

**Das Glykom und Proteom der porcinen Zona pellucida:
Ein massenspektrometrischer Ansatz**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Dorothee von Witzendorff
geboren am 14.07.1975 in Hannover

2006

Referent: Prof. Dr. Jürgen Alves

Korreferentin: Prof. Dr. Edda Töpfer-Petersen

Tag der Promotion: 02. Juni 2006

Zusammenfassung

Die Säugetiereizelle wird von einer extrazellulären Matrix, der Zona pellucida (ZP), umgeben, welche für die Regulierung der Befruchtung eine wesentliche Rolle spielt. Sie besteht aus drei Glykoproteinen (ZPA, ZPB, ZPC) und unterliegt während der Entwicklung und Befruchtung der Oocyte einer Reihe von Reifungs- und Transformationsprozessen. Die Modifizierung der Glykanseitenketten und die Disulfidbrückenbildung scheinen neben der Prozessierung des ZPA-Proteins für die Veränderung der Struktur der ZP bei der Befruchtung verantwortlich zu sein. Die porcinen ZP-Glykoproteine können von Oocyten im Germinalvesikel- (GV) Stadium für biochemische Untersuchungen in ausreichenden Mengen isoliert werden. Sie stellen somit ein interessantes Modell zur Charakterisierung von posttranslationalen Modifikationen dar. Das N-Glykosylierungsmuster des ZPB/ZPC-Oligomers und die N-Glykanstrukturen der ZP sind bereits charakterisiert worden. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die N-Glykosylierung und die Verteilung der oxidativsensitiven Thiolgruppen vorwiegend des ZPA-Glykoproteins durch einen massenspektrometrischen Ansatz analysiert. In-Gel-Deglykosylierung des elektrophoretisch aufgetrennten Proteins und der Vergleich der N-Glykanprofile des nativen, desialylierten sowie desialylierten/Endo- β -Galactosidase gespaltenen Glykoproteins ermöglichen unter Berücksichtigung der schon in den ZP Proteinen identifizierten Oligosaccharidstrukturen die Bestimmung der N-Glykane durch MALDI-ToF-MS. Die N-gebundenen Oligosaccharide sind bi-, tri- und tetraantennäre fucosylierte komplexe Strukturen mit und ohne repetierende N-Acetyllactosamineinheiten, wobei biantennäre N-Glykane mit einem oder zwei terminalen Hexoseresen vorherrschen. Ein Signal entspricht einem High-Mannose-Typ N-Glykan, dessen Struktur durch MSⁿ-Fragmentierungsmuster bestätigt wurde. Zur Identifizierung der N-Glykosylierungsstellen wurden die tryptischen Peptide des durch Endo- β -Galactosidase partiell deglykosylierten ZP-Proteingemisches sowie des im Gel fragmentierten ZPA-Proteins durch Lektin-Affinitätschromatographie mit anschließender Reverse Phase-HPLC isoliert. MALDI-ToF-MS-Analysen der Glykopeptide und ihrer korrespondierenden Peptide ergaben, dass fünf der sechs N-Glykosylierungsstellen an den Positionen N_{84/93}, N₂₆₈, N₃₁₆, N₃₂₃ und N₅₃₀ glykosyliert sind, wobei in dem N-terminalen-Peptid nur lediglich eine der beiden Positionen N₈₄ und N₉₃ Oligosaccharide trägt. Durch N-terminale Sequenzierung konnte bereits gezeigt werden, dass die Glykane an der Position N₈₄ gebunden sind. Das Pentamannosylglykan wurde dem Asparaginrest N₂₆₈ zugeordnet. Interessanterweise unterscheidet sich der neutrale Glykanpool des ZP-Proteingemisches von dem der *in vitro* gereiften Oocyten. Es wurde kein pentamannosyliertes Glykan nachgewiesen. Auch enthielt das N-Glykanprofil keine Signale im höhermolekularen Bereich für lactosaminylierte Strukturen. Für letztere Untersuchungen und für die Analyse der N-Glykane der ZP von Oocyten im GV-Stadium zur Etablierung einer MALDI-ToF-MS-Methode für sulfatierte Oligosaccharide wurden die Proteine aufgrund ihrer geringen Menge On-Blot deglykosyliert. Die Daten zeigen, dass sich die N-Glykosylierung sowohl von orthologen ZP-Proteinen als auch in der ZP einer Spezies von Oocyten verschiedener Entwicklungsstadien unterscheidet. Zur Charakterisierung der Verteilung von freien Cysteinresten im ZPA-Protein im Hinblick auf ihre biologische Funktion wurden die oxidativ-sensitiven Thiolgruppen der ZP mit Biotin-konjugiertem Jodacetamid (BIAM) markiert, und die biotinylierten tryptischen Peptide des durch Reverse Phase-HPLC angereicherten ZPA-Proteins nach MALDI-ToF-MS-Analysen über ihre m/z-Werte identifiziert. Die Tatsache, dass die Cys-SH-Reste vorwiegend sowohl BIAM-markiert als auch nicht modifiziert und/oder carbamidomethyliert vorlagen, zeigt, dass die ZP von Oocyten im GV-Stadium kein definiertes Muster von oxidativ-sensitiven Thiolgruppen enthält.

Insgesamt tragen die Daten zum Verständnis der porcinen ZP-Struktur bei und stützen ein zukünftiges Interesse an der Charakterisierung von posttranslationalen Modifikationen von Oocyten in verschiedenen Entwicklungsstadien.

Schlagwörter: Glykosylierung, oxidativ-sensitive Thiolgruppen, MALDI-ToF-MS

Summary

The mammalian oocyte is encased by a transparent matrix, the zona pellucida (ZP), which plays an essential role in the regulation of fertilization. The ZP consists of three glycoproteins (ZPA, ZPB, ZPC) and undergoes several maturation and transformation processes during development and fertilization of the oocyte. Modification of glycans and formation of disulfide linkages together with processing of the ZPA protein seem to be responsible for the alteration of the ZP structure during fertilization. The porcine ZP glycoproteins of oocytes at the germinal vesicle (GV) stage can be isolated on large scale for biochemical analysis, thus demonstrating an interesting model for characterization of posttranslational modifications in proteins. The N-glycosylation pattern of the ZPB/ZPC oligomer and the glycan structures of the ZP have been recently described. In this work the N-glycosylation and distribution of free oxidative-sensitive thiol residues predominantly of the ZPA glycoprotein were determined by a mass spectrometric approach. In-gel deglycosylation of the electrophoretically separated protein and comparison of the N-glycan profiles of the native, desialylated and desialylated/endo- β -galactosidase-treated glycoprotein allow the assignment of the glycan structures by MALDI-ToF MS by considering the identified oligosaccharide structures of the ZP proteins. The N-linked oligosaccharides are bi-, tri- and tetraantennary α 1,6 fucosylated complex structures with and without N-acetylglucosamine repeating units, whereas the majority of the N-glycans are biantennary structures carrying one or two terminal hexose residues. Furthermore, a distinct signal correlates with a high-mannose type glycan, whose structure was confirmed by MSⁿ fragmentation. For the identification of the N-glycosylation sites the tryptic peptides of the endo- β -galactosidase-treated ZP protein mixture and of in gel digested ZPA were isolated by lectin affinity chromatography and reverse-phase HPLC. MALDI-ToF MS analysis of the glycopeptides and their corresponding peptides lead to the identification of five out of six putative N-glycosylation sites at N_{84/93}, N₂₆₈, N₃₁₆, N₃₂₃ and N₅₃₀, while in the N-terminal peptide only one of the two sites N₈₄ and N₉₃ was found to be glycosylated. N-terminal sequencing has already shown, that the glycans are localised at site N₈₄. The pentamannosyl N-glycan was mapped to the position at Asn₂₆₈. However in the neutral N-linked oligosaccharides of in vitro matured oocytes no pentamannosyl glycan was detected. Also, the N-glycan profile did not contain signals for high-mass glycans with lactosamine repeats. Because of the minor amount of the examined oligosaccharides in the latter case and in the analysis of the N-glycans of oocytes at the GV stage for the establishment of a MALDI-ToF MS method for sulfated oligosaccharides proteins were on-blot deglycosylated.

The combined data indicate that the N-glycosylation differs in orthologous ZP proteins as well as in the ZP of oocytes in different development stages.

In order to characterize the distribution of free cysteine residues in the ZPA protein in view of their biological function, the oxidative-sensitive thiol residues were labeled with biotin-conjugated iodacetamide (BIAM). The biotinylated tryptic peptides of Reverse Phase-HPLC enriched ZPA protein were identified by m/z. The Cys-SH residues were parallel labeled with BIAM or iodacetamide and/or unmodified, indicating no well-defined pattern of oxidative-sensitive thiol groups in the ZP of oocytes at GV stage.

Alltogether the data contribute to the understanding of porcine ZP structure.

Keywords: glycosylation, oxidative-sensitive thiol residues, MALDI-ToF-MS

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Proteom- und Glykomanalysen	1
1.2	Co-Evolution der Gameten und die Befruchtungskaskade	2
1.3	Zona pellucida	8
1.3.1	Funktion und Struktur der ZP von Säugetieren	8
1.3.2	Domänenstruktur der ZP-Proteine	12
1.3.3	Glykosylierung der ZP-Proteine	15
1.4	Rezeptorsystem der Gameten in der Befruchtungskaskade	19
1.5	Strukturveränderungen der ZP-Proteine nach der Befruchtung	22
1.6	Zielsetzung	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Vorbereitung des Materials	26
2.1.1	Isolierung der Zonae pellucidae von präpuberalen Sauen	26
2.1.2	In-vitro-Maturation von Oocyten und anschließende Isolierung der ZP	28
2.1.3	Solubilisierung der ZP	29
2.2	Proteinanalytische Methoden	29
2.2.1	Ethanol-fällung	29
2.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
2.2.3	Gelfärbungen	31
2.2.3.1	Coomassie Brilliant Blue-Färbung	31
2.2.3.2	Modifizierte Coomassie Brilliant Blue-Färbung	31
2.2.3.3	Sypro Ruby-Färbung	31
2.2.3.4	Silberfärbung	32
2.2.4	2D-Gelelektrophorese	33
2.2.5	Immobilisierung von Proteinen auf Membranen (Western Blotting)	34
2.2.6	Biotinylierung von ZP-Proteinen	35
2.2.7	Reverse Phase-HPLC	36
2.2.8	<i>Enzyme-Linked Binding Assay</i>	37
2.2.9	Tryptische Spaltung	37
2.2.10	Tryptische In-Gel-Spaltung	38
2.3	Glykoanalytische Methoden	40
2.3.1	Lektin-Markierung	40
2.3.2	Lektin-Affinitätschromatographie	41

2.3.2.1	Minilektinsäule.....	41
2.3.2.2	Lektin-Batch-Verfahren	42
2.3.3	Endo- β -Galactosidase-Spaltung der ZP-Glykoproteine	42
2.3.4	Desulfatierung der ZP-Glykoproteine	42
2.3.5	Desialylierung der ZP-Glykoproteine.....	43
2.3.6	Deglykosylierung durch N-Glykosidase F.....	43
2.3.6.1	Deglykosylierung von Glykopeptiden und Proteinen	43
2.3.6.2	In-Gel-Deglykosylierung und Isolierung von N-Glykanen.....	43
2.3.6.3	On-Blot-Deglykosylierung und Isolierung von N-Glykanen.....	44
2.3.7	Entsalzen von Glykanen.....	45
2.4	Massenspektrometrie	46
2.4.1	MALDI-ToF-MS-Analyse von Peptiden	46
2.4.2	MALDI-ToF-MS-Analyse von BIAM-markierten Peptiden.....	47
2.4.3	MALDI-ToF-MS- und MS ⁿ -Analysen von neutralen N-Glykanen	47
2.4.4	MALDI-ToF-MS- und MS ² -Analysen von sulfatierten N-Glykanen	48
2.4.4.1	Synthese von D-Arabinosazon	48
2.5	Auswertung der Massenspektren.....	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Glykosylierung der ZP-Proteine.....	50
3.1.1	Elektrophoretische Analyse der ZP-Glykoproteine	50
3.1.2	Lektinologische Analyse der ZP-Proteine.....	51
3.1.3	Profil der N-Glykane des ZPA-Glykoproteins	53
3.1.3.1	MALDI-ToF-MS ⁿ -Analysen der N-Glykane des ZPA-Glykoproteins	57
3.1.4	Identifizierung der N-Glykosylierungsstellen des ZPA-Proteins.....	60
3.1.4.1	Glykosylierungsmuster der komplexen N-Glykane des ZPA-Glykoproteins	70
3.1.4.2	Zuordnung des Pentamannosylglykans	76
3.1.5	Charakterisierung der sulfatierten N-Glykane der ZP-Proteine	78
3.1.5.1	Elektrophoretische Analyse der Sulfatierung der ZP-Proteine	78
3.1.5.2	MALDI-ToF-MS-Analyse der sulfatierten N-Glykane der ZP-Proteine von Oocyten im GV-Stadium.....	81
3.1.5.3	MALDI-ToF-MS ² -Analysen der sulfatierten N-Glykane der ZP-Proteine von Oocyten im GV-Stadium.....	83
3.1.5.4	N-Glykanprofile der ZP-Proteine von Oocyten im GV- und MII-Stadium....	85

3.2	Charakterisierung der oxidativ-sensitiven Thiolgruppen in der ZP	88
3.2.1	Elektrophoretische Analyse der biotinylierten ZP-Proteine.....	88
3.2.2	Identifizierung der oxidativ-sensitiven Thiolgruppen des ZPA-Proteins	90
4	Diskussion	97
4.1	Glykosylierung der ZP-Proteine.....	98
4.1.1	N-Glykosylierungsstellen in ZP-Glykoproteinen	98
4.1.2	N-gebundene Oligosaccharide von ZP-Proteinen	102
4.1.3	Saure Glykane der porcinen ZP-Proteine.....	106
4.2	Verteilung oxidativ-sensitiver Thiolgruppen in ZP-Proteinen	110
5	Literatur	116
6	Anhang.....	129
	Danksagung	131
	Lebenslauf.....	132

Abkürzungsverzeichnis

ACA	Amaranthus Caudatus Agglutinin
APS	Ammoniumpersulfat
AQN	Spermadhäsin mit N-Terminus AQN
AS	Aminosäure
ATR	Attenuated-Total-Reflection
AWN	Spermadhäsin mit N-Terminus AWN
BIAM	N-(biotinoyl)-N'-(iodoacetyl)ethylenediamine
BSA	Bovine Serum Albumine
CAM	Carbamidomethylierung
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBB	Coomassie Brilliant Blue
cDNA	complementäre DNA
CGL	Cortikales Granula Lektin
COC	Cumulus-Oocyten-Komplex
Con A	Concanavalin A
db	dibutyryl
des	desialyliert
dest.	destilliert
DHB	Dihydroxybenzoesäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHP	External Hydrophobic Patch
ELBA	<i>Enzyme-Linked Binding Assay</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
E β Gal	Endo- β -Galactosidase
F	Fraktion
FITR	Fouriertransform-Infrarot-Spektroskopie
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GalTase	Galactosyltransferase
GlcNAc	N-Acetylglucosamin

GS	Griffonia Simplicifolia
GV	Germinalvesikel
hCG	humanes Choriongonadotropin
Hex	Hexose
HexNAc	N-Acetylhexosamin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRPO	Horseradish Peroxidase
IHP	Internal Hydrophobic Patch
LCA	Lens Culinaris Agglutinin
Le	Lewis
[M+A]	(Masse+Ion)-Addukt
m/z	mass/charge
MALDI-ToF-MS	Matrix-Assistierte Laser-Desorption/Ionisierung
Man	Mannose
MII	Metaphase II
MS	Massenspektrometrie
MS ⁿ	Tandem-Massenspektrometrie
mZP	murine Zona pellucida
NCSU	North Carolina State University
NeuGc/Ac	N-Glycolylneuraminic/N-Acetylneuraminic acid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
pI	Isoelektrischer Punkt
pK _a	Säurekonstante
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
PSP	Porcine Seminalplasmaproteine
PVA	Polyvinylalkohol
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
pZP	porcine Zona pellucida
QIT	Quadrupole Ion Trap
RI	Relative Intensität
RP	Reverse Phase

RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SH	Thiol
Sia	Sialinsäure
Sulf	Sulfat
T	tryptisches Peptid
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine
TFA	Trifluoroacetic Acid
TGF	Transforming Growth Factor
ToF	Time of Flight
TPCK	L-1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ü/N	über Nacht
ZP	Zona pellucida

Einbuchstaben- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

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

1 Einleitung

1.1 Proteom- und Glykomanalysen

Durch die Entzifferung des menschlichen Genoms und laufende Genomprojekte anderer Spezies existiert eine Fülle von Sequenzinformationen über Proteine, welchen nun eine Funktion zugeordnet werden muss. Posttranslationale Modifikationen von Proteinen wie die Bildung von Disulfidbrücken, Phosphorylierungen und Glykosylierungen spielen für die Funktion eines Proteins eine bedeutende Rolle; sie sind jedoch nicht ohne weiteres über einen molekularbiologischen Ansatz zu analysieren. Daher ist es erforderlich, die Proteine auf biochemischer Ebene zu charakterisieren. Aufgrund der Fortschritte in den letzten Jahren und ihrer hohen Sensitivität wird die Massenspektrometrie in Kombination mit Separationsmethoden und computergestützten Datenbanken zur Analyse von funktionellen Biomolekülen wie Proteinen und Glykanen eingesetzt. Hierbei haben sich die Matrix-Assistierte Laser-Desorption/Ionisierung (MALDI) und die Elektrosprayionisierung (ESI) bewährt. Die Entwicklung von MSⁿ-Fragmentierungen ausgewählter Ionen ermöglicht neben der Bestimmung der Komplettmassen auch die Sequenzierung von Molekülen. Dies führte nach *Genomics* zur Entwicklung einer *Proteomics* und *Glycomics* Ära.

Die Proteomanalyse beabsichtigt die systematische Charakterisierung von Proteinen sowie deren Identifizierung und Modifikationsanalyse. Die Bestimmung des Peptidmassenfingerabdruckes und MSⁿ-Fragmentierungen erfolgen hierbei mit proteolytisch erzeugten Peptiden.

Für die Glykomanalyse werden die Glykane enzymatisch oder chemisch von Proteinen abgespalten und ein Glykanprofil erstellt. Die Deglykosylierung von N-Glykanen erfolgt mit rekombinanten Enzymen, wohingegen O-Glykane hauptsächlich chemisch abgespalten werden. Eine gleichzeitige MSⁿ-Fragmentierung des Peptids und der gebundenen Glykane ermöglicht eine parallele Analyse des Glykanprofils und des Peptids einer Glykosylierungsstelle (Zamfir et al., 2005).

Die Glykosylierung ist eine der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen von Proteinen, da N- und O-Glykane essentielle zelluläre Erkennungs- und Kommunikationsmechanismen vermitteln. Die Bindung eines Spermatozoons an die Oocyte in der Befruchtungskaskade ist ein klassisches Beispiel für ein Kohlenhydrat-vermitteltes Ereignis von Zellen. Hierbei binden Oberflächen-assoziierte

Spermienproteine mit hoher Affinität an Kohlenhydrate der die Oocyte umgebenden Zona pellucida (ZP). Nach der Fusion des Spermatozoons und der Oocyte wird die Struktur der ZP unter anderem durch Proteinasen, Glykosidasen und die Bildung von intra- und intermolekularen Disulfidbrücken in einer Weise verändert, dass nachfolgende Spermatozoen nicht mehr an die ZP binden oder diese penetrieren können. Die ZP stellt somit ein gutes Modell für Proteom- und Glykomanalysen eines biologisch bedeutenden Systems dar.

1.2 Co-Evolution der Gameten und die Befruchtungskaskade

Die Fortpflanzung ist ein wesentliches Kennzeichen von Lebewesen. Während bei der asexuellen Fortpflanzung das identische Erbmateriale an die folgende Generation weitergegeben wird, kommt es bei der sexuellen Fortpflanzung zusätzlich zu einer Rekombination der Gene und damit zur Entstehung genetischer Vielfalt. Bei den Säugetieren haben sich hierfür zwei haploide Zelltypen, die Oocyte und das Spermatozoon, spezialisiert, welche bei der Befruchtung im weiblichen Genitaltrakt fusionieren. Dieser Vorgang ist durch eine hoch aufeinander abgestimmte Sequenz von zellulären Interaktionen gekennzeichnet und resultiert in der Vereinigung der haploiden Kerne, so dass eine diploide Zygote entsteht. Aus dieser geht ein neues Individuum hervor, das die Genome der morphologisch unterschiedlichen Gameten in sich vereinigt (Gilbert, 1997).

Die evolutionäre Radiation der Säugetiere ging mit der Entwicklung von Unterklassen-spezifischen Merkmalen der männlichen und weiblichen Gameten einher. Die Gameten mussten sich jeweils den neuen Erfordernissen anpassen, was eine reziproke Einflussnahme wahrscheinlich werden lässt (Bedford, 1991, 2004).

Die Oocyte muss für den Beginn der Entwicklung und des Wachstums eines neuen Individuums das Cytoplasma und die biochemische Maschinerie stellen. Das enorme Volumen des Cytoplasmas und der in ihm liegende große Nucleus werden von der Plasmamembran und der oberhalb dieser gelegenen extrazellulären Matrix, der Zona pellucida, umhüllt (siehe Abb. 1.1; Gilbert, 1997).

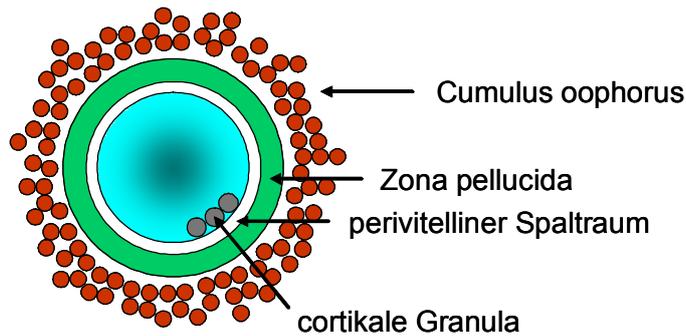


Abb. 1.1: Schematische Darstellung einer Oocyte mit Cumulus oophorus.

Die aus Glykoproteinen aufgebaute ZP dient dem Schutz der Oocyte und vermittelt Spezies-selektive Erkennung zwischen den Gameten (Töpfer-Petersen, 1999a). Unterhalb der Plasmamembran sind die cortikalen Granula angeordnet, deren proteolytischen Enzyme bei der Verhinderung polyspermer Befruchtung eine wichtige Rolle spielen (siehe Abb. 1.1; Yanagimachi, 1994; Ducibella, 1996).

Im Verlauf der Evolution der Säugetiere kam es zu einer Reduktion der Größe der Oocyte sowie einer Zunahme der Elastizität und Dicke der ZP. Während die etwa 3,5-4 mm im Durchmesser große Eizelle der Kloakentiere (Prototheria) von einer weniger als 0,5 μm dicken Protease-sensitiven ZP umgeben ist, beträgt die Größe der Oocyte der Beuteltiere (Marsupialia) im Durchschnitt 120-240 μm und die Dicke ihrer ZP 1,0-2,0 μm . Im Gegensatz hierzu ist die Oocyte der Placentalia (Eutheria) im Durchmesser relativ klein (50-180 μm). Die Dicke ihrer ZP variiert zwischen 6-8 μm bei Nagetieren und 13-27 μm bei Mensch, Rind oder Schwein. Ihre ZP ist neben ihrer Elastizität zusätzlich relativ Protease-resistent und wird bei den meisten Spezies zum Zeitpunkt der Befruchtung von mehreren Lagen Cumuluszellen, dem Cumulus oophorus, umgeben (Bedford, 1991, 2004).

Die ZP der Säugetiere wird während der frühen Stadien der Entwicklung der Oocyte gebildet. Die primäre Oocyte arretiert nach Beginn der Meiose je nach Spezies für Monate oder Jahre im Stadium der Prophase I (Diplotän). Während der Arretierung vergrößert sie sich um das 100fache ihres Volumens. Es werden spezifische Proteine und mRNA synthetisiert, welche die Oocyte für die Wiederaufnahme der Meiose und die folgende Maturation benötigt. Im Primordialfollikel wird die Oocyte von flachen, einschichtigen Granulosazellen umgeben. Mit dem Beginn der Wachstumsphase nehmen sie eine kubische Form an, und man spricht vom Primärfollikel. Anschließend entwickelt sich der Follikel durch aktive Proliferation der Granulosazellen, wodurch das Epithel mehrschichtig wird (Sekundärfollikel).

Zwischen der Oocyte und den Follikelzellen beginnt sich die Zona pellucida zu formen. Der Follikel wird mit der Bildung einer flüssigkeitsgefüllten Follikelhöhle zum Tertiärfollikel, und der Cumulus oophorus entsteht. Der voll entwickelte Follikel setzt aufgrund des cyclus-abhängigen Gonadotropinanstieges die Meiose vom Prophase I-Stadium (Germinalvesikel- (GV) Stadium) zur Metaphase II fort. In diesem Stadium arretiert die sekundäre Oocyte, die erst während der Befruchtung die zweite Reifeteilung vollendet, erneut. Die ablaufenden Prozesse zwischen der Wiederaufnahme der Meiose und der Arretierung im Metaphase II-Stadium werden Eizellreifung, Maturation, genannt (Liebich, 1990; Miyano, 2005). Die Oocyte muss sowohl eine Kernreifung (GVI- bis IV-Stadium bis Metaphase II-Stadium; Motlik und Fulka, 1976) als auch eine cytoplasmatische Reifung durchlaufen, um befruchtungsfähig zu werden (Eppig, 1996; Suzuki et al., 1994). Letztere beinhaltet eine Umstrukturierung der Zellorganellen, wobei sich beim Schwein unter anderem die corticalen Granula unterhalb der Plasmamembran anordnen (Ducibella, 1996; Cran, 1985).

Oocyten im GV-Stadium verschiedener Follikelstadien aus Schlachthausmaterial können *in vitro* bis zum Erreichen des Metaphase II-Stadiums gereift werden (Prather und Day, 1998). Rath et al. (2005) konnten nachweisen, dass während der In-vitro-Reifung biochemische Veränderungen an der porcinen ZP stattfinden. Dies zeigt, dass der Reifungsprozess der Oocyte ebenfalls eine Maturation der ZP beinhaltet.

Das Spermatozoon ist für seine Aufgabe, sein genetisches Material zur Oocyte zu transportieren, funktionell gut ausgestattet. Es besitzt im Gegensatz zur Eizelle sehr wenig Cytoplasma und die Fähigkeit zur Eigenbewegung. Sämtliche Abschnitte des Spermiums werden von einer Plasmamembran umhüllt, die sich durch eine ausgeprägte Regionalisierung auszeichnet (Eddy und O'Brian, 1994). Die benachbarten Membranareale besitzen unterschiedliche Lipidzusammensetzungen und korrelieren mit den verschiedenen Funktionen der einzelnen Spermatozoonkompartimente (Holt, 1984). Die Funktionseinheiten des Spermatozoons - Kopf, Hals und Flagellum - sind lichtmikroskopisch zu unterscheiden. Der Kopf wird fast vollständig von dem stark kondensierten Nucleus eingenommen und ist zum Teil vom Akrosom bedeckt. Das Akrosom entsteht aus Vesikeln des Golgi Apparates und enthält hydrolytische Enzyme wie Hyaluronidase, Neuraminidase und Akrosin, welche die Penetration der ZP ermöglichen. Der

Spermatozoenhals ist ein bewegliches Gelenkstück zwischen Kopf und Schwanz. Er enthält das proximale sowie Reste des distalen Centriols. Das proximale Centriol wird nach der Befruchtung für die erste Teilung der Zygote benötigt, da der Oocyte zur Bildung des Spindelapparates ein eigenes Centriol fehlt. Das Flagellum wird in ein Mittel-, Haupt- und Endstück unterteilt. Es dient der eigenen Fortbewegung im weiblichen Genitaltrakt, um die Eizelle zu erreichen (Eddy und O'Brian, 1994).

Der Grundbauplan des Spermatozoons ist im Verlauf der Evolution der Säugetiere erhalten geblieben, allerdings kam es parallel zur Radiation der ZP zu adaptiven Modifikationen von Motilität des Spermiums und Morphologie des Akrosoms. Das Spermatozoon der Prototheria enthält einen fragilen primitiven Kopf und ein Flagellum mit dicht gepackten Mikrotubuli, die jedoch lediglich rudimentär veranlagt sind. Bei den Beuteltieren tritt dagegen eine ungewöhnliche Anordnung des Akrosoms im Spermatozoonkopf auf, welche mit der Zunahme der Dicke der ZP einhergeht. Ihr Akrosom sitzt asymmetrisch auf der dorsalen Seite des Nucleus, während es bei den Kloakentieren und Placentalia an der Spitze des Nucleus symmetrisch angeordnet ist. Das Design des Kopfes ermöglicht die Kontaktaufnahme der gesamten akrosomalen Fläche mit der ZP. Das Spermatozoenflagellum enthält eine charakteristische 9 + 2-Anordnung der Mikrotubuli und im Mittelstück Mitochondrien, die die für die Bewegung erforderliche Energie produzieren. Disulfidbrücken in den Mikrotubulistrukturen führen zur Stabilisierung und einer gerichteten Bewegung. Für die Penetration der dicken und stabilen ZP der Placentalia führt die Disulfidbrückenbildung unter anderem zwischen thiolreichen Protaminmolekülen des Chromatins im Nucleus und Proteinen des perinuclearen Materials insgesamt zu einer stabileren Kopfstruktur des Spermatozoons. Dies erhöht die physikalische Penetrationsfähigkeit des Spermiums durch die ZP. Der Spermatozoenschwanz ist entsprechend komplex aufgebaut wie bei den Beuteltieren (Bedford, 1991, 2004).

Bei den Placentalia gelangen nach der Ejakulation mehrere Millionen Spermien in den weiblichen Genitaltrakt. Wenige Tausende wandern in den Eileiter ein und lediglich eine geringe Anzahl erreicht den Ort der Befruchtung, die Ampulla. Schließlich befruchtet ein einziges Spermatozoon die Oocyte (siehe Abb. 1.2; Hunter, 1981). Bei den meisten Spezies stellt der caudale Teil des Isthmus ein funktionelles Spermienreservoir da, in dem die Lebensfähigkeit der Spermien erhalten bleibt und

ihre Motilität für einen bestimmten Zeitraum unterdrückt wird (Töpfer-Petersen, 1999a).

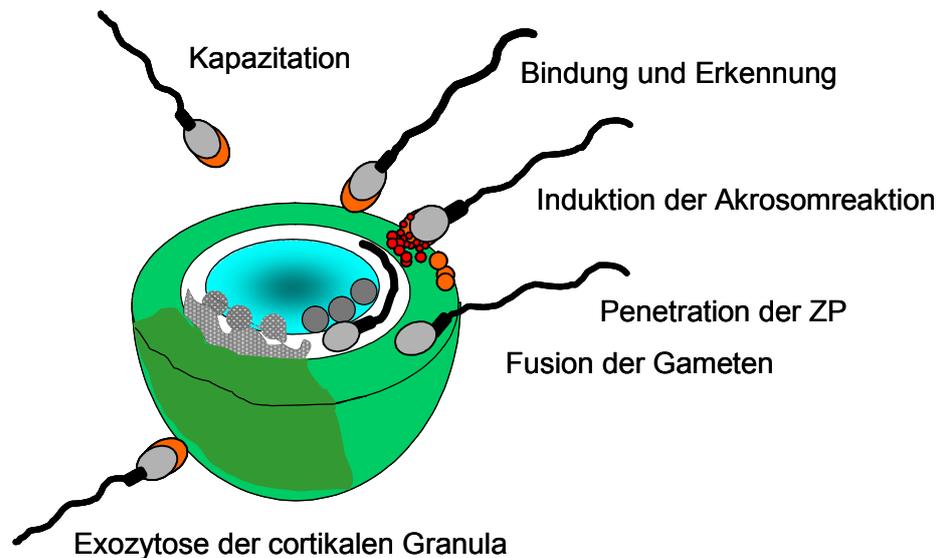


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Befruchtungskaskade.

Um eine Oocyte befruchten zu können, müssen die Spermien einen Reifungsprozess durchlaufen, der als Kapazitation bezeichnet wird. Die Kapazitation schafft die Voraussetzungen für die Bindung an die Oocyte und die sich anschließende Akrosomreaktion (Tulsiani et al., 1997). Hierbei werden Oberflächen-assoziierte Komponenten des Seminalplasmas von den Spermien entfernt (Oliphant, 1976; Reyes et al., 1975) sowie Membrankomponenten biochemisch modifiziert. Die Abnahme der negativen Oberflächenladung der Spermatozoen resultiert aus der Abspaltung von Sialinsäuren und Sulfatresten der Glykoproteine durch Hydrolasen des weiblichen Genitalsekrets (Langlais et al., 1981). Zusätzlich wird Cholesterin aus der Plasmamembran entfernt. Dies führt zu einer erhöhten Membrandurchlässigkeit und zu einem zweiphasigen Calciuminflux. Während der zweite, massive Influx für die Auslösung der anschließenden Akrosomreaktion verantwortlich ist, scheint die erste Phase mit der Kapazitation verbunden zu sein (Fraser, 1995). Die Aktivierung einer Ca^{2+} -abhängigen Adenylatcyclase bewirkt über weitere Enzymaktivierungskaskaden Phosphorylierung von Tyrosinresten in verschiedenen Spermienproteinen (Visconti und Kopf, 1998; Visconti et al., 1998). Die Kapazitationsprozesse und die Veränderung des Bewegungsmusters der Spermien - auch als Hyperaktivierung bezeichnet - ermöglichen, dass sie sich vom Oviduktgewebe ablösen und sich der Oocyte entgegenbewegen können (Suarez, 1998). Das kapazitierte Spermatozoon erkennt und bindet an die ZP der Oocyte.

Diese so genannte primäre Bindung erfolgt über Oligosaccharidstrukturen der ZP und komplementäre Kohlenhydrat-bindende Proteine des Spermiums und führt zur Induktion der Akrosomreaktion (Töpfer-Petersen, 1999b). Hierbei werden in einem exozytotischen Prozess durch vielfältige Fusionen der äußeren akrosomalen Membran mit der darüber liegenden Plasmamembran lytische Enzyme freigesetzt. Die Verschmelzung der Membranen wird durch unterschiedliche Signaltransduktionsmechanismen, die zu einem massiven Ca^{2+} -Influx führen, ausgelöst (Fraser, 1993). Das Akrosom-reagierte Spermatozoon bindet anschließend vorübergehend über Kohlenhydrat-Sulfat-Erkennungsmechanismen an die ZP (sekundäre Bindung; Töpfer-Petersen, 1999b; Howes et al., 2001). Die hyperaktivierte Motilität des Spermatozoons und die partielle Hydrolyse der ZP durch die freigesetzten Enzyme ermöglichen die Penetration der extrazellulären Matrix (Töpfer-Petersen, 1999a, b). Das Spermium lagert sich tangential mit der ganzen Fläche des Kopfes an die Plasmamembran der Eizelle. Nach der Fusion der Plasmamembranen beider Gameten wird zunächst der Spermatozooenkopf und dann das ganze Spermatozoon in einem Phagozytose-ähnlichen Prozess aufgenommen. Durch das Eindringen des Spermatozoons kommt es zur Aktivierung der Oocyte, die in der Vollendung der Meiose und der Exozytose der cortikalen Granula resultiert. Letztere geben ihren Inhalt in den perivitellinen Spaltraum ab (cortikale Reaktion). Die Komponenten modifizieren die ZP-Proteine derart, dass kein weiteres Erkennen, Binden und Penetrieren der ZP durch Spermien möglich ist (langsamer Polyspermieblock). Diese Reaktion wird als Strukturveränderungen der ZP-Proteine nach der Befruchtung in Kapitel 1.5 angesprochen. Weiterhin kommt es unmittelbar nach der Fusion der Gameten zu einer Umstrukturierung der Plasmamembran durch Depolarisierung, welche ebenfalls sicherstellen soll, dass nur ein Spermatozoon die Oocyte befruchtet. Diese Maßnahme wird als schneller Polyspermieblock bezeichnet (Yanagimachi, 1994).

1.3 Zona pellucida

1.3.1 Funktion und Struktur der ZP von Säugetieren

Die ZP ist eine extrazelluläre Matrix, welche die Oocyte und die frühen Stadien der Säugetierembryonen umgibt. Sie erfüllt wichtige Funktionen sowohl während der Befruchtung als auch der frühen embryonalen Entwicklung. So vermittelt die ZP Spezies-selektive Erkennung und Bindung zwischen der Oocyte und dem kapazitierten Spermatozoon (Sinowitz et al., 2003; Töpfer-Petersen, 1999a) und induziert anschließend die Akrosomreaktion, wodurch die Penetration durch die Matrix ermöglicht wird. Weiterhin verhindern Strukturveränderungen der ZP nach der Befruchtung eine Polyspermie. Die modifizierte ZP schützt zusätzlich die befruchtete Eizelle und den sich entwickelnden Embryo vor physikalischen Einflüssen im Ovidukt (Wassarman, 1988; Yanagimachi, 1994).

Der auffälligste morphologische Unterschied der ZP verschiedener Spezies ist ihre relative Dicke. Sie beträgt bei der Maus 5 µm, bei Mensch und Schwein 13-16 µm (Dunbar und Wolgemuth, 1984; Dunbar et al., 1991) und beim Rind 27 µm (Dunbar et al., 1994). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass die ZP aus verschiedenen Schichten und einem Netzwerk mit zahlreichen Poren aufgebaut ist. Die äußere Schicht ist durch eine gitterartige Struktur mit Löchern gekennzeichnet, wohingegen der innere Bereich eine regelmäßige rauhe Oberfläche aufweist (Phillips und Shalgi, 1980; Keefe et al., 1997). Die Größe der Löcher variiert bei verschiedenen Spezies, und die größten Poren sind auf der äußeren Oberfläche lokalisiert, wobei ihr Durchmesser zentripetal abnimmt (Nikas et al., 1994). Die Form der Poren unterscheidet sich innerhalb der ZP, aber auch bei der ZP verschiedener Arten. Viele Zonae pellucidae besitzen eher elliptisch geformte als kreisförmige Poren (Vanroose et al., 2000).

Während der Reifung und Befruchtung der Oocyte verändert sich die Architektur der ZP. Bei bovinen Oocyten zeichnet sich die Oberfläche durch eine weitmaschige Strukturierung mit tiefen Löchern aus. Nach In-vitro-Reifung ist das Netzwerk feiner und die Löcher weniger tief. Dagegen ist die ZP bei *in vitro* befruchteten Oocyten frei von netzartigen Strukturen, und die Matrixlagen erscheinen miteinander verschmolzen (Suzuki et al., 1994). Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen beim Schwein zeigen, dass sich auch die Morphologie der ZP von *in vitro* gereiften und ovulierten Oocyten unterscheidet (Rath et al., 2005; Funahashi et al., 2000).

Auf molekularer Ebene besteht die ZP der meisten Säugetiere aus drei hoch spezifisch ausgebildeten Glykoproteinen mit einem hohen Anteil von heterogenen Glykanen (Dunbar et al., 1994; Töpfer-Petersen, 1999a, b). Neueste Untersuchungen ergaben, dass die humane ZP aus vier Glykoproteinen aufgebaut ist (siehe Tab. 1.1; Lefievre et al., 2004). Die Benennung der ZP-Proteine erfolgte durch zahlreiche verschiedene Nomenklaturen. Bei der Maus wurden die Glykoproteine zunächst entsprechend ihres abnehmenden Molekulargewichtes als mZP1 (200 kDa), mZP2 (120 kDa) und mZP3 (83 kDa) benannt (siehe Tab.1.1; Bleil und Wassarman, 1980).

Die porcinen ZP-Proteine werden gelelektrophoretisch in zwei Banden bei 90 kDa (ZP1) und 55 kDa (ZP3) aufgetrennt. Yurewicz et al. (1987) konnten zeigen, dass die ZP3-Komponente ein Gemisch von zwei verschiedenen Proteinen (ZP3 α und ZP3 β) darstellt. Unter reduzierenden Bedingungen erscheinen jedoch vier Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 90 kDa, 65 kDa, 55 kDa und 25 kDa, die als ZP1, ZP2, ZP3 und ZP4 bezeichnet wurden. Dies beruht auf einer partiellen Spaltung des ZP1-Proteins in die Komponenten ZP2 und ZP4, welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Dunbar et al., 1985; Wardrip und Hedrick, 1985; Hedrick, 1993).

Tab. 1.1: Nomenklatur der ZP-Proteine verschiedener Spezies

Spezies	ZP-Protein-Nomenklatur
Nagetier	ZPB/ZP1
	ZPA/ZP2
	ZPC/ZP3
Mensch	ZP1
	ZPB
	ZPA/ZP2
Schwein	ZPC/ZP3
	ZPA/ZP1
	ZPB/ZP3 α
Rind	ZPC/ZP3 β
	ZPA/ZP1
	ZPB/ZP3 α
	ZPC/ZP3 β

Erst die Bestimmung der Aminosäuresequenz der ZP-Glykoproteine verschiedener Spezies durch Klonierung der cDNA ermöglichte die Einführung eines Spezies-übergreifenden Systems zur Charakterisierung der Proteine. Die ZP-Komponenten wurden entsprechend der Länge ihrer cDNA in die orthologen Genfamilien ZPA, ZPB und ZPC klassifiziert (Harris et al., 1994). Die Aminosäuresequenz der einzelnen ZP-Glykoproteine ist während der Evolution hoch konserviert, und die einzelnen Glykoproteinfamilien weisen 50-98% Homologie auf DNA-Ebene auf (Epifano und Dean, 1994; McLeskey et al., 1998). Posttranslationale Modifikationen und Prozessierungen der ZP-Proteine erfolgen jedoch Spezies-spezifisch und resultieren in einer Heterogenität der gebundenen Oligosaccharide sowie in unterschiedlichen Längen der Polypeptidketten (Töpfer-Petersen, 1999a; Yonezawa und Nakano, 2003).

Phylogenetische Analysen ergaben, dass die ZP-Genfamilien der Vertebraten durch Genduplikationen hervorgegangen sind, welche in mindestens vier paralogen Gruppen der ZP-Gene (ZPA, ZPB, ZP1 und ZPC) resultierten (siehe Abb. 1.3; Breed et al., 2002).

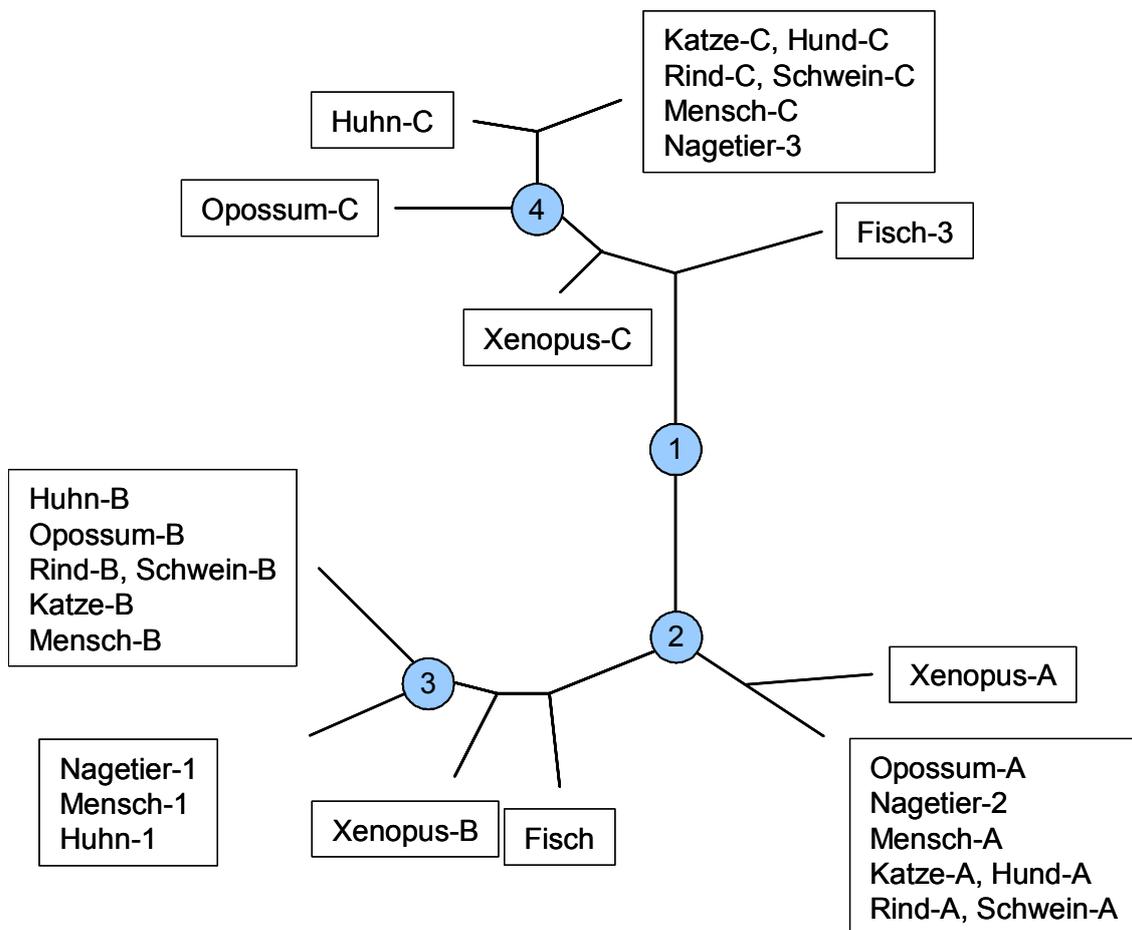


Abb. 1.3: Phylogenetischer Baum der ZP-Gene (modifiziert nach Breed et al., 2002).
Genduplikationen sind durch graue Kreise dargestellt.

Spargo und Hope (2003) unterteilen die ZPB-Genfamilie in die ZPB1-, ZPB2- und ZPB-Gengruppen, wobei das murine ZP1-Glykoprotein durch das Paralog ZPB1 codiert wird. Sie schlagen eine Klassifizierung der ZP-Proteine unter Berücksichtigung der paralogen Gene vor.

Die ZP-Gene werden während der Follikulogenese Spezies-spezifisch exprimiert, und die Proteine sezerniert (Sinowatz et al., 2001). Bei der Maus werden die ZP-Proteine ausschließlich in der wachsenden Oocyte synthetisiert (Wassarman und Kinloch, 1992; Epifano et al., 1995). Bei anderen Arten wie Schwein, Rind, Kaninchen und Mensch erfolgt die Synthese Stadium-spezifisch sowohl in der Oocyte als auch in den Granulosazellen (Sinowatz et al., 2001). ZPB und ZPC werden beim Schwein und Rind vorwiegend im Stadium des Primärfollikels von der Eizelle exprimiert. Während der folliculären Entwicklung tragen auch die Follikelzellen in zunehmendem Ausmaß zur Proteinsynthese der ZP bei. Im porcinen System übernehmen die Granulosazellen und die Corona Radiata des tertiären bzw. preovulatorischen Follikels fast vollständig die Synthese. Beim Rind dagegen synthetisiert die Oocyte während der gesamten Follikulogenese ZP-Proteine (Sinowatz et al., 1995; Kölle et al., 1996, 1998).

Die unterschiedlichen Biosynthesemuster bei Maus und anderen Spezies scheinen zu den erheblichen Unterschieden in der ZP-Struktur beizutragen (Töpfer-Petersen et al., 2000). In der Maus wird die relativ dünne Matrix durch lange Filamente von periodisch angeordneten Heterodimeren des ZPA- (ZP2) und ZPC- (ZP3) Glykoproteins gebildet, welche zufällig durch Disulfidbrücken verbundene Homodimere des ZPB- (ZP1) Proteins quervernetzt werden (siehe Abb. 1.4a; Wassarman und Mortillo, 1991). Die einzelnen Proteine sind durch nicht-kovalente Bindungen miteinander verknüpft. Das für die Maus entwickelte Modell kann jedoch nicht auf die dicke porcine ZP übertragen werden.

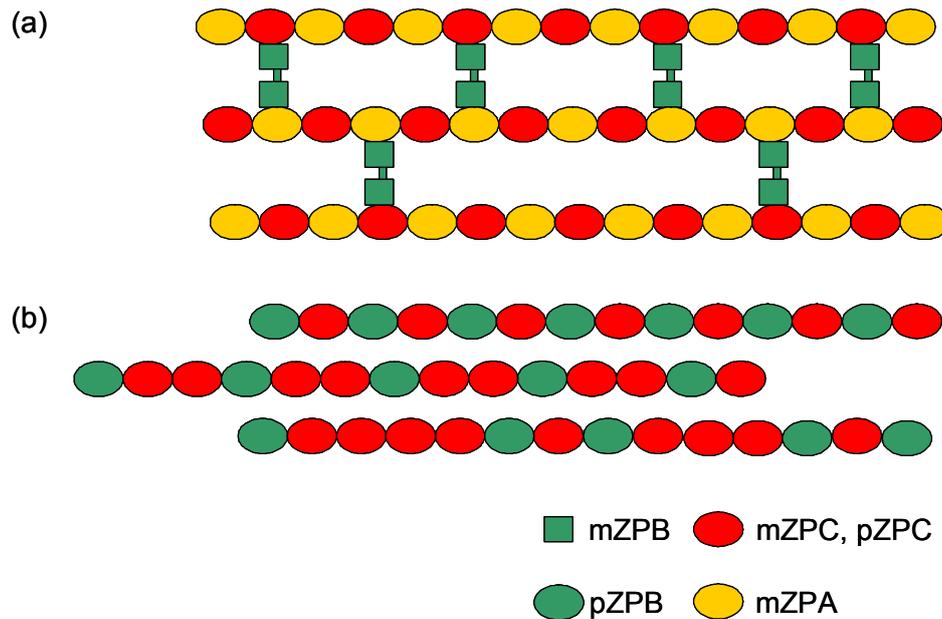


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Polymerisierung der ZP-Proteine bei Maus (a) und Schwein (b).

Beim Schwein bilden ZPB- und ZPC-Proteine ungefähr im äquimolaren Verhältnis höhermolekulare heteromultimere Komplexe (siehe Abb. 1.4b). Isoliertes ZPB liegt vorwiegend monomerisch vor, wohingegen ZPC-Proteine auch Aggregate mit Molekulargewichten von 300 und 160 kDa bilden (Yurewicz et al., 1998).

1.3.2 Domänenstruktur der ZP-Proteine

Die Propeptide der ZP-Glykoproteine verschiedener Spezies zeichnen sich durch eine modulare Struktur mit einer hydrophoben N-terminal gelegenen Signalsequenz, einer ZP-Domäne und einer hydrophoben Transmembrandomäne aus. Vor der Letzteren liegt stromaufwärts eine Konsensus-Furinspaltstelle (siehe Abb. 1.5; Prasad et al., 2000). Die ZP-Proteine gehören neben weiteren strukturellen Komponenten (z. Bsp. Tektorin), Rezeptoren (z. Bsp. TGF- β TypIII) sowie Tumorsuppressoren zu der Familie der ZP-Domänen-Proteine, welche meist auch glykosyliert sind (Jovine et al., 2005).

Die ZP-Domäne ist zusammen mit der Transmembrandomäne für die Polymerisierung der Proteine in Filamente verantwortlich (Jovine et al., 2002).

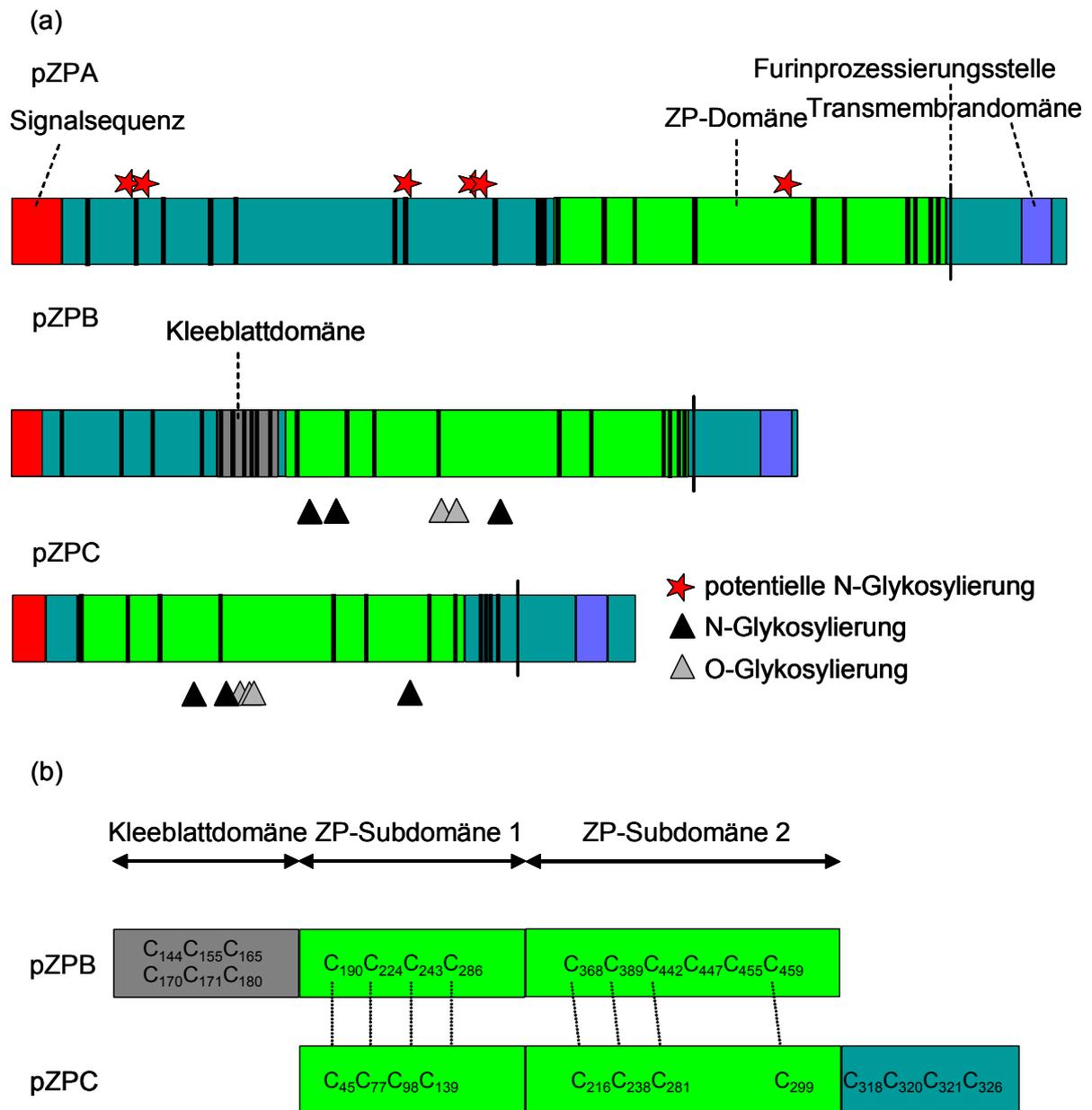


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von porcinen ZP-Proteinen.

(a) Cysteine sind durch schwarze Balken dargestellt. Das reife ZPB ist N-(Asp₁₃₇) und C-terminal (Ala₄₆₂) und das ZPC-Protein C-terminal prozessiert (Ser₃₃₂). Das ZPC-Glykoprotein ist zusätzlich N-terminal blockiert (Pyro-Gln₂₃) (Töpfer-Petersen et al., 2000; Yonezawa und Nakano, 2003).

(b) Subdomänenstruktur der ZP-Domäne (modifiziert nach Yonezawa und Nakano, 2003). Cysteinreste einer Subdomäne bilden untereinander Disulfidbrücken. Konservierte Cysteine sind durch gestrichelte Linien miteinander verbunden.

Sie besteht aus etwa 260 Aminosäuren mit acht konservierten Cysteinen und konservierter Hydrophobizität, Polarität und Turn-bildenden Tendenzen an zahlreichen Positionen (Bork und Sander, 1992). Dies lässt eine ähnliche dreidimensionale Struktur bei verschiedenen Spezies vermuten (Töpfer-Petersen,

1999a). Weiterhin wird für die ZP-Domäne ein hoher Anteil von β -Faltblattstrukturen vorhergesagt (Jovine et al., 2005).

Die aus 40 Aminosäuren bestehende Signatursequenz der ZP-Domäne ist innerhalb des ZPB- (ZP1) Proteins aller Spezies mit Ausnahme der Maus konserviert. Das murine Modul unterscheidet sich in einer Aminosäure (Prasad et al., 2000).

MS-Analysen der ZP-Proteine bei Maus (Boja et al., 2003) und Schwein (Yonezawa und Nakano, 2003) ermöglichen eine Unterteilung der ZP-Domäne in zwei Submodule, die durch definierte Muster von Disulfidbrücken charakterisiert sind (siehe Abb 1.5b; Jovine et al., 2005). Jovine et al. (2004) identifizierten in den murinen ZP-Proteinen kurze hydrophobe konservierte Motive, das IHP (Internal Hydrophobic Patch) und das EHP (External Hydrophobic Patch). Das IHP liegt innerhalb der Subdomäne 1, während das EHP zwischen der Furinprozessierungsstelle und der Transmembrandomäne lokalisiert ist.

Die ZPB-Glykoproteinfamilie enthält N-terminal zur ZP-Domäne eine zusätzliche 45 Aminosäuren lange Kleeblatt-domäne (P-Domäne), in der sechs konservierte Cysteine in einer Kleeblatt-ähnlichen Struktur angeordnet sind (siehe Abb. 1.5). Dies führt zu einer Resistenz des Proteins gegenüber proteolytischem Abbau (Bork, 1993). Die Kleeblatt-domäne zeichnet sich durch eine aus 22 Aminosäuren bestehende Signatursequenz aus und unterscheidet sich bei der Maus von anderen Spezies. Die Unterschiede in der Struktur des Proteins der Maus und anderen Spezies deuten auf unterschiedliche Funktionen des ZP1-Proteins bei Nagetieren und anderen Säugetierspezies hin (Prasad et al., 2000).

Nahezu alle charakterisierten ZP-Proteine enthalten eine N-terminal zur Transmembrandomäne gelegene Furinspaltstelle mit der Konsensussequenz R-X-(K/R)-R. Die Sequenz ist beim humanen und Kaninchen ZPB (S-R-R-R) modifiziert (Yurewicz et al., 1993; Harris et al., 1994). Dies lässt eine Prozessierung der Propolypeptide durch Furin oder Furin-ähnliche Enzyme in ihre sezernierte Form vermuten. Es konnte durch Zellkulturexperimente gezeigt werden, dass sezernierte ZP-Proteine C-terminal prozessiert sind (Litscher et al., 1999; Williams und Wassarman, 2001; Kiefer und Saling, 2002; Qi et al., 2002), und die Glykoproteine durch Konvertasen des Golgi-Apparates oder der Plasmamembran gespalten werden (Kiefer und Saling, 2002). Die Sekretion des ZP3-Proteins und seine Integration in die ZP transgener Mäuse wird durch Mutation der Spaltstelle (RNRR→ANAA) allerdings nicht beeinträchtigt (Zhao et al., 2002). Dies weist darauf

hin, dass bei der Sekretion der ZP-Proteine weitere Polypeptidsequenzen eine Rolle spielen. Rekombinante, an der Furinprozessierungsstelle verkürzte ZP-Proteine werden dagegen im ER zurückgehalten und nicht sezerniert (Williams und Wassarman, 2001). Die C-terminal gelegene Transmembrandomäne wird nicht für die Sekretion der ZP-Proteine benötigt (Jovine et al., 2002; Harris et al., 1999), spielt jedoch indirekt eine Rolle bei der Polymerisierung der Proteine (Jovine et al., 2004).

Jovine et al. (2004) schlagen einen allgemein gültigen Mechanismus für die Polymerisierung der ZP-Proteine vor. Die sezernierten Propeptide sind über ihre Transmembrandomäne in der Plasmamembran verankert. Das EHP und das IHP interagieren miteinander oder die Vorläufermoleküle nehmen eine inaktive von den hydrophoben Motiven abhängige Konformation an, um eine vorzeitige Polymerisierung der Proteine zu verhindern. C-terminale Prozessierung an der Furinspaltstelle führt zur Dissoziation der reifen Proteine vom EHP, welche hierdurch zur Polymerisierung in Filamente aktiviert werden.

Die Bestimmung der C-Termini von orthologen ZP-Proteinen lassen vermuten, dass die Glykoproteine durch weitere Proteasen Spezies-spezifisch prozessiert werden (Boja et al., 2003; Yonezawa und Nakano, 2003).

1.3.3 Glykosylierung der ZP-Proteine

Die Oligosaccharidstrukturen der ZP-Proteine wurden zunächst lektinologisch analysiert. Vergleichende cytochemische Studien zeigten eine Spezies-spezifische Variation der Lektinbindungsmuster, welche sich mit der evolutionären Distanz der Spezies vergrößert (Skutelsky et al., 1994). Alle untersuchten Arten enthalten in ihren Glykanen die Bausteine Mannose und N-Acetylglucosamin der Core-Struktur von N-gebundenen Oligosacchariden. Für Maus und Ratte wurden darüber hinaus noch Bindungsstellen für α -Galactose-erkennende Lektine beschrieben (Maymon et al., 1994). Zusätzlich lokalisierten Aviles et al. (1999) ultrastrukturell GalNAc β 1 \rightarrow 4Gal-Sequenzen in der inneren Region der murinen ZP, was auf eine Regionalisierung der Glykane innerhalb der dreidimensionalen Struktur der ZP hinweist. Für die humane ZP wurden durch lektinologische Analysen N-Glykane vom biantennären komplexen Typ und/oder High-Mannose-Typ (Con A) und fucosylierte komplexe Strukturen (LCA) nachgewiesen. Die meisten O-gebundenen Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc-Sequenzen

scheinen durch α 2,3-gebundene Sialinsäure terminal verlängert zu sein (Maymon et al., 1994; Ozgur et al., 1998).

In den letzten Jahren wurde neben lektinologischen Untersuchungen eine direkte Charakterisierung der einzelnen Oligosaccharidstrukturen und die Identifizierung von Glykosylierungsstellen der ZP mit Hilfe der H-NMR-Spektroskopie durchgeführt. Es wurden zunächst die Oligosaccharidstrukturen der porcinen ZP-Proteine analysiert, da in dieser Spezies Glykane in großen Mengen isoliert werden können (Nakano et al., 1996; Nakano und Yonezawa, 2001; Takasaki et al., 1999; Hirano et al., 1993; Hokke et al., 1993, 1994). Die Strukturen der N-Glykane des ZP-Proteingemisches wurden von Mori et al. (1991, 1998) und diejenigen des ZPB- und ZPC-Proteins von Nakano und seinen Mitarbeitern (Noguchi und Nakano, 1992; Noguchi et al., 1992; Takasaki, 1999) charakterisiert. Die N-gebundenen Oligosaccharide gehören dem komplexen bi-/tri- und tetraantennären Typ mit einer α 1,6-fucosylierten Core-Struktur an, deren Antennen mit n N-Acetyllactosamineinheiten verlängert sein können. Die neutralen und sauren N-Glykane sind in einem molaren Verhältnis von 1:2 vertreten. Die neutralen Formen bestehen im molaren Verhältnis 4:2:1:1 aus bi-, 2,4-verzweigten tri-, 2,6-verzweigten tri- und tetraantennären N-Glykanen. Etwa 1/4 enthalten lineare N-Acetyllactosamineinheiten. N-Acetylglucosaminreste tragen etwa 39% der Oligosaccharide an ihrem nicht reduzierenden Ende (Mori et al., 1991). Die sauren N-Glykane der ZP-Proteine weisen aufgrund von Sialylierung und Sulfatierung eine komplexere strukturelle Heterogenität auf. Für die ZP-Proteine wurden saure mono- bis tetraantennäre Strukturen mit und ohne N-Acetyllactosamineinheiten identifiziert. Sialinsäure tragen 29% der sauren N-Glykane, während 71% sulfatierte Oligosaccharide mit und ohne Sialylierung sind. Die Mehrheit der neutralen und sauren N-Glykane sind biantennäre Strukturen (Mori et al., 1991, 1998; Noguchi und Nakano, 1992; Noguchi et al., 1992).

Von den O-Glykanen der ZP-Proteine sind 30% neutral. Sie enthalten die Core-Struktur 1 ($\text{Gal}\beta 1\rightarrow 3\text{GalNAc}$) und die Core-Struktur 3 ($\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 3\text{GalNAc}$) ungefähr im Verhältnis 13:1. Das hauptsächlich vorkommende Oligosaccharid (45%) hat die Tetrasaccharidstruktur $\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 3\text{Gal}\beta 1\rightarrow 3\text{GalNAc}$, an welche ein bis zwei N-Acetylglucosaminreste linear gebunden sind (siehe Abb. 1.6a). Etwa 16% der O-Glykane mit der Core-Struktur 1 tragen wie die N-gebundenen Oligosaccharide (Mori et al., 1991) an ihrem nicht reduzierenden Ende N-Acetylglucosaminreste. Weiterhin wurden zu einem geringen Anteil Oligosaccharide

mit α -Galactose- (2%) und β -N-Acetylgalactosaminresten (4%) an ihren nicht reduzierenden Enden identifiziert. Analysen mit dem Lektin GS-I ergaben, dass die α -Galactosylreste auf den 55 kDa Glykoproteinen der ZP exprimiert werden (Hirano et al., 1993). Die Azidität der O-Glykane wird entsprechend der N-Glykane durch Sialylierung und/oder Sulfatierung hervorgerufen (Hokke et al., 1994).

Beim Schwein konnte nur für jeweils drei potentielle N-Glykosylierungsstellen des ZPB- (Asn₂₀₃, Asn₂₂₀, Asn₃₃₃) und ZPC-Proteins (Asn₁₂₄, Asn₁₄₆, Asn₂₇₁) eine Besetzung mit neutralen N-Glykanen gezeigt werden. Tri- und tetraantennäre N-gebundene Ketten sind hauptsächlich an der Position Asn₂₂₀ des ZPB- und des Asn₂₇₁ des ZPC-Proteins lokalisiert, während alle Stellen biantennäre N-Glykane tragen (Kudo et al., 1998; Yonezawa et al., 1999; Nakano und Yonezawa, 2001).

Eine O-Glykosylierung wurde an den Positionen Ser₂₉₃ und Thr₃₀₃ des ZPB- und den Positionen Thr₁₅₅, Thr₁₆₁ und Thr₁₆₂ des ZPC-Proteins nachgewiesen (Yurewicz et al., 1992; Nakano und Yonezawa, 2001).

Für das Rind sind ebenfalls die Strukturen der N-Glykane (Katsumata et al., 1996; Amari et al., 2001) und die N-Glykosylierung des ZPA-Proteins (Ikeda et al., 2002) charakterisiert worden. Die Strukturen der N- und O-gebundenen Oligosaccharide der murinen ZP (Nagdas et al., 1994; Noguchi und Nakano, 1993; Easton et al., 2000) sowie die N-Glykosylierungsstellen der ZP-Glykoproteine von Maus (Boja et al., 2003) und Ratte (Boja et al., 2005) sind kürzlich aufgeklärt worden.

Die ZP-Proteine von Maus und Rind tragen wie die des Schweines fucosylierte komplexe N-Glykane mit N-Acetyllactosamineinheiten am nicht reduzierenden Ende, allerdings sind bei der Maus auch Oligosaccharidstrukturen ohne Fucose identifiziert worden. Die einzelnen Spezies unterscheiden sich in dem Verhältnis von bi-, tri und tetraantennären Ketten sowie dem Grad der Sulfatierung und Sialylierung. Die bovinen ZP-Glykoproteine und das murine ZP2 (ZPA) und ZP3 (ZPC) enthalten hauptsächlich saure tri- und tetraantennäre Ketten. Die Azidität der Oligosaccharide wird im Gegensatz zum Schwein vor allem durch Sialinsäure hervorgerufen (Katsumata et al., 1996; Noguchi und Nakano, 1993).

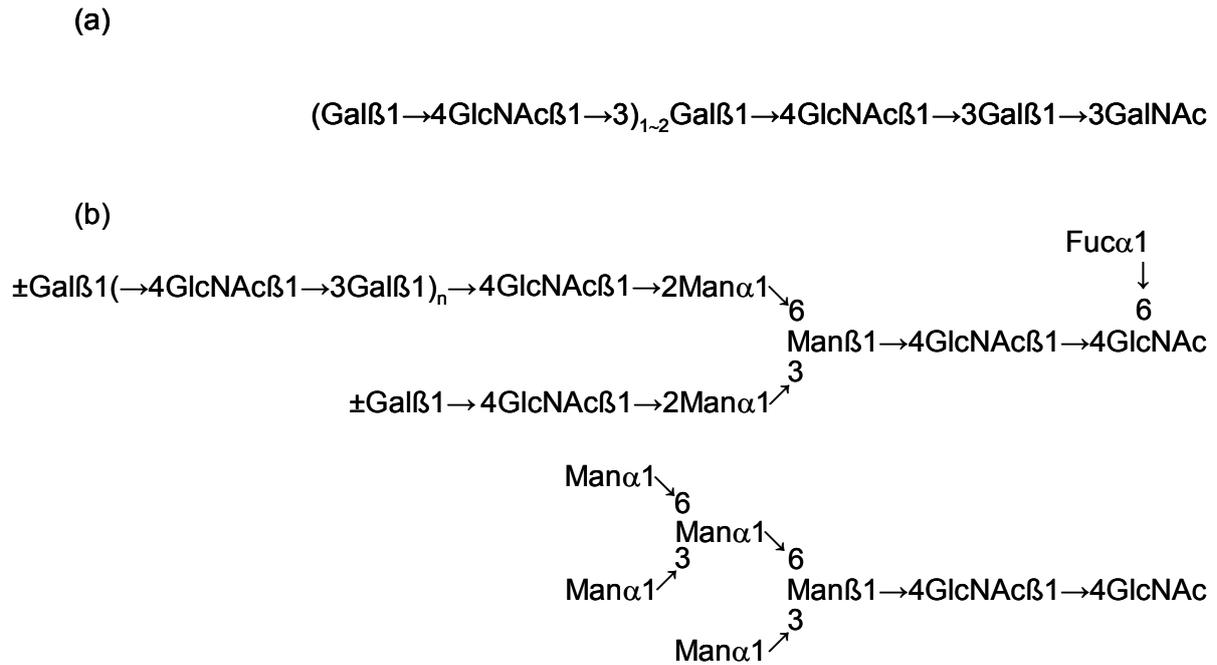


Abb. 1.6: Schematische Darstellung von dominanten neutralen Glykanstrukturen verschiedener Spezies.

Die O-Glykane der porcinen ZP-Proteine enthalten vorwiegend ein lactosaminiertes Tetrasaccharid mit einer Core-Struktur 1 (a). Die N-gebundenen Oligosaccharide sind beim Schwein vorwiegend biantennäre N-Glykane; beim Rind und bei der Maus herrschen Oligosaccharide vom High-Mannose-Typ vor (b).

Die neutralen N-Glykane unterscheiden sich in den einzelnen Spezies erheblich (siehe Abb. 1.6b). Die Glykoproteine des Rindes und der Maus besitzen vorwiegend Kohlenhydratketten vom High-Mannose-Typ (Amari et al., 2001; Easton et al., 2000), während in der porcinen ZP biantennäre komplexe N-Glykane mit N-Acetyllactosamineinheiten vorherrschen (Mori et al., 1991). In den Spezies Rind und Schwein beträgt der relative Anteil der neutralen N-gebundenen Oligosaccharide etwa 25% der gesamten Kohlenhydrate der ZP; in den murinen ZP2- (ZPA) und ZP3- (ZPC) Proteinen sind es hingegen weniger als 5% (Katsumata et al., 1996; Nakano et al., 1996; Noguchi und Nakano, 1993). Bei Rind und Maus sind im Gegensatz zum Schwein zu einem geringen Anteil N-Glykane mit terminalen α -Galactoseresten identifiziert worden (Katsumata et al., 1996; Easton et al., 2000). Sowohl die N- als auch die O-gebundenen Oligosaccharide der murinen ZP-Glykoproteine können ein Sd^a-Antigen (NeuAc α 2 \rightarrow 3[GalNAc β 1 \rightarrow 4]Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc) tragen (Easton et al., 2000). MALDI-ToF-MS-Analysen der O-Glykane des ZP3-Proteins der Maus ergaben die gleichen Oligosaccharidstrukturen wie für das mZP-Glykoproteingemisch (Dell et

al., 2003). Die Glykoproteine enthalten hauptsächlich die Core-Struktur 2 (Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6[Gal β 1 \rightarrow 3]GalNAc) (Easton et al., 2000; Dell et al., 2003).

1.4 Rezeptorsystem der Gameten in der Befruchtungskaskade

Der fundamentale Mechanismus der Gametenerkennung scheint in der Evolution konserviert zu sein und basiert auf Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen zwischen dem Spermatozoon und der ZP der Oocyte. Oligosaccharidstrukturen der ZP werden durch komplementäre Kohlenhydrat-Rezeptoren des Spermiums erkannt, wodurch die Gametenerkennung vermittelt und die Spermienfunktionen für die Befruchtung koordiniert werden (Töpfer-Petersen et al., 2000).

Bei der Maus sind zahlreiche Untersuchungen zum Kohlenhydrat-Erkennungsmechanismus durchgeführt worden. Die Spermienrezeptoraktivität wurde zunächst O-gebundenen Oligosacchariden des ZP3-Proteins mit α -Galactosylresten am nicht reduzierenden Ende zugeordnet (Bleil und Wassarman, 1988), die vermutlich am Ser₃₃₂ und Ser₃₃₄ gebunden sind (Chen et al., 1998). Mittels Photoaffinitätsexperimenten mit ZP3 wurde das sp56-Protein auf Akrosom-intakten Spermatozoen identifiziert (Bleil und Wassarman, 1990) und als ein komplementäres Kohlenhydrat-bindendes Protein für Spezies-spezifische Interaktionen mit der Oocyte vorgeschlagen (Cheng et al., 1994; Bookbinder et al., 1995). Transgene α -Galactosyltransferase-defiziente weibliche Mäuse, die in der ZP keine α -Galactosylreste exprimieren, sind jedoch fruchtbar (Thall et al., 1995). Darüber hinaus ist sp56 eine lösliche Komponente der akrosomalen Matrix. Es interagiert somit vermutlich erst während oder nach der Akrosomreaktion mit der ZP (Foster et al., 1997). Nach Miller et al. (1992) bindet die β 1,4-Galactosyltransferase auf der Spermienoberfläche an N-Acetylglucosaminreste der O-gebundenen Ketten des ZP3-Proteins. Männliche Knockout-Mäuse für β -Galactosyltransferase sind jedoch fertil und binden an die ZP (Lu et al., 1997). Dies lässt vermuten, dass die GalTase die Gametenbindung in einem System von mehreren Rezeptoren lediglich unterstützt (Shur, 1998). Ob O-Glykane potentielle Spermienbindungsstellen darstellen, ist allerdings fraglich, da weder terminale N-Acetylglucosaminreste (Easton et al., 2000) noch O-Glykosylierung am Ser₃₃₂ oder Ser₃₃₄ (Boja et al., 2003) massenspektrometrisch nachgewiesen wurden. Weiterhin identifizierten Johnston et al. (1998) auf der Spermienoberfläche Bindungsstellen mit einer hohen Affinität für α -fucosylierte Oligosaccharide und niedriger Affinität für β -galactosylierte Strukturen.

Vermutlich erfolgt die Bindung des Spermatozoons über eine Gruppe unterschiedlicher Glykane, wobei die korrekte Präsentation der Strukturen eine Rolle spielen könnte.

Das ZP2-Protein der Maus wird als sekundärer Spermienrezeptor vorgeschlagen, an welches Akrosom-reagierte Spermatozoen binden. Die Bindung wird durch Interaktionen des ZP2-Proteins mit der Spermien-Protease Akrosin vermittelt (Howes et al., 2001). Neueste Untersuchungen an Mäusen mit einem humanen ZP3-Transgen lassen jedoch vermuten, dass die In-vitro-Bindung des Spermatozoons an die Oocyte nicht von einem bestimmten ZP-Glykoprotein, sondern von der supramolekularen Struktur der ZP abhängt (Wassarman, 2005).

Trotz der guten Kenntnisse über die Oligosaccharidstrukturen der ZP-Proteine beim Schwein ist wenig über ihre Funktionen bei der Spermienerkennung und -bindung bekannt. Yurewicz et al. (1991) konnten zeigen, dass die O-gebundenen Oligosaccharide des ZPB/ZPC-Proteingemisches die Spermien-Eizellbindung hemmen. Andererseits wurde den neutralen N-gebundenen Glykanen eine Beteiligung an der Spermien-ZP-Interaktion zugewiesen (Noguchi et al., 1992). Partiiell durch Endo- β -Galactosidase (E β Gal) deglykosyliertes ZPB besitzt im Gegensatz zum E β Gal-gespaltenen ZPC Spermienrezeptoraktivität, und die Abspaltung der N-Glykane vom ZPB-Protein reduziert erheblich seine inhibitorische Wirkung auf die Spermien-Eizellbindung. Die Abspaltung der O-gebundenen Kohlenhydratketten verringert dagegegen kaum die hemmende Wirkung (Yonezawa et al., 1995). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die tri- und tetraantennären neutralen N-gebundenen Oligosaccharide der Position Asn₂₂₀ des ZPB-Proteins hauptsächlich an der Spermatozoen-Oocytenbindung beteiligt sind (Nakano et al., 1996; Kudo et al., 1998). Das ZPC-Protein scheint dabei die Spermienligandenaktivität des ZPB-Proteins zu unterstützen (Nakano und Yonezawa, 2001). Yonezawa et al. (2005a) konnten kürzlich nachweisen, dass β -Galactosylreste am nicht reduzierenden Ende der neutralen N-Glykane des ZPB/ZPC-Oligomers eine entscheidende Rolle bei der Spermienerkennung und -bindung spielen.

Es sind zahlreiche Spermien-assoziierte ZP-bindende Proteine beim Schwein identifiziert worden, welche nach der Bindung an die ZP einen multimeren Rezeptorkomplex bilden. Hierzu gehören unter anderem die Spermadhäsine (Töpfer-Petersen, 1999a, b; Töpfer-Petersen et al., 2000). Sie sind multifunktionelle Proteine

und repräsentieren eine neue Klasse von Lektinen. AQN-1, AQN-3 und AWN binden an die Strukturen Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc und Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc, die in den porcinen O- bzw. N-Glykanen enthalten sind. Im Gegensatz dazu zeigt das PSP-II eine hohe Bindungsaffinität für Mannose-6-Phosphat.

Das die sekundäre Bindung vermittelnde intraakrosomale Proakrosin wird während der Akrosomreaktion in das enzymatisch aktive Akrosin umgewandelt, welches dem Spermatozoon die Penetration durch die ZP erleichtert (Töpfer-Petersen et al., 1990). Die Bindung von Akrosin an die ZP wird über einen Polysulfat-Mechanismus vermittelt, der auf Interaktionen zwischen basischen Aminosäuren des Pro/Akrosins und den Sulfatgruppen von lactosaminylierten N- und O-Glykanen der ZP beruht (Jansen et al., 1995, 2001).

Beim Rind hat von den drei ZP-Glykoproteinen das ZPB die stärkste Spermienbindungsaktivität (Yonezawa et al., 2001). Amari et al. (2001) konnten zeigen, dass High-Mannose-Typ N-Glykane mit fünf Mannoseresten die In-vitro-Befruchtung hemmen. Darüber hinaus wird die Ligandenaktivität nach Abspaltung terminaler α -Mannosylreste reduziert. Die α -Mannosylreste spielen somit eine essentielle Rolle bei der bovinen Spermien-Eizellbindung. Die Spermienpenetration durch die ZP beim Menschen wird durch eine Vorbehandlung der Spermien mit D-Mannose gehemmt (Mori et al., 1989), und es wurden Mannose-bindende Lektine der humanen Spermatozoen identifiziert, die an der Erkennung der ZP beteiligt sind (Benoff, 1997). Weiterhin scheinen die ZP-Proteine gegenüber α -Mannosidase empfindliche Oligosaccharide zu enthalten (Tulsiani et al., 1990). Dies lässt vermuten, dass die Gameteninteraktion bei Mensch und Rind ähnlich verläuft (Amari et al., 2001).

Studien zur humanen ZP sind wegen der limitierten Verfügbarkeit des biologischen Materials begrenzt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass zusätzlich zu D-Mannose die Monosaccharide Fucose, Galactose und N-Acetylglucosamin die Bindung der Spermien an die ZP hemmen (Miranda et al. 1997). Weiterhin sind komplexe Glycokonjugate mit selektinähnlichen Liganden, wie Sialyl-Lewis^{x(a)} und ungewöhnliche fucosylierte und sialylierte GalNAc β 1 \rightarrow 4GlcNAc- (LacdiNAc) Antennen der N-Glykane von Glycodelin A, Inhibitoren. Vermutlich wird die Gametenerkennung beim Menschen über einen selektinähnlichen Mechanismus vermittelt (Oehninger et al., 1998).

Die Daten zeigen, dass die biologisch aktiven Oligosaccharide bei verschiedenen Spezies nicht an homologe Proteine gebunden sind. Weiterhin scheint die Erkennung und Bindung zwischen dem Spermatozoon und der Oocyte das Ergebnis eines multimeren Rezeptorsystems zu sein (Shur, 1998).

1.5 Strukturveränderungen der ZP-Proteine nach der Befruchtung

Nach der Befruchtung sind die Aufgaben der ZP die Verhinderung von Polyspermie und der Schutz der befruchteten Oocyte sowie des sich entwickelnden Embryos (Yanagimachi, 1994). Hierfür werden Strukturveränderungen der ZP, die durch die Befruchtung induziert werden, verantwortlich gemacht. Durch einen konservierten Mechanismus wird von dem befruchtenden Spermatozoon die Exozytose der cortikalen Granula ausgelöst. Die freigesetzten Faktoren modifizieren die ZP-Proteine, wodurch weitere Interaktionen zwischen der Eizelle und Spermien verhindert werden (Haley und Wessel, 2004). Weiterhin bewirken sie eine erhöhte Resistenz der ZP gegenüber proteolytischer Spaltung und eine Zunahme der ZP-Härtung. Letzteres ist jedoch nicht eindeutig nachgewiesen worden. Beide Vorgänge werden als „Zona Hardening“ bezeichnet (Green, 1997; Sun et al., 2005).

Beim Seeigel sind die meisten Proteine der cortikalen Granula identifiziert worden. Sie beinhalten strukturelle Proteine, Enzyme (Glucanase, Ovoperoxidase, Trypsin-ähnliche Protease) und Glucosaminoglykane. Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzungen der ZP der Säugetiere und der Vitellinschicht des Seeigels wird die Struktur ihrer Proteine jedoch nicht durch einen allgemein gültigen Mechanismus verändert (Haley und Wessel, 2004; Wong und Wessel, 2004).

Das ZP2-Protein der Maus (120 kDa) wird nach der Befruchtung durch eine Protease der cortikalen Granula in ein 90 kDa und 23 kDa großes Polypeptid gespalten, welche kovalent durch intramolekulare Disulfidbrücken verbunden bleiben (Bleil et al., 1981). Die Protease hydrolysiert *in vitro* das ZP2-, aber nicht das ZP1- und ZP3-Protein (Moller et al., 1990). Die spezifische Spaltung eines ZP-Proteins während der Befruchtung, vermutlich durch Proteasen der cortikalen Granula, wurde ebenfalls bei Schwein, Mensch, Rind und Frosch nachgewiesen (Hedrick et al., 1987; Hatanaka et al., 1992; Bauskin et al., 1999; Noguchi et al., 1994; Lindsay und Hedrick, 2004). Die entsprechende Protease wurde bisher lediglich beim Frosch charakterisiert (Lindsay und Hedrick, 2004). Das porcine ZPA (ZP1) besitzt die konservierte proteolytische Spaltstelle zwischen A₁₆₈ und D₁₆₉. Es liegt in ovariellen Oocyten

bereits teilweise gespalten in ein 69 kDa- (ZP2) und ein 23 kDa- (ZP4) Fragment vor, welche durch Disulfidbrücken verbunden sind (Hedrick und Wardrip, 1987; Hasegawa et al., 1994). Die limitierte und spezifische Spaltung eines ZP-Proteins induziert vermutlich eine Konformationsänderung der ZP-Proteine, die das so genannte „Zona Hardening“ begünstigt und die Zugänglichkeit des Spermiums zu den Bindungsstellen der ZP verhindert (Hatanaka et al., 1992; Lindsay und Hedrick, 2004).

Iwamoto et al. (1999) zeigten beim Rind durch Untersuchungen mit unbefruchteten und befruchteten Oocyten, dass während der Befruchtung zusätzlich zur Proteolyse intramolekulare Disulfidbrücken im ZPA und intra- sowie intermolekulare Disulfidbrücken des ZPB-Proteins gebildet werden. Die Oxidation von Cysteinen des ZPC-Proteins ist dagegen gering. Es wird postuliert, dass die Disulfidbrückenbildung und die spezifische Prozessierung des ZPA-Proteins zusammen zu einer rigideren Struktur der ZP führen, welche wiederum für das so genannte „Zona Hardening“ verantwortlich ist. Die Oxidation wird vermutlich nach der spezifischen Spaltung des ZPA-Proteins induziert (Iwamoto et al. 1999; Zhang et al., 1991).

Neben der Härtung der ZP führen chemische Modifikationen der ZP-Proteine zur Verhinderung einer polyspermen Befruchtung. Bei Maus und Frosch werden Kohlenhydrate der Spermienbindungsstellen eines ZP-Proteins (murines ZP3, Frosch ZPC) durch N-Acetylglucosaminidase der cortikalen Granula abgespalten (Miller et al., 1993; Vo und Hedrick, 2000). Aviles et al. (1997) konnten jedoch durch lektinologische Analysen zeigen, dass die terminalen GlcNAc-Reste bei den ZP-Proteinen der Maus nach der Befruchtung nicht abnehmen. Stattdessen kommt es zu einer Abnahme der Immunreaktivität des ZP2- (ZPA) und ZP3- (ZPC) Proteins und zu einer Veränderung des Bindungsmusters zahlreicher Lektine. Somit werden beide ZP-Proteine nach der Befruchtung modifiziert. Weiterhin ist beim Polyspermieblock des Frosches ein cortikales Granula Lektin (CGL) beteiligt, das an Liganden auf der Oberfläche der Vitellinhülle (Homolog der ZP) bindet (Hedrick und Nishihara, 1991). Das CGL wurde kloniert und als Mitglied einer neuen Lektinfamilie, der Eglektine, identifiziert (Chang et al., 2004). Homologe Lektinstrukturen wurden durch immunocytochemische Untersuchungen bei den Säugetieren Maus, Schwein und Rhesusaffen nachgewiesen und sowohl beim Menschen als auch der Maus kloniert. Die CGL-Liganden-Bindung ist bei Maus und Schwein wie beim Frosch Calcium-abhängig und Galactose-spezifisch (Peavy und Hedrick, 2000; Hedrick, 2004).

Nara et al. (2006) konnten durch ATR-FITR-Spektroskopie zeigen, dass der Gehalt an β -Faltblatt-Strukturen der bovinen intakten ZP-Proteine während der Befruchtung zunimmt. Es erfolgt demnach neben den supramolekularen Strukturveränderungen (s.o.) in der ZP auch eine globale Konformationsänderung der ZP-Proteine.

1.6 Zielsetzung

Die Zona pellucida (ZP) besteht bei den meisten Säugetieren aus drei Proteinen, die durch Glykosylierung und Disulfidbrücken posttranslational modifiziert sind. Die Oligosaccharidstrukturen der ZP spielen in der Befruchtungskaskade eine entscheidende Rolle bei der Spezies-selektiven Erkennung der Gameten. Disulfidbrückenbildung scheint neben der Prozessierung des ZPA-Proteins für die Veränderung der dreidimensionalen Struktur der ZP und somit zur Verhinderung polyspermer Befruchtung verantwortlich zu sein. Bisher liegen nur wenige Informationen über biochemische und strukturelle Veränderungen der ZP-Glykoproteine von Oocyten verschiedener Entwicklungsstadien und während der Befruchtung vor. Die porcinen ZP-Glykoproteine können von Oocyten im GV-Stadium für Proteom- und Glykomanalysen in ausreichenden Mengen isoliert werden. Sie stellen somit ein gutes Modell zur Identifizierung von posttranslationalen Modifikationen eines biologisch wichtigen Systems durch einen massenspektrometrischen Ansatz dar.

Beim Schwein sind bereits die Glykanstrukturen der ZP und das N-Glykosylierungsmuster des ZPB- und ZPC-Proteins charakterisiert worden. In der vorliegenden Arbeit sollen daher auf Basis der bekannten Glykanstrukturen und Aminosäuresequenzen der ZP-Proteine die N-Glykosylierung und die Verteilung der oxidativ-sensitiven Thiolgruppen des ZPA-Proteins von unreifen Oocyten analysiert werden. Weiterhin sollen Methoden etabliert werden, die den Vergleich der ZP-Oligosaccharidstrukturen von Oocyten verschiedener Entwicklungsstadien ermöglichen. Diese Untersuchungen bilden die Basis zum Verständnis der porcinen ZP-Struktur von Oocyten in verschiedenen Entwicklungsstadien und können hilfreich für die Optimierung der In-vitro-Produktion von Schweineembryonen sein.

2 Material und Methoden

Alle verwendeten Chemikalien wurden soweit nicht anders vermerkt in Analysenqualität von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), AppliChem (Darmstadt, Deutschland) und Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Glykoprotein- und Glykananalysen erfolgten in silikonisierten Glas- und Reaktionsgefäßen (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland). Die Proben wurden unter Vakuum in einer SpeedVac oder in einer Gefriertrocknungsanlage (Christ, Osterode, Deutschland) getrocknet.

2.1 Vorbereitung des Materials

2.1.1 Isolierung der Zonae pellucidae von präpuberalen Sauen

Die Isolierung der Zonae pellucidae (ZP) von Oocyten im GV-Stadium erfolgte aus Schlachtmaterial von präpuberalen Sauen modifiziert nach Dunbar et al. (1980). 300-600 Ovarien wurden ü/N bei 4°C in Oocytenpuffer aufgetaut und nach Präparation von Bindegewebsresten mit Hilfe eines Fleischwolfes (Körnungsdurchmesser 5 mm; Scharfen, Witten, Deutschland) zerkleinert. Die Ovariensuspension wurde mit der dreifachen Menge Oocytenpuffer 1 h bei 4°C gerührt. Anschließend wurde sie nacheinander mehrfach durch Nylonnetze (Hepfinger, München, Deutschland) mit abnehmender Porengröße (8 x 2000 µm, 3 x 1000 µm, 3 x 600 µm, 6 x 200 µm) filtriert, wobei der Durchfluss stets gesammelt wurde. Die zurückbleibenden Geweberückstände der ersten 4 Filtrationsschritte wurden nochmals je 10 min bei 4°C gerührt und erneut über das Filtersystem gegeben.

Die Oocyten in dem gesammelten Durchfluss wurden auf einem 80 µm Nylonnetz gesammelt, mit Oocytenpuffer abgespült und ü/N bei 4°C sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe erfolgte eine weitere Aufreinigung der Oocyten durch Percoll-Dichtegradientenzentrifugation mit einem diskontinuierlichen Gradienten (40%, 20%, 10% Percoll). Hierbei wurden die beschichteten Gläser (Schott Duran®; Roth, Karlsruhe, Deutschland) 20 min bei 1900 x g zentrifugiert (Labofuge GL; Heraeus Christ, Hanau, Deutschland). Die Oocyten wurden aus der 10%igen Percollschicht gesammelt und nach Filtration von einem Nylonnetz mit einer Porengröße von 42,5 µm mit dest. H₂O abgespült.

In fünf Tropfen von je 5 µl wurden die Oocyten und Zonae pellucidae unter einem Stereomikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) ausgezählt, ein

Durchschnittswert ermittelt und eine Gesamtzahl an Oocyten bzw. ZP in der Suspension geschätzt.

Schätzung der Oocytenzahl:

Gesamtzahl = Durchschnittswert x 200 ZP x ml der Lösung

1 ZP = 15 ng^{*}

Die Oocyten wurden anschließend durch einen Hub in einem 2 ml Potter (Braun, Melsungen, Deutschland) homogenisiert, die Zonae pellucidae von einem 42,5 µm Nylonnetz in dest. H₂O gesammelt und anschließend solubilisiert (siehe 2.1.3).

Oocytenpuffer:

10 mM Na₂HPO₄*2 H₂O

125 mM NaCl

3 mM C₆H₅Na₃O₇*2 H₂O

2 mM EDTA

10 mM NaH₂PO₄* H₂O, pH 7,0-7,4

Percoll-Lösungen:

Stammlösung (v/v):

90 ml Percoll-Lösung (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland)

10 ml 154 mM NaCl

40% Percoll-Lösung (v/v):

40 ml Stammlösung

60 ml 154 mM NaCl

20% Percoll-Lösung (v/v):

20 ml Stammlösung

80 ml 154 mM NaCl

10% Percoll-Lösung (v/v):

10 ml Stammlösung

90 ml 154 mM NaCl

^{*} Die mittlere Proteinmenge einer ZP wurde über AS-Analyse von 1000 ZP kalkuliert.

2.1.2 In-vitro-Maturation von Oocyten und anschließende Isolierung der ZP

Die In-vitro-Maturation (IVM) von Oocyten wurde am Institut für Tierzucht in Mariensee durchgeführt.

Die Oocyten stammten aus frischen Ovarien von präpuberalen Sauen vom Schlachthof. Aus den Ovarien wurden nach sofortiger Spülung mit 154 mM NaCl (39°C) die Follikel mit einem Durchmesser von 2-5 mm und heller, durchsichtiger Oberfläche mit einer Aspirationsnadel (18-gauge, Mikrolance 3; Becton Dickinson, Basel, Schweiz) punktiert. Die Nadel war über ein Schlauchsystem und einen Adapter mit einem sterilen Auffanggefäß verbunden (50 ml Zentrifugenröhrchen; Greiner, Frickenhausen, Deutschland), das mit einer Unterdruckpumpe (20 mm Hg) gekoppelt war. Die Follikelflüssigkeit in dem Auffanggefäß mit den Cumulus-Oocyten-Komplexen (COC) wurde nach der Punktion mit PBS/2% PVA auf 50 ml aufgefüllt. Nach zehnminütiger Sedimentation wurde der Überstand abgenommen, das Sediment nochmals mit PBS/2% PVA gewaschen und 3 ml mit 10 ml PBS verdünnt. Die COC wurden unter einem Stereomikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) nach morphologischen Kriterien (Leibfried und First, 1979) beurteilt. Es wurden nur Oocyten ausgewählt, die mindestens drei kompakte Cumuluszellagen und keine expandierte Cumulusschicht besaßen. Gruppen von 50 COC wurden zweimal in PBS/2% PVA und dreimal im äquilibrierten Maturationsmedium gewaschen.

Die anschließende Reifung der Oocyten erfolgte in Embryokulturschalen mit fünf Vertiefungen (Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) in je 500 µl Maturationsmedium. Sie wurden in feuchtigkeitsgesättigter Luft in einem Inkubator (Nuair NU 2700 E; Zapf Instrumente, Sarstedt, Deutschland) bei 38,5°C und 5% CO₂ für 48 h inkubiert. Zur Supplementierung wurden in den ersten 24 h Hormone (10 IE/l PMSG und 10 IE/l hCG) und 1 mM db-cAMP hinzugegeben. Die COC wurden danach in Maturationsmedium ohne Zusätze umgesetzt.

Nach der Reifung wurden die COC mehrmals in PBS/2% PVA und dest. H₂O gewaschen. Die Cumuluszellen wurden durch mehrmaliges Pipettieren mit einer 100 µl Eppendorf-Pipette grob abgelöst und anschließend mittels ausgezogener Mikropipette feindenudiert.

Zur Isolierung der ZP wurde die Oocyte erneut mittels einer Mikropipette, deren Durchmesser ein Drittel kleiner als der einer Eizelle war, aufgezogen und ausgespült. Die Oocyte und die ZP wurden durch den Defekt, der durch die Scherkräfte entstand,

voneinander getrennt. Die ZP wurde mit der Pipette gesammelt, in dest. H₂O aufgenommen und nach Trocknung bei -80°C gelagert.

PBS:

154 mM NaCl
9,1 mM Na₂HPO₄/2,71 mM KH₂PO₄, pH 7,4

Maturationsmedium NCSU 37 (Petters und Wells, 1993):

1,7 mM CaCl ₂ *2 H ₂ O	1,2 mM KH ₂ PO ₄
0,6 mM Cystein	1,2 mM MgSO ₄ *6 H ₂ O
10 ng/ml EGF	108,7 mM NaCl
5,6 mM Glucose	25,1 mM NaHCO ₃
1,0 mM Glutamin	100 IE/l Penicillin G
10% immature Follikelflüssigkeit	12 mM Sorbitol
5% Insulin	50 mg/l Streptomycin
4,8 mM KCl	

2.1.3 Solubilisierung der ZP

ZPs wurden für alle Analysen 2 h bei 72°C in dest. H₂O solubilisiert. Nicht gelöste Proteine wurden durch zehnmütige Zentrifugation bei 4°C und 14000 x g abgetrennt. Der Überstand wurde anschließend lyophilisiert und bei -20°C gelagert.

2.2 Proteinanalytische Methoden

2.2.1 Ethanolfällung

30 µg ZP wurden mit dem vierfachen Volumen eiskaltem Ethanol versetzt und 48 h bei -80°C inkubiert. Die gefällten Proteine wurden anschließend 20 min bei 4°C und 14000 x g sedimentiert, zweimal mit eiskaltem Ethanol gewaschen und getrocknet.

2.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli (1970). Die Gele wurden entsprechend der in der Tab. 2.1 angegebenen Zusammensetzungen angefertigt.

Die Trenngellösung wurde nach Zugabe von Polymerisationsinitiator und -katalysator zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und zum Erhalt einer glatten Geloberkante vorsichtig mit dest. H₂O überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Die zu analysierenden

Proben wurden mit dem gleichen Volumen an 2 x Auftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Unter reduzierenden Bedingungen wurden sie nach Zusatz von 100 mM β -Mercaptoethanol zunächst 5 min bei 95°C inkubiert, abgekühlt und 1 min bei 14000 x g zentrifugiert.

Die Elektrophorese erfolgte bis zum Übergang der Proben vom Sammel- zum Trenngel bei konstanter Spannung von 100 V und wurde anschließend bei 200 V fortgesetzt (Elektrophoresesystem: Mini-Protean II; Bio-Rad, München, Deutschland). Sie wurde beendet, wenn der Frontmarker Bromphenolblau an der Gelunterkante austrat.

Tab. 2.1: Lösungen für SDS-Polyacrylamidgele

Komponenten	5% (Sammelgel)	8% (Trenngel)	10% (Trenngel)	12% (Trenngel)	15% (Trenngel)
dest. H ₂ O	1,4 ml	2,3 ml	2,0 ml	1,7 ml	1,2 ml
29,2% Acryl-/0,8% Bisacrylamid	330 μ l	1,3 ml	1,7 ml	2,0 ml	2,5 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	-	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml
1 M Tris-HCl, pH 6,8	250 μ l	-	-	-	-
10% SDS	20 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
10% APS	20 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
TEMED	2 μ l	3 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l

2 x Auftragspuffer:

50 mM Tris-HCl, pH 6,8
 2% SDS
 10% (v/v) Glycerin
 0,1% Bromphenolblau
 (100 mM β -Mercaptoethanol)

Laufpuffer:

25 mM Tris-HCl, pH 8,3
 192 mM Glycin
 0,1% SDS

Proteinlängenstandards:

Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)
 Biotinylierter Broad Molecular Weight- (BMW) Standard (Bio-Rad, München, Deutschland)

2.2.3 Gelfärbungen

2.2.3.1 Coomassie Brilliant Blue-Färbung

Das Gel wurde direkt nach der Elektrophorese für 10 min bei RT unter leichtem Schütteln in CBB-Färbelösung (Empfindlichkeitsgrenze etwa 200-400 ng/Bande) gefärbt. Zur Entfärbung des Hintergrundes wurde das Gel drei- bis viermal 30-60 min in Entfärbelösung gewaschen. Die Entfärbelösung ist nach Filtration über Aktivkohle wieder verwendbar.

Coomassie Brilliant Blue- (CBB) Färbelösung:

- 0,2% Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva, Heidelberg, Deutschland)
- 0,05% Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva, Heidelberg, Deutschland)
- 40,9% Ethanol
- 5% Methanol
- 10% Essigsäure

Entfärbelösung:

- 20% Methanol
- 10% Essigsäure

2.2.3.2 Modifizierte Coomassie Brilliant Blue-Färbung

Bei nachfolgenden massenspektrometrischen Analysen der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurde eine modifizierte CBB-Färbung durchgeführt. Das Gel wurde 2-5 min bei RT in mCBB-Färbelösung leicht geschüttelt. Die Entfärbung des Gels erfolgte durch mehrfaches Waschen in 30% Methanol und Inkubation ü/N in dest. H₂O.

Modifizierte Coomassie Brilliant Blue- (mCBB) Färbelösung:

- 0,1% Coomassie Brilliant Blue R250
- 50% Methanol
- 5% Essigsäure

2.2.3.3 Sypro Ruby-Färbung

Für massenspektrometrische Analysen sehr geringer Proteinmengen wurde eine Fluoreszenzfärbung mittels Sypro Ruby (Bio-Rad, München, Deutschland) durchgeführt.

Das Gel wurde für 30 min in Waschlösung gewaschen und anschließend unter leichtem Schütteln für 3 h in Sypro Ruby-Lösung gefärbt. Zur Reduzierung des Hintergrundes wurde das Gel erneut für 45 min in Waschlösung inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mit einem UV-Transilluminators (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland) bei 312 nm.

Waschlösung:

10% Methanol
7% Essigsäure

2.2.3.4 Silberfärbung

Die Silberfärbung (Empfindlichkeitsgrenze etwa 5-30 ng/Bande) wurde modifiziert nach Heukeshoven und Dernick (1988) durchgeführt. Alle Arbeitsschritte fanden bei RT unter Schwenken statt. Das Gel wurde zunächst für mindestens 1 h in 12,5% TCA fixiert. Anschließend wurde es viermal für 10 min in dest. H₂O gewaschen und für 1 h in Thiosulfatlösung inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen für 10 min in dest. H₂O wurde das Gel für 30 min in Silbernitratlösung inkubiert. Überschüssige Färbelösung wurde durch kurzes Waschen (10 s) mit dest. H₂O entfernt, und das Gel solange in Entwicklerlösung gefärbt, bis deutliche Banden sichtbar waren. Die Farbreaktion wurde durch Inkubation des Gels in Stopplösung beendet.

Thiosulfatlösung:

500 mM C₂H₃NaO₂*3 H₂O
20 mM Na₂O₃S₂*5 H₂O
0,5% Glutaraldehyd

Silbernitratlösung:

6 mM AgNO₃
0,05% Formaldehyd

Entwicklerlösung:

236 mM Na₂CO₃
0,01% Formaldehyd

Stopplösung:

5% Essigsäure

Gefärbte Gele wurden bei RT 18-24 h zwischen zwei Lagen angefeuchteten *Gel Drying Film* (Promega, Mannheim, Deutschland) getrocknet.

2.2.4 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese wurde nach Blase et al. (1998) durchgeführt. Für die erste Dimension wurden ein IPGphor System und Immobilin Dry Strips mit einer Länge von 7 cm und einem linearen pH-Gradienten von pH 3 bis pH 10 verwendet (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland).

Die lyophilisierte Probe wurde in 130 µl Rehydratisierungslösung gelöst und in einen IPGphor Strip Holder gegeben. Unter reduzierenden Bedingungen wurde der Lösung 20 mM DTT zugesetzt. Anschließend wurde der Immobilin Dry Strip mit der Gelseite nach unten aufgelegt und mit 250 µl Mineralöl überschichtet. Die Rehydratisierung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 50 V für 15 h und wie alle weiteren Schritte bei 20°C. Die Auftrennung im pH-Gradienten wurde in mehreren Schritten durchgeführt:

1 h 150 V
1 h 500 V
1 h 1000 V
4000 V bis zum Erreichen von 20000 Vh

Für die zweite Dimension wurde der Immobilin Dry Strip 20 min bei RT in Äquilibriumslösung inkubiert. Unter reduzierenden Bedingungen erfolgte die Äquilibriumslösung 15 min unter Zusatz von 65 mM DTT und 15 min unter Zusatz von 240 mM Jodacetamid. Der Strip wurde anschließend in die Tasche eines 12- oder 15%igen SDS-Polyacrylamidgels eingesetzt und die Geltasche mit 0,3%iger Agarose aufgefüllt. Die Elektrophorese wurde, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, durchgeführt. Die Gele wurden anschließend gefärbt (siehe 2.2.3) oder die Proteine auf PVDF-Membranen transferiert (siehe 2.2.5).

Fokussierte Strips können bei -20°C aufbewahrt werden.

Rehydratisierungslösung:

9 M Harnstoff
2% CHAPS
0,5% IPG-Puffer (pH 3-10)
(20 mM DTT)

Äquibrierungslösung:

0,05 M Tris-HCl, pH 6,8
2% SDS
30% (v/v) Glycerin
6 M Harnstoff
(65 mM DTT)
(240 mM Jodacetamid)

2.2.5 Immobilisierung von Proteinen auf Membranen (Western Blotting)

Gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine (siehe 2.2.2) wurden nach der Semi-Dry-Methode (Semi-Dry-Blotter; Biometra, Göttingen, Deutschland) auf PVDF-Membranen (Millipore, Eschborn, Deutschland) transferiert (Towbin et al., 1979).

Die auf Gelgröße zugeschnittene PVDF-Membran wurde zunächst mit Methanol befeuchtet, mit dest. H₂O gewaschen und anschließend - ebenso wie das Gel sowie sechs auf Gelgröße zugeschnittene Lagen Blotpapier (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) - in Blotpuffer äquilibriert. Das Blotsandwich bestand, ausgehend von der Anode, aus drei Lagen Blotpapier, der PVDF-Membran, dem Gel und drei weiteren Lagen Blotpapier. Der Transfer erfolgte für 2 h bei 1 mA/cm². Die Qualität des Transfers wurde durch eine fünfminütige reversible Färbung der Membran in Ponceau S-Färbelösung und anschließender Entfärbung in dest. H₂O überprüft. Die Membranen wurden entweder sofort für Biotin- und Lektinanalysen (siehe 2.2.6 und 2.3.1) verwendet oder nach Trocknung bei -20°C gelagert. Getrocknete Membranen müssen vor der Verwendung wieder mit Methanol behandelt werden.

Blotpuffer:

39 mM Glycin
48 mM Tris-HCl
0,0375% SDS
20% Methanol

Ponceau S-Färbelösung:

0,5% Ponceau S in 1% Essigsäure

2.2.6 Biotinylierung von ZP-Proteinen

Die Oocyten wurden, wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben, isoliert und von dem 80 µm Nylonnetz mit Biotinylierungspuffer ab gespült. Die Biotinylierung der ZP-Proteine erfolgte vor der Aufreinigung durch Percoll-Dichtegradientenzentrifugation modifiziert nach Lee et al. (1999). Hierbei wurden 10 µM N-(biotinoyl)-N'-(iodoacetyl)ethylenediamine (BIAM; Molecular Probes, Eugene, USA) zur Biotinylierung von 100 µg ZP eingesetzt. Zur Verhinderung von Disulfidscrambling durch Oxidation wurde die Oocytensuspension 20 min vor sowie 10 min nach Zugabe von BIAM mit Stickstoffgas behandelt. Die ZP-Proteine wurden 20 min unter Schwenken bei RT biotinyliert, und die Reaktion durch anschließende Percoll-Dichtegradientenzentrifugation gestoppt. Die Isolierung der ZP erfolgte wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben.

Zur Überprüfung der Biotinylierung wurde ein Western Blot mit anschließender Chemilumineszenz-Detektion durchgeführt. 30-40 µg native oder EßGal-gespaltene ZP (siehe 2.3.3) wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen (siehe 2.2.2) auf PVDF-Membran transferiert (siehe 2.2.5), und unspezifische Bindungsstellen ü/N bei 4°C mit Blockierungslösung blockiert. Anschließend wurde die Membran für 1 h mit HRPO-Streptavidin (1:50000; Dianova, Hamburg, Deutschland) in Blockierungslösung inkubiert. Nach achtmaligem Waschen in TBS/0,05% (v/v) Tween für 5 min wurde die Biotinylierung durch Inkubation für 1 min in 2 ml Working Solution des Uptilight HRPO Blot Chemilumineszenz-Substrates (Interchim, Mannheim, Deutschland) visualisiert. Auf die Membran wurde in einer Dunkelkammer bei Rotlicht 2-10 s ein Röntgenfilm (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) exponiert. Dieser wurde anschließend 30 s im Entwicklungsbad (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) geschwenkt, 1 min fixiert (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und nach fünfminütigem Waschen mit dest. H₂O getrocknet.

Die Proteine von 800 µg biotinylierter ZP wurden nach EßGal-Spaltung (siehe 2.3.3) durch RP-HPLC (siehe 2.2.7) getrennt.

Biotinylierungspuffer:

50 mM Bis-Tris, pH 6,5

150 mM NaCl

1 mM EDTA

TBS:

50 mM Tris-HCl, pH 7,5

150 mM NaCl

Blockierungslösung:

TBS mit 1% Blockierungsreagenz (Roche, Mannheim, Deutschland)

2.2.7 Reverse Phase-HPLC

Die Auftrennung der ZP-Proteine und tryptischer ZP-Peptide (siehe 2.2.9 und 2.2.10) erfolgte mittels Reverse Phase- (RP) HPLC (Shimadzu, Duisburg, Deutschland) mit einer UV-Detektion bei 214 nm.

Zur Fraktionierung der EßGal-gespaltenen ZP-Proteine (siehe 2.3.3) wurde eine Nucleosil 300 C-4 Säule (250 mm x 4 mm; Macherey & Nagel, Düren, Deutschland) mit einer Partikelgröße von 10 µm verwendet. Die Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 0,8 ml/min zunächst 5 min isokratisch (1% Laufmittel B), dann mit einem Gradienten von 1% bis 15% Laufmittel B in 15 min und schließlich mit einem Gradienten von 15% bis 60% Laufmittel B in 180 min.

Tryptische ZP-Peptide wurden auf einer Grom-Sil 120 ODS-4HE C-18 Säule (150 mm x 2 mm; Alltech Grom, Rottenburg-Hailfingen, Deutschland) mit einer Partikelgröße von 3 µm und einer Flussrate von 0,1 ml/min getrennt.

Hierbei wurden die über Lektin-Affinitätschromatographie isolierten ZP-Glykopeptide (siehe 2.3.2) zunächst 10 min isokratisch mit 1% Laufmittel B und dann mit einem Gradienten von 1% bis 70% Laufmittel B in 70 min fraktioniert.

Die Trennung von tryptischen ZP-Peptiden biotinylierter ZP-Proteine (siehe 2.2.6) erfolgte nach isokratischen Bedingungen (5 min, 1% Laufmittel B) mit einem Gradienten von 1% bis 20% Laufmittel B in 20 min und einem Gradienten von 20% bis 75% Laufmittel B in 110 min.

Für die Analyse der ZP-Peptide wurden einzelne Peaks, aber auch kontinuierlich 200 µl-Fraktionen gesammelt. Die einzelnen Fraktionen wurden für weitere Analysen in einer SpeedVac konzentriert.

Laufmittel A:

0,1% TFA in dest. H₂O

Laufmittel B:

0,1% TFA in Acetonitril

2.2.8 Enzyme-Linked Binding Assay

RP-HPLC-Fraktionen mit biotinylierten tryptischen Peptiden (siehe 2.2.7) wurden im *Enzyme-Linked Binding Assay* (ELBA) identifiziert.

1/4 der RP-HPLC-Fraktionen wurden in 20 µl dest. H₂O aufgenommen und nach dem Versetzen mit 80 µl Peptidbeschichtungspuffer in einer Mikrotiterplatte (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) ü/N bei 4°C immobilisiert. Als Kontrolle wurde dest. H₂O verwendet. Nach dreimaligem Waschen mit je 500 µl Waschpuffer pro Vertiefung wurden unspezifische Bindungsstellen mit je 200 µl 5% BSA in Waschpuffer bei 37°C für 1 h blockiert. Die Detektion der biotinylierten Peptide erfolgte durch Inkubation mit je 200 µl HRPO-Streptavidin (1:20000; Dianova, Hamburg, Deutschland) in 0,5% BSA/Waschpuffer für 1 h bei 37°C. Nach dreimaligem Waschen mit je 500 µl Waschpuffer sowie einmaligem Waschen mit dest. H₂O wurde in jede Vertiefung 100 µl Orthophenylendiaminlösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 7 µl 30% H₂O₂ gestartet. Anschließend wurde für 5 min bei RT inkubiert, und die Reaktion durch Zugabe von je 50 µl 4 M H₂SO₄ gestoppt. Die Extinktion wurde in einem ELISA-Reader (ICN, Meckenheim, Deutschland) bei $\lambda=492$ nm gemessen.

Peptidbeschichtungspuffer:

30 mM Na₂CO₃/70 mM NaHCO₃, pH 9,6

Waschpuffer:

28 mM NaH₂PO₄*H₂O/72 mM Na₂HPO₄*2 H₂O, pH 7,2

150 mM NaCl

0,05% (v/v) Tween

Substratpuffer:

50 mM Na₂HPO₄, pH 5,0

20 mM Zitronensäure

Orthophenylendiaminlösung:

20 mg/10 ml Substratpuffer

2.2.9 Tryptische Spaltung

1-2 mg native oder EßGal-gespaltene (siehe 2.3.3) bzw. durch RP-HPLC getrennte (siehe 2.2.7) biotinylierte ZP-Proteine (siehe 2.2.6) wurden in 500 µl Denaturierungspuffer aufgenommen und 30 min bei 50°C reduziert. Anschließend

wurde die Probe auf RT abgekühlt, und die Sulfhydrylgruppen nach Zusatz von 49 mM Jodacetamid bei RT carbamidomethyliert. Nach Zugabe der jeweiligen Puffer wurde für 5 min mit Protectan Spray (Tetenal, Norderstedt, Deutschland) begast, um Disulfidscrambling zu verhindern. Die modifizierte Probe wurde mittels einer NAP-5 Säule (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) nach Vorgaben des Herstellers entsalzt, wobei die Säule mit dem entsprechenden Reaktionspuffer äquilibriert und die Proteine eluiert wurden.

Reduzierte und carbamidomethylierte ZP-Proteine wurden ü/N in 20 mM NH_4HCO_3 , pH 8,5 mit TPCK-behandeltem Trypsin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in einem Enzym/Substratverhältnis von 1:50 bei 37°C inkubiert.

Die Proteolyse von RP-HPLC angereicherten biotinylierten ZP-Proteinen erfolgte in 50 mM NH_4HCO_3 , pH 8,0 nach N-Glykosidase F-Spaltung (siehe 2.3.6) mit 1 µg/ml Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade (Promega, Mannheim, Deutschland).

Die Probe wurde anschließend zur Denaturierung der Enzyme für 5 min auf 95°C erhitzt.

Denaturierungspuffer:

- 100 mM Tris-HCl, pH 8,6
- 5,3 M Guanidiniumhydrochlorid
- 12,5 mM DTT

2.2.10 Tryptische In-Gel-Spaltung

Tryptische In-Gel-Spaltung wurde modifiziert nach dem Protokoll von Jensen et al. (1997) mit 1 mg reduzierter und nicht reduzierter EßGal-gespaltener ZP (siehe 2.3.3) durchgeführt.

Die ZP-Proteine wurden zur Reduktion in 120 µl Denaturierungspuffer aufgenommen und nach Zugabe von 12,5 mM DTT 30 min bei 50°C inkubiert. Nach Abkühlung auf RT wurden die Proteine durch Zusatz von 50 mM Jodacetamid bei RT im Dunkeln carbamidomethyliert. Vor den reduzierenden und modifizierenden Bedingungen wurde die Probe jeweils für 5 min mit Protectan Spray (Tetenal, Norderstedt, Deutschland) begast, um Disulfidscrambling zu verhindern.

Die reduzierten und nicht reduzierten ZP-Proteine wurden in einem 10 oder 12%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, wobei für die reduzierten Proben 2 x Auftragspuffer mit lediglich 1% SDS eingesetzt wurde (siehe 2.2.2). Anschließend wurde eine Sypro Ruby- oder mCBB-Färbung (siehe 2.2.3) durchgeführt. Die Banden

des zu identifizierenden Proteins und als Kontrolle Regionen gleicher Größe ohne Protein wurden aus dem Gel ausgeschnitten und in 1 mm² große Stückchen zerkleinert. Alle folgenden Waschschriffe wurden mit dem zweifachen Gelvolumen Lösung durchgeführt.

Die Gelstückchen wurden zweimal für 15 min in Waschlösung gewaschen und nach Abnahme der Flüssigkeit für 10 min in 100% Acetonitril dehydriert. Anschließend wurde das Acetonitril abgenommen, und das Gel in 0,1 M NH₄HCO₃, pH 8,5 rehydriert. Nach 10 min wurde das gleiche Volumen an 100% Acetonitril hinzugegeben. Die Flüssigkeit wurde nach 15 minütiger Inkubation entfernt, und die Gelstückchen getrocknet. Das Gel wurde in Reduktionspuffer aufgeschwemmt, für 45 min bei 56°C inkubiert und nach Abkühlung auf RT in 100% Acetonitril dehydriert. Nach Trocknung der Gelstückchen erfolgte eine Inkubation für 30 min in Carbamidomethylierungspuffer bei RT im Dunkeln. Die Jodacetamidlösung wurde abgenommen, und die Wasch-, De- und Rehydrierungsschritte so häufig wiederholt, bis die Gelstückchen vollständig entfärbt waren. Das Gel wurde in einer SpeedVac getrocknet.

Die im Gel enthaltenen Proteine wurden ü/N in 50 mM NH₄HCO₃, pH 8,5 mit Trypsin Sequencing Grade (Boehringer, Mannheim, Deutschland) in einem Enzym/Substratverhältnis von 1:20 bei 37°C gespalten. Die Gelstückchen der Kontrolle wurden ebenfalls mit der gleichen Menge an Trypsin versetzt.

Anschließend wurde nach Zentrifugation der Probe (10 s, 14000 x g) der Überstand abgenommen. Die Gelstückchen wurden einmal für 30 min mit dem Extraktionspuffer 1 und dreimal für 40 min mit dem Extraktionspuffer 2 inkubiert. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Peptide durch fünfminütige Ultraschallbehandlung extrahiert. Die einzelnen Überstände wurden vereinigt, für 5 min auf 95°C erhitzt und nach Einengung im SpeedVac für MALDI-ToF-MS-Analysen (siehe 2.4) oder Lektin-Affinitätschromatographie (siehe 2.3.2) eingesetzt.

Denaturierungspuffer:

100 mM Tris, pH 8,5
0,3% SDS

Waschlösung:

50 mM NH₄HCO₃, pH 8,5
50% Acetonitril

Reduktionspuffer:

100 mM NH_4HCO_3 , pH 8,5
10 mM DTT

Carbamidomethylierungspuffer:

100 mM NH_4HCO_3 , pH 8,5
55 mM Jodacetamid

Extraktionspuffer 1:

33% Acetonitril
0,1% TFA

Extraktionspuffer 2:

60% Acetonitril
0,1% TFA

2.3 Glykoanalytische Methoden

2.3.1 Lektin-Markierung

Der Nachweis und die Charakterisierung der Glykosylierung der ZP-Proteine erfolgte durch Lektine (Alexis/Vektor, Grünberg, Deutschland; siehe Tab. 2.2). Hierfür wurden 5-40 μg native oder E β Gal-gespaltene ZP (siehe 2.3.3) durch 1D- und 2D-SDS-Gele elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.2.2) und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert (siehe 2.2.5).

Tab. 2.2: Eigenschaften der verwendeten Lektine

Lektin	Spezifität	Inhibitionszucker
Concanavalin A (Con A)	α -D-Glucose, α -D-Mannose	α -Methylmannopyranosid
Lens Culinaris Agglutinin (LCA)	Fuc α 1 \rightarrow 6GlcNAc komplexer N-Glykane	α -Methylmannopyranosid
Amaranthus Caudatus Agglutinin (ACA)	Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc	β -Lactose

Alle folgenden Arbeitsschritte fanden unter Schwenken statt. Unspezifische Bindungsstellen der Membran wurden ü/N bei 4°C durch Inkubation in TBS/1% (v/v) Tween blockiert. Anschließend wurde die Membran für 30 min bei RT mit 1-2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ biotinylierten Lektinen in TBS/1% (v/v) Tween inkubiert. Die Spezifität der Lektine

wurde auf einer weiteren Membran durch Zusatz von 0,5 M inhibierenden Zucker (siehe Tab. 2.2) getestet. Es folgten vier zehnmütige Waschschrirte in TBS/1% (v/v) Tween, bevor die Membran für 30 min bei RT mit Streptavidin Peroxidase (1:200000; Dianova, Hamburg, Deutschland) in TBS/1% (v/v) Tween inkubiert wurde. Nach achtmaligem Waschen der Membran mit TBS/1% (v/v) Tween für 5 min wurde die Streptavidinbindung entsprechend des Nachweises der Biotinylierung der ZP in Kapitel 2.2.6 visualisiert.

Für weitere Analysen kann die Membran nach zweimaligem Waschen für 10 min mit TBS/1% (v/v) Tween in 3 M Kaliumthiocyanat für 1-6 Tage gestrippt werden.

TBS:

50 mM Tris-HCl, pH 7,5

150 mM NaCl

2.3.2 Lektin-Affinitätschromatographie

Tryptische Glykopeptide des ZP-Proteingemisches (siehe 2.2.9) wurden mittels Minilektinsäulen und die des ZPA-Proteins nach tryptischer In-Gel-Spaltung (siehe 2.2.10) im Lektin-Batch-Verfahren isoliert.

2.3.2.1 Minilektinsäule

Tryptische lyophilisierte Peptide von 2 mg EßGal-gespaltener ZP (siehe 2.3.3) wurden in WP resuspendiert und für 2-3 h mit 800 µl suspendierter LCA-Agarose (Alexis/Vektor, Grünberg, Deutschland) unter Schütteln in einem Biospin-Minisäulchen (Bio-Rad, München, Deutschland) inkubiert. Das Säulenmaterial wurde zweimal mit dem doppelten Säulenvolumen WP gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution der Glykopeptide in einer kompetitiven Verdrängungsreaktion durch Inkubation der Agarose mit einem Säulenvolumen Elutionspuffer für 1-2 h sowie dreifaches Waschen mit Elutionspuffer. Die Glykopeptide wurden vereinigt und für weitere Analysen lyophilisiert.

Der Durchlauf wurde zusätzlich für 2 h mit 100 µl suspendierter Con A-Sepharose (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) inkubiert. Die Wasch- und Elutionsschrirte erfolgten, wie vorher beschrieben.

Waschpuffer (WP):

10 mM Tris-HCl, pH 7,2
1 mM PMSF
1 mM CaCl₂
150 mM NaCl

Elutionspuffer:

0,2 M α -Methylmannopyranosid in WP

2.3.2.2 Lektin-Batch-Verfahren

Die nach tryptischer In-Gel-Spaltung des E β Gal-gespaltenen ZPA-Proteins (siehe 2.3.3) erhaltenen Peptide wurden in WP (siehe 2.3.2.1) resuspendiert und in einem Reaktionsgefäß für 2 h mit suspendierter Con A-Sepharose (0,14 ml/0,2 mg Protein; Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) oder für 3 h mit suspendierter LCA-Agarose (0,4 ml/0,2 mg Protein; Alexis/Vektor, Grünberg, Deutschland) unter Schütteln inkubiert. Nicht gebundene Peptide wurden durch zweimaliges Waschen des Säulenmaterials mit dem doppelten Volumen an WP entfernt (10 min, 800 x g). Die Glykopeptide eluierten durch Inkubation der Matrix für 1-2 h mit einem Säulenvolumen Elutionspuffer (siehe 2.3.2.1) und dreifaches Waschen mit Elutionspuffer (10 min, 800 x g). Sie wurden anschließend vereinigt und für weitere Analysen lyophilisiert.

2.3.3 Endo- β -Galactosidase-Spaltung der ZP-Glykoproteine

2 mg solubilisierte ZP (siehe 2.1.3) wurden in 1000 μ l 0,1 M Ammoniumacetat, pH 5,7 aufgenommen und 24 h mit 20 mU Endo- β -Galactosidase (E β Gal, *Escherichia freundii*; Calbiochem, Bad Soden, Deutschland) bei 37°C inkubiert. Die Probe wurde anschließend lyophilisiert und für weitere Analysen bei -20°C gelagert.

2.3.4 Desulfatierung der ZP-Glykoproteine

Die Desulfatierung der ZP-Glykoproteine wurde nach dem Protokoll von Yagi et al. (2005) durchgeführt. 30 μ g desialylierte (siehe 2.3.5) sowie desialylierte/E β Gal-gespalte ZP (siehe 2.3.3) wurden in 1 M HCl gelöst und für 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde zur Neutralisation 1 M NaOH hinzugegeben.

2.3.5 Desialylierung der ZP-Glykoproteine

Solubilisierter ZP (siehe 2.1.3) wurde in 50 mM Ammoniumacetat, pH 5,0 gelöst (100 µg/100 µl) und für 24 h mit 20 mU Neuraminidase (Roche, Mannheim, Deutschland) bei 37°C inkubiert. Kombinierte Neuraminidase- und EßGal-Spaltung erfolgte in 0,1 M Ammoniumacetat, pH 5,7.

2.3.6 Deglykosylierung durch N-Glykosidase F

Die Deglykosylierung der ZP wurde mit dem rekombinanten Enzym N-Glykosidase F (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

2.3.6.1 Deglykosylierung von Glykopeptiden und Proteinen

Über RP-HPLC isolierte Glykopeptide (siehe 2.2.7) wurden in 30-40 µl dest. H₂O aufgenommen und nach Zugabe von 2-3 U N-Glykosidase F für 24 h bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend auf 10-20 µl im SpeedVac eingengt und für MALDI-ToF-MS-Messungen (siehe 2.4.1) der deglykosylierten Peptide vorbereitet.

RP-HPLC isolierte ZP-Proteine (siehe 2.2.7) wurden nach Carbamidomethylierung sowie vor der tryptischen Spaltung (siehe 2.2.9) mit 10 U N-Glykosidase F für 24 h bei 37°C inkubiert.

2.3.6.2 In-Gel-Deglykosylierung und Isolierung von N-Glykanen

Die In-Gel-Deglykosylierung wurde nach Küster et al. (1997) durchgeführt. 340 µg native, desialylierte (siehe 2.3.5) und desialylierte/ EßGal-gespaltene ZP (siehe 2.3.3) wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen in einem 8%igen SDS-Gel (siehe 2.2.2) elektrophoretisch aufgetrennt, und die Proteine anschließend durch mCBB-Färbung (siehe 2.2.3.2) detektiert.

Zur Charakterisierung der Glykane des N-terminalen etwa 25 kDa großen Fragmentes des ZPA-Proteins wurde 1 mg ZP reduziert und carbamidomethyliert (siehe 2.2.10). Die Auftrennung erfolgte in einem 15%igen SDS-Gel mit einer Endkonzentration von 0,08% Bisacrylamid, um das Eindringen der N-Glykosidase F in das Gel zu ermöglichen. Das Gel wurde mit Sypro Ruby (siehe 2.2.3.3) gefärbt.

Die entsprechenden Banden des Glykoproteins und als Kontrolle Regionen gleicher Größe ohne Protein wurden aus dem Gel herausgeschnitten und zweimal 30 min in 20 mM NaHCO₃, pH 7,0 gewaschen. Das Protein wurde anschließend mit 2,8 mM DTT in 20 mM NaHCO₃, pH 7,0 30 min bei 60°C reduziert. Die

Carbamidomethylierung der Probe erfolgte nach Abkühlung auf RT und Zugabe von 6 mM Jodacetamid 30 min im Dunkeln bei RT. Nach Zugabe der jeweiligen Puffer wurde für 5 min mit Protectan Spray (Tetenal, Norderstedt, Deutschland) begast, um Disulfidscrambling zu verhindern.

Die Gelstücke wurden zur Entfernung der Modifikationsreagenzien sowie des SDS für 1 h in 50% Acetonitril in 20 mM NaHCO₃, pH 7,0 gewaschen, in 1 mm² große Stückchen geschnitten und anschließend getrocknet. Zu den getrockneten Gelstückchen wurden 15-20 U N-Glykosidase F (100 U/ml) in 20 mM NaHCO₃, pH 7,0 gegeben. Der Spaltansatz wurde nach Eindringen der Flüssigkeit mit zusätzlichem Puffer bedeckt und für 12-16 h bei 37°C inkubiert. Der Inkubationspuffer, welcher bereits einige Glykane enthielt, wurde abgenommen, und die Glykane dreimal mit dest. H₂O durch 30 minütige Ultraschallbehandlung extrahiert. Die einzelnen Extrakte wurden vereinigt und für das anschließende Entsalzen in der SpeedVac getrocknet.

Das Protein wurde tryptisch im Gel gespalten (siehe 2.2.10), und die extrahierten Peptide durch MALDI-ToF-MS (siehe 2.4.1) analysiert.

2.3.6.3 On-Blot-Deglykosylierung und Isolierung von N-Glykanen

Die N-Glykane des ZP-Proteingemisches wurden modifiziert nach Zhou et al. (2004) und Küster et al. (1998) nach Immobilisierung der Proteine auf PVDF-Membran (ImmobilonTM-P^{SO}; Millipore, Eschborn, Deutschland) abgespalten.

15-45 µg desialylierte ZP (siehe 2.3.5) wurden in 5-15 µl Blotpuffer (siehe 2.2.5) aufgenommen und auf ein 60 mm² großes in Methanol und Blotpuffer äquilibriertes Membranstück getropft. Als Negativkontrolle wurde ein PVDF-Membranstück gleicher Größe ohne Protein verwendet. Die Membranstückchen wurden bei RT getrocknet, mit Methanol befeuchtet und in 1 mm² Stückchen geschnitten. Anschließend wurden sie zweimal für 15 min in 20 mM NaHCO₃, pH 7,0 gewaschen und 30 min in Denaturierungspuffer bei 60°C inkubiert. Nach Abkühlung auf RT wurden die Proteine durch Zugabe von 100 mM Jodacetamid 30 min bei RT im Dunkeln carbamidomethyliert. Die Membranstückchen wurden 1 h mit 50% Acetonitril in 20 mM NaHCO₃, pH 7,0 gewaschen und eine weitere Stunde zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen in 1% PVP/50% Methanol inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten von 15 min in 20 mM NaHCO₃, pH 7,0 erfolgte die Deglykosylierung der Proteine für 12-16 h mit 3-7 U N-Glykosidase F (60 U/ml) in 20 mM NaHCO₃, pH 7,0 bei 37°C. Der Inkubationspuffer wurde anschließend

abgenommen, und die Glykane zusätzlich 10 min im Ultraschallbad in dest. H₂O extrahiert. Nach Vereinigung der Extrakte erfolgte die Trocknung der Glykane für die anschließende Entsalzung.

Denaturierungspuffer:

6 M Guanidinhydrochlorid
100 mM DTT
in 20 mM NaHCO₃, pH 7,0

2.3.7 Entsalzen von Glykanen

Die nach In-Gel- und On-Blot-Deglykosylierung extrahierten N-Glykane (siehe 2.3.6) wurden modifiziert nach der Methode von Packer et al. (1998) und Wheeler und Harvey (2001) entsalzt.

Hierfür wurde eine Minisäule mit 5-20 µl graphitisiertem Kohlenstoff (Alltech, Unterhaching, Deutschland) in einer ZipTip_{C18}-Pipettenspitze (Millipore, Eschborn, Deutschland) hergestellt. Alle Beladungs-, Wasch- sowie Elutionsschritte erfolgten durch einminütige Zentrifugation des Säulenmaterials bei 14000 x g. Zum Entsalzen der Glykane nach In-Gel-Deglykosylierung wurde der graphitisierte Kohlenstoff mit 80% Acetonitril/0,1% TFA und anschließend mit dest. H₂O gewaschen. Für die Aufreinigung der Glykane nach On-Blot-Deglykosylierung wurde sequentiell dreimal mit 80 µl 1 M NaOH, dest. H₂O, 80% Acetonitril/0,1% TFA, 25% Acetonitril/0,05% TFA, 25% Acetonitril und viermal mit dest. H₂O gewaschen.

Die Glykane wurden in 50-100 µl dest. H₂O gelöst und anschließend über die Minisäule gegeben. Salze wurden durch das dreimalige Waschen der Säule mit 80 µl dest. H₂O entfernt. Die Elution der Glykane erfolgte mit dem dreifachen Säulenvolumen 25% Acetonitril/0,05% TFA.

Zur Trennung von neutralen und sulfatierten Glykanen wurden die neutralen Glykane dreimal mit dem dreifachen Säulenvolumen 25% Acetonitril eluiert. Die Elution von sulfatierten Glykanen wurde dreimal mit dem dreifachen Säulenvolumen 25% Acetonitril/0,05% TFA durchgeführt. Die entsalzten Glykane wurden für MALDI-ToF-MS-Analysen (siehe 2.4) konzentriert.

2.4 Massenspektrometrie

2.4.1 MALDI-ToF-MS-Analyse von Peptiden

Massenspektren von tryptischen ZP-Glykopeptiden (siehe 2.2.9 und 2.2.10) sowie Peptiden nach N-Glykosidase F-Spaltung (siehe 2.3.6) wurden auf einem Kratos MALDI-II Analytical Kompact Instrument (V 5.2; Kratos Analytical, Manchester, England) im positiven linearen Modus aufgenommen. Es wurden zwischen 20 und 80 Laserpulse je Spektrum akkumuliert. Die Kalibrierung des Gerätes erfolgte mit Peptidstandards im Bereich von 1000-10000 Da (siehe unten).

Probenvorbereitung

Die über RP-HPLC isolierten Glykopeptide (siehe 2.2.7) wurden in 10-20 µl dest. H₂O aufgenommen. Von den korrespondierenden deglykosylierten Peptiden und Peptiden nach tryptischer In-Gel-Spaltung wurden nach Aufnahme in 10-20 µl dest. H₂O 5-10 µl über ZipTip_{C18} (Millipore, Eschborn, Deutschland) nach den Vorgaben des Herstellers konzentriert. Die Peptide wurden mit 50% und 80% Acetonitril in 0,1% TFA eluiert.

Die Probenauftragung erfolgte nach der Sandwichmethode (Kusmann et al., 1997). Nach Trocknung von 0,5 µl Matrix A auf dem Target wurden 1 µl 0,1% TFA, 1 µl Probe und 0,5 µl Matrix B hinzugegeben. Die Kristallisation wurde unter trockener Luftzufuhr durchgeführt.

Matrix A:

10 mg α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure/ml (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
in Aceton/dest. H₂O (99:1)

Matrix B:

10 mg α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure/ml
in Acetonitril/0,1% TFA (70/30)

Peptidstandards:

Bradykinin, Ile-Ser-Bradykinin, bovine oxidierte Insulin-B-Kette, humanes in *E. coli* exprimiertes rekombinantes Arg-Insulin und Ubiquitin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

2.4.2 MALDI-ToF-MS-Analyse von BIAM-markierten Peptiden

Die über RP-HPLC isolierten Peptide von BIAM-markierten ZP-Proteinen (siehe 2.2.6 und 2.2.7), die eine positive Reaktion im ELBA (siehe 2.2.8) zeigten, wurden an einem Kratos MALDI-II Analytical Kompact Instrument (V 5.2; Kratos Analytical, Manchester, England) im positiven linearen Modus vermessen. Es wurden zwischen 20 und 80 Laserpulse je Spektrum akkumuliert. Die Kalibrierung des Gerätes erfolgte mit Peptidstandards im Bereich von 1000-10000 Da (siehe 2.4.1).

Probenvorbereitung

1/16-1/8 der Fraktionen wurden in 1 µl dest. H₂O aufgenommen und auf dem Target mit 1 µl Matrix gemischt. Die Kristallisation erfolgte bei RT.

Matrix:

10 mg Sinapinsäure/ml (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
in Acetonitril/0,1% TFA (70/30)

2.4.3 MALDI-ToF-MS- und MSⁿ-Analysen von neutralen N-Glykanen

MALDI-ToF-MS-Messungen der neutralen Glykane (siehe 2.3.7) wurden auf einem Kratos MALDI-II Analytical Kompact Instrument (V 5.2; Kratos Analytical, Manchester, England) im positiven Modus mit hoher Laserenergie durchgeführt. Es wurden zwischen 20 und 80 Laserpulse je Spektrum akkumuliert.

MSⁿ-Massenspektren wurden auf einem AXIMA-QIT-MALDI-TRAP-ToF-Instrument (Kratos Analytical, Manchester, England) aufgenommen. Die Fragmentierung erfolgte durch Heliumgas bei einem Druck von 4×10^{-3} Pa und mit einer Beschleunigungsspannung von 10 kV. Die Geräte wurden mit Glykanstandards im Bereich von 800-1800 Da kalibriert (siehe unten).

Probenvorbereitung

Die entsalzten Glykane wurden in 5-40 µl dest. H₂O aufgenommen. 1 µl Probe wurde mit 1 µl Matrix auf dem Target gemischt. Die Kristallisation erfolgte bei RT.

Matrix:

7 mg 2,5-Dihydroxybenzoesäure/ml (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
in Acetonitril/dest. H₂O (70:30)

Glykanstandards:

α 3-, α 6-Mannopentaose, Mannopentaose-Di-(N-Acetyl)-D-Glucosamin, Mannopentaose-Di-(N-Acetyl-D-Glucosamin)-Asparagin, Mannooctaose-Di-(N-Acetyl)-D-Glucosamin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

2.4.4 MALDI-ToF-MS- und MS²-Analysen von sulfatierten N-Glykanen

Viele sulfatierte Glykane sind aufgrund der labilen Natur des Sulfatrestes bei bestimmten Verknüpfungen mit den normalen Kohlenhydratmatrices schwer durch MALDI-ToF-MS zu analysieren. Es konnten jedoch sulfatierte Oligosaccharide ohne metastabilen Zerfall unter anderem mit D-Arabinosazon als Matrix (Wheeler und Harvey, 2001; von der Ohe et al., 2002) im negativen Modus als $[M-H]^-$ oder $[M-2H+Na]^-$ -Ionen massenspektrometrisch dargestellt werden.

MS- und MS²-Massenspektren von sulfatierten N-Glykanen der ZP-Proteine (siehe 2.3.7) wurden auf einem Ultraflex-Massenspektrometer (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland) im negativen Modus mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV aufgenommen. Die MS²-Messungen erfolgten im Lift Modus. Das Gerät wurde mit Peptidstandards im Bereich von 1000-3000 Da kalibriert (siehe unten).

2.4.4.1 Synthese von D-Arabinosazon

D-Arabinosazon wurde nach dem Protokoll von Chen et al. (1997) synthetisiert. 2,0 mmol D-(-)-Arabinose (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 4,0 mmol Phenylhydrazinhydrochlorid, 10 mmol Natriumacetat und 6 ml dest. H₂O wurden in einem 25 ml Glasgefäß unter gelegentlichem Schwenken in einem kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Beginn der Bildung eines gelben oder ölig braunen Niederschlages wurde das Glasgefäß für weitere 20 min im siedenden Wasser inkubiert und anschließend auf RT abgekühlt. Das durch Zentrifugation (20 min, 3000 x g) und Dekantieren erhaltene Präzipitat wurde dreimal mit 10 ml dest. H₂O gewaschen (20 min, 3000 x g), mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe filtriert und vollständig im Exsikator getrocknet. Zur Entfernung des hohen Anteils von Natriumionen wurde eine 60%ige heiße Ethanollösung langsam unter Rühren bis zur vollständigen Lösung des Präzipitates hinzugegeben. Durch langsame Abkühlung auf RT kam es zur Kristallisierung. Die Mikrokristalle wurden durch Filtration erhalten und nach zweimaliger Rekristallisierung im Exsikator getrocknet. Das bräunliche D-Arabinosazon wurde bei 4°C gelagert.

Probenvorbereitung

Salzfreie sulfatierte Glykane wurden in 1 µl dest. H₂O aufgenommen und nach Mischen mit 0,5 µl Matrix auf dem Target bei RT kokristallisiert. Weitere 0,5 µl Matrix wurde hinzugegeben und bei RT getrocknet.

Matrix:

3-6 mg D-Arabinosazon/ml
in Ethanol/dest. H₂O (3:1)

Peptidstandards:

Angiotensin II, Angiotensin I, Substanz P, Bombesin, ACTH Clip 1-17,
ACTH Clip 18-39, Somatostatin 28 (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland)

2.5 Auswertung der Massenspektren

Die Auswertung der ZP-Peptide basierte auf den Aminosäuresequenzen der SwissProt Zugangsnummern P42099 (ZPA), Q07287 (ZPB) und P42098 (ZPC).

Die Auswertung der Glykopeptid- sowie der Glykanmassen der neutralen N-Glykane erfolgte mit dem ExPASyGlycoMode-Programm (Cooper et al., 2001), wobei die Berechnungen im Wesentlichen auf den für die ZP-Glykoproteine beschriebenen Hauptstrukturen der komplexen fucosylierten bi-, tri- und tetraantennären N-Glykane (Noguchi und Nakano, 1992; Noguchi et al., 1992) basierte.

MALDI-ToF-MSⁿ-Spektren der neutralen N-Glykane wurden mit Hilfe der von Harvey (1999, 2000) identifizierten Fragmente ausgewertet, und die Berechnung der sulfatierten N-Glykane beruhte auf den von Mori et al. (1998) und der Arbeitsgruppe von Nakano identifizierten Strukturen (Noguchi und Nakano, 1992; Noguchi et al., 1992).

3 Ergebnisse

3.1 Glykosylierung der ZP-Proteine

3.1.1 Elektrophoretische Analyse der ZP-Glykoproteine

Da das Schlachtmaterial von präpuberalen Sauen in großen Mengen zur Verfügung stand, konnten die Zonae pellucidae in einer Massenaufarbeitung gewonnen werden. Es wurden aus 300 Ovarien circa 80000 ZPs (1,2 mg ZP) isoliert.

Die solubilisierten ZP-Proteine wurden zur Charakterisierung der Glykosylierung durch 1D- und 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dies führte zu der Auflösung von heterogenen Glykoformen der nativen Proteine. In der 1D-Gelelektrophorese entsprach die Bande zwischen 95 und 120 kDa den ZPA-Isoglykoproteinen. Die Glykoformen von ZPB/ZPC überspannten einen Bereich zwischen 50 und 70 kDa und waren aufgrund ihres hohen Glykosylierungsgrades sowie ähnlichen Molekulargewichten elektrophoretisch nicht voneinander zu trennen (siehe Abb. 3.1a).

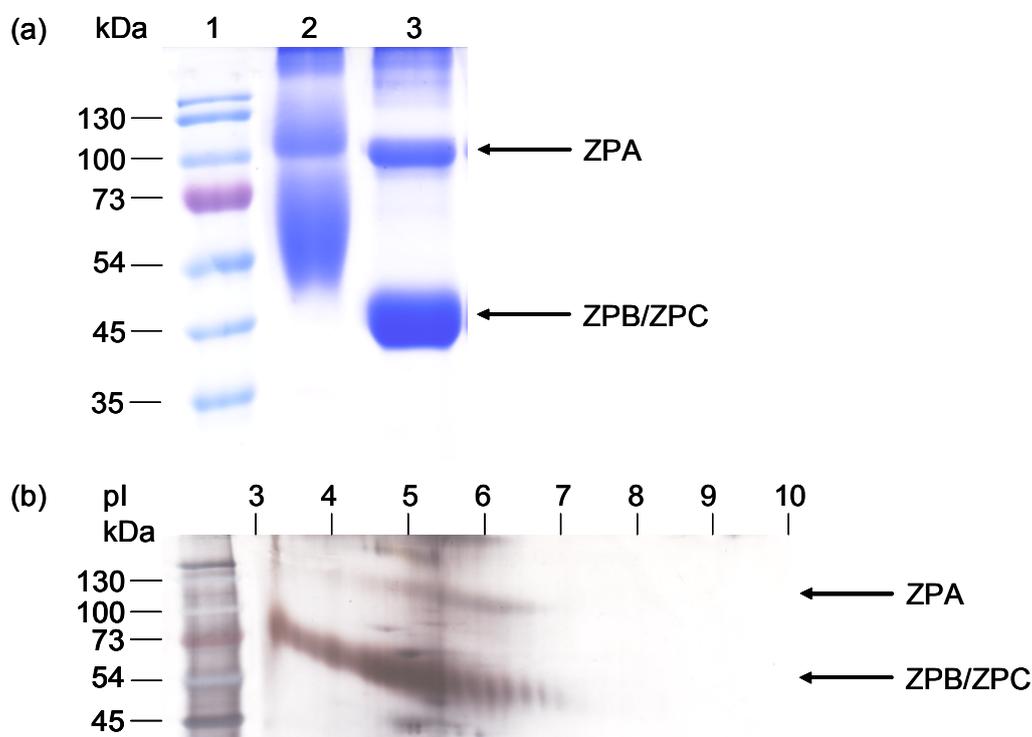


Abb. 3.1: Elektrophoretische Analyse der porcinen ZP-Proteine.

(a) 20 µg native (2) und EβGal-gespaltene ZP (3) wurden durch 10%ige 1D-SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch CBB-Färbung detektiert.

(b) 30 µg native ZP wurden durch 12%ige 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine durch Silberfärbung detektiert.

In der Spur 1 wurde jeweils der Proteinlängenstandard aufgetragen.

In der 2D-Gelelektrophorese stellten sich die ZP-Proteine bei etwas höheren Molekulargewichten dar. Die Isoformen des ZPA-Proteins erstreckten sich über den pI-Bereich von 4,0 bis 6,8 und diejenigen des ZPB- und ZPC-Proteins von pI 3,0 bis 7,0 (siehe Abb. 3.1b).

Endo- β -Galactosidase spaltet die β -galactosidische Verbindung von sich wiederholenden N-Acetyllactosamineinheiten (Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc) der Antennen von N- und O-Glykanen, welche sulfatiert und sialyliert sein können. Die Behandlung der nativen ZP-Glykoproteine mit E β Gal resultierte in einer Abnahme der Molekulargewichte der Proteine (siehe Abb. 3.1a), wobei ein geringerer Massenshift bei dem ZPA-Protein (95-100 kDa) als bei dem ZPB/ZPC-Gemisch (45-50 kDa) zu beobachten war.

Die ZP Proteine tragen demnach heterogene Glykane und bilden ein typisches Glykoproteinmuster mit zahlreichen Spots in der 2D-Gelelektrophorese.

3.1.2 Lektinologische Analyse der ZP-Proteine

Die Kohlenhydratstrukturen der ZP wurden an immobilisierten E β Gal-gespaltene ZP-Proteinen mit Lektinen unter Einsatz eines Biotin-Avidin-Systems und anschließender Chemilumineszenz analysiert.

Das circa 95-100 kDa große E β Gal-gespaltene ZPA-Protein (ZP1) wurde unter reduzierenden Bedingungen in ein etwa 65 kDa großes Polypeptid (ZP2) und zwei Polypeptide im Bereich von 20 bis 30 kDa (ZP4) gespalten (siehe Abb. 3.2a, c). Eine Anfärbung des ZPB/ZPC-Gemisches und der Polypeptide des ZPA-Proteins durch das Lektin Con A zeigte, dass die ZP-Glykoproteine α -gebundene Mannose enthalten (siehe Abb. 3.2a; Kornfeld und Ferris, 1975). Alle ZP-Proteine und Polypeptide des ZPA-Proteins wurden ebenfalls durch das Lektin LCA markiert (siehe Abb. 3.2b, c). Dies spricht für das Vorkommen von fucosylierten komplexen N-Glykanen in der ZP (Kornfeld et al., 1981).

Das Lektin ACA bindet spezifisch an die Core-Struktur 1 (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc) von O-Glykanen (Rinderle et al., 1990). In den ZP-Proteinen konnte O-Glykosylierung nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.2b), allerdings wurde die Doppelbande zwischen 20 und 30 kDa unter reduzierenden Bedingungen nicht angefärbt (siehe Abb. 3.2d).

Alle ZP-Proteine sind demnach N- und O-glykosyliert, wobei jedoch die 20 bis 30 kDa großen Polypeptide des ZPA-Proteins lediglich N-Glykane tragen.

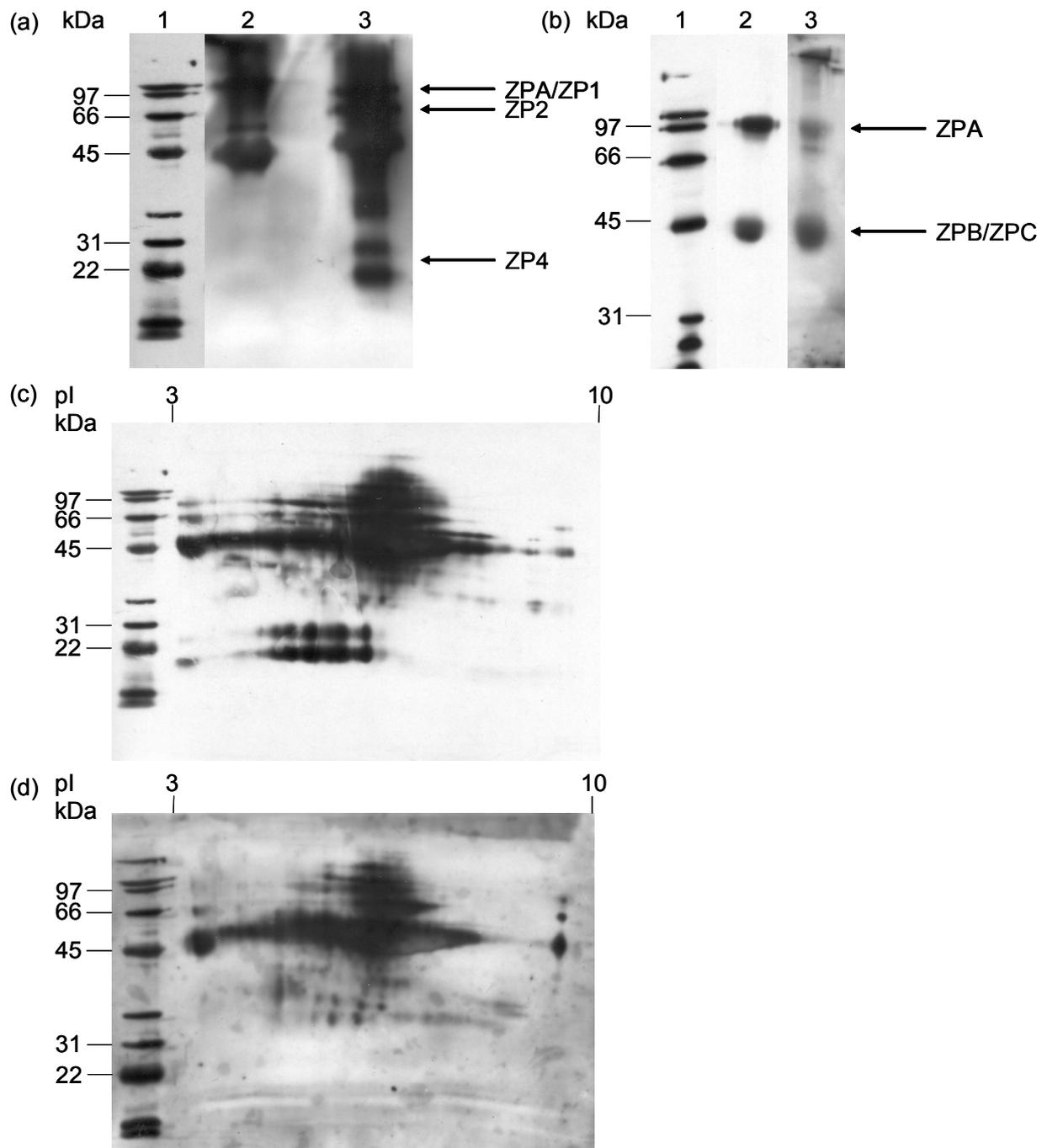


Abb. 3.2: Lektinbindungsmuster von E3Gal-gespaltener ZP.

Immobilisierte ZP-Proteine wurden nach elektrophoretischer Auftrennung mit Lektinen inkubiert; die Reaktion wurde durch ein Biotin-Avidin-System und Chemilumineszenz visualisiert.

ZPA wurde unter reduzierenden Bedingungen in ein 65 kDa großes Polypeptid und zwei Polypeptide von 20-30 kDa gespalten.

(a) 40 µg ZP mit Con A nach 15%iger 1D-SDS-PAGE unter nicht reduzierenden (2) und reduzierenden Bedingungen (3).

(b) 5,8 µg ZP mit LCA (2) und (ACA) (3) nach 12%iger 1D-SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen.

(c) und (d) 29 µg ZP mit LCA (c) und ACA (d) nach 15%iger 2D-SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen.

In der Spur 1 ist jeweils der Proteinlängenstandard dargestellt.

3.1.3 Profil der N-Glykane des ZPA-Glykoproteins

In-Gel-Deglykosylierung des elektrophoretisch aufgetrennten ZPA-Glykoproteins ermöglichte eine massenspektrometrische Analyse der N-Glykanstrukturen des nativen Proteins. Gleichzeitig wurden die ZP-Glykoproteine vor der Elektrophorese desialyliert oder desialyliert und mit EßGal gespalten. Die extrahierten Glykane wurden im positiven Modus durch MALDI-ToF-MS analysiert und die MS-Spektren verglichen (siehe Tab. 3.1).

Sialylierte Oligosaccharide zeigen ionisiert mit 2,5-DHB als Matrix nur schwache Signale. Ebenfalls kann es unter diesen Bedingungen zur Fragmentierung der Sialinsäure und labilen Sulfat-Gruppen kommen (Harvey, 1999; Fukuyama et al., 2002). Daher wurden zunächst die Glykane des desialylierten ZPA-Proteins analysiert (siehe Abb. 3.3b). Ein deutliches Signal bei m/z_{exp} 1253,8 entspricht dem $[M+Na]^+$ -Addukt eines Pentamannosylglykans. Alle weiteren Signale stimmen mit den $[M+Na]^+$ -Addukten von neutralen fucosylierten komplexen N-Glykanen überein. Die beiden stärksten Signale bei m/z_{exp} 1644,2 und m/z_{exp} 1805,7 entsprechen biantennären N-Glykanen mit einer bzw. zwei terminalen Hexosen am nicht reduzierenden Ende der Antennen. Im Gegensatz dazu ist das Signal einer biantennären Struktur mit terminalen N-Acetylhexosaminresten bei m/z_{exp} 1481,2 sehr gering. Die Signale bei m/z_{exp} 1684,9 und m/z_{exp} 1847,0 stimmen mit den Strukturen von triantennären N-Glykanen ohne bzw. mit einer terminalen Hexose und diejenigen bei m/z_{exp} 2009,0; m/z_{exp} 2212,4 und m/z_{exp} 2374,1 mit den Strukturen $\text{Hex}_2\text{HexNAc}_3\text{Fuc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{Hex}_2\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ bzw. $\text{Hex}_3\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ überein. Bei den Letzteren kann es sich um lactosaminylierte bi- und triantennäre oder nicht lactosaminylierte tri- und tetraantennäre N-gebundene Oligosaccharide handeln.

Nach EßGal-Spaltung nahmen die relativen Intensitäten dieser Signale sowie diejenigen der biantennären N-Glykane ohne und mit einer terminalen Hexose zu. Zusätzlich erhielt man ein Signal bei m/z_{exp} 2049,1, welches der tetraantennären Struktur $\text{Hex}_1\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ entspricht (siehe Abb. 3.3c, Tab. 3.1). Das neu entstandene Signal rekrutierte sich aus höhermolekularen tetraantennären Oligosacchariden mit N-Acetyllactosamineinheiten.

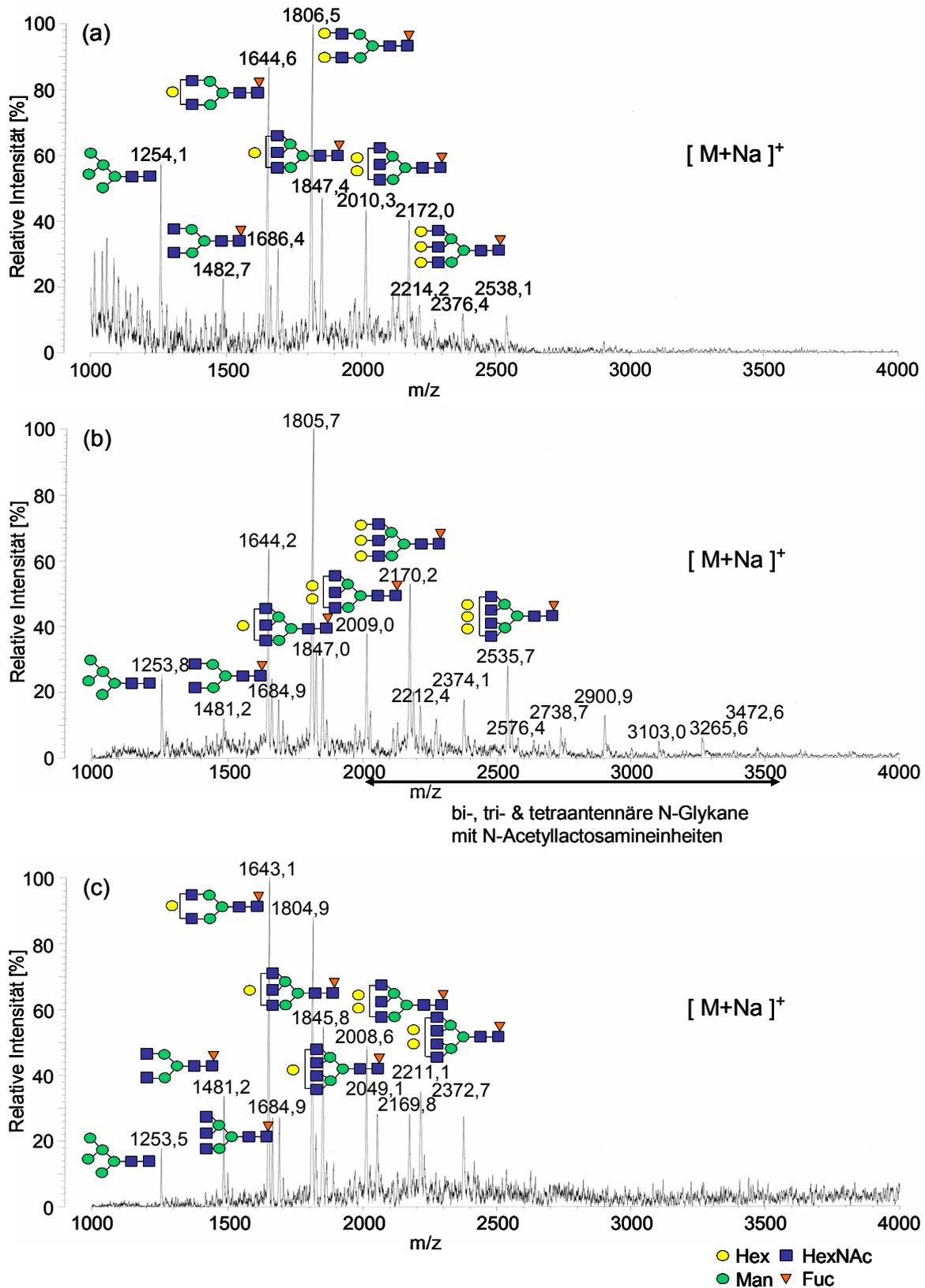


Abb. 3.3: MALDI-ToF-MS-Spektren der N-Glykane des ZPA-Glykoproteins.
 ZPA wurde im Gel mit N-Glykosidase F deglykosyliert. Von den Glykanen des nativen (a), desialylierten (b) sowie desialylierten/E β Gal-gespaltenen ZPA-Proteins (c) wurden MS-Spektren mit einem MALDI-II Kratos Analytical (V 5.2) im positiven Modus aufgenommen.

Da die relative Intensität des Signals bei m/z_{exp} 2170,2 mit der Struktur $\text{Hex}_3\text{HexNAc}_3\text{Fuc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ nach partieller Deglykosylierung abnahm, konnte es triantennären N-Glykanen mit drei terminalen Hexosen und biantennären N-gebundenen Oligosacchariden mit einer N-Acetyllactosamineinheit zugeordnet werden. Darüber hinaus wurde kein Signal mehr bei m/z_{exp} 2535,7 mit der Struktur $\text{Hex}_4\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ detektiert, welches somit einem lactosaminylierten bi- oder tri- und keinem tetraantennären N-Glykan entspricht. Die geringeren Signale bei m/z_{exp} 2576,4; m/z_{exp} 2738,7; m/z_{exp} 2900,9; m/z_{exp} 3103,0; m/z_{exp} 3265,6 und m/z_{exp} 3472,6 mit den Strukturen $\text{Hex}_3\text{HexNAc}_5\text{Fuc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{Hex}_4\text{HexNAc}_5\text{Fuc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{Hex}_5\text{HexNAc}_5\text{Fuc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{Hex}_5\text{HexNAc}_6\text{Fuc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{Hex}_6\text{HexNAc}_6\text{Fuc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ bzw. $\text{Hex}_6\text{HexNAc}_7\text{Fuc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ verschwanden nach Spaltung mit Endo- β -Galactosidase.

Die Daten sprechen dafür, dass das ZPA-Protein bi-, tri- und tetraantennäre N-Glykane mit und ohne repetierende N-Acetyllactosamineinheiten enthält.

Im Bereich von $1200 m/z_{\text{exp}}$ bis $2550 m/z_{\text{exp}}$ sind die Glykanstrukturen des nativen und des desialylierten ZPA-Proteins vergleichbar. Die Abnahme der relativen Intensität des Pentamannosylglykans in der desialylierten Probe zeigt, dass die Glykanstrukturen nebeneinander in ihren sialylierten und nichtsialylierten Isoformen vorliegen. Die höhermolekularen lactosaminylierten N-Glykane scheinen dagegen vorwiegend sialyliert vorzukommen (siehe Abb. 3.3a, b, Tab. 3.1).

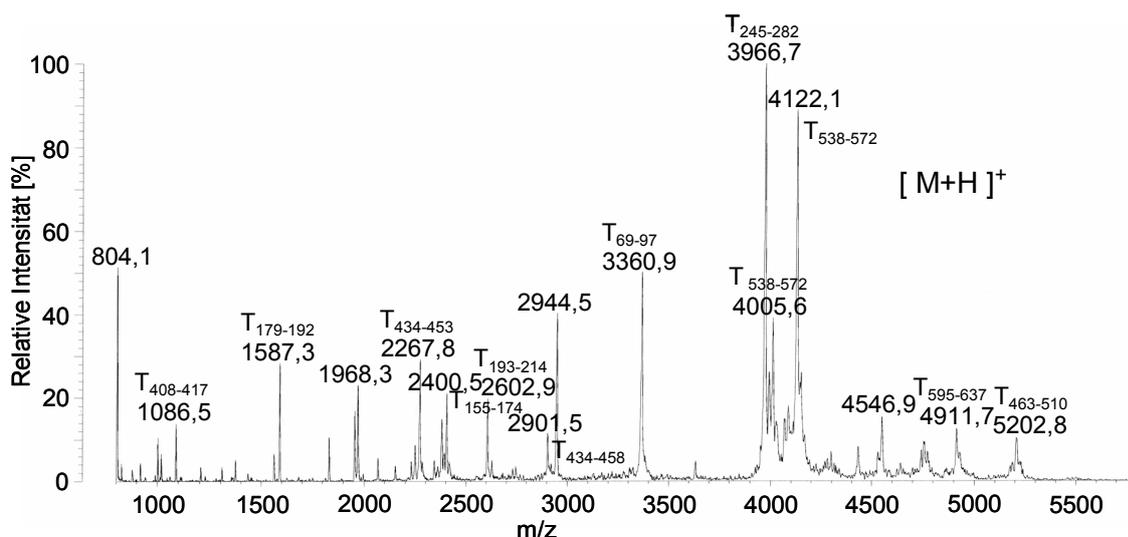


Abb. 3.4: MALDI-ToF-MS-Spektrum der tryptischen Peptide des ZPA-Glykoproteins. Deglykosyliertes ZPA wurde im Gel tryptisch gespalten. Von den Peptiden wurde ein MS-Spektrum mit einem MALDI-II Kratos Analytical (V 5.2) im positiven Modus aufgenommen.

Zur Kontrolle wurde ein Peptidmapping der deglykosylierten ZPA-Bande nach In-Gel-Spaltung mit Trypsin durchgeführt (siehe Abb. 3.4). Etwa 75% der Signale konnten dem ZPA-Protein zugeordnet werden. Der Spaltansatz könnte jedoch zusätzlich Autoproteolyseprodukte des Trypsins enthalten.

Tab. 3.1: N-Glykanprofile des ZPA-Glykoproteins nach In-Gel-Deglykosylierung

Glykanstruktur	m/z_{exp}	m/z_{kalk}	RI_{nativ}	RI_{des}	$RI_{\text{E}\beta\text{Gal}}$
	$[M+Na]^+$	$[M+Na]^+$	[%]	[%]	[%]
Man ₅ GlcNAc ₂	1253,8	1257,4	68	27	20
HexNAc ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAc ₂	1481,7	1485,5	23	14	39
Hex ₁ HexNAc ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAc ₂	1644,0	1647,6	87	65	113
HexNAc ₃ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAc ₂	1685,4	1688,6	32	15	32
Hex ₂ HexNAc ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAc ₂	1805,7	1809,6	100	100	100
Hex ₁ HexNAc ₃ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAc ₂	1846,7	1850,7	48	28	63
Hex ₂ HexNAc ₃ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAc ₂	2009,3	2012,7	45	35	57
Hex ₃ HexNAc ₃ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAc ₂	2170,7	2174,8	41	46	32
Hex ₁ HexNAc ₄ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAc ₂	2049,1	2053,7			32
Hex ₂ HexNAc ₄ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAc ₂	2212,6	2215,8	14	13	42
Hex ₃ HexNAc ₄ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAc ₂	2374,4	2377,9	12	17	33
Hex ₄ HexNAc ₄ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAc ₂	2536,9	2539,9	12	26	
Hex ₃ HexNAc ₅ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAc ₂	2576,4	2580,9		6	
Hex ₄ HexNAc ₅ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAc ₂	2738,7	2743,0		10	
Hex ₅ HexNAc ₅ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAc ₂	2900,9	2905,0		15	
Hex ₅ HexNAc ₆ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAc ₂	3103,0	3108,1		8	
Hex ₆ HexNAc ₆ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAc ₂	3265,6	3270,2		9	
Hex ₆ HexNAc ₇ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAc ₂	3472,6	3473,2		4	

Die m/z_{exp} entsprechen den Mittelwerten der m/z_{exp} von nativen, desialylierten und desialylierten/E β Gal-gespaltenen Glykanen des ZPA-Proteins (siehe Abb. 3.3). Zur Berechnung der relativen Intensitäten (RI) der MALDI-ToF-MS-Signale wurde das Signal des biantennären N-Glykans mit zwei terminalen Hexosen 100% gesetzt.

3.1.3.1 MALDI-ToF-MSⁿ-Analysen der N-Glykane des ZPA-Glykoproteins

Glykane können zur strukturellen Analyse durch Tandem-Massenspektrometrie (MALDI-ToF-MSⁿ) fragmentiert, und die einzelnen Fragmentationen den Strukturen zugeordnet werden (Domon und Costello, 1988; siehe Abb. 3.5).

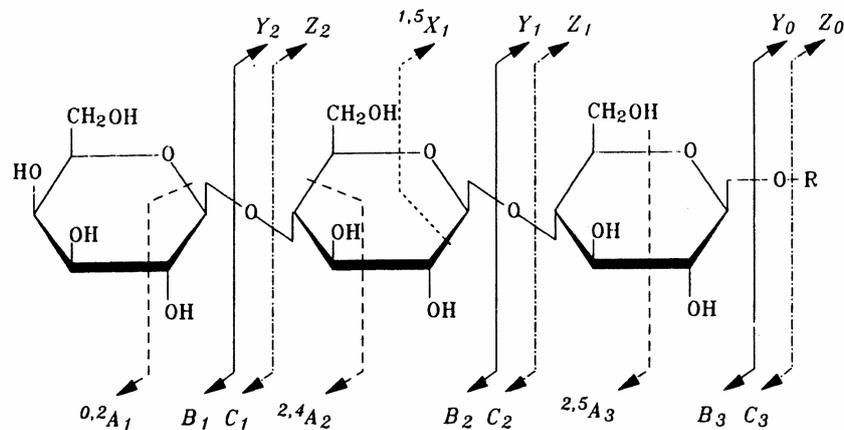


Abb. 3.5: Typen der Carbohydratfragmentierung nach Domon und Costello (1988).

Zum Nachweis der Glykannatur wurden von den einzelnen Signalen MS²-Spektren aufgenommen. Zusätzlich wurden mit einzelnen Fragmentationen MS³-Experimente durchgeführt, und die MSⁿ-Spektren mit Hilfe der von Harvey (1999, 2000) identifizierten Fragmente ausgewertet.

In den Abb. 3.6 und 3.7 sind beispielhaft die MS²-Spektren der Signale bei m/z_{kalk} 1257,4 und m/z_{kalk} 2174,8 und jeweils ein MS³-Spektrum eines Fragmentations dargestellt. Die MSⁿ-Analysen beweisen die Glykannatur der einzelnen Signale, wobei hauptsächlich Fragmentationen nach glykosidischer Spaltung (siehe Abb. 3.5) identifiziert wurden. Das Fragmentierungsmuster des Signals bei m/z_{kalk} 1257,4 bestätigte die Struktur Hex₅HexNac₂ eines High-Mannose-Typ N-Glykans mit sukzessiver Abspaltung von Hexoseresten (siehe Abb. 3.6; Harvey, 1999, 2000).

Tandem-MALDI-ToF-MSⁿ-Analysen aller weiteren Signale resultierten in den Mustern von neutralen fucosylierten komplexen N-Glykanen mit sukzessiver Fragmentierung von Hexose- und N-Acetylhexosaminresten, wobei die Spaltung vorwiegend an den HexNac-Resten erfolgte (siehe Abb. 3.7). Bei den höhermolekularen lactosaminylierten Glykanen wurden zusätzlich Fragmentationen von HexHexNac-Einheiten nachgewiesen.

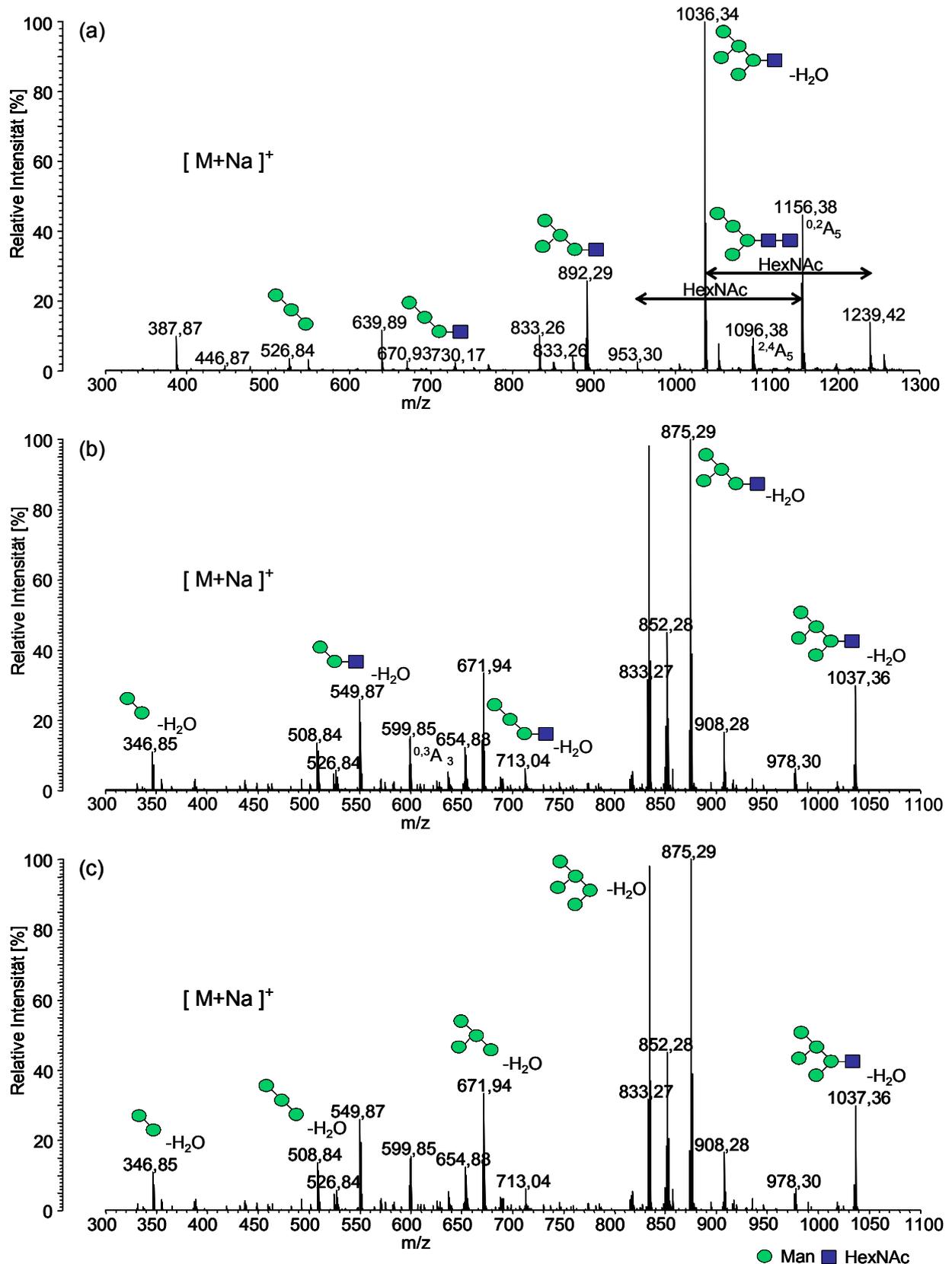


Abb. 3.6: MALDI-ToF-MSⁿ-Analyse des Man₅GlcNAc₂ des ZPA-Proteins.

Das ZPA-Protein wurde mit N-Glykosidase F im Gel deglykosyliert. Für die MSⁿ-Messungen wurde ein AXIMA-QIT-MALDI-TRAP-ToF-Instrument im positiven Modus verwendet. Die glykosidischen Bindungen der Mannosereste sind beispielhaft dargestellt. (a) MS²-Spektrum des Signals bei m/z_{kalk} 1257,4. (b) und (c) MS³-Spektrum des Fragmentations bei m/z_{kalk} 1036,3.

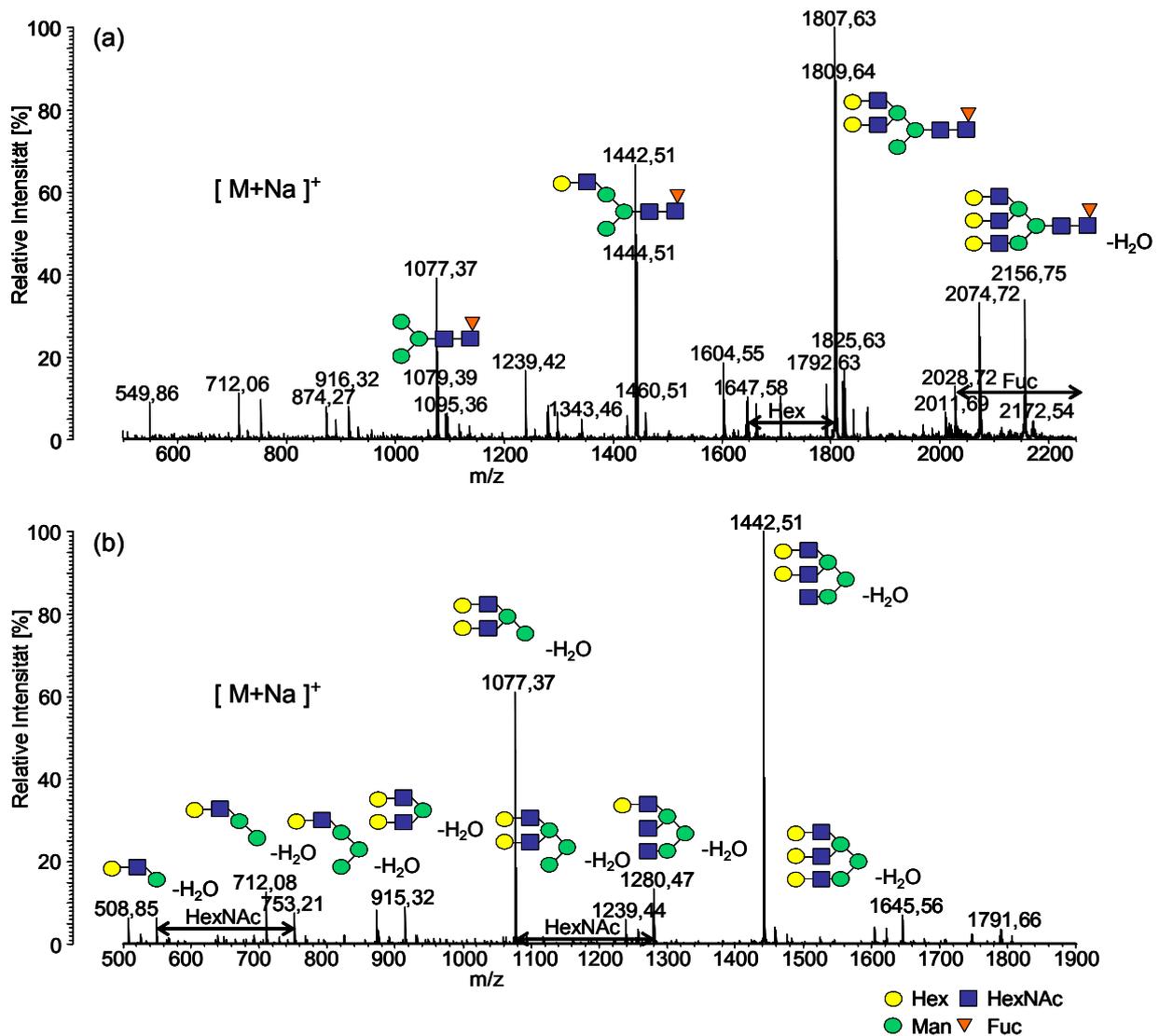


Abb. 3.7: MALDI-ToF-MSⁿ-Analyse des Hex₃HexNAc₃Fuc₁Man₃GlcNAc₂ des ZPA-Proteins.

Das ZPA-Protein wurde mit N-Glykosidase F im Gel deglykosyliert. Für die MSⁿ-Messungen wurde ein AXIMA-QIT-MALDI-TRAP-ToF-Instrument im positiven Modus verwendet. Die glykosidischen Bindungen der Hexose- und N-Acetylhexosaminreste sind beispielhaft dargestellt.

(a) MALDI-ToF-MS²-Spektrum des Signals bei m/z_{kalk} 2174,8. Das Signal bei m/z_{exp} 1807,63 entspricht einem Hex₆HexNAc₄.

(b) MS³-Spektrum des Fragmentations bei m/z_{kalk} 1809,6.

3.1.4 Identifizierung der N-Glykosylierungsstellen des ZPA-Proteins

Das porcine ZPA-Glykoprotein enthält sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen an den Positionen N₈₄, N₉₃, N₂₆₈, N₃₁₆, N₃₂₃ und N₅₃₀ mit der Konsensussequenz N-X-S/T, wobei X jede Aminosäure, mit Ausnahme von Prolin oder Asparaginsäure, sein kann.

Mit einem molaren Verhältnis des ZPA-Proteins zu dem ZPB und ZPC von 1:3:3 (Ikeda et al., 2002) ist der Anteil an der ZP sehr gering. Die N-Glykosylierungsstellen des ZPA-Glykoproteins sind daher zuvor nicht analysiert worden. Aus diesem Grund sollte die Identifizierung der N-Glykosylierungsstellen des Proteins durch einen massenspektrometrischen Ansatz erfolgen.

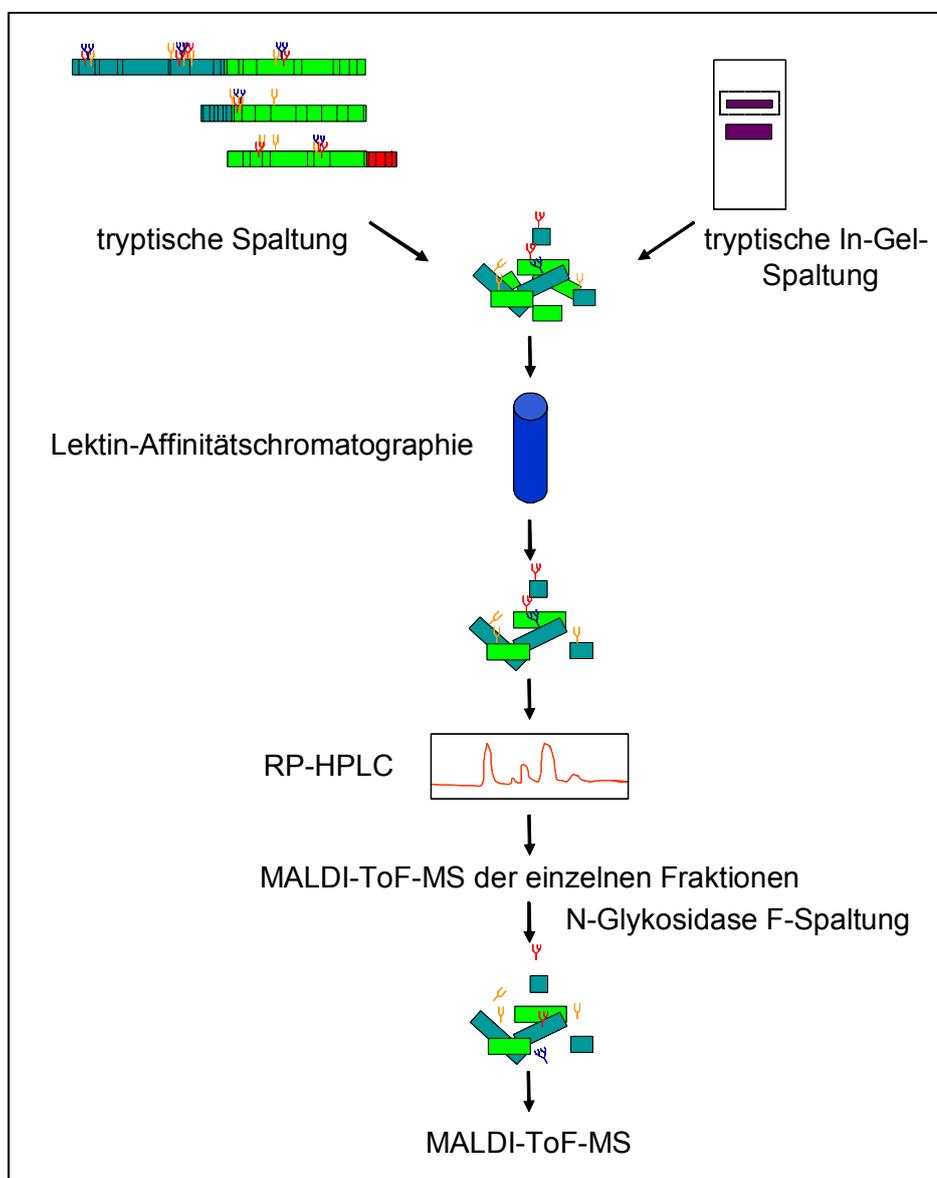


Abb. 3.8: Strategie zur Identifizierung der N-Glykosylierungsstellen des ZPA-Glykoproteins.

Dazu wurde folgende Strategie verfolgt (siehe Abb. 3.8): Einerseits wurde das ZP-Glykoproteingemisch nach Reduktion und Carbamidomethylierung tryptisch in Lösung gespalten. Andererseits wurde das ZPA elektrophoretisch von den anderen Proteinen der ZP getrennt und einer mit Reduktion/Alkylierung kombinierten In-Gel-Spaltung unterworfen. Um die MALDI-ToF-MS-Analysen zu erleichtern wurde die Heterogenität und Azidität der Glykane durch partielle Deglykosylierung mit Endo- β -Galactosidase reduziert. Die tryptischen Glykopeptide der ZP-Proteine bzw. des ZPA-Proteins wurden über Lektin-Affinitätschromatographie isoliert und mittels RP-HPLC getrennt. Die Isolierung von Peptiden mit α 1,6-fucosylierten komplexen N-Glykanen erfolgte über LCA-Affinitätschromatographie (Kornfeld et al., 1981), während sowohl Peptide mit biantennären komplexen N-Glykanen als auch mit Oligosacchariden vom High-Mannose-Typ mit immobilisierten Con A isoliert wurden (Kornfeld und Ferris, 1975). Anschließend wurden die Glykopeptide in den einzelnen HPLC-Fractionen durch MALDI-ToF-MS analysiert. Die Spektren wurden mit dem ExpasyGlycoMode-Programm (Cooper et al., 2001) ausgewertet, wobei die Berechnungen der Glykopeptide im Wesentlichen auf den für das ZPB/ZPC-Oligomer beschriebenen komplexen fucosylierten bi-, tri- und tetraantennären Strukturen beruhten (Noguchi und Nakano, 1992; Noguchi et al., 1992). Hierbei wurden Peptide mit bis zu einer *missed cleavage* berechnet. Zum Nachweis der Glykopeptide wurden die Fractionen mit einem typischen Glykopeptidmuster mit N-Glykosidase F gespalten und das deglykosylierte Peptid durch MALDI-ToF-MS detektiert. Nach Abspaltung der N-gebundenen Glykane wird das Asparagin zu Asparaginsäure umgewandelt, wodurch es zu einer Zunahme von 0,99 m/z_{kalk} kommt.

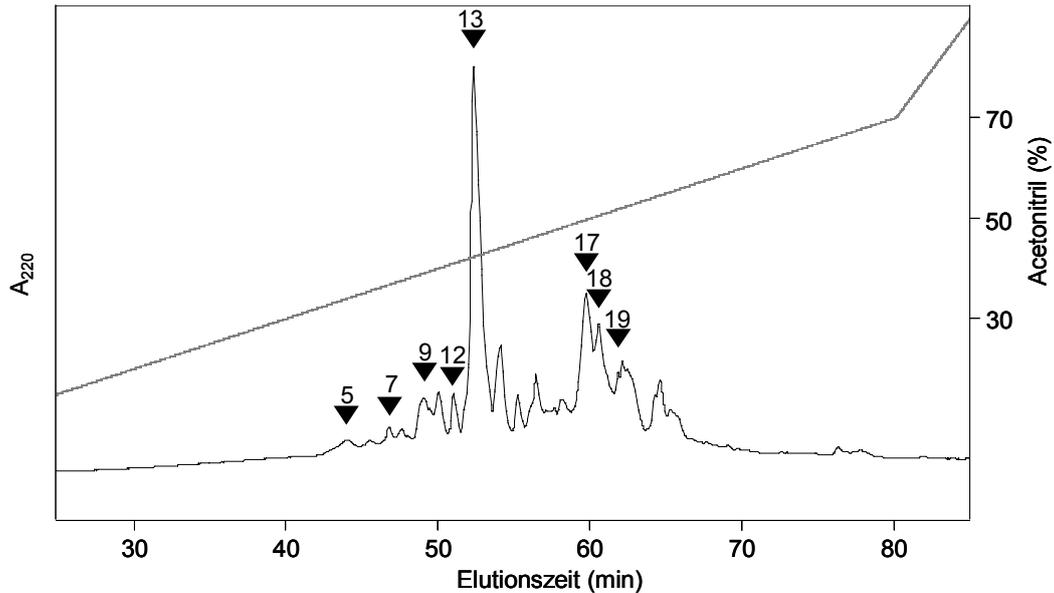


Abb. 3.9: RP-HPLC der LCA-gebundenen tryptischen Glykopeptide des ZP-Proteingemisches.

LCA-gebundene tryptische Peptide des reduzierten und carbamidomethylierten ZP-Glykoproteingemisches wurden mit einem linearen Gradienten (grau gestrichelte Linie) von Acetonitril in 0,1% TFA von einer Grom-Sil 120 ODS-4HE Säule (150 x 2 mm, 3 μ m) eluiert. Die Pfeile kennzeichnen die Fraktionen mit Glykopeptiden.

MALDI-ToF-MS-Analysen der durch RP-HPLC getrennten tryptischen Glykopeptide des ZP-Proteingemisches nach LCA-Affinitätschromatographie (siehe Abb. 3.9) ergaben, dass ZPA an den Asparaginresten der Positionen N₂₆₈, N₃₁₆, N₃₂₃ und N₅₃₀ glykosyliert ist (siehe Tab. 3.2, 3.3). In der Fraktion 18 wurden Peptide mit bi-, tri und tetraantennären N-Glykanen für die Position N₂₆₈ sowie nach Deglykosylierung das Peptid H₂₄₅-K₂₈₂ bei m/z_{exp} 4084,2 nachgewiesen (siehe Abb. 3.10, Tab. 3.2).

Die N-Glykosidase F-Spaltung der Glykopeptide mit einer Glykosylierung an N₃₁₆ in der Fraktion 13 resultierte in dem korrespondierenden Peptid L₃₁₃-K₃₂₁ bei m/z_{exp} 1112,6. Das Glykopeptidmuster in den Fraktionen 5 und 7 entsprach den Peptiden T₃₂₂-K₃₂₇ (N₃₂₃) und I₅₂₈-R₅₃₁ (N₅₃₀) mit fucosylierten komplexen biantennären N-Glykanen. Nach Deglykosylierung erhielt man keine Signale, da die kleinen Peptide bei m/z_{kalk} 678,7 und m/z_{kalk} 516,6 nicht erfasst werden konnten. Zusätzlich befanden sich die Glykopeptide (I₅₂₈-K₅₃₇) für die Position N₅₃₀ mit einer *missed cleavage* in der Fraktion 9. MALDI-ToF-MS-Analysen nach N-Glykosidase F-Spaltung lieferten ein Signal des korrespondierenden Peptids bei m/z_{exp} 1182,6 (siehe Tab. 3.2).

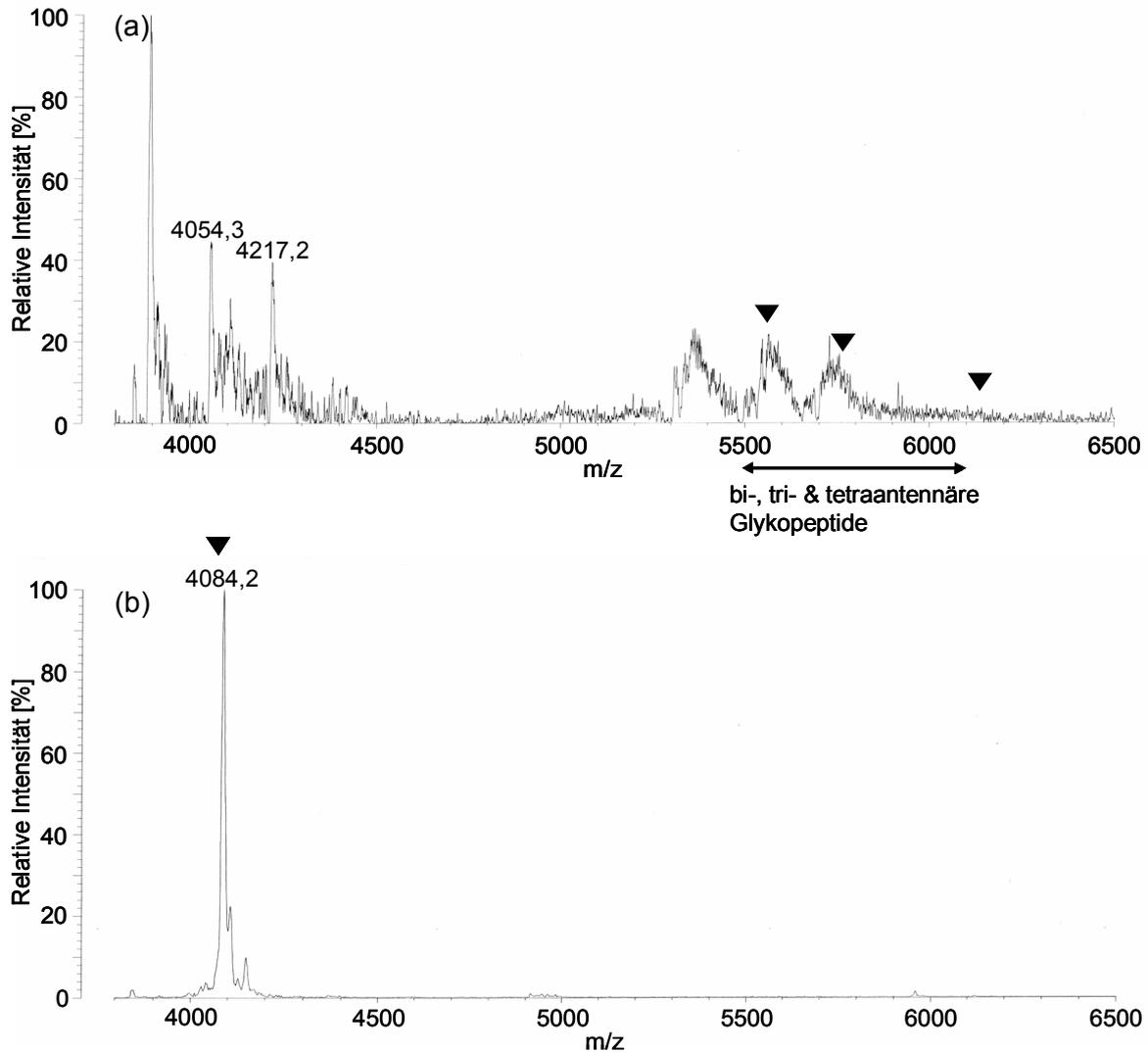


Abb. 3.10: Exemplarische Darstellung einer MALDI-ToF-MS-Analyse des Peptids

T₂₄₅₋₂₈₂

Die Glykopeptide mit der N-Glykosylierungsstelle N₂₆₈ wurden nach tryptischer Spaltung des ZP-Glykoproteingemisches durch LCA-Affinitätschromatographie und RP-HPLC (Fraktion 18) isoliert. Für die MALDI-ToF-MS-Analysen wurde ein MALDI-II Kratos Analytical (V 5.2) im positiven Modus verwendet.

(a) MALDI-ToF-MS-Spektrum der Glykopeptide. Die Pfeile kennzeichnen die Massen des Peptids T₂₄₅₋₂₈₂ ($[M + K]^+$) mit bi- (m/z_{exp} 5567,5) und triantennären (m/z_{exp} 5767,5) komplexen N-Glykanen. Die tetraantennäre Struktur bei m/z_{exp} 6140,0 trägt eine terminale Hexose.

(b) MALDI-ToF-MS-Spektrum des carbamidomethylierten Peptids T₂₄₅₋₂₈₂ nach N-Glykosidase F-Spaltung (m/z_{exp} 4084,2).

Tab. 3.2: MALDI-ToF-MS-Analyse der N-Glykosylierungsstellen des ZPA-Glykoproteins

Peptid	AS-Sequenz	N-Glyko- sylierungsstelle	m/z _{exp} [M+H] ⁺	m/z _{kalk} [M+H] ⁺
T ₆₉₋₉₇	IQYTSVVDPLGLEMMNCTY VLDPENLTLK	N _{84/93}	3306,6	3302,8
			3356,4*	3359,9
			3376,7**	3373,9
T ₂₄₅₋₂₈₂	HVSHGQSLILASQLICVADP VTCNATHVTLAIPFPGK	N ₂₆₈	4084,2*	4084,7
T ₃₁₃₋₃₂₁	LHFNQTLLK	N ₃₁₆	1112,6	1115,3
T ₃₂₂₋₃₂₇	TNVSEK	N ₃₂₃	n.d.	678,7
T ₅₂₈₋₅₃₁	ILNR	N ₅₃₀	n.d.	516,6
T ₅₂₈₋₅₃₇	ILNRTDPNIK	N ₅₃₀	1182,6	1185,4
	<i>eine missed cleavage</i>			

* entspricht m/z_{exp} eines Peptids mit carbamidomethylierten Cystein und ** mit acrylamidylierten Cystein. Die m/z_{exp} des Peptids T₆₉₋₉₇ wurde nach In-Gel-Spaltung der 20-30 kDa großen Polypeptide und anschließender Deglykosylierung bestimmt. Die m/z_{exp} der weiteren Peptide resultierten aus den LCA-gebundenen Glykopeptiden des ZP-Glykoproteingemisches.

Darüber hinaus wurden für ZPC zwei und für ZPB eine N-Glykosylierungsstelle bestätigt. Die Deglykosylierung der Peptide H₁₁₇-R₁₂₉ und A₂₅₂-R₂₇₄ des ZPC-Proteins mit bi- und triantennären fucosylierten N-Glykanen (Fraktionen 12 und 17) resultierte in den korrespondierenden Peptiden bei m/z_{exp} 1445,5 und m/z_{exp} 2601,2. Für das ZPB-Protein war nach N-Glykosidase F-Spaltung das Peptid N₂₀₃-R₂₁₉ bei m/z_{exp} 1951,0 in der Fraktion 19 nachweisbar.

Aus dem Durchlauf der LCA-Affinitätschromatographie wurden die nicht gebundenen Glykopeptide mittels Con A-Sepharose isoliert. Auf diese Weise konnte die N-Glykosylierungsstelle an der Position N₃₃₃ des ZPB-Proteins bestätigt werden.

In einem zweiten Ansatz wurde das EßGal-gespaltene ZPA-Glykoprotein durch In-Gel-Spaltung mit Trypsin fragmentiert, um die Identifizierung der N-Glykosylierungsstellen des Proteins zu erleichtern. MALDI-ToF-MS-Analysen der Glykopeptide nach LCA- und Con A-Affinitätschromatographie mit anschließender Auftrennung durch RP-HPLC ergaben, dass ZPA zusätzlich zu den Positionen N₂₆₈, N₃₁₆, N₃₂₃ und N₅₃₀ an einem Asparagin der Positionen N₈₄ und N₉₃ glykosyliert ist. In der Tab. 3.3 sind die nachgewiesenen Glykanstrukturen der einzelnen N-Glykosylierungsstellen des ZPA-Proteins und in der Abb. 3.11 beispielhaft die RP-HPLC der LCA-gebundenen Glykopeptide dargestellt.

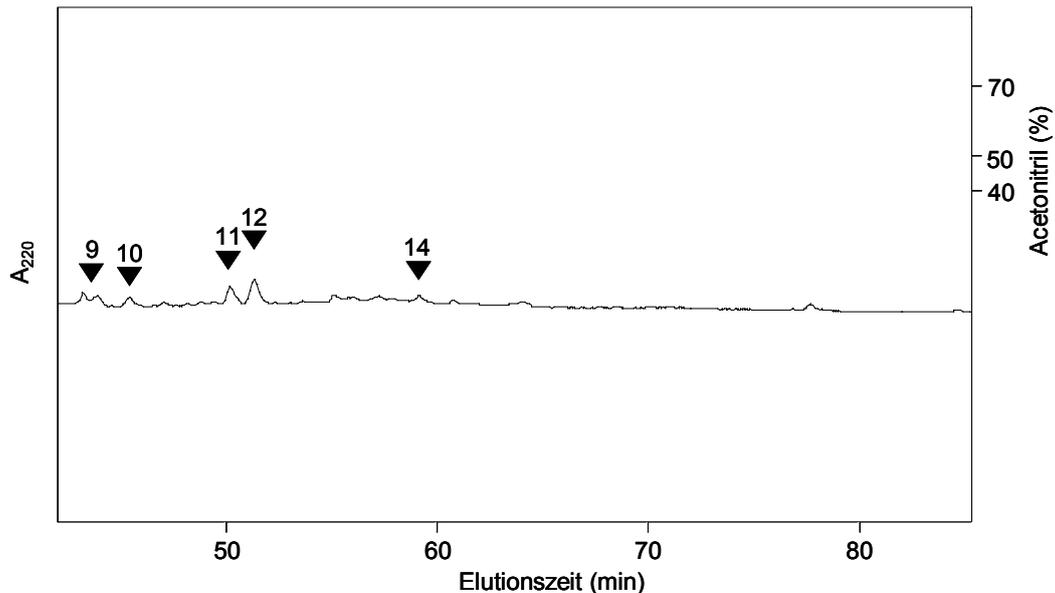


Abb. 3.11: RP-HPLC der LCA-gebundenen tryptischen Glykopeptide des ZPA-Proteins.

ZPA wurde nach Reduktion und Carbamidomethylierung im Gel mit Trypsin gespalten und die LCA-gebundenen Peptide mit einem linearen Gradienten (grau gestrichelte Linie) von Acetonitril in 0,1% TFA von einer Grom-Sil 120 ODS-4HE Säule (150 x 2 mm, 3 μ m) eluiert. Die Pfeile kennzeichnen die Fraktionen mit Glykopeptiden.

Aufgrund der geringen Menge der glykosylierten Peptide wurden kontinuierlich Fraktionen gesammelt. In der Fraktion 14 wurden für die Position N_{84/93} sowohl die Glykopeptide mit bi- und triantennären fucosylierten N-Glykanen an einem Asparaginrest als auch nach Deglykosylierung das Peptid I₆₉-K₉₇ mit einem dominanten Signal bei m/z_{exp} 3359,5 nachgewiesen (siehe Tab. 3.3). Die Glykosylierung der Positionen N₃₁₆ (Fraktion 12; siehe Abb. 3.12), N₃₂₃ (Fraktion 9; siehe Abb. 3.13a) und N₅₃₀ (Fraktion 10; siehe Abb. 3.13b) konnte bestätigt werden. Zusätzlich wurden in der Fraktion 11 die Glykopeptide des Peptids I₅₂₈-K₅₃₇ (N₅₃₀; m/z_{exp} 1184,7) detektiert. In der Abb. 3.14 ist exemplarisch ein MS-Spektrum der über Con A-Affinitätschromatographie isolierten Peptide mit N-gebundenen Oligosacchariden am N₅₃₀ dargestellt.

Die Glykopeptide mit der Position N₂₆₈ (H₂₄₅-K₂₈₂) ergaben nach tryptischer In-Gel-Spaltung Signale mit sehr geringer Intensität, da sie sich aufgrund ihrer Größe und ihrer zweifachen Modifikation durch Carbamidomethylierung oder Acrylamidadduktbildung nicht vollständig aus dem SDS-Gel eluieren ließen.

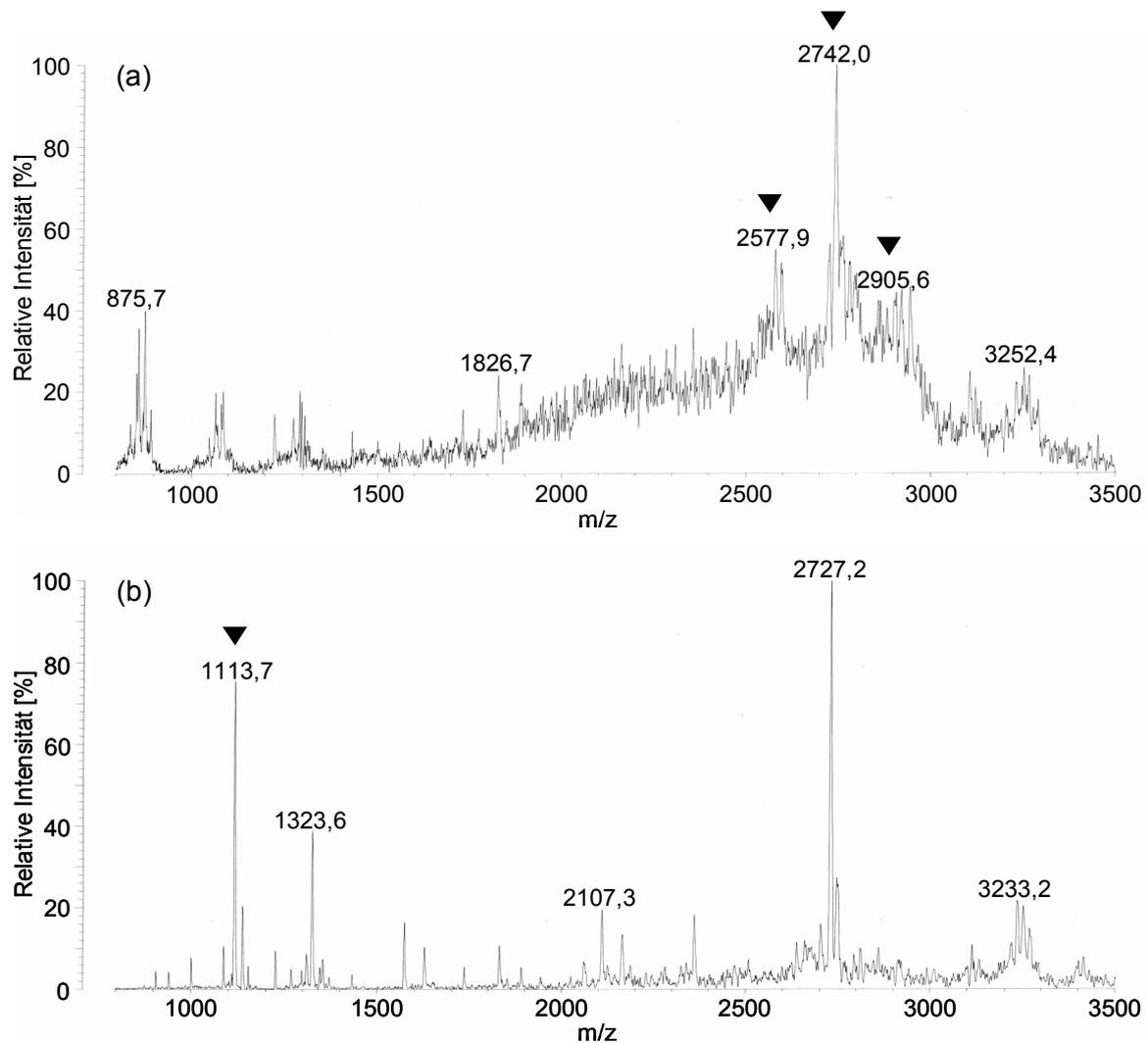


Abb. 3.12: Exemplarische Darstellung einer MALDI-ToF-MS-Analyse des Peptids

$T_{313-321}$.

Die Glykopeptide mit der N-Glykosylierungsstelle N_{316} wurden nach tryptischer In-Gel-Spaltung durch LCA-Affinitätschromatographie und RP-HPLC isoliert. Für die MALDI-ToF-MS-Analysen wurde ein MALDI-II Kratos Analytical (V 5.2) im positiven Modus verwendet.

(a) MALDI-ToF-MS-Spektrum der Glykopeptide. Die Pfeile kennzeichnen die Massen $([M + Na]^+)$ des Peptids $T_{313-321}$ mit biantennären komplexen N-Glykanen (mit keiner (m/z_{exp} 2577,9), einer (m/z_{exp} 2742,0) und zwei terminalen Hexosen (m/z_{exp} 2905,6)).

(b) MALDI-ToF-MS-Spektrum des korrespondierenden Peptids $T_{313-321}$ nach N-Glykosidase F-Spaltung (m/z_{exp} 1113,7).

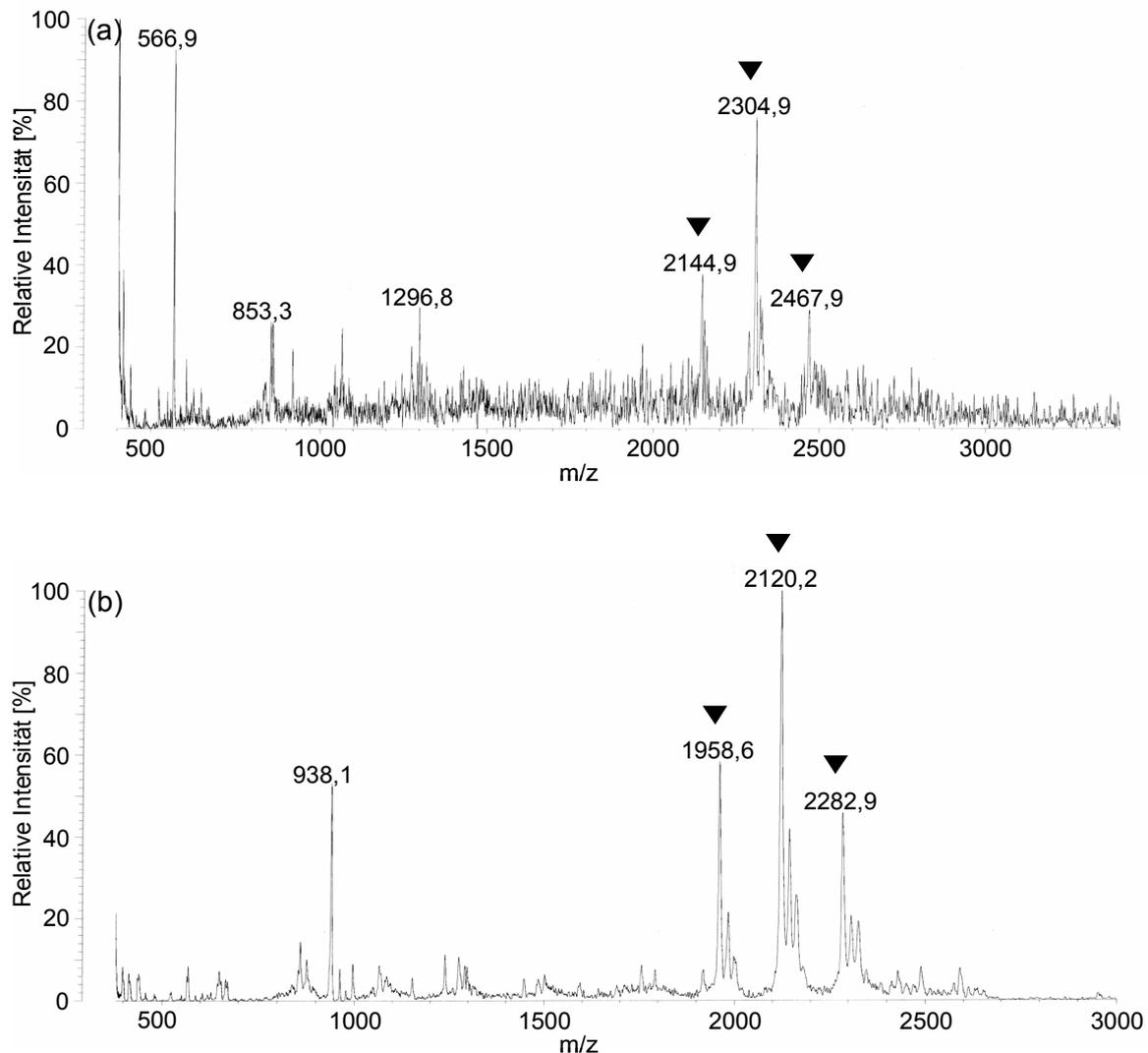


Abb. 3.13: Exemplarische Darstellung einer MALDI-ToF-MS-Analyse der Peptide $T_{322-327}$ und $T_{528-531}$.

Die Glykopeptide mit den N-Glykosylierungsstellen N_{323} und N_{530} wurden nach In-Gel-Spaltung mit Trypsin durch LCA-Affinitätschromatographie und RP-HPLC isoliert. Für die MALDI-ToF-MS-Analysen wurde ein MALDI-II Kratos Analytical (V 5.2) im positiven Modus verwendet.

(a) MALDI-ToF-MS-Spektrum der Glykopeptide des $T_{322-327}$. Die Pfeile kennzeichnen die Massen ($[M + Na]^+$) des Peptids $T_{322-327}$ mit biantennären komplexen N-Glykanen mit keiner (m/z_{exp} 2144,9), einer (m/z_{exp} 2304,9) und zwei terminalen Hexosen (m/z_{exp} 2467,9).

(b) MALDI-ToF-MS-Spektrum der Glykopeptide des $T_{528-531}$. Die Pfeile kennzeichnen die Massen ($[M + H]^+$) des Peptids $T_{528-531}$ mit biantennären komplexen N-Glykanen mit keiner (m/z_{exp} 1958,6), einer (m/z_{exp} 2120,2) und zwei terminalen Hexosen (m/z_{exp} 2282,9).

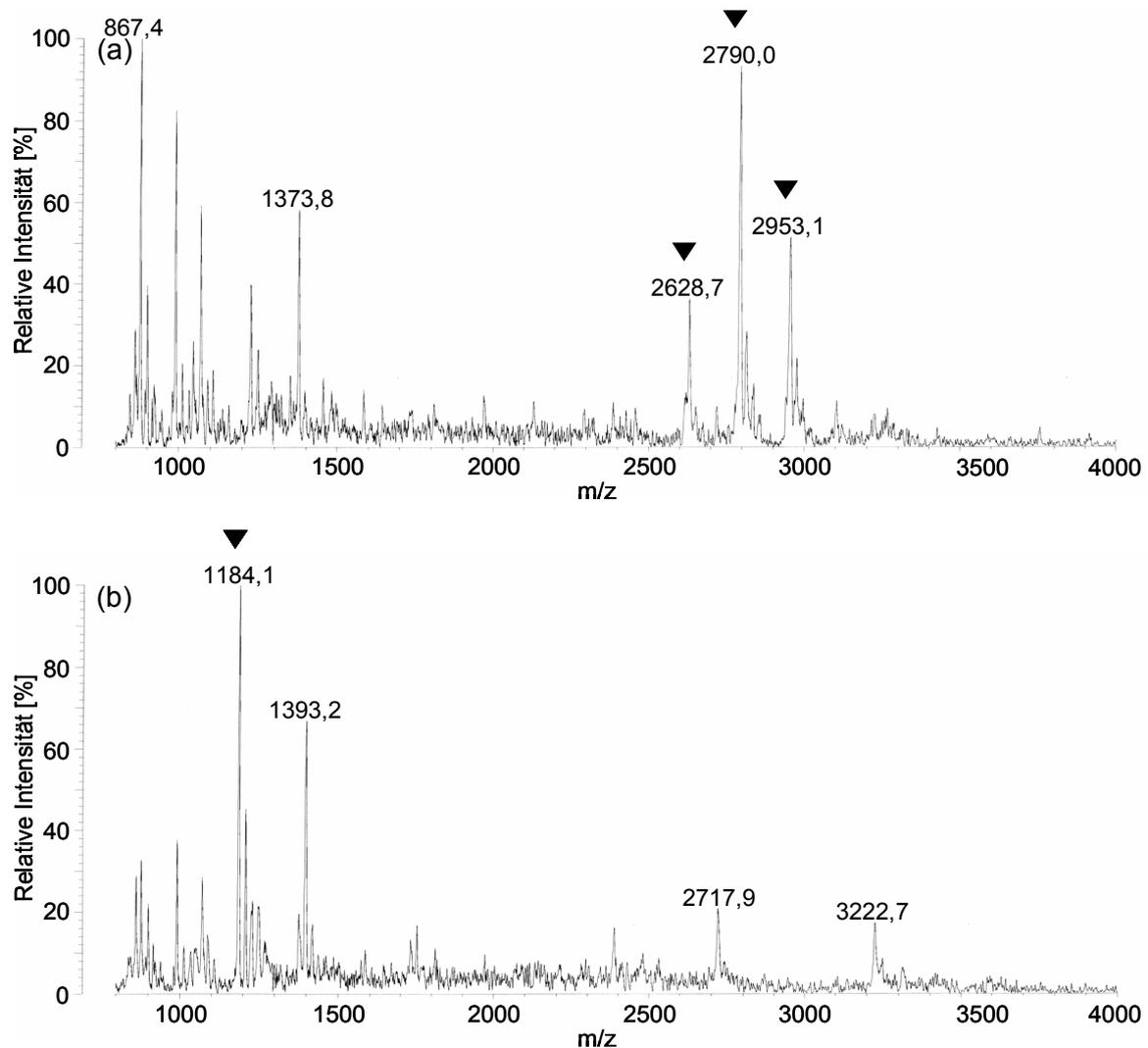


Abb. 3.14: Exemplarische Darstellung einer MALDI-ToF-MS-Analyse des Peptids

T₅₂₈₋₅₃₇

Die Glykopeptide mit einer *missed cleavage* sowie der N-Glykosylierungsstelle N₅₃₀ wurden nach tryptischer In-Gel-Spaltung durch Con A-Affinitätschromatographie und RP-HPLC isoliert. Für die MALDI-ToF-MS-Analysen wurde ein MALDI-II Kratos Analytical (V 5.2) im positiven Modus verwendet.

(a) MALDI-ToF-MS-Spektrum der Glykopeptide. Die Pfeile kennzeichnen die Massen ($[M + H]^+$) des Peptids T₅₂₈₋₅₃₇ mit biantennären komplexen N-Glykanen mit keiner (m/z_{exp} 2628,7), einer (m/z_{exp} 2790,0) und zwei terminalen Hexosen (m/z_{exp} 2953,1).

(b) MALDI-ToF-MS-Spektrum des deglykosylierten Peptids T₅₂₈₋₅₃₇ (m/z_{exp} 1184,1).

Zur Bestätigung einer N-Glykosylierungsstelle an den Positionen N₈₄ und N₉₃ wurden die 20-30 kDa großen N-terminalen Polypeptide des reduzierten ZPA-Proteins im Gel mit Trypsin gespalten, und das Peptidgemisch durch MALDI-ToF-MS untersucht. Das Peptidmapping zeigt ein komplexes heterogenes Glykopeptidmuster im Bereich von 4700 m/z_{exp} bis 5400 m/z_{exp} (siehe Abb. 3.15).

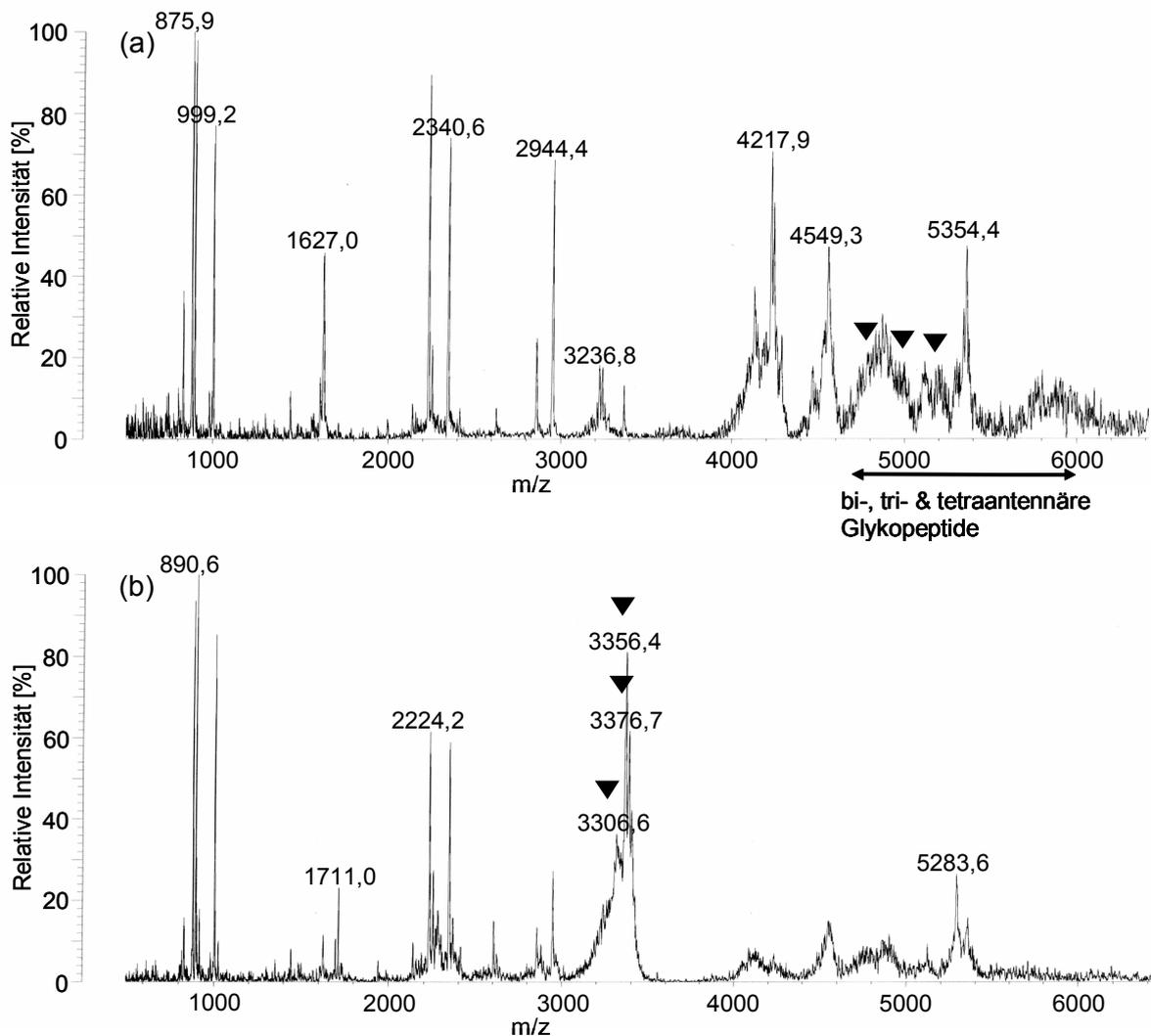


Abb. 3.15: Exemplarische Darstellung einer MALDI-ToF-MS-Analyse des Peptids

T₆₉₋₉₇.

Die N-terminalen 20-30 kDa großen Polypeptide des ZPA-Proteins wurden mit Trypsin im Gel fragmentiert. Für die MALDI-ToF-MS-Analysen wurde ein MALDI-II Kratos Analytical (V 5.2) im positiven Modus verwendet.

(a) MALDI-ToF-MS-Spektrum der Glykopeptide. Die Pfeile kennzeichnen die Massen ($[M + K]^+$) des nicht modifizierten Peptids T₆₉₋₉₇ mit bi- (m/z_{exp} 4782,1), tri- (m/z_{exp} 4989,1) und tetraantennären (m/z_{exp} 5192,0) komplexen N-Glykanen.

(b) MALDI-ToF-MS-Spektrum des Peptids T₆₉₋₉₇ nach N-Glykosidase F-Spaltung. Die Pfeile kennzeichnen die Massen des nicht modifizierten (m/z_{exp} 3306,6), carbamidomethylierten (m/z_{exp} 3356,4) und acrylamidylierten (m/z_{exp} 3376,7) Peptids T₆₉₋₉₇.

Die Auswertung des Spektrums ergibt einen glykosylierten Asparaginrest mit bi-, tri- und tetraantennären komplexen N-Glykanen. Die Deglykosylierung resultierte in einem dominanten Signal bei m/z_{exp} 3356,4 sowie zwei geringeren Signalen bei 3306,6 und 3376,7 (siehe Abb. 3.15b). Sie entsprechen einem carbamidomethylierten, einem nicht modifizierten bzw. einem Peptid mit Acrylamidaddukten.

Durch MALDI-ToF-MS-Analysen der Glykopeptide des ZP-Glykoproteingemisches und des ZPA-Glykoproteins konnte gezeigt werden, dass das ZPA-Protein an den Positionen N_{84/93}, N₂₆₈, N₃₁₆, N₃₂₃ und N₅₃₀ komplexe fucosylierte N-Glykane trägt. Durch den methodischen Ansatz konnte jedoch nicht geklärt werden, ob die Position N₈₄ oder N₉₃ glykosyliert vorliegt.

3.1.4.1 Glykosylierungsmuster der komplexen N-Glykane des ZPA-Glykoproteins

Das Glykosylierungsmuster der komplexen N-Glykane des ZPA-Proteins wurde mit Ausnahme der Position N₂₆₈ anhand der isolierten Glykopeptide nach In-Gel-Spaltung mit Trypsin analysiert (siehe Tab. 3.3). Alle Glykosylierungsstellen des Proteins tragen biantennäre fucosylierte komplexe N-Glykane, welche vorzugsweise an den Asparaginresten der Positionen N₃₁₆, N₃₂₃ und N₅₃₀ lokalisiert sind. Für alle drei Positionen erhielt man das stärkste Signal für biantennäre Oligosaccharidketten mit einer terminalen Hexose (Hex₁HexNAC₂Fuc₁Man₃GlcNAC₂) und lediglich geringe Signale für triantennäre N-Glykane.

Für die Positionen N_{84/93} und N₂₆₈ wurden Peptide mit bi-, tri und tetraantennären N-Glykanen identifiziert. Eine vollständige Bestimmung des Glykosylierungsmusters der Peptide I₆₉-K₉₇ und H₂₄₅-K₂₈₂ war sowohl aufgrund von Modifizierung der Glykopeptide durch Carbamidomethylierung oder Acrylamidadduktbildung als auch aufgrund ihrer Größe erschwert. Rechnerisch ergeben sich mehrere verschiedene Glykanstrukturen für eine m/z_{exp} im höhermolekularen Bereich, wodurch zum Teil nicht zwischen bi-, tri- und tetraantennären Strukturen unterschieden werden kann. Darüber hinaus ließen sich die Peptide wegen der genannten Eigenschaften nicht vollständig aus dem SDS-Gel eluieren. In-Gel-Deglykosylierung der EßGal-gespaltene 20-30 kDa großen Polypeptide des ZPA-Proteins mit den N-Glykosylierungsstellen N₈₄ und N₉₃ bestätigte die Heterogenität der Glykopeptide (siehe Abb. 3.16b). Die dominanten Signale bei m/z_{exp} 1485,4 und m/z_{exp} 1647,9 entsprechen dem $[M+Na]^+$ -Addukt eines fucosylierten biantennären N-Glykans ohne

bzw. mit einer terminalen Hexose. Das Signal einer biantennären Struktur mit zwei Hexosen am nicht reduzierenden Ende der Antennen bei m/z_{exp} 1810,3 ist dagegen gering. Es wurden ebenfalls Strukturen für tri- (m/z_{exp} 1689,0; m/z_{exp} 1851,3; m/z_{exp} 2014,7) und tetraantennäre N-Glykane (m/z_{exp} 2055,9; m/z_{exp} 2218,0; m/z_{exp} 2381,6) mit drei, zwei bzw. einem terminalen N-Acetylhexosaminrest nachgewiesen.

Tab. 3.3: Zusammenfassung der durch MALDI-ToF-MS analysierten komplexen Strukturen der identifizierten N-Glykosylierungsstellen des ZPA-Proteins

Position	Glykanstruktur	M+A	Glykopeptid		Peptid	
			m/z_{exp}	m/z_{kalk}	m/z_{exp}	m/z_{kalk}
N _{84/93}	<i>Con A-positive Fraktion</i>				T ₆₉₋₉₇	
	HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	4802,7	4804,3		
	HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	4827,1	4826,2		
	HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	4844,2	4842,3		
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	4963,0	4966,4	3357,0	3359,9
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	4992,4	4988,4	1CAM	1CAM
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	5005,2	5004,5		
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	5150,4	5150,5		
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	5164,0	5166,6		
	<i>LCA-positive Fraktion</i>				T ₆₉₋₉₇	
	HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	4805,2	4804,3		
	HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	4822,9	4826,2		
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	4962,8	4966,4		
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	4987,5	4988,4		
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	5006,0*	5004,5		
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	5129,1	5128,5	3359,5	3359,9
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	5148,8	5150,5	1CAM	1CAM
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	5168,5*	5166,6		
	HexNAC ₃ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	5006,0*	5007,4		
	HexNAC ₃ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	5033,2	5029,4		
HexNAC ₃ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	5044,6	5045,5			
Hex ₁ HexNAC ₃ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	5168,5*	5169,6			
Hex ₁ HexNAC ₃ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	5192,4	5191,6			

Tab. 3.3: Fortsetzung I

Position	Glykanstruktur	M+A	Glykopeptid		Peptid	
			m/z _{exp}	m/z _{kalk}	m/z _{exp}	m/z _{kalk}
N _{84/93}	<i>20-30 kDa Polypeptide</i>				T ₆₉₋₉₇	
	HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	4825,1	4826,2		
	HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	4842,9	4842,3		
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	4963,7	4966,4	3356,4	3359,9
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	4989,1	4988,4	1CAM	1CAM
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	5149,7	5150,5		
	HexNAC ₄ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	5211,8	5210,6		
Hex ₁ HexNAC ₄ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	5377,4	5372,8			
N ₂₆₈	<i>LCA-positive Fraktion**</i>				T ₂₄₅₋₂₈₂	
	HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	5567,5	5567,2		
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	5710,7	5713,2		
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	5730,8*	5729,3		
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	5849,1	5853,3		
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	5871,7	5875,3		
	HexNAC ₃ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	5730,8*	5732,3	4084,2	4084,7
	HexNAC ₃ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	5753,8	5754,2	2CAM	2CAM
	HexNAC ₃ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	5767,5	5770,3		
	Hex ₁ HexNAC ₃ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	5914,6	5916,4		
	Hex ₁ HexNAC ₄ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	6101,4	6097,6		
Hex ₁ HexNAC ₄ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	6140,0	6135,7			
N ₃₁₆	<i>Con A-positive Fraktion</i>				T ₃₁₃₋₃₂₁	
	HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	2556,8	2559,7		
	HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	2579,4	2581,7		
	HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	2599,6	2597,8		
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	2720,4	2721,8	1114,1	1115,3
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	2743,2	2743,8		
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	2880,4	2884,0		
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	2903,8	2906,0		
Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	2922,8	2922,1			

Tab. 3.3: Fortsetzung II

Position	Glykanstruktur	M+A	Glykopeptid		Peptid	
			m/z _{exp}	m/z _{kalk}	m/z _{exp}	m/z _{kalk}
N ₃₁₆	<i>LCA-positive Fraktion</i>				T ₃₁₃₋₃₂₁	
	HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	2577,9	2581,7		
	HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	2597,2	2597,8		
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	2723,2	2721,8		
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	2742,0	2743,8		
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	2761,9*	2759,9		
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	2881,2	2884,0	1113,7	1115,3
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	2905,6	2906,0		
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	2919,9	2922,1		
	HexNAC ₃ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	2761,9*	2762,9		
	HexNAC ₃ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	2780,9	2784,9		
	HexNAC ₃ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	2802,9	2801,0		
	Hex ₁ HexNAC ₃ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	2924,0	2925,0		
	Hex ₁ HexNAC ₃ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	2943,0	2947,0		
	Hex ₁ HexNAC ₃ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	2965,2	2963,1		
	Hex ₂ HexNAC ₃ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	3110,8	3109,2		
	Hex ₂ HexNAC ₃ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	3127,7	3125,3		
	Hex ₃ HexNAC ₃ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	3267,0	3271,3		
N ₃₂₃	<i>LCA-positive Fraktion</i>				T ₃₂₂₋₃₂₇	
	HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	2144,9	2145,1		
	HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	2159,4	2161,2		
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	2285,4	2285,2	n.d.	678,7
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	2304,9	2307,2		
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	2319,0	2323,3		
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	2445,8	2447,4		
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	2467,9	2469,4		
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	2483,4	2485,5		

Tab. 3.3: Fortsetzung III

Position	Glykanstruktur	M+A	Glykopeptid		Peptid	
			m/z _{exp}	m/z _{kalk}	m/z _{exp}	m/z _{kalk}
N ₅₃₀	<i>Con A-positive Fraktion</i>				T ₅₂₈₋₅₃₇	
	HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	2628,7	2629,7		
	HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	2653,1	2651,7		
	HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	2670,4	2667,8		
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	2790,0	2791,9	1184,1	1185,4
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	2811,6	2813,9		
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	2831,2	2830,0		
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	2953,1	2954,0		
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	2974,2	2976,0		
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	2994,4	2992,1		
	<i>LCA-positive Fraktion</i>				T ₅₂₈₋₅₃₇	
	HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	2626,1	2629,7		
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	2787,6	2791,9		
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	2809,6	2813,9		
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	2831,2	2830,0		
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	2949,7	2954,0	1184,7	1185,4
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	2971,8	2976,0		
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	2992,0	2992,1		
	<i>Con A-positive Fraktion</i>				T ₅₂₈₋₅₃₁	
	HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	1959,8	1961,0		
	HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	1981,3	1983,0		
	HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	1997,4	1999,1		
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	2121,7	2123,1	n.d.	516,6
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	2144,0	2145,1		
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	2160,7	2161,2		
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	2284,0	2285,3		
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	2306,3	2307,3		
Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	2325,9	2323,4			

Tab. 3.3: Fortsetzung IV

Position	Glykanstruktur	M+A	Glykopeptid		Peptid	
			m/z _{exp}	m/z _{kalk}	m/z _{exp}	m/z _{kalk}
N ₅₃₀	<i>LCA-positive Fraktion</i>				T ₅₂₈₋₅₃₁	
	HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	1958,6	1961,0		
	HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	1981,3	1983,0		
	HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	1999,0	1999,1		
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	2120,2	2123,1	n.d	516,6
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	2143,0	2145,1		
	Hex ₁ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	2160,6	2161,2		
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+H	2282,9	2285,3		
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+Na	2305,1	2307,3		
	Hex ₂ HexNAC ₂ Fuc ₁ Man ₃ GlcNAC ₂	M+K	2323,8	2323,4		

Die korrespondierenden Peptide wurden nach N-Glykosidase F-Spaltung durch MALDI-ToF-MS analysiert.

* entspricht m/z_{exp} mit verschiedenen N-Glykanstrukturen und ** einer LCA-positiven Fraktion des ZP-Glykoproteingemisches.

Alle weiteren Daten wurden nach tryptischer In-Gel-Spaltung des ZPA-Proteins erhalten.

3.1.4.2 Zuordnung des Pentamannosylglykans

Die Auswertung der MALDI-ToF-MS-Spektren der Glykopeptidfraktionen des ZPA-Proteins nach Con A-Affinitätschromatographie ergaben, dass das Glykan vom High-Mannose-Typ, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (siehe 3.1.3), an der Position N_{268} und nicht an den Positionen N_{316} , N_{323} und N_{530} lokalisiert ist. Ein dominantes Signal bei $m/z_{\text{exp}} 5302,6$ und ein geringeres Signal bei $m/z_{\text{exp}} 5324,7$ entsprechen dem $[\text{M}+\text{H}]^+$ - bzw. $[\text{M}+\text{Na}]^+$ -Addukt des pentamannosylierten Peptids mit der Position N_{268} . N-Glykosidase F-Spaltung resultierte in dem korrespondierenden Peptid $\text{T}_{245-282}$ bei $m/z_{\text{exp}} 4080,5$. Zusätzlich wurden die MS-Daten der über LCA-Affinitätschromatographie isolierten tryptischen Glykopeptide des ZP-Proteingemisches auf Pentamannosylglykane untersucht. Lediglich für die Position N_{268} des ZPA-Proteins wurden in der RP-HPLC-Fraktion 18 (siehe Abb. 3.9, 3.10) schwache Signale für das Peptid mit einem Pentamannosylglykan als $[\text{M}+\text{H}]^+$ - ($m/z_{\text{exp}} 5299,4$), $[\text{M}+\text{Na}]^+$ - ($m/z_{\text{exp}} 5319,1$) und $[\text{M}+\text{K}]^+$ -Addukt ($m/z_{\text{exp}} 5337,1$) sowie nach N-Glykosidase F-Spaltung das korrespondierende Peptid ($m/z_{\text{exp}} 4084,2$) detektiert.

Weiterhin konnte in der MALDI-ToF-MS-Analyse der N-Glykane der N-terminalen 20-30 kDa großen Polypeptide des EßGal-gespaltenen ZPA-Proteins mit den Positionen N_{84} und N_{93} kein Pentamannosylglykan identifiziert werden. Die weiteren Signale stimmen mit den Glykanstrukturen des ZPA-Proteins überein (siehe Abb. 3.16b).

Für ZPB/ZPC sind keine High-Mannose-Typ N-Glykane identifiziert worden (Noguchi et al., 1992). Um eine Kontamination während der Isolierung der Oligosaccharide ausschließen zu können, wurden die N-Glykane des desialylierten ZPB/ZPC-Gemisches nach In-Gel-Deglykosylierung durch MALDI-ToF-MS untersucht. Das Glykanprofil entspricht etwa demjenigen des ZPA-Proteins, allerdings konnte kein Pentamannosylglykan nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.16c).

Der Asparaginrest der Position N_{268} des ZPA-Proteins ist somit die einzige Glykosylierungsstelle des Glykans vom High-Mannose-Typ in den ZP-Glykoproteinen.

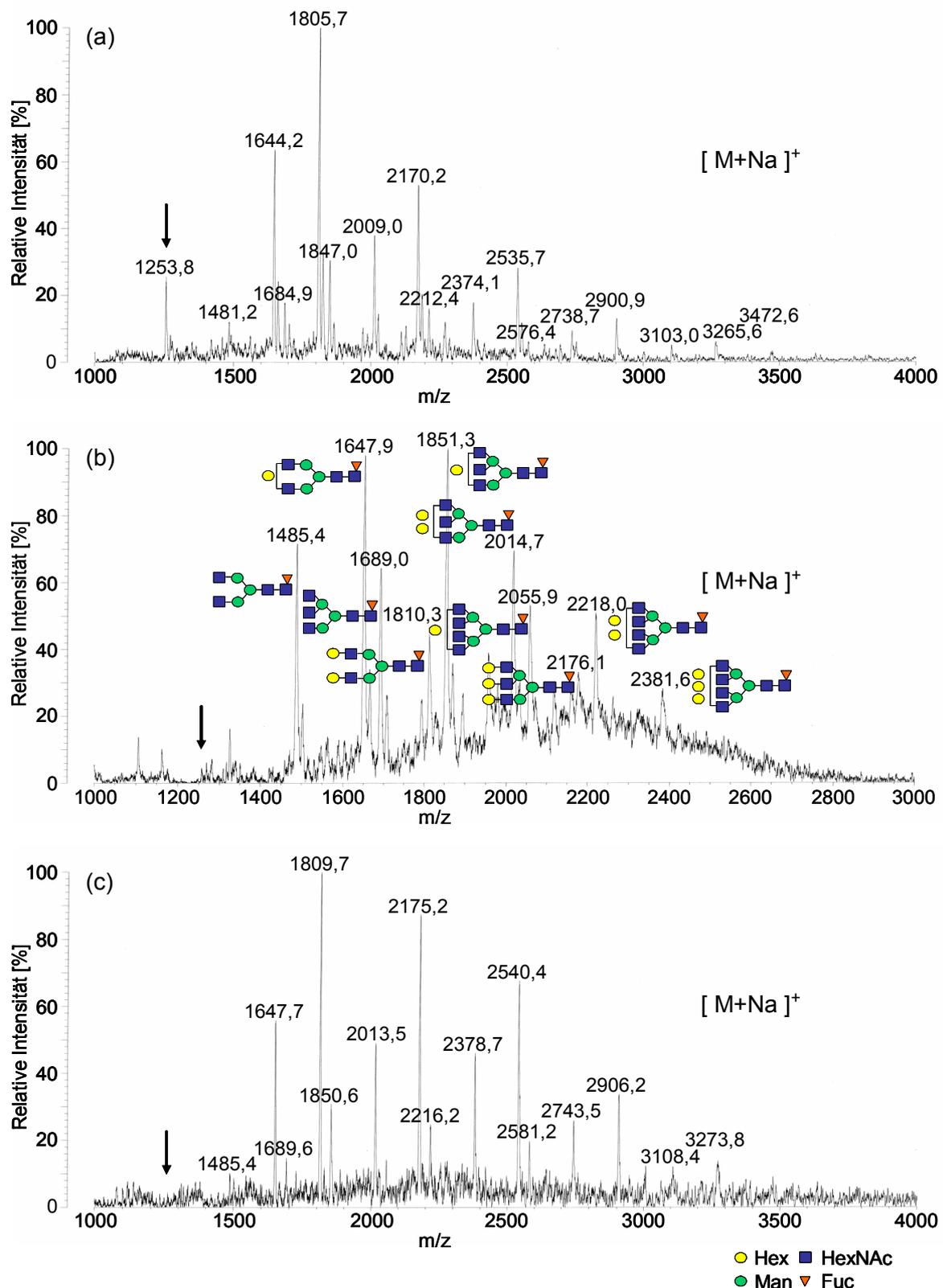


Abb. 3.16: Vergleich der N-Glykanprofile des ZPA- Proteins und des ZPB/ZPC-Gemisches.

Die Proteine wurden im Gel mit N-Glykosidase F deglykosyliert. Von den Glykanen des desialylierten ZPA-Proteins (a), der N-terminalen E3Gal-gespaltenen 20-30 kDa großen Polypeptide des ZPA-Proteins (b) und des desialylierten ZPB/ZPC-Gemisches (c) wurden MS-Spektren mit einem MALDI-II Kratos Analytical (V 5.2) im positiven Modus aufgenommen.

3.1.5 Charakterisierung der sulfatierten N-Glykane der ZP-Proteine

2D-gelelektrophoretische Auftrennungen der ZP-Proteine zeigten, dass In-vitro-Maturation von Oocyten vom GVI- in das MII-Stadium in einer Verschiebung in den sauren Bereich von 0,8 pI-Einheiten für ZPA und 1,3 pI-Einheiten für ZPB/ZPC resultiert. Analysen mit Sialinsäure-erkennenden Lektinen lassen vermuten, dass dafür vorwiegend eine erhöhte Sulfatierung und nicht Sialylierung der N- bzw. O-Glykane verantwortlich sein könnte (Rath et al., 2005).

3.1.5.1 Elektrophoretische Analyse der Sulfatierung der ZP-Proteine

Die Sulfatierung der N- und O-gebundenen Oligosaccharide der ZP-Proteine von Oocyten im GV-Stadium wurde zunächst durch 2D-Gelelektrophorese charakterisiert. Hierbei wurden die Verteilungen der Glykoformen nach Desialylierung und partieller Deglykosylierung durch Endo- β -Galactosidase mit denjenigen von desulfatierten ZP-Proteinen verglichen. Die Proteine wurden vor der elektrophoretischen Auftrennung mit Ethanol gefällt, um eine saure Hydrolyse der Glykoproteine zu verhindern.

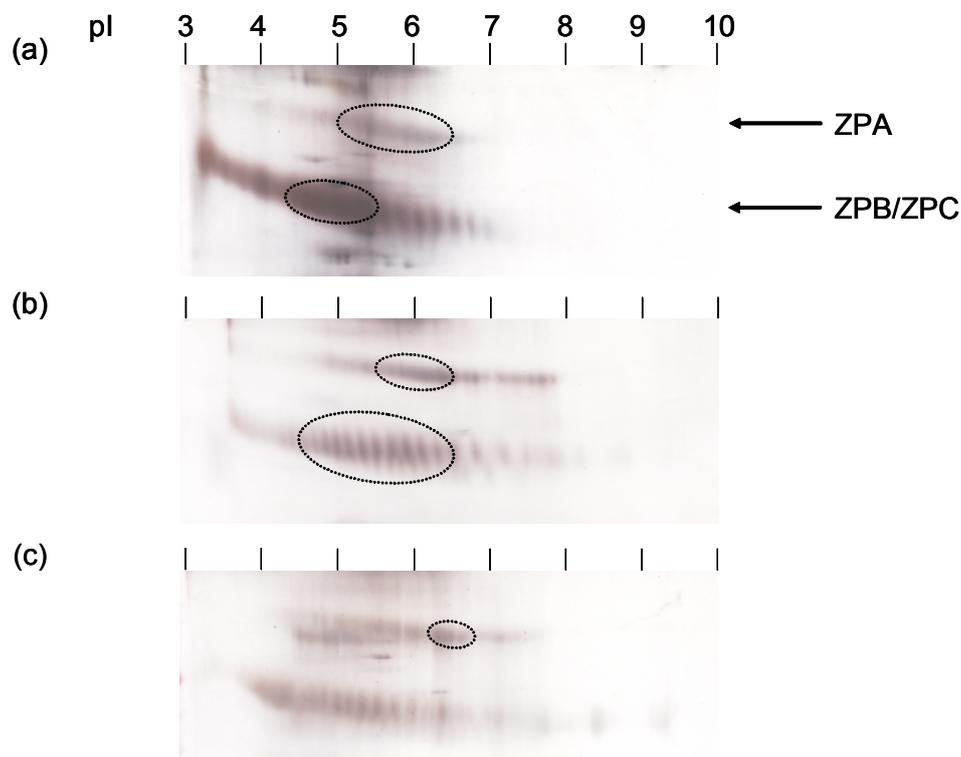


Abb. 3.17: Analyse der aziden Kohlenhydratstrukturen der ZP-Proteine durch 2D-Gelelektrophorese.

30 μ g native (a), desialylierte (b) und desialylierte/desulfatierte (c) ZP wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen durch 12%ige 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine durch Silberfärbung detektiert.

Die nativen ZPA-Isoglykoproteine verteilten sich von pI 4,0 bis 6,8, wobei sie sich hauptsächlich zwischen pI 5,0 und 6,5 anreicherten. Die Bande des ZPB/ZPC-Gemisches überspannte den pI-Bereich von 3,0 bis 7,0 mit einer Konzentrierung der Glykoproteine zwischen pI 4,3 und 5,5 (siehe Abb. 3.17a).

Desialylierung der ZP-Proteine resultierte in einer Verschiebung in Richtung Kathode mit einer Konzentrierung der Glykoformen des ZPA-Proteins (pI 4,7-7,9) zwischen pI 5,5 und 6,5 und derjenigen des ZPB/ZPC-Gemisches (pI 3,5-8,8) zwischen pI 4,5 und 6,5 (siehe Abb. 3.17b).

Eine gleichzeitige chemische Desulfatierung und enzymatische Desialylierung der ZP-Proteine bewirkte eine Verteilung der Isoformen von ZPB/ZPC zwischen pI 3,5 und 9,3. In der Bande des ZPA-Glykoproteins (pI 4,5-7,8) konzentrierten sich die Isoglykoproteine in dem Bereich von pI 6,3 bis 6,7 (siehe Abb. 3.17c).

Um weitere Hinweise auf die Sulfatierung der Glykane zu erhalten, wurden desialylierte ZP-Proteine mit Endo- β -Galactosidase partiell deglykosyliert.

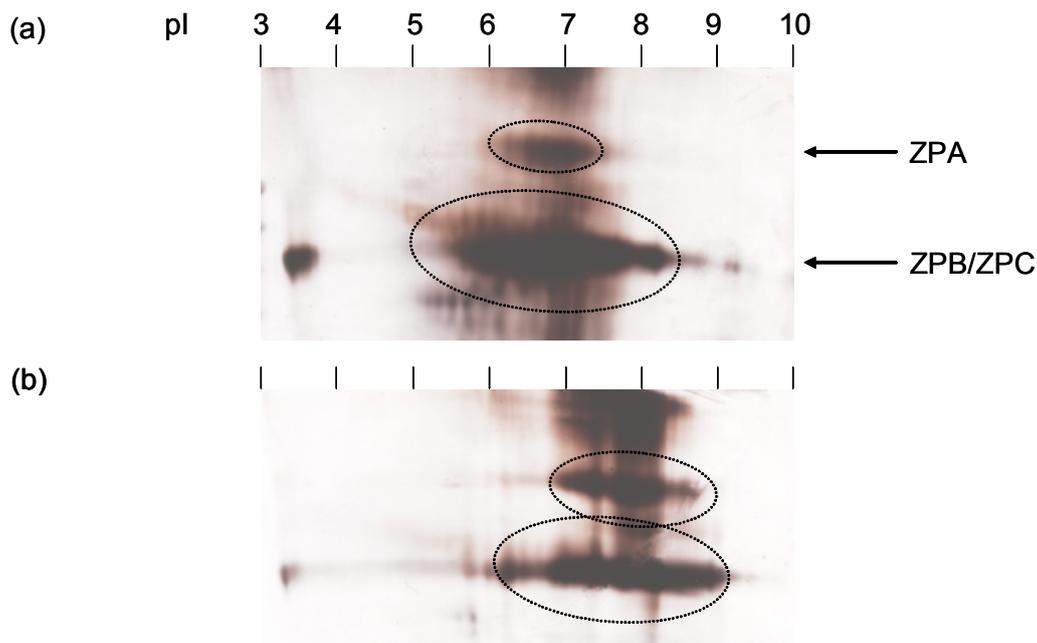


Abb. 3.18: Analyse der Sulfatierung der ZP-Proteine durch 2D-Gelelektrophorese.

30 μ g desialylierte/E β Gal-gespaltene (a) und desialylierte/E β Gal-gespaltene/desulfatierte (b) ZP wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen durch 12%ige 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine durch Silberfärbung detektiert.

Die Isoformen des ZPA-Proteins reichern sich zwischen pI 6,0 und 7,5 und diejenigen des ZPB/ZPC-Gemisches hauptsächlich in dem pI-Bereich von 5,0 bis 8,5 an (siehe Abb. 3.18a). Nach Desulfatierung konzentrierten sich die Isoformen des

ZPA-Glykoproteins in dem pI-Bereich zwischen 6,8 und 9,0 und ZPB/ZPC zwischen pI 6,1 und 9,2 (siehe Abb. 3.18b).

Die Verschiebungen der desialylierten sowie desialylierten/EBGal-gespaltenen ZP-Isoproteine nach Desulfatierung in den alkalischen Bereich deuten darauf hin, dass sowohl die repetierenden N-Acetyllactosamineinheiten der N- und O-Glykane als auch die Core-Struktur bzw. die nicht repetierenden Antennen der N-gebundenen Oligosaccharide sulfatiert sind.

3.1.5.2 MALDI-ToF-MS-Analyse der sulfatierten N-Glykane der ZP-Proteine von Oocyten im GV-Stadium

Um eine Analyse der sulfatierten N-Glykane der ZP-Proteine durchführen zu können, wurde zunächst eine MALDI-ToF-MS-Methode anhand der Oligosaccharide von Oocyten präpuberaler Sauen etabliert. Voraussetzung dazu war die Synthese der Matrix D-Arabinosazon, welche die Detektion von sulfatierten Glykanen im negativen Modus erlaubt. Zur Erleichterung der Auswertung der MS-Spektren wurde von desialyliertem Material ausgegangen. Die Messungen wurden im Vorversuch mit 15 µg ZP-Proteinen (1000 ZP-Äquivalente) durchgeführt, die auf PVDF-Membran immobilisiert und deglykosyliert worden waren. Die Co-Kristallisation mit dem Analyten erfolgte nicht gleichmäßig auf dem Target. Man erhielt eine geringe Anzahl an Kristallen, die für die Aufnahme eines MS-Übersichtsspektrums, jedoch nicht für eine MS²-Analyse aller Signale ausreichte. Zusätzlich wurden bei den MS- und MS²-Messungen die Glykansignale durch ein starkes Hintergrundrauschen überlagert. Die Auswertungen der Signale mit dem ExpasyGlycoMode-Programm (Cooper et al., 2001) ergaben [M-H]⁻-Ionen von fucosylierten komplexen N-gebundenen Oligosacchariden mit einem Sulfatrest (siehe Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Glykanprofil der sulfatierten N-Glykane der ZP-Proteine nach Deglykosylierung auf PVDF-Membran

Glykanstruktur	m/z _{exp} [M-H] ⁻	m/z _{kalk} [M-H] ⁻
Hex ₁ HexNac ₂ Fuc ₁ Sulf ₁ Man ₃ GlcNac ₂	1703,33	1703,55
Hex ₂ HexNac ₂ Fuc ₁ Sulf ₁ Man ₃ GlcNac ₂	1865,7	1865,6
Hex ₁ HexNac ₃ Fuc ₁ Sulf ₁ Man ₃ GlcNac ₂	1906,36	1906,63
Hex ₂ HexNac ₃ Fuc ₁ Sulf ₁ Man ₃ GlcNac ₂	2068,75	2068,68
Hex ₃ HexNac ₃ Fuc ₁ Sulf ₁ Man ₃ GlcNac ₂	2230,49	2230,73
Hex ₂ HexNac ₄ Fuc ₁ Sulf ₁ Man ₃ GlcNac ₂	2270,04	2271,76
Hex ₃ HexNac ₄ Fuc ₁ Sulf ₁ Man ₃ GlcNac ₂	2434,43	2433,81
Hex ₄ HexNac ₄ Fuc ₁ Sulf ₁ Man ₃ GlcNac ₂	2595,52	2595,86
Hex ₄ HexNac ₅ Fuc ₁ Sulf ₁ Man ₃ GlcNac ₂	2796,67	2798,94
Hex ₅ HexNac ₅ Fuc ₁ Sulf ₁ Man ₃ GlcNac ₂	2961,53	2961,0
Hex ₆ HexNac ₆ Fuc ₁ Sulf ₁ Man ₃ GlcNac ₂	3326,87	3326,13

Die Signale stimmen mit biantennären N-Glykanen mit einer (m/z_{exp} 1703,33) und zwei (m/z_{exp} 1865,7) terminalen Hexosen sowie einer triantennären Struktur mit zwei terminalen N-Acetylhexosaminresten (m/z_{exp} 1906,36) überein. Alle weiteren Signale können tri- und tetraantennären Strukturen (m/z_{exp} 2000-2600) oder bi-, tri- und tetraantennären Strukturen (m/z_{exp} 2000-3330) mit repetierenden N-Acetyllactosmineinheiten entsprechen (siehe Abb. 3.19).

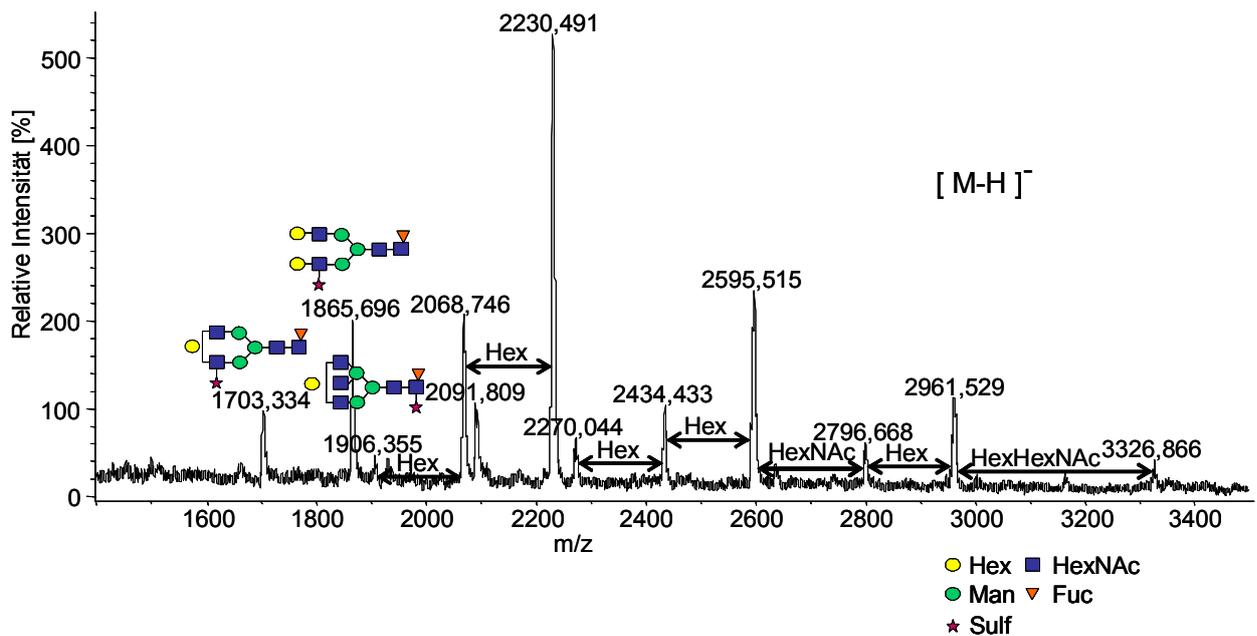


Abb. 3.19: MALDI-ToF-MS-Spektrum der sulfatierten N-Glykane der ZP-Glykoproteine.

15 μg desialylierte ZP-Proteine wurden nach Immobilisierung auf PVDF-Membran mit N-Glykosidase F deglykosyliert. Für die Messungen der sulfatierten Glykane wurde ein Ultraflex-MS im negativen Modus verwendet. Das Signal bei m/z_{exp} 2091,81 entspricht dem Standard ACTH clip 1-17. Die glykosidische Bindung des Sulfatrestes ist beispielhaft dargestellt.

3.1.5.3 MALDI-ToF-MS²-Analysen der sulfatierten N-Glykane der ZP-Proteine von Oocyten im GV-Stadium

Für die MALDI-ToF-MS²-Analysen der sulfatierten N-Glykane wurde von 45 µg ZP-Proteinen (3000 ZP-Äquivalente) ausgegangen. Damit war das Hintergrundrauschen reduziert und die Anzahl der Kristalle reichte für eine Fragmentierung der Oligosaccharide aus. Bei der Auswertung der Spektren wurden Fragmentationen nach glykosidischer Spaltung identifiziert. In der Abb. 3.20 und der Tab. 3.5 ist beispielhaft die Fragmentierung des Signals bei m/z_{Kalk} 1703,55 dargestellt.

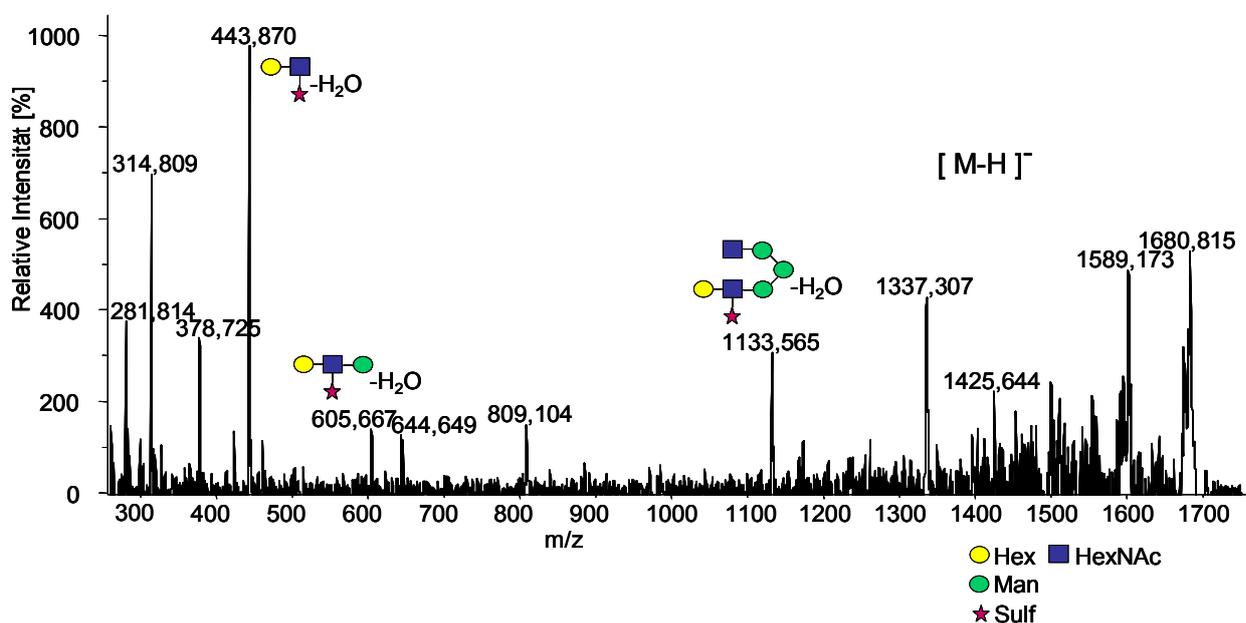


Abb. 3.20: MALDI-ToF-MS²-Analyse des Hex₁HexNAc₂Fuc₁Sulf₁Man₃GlcNAc₂ der ZP-Proteine.

Die ZP-Proteine wurden nach Immobilisierung auf PVDF-Membran mit N-Glykosidase F deglykosyliert. Die MS²-Messung des Signals bei m/z_{Kalk} 1703,55 wurde mit einem Ultraflex-MS im negativen Modus durchgeführt. Die glykosidischen Bindungen des Sulfat-, der Hexose- und der N-Acetylhexosaminreste sind beispielhaft dargestellt.

Die Signale bei m/z_{exp} 443,870; m/z_{exp} 605,667; m/z_{exp} 1133,565 und m/z_{exp} 1279,721 mit den Strukturen Hex₁HexNAc₁Sulf₁ - H₂O; Hex₂HexNAc₁Sulf₁ - H₂O; Hex₄HexNAc₂Sulf₁ - H₂O und Hex₄HexNAc₂Fuc₁Sulf₁ - H₂O entsprechen Fragmentationen mit einer Sulfatierung an einem N-Acetylhexosaminrest einer Antenne. Dabei weist das Signal bei m/z_{exp} 1279,721 zusätzlich auf eine Fucosylierung an einer N-Acetylactosamineinheit hin. Das Signal bei m/z_{exp} 646,988 stimmt mit der Struktur Hex₁HexNAc₂Sulf₁ - H₂O überein, welche einen Sulfatrest an dem reduzierenden terminalen N-Acetylhexosaminrest trägt. Weiterhin wurden Ionen

detektiert, bei denen eine Sulfatierung am N-Acetylhexosamin des reduzierenden oder nicht reduzierenden Endes vorliegen kann (siehe Tab. 3.5).

Tab. 3.5: MS²-Analyse des Signals bei m/z_{kalk} 1703,55 der sulfatierten N-Glykane der ZP-Proteine nach Deglykosylierung auf PVDF-Membran

Glykanstruktur	m/z_{exp} [M-H] ⁻	m/z_{kalk} [M-H] ⁻	Sulf am GlcNAc der Antenne	Sulf am GlcNAc des Cores
HexNAC ₁ Sulf ₁ - H ₂ O	281,814	282,029	X	X
HexNAC ₁ Fuc ₁	366,057	366,141		
Hex ₁ HexNAC ₁ Sulf ₁ - H ₂ O	443,870	444,082	X	
Hex ₁ HexNAC ₁ Sulf ₁	461,807	462,092	X	
Hex ₂ HexNAC ₁ Sulf ₁ - H ₂ O	605,667	606,135	X	
Hex ₁ HexNAC ₂ Sulf ₁ - H ₂ O	646,988	647,161		X
Hex ₂ HexNAC ₂ Sulf ₁ - H ₂ O	809,104	809,214	X	X
Hex ₃ HexNAC ₂ Sulf ₁ - H ₂ O	971,806	971,267	X	X
Hex ₄ HexNAC ₂ Sulf ₁ - H ₂ O	1133,565	1133,32	X	
Hex ₃ HexNAC ₃ Sulf ₁ - H ₂ O	1174,593	1174,346	X	X
Hex ₃ HexNAC ₃ Fuc ₁ - H ₂ O	1239,895	1240,447		
Hex ₄ HexNAC ₃ - H ₂ O	1256,39	1256,442		
Hex ₄ HexNAC ₂ Fuc ₁ Sulf ₁ - H ₂ O	1279,721	1279,377	X	
Hex ₄ HexNAC ₂ Fuc ₁ Sulf ₁	1297,017*	1297,388	X	
Hex ₃ HexNAC ₄ - H ₂ O	1297,017*	1297,469		
Hex ₃ HexNAC ₄	1315,995	1315,479		
Hex ₃ HexNAC ₃ Fuc ₁ Sulf ₁	1337,307*	1338,415	X	X
Hex ₄ HexNAC ₃ Sulf ₁ - H ₂ O	1337,307*	1336,399	X	X
Hex ₄ HexNAC ₃ Sulf ₁	1355,467	1354,41	X	X
Hex ₄ HexNAC ₃ Fuc ₁ Sulf ₁ - H ₂ O	1482,134	1482,457	X	X
Hex ₄ HexNAC ₃ Fuc ₁ Sulf ₁	1499,145	1500,467	X	X
Hex ₄ HexNAC ₃ Fuc ₁ Sulf ₁	1501,583	1500,467	X	X
Hex ₃ HexNAC ₄ Fuc ₁ Sulf ₁ - H ₂ O	1524,214	1523,483	X	X

* entspricht m/z_{exp} mit verschiedenen N-Glykanfragmentstrukturen.

Tandem-MALDI-MS²-Analysen weiterer sulfatierter N-Glykane (m/z_{kalk} 1865,6; m/z_{kalk} 2068,68; m/z_{kalk} 2230,73; m/z_{kalk} 2595,86; m/z_{kalk} 2961,0; siehe Tab. 3.4) resultierten in Fragmentierungsmustern für sulfatierte fucosylierte komplexe N-Glykane. In jedem Spektrum erhielt man ein dominantes Signal bei m/z_{kalk} 444,082

und ein geringeres Signal bei m/z_{kalk} 647,161. Dies spricht sowohl für Sulfatierung an einem N-Acetylhexosaminrest einer Antenne als auch der Core-Struktur. Einige sulfatierte N-Glykane (m/z_{kalk} 1906,63; m/z_{kalk} 2271,76; m/z_{kalk} 2433,81; m/z_{kalk} 2798,94; m/z_{kalk} 3326,13; siehe Tab. 3.4) konnten nicht fragmentiert werden, da die Signalintensitäten im MS-Übersichtsspektrum zu gering waren.

3.1.5.4 N-Glykanprofile der ZP-Proteine von Oocyten im GV- und MII-Stadium

Durch AS-Analyse konnte gezeigt werden, dass der Proteinanteil in der ZP von *in vitro* gereiften Oocyten im MII-Stadium etwa doppelt so hoch ist wie in der ZP von präpuberalen Sauen (Töpfer-Petersen, persönliche Mitteilung). Es wurden daher für die Erstellung der N-Glykanprofile 1110 ZP-Äquivalente von *in vitro* gereiften (~ 33 µg) und unreifen (~ 17 µg) Oocyten eingesetzt.

Die ZP-Proteine von Oocyten im MII-Stadium ließen sich zur Desialylierung der Glykane nicht vollständig in Lösung bringen. Auch der Zusatz von 0,01% SDS führte nicht zur vollständigen Lösung der Glykoproteine. In MALDI-ToF-MS-Analysen konnten keine auswertbaren Signale für sulfatierte N-Glykane detektiert werden. Da für die Detektion der sulfatierten N-Glykane verhältnismäßig hohe Glykankonzentrationen notwendig sind, war die eingesetzte Menge möglicherweise zu gering (siehe 3.1.5.2). Die getrennt isolierten neutralen N-Glykane ließen sich dagegen mit DHB als Matrix untersuchen. In der Abb. 3.21 sind die MS-Spektren der neutralen N-Glykane von unreifen und *in vitro* gereiften Oocyten dargestellt.

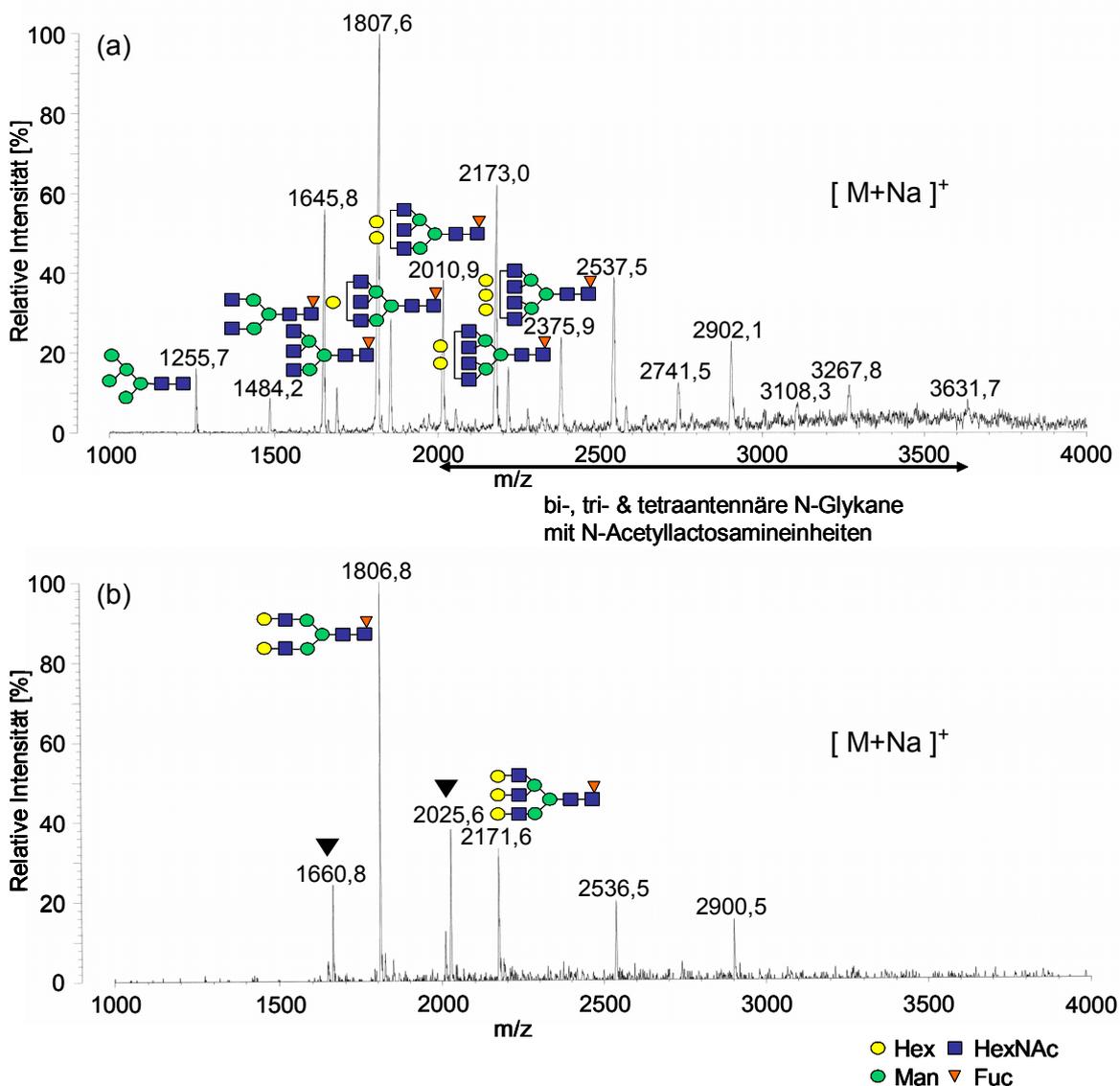


Abb. 3.21: N-Glykanprofile der ZP-Proteine von Oocyten im GV- und MII-Stadium.

1110 desialylierte ZP-Äquivalente unreifer und *in vitro* gereifter Oocyten wurden nach Immobilisierung auf PVDF-Membran mit N-Glykosidase F deglykosyliert. Für die Messungen der neutralen N-Glykane wurde ein MALDI-II Kratos Analytical (V 5.2) im positiven Modus verwendet.

(a) MALDI-ToF-MS-Spektrum der N-Glykane der ZP-Proteine von Oocyten im GV-Stadium.

(b) MALDI-ToF-MS-Spektrum der N-Glykane der ZP-Proteine von *in vitro* gereiften Oocyten im MII-Stadium. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Massen entsprechen dem [M+Na]⁺-Addukt eines Hex₂HexNAc₂Man₃GlcNAc₂ oder [M+K]⁺-Addukt eines Hex₁HexNAc₂Fuc₁Man₃GlcNAc₂ (m/z_{exp} 1660,8) und dem [M+Na]⁺-Addukt eines Hex₃HexNAc₃Man₃GlcNAc₂ oder dem [M+K]⁺-Addukt eines Hex₂HexNAc₃Fuc₁Man₃GlcNAc₂ (m/z_{exp} 2025,6).

Die Signale der N-Glykane der ZP-Proteine von präpuberalen Sauen entsprechen denen für das ZPA-Protein identifizierten [M+Na]⁺-Addukten eines Pentamannosylglykans sowie bi-, tri- und tetraantennären komplexen Strukturen mit und ohne N-Acetylactosamineinheiten (siehe 3.1.3; Abb. 3.21a). Ein zusätzliches Signal bei m/z_{exp} 3631,7 stimmt mit der Struktur Hex₇HexNAc₇Fuc₁Man₃GlcNAc₂

überein. In der ZP von *in vitro* gereiften Oocyten konnten dagegen keine Signale sowohl für ein Pentamannosylglykan als auch ein biantennäres N-Glykan ohne terminale Hexose detektiert werden (siehe Abb. 3.21b). Man erhielt lediglich Signale im Bereich von 1600 m/z_{exp} bis 2900 m/z_{exp} , wobei die Signale bei m/z_{exp} 1806,8; m/z_{exp} 2171,6; m/z_{exp} 2536,5 und m/z_{exp} 2900,5 den Strukturen $\text{Hex}_2\text{HexNAC}_2\text{Fuc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAC}_2$; $\text{Hex}_3\text{HexNAC}_3\text{Fuc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAC}_2$; $\text{Hex}_4\text{HexNAC}_4\text{Fuc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAC}_2$ bzw. $\text{Hex}_5\text{HexNAC}_5\text{Fuc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAC}_2$ zugeordnet werden können. Die Signale bei m/z_{exp} 1660,8 und m/z_{exp} 2025,6 lassen rechnerisch zwei Möglichkeiten zu: Sie entsprechen dem $[\text{M}+\text{Na}]^+$ -Addukt eines defucosylierten biantennären N-Glykans mit zwei terminalen Hexosen am nicht reduzierenden Ende der Antennen ($\text{Hex}_2\text{HexNAC}_2\text{Man}_3\text{GlcNAC}_2$) und der Struktur $\text{Hex}_3\text{HexNAC}_3\text{Man}_3\text{GlcNAC}_2$. Zusätzlich stimmen sie mit dem $[\text{M}+\text{K}]^+$ -Addukt eines biantennären N-Glykans mit einem terminalen N-Acetylhexosaminrest ($\text{Hex}_1\text{HexNAC}_2\text{Fuc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAC}_2$) und eines triantennären N-Glykans mit zwei terminalen Hexosen ($\text{Hex}_2\text{HexNAC}_3\text{Fuc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAC}_2$) überein. Aufgrund des Zusatzes von Kaliumionen in dem Reifungsmedium (siehe 2.1.2) war M+K-Adduktbildung möglich.

3.2 Charakterisierung der oxidativ-sensitiven Thiolgruppen in der ZP

Die Positionen der Cysteine in den ZP-Proteinen verschiedener Spezies sind hoch konserviert (Harris et al., 1994). Die meisten Cysteinreste bilden Disulfidbrücken und sind für die Aufrechterhaltung der dreidimensionalen Struktur der ZP verantwortlich (Dunbar, 1983; Dunbar et al., 1994).

Die limitierte Proteolyse und die Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken des ZPA-Proteins spielen die bedeutendste Rolle beim so genannten „Zona hardening“ (Zhang et al., 1991; Iwamoto et al., 1999; siehe 1.5). Aus diesem Grund sollte geprüft werden, ob im ZPA vor der Befruchtung ein definiertes Muster oxidativ-sensitiver Thiolgruppen vorliegt. Das Protein enthält jeweils 10 Cysteine in der N-terminalen Region und in der ZP-Domäne (siehe 1.3.2).

Die Untersuchungen wurden mit den ZP-Proteinen präpuberaler Sauen durchgeführt, da nur dieses Material in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Hierfür wurden die Proteine mit Biotin-konjugiertem Jodacetamid (BIAM) bei pH 6,5 markiert, welches selektiv Cysteine mit einem niedrigen pK_a -Wert unter physiologischen Bedingungen biotinyliert (Kim et al., 2000). Die Markierung wurde bereits an den intakten ZP durchgeführt, um temperaturbedingtes Disulfidscrambling (Chang und Li, 2001) zu verhindern.

Das durch RP-HPLC angereicherte biotinylierte ZPA-Protein wurde nach Deglykosylierung durch N-Glykosidase F tryptisch gespalten. Die markierten tryptischen Peptide wurden nach Auftrennung durch RP-HPLC und Detektion im ELBA durch MALDI-ToF-MS analysiert.

3.2.1 Elektrophoretische Analyse der biotinylierten ZP-Proteine

Die mit BIAM-markierten solubilisierten ZP-Proteine wurden nach 1D-gelelektrophoretischer Auftrennung und Western Blotting mit HRPO-konjugiertem Streptavidin detektiert.

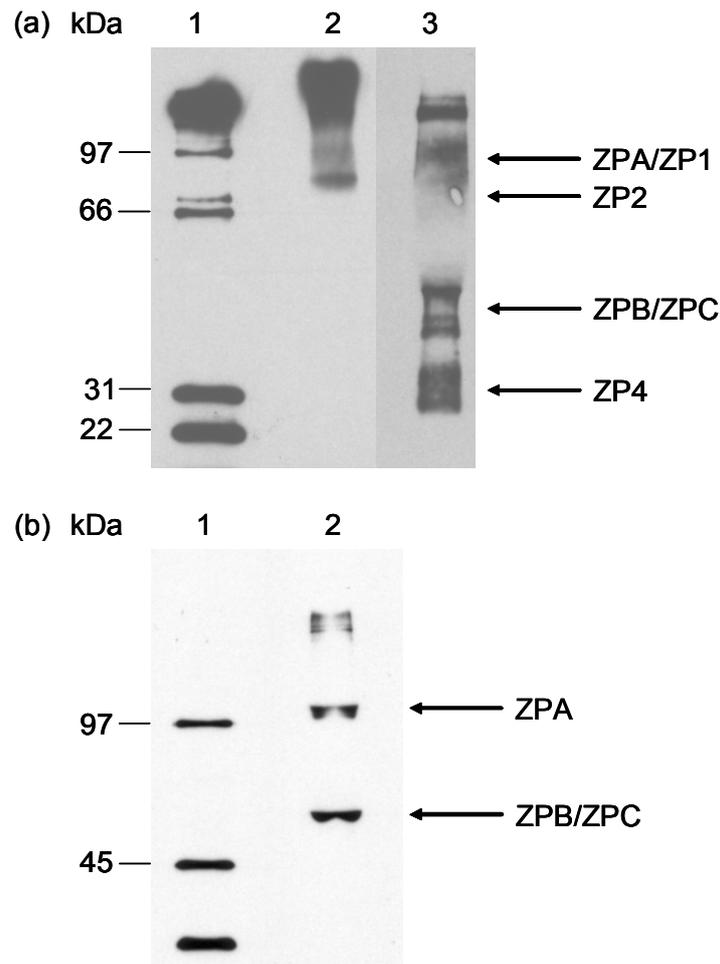


Abb. 3.22: BIAM-Markierungsmuster der ZP-Proteine.

Die ZP-Proteine wurden bei pH 6,5 mit BIAM markiert. Die Biotinylierung wurde durch Analysen mit HRPO-Streptavidin detektiert.

ZPA wurde unter reduzierenden Bedingungen in 25-35 kDa große Polypeptide und ein 70 kDa großes Polypeptid gespalten.

(a) 40 µg native ZP wurden unter nicht reduzierenden (2) und reduzierenden Bedingungen (3) durch 10%ige 1D-SDS-PAGE aufgetrennt.

(b) 30 µg EßGal-gespaltene ZP-Proteine wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen durch 12%ige 1D-SDS-PAGE aufgetrennt.

In der Spur 1 ist der Proteinlängenstandard dargestellt.

Unter nicht reduzierenden Bedingungen wurden selektiv das ZPA und die höhermolekularen Aggregate der ZP-Proteine angefärbt (siehe Abb. 3.22a). Reduzierende Bedingungen resultierten in einer Anfärbung der Spaltprodukte des ZPA-Proteins bei 70 kDa (ZP2) bzw. 25 bis 35 kDa (ZP4). Die Banden im Bereich zwischen 45 und 60 kDa des ZPB/ZPC-Gemisches wurden ebenfalls dargestellt (siehe Abb. 3.22a). Die ZP-Proteine wurden zusätzlich partiell durch Endo-β-Galactosidase deglykosyliert und unter nicht reduzierenden Bedingungen analysiert. Es wurde sowohl das ZPA als auch das ZPB/ZPC-Gemisch markiert (siehe Abb. 3.22b). Das Auftreten der Banden spricht dafür, dass durch Reduktion der

Disulfidbrücken und Abspaltung der N-Acetyllactosamineinheiten die Zugänglichkeit von den BIAM-markierten Thiolgruppen für HRPO-Streptavidin erhöht wird.

3.2.2 Identifizierung der oxidativ-sensitiven Thiolgruppen des ZPA-Proteins

Die Trennung der ZP-Proteine durch RP-HPLC wurde zunächst mit N-Glykosidase F oder Endo- β -Galactosidase gespaltener nicht biotinylierter ZP getestet. SDS-Gelelektrophoreseanalysen der manuell gesammelten Fraktionen zeigten lediglich nach partieller Deglykosylierung eine Anreicherung des ZPA-, ZPB- und ZPC-Proteins in einzelnen Fraktionen.

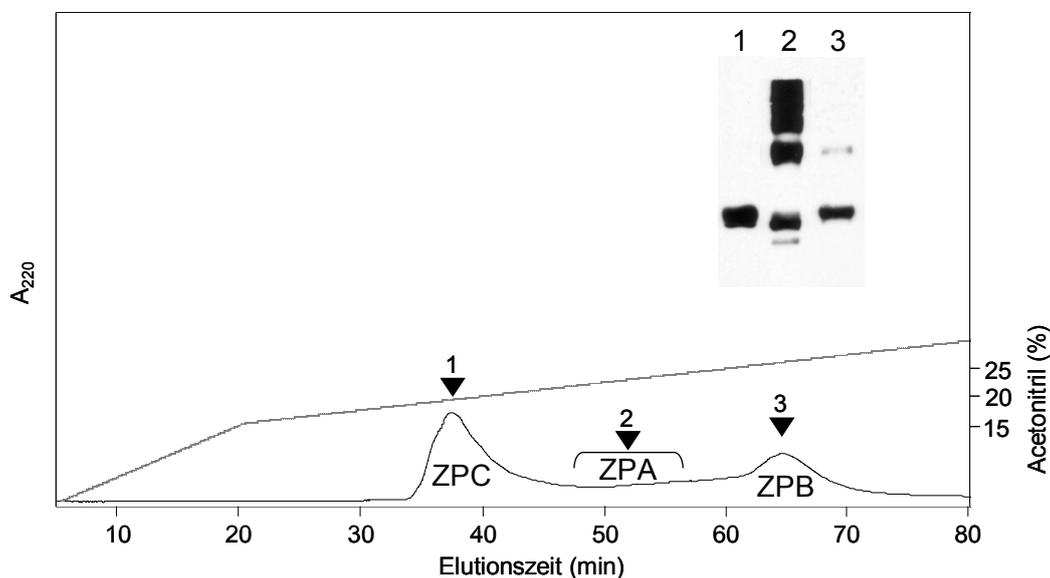


Abb. 3.23: RP-HPLC von E β Gal-gespaltene BIAM-markierten ZP-Proteinen.

E β Gal-gespaltene mit BIAM markierte ZP-Proteine wurden mit einem linearen Gradienten (grau gestrichelte Linie) von Acetonitril in 0,1% TFA von einer Nucleosil 300-10 C-4 Säule eluiert. Die Pfeile kennzeichnen die Fraktionen mit den ZP-Proteinen.

Einsatz: Blottanalysen der RP-HPLC-Fraktionen von BIAM-markierten ZP-Proteinen nach Detektion mit HRPO-Streptavidin.

Die BIAM-markierten ZP-Proteine wurden daher mit E β Gal gespalten und die einzelnen RP-HPLC-Fraktionen nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine mit einem Biotin-Avidin-System sowie anschließender Chemilumineszenz überprüft. Die Fraktionen 1 und 3 enthielten das ZPC- bzw. ZPB-Protein (Töpfer-Petersen et al., 1993). ZPA war in der Fraktion 2 angereichert, in welcher zusätzlich höhermolekulare Aggregate und ZPC detektiert wurden (siehe Abb. 3.23).

In der Abb. 3.24 ist die RP-HPLC der Fraktion 2 nach Trypsin-Spaltung und der ELBA dargestellt.

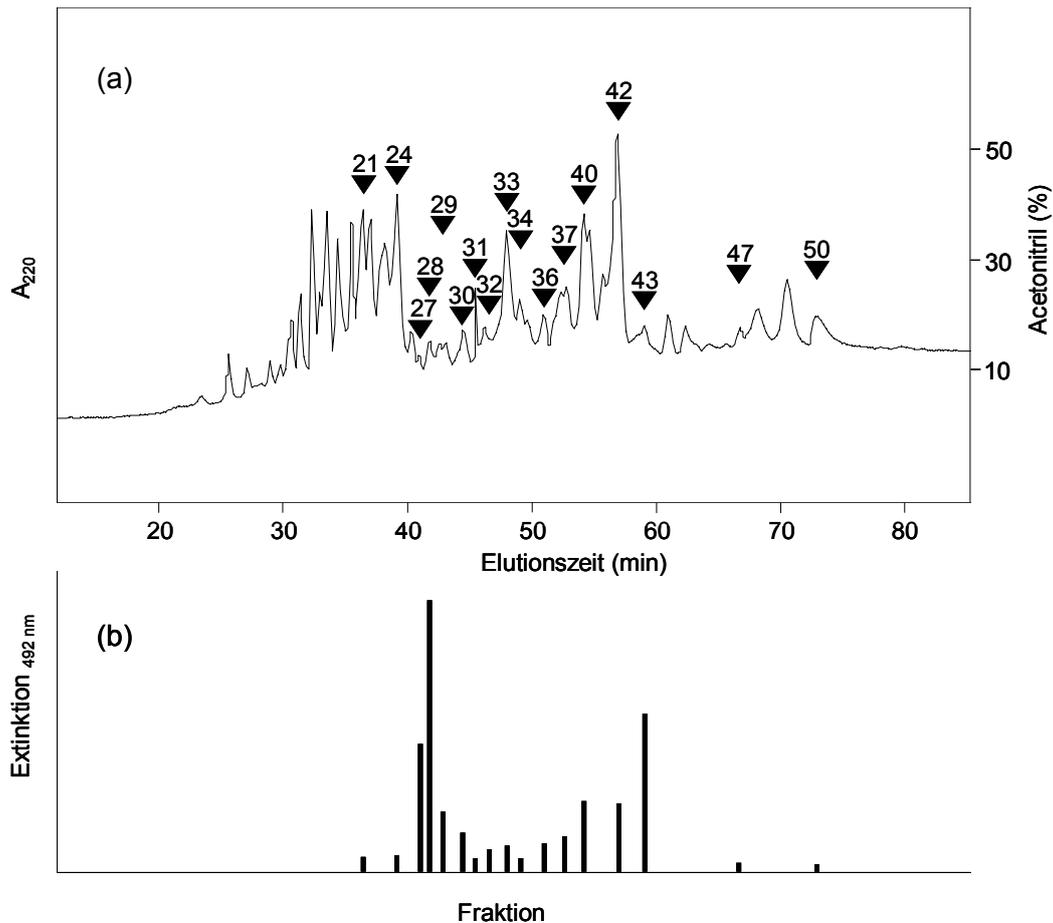


Abb. 3.24: RP-HPLC der tryptischen Peptide der Fraktion 2.

(a) Die Proteine der RP-HPLC-Fraktion 2 wurden nach Reduktion und Carbamidomethylierung tryptisch gespalten; die Peptide wurden mit einem linearen Gradienten (grau gestrichelte Linie) von Acetonitril in 0,1% TFA von einer Grom-Sil 120 ODS-4HE Säule (150 x 2 mm, 3 μ m) eluiert. Die Pfeile kennzeichnen die durch MALDI-ToF-MS analysierten Fraktionen.

(b) Extinktion der einzelnen Fraktionen bei 492 nm nach Reaktion mit HRPO-Streptavidin.

Die BIAM-markierten Proteine wurden vor der tryptischen Spaltung deglykosyliert. Die MS-Spektren der einzelnen RP-HPLC-Fractionen enthielten somit zusätzlich tryptische Peptide der N-Glykosidase F und Autoproteolyseprodukte des Trypsins. Diese wurden allerdings bei der Auswertung der Signale nicht berücksichtigt. Für die einzelnen Cysteine wurden Signale für Peptide mit BIAM (+ m/z_{kalk} 326,4) und/oder Carbamidomethylgruppe (CAM) und/oder ohne Modifizierung ermittelt (siehe Tab. 3.6). Aufgrund der Massengenauigkeit des MALDI-ToF-Massenspektrometers wurde eine Massendifferenz von ± 5 Da zugelassen.

Für den N-Terminus des ZPA-Proteins wurden Signale detektiert, deren m/z_{exp} mit denjenigen von BIAM-markierten Peptiden mit Cysteinen an den Positionen C₅₂

(siehe Abb. 3.25a; Fraktion 42), C₈₅ (Fraktion 36), C₁₀₃ (Fraktionen 27 und 30) und C₃₂₈ (Fraktionen 31 und 47) übereinstimmen.

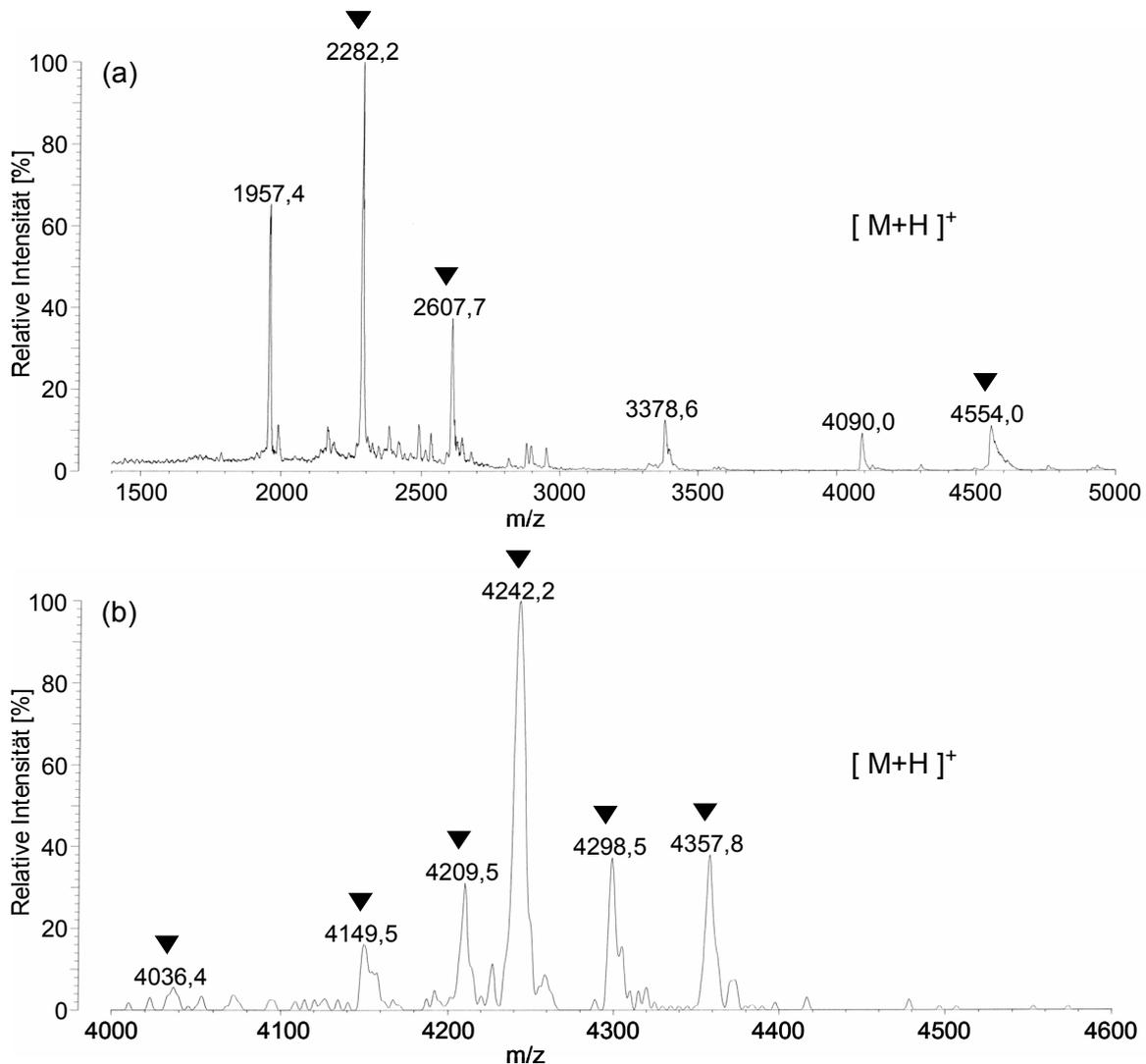


Abb. 3.25: Exemplarische Darstellung von MALDI-ToF-MS-Analysen BIAM-markierter ZP-Peptide.

Die tryptischen Peptide von angereichertem BIAM-markiertem ZPA-Protein (siehe Abb. 3.23) wurden durch RP-HPLC isoliert (siehe Abb. 3.24) und an einem Kratos MALDI-II Analytical Kompact Instrument (V 5.2) im positiven Modus vermessen.

(a) MALDI-ToF-MS-Spektrum der Fraktion 42. Die Pfeile kennzeichnen die Massen ($[M + H]^+$) des Peptids T₆₉₋₁₀₅ (ZPA) mit 1BIAM, 1CAM (m/z_{exp} 4554,0) und des Peptids T₃₆₋₅₆ (ZPA) in nicht modifizierter Form (m/z_{exp} 2282,2) sowie mit 1BIAM (m/z_{exp} 2607,7).

(b) MALDI-ToF-MS-Spektrum der Fraktion 28. Die Pfeile kennzeichnen die Massen ($[M + H]^+$) des Peptids T₂₄₅₋₂₈₂ (ZPA) mit 1BIAM (m/z_{exp} 4298,5) und 1BIAM, 1CAM (m/z_{exp} 4357,8) bzw. des Peptids T₁₆₇₋₂₀₂ (ZPB) mit 1CAM (m/z_{exp} 4036,4), 3CAM (m/z_{exp} 4149,5), 4CAM (m/z_{exp} 4209,5), 1BIAM (m/z_{exp} 4298,5) und 1BIAM, 1CAM (m/z_{exp} 4357,8).

In der ZP-Domäne wurden für die Cysteine an den Positionen C₄₀₂ (Fraktionen 27, 29, 33 und 50) und C₄₂₃ (Fraktionen 29, 30 und 31) biotinylierte Peptide als [M+H]⁺- sowie [M+Na]⁺-Addukte ermittelt. Die Peptide lagen mit Ausnahme von T₆₄₋₉₇ und T₃₂₂₋₃₃₉ zusätzlich nicht modifiziert (T₃₆₋₅₆, T₃₉₇₋₄₁₇) und carbamidomethyliert (T₉₈₋₁₀₆, T₃₉₇₋₄₁₇, T₄₀₈₋₄₂₆) vor. Für die Cysteine C_{135/152}, C_{357/359/371}, C_{543/564} und C_{613/618/628/632} wurden Signale für die Peptide T₁₂₆₋₁₅₄ (Fraktionen 28 und 32), T₃₄₀₋₃₈₀ (Fraktionen 33 und 34), T₅₃₈₋₅₇₂ (Fraktionen 37 und 40) und T₅₉₅₋₆₃₈ (Fraktionen 34 und 36) mit einer BIAM-modifizierten Thiolgruppe detektiert. Die Markierung konnte jedoch nicht einem Cystein zugeordnet werden.

Die ermittelten m/z_{exp} im Bereich von 4290 bis 4360 in den Fraktionen 27 und 28 entsprechen gleichzeitig dem modifizierten Peptid T₂₄₅₋₂₈₂ des ZPA-Proteins (C_{260/267}) und dem T₁₆₇₋₂₀₂ des ZPB-Proteins (C_{170/171/180/190}; siehe Abb. 3.25b). Die Signale der Fraktionen 36, 37 und 43 stimmen jedoch lediglich mit den [M+H]⁺-Addukten des modifizierten Peptids T₂₄₅₋₂₈₂ des ZPA-Proteins überein.

Darüber hinaus entsprechen Signale Peptiden des ZPB- und ZPC-Proteins mit unterschiedlicher Modifizierung durch BIAM und Jodacetamid. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Tab. 3.6 zusammengefasst.

Tab. 3.6: Zusammenfassung der durch MALDI-ToF-MS analysierten BIAM-markierten ZP-Peptide

Peptid	AS-Sequenz	Cystein	M+A	Peptid m/z _{exp}	Peptid m/z _{kalk}	F
ZPA						
T ₃₆₋₅₆	IGVNQLVNTAFPGIVTCHEN	C ₅₂	M+H	2282,2	2283,6	42
	R	C _{52_1BIAM}	M+H	2607,7	2610,0	
T ₆₄₋₉₇	ILGTKIQYTSVVDPLGLEMM NCTYVLDPENLTLK eine <i>missed cleavage</i>	C _{85_1BIAM}	M+H	4140,7	4140,9	36
T ₆₉₋₁₀₅	IQYTSVVDPLGLEMMNCTY VLDPENLTLKAPYEACTK eine <i>missed cleavage</i>	C _{85/103_1BIAM, 1CAM}	M+H	4554,0	4549,3	42
T ₉₈₋₁₀₆	APYEACTKR eine <i>missed cleavage</i>	C _{103_1CAM}	M+H	1097,8	1096,2	27
		C _{103_1BIAM}	M+H	1366,8	1365,6	
		C _{103_1BIAM}	M+Na	1387,6	1387,6	30

Tab. 3.6: Fortsetzung I

Peptid	AS-Sequenz	Cystein	M+A	Peptid m/z _{exp}	Peptid m/z _{kalk}	F	
ZPA							
T ₁₂₆₋₁₅₄	QEALMYHIS C PVMGAEGP	C _{135/152_2CAM}	M+H	3239,5	3236,7	28	
	DQHSGSTI C MK	C _{135/152_1BIAM}	M+H	3448,8	3449,0		
		C _{135/152}	M+H	3123,5	3122,6	32	
		C _{135/152_1BIAM}	M+H	3449,4	3449,0		
T ₂₄₅₋₂₈₂	HVSHGQSLILASQLI C VADP	C _{260/267_1BIAM}	M+H	4301,0*	4296,0	27	
	VTCNATHVTLA I PEFPGK	C _{260/267_1BIAM,} 1CAM	M+H	4357,8*	4353,1		
		C _{260/267_1BIAM}	M+H	4298,5*	4296,0	28	
		C _{260/267_1BIAM,} 1CAM	M+H	4357,8*	4353,1		
		C _{260/267_2CAM}	M+H	4082,8	4083,7	36	
		C _{260/267_1BIAM,} 1CAM	M+H	4348,5	4353,1		
		C _{260/267_1BIAM,} 1CAM	M+H	4349,8	4353,1	37	
		C _{260/267_1BIAM}	M+H	4298,7	4296,0	43	
	T ₃₂₂₋₃₃₉	TNVSEK C LPHQLYLSSLK	C _{328_1BIAM}	M+H	2383,8	2387,8	31
		eine <i>missed cleavage</i>	C _{328_1BIAM}	M+H	2392,6	2387,8	47
		C _{328_1BIAM}	M+Na	2408,9	2409,8		
T ₃₄₀₋₃₈₀	LTFHSQLEAVSMVI I PE C L	C _{357/359/371_1BIAM,} 1CAM	M+H	4963,6	4967,7	33	
	CE S TVSLVSEEL C TQDGF M						
	D V K	C _{357/359/371}	M+H	4588,6	4584,3	34	
		C _{357/359/371_3CAM}	M+H	4750,5	4755,4		
T ₃₉₇₋₄₁₇	VGDSS C QPTFKAPAQGLV	C _{402_1BIAM}	M+Na	2585,5	2586,0	27	
	Q F R	C ₄₀₂	M+H	2232,7	2237,5	29	
	eine <i>missed cleavage</i>	C _{402_1CAM}	M+H	2291,3	2294,6		
		C _{402_1BIAM}	M+H	2563,4	2564,0		
		C _{402_1BIAM}	M+H	2566,7	2564,0	33	
		C _{402_1BIAM}	M+H	2567,2	2564,0	50	
T ₄₁₈₋₄₂₆	IPL N GC G TR	C _{423_1BIAM}	M+Na	1281,3	1279,5	29	

Tab. 3.6: Fortsetzung II

Peptid	AS-Sequenz	Cystein	M+A	Peptid m/z _{exp}	Peptid m/z _{kalk}	F
ZPA						
T ₄₀₈₋₄₂₆	APAQGLVQFRIPLNG C GTR	C _{423_1} CAM	M+H	2058,1	2056,4	30
	eine <i>missed cleavage</i>	C _{423_1} BIAM	M+Na	2348,8	2347,8	
		C _{423_1} BIAM	M+Na	2347,4	2347,8	31
T ₅₃₈₋₅₇₂	LVLDD C WATSTEDPASLPQ	C _{543/564_2} CAM	M+H	4125,3	4123,5	37
	WNVVM DGCE YNLDNHR	C _{543/564_1} BIAM	M+H	4334,2	4335,8	
		C _{543/564_2} CAM	M+H	4125,3	4123,5	40
		C _{543/564_1} BIAM	M+H	4332,9	4335,8	
T ₅₉₅₋₆₃₈	TFAFVSGAQQVSQLVYF H C	C _{613/618/628/632_1} BIAM	M+H	5040,2	5041,8	34
	SVFIC N QLSPTFSL C SVTCH					
	GPSRS	C _{613/618/628/632_1} BIAM, 1CAM	M+H	5098,9	5098,9	
	eine <i>missed cleavage</i>					
		C _{613/618/628/632_4} CAM	M+H	4939,1	4943,6	36
		C _{613/618/628/632_1} BIAM, 1CAM	M+H	5102,3	5098,9	
ZPB						
T ₁₆₇₋₁₈₉	QLG C CYNSEEVPS C YYGN	C _{170/171/180_1} BIAM	M+H	2902,5	2901,2	34
	TVTSR	C _{170/171/180_1} BIAM, 1CAM	M+H	3283,9	3284,7	
T ₁₆₇₋₂₀₂	QLG C CYNSEEVPS C YYGN	C _{170/171/180/190_1} BIAM	M+H	4301,0*	4303,8	27
	TVTSR C TQDGHF S IAVSR					
	eine <i>missed cleavage</i>	C _{170/171/180/190_1} BIAM, 1CAM	M+H	4357,8*	4360,8	
		C _{170/171/180/190_1} CAM	M+H	4036,4	4034,4	28
		C _{170/171/180/190_3} CAM	M+H	4149,5	4148,5	
		C _{170/171/180/190_4} CAM	M+H	4209,5	4205,6	
		C _{170/171/180/190_1} BIAM	M+H	4298,5*	4303,8	
		C _{170/171/180/190_1} BIAM, 1CAM	M+H	4357,8*	4360,8	

Tab. 3.6: Fortsetzung III

Peptid	AS-Sequenz	Cystein	M+A	Peptid m/z_{exp}	Peptid m/z_{kalk}	F
ZPB						
T ₂₂₀₋₂₃₇	NDSECKPVMETHTFVLFR	C _{224_1BIAM}	M+H	2477,7	2480,9	27
T ₄₃₆₋₄₆₂	GPVYLHCTASVCKPAGAPI CVTTCPAA	C _{442/447/455/459_1CAM}	M+H	2691,1	2689,2	21
		C _{442/447/455/459_2CAM}	M+H	2749,4	2746,3	
		C _{442/447/455/459_1BIAM}	M+H	2956,9	2958,6	
ZPC						
T ₃₃₋₅₆	LRPSKPPTVMVEQCQEAQLV	C _{45_1CAM}	M+H	2711,8	2710,3	29
	VIVSK	C _{45_1BIAM}	M+H	2984,3	2979,6	
T ₆₄₋₉₀	LIRPADLSLGPAKCEPLVSQ	C ₇₇	M+H	2863,9	2865,3	24
	DTDAVVR	C _{77_1BIAM}	M+H	3191,7	3191,7	
	eine <i>missed cleavage</i>					
T ₂₁₁₋₂₅₁	LFVDHCVATLTPDWNTSPS	C _{216/238}	M+H	4433,8	4434,0	33
	HTIVDFHGCLVDGLTEASS	C _{216/238_1BIAM}	M+H	4760,1	4760,4	
	AFK	C _{216/238_2BIAM}	M+H	5083,1	5086,8	

* entspricht m/z_{exp} von verschiedenen BIAM-markierten Peptiden.

Die tryptischen BIAM-markierten Peptide wurden durch RP-HPLC getrennt und die einzelnen Fraktionen (F) im ELBA mit HRPO-Streptavidin getestet.

Die MS-Daten zeigen, dass die Cysteine der ZP-Proteine von Oocyten im GV-Stadium sowohl als freie Thiolgruppen als auch in Disulfidbrücken vorliegen.

4 Diskussion

Die Kenntnis der cDNA-/Proteinsequenzen der porcinen ZP-Proteine ermöglichte die Entwicklung von Methoden zur Analyse von posttranslationalen Modifikationen durch die Kombination von enzymatischer Fragmentierung und MALDI-ToF-Massenspektrometrie von Proteinen eines biologisch komplizierten Systems, wie es die Gameteninteraktion darstellt.

Da die glykosylierten Asparaginreste des ZPB/ZPC-Oligomers bekannt waren, konzentrierte sich diese Arbeit auf die Identifizierung der N-Glykosylierungsstellen des ZPA-Glykoproteins. Es wurden nicht nur die tryptischen Glykopeptide des im Gel gespaltenen Proteins, sondern auch die des in Lösung fragmentierten ZP-Gemisches untersucht. Diese strategische Vorgehensweise ermöglichte die Detektion der Glykopeptide, welche sich aufgrund ihrer Größe und Modifizierung schlecht oder gar nicht aus dem Gel eluieren ließen. Gleichzeitig konnten als Kontrolle für den Versuchansatz einige der für das ZPB- und ZPC-Protein identifizierten N-Glykosylierungsstellen bestätigt werden.

Durch N-Glykosidase F-Spaltung wird der Asparaginrest eines Proteins zu Asparaginsäure umgewandelt, wodurch es zu einer Zunahme von m/z_{kaik} 0,99 kommt. N-glykosylierte Positionen können daher in Glykoproteinen mit bekannter Aminosäuresequenz durch MS- sowie MS^n -Analysen der deglykosylierten tryptischen Peptide identifiziert werden (Boja et al., 2003). Bei der Fragmentierung des ZPA-Proteins entstehen zum Teil Peptide, die größer als 2 kDa sind. Solche Fragmente erzeugen aufgrund der Ausbildung kompakter Konformationen durch intramolekulare Wechselwirkungen ein unvollständiges und damit ein schwer interpretierbares Fragmentierungsmuster. Da dies die Zuordnung der Fragmentationen zu einem Peptid erschwert, wurde auf eine Sequenzierung durch MS^n -Fragmentierung verzichtet, und die Glykosylierung durch die Bestimmung des Molekulargewichtes der Glykopeptide als auch des korrespondierenden Peptids nach N-Glykosidase F-Spaltung nachgewiesen.

Die Strukturen der N-Glykane des porcinen ZP-Glykoproteingemisches sind bereits durch sequentielle Glykosidase-Spaltung in Kombination mit Methylierungsanalysen aufgeklärt worden (Mori et al., 1991, 1998). Durch die Kenntnis dieser Strukturen konnte die nähere Charakterisierung der N-gebundenen Oligosaccharide des ZPA-Proteins bzw. der ZP über einen massenspektrometrischen Ansatz erfolgen.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit indirekt das Disulfidbrückenmuster des ZPA-Proteins nach Markierung der ZP mit einem thiolmodifizierenden Reagenz (+ $m/z_{\text{kal}} 326,4$) durch MALDI-ToF-MS untersucht. Dabei wurden die korrespondierenden Peptide über ihr Molekulargewicht identifiziert. Durch den massenspektrometrischen Ansatz konnte bei der Entstehung eines Fragmentes mit mehreren Cysteinresten die Modifizierung keiner Position zugeordnet werden. Die ZP-Peptide müssten zur eindeutigen Bestimmung der freien Thiolgruppen N-terminal durch Edman-Abbau sequenziert werden. Auf die Bestimmung der Aminosäuresequenz ist jedoch in dieser Arbeit verzichtet worden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der hier angewandte massenspektrometrische Ansatz zur Charakterisierung von posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierung und Disulfidbrückenmuster eingesetzt werden kann.

4.1 Glykosylierung der ZP-Proteine

4.1.1 N-Glykosylierungsstellen in ZP-Glykoproteinen

ZPA ist das größte Glykoprotein der porcinen ZP. Das Protein enthält N-terminal zur ZP-Domäne ein 334 Aminosäuren langes Polypeptid, welches die biologisch wichtige Spaltstelle zwischen A₁₆₈ und D₁₆₉ enthält. In Oocyten im GV-Stadium liegt das Glykoprotein bereits partiell gespalten vor, und kann nach Reduktion der Disulfidbrücken in ein etwa 65 kDa großes Polypeptid sowie Polypeptide im Bereich von 20 bis 30 kDa gelelektrophoretisch aufgetrennt werden (Hasegawa et al., 1994). In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass fünf der sechs potentiellen N-Glykosylierungsstellen glykosyliert sind. Die potentiellen Asparaginreste N₈₄ und N₉₃ liegen in dem 20 bis 30 kDa-Polypeptid und innerhalb desselben tryptischen Peptids (I₆₉-K₉₇). Die Glykopeptide enthalten rechnerisch nur an einer Position N-gebundene Oligosaccharide. N-terminale Sequenzierung durch Edman-Abbau dieses Polypeptids resultierte in einer nicht identifizierbaren Aminosäure (X) an der Position N₈₄ sowie einem Asparaginrest an der Position N₉₃. Dies spricht dafür, dass die Oligosaccharide an der Position N₈₄ gebunden sind (Hasegawa et al., 1994). Der Vergleich der identifizierten N-glykosylierten Asparaginreste von orthologen ZPA-Proteinen zeigt, dass die Position N₈₄ die einzige N-Glykosylierungsstelle ist, die bei dem Schwein, dem Rind (N₈₃; Ikeda et al., 2002) und den Nagetieren (Maus: N₈₃, Ratte: N₇₂; Boja et al., 2003, 2005) konserviert ist (siehe Abb. 4.1, 4.2).

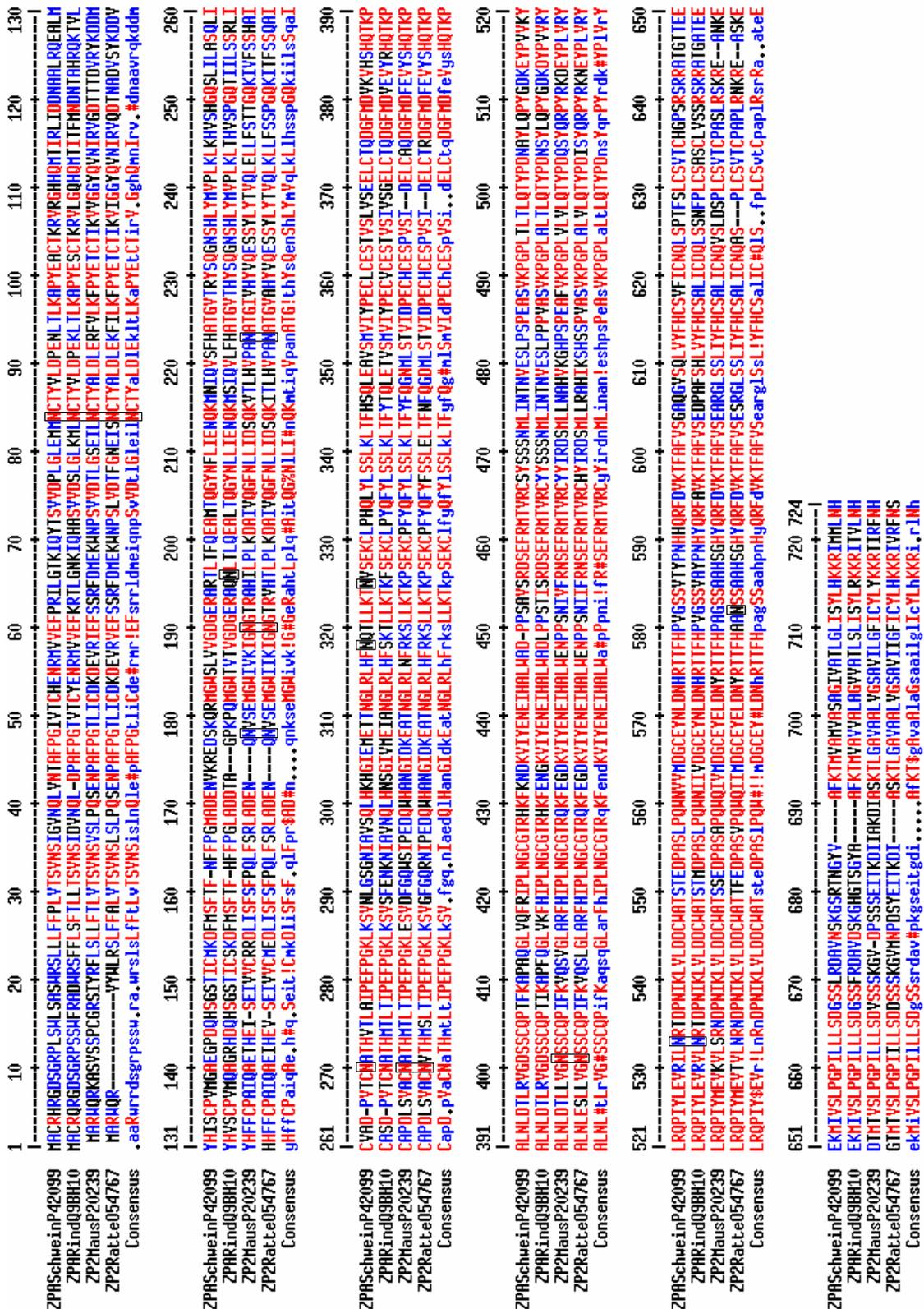


Abb. 4.1: Multiples Alignment der Aminosäuresequenzen des ZPA-Proteins bei Schwein, Rind, Maus und Ratte.

Die potentiellen bzw. identifizierten N-Glykosylierungsstellen sind durch schwarze Kästchen und die Aminosäuren mit hoher (rot) und niedriger (blau) Übereinstimmung farblich gekennzeichnet. Das Alignment wurde mit dem Multialign Programm (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>; 14.01.06) generiert.

Die N-Glykosylierungsstelle an der Position N₂₆₈ wurde anhand der isolierten Glykopeptide nach Spaltung des ZP-Glykoproteingemisches mit Trypsin charakterisiert. Nach Deglykosylierung wurde ein Signal bei m/z_{exp} 4084,2 detektiert, das aufgrund der Massengenauigkeit des Massenspektrometers neben dem carbamidomethylierten Peptid H₂₄₅-K₂₈₂ (m/z_{kalk} 4084,7) des ZPA-Proteins dem Peptid N₂₀₃-R₂₃₇ (m/z_{kalk} 4088,7) des ZPB-Proteins entsprechen kann. Das Peptid N₂₀₃-R₂₃₇ enthält zwei N-Glykosylierungsstellen (Kudo et al., 1998). Die Molekulargewichte der Glykopeptide erlauben rechnerisch jedoch nur Glykosylierung an einem Asparaginrest und können demnach dem ZPA zugeordnet werden. N-terminale Sequenzierung eines durch Con A-Affinitätschromatographie und RP-HPLC angereicherten tryptischen Glykopeptids des nativen ZP-Proteingemisches resultierte in der Sequenz HVSHGQSLILASQLIXVADPVT.... Sie entspricht dem N-Terminus des Peptids H₂₄₅-K₂₈₂ des ZPA-Proteins und bestätigt N-Glykosylierung an dem Asparaginrest der Position N₂₆₈ (Witzendorff et al., 2005). Die Sequenz N₂₆₈AT ist sowohl in dem porcinen, murinen (N₂₆₄AT) als auch dem bovinen (N₂₆₄AT) ZPA-Protein konserviert. Sie ist jedoch lediglich beim Schwein und der Maus glykosyliert. Das orthologe ZP2-Protein der Ratte trägt ebenfalls an der Position N₂₅₃ (N₂₅₃VT) N-gebundene Oligosaccharide. In der ZP-Domäne ist das Motiv NRT beim Schwein (N₅₃₀) und Rind (N₅₂₇) glykosyliert, während bei Maus und Ratte an der Position N₃₉₃ bzw. N₃₈₂ N-Glykane lokalisiert sind. Das Ratten ZP2-Protein enthält einen zusätzlichen glykosylierten Asparaginrest an der Position N₅₆₃ in dem ZP-Modul. Weitere N-Glykosylierungsstellen des ZPA-Proteins bei dem Schwein (N₃₁₆ und N₃₂₃) als auch dem Rind (N₁₉₁) liegen im N-terminalen Polypeptid und sind nicht konserviert. Die Sequenzen NVS und NAT des ZP2-Proteins der Maus (N₁₇₂, N₂₁₇) sowie der Ratte (N₁₆₁, N₂₀₆) tragen N-Glykane, und die murine N-Glykosylierungsstelle an der Position N₁₈₄ (NGT) ist möglicherweise bei dem orthologen ZP-Protein der Ratte (N₁₇₃) glykosyliert (siehe Abb. 4.1, 4.2).

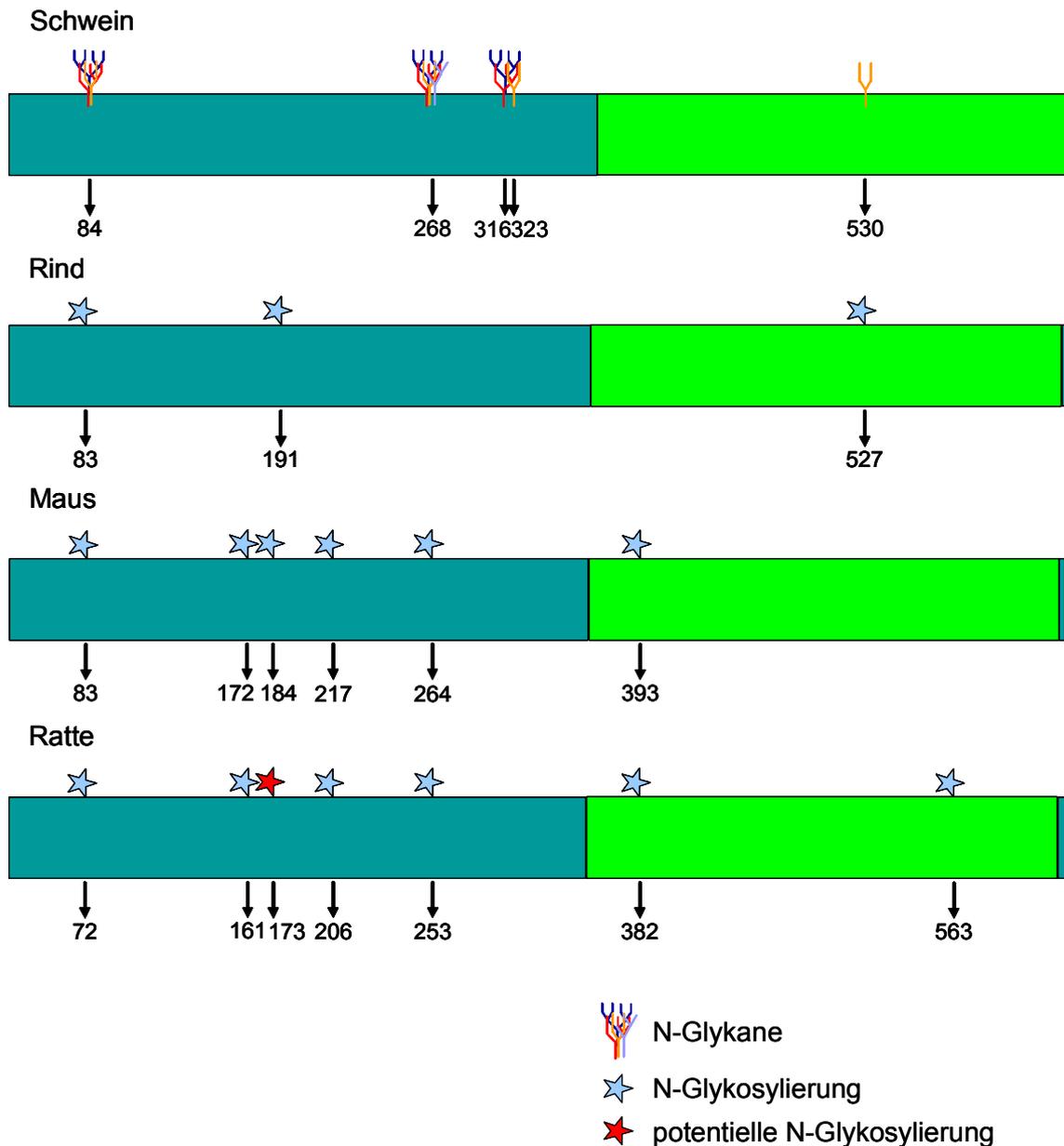


Abb. 4.2: Vergleich der N-Glykosylierungsstellen des ZPA Proteins bei Schwein, Rind, Maus und Ratte.

Die vorhergesagten N-Glykosylierungsstellen des porcinen ZPB- und ZPC-Proteins liegen in der ZP-Domäne. Alle drei potentiellen Asparaginreste des ZPB-Proteins an den Positionen N₂₀₃, N₂₂₀ und N₃₃₃ tragen N-Glykane (Kudo et al., 1998). Die Sequenzen N₂₀₃VT und N₂₂₀DS sind in dem bovinen orthologen ZP-Protein (N₂₀₂VT bzw. N₂₁₉DS) konserviert. Im ZP1 bei Maus und Ratte ist das konservierte Motiv NAS mit den Positionen N₃₇₁ und N₃₆₉ in dem ZP-Modul glykosyliert. Das Protein enthält bei beiden Spezies ein N-terminales Polypeptid, welches beim porcinen ZPB prozessiert vorliegt und mit D₁₃₇ beginnt (Yonezawa et al., 1997). Innerhalb des N-Terminus tragen bei dem murinen ZP1-Protein die Asparaginreste

an den Positionen N₄₉, N₆₈ sowie N₂₄₀ und bei dem orthologen Protein der Ratte an den Positionen N₄₉ und N₆₈ N-gebundene Oligosaccharide (Boja et al., 2003, 2005). In dem porcinen ZPC-Protein sind an den Positionen N₁₂₄, N₁₄₆ und N₂₇₁ der vier potentiellen N-Glykosylierungsstellen Glykane lokalisiert (Yonezawa et al., 1999). Die Sequenzen N₁₄₆VS und N₂₇₁DS sind sowohl bei dem Schwein, dem Rind als auch den Nagetieren (N₁₄₆VS und N₂₇₃DS) konserviert, und bei den Letzteren wurde eine Glykosylierung nachgewiesen (Boja et al., 2003, 2005). Eine potentielle N-Glykosylierungsstelle mit dem Motiv N₁₂₄LS befindet sich ebenfalls im orthologen bovinen ZP-Protein. Das ZP3-Protein der Maus und Ratte enthält in der ZP-Domäne eine zusätzliche glykosylierte Position innerhalb der Sequenz N₃₀₄KT. Bei der Maus ist das Protein außerdem an den Asparaginresten der Positionen N₃₂₇ und N₃₃₀ glykosyliert. Bei der Ratte konnte Glykosylierung an der Position N₃₃₀ detektiert werden. Die bei beiden Spezies konservierten Sequenzen N₃₂₇CS und N₃₃₀SS liegen innerhalb des C-Terminus des Proteins, der bei dem porcinen orthologen ZPC-Protein prozessiert ist (Boja et al., 2003, 2005; Yonezawa und Nakano, 2003). Die N-Glykosylierungsstellen von orthologen ZP-Proteinen sind demnach trotz der hohen Konservierung der Aminosäuresequenzen grundsätzlich nicht konserviert. Zu diesem Zeitpunkt kann nicht gesagt werden, welchen Einfluss das unterschiedliche Glykosylierungsmuster auf die dreidimensionale Struktur der ZP bei verschiedenen Spezies hat.

4.1.2 N-gebundene Oligosaccharide von ZP-Proteinen

Für die porcinen ZP-Glykoproteine (Mori et al., 1991, 1998) und ZPB/ZPC (Noguchi und Nakano, 1992; Noguchi et al., 1992) sind bi-, tri und tetraantennäre N-Glykane vom komplexen Typ mit einem α 1,6-fucosylierten Pentasaccharid identifiziert worden, deren Antennen teilweise mit repetierenden N-Acetyllactosamineinheiten verlängert sind. Die Mehrheit der neutralen (siehe Abb. 4.3a) und der durch Sulfatierung/Sialylierung sauren N-Glykane (siehe Abb. 4.4a) sind biantennäre Strukturen.

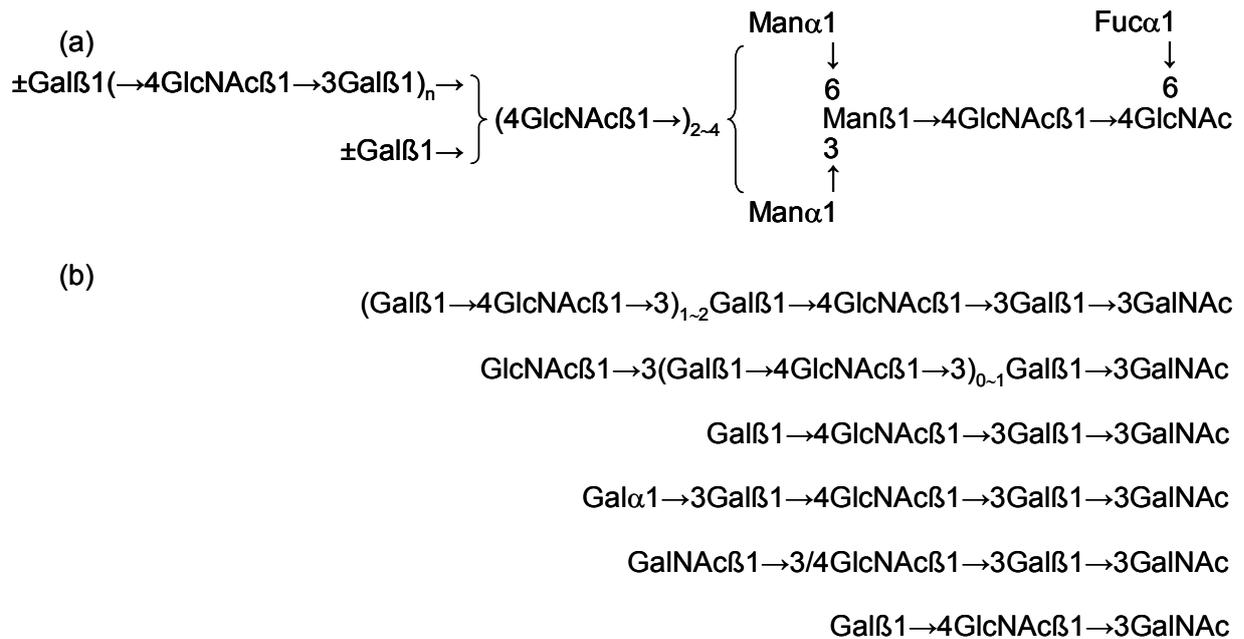


Abb. 4.3: Strukturen der neutralen Glykane der porcinen ZP (Takasaki et al., 1999).

Die Glykoproteine tragen bi-, tri und tetraantennäre N-Glykane mit einem $\alpha 1,6$ -fucosylierten Core-GlcNAc, sowie repetierenden und nicht repetierenden Antennen (a). Zum Vergleich sind die Strukturen der neutralen O-Glykane dargestellt (b).

Das LCA-Bindungsmuster der ZP nach gelelektrophoretischer Auftrennung gab erste Hinweise, dass die Proteine komplexe N-gebundene Oligosaccharide mit einem Fucoserest enthalten. Die N-Glykanprofile des desialylierten und nativen ZPA-Proteins bestätigten das dominante Auftreten von fucosylierten biantennären Strukturen mit einer sowie zwei terminalen Hexosen in den neutralen und aziden Glykoformen des Proteins. Der Anteil von Oligosacchariden mit sich wiederholenden N-Acetyllactosamineinheiten ist verhältnismäßig gering. Dies zeigt sich auch in der geringen Abnahme des Molekulargewichtes des Glykoproteins nach Endo- β -Galactosidase-Spaltung. Die lactosaminylierten Strukturen ließen sich erst nach Desialylierung des ZPA-Proteins nachweisen. Da sialylierte Oligosaccharide mit der Matrix 2,5-DHB schwer nachweisbar sind, kann daraus geschlossen werden, dass die N-Glykane an ihren N-Acetyllactosamineinheiten Sialinsäure tragen. Die starken Signale für bi- und triantennäre N-Glykane mit nur einer oder zwei terminalen Hexosen des nativen sowie desialylierten Glykoproteins sind Hinweise, dass ein erheblicher Anteil der Oligosaccharide N-Acetylglucosaminreste an dem nicht reduzierenden Ende trägt.

Der größte Unterschied zwischen den kürzlich und den in dieser Arbeit identifizierten N-Glykanstrukturen der ZP ist der Nachweis eines High-Mannose-Typ N-Glykans im

ZPA-Protein. Die Arbeitsgruppe von Mori (Mori et al., 1991, 1998) wies lediglich komplexe N-gebundene Oligosaccharide im porcinen ZP-Glykoproteingemisch und diejenige von Nakano (Nakano und Yonezawa, 2001) in dem ZPB/ZPC-Oligomer nach. MSⁿ-Fragmentierungsmuster bestätigten jedoch die Struktur eines Pentamannosylglykans im ZPA-Glykoprotein, und tryptische pentamannosylierte Glykopeptide (H₂₄₅-K₂₈₂) mit der Position N₂₆₈ des ZPA-Proteins wurden nach In-Gel-Spaltung und Con A-Affinitätschromatographie sowie RP-HPLC gewonnen. Zusätzlich wurden schwache Signale des Glykopeptids nach Isolierung der tryptischen Glykopeptide des ZP-Proteingemisches über LCA-Agarose detektiert. Das Lektin LCA bindet mit hoher Affinität an N-Glykane mit einer α 1,6-fucosylierten Core-Struktur (Kornfeld et al., 1981; Marquardt et al., 1999), aber auch mit geringer Affinität an α -Mannose und α -Glucose (Marquardt et al., 1999). Möglicherweise wurde eine schwache Interaktion zwischen dem pentamannosylierten Peptid H₂₄₅-K₂₈₂ und dem Lektin durch das ungünstige Verhältnis von Glykopeptid zum Säulenmaterial begünstigt. Parallel wurde unter gleichen analytischen Bedingungen ein N-Glykanprofil für das ZPB/ZPC-Proteingemisch erstellt. Es wurde entsprechend der publizierten Oligosaccharidstrukturen (Noguchi et al., 1992) kein High-Mannose-Typ N-Glykan identifiziert. Dies zeigt die spezifische Lokalisation des Pentamannosylglykans an der Position N₂₆₈ des ZPA-Proteins.

In den ZP-Proteinen von *in vitro* gereiften Oocyten im MII-Stadium wurde in dieser Arbeit jedoch kein pentamannosyliertes Oligosaccharid nachgewiesen, und weitere neutrale N-Glykane der desialylierten ZP-Proteine unterschieden sich von denjenigen der ZP von Oocyten im GV-Stadium. Während der folliculären Entwicklung durchläuft die Oocyte eine Wachstums- und Reifungsphase. In diesem Zeitraum synthetisieren beim Schwein die Oocyte und die sie umgebenden Granulosazellen Stadiumspezifisch die ZP-Proteine (Sinowatz et al., 2001; siehe 1.3.1). Dabei verdoppelt sich der Proteingehalt der ZP (Töpfer-Petersen, persönliche Mitteilung). Die MS-Daten lassen vermuten, dass die Proteine in den Granulosazellen und der Oocyte unterschiedlich N-glykosyliert werden, und sich während des Wachstums oder der Reifung der Oocyte ihr Beitrag zum Aufbau der ZP verändert. Das in dieser Arbeit verwendete Schlachtmaterial enthielt wahrscheinlich vorwiegend Oocyten in frühen folliculären Stadien, dessen ZP-Proteine ein pentamannosyliertes Oligosaccharid trugen. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass Aviles et al. (2000) bei verschiedenen Spezies unterschiedliche Monosaccharidreste der ZP-Proteine in

verschiedenen Entwicklungsstadien der Oocyte sowie in den verschiedenen Schichten der ZP nachweisen konnten.

N-Glykane vom High-Mannose-Typ sind ebenfalls in dem orthologen Protein beim Rind (Ikeda et al., 2002) und den ZP-Proteinen der Maus (Easton et al., 2000) identifiziert worden. In dem bovinen ZPA ist das Oligosaccharid mit der Struktur $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ an den N-Glykosylierungsstellen N_{83} und N_{191} und zu einem geringen Anteil an der Position N_{527} lokalisiert. Für ZPB und ZPC ist die Zuordnung der N-Glykane noch nicht bekannt. Bei der Gameteninteraktion beim Rind spielen das Pentamannosylglykan sowie das ZPB-Protein die entscheidende Rolle (Amari et al., 2001; Yonezawa et al., 2001). Es ist noch nicht geklärt, ob das ZPA-Protein an der Interaktion zwischen dem Spermatozoon und der Oocyte beteiligt ist. Weiterhin bindet rekombinantes ZPB-Protein vom Schwein mit N-Glykanen vom Paucimannosidischen und High-Mannose-Typ an bovine, aber nicht an porcine Spermien. Dies zeigt, dass die Glykosylierung der ZP-Proteine Spezies-spezifisch abläuft und eine entscheidende Rolle bei der Spezies-selektiven Erkennung beider Gameten spielt (Yonezawa et al., 2005b).

Die High-Mannose-Typ N-Glykane der murinen ZP-Glykoproteine haben vorwiegend die Struktur $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, es sind jedoch auch Oligosaccharide mit bis zu neun Mannoseresten nachgewiesen worden (Easton et al., 2000). Sie sind bis jetzt keinem ZP-Protein zugeordnet worden, allerdings wurden für das ZP2- und ZP3-Protein keine N-Glykane vom High-Mannose-Typ detektiert (Noguchi und Nakano, 1993). Ob die pentamannosylierten N-Glykane eine Rolle bei der Bindung des Spermatozoons an die Oocyte spielen ist noch nicht geklärt. Dafür würde allerdings sprechen, dass murine Oocyten mit einer ZP ohne N-Glykane vom komplexen Typ und Hybrid-Typ befruchtet werden (Shi et al., 2004). Auch die potentiellen Spermien-bindenden O-Glykane des ZP3-Proteins konnten massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden (Boja et al., 2003).

Die Daten zeigen, dass sich die N-Glykanmuster der ZP von Oocyten in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und bei verschiedenen Spezies unterscheiden. Dies deutet auf Unterschiede in biochemischen und physiochemischen Eigenschaften der orthologen Proteine hin.

4.1.3 Saure Glykane der porcinen ZP-Proteine

Die Azidität der porcinen ZP beruht auf Sialylierung und/oder Sulfatierung der N- und O-Glykane der ZP-Proteine. Die Sulfatierung der N-gebundenen Oligosaccharide erfolgt hauptsächlich an der C-6 Position des GlcNAc-Restes ($\text{SO}_3^- \rightarrow 6\text{GlcNAc}$) der sich wiederholenden und nicht wiederholenden Antennen. Zusätzlich wurden zu einem geringen Ausmaß Sulfatreste an der C-3 Position des reduzierenden terminalen GlcNAc-Restes ($\text{SO}_3^- \rightarrow 3\text{GlcNAc}$) nachgewiesen. Sialylierte N-Glykane tragen $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}$ an den repetierenden N-Acetyllactosamineinheiten. Allerdings wurden auch die isomerischen Verbindungen $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}$ und $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 6\text{Gal}$ an den sich nicht wiederholenden Antennen identifiziert. Weiterhin enthalten die N-Acetyllactosamineinheiten der sauren N-Glykane geringfügig verschiedene sulfatierte und nicht sulfatierte Formen von fucosylierten Strukturen, wie $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4(\pm\text{SO}_3^- \rightarrow 6)\text{GlcNAc}$ (Typ 2H), $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4(\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3)(\pm\text{SO}_3^- \rightarrow 6)\text{GlcNAc}$ (Le^x) und $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3/4(\pm\text{SO}_3^- \rightarrow 6)\text{GlcNAc}$ (siehe Abb 4.4a; Mori et al., 1998; Takasaki et al., 1999).

Noguchi und Nakano (1992) charakterisierten die Strukturen der sauren N-gebundenen Ketten des ZPB/ZPC-Oligomers. Endo- β -Galactosidase spaltet die β -galactosidische Verbindung der repetierenden N-Acetyllactosamineinheiten der Antennen. Die sauren Fragmente der Oligosaccharide des ZPB/ZPC-Proteingemisches nach Endo- β -Galactosidase-Spaltung hatten die Strukturen $\text{Neu5Ac}/\text{Gc}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4(\text{SO}_3^- \rightarrow 6)\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}$ und $\text{SO}_3^- \rightarrow 6\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}$. Somit liegt Sulfatierung an der C-6 Position des GlcNAc-Restes und Sialylierung am nicht reduzierenden terminalen Galactoserest von sich wiederholenden N-Acetyllactosamineinheiten vor. Galactosereste der nicht repetierenden Antennen tragen ebenfalls $\text{NeuAc}/\text{Gc}\alpha 2 \rightarrow 3$ -Reste (siehe Abb. 4.4a).

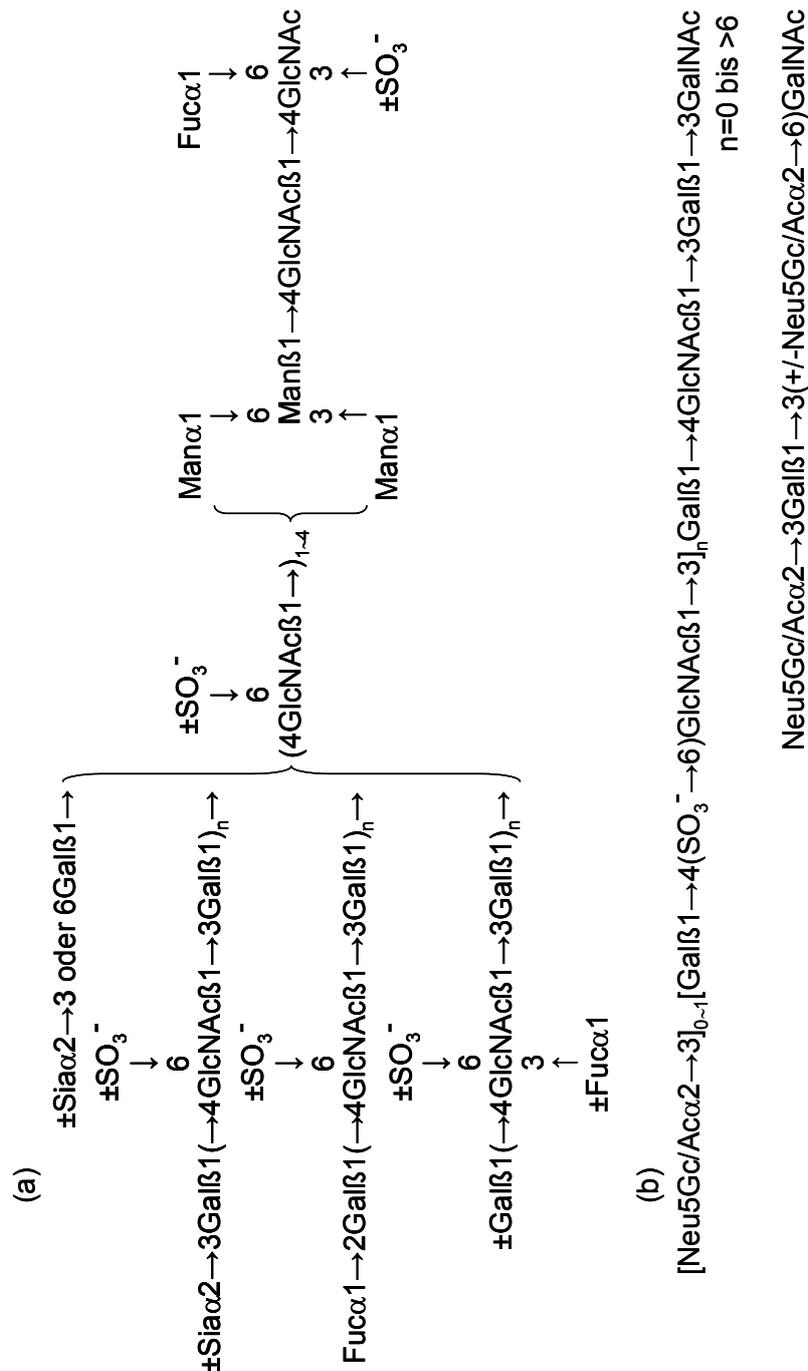


Abb. 4.4: Strukturen der sauren N- (a) und O-Glykane (b) der porcinen ZP (Takasaki et al., 1999).

Die sauren O-Glykane der ZP-Proteine zeigen bei den hauptsächlich vorkommenden Oligosacchariden eine extrem hohe Variation in ihren Strukturen, welche auf der Kombination der Elemente Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc, Gal β 1 \rightarrow 4(6SO $_3^-$)GlcNAc und Neu5Ac/Gc α 2,3 beruht (siehe Abb. 4.4b). Dies resultiert in einer Reihe von unterschiedlich sialylierten und sulfatierten lactosaminylierten Oligosacchariden. Bei einer geringen Anzahl der sauren O-

Glykane ist die Struktur Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc durch Neu5Ac α -2,6GalNAc und/oder Neu5Ac α -2,3Gal ersetzt (Hokke et al., 1994).

2D-gelelektrophoretische Analysen der ZP-Proteine von Oocyten im GV-Stadium bestätigen Sulfatierung und Sialylierung der Glykoproteine. Isoformen der desialylierten und desialylierten/desulfatierten ZP-Proteine waren im Vergleich zu denen der nativen ZP in Richtung Kathode verschoben. Die Ausdehnung der desialylierten Glykoformen des ZPB/ZPC-Proteingemisches nach Abspaltung der Sulfatreste in den alkalischen Bereich zeigt, dass Sulfatierung vorwiegend am ZPB- und ZPC-Protein vorliegt. Weiterhin weist der signifikante alkaline pI-Shift der desialylierten partiell durch Endo- β -Galactosidase deglykosylierten ZP-Proteine nach chemischer Desulfatierung auf SO_3^- -Reste hin, welche direkt an die Core-Struktur und/oder am reduzierenden GlcNAc der komplexen N-Glykane gebunden sind. Da auch bei den O-Glykanen zu einem geringen Anteil Sulfatreste an den an die Core-Struktur gebundenen N-Acetylglucosaminresten nachgewiesen wurden (Hokke et al., 1994), trägt die Desulfatierung der O-gebundenen Oligosaccharide zu der Verschiebung von ZP-Isoglykoproteinen bei.

Es gibt nur sehr wenige Matrices, die zur MALDI-ToF-MS-Analyse von sulfatierten Glykanen geeignet sind. D-Arabinosazon hat sich hierfür bewährt, ist jedoch käuflich nicht erhältlich und wurde deshalb durch Synthese aus D-Arabinose hergestellt. Zur Charakterisierung der sulfatierten N-Glykane wurde zunächst eine MALDI-ToF-MS-Methode anhand der Oligosaccharide von Oocyten im GV-Stadium etabliert. Vorversuche zeigten, dass die Co-Kristallisation mit den Analyten nicht gleichmäßig erfolgte. Wenige Bereiche auf dem Target erlaubten die Aufnahme eines MS-Spektrums. Dies erschwerte zusammen mit einem starken Hintergrundrauschen die Untersuchungen. Es ist nicht auszuschließen, dass Verunreinigungen der Matrix dafür verantwortlich waren. Andererseits spricht einiges dafür, dass die ZP-Proteine nur zu einem geringen Anteil Sulfatreste tragen und die eingesetzte Glykanmenge damit an der Nachweisgrenze lag.

In dieser Arbeit wurden fucosylierte bi-, tri und tetraantennäre N-Glykane mit sowie ohne repetierende N-Acetyllactosamineinheiten nachgewiesen, die lediglich einen Sulfatrest tragen. Die MS^2 -Fragmentierungsmuster bestätigten die von Mori (1998) identifizierte Sulfatierung an einem N-Acetylhexosaminrest einer Antenne und der Core-Struktur. Es kann jedoch bei den lactosaminylierten Oligosacchariden nicht zwischen einer Sulfatierung an den repetierenden und nicht repetierenden

Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc-Strukturen unterschieden werden. Für das ZPB/ZPC-Proteingemisch ist lediglich Sulfatierung an sich wiederholenden N-Acetyllactosamineinheiten nachgewiesen worden (Noguchi und Nakano, 1992). Dies könnte bedeuten, dass ZPA und ZPB/ZPC unterschiedlich sulfatiert vorliegen. Weiterhin wurden keine aziden Oligosaccharide vom monoantennären komplexen Typ identifiziert.

Bei der Charakterisierung der Oligosaccharidstrukturen der desialylierten ZP-Proteine von *in vitro* gereiften Oocyten konnten keine sulfatierten N-Glykane detektiert werden, da die eingesetzte Glykankonzentration zu gering war. Das Glykanprofil der neutralen N-gebundenen Oligosaccharide unterschied sich jedoch von demjenigen der ZP von Oocyten im GV-Stadium. Das Fehlen von Glykanen mit N-Acetyllactosamineinheiten im höhermolekularen Bereich könnte bedeuten, dass die ZP von Oocyten im MII-Stadium einen hohen Anteil von sulfatierten lactosaminylierten Oligosacchariden enthalten. Um dies zu beantworten, müssten die MS-Messungen mit einer größeren Menge von sulfatierten Oligosaccharidstrukturen durchgeführt werden. Die In-vitro-Maturation von Oocyten ist jedoch sehr aufwendig und im größeren Ansatz nicht möglich. Die These, dass die ZP in verschiedenen Entwicklungsstadien unterschiedliche Oligosaccharidstrukturen enthält, wird dadurch gestützt, dass In-vitro-Maturation von Oocyten vom GV- ins MII-Stadium in einem signifikanten aziden Shift der ZP-Proteine in 2D-gelelektrophoretischen Auftrennungen resultierte und Untersuchungen mit Sialinsäure-erkennenden Lektinen keine Veränderung des Glykanmusters oder des Grades der Sialylierung zeigten (Rath et al., 2005). Auch bei der Analyse der Glykoproteine von präpuberalen Schlachtsauen und adulten Tieren mit etwa vergleichbarer Größenverteilung der Oocyten konnte bei den Letzteren ein deutlicher Shift der isoelektrischen Profile um etwa eine pI-Einheit zum sauren pI beobachtet werden (Töpfer-Petersen, persönliche Mitteilung).

Eine Zunahme von sulfatierten ZP-Glykoproteinen während der Reifung der Oocyte ist im Hinblick auf die Rolle von sulfatierten Oligosacchariden in der Befruchtungskaskade sehr interessant. Das intraakrosomale Proakrosin bindet als sekundäres ZP-bindendes Protein an polysulfatierte Gruppen der ZP-Glykoproteine, wobei die Glykanstrukturen für die korrekte stereochemische Anordnung der Sulfatreste verantwortlich sind. Beim Schwein sind alle drei ZP-Proteine sulfatiert und binden an Proakrosin (Howes und Jones, 2002). Welche Rolle die aziden

Glykanstrukturen des ZPA-Proteins bei der Befruchtung spielen und ob lediglich das ZPA-Protein Sulfatierung an nicht repetierenden Antennen und der Core-Struktur seiner N-Glykane trägt, bedarf der weiteren Untersuchung.

4.2 Verteilung oxidativ-sensitiver Thiolgruppen in ZP-Proteinen

In sezernierten Proteinen stellen Disulfidbrücken eines der wichtigsten Elemente der korrekten Proteinfaltung dar und sind für die Stabilität der dreidimensionalen Proteinstruktur verantwortlich. Sie werden in Eukaryoten vorwiegend im ER in einem von Redoxprozessen-abhängigen Mechanismus durch Oxidation der Cysteinthiolgruppen (Cys-SH) in dem naszierenden Protein gebildet (Tu und Weissman, 2004).

Durch Untersuchungen der bovinen ZP mit dem thiolmodifizierenden Reagenz Monobrombiman konnte gezeigt werden, dass während der Befruchtung in den ZP-Proteinen Cysteinreste oxidiert werden. Dabei werden im ZPA-Protein in erster Linie intramolekulare Disulfidbrücken gebildet, welche zum so genannten „Zona Hardening“ und somit zur Verhinderung von Polyspermie beitragen (Iwamoto et al., 1999). In Vorarbeiten für die vorliegende Arbeit wurden im porcinen Modell die freien Cysteinreste der ZP-Proteine im Hinblick auf ihre biologische Funktion mittels Rasterelektronenmikroskopie strukturell analysiert. Hierfür wurden die oxidativ-sensitiven Thiolgruppen der ZP-Proteine von Oocyten in verschiedenen Entwicklungsstadien und nach In-vitro-Befruchtung mit Biotin-konjugiertem Jodacetamid (BIAM) bei pH 6,5 markiert. Die Säurekonstante (pK_a -Wert) der Cys-SH-Reste beträgt bei den meisten Proteinen $\sim 8,5$; sie wird jedoch durch die Ladung der AS-Reste in der Umgebung der Thiolgruppen beeinflusst. Die oxidativ-sensitiven Cysteinreste mit einem niedrigen pK_a -Wert können bei pH 6,5 selektiv mit BIAM markiert werden (Kim et al., 2000). Die Abnahme der Bindung von goldgekoppeltem Streptavidin an die porcinen Zonae pellucidae von gereiften Oocyten nach In-vitro-Befruchtung zeigte, dass wie beim Rind während der Befruchtung neue Disulfidbrücken gebildet werden (Moreira, 2005). Es stellte sich daher die Frage, ob insbesondere das porcine ZPA-Protein von Oocyten im GV-Stadium unter physiologischen Bedingungen ein definiertes Muster oxidativ-sensitiver Thiolgruppen enthält.

Zur biochemischen Analyse der ZP müssen die isolierten Glykoproteine bei 72°C solubilisiert werden. Da unter diesen Bedingungen das Disulfidbrückenmuster von

Proteinen durch temperaturbedingtes Disulfidscrambling modifiziert werden kann, wurden die Thiolgruppen der ZP-Proteine bereits an der intakten dreidimensionalen ZP mit BIAM markiert. Gelöste ZP-Glykoproteine wurden anschließend durch RP-HPLC getrennt, und angereichertes ZPA-Protein nach Reduktion und Carbamidomethylierung tryptisch gespalten. Die Identifizierung der biotinylierten Peptide erfolgte nach Aufnahme eines MS-Spektrums über ihre m/z-Werte. Es wurden sowohl für den N-Terminus als auch für die ZP-Domäne des ZPA-Glykoproteins Signale für tryptische Peptide mit einer BIAM-Markierung detektiert. Die Peptide enthielten zum Teil mehrere Cysteinreste, in denen das Biotin keiner Position zugeordnet werden konnte. Die Cysteinreste lagen mit Ausnahme von C₈₅ und C₃₂₈ zusätzlich sowohl in Fragmenten mit einer Cys-SH-Gruppe als auch in denjenigen mit einem Cysteincluster nicht modifiziert und/oder carbamidomethyliert vor. Die Cysteincluster enthielten in den Peptidformen keine oder lediglich eine oxidativ-sensitive Thiolgruppe und die weiteren Cysteinreste lagen in Disulfidbrücken vor. Dabei könnte jede Thiolgruppe der verschiedenen Cysteine in einem Peptid mit BIAM markiert sein. Dies könnte bedeuten, dass ZPA-Glykoproteine mit unterschiedlichen Disulfidbrückenmustern vorliegen. Andererseits waren möglicherweise einige Thiolgruppen durch Clusterung der Cys-SH-Gruppen für das BIAM-Reagenz nicht zugänglich und wurden nach Reduktion carbamidomethyliert. Demnach würde das ZPA-Protein weitere nicht identifizierte oxidativ-sensitive Cysteinreste enthalten.

Die meisten Positionen der Cysteinreste in orthologen ZP-Proteinen sind konserviert. Dies lässt eine ähnliche dreidimensionale Struktur der Glykoproteine vermuten (Harris et al., 1994). Das intramolekulare Disulfidbrückenmuster ist zum Teil in dem ZPB- sowie ZPC-Protein des Schweines, den ZP-Proteinen der Nagetiere (Maus und Ratte; siehe Abb. 4.5) und den Matrixproteinen (VE-Proteinen) des Fisches bestimmt worden (Yonezawa und Nakano, 2003; Boja et al., 2003, 2005; Darie et al., 2004). Hierfür wurden enzymatische Fragmente der Glykoproteine unter reduzierenden als auch nicht reduzierenden Bedingungen massenspektrometrisch analysiert. Für die N-Termini der verschiedenen Glykoproteine wurde lediglich in dem murinen ZP2-Protein eine Disulfidbrücke zwischen C₈₄ und C₁₀₂ identifiziert (siehe Abb. 4.5; Boja et al., 2003).

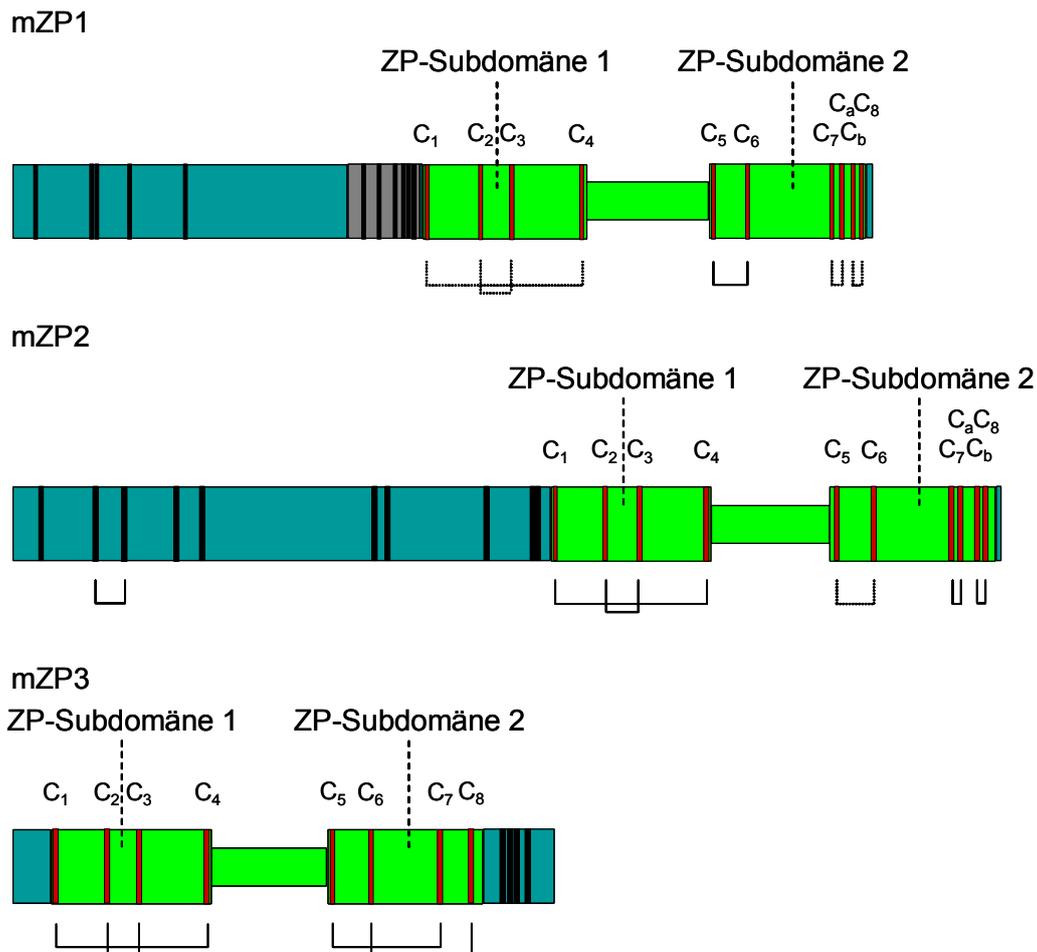


Abb. 4.5: Identifiziertes Disulfidbrückenmuster der murinen ZP-Proteine.
Cysteine sind durch schwarze bzw. rote Balken dargestellt.

Die ZP-Domäne enthält in den ZP- und VE-Proteinen acht (C₁-C₈) konservierte Cysteinreste und besteht aus zwei Subdomänen. In den ZP1- und ZP2- (ähnlichen) Proteinen sind in dem C-terminalen Submodul zusätzlich die Cysteine C_a und C_b konserviert (Jovine et al., 2004, 2005). Die Disulfidbrücken C₁-C₄ und C₂-C₃ liegen innerhalb der N-terminalen Subdomäne. Sie wurden sowohl in dem murinen ZP2- und ZP3-Protein (siehe Abb. 4.5) als auch in den orthologen VE-Proteinen identifiziert. In dem porcinen ZPB-Protein sind C₂ und C₃ ebenfalls durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (Kudo et al., 1998). Darüber hinaus ergab die Analyse von Fragmenten des ZPC-Proteins, dass die Cysteinreste C₁, C₂, C₃ und C₄ untereinander Disulfidbrücken bilden (Yonezawa und Nakano, 2003). Das Disulfidbrückenmuster lässt eine konservierte dreidimensionale Struktur der Subdomäne 1 bei den Fischen und Säugetieren vermuten.

In der C-terminalen ZP-Subdomäne bei dem ZP3- (ähnlichen) Protein bei Maus und Fisch wurden die Disulfidbrücken C₅-C₇ und C₆-C₈ identifiziert.

Yonezawa und Nakano (2003) isolierten nach Bromcyanspaltung des porcinen ZPC-Proteins ein Fragment, das aus der Subdomäne 2 und dem C-Terminus des Glykoproteins besteht, wobei das Disulfidbrückenmuster nicht bestimmt worden ist. In dem C-terminalen ZP-Submodul des ZP2-ähnlichen Fisch-Proteins sind die Cysteine C₅-C₆, C₇-C_a sowie C₈-C_b und im ZP1-ähnlichen Protein C₇-C_a miteinander verbunden. Auch im murinen ZP1-Protein ist C₅-C₆ und im ZP2-Protein sind C₇-C_a und C₈-C_b nachgewiesen worden. Die Disulfidbindungen des porcinen ZPB-Proteins scheinen dagegen C₅-C₇, C₆-C₈ sowie C_a-C_b zu sein. Das abweichende Disulfidbrückenmuster des porcinen ZPB könnte auf Disulfidscrambling zurückzuführen sein, da die enzymatische Spaltung bei einem alkalischen pH erfolgte (Darie et al., 2004).

Die Disulfidbrückenbildung in der ZP und den ZP-Domänen-Proteinen weist sowohl auf eine unabhängige Faltung ihrer Submodule als auch auf ein identisches Disulfidbrückenmuster in der N-terminalen Subdomäne hin. Die ZP-Domäne ist für die Polymerisierung einer großen Anzahl von extrazellulären Proteinen in Filamente mit ähnlicher supramolekularer Struktur verantwortlich (Jovine et al., 2002). Die Bildung von Disulfidbrücken zwischen den konservierten Cysteinresten scheint für die dreidimensionale Faltung und somit für die biologische Funktion des Moduls entscheidend zu sein (Jovine et al., 2002; Yonezawa und Nakano, 2003). Dies könnte bedeuten, dass in ZP-Domänen-Proteinen das N-terminale ZP-Submodul gleich gefaltet und für die Polymerisierung der Proteine zuständig ist. Die Subdomäne 2 könnte bei der Bildung der Proteinkomplexe eine regulatorische Rolle spielen. Die Vermutung wird dadurch gestützt, dass im murinen ZP-Domänen- und Plazentaprotein (PLAC 1) lediglich vier von sechs Cysteinresten konserviert sind. Sie entsprechen den Cysteinresten C₁, C₂, C₃ und C₄ der ZP-Domäne (Jovine et al., 2005).

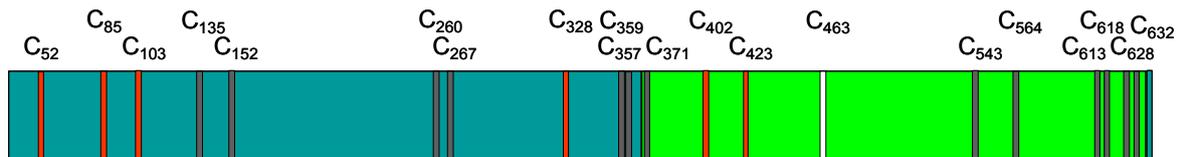


Abb. 4.6: Zusammenfassung der identifizierten oxidativ-sensitiven Thiolgruppen des ZPA-Proteins.

Es wurden tryptische Peptide mit einem Cysteinrest (rot) und mehreren Cysteinen (grau), welche eine BIAM- und/oder CAM-Gruppe und/oder keine Modifizierung enthielten, durch MALDI-ToF-MS detektiert. Das nicht identifizierte Cystein ist weiß dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl in der N-terminalen als auch in der C-terminalen ZP-Subdomäne des ZPA-Proteins die gleichen Cysteinreste mit freien Thiolgruppen und nach Reduktion der Disulfidbrücken nachgewiesen (siehe Abb. 4.6). Darüber hinaus wurden Peptide detektiert, welche auf freie Cys-SH-Reste in dem ZPB- und ZPC-Protein hinweisen. Die von der Arbeitsgruppe von Nakano charakterisierten Proteine enthielten jedoch keine freien Thiolgruppen (Nakano und Yonezawa 2001; Yonezawa und Nakano, 2003). Dies könnte bedeuten, dass die in den Granulosazellen und der Oocyte während der Follikulogenese und Eizellreifung synthetisierten ZP-Proteine nicht nur Unterschiede in der Glykosylierung (siehe 4.1.2), sondern auch im Disulfidbrückenmuster aufweisen. So würden in späteren Entwicklungsphasen vorwiegend Proteine synthetisiert werden, deren dreidimensionale Struktur durch Disulfidbrücken stabilisiert wird. Andererseits ist es auch möglich, dass in der Follikulogenese bzw. Reifungsphase der Oocyte eine Oxidation weiterer Cysteinreste der polymerisierten Glykoproteine erfolgt. Die hier eingesetzten Oocyten aus präpuberalen Sauen befanden sich in verschiedenen Wachstumsstadien, während die Gruppe von Nakano vermutlich die ZP von Oocyten geschlechtsreifer Tiere isolierte. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten ein Hinweis darauf sein, dass die ZP von Oocyten in verschiedenen Wachstumsstadien unterschiedliche Disulfidbrückenmuster aufweisen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass sich das Muster der Disulfidbrücken in den einzelnen Schichten einer ZP unterscheidet. Bereits Strukturanalysen mittels konfokaler Mikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie zeigten Unterschiede in der Lokalisation, Dichte sowie auch Verteilung der oxidativ-sensitiven Cystein-SH-Reste in der ZP von Oocyten im GV- und MII-Stadium (siehe Abb. 4.7; Moreira, 2005).

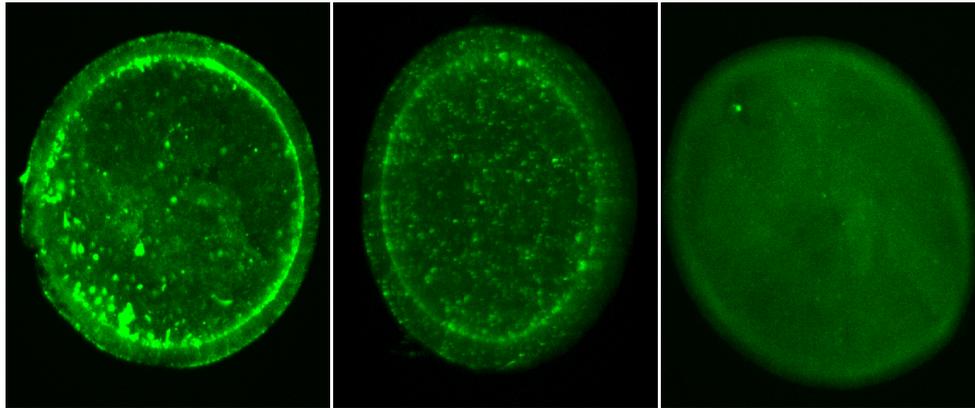


Abb. 4.7: Typische Verteilung der freien Thiolgruppen in der ZP von Oocyten im GV-Stadium präpuberaler Sauen (Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie).

Oocyten im GV-Stadium weisen eine unterschiedliche Verteilung von freien Thiolgruppen innerhalb einer und verschiedener ZP auf (Moreira, 2005).

Die Daten würden die Beobachtung erklären, dass nur die ZP-Glykoproteine adulter Sauen in der Lage sind, nach Solubilisierung zu sphärischen Strukturen zu reaggregieren (Töpfer-Petersen, 1999a). In den Proteinen sind dementsprechend Disulfidbrücken ausgebildet, die zu einer stabilen Konformation der Proteine führen, welche für die Polymerisierung in Filamente verantwortlich ist. Die ZP präpuberaler Schweine enthält dagegen vorwiegend freie Cysteinreste. Ob das heterogene Disulfidbrückenmuster der Oocyten im GV-Stadium ein Phänomen des Wachstums oder der Reifung ist, kann zu diesem Zeitpunkt nicht gesagt werden. Um zu klären, wie sich das Disulfidbrückenmuster der ZP-Proteine bereits während der Entwicklung der Oocyte verändert und welche Cysteinreste für das so genannte „Zona Hardening“ oxidiert werden, bedarf es der massenspektrometrischen Untersuchung der oxidativsensitiven Thiolgruppen in der ZP von Oocyten in definierten Follikel- und Reifestadien.

5 Literatur

- Amari, S., Yonezawa, N., Mitsui, S., Katsumata, T., Hamano, S., Kuwayama, M., Hashimoto, Y., Suzuki, A., Takeda, Y., Nakano, M. (2001) Essential role of the nonreducing terminal alpha-mannosyl residues of the N-linked carbohydrate chain of bovine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding. *Mol. Reprod. Dev.*, **59**, 221-226.
- Aviles, M., Jaber, L., Castells, M.T., Ballesta, J., Kan, F.W. (1997) Modifications of carbohydrate residues and ZP2 and ZP3 glycoproteins in the mouse zona pellucida after fertilization. *Biol. Reprod.*, **57**, 1155-1163.
- Aviles, M., Castells, M.T., Abascal, I., Martinez-Menarguez, J.A., Draber, P., Kan, F.W., Ballesta, J. (1999) Cytochemical localization of GalNAc and GalNAc β 1,4Gal β 1,4 disaccharide in mouse zona pellucida. *Cell Tissue Res.*, **295**, 269-277.
- Aviles, M., Okinaga, T., Shur, B.D., Ballesta, J. (2000) Differential expression of glycoside residues in the mammalian zona pellucida. *Mol. Reprod. Dev.*, **57**, 296-308.
- Bauskin, A.R., Franken, D.R., Eberspaecher, U., Donner, P. (1999) Characterization of human zona pellucida glycoproteins. *Mol. Hum. Reprod.*, **5**, 534-540.
- Bedford, J.M. (1991) The coevolution of mammalian gametes. In Dunbar, B.S., O'Rand, M.G. (Eds.), *A Comparative Overview of Mammalian Fertilization*. Plenum Press, New York, USA, 3-36.
- Bedford, J.M. (2004) Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, **79**, 429-460.
- Benoff, S. (1997) Carbohydrates and fertilization: an overview. *Mol. Hum. Reprod.*, **3**, 599-637.
- Blase, N., Fazeli, A.R., Topper, E., Bevers, M.M., Woelders, H., Töpfer-Petersen, E., Colenbrander, B. (1998) Inhibition of boar sperm binding to homologous zona pellucida by antibodies against zp3 α and zp3 β glycoproteins. *Reprod. Dom. Anim.*, **33**, 21-25.
- Bleil, J.D., Wassarman, P.M. (1980) Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev. Biol.*, **76**, 185-202.
- Bleil, J.D., Wassarman, P.M. (1988) Galactose at the nonreducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 6778-6782.
- Bleil, J.D., Wassarman, P.M. (1990) Identification of a ZP3-binding protein on acrosome-intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5563-5567.
- Bleil, J.D., Beall, C.F., Wassarman, P.M. (1981) Mammalian sperm-egg interaction: fertilization of mouse eggs triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein, ZP2. *Dev. Biol.*, **86**, 189-197.
- Boja, E.S., Hoodbhoy, T., Fales, H.M., Dean, J. (2003) Structural characterization of native mouse zona pellucida proteins using mass spectrometry. *J. Biol. Chem.*, **278**, 34189-34202.

- Boja, E.S., Hoodbhoy, T., Garfield, M., Fales, H.M. (2005) Structural Conservation of Mouse and Rat Zona Pellucida Glycoproteins. Probing the Native Rat Zona Pellucida Proteome by Mass Spectrometry. *Biochemistry*, **44**, 16445-16460.
- Bookbinder, L.H., Cheng, A., Bleil, J.D. (1995) Tissue- and species-specific expression of sp56, a mouse sperm fertilization protein. *Science*, **269**, 86-89.
- Bork, P. (1993) A trefoil domain in the major rabbit zona pellucida protein. *Protein Sci.*, **2**, 669-670.
- Bork, P., Sander, C. (1992) A large domain common to sperm receptors (Zp2 and Zp3) and TGF-beta type III receptor. *FEBS Lett.*, **300**, 237-240.
- Breed, W.G., Hope, R.M., Wiebkin, O.W., Spargo, S.C., Chapman, J.A. (2002) Structural organization and evolution of the marsupial zona pellucida. *Reproduction*, **123**, 13-21.
- Chang, J.Y., Li, L. (2001) The structure of denatured alpha-lactalbumin elucidated by the technique of disulfide scrambling: fractionation of conformational isomers of alpha-lactalbumin. *J. Biol. Chem.*, **276**, 9705-9712.
- Chang, B.Y., Peavy, T.R., Wardrip, N.J., Hedrick, J.L. (2004) The *Xenopus laevis* cortical granule lectin: cDNA cloning, developmental expression, and identification of the eglectin family of lectins. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, **137**, 115-129.
- Chen, P., Baker, A.G., Novotny, M.V. (1997) The use of osazones as matrices for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Anal. Biochem.*, **244**, 144-151.
- Chen, J., Litscher, E.S., Wassarman, P.M. (1998) Inactivation of the mouse sperm receptor, mZP3, by site-directed mutagenesis of individual serine residues located at the combining site for sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6193-6197.
- Cheng, A., Le, T., Palacios, M., Bookbinder, L.H., Wassarman, P.M., Suzuki, F., Bleil, J.D. (1994) Sperm-egg recognition in the mouse: characterization of sp56, a sperm protein having specific affinity for ZP3. *J. Cell Biol.*, **125**, 867-878.
- Cooper, C.A., Gasteiger, E., Packer, N.H. (2001) GlycoMod -A software tool for determining glycosylation compositions from mass spectrometric data. *Proteomics*, **1**, 340-349.
- Cran, D.G. (1985) Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. *J. Reprod. Fertil.*, **74**, 237-245.
- Darie, C.C., Biniossek, M.L., Jovine, L., Litscher, E.S., Wassarman, P.M. (2004) Structural characterization of fish egg vitelline envelope proteins by mass spectrometry. *Biochemistry*, **43**, 7459-7478.
- Dell, A., Chalabi, S., Easton, R.L., Haslam, S.M., Sutton-Smith, M., Patankar, M.S., Lattanzio, F., Panico, M., Morris, H.R., Clark, G.F. (2003) Murine and human zona pellucida 3 derived from mouse eggs express identical O-glycans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 15631-15636.
- Domon, B., Costello, C.E. (1988) A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate J.*, **5**, 397-409.
- Ducibella, T. (1996) The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. *Hum. Reprod. Update*, **2**, 29-42.

- Dunbar, B.S. (1983) Morphological, biochemical and immunochemical characterization of the mammalian zona pellucida. In Hartmann, J.F. (Eds.), *Mechanisms of Mammalian Fertilization*. Academic Press, New York, USA, 140-167.
- Dunbar, B.S., Wolgemuth, D.J. (1984) Structure and function of the mammalian zona pellucida, a unique extracellular matrix. *Mod. Cell Biol.*, **3**, 77-111.
- Dunbar, B.S., Wardrip, N.J., Hedrick, J.L. (1980) Isolation, physicochemical properties, and macromolecular composition of zona pellucida from porcine oocytes. *Biochemistry*, **19**, 356-365.
- Dunbar, B.S., Dudkiewicz, A.B., Bundman, D.S. (1985) Proteolysis of specific porcine zona pellucida glycoproteins by boar acrosin. *Biol. Reprod.*, **32**, 619-630.
- Dunbar, B.S., Prasad, S.V., Timmons, T. (1991) Comparative mammalian Zona Pellucida. In Dunbar, B.S., O'Rand, M. (Eds.), *Comparative Overview of Mammalian Fertilization*. Plenum Press, New York, USA, 97-114.
- Dunbar, B.S., Avery, S., Lee, V., Prasad, S., Schwahn, D., Schwoebel, E., Skinner, S., Wilkins, B. (1994) The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology, and developmental expression. *Reprod. Fertil. Dev.*, **6**, 331-347.
- Easton, R.L., Patankar, M.S., Lattanzio, F.A., Leaven, T.H., Morris, H.R., Clark, G.F., Dell, A. (2000) Structural analysis of murine zona pellucida glycans. Evidence for the expression of core 2-type O-glycans and the Sd(a) antigen. *J. Biol. Chem.*, **275**, 7731-7742.
- Eddy, E.M., O'Brian, D.A. (1994) The spermatozoon. In Knobil, E. Neill, J.D. (Eds.), *The physiology of reproduction*, 2nd ed., Raven Press, New York, USA, **1**, 29-77.
- Epifano, O., Dean, J. (1994) Biology and structure of the zona pellucida: a target for immunocontraception. *Reprod. Fertil. Dev.*, **6**, 319-330.
- Epifano, O., Liang, L.F., Familiari, M., Moos, M.C. Jr., Dean, J. (1995) Coordinate expression of the three zona pellucida genes during mouse oogenesis. *Development*, **121**, 1947-1956.
- Eppig, J.J. (1996) Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Dev.*, **8**, 485-489.
- Foster, J.A., Friday, B.B., Maulit, M.T., Blobel, C., Winfrey, V.P., Olson, G.E., Kim, K.S., Gerton, G.L. (1997) AM67, a secretory component of the guinea pig sperm acrosomal matrix, is related to mouse sperm protein sp56 and the complement component 4-binding proteins. *J. Biol. Chem.*, **272**, 12714-12722.
- Fraser, L.R. (1993) Calcium channels play a pivotal role in the sequence of ionic changes involved in initiation of mouse sperm acrosomal exocytosis. *Mol. Reprod. Dev.*, **36**, 368-376.
- Fraser, L.R. (1995) Ionic control of sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.*, **7**, 905-925.
- Fukuyama, Y., Ciancia, M., Nonami, H., Cerezo, A.S., Erra-Balsells, R., Matulewicz, M.C. (2002) Matrix-assisted ultraviolet laser-desorption ionization and electrospray-ionization time-of-flight mass spectrometry of sulfated neocarrabiose oligosaccharides. *Carbohydr. Res.*, **337**, 1553-1562.
- Funahashi, H., Ekwall, H., Rodriguez-Martinez, H. (2000) Zona reaction in porcine oocytes fertilized in vivo and in vitro as seen with scanning electron microscopy. *Biol. Reprod.*, **63**, 1437-1442.

- Gilbert, S.F. (1997). Fertilization: Beginning a new organism. In Gibert, S.F., *Developmental Biology*. 5th ed., Sinauer, Sunderland, MA, USA, 121-165.
- Green, D.P. (1997) Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Rev. Reprod.*, **2**, 147-156.
- Haley, S.A., Wessel, G.M. (2004) Regulated proteolysis by cortical granule serine protease 1 at fertilization. *Mol. Biol. Cell*, **15**, 2084-2092.
- Harris, J.D., Hibler, D.W., Fontenot, G.K., Hsu, K.T., Yurewicz, E.C., Sacco, A.G. (1994) Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA Seq.*, **4**, 361-393.
- Harris, J.D., Seid, C.A., Fontenot, G.K., Liu, H.F. (1999) Expression and purification of recombinant human zona pellucida proteins. *Protein Expr. Purif.*, **16**, 298-307.
- Harvey, D.J. (1999) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Mass. Spectrom. Rev.*, **18**, 349-450.
- Harvey, DJ. (2000) Collision-induced fragmentation of underivatized N-linked carbohydrates ionized by electrospray. *J. Mass Spectrom.*, **35**, 1178-1190.
- Hasegawa, A., Koyama, K., Okazaki, Y., Sugimoto, M., Isojima, S. (1994) Amino acid sequence of a porcine zona pellucida glycoprotein ZP4 determined by peptide mapping and cDNA cloning. *J. Reprod. Fertil.*, **100**, 245-255.
- Hatanaka, Y., Nagai, T., Tobita, T., Nakano, M. (1992) Changes in the properties and composition of zona pellucida of pigs during fertilization in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, **95**, 431-440.
- Hedrick, J.L. (1993) The Pig Zona Pellucida: Sperm Binding Ligands, Antigens, and Sequence Homologies. In Dondero, F., Johnson, P.M. (Eds.), *Reproductive Immunology*, Serano Symposia Publications, **97**, Raven Press, New York, USA, 59-65.
- Hedrick, J.L. (2004) A structural homologue of the *Xenopus laevis* cortical granule lectin- a member of the eglectin family of lectins- is in mammalian egg cortical granules and functions in the block to polyspermy reaction. In MCBEEC, *The 4th International Symposium on the Molecular and Cell Biology of Egg- and Embryo-Coats*, MielPearl Ise-Shima, Japan, 25.
- Hedrick, J.L., Wardrip, N.J. (1987) On the macromolecular composition of the zona pellucida from porcine oocytes. *Dev. Biol.*, **121**, 478-488.
- Hedrick, J.L., Nishihara T. (1991) Structure and function of the extracellular matrix of anuran eggs. *J. Electron Microsc. Tech.*, **17**, 319-335.
- Hedrick, J.L., Wardrip, N.J., Berger, T. (1987) Differences in the macromolecular composition of the zona pellucida isolated from pig oocytes, eggs, and zygotes. *J. Exp. Zool.*, **241**, 257-262.
- Heukeshoven, J., Dernick, R. (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis*, **9**, 28-32.
- Hirano, T., Takasaki, S., Hedrick, J.L., Wardrip, N.J., Amano, J., Kobata, A. (1993) O-linked neutral sugar chains of porcine zona pellucida glycoproteins. *Eur. J. Biochem.*, **214**, 763-769.

- Hokke, C.H., Damm, J.B., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F. (1993) Structure of three acidic O-linked carbohydrate chains of porcine zona pellucida glycoproteins. *FEBS Lett.*, **329**, 29-34.
- Hokke, C.H., Damm, J.B., Penninkhof, B., Aitken, R.J., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F. (1994) Structure of the O-linked carbohydrate chains of porcine zona pellucida glycoproteins. *Eur. J. Biochem.*, **221**, 491-512.
- Holt, W.V. (1984) Membrane heterogeneity in the mammalian spermatozoon. *Int. Rev. Cytol.*, **87**, 159-194.
- Howes, L., Jones, R. (2002) Interactions between zona pellucida glycoproteins and sperm proacrosin/acrosin during fertilization. *J. Reprod. Immunol.*, **53**, 181-192.
- Howes, E., Pascall, J.C., Engel, W., Jones, R. (2001) Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin; a mechanism for secondary binding of sperm to the zona pellucida during fertilization. *J. Cell Sci.*, **114**, 4127-4136.
- Hunter, R.H. (1981) Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. *J. Reprod. Fertil.*, **63**, 109-117.
- Ikeda, K., Yonezawa, N., Naoi, K., Katsumata, T., Hamano, S., Nakano, M. (2002) Localization of N-linked carbohydrate chains in glycoprotein ZPA of the bovine egg zona pellucida. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 4257-4266.
- Iwamoto, K., Ikeda, K., Yonezawa, N., Noguchi, S., Kudo, K., Hamano, S., Kuwayama, M., Nakano, M. (1999) Disulfide formation in bovine zona pellucida glycoproteins during fertilization: evidence for the involvement of cystine cross-linkages in hardening of the zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.*, **117**, 395-402.
- Jansen, S., Quigley, M., Reik, W., Jones, R. (1995) Analysis of polysulfate-binding domains in porcine proacrosin, a putative zona adhesion protein from mammalian spermatozoa. *Int. J. Dev. Biol.*, **39**, 501-510.
- Jansen, S., Ekhlesi-Hundrieser, M., Töpfer-Petersen, E. (2001) Sperm adhesion molecules: structure and function. *Cells Tissues Organs*, **168**, 82-92.
- Jensen, O.N., Shevchenko, A., Mann, M., Creighton, T.E. (1997) Protein analysis by mass spectrometry. In Jensen, O.N., Creighton, T.E. (Eds.), *Protein Structure - A Practical Approach*, 2nd ed., European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany, 31-57.
- Johnston, D.S., Wright, W.W., Shaper, J.H., Hokke, C.H., Van den Eijnden, D.H., Joziase, D.H. (1998) Murine sperm-zona binding, a fucosyl residue is required for a high affinity sperm-binding ligand. A second site on sperm binds a nonfucosylated, beta-galactosyl-capped oligosaccharide. *J. Biol. Chem.*, **273**, 1888-1895.
- Jovine, L., Qi, H., Williams, Z., Litscher, E., Wassarman, P.M. (2002) The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. *Nat. Cell Biol.*, **4**, 457-461.
- Jovine, L., Qi, H., Williams, Z., Litscher, E.S., Wassarman, P.M. (2004) A duplicated motif controls assembly of zona pellucida domain proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 5922-5927.
- Jovine, L., Darie, C.C., Litscher, E.S., Wassarman, P.M. (2005) Zona pellucida domain proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **74**, 83-114.

- Katsumata, T., Noguchi, S., Yonezawa, N., Tanokura, M., Nakano, M. (1996) Structural characterization of the N-linked carbohydrate chains of the zona pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs. *Eur. J. Biochem.*, **240**, 448-453.
- Keefe, D., Tran, P., Pellegrini, C., Oldenbourg, R. (1997) Polarized light microscopy and digital image processing identify a multilaminar structure of the hamster zona pellucida. *Hum. Reprod.*, **12**, 1250-1252.
- Kiefer, S.M., Saling, P. (2002) Proteolytic processing of human zona pellucida proteins. *Biol. Reprod.*, **66**, 407-414.
- Kim, J.R., Yoon, H.W., Kwon, K.S., Lee, S.R., Rhee, S.G. (2000) Identification of proteins containing cysteine residues that are sensitive to oxidation by hydrogen peroxide at neutral pH. *Anal. Biochem.*, **283**, 214-221.
- Kölle, S., Sinowatz, F., Boie, G., Totzauer, I., Amselgruber, W., Plendl, J. (1996) Localization of the mRNA encoding the zona protein ZP3 alpha in the porcine ovary, oocyte and embryo by non-radioactive in situ hybridization. *Histochem. J.*, **28**, 441-447.
- Kölle, S., Sinowatz, F., Boie, G., Palma, G. (1998) Differential expression of ZPC in the bovine ovary, oocyte, and embryo. *Mol. Reprod. Dev.*, **49**, 435-443.
- Kornfeld, R., Ferris, C. (1975) Interaction of immunoglobulin glycopeptides with concanavalin A. *J. Biol. Chem.*, **250**, 2614-2619.
- Kornfeld, K., Reitman, M.L., Kornfeld, R. (1981) The carbohydrate-binding specificity of pea and lentil lectins. Fucose is an important determinant. *J. Biol. Chem.*, **256**, 6633-6640.
- Kudo, K., Yonezawa, N., Katsumata, T., Aoki, H., Nakano, M. (1998) Localization of carbohydrate chains of pig sperm ligand in the glycoprotein ZPB of egg zona pellucida. *Eur. J. Biochem.*, **252**, 492-499.
- Küster, B., Wheeler, S.F., Hunter, A.P., Dwek, R.A., Harvey, D.J. (1997) Sequencing of N-linked oligosaccharides directly from protein gels: in-gel deglycosylation followed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and normal-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, **250**, 82-101.
- Küster, B., Hunter, A.P., Wheeler, S.F., Dwek, R.A., Harvey, D.J. (1998) Structural determination of N-linked carbohydrates by matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry following enzymatic release within sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide electrophoresis gels: application to species-specific glycosylation of alpha1-acid glycoprotein. *Electrophoresis*, **19**, 1950-1959.
- Kussmann, M., Lassing, U., Sturmer, C.A., Przybylski, M., Roepstorff, P. (1997) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide mapping of the neural cell adhesion protein neurolin purified by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis or acidic precipitation. *J. Mass Spectrom.*, **32**, 483-493.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Langlais, J., Zollinger, M., Plante, L., Chapdelaine, A., Bleau, G., Roberts, K.D. (1981) Localization of cholesteryl sulfate in human spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism of capacitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7266-7270.

- Lee, S.R., Kim, J.R., Kwon, K.S., Yoon, H.W., Levine, R.L., Ginsburg, A., Rhee, S.G. (1999) Molecular cloning and characterization of a mitochondrial selenocysteine-containing thioredoxin reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, **274**, 4722-4734.
- Lefievre, L., Conner, S.J., Salpekar, A., Olufowobi, O., Ashton, P., Pavlovic, B., Lenton, W., Afnan, M., Brewis, I.A., Monk, M., Hughes, D.C., Barratt, C.L. (2004) Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum. Reprod.*, **19**, 1580-1586.
- Leibfried, L., First, N.L. (1979) Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J. Anim. Sci.*, **48**, 76-86.
- Liebich, H.G. (1990) Weibliche Geschlechtsorgane. In Liebich, H.G., *Funktionelle Histologie*, 2. Aufl., Schattauer Verlag, Stuttgart, Deutschland, 255-272.
- Lindsay, L.L., Hedrick, J.L. (2004) Proteolysis of *Xenopus laevis* egg envelope ZPA triggers envelope hardening. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **324**, 648-654.
- Litscher, E.S., Qi, H., Wassarman, P.M. (1999) Mouse zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 undergo carboxy-terminal proteolytic processing in growing oocytes. *Biochemistry*, **38**, 12280-12287.
- Lu, Q., Hasty, P., Shur, B.D. (1997) Targeted mutation in beta1,4-galactosyltransferase leads to pituitary insufficiency and neonatal lethality. *Dev. Biol.*, **181**, 257-267.
- Marquardt, T., Luhn, K., Srikrishna, G., Freeze, H.H., Harms, E., Vestweber, D. (1999) Correction of leukocyte adhesion deficiency type II with oral fucose. *Blood*, **94**, 3976-3985.
- Maymon, B.B., Maymon, R., Ben-Nun, I., Ghetler, Y., Shalgi, R., Skutelsky, E. (1994) Distribution of carbohydrates in the zona pellucida of human oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, **102**, 81-86.
- McLeskey, S.B., Dowds, C., Carballada, R., White, R.R., Saling, P.M. (1998) Molecules involved in mammalian sperm-egg interaction. *Int. Rev. Cytol.*, **177**, 57-113.
- Miller, D.J., Macek, M.B., Shur, B.D. (1992) Complementarity between sperm surface beta-1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature*, **357**, 589-593.
- Miller, D.J., Gong, X., Decker, G., Shur, B.D. (1993) Egg cortical granule N-acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy. *J. Cell Biol.*, **123**, 1431-1440.
- Miranda, P.V., Gonzalez-Echeverria, F., Marin-Briggiler, C.I., Brandelli, A., Blaquier, J.A., Tezon, J.G. (1997) Glycosidic residues involved in human sperm-zona pellucida binding in vitro. *Mol. Hum. Reprod.*, **3**, 399-404.
- Miyano, T. (2005) JSAR Outstanding Research Award. In vitro growth of mammalian oocytes. *J. Reprod. Dev.*, **51**, 169-176.
- Moller, C.C., Bleil, J.D., Kinloch, R.A., Wassarman, P.M. (1990) Structural and functional relationships between mouse and hamster zona pellucida glycoproteins. *Dev. Biol.*, **137**, 276-286.
- Moreira, A.C. (2005) Biochemical and structural alteration of the porcine Zona pellucida (ZP) during maturation (in vivo and in vitro) and fertilization. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland.

- Mori, K., Daitoh, T., Irahara, M., Kamada, M., Aono, T. (1989) Significance of D-mannose as a sperm receptor site on the zona pellucida in human fertilization. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **161**, 207-211.
- Mori, E., Takasaki, S., Hedrick, J.L., Wardrip, N.J., Mori, T., Kobata, A. (1991) Neutral oligosaccharide structures linked to asparagines of porcine zona pellucida glycoproteins. *Biochemistry*, **30**, 2078-2087.
- Mori, E., Hedrick, J.L., Wardrip, N.J., Mori, T., Takasaki, S. (1998) Occurrence of reducing terminal N-acetylglucosamine 3-sulfate and fucosylated outer chains in acidic N-glycans of porcine zona pellucida glycoproteins. *Glycoconj. J.*, **15**, 447-456.
- Motlik, J., Fulka, J. (1976) Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *J. Exp. Zool.*, **198**, 155-162.
- Nagdas, S.K., Araki, Y., Chayko, C.A., Orgebin-Crist, M.C., Tulsiani, D.R. (1994) O-linked trisaccharide and N-linked poly-N-acetylactosaminyl glycans are present on mouse ZP2 and ZP3. *Biol. Reprod.*, **51**, 262-272.
- Nakano, M., Yonezawa, N. (2001) Localization of sperm ligand carbohydrate chains in pig zona pellucida glycoproteins. *Cells Tissues Organs*, **168**, 65-75.
- Nakano, M., Yonezawa, N., Hatanaka, Y., Noguchi, S. (1996) Structure and function of the N-linked carbohydrate chains of pig zona pellucida glycoproteins. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **50**, 25-34.
- Nara, M., Yonezawa, N., Shimada, T., Takahashi, K., Tanokura, M., Yumoto, F., Nakagawa, H., Ohashi, K., Hamano, S., Nakano, M. (2006) Fourier transform infrared spectroscopic analysis of the intact zona pellucida of the mammalian egg: changes in the secondary structure of bovine zona pellucida proteins during fertilization. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, **231**, 166-171.
- Nikas, G., Paraschos, T., Psychoyos, A., Handyside, A.H. (1994) The zona reaction in human oocytes as seen with scanning electron microscopy. *Hum. Reprod.*, **9**, 2135-2138.
- Noguchi, S., Nakano, M. (1992) Structure of the acidic N-linked carbohydrate chains of the 55-kDa glycoprotein family (PZP3) from porcine zona pellucida. *Eur. J. Biochem.*, **209**, 883-894.
- Noguchi, S., Nakano, M. (1993) Structural characterization of the N-linked carbohydrate chains from mouse zona pellucida glycoproteins ZP2 and ZP3. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1158**, 217-226.
- Noguchi, S., Hatanaka, Y., Tobita, T., Nakano, M. (1992) Structural analysis of the N-linked carbohydrate chains of the 55-kDa glycoprotein family (PZP3) from porcine zona pellucida. *Eur. J. Biochem.*, **204**, 1089-1100.
- Noguchi, S., Yonezawa, N., Katsumata, T., Hashizume, K., Kuwayama, M., Hamano, S., Watanabe, S., Nakano, M. (1994) Characterization of the zona pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1201**, 7-14.
- Oehninger, S., Patankar, M., Seppala, M., Clark, G.F. (1998) Involvement of selectin-like carbohydrate binding specificity in human gamete interaction. *Andrologia*, **30**, 269-274.

- Ohe von der, M., Wheeler, S.F., Wuhrer, M., Harvey, D.J., Liedtke, S., Mühlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R., Geyer, H., Dwek, R.A., Geyer, R., Wing, D.R., Schachner, M. (2002) Localization and characterization of polysialic acid-containing N-linked glycans from bovine NCAM. *Glycobiology*, **12**, 47-63.
- Oliphant, G. (1976) Removal of sperm bound seminal plasma components as a prerequisite to induction of the rabbit acrosome reaction. *Fertility and Sterility*, **27**, 28-38.
- Ozgun, K., Patankar, M.S., Oehninger, S., Clark, G.F. (1998) Direct evidence for the involvement of carbohydrate sequences in human sperm-zona pellucida binding. *Mol. Hum. Reprod.*, **4**, 318-324.
- Packer, N.H., Lawson, M.A., Jardine, D.R., Redmond, J.W. (1998) A general approach to desalting oligosaccharides released from glycoproteins. *Glycoconj. J.*, **15**, 737-747.
- Peavy, T.R., Hedrick J.L. (2000) An egg cortical granule lectin and the block to polyspermy in mammalian eggs, *Mol. Biol. Cell Suppl.*, **11**, 405a.
- Petters, R.M., Wells, K.D. (1993) Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **48**, 61-73.
- Phillips, D.M., Shalgi, R.M. (1980) Surface properties of the zona pellucida. *J. Exp. Zool.*, **213**, 1-8.
- Prasad, S.V., Skinner, S.M., Carino, C., Wang, N., Cartwright, J., Dunbar, B.S. (2000) Structure and function of the proteins of the mammalian Zona pellucida. *Cells Tissues Organ*, **166**, 148-164.
- Prather, R.S., Day, B.N. (1998) Practical considerations for the in vitro production of pig embryos. *Theriogenology*, **49**, 23-32.
- Qi, H., Williams, Z., Wassarman, P.M. (2002) Secretion and assembly of zona pellucida glycoproteins by growing mouse oocytes microinjected with epitope-tagged cDNAs for mZP2 and mZP3. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 530-541.
- Rath, D., Töpfer-Petersen, E., Michelmann, H.W., Schwartz, P., Ebeling, S. (2005) Zona pellucida characteristics and sperm-binding patterns of in vivo and in vitro produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa. *Theriogenology*, **63**, 352-362.
- Reyes, A., Oliphant, G., Brackett, B.G. (1975) Partial purification and identification of a reversible decapacitation factor from rabbit seminal plasma. *Fertility and Sterility*, **26**, 148-157.
- Rinderle, S.J., Goldstein, I.J., Remsen, E.E. (1990) Physicochemical properties of amaranthin, the lectin from *Amaranthus caudatus* seeds. *Biochemistry*, **29**, 10555-10561.
- Shi, S., Williams, S.A., Seppo, A., Kurniawan, H., Chen, W., Ye, Z., Marth, J.D., Stanley, P. (2004) Inactivation of the Mgat1 gene in oocytes impairs oogenesis, but embryos lacking complex and hybrid N-glycans develop and implant. *Mol. Cell Biol.*, **24**, 9920-9929.
- Shur, B.D. (1998) Is sperm galactosyltransferase a signaling subunit of a multimeric gamete receptor? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **250**, 537-543.
- Sinowatz, F., Amselgruber, W., Töpfer-Petersen, E., Totzauer, I., Calvete, J., Plendl, J. (1995) Immunocytochemical characterization of porcine zona pellucida during follicular development. *Anat. Embryol. (Berl.)*, **191**, 41-46.

- Sinowatz, F., Kölle, S., Töpfer-Petersen, E. (2001) Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Cells Tissues Organs*, **168**, 24-35.
- Sinowatz, F., Wessa, E., Neumüller, C., Palma, G. (2003) On the Species Specificity of Sperm Binding and Sperm Penetration of the Zona Pellucida. *Reprod. Dom. Anim.*, **38**, 141-146.
- Skutelsky, E., Ranen, E., Shalgi, R. (1994) Variations in the distribution of sugar residues in the zona pellucida as possible species-specific determinants of mammalian oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, **100**, 35-41.
- Spargo, S.C., Hope, R.M. (2003) Evolution and nomenclature of the zona pellucida gene family. *Biol. Reprod.*, **68**, 358-362.
- Suarez, S.S. (1998) The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation. *Biol. Reprod.*, **58**, 1105-1107.
- Sun, Y., Nelson, B.J., Greminger, M.A. (2005) Investigating Protein Structure Change in the Zona Pellucida with a Microrobotic System. *The International Journal of Robotics Research*, **24**, 211-218.
- Suzuki, H., Yang, X., Foote, R.H. (1994) Surface alterations of the bovine oocyte and its investments during and after maturation and fertilization in vitro. *Mol. Reprod. Dev.*, **38**, 421-430.
- Takasaki, S., Mori, E., Mori, T. (1999) Structures of sugar chains included in mammalian zona pellucida glycoproteins and their potential roles in sperm-egg interaction. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1473**, 206-215.
- Thall, A.D., Maly, P., Lowe, J.B. (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**, 21437-21440.
- Töpfer-Petersen, E. (1999a) Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. *Hum. Reprod. Update*, **5**, 314-329.
- Töpfer-Petersen, E. (1999b) Molecules on the sperm's route to fertilization. *J. Exp. Zool.*, **285**, 259-266.
- Töpfer-Petersen, E., Cechova, D., Henschen, A., Steinberger, M., Friess, A.E., Zucker, A. (1990) Cell biology of acrosomal proteins. *Andrologia Suppl.*, **1**, 110-121.
- Töpfer-Petersen, E., Mann, K., Calvete, J.J. (1993) Identification of porcine oocyte 55 kDa alpha and beta proteins within the zona pellucida glycoprotein families indicates that oocyte sperm receptor activity is associated with different zone pellucida proteins in different mammalian species. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, **374**, 411-417.
- Töpfer-Petersen, E., Petrounkina, A.M., Ekhlasi-Hundrieser, M. (2000) Oocyte-sperm interactions. *Anim. Reprod. Sci.*, **60-61**, 653-662.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354.
- Tu, B.P., Weissman, J.S. (2004) Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J. Cell Biol.*, **164**, 341-346.

- Tulsiani, D.R., Skudlarek, M.D., Orgebin-Crist, M.C. (1990) Human sperm plasma membranes possess alpha-D-mannosidase activity but no galactosyltransferase activity. *Biol. Reprod.*, **42**, 843-858.
- Tulsiani, D.R., Yoshida-Komiya, H., Araki, Y. (1997) Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. *Biol. Reprod.*, **57**, 487-494.
- Vanroose, G., Nauwynck, H., Soom, A.V., Ysebaert, M.T., Charlier, G., Oostveldt, P.V., de Kruif, A. (2000) Structural aspects of the zona pellucida of in vitro-produced bovine embryos: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study. *Biol. Reprod.*, **62**, 463-469.
- Visconti, P.E., Kopf, G.S. (1998) Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol. Reprod.*, **59**, 1-6.
- Visconti, P.E., Galantino-Homer, H., Moore, G.D., Bailey, J.L., Ning, X., Fornes, M., Kopf, G.S. (1998) The molecular basis of sperm capacitation. *J. Androl.*, **19**, 242-248.
- Vo, L.H., Hedrick, J.L. (2000) Independent and hetero-oligomeric-dependent sperm binding to egg envelope glycoprotein ZPC in *Xenopus laevis*. *Biol. Reprod.*, **62**, 766-774.
- Wardrip, N.J., Hedrick, J.L. (1985) Pig zona pellucida 25K and 65K glycoproteins are derived from hydrolysis and reduction of the 90K family. *J. Cell Biol.*, **101**, 378a.
- Wassarman, P.M. (1988) Zona pellucida glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 415-442.
- Wassarman, P.M. (2005) Contribution of mouse egg zona pellucida glycoproteins to gamete recognition during fertilization. *J. Cell Physiol.*, **204**, 388-391.
- Wassarman, P.M., Mortillo, S. (1991) Structure of the mouse egg extracellular coat, the zona pellucida. *Int. Rev. Cytol.*, **130**, 85-110.
- Wassarman, P.M., Kinloch, R.A. (1992) Gene expression during oogenesis in mice. *Mutat. Res.*, **296**, 3-15.
- Wheeler, S.F., Harvey, D.J. (2001) Extension of the in-gel release method for structural analysis of neutral and sialylated N-linked glycans to the analysis of sulfated glycans: application to the glycans from bovine thyroid-stimulating hormone. *Anal. Biochem.*, **296**, 92-100.
- Williams, Z., Wassarman, P.M. (2001) Secretion of mouse ZP3, the sperm receptor, requires cleavage of its polypeptide at a consensus furin cleavage-site. *Biochemistry*, **40**, 929-937.
- Witzendorff von, D., Ekhlasi-Hundrieser, M., Dostalova, Z., Resch, M., Rath, D., Michelmann, H.W., Töpfer-Petersen, E. (2005) Analysis of N-linked glycans of porcine zona pellucida glycoprotein ZPA by MALDI-TOF MS: a contribution to understanding zona pellucida structure. *Glycobiology*, **15**, 475-488.
- Wong, J.L., Wessel, G.M. (2004) Major components of a sea urchin block to polyspermy are structurally and functionally conserved. *Evol. Dev.*, **6**, 134-153.
- Yagi, H., Takahashi, N., Yamaguchi, Y., Kimura, N., Uchimura, K., Kannagi, R., Kato, K. (2005) Development of structural analysis of sulfated N-glycans by multidimensional high performance liquid chromatography mapping methods. *Glycobiology*, **15**, 1051-1060.

- Yanagimachi, R. (1994) Mammalian fertilization. In Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed., **1**, Raven Press, New York, USA, 189-317.
- Yonezawa, N., Nakano, M. (2003) Identification of the carboxyl termini of porcine zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **307**, 877-882.
- Yonezawa, N., Aoki, H., Hatanaka, Y., Nakano, M. (1995) Involvement of N-linked carbohydrate chains of pig zona pellucida in sperm-egg binding. *Eur. J. Biochem.*, **233**, 35-41.
- Yonezawa, N., Mitsui, S., Kudo, K., Nakano, M. (1997) Identification of an N-glycosylated region of pig zona pellucida glycoprotein ZPB that is involved in sperm binding. *Eur. J. Biochem.*, **248**, 86-92.
- Yonezawa, N., Fukui, N., Kudo, K., Nakano, M. (1999) Localization of neutral N-linked carbohydrate chains in pig zona pellucida glycoprotein ZPC. *Eur. J. Biochem.*, **260**, 57-63.
- Yonezawa, N., Fukui, N., Kuno, M., Shinoda, M., Goko, S., Mitsui, S., Nakano, M. (2001) Molecular cloning of bovine zona pellucida glycoproteins ZPA and ZPB and analysis for sperm-binding component of the zona. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 3587-3594.
- Yonezawa, N., Amari, S., Takahashi, K., Ikeda, K., Imai, F.L., Kanai, S., Kikuchi, K., Nakano, M. (2005a) Participation of the nonreducing terminal beta-galactosyl residues of the neutral N-linked carbohydrate chains of porcine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding. *Mol. Reprod. Dev.*, **70**, 222-227.
- Yonezawa, N., Kudo, K., Terauchi, H., Kanai, S., Yoda, N., Tanokura, M., Ito, K., Miura, K., Katsumata, T., Nakano, M. (2005b) Recombinant porcine zona pellucida glycoproteins expressed in Sf9 cells bind to bovine sperm but not to porcine sperm. *J. Biol. Chem.*, **280**, 20189-20196.
- Yurewicz, E.C., Sacco, A.G., Subramanian, M.G. (1987) Structural characterization of the Mr = 55,000 antigen (ZP3) of porcine oocyte zona pellucida. Purification and characterization of alpha- and beta-glycoproteins following digestion of lactosaminoglycan with endo-beta-galactosidase. *J. Biol. Chem.*, **262**, 564-571.
- Yurewicz, E.C., Pack, B.A., Sacco, A.G. (1991) Isolation, composition, and biological activity of sugar chains of porcine oocyte zona pellucida 55K glycoproteins. *Mol. Reprod. Dev.*, **30**, 126-134.
- Yurewicz, E.C., Pack, B.A., Sacco, A.G. (1992) Porcine oocyte zona pellucida M(r) 55,000 glycoproteins: identification of O-glycosylated domains. *Mol. Reprod. Dev.*, **33**, 182-188.
- Yurewicz, E.C., Hibler, D., Fontenot, G.K., Sacco, A.G., Harris, J. (1993) Nucleotide sequence of cDNA encoding ZP3 alpha, a sperm-binding glycoprotein from zona pellucida of pig oocyte. *Biochim. Biophys. Acta*, **1174**, 211-214.
- Yurewicz, E.C., Sacco, A.G., Gupta, S.K., Xu, N., Gage, D.A. (1998) Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *J. Biol. Chem.*, **273**, 7488-7494.
- Zamfir, A.D., Bindila, L., Lion, N., Allen, M., Girault, H.H., Peter-Katalinic, J. (2005) Chip electrospray mass spectrometry for carbohydrate analysis. *Electrophoresis*, **26**, 3650-3673.
- Zhang, X., Rutledge, J., Armstrong, D.T. (1991) Studies on zona hardening in rat oocytes that are matured in vitro in a serum-free medium. *Mol. Reprod. Dev.*, **28**, 292-296.

Zhao, M., Gold, L., Ginsberg, A.M., Liang, L.F., Dean, J. (2002) Conserved furin cleavage site not essential for secretion and integration of ZP3 into the extracellular egg coat of transgenic mice. *Mol. Cell Biol.*, **22**, 3111-3120.

Zhou, Q., Park, S.H., Boucher, S., Higgins, E., Lee, K., Edmunds, T. (2004) N-linked oligosaccharide analysis of glycoprotein bands from isoelectric focusing gels. *Anal. Biochem.*, **335**, 10-16.

6 Anhang

Aminosäuresequenzen der porcinen ZP-Proteine:

ZPA:

MACRHRGDSGRPLSWLSASWRSLLLFFPLVTSVNSIGVNLVNTAFPGIVTCHENR
 MVVEFPRILGTKIQYTSVVDPLGLEMMNCTYVLDPENLTLKAPYEACTKRVRGHHQ
 MTIRLIDDNAALRQEALMYHISCPVMGAEGPDQHSGSTICMKDFMSFTFNFFPGMA
 DENVKREDSKQRMGWSLVVGDGERARTLTFQEAMTQGYNFLIENQKMNIQVSFHA
 TGVTRYSQGNSHLYMVPLKLVSHGQSLILASQLICVADPVTNATHVTLAIPEFP
 GKLSVNLGSGNIAVSQLHKHGIEMETTNGRLRHFNQTLTKTNVSEKCLPHQLYLSS
 LKLTFFHSQLEAVSMVIYPECLCESTVSLVSEELCTQDGFMDVKVHSHQTKPALNLDT
 LRVGDSSCQPTFKAPAQGLVQFRIPLNGCGTRHKFKNDKVIYENEIHALWADPPSA
 VSRDSEFRMTVRCSYSSSNMLINTNVESSLPSPEASVKPGPLTLTLQTYPDNAYLQP
 YGDKEYPVVKYLRQPIYLEVRILNRTDPNIKLVLDCCWATSTEDPASLPQWNVMD
 GCEYNLDNHRTTFHPVGSSTYPNHHQRFDVKTFVSGAQGVSQLVYFHCSVFIC
 NQLSPTFSLCSVTCHGPSRSRRATGTTEEEKMIVSLPGPILLSDGSSLRDAVNSKG
 SRTNGYVAFKTMVAMVASAGIVATLGLISYLHKKRIMMLNH

ZPB:

MWLRPSIWLCFPLCLALPGQSQPKAADDLGGLYCGPSSFHFSINLLSQDTATPPAL
 VVWDRRGRLHKLQNDSGCGTWWHKGPGSSMGVEASYRGCYVTEWDSHYLMPIG
 LEEADAGGHRTVTETKLFKCPVDLALDVPTIGLCDAVPVWDRLPCAPPPITQGECK
 QLGCCYNSEEVPCYYGNTVTSRCTQDGHFSIAVSRNVTSPPLLWDSVHLAFRND
 SECKPVMETHTFVLFVFRFPFSSCGTAKRVTGNQAVYENELVAARDVRTWSHGSIIRD
 SIFRLRVSCIYSVSSSALPVNIQVFTLPPPLPETHPGPLTLELQIAKDERYGSYYNASD
 YPVVKLLREPIYVEVSIRHRTDPSLGLHLHQCWATPGMSPLLQPQWPMLVNGCPYT
 GDNYQTKLIPVQKASNLLFPHYQRFSVSTFSFVDSVAKQALKGPVYLHCTASVCK
 PAGAPICVTTCPAARRRRSSDIHFQNGTASISSKGPMILLQATRDSSERLHKYSRPP
 VDSHALWVAGLLGSLIIGALLVSYLVFRKWR

ZPC:

MAPSWRFFVCFLLWGGTELCSPQPWWQDEGQRLRPSKPPTVMVEQCQEAQLVVIV
SKDLFGTGKLRPADLSLGPACKEPLVSQDQDAVVRFEVGLHECGSSLQVTDDALV
YSTFLRHDP RPAGNLSILRTNRAEVPIECHYPRQGNVSSWAILPTWVPFRRTTVFSEE
KLVFSLRLMEENWSAEKMTPTFQLGDRAHLQAQVHTGSHVPLRRLFVDHCVATLTP
DWNTSPSHTIVDFHGCLVDGLTEASSAFKAPRPGPETLQFTVDVHFHFANDSRNTIYI
TCHLKVTPADRVPDQLNKACSFSSNRWSPVEGPAVICRCCHKGQCGTPSLSRK
LSMPKRQSAPRSRRHVTDADVTVGPLIFLGKTSDHGVEGSTSSPTSVMVGLGLAT
VVTLTLATIVLGVPRRRRAAAHLVCPVSASQ

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Edda Töpfer-Petersen für die Überlassung des faszinierenden Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und ihre uneingeschränkte Unterstützung bedanken. Ihre Kreativität und stetige Diskussionsbereitschaft haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Alves danke ich für die kreativen Diskussionen.

Herrn Dr. Martin Resch von der Firma Shimadzu gilt mein Dank für die Durchführungen einiger Glykanmessungen und seine ständige Unterstützung bei der Massenspektrometrie.

Für die Bereitstellung von Ovarien und *in vitro* gereifter Oocyten bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Detlef Rath des Institutes für Tierzucht in Mariensee, insbesondere bei Antje Frenzel und Petra Westermann.

Herrn PD Dr. Andreas Pich sowie allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Toxikologie der Medizinischen Hochschule Hannover danke ich für ihre herzliche Gastfreundschaft und Unterstützung am Massenspektrometer.

Bei Herrn Dr. Kai Maass des Institutes für Biochemie des Universitätsklinikums Giessen möchte ich mich für die Hilfe bei der Auswertung der sulfatierten Glykane bedanken.

Frau Bianca Oldendorf danke ich für ihre Hilfe bei den etlichen ZP-Aufarbeitungen.

Bei Frau Dr. Ana-Claudia Moreira bedanke ich mich für die Bereitstellung der LSCM-Aufnahmen.

Frau Christine Kochel danke ich für ihre ständige Unterstützung und ihre Herzlichkeit.

Frau Dr. Mahnaz Ekhlasi-Hundrieser, Frau Miroslava Tsoleva und Frau Christiane Hettel sei für die gute Zusammenarbeit und die nette Arbeitsatmosphäre gedankt.

Bei allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes, die durch ihren Einsatz zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich bedanken.

Meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere Dr. Andreas Skouras danke ich für ihre uneingeschränkte Unterstützung, Geduld und ihr Verständnis.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Dorothee von Witzendorff

Geburtsdatum: 14.7.75

Geburtsort: Hannover

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1982-1986 Heinrich Bokemeyer Grundschule in Immensen

1986-1988 Orientierungsstufe Lehrte Ost

1988-1995 Gymnasium Lehrte mit Abschluss Abitur

Hochschulausbildung:

1996-2002 Studium der Biologie an der Universität Münster und der Universität Hannover mit Abschluss Diplom-Biologin

07/2001-03/2002 Diplomarbeit am Zentrum Biochemie, Abteilung Biophysikalische Chemie, der Medizinischen Hochschule Hannover, „Fusion von DNA-Bindungsdomänen mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* zur Erweiterung der Sequenzspezifität“

Sonstige Tätigkeiten

07/2000–09/2000 Praktikum in der Virologie der Escuela de Veterinaria der Universidad Nacional Heredia, Costa Rica

09/2002-12/2002 Wissenschaftliche Tätigkeit am Institut für Physiologische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover

Promotion:

02/2003-06/2006 Promotion am Institut für Reproduktionsbiologie, Tierärztliche Hochschule Hannover, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Edda Töpfer-Petersen