	2
1.1.1. Gametogenese	2
1.1.2. Zona pellucida	4
1.1.3. Kortikalgranula	5
1.1.4. Ei-Spermium-Interaktion	7
1.2. Proteasen	9
1.2.1. Die Astacin-Familie	10
1.3. Ovastacin	11
1.3.1. Struktur	12
1.3.2. Funktion	13
1.4. Fragestellung	16
2. Material und Methoden	17
2.1. Tiermaterial	17
2.2. Antikörper	18
2.3. Chemikalien	18
2.4. Standardpuffer	19
2.5. Proteinbiochemie	19
2.5.1. Photometrische Konzentrationsbestimmung	19
2.5.2. Proteinfällung mit Trichloressigsäure	20
2.5.3. Konzentrierung und Umpufferung von Proteinlösungen	20
2.5.4. Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	21
2.5.5. Western-Blot mit Immunodetektion	22
2.5.6. Antikörper- <i>Stripping</i>	23
2.5.7. Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Brillant-Blau	23
2.5.8. Färbung von Polyacrylamidgelen mit Silbernitrat	24
2.5.9. Protein G Affinitätschromatographie	24

Inhaltsverzeichnis

2.5.10. Sequenzielle Antikörper Präabsorbtion	24
2.6. Proteinexpression und -reinigung	25
2.6.1. Baculovirus Expressionssystem	25
2.6.2. Proteinreinigung	26
2.7. Zellkultur muriner Keimzellen und Embryonen	27
2.7.1. Gewinnung und Kultur muriner Gameten	27
2.7.2. <i>In vitro</i> -Fertilisation	28
2.7.3. Gewinnung von Zygoten	29
2.7.4. Kultivierung von Präimplantationsembryonen	29
2.7.5. <i>Zona pellucida</i> Verdau	30
2.7.6. Aktivierung von Oocyten	31
2.7.7. Präparation von Oocyten und Embryonen für SDS-PAGE	31
2.8. Immunhistologie	31
2.8.1. Immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten	31
2.8.2. Immunhistologische Färbung von Oocyten und Embryonen	32
2.8.3. Dekonvolution	33
2.9. Gentechnik	34
2.9.1. Isolation und reverse Transkription von RNA	34
2.9.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	34
2.9.3. Polymerase-Kettenreaktion	34
2.9.4. Agarose Gelelektrophorese	36
2.10. Bioinformatik	36
2.10.1. Datenbankanalyse nach Ovastacinsequenzen anderer Säuge- tiere	36
2.10.2. Sequenz-Alignment der mammalen Ovastacine	36
2.10.3. Erstellung molekularer Stammbäume	36
3. Ergebnisse	39
3.1. Funktionelle Analyse von Ovastacin	39
3.1.1. Freisetzung und Aktivierung von Ovastacin	40
3.1.2. Lokalisation und Verbleib von Ovastacin nach Befruchtung	44
3.1.3. Ursachen der Subfertilität Ovastacin-defizienter Mäuse	53
3.2. Extraovariale Expression	56
3.3. Phylogenie von Ovastacin	59
4. Diskussion	63
4.1. Aktivierung und Freisetzung von Ovastacin	63
4.2. Ovastacin nach der Befruchtung	64
4.3. Subfertilität Ovastacin-defizienter Mäuse	66
4.4. Extraovariale Expression des Ovastacins	68
4.5. Phylogenie des Ovastacins	68
4.6. Ausblick	69

A. Abkürzungen	85
B. Hersteller- und Firmenverzeichnis	91
C. DNA-, RNA- und Proteinsequenzen	93
D. Proteinparameter	97
E. Systemspezifikationen und Einstellungen	99
F. Weitere Daten	101

Abbildungsverzeichnis

1.1. Titeltseite der Publikation Karl Ernst von Baers zur Entdeckung des Säugetiereies	1
1.2. Darstellung von Spermien (aus VAN LEEUWENHOEK, 1677)	1
1.3. Schematischer Aufbau eines murinen Spermiums	2
1.4. Schematischer Überblick über die Folliculogenese	3
1.5. Zona pellucida Filament Modell	4
1.6. Schematischer Aufbau der <i>Zona pellucida</i> Proteine	5
1.7. Oberflächenstruktur der <i>Zona pellucida</i>	7
1.8. Schematischer Überblick über die Systematik der Proteasen	10
1.9. Schematische Darstellung des Katalysemechanismus	11
1.10. Homologiemodell der Protease-Domäne des murinen Ovastacins	12
1.11. Modell der <i>Zona pellucida</i> Bindung	14
3.1. Ovastacin in Oocyten	39
3.2. Prozessierung der <i>Zona pellucida</i> durch Ovastacin	41
3.3. Ovastacin in Oocyten	42
3.4. Immunhistologie von Oocyten/Embryonen 1 (anti-Propeptid Antikörper)	45
3.5. Immunhistologie von Oocyten/Embryonen 2 (anti-Ovastacin Antikörper)	46
3.6. Immunhistologie von Oocyten/Embryonen 3 (anti-Proovastacin Antikörper)	47
3.7. Erkennung von Ovastacin durch LCA in Oocyten	48
3.8. Reinigung Ovastacin C-Terminus und Antikörperpräabsorption	49
3.9. Immunhistologie von Oocyten/Embryonen 4 (anti-Proovastacin Antikörper)	50
3.10. Immunhistologie von Oocyten/Embryonen 5 (anti-„Proovastacin“ Antikörper)	51
3.11. Immunhistologie von Oocyten/Embryonen 6 (anti-„Proovastacin“ Antikörper)	52
3.12. Wurfgröße Wiltyp und Ovastacin-defizienter Mäuse	53
3.13. Untersuchung der <i>Zona pellucida</i> Härtung in Ovastacin-defizienten Mäusen	54
3.14. Befruchtungserfolg und Embryoentwicklung	55
3.15. Expressionsanalyse von Ovastacin in murinen Geweben	56
3.16. Antikörperpräabsorption 2	57

Abbildungsverzeichnis

3.17. Immunhistologie des Thymus	58
3.18. Konsensusbaum der C-terminalen Domäne	61
4.1. Vorgeschlagenes Modell zum Verbleib und den Interaktionen von Ovastacin	65
4.2. Vorgeschlagenes Modell der vorzeitigen Freisetzung und Aktivität von Ovastacin	67
C.1. DNA- und Proteinsequenz des C-Terminus Konstruktes	93
C.2. DNA- und Proteinsequenz des Ovastacin Konstruktes	94
C.3. DNA- und Proteinsequenz des Fetuin-B Konstruktes	95
C.4. Ovastacin mRNA aus <i>Mus musculus</i>	96
F.1. Ovastacin in Oocyten	101
F.2. Immunhistologie von Embryonen 7 (anti-„Proovastacin“ Antikörper)	102
F.3. Immunhistologie von Oocyten/Embryonen 8 (anti-C-Terminus An- tikörper)	103
F.4. Immunhistologie von Oocyten/Embryonen 9	104
F.5. Immunhistologie des Thymus 2	105
F.6. Alignment der C-terminalen Domäne Ovastacins	106
F.6. Alignment der C-terminalen Domäne Ovastacins (Fortsetzung 1) . .	107
F.6. Alignment der C-terminalen Domäne Ovastacins (Fortsetzung 2) . .	108
F.6. Alignment der C-terminalen Domäne Ovastacins (Fortsetzung 3) . .	109
F.7. Homologiematrix der katalytischen Domäne Ovastacins	110
F.8. Homologiematrix der C-terminalen Domäne Ovastacins	111
F.9. Homologiematrix der katalytischen und C-terminalen Domäne Ova- stacins	112

Tabellenverzeichnis

2.1. Sequenzen der Primer zur Genotypisierung	17
2.2. PCR-Programm der Genotypisierung	17
2.3. Verwendete Antikörper	18
2.4. Zusammensetzung der Phosphatpuffer	19
2.5. Zusammensetzung der Tris-Puffer	19
2.6. Zusammensetzung der Puffer für SDS-PAGE	21
2.7. Zusammensetzung der Polyacrylamidgele	21
2.8. Puffer für Western-Blotting	22
2.9. Zusammensetzung des <i>Stripping</i> -Puffers	23
2.10. Lösungen für die Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau	23
2.11. Lösungen für die Färbung mit Silbernitrat	24
2.12. Zusammensetzung der Puffer für die Proteinreinigung	26
2.13. Zeitplan der Kultur muriner Keimzellen	27
2.14. Zusammensetzung des TYH-Mediums	28
2.15. Zusammensetzung des HTF-Mediums	29
2.16. Zusammensetzung des M16-Mediums	30
2.17. Immunhistologische Färbung an Gewebeschnitten	32
2.18. Immunhistologische Färbung an Oocyten und Embryonen	33
2.19. Sequenzen der Primer zum Nachweis von Ovastacin	35
2.20. PCR-Programm zum Nachweis von Ovastacin	35
2.21. Zusammensetzung des TAE-Puffers	36
3.1. Ovulation nach Hormonbehandlung	53
3.2. Verfügbare Ovastacin Sequenzen	59
3.2. Verfügbare Ovastacin Sequenzen	60
A.1. Drei- und Einbuchstabencode der Aminosäuren	85
A.2. Verwendete Einheiten	86
A.3. Verwendete Abkürzungen	87
A.3. Verwendete Abkürzungen	88
B.1. Angaben zu den Herstellern und Firmen	91
D.1. Parameter der verwendeten Proteine	97
E.1. Relevante Systemspezifikationen Leica DM600B	99
E.2. Einstellung Huygens Remote Manager	100

1. Einleitung

Die Befruchtung oder auch Fertilisation bezeichnet die Verschmelzung weiblicher und männlicher Geschlechtszellen (Gameten) zur Bildung der diploiden Zygote. Obwohl dieser Prozess grundlegend für die Fortpflanzung auch der Säugetiere und somit des Menschen ist, sind die Mechanismen, die zur Verschmelzung (Plasmogamie) von Ei und Spermium führen noch nicht vollständig verstanden. Bereits in der griechischen Antike wurden Modelle aufgestellt, um zu erklären wie ein kompletter Mensch nach dem Geschlechtsverkehr entsteht. Hippocrates (460 bis 370 v. Chr.) folgerte, dass sowohl Mann als auch Frau Samen beitragen und diese vermischt im Uterus den Embryo formen (rezensiert von CLIFT UND SCHUH, 2013). Mehr als 2000 Jahre später gelang es Antoni van Leeuwenhoek erstmals mittels des von ihm erfundenen Mikroskops Spermien nachzuweisen (VAN LEEUWENHOEK, 1677). Dies war die wissenschaftliche Basis für die von Nicolas Hartsoeker

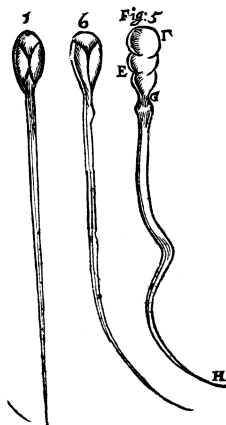


Abbildung 1.2.: Darstellung von Spermien (aus VAN LEEUWENHOEK, 1677)

(1656 - 1725 n.Chr.) veröffentlichte Darstellung des im Spermium präformierten Homunculus. Trotz der Befruchtungsversuche von Lazzaro Spallanzani (1729 - 1799 n.Chr.), welche die Grundlage der Befruchtungslehre bilden, gelang Karl Ernst von Baer erst 150 Jahre nach den Spermien der erste Nachweis des mammalen Ovums (VON BAER, 1827). Der Nachweis der eigentlichen Interaktion von Ei und Spermium bei Säugetieren (BARRY, 1843; BISCHOFF, 1854) war Voraussetzung für die Etablierung der Befruchtungstheorie (HERTWIG, 1876; WUNDT, 1873). Auch wenn bis heute das Verständnis der Befruchtung um viele Aspekte erweitert wurde, so sind bislang vor allem die Details der Ei-Spermium-Interaktion nicht abschließend geklärt oder werden kontrovers diskutiert (rezensiert von AVELLA ET AL., 2013; CLARK, 2011). Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Metalloendopeptidase Ovastacin, welche - im Zuge der Befruchtung freigesetzt - Einfluss auf die Fruchtbarkeit hat.

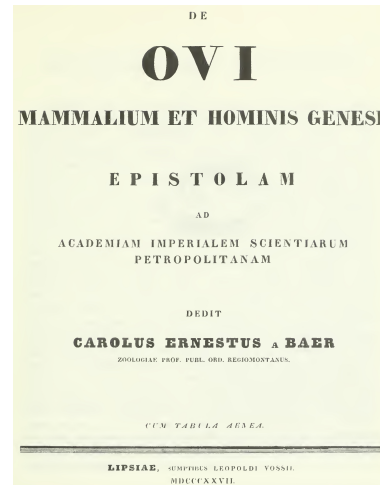


Abbildung 1.1.: Titeltseite der Publikation Karl Ernst von Baers zur Entdeckung des Säugetiereies (1827)

1. Einleitung

1.1. Befruchtungsbiologie

Im Allgemeinen wird die Befruchtung in drei Abschnitte gegliedert (siehe Abschnitt 1.1.4). Zunächst erfolgt eine taxonspezifische Erkennung der Gameten, worauf die Penetration des Eimantels durch das Spermium und die Fusion der Gameten folgt. Nach der eigentlichen Fertilisation wird der Polyspermieblock etabliert. Die im Folgenden beschriebenen Aspekte der Befruchtungsbiologie beziehen sich auf plazentale Säugetiere. Da die Datenlage in den basalen Säugergruppen und bei anderen Amnioten als mangelhaft zu bezeichnen ist (DUNBAR UND O'RAND, 1991), sind interspezifische Vergleiche als fragwürdig anzusehen. Die hier beschriebenen Sachverhalte legen soweit möglich den Fokus auf die Rodentia und im speziellen auf die Hausmaus (*Mus musculus*) als Modellorganismus.

1.1.1. Gametogenese

Zum besseren Verständnis der Befruchtung und der Funktion des Ovastacins werden in diesem Abschnitt die Grundzüge der Gametogenese erläutert. Sowohl männliche als auch weibliche Gameten stammen von totipotenten, geschlechtlich noch undifferenzierten, diploiden Urkeimzellen ab. Diese sind evolutionär offenbar keinem Keimblatt zuzuordnen. Sie wandern während der Ontogenese aktiv in die Genitalleiste, aus welcher sich später die Gonadenanlage differenziert. Auch diese aus Kortex und Medulla bestehende Anlage ist sexuell noch indifferent. Erst durch hormonelle Regulation differenziert sich aus dem Mark der Hoden und aus dem Kortex das Ovar.

Spermatogenese

Die reifen Hoden sind von den *Tubuli seminifera* durchzogen und münden mit beiden Enden in die Ausführgänge zum *Ductus deferens*. Deren Epithel wird von verzweigten Sertolizellen durchzogen, welche die Zellen der Spermatogenese schützen und versorgen. Zunächst teilen sich die diploiden Spermatogonien über verschiedene Spermatogon-

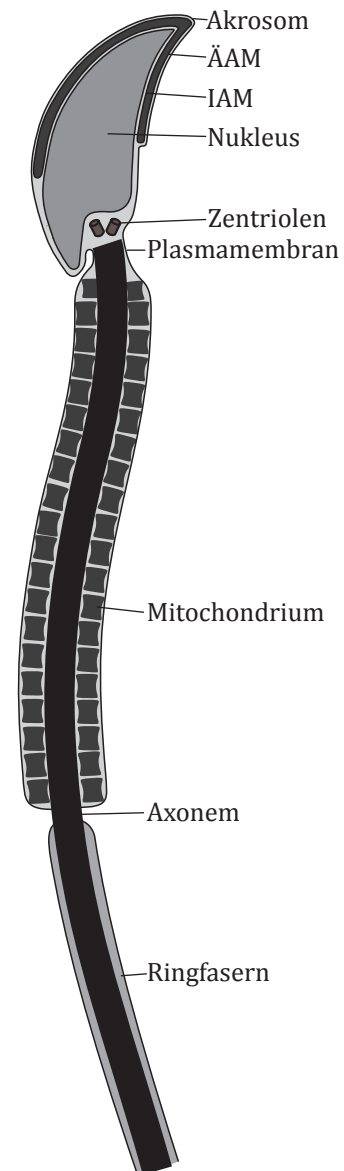


Abbildung 1.3.: **Schematischer Aufbau eines murinen Spermiums** IAM = Innere akrosomale Membran; ÄAM = Äußere akrosomale Membran

nientypen in die Spermatocten I. Ordnung. Während der Meiose I werden aus diesen Spermatocten II. Ordnung und im zweiten Teilungsschritt Spermatocten. Diese differenzieren sich zu den funktionsfähigen Spermien mit Geißel und Akrosom (siehe Abbildung 1.3). Bei dem Akrosom handelt es sich um ein vom Golgi-Apparat abgeleitetes Vesikel. Dessen Exocytose, die Akrosomenreaktion, setzt während der Fertilisation Enzyme frei und legt Bindungstellen auf der inneren Akrosomalen Membran für die Interaktion mit der Oocyte offen (siehe Abschnitt 1.1.4).

Oogenese

Nach der Geburt teilen sich die aus den Urkeimzellen hervorgegangenen Oogonien nicht mehr und verharren von einem dünnen einschichtigen Follikelepithel umgeben, im Diplotän der Prophase I als Primordialfollikel. Erst mit der Menarche und der vermehrten Sekretion des Gonadotropin-*Releasing*-Hormones (GnRH) aus dem Hypothalamus setzt die Ausschüttung des follikelstimulierenden Hormones (FSH) und des luteinisierenden Hormones (LH) aus der Adenohypophyse ein.

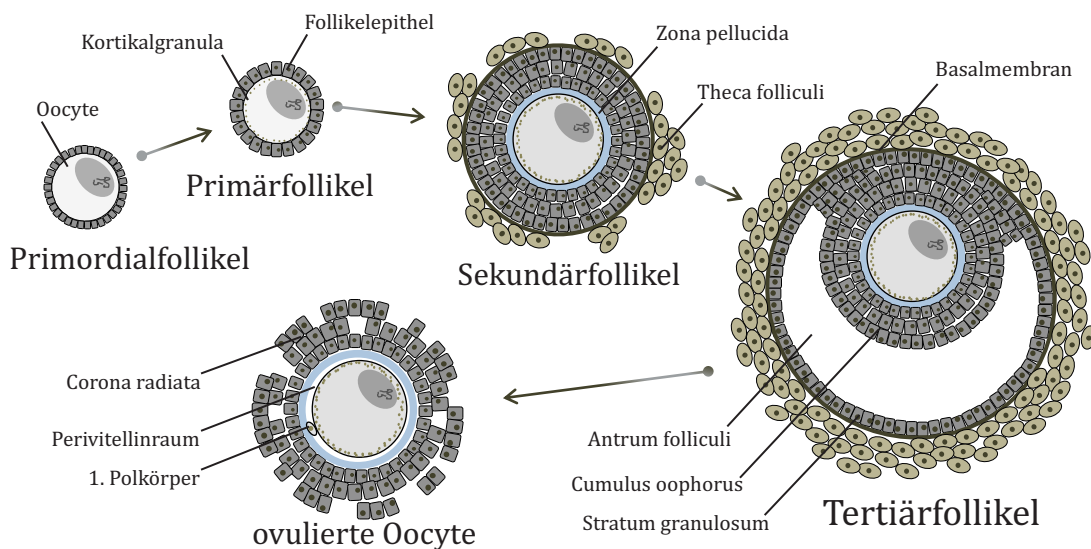


Abbildung 1.4.: Schematischer Überblick über die Folliculogenese ohne Graaf-Follikel

Die so stimulierte Östrogenbildung in den Ovarien bewirkt die Follikelreifung. Zunächst wird das Follikelepithel hochprismatisch. In diesem Primärfollikel beginnt auch die Synthese der ersten Kortikalgranula (siehe Abbildung 1.4). In der weiteren Reifung wird das Follikelepithel mehrschichtig, man spricht vom Sekundärfollikel. Zu diesem Zeitpunkt wird zwischen Oocyte und Follikelepithel eine Schicht aus Glykoproteinen, die *Zona pellucida* (siehe Abschnitt 1.1.2), sichtbar. Weiterhin bilden die Granulosazellen des Follikelepithels Cytoplasmafortsätze mit *gap-junctions* zur Oocyte um deren Versorgung sicherzustellen. Außerhalb der Basalmembran organisiert sich die hormonproduzierende *Theca folliculi*. Durch weiteres

1. Einleitung

Wachstum entsteht ein flüssigkeitsgefüllter Hohlraum, das *Antrum folliculi*. Es wird nun von einem Tertiärfollikel gesprochen. Während der weiteren Reifung löst sich die Oocyte samt dem sie umgebenden *Cumulus oophorus* und schwimmt frei in der Follikelflüssigkeit. Dieses Stadium, der Graaf-Follikel, wird von nur sehr wenigen Follikeln erreicht. Zu diesem Zeitpunkt beendet die Oocyte auch die Meiose I und beginnt mit der 2. Reifeteilung. Der hierbei entstandene Polkörper verbleibt zwischen Oolemma und der *Zona pellucida* im Perivitellinraum (PVR). Ab der Transition von Primär- zu Sekundärfollikel produzieren die Oocyten kontinuierlich die Kortikalgranula (siehe Abschnitt 1.1.3), welche in den Kortex der Oocyte transloziert werden. Durch die verstärkte Abgabe des LH kommt es zur Ovulation und die Oocyte gelangt über das Infundibulum zur Ampulla des Oviduktes.

1.1.2. Zona pellucida

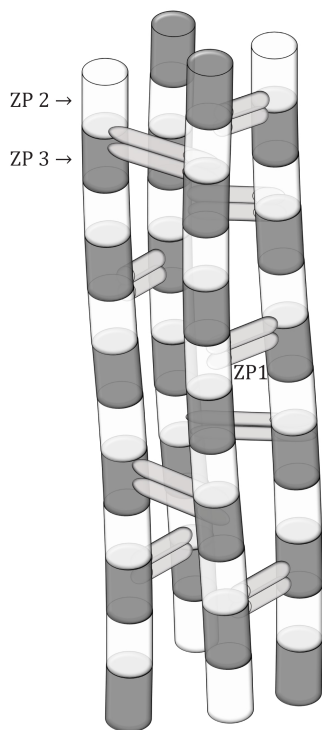


Abbildung 1.5.: **Zona pellucida Filament Modell (nach WASSARMAN, 1988)**

Bei der *Zona pellucida* handelt es sich um eine die Oocyte umgebende extrazelluläre Matrix aus meist N-glykosylierten Glykoproteinen (BOJA ET AL., 2003). Mit ca. 3,5 ng macht sie etwa 15 % des murinen Oocytenproteoms aus (WASSARMAN ET AL., 2004). Während der Befruchtung binden und penetrieren Spermien diese Matrix. Sie schützt das Ei beziehungsweise den Embryo bis zur Implantation. Mutationen, die den Verlust der *Zona pellucida* bewirken, führen aufgrund von Resorption des frühen Embryos zu Infertilität (rezensiert von AVELLA ET AL., 2013). Je nach Spezies besteht die *Zona pellucida* aus bis zu 4 verschiedenen Proteinen (ZP1, ZP2, ZP3 und ZP4). Mindestens die *zona pellucida* Proteine 2 und 3 (ZP2 & ZP3) sind in allen Spezies vorhanden. ZP1 und ZP4 sind Paraloge und stammen von ZPX ab (CONNER UND HUGHES, 2003). Beim Menschen sind alle 4 Proteine vorhanden (LEFIEVRE ET AL., 2004), während in der Hausmaus ZP4 als Pseudogen transkribiert aber nicht translatiert wird. Der strukturelle Aufbau der *Zona pellucida*-Proteine ist schematisch in Abbildung 1.6 dargestellt. Der in ZP1 und ZP4 vorkommenden Trefoil Domäne konnte bislang noch keine Funktion zugeordnet werden (SOMMER ET AL., 1999; BORK, 1993). Zunächst werden alle Proteine monomer exprimiert und exocytet. Jedes der ZP-Proteine wird während der Sekretion, aber vor der Assemblierung zur *Zona pellucida* durch Furin von seiner Transmembrandomäne getrennt (JOVINE ET AL., 2004). Von der Membran gelöst, wird es in seine endgültige Form überführt. In der reifen *Zona pellucida* liegt ZP1 über intermolekulare Disulfidbrücken verknüpft als Dimer vor (BLEIL UND WASS-

ARMAN, 1980). Die ZP Domäne der *Zona pellucida* Proteine 2 und 3 erlaubt diesen nicht kovalent zu langen Filamenten zu polymerisieren (JOVINE ET AL., 2002). Diese sind, wie in Abbildung 1.5 dargestellt, über die ZP1-Dimere verlinkt (GREVE UND WASSARMAN, 1985).

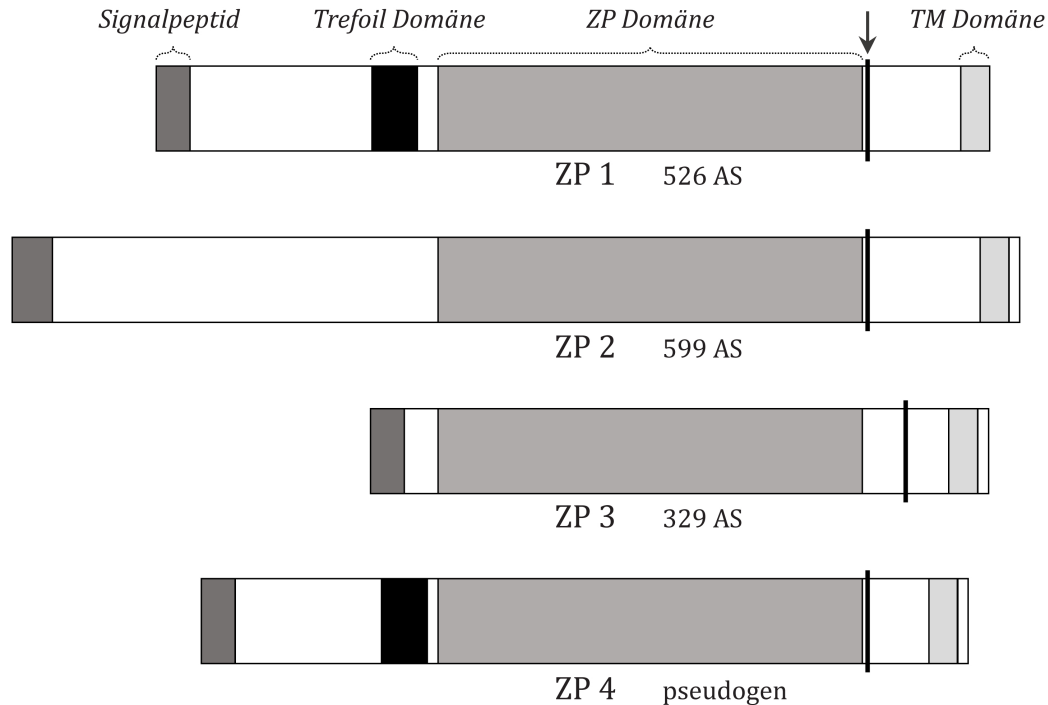


Abbildung 1.6.: **Schematischer Aufbau der *Zona pellucida* Proteine** Darstellung nach CONNER ET AL. (2005), mit Daten für die Hausmaus aus AVELLA ET AL. (2013); ↓ = Furinschnittstelle (Abtrennung der TM-Domäne)

Die Funktion der *Zona pellucida* liegt zum einen im mechanischen Schutz der Oocyte und des frühen Embryos, zum anderen spielt sie eine wichtige Rolle bei der Ei-Spermium-Interaktion (siehe Abschnitt 1.1.4).

Eine ZP1 Defizienz führt zu einer instabilen, lockeren *Zona pellucida* und beeinträchtigt somit aufgrund des reduzierten mechanischen Schutzes die Fertilität (RANKIN ET AL., 1999). Eine ZP2 oder ZP3 Defizienz hingegen führt zu einem vollständigen Verlust der *Zona pellucida*, welcher zu einer Resorption des frühen Embryos und somit zu Infertilität führt (RANKIN ET AL., 2001; LIU ET AL., 1996).

1.1.3. Kortikalgranula

Diese im Kortex von Oocyten lokalisierten Vesikel wurden 1956 erstmals in Säugtieren beschrieben (AUSTIN, 1956). Sie haben je nach Spezies einen Durchmesser von 0,2 – 0,6 μm (CRAN, 1989) und unterscheiden sich von den meisten anderen reguliert sekretierten Organellen dadurch, dass sie - einmal freigesetzt - nicht

1. Einleitung

erneuert werden (rezensiert von LIU, 2011). Da sie mit ca. 20 ng Protein nur ca. 2,5 – 5 % der Oocyte (Hausmaus) ausmachen (GROSS ET AL., 2000), sind diese Organellen sehr schwer zu untersuchen.

Aufgrund ihrer Eigenschaften im Elektronenmikroskop können zwei Populationen unterschieden werden (HINDUJA ET AL., 1990), welche eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber pathogenen Aktivatoren aufweisen (RAZ ET AL., 1998). Ob es sich um funktionelle Unterschiede handelt oder nur unterschiedliche Reifegrade ist unklar. Sie sind frühestens im unilamellaren Follikel nachweisbar (SZOLLOSI, 1967) und werden kontinuierlich während der Folliculogenese synthetisiert und in den Kortex transloziert (DUCIBELLA ET AL., 1994).

Nicht nur, dass die Kortikalgranula nicht mit dem Oolemma assoziiert sind (WESSEL ET AL., 2001), sondern auch das Vorhandensein einer Kortikalgranula freien Domäne (KGFD) sind Besonderheiten der Oocyten der Rodentia (OKADA ET AL., 1986; DUCIBELLA ET AL., 1988). Diese KGFD entsteht zuerst in der Meiose I im Bereich des Spindelapparates. Hierfür werden die Kortikalgranula sowohl teilweise exocytiert als auch umverteilt (OKADA ET AL., 1986). Hierbei werden wohl nur bestimmte Populationen der Kortikalgranula ausschließlich in der Abschnürfuge des 1. Polkörperchens freigesetzt (LIU ET AL., 2003; DUCIBELLA ET AL., 1988). Die Neuentstehung dieses Kortikalgranula freien Bereiches während der Meiose II ist ausschließlich auf eine Chromatin vermittelte Umverteilung zurückzuführen (DENG ET AL., 2003). Diese Freisetzung vor der Befruchtung führt wahrscheinlich partiell zu physiko-chemischen Veränderungen der *Zona pellucida* (siehe Abschnitt 1.1.4) um das Eindringen des Spermiums im Bereich des maternalen Pronucleus zu verhindern (DENG ET AL., 2003; JOHNSON ET AL., 1975). Allgemein wird angenommen, dass diese Veränderungen nur „starken“ Spermien die Befruchtung erlauben (rezensiert von LIU, 2011). Nach dieser vorzeitigen Exocytose und Umverteilung bleiben der Oocyte noch ca. 4000 – 6000 Kortikalgranula (DUCIBELLA ET AL., 1988), welche ihren Inhalt im Zuge der Befruchtung in der Kortikalreaktion ausschütten (siehe Abschnitt 1.1.4).

Der genaue Inhalt der Granula ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird von bis zu 14 verschiedenen Proteinen ausgegangen (rezensiert von LIU, 2011), von denen zumindest einige glykosyliert sind, da sich die Granula beziehungsweise das spätere Exsudat mit Lectinen (u.a. *Lens culinaris* Agglutinin (LCA)) färben lässt (DUCIBELLA ET AL., 1988).

Zunächst konnte eine trypsinähnliche Proteaseaktivität im Exsudat der Kortikalgranula gezeigt werden (GWATKIN ET AL., 1973; TAWIA UND LOPATA, 1992), welche die Härtung der *Zona pellucida* nach der Befruchtung (siehe Abschnitt 1.1.4) bewirkt. Erst später konnte gezeigt werden, dass es sich bei dieser Protease nicht um eine Serinprotease (MOLLER UND WASSARMAN, 1989), sondern vielmehr um Ovastacin (siehe Abschnitt 1.3) handelt (BURKART ET AL., 2012). Des Weiteren konnte die Freisetzung von tPA (*tissue-type plasminogen activator*) aus den Oocyten gezeigt werden (ZHANG ET AL., 1992). Ob dieses sich zuvor in den kortikalen Granula befand oder aus anderen Vesikeln stammt muss noch geklärt werden. Im

Sekretom nach künstlicher Aktivierung (nach ausgelöster Kortikalreaktion (siehe Abschnitt 1.1.4)) konnten mehrere Proteasen massenspektrometrisch identifiziert werden (PENG ET AL., 2012). Hierbei handelt es sich neben Ovastacin unter anderem um Trypsin 10, Trypsinogen 7 und PRSS1, sowie weitere Enzyme. Darüber hinaus konnten eine Ovoperoxidase (SCHMELL UND GULYAS, 1980), Calreticulin (TUTUNCU ET AL., 2004), eine N-Acetylglucosaminidase (MILLER ET AL., 1993), welche das Bindemotif der 1,4- β -Galactosyltransferase (GALT) an ZP3 zerstört (siehe Abschnitt 1.1.4), sowie weitere Proteine, denen eine Funktion bei der Befruchtung zugesprochen wird, in den Kortikalgranula identifiziert werden.

1.1.4. Ei-Spermium-Interaktion

Vor der eigentlichen Ei-Spermium-Interaktion durchlaufen die Spermien bereits im weiblichen Reproduktionstrakt die Kapazitation, wodurch sie ihre Befruchtungsfähigkeit erlangen, und eine Selektion, was zu einer deutlichen Limitierung der Spermien führt, welche die Eizelle erreichen (BRADEN, 1953). Daher können Ergebnisse aus Studien zur Befruchtung, welche mittels *in vitro* Fertilisation erzielt wurden, aufgrund eines 100-1000fach höheren Verhältnisses von Ei zu Spermium auch nur begrenzt Aufschluss über die *in vivo* Situation geben. Dies ist als besonders kritisch zu betrachten, wenn die Polyspermie untersucht werden soll (VAN DER VEN ET AL., 1985).

Zona Bindung

Nach Erreichen der Eizelle erfolgt die Bindung der kapazitierten Spermien an die *Zona pellucida* (Abbildung 1.7). Welche Rezeptoren hierbei an welchen *Zona pellucida* Liganden binden wird teils noch kontrovers diskutiert (rezensiert von AVELLA ET AL., 2013). Im Allgemeinen scheint die Glykosylierung der ZP-Proteine für die Bindung *in vivo* keine Rolle zu spielen (BLEIL UND WASSARMAN, 1988; SHUR UND HALL, 1982; THALL ET AL., 1995). Es wurde gezeigt, dass akrosomenreagierte Spermien an ZP1 und ZP3 (GUPTA ET AL., 2012) binden, wobei die Bindung an ZP3 die Akrosomenreaktion auszulösen scheint (CHIU ET AL., 2008A). Die eigentliche Bindung an die *Zona pellucida* an ZP2 erfolgt erst nach Akrosomenreaktion und Freilegung der inneren akrosomalen Membran (CHIU ET AL., 2008B). Der sukzessive Austausch vom ZP-Proteinen in murinen Oocyten durch Homologe anderer Spezies zeigte, dass nur

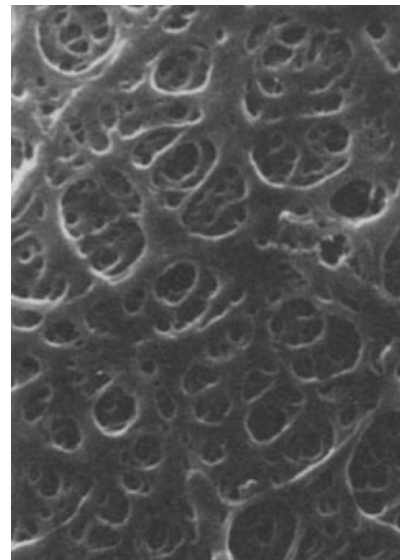


Abbildung 1.7.: **Raster-**
elektronenmikroskopische
Aufnahme der Oberflä-
chenstruktur der
Zona
pellucida von *Sus* sp. (aus
DUNBAR UND O'RAND, 1991)

1. Einleitung

in Gegenwart von murinem ZP2 eine Bindung und Befruchtungserfolg beobachtet wurde (BAIBAKOV ET AL., 2012). Inzwischen konnte die Bindedomäne (ZP2⁵¹⁻¹⁴⁹) identifiziert werden (AVELLA ET AL., 2014). Es ist bislang unklar welcher Rezeptor auf dem Spermium diese Bindung vermittelt. Dass eine Bindung an ZP3 zur Auslösung der Akrosomenreaktion notwendig ist, muss allerdings bezweifelt werden (BAIBAKOV ET AL., 2007; JIN ET AL., 2011). Es könnte allerdings eine Absicherung der Bindungsfähigkeit darstellen.

Welcher Rezeptor auf der Seite des Spermiums diese Bindung vermittelt ist unterschiedlich publiziert. Einerseits konnte die Bindung der 1,4- β -Galactosyltransferase (GALT) an ZP3 (BLEIL UND WASSARMAN, 1990) sowie die von sp56 (ZP3R) (SHUR UND HALL, 1982) gezeigt werden, andererseits hat die Defizienz dieser Rezeptoren, abgesehen von einer beeinträchtigten Bindung an ZP3, keinerlei Einfluss auf die Fertilität (MUR ET AL., 2012). Ähnliche Sachverhalte gelten für viele weitere Proteine, denen wichtige Bindungsfunktionen zugesprochen wurden. Erst deren *knockout* zeigte, dass diese *in vivo* für die Fertilisation nicht essentiell sind (siehe AVELLA ET AL., 2013 und OKABE, 2013). Es handelt sich hierbei auch um Acrosin (BABA ET AL., 1994) und ADAM1 (NISHIMURA ET AL., 2004) um nur zwei zu nennen. Nach der erfolgreichen Bindung an die *Zona pellucida* folgt die Penetration. Sobald das Spermium den Perivitellinraum erreicht erfolgt die Membranbindung und Plasmogamie.

Membranbindung und Plasmogamie

Auch für die Membranbindung, welche die Voraussetzung für die Verschmelzung der Gameten ist, sind wichtige Proteine identifiziert worden. Unter anderem auch SLLP 1 (*sperm lysozyme like protein 1*) (MANDAL ET AL., 2003; HERRERO ET AL., 2005). Allerdings hatten Mutationen dieser Proteine meist keinen essentiellen Einfluss auf den Befruchtungserfolg (rezensiert von OKABE, 2013). Bislang konnte nur ein Rezeptor-Liganden-Paar als essenziell für die Befruchtung identifiziert werden. Hierbei handelt es sich spermienseitig um IZUMO 1 (INOUE ET AL., 2005) und oolemmal um Juno (*folate receptor 4*) (BIANCHI ET AL., 2014). Die Plasmogamie führt zur Aktivierung der Eizelle und induziert Calcium Oszillationen. Dies führt zur Kortikalreaktion und Komplettierung der Meiose II.

Polyspermieblock

Unter dem Polyspermieblock sind alle Mechanismen zusammengefasst, die das Eindringen mehrerer Spermien in die Eizelle verhindern. Der bei basalen Deuterostomia vorkommende schnelle elektrische Block durch Veränderungen des Membranpotentials konnte bei Säugetieren bislang nicht gezeigt werden. Sicher ist nur, dass Polyspermie bei den Mammalia primär letale Folgen hat. Aufgrund unzureichender Daten war lange Zeit wenig über den Membranblock bekannt (DUCIBELLA, 1996), weshalb der Fokus auf dem einfacher zu untersuchenden Polyspermieblock durch

die Härtung der *Zona pellucida* lag. Inzwischen konnte allerdings von BIANCHI UND WRIGHT (2014) gezeigt werden, dass Juno nach der Gametenfusion abgespalten wird und akessorische Spermien neutralisiert.

Die Aktivierung der Eizelle löst über die Inositol-1,4,5-triphosphat(IP3)-Signaltransduktion einen Calcium-Influx aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Cytoplasma aus (rezensiert von WESSEL ET AL., 2001). Hierdurch wird das Verschmelzen der Kortikalgranula über den *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*(SNARE)-Mechanismus mit dem Oolemma und somit die Kortikalreaktion ausgelöst (rezensiert von LIU, 2011). Diese Kortikalreaktion bewirkt die Härtung der *Zona pellucida* und verhindert die Bindung sowie Penetration weiterer Spermien an diese (AUSTIN UND BRADEN, 1956). Die einzige experimentell nachgewiesene Veränderung an der *Zona pellucida* ist die die Härtung bewirkende Prozessierung von ZP2 in ZP2_f (MOLLER UND WASSARMAN, 1989). Erst BURKART ET AL. (2012) konnten zeigen, dass dieser Schnitt von Ovastacin durchgeführt wird (siehe Abschnitt 1.3). Nach SATO (1979) verhindert die Freisetzung der Kortikalgranula bereits innerhalb von wenigen Minuten nach Befruchtung die Penetration durch weitere Spermien. Ob diese Härtung der *Zona pellucida* der Abwehr von Polyspermie oder vielmehr der mechanischen Protektion des frühen Embryos dient muss noch geklärt werden. Sicher ist jedoch, dass die Regulation von Ovastacin durch Fetuin-B (DIETZEL ET AL., 2013) für die Fruchtbarkeit essentiell ist (siehe Abschnitt 1.3.2).

1.2. Proteasen

Proteasen spalten unter Wasserverbrauch Peptidbindungen, womit sie zur Enzymklasse der Hydrolasen zählen. Je nach Typ spalten sie diese von den Enden her (Exopeptidasen) oder innerhalb der Polypeptidkette (Endopeptidasen). Funktionell werden die Proteasen allerdings anhand der Architektur ihres katalytischen Zentrums klassifiziert. Hieraus ergeben sich folgende Gruppen: Aspartat-, Cystein-, Glutamat-, Serin-, Threonin- und Metalloproteasen. Die namensgebende Aminosäure greift bei den Cystein-, Serin- und Threoninproteasen selbst die Peptidbindung nukleophil an, während bei den übrigen zuerst ein Wassermolekül aktiviert wird, welches als Nukleophil angreift.

Die bisher im Menschen gefundenen 565 Proteasen, welche ca. 2 % des Genoms ausmachen (ORDÓÑEZ ET AL., 2009), übernehmen mannigfaltige Funktionen. Dieses proteolytische Netzwerk übernimmt essenzielle Funktionen unter anderem in stoffwechselbiologischen, morphogentischen, entwicklungs- und fortpflanzungsbiologischen Prozessen (LÓPEZ-OTÍN UND BOND, 2008). Ovastacin als zinkabhängige Metalloendopeptidase gehört innerhalb der Metalloproteasen zur Familie der Astacine, als Bestandteil der Metzinkine (siehe Abbildung 1.8).

1. Einleitung

1.2.1. Die Astacin-Familie

Namensgebend für diese Proteasefamilie ist das aus dem Magen des Edelflusskreb-
ses (*Astacus astacus* LINNAEUS, 1758) stammende Astacin (STÖCKER ET AL., 1988). Es
war auch das erste eukaryotische Mitglied der Metzinkine, dessen Struktur aufge-
klärt wurde (BODE ET AL., 1992).

Als Bestandteil der Metzinkine weisen alle Astacine deren typische Merkmale auf.
Sie verfügen über die zinkbindende Konsensussequenz HExxHxxGxxH (Amino-
säuren im Einbuchstabencode; siehe Tabelle A.1) und den sogenannten *Met-turn*.
Das namensgebende Methionin dieser C-terminal gelegenen Sequenz aus SxMHY
besitzt, zumindest bei den Astacinen, eine stabilisierende Wirkung auf die drei
Histidine, welche das Zinkion komplexieren (STÖCKER UND BODE, 1995).

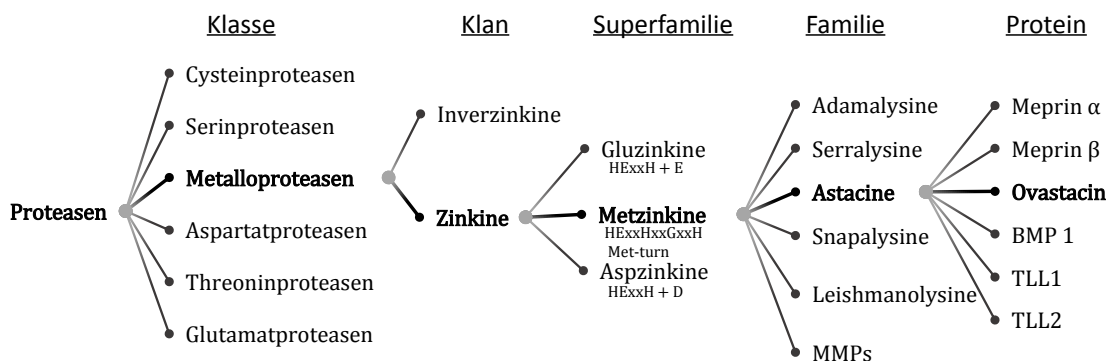


Abbildung 1.8.: **Schematischer Überblick über die Systematik der Proteasen** nach Daten aus LÒPEZ-OTÌN UND BOND (2008) und GOMIS-RÜTH (2003)

Die Proteasedomäne der Astacine, aber auch allgemein der Metzinkine, besteht aus einer „oberen“ und „unteren“ Subdomäne und dem dazwischen liegenden katalytischen Zentrum. Die Obere besteht aus fünf konservierten β -Faltblättern und zwei α -Helices, während in der Unteren nur eine α -Helix konserviert ist (GOMIS-RÜTH, 2003) (siehe Abbildung 1.10). Die Astacine bestehen nicht nur aus ihrer katalytischen Domäne, sondern weisen eine Multidomänenstruktur auf. Physiologisch lassen sich Astacine bei den Vertebraten in drei Gruppen unterteilen: Meprine, Tolloide und Schlüpfenzyme (engl. *hatching enzymes*). Die Tolloide spielen bei den Vertebraten eine wichtige Rolle in der Gewebedifferenzierung, indem sie unter anderem wichtige Matrixproteine wie Prokollagene, Laminine und Proteoglykane prozessieren. Sie sind aber auch an der Regulation von Wachstumsfaktoren beteiligt (rezensiert von GOMIS-RÜTH ET AL., 2012). Die Meprine sind die einzigen Vertreter der Astacine, welche eine Transmembrandomäne besitzen. Sie sind auch an der Gewebedifferenzierung beteiligt (rezensiert von BOND UND BEYNON, 1995). Die *hatching enzymes* sind für die Prozessierung der Eihülle zuständig und ermöglichen so das Schlüpfen des jungen Tieres. Es ist anzunehmen, dass diese auch bei den Amniota primär die Vitellinmembran beziehungsweise die *Zona pellucida* des

Embryos prozessieren um das Schlüpfen zu ermöglichen (YASUMASU ET AL., 2010; ELAROUSSI UND DELUCA, 1994; QUESADA ET AL., 2004).

Im murinen wie humanen Genom codieren 6 Gene für Astacinproteasen: 3 Tolloide (BMP1 (*bone morphogenetic protein 1*), TLL1 (*mammalian tolloid like 1*) und TLL2 (*mammalian tolloid like 2*)), 2 Meprine, (Meprin- α und Meprin- β) sowie Ovastacin. Allen gemein ist, dass sie als inaktive Zymogene exprimiert von anderen Proteinasen aktiviert werden müssen. Bis auf die Tolloide, welche bereits im Golgi-Netzwerk von Furin, einer calciumabhängigen Serinprotease, aktiviert werden, werden die Astacine extrazellulär aktiviert. In den meisten Fällen, wie auch bei den Meprinen, sind die Aktivatoren extrazelluläre Serinproteasen wie Plasmin oder Kallikreine (BECKER ET AL., 2003; OHLER ET AL., 2010). BECKER-PAULY ET AL. (2011) untersuchten die Spaltspezifität der Astacine und konnten durch massenspektrometrische Methoden eine Präferenz für saure Aminosäuren in P1'-Position zeigen.

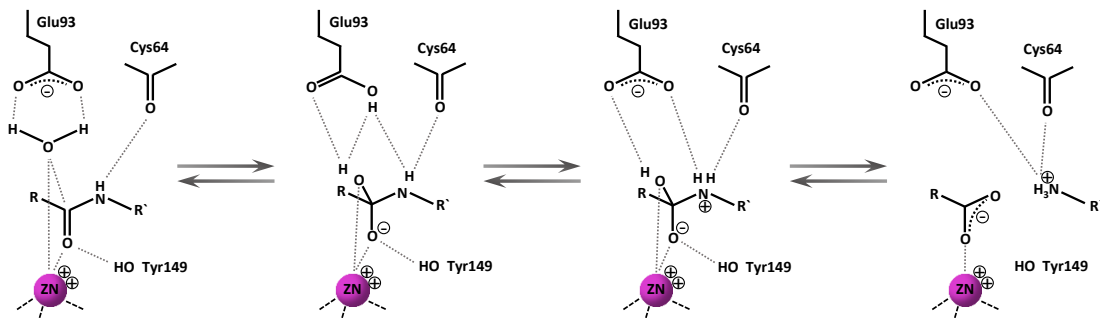


Abbildung 1.9.: **Schematische Darstellung des Katalysemechanismus** des Astacins; verändert nach GRAMS ET AL. (1996)

Die schematische Darstellung des Katalysemechanismus (siehe Abbildung 1.9) zeigt, dass ein Wassermolekül durch das Glutamat 93, im Falle des Astacins, „aktiviert“ wird und nukleophil die Polypeptidkette angreift. Es entsteht ein tetraedrischer Übergangszustand bevor der neue N-terminus der geschnittenen Polypeptidkette freigesetzt wird.

1.3. Ovastacin

Ovastacin wurde erstmals von QUESADA ET AL. (2004) beschrieben. Bei Mensch und Hausmaus ist das Gen auf Chromosom 2 lokalisiert (*Gene ID*: 431705 bzw. 215095). Sequenzanalysen zeigten, dass Ovastacin im Stammbaum der Astacine mit den Schlüpfenzymen gruppiert. Zu diesem Zeitpunkt war bereits bekannt, dass die Enzyme, welche bei Säugetieren das Schlüpfen der Blastocyste ermöglichen sollten, ISP1 und ISP2 (*implantation serine protease-1* beziehungsweise -2)

1. Einleitung

(O'SULLIVAN ET AL., 2002) im Menschen fehlen (PUENTE ET AL., 2003). So ging man davon aus, dass diese Funktion auch bei anderen Säugetieren von Ovastacin übernommen wird (QUESADA ET AL., 2004).

Aufgrund seines exklusiven Vorkommens in Oocyten beziehungsweise im Ovar und seiner Zugehörigkeit zu den Astacinen erhielt Ovastacin (*ovary astacin*) seinen Namen. Innerhalb der Oocyte liegt es in den Kortikalgranula vor (BURKART ET AL., 2012). Es ist ab der Transition von Primär- zu Sekundärfollikel in den Kortikalgranula nachweisbar (PIRES ET AL., 2013). Über den Verbleib von Ovastacin nach der Befruchtung wird in der Literatur kontrovers diskutiert (BURKART ET AL., 2012; SACHDEV ET AL., 2012). Inzwischen deuten einige Proteomanalysen darauf hin, dass Ovastacin auch außerhalb der Oocyte vorkommt (u.a. ZGODA ET AL., 2009; YIN ET AL., 2010). Die Ergebnisse von QUESADA ET AL. (2004) deuten auch auf eine hormon-, also zyklusabhängige, Expression hin.

1.3.1. Struktur

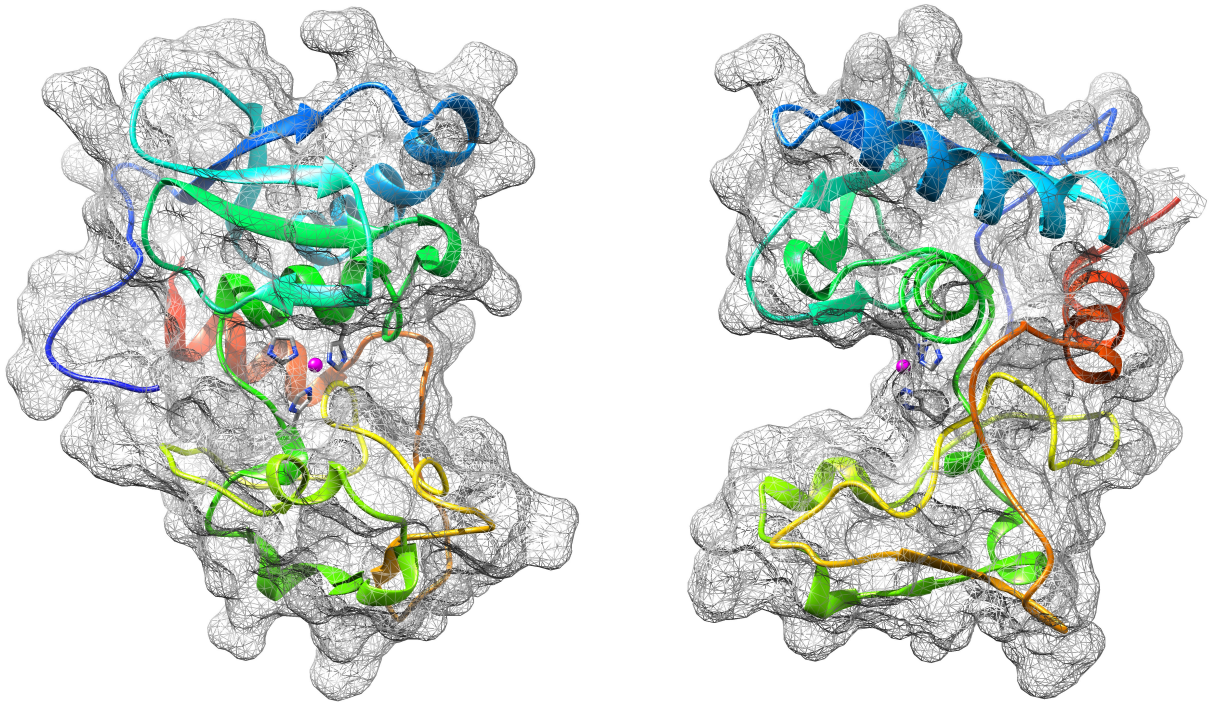


Abbildung 1.10.: **Homologiemodell der Protease-Domäne des murinen Ovastacins** erstellt anhand der Kristallstruktur des Schlüpfenzym ZHE1 von *Danio rerio* (pdb 3LQB; (OKADA ET AL., 2010)); das komplexierte Zink-Ion ist pink dargestellt, die drei komplexierenden Histidine sind hervorgehoben, sowie die Oberflächenstruktur ist als graues Gitter dargestellt; links Darstellung in Standardorientierung, rechts Standardorientierung vertikal um 90° (rechts) gedreht.

Ovastacin besteht aus einem Signalpeptid (23 AS), einem Propeptid (66 AS), der

katalytischen Domäne (194 AS) und der C-terminalen Domäne (152 AS) (Zahlen beziehen sich auf die Hausmaus). Das Signalpeptid vermittelt die Translokation über das endoplasmatische Retikulum in den Golgi-Apparat und somit die Exocytose des reifen Proteins. Auch wenn für Ovastacin keine diesbezüglichen Daten vorliegen, wird aufgrund des Sachverhaltes in anderen Astacinen davon ausgegangen, dass Ovastacin als Zymogen exocytiert wird. Erst durch Abspaltung des Propeptids ergibt sich die proteolytische Aktivität. Abbildung 1.10 zeigt die 3-D Struktur der katalytischen Domäne als Homologiemodell. Aufgrund der hohen Sequenzidentität dieser Domäne von ca. 40-50 % zu den *hatching* Enzymen ist ein solches Modell als glaubwürdig anzusehen. Es zeigt die unter Abschnitt 1.2.1 aufgeführten konservierten Charakteristika. Auch die gezeigte Schnittsequenz in ZP2 (BURKART ET AL., 2012) zeigt die für Astacine typische Präferenz (siehe Abschnitt 1.2.1).

Über die Struktur der C-terminalen Domäne kann derzeit noch keinerlei Aussage getroffen werden. Weder liegt eine Kristallstruktur vor, noch zeigen Datenbankanalysen verlässliche Sequenzähnlichkeiten zu anderen Proteinen geschweige denn homologe Domänen. Bislang liegen auch noch keine Daten vor, ob diese Domäne einen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms hat oder ob diese sogar prozessiert singulär vorliegt.

1.3.2. Funktion

Über die Funktion von Ovastacin bestehen derzeit zwei konkurrierende Modellvorstellungen. Die eine, die Prozessierung von ZP2 post Fertilisation, konnte experimentell durch die Etablierung einer Ovastacin-defizienten Mauslinie verifiziert werden (BURKART ET AL., 2012). Die andere, als oolemmaler Rezeptor für SLLP1 (*sperm lysozyme like Protein 1*), konnte bislang nur *in vitro* gezeigt werden (SACHDEV ET AL., 2012).

***Zona pellucida* Härtung und Polyspermieblock**

GAHLAY ET AL. (2010) haben durch Etablierung einer ZP_{mut} Mauslinie, welche eine Mutation im ZP2 bewirkt ($^{166}\text{LA}\downarrow\text{DE}^{169} \rightarrow ^{166}\text{LG}\downarrow\text{AA}^{169}$), die Schnittstelle im ZP2 identifizieren können, welche zur Härtung der *Zona pellucida* führt. Auch wenn die Literatur (u.a. MOLLER UND WASSARMAN, 1989; GWATKIN ET AL., 1973) immer davon ausging, dass dieser Schnitt durch eine Serinprotease erfolgt, deutete diese auf eine Protease der Astacin Familie hin (siehe Abschnitt 1.2.1). Die hierbei entstehenden Fragmente von 30 beziehungsweise 90 kDa bleiben allerdings kovalent über eine Disulfidbrücke verbunden. Erst durch Generierung und Untersuchung Ovastacin-defizienter Mäuse konnte eindeutig gezeigt werden, dass Ovastacin *in vivo* und *in vitro* ZP2 in ZP2_f konvertiert (BURKART ET AL., 2012). Fehlt Ovastacin so bleibt der Schnitt aus. Die *Zona pellucida* behält ihre Bindungsfähigkeit und Penetrierbarkeit auch nach der Befruchtung. Es gelangen zumindest

1. Einleitung

in vitro zusätzliche Spermien in den Perivitellinraum. Einige Autoren (u.a. BURKART ET AL., 2012; DIETZEL ET AL., 2013) gehen von Polyspermie aus. Diese konnte bislang nicht gezeigt werden.

Aufgrund der Kollokalisierung mit LCA wird angenommen, dass Ovastacin in den Kortikalgranula vorliegt und mit diesen im Zuge der Kortikalreaktion exocytiert wird. Auf diese Weise freigesetzt kann Ovastacin nach der Befruchtung ZP2 schneiden, was zu einer Konformationsänderung führt, durch welche die Bindefähigkeit aufgehoben wird und die *Zona pellucida* verhärtet. Dieses Modell ist in Abbildung 1.11 schematisch dargestellt.

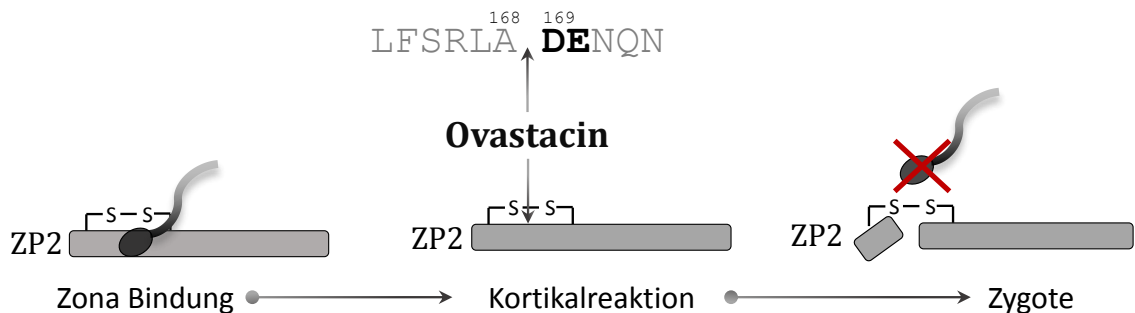


Abbildung 1.11.: **Modell der *Zona pellucida* Bindung ZP2 Spaltungsmodell** nach AVELLA ET AL. (2013) als Zeitlinie der Befruchtung

Bislang liegen keine weiteren Daten über die Aktivierung und Prozessierung von Ovastacin vor. Frühere Analysen der damals noch unbekanntes ZP2 Protease legen lediglich eine hohe Toleranz gegenüber gängigen Metalloprotease Inhibitoren nahe (MOLLER UND WASSARMAN, 1989).

Außer eine um ein Drittel reduzierte Fertilität weisen die Ovastacin-defizienten Mäuse des FVB-Stammes keinen beschriebenen Phänotyp auf (BURKART ET AL., 2012). Laut den Autoren liegt die Ursache hierfür in einer erhöhten Polyspermierate aufgrund der ausbleibenden Prozessierung des ZP2, obwohl bereits gezeigt wurde, dass eine ausbleibende Prozessierung durch Mutation der Schnittstelle nicht zu einer Erhöhung der Polyspermierate führt (GAHLAY ET AL., 2010).

Inhibition

SCHROEDER ET AL. (1990) konnten zeigen, dass eine Supplementierung mit Serum den Befruchtungserfolg einer *in vitro* Fertilisation erhöht. Es stellte sich heraus, dass dies auf eine Verzögerung der Härtung der *Zona pellucida* zurückzuführen ist. Als ursächlichen Bestandteil des Serums konnten sie Fetuin identifizieren. OLIVIER ET AL. (2000) entdeckten zusätzlich zum Fetuin (heute: Fetuin-A) das Fetuin-B. Bei den Fetuinen handelt es sich um Cystatine (Inhibitoren von Cysteinproteasen). Da es sich bei diesen um Plasmaproteine handelt werden sie zu den Typ 3 Cystatinen gezählt. Zu dieser Gruppe gehören neben Fetuin-A (im Mensch als AHSG

(alpha-2-Heremans Schmid Glykoprotein) bezeichnet) und Fetuin-B auch Kininogen und das Histidin-reiche Glykoprotein (rezensiert von LEE ET AL., 2009). Bis auf Kininogen besitzen die Typ 3 Cystatine zwei sogenannte Cystatin-ähnliche Domänen sowie eine weitere C-terminale Domäne. Die Tertiärstruktur wird über mehrere Disulfidbrücken stabilisiert. Keines der Typ 3 Cystatine zeigt eine Inhibition von Cysteinproteasen. Die beiden Fetuine werden hauptsächlich in der Leber exprimiert und kommen je nach Spezies in hohen Serumkonzentrationen und somit auch in der Oviduktflüssigkeit vor (DENECKE ET AL., 2003).

Welches der Fetuine den befruchtungsfördernden Effekt *in vitro* bewirkte, blieb bis zur Etablierung der Fetuin-defizienten Mauslinien (JAHNEN-DECHENT ET AL., 1997, MERX ET AL., 2005; LEE ET AL., 2009) unklar. Die Ursache der bereits in LEE ET AL. (2009) erwähnten weiblichen Infertilität in Fetuin-B-defizienten Mäusen wurde erst durch DIETZEL ET AL. (2013) beantwortet. Die Autoren konnten zeigen, dass die Infertilität auf eine vorzeitige Verhärtung der *Zona pellucida*, also auf eine zu früh erfolgte Prozessierung des ZP2, zurückzuführen ist. *In vitro* konnte eine nahezu titrierende Hemmung von rekombinantem Ovastacin durch rekombinantes Fetuin-B gemessen werden. Es ist somit davon auszugehen, dass Fetuin-B *in vivo* das Ovastacin, welches im Zuge der vorzeitigen Exocytose aus den Kortikalgranula (siehe Abschnitt 1.1.3) freigesetzt wird, eine Prozessierung der *Zona* hemmt. Die Wiederherstellung der Fertilität nach Transplantation Fetuin-B-defizienter Ovarien in Wildtyp Mäuse bestätigte dies (DIETZEL ET AL., 2013). Auch wenn im Menschen die Serumkonzentration des Fetuin-B mit ca. 100 nM nur etwa ein $\frac{1}{30}$ der Maus beträgt (DENECKE ET AL., 2003), scheint es einen Zusammenhang zwischen dem Serum Fetuin-B Level und dem Erfolg einer *in vitro* Fertilisation zu geben (FLOEHR ET AL., 2016). Werden einer murinen *in vitro* Fertilisation steigende Mengen rekombinantes Fetuin-B zugegeben, so wirkt sich dies auch positiv auf die Befruchtung aus. Es wird hierdurch nicht nur die Befruchtungsrate erhöht, auch die Härtung der *Zona pellucida* wird verlangsamt und somit die Befruchtungsfähigkeit zeitlich verlängert (DIETZEL, 2014).

Alternative Funktion

Wie bereits erwähnt wird eine weitere Funktion von Ovastacin diskutiert. SACHDEV ET AL. (2012) konnten *in vitro* unter anderem durch Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie eine hohe Affinität zu SLLP 1 (siehe Abschnitt 1.1.4) nachweisen. Auch Untersuchungen an Oocyten konnten diese Interaktion bestätigen. Da nach MANDAL ET AL. (2003) diese Interaktion für die Plasmogamie wichtig sein soll, die Ovastacin-defizienten Mäuse allerdings keinen Verschmelzungsphänotyp aufweisen, bleibt die Frage nach der Funktion. Die Autoren postulieren auch, dass es sich bei Ovastacin oolemmal um eine membranständigen Rezeptor handelt. Die mutmaßliche Transmembrandomäne wurde von PIRES ET AL. (2013) publiziert. Da diese zwei der fünf konservierten β -Faltblätter der oberen Subdomäne (siehe Abschnitt 1.2.1) einschließt, ist nach diesem Modell die proteolytische Ak-

1. Einleitung

tivität und die Prozessierung von ZP2 auszuschließen. Dieses Model steht daher in Widerspruch zu BURKART ET AL. (2012). Es wird auch hier lediglich von der Proteasedomäne gesprochen und keine Aussage über Struktur und Funktion der C-terminalen Domäne gemacht.

1.4. Fragestellung

Statistisch betrachtet bleibt bei jedem zwanzigsten Paar der Kinderwunsch unerfüllt (u.a. GNOTH ET AL., 2005). In etwa 30 % der Fälle kann die Ursache dieser Infertilität bislang nicht geklärt werden (GELBAYA ET AL., 2014). Dieser Sachverhalt führt seit Jahrzehnten zu konstant steigenden Zahlen an *in vitro* Fertilisationen. Ein besseres Verständnis der Befruchtung und Ei-Spermium-Interaktion bei Säugetieren im Allgemeinen könnte diese Situation verbessern.

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit liegt in der Freisetzung und Aktivierung von Ovastacin um dessen Rolle im proteolytischen Netzwerk der Befruchtung genauer zu verstehen. Bislang gibt es noch keine Erkenntnisse über die *in vivo* Aktivierung beziehungsweise über die aktivierende Protease. Mittels Prozessierungs- und Aktivitätsanalysen *in vitro* und *in vivo* soll dieser Mechanismus genauer untersucht werden.

Ob die Subfertilität Ovastacin-defizienter Mäuse tatsächlich auf eine erhöhte Polyspermie, wie in der Literatur beschrieben, zurückzuführen ist, soll durch vergleichende Untersuchungen an Wildtyp sowie Ovastacin-defizienten Tieren genauer untersucht werden.

Die kontroverse Datenlage über die Freisetzung von Ovastacin macht weitere Untersuchungen hierzu notwendig. Hierbei steht die Frage nach dem Verbleib und der Funktion der C-terminalen Domäne während der Befruchtung im Vordergrund.

Mittels bioinformatischer Methoden wird versucht weitere Erkenntnisse vor allem über die C-terminale Domäne in Bezug auf Verbreitung und Konservierung innerhalb der Mammalia zu erlangen.

Aufgrund von Indizien der extraovariellen Ovastacinexpression, ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit andere Organe der Hausmaus auf Ovastacin spezifische mRNA und das Protein selbst hin zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1. Tiermaterial

In dieser Arbeit fanden Tiere des Inzuchtstammes FVB der Hausmaus (*Mus musculus* LINNAEUS, 1758) Verwendung. Dieser bereits 1935 etablierte Stamm zeigt eine Sensitivität gegenüber dem Leukämie verursachenden *Friend Virus B*. Aufgrund der deutlichen *Pronuclei* in den Zygoten und der Wurfgröße ist dieser Stamm zur Etablierung transgener Linien besonders geeignet. Die Ovastacin-defizienten Mäuse (FVB-OvaKO), welche aus diesem Stamm generiert wurden (siehe BURKART ET AL., 2012), wurden freundlicherweise von Jurrien Dean (National Institutes of Health, US-Bethesda) zur Verfügung gestellt. Die Zucht und Haltung erfolgte in der Arbeitsgruppe. Die Primer zur Genotypisierung sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1.: **Sequenzen der Primer zur Genotypisierung**

Primer 1 und 2 wurden zur Detektion des Wildtypallels (558 bp), Primer 2 und 3 zur Detektion des mutanten Allels (~ 650 bp) verwendet

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

Die DNA-Extraktion und PCR aus Ohrbiopsien wurde mit dem KAPA *Mouse Genotyping Kit* (KAPA Biosystems Inc., US-Wilmington) oder mit *Extracta™ DNA Prep for PCR-Tissue* (Quanta, US-Beverly) nach Herstellerangaben, gemäß PCR-Programm (siehe Tabelle 2.2) durchgeführt.

Tabelle 2.2.: **PCR-Programm der Genotypisierung**

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	
Denaturierung	94	120	
Denaturierung	94	20	↪ 10x -0,5 °C pro Zyklus
Annealing	65	15	
Elongation	68	10	
Denaturierung	94	15	↪ 28x
Annealing	60	15	
Elongation	72	10	
Finale Elongation	72	120	

2.2. Antikörper

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind mit den eingesetzten Verdünnungen in Tabelle 2.3 aufgeführt. Die Propeptid-, Proovastacin- und C-Terminus-Antiseren wurden von der Arbeitsgruppe Stöcker in Auftrag gegeben und von Pineda Antikörper-Service (D-Berlin) in Kaninchen hergestellt. Bei dem C-Terminus- und Propeptid-Antiserum handelt es sich um Peptidantikörper, welche durch Immunisierung mit synthetischen Peptiden mit den in Tabelle 2.3 angegebenen Sequenzen hergestellt wurden. Vor Verwendung für diese Arbeit wurden diese über Affinitätschromatografie mittels der zur Immunisierung verwendeten Peptide gereinigt und so monospezifische Fraktionen erstellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Proovastacin-Antiserum, welches durch Immunisierung mit rekombinantem murinen Proovastacin hergestellt wurde (siehe HILDEBRAND, 2008), über Affinitätschromatografie mittels Protein-G (HiTrap™ Protein G HP, GE Healthcare, D-München) nach Herstellerprotokoll gereinigt und eine IgG-Antikörper Fraktion erstellt. Der anti-Ovastacin Antikörper wurde freundlicherweise von Jurrien Dean (National Institutes of Health, US-Bethesda) zur Verfügung gestellt. Dieser Antikörper ist auch gegen die C-terminale Domäne von Ovastacin gerichtet (siehe BURKART ET AL., 2012). Die Bindestellen der Peptidantikörper sind im Anhang in Abbildung C.2 markiert. Als sekundäre Antikörper in der Immunodetektion wurden nach Western-Blot ein mit Meerrettichperoxidase und für die Histologie ein mit dem Fluorophor Alexa Fluor® 488 gekoppelter Antikörper verwendet.

Tabelle 2.3.: **Verwendete Antikörper**

alle dieser Arbeit verwendeten Antikörper. Für Immunoblot wurden die Antikörper entsprechend in TBS-T mit 7,5 % (w/v) Magermilchpulver (siehe Tab. 2.5), für Immunhistologie entsprechend in PBS-T mit 0,3 % (w/v) Albumin (siehe Tab. 2.4) verdünnt.

Antikörper	Antigen	Verdünnung		Bezug
		Blot	Histologie	
Propeptid	CSTSVPEGFTPEGSPVFQDK	1:15000	1:200	AG Stöcker
Proovastacin	Maus Proovastacin-Strep	1:10000	1:200	AG Stöcker
C-Terminus	CAPGSHIREVPRD	1:1500	1:100	AG Stöcker
anti-Ovastacin	PLALFPEARDKPAP	1:1000	1:50	Jurrien Dean
Peroxidase	Kaninchen IgG	1:7500	—	Dianova
Alexa Fluor® 488	Kaninchen IgG	—	1:400	Thermo Fisher

2.3. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben wurden alle verwendeten Chemikalien von der Appli-Chem GmbH (D-Darmstadt) bezogen. Die Reinheit entsprach entweder „für die Molekularbiologie“ oder „per analysis“. Alle Lösungen wurden, soweit nicht

anders angegeben, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst.}}$ (Milli-Q Anlage, Merck Millipore, D-Darmstadt) angesetzt.

2.4. Standardpuffer

In diesem Abschnitt sind die in dieser Arbeit verwendeten Pufferlösungen zusammengefasst, die in mehreren Methoden verwendet wurden. Alle weiteren Pufferlösungen sind in der jeweiligen Methode aufgeführt. Die Zusammensetzung der verwendeten Phosphatpuffer (PBS) ist Tabelle 2.4 zu entnehmen. Diese wurden wie angegeben verwendet. Ausschließlich in Versuchen an vitalen Oocyten und Embryonen fand Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Sigma-Aldrich, D-Taufkirchen) Verwendung. Die Zusammensetzung der verwendeten Tris-Puffer sind in Tabelle 2.5 aufgeführt.

Tabelle 2.5.: **Zusammensetzung der Tris-Puffer**

Puffer	Zusammensetzung
TBS	150 mM NaCl pH = 7,5 10 mM Tris
TBS-T	500 mM NaCl pH = 7,5 20 mM Tris 0,05 % (v/v) Tween 20 0,2 % (v/v) Triton X-100

Tabelle 2.4.: **Zusammensetzung der Phosphatpuffer**

Puffer	Zusammensetzung
PBS	140 mM NaCl pH = 7,4 10 mM Na_2HPO_4 2,7 mM KCl 1,8 mM KH_2PO_4
PBS-T	siehe PBS 0,4 % (v/v) Tween 20

Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit 10 M HCL bzw. NaOH. Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Tris-Puffern war darauf zu achten, dass der pH bei der jeweiligen Verwendungstemperatur eingestellt wurde, da die Säurekonstante von Tris mit $\Delta pK_s = -0,031K^{-1}$ stark temperaturabhängig ist. Je nach Verwendung wurden die Puffer mit einer Porengröße von $0,2 \mu\text{m}$ sterilfiltriert.

2.5. Proteinbiochemie

2.5.1. Photometrische Konzentrationsbestimmung

Abhängig von der Wellenlänge und den gelösten Substanzen wird Licht, das durch wässrige Lösungen fällt, unterschiedlich absorbiert. Die gelösten Substanzen haben charakteristische Absorptionsmaxima. Dies wurde bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung von Proteinen und DNA beziehungsweise RNA genutzt. Die maximale Absorption der aromatischen Aminosäuren liegt bei 280 nm (Trp), 274 nm (Tyr) und 257 nm (Phe). Dies wurde erstmals durch SMITH (1929) gezeigt. Da Tryptophan eine deutlich höhere Absorbtivität im Vergleich zu den anderen Aminosäuren besitzt, wurde die Konzentration bei 280 nm bestimmt. Als Nullabgleich diente die Absorption bei 320 nm.

2. Material und Methoden

Die auf diese Weise bei 280 nm ermittelte optische Dichte ($OD_{280\text{nm}}$; entspricht der Absorption bei 1 cm Schichtdicke) wurde mit Hilfe des Gesetzes von *Lambert-Beer* (siehe Gleichung 2.1) in die Proteinkonzentration umgerechnet. Der hierfür notwendige molare Extinktionskoeffizient (ϵ_λ) wurde mittels der Web-Applikation ProtParam ([web.expasy.org/ protparam/](http://web.expasy.org/protparam/)) des SIB Bioinformatics Resource Portals berechnet.

$$E_\lambda = \lg \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon_\lambda * c * d \quad (2.1)$$

I	=	I des transmittierten Lichtes	c	=	Konzentration
I_0	=	Intensität des einfallenden Lichtes	d	=	Schichtdicke
ϵ_λ	=	molarer Extinktionskoeffizient	E_λ	=	Extinktion

Die Umrechnung der Konzentrationen in mg/ml erfolgte gemäß folgender Formel:

$$C_m = c * M_r \quad (2.2)$$

C_m	=	Konzentration im mg/ml	c	=	Konzentration
M_r	=	molare Masse			

2.5.2. Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Um Proteine u.a. für die SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.5.4) zu konzentrieren, wurden diese mit Hilfe des Natriumsalzes der Desoxycholsäure (DOC) und der Trichloressigsäure (TCA) nach BENSADOUN UND WEINSTEIN (1976) präzipitiert. Die Probe wurde 100:1 mit einer 2 %igen (w/v) DOC-Lösung versetzt und für 60 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben im Verhältnis 10:1 mit einer 100 %igen TCA-Lösung gemischt und für mindestens weitere 60 min auf Eis inkubiert. Die gefällten Proteine wurden für 20 min bei 16 000 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 200 µl eisgekühltem Aceton gewaschen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 min bei 16 000 x g. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet bei RT getrocknet. Für die weitere Verwendung wurde das Pellet in dem benötigten Puffer und Volumen gelöst.

2.5.3. Konzentrierung und Umpufferung von Proteinlösungen

Soweit es für die Versuche in dieser Arbeit nötig war Proteinlösungen zu konzentrieren, wurden Amicon® Zentrifugationsfilter (Merck-Millipore, D-Darmstadt) verwendet. Die Ausschlussgröße richtete sich nach dem zu konzentrierenden Protein. Es wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen.

Für einige Versuche war es notwendig, das rekombinante Ovastacin und Fetuin-B in für Oocyten verträgliche Lösungen umzupuffern. Hierfür wurden Zeba™ Spin Desalting Columns (Thermo Fisher, US-Waltham) verwendet. Die Größe der Säule richtete sich

nach dem umzupuffernden Volumen. Es wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen. Um Proteinverlust durch das Umpuffern zu ermitteln, wurde, soweit möglich, die Proteinkonzentration photometrisch nachgemessen (siehe Abschnitt 2.5.1).

2.5.4. Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Da Proteine aufgrund ihrer Eigenladung in einer klassischen Gelelektrophorese unterschiedlich schnell entweder zur Kathode oder Anode wandern, wurde in dieser Arbeit die Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet. Hierbei denaturiert das SDS die Proteine und versieht die Proteine proportional zu ihrem Molekulargewicht mit einer negativen Ladung. Somit werden die Proteine nach ihrer Größe quantifizierbar aufgetrennt. Um eine vollständige Entfaltung in ihre Primärstruktur zu gewährleisten, wurden die Proben zusätzlich mit Dithiothreitol (DTT) versetzt, um Disulfidbrücken zu reduzieren. Die Trennschärfe des Polyacrylamidgels wurde durch Verwendung eines diskontinuierlichen Gels erhöht. Es ist aus einem niedriger prozentigen Sammel- und einem höher prozentigen Trenngel mit Sprung des pH-Wertes aufgebaut. Nach dem *Gesetz von Kohlrausch* (Kohlrausch, 1879; Kohlrausch und Holborn, 1898) werden die Proteine aufgrund der Bedingungen im Sammelgel fokussiert und im Trenngel scharf aufgetrennt.

Tabelle 2.6.: **Zusammensetzung der Puffer für SDS-PAGE** verändert nach LAEMMLI (1970)

Puffer	Zusammensetzung
Sammelgel-	0,5 M Tris/HCl pH = 6,8 0,4 % (w/v) SDS
Trenngel-	1,5 M Tris/HCl pH = 8,8 0,4 % (w/v) SDS
Lauf-	25 mM Tris/HCl pH = 8,3 192 mM Glycin 0,02 % (w/v) SDS
3x Proben-	200 mM Tris/HCl pH = 6,8 10 % (v/v) SDS 25 % (v/v) Glycerin 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 140 mM DTT

Tabelle 2.7.: **Zusammensetzung der Polyacrylamidgele**

Pipettierschema für das Ansetzen der Polyacrylamidgele; Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS) wurden in $H_2O_{\text{reinst.}}$ angesetzt; das Acrylamid (Rotiphorese 30) wurde von Carl-Roth bezogen

Polyacrylamid:	Trenngel		Sammelgel
	12 %	14 %	3,8 %
Sammelgelpuffer	—	—	1 ml
Trenngelpuffer	2 ml	2 ml	—
$H_2O_{\text{reinst.}}$	2,68 ml	2,25 ml	2,44 ml
Rotiphorese 30	3,2 ml	3,73 ml	0,51 ml
TEMED 10 % (v/v)	60 μ l	60 μ l	30 μ l
APS 10 % (w/v)	60 μ l	60 μ l	30 μ l

Die verwendeten Puffer sind Tabelle 2.6 zu entnehmen. Das Pipettierschema für die Zu-

2. Material und Methoden

sammensetzung der Gele ist in Tabelle 2.6 dargestellt. Es fand für die Gelelektrophorese das Mini-PROTEAN® System von Bio-Rad (D-München) Verwendung. Die aufzutrennenden Proben wurden 2:1 mit 3x Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Für die Auftrennung wurde dem Gel eine konstante Spannung von 180 V angelegt. Je nach weiterer Verwendung des Gels wurden unterschiedliche Proteinmarker verwendet. Für eine Coomassie-Färbung (siehe Abschnitt 2.5.7) wurde der *Unstained Protein Marker, Broad Range* (2-212kDa) (New England Biolabs, D-Frankfurt a.M.) und für den Western-Blot (siehe Abschnitt 2.5.5) *MagicMark™ Western Protein Standard* (Thermo Fisher, US-Waltham) verwendet.

2.5.5. Western-Blot mit Immunodetektion

Im Western-Blotting Verfahren werden die Proteine aus einem SDS-Polyacrylamidgel mittels elektrischer Spannung auf eine Membran transferiert. In dieser Arbeit wurde nach KYHSE-ANDERSEN (1984) das *Semi-Dry* Verfahren verwendet. Um die transferierten Proteine sichtbar zu machen, wurden diese mit speziellen Antikörpern (siehe Abschnitt 2.2) markiert und diese wiederum mit einem zweiten Antikörper, der gegen die Fc-Region des Ersten gerichtet ist, behandelt. In dieser Immunodetektion wurde ein sekundärer Antikörper verwendet, welcher an eine Peroxidase gekoppelt ist. Nach Zugabe des entsprechenden Substrates kann die Peroxidase das Substrat umsetzen, wodurch in diesem Fall Licht emittiert wird. In dieser Arbeit wurde das Clarity™ Western ECL Blotting Substrat von Bio-Rad (D-München) verwendet.

Tabelle 2.8.: **Puffer für Western-Blot**

Puffer	Zusammensetzung
Anoden-	300 mM Tris/HCl pH = 10,4 20 % (v/v) Ethanol 2,7 mM KCl
Kathoden-	25 mM Tris/HCl pH = 8 40 mM Glycin 20 % (v/v) Ethanol

Das „Blot-Sandwich“ wurde wie folgt aufgebaut: Zunächst wurden das SDS-Polyacrylamidgel auf vier in Anodenpuffer getränkte Blottingpapiere (3mm CHR, GE Healthcare, D-München) gelegt und darauf die für 10 s in Ethanol aktivierte Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) (Immobilon-P, Merck Millipore, D-Darmstadt) platziert. Darauf wurden weitere vier in Kathoden-

puffer getränkte Blottingpapiere gelegt und für 75 min bei konstanten 20 V in einem Semi-Dry Blotter „Pegasus“ (PHASE, D-Lübeck) geblottet.

Für die Immunodetektion wurde die Membran zunächst für 60 min bei RT mit 10 % (w/v) Magermilchpulver in TBS (siehe Tabelle 2.5) blockiert und kurz mit TBS gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (gemäß Tabelle 2.3) erfolgte für 60 min bei RT. Anschließend wurde die Membran mit TBS-T abgespült und für 10 min in TBS-T (2.5) gewaschen. Die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Antikörper erfolgte gemäß Tabelle 2.3 für 60 min bei RT. Nachdem die Membran mit TBS abgespült wurde, wurde diese für 2 x 10 min in TBS-T gewaschen und in TBS überführt.

Erfolgte die Detektion nicht über Antikörper, sondern mittels Lektinen, wurde auf eine Nitrocellulosemembran (Amersham™ Protran™ 0,45 µm NC, GE Healthcare, D-München) geblottet. Die Blockierung erfolgte in TBS mit 0,5 % (v/v) Tween 20 und 1 % (w/v) Albumin für eine Stunde. Nach zweimaligen Waschen in TBS mit 0,5 % Tween 20 er-

folgte die Lektinbehandlung über Nacht bei 4 °C mit 10 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ biotinylierten *Lens culinaris* Agglutinin (Vectorlabs, US-Malvern) in TBS mit 0,5 % Tween 20. Die Membran wurde fünfmal für je 5 Minuten in TBS mit 0,5 % Tween 20 gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit 0,05 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Meerrettichperoxidase-gekoppelten Avidin (Thermo Fisher, US-Waltham) in TBS mit 0,5 % Tween 20. Die Membran wurde fünfmal für 5 Minuten in TBS mit 0,5 % Tween 20 gewaschen.

Die Dokumentation erfolgte mittels *Clarity™ ECL Blotting Substrate* (Bio-Rad, D-München) entweder auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, GE Healthcare, D-München) oder an einem Fusion FX (VWR, D-Darmstadt) und wurde mit der Fusion-Capt Advance Software ausgewertet.

2.5.6. Antikörper-Stripping

Um auf der geblotteten PVDF-Membran Kolokalisation mittels verschiedener Antikörper zu zeigen oder auch um den Tierverbrauch zu verringern, wurden die Antikörper in einigen Versuchen nach erfolgreicher Immunodetektion von der Membran gelöst (*stripped*) und mit dem nächsten Antikörper gemäß Abschnitt 2.5.5 weiterbehandelt. Das *Stripping* erfolgte für 3-4 min bei RT in *Stripping*-Puffer.

Danach wurde die Membran mehrfach in TBS gewaschen.

Tabelle 2.9.: **Zusammensetzung des *Stripping*-Puffers** Der pH wird mit NaOH auf pH 10,8 eingestellt

Puffer	Zusammensetzung
<i>Stripping</i>	50 mM Glycin pH = 10,8
	7 M Guanidiniumhydrochlorid
	0,1 M KCl
	50 μM EDTA
	20 mM β -Mercaptoethanol

2.5.7. Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Brillant-Blau

Um die Proteine im Polyacrylamidgel nach der Elektrophorese sichtbar zu machen, wurden die Gele mittels Coomassie-Brillant-Blau (CBB) G 250 nach KANG ET AL. (2002) gefärbt. Coomassie lagert sich an die basischen Seitenketten von Aminosäuren an, wodurch die Proteine gefärbt werden. Um möglichst sensitiv zu färben, wurden die Gele in einer kolloidalen CBB-Lösung (siehe Tabelle 2.10) über mehrere Stunden gefärbt. Die Sensitivität liegt laut KANG ET AL. (2002) bei 10 ng pro Proteinbande. Obwohl diese Methode hintergrundfrei färbt, mussten die Gele teilweise für kurze Zeit entfärbt werden.

Tabelle 2.10.: **Lösungen für die Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau** Zuerst das Aluminiumsulfat in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst.}}$ vollständig lösen, dann das Coomassie-Brillant-Blau (CBB) und Ethanol, zuletzt wurde die Phosphorsäure zugesetzt

Puffer	Zusammensetzung
Färber	5 % (w/v) $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 16-18 \text{H}_2\text{O}$
	0,02 % (w/v) CBB G-250
	10 % (v/v) Ethanol
	2 % (v/v) o-Phosphorsäure
Entfärber	10 % (v/v) Ethanol
	2 % (v/v) o-Phosphorsäure

2.5.8. Färbung von Polyacrylamidgelen mit Silbernitrat

Bei der Silbernitratfärbung von Polyacrylamidgelen handelt es sich um eine sensitivere Färbemethode als die Coomassie-Färbung. Die Detektionsgrenze liegt bei bis zu 0,1 ng Protein pro Bande (DUNN UND CRISP, 1994). Bei dieser Methode bildet das Ag^+ -Ion Komplexe mit den Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine. Das Silberion dieser Komplexe wird durch alkalisches Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert.

Das Polyacrylamidgel wurde zweimal für 15 min fixiert. Durch zweimaliges Waschen für je 20 min wurde die Fixierlösung entfernt. Nachdem das Gel zweimal in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst.}}$ geschwenkt wurde, wurde das Gel für 1 min in die Sensitizerlösung überführt. Nach Abspülen der Lösung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst.}}$ wurde das Gel bei 4 °C für 20 min in der Silberlösung geschwenkt. Das Gel wurde dreimal für 15 s in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst.}}$ gewaschen und in die Entwicklerlösung überführt. Die Entwicklung wurde gestoppt, indem das Gel in 5 % (v/v) Essigsäure überführt wurde.

Tabelle 2.11.: Lösungen für die Färbung mit Silbernitrat

Lösung	Zusammensetzung
Fixier-	40 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure
Wasch-	30 % (v/v) Ethanol
Sensitizer-	0,02 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
Silber-	100 mM AgNO_3 0,02 % (v/v) Formaldehyd
Entwickler-	2 % (w/v) Na_2CO_3 0,04 % (v/v) Formaldehyd

2.5.9. Protein G Affinitätschromatographie

Für die sequenzielle Präabsorption (siehe Abschnitt 2.5.10) war es sinnvoll die Immunglobuline G (IgG) von den restlichen Serumproteinen des Antiserums gegen Proovastacin zu trennen, um eine IgG-Fraktion zu erstellen. Hierfür wurde eine HiTrap™ Protein G HP Säule (GE Healthcare, D-Bremen) verwendet. Hier ist das in der Zellwand von Bakterien der Gattung *Streptococcus* vorkommende Protein G an die Säulenmatrix gekoppelt. Dieses Protein hat eine hohe Affinität gegen die Fc-Region von Antikörpern, um *in vivo* die Markierung durch das Immunsystem des infizierten Organismus zu umgehen. Dies wird für die Affinitätschromatographische Trennung der Antikörper aus dem Antiserum genutzt. Hierbei wurde strikt nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.

2.5.10. Sequenzielle Antikörper Präabsorbtion

Ziel der sequenziellen Präabsorption war es zum einen bereits gezeigte Kreuzreaktivitäten des Proovastacin Antikörpers zu entfernen sowie die Spezifität des Antikörpers auf bestimmte Domänen des Ovastacin einzuengen.

Um die Kreuzreaktivität zu entfernen, wurde der Zellüberstand von Nephrosin exprimierenden High Five™ Zellen (siehe Abschnitt 2.6) verwendet. Dieser Überstand wurde freundlicherweise von Mario Olf (Johannes Gutenberg-Universität, Mainz) zur Verfügung gestellt.

Für einige immunhistologische Versuche war es nötig einen Antikörper zu verwenden, welcher die Proteasedomäne, aber nicht die C-terminale Domäne, erkennt. Dies wurde durch die Präabsorption mit der rekombinant exprimierten und gereinigten C-terminalen

Domäne (siehe Abschnitt 2.6) erreicht.

Zunächst wurden die Proteinlösungen in PBS (siehe Tabelle 2.4) umgepuffert. Der Proovastacin Antikörper wurde 1:100 in 5 ml PBS mit 0,001 % NaN_3 verdünnt. Es wurde der Zellkulturüberstand beziehungsweise der C-Terminus im Verhältnis 1:100 hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C rotiert. Die Lösung wurde für 2 h bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand erneut mit Zellkulturüberstand beziehungsweise C-Terminus versetzt. Dieser Prozess wurde so oft wiederholt, bis im Western-Blot (siehe Abschnitt 2.5.5) keine Reaktivität des Antikörpers mit dem Absorbans mehr zu detektieren war. Dies war meist nach 8 bis 10 Zyklen der Fall.

2.6. Proteinexpression und -reinigung

In diesem Abschnitt ist die Expression und Reinigung aller in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine dargestellt. Das verwendete murine Proovastacin stammte aus WESTPHAL (2013). Das Konstrukt wurde von Dr. Irene Yiallourou (Johannes Gutenberg-Universität, Mainz) hergestellt, die Expression wurde von Birgit Schättler durchgeführt. Das verwendete murine Fetuin-B wurde von Konstantin Karmilin (Johannes Gutenberg-Universität, Mainz) exprimiert, gereinigt und zur Verfügung gestellt (siehe KARMILIN, 2016). Die C-terminale Domäne des murinen Ovastacins wurde von Michael Kuske (Johannes Gutenberg-Universität, Mainz) exprimiert und von mir im Rahmen dieser Arbeit gereinigt. Die DNA Sequenzen der Konstrukte für Fetuin-B und die c-terminale Domäne wurden mit dem Programm GeneOptimizer auf GeneArt™ Gene Synthesis Plattform von Life Technologies (D-Darmstadt) auf die Expression in Insektenzellen Codon optimiert und von Life Technologies in Vektor pFastBac1 synthetisiert. Die Sequenzen sind dem Anhang (Abbildungen C.1 bis C.3) zu entnehmen.

2.6.1. Baculovirus Expressionssystem

Da die in diesem Abschnitt erläuterte Methode nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, dient dies nur zur vollständigen Nachvollziehbarkeit der Proteinexpression für die nachfolgende Reinigung. Alle in Abschnitt 2.6 genannten Proteine wurden mittels des Bac-to-Bac® Baculovirus Expressionssystem (Life Technologies, Invitrogen) exprimiert. Dieses System beinhaltet sowohl die Generation und Amplifikation der rekombinanten Baculoviren in Sf9-Zellen (immortalisierte Ovar-Zellen aus *Spodoptera frugiperda*_{SMITH,1797}), sowie die Infektion mit diesen Baculoviren und anschließender Expression in BTI-Tn-5B1-4 (Friedrich-Löffler-Institut, D-Greifswald), im Folgenden als High Five™ Zellen (immortalisierte Ovar-Zellen aus *Trichoplusia ni*_{HÜBNER,1803}) bezeichnet. Zunächst wurden *Escherichia coli* Bakterien vom Stamm DH10Bac mit dem pFastBac hitzeschocktransformiert. Hier erfolgt die Transposition der Expressionkassette des transfizierten pFastBac Vektors in das Virusgenom. Aus diesen Zellen wurde das rekombinierte Baculovirusgenom isoliert. Mit dieser Bacmid-DNA wurden die Sf9-Zellen mittels X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche, D-Mannheim) transfiziert. Die Amplifikation in Sf9-Zellen erfolgte mindestens bis zum Stadium der Quartärviren, mit welchen die High Five™ Zellen bei einer Dichte von $1,6 \cdot 10^6$ Zellen/ml infiziert wurden. Die Expression erfolgte für 72 h bei 27 °C.

2. Material und Methoden

Die oben genannten Schritte sind dem Handbuch „Bac-to-Bac Expression System“ der Firma Invitrogen zu entnehmen.

2.6.2. Proteinreinigung

Die sich an die Proteinexpression anschließende Reinigung gliedert sich in zwei Schritte. Zunächst wurde der zellfreie Überstand nativ gefällt und dialysiert, um das Volumen und die Kontamination mit störenden Stoffen zu verringern. Daran anschließend wurde die affinitätschromatographische Reinigung durchgeführt.

Zuerst wurde die Zellsuspension bei 200 rpm (SLA-3000 Rotor; $\sim 680 \times g$) zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen.

Fällung und Dialyse

Die Zellsuspension wurde bei 200 rpm (SLA-300 Rotor; $\sim 680 \times g$) zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde anschließend mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefällt. Hierfür wurde stufenweise bei 4°C in geringen Mengen Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 60 % ($390 \frac{g}{l}$) zugegeben und über Nacht unter Rühren inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden für 90 min und nochmals für 30 min bei 9000 rpm ($\sim 13500 \times g$) und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in $\frac{1}{10}$ des Ausgangsvolumens Dialysepuffer (siehe Tabelle 2.12) resuspendiert.

Die Umpufferung erfolgte mittels eines Acetyl-Zellulose-Schlauches mit einer Ausschlussgröße von $M_r = 4000\text{--}6000$. Es wurde solange gegen den Puffer dialysiert, bis die Osmolalität der Proteinlösung etwa der des Dialysepuffers entsprach. Um die Säule im nächsten Reinigungsschritt nicht zu verstopfen, wurde das Dialysat entweder zentrifugiert oder sterilfiltriert.

Äffinitätschromatographie mittels Strep-Tactin[®]-Sephrose

Auf die zuvor mit Dialysepuffer äquilibrierte Strep-Tactin[®]-Sephrose Säulenmatrix (IBA-Lifesciences, D-Göttingen) wurde das Dialysat gegeben. Die Säule wurde so lange mit Dialysepuffer gewaschen, bis die OD_{280} konstant war. Für die Elution wurde die Säule mit Elutionspuffer (siehe Tabelle 2.12) beladen und Fraktionen von 1,5 ml gesammelt. Es wurden die Konzentrationen gemäß Abschnitt 2.5.1 bestimmt und die Proteine bei -20°C gelagert.

Die Matrix wurde mit dem 10fachen Säulenvolumen Regenerationspuffer (siehe Tabelle 2.12) gewaschen und in Dialysepuffer gelagert.

Tabelle 2.12.: **Zusammensetzung der Puffer für die Proteinreinigung**

D-Desthiobiotin und Regenerations-Puffer wurden von IBA-Lifesciences bezogen

Puffer	Zusammensetzung
Dialyse-	50m M Tris/HCl pH = 7,4 150 mM NaCl
Elutions-	2,5 mM D-Desthiobiotin in Dialysepuffer
Regeneration-	100 mM Tris/HCl pH = 8 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM HABA

2.7. Zellkultur muriner Keimzellen und Embryonen

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle in diesem Abschnitt verwendeten Medien unter Mineralöl (M5310, Sigma-Aldrich) über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ äquilibriert und alle weiteren Inkubationen unter diesen Bedingungen durchgeführt. Es war darauf zu achten, dass ausschließlich pyrogenfreie Materialien verwendet wurden.

2.7.1. Gewinnung und Kultur muriner Gameten

Um die Ausbeute befruchtungsfähiger Oocyten zu optimieren wurden die weiblichen Spendertiere hormonbehandelt. Für diese Superovulation wurden 8–10 Wochen alte Tiere mit 5 IU hCG (humanem Choriongonadotropin) i.p. und 5 IU PMSG (*pregnant mares serum gonadotropin*) i.p. behandelt. Der Zeitplan für die Hormonbehandlung, Fertilisation und Kultur ist in Tabelle 2.13 dargestellt. Die Präparation und Manipulation der in diesem Abschnitt aufgeführten Methoden erfolgte an einem Olympus SZX 10 Stereomikroskop mit 1.25x planapochromatem Objektiv und Glasheizplatte bei 37 °C. Für die Dokumentation wurde eine Olympus SC50 Kamera und die Olympus CellSens Standard Software verwendet.

Tabelle 2.13.: **Zeitplan der Kultur muriner Keimzellen**

Der Tag-Nacht-Rythmus im Tierhaus betrug je 12 h mit Tageslicht von 7-19 Uhr; die Hormone wurden je um 17 Uhr i.p. appliziert; Präparation befruchtungsfähiger Oocyten 13,5 h nach zweiter Hormonapplikation

Tag der PMSG Injektion Tag -3	Tag der hCG Injektion Tag -1	Tag der Präparation bzw. IVF	2-Zell Embryo Tag 2	4-Zell Embryo Tag 3
Montag	Mittwoch	Donnerstag	Freitag	Samstag
Dienstag	Donnerstag	Freitag	Samstag	Sonntag
Mittwoch	Freitag	Samstag	Sonntag	Montag
Donnerstag	Samstag	Sonntag	Montag	Dienstag
Freitag	Sonntag	Montag	Dienstag	Mittwoch
Samstag	Montag	Dienstag	Mittwoch	Donnerstag
Sonntag	Dienstag	Mittwoch	Donnerstag	Freitag

Zur Gewinnung der murinen Gameten wurden die Tiere mittels Isofluran narkotisiert, getötet und die *Caudae epididymides* beziehungsweise Ovidukte präpariert. Um die Befruchtungsfähigkeit der Gameten zu erhalten, ist darauf zu achten, dass die Gameten nicht mit Blut in Kontakt geraten und kein Fettgewebe am Gewebe verbleibt. Alle hierfür verwendeten Medien wurden steril angesetzt und filtriert.

Gewinnung und Kapazitation muriner Spermien

Es wurden je 90 µl TYH-Medium unter Öl über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ äquilibriert. Die *Caudae epididymides* der männlichen Spendertiere wurden in das Mineralöl

2. Material und Methoden

überführt, radial mit einer Kanüle aufgerissen und in das TYH-Medium (TAKEO UND NAKAGATA, 2011) überführt. Hierbei handelt es sich um ein modifiziertes Krebs-Ringer-Medium. Die Zusammensetzung ist Tabelle 2.14 zu entnehmen. Nach 5 min wurden die Gewebereste entfernt und die Spermien für weitere 55 min kapazitiert. Um die optimale Befruchtungsfähigkeit zu garantieren ist die 60 minütige Kapazitationszeit möglichst exakt einzuhalten. Die männlichen Tiere wurden daher exakt 1 Stunde vor den Weibchen getötet.

Tabelle 2.14.: **Zusammensetzung des TYH-Mediums**

Stoff	Sigma-Aldrich Artikelnummer	Konzentration für 50 ml Stocklösung	Konzentration Medium
NaCl	S5886	5080,4 mM	1181 µl 120 mM
KCl	P5405	1173,7 mM	213 µl 5 mM
MgSO ₄	230391	99,4 mM	603,6 µl 1,2 mM
KH ₂ PO ₄	P5655	99,2 mM	604,8 µl 1,2 mM
CaCl ₂	C7902	1283,9 mM	66,2 µl 1,7 mM
NaHCO ₃	S5761	—	105 mg 25 mM
Glucose	G6152	1387,6 mM	200 µl 5,6 mM
Na-Pyruvat	P4562	840,6 mM	29,7 µl 0,5 mM
Penicillin G	P7794	75 mg/ml	50 µl 75 µg/ml
Streptomycin	S1277	50 mg/ml	50 µl 50 µg/ml
Methyl-β- cyclodextrin	C4555	—	49,2 mg —
PVA	P8136	—	50 mg 0,1 %

Gewinnung von murinen Oocyten

Um die Cumulus-Oocyten-Komplexe (COKs) zu gewinnen, wurden zunächst die Ovidukte im Bereich der *Ampullae* präpariert und in Mineralöl überführt. Die *Ampullae* wurden im Bereich der COKs mittels Präzisionspinzette aufgerissen und diese in HTF-Medium (siehe Tabelle 2.15) überführt. Die Größe des Medientropfens richtete sich nach dem weiteren Vorgehen. Für *in vitro*-Fertilisation wurden die Cumulus-Oocyten-Komplexe in 200 µl, für alle anderen Versuche in 582 µl HTF-Medium überführt, da es für diese nötig war die Oocyten von den Cumulus-Zellen zu befreien. Für diesen Cumulus Verdau wurden den 582 µl weitere 18 µl einer 10 $\frac{mg}{ml}$ Hyaluronidase Stammlösung (in HTF-Medium) zugesetzt und für max. 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Oocyten wurden durch 3 x 200 µl HTF gewaschen. Zum Transfer der freien Oocyten in allen folgenden Schritten wurden Retransferpipetten mit einem Innendurchmesser von 115-124 µm von BioMedical Instruments (D-Zöllnitz) verwendet. Zur Vermeidung von Proteinverunreinigungen wurde für SDS-PAGE und Western Blot Analyse das HTF-Medium ohne Albumin verwendet.

2.7.2. *In vitro*-Fertilisation

Den Cumulus-Oocyten-Komplexen in den 200 µl HTF-Medium (siehe Abschnitt 2.7.1) wurden für 4 h je 10 µl der kapazitierten Spermien zugegeben. Um möglichst motile Sper-

2.7. Zellkultur muriner Keimzellen und Embryonen

Tabelle 2.15.: Zusammensetzung des HTF-Mediums

Die Osmolalität hat 300 ± 10 mOsmol zu betragen; NaHCO_3 und Albumin werden frisch angesetzt

Stoff	Sigma-Aldrich Artikelnummer	Konzentration für 50 ml Stocklösung	Konzentration Medium	
NaCl	S5886	5080,4 mM	1000 μl	101,6 mM
KCl	P5405	1173,7 mM	200 μl	4,7 mM
MgSO_4	230391	99,4 mM	100 μl	0,2 mM
KH_2PO_4	P5655	99,2 mM	200 μl	0,4 mM
CaCl_2	C7902	1283,9 mM	200 μl	5,1 mM
NaHCO_3	S5761	—	105 mg	25 mM
Glucose	G6152	1387,6 mM	100 μl	2,8 mM
Na-Pyruvat	P4562	840,6 mM	20 μl	0,3 mM
Na-Laktat	L7900	60 % _(w/w)	170 μl	0,2 %
Penicillin G	P7794	75 mg/ml	50 μl	75 $\mu\text{g/ml}$
Streptomycin	S1277	50 mg/ml	50 μl	50 $\mu\text{g/ml}$
Albumin	A3311	—	200 mg	4 mg/ml
Phenolrot	P0290	0,5 %	20 μl	0,002 ‰

mien zu verwenden, wurden diese vom Rand des Kapazitationstropfens mit einer nicht zu schmalen Pipettenspitze aufgenommen. Danach wurden die Oocyten beziehungsweise Zygoten durch fünfmaliges Waschen in 150 μl HTF von den Spermien wieder befreit und über Nacht weiter inkubiert. Spätestens 26 h post Insemination sollten sich die Zygoten geteilt haben. Für die Versuche an 2-Zell Embryonen, wurden diese im Zeitraum zwischen 25-27 h nach Insemination verwendet.

2.7.3. Gewinnung von Zygoten

Zur Gewinnung von Zygoten wurden die weiblichen Spendertiere bereits um 13 Uhr hormonbehandelt. Die Verpaarung erfolgte unmittelbar nach hCG Applikation. Die Präparation der Zygoten erfolgte am nächsten Morgen um 10 Uhr auf gleiche Weise wie unter 2.7.1 beschrieben. Da die so gewonnenen Zygoten noch von Cumulus-Zellen umgeben sind, wurden diese zur Kultivierung und für Versuche gemäß Abschnitt 2.7.1 verdaut.

2.7.4. Kultivierung von Präimplantationsembryonen

Sollten die Embryonen weiter als bis zum 2-Zell Stadium kultiviert werden, wurden diese in M16-Medium (WHITTEN, 1971) überführt. Die Zusammensetzung ist Tabelle 2.16 zu entnehmen. Um 4-Zeller zu erhalten, wurden die Embryonen ca. 18 h weiter inkubiert. Sollten die Embryonen bis zur Morula oder Blastocyste kultiviert werden, so wurden diese nach 2 Tagen in neues Medium transferiert.

2. Material und Methoden

Tabelle 2.16.: **Zusammensetzung des M16-Mediums**

Die Osmolalität hat 280 ± 10 mOsmol zu betragen; NaHCO_3 und Albumin werden frisch angesetzt

Stoff	Sigma-Aldrich Artikelnummer	Konzentration für 50 ml Stocklösung	Konzentration Medium	Konzentration
NaCl	S5886	5080,4 mM	930,9 μl	945,9 mM
KCl	P5405	1173,7 mM	203,6 μl	4,8 mM
MgSO ₄	230391	99,4 mM	598,6 μl	1,2 mM
KH ₂ PO ₄	P5655	99,2 mM	599,8 μl	1,2 mM
CaCl ₂	C7902	1283,9 mM	66,6 μl	1,7 mM
NaHCO ₃	S5761	—	105 mg	25 mM
Glucose	G6152	1387,6 mM	200,3 μl	5,6 mM
Na-Pyruvat	P4562	840,6 mM	19,6 μl	0,3 mM
Na-Laktat	L7900	60 % _(w/w)	166 μl	0,199 %
Penicillin G	P7794	75 mg/ml	50 μl	75 $\mu\text{g/ml}$
Streptomycin	S1277	50 mg/ml	50 μl	50 $\mu\text{g/ml}$
BSA	A3311	—	200 mg	4 mg/ml
Phenolrot	P0290	0,5 %	20 μl	0,002 ‰

2.7.5. *Zona pellucida* Verdau

Die Härtung der *Zona pellucida*, also die Prozessierung des ZP2 durch Ovastacin, kann indirekt über eine zunehmende Resistenz gegenüber Proteolyse nachgewiesen werden (GWATKIN, 1964; GULYAS UND YUAN, 1985). In dieser Arbeit wurde hierfür α -Chymotrypsin (C4129, Sigma-Aldrich) verwendet. Die Chymotrypsin-Lösung wurde direkt vor dem Versuch angesetzt und, wie das PBS, für 30 min bei 37 °C vorinkubiert. Zunächst wurde mit den Oocyten beziehungsweise Embryonen ein Cumulus Verdau (siehe Abschnitt 2.7.1) durchgeführt.

Entsprechend der Versuche wurden die Oocyten beziehungsweise Embryonen unterschiedlich weiterbehandelt. In den Kontrollen wurde der Zona Verdau direkt nach dem Cumulus Verdau durchgeführt. In den Versuchen mit aktivierten Oocyten, welche die Kortikalreaktion durchlaufen haben (siehe Abschnitt 2.7.6), wurden diese für weitere 20 min in HTF mit den jeweiligen Zusätzen inkubiert. Darauf folgte der *Zona pellucida* Verdau. Für den *Zona pellucida* Verdau wurden die cumulusfreien Oocyten zweimal in 200 μl PBS + 0,1 % (w/v) PVA gewaschen, einmal in der Chymotrypsin-Lösung ($2 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ in PBS, 0,1 % (w/v) PVA, 1 mM CaCl₂) gewaschen und in einen zweiten Tropfen Chymotrypsinlösung transferiert. Sobald die Oocyten im ersten Tropfen mit Chymotrypsin waren, wurde der Verdau optisch dokumentiert. Hierfür wurden die Oocyten unter dem Stereomikroskop minütlich fotografiert. Alle Schritte erfolgten bei 37 °C.

In der Auswertung wurde der Zeitpunkt des vollständigen Verdau jeder einzelnen *Zona pellucida* optisch bestimmt. Darauf folgte die statistische Analyse. Zunächst wurden die Datensätze dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung unterzogen. Waren diese normalverteilt, erfolgte die Signifikanzbestimmung mittels ungepaartem t-Test. Waren die Datensätze nicht normalverteilt, so erfolgte die Signifikanzbestimmung mittels Mann-Whitney U Test.

2.7.6. Aktivierung von Oocyten

Für die Analyse der Aktivität und Lokalisation war es notwendig die Kortikalreaktion und somit die Ausschleusung von Ovastacin künstlich zu induzieren. Für diese Methode (GWATKIN ET AL., 1976) wurde Calcium Ionophore A23187 (C7522, Sigma-Aldrich) verwendet. Nach TAWIA UND LOPATA (1992) wurden die Oocyten mit einer 2,5 mM Calcium Ionophore Stocklösung in DMSO (A994, Carl-Roth GmbH, D-Karlsruhe) 1:1000 in HTF verdünnt für 5-10 min behandelt und in HTF gewaschen. Auf diese Weise konnte das Exsudat der Kortikalgranula gewonnen oder die Härtung der *Zona pellucida* untersucht werden. Bei dieser Methode bleibt jedoch zu beachten, dass etwa ein Viertel der Kortikalgranula auf diesen Calcium-Influx nicht reagiert und in der Oocyte verbleibt (NICOSIA ET AL., 1977).

2.7.7. Präparation von Oocyten und Embryonen für SDS-PAGE

Für die Gelelektrophorese und anschließende Immunodetektion, wurden die Oocyten beziehungsweise Embryonen dreimal in modifiziertem HTF-Medium gewaschen. Hierfür wurde HTF-Medium (siehe Tabelle 2.15) ohne Albumin mit 0,1 % (w/v) PVA verwendet, damit die Auftrennung in der Gelelektrophorese nicht durch verschlepptes Albumin beeinträchtigt wird. Die so gewaschenen Oocyten / Embryonen wurden in möglichst wenig Volumen mit 3-fach Probenpuffer versetzt und entsprechend Abschnitt 2.5.4 weiterbehandelt. Für die Analyse des Zellüberstands wurde dieser zunächst TCA-DOC gefällt (siehe Abschnitt 2.5.2), bevor dieser in 1-fach Probenpuffer resuspendiert wurde.

2.8. Immunhistologie

Die Präparate wurden gemäß Abschnitt 2.8.1 (Gewebe) und Abschnitt 2.8.2 (Oocyten und Embryonen) erstellt. Die mikroskopische Auswertung wurde an einem Leica DM 6000B durchgeführt. Die Systemspezifikationen finden sich im Anhang in Tabelle E.1. Um die Vergleichbarkeit der Fluoreszenzintensitäten zu gewährleisten, wurde darauf geachtet, dass sowohl die Belichtungszeit als auch die Beleuchtungsintensität konsistent waren. Die Aufnahmen wurden, wie in Abschnitt 2.8.3 erläutert, dekonvuliert, um die Unschärfe herauszurechnen. Soweit die Fluoreszenzintensitäten verglichen werden mussten, wurden diese zunächst mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (SCHNEIDER ET AL., 2012) bestimmt und dann statistisch, wie in Abschnitt 2.7.5 erläutert, ausgewertet.

2.8.1. Immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten

Unmittelbar nach Tötung der Tiere wurden diese mit PBS und darauf mit PBS + 2 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA) über den linken Ventrikel und perforiertem rechtem Atrium perfundiert. Die entnommenen Organe wurden weitere 2 h in PBS + 2 % (w/v) PFA fixiert.

2. Material und Methoden

Nachdem die Organe in PBS gewaschen wurden, erfolgte die Einbettung in Tissue Tek[®] (Sakura, US-Torrance). Hierfür wurden die überschichteten Organe auf einer mit LN₂ auf -196 °C gekühlten Metallplatte tiefgefroren. Es wurden am Kryomikrotom (HM560, Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) Sektionen von 5 µm bei -22 °C erstellt und diese auf Objektträger gezogen, mit einem *PAP Pen* umrandet und bei 4 °C getrocknet. Die Schnitte wurden gemäß Tabelle 2.17 gewaschen und inkubiert. Um nicht nur morphologisch den Zustand der Zellen zu prüfen, wurden zur Kontrolle auch die Aktinfilamente des Zytoskeletts gefärbt.

Hierfür wurde TRITC-Phalloidin (P1951, Sigma-Aldrich) verwendet. Hierfür wurde 0,1 mg/ml TRITC-Phalloidin in Ethanol gelöst und 1:333 der ersten Lösung des letzten Waschschruttes zugegeben.

Als Einbettmedium diente Mowiol 4-88 (Carl Roth GmbH, D-Karlsruhe). Dieser Polyvinylalkohol wurde nach Herstellerprotokoll gelöst und dieser Lösung mit 0,5 mg/ml 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) als Marker für doppelsträngige DNA und 25 mg/ml 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO) als Bleichschutz für die Fluorophore zugesetzt.

2.8.2. Immunhistologische Färbung von Oocyten und Embryonen

Die Oocyten beziehungsweise Embryonen wurden in Blockschälchen nach der in Tabelle 2.18 angegebenen Reihenfolge behandelt. Sollten die Oocyten und Embryonen in den Lokalisationsversuchen für die Antikörper impermeabel bleiben, so wurde in allen Schritten mit PBS-T dieses durch PBS ersetzt. Soweit es sinnvoll war, wurden die kortikalen Granula als Kontrolle der Kortikalreaktion gefärbt. Hierzu wurde *Lens culinaris* Agglutinin (LCA) verwendet, welches Oligosaccharide erkennt. Neben Anderen bindet dieses Lectin in den Kortikalgranula vor allem an α -verknüpfte Mannose der glykosylierten Proteine. Für diese in DUCIBELLA ET AL. (1995) beschriebene Methode wurde an Rhodamin gekoppeltes LCA (Vectorlabs, US-Malvern) verwendet. Hierzu wurde der 2. Antikörperlösung 10 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ LCA-Rhodamin zugegeben.

Als Einbettmedium diente, wie in Abschnitt 2.8.1 beschrieben, Mowiol 4-88. Um die Oocyten, welche einen Durchmesser von ca. 80 µm inklusiv *Zona pellucida* haben, durch das Eindeckeln nicht zu beschädigen, wurden die Objektträger besonders präpariert. Es wurden je 2 Lagen tesafilm[®] transparent auf die Ränder eines Objektträgers geklebt.

Tabelle 2.17.: **Reihenfolge der Inkubation für immunhistologische Färbung an Gewebeschnitten** Die Schritte erfolgten bei RT mit jeweils ca. 200 µl Volumen; die Inkubation mit dem 1. Antikörper erfolgte bei 4 °C

Schritt	Lösung	Dauer
Waschen I	PBS-T	10 min
Waschen II	PBS + 50 mM NH ₄ Cl	10 min
Waschen I	PBS-T	10 min
Blockieren	PBS + 10 % Ziegenserum	1 h
Waschen I	PBS-T	2 x 10 min
Inkubation I	1. Antikörper	3-4 h
Waschen I	PBS-T	2 x 10 min
Inkubation II	2. Antikörper	1 h
Waschen I	PBS-T	2 x 10 min

Hierdurch wurde ein Abstand von ca. 150 μm zwischen Objektträger und Deckglas erzeugt. Es wurden je 50 μl des Einbettmediums auf den tesafilm[®] und in die Mitte des Objektträgers pipettiert. Beim Transfer der Oocyten in das Einbettmedium ist darauf zu achten, diese nicht punktuell sondern verteilt in das Medium zu überführen, da diese sonst aufschwimmen und verloren gehen können. Die Präparate wurden mindestens 7 Tage bei 4 °C getrocknet.

2.8.3. Dekonvolution

Die durch Unschärfe und Streulicht beeinträchtigte Bildqualität wurde mittels Dekonvolution versucht zu verbessern. Ein Mikroskop stellt lediglich die Abbildung eines Objektes dar. Die sogenannte Punktspreizfunktion (PSF) gibt an wie ein punktförmiges Objekt durch ein solches System dargestellt wird. Es folgt aus der Gleichung:

$$g(\text{Bild}) = h(\text{PSF}) * f(\text{Objekt}) \quad (2.3)$$

g = Bildfunktion, h = Funktion der PSF, f = Funktion des Objektes

dass sich das Bild aus der Faltung (Konvolution) des realen Objektes und der PSF ergibt. Der Konvolutionsoperator ($*$) beinhaltet ein Integral über den gesamten Raum. Ist die PSF bekannt, kann durch Umstellung der Gleichung auf das Objekt rückgefaltet (dekonvolviert) werden. Die PSF kann entweder experimentell bestimmt oder theoretisch aus der Optik errechnet werden. In dieser Arbeit wurden die theoretischen PSF verwendet. Für die gesamte Berechnung wurde die HuygensCore Software (Scientific Volume Imaging b.v., NL-Hilversum) über den Remote Manager der Johannes-von-Gutenberg Universität Mainz (<https://imbhuygens.imb.uni-mainz.de/huygens/>) verwendet. Es wurde der „Classic Maximum Likelihood Estimation“ Algorithmus verwendet. Die genauen Einstellungen finden sich in Abbildung E.2. Die Nachbearbeitung der Aufnahmen erfolgte mittels der ImageJ Software (SCHNEIDER ET AL., 2012).

Tabelle 2.18.: **Reihenfolge der Inkubation für immunhistologische Färbung an Oocyten und Embryonen** Die Schritte erfolgten bei RT mit jeweils ca. 300 μl Volumen; die Inkubation mit dem 1. Antikörper erfolgte bei 4 °C; Lösungen mit PVA enthalten zusätzlich 0,1 % Polyvinylalkohol als Pipettierschutz; PFA = Paraformaldehyd, ü.N. = über Nacht

Schritt	Lösung	Dauer
Waschen I	PBS _{PVA}	2 x 5 min
Fixieren	PBS _{PVA} + 2 % PFA	60 min
Waschen II	PBS-T _{PVA}	2 x 5 min
Waschen III	PBS _{PVA} + 0,1 M Glycin	60 min
Waschen II	PBS-T _{PVA}	5 min
Blockieren	PBS _{PVA} + 10 % Ziegen Serum	60 min
Waschen II	PBS-T _{PVA}	2 x 5 min
Inkubation I	1. Antikörper _{PVA}	ü.N.
Waschen II	PBS-T _{PVA}	2 x 5 min
Inkubation II	2. Antikörper _{PVA}	1h
Waschen II	PBS-T _{PVA}	3 x 5 min

2.9. Gentechnik

In diesem Abschnitt finden sich alle Methoden, welche zum Nachweis der Ovastacinexpression in Organen der Hausmaus verwendet wurden.

2.9.1. Isolation und reverse Transkription von RNA

Zur Gewinnung von mRNA wurden die Spendertiere getötet und mit PBS perfundiert (siehe Abschnitt 2.8.1). Die frisch entnommenen Gewebe wurden mit LN₂ auf -196 °C gekühlt und mit einem ebenso gekühlten Perkussionsmörser pulverisiert. Die RNA Isolation erfolgte mittels TRI Reagent[®] (T9424, Sigma-Aldrich, D-Taufkirchen) nach Herstellerprotokoll. Um die in dieser RNA enthaltene mRNA in cDNA zu transkribieren, wurde das Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (K1641, Thermo-Fisher Scientific Inc., US-Waltham) verwendet. Hierfür wurde die RNA-Konzentration gemäß Abschnitt 2.5.1 bestimmt und 0,5-1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Es wurde ebenso nach Herstellerprotokoll vorgegangen. Alle Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen.

Auf diese Weise konnte mit spezifischen Primern für die Ovastacin mRNA beziehungsweise cDNA die Expression von Ovastacin in allen Geweben getestet werden.

2.9.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Für die reverse Transkription sowie für die Polymerase-Kettenreaktion war es nötig die DNA- beziehungsweise RNA-Konzentration zu kennen. Hierfür wurde die Konzentration photometrisch bestimmt. Wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben, wurde die optische Dichte bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge bestimmt. Es wurde ein Nullabgleich mit 320 nm durchgeführt.

$$c \left[\frac{ng}{\mu l} \right] = OD_{260} * V * F \quad (2.4)$$

V = Verdünnungsfaktor F = Multiplikationsfaktor

Gemäß Gleichung 2.4 wurde die Konzentration errechnet. Als Multiplikationsfaktor wurde für dsDNA 50 $\frac{ng}{\mu l}$, für ssDNA 33 $\frac{ng}{\mu l}$ und für RNA 40 $\frac{ng}{\mu l}$ verwendet.

Über das Verhältnis der OD₂₆₀ und der OD₂₈₀ lassen sich Aussagen über die Proteinkontamination der Probe machen. Der Quotient ($\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$) reiner DNA beziehungsweise RNA Lösungen liegt bei 1,8 – 2. Wobei hier auf die Zusammensetzung des Puffers zu achten ist (WILFINGER ET AL., 1997).

2.9.3. Polymerase-Kettenreaktion

Mithilfe der PCR (*polymerase-chain-reaction*) kann *in vitro* DNA vervielfältigt werden. Hierbei wird die ursprüngliche doppelständige DNA bei hoher Temperatur in ihre Einzelstränge zerlegt und die Temperatur wieder gesenkt, sodass sich kurze spezifische Oli-

gonukleotide, die Primer, an ihre Zielsequenz anlagern können. Durch Zugabe einer hitzestabilen Polymerase können die über die Primer vordefinierten Abschnitte repetitiv synthetisiert werden. Diese von SAIKI ET AL. (1985) beschriebene Methode wurde in dieser Arbeit genutzt, um die in DNA revers transkribierte RNA auf die Expression von Ovastacin zu untersuchen.

Die dafür notwendigen spezifischen Primer für Ovastacin, als auch Primer für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), welche als Positivkontrolle dienen, wurden über die Web-Applikation Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) des *National Center for Biotechnology Information* designt.

Tabelle 2.19.: **Sequenzen der Primer zum Nachweis von Ovastacin auf mRNA-Ebene**

Der Bezug der Primer erfolgte über biomers.net GmbH (D-Ulm); als 0,1 mM Stammlösung in H₂O_{DEPC} (Carl-Roth GmbH, D-Karlsruhe) gelöst

Bezeichnung	Sequenz (5´-3´)	Produkt
Ovastacin forward	TTC CTA TGG CGG GGT GTT TC	386 bp
Ovastacin reverse	GCA GAC CCG GGT GAT ATC TG	
GAPDH forward	GCG AGA CCC CAC TAA CAT CA	832 bp
GAPDH reverse	GAG TTG GGA TAG GGC CTC TCT T	

Für beide Primerpaare wurde das in Tabelle 2.20 dargestellte PCR-Programm verwendet. Für die PCR wurde die One *Taq*[®] DNA Polymerase (New England Biolabs, D-Frankfurt) verwendet. Es wurde entsprechend des Herstellerprotokolls vorgegangen. Es wurden je 2 µl der Probe aus der reversen Transkription (siehe Abschnitt 2.9.1) für einen 20 µl Ansatz verwendet. Die Primerkonzentration im Endansatz betrug 0,5 µM. Zusätzlich wurde dem Ansatz Betain (1 M im Endansatz) zugegeben.

Die Primer und PCR-Bedingungen für die Genotypisierung der verwendeten Tiere ist Abschnitt 2.1 zu entnehmen.

Tabelle 2.20.: **PCR-Programm zum Nachweis von Ovastacin auf mRNA-Ebene**

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	
Denaturierung	94	120	↻ 40x
Denaturierung	94	30	
Anealing	58	30	
Elongation	72	90	
Finale Elongation	72	300	

2.9.4. Agarose Gelelektrophorese

Für die Auswertung der PCR wurden die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt. Aufgrund der negativen Ladung des Phosphatrückgrats der DNA, wandert diese im elektrischen Feld zur Anode. Lineare DNA kann so der Größe nach aufgetrennt werden.

Es wurden 1,5 % (w/v) Agarosegele mit TAE-Puffer (siehe Tabelle 2.21) hergestellt. Durch Zugabe von Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert und unter Anregung im UV-Licht fluoresziert, wurde die DNA im Gel sichtbar gemacht. Als Laufpuffer diente ebenso TAE-Puffer. Als DNA-Marker und Ladepuffer wurde 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs, D-Frankfurt) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei konstanten 100 V.

Tabelle 2.21.: **Zusammensetzung des TAE-Puffers** Der pH wird mit Eisessig eingestellt

Puffer	Zusammensetzung
TAE	40 mM Tris pH = 8 1 mM Na ₂ EDTA

2.10. Bioinformatik

In diesem Abschnitt sind alle Methoden aufgeführt, die zur Erstellung von Sequenz-Alignments und zur Erstellung molekularer Stammbäume der C-terminalen Domäne des Ovastacins angewendet wurden.

2.10.1. Datenbankanalyse nach Ovastacinsequenzen anderer Säugetiere

Für die Datenbankanalyse nach derzeit verfügbaren Proteinsequenzen für Säugetier-Ovastacine wurde auf verschiedene Datenbanken zugegriffen. Zunächst wurden die Datenbanken (<http://www.uniprot.org>) und (<http://www.ensembl.org>) nach Ovastacinen durchsucht. Ovastacine weiterer Spezies konnten mittels *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) in der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) identifiziert werden.

2.10.2. Sequenz-Alignment der mammalen Ovastacine

Die Sequenz-Alignments wurden mittels der ClustlX Software, Version 2.1, (<http://www.clustal.org>) erstellt. Die Berechnung des Alignments erfolgte unter den von ClustlX vorgegebenen Standardeinstellungen. Es erfolgte eine manuelle Nachbearbeitung des Alignments. Für die weitere Berechnung der Stammbäume wurde das Alignment als .nxs gespeichert.

2.10.3. Erstellung molekularer Stammbäume

Aufgrund der zwischen den Spezies sehr unterschiedlichen Sequenzlängen und des damit unpräziseren Alignments im c-terminalen Bereich, wurden für die Berechnung der molekularen Stammbäume nur die N-terminalen 250 Aminosäuren des Alignments verwendet.

Die Berechnung der molekularen Stammbäume erfolgte mittels der „MrBayes“ Software (<http:// mrbayes.sourceforge.net>), Version 3.2.6. Hierbei werden unter Nutzung einer *likelihood* Funktion und eines Algorithmus des Markov-Ketten-Monte-Carlo-Verfahrens Stammbäume möglichst hoher Wahrscheinlichkeit gesammelt. Aus dem Alignment werden mehrere Stammbäume, deren Wahrscheinlichkeit *a posteriori* bewertet wird, erzeugt. Der mit der höchsten Wahrscheinlichkeit dient als Basis für die nächste Iteration. Konvergiert die Wahrscheinlichkeitsverteilung, können die Stammbäume für einen Konsensusbaum verarbeitet werden.

Zur Berechnung der Stammbäume wurden vor END; der .nxs-Datei folgende Zeilen eingefügt:

```
BEGIN MRBAYES;
log start filename=filename.log.txt;
set autoclose=yes;
prset aamodelpr=fixed(WAG);
showmodel;
mcmc ngen=1000000 samplefreq=100 printfreq=10 nchains=4 savebrlens=yes;
log stop;
```

Die Zusammenfassung und Ausgabe des Konsensusstammbaumes erfolgte durch die Kommando Eingabe:

```
sumt relburnin=yes burninfrac=0.25
```

Für die grafische Darstellung des erstellten Konsensusbaumes wurde die Dendroscope Software, Version 3.5.7, (<http:// ab.inf.uni-tuebingen.de/ data/ software/ dendroscope3/ download/>) verwendet.

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse sind entsprechend der Fragestellung gegliedert. Die Versuche, welche zu den Ergebnissen, die Abbildungen 3.4 bis 3.6 zeigen, führten, wurden unter meiner Aufsicht und Anleitung von Michael Kuske im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt.

3.1. Funktionelle Analyse von Ovastacin

Für eine funktionelle Analyse von Ovastacin wurden zunächst Oocyten mittels Antikörpern, welche Rückschlüsse auf jede einzelne Domäne zulassen, untersucht, um das Prozessierungsmuster vor Freisetzung von Ovastacin beurteilen zu können. Wie Abbildung 3.1 zu entnehmen, ist zeigen sich in rekombinantem murinen Ovastacin (rm Ovastacin) Signale bei ca. 52 und 45 kDa in der Form einer Doppelbande, wobei der anti-Ovastacin Antikörper lediglich die Größere der beiden erkennt. Unterhalb von 20 kDa erkennen der anti-Proovastacin sowie der anti-Ovastacin Antikörper weitere Fragmente.

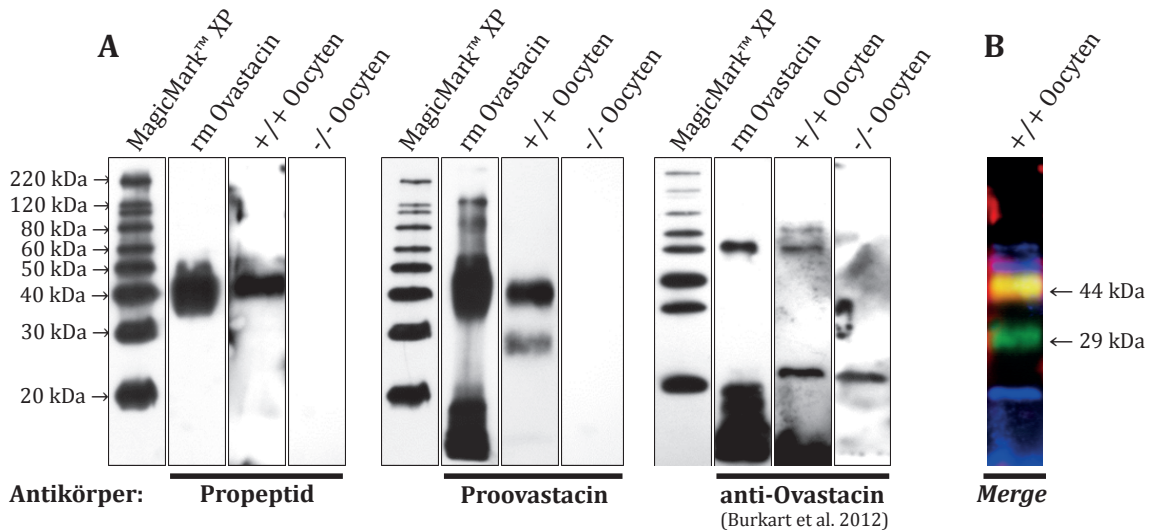


Abbildung 3.1.: **Ovastacin in Oocyten** je 80-100 cumulusfreie Wildtyp (+/+) bzw. Ovastacin-defiziente (-/-) Oocyten und 0,6 µg rekombinantes murines (rm) Ovastacin wurden in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran gebロットet und mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert. **A**) Es wurden jeweils die gleichen Proben mit dem anti-Propeptid-, dem anti-Proovastacin- und dem gegen den C-terminus gerichteten anti-Ovastacin-Antikörper inkubiert. **B**) Überlagerung der drei Antikörper: anti-Propeptid (rot), anti-Proovastacin (grün) und anti-Ovastacin (blau)

In den Oocyten zeigt sich Ovastacin als deutliche Einzelbande entsprechend einer Masse

3. Ergebnisse

von etwa 44 kDa mit dem anti-Propeptid und dem anti-Proovastacin Antikörper. Diese Bande wird nicht von dem anti-Ovastacin Antikörper erkannt. Dieser Antikörper detektiert bei ca. 52 kDa und über 60 kDa zwei Proteinbanden. Im Gegensatz zu den anderen Antikörpern zeigt dieser auch eine Kreuzreaktivität mit Ovastacin-defizienten Oocyten. Das gleiche Verhalten zeigt auch der anti-C-Terminus Antikörper (siehe Anhang Abbildung F.1).

Die Überlagerung der drei Antikörper, wie sie in Abbildung 3.1 B dargestellt ist, lässt eine genauere Beschreibung der Prozessierung zu. Die Bande von 44 kDa ist sehr wahrscheinlich aufgrund der fehlenden Signale mit dem anti-Ovastacin Antikörper bereits C-terminal prozessiert, beinhaltet aber noch das Propeptid. Da ausschließlich der anti-Proovastacin Antikörper das Protein von 29 kDa erkennt, kann es sich hierbei nur um die einzelne aktive katalytische Domäne ohne Propeptid und C-Terminus handeln. Ovastacin liegt somit bereits in den Oocyten zum Teil prozessiert vor.

Um den Prozessierungsgrad nicht nur in den Oocyten vor, sondern auch nach der Kortikalreaktion außerhalb der Oocyten untersuchen zu können, wurden die Oocyten künstlich mit Ca-Ionophore A23187 aktiviert.

3.1.1. Freisetzung und Aktivierung von Ovastacin

Um herauszufinden wie Ovastacin *in vivo* aktiviert wird, wurde zunächst darauf getestet, ob es bereits aktiv freigesetzt wird oder, wie bei den meisten anderen Astacinen, extrazellulär von einer Serinprotease aktiviert werden muss. Hierfür wird die Aktivität von Ovastacin indirekt über die Prozessierung beziehungsweise die Härtung der *Zona pellucida* gemessen (siehe Abbildung 3.2). Die „unprozessierte“ *Zona pellucida* von frisch präparierten Wildtyp Oocyten zeigt eine Verdauzeit von etwa $18,8 \pm 7,2$ Minuten (Mittelwert mit Standardabweichung), während die Verdauzeit mit $36,7 \pm 1,4$ Minuten im Zweizellstadium signifikant abweicht. Wird die Kortikalreaktion in den Oocyten durch Ca-Ionophore ausgelöst, so führt dies zu einer signifikanten Härtung der *Zona pellucida*, welche sich in einer mittleren Verdauzeit von $35,2 \pm 3,2$ Minuten widerspiegelt. Diese Härtung erreicht allerdings noch nicht die Verhältnisse im frühen Embryo. Dieser Härtungsprozess kann durch Zugabe von rekombinantem murinen Fetuin-B nahezu komplett verhindert werden ($19,6 \pm 6,2$ min), was darauf hindeutet, dass diese Härtung auf Ovastacin zurückzuführen ist. Sollte Ovastacin ausschließlich extrazellulär von einer Serin- oder Cysteinprotease aktiviert werden, so sollte eine Supplementierung mit Pefabloc SC (AEBSF, 4-(2-Aminoethyl)benzensulfonyl-fluorid-hydrochlorid) und E64 die Härtung ebenso unterbinden wie Fetuin-B. Da sich die Härtung der so behandelten Eizellen mit einer Verdauzeit von $34,9 \pm 2,4$ Minuten nicht von den nur aktivierten unterscheidet, ist gezeigt, dass Ovastacin nicht erst extrazellulär aktiviert werden muss, um zur Härtung der *Zona pellucida* zu führen.

Eine demzufolge wahrscheinlich intrazelluläre Aktivierung von Ovastacin ist allerdings äußerst schwierig zu untersuchen. Selbst wenn man unrealistischerweise davon ausgeht, dass es sich bei den im Zuge der Befruchtung aus den Kortikalgranula freigesetzten 100 pg Protein (MOLLER UND WASSARMAN, 1989; GREEN, 1997) zur Hälfte um Ovastacin handelt, so sind dies lediglich etwa 1 fmol ($1 * 10^{-15}$ mol oder ca. $6 * 10^6$ Moleküle) pro Oocyte. Dies schränkt die Untersuchungsmöglichkeiten zum einen stark ein und würde

3.1. Funktionelle Analyse von Ovastacin

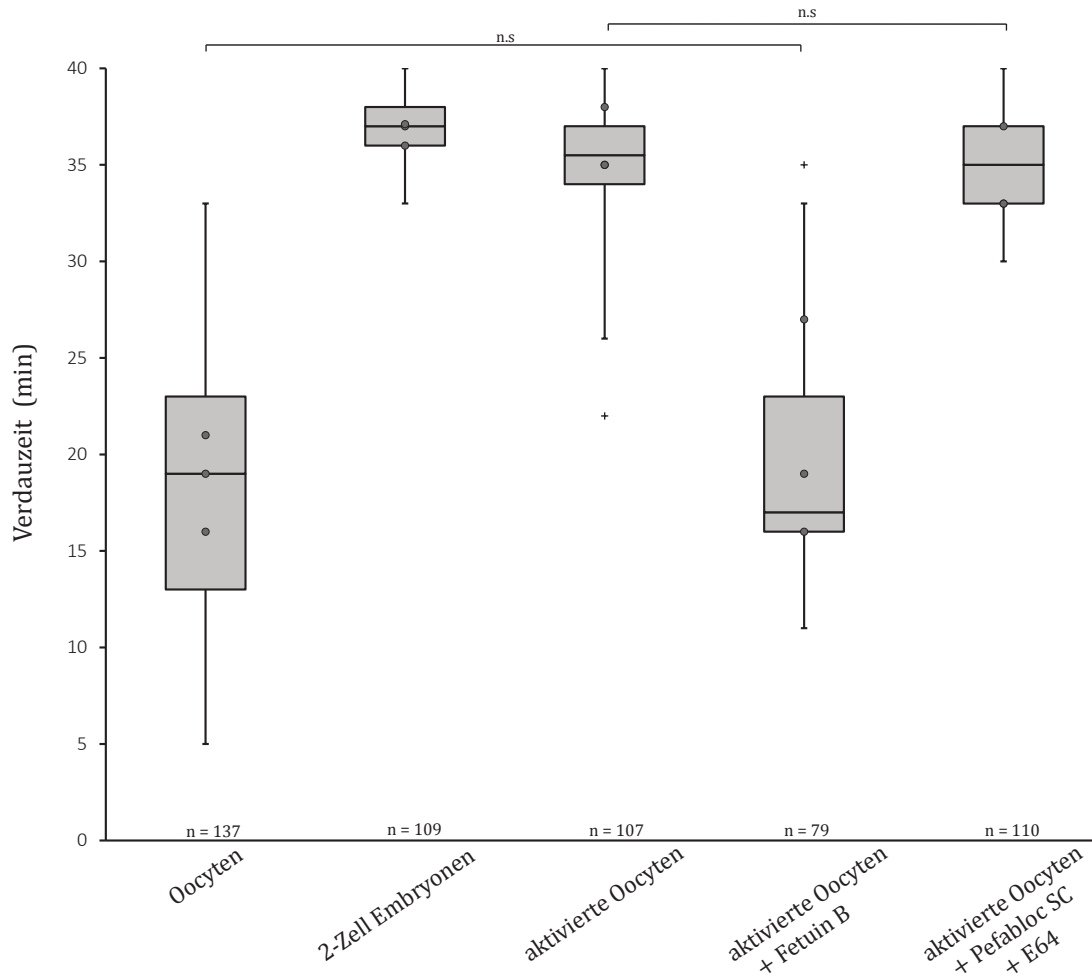


Abbildung 3.2.: **Prozessierung der *Zona pellucida* durch Ovastacin** Verdauzeit der *Zona pellucida* durch α -Chymotrypsin ($80 \mu\text{M}$); jeder Boxplot repräsentiert drei Einzelversuche (Mittelwert der Einzelversuche als Punkt dargestellt) mit je mindestens 20 Oocyten/Embryonen; Embryonen gehen aus *in vitro* Fertilisation hervor; Aktivierung mit Ca-Ionophore ($2,5 \mu\text{M}$) für 5 min und 25 min weitere Inkubation; Fetuin-B $2,5 \mu\text{M}$; Pefabloc SC $250 \mu\text{M}$, E 64 $50 \mu\text{M}$; alle Versuche nach Mann-Whitney U Test (bis auf die als nicht signifikant (n.s.) angegebenen) signifikant ($p < 0,01$); Ausreißer ($> 1,5$ facher Interquartilsabstand) mit + gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

gleichzeitig zu einem enorm hohen Tierverbrauch führen, um die Aktivierung genau zu studieren. Um einen Aktivierungsverlauf zu zeigen wurde daher zunächst per SDS-Page und Western-Blot das Prozessierungsmuster und die Freisetzung in Oocyten und Embryonen untersucht.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3 dargestellt. Die beiden bereits beschriebenen Ovastacin-spezifischen Banden von 29 und 44 kDa sind erst nach Aktivierung mit Ca-Ionophore im Überstand, dem Kortikalgranula-Exsudat, nachweisbar. Auffällig ist allerdings, dass trotz Aktivierung und ausgelöster Kortikalreaktion weiterhin das Gros an Ovastacin in der Oocytenfraktion detektierbar ist. Um auszuschließen, dass es sich dabei um Ovastacin handelt, welches affin an ZP2 gebunden ist, wurde der Versuch mit *Zona pellucida* freien Oocyten wiederholt (siehe Abbildung 3.3 B). Auch hier ist Ovastacin weiterhin deutlich detektierbar. Im Überstand ist allerdings kaum Ovastacin nachweisbar. Wird der Versuch mit *in vitro* fertilisierten Zygoten durchgeführt (siehe Abbildung 3.3 C), so bleibt Ovastacin auch weiterhin im frühen Embryo und dessen Kulturüberstand nachweisbar. Die Versuche zeigen sowohl nach künstlicher als auch natürlicher Kortikalreaktion das gleiche Muster der Ovastacinfreisetzung.

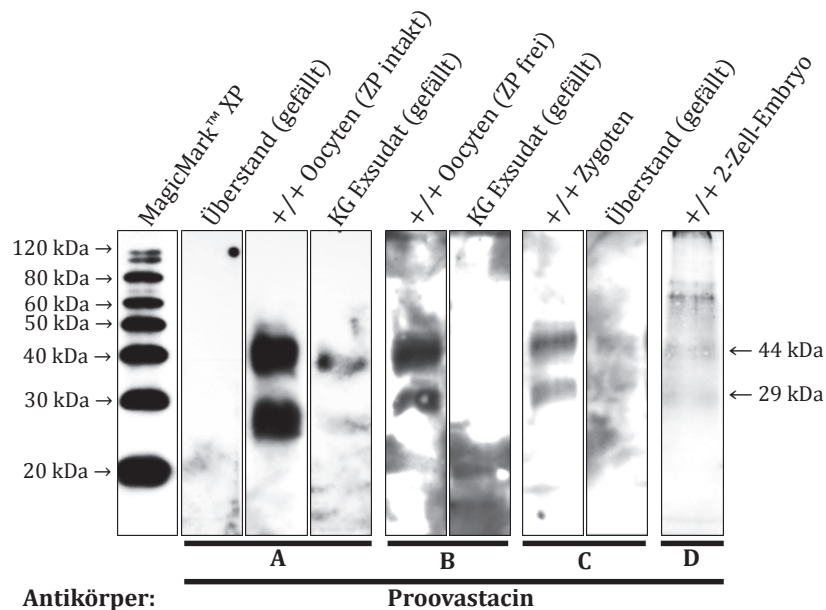


Abbildung 3.3.: **Ovastacin in Oocyten** je 80-100 cumulusfreie Oocyten bzw. Embryonen wurden in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit dem anti-Proovastacin Antikörper inkubiert. **A)** Wildtyp (+/+) Oocyten wurden gemäß Abschnitt 2.7.6 für 10 min aktiviert; die Kortikalgranula (KG) Exsudate wurden mittels TCA gefällt. **B)** Oocyten wurden mittels α -Chymotrypsin von der *Zona pellucida* befreit und wie A) weiterbehandelt. **C)** *in vitro* befruchtete Oocyten, Überstand TCA gefällt **D)** *in vitro* befruchtete Zweizeller.

Da es zu keinem deutlichen Anstieg der Intensität der 29 kDa Bande im Verhältnis zum 44 kDa Signal kommt scheint es nach Freisetzung zumindest *in vitro* zu keiner

3.1. Funktionelle Analyse von Ovastacin

detektierbaren Prozessierung beziehungsweise Aktivierung von Ovastacin zu kommen. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen in Abbildung 3.2. Wie Abbildung 3.3 D zeigt sind sogar im Zweizellstadium noch geringe Mengen Ovastacin nachweisbar. Diese Ergebnisse decken sich teilweise mit denen in Abschnitt 3.1.2.

3.1.2. Lokalisation und Verbleib von Ovastacin nach Befruchtung

Um die Ergebnisse aus Abschnitt 3.1.1 auf die Lokalisation und den Verbleib von Ovastacin zu untersuchen, wurden Oocyten und Embryonen immunhistologisch mit allen verfügbaren Antikörpern untersucht. Als Negativkontrolle dienten Ovastacin-defiziente Tiere.

Die Ergebnisse in Abbildung 3.4 zeigen die Lokalisation des Propeptid vor und nach der Befruchtung. Vor der Befruchtung ist das Propeptid des Ovastacins im Kortex der Oocyte deutlich nachweisbar (siehe Abbildung 3.4 A2). Nach der Befruchtung ist es nicht mehr zu detektieren (siehe Abbildung 3.4 C2). Die Ovastacin-defizienten Tiere zeigen keine Kreuzreaktivität. Das LCA-Signal zeigt allerdings im Embryo des Wildtyps noch schwache Signale, welche im defizienten Embryo nicht auftreten.

Auch der C-Terminus ist zunächst im Kortex der Oocyte zu erkennen (siehe Abbildung 3.5 A2), allerdings verschwindet das Signal im frühen Embryo nicht vollständig (siehe Abbildung 3.5 C2). Es bleibt ein schwaches aber deutliches Signal am Plasmalemma erhalten. Die Negativkontrolle zeigt auch hier keine Kreuzreaktivität, der Embryo allerdings ein erhöhtes unspezifisches „Rauschen“. Auch der zweite gegen die C-terminale Domäne gerichtete Antikörper deutet auf einen Verbleib eines Teils des Proteins am Plasmalemma nach der Befruchtung hin (siehe Anhang Abbildung F.3).

Der Blick auf die Ergebnisse des anti-Proovastacin Antikörpers (siehe Abbildung 3.6) zeigt die bekannte kortikale Lokalisation vor Befruchtung in den Oocyten. Allerdings ist im zweizelligen Embryo im Bereich des Oolemma immer noch ein deutliches Signal zu erkennen, ohne dass die Negativkontrolle Signale zeigt.

Die Ergebnisse aller Antikörper legen nahe, dass das Propeptid nach Kortikalreaktion freigesetzt wird, während zumindest kleine Mengen der C-terminalen Domäne beziehungsweise dieser und der katalytischen Domäne an der Oocyte verbleiben. Auffällig ist auch, dass fast alle Embryonen des Wildtyps noch Interaktionen mit LCA zeigen, während dies im Ovastacin-defizienten Embryo nicht der Fall ist.

Um diese potentielle Interaktion von LCA mit Ovastacin zu untersuchen, wurden Lysate aus Wildtyp und Ovastacin-defizienten Oocyten gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Immunoblot untersucht. Als Positivkontrollen dienten Vitellogenin aus *Platyneris dumerilii* (von Prof. Dr. Ulrich Hoeger (Johannes Gutenberg-Universität Mainz) zur Verfügung gestellt) für das LCA-Biotin und rekombinantes murines Ovastacin für den anti-Proovastacin Antikörper. Wie der Abbildung 3.7 A links zu entnehmen ist, detektiert LCA in den Oocytenlysaten diverse Proteine. Allerdings ist auch deutlich, dass den Ovastacin-defizienten Oocyten im Vergleich zum Wildtyp zwei Banden auf der Höhe von 44 kDa beziehungsweise 29 kDa fehlen. Da diese beiden Banden mit dem anti-Proovastacin Antikörper auch nur im Wildtyp nachweisbar sind und sich, wie Abbildung 3.7 B zeigt, überlagern, ist gezeigt, dass LCA murines Ovastacin erkennt. Die verbleibenden Signale des LCA nach Befruchtung in der Immunhistologie von Wildtyp Embryonen können somit auf Ovastacin zurückgeführt werden.

3.1. Funktionelle Analyse von Ovastacin

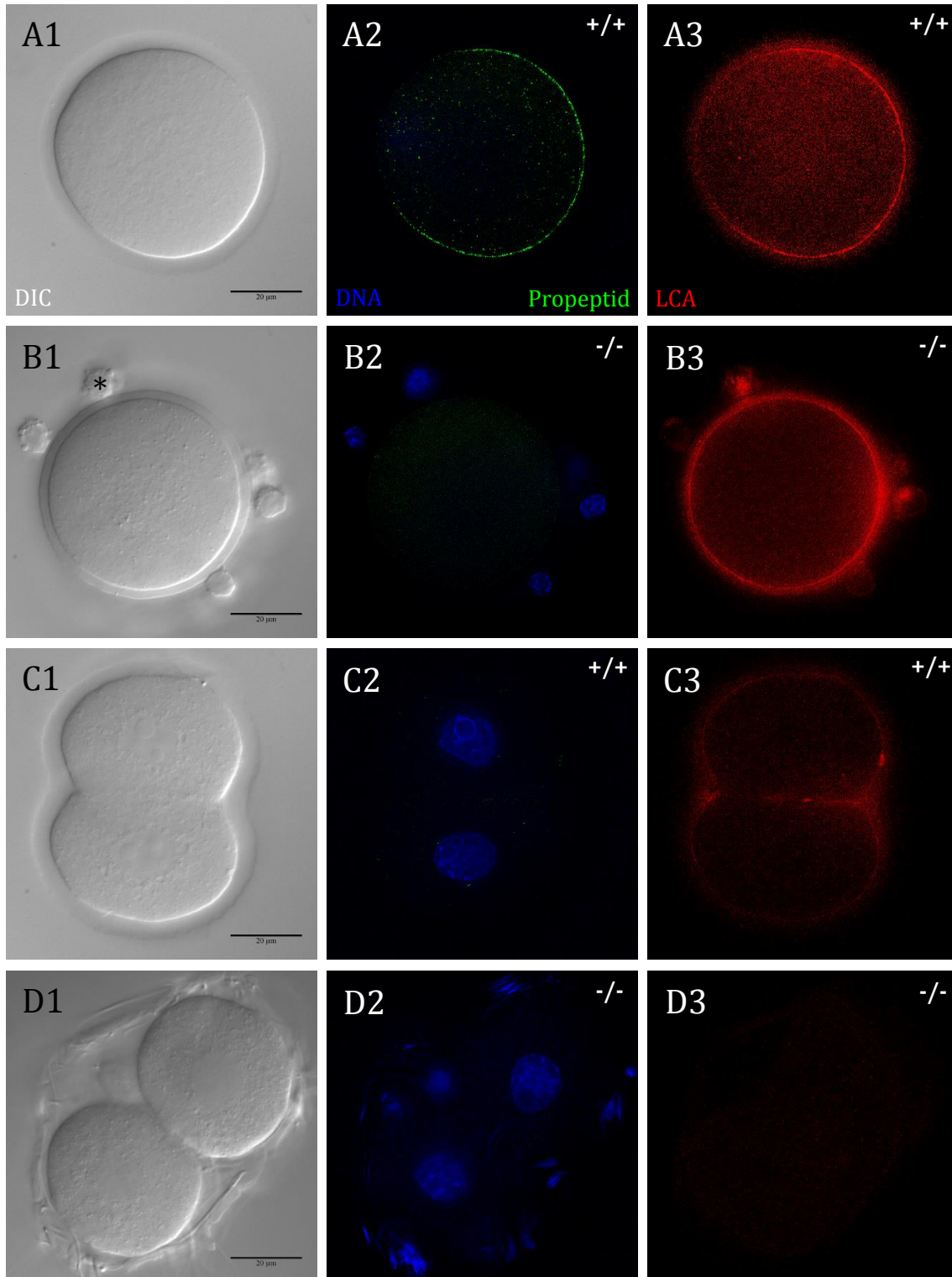


Abbildung 3.4.: **Immunhistologie von Oocyten/Embryonen 1 (anti-Propeptid Antikörper)** lichtmikroskopische Aufnahme (nach Dekonvolution), 100x Objektiv, Cumulus (*); **A**) Wildtyp (+/+) **B**) Ovastacin-defiziente (-/-) Oocyte **C**) Wildtyp **D**) Ovastacin-defizienter Embryo; **1**) differentieller Interferenzkontrast (DIC) **2**) DNA Färbung mittels DAPI (blau) und anti-Propeptid Antikörper (grün) **3**) *Lens culinaris* Agglutinin (LCA)(rot)

3. Ergebnisse

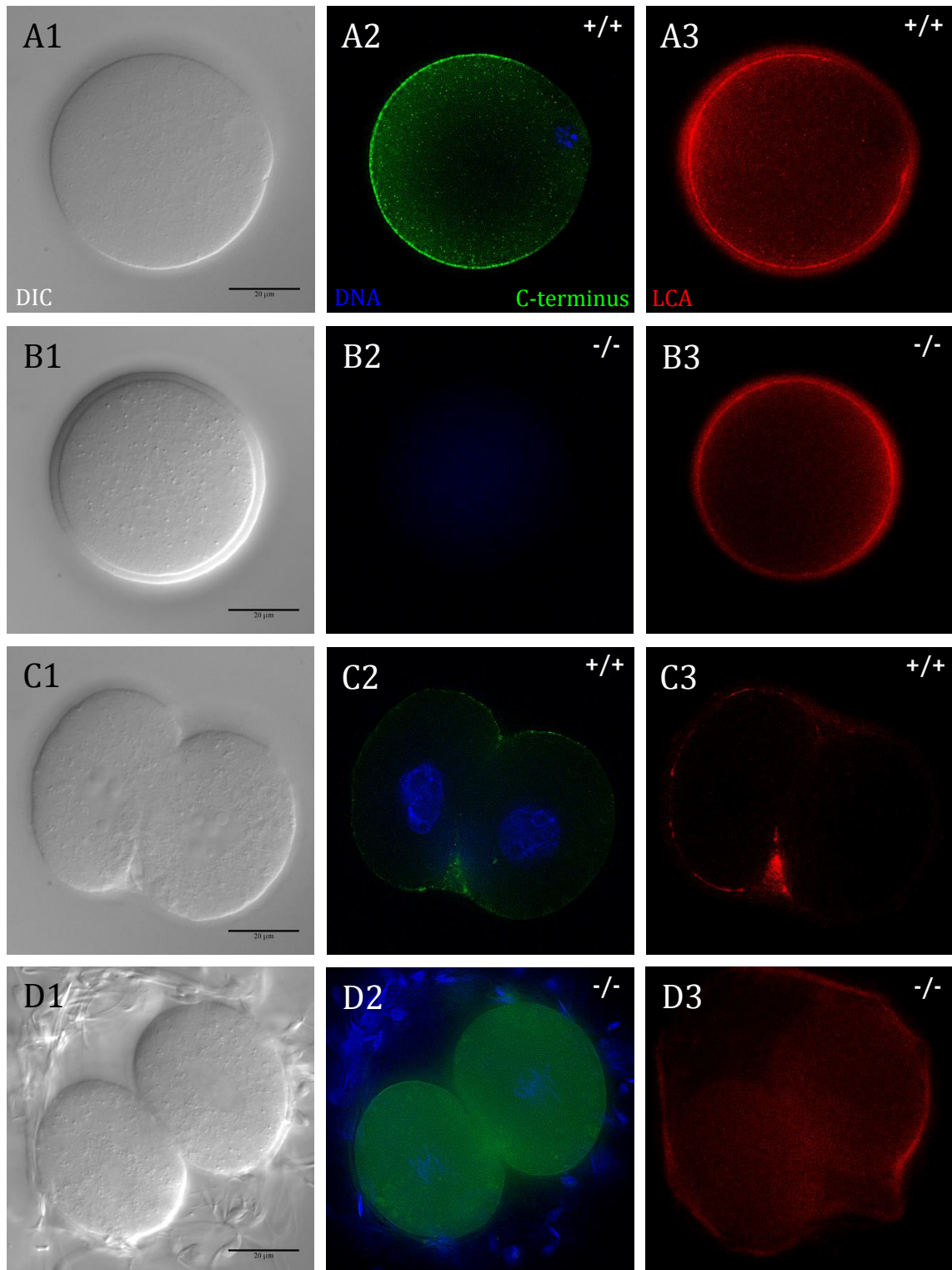


Abbildung 3.5.: Immunhistologie von Oocyten/Embryonen 2 (anti-Ovastacin Antikörper aus BURKART ET AL. (2012)) lichtmikroskopische Aufnahme (nach Dekonvolution), 100x Objektiv; **A**) Wildtyp (+/+) **B**) Ovastacin-defiziente (-/-) Oocyte **C**) Wildtyp **D**) Ovastacin-defizienter Embryo; **1**) differenzieller Interferenzkontrast (DIC) **2**) DNA Färbung mittels DAPI (blau) und C-terminaler anti-Ovastacin Antikörper (grün) **3**) *Lens culinaris* Agglutinin (LCA)(rot)

3.1. Funktionelle Analyse von Ovastacin

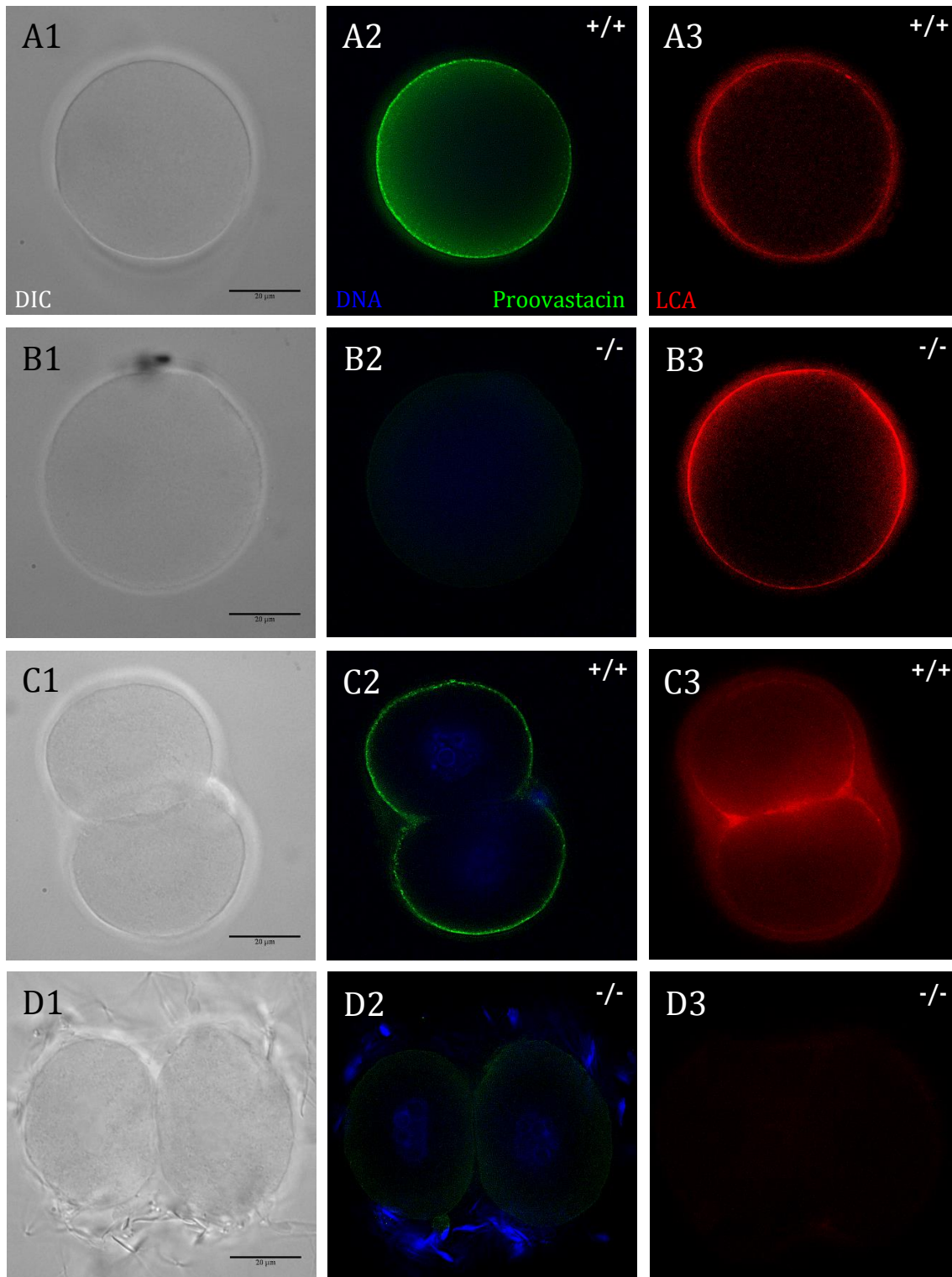


Abbildung 3.6.: **Immunhistologie von Oocyten/Embryonen 3 (anti-Proovastacin Antikörper)** lichtmikroskopische Aufnahme (nach Dekonvolution), 100x Objektiv; **A)** Wildtyp (+/+) **B)** Ovastacin-defiziente (-/-) Oocyte **C)** Wildtyp **D)** Ovastacin-defizienter Embryo; **1)** differentieller Interferenzkontrast (DIC) **2)** DNA Färbung mittels DAPI (blau) und anti-Proovastacin Antikörper (grün) **3)** *Lens culinaris* Agglutinin (LCA)(rot)

3. Ergebnisse

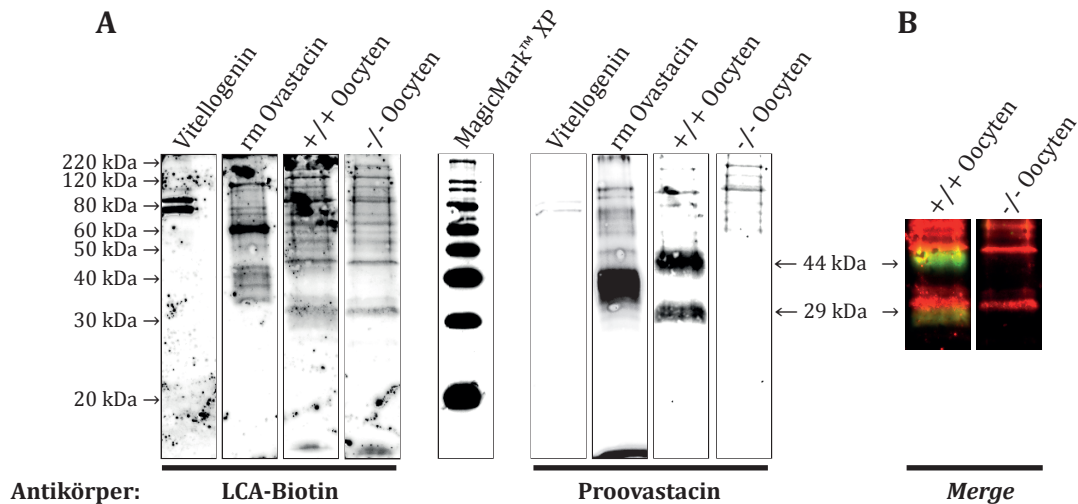


Abbildung 3.7.: **Erkennung von Ovastacin durch LCA in Oocyten** je ca. 120 Oocyten bzw. 0,1 μ g rekombinantes murines Ovastacin und 0,5 μ g Vitellogenin aus *P. dumerilii* wurden in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran gebロットet und mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert. **A)** Es wurden jeweils die gleichen Proben mit LCA-Biotin und dem anti-Proovastacin Antikörper inkubiert. **B)** Überlagerung der beiden „Antikörper“: LCA-Biotin (rot), Proovastacin (grün)

Ob die Ovastacin-spezifischen Signale im Embryo (siehe Abbildung 3.6) ein Artefakt der *in vitro* Fertilisation sind, wurde durch Wiederholung des Versuches mit dem anti-Proovastacin Antikörper nach *in vivo* Fertilisation beantwortet. Wie Abbildung 3.9 B2 zeigt, bleibt das Signal auch nach *in vivo* Befruchtung erhalten. Da Ovastacin in den Embryonen nicht mehr in den Kortikalgranula vorliegen kann, wurden, um zu klären wo Ovastacin genau vorliegt – intra- oder extrazellulär –, Permeabilisierungsversuche durchgeführt. Da ohne Permeabilisierung der Antikörper nicht in die Zelle gelangt, kann gefolgert werden, wo sich das detektierte Protein befindet. Vergleicht man Abbildung 3.9 A2 & C2 so wird deutlich, dass Ovastacin vor Befruchtung bis auf einen kleinen Bereich um den ersten Polkörper intrazellulär vorliegt. Nach der Befruchtung (siehe Abbildung 3.9 B2 & D2) ist dies nicht mehr so deutlich. Da die Ergebnisse mit und ohne Tween relativ kongruente Signale zeigen, scheint das verbleibende Ovastacin größtenteils extrazellulär am Plasmalemma vorzuliegen. Außer dass dieses verbleibende Ovastacin nicht mehr über das Propeptid verfügt (siehe Abbildung 3.4) ist unklar, ob die Signale im Embryo nur einen freien C-Terminus oder den C-Terminus mit katalytischer Domäne abbilden.

Um diese Frage zu beantworten, wurde zunächst die 17 kDa schwere C-terminale Domäne rekombinant exprimiert und gereinigt (siehe Abbildung 3.8 A). Mit dieser wurde eine sequenzielle Präabsorption des anti-Proovastacin Antikörpers durchgeführt. Der daraus resultierende anti-„Proovastacin“ Antikörper ist nur noch in der Lage das Propeptid und die katalytische Domäne – aber nicht mehr die C-terminale Domäne – zu erkennen. Wie Abbildung 3.8 B zeigt, wurde dies mittels SDS-Page und Western-Blot überprüft.

3.1. Funktionelle Analyse von Ovastacin

Mit diesem anti-„Proovastacin“ und dem anti-Proovastacin Antikörper wurden die immunhistologischen Versuche wiederholt. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der beiden Antikörper zu überprüfen wurden zunächst die Ergebnisse von permeabilisierten Wildtyp Oocyten (siehe Abbildung 3.10 A & B) statistisch ausgewertet. Der Signifikanztest (Mann-Whitney-U) mit den Ergebnissen der permeabilisierten Oocyten zeigt, dass die beiden Antikörper in den eingesetzten Konzentrationen sich nicht unterscheiden und zu gleichem Ergebnis führen. Somit ist die Vergleichbarkeit der beiden Antikörper gegeben und eine Auswertung der weiteren Versuche verlässlich. Die Ergebnisse der nicht permeabilisierten Oocyten vor Befruchtung (siehe Abbildung abb ovast PD oocyten C2 & D2) zeigt ein signifikant ($p < 0,01$) stärkeres Signal im Bereich des ersten Polkörperchens. Somit kann es sich hierbei nur um das Signal des extrazellulären freien C-Terminus handeln.

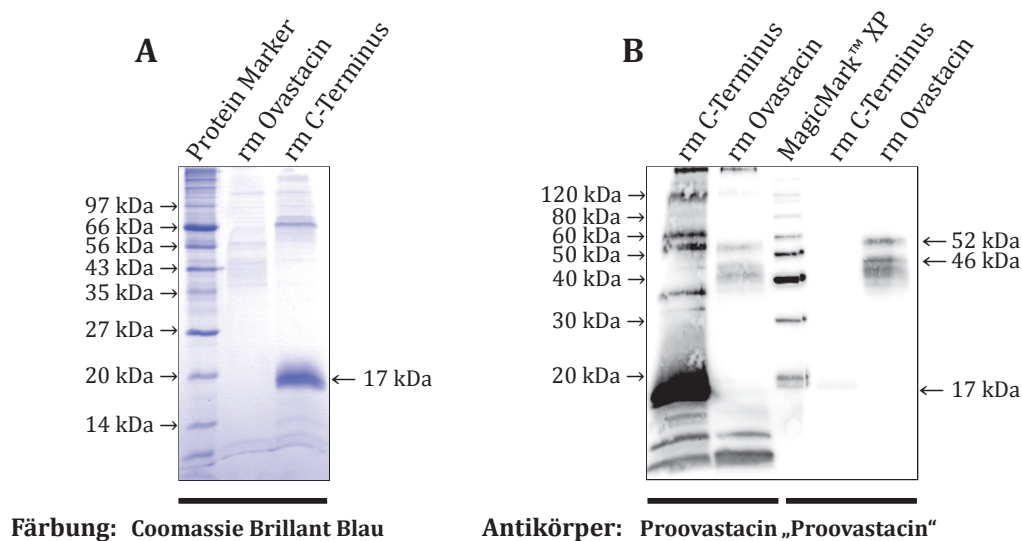


Abbildung 3.8.: **Reinigung Ovastacin C-Terminus und Antikörperpräabsorption** Auftrennung in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel. **A)** Färbung mit Coomassie Brilliant Blau nach KANG ET AL. (2002); 5 μ g rekombinanter muriner Ovastacin C-Terminus; 3 μ g rekombinantes murines Ovastacin. **B)** Überprüfung des mit rm Ovastacin C-Terminus präabsorbierten anti-Proovastacin Antikörpers: Gel wurde auf eine PVDF-Membran geblottet und mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert; 2,5 μ g rm Ovastacin C-Terminus; 1 μ g rm Ovastacin

Im frühen Embryo (siehe Abbildung 3.11) zeigen sich ähnliche Ergebnisse. Der anti-Proovastacin Antikörper zeigt im Bereich des Plasmalemma signifikant ($p = 0,038$) stärkere Signale als der anti-„Proovastacin“ Antikörper.

Diese Ergebnisse zeigen daher, dass der C-Terminus ohne die katalytische Domäne noch im frühen Embryo zumindest teilweise auf dem Oolemma extrazellulär verbleibt. Das Verhältnis der Signale mit dem anti-Proovastacin Antikörper und dem anti-„Proovastacin“ Antikörper zeigen auch die Versuche permeabilisierten Embryonen (siehe Anhang Abbildung F.2).

3. Ergebnisse

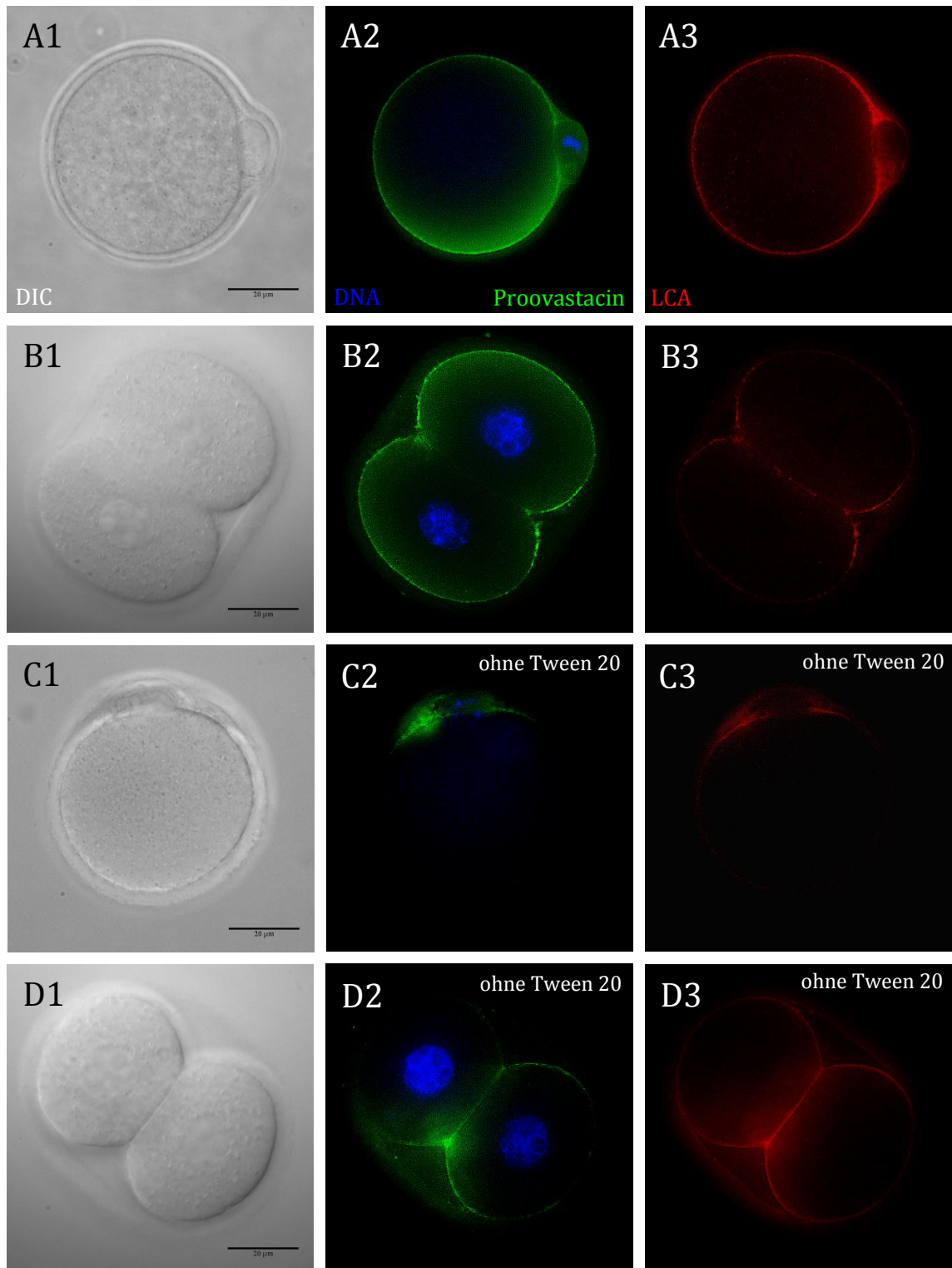


Abbildung 3.9.: Immunhistologie von Wildtyp Oocyten/Embryonen 4 (anti-Proovastacin Antikörper) lichtmikroskopische Aufnahme (nach Dekonvolution), 100x Objektiv; Versuch nach *in vivo* Fertilisation. **A**) & **C**) Oocyte; **B**) & **D**) Embryo; nur **A**) & **B**) permeabilisierend behandelt; **1**) differentieller Interferenzkontrast (DIC). **2**) DNA Färbung mittels DAPI (blau) und anti-Proovastacin Antikörper (grün). **3**) *Lens culinaris* Agglutinin (LCA)(rot)

3.1. Funktionelle Analyse von Ovastacin

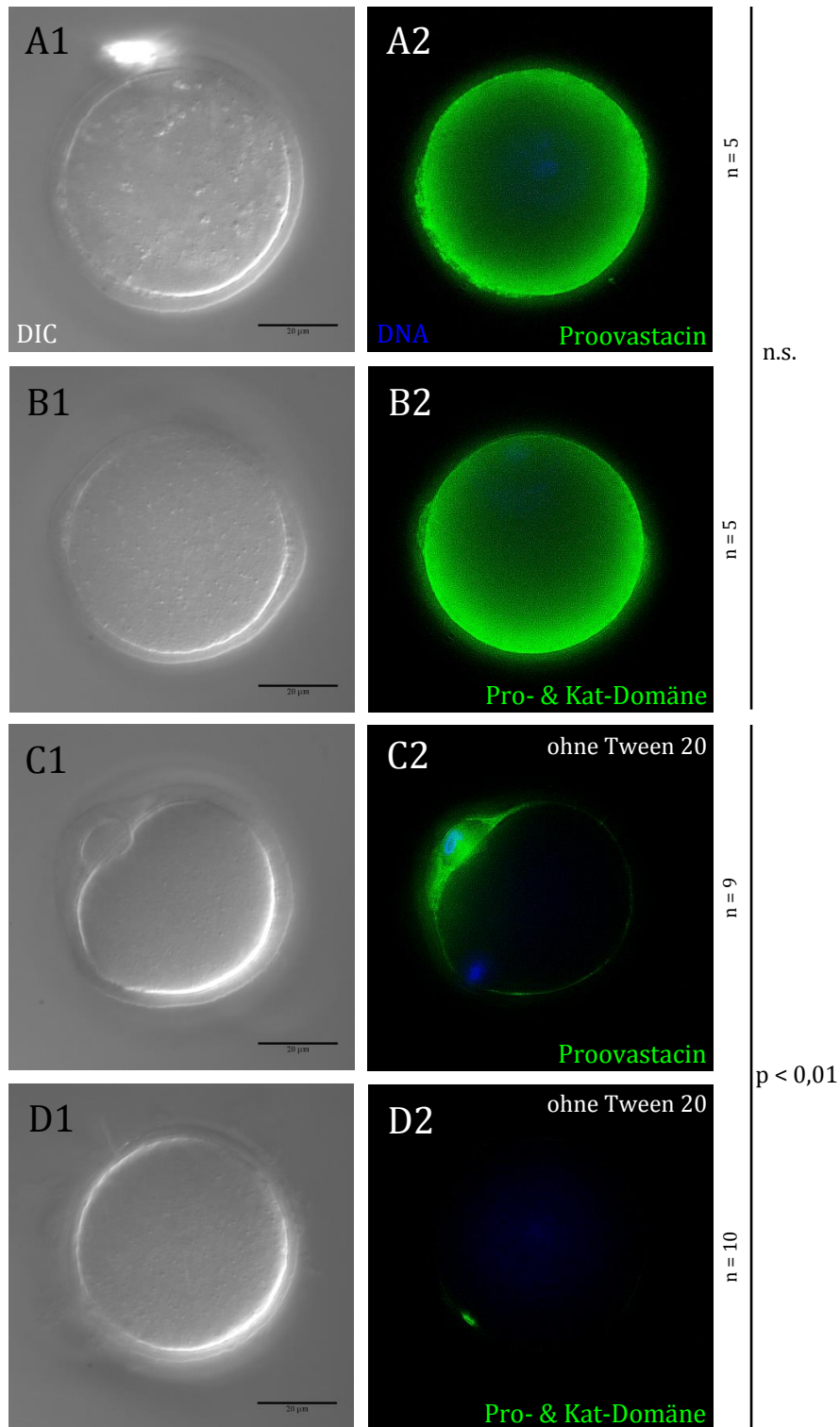


Abbildung 3.10.: **Immunhistologie von Oocyten 5 (anti-„Proovastacin“ Antikörper)** lichtmikroskopische Aufnahme (nach Dekonvolution), 100x Objektiv, Wildtyp Oocyten. **A)** anti-Proovastacin Antikörper permeabilisiert. **B)** anti-„Proovastacin“ Antikörper permeabilisiert. **C)** anti-Proovastacin Antikörper. **D)** anti-„Proovastacin“ Antikörper permeabilisiert. **1)** differentieller Interferenzkontrast (DIC). **2)** DNA Färbung mittels DAPI (blau) und anti-Proovastacin bzw. anti-„Proovastacin“ Antikörper (grün); Statistik der Fluoreszenzintensität des primären Antikörpers mit Mann-Whitney U Test 51

3. Ergebnisse

Diese Ergebnisse legen eine Freisetzung der katalytischen Domäne ohne den C-Terminus nahe.

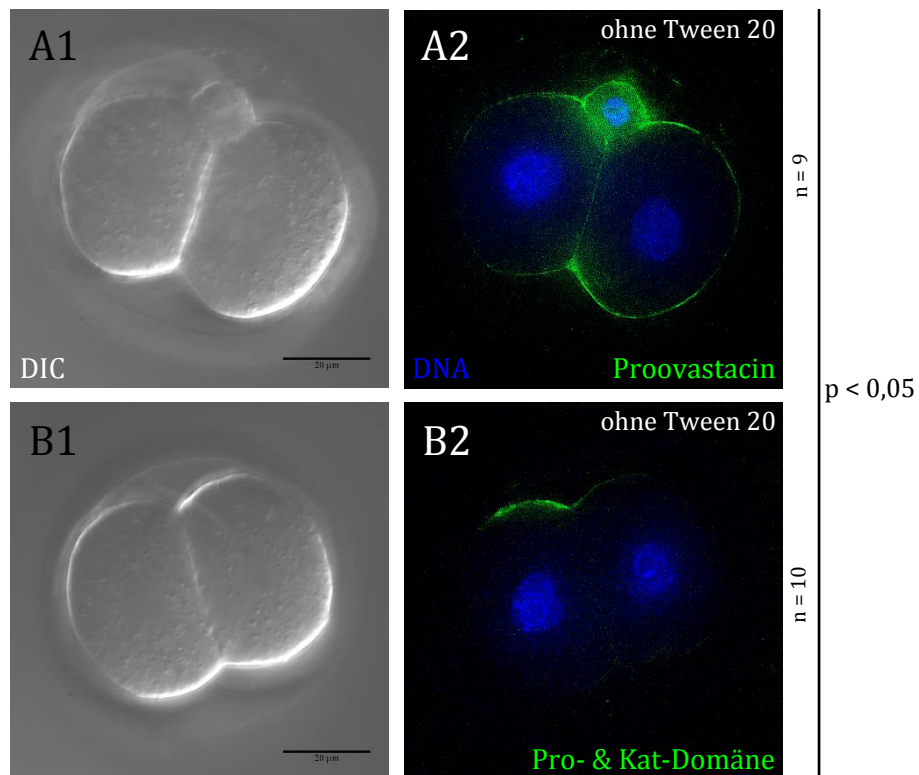


Abbildung 3.11.: **Immunhistologie von Embryonen 6 (anti-„Proovastacin“ Antikörper)** lichtmikroskopische Aufnahme (nach Dekonvolution), 100x Objektiv, Wildtyp Embryonen. **A)** anti-Proovastacin Antikörper nicht permeabilisiert. **B)** anti-„Proovastacin“ Antikörper nicht permeabilisiert; **1)** differentieller Interferenzkontrast (DIC). **2)** DNA Färbung mittels DAPI (blau) und anti-Proovastacin bzw. anti-„Proovastacin“ Antikörper (grün); Statistik der Fluoreszenzintensität des primären Antikörpers mit Mann-Whitney U Test

3.1.3. Ursachen der Subfertilität Ovastacin-defizienter Mäuse

Zum Nachweis der Ursache der Subfertilität Ovastacin-defizienter weiblicher FVB Mäuse wurden zunächst die Zuchtdate ausgewertet, um diese mit den bereits publizierten vergleichen zu können. Wie Abbildung 3.12 zeigt haben die Ovastacin-defizienten Mäuse signifikant weniger Nachkommen pro Wurf. Während der Wildtyp durchschnittlich $9 \pm 2,2$ (Mittelwert und Standardabweichung) Jungtiere wirft, hat der *knockout* nur knapp die Hälfte ($4 \pm 2,1$). Da als Ursache hierfür nicht nur Polyspermie in Betracht zu ziehen ist sondern unter anderem auch eine beeinträchtigte Ovulation, wurden die Ovulationsdaten nach Hormonbehandlung verglichen. Tabelle 3.1 zeigt allerdings, dass die Ovulation der Ovastacin-defizienten Tiere nicht beeinträchtigt zu sein scheint. Tendenziell scheinen diese Tiere sogar mehr Eizellen als der Wildtyp zu ovulieren.

Da somit direkte Präfertilisationsfaktoren als Ursache auszuschließen sind, wurde die Befruchtung selbst und deren Effekte auf die Härtung der *Zona pellucida* genauer untersucht. Hierfür wurden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Fertilisationen durchgeführt und ausgewertet. Wie Abbildung 3.13 zeigt, entspricht die Härtung der *Zona pellucida* der *in vivo* befruchteten Wildtypembryonen mit $38,9 \pm 2,2$ Minuten etwa den *in vitro* fertilisierten (siehe Abbildung 3.2). Eine signifikant niedrigere Verdauzeit zeigen die Ovastacin-defizienten Embryonen.

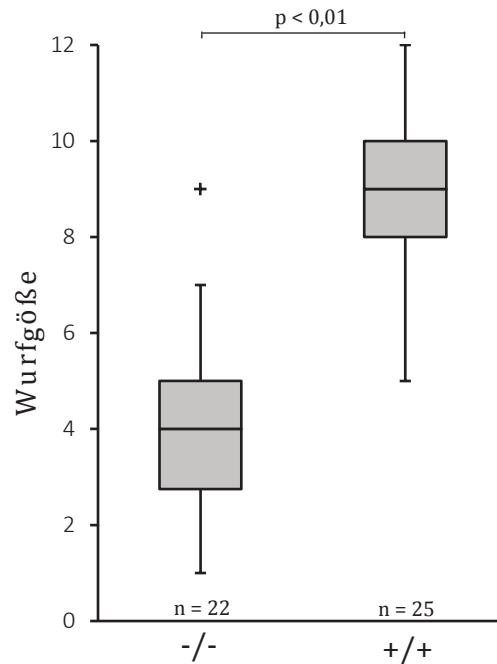


Abbildung 3.12.: **Wurfgröße Wildtyp und Ovastacin-defizienter Mäuse** Boxplot der durchschnittlichen Wurfgrößen über den Zeitraum eines Jahres von Wildtyp (+/+) und Ovastacin-defizienten (-/-) Tieren; Signifikanzbestimmung mittels ungepaartem t-Test

Tabelle 3.1.: Ovulation nach Hormonbehandlung

Bestimmung der Zahl ovulierter Oocyten nach Hormonbehandlung mit je 5 IU PMSG und hCG aus Wildtyp (+/+) und Ovastacin-defizienten (-/-) Weibchen

Stamm	Stichprobengröße		Oocyten/Tier
	Weibchen	Oocyten	
+/+	35	996	28,5
-/-	19	592	31,2

Diese liegt mit $1,4 \pm 0,5$ Minuten sogar deutlich unter der von frisch präparierten Wildtyp Oocyten (siehe Abbildung 3.2). Um auszuschließen, dass diese Reduktion der Verdauzeit durch die Befruchtung, zum Beispiel auf eine Prozessierung durch Spermienproteasen, wie

3. Ergebnisse

Akrosin oder ähnliches, zurückzuführen ist, wurden diese Versuche mit unbefruchteten Ovastacin-defizienten Oocyten wiederholt. Auch diese weisen mit einer Verdauzeit von einer Minute eine deutlich „weichere“ *Zona pellucida* auf, als der Wildtyp.

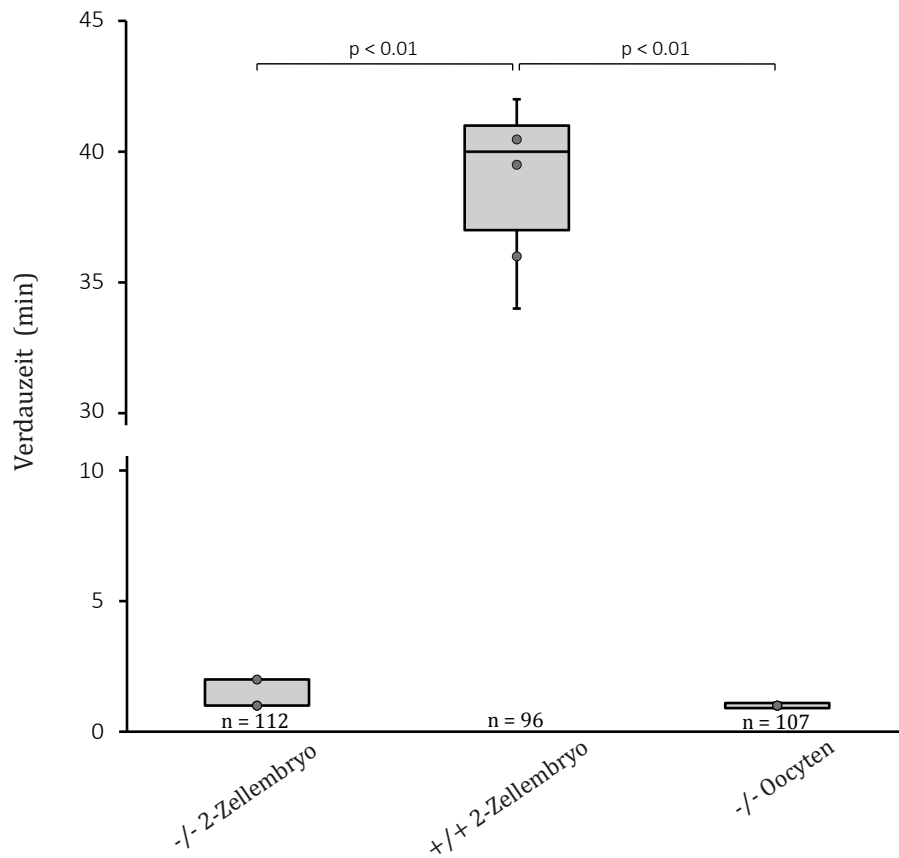


Abbildung 3.13.: **Untersuchung der *Zona pellucida* Härtung in Ovastacin-defizienten Mäusen** Verdauzeit der *Zona pellucida* durch α -Chymotrypsin (80 μ M); jeder Boxplot repräsentiert drei Einzelversuche (Mittelwert der Einzelversuche als Punkt dargestellt) mit je mindestens 20 Oocyten/Embryonen; Zweizeller sowohl Wildtyp (+/+) als auch Ovastacin-defizient (-/-) gehen aus *in vivo* Fertilisation hervor; Statistik nach Mann-Whitney U Test signifikant ($p < 0,01$).

Somit ist der einzige dokumentierbare Unterschied zwischen Wildtyp und Ovastacin-defizienten Oocyten beziehungsweise Embryonen die Beschaffenheit ihrer *Zona pellucida*. Im nächsten Schritt wurde der Befruchtungs- beziehungsweise Entwicklungserfolg von Wildtyp und Ovastacin-defizienten Oocyten analysiert, um zu untersuchen ob die ausbleibende ZP2 Prozessierung eine erhöhte Polyspermierate bewirkt. Es zeigte sich, dass sowohl *in vivo* als auch *in vitro* der Wildtyp eine leicht geringere Befruchtungsrate (Prozentsatz der Zweizellembrionen) gegenüber dem *knockout* aufweisen (siehe Abbildung 3.14 A). Betrachtet man die Entwicklungsrate zur Blastocyste, so entwickeln sich in beiden Genotypen 60–70 % der Oocyten zu Blastocysten. Da Polyspermie in der Regel zu einer Asymmetrie des Spindelapparates führt und aufgrund der Folgen für die Mitose

3.1. Funktionelle Analyse von Ovastacin

im frühen Embryo letal ist, zeigen diese Ergebnisse kein erhöhtes Polyspermierisiko in Ovastacin-defizienten Mäusen. *In vitro* bleiben, wie unter anderem Abbildung 3.14 G zeigt, zahlreiche Spermien an den Embryo gebunden. Dies trifft aufgrund des geringeren Verhältnisses von Spermien pro Oocyten *in vivo* nicht zu.

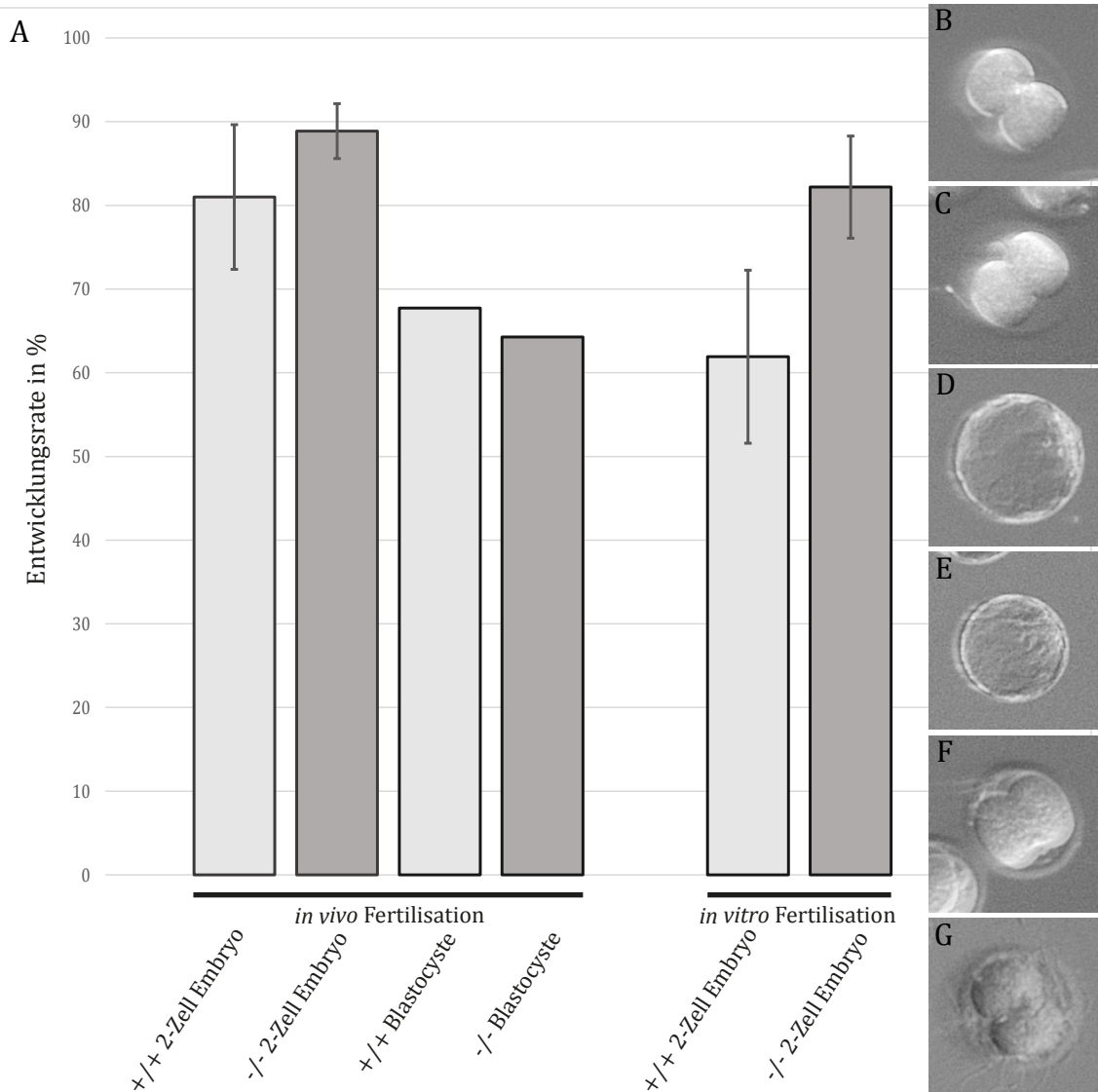


Abbildung 3.14.: **Befruchtungserfolg und Embryoentwicklung** Vergleich zwischen Wildtyp (+/+) und Ovastacin-defizienten (-/-) Zweizellern bzw. Blastocysten. **A)** Befruchtungs- bzw. Entwicklungsraten von aus *in vivo* bzw. *in vitro* Fertilisation. Fehlerbalken $\hat{=}$ Standardabweichung; **B)** *in vivo* befruchteter +/+ Zweizellenembryo; **C)** *in vivo* befruchteter -/- Zweizellenembryo; **D)** *in vivo* befruchtete +/+ Blastocyste; **E)** *in vivo* befruchtete -/- Blastocyste; **F)** *in vitro* befruchteter +/+ Zweizellenembryo; **G)** *in vitro* befruchteter -/- Zweizellenembryo.

3. Ergebnisse

3.2. Extraovariale Expression

Ob Ovastacin neben den Oocyten auch in anderen Organen exprimiert wird, wurde zunächst auf mRNA-Ebene überprüft. Hierfür wurde die mRNA sowohl männlicher als auch weiblicher Tiere in cDNA umgeschrieben und mittels ovastacinspezifischer Primer amplifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.15 dargestellt. Wie erwartet ist im Ovar das stärkste Signal vorhanden. Allerdings ist ovastacinspezifische mRNA auch in anderen Geweben wie Thymus und Milz nachweisbar. Dies gilt sowohl für weibliche als auch männliche Tiere. Eine minimale Expression ist in Uterus, Skelettmuskulatur und Leber nachweisbar. Da QUESADA ET AL. (2004) eine Hormonabhängigkeit der Ovastacinexpression in murinen Oocyten zeigen konnten, wurden vergleichende Untersuchungen weiblicher Tiere mit und ohne Hormonbehandlung durchgeführt. Diese zeigten allerdings keine unterschiedliche im Expressionmuster.

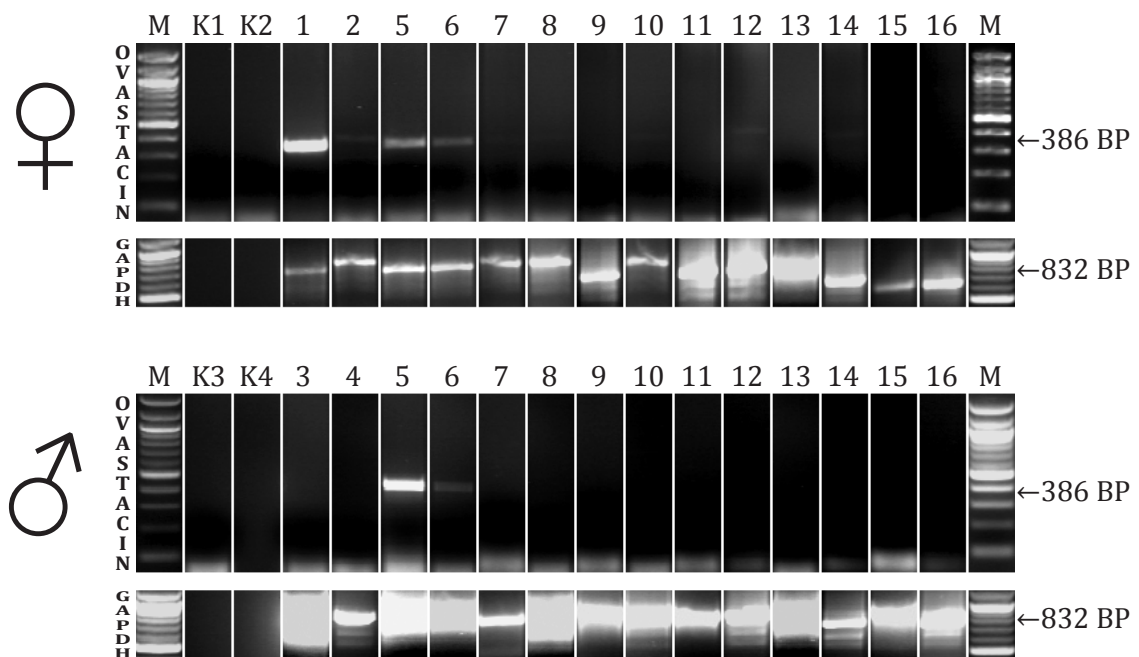


Abbildung 3.15.: **Expressionsanalyse von Ovastacin in murinen Geweben** je ein weibliches (oben) bzw. männliches (unten) Tier im Alter von 3 Monaten; jeweils obere Reihe mit Ovastacin spezifischen Primern und Untere mit GAPDH-spezifischen Primern; **M** 100 bp DNA Ladder, **K1** Ovar RNA ohne Primer, **K2 & K4** nur RT Enzym Mix, **K3** Thymus RNA ohne Primer, **1** Ovar, **2** Uterus, **3** Hoden, **4** Prostata, **5** Thymus, **6** Milz, **7** Leber, **8** Niere, **9** Nebenniere, **10** Lunge, **11** Herz, **12** Skelettmuskulatur, **13** Gehirn, **14** Dünndarm, **15** Haut, **16** Knochenmark

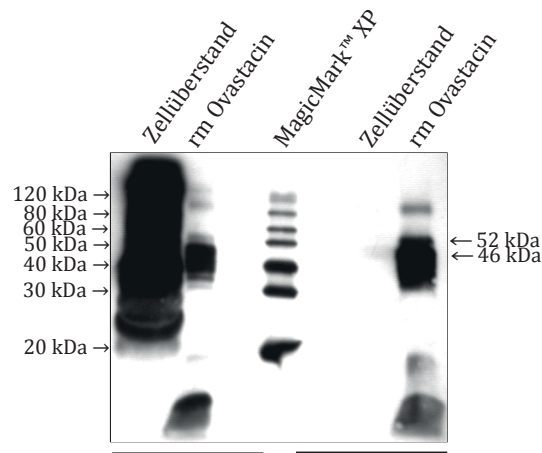
Da jenseits des Ovars in beiden Geschlechtern in Thymus und Milz eine Ovastacinexpression nachweisbar ist, wurden diese Gewebe immunhistologisch untersucht, um Ovastacin auch auf Proteinebene nachzuweisen. Allerdings stellte sich heraus, dass die Negativkontrollen (Ovastacin-defiziente Gewebe) mit allen zur Verfügung stehenden Antikörpern

kreuzreagieren. Beispielhaft sei hier die Kreuzreaktivität des anti-Proovastacin Antikörpers mit Thymusgewebe genannt (siehe Abbildung F.5). Um sich dieser Kreuzreaktivität zu entledigen, wurde der anti-Proovastacin Antikörper weiter spezifisch gereinigt.

Hierfür wurde die bekannte Kreuzreaktivität des Antikörpers mit Zellüberstand von Nephrosin-exprimierenden High Five™ Zellen genutzt um bestimmte Populationen des Antikörpers zu präabsorbieren. Bei Nephrosin handelt es sich um eine Astacin-Metalloproteinase aus *Danio rerio*. Wie in Abbildung 3.16 (rechts) zu erkennen ist, führte die Behandlung zum Verlust dieser Kreuzreaktivität mit Ovastacin. Mit diesem spezifischeren Antikörper wurden die immunhistologischen Versuche wiederholt.

In den Gewebeschnitten der Ovastacin-defizienten Milz war weiterhin eine Kreuzreaktivität zu erkennen, sodass der Nachweis auf Proteinebene nicht unzweifelbar belegbar ist. Allerdings konnte mit diesem Antikörper Ovastacin auf Proteinebene in weiblichem Thymusgewebe verifiziert werden (siehe Abbildung 3.17).

Im Kortex des Thymus sind im Vergleich zur Negativkontrolle im Bereich der *trabeculae* deutliche Signale zu erkennen. Diese Septen, welche den Thymus in kleine „Läppchen“ unterteilen, führen Blutgefäße und Nerven. Welche Zelltypen hier Ovastacin exprimieren beziehungsweise welche Funktion Ovastacin hier übernimmt, konnte bislang nicht weiter verifiziert werden.



Antikörper: Proovastacin „Proovastacin-2“

Abbildung 3.16.: **Antikörperpräabsorption 2** Auftrennung in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel; Überprüfung des mit Zellüberstand aus Nephrosin exprimierenden High Five™ Zellen präabsorbierten anti-Proovastacin Antikörpers: Gel wurde auf eine PVDF-Membran geblottet und mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert; je 20 µl Zellüberstand; 1 µg rm Ovastacin

3. Ergebnisse

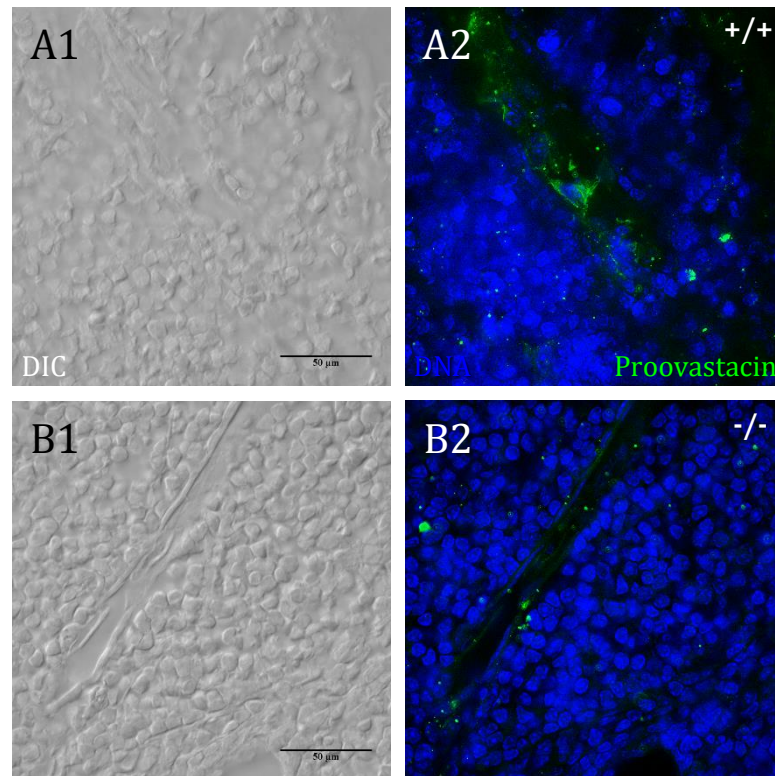


Abbildung 3.17.: **Immunhistologie des Thymus (anti-„Proovastacin-2“ Antikörper)** lichtmikroskopische Aufnahme des weiblichen Thymus (nach Dekonvolution), 63x Objektiv. **A)** Wildtyp. **B)** Ovastacin-defizienter Thymus. **1)** differenzieller Interferenzkontrast (DIC). **2)** DNA Färbung mittels DAPI (blau) und anti-Proovastacin Antikörper (grün)

3.3. Phylogenie von Ovastacin

Da bislang wenig über die Verbreitung von Ovastacin innerhalb der Säugetiere bekannt ist, wurden zunächst die Datenbanken „UniProt“, „Ensembl“ und „NCBI“ nach Säuger Ovastacinen durchsucht. Insgesamt konnte in 64 Spezies aller Ordnungen außer Lagomorpha und Xenarthra, in denen es noch keine vollständig sequenzierte Spezies gibt, eine vollständige Sequenz einer *astacin-like* (astl) Protease identifiziert werden, welche den Domänenaufbau von Ovastacin aufweist (Stand: April 2016). Hiervon sind 61 aus den Eutheria, 2 aus den Metatheria und eines aus den Protheria. Da der typische Domänenaufbau hauptsächlich durch die C-terminale Domäne definiert wird, diese Domäne bei den Monotremen und Marsupialia aber äußerst geringe Sequenzidentitäten aufweisen (< 20 %), können diese nicht eindeutig als Ovastacine identifiziert werden. Wie der Tabelle 3.2 zu entnehmen ist, zeigt die katalytische Domäne mit 69 – 93 % Sequenzidentität eine starke Konservierung. Ein genauer Blick auf die C-terminale Domäne zeigt, dass Sequenzidentitäten der Säuger hier lediglich 19 – 71 % betragen, wobei diese Werte nicht unbedingt mit den jeweiligen Verwandtschaftsverhältnissen korrelieren. Zum einen weisen die Primaten eine dem Verwandtschaftsgrad eine sehr hohe Konservierung auf,

Tabelle 3.2.: **Verfügbare Ovastacin Sequenzen** aller Theria (ohne *Didelphis virginiana*); Sequenzidentitäten beziehen sich auf die Hausmaus; Kat = katalytische Domäne, C-T = C-terminale Domäne

dt. Name	Name	Accession-number	Sequenzidentität	
			Kat	C-T
Großer Panda	<i>Ailuropoda melaneuca</i>	XP_002926533.1	81 %	42 %
Zwergwal	<i>Balenoptera acutorost.</i>	XP_007197479.1	79 %	41 %
Amerikan. Bison	<i>Bison bison</i>	XP_010828152.1	78 %	30 %
Yak	<i>Bos mutus</i>	XP_005891691.1	78 %	33 %
Hausrind	<i>Bos taurus</i>	ENSBTAT27119	78 %	37 %
Wasserbüffel	<i>Bubalus bubalis</i>	XP_006059970.1	77 %	32 %
Weißbüschelaffe	<i>Callithrix jacchus</i>	XP_002757421.1	80 %	48 %
Trampeltier	<i>Camelus bactrianus</i>	XP_010957445.1	80 %	31 %
Dromedar	<i>Camelus dromedarius</i>	XP_010983918.1	80 %	31 %
Wolf	<i>Canis lupus</i>	XP_005630449.1	79 %	42 %
Wildziege	<i>Capra hircus</i>	XP_005686473.1	79 %	36 %
Meerschweinchen	<i>Cavia porcellus</i>	XP_003471753.1	85 %	47 %
Breitmaulnashorn	<i>Ceratotherium simum</i>	XP_014647063.1	81 %	45 %
Langschw.-Chinchilla	<i>Chinchilla langeria</i>	XP_013378299.1	82 %	51 %
Kap-Goldmull	<i>Chrysochloris asiatica</i>	XP_006873613.1	75 %	39 %
Chin. Hamster	<i>Cricetelus griseus</i>	XP_007638035.1	93 %	71 %
Kängururatte	<i>Dipodomys ordii</i>	XP_012875176.1	79 %	22 %
Kl. Igeltrennek	<i>Echinops telfairi</i>	XP_004704528.1	75 %	34 %
Kap-Elefantenspitzm.	<i>Elephantulus edwardii</i>	XP_006900773.1	76 %	31 %
Hauspferd	<i>Equus caballus</i>	trF7ALI3	83 %	54 %
Przewlski-Pferd	<i>Equus przewalskii</i>	XP_008537827.1	83 %	54 %
Braunbrustigel	<i>Erinacaeus europaeus</i>	XP_007529964.1	77 %	36 %
Hauskatze	<i>Felis catus</i>	ENSFCAT10695	80 %	50 %

Fortsetzung →

3. Ergebnisse

Tabelle 3.2.: **Verfügbare Ovastacin Sequenzen** Fortsetzung

dt. Name	Name	Accession- number	Sequenzidentität	
			PO	C-T
Graumull	<i>Fukomys damarensis</i>	XP_010636446.1	85 %	51 %
Malaien-Gleitflieger	<i>Galeopterus variegatus</i>	XP_008587830.1	79 %	52 %
Westl. Gorilla	<i>Gorilla gorilla</i>	G3R9B1	81 %	49 %
Nacktmull	<i>Heterocephalus glaber</i>	XP_004844781.1	85 %	50 %
Mensch	<i>Homo sapiens</i>	spQ6HA08	79 %	50 %
13-Streifen-Hörnchen	<i>Ictidomys tridecemlin.</i>	XP_005339670.1	82 %	46 %
Kl. Wüstenspringm.	<i>Jaculus jaculus</i>	XP_004651733.1	84 %	54 %
Weddellrobbe	<i>Leptonychotes wedellii</i>	XP_006731067.1	81 %	41 %
Chin. Flussdelfin	<i>Lipotes vexillifer</i>	XP_007470293.1	80 %	40 %
Afrikan. Elefant	<i>Loxodonta africa</i>	trG3TB63	73 %	45 %
Drill	<i>Mandrillus leucophaeus</i>	XP_011825044.1	80 %	48 %
Goldhamster	<i>Mesocricetus auratus</i>	XP_005068526.1	89 %	70 %
Präriewühlmaus	<i>Microtus ochogaster</i>	XP_005364490.1	91 %	68 %
Hausmaus	<i>Mus musculus</i>	spQ6HA09	100 %	100 %
Europ. Iltis	<i>Mustela putorius</i>	trM3YC95	81 %	49 %
Mausohr	<i>Myotis lucifugus</i>	XP_006108756.10	83 %	33 %
Blindmaus	<i>Nannospalax galili</i>	XP_008836394.1	86 %	59 %
Degu	<i>Octodon degus</i>	XP_004633295.1	82 %	48 %
Walros	<i>Odobenus rosmarus</i>	XP_004399935.1	79 %	39 %
Orca	<i>Orcinus orca</i>	XP_004277875.1	78 %	41 %
Erdferkel	<i>Orycteropus afer afer</i>	XP_007957712.1	75 %	53 %
Riesengalago	<i>Ottolemur garnettii</i>	ENSOG AT1308	79 %	48 %
Hausschaf	<i>Ovis aries</i>	XP_012005403.1	78 %	36 %
Bonobo	<i>Pan paniscus</i>	XP_003805773.1	81 %	48 %
Schimpanse	<i>Pan troglodytes</i>	trH2QIC4	81 %	48 %
Tiger	<i>Panthera tigris</i>	XP_007082535.1	79 %	43 %
Tschiru	<i>Pantholops hodgsonii</i>	XP_005980614.1	78 %	36 %
Anubispavian	<i>Papio anubis</i>	XP_003909020.1	80 %	49 %
Hirschmaus	<i>Peromyscus maniculatus</i>	XP_006986519.1	89 %	71 %
Pottwal	<i>Physeter catodon</i>	XP_007118553.1	78 %	40 %
Orang-Utan	<i>Pongo abelii</i>	XP_002811693.1	81 %	50 %
Conq.-Sifaka	<i>Propithecus conquireli</i>	XP_012497335.1	79 %	52 %
Schw. Flughund	<i>Pteropus alecto</i>	XP_006909541.1	80 %	39 %
Tasman. Teufel	<i>Sarcophilus harrisii</i>	XP_003758159.1	69 %	19 %
Wildschwein	<i>Sus scrofa</i>	trF1SU45	79 %	40 %
Spitzhörnchen	<i>Tupaia chinensis</i>	XP_006166612.1	81 %	51 %
Gr. Tümmler	<i>Tursiops truncatus</i>	XP_004311528.16	77 %	41 %
Alpaka	<i>Vicugna pacos</i>	XP_006203983.1	80 %	40 %

zum anderen zeigen die Rodentia nur innerhalb der Muridae einen erhöhten Konservierungsgrad (siehe Anhang Abbildung F.8). Auch innerhalb der Afrotheria sind die C-Termini mit 46 – 73 % nur wenig konserviert. Die Artiodactyla bilden zwei Cluster, zum einen die Wiederkäuer (Ruminantia) und zum anderen die übrigen Paarhufer.

Wenn man das Alignment (siehe Abbildung F.6) dieser einzigartigen Domäne genauer betrachtet, fällt auf, dass die N-terminale Hälfte deutlich höher konserviert ist und die C-terminale eine hohe Flexibilität der Sequenz wie auch der Länge aufweist. Vollständig

konserviert ist ausschließlich ²⁹LxxL³².

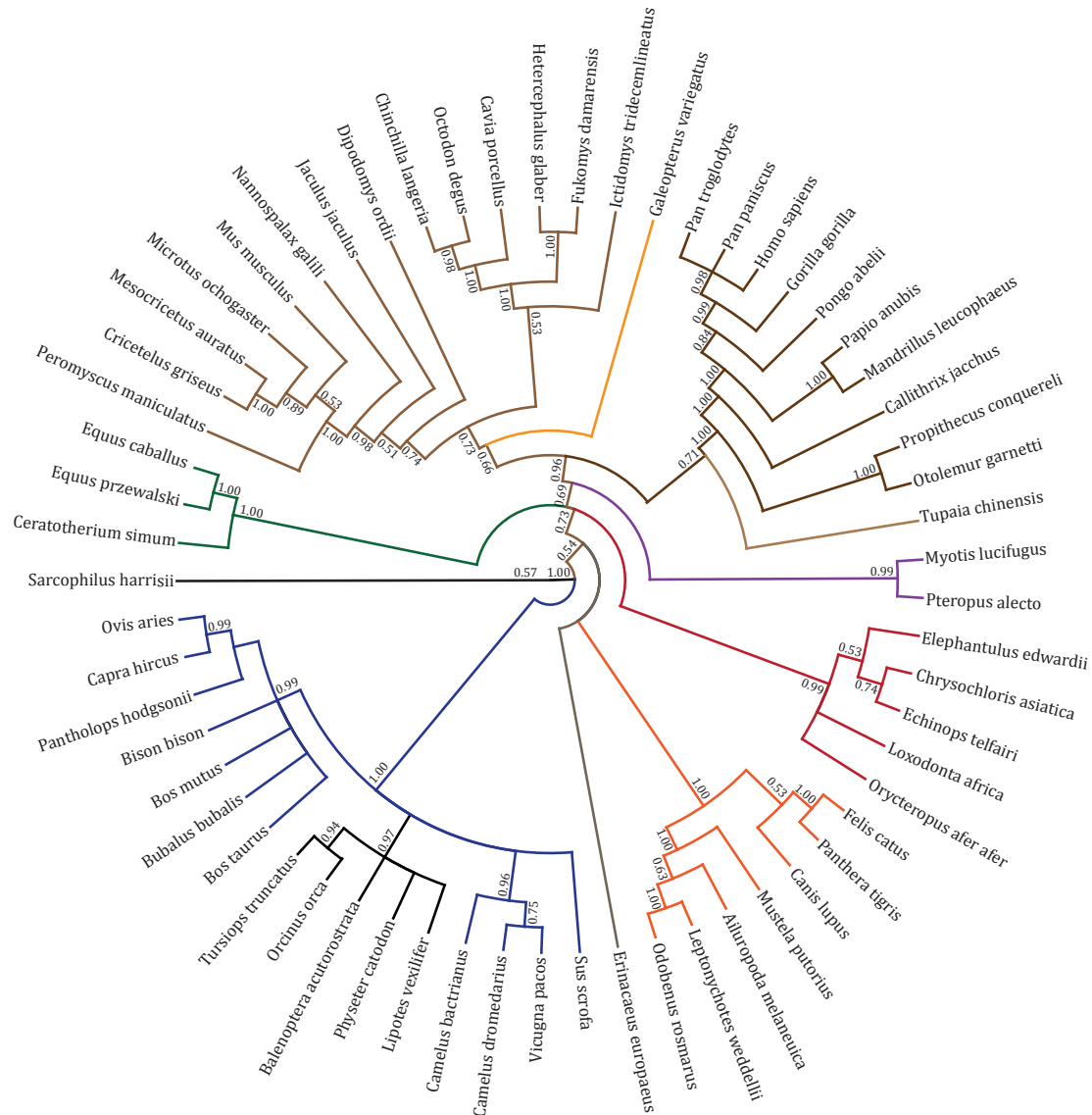


Abbildung 3.18.: **Konsensusbaum der C-terminalen Domäne** Zirkuläres Kladdogramm der C-terminalen Domäne Ovastacins der Placentalia; *Sarcophilus harrisii* als Außengruppe; Farbkodierung zur besseren Unterscheidung der Säuger Großgruppen: **Artiodactyla**, Cetacea, Eulipotyphla, **Carnivora**, **Afrotheria**, **Chiroptera**, **Scandentia**, Primates, **Dermoptera**, Rodentia, **Perissodactyla**; *credibility score*: > 0.95 „sehr gut“, > 0.75 „gut“

Da bislang nichts über die Funktion dieser Domäne bekannt ist, wurde aus dem Alignment ein molekularer Stammbaum errechnet. Würde ein so erstellter Stammbaum die Phylogenie der Placentalia widerspiegeln, deutet dies auf einen Funktionserhalt hin, während deutliche Abweichungen ein Indiz für einen Funktionwechsel wären. Dies würde

3. Ergebnisse

Rückschlüsse darauf zulassen, ob Ovastacin beziehungsweise die C-terminale Domäne bei allen oder nur bestimmten Säugetiergruppen die gleiche Funktion übernimmt.

Der C-Terminus des Tasmanischen Teufels weist keine Sequenzähnlichkeit (<20 %) auf. Daher bleibt unklar ob es sich bei diesem Protein bereits um Ovastacin handelt. Diese Sequenz dient daher als Außengruppe für den errechneten Stammbaum. Der Konsensusbaum der C-terminalen Domäne (siehe Abbildung 3.18) zeigt, dass nahezu alle Spezies sich sehr gut in ihre entsprechenden Taxa gruppieren. Somit ergeben sich aus dem Baum alle größeren Säugetiertaxa: Cetartiodactyla, Eulipotyphla, Carnivora, Perissodactyla, Afrotheria, Chiroptera, Rodentia, Dermoptera, Primates und Scandentia. Die Verhältnisse dieser Taxa werden allerdings nur gut bis mäßig aufgelöst. Ein Schwestergruppenverhältnis der Laurasiatheria zu den Euarchontoglires wird hier nicht unterstützt. Das Kladogramm zeigt auch kein Schwestergruppenverhältnis der Afrotheria zu den restlichen Placentalia, wie dies allgemein akzeptierte phylogenetische Kladogramme unterstützen.

4. Diskussion

4.1. Aktivierung und Freisetzung von Ovastacin

Die Untersuchungen zur Prozessierung und Aktivierung von Ovastacin zeigen, dass Ovastacin bereits vor der Kortikalreaktion zum Teil prozessiert vorliegt. Hierbei handelt es sich um zwei Formen. Ein 29 kDa großes Fragment, welches ausschließlich die katalytische Domäne beinhaltet, sowie ein 44 kDa große Proteinvariante, die mit Hilfe des anti-Propeptid-Antikörpers, des anti-Proovastacin-Antikörpers und des anti-C-Terminus-Antikörpers detektiert werden kann. Der von Jurrien Dean zur Verfügung gestellte, gegen den C-Terminus gerichtete, anti-Ovastacin Antikörper detektiert Ovastacin mit einer Größe von ca. 52 kDa in Oocyten. Diese Bande ist jedoch mit keinem der anderen Antikörper detektierbar. Auf dieses Molekulargewicht kamen auch BURKART ET AL. (2012) mit diesem Antikörper. Da diese Bande in Ovastacin-defizienten Oocyten nicht vorhanden ist, muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesem Protein um die C-terminale Domäne handelt, welche C-terminal prozessiert ist und somit nicht vom anti-C-Terminus Antikörper erkannt wird. Da die eigentliche Größe dieser Domäne lediglich ca. 15 kDa umfassen sollte, kann zum Beispiel über eine *linker* Funktion spekuliert werden.

Das 29 kDa große Fragment umfasst nur die katalytische Domäne umfasst und stellt vermutlich das vollständig aktive Enzym dar. Wie KARMILIN (2016) zu entnehmen ist, hat aktiviertes rekombinantes murines Ovastacin eine Masse von knapp unter 30 kDa. Diesen Sachverhalt bestätigen auch die Versuche des *Zona pellucida* Verdaus. Diese belegen, dass die Härtung der *Zona pellucida* durch Ovastacin hervorgerufen wird, dies kann durch Fetuin-B Zugabe verhindert werden. Weil aber die Supplementierung von Serin- und Cysteinprotease-Inhibitoren keinen ähnlichen Effekt auslöst, muss davon ausgegangen werden, dass Ovastacin bereits intrazellulär zum Teil prozessiert und aktiv freigesetzt wird. Ich konnte somit die Ergebnisse von MOLLER UND WASSARMAN (1989) bestätigen, welche diese Versuche allerdings ohne die Positivkontrolle mit Fetuin-B durchführten. Deren Ergebnisse standen jedoch im Widerspruch zu GWATKIN ET AL. (1973), welche die Hemmung dieses Enzyms durch den Trypsininhibitor aus der Sojabohne (*soy bean trypsin inhibitor* (SBTI)) zeigen konnten und deshalb von einer ZP2 Prozessierung durch eine Serinprotease ausgingen. MOLLER UND WASSARMAN (1989) konnten jedoch auch keine Hemmung ihrer „*Zona pellucida* Protease“ durch andere Inhibitoren, wie α_2 -Macroglobulin oder *o*-Phenanthrolin, nachweisen, weshalb sie damals nicht zu dem Schluss kommen konnten, dass es sich um eine Metalloprotease handeln musste. Nach Mitteilung von KONSTANTIN KARMILIN wird rekombinantes Ovastacin durch diese beiden Inhibitoren nur ineffizient gehemmt. Festzuhalten ist, dass die Härtung der *Zona pellucida* erstmals mit der Ovastacinaktivität korreliert werden konnte. In Anbetracht dessen, dass vor allem *in vitro*, wo im Vergleich zur *in vivo* Situation nahezu keine potenziellen Aktivatoren im Medium vorhanden sind, eine vorzeitige Härtung der *Zo-*

4. Diskussion

na pellucida auftritt, wäre eine extrazelluläre Aktivierung von Ovastacin ohnehin nicht erklärbar. Die Ergebnisse zeigen also, dass die im Western-Blot gezeigte teilweise Prozessierung ausreicht, um *in vitro* die *Zona pellucida* zu verhärten.

Aufgrund der – wie oben angeben – geringen zur Verfügung stehenden Menge nativen Ovastacins konnte nicht entgültig geklärt werden, durch welche Protease Ovastacin bereits intrazellulär geschnitten wird. Aufgrund der Ergebnisse von PENG ET AL. (2012) sowie des Sachverhaltes anderer Proteasen der Astacin-Familie ist es wahrscheinlich, dass es sich bei dem Aktivator um eine Serinprotease handelt.

Da der Mechanismus der Aktivierung sowie der Phylogenie der *hatching* Enzyme anderer Amniotenta bislang auch nicht geklärt sind, können keine vergleichenden Untersuchungen Hinweise auf die Aktivierung von Ovastacin geben.

Bislang liegen keine Erkenntnisse über eine Prozessierung der *Zona pellucida* der Monotremata und Marsupialia nach Fertilisation vor (DUNBAR UND O‘RAND, 1991). Somit sind auch keine Informationen zur Evolution der ZP2 Prozessierung innerhalb der Mammalia zu erlangen, welche das Verständnis der Aktivierung und Funktion von Ovastacin erweitern könnten. Selbst innerhalb der Eutheria scheint eine Prozessierung der *Zona pellucida* durch verschiedene Proteasen *in vivo* möglich. Bei bestimmten Artiodaktylen ist eine Prozessierung der *Zona pellucida* durch Plasmin gezeigt (MONDÉJAR ET AL., 2012; COY ET AL., 2012; GRULLÖN ET AL., 2013), welche zu einer Härtung führt. Da in Mäusen eine Plasmin-Defizienz jedoch keinen Effekt auf die Befruchtung hat (BUGGE ET AL., 1995) und Ovastacin nicht extrazellulär aktiviert werden muss, ist die Aktivierung durch Plasmin (KARMILIN, 2016) in Mäusen *in vivo* eher unwahrscheinlich.

4.2. Ovastacin nach der Befruchtung

Durch den Western-Blot mit aktivierten Oocyten beziehungsweise Embryonen konnte bestätigt werden, dass Ovastacin durch künstliche Aktivierung mit Calcium-Ionophoren freigesetzt wird. Allerdings verbleibt ein Großteil an der Oocyte. Da auch in Zygoten und im Embryo noch Ovastacin nachweisbar ist, muss davon ausgegangen werden, dass natürlicherweise gewisse Mengen Ovastacin am Embryo persistieren. Die immunhistologischen Untersuchungen an Oocyten und Embryonen bestätigen die Versuche zur *Zona* degradation durch α -Chymotrypsin und die Detektion der Ovastacinvarianten im Western-Blot in den meisten Aspekten. Das Propeptid ist nach der Kortikalreaktion nicht mehr nachweisbar. Dass der anti-Ovastacin Antikörper einen teilweisen Verbleib der C-terminalen Domäne im Zweizellembryo zeigt, steht im Widerspruch zu den Beobachtungen von BURKART ET AL. (2012). Betrachtet man allerdings die Aufnahmen der Originalpublikation, fällt auf, dass der Hintergrund in der Oocyten deutlich stärker leuchtet als bei den Zygoten. Daher ist anzunehmen, dass dieses Signal im Embryo dort auch vorhanden sein könnte, aber aufgrund der Aufnahmeeinstellungen nicht sichtbar ist. Der Nachweis geringer Ovastacinmengen in Zweizellembryonen mit Hilfe des anti-Proovastacin Antikörpers in der Immunhistologie, ist eine weitere Bestätigung dieses Sachverhalts. Erst durch die sequenzielle Präabsorption des Antikörpers mit der rekombinanten murinen C-terminalen Domäne, konnte letztlich bestätigt werden, dass die verbleibenden Signale im Embryo vermutlich ausschließlich auf die C-terminale Domäne zurückzuführen sind.

Auch der Umstand, dass LCA auch murines Ovastacin erkennt und im frühen Wildtyp

4.2. Ovastacin nach der Befruchtung

Embryo, nicht aber im Ovastacin-defizienten Embryo, Signale bewirkt, spricht für einen teilweisen – wenn auch geringen – Verbleib von Ovastacin extrazellulär am Plasmalemma.

Darüber hinaus stellten bereits BURKART ET AL. (2012) fest, dass mit LCA in Ovastacin-defizienten Oocyten im Vergleich zum Wildtyp deutlich geringere Intensitäten nachweisbar sind. Sie konnten jedoch keine schlüssige Begründung hierfür vorlegen, insbesondere nicht dafür, dass Ovastacin durch LCA erkannt wird. Trotz der Tatsache, dass im Western-Blot der Oocyten mit LCA mehrere andere glykosylierte Proteine, wie auch die *Zona pellucida* Proteine, erkannt werden, konnte die Bindung von LCA an Ovastacin in dieser Arbeit gezeigt werden.

Die Ergebnisse des Western-Blots mit LCA decken sich mit denen von LIU ET AL. (2003), die eine nahezu identische Signalverteilung erzielten, allerdings keine der Banden einem Protein eindeutig zuordnen konnten. Dies war durch den Ovastacin *knockout* nun möglich.

Da bislang noch keine Strukturdaten zu Ovastacin vorliegen, ist unklar, wo die von LCA erkannten Glykosylierungen *de facto* liegen. *In silico* Untersuchungen prognostizieren zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen ausschließlich in der Proteasedomäne, während sich viele der potentiellen O-Glykosylierungsstellen hauptsächlich in der C-terminalen Domäne befinden (QUESADA ET AL., 2004). Da LCA deutlich besser N-Glykosylierungen erkennt ist es wahrscheinlich, dass LCA an die Proteasedomäne bindet. Zumindest konnte gezeigt werden, dass murines Ovastacin *in vivo* glykosyliert wird.

Die Kolokalisation der Ovastacin-spezifischen Signale mit LCA in nicht permeabilisierten unbefruchteten Oocyten im Bereich des 1. Polkörperchens decken sich mit den von DENG ET AL. (2003) publizierten Beobachtungen. Die Autoren hatten in diesem Kortikalgranula freie Bereich eine nur partielle Härtung der *Zona pellucida* gefunden.

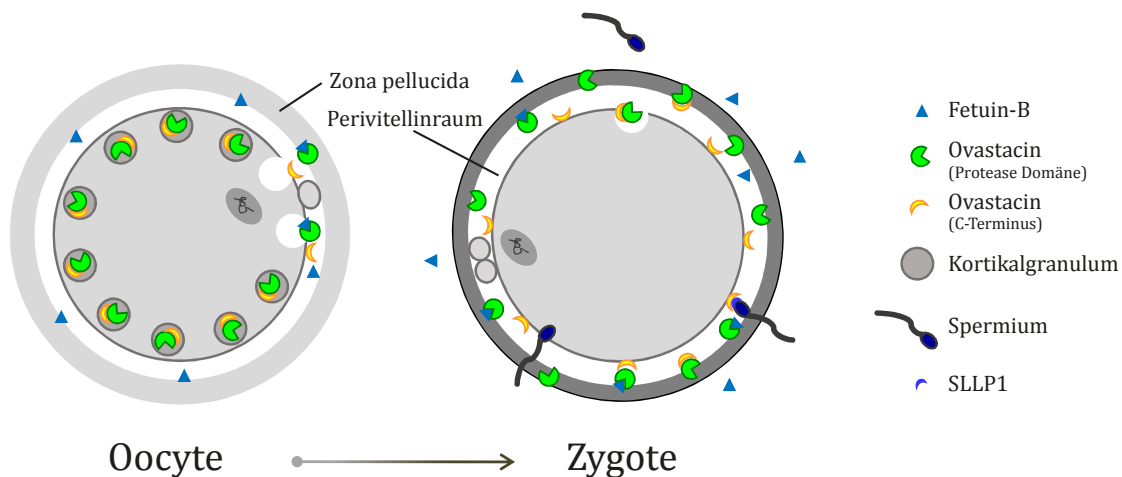


Abbildung 4.1.: **Vorgeschlagenes Modell zum Verbleib und den Interaktionen von Ovastacin** nach STÖCKER ET AL. (2014) erweitert um Ergebnisse dieser Arbeit.

4. Diskussion

Erst durch Nachweis des Verbleibs von Teilen des Ovastacins, stehen die ursprünglich gegensätzlichen Publikationen von BURKART ET AL. (2012) und SACHDEV ET AL. (2012) nicht mehr vollständig im Widerspruch zueinander. Trotz der nachgewiesenen Freisetzung und der Aktivität von Ovastacin in der Prozessierung der *Zona pellucida* ist auch eine potentielle Rezeptorfunktion für SLLP1 des am Plasmalemma verbleibenden C-Terminus weiterhin möglich. Lediglich die durch ausschließlich bioinformatische Analysen belegte Transmembrandomäne, wie sie PIRES ET AL. (2013) favorisieren, widerspricht dieser Doppelfunktion von Ovastacin. Solch eine Transmembrandomäne würde mindestens aus sterischen Gründen einer proteolytischen Aktivität und der ZP2-Prozessierung widersprechen.

In Abbildung 4.1 ist der aus dieser Arbeit hervorgehende Ablauf der Ovastacin Freisetzung und der Interaktionen visuell dargestellt. Diese erweitert das von STÖCKER ET AL. (2014) vorgeschlagene Modell um den Verbleib und die Funktion der C-terminalen Domäne des Ovastacins. Nach Exocytose des ersten Polkörperchens verbleibt der C-Terminus am Oolemma in diesem Bereich der Kortikalgranula freien Domäne, sowie nach der Plasmogamie ringsum am Plasmalemma der Zygote. Aus diesem Modell geht deutlich sowohl die Möglichkeit einer Rezeptorfunktion, als auch der ZP2-Prozessierung hervor. Über die konkrete Funktion der C-terminalen Domäne kann derzeit nur spekuliert werden.

Hierbei darf nicht unerwähnt bleiben, dass sich die Ergebnisse im Western-Blot und der Histologie in bestimmten Aspekten widersprechen. Der Western-Blot suggeriert den Verbleib sowohl des C-Terminus als auch der katalytischen Domäne am Embryo, während die histologischen Untersuchungen nur den Verbleib der C-terminalen Domäne unterstützen. Da es bislang nicht möglich war, die Gesamtmenge und verbleibende Menge an Ovastacin zu quantifizieren, bleibt noch unklar, wieviel des exocytierten Ovastacins am Plasmalemma zurückbleibt. Auch in der höheren Sensitivität der Immunfluoreszenz gegenüber dem Western-Blot beziehungsweise in der Erkennung der nativen Faltung des Proteins in der Immunfluoreszenz könnte die Ursache dieses Widerspruchs zu finden sein.

4.3. Subfertilität Ovastacin-defizienter Mäuse

In dieser Arbeit konnte die publizierte Subfertilität des Ovastacin-defizienten FVB-Stamms bestätigt werden. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass diese Subfertilität nicht auf eine geringere Ovulationsrate zurückzuführen sein kann. Allerdings konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die Ovastacin-Defizienz kein erhöhtes Polyspermierisiko bewirkt. Im Gegenteil, zeigen die Ovastacin-defizienten Mäuse haben sogar eine leicht höhere Befruchtungsrate sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Somit sind die vielen noch an die Zygote des *knockouts* gebundenen Spermien kein Indiz für Polyspermie. Diese Ergebnisse decken sich mit den Daten aus DIETZEL (2014) und GAHLAY ET AL. (2010). Diese untersuchten zwar nicht Ovastacin-defiziente Oocyten, bewirkten allerdings durch Supplementierung von Fetuin-B beziehungsweise durch Mutation der Schnittstelle im ZP2 eine funktionelle Defizienz. GAHLAY ET AL. (2010) beobachteten eine um etwa 70 % reduzierte Fertilität ihrer ZP_{mut} Mäuse. Sie konnten keine häufigere Polyspermie detektieren, mussten aber feststellen, dass *in vivo* signifikant weniger Blastocysten zu

präparieren waren.

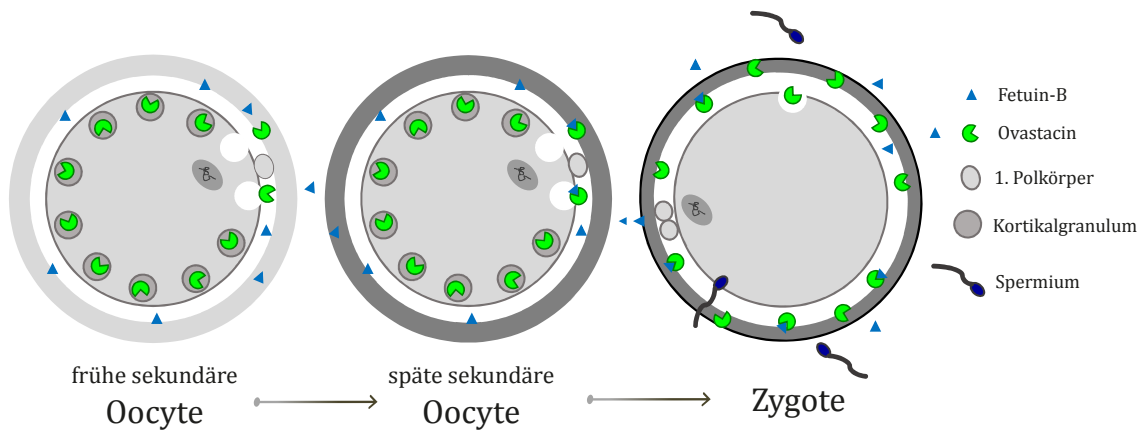


Abbildung 4.2.: **Vorgeschlagenes Modell der vorzeitigen Freisetzung und Aktivität von Ovastacin** nach STÖCKER ET AL. (2014) erweitert um die dieser Arbeit gezeigte Vorprozessierung der *Zona pellucida*.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen nicht nur, dass die *Zona pellucida* nach Befruchtung nicht prozessiert wird, sondern dass die *Ovastacin*-defizienten Oocyten bereits vor Befruchtung geringer prozessiert sind, da die Verdauzeit der *Zona pellucida* durch α -Chymotrypsin signifikant verkürzt ist. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass bereits der *premature release* von *Ovastacin* trotz der Anwesenheit von Fetuin-B zu einer Vorhärtung der *Zona pellucida* führt. Auch die bislang nur in den Rodentia gezeigte partielle Härtung der *Zona pellucida* vor Befruchtung im Bereich der Corticalgranula freien Domäne des ersten Polkörperchens dürfte auf eine Prozessierung durch *Ovastacin* zurückzuführen sein. Somit muss das Inhibitionsmodell (DIETZEL ET AL., 2013; STÖCKER ET AL., 2014) um diesen Sachverhalt erweitert werden (siehe Abbildung 4.2). Die Härtung der *Zona pellucida* ist daher als zweistufiger Prozess zu verstehen: Eine partielle Prozessierung vor der Befruchtung, die noch nicht dazu führt, dass die Spermien nicht penetrieren können, und die endgültige Härtung nach der Corticalreaktion, welche die Penetration weiterer Spermien verhindert.

Diese nicht vorhandene „Vorprozessierung“ könnte die Ursache der leicht erhöhten Befruchtungsrate in den *Ovastacin*-defizienten Tieren sein. Welche physiologische Funktion sich hinter dieser leichten „Vorhärtung“ verbirgt ist spekulativ, könnte aber, wie DENG ET AL. (2003) vorschlagen, in der Prävention des Spermieintritts im Bereich des maternalen Pronucleus begründet sein oder generell eine gewisse mechanische Grundresistenz der ovulierten Oocyten garantieren.

Die ZP_{mut} Mauslinie sollte der Theorie nach den gleichen Phänotyp aufweisen. Da eine $ZP1$ Defizienz zu einer deutlich weniger stabilen *Zona pellucida* führt, ist aufgrund von Resorption des frühen Embryos die Fertilität eingeschränkt (RANKIN ET AL., 1999). Diese Möglichkeit sollte auch bei *Ovastacin*-defizienten Mäusen in Betracht gezogen werden. Eine „weich“ bleibende *Zona pellucida* könnte ein vorzeitiges *hatching* bewirken.

4. Diskussion

Der dadurch ungeschützte Embryo ist im Ovidukt anfälliger resorbiert zu werden. Dies würde den Phänotyp genauso eindeutig klären, wie den nun eher untergeordnet wichtig erscheinenden Schutz vor Polyspermie.

Besonders beim Menschen ist aufgrund der geringeren Ovulationsrate und des fehlenden Schutzes durch den die Zygote umgebenden Cumulus, anzunehmen, dass eine *loss of function* Mutation im Ovastacin-Gen auch zur Subfertilität, wenn nicht gar zur Infertilität, führt.

4.4. Extraovariale Expression des Ovastacins

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ovastacin nicht exklusiv in den Oocyten beziehungsweise im Ovar exprimiert wird. Dies erweitert das von QUESADA ET AL. (2004) gezeigte Expressionsmuster um Thymus und Milz, außerdem betrifft dieser Befund beide Geschlechter. Untersuchungen von PIRES ET AL. (2015) zeigten keine Expression außerhalb der Oocyte. Diese Autoren selbst im Ovar nur eine sehr schwache Expression zeigen konnten. Dafür könnte eventuell die mangelnde Sensitivität des dort verwendeten Nachweisverfahrens verantwortlich sein. Die zusätzliche Expression im Thymus könnte mit der dort stattfindenden T-Zell Reifung im Zusammenhang stehen. Der Nachweis auf Proteinebene außerhalb des Ovars beschränkt sich ausschließlich auf Thymusgewebe.

Da das Expressionsmuster der hormonbehandelten, wie nicht-hormonbehandelten Mäuse identisch ist, muss davon ausgegangen werden, dass sich die von QUESADA ET AL. (2004) gezeigte Hormonabhängigkeit der Expression ausschließlich auf die Oocyten beschränkt.

4.5. Phylogenie des Ovastacins

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass die C-terminale Domäne in allen Eutheria mit der Konsensussequenz LxxL zwar vorhanden ist, allerdings in einigen Ordnungen (u.a. Afrotheria) mit ca. 35 % Identität eine nur geringe Sequenzähnlichkeit mit murinem Ovastacin aufweist. Dennoch stimmt der Konsensusbaum mit der aktuell akzeptierten Phylogenie der Säugetierordnungen überein. Der Baum löst die Stellungen der Ordnungen zueinander allerdings nicht entsprechend der aktuell bekannten Verwandtschaftsverhältnisse (BININDA-EMONDS ET AL., 2007) auf. Dies war allerdings aufgrund der sehr raschen Evolution der Großgruppen (Afrotheria, Euarchontoglires und Laurasiatheria), welche alle vor ca. 100 Mio. Jahren evolvierten, auch nicht zu erwarten. Die Phylogenie des C-Terminus belegt allerdings, dass ein gewisser Selektionsdruck auf ihm liegen muss, da die Ordnungen oder andere Taxa sonst nicht, wie aus Abbildung F.8 ersichtlich ist, clustern würden. Unklar bleibt, warum die N-terminale Hälfte der C-terminalen Domäne deutlich konservierter ist, als der C-terminale Bereich.

Da die C-terminale Domäne des Ovastacins der Marsupialia außer ihrem Vorhandensein keine signifikante Sequenzähnlichkeit (<20 %) zum murinen Enzym zeigt, bleibt zu bezweifeln, dass es sich bei diesem Protein schon um das eigentliche Säugerovastacin handelt. Bis jetzt sind außerhalb der Mammalia nur zwei *hatching* Enzyme in den Amniota beschrieben, eins in der Wachtel (*C. coturnix*) (ELAROSSI UND DELUCA, 1994) und eins in einer Weichschildkröte (*P. sinensis*) (YASUMASU ET AL., 2010). Somit kann

mit den bisher veröffentlichten Daten nur wenig über die Evolution der amniotischen *hatching* Enzyme zum Ovastacin gesagt werden. Da diese beiden *hatching* Enzyme den gleichen Domänenbau mit einer nicht charakterisierten C-terminalen Domäne aufweisen, liegt jedoch eine Homologievermutung nahe. Hierfür spricht auch die scheinbare Konservierung der Astacin-spezifischen diaziden Schnittstelle der *Zona pellucida* auch in der Vitellinmembran der Amnioten.

Wann sich allerdings der Wandel von einem *hatching* zu einem *hardening* Enzym vollzogen lässt sich nicht klären. Während die amniotischen *hatching* Enzyme sukzessiv die Vitellinmembran abbauen, führt die plötzliche Prozessierung durch Ovastacin zur Härtung und nach dem Schlüpfen bleibt meist noch die *Zona pellucida* als Hülle zurück. Da die *Zonae pellucidae* der Marsupialia deutlich schneller durch α -Chymotrypsin abgebaut werden (DUNBAR UND O'RAND, 1991), als die der Placentalia, bleibt die Frage offen, welche Funktion ein typisches Ovastacin-Homolog zu erfüllen hat. Bislang liegen leider keinerlei Daten zur *Zona pellucida* Prozessierung in den Monotremata und Marsupialia *in vivo* wie *in vitro* vor.

Die rein bioinformatische Analyse der *astacin-like* (astl) Metalloprotease der Marsupialia legt nicht nahe, dass es sich bei diesem Enzym bereits um Ovastacin handelt.

4.6. Ausblick

Freisetzung und Aktivierung von Ovastacin

Da im Rahmen dieser Arbeit nicht der *in vivo* Aktivator identifiziert werden konnte, muss dies der Gegenstand nachfolgender Arbeiten sein. Das proteolytische Netzwerk der Befruchtung und die Stellung des Ovastacins in diesem Netzwerk sind noch nicht hinreichend geklärt. Technisch könnten bei dieser Aufklärung membrangängige Ovastacin-spezifische Substrate sowie gegen den neo-N-Terminus des Ovastacin gerichtete Antikörper helfen. Dadurch könntete es gelingen, den genauen Zeitpunkt der intrazellulären Aktivierung zu bestimmen. Auch ob es *in vivo* zu einer zusätzlichen Prozessierung nach der Freisetzung kommt, ist noch ungeklärt.

Ein weiterer zentraler Punkt künftiger Arbeiten muss die Analyse der Funktion der C-terminalen Domäne sein. Hierfür wäre vor allem die Aufklärung der Struktur hilfreich. Auch die Gesamtstruktur von Ovastacin im Komplex mit Fetuin-B könnte genaueren Einblick in die Abläufe um die Befruchtung liefern.

Auch gilt es den Verbleib des C-Terminus am Plasmalemma genauer zu untersuchen, um die Unklarheiten die sich aus dieser Arbeit ergaben zu beseitigen.

Unter anderem ist die Frage offen, ob der dort verbleibende C-terminale Abschnitt, wie vermutet, als Rezeptor oder Ligand, agiert.

Der Frage nach der Funktion der Vorhärtung der *Zona pellucida* im Rahmen der Ei-Spermium-Interaktion muss noch eingehender nachgegangen werden. Es könnte sein, dass diese leichte Vorhärtung einen Effekt auf die Bindungsfähigkeit der *Zona* oder den Penetrationserfolg der Spermien hat. Ein feineres Setup der *Zona pellucida* Degradation und Messungen des Penetrationserfolges könnten hierzu Aufschluss geben.

4. Diskussion

Subfertilität Ovastacin-defizienter Mäuse

Um nachzuweisen, dass die Subfertilität der Ovastacin-Defizienz auf eine Resorption des frühen Embryo zurückzuführen ist, sind weitere Untersuchungen nötig. Vergleichende Messungen der Stärke der *Zona pellucida* im frühen Embryo sowie Bestimmung des *hatching*-Zeitpunktes in Wildtyp und *knockout* könnten dafür Beweise liefern. Sollte dies eine Resorption bestätigen, so wäre es sinnvoll das humane Genom nach Mutationen im Ovastacin-Gen und auf gehäufte Infertilität zu untersuchen. Wenn die Regulation von Ovastacin und Fetuin-B keinen Einfluss auf die Polyspermie hat, ist die Frage nach der erhöhten Polyspermie in der *in vitro* Fertilisation erneut zu stellen.

Phylogenie von Ovastacin

Um der Phylogenie von Ovastacin genauer auf den Grund zu gehen sind vergleichende Untersuchungen mit den potentiellen Vorfahren, den amniotischen *hatching* Enzymen, nötig. Eine genauere Charakterisierung der C-terminalen Domäne könnte weitere konservierte Bereiche zeigen und eventuell auch Rückschlüsse auf den Ursprung dieser Domäne selbst geben. Weitere bioinformatische Analysen könnten Aufschluss über den Wandel vom *hatching* zum *hardening* Enzym geben.

Literaturverzeichnis

- Austin, C. (1956). Cortical granules in hamster eggs. *Exp. Cell Res.*, 10(2):533–540.
- Austin, C. und Braden, A. (1956). Early reaction of the rodent egg to sperm penetration. *J. Exp. Biol.*, 33:358–365.
- Avella, M., Baibakov, B., und Dean, J. (2014). A single domain of the ZP2 zona pellucida protein mediates gamete recognition in mice and humans. *J. Cell. Biol.*, 205(6):801–809.
- Avella, M., Xiong, B., und Dean, J. (2013). The molecular basis of gamete recognition in mice and humans. *Molecular Human Reproduction*, 19(5):279–289.
- Baba, T., Azuma, S., Kashiwabara, S., und Toyoda, Y. (1994). Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J. Cell Biol.*, 269:31845–49.
- Baibakov, B., Boggs, N., Yauger, B., Baibakov, G., und Dean, J. (2012). Human sperm bind to the N-terminal domain of ZP2 in humanized zonae pellucidae in transgenic mice. *J. Cell Biol.*, 197(7):897–905.
- Baibakov, B., Gauthier, L., Talbot, P., Rankin, T., und Dean, J. (2007). Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis. *Development*, 134:933–943.
- Barry, M. (1843). Spermatozoa Observed within the Mammiferous Ovum. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 133:33.
- Becker, C., Kruse, M.-N., Slotty, K., Köhler, D., Harris, J., Rösmann, S., Sterchi, E., und Stöcker, W. (2003). Differences in the Activation Mechanism between the α and β Subunits of Human Meprin. *J. Biol. Chem.*, 384:825–831.
- Becker-Pauly, C., Barre, O., Schilling, O., dem Keller, U. A., Ohler, A., Broder, C., Schütte, A., Kappelhoff, R., Stöcker, W., und Overall, C. (2011). Proteomic analyses reveal an acidic prime side specificity for the astacin metalloprotease family reflected by physiological substrates. *Mol. Cell Prot.*, 10(9):M111.009233.
- Bensadoun, A. und Weinstein, D. (1976). Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Analytical Biochemistry*, 70:241–250.
- Bianchi, E., Doe, B., Glouding, D., und Wright, G. (2014). Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature*, 408(7497):483–487.

Literaturverzeichnis

- Bianchi, E. und Wright, G. (2014). Izumo meets Juno: preventing polyspermy in fertilization. *Cell Cycle*, 13(13):2019–20.
- Bininda-Emonds, O., Cardillo, M., Jone, K., MacPhee, R., Beck, R., Grenyer, R., Price, S., Vos, R., Gittleman, J., und Purvis, A. (2007). The delayed rise of present-day mammals. *Nature*, 446:507–512.
- Bischoff, T. (1854). Bestätigung der von Dr. Newport bei den Batrachiern und Dr. Barry bei den Kaninchen behaupteten Eindringens der Spermatozoiden in das Ei. Rickers'sche Buchhandlung Giessen.
- Bleil, J. und Wassarman, P. (1980). Structure and function of the Zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocytes's zona pellucida. *Dev Biol*, 76:185–202.
- Bleil, J. und Wassarman, P. (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. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 85(18):6778–82.
- Bleil, J. und Wassarman, P. (1990). Identification of a ZP3-binding protein on acrosome-intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking. *J. Cell Biol.*, 87:5563–67.
- Bode, W., Gomis-Rüth, F., Hube, R., Zwilling, R., und Stöcker, W. (1992). Structure of astacin and implication for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases. *Nature*, 358(6382):164–167.
- Boja, E., Hoodbhoy, T., Fale, H., und Dean, J. (2003). Structural characterization of native mouse zona pellucida proteins using mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry*, 278:3419–34202.
- Bond, J. und Beynon, R. (1995). The astacin family of metalloendopeptidases. *Protein Science*, 4:1247–1261.
- Bork, P. (1993). A trefoil domain in the major rabbit zona pellucida protein. *Protein Science*, 2:669–670.
- Braden, A. (1953). Distribution of sperms in the genital tract of the female rabbit after coitus. *Aust. J. Biol. Sci.*, 6(4):693–705.
- Bugge, T., Flick, M., Daugherty, C., und Degen, J. (1995). Plasminogen deficiency causes severe thrombosis but is compatible with development and reproduction. *Genes & Development*, 9(7):794–807.
- Burkart, A., Xiong, B., Baibakov, B., Jimenez-Movilla, M., und Dean, J. (2012). Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in zona pellucida to prevent polyspermy. *J. Biol. Chem*, 197(1):37–44.
- Chiu, P., Wong, B., Chung, M., Pang, R., Sumitro, S., Gupta, S., und Yeung, W. (2008)a. Native human zona pellucida glycoproteins: purification and binding properties. *Biol. Reprod.*, 79(5):869–877.

- Chiu, P., Wong, B., Lee, C., Sumitro, S., Gupta, S., und Yeung, W. (2008)b. Native human zona pellucida glycoproteins: purification and binding properties. *Hum. Reprod.*, 23(6):1385–93.
- Clark, G. (2011). The molecular basis of mouse sperm-zona pellucida binding: a still unresolved issue in developmental biology. *Reproduction*, 142(3):279–289.
- Clift, D. und Schuh, M. (2013). Restarting life: fertilization and the transition from meiosis to mitosis. *Nature reviews: Molecular cell biology*, 14 (9):549–562.
- Conner, S. und Hughes, D. (2003). Analysis of fish ZP1/ZPB homologous genes - Evidence for both genome duplication and species-specific amplification models of evolution. *Reproduction*, 126:347–352.
- Conner, S., Lefièvre, L., Hughes, D., und Barratt, C. (2005). Cracking the egg: increased complexity in the zona pellucida. *Human Reproduction*, 20(5):1148–1152.
- Coy, P., Jimenez-Movilla, M., Garcia-Vazquez, F., Mondéjar, I., Grullón, L., und Romar, R. (2012). Oocytes use the plasminogen-plasmin system to remove supernumerary spermatozoa. *Human Reprod.*, 27(7):1985–1993.
- Cran, D. (1989). Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 38:39–62.
- Denecke, B., Gräber, S., Schäfer, C., Heiss, A., m Wöltje, und Jahnen-Dechent, W. (2003). Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of Fetuin-B and fetuin-A. *Biochem.J.*, 376:135–145.
- Deng, M., Kishikawa, H., Yanagimachi, R., Kopf, G., Schultz, R., und Williams, C. (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. (2014). The biological role of fetuin-B: inhibition of zona pellucida hardening and preservation of female fertility in mice. *Dissertation, RWTH Aachen*.
- Dietzel, E., Wessling, J., Floehr, J., Schäfer, C., Ensslen, S., Denecke, B., Neulen, J., Rösing, B., Veitinger, T., Spehr, M., Tropartz, T., Tolba, R., Renne, T., Egert, A., Schorle, H., Gottenbusch, Y., Hildebrand, A., Yiallourous, I., Stöcker, W., und Jahnen-Dechent, W. (2013). Fetuin-B, a Liver-Derived Plasma Protein is Essential for Fertilization. *Dev. Cell*, 25(1):106–112.
- Ducibella, T. (1996). The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. *Hum.Reprod.Update*, 2(1):29–42.
- Ducibella, T., Anderson, E., Albertini, D., Aalberg, J., und Rangaraian, S. (1988). Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. *Dev. Biol*, 130(1):184–197.

Literaturverzeichnis

- Ducibella, T., Duffy, P., und Buetow, J. (1994). Quantification and localization of cortical granules during oogenesis in the mouse. *Biol. Reprod.*, 50(3):467–473.
- Ducibella, T., Gross, A., Emmi, V., Pezias, A., Layman, L., und Reindollar, R. (1995). A zona biochemical change and spontaneous cortical granule loss in eggs that fail to fertilize in in vitro fertilization. *Fertil Steril.*, 64:1154–1161.
- Dunbar, B. und O'Rand, M. (1991). A COMPARATIVE OVERVIEW OF MAMMALIAN FERTILIZATION. Springer Science + Business Media, New York.
- Dunn, M. und Crisp, S. (1994). Detection of Proteins in Polyacrylamide Gels Using an Ultrasensitive Silver Staining Technique. *Methods in Molecular Biology*, 32:113–118.
- Elaroussi, M. und DeLuca, H. (1994). A new member of the astasin family of metalloendopeptidases: A novel 1,25-dihydroxyvitamin D-3-stimulated mRNA from chorioallantoic membrane of quail. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1217(1):1–8.
- Floehr, J., Dietzel, E., Neulen, J., Rösing, B., Weissenborn, U., und Jahnen-Dechent, W. (2016). Association of high fetuin-B concentrations in serum with fertilization rate in IVF: a cross-sectional pilot study. *human reproduction*, 0(0):1–8.
- Gahlay, G., Gauthier, L., Baibakov, B., Epifano, O., und Dean, J. (2010). Gamete Recognition in Mice Depends on the Cleavage Status of an Egg's Zona Pellucida Protein. *Science*, 329(5988):216–219.
- Gelbaya, T., Potdar, N., Jevé, Y., und Nardo, L. (2014). Definition and Epidemiology of Unexplained Infertility. *Obs. Gyn Soc.*, 69(2):109–115.
- Gnoth, C., Godehardt, E., Frank-Herrmann, P., Friol, K., und Freundl, G. (2005). Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum. Reprod.*, 20(5):1144–47.
- Gomis-Rüth, F. (2003). Structural Aspects of the Metzincin Clan of Metalloendopeptidases. *Mol. Biol.*, 24(2):157–202.
- Gomis-Rüth, F., Trillo-Muyo, S., und Stöcker, W. (2012). Functional and structural insight into astacin metallopeptidases. *J. Biol. Chem.*, 393:1027–1041.
- Grams, F., Dive, V., Yiotakis, A., Yiallourous, I., Zwilling, R., Bode, R., und Stöcker, W. (1996). Structure of astacin with a transition-state analogue inhibitor. *Nat. Struct. Biol.*, 3:671–675.
- Green, D. (1997). Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Reviews of reproduction*, 2:147–156.
- Greve, J. und Wassarman, P. (1985). Mouse extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J Mol Biol*, 181:253–264.
- Gross, V., Wessel, G., Florman, H., und Ducibella, T. (2000). A Monoclonal Antibody That Recognizes Mammalian Cortical Granules and a 32-Kilodalton Protein in Mouse Eggs. *Biology of Reproduction*, 63(2):575–581.

- Grullòn, L., Gadea, J., Mondèjar, I., Matàs, C., Romar, R., und Coy, P. (2013). How Is Plasminogen/Plasmin System Contributing to Regulate Sperm Entry Into the Oocyte. *Reproductive Sciences*, 9:1075–82.
- Gulyas, B. und Yuan, L. (1985). Cortical reaction and zona hardening in mouse oocytes following exposure to ethanol. *The Journal of experimental zoology*, 233(2):269–276.
- Gupta, S., Bhandari, B., Shrestha, A., Biswal, B., Palaniappan, C., Malhotra, S., und Gupta, N. (2012). Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization. *Cell Tissue Res.*, 349(3):665–678.
- Gwatkin, R. (1964). EFFECT OF ENZYMES AND ACIDITY ON THE ZONA PELLUCIDA OF THE MOUSE EGG BEFORE AND AFTER FERTILIZATION. *Journal of reproduction and fertility*, 7:99–105.
- Gwatkin, R., Rasmusson, G., und Williams, D. (1976). Induction of the cortical reaction in hamster eggs by membrane-active agents. *J. Reprod. Fert.*, 47:299–303.
- Gwatkin, R., Williams, D., Hartmann, J., und Kniazuk, M. (1973). THE ZONA REACTION OF HAMSTER AND MOUSE EGGS: PRODUCTION IN VITRO BY A TRYPSIN-LIKE PROTEASE FROM CORTICAL GRANULES. *J. Reprod. Fert.*, 32:259–265.
- Herrero, M., Mandal, A., Digilio, L., Coonrod, S., Maier, B., und Herr, J. (2005). Mouse SLLP1, a sperm lysozyme-like protein involved in sperm-egg binding and fertilization. *Dev. Biol.*, 284:126–142.
- Hertwig, O. (1876). Beiträge zur Kenntnis der Bildung, Befruchtung und Theilung des thierischen Eies. *Morphologisches Jahrbuch*, 1(2):347–434.
- Hildebrand, A. (2008). Expression und funktionelle Analyse von Ovastacin. *Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz*.
- Hinduja, I., Kumar, A., und Kumar, T. A. (1990). Ultrastructure of the cortex in the human egg. *Hum. Reprod.*, 5(1):66–70.
- Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A., und Okabe, M. (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*, 434(7030):234–238.
- Jahnen-Dechent, W., Schinke, T., Trindl, A., Müller-Esterl, W., Sablitzki, F., Kaiser, S., und Blessing, M. (1997). Cloning and Targeted Deletion of the Mouse Fetuin Gene. *Journal of Biological Chemistry*, 272(50):31496–503.
- Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Stouh, Y., Baba, S., Chiba, K., und Hirohashi, N. (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 108(12):4892–96.

Literaturverzeichnis

- Johnson, M., Eager, D., Muggelton-Harris, A., und Grave, H. (1975). Mosaicism in organisation concavalin A receptors on surface membrane of mouse egg. *Nature*, 257(5524):321–322.
- Jovine, L., Qi, H., Litscher, E., und Wassarman, P. (2004). A duplicated motif controls assembly of zona pellucida domain proteins. *PNAS*, 101(16):5922–27.
- Jovine, L., Qi, H., Williams, Z., Litscher, E., und Wassarman, P. (2002). The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. *Nature Cell Biol*, 4:457–461.
- Kang, D., Gho, Y., Suh, M., und Kang, C. (2002). Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 23:1511–1512.
- Karmilin, K. (2016). Regulation der Aktivität von Ovastacin, einer Protease aus den cortikalen Granula der Säugereizelle. *Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz*.
- Kohlrausch, F. (1879). Das elektrische Leitvermögen der wässrigen Lösungen von den Hydraten und Salzen der leichten Metalle, sowie Kupfervertriol, Zinkvertriol und Silber-salpeter. *ANNALEN DER PHYSIK UND CHEMIE*, VI.
- Kohlrausch, F. und Holborn, L. (1898). Das Leitvermögen der Elektrolyte insbesondere der Lösungen. B.G. Teubner, Leipzig.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem Biophys Methods*, pages 203–209.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685.
- Lee, C., Bongcam-Rudolf, E., Sollner, C., Jahnen-Dechent, W., und Claesson-Welsh, L. (2009). Type 3 cystatins; fetuins, kininogen and histidine-rich glycoprotein. *Frontiers in Bioscience*, 14:2911–2922.
- Lefie’vre, L., Conner, S., Olufowobi, O., Afnan, M., Lenton, W., Hughes, D., Brewis, I., und Barrat, C. (2004). Identification of four glycoproteins in the human zona pellucida by proteomic analysis of 5 oocytes. *Hum. Reprod.*, 19:1580–1586.
- Liu, C., Litscher, E., Mortillo, S., Sakai, Y., Kinloch, R., Stewart, C., und Wassarman, P. (1996). Targeted disruption of the mZP3 gene results in production of eggs lacking a zona pellucida and infertility in female mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:5431–5436.
- Liu, M. (2011). The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9(1):1–17.

- Liu, M., Sims, D., Calarco, P., und Talbot, P. (2003). Biochemical heterogeneity, migration and pre-fertilization release of mouse oocyte cortical granules. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 1(77).
- López-Otín, C. und Bond, J. (2008). Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. *J. Biol. Chem.*, 283:30433–30437.
- Mandal, A., Klotz, K., Shetty, J., Jayes, F., Wolkowicz, M., Bolling, L., Coonrod, S., Black, M., Diekman, A., Haystead, T., Flickinger, C., und Herr, J. (2003). SLLP1, a unique, intra-acrosomal, non-bacteriolytic, c lysozyme-like protein of human spermatozoa. *Biol.Reprod.*, 68(5):1525–37.
- Merx, M., Schafer, C., Westenfeld, R., Brandenburg, V., Hidajat, S., Weber, C., Keteler, M., und Jahnen-Dechent, W. (2005). Myocardial stiffness, cardiac remodelling and diastolic dysfunction in calcification-prone fetion-A-deficient mice. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 16:3357–64.
- Miller, D., Gong, X., Decker, G., und Shur, B. (1993). Egg cortical granule N-acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy. *J. Cell Biol.*, 123(6):1431–1440.
- Moller, C. und Wassarman, P. (1989). Characterization of a Proteinase That Cleaves Zona Pellucida Glycoprotein ZP2 following Activation of Mouse Eggs. *Developmental Biology*, 132:103–112.
- Mondèjar, I., Grullòn, L., García-Vázquez, F., Romar, R., und 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. *Reprod. Biol.*, 97(2):453–461.
- Mur, Y., Buffone, M., Okane, M., und Gerton, G. (2012). Function of the acrosomal matrix: zona pellucida 3 receptor (ZP3R/sp56) is not essential for mouse fertilization. *Biol. Reprod.*, 86:1–6.
- Nicosia, S., Wolf, P., und Inoue, M. (1977). Cortical granule distribution and cell surface characteristics in mouse eggs. *Developmental Biology*, 57:56–74.
- Nishimura, H., Kim, E., Nakanishi, T., und T, B. (2004). Possible function of the ADAM1a/ADAM2 Fertilin complex in the appearance of ADAM3 on the sperm surface. *J. Biol. Chem.*, 279:34957–62.
- Ohler, A., Debela, M., Wagner, S., Magdolen, V., und Becker-Pauly, C. (2010). Analyzing the protease web in skin: meprin metalloproteases are activated specifically by KLK4, 5 and 8 vice versa leading to processing of proKLK7 thereby triggering its activation. *Biol. Chem.*, 391(4):455–460.
- Okabe, M. (2013). The cell biology of mammalian fertilization. *Development*, 140:4471–79.

Literaturverzeichnis

- Okada, A., Sano, K., Nagata, K., Yasumasu, S., Ohtsuka, J., Yamamura, A., Kubota, K., Iuchi, I., und Tanokura, M. (2010). Crystal structure of zebrafish hatching enzyme 1 of zebrafish *danio rerio*. *J.Mol.Biol.*, 402:865–878.
- Okada, A., Yanagimachi, R., und Yanagimachi, H. (1986). Development of a cortical granule-free area of the cortex and the perivitelline space in the hamster oocyte during maturation and following ovulation. *J Submicrosc. Cytolo.*, 18(2):233–247.
- Olivier, E., Soury, E., Ruminy, P., Husson, A., Parmenttier, F., Daveau, M., und Sailer, J. (2000). Fetuin-B, a second member of the fetuin family in mammals. *Reprod. Biol.*, 350(2):589–597.
- Ordóñez, G., Puente, X., Quesada, V., und Lòpez-Otín (2009). Proteolytic systems: constructing degradomes. *Meth.Mol.Biol.*, 539:33–47.
- O’Sullivan, C., Liu, S., Karpinka, J., und Rancourt, D. (2002). Embryonic hatching enzyme strypsin/ISP1 is expressed with ISP2 in endometrial glands during implantation. *Molecular Reproduction and Development*, 62(3):328–334.
- Peng, Q., Yang, H., Xue, S., Shi, L., Yu, Q., und Kuang, Y. (2012). Secretom profile of mouse oocytes after activation using mass spektrum. *J Assist. Reprod. Genet.*, 29:765–771.
- Pires, E., D’Souza, R., Needham, M., Herr, A., Jazaeri, A., Li, H., Stoler, M., Anderson-Knapp, K., Thomas, T., Mandal, A., Gougeon, A., Flickinger, C., Bruns, D., Pollok, B., und Herr, J. (2015). Membrane associated cancer-oocyte neoantigen SAS1B/Ovastacin is a candidate immunotherapeutic target for uterine tumors. *Oncotarget*, 6(30):30194–211.
- Pires, E., Hlavin, C., Macnamara, E., Ishola-Gbenla, K., Doerwaldt, C., Chamberlain, C., Klotz, K., Herr, A., Khole, A., Chertihin, O., Curnow, E., Feldman, S., Mandal, A., Shetty, J., Flickinger, C., und Herr, J. (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. *Dev.Dyn.*, 242(12):1405–26.
- Puente, X., Sànchez, L., Overall, C., und Otín, C. (2003). Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nature Reviews*, 4:544–558.
- Quesada, V., Sànchez, L., Àlvarez, J., und Otín, C. (2004). Identification and Characterization of Human and Mouse Ovastacin. *J. Biol. Chem.*, 279:26627–26634.
- Rankin, T., O’Brien, M., Lee, E., Wigglesworth, K., und Dean, J. (2001). Defective zonae pellucidae in Zp2 null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development*, 128:1119–1126.
- Rankin, T., Talbot, P., Lee, E., und Dean, J. (1999). Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development*, 126:3847–3855.

- Raz, T., Skutelsky, E., Amihai, D., Hammel, I., und Shalgi, R. (1998). Mechanisms Leading to Cortical Reaction in the Mammalian Egg. *Molecular Reproduction and Development*, 51:295–303.
- Sachdev, M., Mandal, A., Mulders, S., Digilio, L., Panneerdoss, S., Suryavathi, V., Pires, E., Klotz, K., and MB Herrero, L. H., Flickinger, C., van Duin, M., und Herr, J. (2012). Oocyte specific oolemal SAS1B is involved in sperm binding through intra-acrosomal SLLP1 during fertilisation. *Dev. Biol.*, 363:40–51.
- Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H., und Arnheim, N. (1985). Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science*, 230 (4732):1350–1354.
- Sato, K. (1979). Polyspermy-preventing mechanisms in mouse eggs fertilized in vitro. *J. Exp. Zool.*, 210:353–359.
- Schmell, E. und Gulyas, B. (1980). Ovoperoxidase activity in ionophore treated mouse eggs. II. Evidence for the enzymes' role in hardening the zona pellucida. *Gam. Res.*, 3:279–290.
- Schneider, C., Rasband, W., und Eliceiri, K. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 69:671–675.
- Schroeder, A., Schultz, R., Kopf, G., Taylor, F., Becker, R., und Eppig, J. (1990). Fetuin Inhibits Zona Pellucida Hardening and Conversion of ZP2 to ZP2F during Spontaneous Mouse Oocyte Maturation In Vitro in the Absence of Serum. *Biol. of Reprod.*, 43:891–897.
- Shur, B. und Hall, N. (1982). A role for mouse sperm surface galactosyltransferase in sperm binding to the egg zona pellucida. *J. Cell Biol.*, 95(2):574–579.
- Smith, F. (1929). The Ultra-Violet Absorption Spectra of Certain Aromatic Amino-Acids, and of the Serum Proteins. *Proceedings of the Royal Society of London*, 104:198–205.
- Sommer, P., Blin, N., und Gott, P. (1999). Tracing the evolutionary origin of the TFF-domain, an ancient motif at mucous surfaces. *Gene*, 236:133–136.
- Stöcker, W., Karmilin, K., Hildebrand, A., Westphal, H., Yiallourous, I., Weiskirchen, R., Dietzel, E., Floehr, J., und Jahnen-Dechent, W. (2014). Mammalian gamete fusion depends on the inhibition of ovastacin by fetuin-B. *Biol. Chem.*, 10:1195–99.
- Stöcker, W. und Bode, W. (1995). Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. *Cur. Op. Struct. Biol.*, 5(3):383–390.
- Stöcker, W., Wolz, R., und Zwilling, R. (1988). Astacus protease, a zinc metalloenzyme. *Biochemistry*, 27:5026–5032.
- Szollosi, D. (1967). Development of cortical granules and the cortical reaction in rat and hamster eggs. *Anat. Rec.*, 159(4):431–446.

Literaturverzeichnis

- Takeo, T. und Nakagata, N. (2011). Reduced Glutathione Enhances Fertility of Frozen/Thawed C57BL/6 Mouse Sperm after Exposure to Methyl-Beta-Cyclodextrin. *Biol. Reprod.*, 85(5):1066–72.
- Tawia, S. und Lopata, A. (1992). The fertilization and development of mouse oocytes following cortical granule discharge in the presence of a protease inhibitor. *Human Reproduction*, 7(7):1004–1009.
- Thall, A., Maly, P., und Lowe, J. (1995). Oocyte Gal alpha 1,3Gal epitopes implicated in sperm adhesion to the zona pellucida glycoprotein ZP3 are not required for fertilization in the mouse. *J. Biol.Chem.*, 270(37):21437–40.
- Tutuncu, L., Stein, P., Ord, T., Jorges, C., und Williams, C. (2004). Calreticulin on the mouse egg surface mediates transmembrane signaling linked to cell cycle resumption. *Dev. Biol.*, 270(1):246–260.
- van der Ven, H., Al-Hasani, S., Diedrich, K., Hamerich, U., Lehmann, F., und Krebs, D. (1985). Polyspermy in in vitro fertilization of human oocytes: frequency and possible causes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 442:88–95.
- van Leeuwenhoek, A. (1677). Observationes D. Anthonii Lewenhoek, de Natis e semine genitali Animalculis. *Philosophical Transactions of the Roal Society of London*, 12(133-142):1040–1046.
- von Baer, K. E. (1827). De Ovi Mammaliam et Honiinis genesis. *Epistolam ad Academiam Imperialem Scientarum Petropolitanam*, Leopold Voss, Leipzig.
- Wassarman, P. (1988). Zona pellucida glycoproteins. *Annual Review Biochemistry*, 57:415–442.
- Wassarman, P., Jovine, L., und Litscher, E. (2004). Mouse zona pellucida genes and glycoproteins. *Cytogenetic and genome research*, 101:228–234.
- Wessel, G., Brooks, J., Green, E., Haley, S., Voronina, E., Wong, J., Zaydfudim, V., und Conner, S. (2001). The Biology of Cortical Granules. *International Review of Cytology*, 209:117–206.
- Westphal, H. (2013). Ovastacin in der Hausmaus - Lokalisation im Organismus und Funktion bei der Befruchtung. *Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz*.
- Whitten, W. (1971). Nutrient requirements for the culture of preimplantation mouse embryos in vitro. *Adv. Biosci.*, 6:129–141.
- Wilfinger, W., Mackey, K., und Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*, 22:474–481.
- Wundt, W. (1873). Lehrbuch der Physiologie des Menschen. Verlag Ferdinand Enke Erlangen.

- Yasumasu, S., Uzawa, M., Iwasawa, A., und Yoshzaki, N. (2010). Hatching mechanism of the soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 155(4):435–441.
- Yin, X., Cuello, F., Mayr, U., Hao, Z., Hornshaw, M., Ehler, E., Avkiran, M., und Mayr, M. (2010). Proteomics Analysis of the Cardiac Myofilament Subproteome Reveals Dynamic Alterations in Phosphatase Subunit Distribution. *Mol Cell Proteomics*, 9(3):497–509.
- Zgoda, V., Moshkovskii, S., Ponomarenko, E., Andreewski, T., Kopylov, A., Tikhonova, O., Melnik, S., und Lisitsa, A. (2009). Proteomics of mouse liver microsomes: Performance of different protein separation workflows for LC-MS/MS. *Proteomics*, 9:4102–4105.
- Zhang, X., Rutledge, J., Khamsi, F., und Amrstrong, D. (1992). Release of tissue-type plasminogen activator by activated rat eggs and its possible role in the zona reaction. *Mol Reprod. Dev.*, 32(1):28–32.

A. Abkürzungen

Tabelle A.1.: **Drei- und Einbuchstabencode der Aminosäuren**

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutamat	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	Try	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
beliebige Aminosäure	Xxx	X

A. Abkürzungen

Tabelle A.2.: **Verwendete Einheiten**

Basenpaare	bp
Dalton	Da
Erdbeschleunigung	x g
Femtomolar	fM
Grad Celsius	°C
Gramm	g
Internationale Einheit	IU
Kilodalton	kDa
Kilogramm	kg
Liter	l
Meter	m
Mikromolar	μM
Mikrogramm	μg
Milligramm	mg
Millimolar	mM
Minuten	min
Molar	M
molarer Extinktionskoeffizient	ϵ_λ
Nanometer	nm
Nanomolar	nM
Osmolalität	Osmol
Sekunden	s
Stunden	h
Tage	d
Umdrehungen pro Minute	rpm
Volt	V
Zentimeter	cm

Tabelle A.3.: **Verwendete Abkürzungen**

-/-	<i>knockout</i>
+/+	Wildtyp
ADAM 1	<i>A Disintegrin And Metalloprotease 1</i> (Fertilin- α)
AHSG	(alpha-2-Heremans Schmid Glykoprotein)
APS	Ammoniumpersulfat
astl	<i>astacin-like</i>
BMP1	<i>Bone Morphogenetic Protein 1</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CBB	Coomassiebrillantblau
cDNA	<i>copy</i> DNA
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DIC	differentieller Interferenzkontrast
DOC	Desoxycholat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
Fc	<i>crystallisable fragment</i>
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
FVB	<i>Friend Virus B</i>
GALT	β -Galactosyltransferase
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
Gnrh	Gonadotropin- <i>Releasing</i> -Hormon
hCG	humanes Choriongonadotropin
HTF	<i>human tubal fluid</i>
i.p.	<i>intra peritoneal</i>
IgG	Immunglobulin G
IP3	Inositol-1,4,5-Triphosphat
ISP1	<i>Implantation Serine-Protease 1</i>
ISP2	<i>Implantation Serine-Protease 2</i>
KG	Kortikalgranula
KGFD	Kortikalgranula freie Domäne
LCA	<i>Lens culinaris</i> Agglutinin
LH	Luteinisierendes Hormon

A. Abkürzungen

Tabelle A.3.: **Verwendete Abkürzungen** Fortsetzung 1

MMPs	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n.s.	nicht signifikant
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>phosphate buffered saline</i> + Tween 20
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PMSG	<i>pregnant mares serum gonadotropin</i>
PRSS1	<i>protease serine 1</i>
PSF	Punktspreizfunktion
PVA	Polyvinylalkohol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVR	Perivitellinraum
rm	rekombinantes murines
RT	Raumtemperatur
SAS1B	<i>Sperm Acrosomal SLLP Binding</i> (aka Ovastacin)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SLLP 1	<i>Sperm Lysozyme Like Protein 1</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
SP56	siehe ZP3R
ssDNA	<i>single strand DNA</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBS-T	<i>tris buffered saline</i> + Tween 20
TCA	<i>trichloroacetic acid</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLL1	<i>tolloid-like 1</i>
TLL2	<i>tolloid-like 2</i>
TM	Transmembran-
tPA	<i>tissue plasminogen activator</i>
TRITC	<i>tetramethylrhodamine isothiocyanate</i>
TYH	Toyoda Yokoyama und Hosi

Tabelle A.3.: **Verwendete Abkürzungen** Fortsetzung 2

UV	ultraviolett
ZHE1	<i>zebrafish hatching enzyme 1</i>
ZP1	<i>Zona pellucida</i> Protein 1
ZP2	<i>Zona pellucida</i> Protein 2
ZP3	<i>Zona pellucida</i> Protein 3
ZP4	<i>Zona pellucida</i> Protein 4
ZPX	<i>Zona pellucida</i> Protein X
ZP3R	<i>Zona pellucida</i> Protein 3 Rezeptor

B. Hersteller- und Firmenverzeichnis

Tabelle B.1.: Angaben zu den Herstellern und Firmen der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Geräte

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
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
Leica Mikrosysteme GmbH	Ernst-Leitz-Str. 17-19, 35578 Wetzlar, D	www.leica-microsystems.com
Life Technologies GmbH	Frankfurter Str. 129B, 64293 Darmstadt, D	www.lifetechnologies.com
Merck KGaA	Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt, D	http://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
Sakura Finetek USA, Inc.	1750 West 214th Street, Torrance, CA 90501, US	www.sakura-americas.com
Sarstedt AG	Postfach 1220, 51582 Nümbrecht, D	www.sarstedt.com
Sigma Aldrich GmbH	Eschenstr. 5, 82024 Taufkirchen, D	www.sigmaaldrich.com
Thermo Fisher Scientific Inc.	81 Wyman Street, Waltham, MA 02454, USA	www.thermofisher.com
Vector BioLabs	293 Great Valley Parkway, Malvern, PA 19355, US	www.vectorbiolabs.com

C. DNA-, RNA- und Proteinsequenzen

```

1 ATGGGCCTGCTGCGTCTGCTGGTGTGTGC ACTTTGGCTGCTTGCTGCATGGCTCCCGAC
1 M G L L R L L V L C T L A A C C M A P D
61 TCCCACGGTCGTGGTTTTCGAGGCTCAGTCC GACGGTTCCCTCCCTGACCCCTGCTTCCATC
21 S H G R G F E A Q S D G S S L T P A S I
121 TCCCGTCTGCAGCGTCTGTTGGAGGCCCTG TCCGAGGAATCCGGTTCCTCCGCTCCTTCC
41 S R L Q R L L E A L S E E S G S S A P S
181 GGTTCCCGTACCGGTGGCCAGTCTATCGCT GGCCTGGGAAACTCCCAGCAGGGCTGGGAA
61 G S R T G G Q S I A G L G N S Q Q G W E
241 CACCCTCCCCAGTCCACCTTCTCTGTGGGT GCTCTGGCTCGTCCCCCCCAGATGTTGGCT
81 H P P Q S T F S V G A L A R P P Q M L A
301 GACGCTTCCAAGTCCGGTCCCGGTGCTGGC GCTGACTCCCTGTCTTTGGAGCAGTTCCAG
101 D A S K S G P G A G A D S L S L E Q F Q
361 CTGGCTCAGGCTCCCACCGTGCCTCTGGCT CTGTTCCCTGAGGCTCGTGACAAGCCCGCT
121 L A Q A P T V P L A L F P E A R D K P A
421 CCCATCCAGGACGCTTTTCGAGCGTCTGGCT CCTCTGCCTGGTGGTTGCGCTCCTGTTCT
141 P I Q D A F E R L A P L P G G C A P G S
481 CACATCCGCGAGGTGCCACGTGACGGTACC TGGTCCCACCCCCAGTTTCGAGAAG
161 H I R E V P E D G T W S H P Q F E K

```

Abbildung C.1.: DNA- und Proteinsequenz des C-Terminus Konstruktes
 Signalpeptid (aus Fetuin-B), C-terminale Domäne, Strep-tag; Antikörper Bindestellen:
 anti-Ovastacin Antikörper, anti-C-Terminus Antikörper

C. DNA-, RNA- und Proteinsequenzen

```

1 ATGGGTATCATGGGAAGCCTGTGGCCTTGG ATATTAACTATGCTCTCCTTGCTAGGTTTG
1 M G I M G S L W P W I L T M L S L L G L
61 AGCATGGGAGCACCCCTCAGCATCCAGATGT 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 Q D K D I P A I N Q
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 CCAAGCCCTTTCCGATTGTTGTGTCAGTGACC AATAATAAATGGCCCAAGGGCGTTGGTGGC
81 P S P F R L L S V T N N K W P K G V G G
301 TTTGTGGAGATCCCCTTCCCTGCTTTCCAGA AAGTATGATGAACCTCAGCCGCCGGGTCATT
101 F V E I P F L L S R K Y D E L S R R V I
361 ATGGATGCCTTTGCTGAGTTTGAACGTTTC ACATGCATCCGGTTTGTGTGCTACCATGGT
121 M D A F A E F E R F T C I R F V A Y H G
421 CAGAGAGACTTTGTTTCCATTCTTCCTATG GCGGGGTGTTTCTCTGGTGTGGGACGCAGT
141 Q R D F V S I L P M A G C F S G V G R S
481 GGAGGGATGCAGGTGGTGTCCCTGGCACCC ACTTGTCTCCGGAAGGGCCGAGGCATTGTC
161 G G M Q V V S L A P T C L R K G R G I V
541 CTACATGAGCTCATGCACGTACTTGGCTTC TGGCATGAGCATTACGGGCAGATCGGGAC
181 L H E L M H V L G F W H E H S R A D R D
601 CGCTACATCCAAGTCAACTGGAACGAGATC CTCCCGGGCTTTGAAATCAACTTCATCAAG
201 R Y I Q V N W N E I L P G F E I N F I K
661 TCACGGAGTACCAATATGTTAGTTCCTAT GACTACTCATCTGTGATGCATTATGGGAGA
221 S R S T N M L V P Y D Y S S V M H Y G R
721 TTTGCCTTCAGCTGGCGTGGGCAGCCCACC ATCATAACCACTCTGGACCTCCAGTGTTCAC
241 F A F S W R G Q P T I I P L W T S S V H
781 ATTGCCAGCGATGGAACCTGAGTACCTCA GATATCACCCGGTCTGCAGGCTGTATAAC
261 I G Q R W N L S T S D I T R V C R L Y N
841 TGCAGCCGGAGTGTCCCTGACTCCCACGGG AGAGGGTTTGAGGCCAGAGTGTGGAAGC
281 C S R S V P D S H G R G F E A Q S D G S
901 AGCCTCACCCCTGCCTCTATATCACGTCTA CAAAGACTTCTCGAGGCACTGTGAGAGGAA
301 S L T P A S I S R L Q 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 Q S I A G L G
1021 AACAGCCAGCAAGGATGGGAGCATCCTCCT CAGAGCACATTCAGTGTGGGAGCCTTGGCA
341 N S Q Q G W E H P P Q S T F S V G A L A
1081 AGACCACCTCAGATGCTAGCCGATGCTTCA AAATCGGGGCCTGGAGCAGGTGCAGACAGC
361 R P P Q M L A D A S K S G P G A G A D S
1141 TTGTCTCTAGAGCAGTTCCAGCTAGCCAG GCCCCCACTGTACCTCTTGCTCTATTTCCA
381 L S L E Q F Q L A Q A P T V P L A L F E
1201 GAAGCCAGAGACAAGCCAGCACCTATCCAA GATGCCTTTGAGAGGCTAGCTCCACTTCCA
401 E A R D K P A P I Q 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 E R S W S H
1321 CCGCAGTTCGAAAAA
441 P Q F E K

```

Abbildung C.2.: DNA- und Proteinsequenz des murinen Ovastacin Konstruktes Signalpeptid, Propeptid, Proteasedomäne, C-terminale Domäne, Streptag; Antikörper Bindestellen: anti-Propeptid Antikörper, anti-Ovastacin Antikörper, anti-C-Terminus Antikörper

```

1 ATGGGCCTGCTGCGTCTGCTGGTGCTGTGC ACTTTGGCTGCTTGCTGCATGGCTCGTTCC
1 M G L L R L L V L C T L A A C C M A R S
61 CCCCCTGCTCCTCCACTGCCTCAACGTCCT CTGTCCCCTCTGCACCCCCTGGGTTGCAAC
21 P P A P P L P Q R P L S P L H P L G C N
121 GACTCTGAGGTGCTGGCTGTGGCTGGCTTC GCTCTGCAGAACATCAACCGTGACCAAAG
41 D S E V L A V A G F A L Q N I N R D Q K
181 GACGGTTACATGCTGTCCCTGAACCGTGTG CACGACGTGCGCGAGCACTACCAAGAGGAC
61 D G Y M L S L N R V H D V R E H Y Q E D
241 ATGGGTTCCCTGTTCTACCTGACCCTGGAC GTGCTGGAACCGACTGCCACGTGCTGTCC
81 M G S L F Y L T L D V L E T D C H V L S
301 CGCAAGGCTCAGAAGGACTGCAAGCCCCGT ATGTTCTACGAGTCCGTGTACGGCCAGTGC
101 R K A Q K D C K P R M F Y E S V Y G Q C
361 AAGGCTATGTTCCACATCAACAAGCCTCGT CGTGTGCTGTACCTGCCCGCTTACAACCTGC
121 K A M F H I N K P R R V L Y L P A Y N C
421 ACCCTGCGTCCCGTGTCCAAGCGCAAGACC CACACCACTTGCCCCGACTGCCCTTCCCCT
141 T L R P V S K R K T H T T C P D C P S P
481 ATCGACCTGTCCAACCCCTCCGCTCTGGAA GCTGCTACCGAGTCCCTGGCTAAGTTCAAC
161 I D L S N P S A L E A A T E S L A K F N
541 TCCAAGTCCCCATCCAAGAAGTACGAGCTG GTCAAAGTGACCAAGGCCATGAACCAGTGG
181 S K S P S K K Y E L V K V T K A M N Q W
601 GTGTCCGGTCCCGCTTACTACGTGAGTAC CTGATCAAGGAAGCTCCCTGTACCAAGTCC
201 V S G P A Y Y V E Y L I K E A P C T K S
661 CAGGCTTCCCTGCTCCCTGCAGCACTCCGAC TCCGAGCCTGTCGGTATCTGCCAGGGTTCC
221 Q A S C S L Q H S D S E P V G I C Q G S
721 ACCGTGCAGTCCTCCCTGCGTCACGTCCCA CTGATCCAGCCCGTCGAGAAGTCCGTGACC
241 T V Q S S L R H V P L I Q P V E K S V T
781 GTGACCTGCGAGTTCTTCGAAAGCCAGGT CAGGTGCCCGGCGACGAGAACCCTGCTGTG
261 V T C E F F E S Q A Q V P G D E N P A V
841 ACTCAGGGTCCCCAGAAGCTGCCCCAGAAG AACACCGCTCCTACCTCCAGCCCTTCCGTC
281 T Q G P Q K L P Q K N T A P T S S P S V
901 ACTGCTCCCCGTGGTTCCATCCAGCACTTG CCCGAGCTGGACGACGAGAAGCCCCGAGGAA
301 T A P R G S I Q H L P E L D D E K P E E
961 TCCAAGGGCGGTTCCCCCGAAGAGGCTTTC CCTGTGCAGCTGGACCTGACCACCAACCCT
321 S K G G S P E E A F P V Q L D L T T N P
1021 CAGGGCGATACTCTGGACGTGTCCTTCCCTG TACCTGGAACCTGGCGACAAGAAGCTGGTC
341 Q G D T L D V S F L Y L E P G D K K L V
1081 GTCCTGCCATTCCCCGGCAAGGAACAGCGT TCCGCTGAGTGCCCTGGTCCCGAGAAGGAA
361 V L P F P G K E Q R S A E C P G P E K E
1141 AACACCCCCTGGTCCTGCCCCCAGCGCT CATCATCACCACCACCAC
381 N N P L V L P P S A H H H H H H

```

Abbildung C.3.: DNA- und Proteinsequenz des murinen Fetuin-B Konstrukt **Signalpeptid**, **His-tag**

C. DNA-, RNA- und Proteinsequenzen

5' ATGGGTATCATGGGAAGCCTGTGGCCTTGGATATTAAGTATGCTCTCCTTGCTAGGTTTGGAGCATGGGAGCAC
CCTCAGCATCCAGATGTTCTGGAGTCTGCAGTACCAGTGTCCAGAAGGCTTCACTCCTGGGGGAAGCCCGGTAT
TTCAGGACAAGGACATCCCGCAATTAACCAAGGGCTCATCTCAGAGGAGACCCAGAAAGCAGCTTCTGGTAG
AAGGGGACATTATCCGGCCAAGCCCCCTCCGATTGTTGTCAGTGACCAATAATAAATGGCCCAAGGGCGTTGGTG
GCTTTGTGGAGATCCCCTTCTGCTTTCCAGAAAGTATGATGAACCCAGCCGCCGGGTCATTATGGATGCCTTTG
CTGAGTTTGAACGTTTTCACATGCATCCGGTTTGTGGCTACCATGGTCAGAGAGACTTTGTTTCCATTCTTCCTA
TGGCGGGGTGTTTCTCTGGTGTGGGACGCAGTGGAGGGATGCAGGTGGTGTCTTGGCACCCTTGTCTCCGGA
AGGGCCGAGGCATTGTCTACATGAGCTCATGCACGTAAGTGGCTTCTGGCATGAGCATTACGGGCAGATCGGG
ACCGCTACATCCAAGTCAACTGGAACGAGATCCTCCCGGGCTTTGAAATCAACTTCATCAAGTCACGGAGTACCA
ATATGTTAGTTCCCTATGACTACTCATCTGTGATGCATTATGGGAGATTTGCCTTCAGCTGGCGTGGGCAGCCCA
CCATCATACCACTCTGGACCTCCAGTGTTCACATTGGCCAGCGATGGAACCTGAGTACCTCAGATATCACCCGGG
TCTGCAGGCTGTATAACTGCAGCCAGAGTGTCCCTGACTCCACGGGAGAGGGTTTGGAGCCAGAGTGTGGAA
GAAGTCTCACCCCTGCCTCTATATCACATCTACAAAGACTTCTCGAGGCACTGTGAGAGGAATCTGGAAGCTCTG
CCCCTAGTGGCTCCAGGACTGGAGGCCAGAGTATTGCCGGGCTTGGTAACAGCCAGCAAGGATGGGAGCATCCTC
CTCAGAGCACATTCAGTGTGGGAGCCTTGGCAAGACCACCTCAGATGCTAGCCGCTGCTTCAAATCGGGGCCTG
GAGCAGGTGCAGACAGCTTGTCTCTAGAGCAGTTCAGCTAGCCAGGCTCCCACTGTACCTTTGCTCTATTTT
CAGAAGCCAGAGACAAGCCAGCACCTATCCAAGATGCCCTTGGAGAGGCTAGCTCCGCTTCCAGGAGGCTGTGCAC
CTGGAAGTCACATTAGAGAGGTGCCAGAGACTGA 3'

Abbildung C.4.: **Ovastacin mRNA** aus *Mus musculus*
Primer Bindungsstellen an cDNA

D. Proteinparameter

Tabelle D.1.: **Parameter der verwendeten Proteine**

Erstellung der Proteinparameter ohne jeweiliges Signalpeptid mittels der Web-Applikation (web.expasy.org/protparam/); pI = Isoelektrischer Punkt; Extinktionskoeffizient ($\epsilon_{280\text{nm}}$) unter Annahme aller Cys als Cystine

Parameter	m Ovastacin	rm Ovastacin	rm C-Terminus	rm Fetuin-B
Länge	415 AS	425 AS	160 AS	378
Gewicht	45,2 kDa	46,5 kDa	16,7 kDa	41,8 kDa
pI	6,79	7,15	5,29	6,33
$\epsilon_{280\text{nm}}$	49430 /M*cm	54930 /M*cm	11000 /M*cm	24130 /M*cm

E. Systemspezifikationen und Einstellungen

Tabelle E.1.: **Relevante Systemspezifikationen Leica DM6000B**

Systemnummer: AF 6000 LX; Kamera: DFC360FX-360484408; DIC = differentieller Interferenzkontrast, BP = bandpass filter

Objektiv	Vergrößerung	numerische Apertur	Pixel	Refraktionsindex
HCX PL APO CS	63 x	1.32	202,36 x 151,15 µm	1.52
HCX PL APO CS	100 x	1.40	127,49 x 95,23 µm	1.52

Kanal	Filter	Exitationsfilter	Suppressionsfilter	dichroischer Spiegel
DIC	Ana	—	—	—
Fluoreszenz Blau	A4	BP 360/40	BP 470/40	400
Fluoreszenz Grün	L5	BP 480/40	BP 527/30	505
Fluoreszenz Rot	N3	BP 546/12	BP 600/40	565

Tabelle E.2.: **Einstellung Huygens Remote Manager** für Leica DM 6000B und 100fache Vergrößerung

Option	Einstellung
Number of channels	3
Point Spread Function	theoretical
Microscope type	widefield
Objective	100x
n.a.	1.4
Objective type	oil (1.515)
Sample medium	Mowiol (1.49)
Pixel size	91.59 nm
Depth dependent PSF correction	no
Restoration template	classic maximum likelihood
Signal to noise ration (SNR)	60
Background estimation	automatic
Stopping criteria	No. of Iterations 100 / Quality change 0.01

F. Weitere Daten

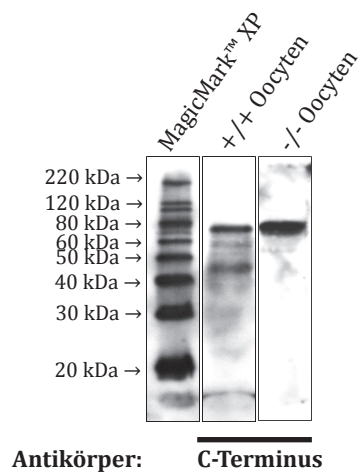


Abbildung F.1.: **Ovastacin in Oocyten** je 80-100 Oocyten bzw. 0,6 μg rekombinantes murines Ovastacin wurden in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit dem anti-C-Terminus Antikörper inkubiert

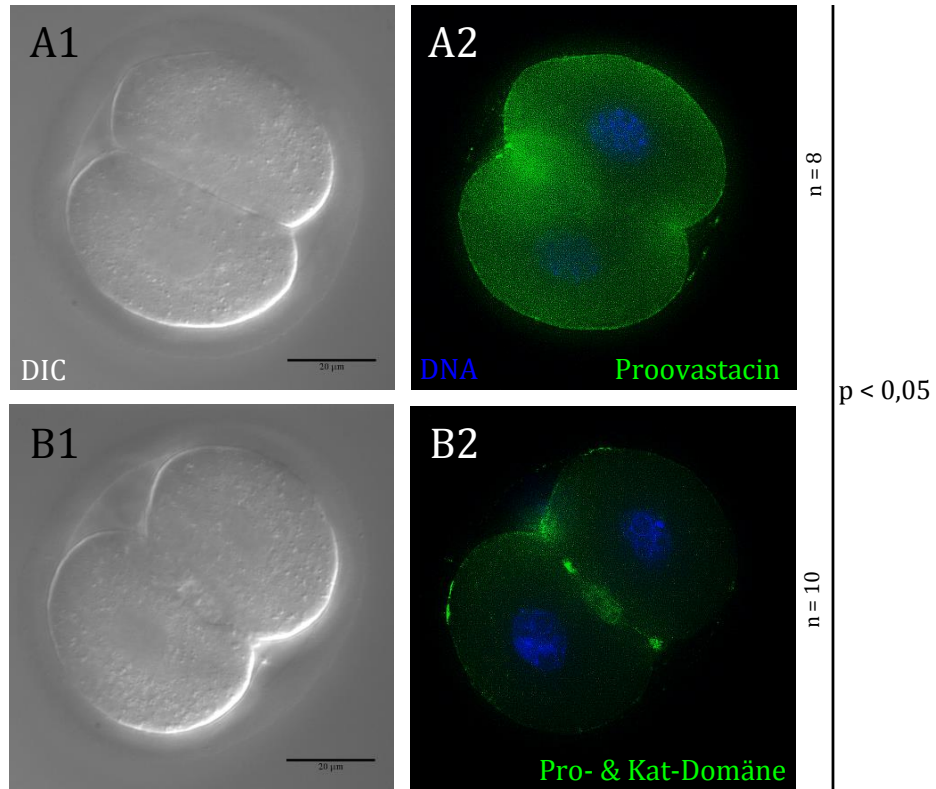


Abbildung F.2.: **Immunhistologie von Embryonen 7 (anti-„Proovastacin“ Antikörper)** lichtmikroskopische Aufnahme (nach Dekonvolution), 100x Objektiv, Wild-typ Embryonen **A)** anti-Proovastacin Antikörper permeabilisiert **B)** anti-„Proovastacin“ Antikörper permeabilisiert; **1)** differentieller Interferenzkontrast (DIC) **2)** DNA Färbung mittels DAPI (blau) und anti-Proovastacin bzw. anti-„Proovastacin“ Antikörper (grün); Statistik der Fluoreszenzintensität des primären Antikörpers mit Mann-Whitney U Test

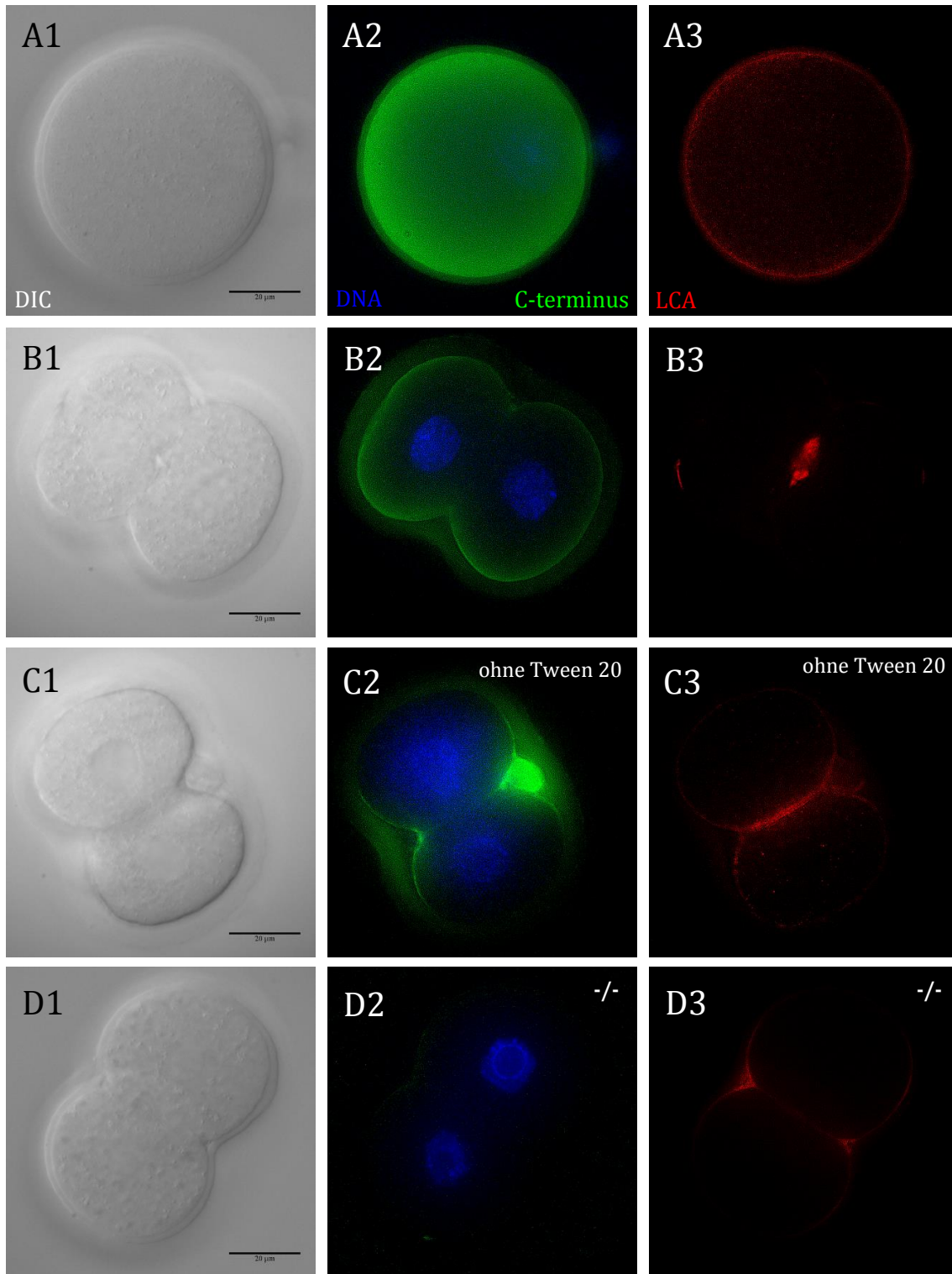


Abbildung F.3.: **Immunhistologie von Oocyten/Embryonen 8 (anti-C-Terminus Antikörper)** lichtmikroskopische Aufnahme (nach Dekonvolution), 100x Objektiv; **A)** Wildtyp (+/+) Oocyte **B)** Wildtyp Embryo **C)** Wildtyp nicht permeabilisierter Embryo **D)** Ovastacin-defizienter Embryo; **1)** differentieller Interferenzkontrast (DIC) **2)** DNA Färbung mittels DAPI (blau) und anti-C-Terminus Antikörper (grün) **3)** *Lens culinaris* Agglutinin (LCA)(rot)

F. Weitere Daten

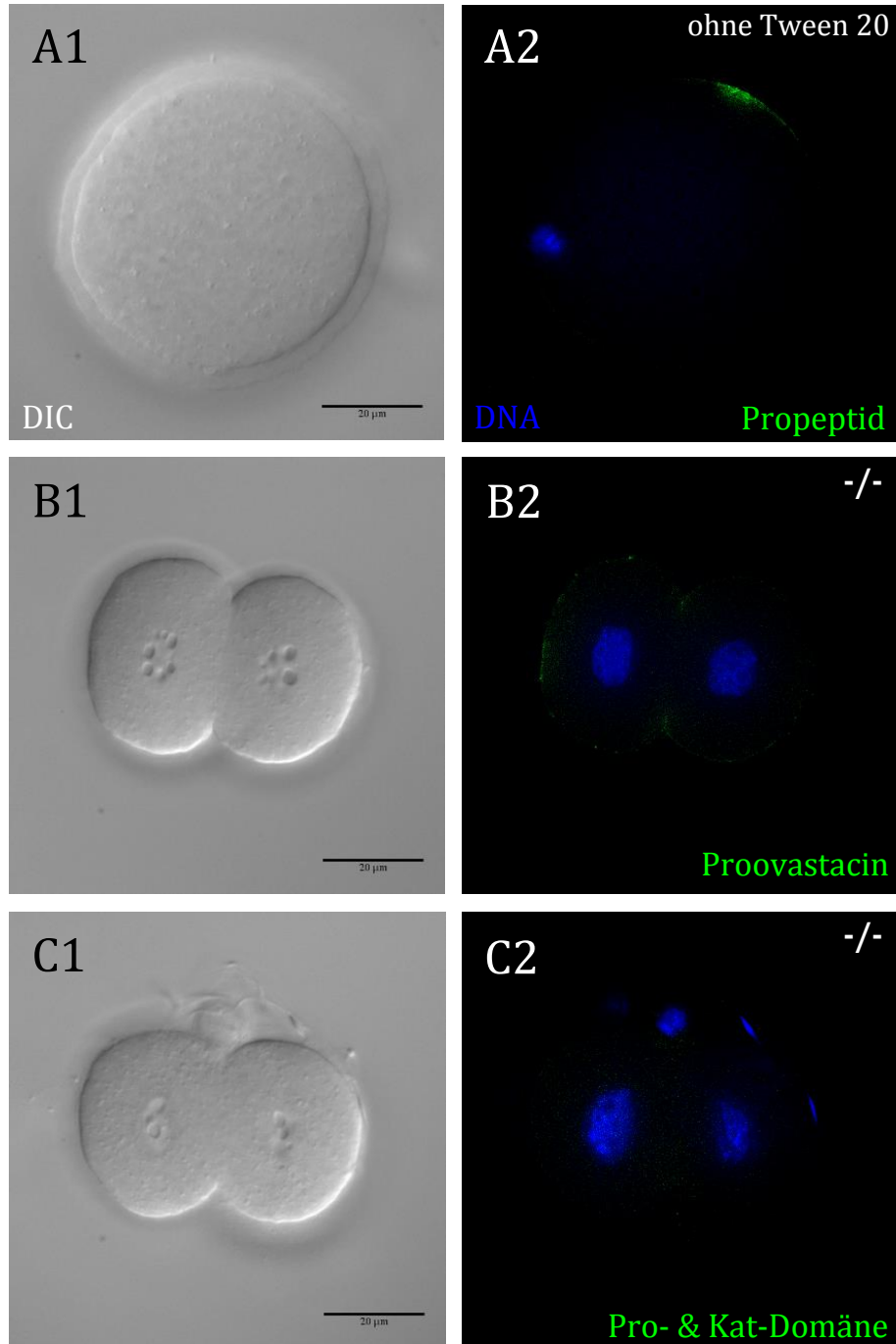


Abbildung F.4.: **Immunhistologie von Oocyten/Embryonen 9** lichtmikroskopische Aufnahme (nach Dekonvolution), 100x Objektiv; **A**) Wildtyp (+/+) nicht permeabilisierte Oocyte mit anti-Propeptid Antikörper behandelt; **B**) und **C**) Ovastacin-defizienter Embryo; **B**) mit anti-Proovastacin Antikörper; **B**) mit anti-“Proovastacin Antikörper“ behandelt; **1**) differentieller Interferenzkontrast (DIC) **2**) DNA Färbung mittels DAPI (blau) und entsprechendem Antikörper (grün)

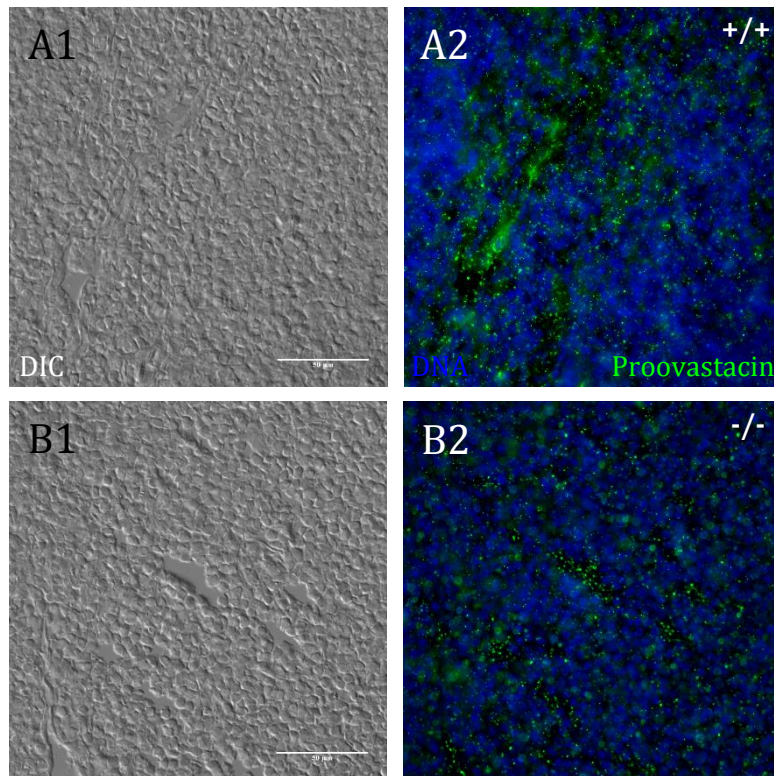


Abbildung F.5.: **Immunhistologie des Thymus 2 (anti-Proovastacin Antikörper)** lichtmikroskopische Aufnahme des weiblichen Thymus, 40x Objektiv, **A)** Wildtyp **B)** Ovastcin-defizienter Thymus **1)** differentieller Interferenzkontrast (DIC) **2)** DNA Färbung mittels DAPI (blau) und anti-Proovastacin Antikörper (grün)

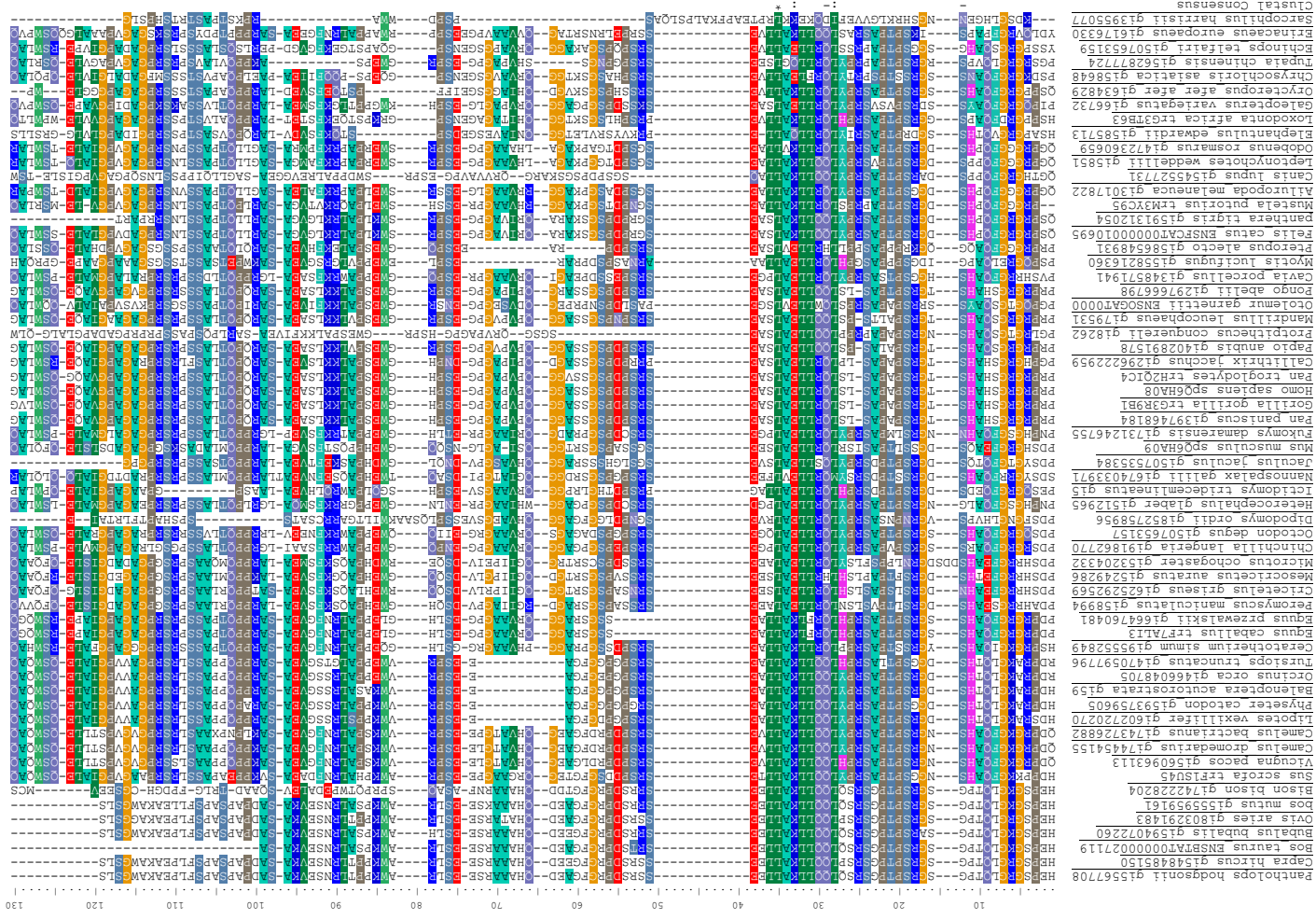


Abbildung F.6.: Alignment der C-terminalen Domäne Ovastacins Alle verfügbaren Sequenzen der Thera Ovastacine ohne *Didephis*; Aminosäuren im Einbuchstabencode; alle Aminosäuren > 50 % Konservierung farblich hinterlegt; * = vollständig konserviert; : = *scoring* > 0.5 in Gonnet PAM 250 Matrix

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62
1 Pteropus_ajlecto_g536548931	100	45	40	40	35	39	39	40	37	41	46	45	44	46	46	43	47	47	49	48	48	49	47	44	44	46	42	38	36	37	36	37	44	26	20	29	44	32	37	32	42	41	41	39	44	45	46	45	42	41	41	45	44	41	44	44	38	36	19			
2 Myotis_tingitana_g5310849	45	100	31	31	33	33	35	36	42	38	39	40	41	43	42	42	45	45	45	44	42	39	38	41	38	37	40	38	40	45	25	19	24	41	38	31	25	37	34	39	34	38	41	37	34	34	38	41	37	35	44	31	37	35	44	35	18					
3 Mesocricetus_auratus_g5249286	37	37	100	84	74	78	70	62	55	50	47	50	49	48	53	49	48	48	49	47	46	51	52	52	45	42	45	42	38	38	38	28	21	29	52	33	39	35	43	41	41	42	45	43	45	47	47	48	43	36	45	41	41	45	43	35	18					
4 Cricetulus_grisceus_g5252949	40	38	84	100	77	79	71	62	51	49	47	47	48	48	55	49	52	51	52	51	51	50	49	50	53	50	46	50	31	31	31	31	38	28	24	30	31	32	38	34	44	42	42	43	44	43	44	46	45	47	48	48	41	35	44	40	37	43	42	16		
5 Microtus_ochogaster_g5204332	35	33	74	77	100	68	60	51	47	47	47	47	47	51	53	45	44	46	45	47	45	45	45	49	47	44	46	45	47	40	34	25	29	47	30	36	36	44	43	41	42	46	40	45	47	44	49	47	35	40	39	41	44	38	14							
6 Peromyscus_mantidactylus_g58994	39	34	78	79	76	100	70	63	54	49	52	53	52	55	59	55	53	53	55	54	52	52	56	53	47	50	34	33	34	41	41	22	28	54	33	42	35	45	44	42	50	48	49	51	50	51	52	44	39	44	41	48	43	39	15							
7 Mus_musculus_sp06140	39	33	70	71	68	71	100	59	54	46	51	47	47	48	50	54	47	46	49	48	48	47	48	51	52	47	50	33	32	36	36	37	30	23	31	53	34	43	39	42	40	40	40	41	40	41	42	42	46	47	47	46	39	43	41	39	46	43	36	19		
8 Nannomys_pallasi_g507403971	40	35	62	62	60	63	59	100	57	51	51	53	57	52	54	48	50	50	51	50	51	50	50	56	53	51	52	36	35	36	35	29	24	32	54	35	40	42	46	46	43	47	50	49	51	52	50	47	47	46	47	41	49	47	46	44	40	14				
9 Ilesius_ilesius_g50753384	37	34	55	51	51	54	54	57	100	52	51	52	52	52	49	51	50	53	53	50	52	50	52	58	55	52	38	35	37	37	41	33	30	35	56	34	42	48	51	46	44	53	51	53	54	51	49	48	47	46	39	50	54	50	48	16						
10 Ictidomys_tridecemlineatus_g5	41	44	50	49	47	49	46	51	52	54	54	54	54	50	52	51	58	57	60	58	54	57	55	55	55	54	49	52	42	42	42	41	44	33	32	33	50	41	45	37	50	51	54	54	53	54	55	53	51	52	52	52	48	60	58	54	56	58	42	15		
11 Chinchilla_langueta_g519462770	46	38	47	47	52	51	51	52	100	54	54	54	57	72	73	61	65	55	57	56	55	57	55	56	53	53	58	40	37	40	38	46	31	31	33	50	41	51	48	53	51	50	50	53	50	52	51	48	44	52	53	50	53	51	45	17						
12 Cavia_porcellus_g348571941	45	39	50	47	47	53	47	53	51	54	79	100	74	70	71	58	57	56	59	57	58	57	57	59	56	53	56	36	36	35	41	29	26	55	42	48	40	51	48	57	54	54	53	56	55	54	53	48	44	54	53	48	44	54	50	54	50	48	16			
13 Octodon_degus_g507653157	44	37	49	48	47	52	47	57	52	52	72	74	100	67	68	60	56	55	58	57	57	57	56	55	54	58	43	41	43	42	42	49	31	29	36	52	45	49	42	56	54	54	50	55	55	53	52	56	52	56	57	57	51	44	55	56	53	55	53	47	16	
14 Heterocephalus_glaber_g5219655	46	40	48	48	48	55	48	52	52	50	77	70	100	82	80	58	58	58	60	60	60	59	57	56	58	58	57	54	55	42	41	41	40	40	48	31	28	34	59	42	49	39	54	53	50	56	55	53	53	57	57	60	61	44	54	53	49	55	45	46	15	
15 Falcopus_diamantinus_g31246755	46	41	53	55	51	59	50	54	52	73	71	68	100	59	58	58	60	59	59	57	56	58	58	57	54	55	42	41	41	40	40	48	31	28	34	59	42	49	39	54	53	50	56	55	53	53	57	57	60	61	44	54	53	49	55	45	46	15				
16 Galeopterus_variegatus_g66732	43	43	49	49	53	55	54	48	49	51	61	58	60	58	59	100	58	57	60	57	58	57	56	58	55	54	58	43	41	43	42	42	49	31	28	34	59	42	49	39	54	53	50	56	55	53	53	57	57	60	61	44	54	53	49	55	45	46	15			
17 Pan_troglodytes_rH2Q24	47	42	48	52	45	53	48	49	51	58	55	57	56	58	58	58	100	98	96	90	87	85	81	71	65	61	61	38	38	38	42	41	42	45	39	28	37	58	42	49	40	51	51	50	52	55	54	54	57	55	54	52	54	52	49	53	51	45	47	15		
18 Pan_panicus_g397403184	47	42	48	51	44	53	46	50	50	57	55	56	55	58	58	57	98	100	97	96	90	87	85	81	69	63	60	59	38	37	38	43	43	28	27	36	55	42	48	40	51	51	50	51	55	54	54	57	55	55	54	54	52	53	51	49	52	50	48	15		
19 Homo_sapiens_sp06140	49	45	49	52	46	55	49	51	53	60	57	59	58	60	60	60	97	100	92	89	87	83	78	65	62	63	39	38	39	39	44	49	28	27	37	55	44	50	41	54	54	52	53	56	56	59	57	55	56	56	56	54	55	54	51	55	53	55	53	45	46	15
20 Gorilla_gorilla_tr38981	48	45	48	51	45	55	48	50	53	58	56	57	60	59	60	60	96	96	99	100	92	89	87	83	68	65	61	61	39	38	39	39	44	49	28	27	37	55	44	50	40	53	53	52	53	56	55	55	58	56	55	55	53	54	52	50	55	51	46	15		
21 Pongo_abelii_g507666798	48	43	49	51	47	54	49	51	50	54	55	57	60	59	57	90	90	92	92	100	89	87	81	70	66	65	60	41	38	41	40	41	44	49	28	27	35	55	42	49	40	57	55	56	59	59	61	59	55	56	57	59	58	54	50	53	54	55	47	15		
22 Papio_anubis_g502891578	49	45	47	50	45	52	48	50	52	57	57	58	56	59	57	58	87	89	89	90	100	88	80	69	67	64	63	40	37	41	40	41	44	49	28	26	36	55	44	48	40	54	54	53	56	59	58	58	60	55	55	54	55	54	53	51	53	52	42	46	15	
23 Mandrillus_leucophaeus_g79531	47	44	46	49	45	52	47	50	52	55	57	55	57	56	57	85	85	87	87	87	100	77	68	65	62	61	39	36	40	39	40	43	48	26	26	34	53	42	40	47	52	51	53	58	56	56	59	59	53	54	53	53	51	49	51	49	51	50	50	40	15	
24 Callithrix_jacchus_g50622959	44	42	51	50	45	56	48	50	55	56	57	59	58	55	81	81	83	83	81	80	77	100	65	64	63	59	38	37	38	39	41	48	27	27	37	54	42	48	36	50	49	51	53	53	52	55	53	57	58	56	55	52	52	51	46	54	51	48	17			
25 Propithecus_conqueror_g8262	47	42	52	53	49	53	51	56	57	55	53	56	56	57	69	68	65	60	60	69	68	100	88	72	60	40	38	40	41	41	45	29	28	34	54	41	45	44	58	58	54	56	57	59	60	58	60	61	60	55	52	58	57	53	56	55	47	48	17			
26 Microcebus_murinus_g829874861	44	39	52	50	47	53	52	53	58	54	53	56	54	56	57	58	65	63	65	66	67	65	64	88	100	72	60	37	35	37	38	42	48	20	30	32	54	39	48	40	60	60	57	58	56	55	57	58	57	57	55	53	54	55	54	50	48	40	15			
27 Indromys_gameti_g505647000	46	38	45	46	44	47	47	51	55	49	53	53	54	54	55	61	60	62	61	65	64	62	63	72	100	55	34	33	34	34	34	34	34	45	38	46	38	46	39	56	55	54	53	52	51	57	57	59	43													

Curriculum Vitae

Hagen WESTPHAL

Persönliche Daten

Akademischer Werdegang

Schulbildung

Nebentätigkeiten

Tagungsbeiträge

Sprachen

Publikationen

Weitere Qualifikationen

Danksagung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit wurde bisher weder veröffentlicht noch einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich habe bisher keinen weiteren Promotionsversuch unternommen.

Wiesbaden, den 26.09.2016

.....
(Hagen Westphal)

„...I am still confused, but on a higher level“
– **Enrico Fermi** –