

VII. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, die porcine Zona pellucida biochemisch und funktionell zu charakterisieren und nähere Hinweise auf den Mechanismus der Spermienbindung beim Schwein zu erhalten.

Zunächst unterzog man die Zona pellucida einer biochemischen Untersuchung. In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigte sie unter nicht reduzierenden Bedingungen zwei Banden. Eine bei 67 (pZP1 oder ZPA) und eine bei 55 kDa. In der 55 kDa Bande sammelten sich zwei Proteine mit demselben Molekulargewicht, das pZP3 α (ZPB) und das pZP3 β (ZPC). Über Gelfiltration und reverse-phase HPLC wurden die 67 und 55 kDa-Komponente voneinander getrennt. Eine saubere Trennung war nur über reverse-phase HPLC möglich.

Polyklonale Antikörper gegen pZP3 α (ZPB) und pZP3 β (ZPC) kamen im Hemizona-Assay zum Einsatz, nachdem ihre Spezifität und ihre Bindungsfähigkeit an native Zona pellucida überprüft wurde. Beide Antikörper waren in der Lage die Bindung von Spermien an die Hemizona zu hemmen. Anti- α aber mit größerer Effektivität.

Um die Zuckerketten der Zona pellucida näher zu charakterisieren, untersuchten wir das Lektinbindungsmuster porciner und boviner Eizellen. Das Bindungsmuster dieser beiden Arten zeigte keine Unterschiede. Mit Hilfe der Lektine konnten folgende Zuckerstrukturen detektiert werden:

N-glykosidisch

α/β -Gal

α -D-Man

α/β -GalNAc

α -D-GlcNAc

Gal β (1-4)GlcNAc

Fuc α (1-6)-GlcNAc

NeuNAc- α -(2-6)-Gal

NeuNAc- α -(2-3)-Gal

NeuNAc(2-3/6)Gal β (1-4)-D-GlcNAc

O-glykosidisch

α -D-Gal β (1-3)-GalNAc

NeuNAc- α -(2-3/6)-Gal β (1-3)-GalNAc

Die Struktur Gal β (1-3)-GlcNAc konnte nicht gefunden werden

Um die Funktion der Oligosaccharide bei der Zona pellucida Bindung näher zu untersuchen, wurden Lektine im Hemizona-Assay eingesetzt. Effektiv zeigten sich die Lektine WGA [β (1-4)-D-GlcNAc-2-NeuNAc] und das Lektin MAA [NeuNAc- α -(2-3)-Gal]. Das Lektin AAA [Fuc α (1-6)-GlcNAc] hatte keinen Einfluß. Ebenso blieb das eingesetzte Oligosaccharid Fucosyl-Laktose ohne Einfluß, während Sialyl-Laktose eine Hemmung der Spermienbindung dosisabhängig bewirkte.

Über eine Trypsinspaltung des Fetuins und anschließende reverse-phase HPLC-Chromatographie wurden Peptide isoliert und in der Aminosäuren- und Zuckeranalyse charakterisiert. Neun dieser isolierten Peptide konnten funktionell auf ihre Fähigkeit, die Spermienbindung teilweise zu blockieren, getestet werden. Als effektiv stellten sich nur die O-glykosylierten Peptide heraus. Nur ein N-glykosyliertes Peptid war ebenfalls in der Lage in hoher Konzentration die Spermienbindung zu hemmen. Nichtglykosylierte Peptide blieben ohne Einfluß.

Wurde durch die enzymatische Abspaltung von Sialinsäure terminale Galaktose exponiert, so erhöhte sich die Anzahl gebundener Spermien signifikant, während sie sich nach einer enzymatischen Abspaltung von β -Galaktose deutlich reduzierten.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Spermienbindung beim Schwein sehr komplex ist und vermutlich durch eine längere, O-glykosidisch gebundene Zuckerkette mit terminaler Galaktose vermittelt wird [Gal β (1-3)-GalNAc].

VIII. Summary

Biochemical and functional characterization of the zona pellucida of pig oocytes

Nicole Blase

The aim of this work was the biochemical and functional characterization of the porcine zona pellucida and to get information on the mechanism of sperm binding in the pig

First, the zona pellucida was biochemically investigated. Under non reducing conditions in the SDS-polyacrylamid-gel electrophoresis two bands were evident. The first one at 67 kDa (pZP1 or ZPA) and a second one at 55 kDa. The 55 kDa band exists actually of two different proteins of the same molecular weight, the pZP3 α (ZPB) and the pZP3 β (ZPC). The 67 and 55 kDa fractions could be separated by gel filtration or by reverse-phase-HPLC chromatography. A clear separation was only possible by reverse-phase-HPLC chromatography.

Polyclonal antibodies against pZP3 α (ZPB) and pZP3 β (ZPC) were used in the hemizona assay after proving their specificity and their ability to bind native zona pellucida. Both antibodies were able to inhibit sperm binding to the hemizona. Anti- α was the most effective one.

To characterize the sugar chains of the zona pellucida the lectin binding patterns of porcine and bovine oocytes were performed. Both species showed no difference in their lectin binding pattern. The following sugar structures were detected by the lectins:

N-glycosylated

β -Gal

α/β -Gal

α -D-Man

α/β -GalNAc

α -D-GlcNAc

Gal β 1-4GlcNAc

Fuc α (1-6)-GlcNAc

NeuNAc- α -(2-3/6)-Gal
 NeuNAc- α -(2-3/6)-Gal β (1-4)-D-GlcNAc

O-glycosylated

α -D-Gal β (1-3)-GalNAc
 NeuNAc- α -(2-3/6)-Gal β (1-3)-GalNAc

This sugar structure could not be found: Gal β (1-3)-GlcNAc.

A selection of lectins were set up in the hemizona assay, too. The lectins WGA [β (1-4)-D-GlcNAc-2-NeuNAc] and MAA [NeuNAc- α -(2-3)-Gal] were effective. The lectin AAA [Fuc α (1-6)-GlcNAc] had no influence. Also the oligosaccharide fucosyl-lactose was without any influence but sialyl-lactose acid inhibited sperm binding in a dose dependent manner.

Tryptic peptides of fetuin were produced, isolated via reverse-phase-HPLC chromatography and characterized in amino acid- and sugar analysis. Nine of these peptides were checked for their functional ability of blocking sperm binding partially. The O-glycosylated peptides were effective. Only one N-glycosylated peptide was also possible to inhibit sperm binding but only in a high concentration. Non glycosylated peptides were without any influence.

Enzymatic digestion of sialic acid offered terminal galactose as new binding ligands for sperm. This treatment stimulated sperm binding significantly. By an additional digestion of terminal β -galactose the number of bound sperm was clearly reduced.

The results show that sperm binding in the pig is a very complex process and is probably mediated by a longer O-glycosylated sugar chain carrying terminal galactose [Gal β (1-3)-GalNAc].