

Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW)
im Forschungsverbund Berlin e.V.

**Identifikation antigener Determinanten des ZPB2 Proteins der Hauskatze
und Charakterisierung ihrer kontrazeptiven und immunogenen
Eigenschaften**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium"
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin "Biotechnologie"

eingereicht an der
**Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam**

von
Jennifer Ringleb

Potsdam, den 14.06.2004

Gewidmet:

Margot Ringleb

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Problematik der verwilderten Hauskatze speziell in urbanen Gebieten	3
2.2	Bisherige Kontrazeptionsmethoden bei verwilderten Katzen	4
2.3	Die immunologische Kontrazeption als Alternative für die Katze und andere Spezies	5
2.3.1	Was ist immunologische Kontrazeption?.....	5
2.3.2	Überblick über mögliche Zielkomponenten der immunologischen Kontrazeption.....	6
2.4	Charakterisierung und Wirkweise der Zona pellucida als kontrazeptives Antigen	9
2.4.1	Struktur und Synthese der Zona pellucida.....	9
2.4.2	Nomenklatur der Zona pellucida.....	11
2.4.3	Funktion der Zona pellucida.....	15
2.4.4	Wirkmechanismen der immunologischen Kontrazeption mit ZP-Proteinen.....	17
2.4.5	Die Kehrseite der ZP-Kontrazeption – Nebenwirkungen.....	18
2.5	Überblick über Immunisierungsstudien mit ZP-Proteinen in der Kontrazeptionsforschung	21
2.5.1	Bedeutung und Problematik der Verwendung teilweise gereinigter, deglykosilierter und rekombinanter ZP-Proteine.....	21
2.5.2	Bedeutung und Problematik der Verwendung synthetischer oder rekombinanter Peptide.....	22
2.6	Vakzin-Design	23
2.6.1	Kontrolle der Stimulation einer Immunantwort.....	23
2.6.2	Vakzin-Komposition: Formulierung und Verabreichung.....	25
2.6.2.1	Das Immunogen - Wahl und „Design“ des Zielmoleküls.....	25
2.6.2.2	Wahl des Trägerproteins (Carrier).....	26
2.6.2.3	Wahl des Adjuvans.....	27

2.6.2.4	Vehikel – Verabreichungssysteme.....	28
2.6.2.5	Wege der Verabreichung kontrazeptiver Vakzine.....	30
2.6.2.6	Verabreichungsprotokoll.....	31
2.7	Fazit der Literaturübersicht.....	32
3	MATERIAL UND METHODEN.....	33
3.1	Epitop-Mapping - Detektion antigener Determinanten auf der feline ZPB2	
	Proteinsequenz unter Verwendung eines spezifischen Anti-fZP Antiserums.....	33
3.1.1	Herstellung der Epitop-Mapping-Membran.....	33
3.1.2	Erzeugung des primären Antikörpers gegen feline Zona pellucida Proteine.....	33
3.1.3	Immunologische Identifizierung antigener Determinanten.....	34
3.1.4	Regeneration der Membran.....	35
3.2	Identifizierung der detektierten Sequenzen und Peptidsynthese.....	35
3.2.1	Identifikation linearer Peptid-Epitope.....	35
3.2.2	Antigenitätsplot.....	35
3.2.3	Synthese der Peptide P1-P6.....	36
3.3	Dot Immunoassay.....	36
3.3.1	Modifikationen der Testbedingungen für den Nachweis einer Bindung zwischen den synthetischen Peptiden und dem Anti-fZP Antiserum bzw. für den Nachweis generierter Anti-Peptid Antikörper in Seren von Ratten und Katzen.....	38
3.4	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	40
3.4.1	Beschichtung der Mikrotiterplatten.....	41
3.4.2	Durchführung der ELISA.....	41
3.5	Herstellung von Anti-Peptid Antiseren in Ratten.....	43
3.5.1	Kopplung der Peptide an BSA.....	43
3.5.2	Immunisierungsschema der Ratten und Blutentnahmen.....	43
3.6	<i>In vitro</i> Testung des kontrazeptiven Potentials der Peptide 3 und 6.....	44
3.6.1	<i>In vitro</i> Reifung (IVM) und Befruchtung (IVF) von Katzenoozyten.....	44
3.6.1.1	Gewinnung von Katzentestis und –ovarien.....	44
3.6.1.2	Gewinnung und Kultur von befruchtungsfähigen Eizellen.....	44

3.6.1.3	Gewinnung und Aufarbeitung von Nebenhodenspermien.....	47
3.6.1.4	Kryokonservierung von epididymalen Spermien.....	48
3.6.1.5	Auftauen kryokonservierter Katzenspermien.....	49
3.6.1.6	Befruchtung und Embryonenkultur.....	49
3.6.1.7	Fixierung, Färbung und Auswertung potentiell befruchteter Eizellen.....	50
3.6.2	Testung des kontrazeptiven Potentials von synthetischen fZPB2 Peptiden bzw. Anti-Peptid Antiseren in der <i>in vitro</i> Kultur von Katzenoozyten.....	51
3.6.2.1	Überprüfung des kontrazeptiven Einflusses der synthetischen Peptide P3 und P6.....	51
3.6.2.2	Überprüfung des kontrazeptiven Einflusses der Ratten Anti-P3 und Anti-P6 Antiseren.....	51
3.6.2.3	Statistische Analyse der Ergebnisse aus den <i>in vitro</i> Untersuchungen	51
3.7	Untersuchung kontrazeptiver Peptid-Vakzine <i>in vivo</i>.....	52
3.7.1	Haltung der Katzen.....	52
3.7.2	Vakzin-Design für die Immunisierung von weiblichen Katzen.....	52
3.7.2.1	Kopplung der Peptide P3 und P6 untereinander.....	52
3.7.2.2	Proteingehaltsbestimmung.....	53
3.7.2.3	Kopplung der einzelnen sowie der vernetzten Peptide an Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)	54
3.7.2.4	Einschluss der KLH gekoppelten Peptide in Liposomen.....	55
3.7.3	Vakzinierung der Hauskatzen.....	55
3.7.4	Verpaarung und Kastration.....	56
3.7.5	Progesteron (P4) und Östradiol (E2) Bestimmungen.....	56
3.7.6	Histologische Aufarbeitung der Ovarien und Uteri.....	57
4	ERGEBNISSE.....	58
4.1	Epitop-Mapping der Aminosäuresequenz des feline ZPB2 Proteins.....	58
4.1.1	Identifikation von Peptid-Epitopen.....	58

4.1.2	Charakterisierung der Peptid-Epitope 3 und 6.....	58
4.2	Reaktivität zwischen den aus den detektierten Epitopen synthetisierten Peptiden und dem Anti-fZP Antiserum.....	62
4.3	Nachweis generierter Anti-Peptid Antiseren in den Seren Peptid-immunisierter Ratten (Dot Immunoassay) und Titerbestimmung (ELISA).....	63
4.4	Spermienbindungstest und <i>in vitro</i> Befruchtung in Anwesenheit der Peptide 3 und 6 bzw. ihrer Ratten Anti-Peptid Antiseren.....	64
4.4.1	Experiment 1: Testung des kontrazeptiven Einflusses der Peptide P3 und P6 auf Spermienbindung und Befruchtung.....	66
4.4.2	Experiment 2: Testung des kontrazeptiven Einflusses der Ratten Anti-Peptid Antiseren auf Spermienbindung und Befruchtung.....	67
4.5	Nachweis und Titerbestimmung generierter Anti-Peptid-Antiseren aus immunisierten Katzen mittels Dot Immunoassay und ELISA.....	69
4.5.1	Titerbestimmung generierter Katzen Anti-Peptid Antiseren mittels Dot Immunoassay.....	69
4.5.2	Titerbestimmung generierter Katzen Anti-Peptid Antiseren mittels ELISA.....	72
4.6	Untersuchung der Ovarien und Uteri Peptid-immunisierter Katzen nach der Kastration.....	75
4.6.1	Visuelle Untersuchung der Ovarien.....	75
4.6.2	Visuelle Untersuchung der Uteri.....	75
4.6.3	Histologische Untersuchung der Ovarien.....	76
4.6.3.1	Bewertung der Struktur der Gelbkörper.....	76
4.6.3.2	Untersuchung der Ovarien auf pathologische Veränderungen.....	78
4.6.4	Histologische Untersuchung der Uteri.....	78
4.7	Auswertung der Östradiol- und Progesteronwerte.....	78
4.7.1	Auswertung der Östradiolwerte.....	78
4.7.2	Auswertung der Progesteronwerte.....	79
4.8	Zusammenfassung der Trächtigkeitsbefunde der immunisierten Katzen.....	80

5	DISKUSSION	81
5.1	Vakzin-Design: Vom Immunogen zum wirksamen Vakzin	81
5.1.1	Wahl des Ziel-Immunogens.....	81
5.1.2	Identifikation antigener Determinanten.....	82
5.1.3	Verifizierung antigener Determinanten.....	83
5.1.4	Formulierung von Peptid-Vakzine – Wahl des Trägerproteins, der Kopplungsmethode und des Adjuvans.....	85
5.2	Austestung der immunogenen Aktivität eines Vakzins – Schwierigkeiten im Umgang mit Peptiden in Testsystemen zur Titerbestimmung	88
5.3	Bewertung der kontrazeptiven Aktivität eines Vakzins	89
5.3.1	Die Bedeutung der Überprüfung des kontrazeptiven Potentials in einem <i>in vitro</i> System.....	90
5.3.2	<i>In vivo</i> Erprobung der kontrazeptiven Effektivität der Peptid-Vakzine – Verpaarung von Katzen sechs Monate nach der Immunisierung.....	92
5.4	Schlussfolgerungen und Ausblick	95
5.4.1	Synthetische Peptide in der Immunokontrazeption.....	95
5.4.2	Formulierung der Vakzine für Hauskatzen (Vakzin-Design)	95
5.4.3	Dot Immunoassay und ELISA als Titernachweissysteme.....	97
5.4.4	Ausblick.....	97
6	ZUSAMMENFASSUNG	99
7	SUMMARY	101
8	ANHANG	103
8.1	Literaturverzeichnis	103
8.2	Abbildungsverzeichnis	117
8.3	Tabellenverzeichnis	118
8.4	Verzeichnis der verwendeten Chemikalien und Reagenzien	120

Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Aqua bidest	Aqua bidestillata, doppelt destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COC	“Cumulus-oocyte-complex“, Cumulus-Oozyten-Komplex
DMF	N,N-Dimethylformamid
DPBS	“Dulbecco`s phosphat buffered saline“, Dulbeccos Phosphatpuffer
DPBS	Dulbeccos`s phosphate buffered saline
E2	Östradiol
EDC	1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl]carbodiimide Hydrochloride
EDTA	[Ethylenedinitrilo]tetraacetic acid
EKH	Europäische Kurzhaarkatze
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCA bzw. CFA	Freund`s complete Adjuvant, Freundesches Adjuvans
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
fZP	Feline Zona pellucida
g	Gramm
G	Zentrifugalbeschleunigung
GnRH	Gonadotropin-Releasinghormon
h	Stunde
hCG	Humanes Choriongonadotropin
IgG	Immunglobulin G
IU	Internationale Einheiten
IVF	<i>In vitro</i> Fertilisation (Befruchtung)
IVM	<i>In vitro</i> Maturation (Reifung)
kDa	kilo Dalton
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
LH	Luteinisierendes Hormon
MAP	Mutiple antigen peptides
MBS	[m-Maleimido-benzoyl-N-hydroxysulfosuccinimidester
mg	Milligramm
min	Minute
Mio.	Millionen
ml	Milliliter

mm	Millimeter
mM	Millimol
NSB	Nichtspezifische Bindung
OD	Optische Dichte
P1-P6	Peptid 1-6
P4	Progesteron
PBS	“phosphat buffered saline”, Phosphatpuffer
POD	Peroxidase
pZP	Porcine Zona pellucida
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate, Natriumdodezyl-Sulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Tab.	Tabelle
TALP	Tyrode Medium mit Albumin, Laktat und Pyruvat
TBS	Tris buffered saline, TRIS-Puffer
TMB	Tetramethylbenzidin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T-TBS	Tween-Tris buffered saline
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume
ZP	Zona pellucida
ZP1,2, 3	Zona pellucida Protein 1, 2, 3
ZPA, B, C	Zona pellucida Protein A, B, C
ZPB2	Zona pellucida B2 Protein

1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG

Die Möglichkeit durch Vakzinierung eine verlässliche, langanhaltende und reversible Form der Empfängnisverhütung (Immunokontrazeption) zu generieren, wird in der modernen Kontrazeptionsforschung für Haus- seltener sogar für Wildtiere als nahezu ideal angesehen. Vornehmlicher Grund für diese Sichtweise ist die Tatsache, dass die Inhibierung des eigentlichen Befruchtungsprozesses durch Antikörper einen Eingriff in die Fortpflanzung ermöglicht, ohne dass zwangsläufig Sexualverhalten und/ oder das Endokrinum beeinflusst werden.

Obwohl seit über 30 Jahren an der Immunokontrazeption geforscht - und inzwischen ein faszinierendes Basiswissen etabliert wurde, ist bis heute kein finales praktikables Produkt zur Vakzinierung verfügbar.

Frühe Untersuchungen von PORTER (1965) bzw. PORTER et al. (1970) demonstrierten erstmals, dass gegen Ovargewebe generierte Antikörper die Fertilität immunisierter Tiere beeinträchtigten - ohne dass der dahinterstehende Mechanismus genauer spezifiziert werden konnte. Die Identifikation der Zona pellucida (eine die Eizelle umgebende Glykoproteinhülle) als Zielantigen für Antikörper mit gewebsspezifischen Eigenschaften gelang OWNBY & SHIVERS (1972) bzw. SACCO & SHIVERS (1973). Seither steht die Zona pellucida neben den Spermiantigenen als Ziel für eine Immunokontrazeption im Zentrum der Kontrazeptionsforschung. Nach diesem vielversprechenden Beginn relativierten jedoch gravierende Nebenwirkungen, wie auftretende Zyklusabnormitäten, Eierstockentzündung (Oophoritis) und nicht steuerbare Irreversibilität der Kontrazeption, die Hoffnung auf eine rasche Etablierung eines ZP basierenden Immunokontrazeptivums. Die Anwendung von ZP-Antigenen für die humane Kontrazeption wird aus diesen Gründen kaum noch diskutiert. Im Gegensatz zum Menschen ist eine mögliche Irreversibilität der Immunokontrazeption bei verwilderten Hauskatzen durchaus wünschenswert. Sie sollte jedoch keinesfalls mit entzündlichen Prozessen verbunden sein, unter denen das Tier leiden könnte.

Die Fokussierung auf eine genauere Identifizierung wirksamer Oberflächenepitope der Zona pellucida eröffnete die Möglichkeit, statt des gesamten Proteins, ausgewählte synthetische oder rekombinante Peptide für die Immunisierung zu verwenden (HINSCH et al., 2003). Viele Wissenschaftler (STEVENS, 1995; MAHI-BROWN, 1996; SADLER et al., 2000) erhofften sich durch die Trennung von B- und T-Zell-Epitopen eine neue Generation nebenwirkungsarmer bzw. -freier ZP-Vakzine.

Die Verwendung von Peptiden (antigenen Determinanten) als Basis für kontrazeptive Vakzine wirft jedoch ein Problem ganz anderer Art auf. Aufgrund der geringen Größe der Sequenzen und der damit verbundenen geringen Immunogenität, ist ein spezielles „Vakzin-Design“, welches möglichst selektiv die Generierung einer Immunantwort gegen das Zilopeptid stimuliert, von essentieller Bedeutung.

Zielstellung der vorliegenden Arbeit:

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Evaluierung des immunogenen sowie kontrazeptiven Potentials ausgewählter Peptide des felinen ZPB2, eines der drei Zona pellucida Proteine der Hauskatze (*Felis catus*; korrekter *Felis sylvestris lybica forma catus*). Diese Peptide sollten Bestandteil eines kontrazeptiven Vakzins zur Regulation der Population verwilderter Hauskatzen sein.

Die vorliegende Arbeit beinhaltete zunächst die Identifikation relevanter antigenen Determinanten mittels Epitop-Mappings. Das kontrazeptive Potential zweier als B-Zell-Epitope charakterisierte Peptide, sowie entsprechend generierter Peptid-Antiseren wurde in der *in vitro* Befruchtung von Katzenoozyten (Einfluss auf Spermien-Eizell-Wechselwirkungen) überprüft. Darüber hinaus wurden erste Prototypen potenter Peptid-Vakzine formuliert, welche den speziellen Bedürfnissen der Kontrazeption verwilderter Katzen (einmalige Applikation ohne Boosterimmunisierung) entgegenkommen.

Die immunogene Kapazität der Vakzine wurden *in vivo* in Katzen evaluiert, die Bestimmung der Antikörpertiter erfolgt mit der Methodik des Dot Immunoassays, sowie des ELISA. Parallel dazu erfolgte das Abschätzen der kontrazeptiven Effektivität des Vakzins *in vivo*.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Problematik der verwilderten Hauskatze speziell in urbanen Gebieten

Verwilderte Hauskatzen sind ein Problem vieler Städte und Gemeinden. Allein für die USA wird die Anzahl streunender Katzen auf 60-100 Mio. Tiere geschätzt (ALLEY CAT ALLIES, 2002). Mehrere Millionen Tiere werden jährlich allein aus diesem Grund und ohne medizinische Indikation euthanasiert. Das Problem der Überpopulation von Katzen in urbanen Gebieten existiert auch in Deutschland. Die im Vergleich zu den USA fortschrittliche Tierschutzgesetzgebung verbietet jedoch, die Lösung des Problems in der schlichten Euthanasie der Tiere zu suchen.

Die Populationsdichte ebenso wie die Sozialstruktur von Katzen ist maßgeblich abhängig vom Nahrungsangebot (LIBERG & SANDELL, 1988). Der städtische Lebensraum bietet neben einer Vielzahl geeigneter Habitate (Grünanlagen, Hinterhöfe, Gärten, leerstehende Gebäude) in der Regel vielfältige Möglichkeiten der Ernährung. Verwilderte Katzen werden von Anwohnern gefüttert, ernähren sich von Abfällen oder durch den Fang von Kleinsäugetieren und Vögeln (KALZ, 2001). Eine ökologische Bedrohung für diverse Singvögel durch das Jagdverhalten der Katze wird nach wie vor kontrovers diskutiert (SPITTLER, 1978, 1999; CHURCHER & LAWTON, 1987; FITZGERALD, 1988). Dagegen steht die Bedeutung der Katze als potentieller Überträger von Krankheiten auf Mensch und Tier außer Frage (MAHLOW & SLATER, 1996). Hauskatzen können direkt bzw. indirekt durch ihren Kot Parasitosen (Flohbefall, Wurmbefall, Kokzidiose, *Larva migrans visceralis*) und Infektionskrankheiten verbreiten, die sowohl für den Menschen (Toxoplasmose, Salmonellose, Tollwut) als auch für Haustiere (Katzenschnupfen, Katzenseuche, feline Leukose, feline Immunschwäche [FIV], feline infektiöse Peritonitis [FIP],) relevant sind (PATRONEK, 1998; OLSEN, 1999).

Unter den beschriebenen Lebensbedingungen führt das starke Fortpflanzungsvermögen der Katze rasch zur Überpopulation und damit zur Verstärkung der Problematik. Eine Reproduktionskontrolle der verwilderten Katzen in der Stadt ist daher unbedingt erforderlich (KALZ, 2001).

Prinzipiell können Populationen durch Erhöhung der Mortalitätsrate oder durch Senkung der Geburtenrate kontrolliert werden (TUYTTENS & MACDONALD, 1998). Katzen besitzen ein hohes Reproduktionsvermögen. Weibliche Tiere beginnen im Alter von 6 bis 8 Monaten erste Zyklusansätze zu zeigen, Kater erreichen die Pubertät zwischen dem 8. und dem 12.

Lebensmonat (BRUNNER, 1994). Die durchschnittliche Anzahl der Würfe pro Jahr liegt bei zwei, die Wurfgröße bei verwildert lebenden Hauskatzen geben JONES & COMAN (1982) mit 4,4 an. OLSON & JOHNSTON (1993) kalkulieren, dass ein Paar Katzen in 7 Jahren theoretisch 174.760 Nachkommen direkt bzw. indirekt erzeugen könnte, wenn man davon ausgeht, dass kein Junges stirbt und das Geschlechterverhältnis 1:1 ist.

2.2 Bisherige Kontrazeptionsmethoden bei verwilderten Katzen

In der Vergangenheit sind bereits eine Reihe von Methoden verwandt worden, um das enorme Fortpflanzungsvermögen verwilderter Katzen zu kontrollieren. Von besonderer Bedeutung in stark besiedelten Gebieten ist dabei der Schutz und die Sicherheit von Nicht-Zielspezies (einschließlich des Menschen) vor derartigen Maßnahmen. Vergiften oder Euthanasieren haben sich im Gegensatz zur kontrollierten Aufrechterhaltung eines Bestandes als ineffizient erwiesen. Dies liegt einerseits an dem von TABOR (1981) beschriebenen Vakuumeffekt, bei dem Katzen aus umliegenden Gebieten in das nicht mehr besiedelte immigrieren. Auf der anderen Seite finden derartige Methoden in großen Teilen der Bevölkerung keine Akzeptanz. Die alternativ durchgeführte Etablierung von Kastrationsprogrammen resultierte dagegen relativ schnell in einer stabilen Anzahl Katzen, da keine Jungtiere mehr hinzukamen (NEVILLE & REMFRY, 1984; ZAUNBRECHER & SMITH, 1993). Eine kleine Subpopulation von einem Dutzend Katzen am Londoner Fitzroy Square erlosch etwa 10 Jahre nachdem mit der Kastration der Tiere begonnen wurde (REMFY, 1996). Die Methode der chirurgischen Kastration erweist sich damit als hocheffektives Mittel zur Bestandkontrolle verwilderter Hauskatzen (NEVILLE, 1989).

Nach MAHLOW & SLATER (1996) hat die Kastration auch Auswirkungen auf das Verhalten der Katzen: sie streunen und markieren weniger und neigen seltener zu lautstarken kämpferischen Auseinandersetzungen. In einer derart kontrollierten Population werden die Tiere häufig veterinärmedizinisch grundversorgt, sind seltener Krankheitsüberträger und werden daher von der Bevölkerung leichter toleriert. Bisher gibt es wenige Daten über Langzeiteffekte jeglicher Form der Kontrazeption in Populationen freilebender urbaner Katzen. Nach einer Follow-up Studie von REMFRY (1996) lebten noch 70% der Katzen 5 Jahre nach der Initiierung eines Kastrationsprogramms. Einige Autoren bestätigen, dass kastrierte Tiere eine höhere durchschnittliche Lebenserwartung haben als unkastrierte (HAMILTON et al., 1969; TABOR, 1983; KALZ, 2001).

Auch in den USA werden derzeit Kastrationsprogramme etabliert, um die Reproduktion der Tiere einzudämmen, ohne den Katzen Schaden zuzufügen (HUGHES & SLATER, 2002; SCOTT et al., 2002). LEVY et al. (2003) gehen nach ihren Untersuchungen davon aus, dass es mit dem unter der Bezeichnung TNR (Trap-Neuter-Return) laufenden System langfristig möglich sein wird, die Anzahl streunender Katzen zu reduzieren. Gestützt wird diese Aussage durch Computersimulationen, mit denen es möglich ist, die Populationsdynamik einer theoretischen Katzenpopulation unter Einfluss von Kastrationsmaßnahmen zu ermitteln. Eine Kastration von über 65% der weiblichen Katzen hat demnach eine Verringerung des Populationsanstieges um mehr als 70% zur Folge. Demgegenüber müssten 95% der Kater kastriert werden, um einen ähnlichen Effekt auf die Entwicklung der Populationsgröße zu erzielen (WEGNER, 2000). Für die männlichen Tiere kann alternativ zur Kastration eine Sterilisation in Betracht gezogen werden. Infertile Verpaarungen erhöhen den Anteil pseudogravidier Katzen in der Population, welches ebenfalls einen senkenden Einfluss auf den Anstieg der Populationsgröße hätte. Der Eingriff der Sterilisation ist bei Katern jedoch gravierender als die Kastration.

Die chirurgische Kontrazeption hat den Vorteil der dauerhaften und hundertprozentigen Sterilität und erwies sich als hocheffektives Mittel zur Bestandkontrolle verwilderter Hauskatzen (NEVILLE, 1989). Sie ist jedoch mit einer erheblichen Stressbelastung des einzelnen Tieres verbunden, erfordert eine stationäre Behandlung und hohen Personaleinsatz. Deshalb suchen gerade Tierschutzorganisationen nach Alternativen, die preisgünstiger, leichter anwendbar und nebenwirkungsarm, dabei aber von dauerhafter Wirkung und stressarm für die Tiere sind (CARTER, 1990).

2.3 Die immunologische Kontrazeption als Alternative für die Katze und andere Spezies

2.3.1 Was ist immunologische Kontrazeption?

Immunokontrazeption ist definiert als die Inhibierung der Fruchtbarkeit durch immunologische Methoden. Grundlage des Konzeptes ist die Induktion einer Immunantwort gegen Antigene (Proteine, Hormone) des Reproduktionssystems. Spezifische Antikörper gegen diese **körpereigenen** Makromoleküle können jene in ihrer Funktion derart hemmen, dass dadurch Infertilität verursacht wird. Essentielle Voraussetzung für die

Immunokontrazeption ist die Identifikation und Isolierung relevanter Antigene sowie deren Immunogenität im eigenen Organismus. Frühe Studien konzentrierten sich auf Spermienantigene oder Komponenten des männlichen Reproduktionstraktes. Inzwischen ist der Ansatz breiter geworden und umfasst auch Studien über mögliche Komponenten, die mit dem weiblichen Reproduktionssystem assoziiert sind, so z. B. Oozyten, Embryonen, Trophoblasten, Feten, die Plazenta oder Reproduktionshormone (SACCO, 1981a).

2.3.2 Überblick über mögliche Zielkomponenten der immunologischen Kontrazeption

Bei der Wahl eines kontrazeptiven Immunogens ist zunächst entscheidend, dass es eine Relevanz im Reproduktionssystem besitzt. In aller Regel basiert es entweder auf den bekannten reproduktionsrelevanten Hormonen (Gonadotropin-Releasinghormon [GnRH], Follikel-stimulierendes Hormon [FSH], Luteinisierendes Hormon [LH], humanes Choriongonadotropin [hCG]), oder gehört zur sehr heterogenen Gruppe der Oberflächenantigene von Spermien, Eizellen, Trophoblasten oder frühen Embryonen. Die Lokalisation an der Oberfläche kann entscheidend für die Zugänglichkeit durch Antikörper und Lymphozyten sein. Die derzeit (unabhängig von der Zielspezies) neben den Zona pellucida Proteinen im Blickfeld der Forschung stehenden Zielmoleküle sollen nachfolgend kurz vorgestellt werden.

GnRH: Die Anwendung von Vakzinen auf der Basis dieses hypothalamischen Hormons, welches die Sekretion der Hypophysenhormone reguliert, gilt als äußerst effektiv und ist, ebenso wie Immunokontrazeption gegen LH, einer reversiblen Kastration funktionell äquivalent (COHNEN, 1995). Allerdings gibt es starke individuelle Unterschiede im Zeitpunkt des Auftretens von Antikörpern ebenso wie in der Dauer, die diese persistieren. Darüber hinaus ist der Einsatz derartiger Vakzine nicht frei von teilweise gravierenden Nebenwirkungen, wie endokrinen Störungen, Veränderungen der Anatomie (Zurückgehen sekundärer Geschlechtsmerkmale) oder des Verhaltens der behandelten Tiere (GRIFFIN, 1990). In der Praxis ist die Anwendung von GnRH-Vakzinen aufgrund der oben beschriebenen Nebenwirkungen äußerst eingeschränkt und für den Menschen grundsätzlich indiskutabel. Der Einsatz bei Zootieren wird nur selten beschrieben, es fehlen insbesondere aktuelle Studien. Allenfalls in der Nutztierhaltung findet GnRH gelegentlich Verwendung. Hauptzweck der Anwendung ist jedoch, die Schlachtkörperausbeute und -qualität zu

verbessern bzw. den unangenehmen Geruch der männlichen Schweine und Ziegen zu eliminieren (THOMSON, 2000).

FSH/LH: Für die Hypophysenhormone gilt im Prinzip das Gleiche wie für GnRH. STEVENS (1995) weist darüber hinaus auf das Risiko von Autoimmunerkrankungen hin, da gerade FSH kontinuierlich synthetisiert wird. Derartige Nebenwirkungen könnten dann auch den Syntheseort, die Hypophyse, betreffen. Die Immunisierung gegen FSH wurde insbesondere im Hinblick auf die Verwendbarkeit als mögliches männliches Kontrazeptivum untersucht. Im Gegensatz zur Neutralisation von GnRH oder LH bleibt die Testosteronproduktion bestehen, da die Leydigzellfunktion intakt bleibt, die Spermatogenese wird jedoch unterdrückt. Infertilität konnte bei mehreren Tieren nachgewiesen werden und war zumeist reversibel (WICKINGS & NIESCHLAG, 1980).

hCG: Eine weitere effektive Alternative zumindest für den Menschen stellt das humane Choriogonadotropin (hCG) dar, welches für die Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft essentiell notwendig ist. Aufgrund einer gemeinsamen Untereinheit bestehen Kreuzreaktionen zu FSH und insbesondere zu LH (KHARAT et al., 1990) und TSH (Thyreoida stimulierendes Hormon). Das Risiko unerwünschter Kreuzreaktion kann durch den Einsatz hCG spezifischer synthetischer Peptide minimiert werden. In der ersten klinischen Untersuchungsphase traten keine Nebenwirkungen auf, jedoch zeigte das Antigen auch nur geringes immunogenes Potential (AITKEN, 2002).

Spermien-Antigene: Der Ansatz gilt zumindest für den Menschen als durchaus vielversprechend, da Antikörper gegen Spermien auch natürlicherweise in einigen Frauen mit zunächst ungeklärter Unfruchtbarkeit nachgewiesen werden konnten. Ein kontrazeptives Vakzin auf der Basis von Spermienoberflächenantigenen ist sowohl für Frauen als auch für Männer entwickelbar (AITKEN, 2002). Ein grundsätzlicher Nachteil der Immunokontrazeption gegen Spermienbestandteile ist die Notwendigkeit hoher Anti-Spermien Antikörpertiter aufgrund der großen Anzahl von Spermatozoen. Es gibt eine Vielzahl von Spermienantigenen, deren Neutralisation durch Antikörper ein Ausschalten der Befruchtungsfähigkeit verursachen kann. Die meisten Antigene sind jedoch nicht spezifisch für das Spermium, so dass entsprechende Antikörper des weiblichen Tieres auch andere Gewebe angreifen können. Ein spezifisches und deshalb vielversprechendes Molekül ist das

Spermienoberflächenantigen PH-20, ein 64 kDa schweres Hyaluronidase-Vorläuferprotein, welches auf der Spermienplasmamembran lokalisiert und somit für Antikörper frei zugänglich ist (JONES, 1994). Die Immunisierung mit PH-20 führte in männlichen und weiblichen Meerschweinchen zu sechsmonatiger Infertilität (PRIMAKOFF et al., 1988). Eine neuere Studie belegte allerdings, dass auch männliche Mäuse mit einer Nullmutation auf dem PH-20 Gen fertil waren. In *in vitro* Versuchen zeigten die Spermien besagter Mäuse reduzierte Fähigkeiten, die Kumuluszellen zu durchdringen, was zu verzögerter Fertilisation führte. Weitere Analysen enthüllten das Vorhandensein anderer Hyaluronidasen, die wahrscheinlich im Akrosom lokalisiert sind, so dass die Anwesenheit von PH-20 zumindest in der Maus entbehrlich ist (BABA et al., 2002).

Zona pellucida – ein potentes Eizell-Antigen: Die Zona pellucida (ZP) ist eine spezifische extrazelluläre Eizellhülle, die nach SACCO & YUREWICZ (1989) eine Reihe von Vorbedingungen erfüllt, welche sie als kontrazeptives Antigen attraktiv erscheinen lassen:

- Die ZP ist reproduktionssystemspezifisch.
- Ihr kommt eine fundamentale Bedeutung im Fertilisationsgeschehen zu.
- ZP Protein zirkuliert nicht im Blutsystem, die Bildung von Immunkomplexen ist daher unwahrscheinlich.
- Da nur wenige Eizellen parallel pro Zyklus ovulieren, kann bereits eine geringgradige Immunantwort wirksam werden.
- Speziesfremde ZP-Proteine sind hoch immunogen.
- Zumindest vom Schwein ist ZP über Schlachthöfe grundsätzlich verfügbar.

Die Effektivität von Zona pellucida Proteinen in der Kontrazeption ist bereits bei vielen Spezies beschrieben worden (SACCO et al., 1987; MAHI-BROWN et al., 1988; KIRKPATRICK et al., 1991; PATERSON et al., 1992). In der Vergangenheit war die Immunisierung mit ZP-Proteinen jedoch häufig von Beeinträchtigungen der normalen Ovarfunktion begleitet (s. Kap. 2.4.5). Die Tatsache, dass nicht nur ovulierte Eizellen, sondern auch der Synthesort (heranreifende Follikelzellen) der ZP-Proteine im Ovar als Ziel erkannt werden (STEVENS, 1995), kann faktisch zu einer immunologischen Kastration führen und schließt daher die Anwendung in bestimmten Spezies (z.B. Mensch) vorerst aus.

2.4 Charakterisierung und Wirkweise der Zona pellucida als kontrazeptives Antigen

2.4.1 Struktur und Synthese der Zona pellucida

Die Zona pellucida ist eine extrazelluläre, visköse Glykoproteinhülle, die die Säugetier-Eizelle vollständig umgibt und von den umgebenden Follikel- und Kumuluszellen abgrenzt (YANAGIMACHI, 1994). In der Regel besteht die Zona aus drei verschiedenen Glykoproteinen, ZP1, ZP2, ZP3 bzw. ZPB, ZPA, ZPC (zur Nomenklatur vergl. Kap. 2.4.2), die netzartig miteinander verbunden sind (WASSARMAN, 1988; DUNBAR et al., 1994). Für die Maus konnte nachgewiesen werden, dass ZP2 und ZP3 Dimerketten bilden, die durch ZP1 als Strukturprotein untereinander vernetzt werden. An dieses Proteingrundgerüst spezifisch (o- und n- glykosidisch), befinden sich verschiedene Kohlenhydratketten. Die Gensequenz der Zona Pellucida verschiedener Spezies ist sehr einheitlich und weist Homologien von 69-85% zwischen den bisher untersuchten Arten auf (HARRIS et al., 1994).

Die Synthese und Formierung der einzelnen Zona pellucida Proteine scheint zwischen den Spezies sowohl im Zeitpunkt der Genese als auch im Bildungsort zu variieren. Nach den Autoren BLEIL & WASSARMAN (1980a) bzw. GREVE et al. (1982) geht bei der Maus die Synthese allein von der Eizelle aus. Bei anderen Säugetierspezies dagegen gibt es Hinweise auf eine Beteiligung der umliegenden Granulosazellen (Kaninchen: LEE & DUNBAR, 1993; Kaninchen, Seidenäffchen und Rhesusaffen: GROOTENHUIS & PHILIPSEN, 1996; Javaneraffen: MARTINEZ et al., 1996; Weißbüscheläffchen: BOGNER et al., 2004; Rind: KÖLLE et al., 1998; Hund: BLACKMORE et al., 2004). JEWGENOW & RUDOLPH (2001) charakterisieren für die Katze sogar die Granulosazellen allein als Syntheseort der ZP.

Allgemein gilt, dass die Synthese der Zona pellucida mit der Rekrutierung primordialer Keimzellen in den Pool wachsender Follikel beginnt (AITKEN et al., 1996). Der Hauptteil der Glykoproteinsynthese erfolgt jedoch kontinuierlich bis die Eizelle mit Erreichen des Tertiärfollikelstadiums ausgewachsen ist (zur Charakterisierung der Follikulogenese siehe Abb.1). Einige Autoren beschreiben mRNA-Expression als Kennzeichen von Syntheseaktivität auch noch bei präovulatorischen Eizellen (KÖLLE et al., 1996; KIMURA et al., 2002). In der Katze ist das in dieser Arbeit untersuchte ZPB2 Protein (siehe Kap. 2.4.2) das einzige Zona Protein, bei dem Genexpression bereits in Primärfollikeln nachgewiesen wurde (JEWGENOW & FICKEL, 1999). Im nächsthöheren (Sekundär-)Follikelstadium ist die Genexpression auch für alle weiteren ZP-Proteine belegt.

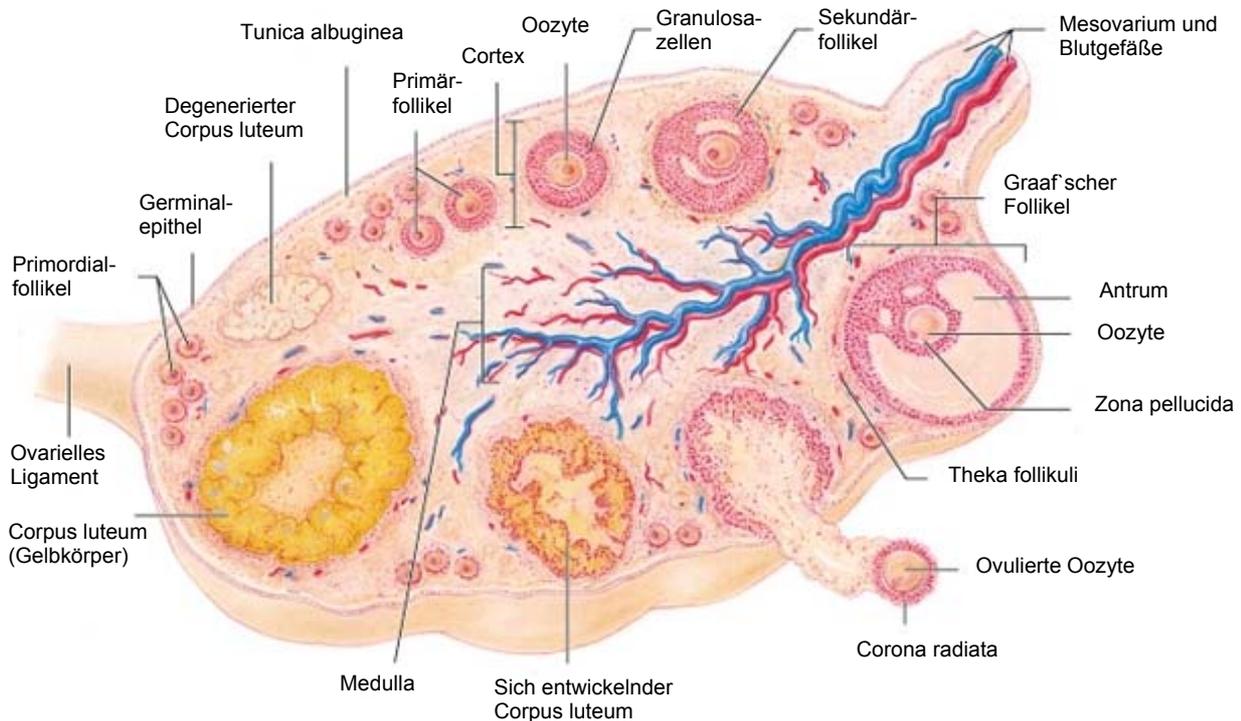
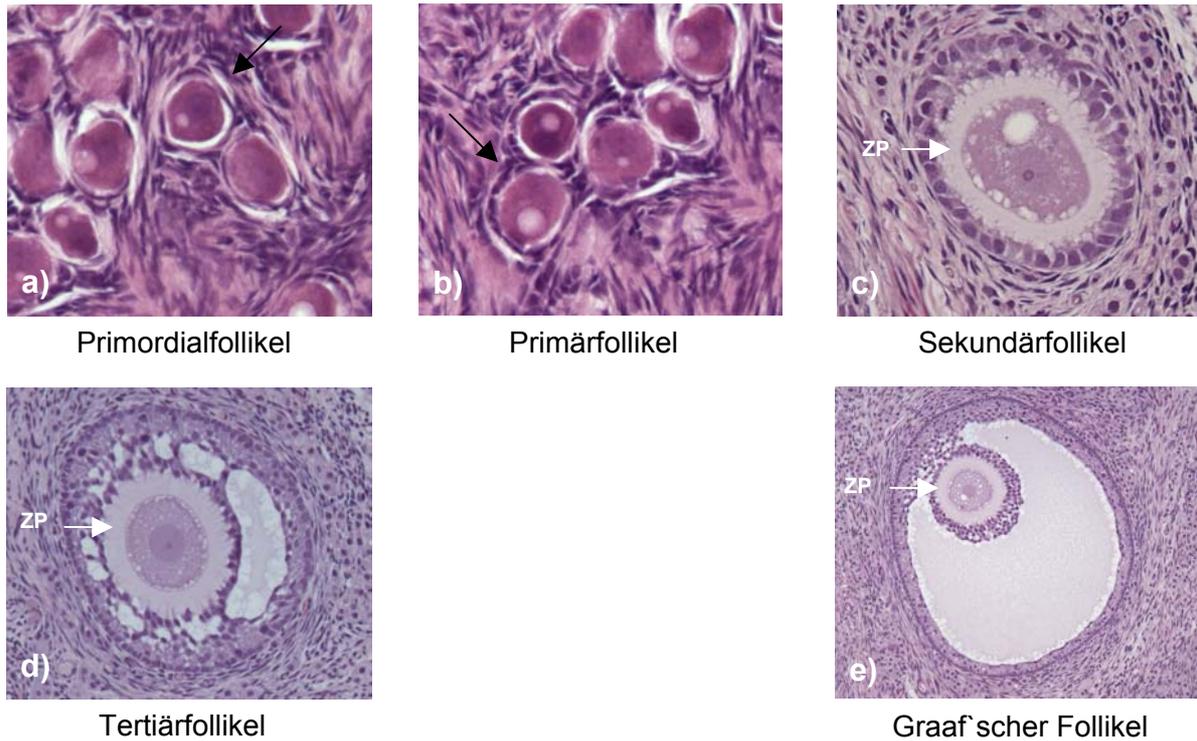


Abb. 1 Schema der Follikulogenese im Ovar (entnommen der Homepage <http://www.colorado.edu/epob/epob4480tsai/ovary>). Die fünf im Ovar vorkommenden Entwicklungsstadien der Follikel, beginnend mit den Primordialfollikel und endend mit den Graaf'schen Follikeln sind zusätzlich histologisch abgebildet (Vergrößerung der Abbildungen a)-c) 200fach; d)-e) 100fach). Die Struktur der Zona pellucida (ZP) lässt sich in der Katze ab dem Sekundärfollikelstadium histologisch nachweisen und ist entsprechend gekennzeichnet.

2.4.2 Nomenklatur der Zona pellucida

Die erstmals mittels SDS-PAGE identifizierten ZP-Proteine waren die der Maus bzw. Ratte. Sie wurden ZP1, ZP2 und ZP3 genannt, beginnend mit dem höchsten und endend mit dem niedrigsten Molekulargewicht (REPIN & AKIMOVA, 1976; BLEIL & WASSARMAN, 1980b). Nachfolgend identifizierte ZP-Glykoproteine anderer Spezies wurden nach verschiedenen Kriterien benannt: Molekulargewicht des Glykoproteins, Proteinsequenzlänge oder anhand von Sequenzvergleichen. Die Einführung der molekularbiologischen Techniken enthüllte, dass viele der mutmaßlichen Homologien, die den ZP-Proteinen auf der Basis ihrer elektrophoretischen Mobilität zugeschrieben wurden, nicht haltbar waren.

Zu Beginn der neunziger Jahre gipfelte die widersprüchliche Namensgebung der ZP-Gene und -Proteine in einem konfusem Nomenklatorsystem, welches die Kommunikation über die einzelnen Genfamilien stark erschwerte. HARRIS et al. (1994) nahmen sich dieses Problems an und schlugen ein einheitliches System vor, nach dem die ZP-Gene prinzipiell nach der Länge der Proteinsequenz, für die sie kodieren, benannt werden sollten. Unglücklicherweise ist die Sequenz des murinen ZP2 jedoch länger als die des ZP1, so dass die Bezeichnung beider hätte getauscht werden müssen. Um weitere Konfusionen zu vermeiden, wurden stattdessen Buchstaben eingeführt (ZP1 = ZPB, ZP2 = ZPA und ZP3 = ZPC).

Nach der Aufklärung der kompletten cDNA Sequenz des murinen ZP1-Gens und des humanen ZPB-Gens wurde aufgrund der großen Ähnlichkeit zunächst angenommen, beide seien ortholog¹. HUGHES & BARRETT (1999) identifizierten jedoch eine weitere humane Gensequenz, die sich zwar ortholog zum murinen ZP1-Gen, aber paralog zum bisherigen humanen ZPB-Gen darstellte. Die Analysen dieser Autoren deuteten darauf hin, dass der Sachverhalt auf eine Genverdopplung zurückzuführen ist, die zur Folge hatte, dass zwei paraloge Gengruppen innerhalb der ZPB-Familie entstanden. Die Autoren SPARGO & HOPE (2003) vertreten aufgrund ihrer Berechnungen die Ansicht, dass die ZPB Familie sogar aus insgesamt drei verschiedenen Gengruppen besteht, ZPB, ZPB1 und ZPB2 (Abb. 2). Dabei soll ZPB sich ortholog zu ZPB1 und ZPB2 verhalten, die beiden letzteren jedoch paralog zueinander stehen, da sie sich von verschiedenen Kopien des ursprünglichen ZPB-Genes aus

¹Def. ortholog: Als ortholog werden Gene verschiedener Spezies bezeichnet, die sich durch Artbildung (Speziation) aus einem gemeinsamen Vorfahren entwickelten. Gemeinhin bleibt dabei die gleiche Funktion der Gene erhalten. Im Gegensatz dazu gehen paraloge Gene auf eine Genverdopplung zurück, bei der häufig neue Funktionen evolviert werden (<http://homepage.usask.ca/~ct1271/index.shtml>, Chis T. Lewis, Agriculture and Agri-food Canada, Saskatoon Research Centre, Saskatoon, SK, Canada).

entwickelten. Es ist daher unzulässig, die Begriffe ZP1 und ZPB grundsätzlich parallel zu verwenden.

Der ZPB1-Genngruppe gehören das murine ZP1 und das zuletzt identifizierte humane ZPB an, zu der ZPB2-Gruppe werden das zuerst identifizierte humane ZPB und das früher als ZPB (HARRIS et al., 1994) bezeichnete Protein der Katze gezählt. Die vorliegende Arbeit folgt der von SPARGO & HOPE (2003) vorgeschlagenen Systematik. Die Originalbezeichnungen aus früheren Veröffentlichungen werden nur beibehalten, wenn die neue Nomenklatur nicht eindeutig anwendbar ist.

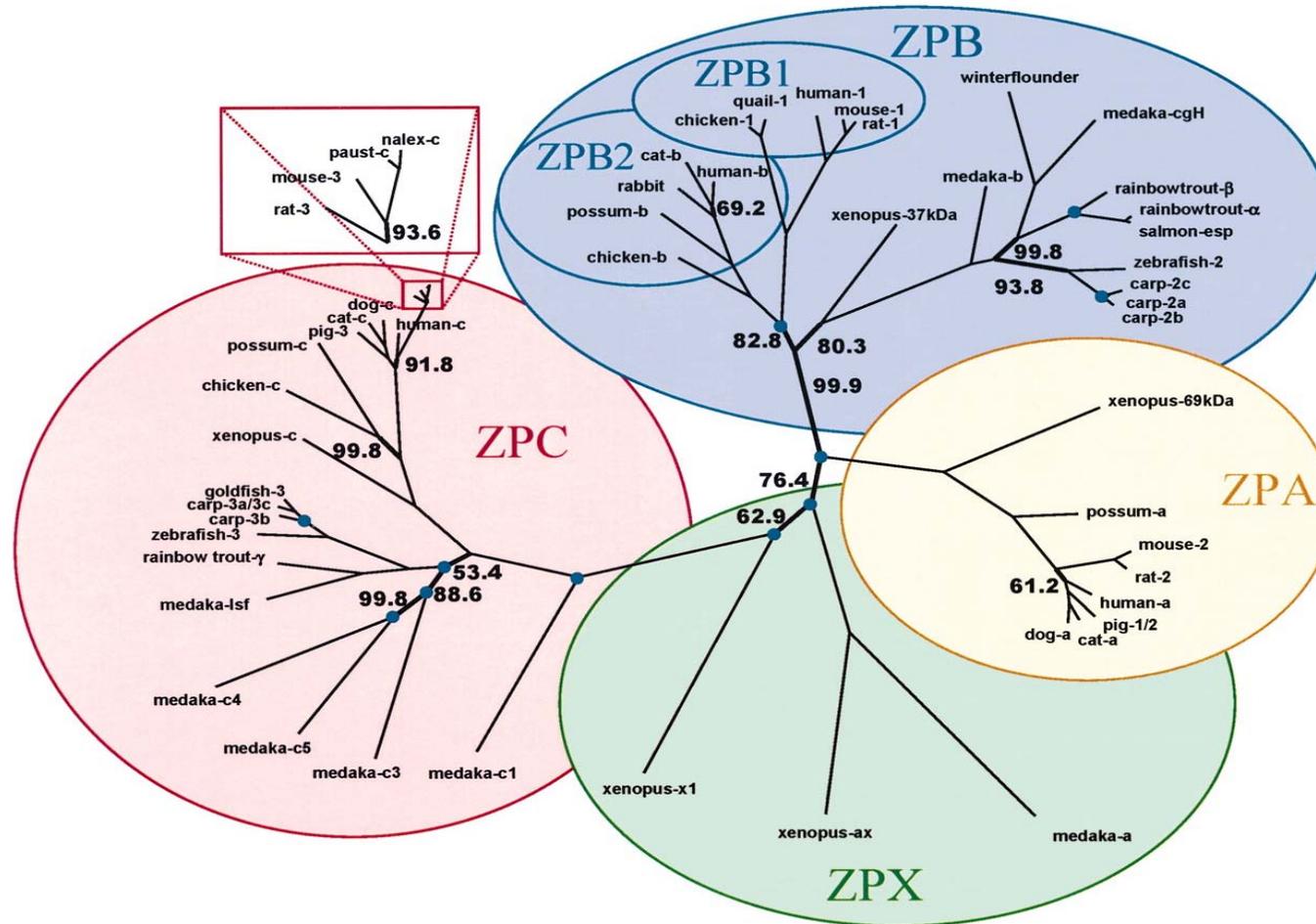


Abb. 2 Phylogenetischer Stammbaum der ZP Genfamilie. Die relative Zweiglänge gibt den Grad der Evolution entlang eines bestimmten Astes wieder. Innerhalb der ZPB Genfamilie befinden sich die paralog zueinander stehenden Gruppen ZPB1 und ZPB2 (Übernommen aus SPARGO & HOPE, 2003).

Tab. 1 Auszug aus der Liste charakterisierter Gene der ZP Genfamilie nach (SPARGO & HOPE, 2003)

Tierspezies	Wissenschaftliche Bezeichnung	Stammbaum-bezeichnung	Accession Nummer	GenBank Name	Vorgeschlagene Bezeichnung
Mensch	<i>Homo sapiens</i>	Human-a	M90366	ZPA	ZPA
		Human-b	U05781	ZPB	ZPB2
		Human-c	A18567	ZPC	ZPC
		Human-1	AC004126	ZP1	ZPB1
Weißbücheläffchen	<i>Callithrix jacchus</i>	Marmoset-1	Y10822	ZP1	ZPB2
		Marmoset-2	Y10767	ZP2	ZPA
Indischer Hutaffe	<i>Macaca radiata</i>	Macaque-1	Y10381	ZP1	ZPB2
		Macaque-2	Y10690	ZP2	ZPA
		Macaque-3	X82639	ZP3	ZPC
Katze	<i>Felis catus</i>	Cat-a	U05776	ZPA	ZPA
		Cat-b	U05777	ZPB	ZPB2
		Cat-c	U05778	ZPC	ZPC
Kaninchen	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Rabbit	M58160	ZP	ZPB2
Maus	<i>Mus musculus</i>	Mouse-1	MN_009580	ZP1	ZPB1
		Mouse-2	NM_011775	ZP2	ZPA
		Mouse-3	NM_011776	ZP3	ZPC
Ratte	<i>Rattus norvegicus</i>	Rat-1	AB000928	ZP1	ZPB1
		Rat-2	NM_031150	ZP2	ZPA
		Rat-3	D78482	ZP3	ZPC
Schwein	<i>Sus scrofa</i>	Pig-1/2	S74651/D45064	ZP1/2	ZPA ^a
		Pig-3	D45065	ZP3	ZPC

^a *Sus scrofa* ZP1 und ZP2 zeigen eine 99%ige Übereinstimmung ihrer Nucleotidsequenzen über 2203 Basenpaare. Die Sequenzen werden daher als Allele des selben ZPA Gens angesehen.

2.4.3 Funktion der Zona pellucida

Die Funktion der Zona pellucida ist durch ihre zentrale Rolle im Befruchtungsprozess charakterisiert. Dazu gehört in erster Linie die Vermittlung der artspezifischen Bindung der Spermatozoen an den primären Spermienrezeptor der Zona pellucida, welcher zumindest bei der Maus auf dem ZPC-Protein lokalisiert ist. Daran anschließend induziert die ZP die Akrosomenreaktion des Spermiums, welche Voraussetzung für die Penetration der Eizelle ist (BLEIL & WASSARMAN, 1983; SALING, 1989). Ein sekundärer Spermienrezeptor, der für die Aufrechterhaltung der Spermienbindung nach der Akrosomenreaktion sorgt, konnte ebenfalls nachgewiesen werden (BLEIL et al., 1988). Das erfolgreiche Eindringen eines Spermiums in die Eizelle schließlich zieht die sogenannte Zona-Reaktion, ein Verhärten der Proteinstruktur zur Unterbindung der Mehrfachbefruchtung (Polyspermie), nach sich. Kennzeichnend für diesen Vorgang ist die Ausschüttung proteolytischer Enzyme aus den kortikulären Granulae der Eizelle in den zwischen der Plasmamembran der Eizelle und der Eihülle liegenden perivitellinen Spalt (GULYAS, 1980). Diese Enzyme verändern die Struktur der ZP und zerstören die Rezeptoreigenschaften, so dass keine weitere Spermienbindung erfolgen kann. Zum Schutze des Embryos bleibt die ZP als umgebende Hülle für die Zeit des Transportes durch den Ovidukt bis zum Schlüpfen der entstehenden Blastozyste kurz vor der Implantation erhalten.

Die Zuordnung der spezifischen Funktionen zu einzelnen Zonaproteinen konnte bisher bei verschiedenen Spezies nur unvollständig erfolgen. Dabei können interessanterweise die individuellen Proteine, welche die Interaktionen zwischen Spermien und Eizelle vermitteln, in verschiedenen Spezies variieren (DUNBAR et al., 1994). So hat ZPA (ehemals ZP2) des Schweins strukturelle Bedeutung, fungiert jedoch bei der Maus als sekundärer Spermienrezeptor. ZPC (ehemals ZP3) wies bei allen untersuchten Spezies Rezeptoraktivitäten auf. Das dem murinen ZPC homologe Protein des Schweins (pZP3 β) zeigte in Versuchen von YUREVICZ et al. (1993a) keine direkte Bindung an die Spermienmembran, potenzierte jedoch die Bindung von Membranvesikeln an ZPB2 (ZP3 α). Die Involvierung beider Proteine in die Spermienrezeption ist auch für das Kaninchen gezeigt worden. Diese Beispiele machen deutlich, dass Rückschlüsse auf die bisher nicht näher charakterisierten Funktionen der Zonaproteine der Katze durch Vergleiche mit anderen Spezies nicht gezogen werden können.

Die Spermienbindung wird vor allem durch Kohlenhydrate und kaum charakterisierte posttranslationale proteolytische Prozesse an den O- und N-Enden der Glykoproteinketten verschiedener ZP-Proteine vermittelt (WASSARMAN & MORTILLO, 1991; DUNBAR et al., 1994; YAMASAKI et al., 1995; HEDRICK, 1996).

Die primäre Spermienbindung bei der Maus erfolgt durch o-glykosidisch gebundene Oligosaccharide des ZPC. Das genannte Protein induziert ebenfalls die Akrosomenreaktion. Konsolidiert wird die Bindung des Spermiums durch nachfolgende Interaktionen mit ZPA (ehemals ZP2). (FLORMAN et al., 1984; FLORMAN & WASSARMAN, 1985; WASSARMAN, 1990). Dem ZPA der Maus scheint darüber hinaus eine essentielle Rolle bei der Verhinderung der Polyspermie zuzukommen.

Die Verfügbarkeit von cDNA-Klonen für die meisten der ZP-Proteine verschiedener Spezies eröffnete die Möglichkeit, rekombinante Proteine herzustellen und zu charakterisieren. Seit angenommen wird, dass auch die Kohlenhydrate bei der Spermienbindung eine Rolle spielen, sind viele dieser cDNAs in eukaryotischen Expressionssystemen exprimiert worden, um rekombinante Proteine verschiedener Glykosylierungsgrade auf ihre funktionelle Bedeutung hin zu untersuchen. In der Tat zeigen verschiedene rekombinante Proteine ein sehr unterschiedliches Verhalten. Interessanterweise inhibierte rekombinantes murines ZPC-Protein in den Studien von BEEBE et al. (1992) die Spermienbindung, induzierte jedoch die Akrosomenreaktion. Im Gegensatz dazu konnte bei einem auf dem selben Wege hergestellten ZPC-Protein des Hamsters keine biologische Aktivität nachgewiesen werden (KINLOCH et al., 1991).

Sowohl für das Kaninchen ZPB2 (ehemals 55-kDa Protein), als auch das ZPB2 des Schweins wurde eine Region nachgewiesen, die als Kleeblattdomäne bezeichnet wird (BORK, 1993). Die Kleeblatt-Peptidfamilie ist eine Gruppe von Proteinen, die sich durch eine oder mehrere Kopien eines Kleeblattmotivs - eine dreischlaufige Domäne, die durch konservative Disulfidbrücken zusammengehalten wird - auszeichnet. Kleeblattpeptide konnten in vielen Spezies nachgewiesen werden und scheinen, mit Ausnahme des in der ZP lokalisierten, eng mit mukösen Epithelien, insbesondere des Gastrointestinaltraktes assoziiert zu sein. Eine mögliche Anpassung an das besondere biochemische Milieu stellt möglicherweise die kompakte Natur des Kleeblattmotivs dar, welche eine Resistenz gegen enzymatische Angriffe durch Trypsin und Chymotrypsin bewirkt. Die genaue Funktion der Kleeblattmotive konnte bisher nicht eindeutig charakterisiert werden. Aufgrund der Struktur der Kleeblattschlaufen scheint die Interaktion mit spezifischen Rezeptoren (OTTO & WRIGHT, 1994), bzw. die

Bindung von Kohlenhydraten an die Kleeblattdomäne insbesondere für ZPB2 (BORK, 1993) zumindest sehr wahrscheinlich. HOFFMANN & HAUSER (1993) schreiben Kleeblattproteinen allgemein eine Funktion als Wachstumsfaktor zu, die Zellwachstum sowohl inhibieren als auch stimulieren können. Außerdem scheinen sie Bestandteil von Abwehrmechanismen der Schleimhäute zu sein. WRIGHT et al. (1997) beobachteten eine Hochregulierung der Kleeblattproteine in Bereichen, in denen das Epithel z. B. durch Ulzera geschädigt war und folgerten, dass die Peptide mit der Regeneration von Epithelien in Verbindung stehen. Eine spezifische Funktion der Kleeblattdomäne auf dem ZPB2 Protein ist bisher nicht beschrieben.

2.4.4 Wirkmechanismen der immunologischen Kontrazeption mit ZP-Proteinen

Das Konzept der immunologischen Kontrazeption durch Anti-Zona pellucida Antikörper existiert, seit in zahlreichen Studien nachgewiesen werden konnte, dass aktive oder passive Immunisierung mit Zonaantigenen bzw. -Antikörpern fertilitätshemmend wirken kann (GWATKIN & WILLIAMS, 1978; WOOD et al., 1981; DIETL et al., 1982; SACCO et al., 1983). Antigene Determinanten der ZP sind zwischen verschiedenen Tierarten entweder konservativ oder aber speziesspezifisch (DRELL & DUNBAR, 1984; MARESH & DUNBAR, 1987; AITKEN et al., 1990). Die Immunogenität und Antigenität hängt daher von der immunisierten Zielspezies und von der Spezies ab, aus der das Antigen stammt. Darüber hinaus spielt die Art des Antigens und die Art der Präsentation („Vakzin-Design“ siehe Kap. 2.6) eine erhebliche Rolle. Die Verimpfung von speziessfremden ZP-Glykoproteinen rief in zahlreichen Tieren eine starke Immunantwort bei gleichzeitig verminderter Fruchtbarkeit hervor (Kaninchen: SKINNER et al., 1984; Hund: MAHI-BROWN et al., 1988; Totenkopfflächen: SACCO et al., 1991; Weißbüschelaffchen: PATERSON et al., 1992). Ursache dafür ist die Induktion einer Antikörperantwort, die sich auch gegen eigene ZP Antigene richtet. Dabei kann sowohl die Follikelentwicklung im Ovar durch die während des Eizellwachstums verlaufende Zona-Generierung als auch der Befruchtungsvorgang betroffen sein (WOOD et al., 1981; SACCO et al., 1991; JONES et al., 1992). Es existieren also grundsätzlich zwei verschiedene Wirkmechanismen der ZP-Kontrazeption:

- a) Während der Fertilisation: Antikörper interagieren mit einem funktionell relevanten Epitop der ZP und beeinträchtigen dadurch Spermienbindung und Befruchtung. Die Hemmung kann direkt durch Blockierung des Spermienrezeptors auf der ZP erfolgen. Alternativ kann das Ziel des Antikörpers auch in der Nähe eines solchen Rezeptors liegen und die Funktion durch sterische Behinderung beeinträchtigt werden (TESARIK, 1995).
- b) Während der Follikulogenese: Der kontrazeptive Effekt erfolgt durch immunologische Eliminierung ZP-synthetisierender Zellen während der Follikulogenese im Ovar. Dies geht unter Umständen mit einer autoimmunen Zerstörung des Ovars einher.

Insbesondere der zweite Weg der immunologischen Wirkung im Ovar selbst hat sich in der Vergangenheit aufgrund der Nebenwirkungen (Kap. 2.4.5), einschließlich potentieller Irreversibilität der Kontrazeption, als folgenschwer erwiesen. Aus diesem Grund ist die Kontrolle der Immunantwort über das Design eines Vakzins ein Schwerpunkt der derzeitigen Forschung auf dem Gebiet der immunologischen Kontrazeption.

2.4.5 Die Kehrseite der ZP-Kontrazeption – Nebenwirkungen

Immunisierung gegen die meisten Antigene des Reproduktionstraktes basiert auf einer reversiblen Immunantwort. Mit sinkendem Antikörpertiter erlangt das behandelte Tier seine Fertilität zurück (DUNBAR & SCHWOEBEL, 1988). Die Tatsache, dass mit der Immunisierung mit ZP und dem erwünschten Effekt der Kontrazeption jedoch auch unerwünschte und teilweise irreversible Nebenwirkungen einhergehen können, ist inzwischen für diverse Spezies beschrieben worden (vergl. Tab. 2). Bei Primaten veränderte sich nach Verabreichung von pZP sowohl die Ovarstruktur als auch die Zyklusaktivität (GULYAS et al., 1983; SACCO et al., 1983, 1991; DUNBAR et al., 1989b). Das gleiche Protein führte bei Kaninchen (SKINNER et al., 1984), Hunden (MAHI-BROWN et al., 1988) und Mäusen (RHIM et al., 1992) zu dauerhafter Beeinträchtigung der Ovarfunktion durch Schädigung der Primordialfollikelpopulation, Auftreten von Follikelclustern und Verlust sich entwickelnder Follikel. DUNBAR (1989a) schlägt dazu folgenden hypothetischen Verlauf vor: Antikörper können an ZP Antigene binden, sobald diese exprimiert und in den Raum zwischen Oozyte und Granulosazellschicht sezerniert werden. Das Interferieren der Antikörper mit den Gap junctions zwischen Oozyten und Granulosazellen führt zur Degeneration des gesamten wachsenden Follikels. Ein Fehlen reifer Follikel wiederum verursacht eine beschleunigte Rekrutierung und damit einen raschen

Verlust (Demission) von Eizellen aus dem primordialen Pool, da die Hemmung der Follikulogenese durch reife Follikel entfällt. Das Ergebnis entspricht einer vorzeitigen Menopause bzw. immunologischer Kastration, da keine zyklische Aktivität mehr möglich ist. Alternativ zur B-Zell-Antwort wird als Ursache für den Verlust von Primordialfollikeln eine zytotoxische T-Zell-Antwort diskutiert. Eine derartige Immunantwort ginge ebenfalls mit der gezielten Zerstörung ZP tragender Zellen einher. Eine Lymphozyteninfiltration in die Ovarrinde nach ZP Immunisierung (bei Kaninchen und Primaten) mit anschließendem Verlust der primordialen Keimzellen konnte jedoch bisher nicht beobachtet werden. Im Gegensatz dazu ist die Lymphozyteninfiltration in das Ovar bei einigen Mäusestämmen sehr wohl beschrieben worden (RHIM et al., 1992; TUNG et al., 1994), war jedoch assoziiert mit Eierstockentzündungen (Oophoritis) (AITKEN, 2002). Da eine entzündliche Zerstörung von Ovargewebe gegebenenfalls auch schmerzhaft sein kann, ist die Generierung einer derartigen T-Zell-Antwort kaum akzeptabel. Folglich wurden diverse Versuche unternommen, B-Zell- und T-Zell-Epitope zu trennen und so die unerwünschte Wirkung zu vermeiden. Die beschriebenen entzündlichen Nebenwirkungen waren nicht auf die Verunreinigung des verimpften Proteins zurückzuführen, denn sie traten auch unter Verwendung von rekombinantem humanen bzw. murinen ZPC (ehemals ZP3) (VAN DUIN et al., 1994; PATERSON et al., 1998, 1999) und aufgereinigtem pZP3 (PATERSON et al., 1992) in Erscheinung. Es gibt jedoch einen klaren Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Nebenwirkungen und der Natur des verwendeten ZP-Antigens. So führte die Immunisierung mit einem synthetischen ZPC (ZP3) Peptid (AS 336-342) zu effizienter und nebenwirkungsfreier Inhibierung der Befruchtung (MILLAR et al., 1989), wohingegen das teilweise überlappende Peptid (AS 328-342) eine autoimmunbedingte Oophoritis einschließlich Schädigung der Follikulogenese verursachte.

Nach AITKEN et al. (1996, 2002) treten Ovarpathologien teilweise erst ein Jahr nach erstmaliger Verabreichung von ZP3 ein. Berichte, nach denen rekombinante Proteine nebenwirkungsfrei verwendet werden können, sollten daher mit Vorsicht bedacht werden, da der Untersuchungszeitraum möglicherweise zu kurz gewesen sein könnte. Die zwischen der Induktion der Immunantwort und dem Zusammenbruch der Ovarfunktion liegende zeitliche Distanz ist mit dem hypothetischen Wirkmechanismus von DUNBAR (1989a) klar begründbar. Der Verlust der Primordialfollikel und das Auftreten von Oophoritis ist also möglicherweise auf zwei verschiedene Ursachen (B-Zell-Antwort versus T-Zell-Antwort) zurückzuführen.

Tab. 2 Zusammenfassung von Ovarfunktionalität und Pathologien in Modelltieren nach Immunisierung mit Zona pellucida Proteinen modifiziert nach DUNBAR et al. (2002). Die Autoren bemerken dazu, dass die Interpretation einiger Studien aufgrund der nicht einheitlichen Nomenklatur der ZP-Proteine schwierig war. Zum besseren Verständnis sind daher in Klammern die entsprechenden Bezeichnungen der in dieser Studie verwendeten Nomenklatur nach SPARGO & HOPE (2003) eingefügt.

Immunisierte Spezies	Immunogen (neue Nomenklatur)	Ovarpathologie / Fertilitätsstatus	Literatur
Kaninchen	Native pZP	Infertilität/ Dysfunktion der Ovarien	Skinner et al. (1984) ; Wood et al. (1981)
	Native pZP (ZPA, ZPC)	Infertilität/ Dysfunktion der Ovarien	Jones et al. (1992)
	Deglykosylierte pZP3 α (ZPB2)	Normale ovarielle Follikelentwicklung	Jones et al. (1992)
	Deglykosylierte pZP3 β (ZPC)	Infertilität/ Ovarpathologie	Jones et al. (1992)
	Rekombinante Kaninchen ZPB (ZPB2)	Infertilität/ Ovarpathologie	Kerr et al. (1999)
Meerschweinchen	Deglykosylierte Kaninchen 55kDa (ZPB2)	Normale ovarielle Follikelentwicklung	Lee et al. (1992)
	Deglykosylierte Kaninchen 45kDa (ZPC)	Ovarpathologie, polyzystische Ovarien	Lee et al. (1992)
	Native pZP	Oophoritis	Lee et al. (1992)
Hund	Native pZP	Infertilität/ Ovarielle Dysgenese, polyzystische Ovarien	Mahi-Brown et al. (1988)
Javaneraffe	Rekombinante Kaninchen 55 kDa (ZPB2)	Normale Ovarien/ Inhibierung der Spermienbindung	VandeVoort et al. (1995)
	Rekombinante Kaninchen 75 kDa (ZPA)	Ovarpathologie, keine Hemmung der Spermienbindung	VandeVoort et al. (1995)
	Rekombinante humane ZP 1,2,3 (ZPA, ZPB2, ZPC)	Reversible Infertilität (7 von 36 Tieren starben im Verlauf der Studie)	Martinez & Harris (2000)
Weißbüschel- äffchen	Native pZP3 (ZPA, ZPC)	Infertilität, Dysfunktion der Ovarien	Paterson et al. (1992)
	Rekombinante humane ZP3 (ZPC)	Infertilität, Ovarpathologie	Paterson et al. (1992)
Totenkopffäffchen	Native pZP3 (ZPA, ZPC)	Infertilität, funktionale Ovarien	Sacco et al. (1987)
	Deglykosylierte pZP3 (ZPA, ZPC)	Infertilität, funktionale Ovarien	Sacco et al. (1991)
Pavian	Deglykosylierte pZP3 (ZPC)	Infertilität, Dysfunktion der Ovarien	Dunbar et al. (1989b)
	Rekombinante humane ZP1 (ZPB1)	Reversible Infertilität	Martinez & Harris (2000)
Maus	Native pZP	Fertilität	Sacco et al. (1981b)
	Murine ZP3 Peptide (ZPC)	Infertilität/ normale Ovarien	Millar et al. (1989)
	Murine ZP3 Peptide (ZPC)	Infertilität, Oophoritis	Lou & Tung (1993)

2.5 Überblick über Immunisierungsstudien mit ZP-Proteinen in der Kontrazeptionsforschung

2.5.1 Bedeutung und Problematik der Verwendung teilweise gereinigter, deglykosilierter und rekombinanter ZP-Proteine

Die umfangreichsten Erkenntnisse über die Wirkmechanismen der immunologischen Kontrazeption mit ZP-Antigenen liegen, aufgrund der guten Verfügbarkeit (Schlachthöfe), über Immunisierungen mit ZP des Schweins (pZP) vor. Immunisierung von Kaninchen und Affen mit nativen porcinen ZP-Proteinen rief eine Antikörperentwicklung hervor, die mit der Follikelentwicklung ebenso wie mit der Befruchtung interferierte. Dagegen hatte die Immunisierung von Ratten und Mäusen mit nativer pZP keinen Einfluss auf die Fertilität (WOOD et al., 1981; MAHI-BROWN et al., 1988; UPADHYAY et al., 1989; JONES et al., 1992). Ebenso induzierte eine Alloimmunisierung von Kaninchen mit unbearbeiteter ZP trotz des Einsatzes von Freundschem Adjuvans keine signifikante Immunantwort (SKINNER et al., 1987).

Die Verwendung unaufgereinigter ZP-Proteine führte in der Vergangenheit bei mehreren Spezies zu starken Nebenwirkungen. Alternativ wurden Möglichkeiten des Einsatzes deglykosilierter ZP-Proteine, später rekombinanter Proteine bzw. relevanter Peptidsequenzen untersucht.

SACCO et al. (1986) stellten fest, dass die chemische Deglykosilierung des pZP3 zu dramatischen Veränderungen der physiko-chemischen und immunologischen Eigenschaften des Makromoleküls führte. Die veränderte Immunogenität zeigte sich in signifikant geringeren Antikörpertitern im Vergleich zum normalen ZP3. Kohlenhydrate spielen demnach bei der Aufrechterhaltung der Immunogenität² und Antigenität eine wichtige Rolle. Nichtsdestotrotz gelang den Autoren anschließend nicht nur die Herstellung eines Kaninchen Antiserums gegen das Molekül, sie konnten mittels eines kompetitiven Bindungstests darüber hinaus nachweisen, dass das deglykosylierte pZP3 und das unbehandelte pZP3 über gleiche antigene Determinanten verfügen.

Studien mit rekombinanten ZP-Proteinen kamen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. SCHWOEBEL et al. (1992) stellten fest, dass rekombinante Proteine weniger immunogen sind als native. Der Grund dafür könnte sein, dass in Bakterien synthetisierte Fusionsproteine

² Def. Immunogenität: Fähigkeit eines Antigens, eine immunologische Reaktion auszulösen.
Def. Antigenität: Vermögen eines Antigens, mit dem homologen Antikörper zu reagieren.

möglicherweise mit veränderter Tertiärstruktur exprimiert wurden, und dadurch eine veränderte Faltung und Funktionalität aufwiesen. Andererseits zeigten VANDEVOORT et al. (1995), dass rekombinantes ZPB2 des Kaninchens in Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) nicht nur eine signifikante Immunantwort hervorrief, sondern trotz niedrigen Titers auch die Spermienbindung an Eizellen in *in vitro* Versuchen hemmte.

PATERSON et al. (1996, 1999) immunisierten Weißbüscheläffchen (*Callithrix jacchus*) mit rekombinantem humanem ZPC (ZP3) bzw. rekombinantem ZPC (ZP3) besagter Affen selbst und erreichten eine langfristige Infertilität. Als Begleiterscheinung trat allerdings eine Schädigung des primordialen Eizellpools verbunden mit einem Ausfall der Follikulogenese und damit der Verlust der Funktionalität des Ovars auf.

Die erste Studie, in der es gelang, ohne dauerhafte Beeinträchtigung der Ovarfunktion mit rekombinanten Proteinen Infertilität zu erzeugen, war die von MARTINEZ & HARRIS (2000).

Rekombinantes humanes ZPB2 (ZPB) wurde in Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) verimpft und induzierte eine Infertilität für 9-35 Monate. Bei hohen Titern zeigten einige Tiere Zyklusstörungen, die jedoch nach Abfall des Titers wieder verschwanden. Ähnliche Ergebnisse erzielte auch die Immunisierungsstudie von GOVIND & GUPTA (2000) mit Anubispavianen (*Papio anubis*), die rekombinantes ZPB2 (ZPB) Protein des indischen Hutaffen (*Macaca radiata*) erhielten.

2.5.2 Bedeutung und Problematik der Verwendung synthetischer oder rekombinanter Peptide

Basierend auf der Kenntnis der primären Aminosäuresequenz von ZP-Proteinen und dem Grad der Homologie zwischen den verschiedenen Spezies sind Versuche unternommen worden, Peptid-Epitope auszuwählen, die eine spezifische, sichere und effektive Immunantwort induzieren, ohne Ovarpathologien zu verursachen (DEAN & MILLAR, 1990; DEAN, 1992). Anlass zur Hoffnung auf die Zukunft synthetischer Vakzine geben die Studien von YUREWICZ et al. (1993b) und HALL et al. (1994). Erstere verfügen über ein Antiserum gegen ein pZPB2 (pZP3 α) abgeleitetes Peptid, welches *in vitro* die Spermien-Eizell-Bindung beeinflusste. Ergänzend dazu erzeugten HALL und Kollegen Antiseren gegen fünf weitere Peptide, von denen zwei die Spermien-Eizell-Bindung unterbanden. Damit lag der Beweis vor, dass die Kohlenhydrate der ZP-Glykoproteine zwar einen Einfluss auf die Immunantwort

haben, die Verwendung entsprechend glykosilierter Peptide jedoch nicht essentiell notwendig ist.

MAHI-BROWN (1996) erzielte in Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) sowohl mit einem synthetischen Peptid des humanen ZPC (ZP3), als auch mit der orthologen Sequenz des Javaneraffen selbst eine Immunantwort mit fertilitätshemmender Wirkung bei normaler Ovarfunktion.

Einen äußerst interessanten Ansatz für ihre Studie nutzten SIVAPURAPU et al. (2003). Sie wählten je ein Epitop des ZPB2, ZPA und ZPC (ehemals ZP1, ZP2, ZP3) Proteins des indischen Hutaffen (*Macaca radiata*) erwiesener Funktionalität und exprimierten ein Fusionsprotein in *Escherichia coli*. *In vitro* zeigten Antikörper gegen alle drei Epitope signifikant spermienbindungshemmende Eigenschaften.

Parallel zu den bereits weiter oben zitierten Studien der gleichen Forschergruppe mit rekombinanten Proteinen, führten PATERSON et al. (1996, 1999) auch Untersuchungen mit ZP-Peptiden durch. Es fand sich kein Hinweis auf Induktion von Ovarpathologien. Jedoch konnte trotz des Nachweises der Antikörper in der Immunhistochemie und einer 60%igen Hemmung der Spermienbindung *in vitro* keine verlässliche Kontrazeption *in vivo* festgestellt werden.

2.6 „Vakzin-Design“

2.6.1 Kontrolle der Stimulation einer Immunantwort

Unter „Vakzin-Design“ versteht man die Entwicklung von Impfstoffkompositionen zur Optimierung der Induktion einer gezielten Immunantwort. Traditionell wurden Vakzine gegen krankheitsverursachende Mikroorganismen entwickelt, um eine schützende Immunantwort hervorzurufen (GRIFFIN, 1990). Sie basieren daher auf immunologisch fremden Antigenen und sind gleichfalls gegen eben diese gerichtet.

Kontrazeptive Vakzine dagegen richten sich gegen Antigene (Hormone oder Proteine) des eigenen Reproduktionssystems. Der Empfänger ist gegen diese in der Regel immunologisch tolerant (JONES, 1983; HERR, 1996). Die Moleküle sind somit, wenn überhaupt, nur schwach immunogen und müssen daher durch chemische Veränderung oder Konjugation an Makromoleküle (Carrier) modifiziert, das heißt „verfremdet“ werden.

Zum „Vakzin-Design“ gehört auch die Auswahl eines geeigneten Immunstimulans (Adjuvans) bzw. Vektors, um eine möglichst starke und dauerhafte Immunantwort zu gewährleisten. Schließlich beeinflussen auch Dosis, sowie Anzahl der Boosterimmunisierungen, Zeitpunkt und Dauer der Präsenz des Antigens die Stimulation des Immunsystems. Je nach Wahl der Komponenten eines Vakzins kann diese vorwiegend eine antikörpervermittelte Immunantwort oder eine zellvermittelte Immunantwort induzieren.

Vakzine sollten so konstruiert werden, dass sie sowohl mit Makrophagen als auch mit den zwei Immunzelltypen, T- und B-Zellen reagieren können (MILLER, 1997). Die Stimulation der B-Zell-Aktivität ist entscheidend für die Produktion von Antikörpern, ebenso wie für die Etablierung von B-Gedächtniszellen. Voraussetzung für die Stimulation und Differenzierung der B-Zellen ist eine Aktivierung durch T-Zellen, welche zuvor körperfremdes Material von antigenpräsentierenden Zellen dargeboten bekommen. T-Zellen sind jedoch auch die Vermittler von Entzündungsreaktionen und gelten als an der Auslösung von Autoimmunität beteiligt. Die tatsächliche Beteiligung von T-Zell-Epitopen der ZP bei der Provokation einer T-Zell-Antwort, die zu ovariellen Funktionsstörungen in aktiv immunisierten Tieren führt, wurde erstmals 1989 von MILLAR et al. in der Maus bestätigt (s.o.). Auch andere Autoren unterstützen aufgrund ihrer Ergebnisse die Hypothese, dass eine zelluläre Immunantwort verantwortlich für die Entstehung von ovaropathologischen Veränderungen ist (MAHI-BROWN et al., 1992; TUNG & LOU, 1993).

MILLARS Ergebnisse belegen jedoch ebenfalls erneut die Tatsache, dass B- und T-Zell-Epitope nicht zwangsläufig deckungsgleich liegen. Aufgrund dessen beschäftigten sich eine Reihe von Studien mit der Identifikation derartiger Epitope und der Generierung von Vakzinen auf der Basis von B-Zell-Epitopen unter Eliminierung zonaspezifischer T-Zell-Epitope (EPIFANO & DEAN, 1994; TUNG et al., 1994; NAZ et al., 1995). Gleichwohl sind T-Zell-Epitope unerlässlich für die Entwicklung von T-Helfer-Zellen, deren Aktivität wiederum Voraussetzung für die Antikörperproduktion der B-Zellen ist.

Um die T-Helfer-Zellaktivität weiterhin zu gewährleisten, können B-Zell-Epitope abdeckende Peptide an ein fremdes immunogenes Carriermolekül oder ein definiertes Nicht-Zona-T-Zell-Epitop konjugiert werden. Dies stimuliert die Proliferation der T-Helfer-Zellen, ohne dass T-Gedächtniszellen entstehen, die die Zona pellucida erkennen (EPIFANO & DEAN, 1994; STEVENS 1995; MAHI-BROWN, 1996). Gängige Praxis ist die Konjugation an immunogene Bakterienprodukte wie Tetanus- oder Diphtherietoxoid (entgiftete Toxide), oder an

hochmolekulare körperfremde Proteine wie zum Beispiel das Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) der marinen Schnecke *Megathura crenulata*.

2.6.2 Vakzin-Komposition: Formulierung und Verabreichung

Von dem „Design“ eines Vakzins ist nicht nur im entscheidenden Maße abhängig, ob der eigentliche Wirkstoff einen Effekt erzielen kann, sondern auch wie, wo und wann er es tut und ob dies mit unerwünschten Begleiterscheinungen verbunden ist oder nicht. Es erscheint daher lohnenswert, einige Teilaspekte der Vakzin-Komposition näher zu betrachten.

Aspekte der Vakzin-Komposition (modifiziert nach GRIFFIN, 1990)

- Wahl und Design des Zielmoleküls
- Trägermoleküle (Carrier)
- Adjuvantien
- Vehikel, Verabreichungssysteme
- Dosis und Verabreichungsart (oral, transkutan, intramuskulär, intraperitoneal) und Häufigkeit (Boosterung)

2.6.2.1 Das Immunogen - Wahl und „Design“ des Zielmoleküls

Ein kurzer Überblick über in Frage kommende Zielmoleküle wurde bereits in Kapitel 2.3.2 gegeben und soll an dieser Stelle nicht wiederholt werden. Darüber hinaus ist auf zwei wichtige Auswahlkriterien, nämlich Funktion im Reproduktionssystem und Lokalisation an der Oberfläche größerer Moleküle hingewiesen worden. Angesichts möglicher Nebenwirkungen sollten jedoch noch weitere Aspekte bei der Auswahl eines geeigneten Antigens bedacht werden. Das Zielmolekül sollte gewebespezifisch sein, um unerwünschte Kreuzreaktionen und immunpathologische Veränderungen in anderen Geweben zu verhindern. Ebenso ist die Ausbildung von Pathologien verursachenden Immunkomplexen zu bedenken. Idealerweise sollte das Zielmolekül daher nur vorübergehend im Körper vorhanden sein, wird also nur zu bestimmten Zeiten synthetisiert und kommt in möglichst geringen Mengen vor.

Des Weiteren müssen Methoden entwickelt werden, die das Immunogen in ausreichender Reinheit und Menge zur Verfügung stellen (z.B. Peptidsynthese, Isolation aus natürlichen Quellen, gentechnische Synthese, HERR, 1996). Aufgrund der in der Vergangenheit immer wieder aufgetretenen Nebenwirkungen durch Verwendung nativer, deglykosilierter aber auch rekombinanter ZP-Proteine (s.o.), steht derzeit die gezielte Identifikation einzelner relevanter B-Zell-Epitope im Vordergrund. Die auf dieser Basis für Immunisierungen verwendeten synthetischen Peptide sind allein allerdings kaum in der Lage, eine Antikörperreaktion auszulösen. Sie bedürfen der Kopplung an ein größeres immunogenes Molekül (Carrier, siehe folgendes Kapitel). Ferner kann die Struktur der verwendeten Peptide sowohl für die Generierung von Antikörpern als auch für das Auffinden der körpereigenen Struktur durch diese Antikörper von entscheidender Bedeutung sein. Neben der Verwendung von Peptiden stellt auch der Einsatz von DNA-Vakzinen eine bedeutende Entwicklung dar. DNA-Vakzine basieren nicht auf der Applikation von Antigenen, sondern auf der Impfung mit der DNA eines antigencodierenden Expressionsplasmids (ROLLE & MAYR, 2002). Mit der Einschleusung in eine Wirtszelle und der Transformation der Erbinformation in ein Protein beginnt der Körper den eigentlichen Impfstoff selbst herzustellen. RATH et al. (2003) demonstrierten erstmals die Möglichkeit der Erzeugung einer Immunantwort gegen ZPC (ZP3) des Hundes mittels eines DNA-Vakzins.

2.6.2.2 Wahl des Trägerproteins (Carrier)

Kurze synthetische B-Zell-Epitop-umfassende Peptide sind allein nicht in der Lage, B-Zellen zur Differenzierung und Antikörperproduktion zu veranlassen, wenn sie nicht mit einem Epitop assoziiert sind, welches von T-Helfer-Zellen erkannt wird. Traditionell werden die synthetischen Peptide an Carrier-Proteine gekoppelt, um die T-Helfer-Zell-Antwort zu induzieren (SADLER et al., 2000). Mögliche Nachteile solcher Konjugationen sind Veränderung der Antigenspezifität (BRIAND et al., 1985) oder Hypersensibilisierung nach mehrfacher Verabreichung. Tiere, die mit Peptid-Protein-Konjugaten immunisiert werden, bilden Antikörper gegen das Peptid ebenso wie gegen das Trägerprotein. Die T-Helfer-Zell-Antwort richtet sich zumeist gegen den konjugierten Carrier, so dass eine Boosterung möglicherweise nicht zu einer sekundären Immunantwort führt, da keine entsprechenden T-Gedächtniszellen vorhanden sind (JANEWAY & TRAVERS, 1995). Alternativ kann das funktionelle B-Zell-Epitop an ein definiertes T-Helfer-Zell-Epitop eines nicht verwandten

(körperfremden) Proteins gekoppelt werden, um z.B. Veränderungen in der Zugänglichkeit des B-Zell-Epitops durch raumgreifende Trägerproteine zu minimieren.

Die Art und Weise, wie ein Carrier konjugiert wird, kann beträchtliche Auswirkungen auf die ursprüngliche Konformation und damit auf die spezifische Immunantwort gegen das Peptid haben (ALEXANDER & BIALY, 1994). 1995 untersuchten MAHI-BROWN & MORAN zwei verschiedene Carrier, die mit drei verschiedenen Konjugationsmethoden an ein synthetisches Peptid gekoppelt wurden. Die höchste Immunantwort erzeugte maleimidaktiviertes KLH als Carrier. Ebenfalls hohe Titer erbrachte die Verwendung von Tetanustoxoid als Carrier in einer Folgestudie von MAHI-BROWN (1996). Durch die Konjugation schienen jedoch einige B-Zell-Epitope des gekoppelten Peptides maskiert oder in der Konformation verändert worden zu sein.

2.6.2.3 Wahl des Adjuvans

Wenn man sie allein verabreicht, sind die meisten Proteine nur schwach oder überhaupt nicht immunogen. Adjuvantien sind Substanzen, die die spezifische Immunreaktion auf ein Antigen steigern (MULLER et al., 1997). Von den oben erwähnten Carriern unterscheiden sich Adjuvantien dadurch, dass sie mit dem Immunogen keine stabile Verbindung eingehen. Außerdem sind sie vor allem bei der ersten Immunisierung notwendig, wohingegen Trägerproteine für Haptene auch bei den folgenden Immunreaktionen benötigt werden. Die meisten Adjuvantien besitzen zwei Eigenschaften, welche die Immunogenität der Proteine verstärken. Sie können lösliche Proteinantigene in partikuläres Material umwandeln, welches die antigenpräsentierenden Zellen (wie etwa Makrophagen) schneller aufnehmen. Dies geschieht etwa durch Anlagern der Antigene an Aluminiumpartikel oder Emulsion in Mineralöl. Depotbildung mit verlangsamter Antigenfreisetzung durch Umwandlung löslicher Proteine in unlösliche Partikel erhöht die Immunogenität zwar zu einem gewissen Grad, Adjuvantien wirken jedoch verhältnismäßig schwach, wenn sie nicht einen zweiten äußerst immunstimulierenden Bestandteil enthalten: Bakterien oder deren Produkte.

Das potenteste käuflich erwerbbar und in der Forschung am häufigsten verwendete Adjuvans ist das komplette Freundsches Adjuvans (FCA), eine Wasser-in-Öl-Emulsion mit abgetöteten Mycobakterien. Anschließende Boosterimmunisierungen werden zumeist mit inkomplettem Freundsches Adjuvans durchgeführt, welches keine Bakterien enthält. Neben der erwünscht starken Immunantwort provoziert Freundsches Adjuvans in vielen Spezies

Entzündungsreaktionen an der Einstichstelle (ALEXANDER & BIALY, 1994). Störungen des Ovarzyklusses durch die alleinige Verabreichung von FCA ist ebenfalls mehrfach beschrieben worden (AITKEN et al., 1984; SACCO et al., 1987; MAHI-BROWN et al., 1985; UPADHYAY et al. 1989). Schließlich können bakterienhaltige Adjuvantien im Experiment Autoimmunkrankheiten auslösen (JANEWAY & TRAVERS, 1995). Aufgrund der Tierschutzrelevanz des Freundschens Adjuvans wird zunehmend nach Alternativen wie Aluminiumhydroxid, Lipopolysaccharide, Saponine oder Cytokine zu FCA gesucht.

2.6.2.4 Vehikel - Verabreichungssysteme

Für die effektive Übertragung des Antigens als Bestandteil eines Vakzins stehen heute eine Reihe spezieller Übermittlungsinstrumente zur Verfügung. Eine klare begriffliche Unterscheidung hat sich bislang nicht durchgesetzt. In der vorliegenden Arbeit wird zwischen Vektoren (Viren, Bakterien) als Vehikel natürlichen Ursprungs, und artifiziell hergestellten Vehikeln (Mikrosphären, Liposomen) unterschieden.

Vektoren:

Unter Vektor-Vakzinen (rekombinierte Vakzine) versteht man Impfstoffe, die über einen mikrobiellen oder viralen Träger (Vektor) als Produzenten für immunisierende Bestandteile verimpft werden. Bei dieser Impfstoffkonstruktion handelt es sich um eine Rekombination, die durch den Einbau eines Fremdgens in das Genom des Vektors erfolgt. Die inserierten Nukleinsäuren (Fremdgene) werden in der Zielspezies durch den Vektor zur Expression des immunisierenden Fremdproteins gebracht. Als Vektoren werden in der Regel avirulente bzw. schwach virulente, meist attenuierte Mikroorganismen verwendet. Eines der bekanntesten unter den viralen Vektoren ist das Vacciniavirus aus der Familie der Pockenviren (MOSS, 1991), welches bereits erfolgreich als Träger eines Tollwutvakzins fungiert. Die generellen Vorteile eines Vakzins auf der Basis des Vacciniavirus (Kuhpockenvirus) liegen für HRUBY (1993) in der jahrelangen klinischen Erfahrung mit dem Virus als Pockenvakzin sowie in der kostensparenden Herstellung und der großen Stabilität (Lyophilisierbarkeit). Darüber hinaus kann bereits eine einzige Injektion des lebenden Virus zu langanhaltender und kräftiger Immunstimulation führen. Das Kuhpockenvirus besitzt zudem mit 180000 Basenpaaren ein relativ komplexes Genom, in das sich ohne Verlust der Individualität und der Vermehrungsfähigkeit des Vektors, fremde Gene inserieren lassen (ROLLE & MAYR, 2002).

Nach MORELL (1993) und TYNDALE-BISCOE (1994) könnten virale Vektoren zukünftig auch als Bestandteil kontraceptiver Vakzine eine Rolle spielen.

Ebenso wie Viren können auch rekombinante Bakterienproteine mit immunkontraceptiver Relevanz in den Wirt eingeschleust werden. Bereits vielfach verwendet wird eine *Salmonella typhi* Art, die aufgrund des Fehlens von 2 Genen avirulent und damit sehr sicher ist (MILLER, 1997).

Artifizielle Vehikel:

Nach MILLER (1997) gilt als Voraussetzung für eine langanhaltende Immunantwort die kontinuierliche Präsentation des Immunogens über mehrere Wochen. Mikrosphären und Liposomen sind als artifizielle Vehikel im besonderen Maße dazu geeignet, diesem Anspruch gerecht zu werden.

Mikrosphären sind biologische abbaubare Kopolymere (Poly-Lactide-Glykolide), die das Antigen umschließen und je nach Größe und Polymerisationsverhältnis innerhalb von einer Woche bis hin zu mehreren Monaten freisetzen. Die Verabreichung erfolgt meistens parenteral, eine orale Aufnahme ist jedoch ebenfalls möglich. Darüber hinaus können sie die Funktion eines Adjuvans besitzen (ELDRIDGE et al., 1989, 1993).

Liposomen sind kugelförmige, biologische Membranen, bestehend aus Phospholipiden und Cholesterol (ALVING et al., 1991). In wässrigen Lösungen existieren die Phospholipide als Bilayer und variieren in ihrer Morphologie von einschichtigen kleinen (25 nm) und großen (1000 nm) Vesikeln bis hin zu einem Mehrschichtenaufbau (multilamellare Vesikel [MLV]: 100-1000 nm). In Liposomen können Antigene sowohl hydrophiler (im wässrigen Innenraum, bzw. in Zwischenräumen) als auch lipophiler Natur (innerhalb der Membranen) eingeschlossen werden. Die Tatsache, dass die Hauptkomponenten der Liposomen mit Phospholipiden und Cholesterol natürliche Bestandteile der Säugetierzellmembranen sind, bedingt eine gute Metabolisierung, geringe Toxizität und gute Biokompatibilität. Prinzipiell können die Antigene der Liposomen den Zielzellen über drei verschiedene Wege zur Verfügung gestellt werden. Als erstes kann das Liposom im Rahmen eines aktiven Internalisierungsprozesses in die Zelle gelangen und intrazellulär entleert werden (Endozytose). Die zweite Möglichkeit besteht in der extrazellulären Freisetzung des Wirkstoffes und anschließendem Transport in die Zielzelle. Schließlich können Liposomen,

mit Zellmembranen fusionieren und ihren Inhalt (Antigen) ins Zytoplasma der Zielzelle abgeben (Krause, 2000). Der besondere Vorteil der Liposomen liegt in der Doppelfunktion als Antigen-Mikrocarrier und als Adjuvans. Parenterale und orale Verabreichungsformen sind möglich.

2.6.2.5 Wege der Verabreichung kontrazeptiver Vakzine

Im folgenden soll kurz auf die möglichen, und für verwilderte Katzen praktikablen, Verabreichungsformen eingegangen werden. Verwilderte Katzen in deutschen Städten sind, sofern ihre Existenz bekannt ist, in der Regel ein oder mehreren Futterplätzen zuordenbar. An diesen Stellen werden die Tiere regelmäßig von Freiwilligen mit Futter versorgt, sind individuell bekannt und werden teilweise zumindest geringgradig veterinärmedizinisch versorgt. Einige Tiere sind sogar handzahn.

Grundsätzlich sind zwei verschiedene Verabreichungssysteme für Immunkontrazeptiva denkbar (MULLER et al., 1997):

- intramuskuläre Verabreichung, direkt (z.B. in der Falle) oder aus der Distanz
- orale Verabreichung über das Futter

Fernverabreichung von Kontrazeptiva mittels Dartpfeil wurde bereits in den neunziger Jahren des 20. Jahrhunderts erfolgreich von TURNER et al. (1992) bei Weißwedelhirschen bzw. von KIRKPATRICK et al. (1990, 1991, 1992) bei Pferden angewandt. Allerdings gestaltet sich diese Applikationsform in größeren Tierbeständen bei der Erforderlichkeit mehrerer Boosterimmunisierungen schwierig. Im Falle der verwilderten Katzen könnten die Tiere aus geringer Distanz immunisiert werden. Ein individuelles Erkennen der Katzen durch die Betreuer und genaue Protokollführung sind jedoch unerlässlich. Im Vergleich zur bisher praktizierten Kastration hat dies den Vorteil, dass die Tiere weder eingefangen noch betäubt werden müssen. Eine Gefährdung für Katzen, andere Haustiere und auch Menschen durch nicht wiedergefundene Projektile kann weitestgehend ausgeschlossen werden.

Bei größeren Tieren wurde auch die Fernapplikation von sogenannten Biobullets getestet. Diese Geschosse bestehen aus einer äußeren, biologisch abbaubaren, Hülle, die mit 125-300 mg der kontrazeptiven Substanz gefüllt werden kann. Hauptbestandteile der Hülle sind Hydroxypropylzellulose (ein Futterzusatzstoff) und Kalziumkarbonat. Nach der Applikation

ins Tier löst sich die Hülle innerhalb von 24 h auf, die Wirksubstanzen werden frei. Biobullets funktionieren auf einer Distanz unter 25 m, verschollene Geschosse bauen sich rasch in der Umwelt ab (KREEGER, 1997). GOODLOE et al. (1991) testeten ein in Biobullets eingeschlossenes GnRH-Vakzin in Pferden, konnten jedoch keine kontrazeptive Wirkung feststellen. Unklar blieb, ob dies an den Biobullets selbst, oder an der Formulierung des Vakzins lag. Ebenfalls keine kontrazeptive Wirkung konnten WHITE et al. (1993) nachweisen, die mit einem in Biobullets eingeschlossenen Anti-Spermien-Vakzin Weißwedelhirsche immunisierten. Da sie aber hohe Antikörpertiter feststellen, scheint das Problem eher in dem Vakzin selbst als in der Applikationsform begründet zu sein. Ein in Biobullets appliziertes pZP-Vakzin von WILLIS et al. (1994) führte bei Pferden schließlich zu hohen Titern und erfolgreicher Kontrazeption über zwei Fortpflanzungsperioden.

Die Generierung einer Immunantwort im Darm als Reaktion auf die orale Applikation von Antigenen ist prinzipiell ebenfalls möglich (KAGNOFF, 1993). Gleichwohl sind enzymatische Verdauung und Konformationsänderungen des Proteins bei der Passage Hindernisse, die die Effektivität erheblich beeinträchtigen können. Hier besteht weiterhin ein sehr großer Forschungsbedarf.

2.6.2.6 Verabreichungsprotokoll

Das Standardprotokoll für eine Vakzinierung nach MILLER (1997) beinhaltet zunächst 50-100 µg Antigen für bis zu kaninchengroße Tiere, und 200-400 µg für größere Tiere, wobei aus den Angaben nicht hervorgeht, ob damit reines Antigen oder bereits Konjugate mit Carriermolekülen gemeint sind. Die Emulsion wird entweder subkutan, intrakutan, intraperitoneal oder intramuskulär an verschiedenen Stellen verimpft. Für die Erstimmunisierung werden 1-2 Applikationen im Abstand von 4-6 Wochen benötigt. Für Boosterimmunisierungen werden gleiche oder etwas geringere Mengen Antigen verimpft.

2.7 Fazit der Literaturübersicht

Angesichts ernstzunehmender Nebenwirkungen bei der Verwendung nativer Zona pellucida in verschiedenen Spezies erscheint die Generierung von Peptid-Vakzinen für die Immunkontrazeption basierend, auf B-Zell-Epitopen, sinnvoll und aussichtsreich.

Dies impliziert zunächst den Schritt der Identifizierung derartiger Epitope, sowie die Synthese der daraus abgeleiteten Peptide. Wie aus Kap. 2.6 hervorgeht ist die Entwicklung eines auf die speziellen Bedürfnisse der entsprechenden Zielspezies abgestimmten „Vakzin-Designs“ von essentieller Bedeutung. Für den Nachweis der spezifischen Immunogenität der Vakzine muss die Antikörperentwicklung verfolgt werden. Die kontrazeptiven Eigenschaften können durch Hemmung der Spermienbindung bzw. der Befruchtung *in vitro* bzw. *in vivo* eruiert werden.

Die Entwicklung derartiger Peptid-Vakzin-Prototypen für die Immunkontrazeption der Hauskatze war daher Ansatzpunkt für die eigene, hier vorliegende Arbeit.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Epitop-Mapping – Detektion antigener Determinanten auf der feline ZPB2 Proteinsequenz unter Verwendung eines spezifischen Anti-fZP Antiserums

Die hier praktizierte Anwendung eines Peptid-Screenings diente der Analyse und Lokalisation von Antikörper-Bindungssequenzen (kontinuierlichen Epitopen) auf dem feline ZPB2 Protein. Dazu wurden überlappende Peptide, welche die gesamte Proteinsequenz abdeckten, auf eine Matrix synthetisiert und mit einem feline Anti-ZP Antiserum inkubiert. Der Nachweis der Bindung der Antikörper an bestimmte Peptide erfolgte mit Hilfe eines POD-markierten sekundären Antikörpers und der Chemilumineszenzreaktion.

3.1.1 Herstellung der Epitop-Mapping-Membran

Unter Verwendung der Spot-Synthese-Technik (REINEKE et al., 1999; FRANK, 1992) wurden 187 sich überlappende feline ZPB2-Peptide (PepScans) hergestellt und auf eine Zellulosemembran (Whatman, Maidstone, England) synthetisiert. Die Gesamtheit der Peptide deckte die vollständige Aminosäuresequenz des fZPB2 Proteins (SPARGO & HOPE, 2003) ab. Bei einer Länge von je 13 Aminosäuren teilte jedes Peptid 10 identische Aminosäuren mit dem Folgepeptid. Die Synthese übernahm die Firma Jerini BioTools, Berlin, Deutschland.

3.1.2 Erzeugung des primären Antikörpers gegen feline Zona pellucida Proteine

Als primärer Antikörper diente ein Antiserum gegen native Zona pellucida Proteine der Katze (fZP), welches bereits vor dieser Studie in Kaninchen hergestellt wurde. Die hohe Spezifität des Anti-fZP Antiserums wies WEGNER (2000) mittels ELISA, Immunelektrophorese und Immunhistochemie nach. Die antifertile Wirkung des Antiserums zeigte sich in der Hemmung der Anzahl gebundener Spermien und darüber hinaus in der Inhibierung der Befruchtung von Eizellen *in vitro* (JEWGENOW et al., 2000).

3.1.3 Immunologische Identifizierung antigener Determinanten

Die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen auf der Epitop-Mapping-Membran, die Inkubation der Membran mit den primären und sekundären Antikörpern sowie die Visualisierung der Bindungsstellen mittels Chemilumineszenz erfolgte nach folgendem Protokoll:

TBS: Tris buffered saline	T-TBS	Blockierpuffer
TRIS 50 mM NaCl 137 mM KCl 2,7 mM auf pH 8,0 einstellen	TBS Tween 20 0,05% (w/v)	T-TBS Milchpulver 0,5% (w/v)

1. Zellulosemembran 1 min in Ethanol (96%, v/v) spülen
2. 3 x 10 min Waschen in TBS
3. über Nacht in Blockierpuffer sanft auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler (Titramax 100, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) schwenken
4. 1 x 10 min Waschen in T-TBS
5. 3 h Inkubation in Kaninchen Anti-fZP Antiserum (1:1000)
6. 3 x 10 min Waschen in T-TBS
7. 1 h Inkubation in POD-markiertem Ziege Anti-Kaninchen-IgG (1:2000)
8. 3 x 10 min Waschen in T-TBS

Die nachfolgenden Schritte wurden in der Dunkelkammer durchgeführt. Die Detektion der Bindung des sekundären Antikörpers erfolgte mittels Chemilumineszenz unter Verwendung des ECL Western Blotting Detection Reagents Kits (Amersham Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, England). Dafür wurden die zwei Lösungen des Kits zur Detektion 1:1 (v/v) gemischt und die darin befindliche Membran für 1 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran kurz trockengetupft, in Zellophanfolie geschlagen und zusammen mit einem hochauflösenden Chemilumineszenz Film (Amersham) für 1-2 min in einer Hyperkassette (Amersham) belichtet, daraufhin entwickelt und fixiert.

Alle Wasch- und Inkubationsschritte des Epitop-Mappings erfolgten bei Raumtemperatur. Das Volumen des jeweiligen Puffers betrug mindestens 25 ml, so dass die Membran immer ausreichend mit Flüssigkeit bedeckt blieb.

3.1.4 Regeneration der Membran

Entsprechend der Angaben des Herstellers kann eine Epitop-Mapping-Membran in den meisten Fällen regeneriert werden. Zur Ablösung des primären Antikörpers standen zwei verschiedene Regenerationsprotokolle zur Verfügung. Trotz mehrfacher Anwendung beider, waren Peptid-Epitope durch erneute Inkubation mit dem sekundären Antikörper und Chemilumineszenz-Auswertung weiterhin detektierbar.

Die einmalige Wiederholung des Epitop-Mappings erfolgte daher mit einer neu synthetisierten Nitrozellulosemembran.

3.2 Identifizierung der detektierten Sequenzen und Peptidsynthese

3.2.1 Identifikation linearer Peptid-Epitope

Wenigstens drei bis vier direkt hintereinander liegende, dunkel gefärbte „Spots“ wurden als ein lineares Epitop gewertet (Abb. 4). Einzelne gefärbte Spots deuteten auf das Vorliegen eines diskontinuierlichen Epitops hin. Da es bei alleiniger Anwendung dieser Methode nicht möglich war, weitere dazugehörige Sequenzen sicher zu identifizieren, konnten diese Spots nicht berücksichtigt werden. Die Farbintensität gefärbter Spots variierte zwischen den beiden durchgeführten Epitop-Mappings.

3.2.2 Antigenitätsplot

Die Gesamtsequenz identifizierter Peptid-Epitope wurde mit einem im Internet verfügbaren Programm nach HOPP & WOODS (1981) auf ihre theoretische Antigenität hin überprüft (<http://www.embl-heidelberg.de/JaBMW/3/1/7/>). Auf der Basis dieser Ergebnisse wurden die gefundenen Sequenzen um wenige Aminosäuren gekürzt oder erweitert, um das höchstmögliche antigene Potential zu gewährleisten.

3.2.3 Synthese der Peptide P1-P6

Die Herstellung von sechs synthetischen Peptiden auf der Basis der identifizierten Epitope erfolgte mittels Fmoc-Methode (CARPINO et al., 2003) durch die Firma Jerini BioTools (Berlin, Deutschland). Nachfolgend wurden die Peptide mit den Kürzeln P1-P6 belegt.

3.3 Dot Immunoassay

Eine spezielle Variante der Nutzung von Immunreaktionen an membran-immobilisierten Antigenen ist der Dot Immunoassay (Dot Blot Test). Dabei wird das Antigen direkt auf die immobilisierende Membran aufgetragen, so dass das klassische Blotting, also der Transfer von Makromolekülen aus Trenngelen auf eine immobilisierende Matrix, entfällt. Nach erfolgter Inkubation mit einem primären Antikörper kann die Bindung an das Antigen mit Hilfe eines markierten sekundären Antikörpers erfolgen. Der Test eignet sich für semiquantitative Bestimmungen von Antigenen und Antikörpern.

In dieser Studie wurde die Methodik des Dot Immunoassay (Dot Blot) unter drei verschiedenen Gesichtspunkten angewendet:

- Nachweis der Bindung von Anti-fZP Antikörpern an die synthetische Peptide P1-P6
- Detektion von Anti-Peptid Antikörpern im Serum immunisierter Ratten
- Titerbestimmung der Anti-Peptid Antikörper im Serum immunisierter Katzen

Die Nachweisreaktion erfolgte jeweils mittels Chemilumineszenz.

Phosphatpuffer (PBS^a) pH 7,4-7,5	Testpuffer, pH 7,2
Na ₂ HPO ₄ 1,62 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 0,04 M
NaCl 0,027 mM	NaCl 0,15 M
KCl 0,54 mM	BSA 0,1% (w/v)
KH ₂ PO ₄ 0,3 mM	
TBS: Tris buffered saline	T-TBS
TRIS 50 mM	TBS
NaCl 137 mM	Tween 20 0,05% (w/v)
KCl 2,7 mM	
auf pH 8,0 einstellen	

Für den Dot Immunoassay wurden zunächst die Peptide in PBS^a Puffer oder Aqua bidest. gelöst und in verschiedenen Konzentrationen auf Nitrozellulose-Membranen (Hybond ECL Nitrozellulose, Amersham) aufgetropft und luftgetrocknet. Der prinzipielle Ablauf der folgenden Arbeitsschritte blieb für alle drei Zielstellungen weitestgehend gleich; die notwendigen Modifikationen der Versuchsbedingungen für die drei durchgeführten Dot Blots sind in Tab. 3 aufgeführt.

Versuchsablauf für Dot Immunoassays:

1. 3 x 10 min Waschen in TBS
2. Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran durch mehrstündiges sanftes Schwenken in Blockierpuffer
3. 1 x 10 min Waschen in T-TBS
4. Inkubation im primären Antikörper
5. 3 x 10 min Waschen in T-TBS
6. 1 h Inkubation im sekundären POD-markiertem Antikörper
7. 3 x 10 min Waschen in T-TBS
8. Detektion der Bindung des sekundären Antikörpers mittels Chemilumineszenz unter Verwendung des ECL (Advance) Western Blotting Detection Reagents Kit.

3.3.1 Modifikationen der Testbedingungen für den Nachweis einer Bindung zwischen den synthetischen Peptiden und dem Anti-fZP Antiserum bzw. für den Nachweis generierter Anti-Peptid Antikörper in Seren von Ratten und Katzen

Zur Überprüfung der Reaktivität zwischen dem Anti-fZP Antiserum und den Peptiden P1-6, wurden letztere in PBS^a gelöst, auf die Zellulosemembran aufgebracht und unter den in Tab. 3 beschriebenen Bedingungen getestet.

Für die Detektion von Anti-Peptid Antikörpern im Serum immunisierter Ratten wurden parallel zu den eingesetzten Peptidlösungen von P3 und P6 in diesem Test zusätzlich Rattennormalserum als Positivkontrolle des sekundären Antikörpers in der Verdünnung 1:2000 und Testpuffer (0,1% BSA) auf die Nitrozellulose aufgetropft. Der vergleichende Ansatz mit einem BSA-haltigen Puffer gab Aufschluss über die Stärke der Immunantwort gegen das bei den Immunisierungen verwendete Carrierprotein, BSA.

Das für die Titerbestimmung der Anti-Peptid Antikörper im Serum P3- und P6-immunisierter Katzen neu verwendete, sensitivere Detektionssystem bedingte einige Modifikationen im Vorfeld (siehe Tab. 3). Für die Abschätzung der Antikörpertiter in Blutseren verschiedener Katzen (siehe Kap. 4.5.1) wurden drei Verdünnungen (5, 25 und 100 µg/ml) der Peptidlösungen von P3 und P6 aufgetragen und gegen die Serumverdünnungsstufen 1:5000, 1:20.000 und 1:80.000 getestet.

Tab. 3 Überblick über die Versuchsparameter der in dieser Studie durchgeführten Dot Immunoassays

	Kreuzreaktivität der Peptide zum Anti-fZP Antiserum	Detektion von Ratten Anti-Peptid Antikörpern	Titerbestimmung von Katzen Anti-Peptid Antiseren
Konzentration der Peptidlösung	1 mg/ml in PBS	1 mg/ml in H ₂ O	100, 25, 5 µg/ml in PBS
Eingesetztes Volumen der Peptidlösung	2-5 µl	2 µl	1 µl
Blockierpuffer	0,5% Milchpulver in T-TBS	1% Milchpulver in T-TBS	1% Milchpulver + 1% BSA in T-TBS
Blockierzeit, Temperatur	6 h, RT	6 h, RT	16 h, 4°C
Primäre Antikörper	Anti-fZP Antiserum (Kap. 3.1.2)	Ratten Anti-Peptid Antikörper (Kap. 3.5)	Katzen Anti-Peptid Antiseren (Kap. 3.7)
Verdünnung der primären Antikörper	1:1000 in Blockierpuffer	1:400 in Blockierpuffer	1:5000, 1:20.000 und 1:80.000 in Blockierpuffer
Negativkontrolle	Kaninchennormalserum	Rattennormalserum	Präimmunserum (Katze)
Inkubationszeit der primären Antikörper	16 h, RT	16 h, 4°C	4 h, 4°C
Sekundäre Antikörper	POD konjugiertes Ziege Anti-Kaninchen-IgG	POD konjugiertes Kaninchen Anti-Ratten-IgG	POD konjugiertes Ziege Anti-Katzen-IgG
Verdünnung der sekundären Antikörper	1:2000 in Blockierpuffer	1:2000 in Blockierpuffer	1:50.000 bzw. 1:100.000 in Blockierpuffer
Inkubationszeit der sekundären Antikörper	1 h, RT	1 h, RT	1 h, RT
Detektionssystem	ECL Western Blotting Detection Reagents Kit	ECL Western Blotting Detection Reagents Kit	ECL Advance Western Blotting Detection Kit

3.4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die ELISA-Methode ist derzeit die am häufigsten verwendete Methode für die Bestimmung von Antikörperkonzentrationen und dient damit der Bewertung hergestellter Antiseren. Sie kann jedoch ebenso für die Bestimmung von Antigenen herangezogen werden. Gegenüber dem klassischen Dot Immunoassay bietet diese Methode die Möglichkeit der genauen Quantifizierung einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Das Prinzip des ELISA beruht dabei auf der Ermittlung der Konzentration des Analyten über die Aktivitätsbestimmung eines Markerenzym. In dem hier verwendeten ELISA binden sich die nachzuweisenden Probenantikörper in einem ersten Reaktionsschritt an Festphase-adsorbiertes Antigen. Nach der Trennung der gebundenen von den freien Antikörpern können erstere durch enzymmarkierte Anti-Spezies Antikörper nachgewiesen werden. Die gemessene Menge der Enzymaktivität ist dem Gehalt an spezifischem Antikörper im Versuchsserum proportional.

In dieser Arbeit wurde der ELISA parallel neben dem Dot Immunoassay zur Bearbeitung folgender Aufgaben herangezogen.

- Bestimmung der Bindung von Anti-fZP Antikörpern an die synthetische Peptide P1-P6 (Kap. 4.2)
- Titerbestimmung der Anti-Peptid Antikörper im Serum immunisierter Ratten (Kap. 4.3)
- Titerbestimmung der Anti-Peptid Antikörper im Serum immunisierter Katzen (Kap. 4.5.2)

3.4.1 Beschichtung der Mikrotiterplatten

Für jeden durchgeführten ELISA mussten zunächst Mikrotiterplatten mit dem entsprechenden Peptid beschichtet werden. Dazu wurden die Wells mit je 1 µg Peptid in 100 µl Beschichtungspuffer beschickt und die Platten anschließend bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit aus den Wells entfernt und die Mikrotiterplatte zusätzlich auf Zellstoff ausgeklopft. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur mit Testpuffer bzw. für die Titerbestimmung der Rattenserum mit milchpulverhaltigem Blockierpuffer.

Beschichtungspuffer		Blockierpuffer	Testpuffer, pH 7,2	
Na ₂ CO ₃ x 10 H ₂ O	0,015 M	T-TBS	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,04 M
NaHCO ₃	0,03 M	Milchpulver 0,5% (w/v)	NaCl	0,15 M
pH 9,6			BSA	0,1% (w/v)
Substrat-Färbelösung				
Lösung A pH 2,4			Lösung B pH 5	
3,3',5,5'-TMB	300	mg	H ₂ O ₂ -Harnstoff	0,106 M
Dimethylsulfoxid	40	ml	Na ₂ HPO x 2 H ₂ O	0,1 M
Aqua bidest.	960	ml	Zitronensäure x H ₂ O	0,049 M
Zitronensäure x H ₂ O	10,3	g		
Lösung A und B kurz vor Gebrauch 1:2 mischen				

3.4.2 Durchführung der ELISA

Unter Verdopplung der Verdünnungsschritte (Bereiche für die einzelnen Versuche siehe Tab. 4) wurden die zu testenden Antiseren auf eine Peptid-beschichtete 96-iger Mikrotiterplatte aufgetragen. Die Verdünnung aller verwendeten Antikörper erfolgte in Testpuffer. Zur Beurteilung der unspezifischen Bindungseigenschaften der sekundären Antikörper wurde das primäre Antiserum durch Testpuffer bzw. durch Blockierpuffer ersetzt.

Versuchsablauf des ELISA:

1. Inkubation der Platte über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken
2. Flüssigkeit aus den Wells verwerfen
3. Zugabe von 100 µl des sekundären Antikörpers
4. Inkubation bei 24°C für 1 h
5. Platte viermal Waschen (Platten-Washer 96PW, SLT Labinstruments, Crailsheim, Deutschland)
6. Inkubation mit 150 µl Tetramethylbenzidin (TMB)-haltiger Substrat-Färbelösung für 40 min bei 24°C
7. Abstoppen der Reaktion mit 4N H₂SO₄

Das innerhalb der 40 min durch die im Immunkomplex verbliebene Menge Peroxidase umgesetzte Reaktionsprodukt wurde photometrisch mit einem Mikrotiterplattenreader (SLT Spectra, SLT Laborinstrumente, Crailsheim) bei 450 nm bestimmt. Modifikationen einzelner Arbeitsschritte der verschiedenen ELISA (Testung des Anti-fZP Antiserums, Ratten- und Katzenserum) sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4 Überblick über die Versuchsparameter der durchgeführten ELISA

	Kreuzreaktivität der Peptide zum Anti-fZP Antiserum	Titerbestimmung der Ratten Anti-Peptid Antiserum	Titerbestimmung der Katzen Anti-Peptid Antiserum
Primäre Antiserum	Anti-fZP Antiserum	Ratten Anti-Peptid Antiserum	Katzen Anti-Peptid Antiserum
Verdünnungsbereiche der primären Antiserum	1:2500 bis 1:160.000	1:1000 bis 1:64.000	1:500 bis 1:64.000
Negativkontrolle	Präimmunserum	Rattennormalserum	Präimmunserum
POD markierte sekundäre Antikörper	Ziege Anti-Kaninchen-IgG	Kaninchen Anti-Ratten-IgG	Ziege Anti-Katzen-IgG
Verdünnung der sekundären Antikörper	1:10.000	1:10.000 bis 1:40.000	1:10.000

3.5 Herstellung von Anti-Peptid Antiseren in Ratten

Antiseren gegen „Standardantigene“, z.B. humanes IgG sind käuflich erwerbbar. Die von uns zu weiteren Testzwecken gewünschten Anti-Peptid Antiseren gehören nicht zu dieser Gruppe und mussten daher selbst hergestellt werden. Einzelne antigene Determinanten, zu denen auch unsere Peptide gehören, sind in der Regel zu klein, um eine adäquate Immunantwort auslösen zu können und werden daher vor der Verimpfung an höhermolekulare Carrier konjugiert.

3.5.1 Kopplung der Peptide an BSA

Die Konjugation der Peptide 3 und 6 (P3, P6) an das Trägerprotein BSA erfolgte über die Carbodiimid-Methode (modifiziert nach KYREIN, 1983). Dazu mussten zunächst 10 mg des jeweiligen Peptides in 1 ml N,N-Dimethylformamid (DMF) gelöst werden. Anschließend wurde zu dieser Peptidlösung tropfenweise 0,5 ml EDC-Lösung gegeben (10 mg 1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl]Carbodiimid-Hydrochlorid in 0,5 ml Aqua dest.). Unter Kontrolle des pH-Wertes erfolgte die Zugabe von 1 ml PBS^b, in dem zuvor 20 mg BSA gelöst wurden. Anschließend wurde das Gemisch bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren 20 h inkubiert, bevor es über 36 h im Dialysierschlauch „Visking“ mit einem Molekulargewichtausschluss von 14000 Da (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gegen PBS^b dialysiert wurde. Bis zur weiteren Verwendung wurden die konjugierten Peptide portioniert und bei -20°C eingefroren.

Phosphatpuffer (PBS ^b) pH 7,2	
Na ₂ HPO ₄	58 mM
NaH ₂ PO ₄	58 mM
NaCl	156 mM

3.5.2 Immunisierungsschema der Ratten und Blutentnahmen

In Wistar Ratten wurde intramuskulär eine Emulsion aus 100 µl komplettem Freundschem Adjuvans (FCA) und 250 µg Peptid-BSA, aufgelöst in 100 µl PBS^a, injiziert. Es folgten im dreiwöchigen Abstand bis zu sieben Boosterungen (intraperitoneal), wobei dafür inkomplettes Freundsches Adjuvans und je 125 µg Peptid-BSA in PBS^a verwendet wurden. Die Haltung

der Ratten und Serumgewinnung oblag der Firma Biopharm GmbH (Berlin, Deutschland). Jeweils zehn Tage nach Boosterung erfolgte eine retrobulbäre Blutentnahme. Zur Serumgewinnung wurden die Blutproben für 30 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Der Überstand (Serum) wurde bis zur Titerbestimmung mittels Dot Immunoassay bzw. ELISA bei -20°C eingefroren.

3.6 *In vitro* Testung des kontrazeptiven Potentials der Peptide 3 und 6

3.6.1 *In vitro* Reifung (IVM) und Befruchtung (IVF) von Katzenoozyten

Die Befruchtung von Katzeizellen mit Katzenspermien unter artifiziellen Bedingungen ist ein Prozess, der es erlaubt, den Einfluss auf den Befruchtungsvorgang kontrazeptiv wirkender Substanzen *in vitro* zu testen. Die antifertile Wirkung der Peptide wurde durch eine einstündige Vorinkubation der Spermien vor der Befruchtung (1 $\mu\text{g/ml}$) getestet. Im Gegensatz dazu wurden die Anti-Peptid Antiseren direkt zum Befruchtungsmedium hinzugefügt. Als Negativkontrolle diente Rattennormalserum.

3.6.1.1 Gewinnung von Katzentestis und -ovarien

Ovarien und Hoden fielen bei routinemäßigen Kastrationen von Katzen im Tierheim Berlin (Tierschutzverein für Berlin und Umgebung) an, wurden von den dortigen Mitarbeitern gesammelt und bei 4°C gelagert. Im Gegensatz zu dem Transport der Hoden ohne Flüssigkeit wurden die Ovarien direkt nach Entnahme in DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline + 1% einer Antibiotikum- sowie Antimykotikum-haltigen Lösung) überführt.

3.6.1.2 Gewinnung und Kultur von befruchtungsfähigen Eizellen

Die Präparation von reifungs- und befruchtungsfähigen Eizellen (Cumulus-Oozyten-Komplexe, COC) aus den Ovarien erfolgte noch am Tag der Kastration, die Aufarbeitung der Hoden und Gewinnung von Nebenhodenspermien am darauffolgenden Tag. Die Zeitspanne von der Ovariohysterektomie bis zum Kulturbeginn der Oozyten betrug niemals mehr als 6 h. Die *in vitro* Reifung und Befruchtung erfolgte in Anlehnung an FREISTEDT et al. (2001).

Dazu wurden die Ovarien von anliegenden Geweben (Bindegewebe, Eileiter) freipräpariert, in DPBS gespült und in sterile 6 cm Zellkulturschalen (NUNC, Roskilde, Denmark) mit mM199 Waschmedium gesetzt. Das Freisetzen der COC erfolgte durch oberflächliches Einritzen des Ovars mit einer Skalpellklinge (Aesculap, Tuttlingen). Mit Hilfe handausgezogener Pipetten (Mikro-Haematokrit Kapillaren, Heiland Vet GmbH, Hamburg) und eines Aspirationsschlauches (Cook Veterinary Products GmbH, Mönchengladbach, Deutschland) wurden die COC anschließend unter dem Binokular nach zweimaligem Waschen in 400 µl Reifungsmedium transferiert und über 24 h bei 39°C in 4-Well Nunclon Multischalen (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) kultiviert.

Waschlösung mM 199	Reifungsmedium (IVM-Medium)
M199 mit Earle`s Salzen und L-Glutamine	Waschlösung mM 199
HEPES 1,4 mg/ml	Equines LH 0,01 IU/ml
Zysteinlösung 0,1 mg/ml	Porcines FSH 0,02 IU/ml
Natrium-Laktat 0,6 mg/ml	
Natrium-Pyruvat 0,25 mg/ml	
Gentamizin 0,055 mg/ml	
BSA 3 mg/ml	
steril filtrieren	

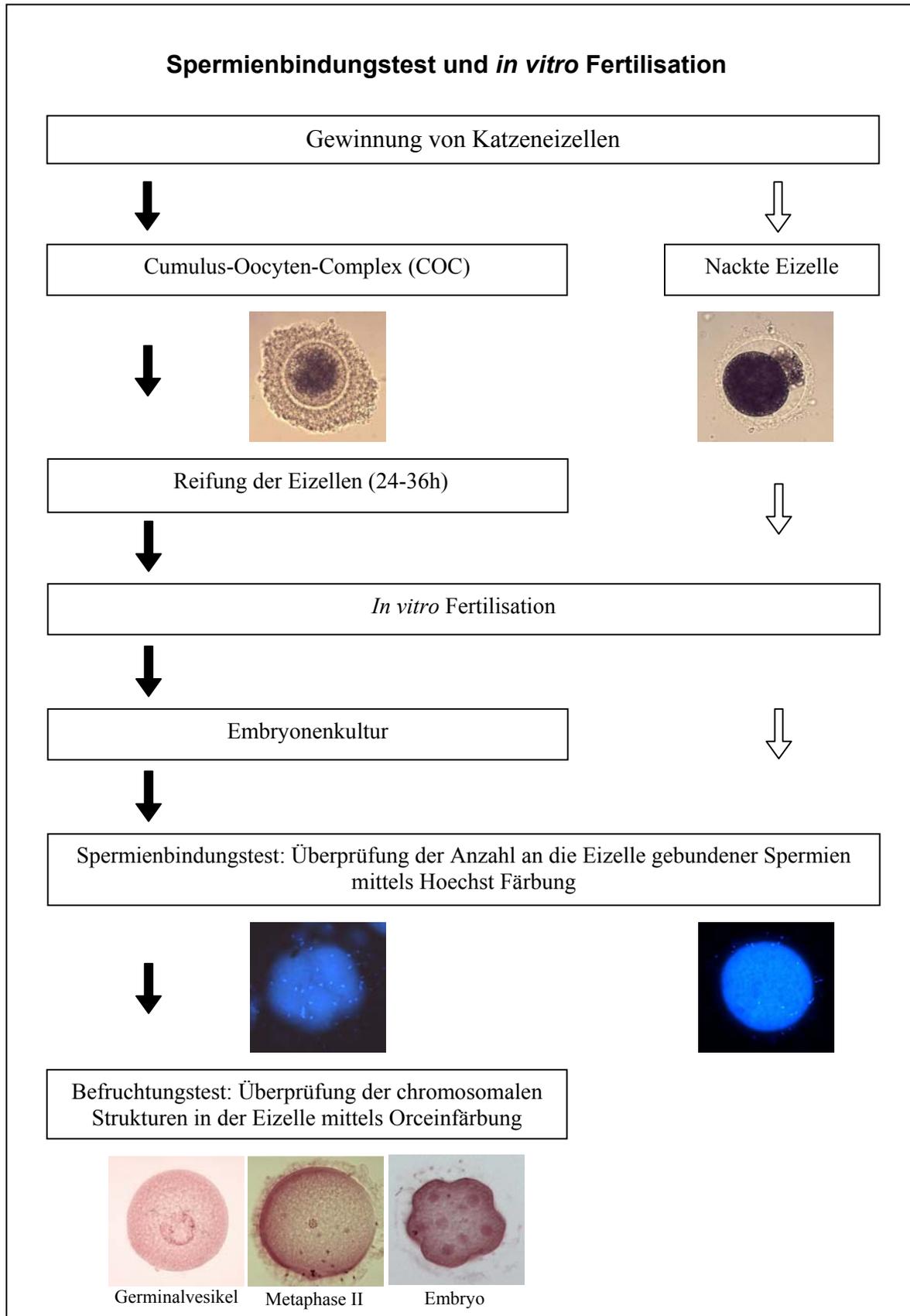


Abb. 3 Schema der in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Kultur (Gewinnung, Reifung, Befruchtung, Auswertung) von Katzenoozyten.

Nur Oozyten mit gleichmäßig dunklem Zytoplasma und mehrschichtiger Corona radiata fanden für die Kultivierung Verwendung (Abb. 3). Darüber hinaus wurden auch cumulusfreie, sogenannte „nackte“ Eizellen gesammelt, über Nacht in DPBS bei 4°C gelagert und am nächsten Tag zusammen mit den Spermien in Befruchtungsmedium inkubiert. Nackten Oozyten fehlt die Fähigkeit der Reifung und Befruchtung. Sie fanden daher nur im Spermienbindungstest (siehe Kap. 4.4) Verwendung. Die weitere Verarbeitung nackter Eizellen verlief wie für die COC beschrieben. Allerdings war eine spätere Kultivierung in Embryonenkulturmedium ebenso wie die anschließend erfolgende Färbung zur Identifikation der Befruchtungs- und Embryonalstadien unnötig. Alle Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen.

3.6.1.3 Gewinnung und Aufarbeitung von Nebenhodenspermien

Die Gewinnung vitaler und befruchtungsfähiger Spermien für die IVF erfolgte aus dem Nebenhoden adulter Kater. Dazu wurde zunächst der Nebenhoden vom Hoden freipräpariert. Der distale Abschnitt der Cauda epididymis, in dem sich der Nebenhodenkanal deutlich abzeichnete, und zusätzlich 1-2 cm des Ductus deferens wurden abgetrennt und in 1 ml Spermienmedium fein zerschnitten, so dass die Spermien in das Medium ausschwimmen konnten. Die Verwendung von leicht modifiziertem TALP (Tyrode's Albumin-Lactat-Pyruvat) Medium als Spermienmedium ist für viele Tierarten, u.a. Rind, Pferd und Hamster beschrieben (z.B. YANAGIMACHI, 1982). Nach 5 min erfolgte eine erste subjektive Einschätzung des prozentualen Anteils beweglicher Spermien unter dem Mikroskop bei 250facher Vergrößerung und einfachem Phasenkontrast. Suspensionen mit mindestens 50% Motilität wurden vorsichtig, unter Zurückhaltung von Geweberesten, durch einen Trichter in Zentrifugenröhrchen dekantiert und bei 500 x g und 18°C für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 100-200 µl Spermienmedium resuspendiert und anschließend einer weiteren Motilitätsbestimmung unterzogen. Nach Vereinigung der Suspensionen mit der höchsten Spermienbeweglichkeit fand die endgültige Motilitäts- und Konzentrationsbestimmung, letztere mit Hilfe einer NEUBAUER Zählkammer (Fein-Optik, Bad Blankenburg), statt. Durch Verdünnung mit Spermienmedium wurde eine Konzentration von 4×10^5 motile Spermien/ml eingestellt. In den Wochen, in denen frische Spermien nicht zur Verfügung standen, wurden kryokonservierte Spermien aufgetaut (siehe Kap. 3.6.1.5),

aufgrund ihrer schlechteren Bindungsfähigkeit und der kürzeren Überlebensdauer auf eine Konzentration von 4×10^6 Spermien/ml eingestellt und für die Befruchtung verwendet.

Spermien-(TALP)-Medium	Befruchtungsmedium (IVF-Medium)
Tyrode-Salzlösung	TALP Medium
BSA 6 mg/ml	Heparin 12,5 µg/ml
HEPES 1,2 mg/ml	
Natrium-Lactat 1,1 mg/ml	
Natrium-Pyruvat 0,1 mg/ml	
Steril filtrieren	

3.6.1.4 Kryokonservierung von epididymalen Spermien

Spermiesuspensionen mit mindestens 50% Motilität und ausreichender Dichte (mindestens 50×10^6 Spermien/ml, zur Aufarbeitung vgl. Kap. 3.6.1.3) wurden nach LENGWINAT & BLOTTNER (1994) wie folgt eingefroren. In Abhängigkeit von der Konzentration der Spermiesuspension wurde Tiefgefriermedium Test G im Verhältnis von mindestens 4:1 bei Raumtemperatur vorsichtig hinzugegeben, so dass die Endkonzentration der Spermien ca. $10\text{--}20 \times 10^6$ motile Spermien/ml erreichte. Je 300 µl der Spermienlösung wurde in Kryoröhrchen (2 ml „Cryo.s“ Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) transferiert und für mindestens 1,5 h im doppelten Wasserbad (Kryoröhrchen werden in zwei ineinanderstehende wassergefüllte Bechergläser gestellt) bei 4°C langsam und gleichmäßig herabgekühlt. Mit Hilfe des Halbautomaten NICOOL LM10 (Air Liquide, Berlin, Deutschland) wurden die Röhrchen im Stickstoffdampf mit einer Kühlgeschwindigkeit von 2°C/min auf -5°C heruntergekühlt, mit 4 °C/min auf -25°C gebracht und nach Erreichen von -100°C (5°C/min) direkt in flüssigen Stickstoff überführt. Die Methode ist eine Modifizierung des von LENGWINAT & BLOTTNER (1994) beschriebenen Einfrierprotokolls unter Berücksichtigung der technischen Parameter des verfügbaren Einfriergerätes. Bis zur weiteren Verwendung lagerte die Spermiesuspension in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

Tiefgefriermedium Test G			
TES	21,07	mM	
Tris	9,58	mM	
Fruktose	1,11	mM	
Glycerol	7,5 %	(v/v)	
Eidotter	15 %	(v/v)	
pH 7,1-7,2			

3.6.1.5 Auftauen kryokonservierter Katzenspermien

Ein bis drei Kryoröhrchen verschiedener Spermien suspensionen wurden im 37°C warmen Wasserbad in 1,5 min unter leichtem Schütteln rasch aufgetaut und anschließend sofort mit 100 µl Spermienmedium (37°C) versetzt. Motilitätsbestimmung und Verdünnung auf die Endkonzentration von 4×10^6 motile Spermien/ ml erfolgten wie unter Kap. 3.6.1.3 beschrieben.

3.6.1.6 Befruchtung und Embryonenkultur

100 µl Spermienlösung wurden zu 300 µl IVF Medium gegeben und die Oozyten (entweder COC oder nackte Eizellen) vorsichtig ins Medium transferiert. Zu diesem Zeitpunkt bereits fragmentierte Eizellen wurden von der Weiterkultivierung ausgeschlossen. Potentiell befruchtete Oozyten wurden nach 18-20 h Kokultur und dreimaligem Waschen in 400 µl Embryonenkulturmedium überführt und dort weitere 24 h bei 39°C kultiviert.

Embryonenkulturmedium SOF ¹			
SOF Medium auftauen			
pH 7,4 mit 2N HCl einstellen			
Na-Pyruvat	3,7	µl/ml	
BSA	9	mg/ml	
steril filtrieren			

¹ Synthetic Oviductal Fluid (SOF)-Medium nach STEEVES & GARDNER (1999) stellte das Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztier, Schönöw, zur Verfügung. Es wurde bis zur weiteren Verwendung portioniert bei -20°C eingefroren.

3.6.1.7 Fixierung, Färbung und Auswertung potentiell befruchteter Eizellen

Um lose gebundene Spermien und Cumulusreste zu entfernen, wurden die Embryonen dreimal kräftig in DPBS (+ 3 mg/ml BSA) gewaschen und anschließend in 4%igem Paraformaldehyd (+ 0,02% (v/v) Triton-X100) für 45-60 min im Brutschrank fixiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten in DPBS + BSA erfolgte die Färbung mit 10 µg/ml Hoechst 33258 in DPBS + BSA für 45 min.

Für die mikroskopische Auswertung wurden die Eizellen auf einen Objektträger transferiert. Um ein Zerdrücken der Zellen durch das Deckgläschen zu verhindern, mussten zunächst zwei Vaselinestreifen auf den Objektträger in der Breite des Deckgläschens aufgebracht werden. Die Eizellen wurden zwischen die Streifen platziert, das Deckgläschen vorsichtig aufgesetzt und unter mikroskopischer Kontrolle angedrückt. Bis zur anschließenden Auszählung der gebundenen Spermien wurden die Objektträger abgedunkelt in einer feuchten Kammer aufbewahrt, um einen Intensitätsverlust des Fluorochroms zu vermeiden.

Die Anregung des Fluorochroms und Auszählung der gebundenen Spermien erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (DMLB Leica Microscope Wetzlar, Deutschland, mit Quecksilber-Dampflampe HB 100 unter Nutzung eines Anregungsfilters der Wellenlänge 340-380 nm und eines Sperrfilters von 425 nm).

Die Aceto-Orceinfärbung wurde zur Identifikation von Embryonen eingesetzt. Sie ermöglicht die Beurteilung der Meiosestadien (Reifezustand der Eizellen) und des Status der Embryonen anhand chromosomaler Strukturen. In eine Färbekuvette wurden 20 ml eines 1:4 Gemisches aus Essigsäure (99,8%) und Methanol (100%) gegeben und die Eizellen auf den Objektträgern darin für 15 min fixiert. Die anschließende Färbung erfolgte durch Auftragen eines Tropfens einer 2%igen Orceinlösung (in 99,8%iger Essigsäure) an den unteren Rand des Deckgläschens. Der Farbtropfen konnte mit Hilfe eines Filterpapiers vollständig unter das Deckgläschen gezogen werden. Zur langsamen Entfärbung wurden die Objektträger nach 2-5 min für etwa eine Stunde zurück in die Kuvette gestellt. Im Anschluss daran erfolgte die lichtmikroskopische Beurteilung unter 200- bis 400facher Vergrößerung. Die Kernstruktur gab Auskunft über den Entwicklungszustand potentieller Embryonen, wobei das Auftreten von Vorkernen, zwei oder mehr Kernen bzw. Blastomeren als Anzeichen erfolgreicher *in vitro* Befruchtung gewertet wurde.

3.6.2 Testung des kontrazeptiven Potentials von synthetischen fZPB2 Peptiden bzw. Anti-Peptid Antiseren in der *in vitro* Kultur von Katzenoozyten

3.6.2.1 Überprüfung des kontrazeptiven Einflusses der synthetischen Peptide P3 und P6

Zur Untersuchung des kontrazeptiven Potentials der Peptide wurden die Spermien vor der Befruchtung für 1 h mit 1 µg/ml Peptid in Spermienmedium bei 39°C inkubiert. Die mögliche Besetzung von ZP-Bindungsstellen auf der Oberfläche der Spermatozoen sollte zu einer Verringerung ihrer Bindungs- und Befruchtungsfähigkeit *in vitro* führen.

3.6.2.2 Überprüfung des kontrazeptiven Einflusses der Ratten Anti-P3 und Anti-P6 Antiseren

In diesem Versuchsansatz wurde das Antiserum in einer Verdünnung von 1:10 direkt in das Befruchtungsmedium gegeben. Das Maskieren von Spermienbindungsstellen auf der Zona pellucida durch den Antikörper sollte ebenfalls zu einer Verringerung der Bindungs- und Befruchtungsfähigkeit führen. Um den durch die Serumzugabe höheren Albumingehalt auszugleichen (der Albuminanteil im Serum liegt zwischen 3,5 und 5,5 mg/ml), wurde der BSA Anteil des IVF Mediums von 6 auf 2,22 mg/ml reduziert. Als Kontrolle diente Ratten Präimmenserum.

3.6.2.3 Statistische Analyse der Ergebnisse aus den *in vitro* Untersuchungen

Die Ergebnisse aus den Versuchen zur Spermienbindung wurden als Mittelwerte \pm des Standardfehlers der Mittelwerte (SEM) angegeben. Alle Versuche wurden auf Normalverteilung geprüft. Die verschiedenen Mittelwerte der Untersuchungsgruppen wurden dem nichtparametrischen Mann-Whitney-Test unterzogen. Die Ergebnisse der Versuche zur *in vitro* Reifung und Befruchtung von Katzeizellen stellen die Zusammenfassung von mindestens vier Versuchen dar. Zur Bestimmung der Reifungs- und Befruchtungsraten wurde die Anzahl der Eizellen über die Versuche summiert.

Vergleiche zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppen erfolgten mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests unter Verwendung einer 2 x 2 Tabelle. P-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant

verschieden angesehen. Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Softwareprogramm „Instat Version 3“ (Graphpad Software Inc.) durchgeführt.

3.7 Untersuchung kontrazeptiver Peptid-Vakzine *in vivo*

Die Vakzinierung der Zielspezies mit der eigens für sie formulierten Zusammensetzung gibt wichtige Auskünfte über Wirkung und Verträglichkeit eines Impfstoffs. In diesem Falle sind zwei unterschiedliche Wirkungen von großer Bedeutung – das Vermögen eine adäquate Immunantwort auszulösen und der kontrazeptive Effekt des Vakzins.

3.7.1 Haltung der Katzen

Neun verwilderte weibliche Hauskatzen (EKH = Europäisch Kurzhaar) wurden von Oktober 2002 - April 2003 in der Außenstelle des „Severtsov Institutes für Ökologie und Evolution“ in Tschernogolovka (60 km nordöstlich von Moskau), Russland gehalten. Die Tiere teilten sich einen 24 m² umfassenden Außenkäfig, der zum Schutz vor Regen und Schneefall über vier für Katzen begehbare Holzboxen verfügte. Zwei der Boxen waren beheizbar. Die Ernährung erfolgte mit kommerziellem Katzenfutter, Wasser stand *ad libitum* zur Verfügung.

3.7.2 „Vakzin-Design“ für die Immunisierung von weiblichen Katzen

Die Immunisierung von jeweils 3 Katzen erfolgte entweder mit Peptid P3, Peptid P6 oder einer Kombination aus P3 und P6. Um eine möglichst kräftige und langanhaltende Immunantwort zu generieren, wurden die Peptide zunächst an Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) gekoppelt und die entstehenden Moleküle dann in Liposomen integriert. Schließlich wurde die Liposomenemulsion 1:1 mit komplettem Freundschem Adjuvans (FCA) gemischt und verimpft.

3.7.2.1 Kopplung der Peptide P3 und P6 untereinander

Die Vernetzung der Peptide P3 und P6 erfolgte über den Carboxy-Terminus des P6 und den Amino-Terminus des P3 mit Hilfe der Carbodiimid-Methode (modifiziert nach KYREIN, 1983). Zunächst wurde 1 mg P6 in 1 ml Aqua bidest. gelöst und durch Zufügen von 100 µl

HEPES-Puffer mit EDC (1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl]Carbodiimid-Hydrochlorid) aktiviert. Die Substanzen wurden abgedunkelt über 15 min bei Raumtemperatur sorgfältig verrührt. Darauf folgte die Zugabe von P3, ebenfalls 1 mg/ml in Aqua bidest. gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde weitere 2 h abgedunkelt gerührt.

In Vorbereitung auf die spätere Kopplung der vernetzten Peptide an einen Carrier musste der bisherige Puffer gegen Maleimid-Konjugationspuffer getauscht werden. Dazu wurden die gekoppelten Peptide über eine mit Maleimid-Konjugationspuffer äquilibrierte 5 ml Sephadex G-25 Säule (D-Salt™, Pierce, Rockford, USA) laufen gelassen. 500 µl Fraktionen wurden gesammelt und mit der BCA-Methode auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Proteinhaltige Fraktionen wurden gepoolt und bis zum nächsten Tag bei -4°C gelagert.

HEPES-Puffer mit EDC	Maleimid-Konjugationspuffer
HEPES 0,1 M	PBS 83 mM
NaCl 0,5 M	EDTA 0,1 M
pH 5,3	NaCl 0,9 M
EDC 10 mg/ml	Natrium-Azid 0,02% (w/v)
	pH 7,2

3.7.2.2 Proteingehaltsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinmenge der Kopplungsfractionen wurde mittels Bicinchonin-Säure (BCA)-Methode nach SMITH et al. (1985) durchgeführt. Dazu wurden je 20 µl des Standards bzw. der Probe auf eine Mikrotiterplatte gegeben und nach Zugabe von 300 µl BCA-Lösung (Lösung A : Lösung B = 50:1) bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte anschließend im Mikrotiterplattenreader (SLT Spectra, SLT Laborinstrumente, Crailsheim) bei 492 nm.

Lösung A		Lösung B	
4,4-Dicarboxy-2,2-biquinolin-Na ₂	8,6 g	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	40 g
Na ₂ CO ₃ x 10 H ₂ O	15,5 g		
Na ₂ -Tatrat	1,6 g		
NaOH (1 molar)	194 ml		
NaHCO ₃	9,5 g		
pH 11,25			

3.7.2.3 Kopplung der einzelnen sowie der vernetzten Peptide an Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)

Zur Verbesserung der Immunogenität wurden die Peptide P3 und P6 sowie die vernetzten Peptide P3-P6 an ein größeres Protein (Carrier) gekoppelt. Die Kopplung an KLH erfolgte jedoch spezifischer über die Schwefel-Wasserstoff (SH)-Gruppen in der Absicht, große Bereiche der Peptidsequenzen möglichst frei und damit leicht zugänglich zu halten. Verwendung fand Imject® Maleimide Activated mcKLH Kit (Pierce, Rockford, USA), eine bereits aktivierte Form des KLH, welche über 100 Maleimidgruppen pro Molekül trägt. Die Kopplung erfolgte nach den Instruktionen des Herstellers. Je 2 mg Peptid wurde in 1 ml Maleimid-Konjugationspuffer (siehe Kap. 3.7.2.1) gelöst und 2 mg KLH hinzugefügt. Im Falle der untereinander vernetzten Peptide P3-P6 wurden die gepoolten proteinhaltigen Fraktionen (ca. 2 mg) und ebenfalls 2 mg KLH verwendet. Die Gemische wurde unter Ausschluss des Lichtes für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Moleküle ließen sich aufreinigen, indem sie über eine 5 ml D-Salt™ Säule liefen, die mit Konjugationspuffer ohne EDTA äquilibriert war. Die Trennung der Kopplungsprodukte von EDTA war notwendig, da EDTA aufgrund seiner gerinnungshemmenden Eigenschaft nicht Bestandteil des Vakzins sein darf. Wiederum wurden Fraktionen von 500 µl gesammelt, ihr Proteingehalt bestimmt und proteinhaltige Fraktionen vereinigt. Der Gesamtproteingehalt für P3-KLH betrug 3,12 mg/ml und für P6-KLH 3,11 mg/ml. Beide Konjugate lagerten bis zur weiteren Verwendung bei -70°C. Aufgrund des hohen Volumens musste das dritte Konjugat, bestehend aus den vernetzten Peptiden P3-P6 und KLH, zunächst drei Tage gegen destilliertes Aqua dest. dialysiert und anschließend lyophilisiert werden. Vor dem Einfrieren erfolgte die erneute Lösung in PBS^b. Der Proteinanteil betrug 1,5 mg/ml.

Phosphatpuffer (PBS^b), pH 7,2			
Na ₂ HPO ₄	5,8	mM	
NaH ₂ PO ₄	5,8	mM	
NaCl	156	mM	
	pH 7,2		

3.7.2.4 Einschluss der KLH gekoppelten Peptide in Liposomen

Die KLH gekoppelten Peptide wurden in große multilamellare Liposomen (MLV) eingeschlossen. Die Liposomen bestanden in Anlehnung an BROWN et al. (1997b) aus 200 mg Soja Lezithin (Phospholipon G90, Nattermann GmbH, Köln, Deutschland) und 20 mg Cholesterol, gelöst in 1 ml Phosphatpuffer. Für die Herstellung der Vesikel wurden die beiden Substanzen getrennt in Chloroform gelöst und anschließend zusammenpipettiert. Als nächstes erfolgten die Trocknung der Lipid-Mischung über Stickstoffgas und die anschließende Lösung in PBS^b (siehe Kap. 3.7.2.3), welches die KLH gekoppelten Peptide in einer Konzentration von 800 µg/ml enthielt. Die Lipid-Protein-Suspension wurde bei 55°C für 1 h intensiv geschüttelt und anschließend fünf Gefrier-Tau-Zyklen (-70°C, 10 min; 55°C, 5 min) unterzogen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die in Liposomen eingeschlossenen Peptide bei -70°C eingefroren. Nicht eingeschlossene Peptide verblieben in der Suspension, da sie für eine rasche Initiation der Immunantwort sorgen sollten.

3.7.3 Vakzinierung der Hauskatzen

Alle 9 Katzen wurden einmalig ohne Boosterimmunisierung mit 250 µl Peptid-KLH-Liposomen-Emulsion (200 µg Protein) intramuskulär immunisiert. Die Katzen 1-3 erhielten Peptid 3, Katze 4-6 Peptid 6 und Katze 7-9 das kombinierte Vakzin aus Peptid 3 und 6. Direkt vor der Immunisierung wurde die Liposomen-Emulsion mit dem gleichen Volumen kompletten Freundschens Adjuvans (FCA) gemischt.

Tab. 5 Zeitschema der Immunisierung von Katzen, Blutentnahmen und abschließender Kastration

Datum der Blutentnahmen	Bezeichnung
20.10.02 (Impfung)	Serum 1
17.11.02	Serum 2
15.12.02	Serum 3
12.01.03	Serum 4
10.02.03	Serum 5
09.03.03	Serum 6
11.04.03 (Kastration)	Serum 7

Alle 4 Wochen erfolgte bei jedem der 9 Tiere eine Blutentnahme von etwa 2 ml aus der *Vena cephalica antibrachii*. Für die Prozedur wurden die Katzen zunächst intramuskulär mit 2 mg/kg (Körpergewicht) Xylazin-Hydrochlorid (XylaTM 2%, Interchemie, Castenray, Niederlande) und 5-15 mg/kg Ketamin-Hydrochlorid (KetamineTM 10%, Essex, München, Deutschland) immobilisiert. Nach der Blutentnahme wurde die Narkose mit 0,6-0,8 ml Atipamezolhydrochlorid (Antisedan, Pfizer, Karlsruhe Deutschland) pro Katze antagonisiert. Die folgenden 24 h verbrachten die Tiere in einem gewärmten Raum unter Beobachtung. Nach 30 min Zentrifugation der Blutproben bei 4000 U/min, konnte das Serum als Überstand abgenommen und bei -20°C eingefroren werden.

3.7.4 Verpaarung und Kastration

Um die Auswirkungen der Peptide auf die Fertilität zu überprüfen, hatten alle Katzen in den letzten 21 Tagen vor der Kastration (11.04.03) Zugang zu einem Kater mit erwiesener Fertilität. Da der anovulatorische Reproduktionszyklus 5-16 Tage dauert (CHRISTIANSEN, 1984), konnte davon ausgegangen werden, dass sich die Katze in Gegenwart des Katers mindestens einmal in der für eine erfolgreiche Verpaarung optimalen Östrusphase befunden hat. Die Kastration der Katzen erfolgte durch den an der Forschungsstation "Tschernogolovka" ansässigen Tierarzt. Die Tiere wurden nach Abschluss des Versuchs in private Hände abgegeben.

3.7.5 Progesteron (P4) und Östradiol (E2) Bestimmungen

Die Messung der Progesteron- bzw. Östradiolwerte in den Blutserumproben der Katzen erfolgte mit Hilfe standardisierter ELISA nach PRAKASH et al. (1987) bzw. MEYER (1989). Beide Hormone wurden in der 7. Abnahme bestimmt, als Referenzwerte dienten die jeweiligen Präimmunsere der Katzen.

2.7.6 Histologische Aufarbeitung der Ovarien und Uteri

Nach der Ovariohysterektomie wurden die Ovarien und Uteri grob morphologisch begutachtet und anschließend sofort in phosphatgepuffertem 4%igen Formaldehyd immersionsfixiert. Die Ovarien wurden optisch auf die Anzahl der vorhandenen Gelbkörper (Corpora lutea) untersucht, die einen direkten Hinweis auf die Anzahl ovulierter Follikel gibt. Ebenso erfolgte die Untersuchung der Uteri auf Implantationsstellen.

Zur histologischen Aufarbeitung der fixierten Organe wurden sie zunächst in Paraffin eingebettet. Mittels Mikrotom (2065 Supercut, Leica Instruments GmbH, Deutschland) wurden 3 µm dünne Schnitte angefertigt und auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger verbracht. Anschließend erfolgte eine Hämalaun-Eosin Doppelfärbung (H & E) der Präparate nach ROMEIS (1989). Die mikroskopische Auswertung wurde bei 100-200facher Vergrößerung ausgeführt und umfasste die Beurteilung des Luteinisierungsgrades von Gelbkörper im Ovar nach ROTH et al. (1995) und der Existenz plazentarer Strukturen im Uterus.

4 ERGEBNISSE

4.1 Epitop-Mapping der Aminosäuresequenz des felines ZPB2 Proteins

4.1.1 Identifikation von Peptid-Epitopen

Mittels Epitop-Mapping konnten auf zwei verschiedenen Membranen insgesamt 6 Peptid-Epitope identifiziert werden, die mit mindestens drei aufeinanderfolgenden dunkel gefärbten „Spots“ den Auswahlkriterien entsprachen und in Abb. 4 dargestellt sind. Die Ergebnisse beider Versuche waren nicht vollständig deckungsgleich. Sowohl Peptid-Epitop 3 als auch Peptid-Epitop 4 waren auf der ersten, hier aus Gründen geringerer Bildqualität nicht abgebildeten, Membran deutlich detektierbar und wurden in der abgebildeten zweiten Membran entsprechend markiert.

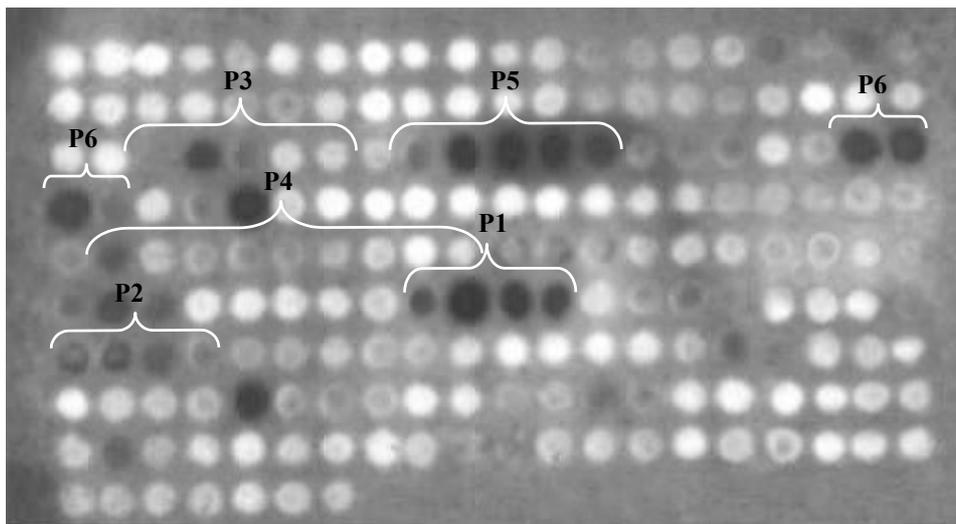


Abb. 4 Epitop-Mapping: Charakterisierung der Immunreaktion des Kaninchen Anti-fZP Antiserums gegen überlappende, die gesamte Aminosäuresequenz des felines ZPB2 Proteins umfassende, Peptid-Epitope auf der Nitrozellulosemembran. P3 und P4 konnten nur im ersten Epitop-Mapping-Versuch (Bild der Membran aus qualitativen Gründen nicht gezeigt) deutlich detektiert werden.

4.1.2 Charakterisierung der Peptid-Epitope 3 und 6

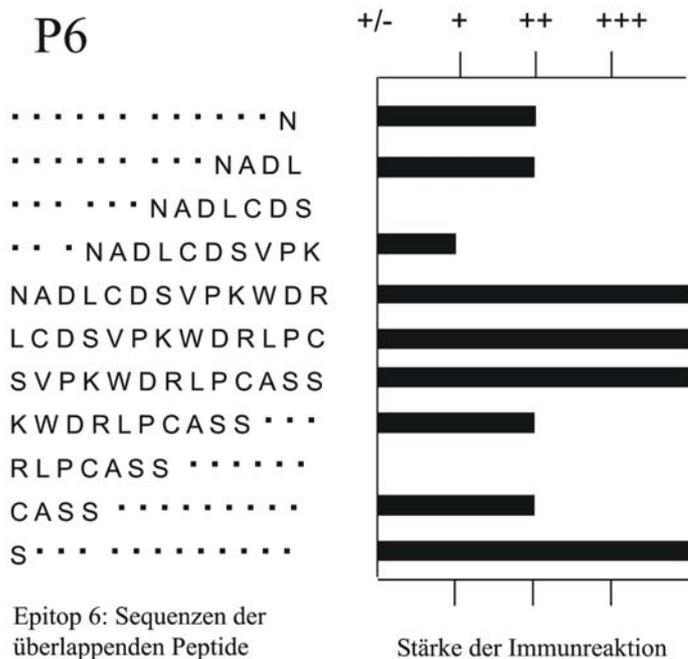
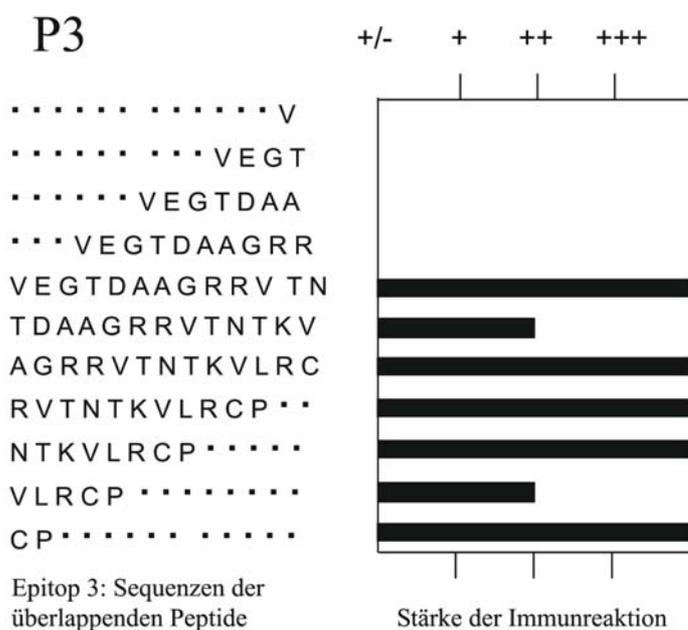
Basierend auf den Ergebnissen auf Reaktivität zwischen den zeitlich später synthetisierten Peptiden mit dem Anti-fZP Antiserum (Kap. 4.2), beschränken sich alle Folgeversuche auf die Verwendung von P3 und P6. Daher wird die genauere Charakterisierung stellvertretend für alle ursprünglich detektierten Sequenzen auch nur für diese beiden Epitope (3 und 6)

dargestellt. In Abb. 5 ist zunächst die Stärke der Immunreaktion für jeden einzelnen Spot auf der Epitop-Mapping-Membran, der mindestens eine Aminosäure der detektierten Sequenz enthält, abgebildet. Farbintensitätsunterschiede auf der Membran waren visuell ablesbar und reichten von ungefärbt weiß (keine Immunreaktion) über hell- und mittelgrau bis schwarz (starke Immunreaktion). Da Epitop 3 nur im ersten, hier nicht gezeigten Versuch detektierbar war, bezieht sich die Darstellung der Stärke der Immunantwort für dieses Peptid nicht auf die abgebildete Membran (Abb. 4).

Die Charakterisierung des Peptides P3 (Abb. 5) zeigt deutlich, dass die ersten Aminosäuren für die Erkennung des Antikörpers in diesem Epitop-Mapping nicht entscheidend sind. Aufgrund der guten theoretischen Antigenität (Abb. 6) wurde die Sequenz des Peptides jedoch um eben diese ersten Aminosäuren erweitert.

Der Antigenitätsplot ist eine theoretische Berechnung der Hydrophilizität von Aminosäuresequenzen. Dem zugrunde liegt die Erkenntnis, dass hydrophile Abschnitte in der Konformation eines Proteins im Gegensatz zu hydrophoben eher „außen“ liegen und daher Antikörpern leichten Zugang ermöglichen.

Beide abgebildeten Peptid-Epitope (3 und 6) liegen größtenteils im positiven Bereich und sind daher zumindest theoretisch für Antikörper gut zugänglich. Ebenso wie für P3 und P6 erfolgte die Berechnung der Antigenität der anderen, hier nicht dargestellten Peptid-Epitope. Aufgrund der Ergebnisse des Antigenitätsplots wurden die Epitopsequenzen an beiden Enden teilweise um 1-5 Aminosäuren verkürzt oder verlängert, wenn die theoretische Gesamtantigenität des Epitopes damit erhöht werden konnte. Eine derartige Erweiterung des Peptid-Epitops 5 im vorderen Bereich führte zu einer deutlichen Überlappung mit dem kurz davor liegenden Peptid-Epitop 3, so dass sich beide eine Anzahl von neun Aminosäuren teilen. Die entgültigen Sequenzen der sechs Epitope, die anschließend als Peptide synthetisiert wurden, sind in Abb. 7 dargestellt.



- +/- keine Immunreaktion (weißer Spot)
- + schwache Immunreaktion (hellgrauer Spot)
- ++ moderate Immunreaktion (dunkelgrauer Spot)
- +++ starke Immunreaktion (schwarzer Spot)

Abb. 5 Charakterisierung der Stärke der Immunreaktion der überlappenden Peptidsequenzen der Epitope 3 und 6. Die Länge der Balken steht in Relation zur Farbintensität der einzelnen Spots auf der Epitop-Mapping-Membran.

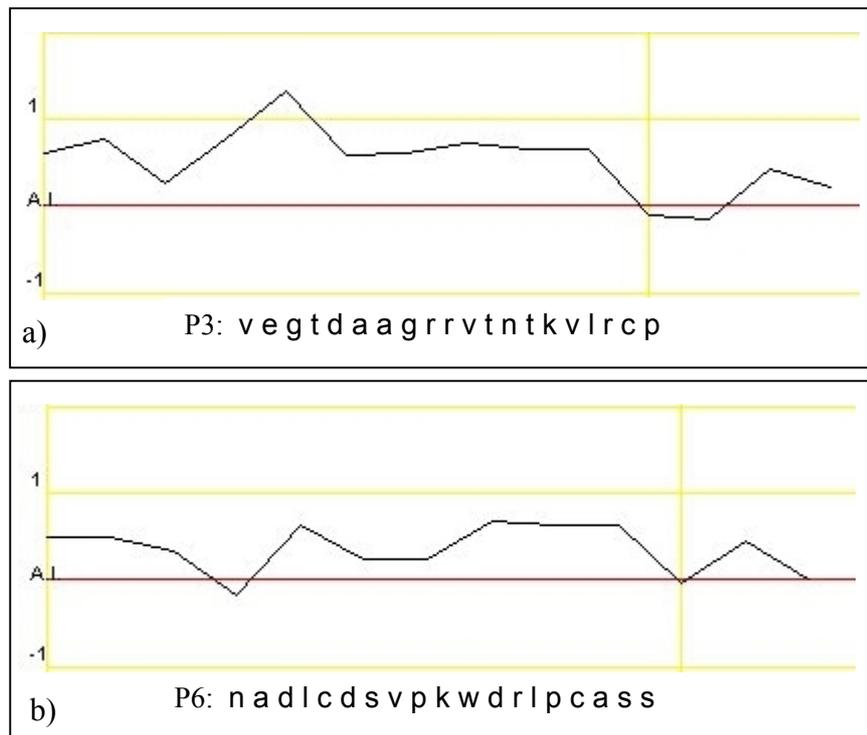


Abb. 6 Darstellung des Antigenitätsindex für die Aminosäuresequenz der Peptide P3 (a) und P6 (b). Je höher der Index liegt, desto wahrscheinlicher ist die Erkennung des Bereichs durch potentielle Antikörper.



Abb. 7 Lage der entgültigen (modifizierten) Peptidsequenzen auf der Gesamtsequenz des fZPB2. Die überlappenden Peptide 3 und 5 teilen sich die grün markierten Aminosäuren.

4.2 Reaktivität zwischen den aus den detektierten Epitopen synthetisierten Peptiden und dem Anti-fZP Antiserum

Im Gegensatz zur linearen Struktur der Aminosäuren auf den Peptidspots (Pepspots) der Epitop-Mapping-Membran, kann es durch Lösung der synthetischen Peptide in Puffer zu einer Konformationsänderung kommen, die die ursprünglich vorhandene Reaktion mit dem detektierenden Antiserum beeinträchtigt. Da diese Peptide jedoch später als Hauptbestandteil eines kontrazeptiven Vakzins fungieren sollten, musste zunächst sicher gestellt werden, dass auch gelöste Peptide für eine Immunreaktionen frei zugänglich bleiben.

Der Test erfolgte, wie in Kap. 3 beschrieben, mittels zweier verschiedener Verfahren, dem Dot Immunoassay und dem ELISA. Für beide Methoden wurden die Peptide zunächst gelöst und aus der Lösung anschließend wieder an eine Matrix (Zellulosemembran bzw. Mikrotiterplatte) gebunden.

Das Kaninchen Anti-fZP Antiserum detektierte im Dot Immunoassay nur die Peptide P3 und P6, wohingegen im ELISA zusätzlich eine Reaktion des besagten Antiserums mit P2, P4 und P5 nachgewiesen werden konnte. Eine Aussage über P1 zu treffen war nicht möglich, da sich eine Reaktion zwar andeutete, dieses Peptid in wässrigen Lösungen jedoch kaum löslich war. Die starke Reaktion in beiden Testsystemen von Peptid P3 und P6 mit dem Anti-fZP Antiserum bestätigte die theoretischen Berechnungen der Zugänglichkeit für Antikörper des Antigenitätsplots. Aufgrund dieser Ergebnisse beschränkten sich die Folgeversuche nur noch auf die Verwendung von P3 und P6.

Tab. 6 Aminosäurepositionen der sechs synthetischen Peptide in der ZPB2 Gesamtsequenz, basierend auf den identifizierten Epitopen und Reaktivität zum Anti-fZP Antiserum in Dot Immunoassay und ELISA.

Peptid	Aminosäuren der ZPB2	Reaktivität zum Anti-fZP Antiserum	
		Dot Blot	ELISA *
P1	314-338	?	?
P2	373-385	-	+
P3	130-149	+	++
P4	249-269	-	++
P5	141-159	-	++
P6	175-193	++	+++

* Die Ergebnisse des ELISA wurden als Differenz zwischen der optischen Dichte (OD) des gebundenen Antiserums (Verdünnung 1:1000) und den Werten der nichtspezifischen Bindung (NSB) quantifiziert.

? nicht auswertbar

- keine Reaktion (kein Spot); Differenz zwischen OD und NSB beträgt $< 0,1$

+ schwache Reaktion (hellgrauer Spot); Differenz zwischen OD und NSB beträgt $0,1 - 0,3$

++ moderate Reaktion (dunkelgrauer Spot); Differenz zwischen OD und NSB beträgt $0,3 - 0,6$

+++ starke Reaktion (schwarzer Spot); Differenz zwischen OD und NSB beträgt $> 0,6$

4.3 Nachweis generierter Anti-Peptid Antiseren in den Seren Peptid-immunisierter Ratten (Dot Immunoassay) und Titerbestimmung (ELISA)

Nach der Gewinnung der Seren peptid-immunisierter Ratten gelang der Nachweis von Peptid-Antikörpern im Dot Immunoassay (Abb. 8) für P3 verlässlich, P6 dagegen konnte nicht nachgewiesen werden. Ein starke Reaktion mit BSA im Dot Immunoassay deutet auf einen hohen Serumtiter gegen das verwendete Carrierprotein hin.

Trotz bis zu siebenmaligen Boosterimmunisierungen zeigten die ELISA Testergebnisse zur Serumtiterbestimmung starke Schwankungen und waren nicht zuverlässig reproduzierbar. Insbesondere die hohen NSB-Werte (nichtspezifische Bindung) waren störend und ließen sich auch durch Modifikation der Blockierung nicht beseitigen. Der Titer kann für beide Anti-Peptid Antiseren mit maximal 1:5000 angegeben werden, für P6 liegt er wahrscheinlich noch deutlich darunter.

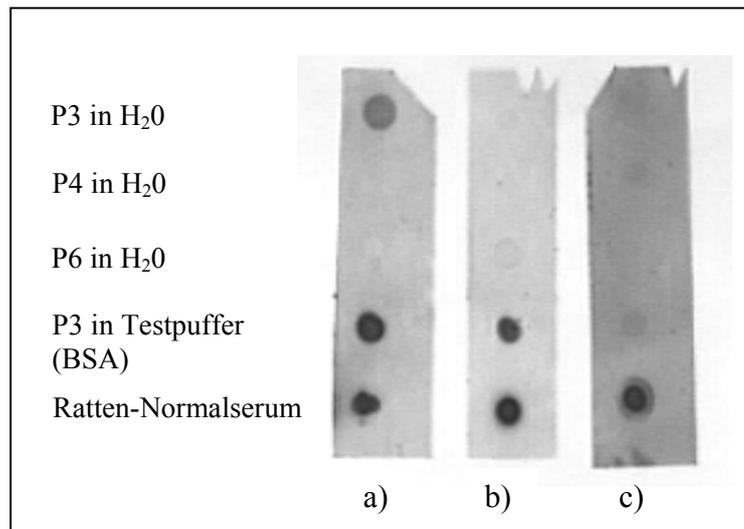


Abb. 8 Detektion von Anti-Peptid Antikörpern im Serum immunisierter Ratten mittels Dot Immunoassay. Auf jedem Streifen sind die reinen Peptide P3, P4 (Negativkontrolle) und P6 aufgetragen, sowie P3 in einem BSA-haltigen Puffer und Rattennormalserum als Positivkontrolle für die Wirksamkeit des sekundären Antikörpers (POD markiertes Kaninchen Anti-Ratten IgG). Die Reaktion auf BSA gibt einen Hinweis auf die Stärke der Immunantwort gegen das Carriermolekül. Als primärer Antikörper diente in Streifen a) Anti-P3 Antiserum, in Streifen b) Anti-P6 Antiserum und in Streifen c) als Negativkontrolle Rattennormalserum

4.4 Spermienbindungstest und *in vitro* Befruchtung in Anwesenheit der Peptide 3 und 6 bzw. ihrer Anti-Peptid Antiseren

Die Reifungsrate der ovariellen Eizellen, gemessen am Eintritt in die Meiose, betrug 77,3% (426 von 551 kultivierten COC). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den Reifungsraten zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen festgestellt werden. Eine Befruchtung erfolgte bei 85 von 173 gereiften Eizellen (49,1%) der Kontrollgruppe. Befruchtungskriterien waren das Formieren von Vorkernen bzw. embryonale Zellteilungen (Abb. 9).

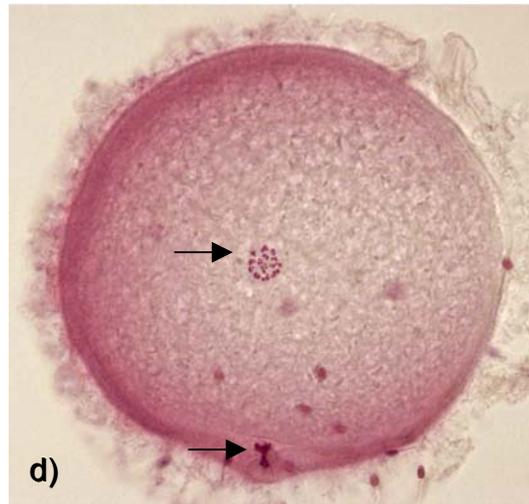
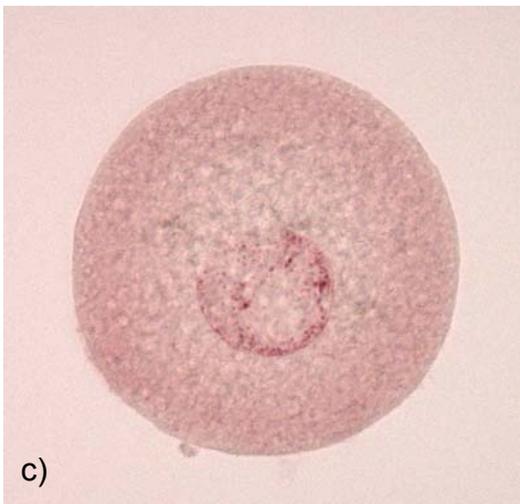
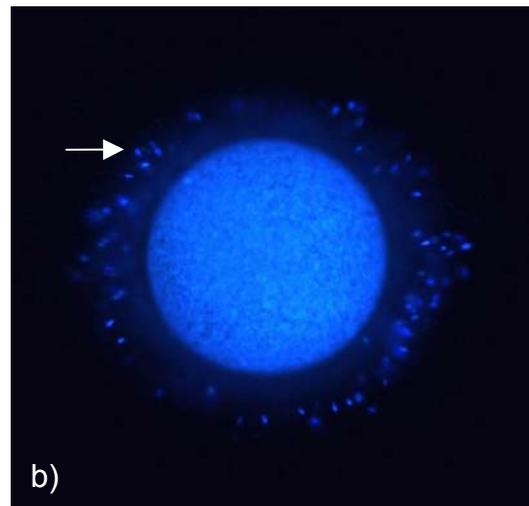
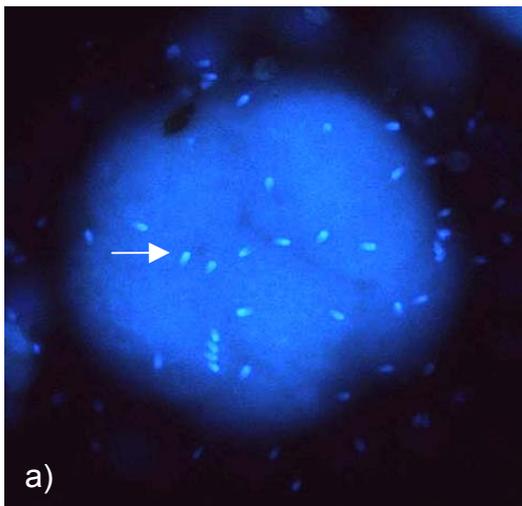
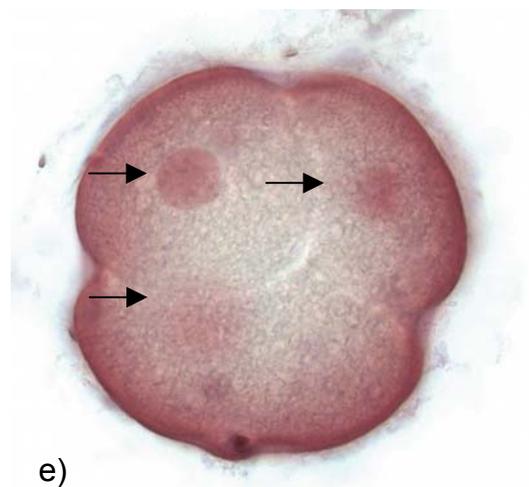


Abb. 9 a-e) Beurteilung der Spermienbindung, Kernstruktur und Zellteilung an gefärbten Oozyten/ Embryonen: a-b Hoechst Fluoreszenzfärbung, Spermien erscheinen als helle Spots a) Mehrzellstadium b) Einzellstadium. c-e Orceinfärbung, c) ungerifte Oozyte mit zentral gelegenem Germinalvesikel, d) gereifte Oozyte im Metaphase II Stadium mit Polkörper am unteren Rand, e) Vierzellstadium mit drei sichtbaren Kernen



4.4.1 Experiment 1: Testung des kontrazeptiven Einflusses der Peptide P3 und P6 auf Spermienbindung und Befruchtung

Die Vorinkubation von Spermien mit den Peptiden P3 und P6 und nachfolgende Koinkubation mit den COC erbrachte keinen signifikanten Einfluß auf die Anzahl gebundener Spermien. Dieses galt sowohl für die Versuche mit gereiften COC als auch mit nackten Eizellen ohne Cumulus. Die durchschnittliche Anzahl gebundener Spermien in der Gruppe der gereiften COC betrug $22,3 \pm 3,7$ für den Kontrollversuch und $25,5 \pm 5,8$ bzw. $20,7 \pm 4,0$ in Anwesenheit von P3 and P6. An die nackten Eizellen banden durchschnittlich $30,9 \pm 5,3$ Spermien für den Kontrollversuch, $25,7 \pm 1,1$ Spermien in Anwesenheit von P3 und $30,7 \pm 1,2$ in Anwesenheit von P6 (Tab. 7). Ebenfalls waren keine signifikanten Unterschiede in den Fertilisationsraten gereifter Eizellen feststellbar, wenn die Spermien mit den Peptiden vorinkubiert wurden: 49,4% in der Kontrolle, gegenüber 43,4% bzw. 57,6% für Versuche mit Peptid P3 und P6 (Tab. 8).

Tab. 7 Bindung vorinkubierter frischer Nebenhodenspermien an die feline Zona pellucida *in vitro* gereifter bzw. ungereifter (nackter) Oozyten. Die Vorinkubation erfolgte entweder mit 1 µg/ml Peptid P3 oder P6 für 1 h bei 39°C.

(n Experimente)	Vorinkubation	Spermien/Oozyte	% Inhibierung
Gereifte Oozyten (7)	Kontrolle (n = 97)	$22,3 \pm 3,7$	-
	P3 (n = 96)	$25,5 \pm 5,8$	$-14,1 \pm 14,6^*$
	P6 (n = 98)	$20,7 \pm 4,0$	$7,4 \pm 8,6^*$
Nackte Oozyten (7)	Kontrolle (n = 86)	$30,9 \pm 5,3$	-
	P3 (n = 81)	$25,7 \pm 1,1$	$16,9 \pm 4,2^*$
	P6 (n = 82)	$30,7 \pm 1,2$	$0,7 \pm 1,6^*$

* Keine signifikante Differenz zur Kontrolle

Tab. 8 *In vitro* Fertilisation von Katzenoozyten mit frischen Nebenhodenspermien, welche mit entweder 1 µg/ml Peptid P3 oder P6 für 1 h vorinkubiert wurden.

Vorinkubation (n Oozyten)	Reifungsrate (n Oozyten)	Befruchtungsrate (n Oozyten)	% Inhibierung
Kontrolle (97)	79,4% (77)	49,4% (38)	-
P3 (96)	79,2% (76)	43,4% (33)	12,1*
P6 (98)	67,3% (66)	57,6% (38)	-*

* Keine signifikante Differenz zur Kontrolle

4.4.2 Experiment 2: Testung des kontrazeptiven Einflusses der Ratten Anti-Peptid Antiseren auf Spermienbindung und Befruchtung

Die Anwesenheit des Ratten Anti-P3 Antiserums während der Koinkubation von Spermien und COC führte zu einer signifikanten Reduktion gebundener Spermien im Vergleich zur Kontrollgruppe (Spermien/Eizelle in Anwesenheit des Anti-P3 Antiserum: $5,0 \pm 2,0$; Spermien/Eizelle in Anwesenheit von Rattennormalserum (Kontrollgruppe): $14,6 \pm 3,4$; $p < 0,05$). Dies ergab eine Inhibierung der Spermienbindung von $65,8 \pm 13,8\%$ ($p = 0,0159$). Im Vergleich zur Kontrolle deutete sich ein ähnlich inhibierender Effekt in Versuchen mit nackten Eizellen an. Die Reduktion gebundener Spermien um $46,2\%$ war jedoch nicht signifikant (Tab. 9). Der inhibitorische Effekt des Anti-P3 Antiserums setzte sich in der Befruchtungsrate fort. Im Vergleich zur Kontrolle ($69,6\%$) lag die Befruchtungsrate, bezogen auf die Anzahl gereifter Eizellen, in Anwesenheit des Anti-P3 Antiserums bei $40,7\%$ ($p = 0,0073$).

In Anwesenheit des Anti-P6 Antiserums konnte kein signifikant hemmender Einfluss festgestellt werden. Dies betraf sowohl die Spermienbindungsrate an gereiften Eizellen (Spermien/Eizelle in Anwesenheit des Anti-P6 Antiserums: $13,7 \pm 8,3$; Spermien/Eizelle in Anwesenheit von Rattennormalserum (Kontrollgruppe): $12,9 \pm 5,9$) als auch die Befruchtungsrate ($52,8\%$ im Vergleich zu $39,1\%$ in der Kontrolle). Die Anzahl gebundener Spermien an nackten Eizellen in Anwesenheit des Anti-P6 Antiserums ($6,6 \pm 1,7$) differierte ebenfalls nicht signifikant von der Kontrolle ($9,4 \pm 4,1$) (Tab. 9).

Tab. 9 Bindung frischer bzw. kryokonservierter Spermien an die feline Zona pellucida *in vitro* gereifter und ungereifter (nackter) Oozyten in Anwesenheit von jeweils 10%igem Rattennormalserum (Kontrolle) bzw. Ratten Anti-P3 Antiserum oder Ratten Anti-P6 Antiserum.

(n Experimente)	Koinkubation (n Oozyten)	Spermien/ Oozyte	% Inhibierung
Gereifte Oozyten (5)	Kontrollserum (96)	14,6 ± 3,4	-
	Anti-P3 Antiserum (94)	5,0 ± 2,0	65,8 ± 13,8 ^a
Nackte Oozyten (4)	Kontrollserum (140)	22,5 ± 7,5	
	Anti-P3 Antiserum (137)	12,1 ± 5,1	46,2 ± 25,7
Gereifte Oozyten (6)	Kontrollserum (85)	12,9 ± 5,9	
	Anti-P6 Antiserum (84)	13,7 ± 8,3	-6,0 ± 65,6
Nackte Oozyten (5)	Kontrollserum (217)	9,4 ± 4,1	
	Anti-P6 Antiserum (208)	6,6 ± 1,7	30,4 ± 130,0

^a Der hochgestellte Index markiert die signifikante Differenz zur Kontrolle mit $p = 0,0159$

Tab. 10 *In vitro* Fertilisation von Katzenoozyten und frischen bzw. kryokonservierten Spermien in Anwesenheit von jeweils 10% der folgenden Antiseren: Rattennormalserum (Kontrolle), Ratten Anti-P3 Antiserum oder Ratten Anti-P6 Antiserum. Die Befruchtungsrate bezieht sich auf die Anzahl gereifter Oozyten.

Koinkubation (n Oozyten)	Reifungsrate (n Oozyten)	Befruchtungsrate (n Oozyten)	% Inhibierung
Kontrolle (65)	70,8% (46)	69,6% (32)	-
Anti-P3 Antiserum (65)	83,1% (54)	40,7% (22)	41,5 ^a
Kontrolle (85)	75,3% (64)	39,1% (25)	-
Anti-P6 Antiserum (84)	85,7% (72)	52,8% (38)	-

^a Der hochgestellte Index markiert die signifikante Differenz zur Kontrolle (Chi-Quadrat = 7,189) mit $p = 0,0073$

4.5 Nachweis und Titerbestimmung generierter Anti-Peptid-Antiseren aus immunisierten Katzen mittels Dot Immunoassay und ELISA

Der ELISA ist die klassische und häufigst genutzte Methode der Titerbestimmung. Da die Etablierung zuverlässiger und reproduzierbarer ELISA für die Bestimmung der Titer der Ratten Anti-Peptid Antiseren sich bereits als schwierig erwies, wurde in diesem Fall zunächst der Dot Immunoassay zur laufenden Titerbestimmung herangezogen und nachfolgend durch die Entwicklung eines funktionstüchtigen ELISA ergänzt. Ein Vergleich der Maximaltiter, gemessen mit beiden Methoden, ist in Tab. 13 dargestellt.

4.5.1 Titerbestimmung generierter Katzen Anti-Peptid Antiseren mittels Dot Immunoassay

Die Resultate des Dot Immunoassays sind in Tab. 11 dargestellt. Abb. 10 demonstriert am Beispiel der Katze 4 die Titerbestimmung in den verschiedenen Seren. Zur besseren Vergleichbarkeit beziehen sich die aufgeführten Serumverdünnungen in Tab. 11 auf die Peptidkonzentration von 25 µg/ml. Mit steigender Peptidkonzentration war häufig auch noch die nächst höhere Verdünnungsstufe detektierbar. Aus der Gruppe der Katzen, die gegen P3 immunisiert wurden (Katze 1-3), erreichte Katze 3 den höchsten Antikörpertiter mit 1:20.000, Katze 1 folgte mit 1:5000, für Katze 2 war kein Antikörper nachweisbar. Von den Katzen die gegen P6 immunisiert wurden (Katze 4-6), konnten für Katze 5 und 6 je Antikörper mit einem Titer von 1:20.000, für Katze 4 mit einem Titer von 1:80.000 nachgewiesen werden. Für die Katzen 7-9, die eine Kombination aus P3 und P6 erhielten, ließen sich mittels Dot Immunoassay keine Antikörper im Serum nachweisen. Alle Tiere, für die ein Antikörpertiter im Verlauf der Bestimmungen nachgewiesen werden konnte, zeigten diese spätestens nach acht Wochen. Ebenso war die Immunantwort ohne Boosterung bis zum Ende der Versuche mit der 7. Blutentnahme noch nachweisbar. Einzige Ausnahme war die Katze 3, deren Antikörper erstmals nach 12 Wochen (Serum 4) auftraten und nur über einen Zeitraum von 8 Wochen nachweisbar blieben.

Tab. 11 Ergebnis der Titerbestimmung aus den Katzen Anti-Peptid Antiseren gemessen via Dot Immunoassay

Katze Nr. (Vakzin)	2. Serum	3. Serum	4. Serum	5. Serum	6. Serum	7. Serum
1 (P3)	5000	5000	5000	5000	5000	5000
2 (P3)	0	0	0	0	0	0
3 (P3)	0	0	20.000	0	20.000	0
4 (P6)	5000	80.000	80.000	80.000	80.000	80.000
5 (P6)	5000	20.000	20.000	20.000	5000	0
6 (P6)	20.000	20.000	20.000	80.000	80.000	80.000
7 (P3 + P6)	0	0	0	0	0	0
8 (P3 + P6)	0	0	0	0	0	0
9 (P3 + P6)	0	0	0	0	0	0

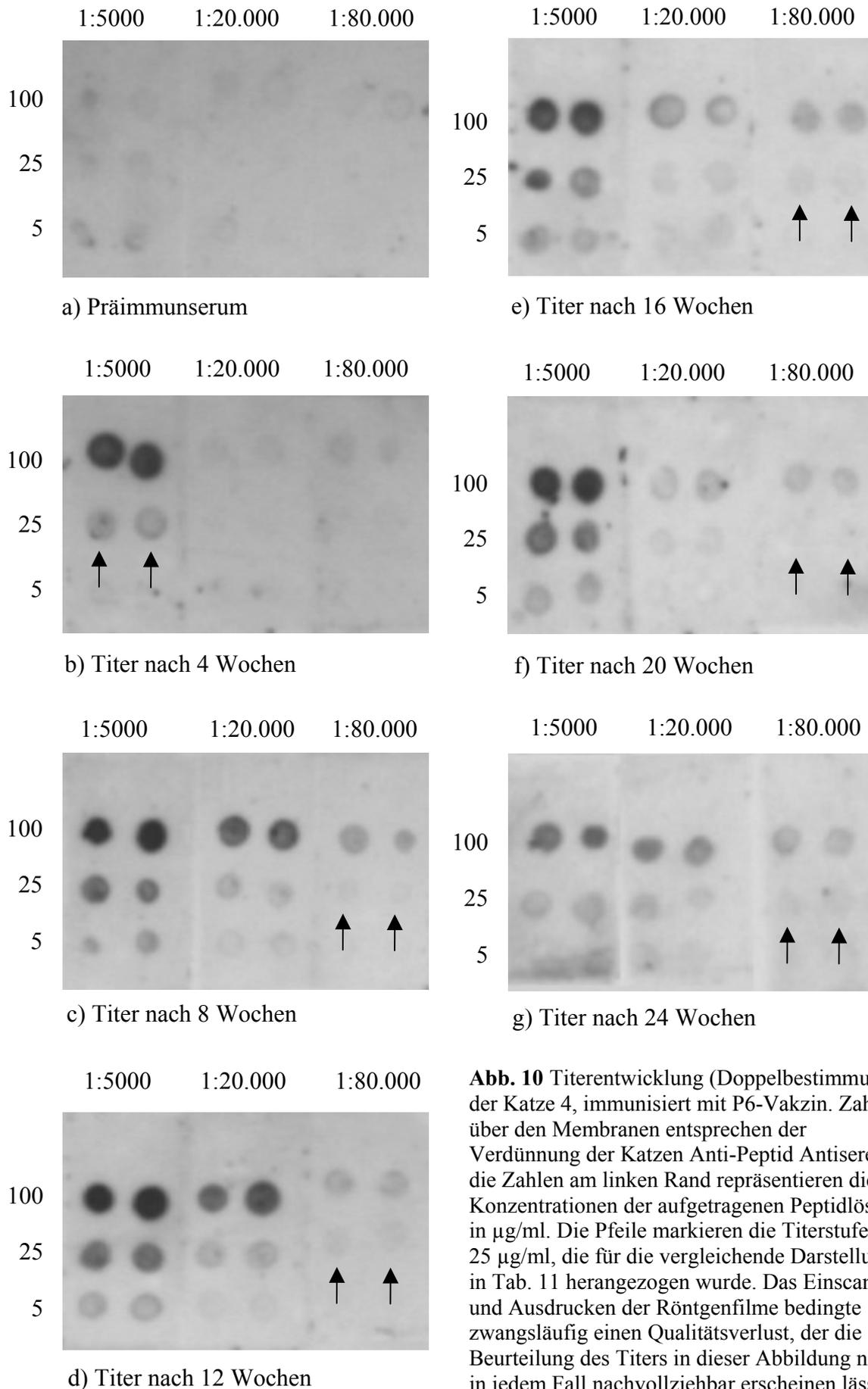


Abb. 10 Titerentwicklung (Doppelbestimmung) der Katze 4, immunisiert mit P6-Vakzin. Zahlen über den Membranen entsprechen der Verdünnung der Katzen Anti-Peptid Antiseren, die Zahlen am linken Rand repräsentieren die Konzentrationen der aufgetragenen Peptidlösung in µg/ml. Die Pfeile markieren die Titerstufe bei 25 µg/ml, die für die vergleichende Darstellung in Tab. 11 herangezogen wurde. Das Einscannen und Ausdrucken der Röntgenfilme bedingte zwangsläufig einen Qualitätsverlust, der die Beurteilung des Titers in dieser Abbildung nicht in jedem Fall nachvollziehbar erscheinen lässt.

4.5.2 Titerbestimmung generierter Katzen Anti-Peptid Antiseren mittels ELISA

In Tab. 12 ist die Titerentwicklung in den drei Vakzinierungsgruppen über den Versuchszeitraum von sieben Monaten, gemessen mittels ELISA, dargestellt. In der ersten mit P3 immunisierten Gruppe zeigte Katze 3 den konstantesten Anti-Peptid Antikörpertiter mit Werten zwischen 1:16.000 und 1:4000 ohne eindeutige Abfallstendenz bis zum Ende des Versuchs. Ebenfalls 1:16.000 erreichte Katze 1 in der dritten Blutentnahme (3. Serum), danach sank der Titer rasch unter 1:1000, stieg jedoch im letzten Serum wieder auf 1:2000 an. Im Gegensatz zum Dot Immunoassay konnte für Katze 2 ein, wenn auch äußerst geringer Antikörpertiter von 1:2000 ermittelt werden, der jedoch ab Serum 5 nicht mehr nachweisbar war. Die Gruppe der mit P6 immunisierten Katzen zeigte mit 1:32.000 die kräftigsten Titer, wobei der zeitliche Verlauf leicht differierte. Sowohl Katze 4 als auch Katze 6 begannen in Serum 2 mit dem Höchstititer von 1:32.000, welcher für Katze 4 auch noch eine Entnahme später detektierbar war. Zum 5. Serum sank der Titer auf 1:8000, bevor er in den letzten beiden Messungen wieder auf 1:16.000 anstieg. Das Absinken des Antikörpertiters der Katze 6 bis auf 1:2000 ereignete sich in Serum 3 und 4, danach lag er konstant bei 1:4000 ohne Abfallstendenz. Der anfängliche Titer der Katze 5 von 1:8000 sank in Serum 3 bereits auf 1:2000 und blieb danach bis zum Ende des Versuches bei unter 1:1000.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Dot Immunoassay konnten für alle drei Katzen der dritten Gruppe Anti-Peptid Antikörper nachgewiesen werden. Die mäßigen Anfangstitere (Serum 2) von 1:4000 bis 1:16.000, fielen im Verlauf der Untersuchung der Studie relativ stark ab. Sowohl Katze 7 als auch Katze 9 zeigten jedoch in der letzten Blutentnahme einen leichten Aufwärtstrend.

Anders als im Dot Immunoassay sind Anti-Peptid Antikörper bei allen Katzen bereits vier Wochen nach der Immunisierung messbar.

Tab. 12 Ergebnis der Titerbestimmung aus den Katzen Anti-Peptid Antiseren gemessen via ELISA

Katze Nr. (Vakzin)	2. Serum	3. Serum	4. Serum	5. Serum	6. Serum	7. Serum
1 (P3)	8000	16.000	4000	0	0	2000
2 (P3)	2000	2000	2000	0	0	0
3 (P3)	4000	16.000	16.000	4000	16.000	4000
4 (P6)	32.000	32.000	16.000	8000	16.000	16.000
5 (P6)	8000	2000	0	0	0	0
6 (P6)	32.000	8000	2000	4000	4000	4000
7 (P3 + P6)	16.000	8000	4000	4000	2000	2000
8 (P3 + P6)	4000	8000	0	0	2000	2000
9 (P3 + P6)	4000	2000	0	0	0	2000

Tab. 13 Vergleich der Maximaltiter der 9 immunisierten Katzen, ermittelt via Dot Immunoassay bzw. ELISA

Katze Nr.	Vakzin	Maximaltiter im Serum	
		Dot Blot	ELISA
1	P3	1:5000	1:16.000
2	P3	Nicht messbar	1:2000
3	P3	1:20.000	1:16.000
4	P6	1:80.000	1:32.000
5	P6	1:20.000	1:8000
6	P6	1:20.000	1:32.000
7	P3+6	Nicht messbar	1:16.000
8	P3+6	Nicht messbar	1:8000
9	P3+6	Nicht messbar	1:4000

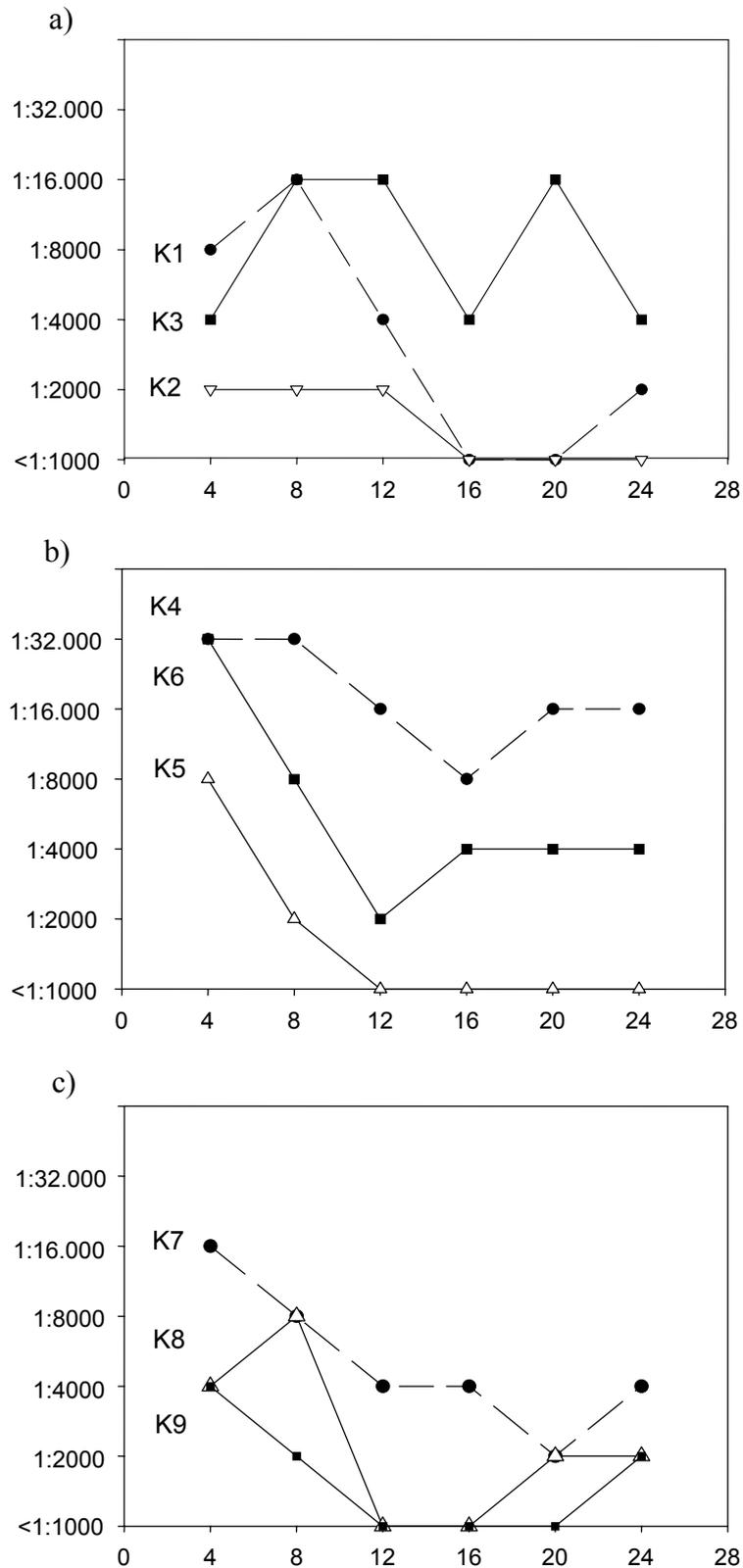


Abb. 11 Verlauf der Anti-Peptid Antikörpertiter der Katzen K1-K9 über 28 Wochen: a) K1-K3 immunisiert mit P3-Vakzin, b) K4-K6 immunisiert mit P6-Vakzin, c) K7-K9 mit P3+P6-Vakzin. Auf der X-Achse sind die Wochen nach Immunisierung aufgetragen, die Y-Achse gibt die Titerhöhe wieder.

4.6 Untersuchung der Ovarien und Uteri Peptid-immunisierter Katzen nach der Kastration

4.6.1 Visuelle Untersuchung der Ovarien

Katzen sind induzierte Ovulierer. Das bedeutet, dass der Vorgang der Ovulation erst durch die Verpaarung mit einem oder mehreren Katern ausgelöst wird. Wie in Tab. 14 zu sehen ist, wiesen die Ovarien aller kastrierten Katzen pro Ovar mindestens 2 Gelbkörper (*Corporae luteae*) auf. Damit ist eindeutig bewiesen, dass alle Tiere erfolgreich ovuliert haben müssen. Dies gilt ebenso für Katze 2, welche durch ein Versehen bereits drei Wochen zu früh Zugang zum Kater bekam. Die Trächtigkeit dieses Tieres war zum Kastrationstermin bereits soweit fortgeschritten, dass auf eine Kastration zunächst verzichtet wurde. Katze 2 trug vier Jungtiere aus und wurde anschließend kastriert.

4.6.2 Visuelle Untersuchung der Uteri

Neben Katze 2 konnten durch Untersuchung der Uteri noch zwei weitere Tiere als eindeutig trächtig identifiziert werden. Dies betraf Katze 1 und Katze 9 (Tab. 14).

Tab. 14 Ergebnisse visueller Untersuchung der Gonaden immunisierter und kastrierter Katzen

Katze Nr.	Vakzin	Corpora lutea		Uterus
		Ovar links	Ovar rechts	
1	P3	5	4	9 Embryonen
2	P3	Nicht kastriert		4 Welpen
3	P3	2	2	-
4	P6	2	2	-
5	P6	2	3	-
6	P6	4	4	-
7	P3 + P6	2	3	-
8	P3 + P6	2	3	-
9	P3 + P6	2	3	4 Embryonen

4.6.3 Histologische Untersuchung der Ovarien

Da alle Tiere erfolgreich ovulierten, nur wenige jedoch als einwandfrei trächtig zugeordnet werden konnten, verblieb die Möglichkeit einer sehr frühen, zeitlich noch vor der Implantation stehenden Trächtigkeit. Sowohl die Auswertung der Östradiol- und Progesteronwerte, als auch die Untersuchung der Struktur vorhandener Gelbkörper kann Aufschluß darüber geben, wieviel Zeit seit der ersten erfolgreichen Verpaarung bzw. der Ovulation verstrichen ist.

4.6.3.1 Bewertung der Struktur der Gelbkörper

Etwa 76 h nach der ersten Kopulation verändert sich die Form der Zellen eines Gelbkörpers von fusiformen hin zu polygonalen Zellen. Nach 100 h ist der Zeitpunkt erreicht, an dem beide Zellformtypen in etwa demselben Verhältnis vorkommen, nach 124 h ist der Vorgang abgeschlossen, es kommen nur noch polygonale Zellen vor (ROTH et al., 1995).

Fusiforme Zellen in Gelbkörpern lassen sich bei Katze 5 und Katze 8 finden (Abb. 12). Die Ovulation der beiden Katzen liegt damit höchstens 100 h zurück. Über eine mögliche Trächtigkeit kann daher bei diesen Tieren keine Aussage getroffen werden. Alle anderen Tiere wiesen Gelbkörper mit polygonaler Zellstruktur auf.

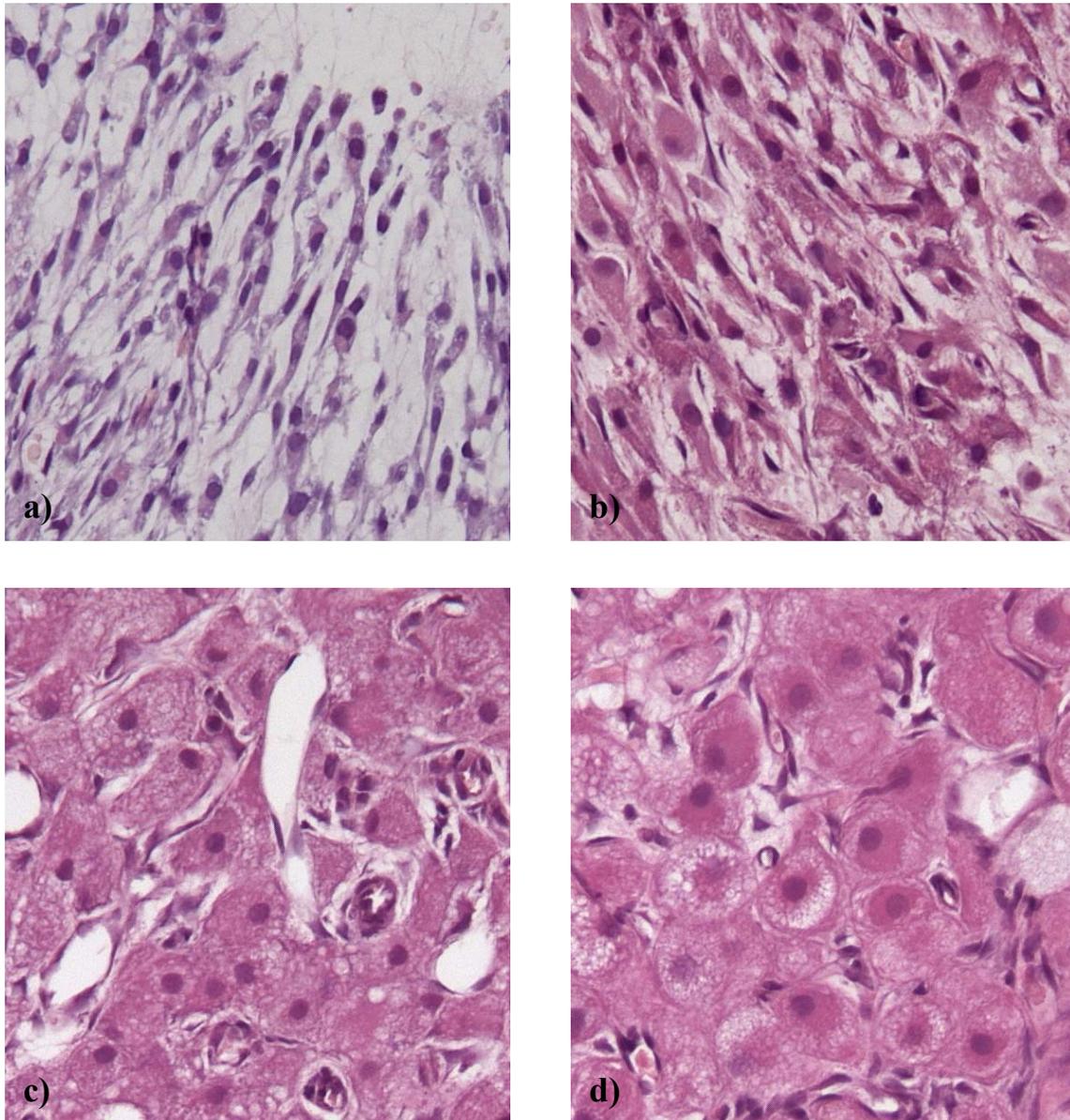


Abb. 12 Histologische Darstellung der Gelbkörperstruktur ausgewählter Katzen (200fache Vergrößerung): a) + b) fusiforme Zellen der Katzen 5 und 8, c) + d) polygonale Zellen der Katzen 4 und 9.

4.6.3.2 Untersuchung der Ovarien auf pathologische Veränderungen

Anhand der histologischen Schnitte der Ovarien ließen sich bei keinem der Tiere organpathologische Veränderungen feststellen. Häufig mit ZP Immunisierungen in Verbindung gebrachte Clusterbildung von Primordialfollikeln oder gehäuftes Vorkommen atretischer Sekundär- bzw. Tertiärfollikel (siehe Kap. 2.4.5) konnten ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

4.6.4 Histologische Untersuchung der Uteri

Die histologische Untersuchung der Uteri auf Implantationsstellen erbrachte für keines der Tiere weitere Anhaltspunkte für eine frühe Trächtigkeit. Ebenso konnten keine pathologischen Auffälligkeiten festgestellt werden.

4.7 Auswertung der Östradiol- und Progesteronwerte

4.7.1 Auswertung der Östradiolwerte

Nach Untersuchungen von SWANSON et al. (1995) sind erhöhte Östradiolwerte zum Ovulationszeitpunkt messbar und erreichen die Basislinie erst 124 h nach erfolgter Erstkopulation wieder. Ein erhöhter Östradiolwert lässt daher auf eine höchstens 124 h zurückliegende Ovulation schließen. Die Messung der Östradiolwerte erfolgte bei jeder Katze im Präimmunserum (1. Serum) und in der letzten Blutentnahme (Serum 7).

Alle Katzenserumproben der letzten Blutentnahme (Serum 7) wiesen äußerst niedrige Östradiolwerte zwischen 0,06 (Katze 9) und 0,13 ng/ml (Katze 4) auf und zeigen damit ein ganz ähnliches Niveau wie die Werte der 1. Seren von 0,01 (Katze 3) bis 0,09 ng/ml (Katze 1, 9) (Tab. 15).

4.7.2 Auswertung der Progesteronwerte

Die Progesteronwerte beginnen etwa 100 h nach erfolgter Kopulation deutlich anzusteigen (Abb. 13) und erreichen ihr Maximum erst nach dem Implantationszeitpunkt. Drei Katzen (Katze 1, 2 und 9) sind als trächtig identifiziert worden und wiesen Progesteronwerte von über 9 ng/ml auf. Zwei weitere Katzen (Katze 5 und 8) standen eindeutig vor dem Implantationszeitpunkt und zeigten Werte von 0,72 bzw. 4,01 ng/ml. Die Progesteronwerte der verbliebenen Tiere lagen bei 1,14 (Katze 3); 3,90 (Katze 7); 4,45 (Katze 4) und 7,47 ng/ml (Katze 6) (Tab. 15). Eine eindeutige Aussage darüber, ob diese Werte Anzeichen einer bestehenden Pseudogravidität waren, oder sich die Tiere ebenfalls noch vor der Implantationsphase befanden, kann nicht getroffen werden.

Tab. 15 Ergebnisse der Messung der Östradiol- und Progesteronwerte immunisierter Katzen aus dem Präimmuns serum (1. Serum) und der letzten Blutentnahme 6 Monate später (7. Serum)

Katze Nr.	Östradiol (ng/ml)	Östradiol (ng/ml)	Progesteron (ng/ml)	Progesteron (ng/ml)
	1. Serum	7. Serum	1. Serum	7. Serum
1	0,09	0,11	0,66	10,66
2	0,08	0,11	4,96	9,62
3	0,01	0,11	0,78	1,14
4	0,07	0,13	0,39	4,45
5	0,06	0,09	0,60	0,72
6	0,06	0,08	0,20	7,47
7	0,05	0,07	5,42	3,90
8	0,05	0,09	8,76	4,01
9	0,09	0,06	6,25	9,24

4.8 Zusammenfassung der Trächtigkeitsbefunde der immunisierten Katzen

Mit Sicherheit als trächtig konnten drei der neun Katzen identifiziert werden. Dazu gehörten Katze 1 und 2, die beide mit P3 immunisiert wurden, wobei Katze 2 einen sehr geringen Antikörpertiter entwickelte, der nur mittels ELISA nachgewiesen werden konnte. Ebenfalls trächtig war Katze 9, die mit der Kombination P3 + P6 immunisiert wurde und wie Katze 2 auch keine im Dot Blot messbaren Antikörper generierte. Zwei weitere Tiere (Katze 5, 8) standen eindeutig in der Zeitspanne der 12,5 Tage, die zwischen dem ersten Coitus und der Implantation liegen. Eine endgültige Diagnose konnte daher nicht getroffen werden. Die verbliebenen vier Katzen (Katze 3, 4, 6 und 7) wiesen keine Anzeichen einer Trächtigkeit auf. Die Progesteronwerte (mit Ausnahme derer von Katze 3) deuteten auf eine mögliche Pseudogravidität hin, dies gilt im besonderen Maße für Katze 6. Es kann jedoch auch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass sich diese Tiere noch in der präimplantativen Phase befunden haben.

Tab. 16 Trächtigkeitsbefund für die Katzen 1-9 anhand der Uterus- und Gelbkörperbefunde sowie der Östradiol- und Progesteronwerte.

Katze Nr. (Vakzin)	Progesteron (ng/ml)	Östradiol (ng/ml)	Uterus-befund	Alter der Gelbkörper	Trächtigkeits-befund
1 (P3)	10,66	0,11	9 Embryonen		trächtig
2 (P3)	9,62	0,11	4 Welpen		trächtig
3 (P3)	1,14	0,11	-		keine Indizien für Trächtigkeit
4 (P6)	4,45	0,13	-		keine Indizien für Trächtigkeit
5 (P6)	0,72	0,09	-	< 100 h	vor Implantation
6 (P6)	7,47	0,08	-		keine Indizien für Trächtigkeit
7 (P3 + P6)	3,90	0,07	-		keine Indizien für Trächtigkeit
8 (P3 + P6)	4,01	0,09	-	< 100 h	vor Implantation
9 (P3 + P6)	9,24	0,06	4 Embryonen		trächtig

5 DISKUSSION

5.1 „Vakzin-Design“: Vom Immunogen zum wirksamen Vakzin

5.1.1 Wahl des Ziel-Immunogens

Die vorliegende Studie konzentriert sich auf die Identifikation und Untersuchung des kontrazeptiven Potentials von Peptiden des feline ZPB2 Proteins (SPARGO & HOPE, 2003). Der Grund für die Fokussierung auf dieses ZPB2 Protein für die Immunokontrazeption der Katze liegt in der Tatsache, dass die Gene dieses Proteins im Verlauf der feline Follikulogenese als erstes exprimiert werden (JEWGENOW & FICKEL, 1999) und somit das Protein für einen potentiellen Angriff bereits im Primärfollikelstadium bereitsteht. Die Eliminierung früher Follikel kann zur rasch fortschreitenden Rekrutierung weiterer Primordialfollikel bis hin zur völligen Erschöpfung des Eizellpools führen und käme einer immunologischen Sterilisation gleich (Kap. 2.4.5). Darüber hinaus zeigen andere Studien, dass die Immunisierung mit ZPB2 zu Infertilität führen kann. MARTINEZ & HARRIS (2000) wendeten rekombinantes humanes ZPB2 erfolgreich für die Kontrazeption von Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) und Pavianen (*Papio cynocephalus*) an. GOVIND & GUPTA (2000) immunisierten ebenfalls erfolgreich Anubis-Paviane (*Papio anubis*) sowie indische Hutaffen (*Macaca radiata*) mit ZPB2 und erzeugten neben guten Antikörpertitern eine Infertilität, frei von Zyklusunregelmäßigkeiten.

Die erfolgreiche Anwendung synthetischer Peptide der Zona pellucida für die Immunokontrazeption wurde erstmals von MILLAR et al. (1989) in Mäusen demonstriert. Das 16 Aminosäuren umfassende murine ZPC Peptid beinhaltet jedoch ein T-Zell-Epitop, welches in dafür empfänglichen Mäusestämmen eine entzündliche Oophoritis induzieren kann, wie RHIM et al. (1992) nachwies. Aufgrund des kontrazeptiven Einflusses dieses Peptids beschränkten sich nachfolgende Studien anderer Autoren vornehmlich auf die eingehendere Untersuchung modifizierter Formen des besagten murinen ZPC Epitopes bzw. homologer Sequenzen anderer Spezies (LOU & TUNG, 1993; GUPTA et al., 1994; MAHI-BROWN & MORAN, 1995; MILLER et al., 1997; PATERSON et al., 1999).

Hauptgrund für die Fokussierung auf Peptide in der Immunokontrazeption ist neben den standardisierten Möglichkeiten der Synthese insbesondere die Hoffnung, die bei der Verwendung von ZP Proteinen auftretenden Nebenwirkungen vermeiden zu können. Die

nebenwirkungsfreie Applikation von ZP-Vakzinen erfordert nach Meinung vieler Forscher (EPIFANO & DEAN, 1994; TUNG et al., 1994; NAZ et al., 1995; MAHI-BROWN, 1996) die Trennung von B- und T-Zell-Epitopen, welches bei dem Einsatz von Peptiden gut realisierbar wäre.

Die in dieser Studie verwendeten Peptide sind von hochspezifischen Kaninchen Anti-fZP Antikörpern identifiziert worden (WEGNER, 2000) und daher mit einiger Sicherheit B-Zell-Epitope. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Sequenzen darüber hinaus auch T-Zell-Epitope beinhalten. Der Nachweis von T-Helfer-Zell-Epitopen kann z.B. durch Epitop-Mapping oder T-Zell-Proliferationstest erfolgen, lag jedoch nicht im zeitlichen Rahmen der vorliegenden Arbeit da derartige Methoden zunächst für die Zielspezies Katze etabliert werden müssten.

5.1.2 Identifikation antigener Determinanten

Für die Identifizierung antigener Determinanten eines Proteins stehen derzeit mehrere Methoden des Epitop-Mappings zur Verfügung. Am weitesten verbreitet ist die von PATERSON et al. (1999) durchgeführte Identifikation mittels ELISA-Technik. Ähnlich wie bei dem hier durchgeführten Epitop-Mapping, wurde zunächst ein spezifisches Antiserum, in diesem Falle gegen ZP3 des Weißbüscheläffchens (mstZP3) generiert. Anschließend wurde die gesamte Aminosäuresequenz der mstZP3 als 108 überlappende Peptide synthetisiert und letztere im ELISA auf Reaktion mit dem Antiserum überprüft.

Das in dieser Arbeit gewählte Epitop-Mapping auf der Basis der Spot-Synthese-Technik repräsentiert eine weitere Methode, Epitope zu screenen. Überlappende Peptide werden nicht im ELISA getestet, sondern nebeneinander auf eine Zellulosemembran synthetisiert und die Antigen-Antikörper-Reaktion mittels Western Blot Technik ausgewertet. Unter Verwendung eines hochspezifischen, gegen feline Zona pellucida Proteine gerichteten, Kaninchen Antiserums konnten so sechs immunogene Peptid-Epitope (P1-P6) auf der Aminosäuresequenz des feline ZPB2 Proteins identifiziert werden. Eines dieser Peptide (P6, AS 175-193) deckt sich in neun Aminosäuren (davon fünf identische) mit dem durch GOVIND et al. (2000) identifizierten B-Zell-Epitop (AS 136-147) des ZPB2 Proteins vom indischen Hutaffen (*Macaca radiata*). Monoklonale Antikörper gegen dieses Epitop zeigten sich *in vitro* in der Lage, die Spermienbindung an Eizellen signifikant zu inhibieren.

Die Tatsache, dass sich die Membran in unseren Untersuchungen nicht regenerieren lies, deutet auf eine sehr hohe Affinität zwischen dem Anti-fZP Antiserum und den detektierten Peptid-Epitopen hin. Anderenfalls hätte sich die Bindung durch Inkubation in den SDS-, mercaptoethanol- bzw. harnstoffhaltigen Lösungen der Regenerationsprotokolle des Herstellers lösen lassen müssen. Die Nichtregenerierbarkeit der Zellulosemembran war von großem Nachteil, da es nicht möglich war, die Methode durch Variation von Konzentrationen und Inkubationszeiten des primären sowie sekundären Antikörpers zu optimieren. Zur Verifizierung des Ergebnisses des ersten Epitop-Mappings musste somit eine zweite identische Membran beschafft werden. Jedoch führten die nicht ausreichend optimierten Versuchsbedingungen (das Epitop-Mapping konnte nur den Instruktionen des Herstellers folgend durchgeführt werden) zu etwas unterschiedlichen Detektionsbildern. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass herstellungsbedingte Schwankungen in der Menge aufgetragener Spots Detektionsunterschiede bedingen. Die übliche Menge Peptid pro Spot beträgt laut Hersteller 4-5 nmol. Von dem eigentlichen Vorteil des Epitop-Mappings via Spot-Synthese-Technik gegenüber der ELISA-Detektion – rasche Verifizierung der Ergebnisse auf der gleichen Membran – konnte somit nicht profitiert werden. Da die ELISA-Detektion von Epitopen im Rahmen dieser Arbeit nicht versucht worden ist, und die Affinität eines Antiserums zu bestimmten Epitopen im vorhinein kaum eruiert werden kann, ist eine abschließende Bewertung der Methoden für die Fragestellung dieser Arbeit kaum möglich.

5.1.3 Verifizierung antigener Determinanten

Die Analyse der Bindungsreaktion zwischen den auf der Basis der Epitope synthetisierten Peptiden und dem Anti-fZP Antiserum offenbarte trotz der hohen Affinität des Antiserums zu den membrangebundenen Peptid-Epitopen eine sehr differenzierte Reaktion mit den gelösten und wieder immobilisierten Peptiden. Bis zur Etablierung eines empfindlichen und funktionstüchtigen ELISA erfolgte der Test auf der Basis des Dot Immunoassays.

Im Gegensatz zum ELISA, bei dem mit Ausnahme des unlöslichen Peptides P1 alle Peptide durch das Anti-fZP Antiserum detektiert werden konnten, gelang der Nachweis im Dot Immunoassay nur für P3 und P6 (Tab. 6). Dieses Ergebnis rechtfertigte die alleinige Weiterverwendung von P3 und P6, wirft jedoch zwei Fragen auf:

- (1) Weshalb kann die Kreuzreaktion von P2, P4 und P5, obwohl im Epitop Mapping vorhanden, im Dot Blot nicht nachgewiesen werden?

(2) Welchen Ursachen liegen den Detektionsunterschieden zwischen Dot Immunoassay und ELISA zugrunde?

Zur Klärung der ersten Frage lassen sich mehrere Gründe anführen. Wir vermuten hinter diesem Phänomen methodisch bedingte Veränderungen der Antigenität der Peptidsequenzen durch

- a) Konformationsänderungen nach Lösung in wässriger Phase,
- b) Veränderung der zu synthetisierenden Aminosäuresequenzen aufgrund der Ergebnisse des Antigenitätsplots (Kap. 3.2.2) und/ oder
- c) Unterschiede in der tatsächlichen Linearität der zugrunde liegenden Epitope.

Im Unterschied zum Epitop-Mapping wurden die Peptide sowohl für die Anwendung im Dot Immunoassay, als auch im ELISA in Puffer gelöst, bevor das Verbringen auf die Membran bzw. auf die Mikrotiterplatte erfolgte. Offensichtlich spielt die Darreichungsform der Peptide für die Antikörperbindung eine entscheidende Rolle. Durch Lösung induzierte Konformationsänderungen (a) könnten eine Ursache für die Reduktion der Reaktivität einiger Peptide im Dot Immunoassay sein.

Weiterhin kann davon ausgegangen werden, dass die letztendlich synthetisierten Peptidsequenzen aus folgenden Gründen nicht vollständig mit den Sequenzen identisch waren (b), die im Epitop-Mapping reagierten: Die Reaktion eines Spots im Epitop-Mapping umfasst grundsätzlich 13 Aminosäuren, die jedoch nicht alle direkt Anteil an der Reaktion haben müssen. Wenn ein Folgepunkt ebenfalls reagiert, kann das ein Hinweis darauf sein, dass die drei Aminosäuren, die diesen vom vorigen Spot unterscheiden, für die Bindung des Antikörpers irrelevant sind. Über die anderen zehn Aminosäuren lässt sich so jedoch keine Aussage treffen. Um die definitive Beteiligung einzelner Aminosäuren an der Bindung nachzuweisen, hätte zusätzlich eine Analyse der Veränderlichkeit der Peptid-Epitope (SCHNEIDER-MERGENER et al., 1996) durchgeführt werden müssen. Dabei wird jede Aminosäure des detektierten Epitops nacheinander durch alle anderen existierenden Aminosäuren ersetzt und die Wiedererkennung durch den entsprechenden Antikörper geprüft. Die alleinige Fokussierung auf jene drei oder vier Aminosäuren, die die Bindung tatsächlich eingehen, erschien für den weiteren Verlauf der Untersuchungen jedoch weder relevant noch praktikabel. Von fundamentaler Bedeutung dagegen ist das Abdecken des reaktiven Bereiches. Ebenso essentiell für die Entwicklung eines Vakzins ist die Antigenität der Peptide. Basierend auf den Ergebnissen des Antigenitätstests nach HOPP & WOODS (1981) wurden die Peptidsequenzen daher zusätzlich modifiziert. Die, dem Test zugrundeliegende,

theoretische Berechnung der Hydrophilizität als charakteristische Eigenschaft für oberflächlich lokalisierte Sequenzen, ist immer noch Methode der Wahl um die Antigenität bzw. allgemein mögliche Interaktionsstellen auf einem Protein zu identifizieren.

Sowohl die Wirkung eines als auch die Überlagerung sämtlicher aufgezählter Faktoren kann nicht ausgeschlossen werden und sollte gleichermaßen die Ergebnisse des Tests auf Reaktivität zwischen Antikörpern und Peptiden in Dot Immunoassay und ELISA beeinflussen. Die Ursache für die Diskrepanz der Ergebnisse zwischen beiden Methoden sehen wir daher in der höheren Empfindlichkeit des ELISA gegenüber dem Dot Immunoassay (eingesetzte Antiserumverdünnungen im Dot Immunoassay 1:1000; im ELISA 1:2500 – 1:160.000). Mithilfe des ELISA ist es möglich auch geringfügigste Bindung zwischen Anti-fZP Antiserum und den Peptiden nachzuweisen.

Die Ergebnisse aus den Bestimmungen der Bindungsreaktion (Kap. 4.2) sowie die Notwendigkeit der Beschränkung auf zwei Peptide bedingten eine Fokussierung der folgenden Untersuchungen auf die Peptide P3 und P6.

5.1.4 Formulierung von Peptid-Vakzine – Wahl des Trägerproteins, der Kopplungsmethode und des Adjuvans

Im Zuge der Verwendung von Peptiden als funktionale Bestandteile eines Vakzins ergeben sich zwei wesentliche Herausforderungen. Dies betrifft einerseits das „Vakzin-Design“ verbunden mit einem praktikablen Impfreime für verwilderte Haustiere und Wildtiere, und andererseits die Etablierung einer stabilen Nachweismethode für die Wirksamkeit des Vakzins durch ein schnelles und effektives Titer-Monitoring.

Im Verlauf der Studie wurden zwei Varianten von Peptid-Vakzine entwickelt und verimpft. Die Untersuchung des immunogenen Potentials erfolgte durch Nachweis von Anti-Peptid Antikörpern bzw. Quantifizierung der Immunantwort durch Ermittlung des Antikörpertiters. Die zunächst für die Immunisierung von Ratten entwickelte Vakzin-Variante bestand aus drei Komponenten: Dem Peptid P3 bzw. P6 (1), welches durch Carbodiimid-Konjugation an das Carrierprotein BSA (2) konjugiert wurde und dem Freundschens Adjuvans (3) als Immunstimulans.

Trotz bis zu siebenmaliger Boosterung der Ratten gelang ein qualitativer Antikörpernachweis im Dot Immunoassay nur für das Anti-P3 Antiserum. Das Ergebnis wurde durch den ELISA

insofern bestätigt, als dass der Höchstwert des Antikörpertiters für P3 nur mit 1:5000 angegeben werden kann. Die Höhe des Anti-P6 Antikörpertiters konnte nicht einwandfrei reproduziert werden und lag mit unter 1:5000 unter einer stabilen Nachweisgrenze.

Es stellt sich die Frage, welche Bestandteile dieser Vakzin-Variante die Ursache für die mangelhafte Titerentwicklung waren. Die Komponente (3), das Freundschsche Adjuvans, kann mit einiger Sicherheit ausgeschlossen werden, da es als potentestes Immunstimulans überhaupt auch in Ratten Verwendung findet (VAN DER VEN, 2002). Die Peptide (1) selbst sind ohne Zweifel aufgrund ihrer niedrigen Molekulargewichte gering immunogen, jedoch als funktionaler Bestandteil des Vakzins nicht ersetzbar. Die kräftige Kreuzreaktion auf das konjugierte Carrierprotein BSA (2) im Dot Immunoassay deutet auf eine starke Immunantwort gegen das verimpfte Carrierprotein hin. Das lässt den Schluss zu, dass die Kopplung der Peptide an BSA mit Carbodiimid für eine schwache Immunantwort gegen die eigentlichen Peptide verantwortlich sein muss. Möglicherweise führte die Bindung über Carboxylgruppen zu einer Konformationsänderung oder gar zu einem Verdecken des Peptides, welche die notwendige Präsenz für die Immunzellen nicht gewährleistet. Zu ganz ähnlichen Resultaten kommt auch die Studie von MAHI-BROWN (1996), in der das Potential verschiedener Carrierproteine, so zum Beispiel BSA, Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), Ovalbumin, Tetanustoxoid und sogenannte MAPs (multiple antigen peptides), die eine Verknüpfung mehrerer Peptide untereinander darstellen, getestet wurde. Die Kopplung der Peptide an KLH erzeugte die höchsten Titer; die kräftige Immunantwort blieb bei Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) allerdings allein auf eine Generierung von Antikörpern gegen das Carrierprotein beschränkt. Neben KLH (MILLER et al., 1997; SHIGETA et al., 2000) wendeten andere Autoren mit einigem Erfolg auch Diphtherietoxoid an, um die Immunogenität von Peptiden zu steigern (KAUL et al., 1996; AFZALPURKAR et al., 1997; SHIGETA et al., 2000).

Basierend auf diesen Ergebnissen und den Erfahrungen mit der Vakzin-Variante für die Ratten wurde bei der Entwicklung eines Peptidvakzins für Katzen in der vorliegenden Studie versucht, die Konjugationsmethode durch die spezifischere Kopplung über Schwefel-Wasserstoff-Brücken zu optimieren (MBS- [m-Maleimido-benzoyl-N-hydroxysulfosuccinimidester] Methode). Auch das Carrierprotein wurde gegen das artfremdere und höhermolekulare ($4 \times 10^5 - 1,3 \times 10^7$ Da) KLH ausgetauscht. Darüber hinaus sind die KLH-konjugierten Peptide in multilamellare Liposomen eingeschleust worden. Die

somit erzielte zusätzliche Adjuvanswirkung erübrigte eine Boosterung (BROWN et al., 1997b).

Obwohl die beiden Vakzin-Varianten in zwei unterschiedlichen Spezies eingesetzt wurden, kann man von einer Verbesserung der immunogenen Wirkung sprechen. Die einmalige Verimpfung der einzelnen Peptidkonjugate (P3 oder P6) mit der neuen Formulierung führte in Katzen zu einer starken Immunantwort, gekennzeichnet durch den Nachweis von Antikörpern in hohen Serumverdünnungen (Dot Immunoassay 1:80.000, bzw. ELISA 1:32.000) und in Seren, die in einem zeitlichen Abstand von mehr als fünf Monaten zur Vakzinierung lagen (Katze 1, 4, 6 und 7). Die Ergebnisse unterstützen die Vorstellung, dass Liposomen eine langsame und kontinuierliche Freisetzung des Antigens und somit einen Effekt der Selbstboosterung bewirken. Positive Erfahrungen mit Liposomen in der Immunokontrazeption liegen auch von anderen Autoren vor, beschränken sich jedoch auf die Verwendung von pZP als kontrazeptives Antigen. GORMAN et al. (2002) immunisierten mit einem liposomenhaltigen pZP Vakzin. Unter gleichzeitiger Verwendung des Freundschens Adjuvans hielt sich die Antikörperkonzentration über 40 Wochen ohne eindeutige Abfalltendenz. Besonders beeindruckend sind die Ergebnisse von BROWN et al. (1997a). Eine einzelne Immunisierung mit einem ebenfalls auf porcinen Zona pellucida Proteinen basierenden Vakzin (integriert in Liposomen) reduzierte bei wilden Kegelrobben die Jungenproduktion um über 90%. Obwohl die Antikörpertiter verschiedener Tiere stark variierten, konnten sie in mehreren Fällen auch nach 5 Jahren noch ohne klares Absinken nachgewiesen werden.

Über die Ursachen der geringen Antikörperbildung in den Katzen, die in dieser Studie mit vernetzten Peptiden P3+P6 immunisiert wurden, lässt sich nur spekulieren. Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass die Konjugation zu Konformationsänderungen führte, die die natürliche Struktur der Epitope zu stark modifizierte bzw. für Immunzellen unzugänglich machte. Möglicherweise wäre eine spezifischere Konjugation über Zysteinreste für die Vernetzung der Peptide untereinander günstiger gewesen als die verwendete Carbodiimid-Methode, welche die endständigen Carboxylgruppen, sowie die Carboxylgruppen der Glutamin- und Asparaginsäure aktiviert.

BRIAND et al. (1985) konnten in ihrer Studie demonstrieren, dass viele Kopplungen eine äußerst geringe Zeitstabilität aufweisen, so dass bereits nach 14 Tagen Lagerung bei 4°C nur noch 50% oder weniger des Ausgangskonjugats vorhanden waren. Obwohl die 1985 getestete MBS- (m-Maleimido-benzoyl-N-hydroxysulfosuccinimidester) Methode (molares Verhältnis

von Protein zu Peptid: 1:14) sich mit ca. 75% Ausgangsmaterial nach 40 Tagen als relativ stabil erwies, bleibt unklar, ob sich die Konjugate bei dem von uns verwendeten Verhältnis von ca. 1:200 ebenso verhielten.

5.2 Austestung der immunogenen Aktivität eines Vakzins – Schwierigkeiten im Umgang mit Peptiden in Testsystemen zur Titerbestimmung

Wie bereits erwähnt, ist der ELISA die Methode der Wahl zur Bestimmung von Antikörperkonzentrationen in Blutseren. Der Vorteil des Dot Immunoassays dagegen liegt in dem raschen Nachweis einer Bindungsreaktion. Die Möglichkeiten der Quantifizierung sind jedoch eingeschränkt.

Nachfolgend soll vertieft werden, warum in der vorliegenden Arbeit beide Methoden häufig parallel angewandt wurden und weshalb darüber hinaus auch die Quantifizierung eines Antikörpernachweises mittels Dot Immunoassay entwickelt wurde.

Ein Problem bei der Titerbestimmung, insbesondere für die Ratten Anti-Peptid Antiseren, war die schlechte Reproduzierbarkeit der Werte gepaart mit wiederkehrenden hohen Werten der nichtspezifischen Bindung (NSB) im ELISA. In diesem Fall kommen vermutlich zwei ungünstige Gegebenheiten zusammen. Einerseits war es nicht möglich andere ELISA-Systeme zu etablieren, die auf Festphasen-adsorbierten Antikörpern („Sandwich“-System, kompetitiver Enzymimmunoassay) basieren. Die Peptide konnten weder mit Biotin noch mit POD unter Erhalt der Bindungsfähigkeit markiert werden und waren ebenfalls zu klein für einen zweiseitigen Angriff durch Antikörper (Ergebnisse nicht dargestellt). Die direkte Adsorption des Peptides an die Mikrotiterplatten war die einzig mögliche Variante.

Die variable Bindungskapazität der Peptide an die Mikrotiterplatte führt jedoch bekanntermaßen zu einer reduzierten Präzision der Ergebnisse (BRIAND et al., 1985; MEYER, 1989). Des Weiteren wurde eine starke Instabilität der Peptidbeschichtung beobachtet. Beschichtete Platten mussten in der Regel innerhalb von 7 Tagen verwendet werden, ein gradueller Verlust der Beschichtung über diesen Zeitraum hinaus war anhand sinkender Werte für die optische Dichte (OD) und schwankender NSB-Werte erkennbar.

Erschwerend kommt hinzu, dass Antiseren mit niedrigem Titer ($< 1:5000$) selbst zur Instabilität des ELISA beitragen (MEYER, mündl. Mitteilung). Um eine gewisse Sicherheit über das Vorhandensein von Anti-Peptid Antikörpern in den Rattenserum zu erlangen, wurde

daher neben dem ELISA ein Dot Immunoassay durchgeführt. Bei einer Verdünnung des Rattenserums von 1:400 konnten im Dot Blot Anti-P3 Antikörper, nicht jedoch Anti-P6 Antikörper nachgewiesen werden.

Die Reproduzierbarkeit der Titer für die Katzen Anti-Peptid Antiseren im ELISA stellte aufgrund der höheren Titer kaum ein Problem dar, schwankende Werte für die nichtspezifische Bindung waren jedoch auch in diesem Fall störend und stützen die Annahme einer instabilen Beschichtung. Aufgrund der Erfahrungen aus den Titermessungen der Ratten Anti-Peptid Antiseren, wurde bis zur Etablierung des ELISA bei den Katzen zunächst eine quantitative Schätzung mittels Dot Immunoassay vorgenommen. Im Dot Immunoassay ließen sich bei zwei der mit P6 immunisierten Katzen (Katze 4 und 6) Maximaltiter von 1:80.000 messen. Zwei weitere Katzen (Katze 3, P3 immunisiert; Katze 5, P6 immunisiert) generierten Antikörper mit einem Titer von 1:20.000. Für Katze 2 (P3 immunisiert) konnten im Dot Immunoassay keine Anti-Peptid Antikörper nachgewiesen werden. Das Gleiche galt für die gesamte Gruppe der Tiere, die mit einer Kombination aus P3 und P6 immunisiert wurden. Im Unterschied zum Dot Immunoassay konnten im ELISA bei ausnahmslos allen Katzen zumindest anfänglich Antikörper mit Titern von bis zu 1:32.000 (Katze 4 und 6) festgestellt werden. Damit wurde auch für die mit P3 + P6 immunisierten Katzen im Gegensatz zum Dot Blot eine Immunantwort nachgewiesen. Bei allen drei Tieren (Katze 7, 8 und 9) fällt er jedoch rasch ab. Die Detektionsunterschiede insbesondere in der letztgenannten Immunisierungsgruppe sprechen für eine höhere Sensitivität des ELISA gegenüber dem Dot Immunoassay. Erstaunlich und nicht erklärbar ist in diesem Zusammenhang das Ergebnis für die mit P6 immunisierte Katze 5. Die Antikörperantwort dieses Tieres konnte im Dot Immunoassay, nicht jedoch im ELISA über den gesamten Zeitraum nachgewiesen werden.

Alle genannten Ergebnisse sind auf eine Peptidmenge von 25 µg/ml bezogen. Bei veränderter Peptidkonzentration lassen sich tendenziell die gleichen Resultate beobachten - je geringer die Konzentration der aufgetragenen Peptide, desto höher die benötigte Antikörperkonzentration um eine Bindung nachzuweisen und umgekehrt. Dieser Zusammenhang verdeutlicht die Möglichkeiten einer Quantifizierung der Bindungsreaktion im Dot Immunoassay.

5.3 Bewertung der kontrazeptiven Aktivität eines Vakzins

Für die Bewertung der kontrazeptiven Aktivität eines Vakzins kommen mit *in vitro* bzw. *in vivo* Untersuchungen grundsätzlich zwei verschiedene Systeme in Frage. Im Verlauf der dreijährigen Studie konnte nur die *in vitro* Untersuchung umfassend durchgeführt werden und nahm einen beträchtlichen zeitlichen Anteil der Arbeit ein. Die Eruiierung des Infertilität induzierenden Potentials der untersuchten Peptid-Vakzine *in vivo* konnte im Rahmen dieser Arbeit nur ansatzweise erbracht werden - und muss daher zukünftig vertiefend erfolgen.

5.3.1 Die Bedeutung der Überprüfung des kontrazeptiven Potentials in einem *in vitro* System

Um die Relevanz der *in vitro* Versuche zu verdeutlichen, soll an dieser Stelle nochmals kurz auf die möglichen Wirkmechanismen eines auf ZP-Peptiden basierenden Vakzins eingegangen werden.

Immunisierungen mit ZP Peptiden kann die Fertilität durch verschiedene Mechanismen reduzieren (Kap. 2.4). Eine dieser Möglichkeiten ist die Besetzung des Spermienrezeptors auf der Zona pellucida mit Antikörpern. In diesem Falle wären die ZP Peptide mit dem Spermienrezeptor identisch und sollten an die Spermatozoen binden. Durch die Maskierung der Spermienmembran mit den Peptiden müsste sich die Befruchtungskapazität der Spermatozoen folglich verringern.

Da die Peptide P3 und P6 nach Vorinkubation mit Katzenspermien weder die Spermienbindung noch die Befruchtung von Katzeizellen *in vitro* reduzierten, erscheint es unwahrscheinlich, dass sie einen Spermienrezeptor der Zona pellucida repräsentieren. Andererseits herrscht über die Lage von Spermienrezeptoren auf der felines ZP noch völlige Ungewissheit und die erfolgreichen Kontrazeptionsversuche mit ZPB2 homologen Proteinen in Javaneraffen und Pavianen (MARTINEZ & HARRIS, 2000) deuten möglicherweise eine Lokalisation des Spermienrezeptors auf besagtem Protein an. Darüber hinaus ist P6 Bestandteil einer Kleeblattdomäne, über deren Rezeptorfunktion grundsätzlich spekuliert wird (BORK & SANDER, 1992).

Eine zweite Möglichkeit, die Fertilisationsrate zu reduzieren, liegt in der Bedeckung der Eizelloberfläche mit Antikörpern, die den Zugang der Spermien zur Zona pellucida derart sterisch behindern, dass sie die Eizelle nicht zu penetrieren vermögen (SACCO, 1981a). Der Nachweis dieser Reaktion gelingt durch die Inkubation von Eizellen mit den Anti-Peptid Antikörpern. Mit einem Titer von 1:5000 reduzierte das Anti-P3 Antiserum bei einer

Verdünnung von 1:10 die Anzahl der an die Katzenoozyte gebundenen Spermien im Vergleich zur Kontrolle um $65,8 \pm 13,8\%$. Ebenso war die Befruchtungsrate *in vitro* um 41,5% reduziert. Wir vermuten, dass die Reduktion der Spermienbindungs- bzw. Befruchtungsrate in Anwesenheit des Ratten Anti-P3 Antiserums auf eine sterische Behinderung der Spermien zurückzuführen ist.

Die Kapazität des Anti-P6 Antiserums konnte nicht nachgewiesen werden, da der Antikörpertiter von $< 1:5000$ vermutlich zu gering war, um eine kontrazeptive Wirkung zu erzielen.

Eine Infertilität infolge ZP-Applikation könnte auch durch die Induktion einer T-Zell vermittelten Autoimmunreaktion gegen das Ovargewebe (bzw. frühe Oozyten) eintreten (LOU et al., 1996). Dieser Mechanismus, der durch entzündliche Reaktionen und Veränderungen innerhalb des Ovargewebes gekennzeichnet ist, ist nicht durch die hier beschriebene *in vitro* Kultur von Katzenoozyten bestimmbar. Einen Hinweis auf T-Zell-Beteiligung könnte ein *in vitro* T-Zell-Proliferationstest infolge Peptidinkubation bringen, jedoch lässt dies nicht zwangsläufig den Schluss einer Autoimmunreaktion zu. Zudem müsste der Test zunächst für Katzen-Lymphozyten etabliert werden.

Die Anwendung von *in vitro* Spermienbindungs- und Befruchtungstest für die Untersuchung des antifertilen Potentials relevanter ZP-Vakzine sollte nicht unterschätzt werden, da im Vorfeld wichtige Aussagen auch ohne Tierversuch (Impfungen von Tieren) gemacht werden können. Die Interferenz von Substanzen (Antikörpern) mit Spermien und Eizellen während des Befruchtungsprozesses gibt wichtige Einblicke in die Mechanismen möglicher Kontrazeption. Zwei der drei beschriebenen Wirkmechanismen von ZP-Peptid-Vakzinen konnten durch derartige Versuche erfolgreich überprüft werden. Dem Tierschutzgedanken kommt die Methode insofern entgegen, als dass eine beträchtliche Anzahl von Versuchstieren eingespart werden kann, gleichwohl die *in vivo* Versuche nicht vollständig ersetzt werden können. Dies zeigt die Studie von PATERSON et al. (1999), nach der ein Anti-Peptid Antikörper die Spermienbindung *in vitro* um 60% zu reduzieren vermochte, *in vivo* jedoch keine zuverlässige Kontrazeption erreicht werden konnte.

Die Nachteile der *in vitro* Untersuchungen liegen in dem relativ hohen Zeitaufwand, dem begrenzten Zugang zu Probenmaterial (dies gilt allerdings nicht für Hauskatzen, da Katzenovarien und -hoden das gesamte Jahr über durch Kastration in Tierarztpraxen und Tierheimen anfallen) und in der beträchtlichen Variabilität der Ergebnisse. Ursachen für

letzteres sind jahreszeitlich bedingt, oder individuell bzw. altersbedingte Unterschiede des Hoden- und Ovarmaterials (FREISTEDT et al., 2001; SPINDLER & WILDT, 1999).

5.3.2 *In vivo* Erprobung der kontrazeptiven Effektivität der Peptid-Vakzine – Verpaarung von Katzen sechs Monate nach der Immunisierung

Die in den Hauskatzen mittels Peptidimmunisierung erzeugten relativ hohen Antikörpertiter (> 1:20.000) ebenso wie der Fakt, dass alle Katzen nach Abschluss der Versuche kastriert werden sollten, gab Anlass zu einem abschließenden Fertilitätstest mittels Verpaarung zur Überprüfung der kontrazeptiven Effektivität der P3-, P6- und P3+P6-Vakzine. Bedauerlicherweise ergaben sich aus den Haltungsbedingungen (Gruppenhaltung im Freigehege), welche dem Lebensraum verwilderter Katzen zumindest ähneln, Einschränkungen, die letztendlich die Aussagefähigkeit des Ansatzes herabsetzten.

So war die Anzahl der zur Verfügung stehenden Katzen von vornherein auf neun beschränkt. Aufgrund der Gehegestruktur und Haltungsform konnten weder Verpaarungen beobachtet, noch der Zykluszustand der Katzen während des laufenden Versuchs überprüft werden. Der Kater wurde daher drei Wochen vor dem Kastrationszeitpunkt zu den Katzen gelassen. Nachfolgende Hormonanalysen ebenso wie histologische Untersuchung der Ovarien konnten jedoch nur eingeschränkt den Kopulationszeitpunkt widerspiegeln und zur Differenzierung zwischen Konzeption und Kontrazeption beitragen.

Die visuellen Untersuchungen der Ovarien belegten eindeutig das Vorhandensein von mindestens vier Gelbkörpern pro Katze. Bei Katzen als induzierten Ovulierern kann die Anwesenheit von *Corporae luteae* auf dem Ovar als eindeutiges Indiz für eine Verpaarung gelten. Drei der Tiere (Katze 1, 2 und 9) waren zum Zeitpunkt der Kastration trächtig. Damit übereinstimmend liegen die Progesteronwerte dieser Tiere über 9 ng/ml (Katze 1: 10,66; Katze 2: 9,62; Katze 9: 9,24). Die anderen 6 Tiere zeigten keine Anzeichen einer postimplantativen Trächtigkeit, die Progesteronwerte dieser Tiere lagen mit 0,72 bis 7,47 ng/ml zumeist deutlich unter den Werten trächtiger Tiere.

Von dem erfolgten Coitus bis zur Implantation der Blastozyste vergehen bei Katzen 12,5 Tage (LEISER, 1979; 1982). Da für das Paarungsexperiment nur drei Wochen zur Verfügung standen und sicher nicht alle Katzen sofort in die Rolligkeit gekommen sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich einige Tiere noch im präimplantativen Stadium befanden, eine Phase, die von der Nichtträchtigkeit methodisch kaum zu unterscheiden ist. Anhaltspunkte

für eine frühe, präimplantative Trächtigkeit lassen sich nach ROTH et al. (1995) und SWANSON et al. (1995) durch Auswertung der Struktur der Gelbkörper und der Progesteron- und Östradiolwerte (Kap. 4.6; 4.7) gewinnen. Etwa 25-28 h (30-36 h, SWANSON et al., 1994) nach der ersten Verpaarung erfolgt bei der Katze die Ovulation (GREULICH, 1934; VERHAGE et al., 1976). Die Form der Zellen eines Gelbkörpers beginnt sich 76 h nach der Kopulation von fusiformen hin zu polygonalen Zellen zu verändern. Beide Zellformtypen kommen nach 100 h in etwa demselben Verhältnis vor, weitere 24 h später ist die Umwandlung weitgehend abgeschlossen, es kommen nur noch polygonale Zellen vor (ROTH et al., 1995). Fusiforme Zellen und damit eine Ovulation, die höchstens 4-5 Tage zurückliegt, deuten sich nach diesen Angaben bei zwei Katzen (Katze 5 und 8) an. Nicht in Einklang damit zu bringen sind die Östradiolwerte der beiden Tiere.

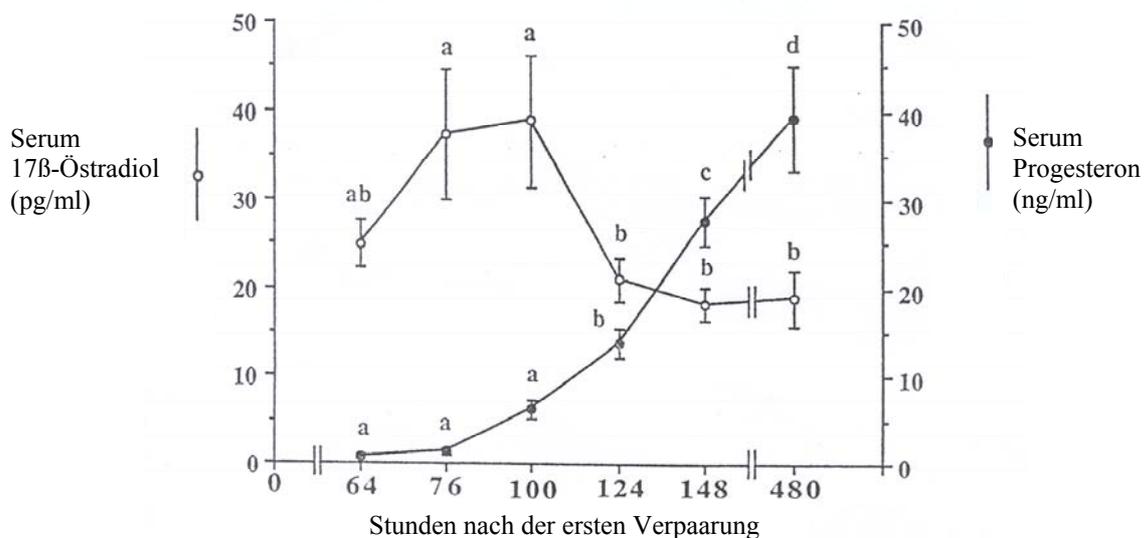


Abb. 13 Verlauf der durchschnittlichen (\pm SEM) Serum 17 β -Östradiol und Progesteron Konzentrationen bei Hauskatzen ($n = 47$) nach natürlicher Verpaarung und Ovulation. Werte die innerhalb eines Hormons signifikant differieren ($p < 0,05$) sind jeweils mit verschiedenen Buchstaben versehen (Übernommen aus SWANSON et al., 1995); aufgrund der verschiedenen Testsysteme sind die Werte nicht direkt auf die in dieser Studie gemessenen übertragbar. Ersichtlich wird jedoch die Gegenläufigkeit der Hormonwerte von Östradiol und Progesteron nach erfolgter Ovulation.

Wie aus der Abb. 13 nach SWANSON et al. (1995) ersichtlich wird, verhalten sich die Progesteron- und Östradiolwerte nach der Verpaarung zunächst gegenläufig. Etwa 100 h nach der Verpaarung beginnt der Östradiolspiegel drastisch abzufallen, wohingegen Progesteron

nach etwa 64 h zu steigen beginnt. Eine Katze, deren Gelbkörper fusiforme Zellen aufweist, müsste demnach über erhöhte Östradiolwerte verfügen. Entgegen den Untersuchungen SWANSONS ist dies jedoch weder bei Katze 5 noch bei Katze 8 der Fall. Mit Ausnahme der Östradiolwerte deuten neben der Gelbkörpermorphologie auch die Progesteronwerte (Katze 5: 0,72 ng/ml; Katze 8: 4,01 ng/ml) an, dass sich beide Katzen in einem Zeitraum von etwa 64-100 h nach Ovulation befinden könnten. Eine Aussage über eine mögliche Trächtigkeit ist daher nicht zu treffen. Warum sich das Zusammenspiel von Gelbkörpermorphologie, Progesteron- und Östrogenlevel nicht wie bei SWANSON et al. (1995) bzw. ROTH et al. (1995) darstellen, bleibt unklar. Es ist zu vermuten, dass der Östradiolspiegel zumindest in diesen Katzen zeitlich deutlich kürzer nach der Ovulation abfällt als nach den von den genannten Autoren angegebenen 124 h.

Die Progesteronwerte der verbliebenen Tiere könnten mit 3,90 ng/ml (Katze 7); 4,45 ng/ml (Katze 4) und 7,47 ng/ml (Katze 6) eine bestehende Pseudoträchtigkeit andeuten. Dies gilt insbesondere für Katze 6.

Die folgenden Aussagen über mögliche Zusammenhänge der Trächtigkeitsergebnisse und der ermittelten Antikörper-Titerhöhe beider Bestimmungsmethoden, können aufgrund der geringen Anzahl vakzinierter Katzen nur Spekulation sein. Da sie aber eventuell wichtige Hinweise bergen, soll an dieser Stelle nicht darauf verzichtet werden.

Ein sehr ermutigender Befund dieser *in vivo* Studie ist die Tatsache, dass Tiere die im Vergleich tendenziell hohe Titer entwickelten (Katze 4, 6, 3 und 7) keine Anzeichen einer bestehenden Trächtigkeit zeigten. Dagegen bildeten alle drei definitiv trächtigen Tiere (Katze 1, 2, 9) geringe Antikörpertiter aus - ein Zusammenhang zwischen geringer Titerhöhe und Trächtigkeit bzw. im Vergleich hoher Titer und Nichtträchtigkeit deutet sich somit an.

Als besonders vielversprechend kann in diesem Zusammenhang die Immunisierung mit dem P6-Vakzin angesehen werden. Dies gilt nicht nur, da in dieser Gruppe die stärksten Immunantworten produziert wurden, sondern vielmehr weil zwei von drei immunisierten Tieren keine Anzeichen einer Trächtigkeit aufwiesen. Darüber hinaus existiert im Gegensatz zu den beiden anderen Vakzinierungsgruppen kein definitiv trächtiges Tier.

5.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

5.4.1 Synthetische Peptide in der Immunkontrazeption

Die Inhibierung der Spermienbindung und Befruchtung *in vitro* durch Anti-P3 Antikörper zeigt, dass die untersuchten Peptide als Kontrazeptiva durchaus vielversprechend sein können, zumal das kontrazeptive Potential des Peptides 6 aufgrund des zu geringen Titers in Ratten möglicherweise noch nicht ausgeschöpft ist. Erste Hinweise aus der Immunisierung von Katzen deuten darauf hin, dass auch P6 bei entsprechenden Titern eine Inhibierung der Befruchtung bewirken könnte. Unter Einbeziehung der bereits in Kap. 2.5.2 beschriebenen Vorteile können synthetische Peptide als Basis für eine Immunkontrazeption empfohlen werden.

5.4.2 Formulierung der Vakzine für Hauskatzen („Vakzin-Design“)

Das Beispiel der Rattenimmunisierung, insbesondere mit Peptid P6, zeigt klar, welche essentielle Bedeutung dem „Vakzin-Design“ zukommt. Wir beurteilen das für diese Studie an Hauskatzen ausgewählte „Vakzin-Design“ als erfolgreich und können die Weiterverwendung in der Zukunft (eventuell mit leichter Modifikation) empfehlen.

Der Wechsel von der Carbodiimid- zur MBS-Konjugationsmethode für die Kopplung der Peptide an ein größeres Carrierprotein, sowie die Auswahl des KLH als Carrier, haben sich für die Immunisierung von Katzen als günstig erwiesen. Anlass für eine Modifikationen sehen wir gegebenenfalls in der möglichen endständigen Synthese eines Zysteinrests an die Peptide um einen noch freieren Zugang zum Zielantigen zu gewährleisten. Dies betrifft insbesondere P6, welches Zysteinreste an fünfter und sechzehnter Position trägt. Nichtsdestotrotz konnten auch ohne diese Veränderung in zwei der drei P6 immunisierten Katzen eine starke Immunantwort induziert werden. Der einzige Zysteinrest des P3 liegt an neunzehnter und damit vorletzter Stelle und bedarf vermutlich keiner Modifikation. Falls das Vakzin vor der Verimpfung länger bei 4°C gelagert wird, muss die Zeitstabilität der Kopplungsprodukte unbedingt überprüft werden. Wir gehen davon aus, dass der Zerfall der Konjugate bei der von uns praktizierten Lagerung von mindestens -20°C sehr gering sein dürfte.

Die zusätzliche Einschleusung der Konjugate in Liposomen stellt sich in dieser Studie als praktikabel und sehr anwendungsorientiert dar. Das angestrebte Ziel der

Immunokontrazeption für verwilderte Hauskatzen kann nur in der einmaligen Immunisierung ohne Boosterung bei voller Entfaltung der kontrazeptiven Wirkung liegen, da der regelmäßige Wiederfang der Tiere im Abstand weniger Wochen nicht zu gewährleisten ist. Dessen ungeachtet würde ein jährlich notwendiger, mehrfacher Wiederfang der Tiere keinen echten Fortschritt zur bisher praktizierten Methode des einmaligen Fangens, Kastrierens und Wiederaussetzens darstellen. Das Erreichen beständiger Titer über 28 Wochen bei einmaliger Immunisierung in einigen Katzen halten wir in diesem Zusammenhang für bemerkenswert. Neben den Liposomen hat möglicherweise auch das Freundschsche Adjuvans beträchtlichen Anteil an der dauerhaften Immunantwort. Darauf deutet der Vergleich zweier Adjuvantien (FCA und Alum) in den Immunisierungsstudien von GORMAN et al. (2002). Da die Anwendung von FCA aufgrund seiner Nebenwirkungen zu Recht umstritten ist, sollten alternative Adjuvantien in zukünftige „Vakzin-Designs“ einbezogen werden.

Noch nicht ausgeschöpft ist das Potential der kombinierten Verimpfung von Peptiden. Anhaltspunkte für kontrazeptive Effektivität durch Kombination von ZP-Peptiden lassen sich in der Literatur mehrfach finden. SIVAPURAPU et al. (2003) wählten je ein Epitop der ZPA, ZPB2 und ZPC Proteine des indischen Hutaffen (*Macaca radiata*) mit erwiesener kontrazeptiver Funktionalität und exprimierten ein Fusionsprotein in *Escherichia coli*. Antisera gegen das Fusionsprotein erkannten im Immunfluoreszenztest sowohl native Zona pellucida des Hutaffen als auch des Menschen. Darüber hinaus zeigten sie sich in der Lage, die Spermienbindung humaner Spermien in Hemizona-Versuchen zu inhibieren (eine isolierte Zona pellucida wird in zwei Hälften geteilt und je eine Hälfte anschließend für den Versuch bzw. die Kontrolle verwendet). AFZALPURKAR et al. (1997) erzeugten Antisera gegen verschiedene, mittels Glutaraldehyd-Methode an Diphtherietoxoid gekoppelte, ZP-Peptide. Keines dieser Antiseren wirkte allein kontrazeptiv *in vitro*, für einige Serenkombinationen dagegen wurde dieser Effekt nachgewiesen.

Die hier praktizierte Vernetzung der Peptide untereinander mittels Carbodiimid-Methode vor der Konjugation an KLH (via MBS-Methode) kann aufgrund der geringen Titerhöhe in allen drei immunisierten Tieren nicht empfohlen werden. Die einfachste Modifikation würde auch in diesem Fall den Wechsel der Konjugationsmethode für die Vernetzung der Peptide beinhalten. Möglich wäre jedoch auch ein völliger Verzicht auf die Vorabvernetzung. Die Peptide könnten stattdessen einzeln oder parallel mittels MBS-Kopplung direkt an KLH konjugiert werden.

5.4.3 Dot Immunoassay und ELISA als Titernachweissysteme

Neben dem „Vakzin-Design“ hat sich die Etablierung stabiler und empfindlicher Nachweissysteme (ELISA, Dot Immunoassay) zur Titerbestimmung als absolut essentiell herausgestellt. Die Stärke des Dot Immunoassays liegt in der raschen Nachweismöglichkeit eines im Serum vorhandenen Anti-Peptid Antikörpers. Eine quantitative Annäherung an die Beurteilung der Titerhöhe ist arbeitsintensiv, kann jedoch, wie in dieser Arbeit gezeigt, ebenfalls mit dem Dot Immunoassay gelingen. Die eigentliche Quantifizierung der Immunantwort obliegt dagegen wegen ihrer hohen Sensitivität der ELISA-Methode. Diese war aufgrund der geringen Größe des Antigens nicht leicht zu etablieren.

5.4.4 Ausblick

Die Weiterführung dieser Arbeit sollte in zwei Schwerpunkten erfolgen:

Zunächst muss die kontrazeptive Effizienz der Peptid-Vakzine in einer umfassenden *in vivo* Studie überprüft werden. Das Problem der eindeutigen Diagnostizierung von Trächtigkeit bzw. Nichtträchtigkeit sollte bei zukünftigen Versuchen unbedingt berücksichtigt werden. Neben einer deutlich höheren Zahl an Katzen und der genauen Beobachtung der einzelnen Verpaarungen, sowie einem danach gerichteten Kastrationszeitpunkt, erscheint uns auch die Wahl des Verpaarungszeitpunktes wichtig. Dieser sollte nicht wie in der vorgestellten Studie 6 Monate nach Vazinerung, sondern zum Zeitpunkt des höchsten Titers, hier nach 1-2 Monaten liegen. Diese Erkenntnis konnte allerdings erst aus den Ergebnissen dieser Arbeit gewonnen werden. Damit diktiert die Fortpflanzungssaisonalität der Katze den optimalen Zeitpunkt für die Immunisierungen. Wenn man davon ausgeht, dass die erste Rolligkeit insbesondere bei den in Russland lebenden Katzen im März liegt, könnte mit den Immunisierungen frühestens im Januar bzw. Februar begonnen werden.

Ebenfalls genauer untersucht werden müssten mögliche Langzeiteffekte durch Autoimmunreaktionen, die bei der Verwendung z.B. rekombinanter Peptide in der Vergangenheit auftraten (PATERSON et al. 1998, 1999). AITKEN (2002) kritisierte, dass viele Studien, die die Immunisierung mit ZP Bestandteilen propagieren, über einen zu kurzen Zeitraum durchgeführt würden, um derartige negative Nebenwirkungen feststellen zu können. Oftmals dauere es mehr als ein Jahr, bis sich Ovarpathologien manifestieren.

Einen zweiten Schwerpunkt sollte zukünftig die genauere Charakterisierung des Peptides P6 bilden. Als Bestandteil einer Kleeblattdomäne mit diskutierter Rezeptorfunktion könnte dieses interessante Peptid möglicherweise ganz entscheidend zur Immunokontrazeption der Hauskatze beitragen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die immunologische Kontrazeption mittels Zona pellucida (ZP) Proteinen gilt als vielversprechender Ansatz für die Reproduktionskontrolle verwilderter Haus- und Wildtierbestände. Da die Applikation von nativer ZP mit Nebenwirkungen verbunden ist, wird die Verwendung einzelner ZP Peptide als Bestandteil kontrazeptiver Vakzine als besonders aussichtsreich erachtet. Das Prinzip dieser nebenwirkungsfreien ZP Immunisierung ist die gezielte Trennung der Entzündungsreaktionen auslösenden T-Zell-Epitope der ZP von den kontrazeptiv wirkenden B-Zell-Epitopen.

Niedermolekulare synthetische oder rekombinante Peptide allein sind gering immunogen und können somit keine ausreichende Immunantwort induzieren. Die Verwendung von Peptiden für die immunologische Kontrazeption erfordert daher ein „Vakzin-Design“, d. h. die gezielte Kombination der Peptide mit immunstimulierenden Substanzen (Liposomen, Carrierproteinen, Adjuvantien).

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Potentials synthetischer Peptide für die Immunokontrazeption von verwilderten Hauskatzen (*Felis catus*). Dazu wurden zunächst relevante B-Zell-Epitope des feline Zona pellucida Proteins, ZPB2, identifiziert und synthetisiert. Zwei der synthetischen Peptide (P3, P6) wurden zur Herstellung von Antikörpern an BSA konjugiert und zusammen mit Freundschem Adjuvans in Ratten verimpft. Die kontrazeptive Relevanz beider Peptide sowie der Ratten Anti-Peptid Antiseren wurde im *in vitro* Befruchtungssystem der Hauskatze geprüft. Zur Untersuchung der Immunogenität der Peptide in der Zielspezies Hauskatze erfolgte die Entwicklung von Vakzin-Prototypen für die einmalige Applikation. Neben der Eruiierung der Stärke und Dauer der Immunantwort wurde durch Verpaarung der Tiere auch das kontrazeptive Potential *in vivo* abgeschätzt.

Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Mittels Epitop-Mapping wurden sechs Epitope identifiziert und als Peptide synthetisiert. Zwei der Peptide, P3 (AS 130-149) und P6 (AS 175-193) wiesen eine verstärkte Affinität zu einem Antiserum gegen native feline ZP auf. Alle Folgeuntersuchungen beschränkten sich daher auf diese Peptide.

- Die Generierung von Antikörpern gegen P3 und P6 in Ratten führte trotz bis zu siebenfacher Boosterung zu geringen Antikörpertitern von ca. 1:5000.
- Das kontrazeptive Potential der Peptide selbst konnte nach einer Vorinkubation mit Katzenspermien im *in vitro* Befruchtungssystem nicht nachgewiesen werden. Eine Bindung an die Spermienoberfläche kann somit ausgeschlossen werden. Dagegen zeichnete sich ein inhibierender Effekt des Ratten Anti-P3 Antiserums auf die Spermienbindung an die Eizelle (Reduktion im Vergleich zur Kontrolle um $65,8 \pm 13,8\%$; $p = 0,0159$) sowie auf die Befruchtung (Reduktion um $41,5\%$; $p = 0,0073$) deutlich ab. Das Anti-P6 Antiserum hatte möglicherweise aufgrund zu geringer Antikörpertiter keinen messbaren Effekt.
- Aus den Erfahrungen der Rattenimmunisierung heraus wurde die Formulierung der Peptid-Vakzine für Katzen neu konzipiert. Dazu erfolgte zunächst eine Konjugation der einzelnen (P3, P6) bzw. vernetzten (P3 + P6) Peptide an das Trägerprotein KLH, welche anschließend zusammen in multilamellare Liposomen eingeschleust wurden. Die Immunisation der Katzen erfolgte einmalig intramuskulär mit $250\ \mu\text{l}$ Protein-Liposomen-Emulsion + $250\ \mu\text{l}$ kompletten Freundschens Adjuvans.
- Im Resultat der einmaligen Vakzinierung wurden Antikörper über sechs Monate mit Titermaxima von 1:80.000 nachgewiesen. Die höchste immunogene Wirkung erzielte das P6- vor dem P3-Vakzin. Als eher gering immunogen muss die Kombination aus P3 + P6 bezeichnet werden. Nebenwirkungen traten im Untersuchungszeitraum nicht auf.
- Zum Abschluß der *in vivo* Studie wurden alle Katzen verpaart. Obwohl die Anzahl immunisierter Tiere zu gering war, um statistisch abgesicherte Aussagen zu treffen, deutete sich ein Zusammenhang zwischen Stärke der Immunantwort (gemessen als Antikörpertiter) und verringerter Anzahl nachgewiesener Trächtigkeit an.

Die Verwendung von Peptiden für die Immunokontrazeption allgemein und die Formulierung des Peptid-Vakzins für die Peptide P3 und P6 im Speziellen können für die Katze als erfolgreich und anwendungsorientiert eingeschätzt werden. Beide untersuchten Peptide (P3, P6) scheinen ein kontrazeptives Potential zu besitzen. Dieses sollte jedoch in umfangreicheren *in vivo* Folgestudien noch eingehender untersucht werden, bevor eine endgültige Empfehlung der Vakzine für die immunologische Kontrazeption von Katzen geben werden kann.

7 SUMMARY

Immunological contraception based on zona pellucida (ZP) proteins is regarded as a promising approach for the control of reproduction in feral domestic and wild animals. Because application of native ZP caused adverse reactions, utilization of single ZP peptides as elements of contraceptive vaccines were considered to bear good prospects. The principle of this ZP immunization is based upon a systematic separation of inflammation triggering T-cell epitopes from the contraceptive B-cell epitopes.

The present study evaluates the immunogenicity and contraceptive potential of synthetic feline ZPB2 peptides for immunocontraception in cats (*Felis catus*).

First of all, relevant B-cell epitopes were identified and synthesized. In order to generate anti-peptide antibodies two peptides (P3, P6) were chosen and coupled to BSA. Rats were immunized with the conjugation product combined with Freund's complete adjuvant.

The contraceptive efficacy of both peptides and of the anti-peptide antibodies generated were determined using *in vitro* fertilization of feline oocytes (IVF). To evaluate the peptides immunogenicity in the target species (cat), vaccine-prototypes were developed for a single application protocol. The strength and duration of the immune response was analyzed. Additionally, cats were mated to assess the contraceptive potential of the vaccines *in vivo*.

The results were as follows:

- Via epitope-mapping six linear epitopes were identified. Afterwards epitope-derived peptides were synthesized and the binding reaction to an antiserum against native feline ZP was ascertained. Since two out of six peptides (P3, aa 130-149; P6, aa 175-193) showed strong affinity to the antiserum, the following research work was restricted to these two.
- Despite septuplicate booster injections, titers of anti-peptide antibodies generated in rats did not exceed 1:5000.
- Pre-incubation of sperm cells with both peptides failed to affect sperm binding and fertilization capacity *in vitro*. Therefore, a binding reaction between peptides and the sperm surface can be excluded. In contrast, anti-P3 antibodies significantly inhibited sperm binding (reduction compared to control $65.8 \pm 13.8\%$; $p = 0.0159$) and

fertilization (reduction of 41.5 %; $p = 0.0073$) of cat oocytes. The failure of the anti-P6 antiserum was possibly caused by the low antibody concentration.

- Due to the experience in the immunization of rats, the formulation of the peptide-vaccine components for cats got a new conceptual design. For this purpose P3, P6 and the combination P3 + P6 were each conjugated to the carrier protein KLH. The products were integrated in multilamellar liposomes and cats were vaccinated (i. m.) once with 250 μ l protein-liposome emulsion + 250 μ l of Freund's complete adjuvant.
- Vaccination of cats resulted in an immune response, evaluated as the titer of antibodies which had maxima of 1:80,000 and lasted over six months. The P6-vaccine achieved the highest immunogenic efficacy, followed by the P3-vaccine, whereas the combination of P3+P6 seemed to be less immunogenic. There were no signs of negative side-effects during the investigation period.
- Finally all the cats of the *in vivo* study were mated to assess the contraceptive potential of the vaccines. Although the number of animals was too small for a statistically confirmed statement, the results indicate coherence between the strength of the immune reaction (assessed as titer of antibodies) and pregnancy.

The application of peptides for immunocontraception in general and the formulation of the peptide vaccines for P3 and P6 in particular were found to be successful and application-oriented in cats. Extensive *in vivo* studies must be done in the future until definite recommendations concerning the contraceptive potential in cats can be given.

8 ANHANG

8.1 Literaturverzeichnis

Afzalpurkar A, Sacco AG, Yurewicz EC, Gupta SK (1997): Induction of native protein reactive antibodies by immunization with peptides containing linear B-cell epitopes defined by anti-porcine ZP3 beta monoclonal antibodies. *J. Reprod. Immunol.* 33 (2), 113-25

Aitken RJ (2002): Immunocontraceptive vaccines for human use. *J. Reprod. Immunol.* 57 (1-2), 273-287

Aitken RJ, Paterson M, Braude P, Thillai-Koothan P (1990): Evaluation of glycosylated and deglycosylated porcine zona antigens for contraceptive efficacy *in vivo* and *in vitro*. In: *Gamete Interaction: Prospects for Immunocontraception* (Hrsg.: Alexander J, Griffin D, Spieler JM, Waites GMH), Wiley-Liss, New York, 293-311

Aitken RJ, Paterson M, van Duin M (1996): The potential of the zona pellucida as a target for immunocontraception. *Am. J. Reprod. Immunol.* 35 (3), 175-180

Aitken RJ, Richardson DW, Hulme M (1984): Immunological interference with the properties of the zona pellucida. In: *Immunological Aspects of Reproduction in Mammals* (Hrsg.: Crichton DB), Butterworths, London, 305-325

Alexander NJ, Bialy G (1994): Contraceptive vaccine development. *Reprod. Fertil. Dev.* 6 (3), 273-280

Alley Cat Allies (2002): Getting ahead of the game. Erhältlich unter www.alleycat.org.

Alving CR, Wassef NM, Verma JN, Richards RL, Atkinson CT, Aikawa M (1991): Liposomes as vehicles for vaccines: intracellular fate of liposomal antigen in macrophages. In: *Progress in membrane biotechnology* (Hrsg.: Fernandez G, Chapman D, Parker L), Birkhauser Verlag, Basel, 195-202

Baba D, Kashiwabara SI, Honda A, Yamagata K, Wu Q, Ikawa M, Okabe M, Baba T (2002): Mouse sperm lacking cell surface hyaluronidase PH-20 can pass through the layer of cumulus cells and fertilize the egg. *J. Biol. Chem.* 277 (33), 30310-30314

Beebe SJ, Leyton L, Burks D, Ishikawa M, Fuerst T, Dean J, Saling P (1992): Recombinant mouse ZP3 inhibits sperm binding and induces the acrosome reaction. *Dev. Biol.* 15 (1), 48-54

Blackmore DG, Baillie LR, Holt JE, Dierkx L, Aitken RJ, McLaughlin EA (2004): Biosynthesis of the canine zona pellucida requires the integrated participation of both oocytes and granulosa cells. *Biol. Reprod.* Elektronische Vorabpublikation

Bleil JD, Greve JM, Wassarman PM (1988): Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Dev. Biol.* 128 (2), 376-385

Bleil JD, Wassarman PM (1980a): Synthesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (2), 1029-1033

Bleil JD, Wassarman PM (1980b): Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev. Biol.* 76 (1), 185-202

Bleil JD, Wassarman PM (1983): Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev. Biol.* 95 (2), 317-324

Bogner K, Hinsch KD, Nayudu P, Konrad L, Cassara C, Hinsch E (2004): Localization and synthesis of zona pellucida proteins in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) ovary. *Mol. Hum. Reprod.* Elektronische Vorabpublikation

Bork P (1993): A trefoil domain in the major rabbit zona pellucida protein. *Protein Sci.* 2 (4), 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 (3), 237-240

Briand JP, Muller S, Van Regenmortel MH (1985): Synthetic peptides as antigens: pitfalls of conjugation methods. *J. Immunol. Methods* 78 (1), 59-69

Brown RG, Bowen WD, Eddington JD, Kimmings WC, Mezei M, Parsons JL, Pohajdak B (1997a): Evidence for a long-lasting single administration contraceptive vaccine in wild grey seals. *J. Reprod. Immunol.* 35 (1), 43-51

Brown RG, Bowen WD, Eddington JD, Kimmings WC, Mezei M, Parsons JL, Pohajdak B (1997b): Temporal trends in antibody production in captive grey, harp and hooded seals to a single administration immunocontraceptive vaccine. *J. Reprod. Immunol.* 35 (1), 53-64

Brunner, F (1994): *Die unverstandene Katze*. Naturbuchverlag, Augsburg, S. 142-143

Carpino LA, Ionescu D, El-Faham A, Beyermann M, Henklein P, Hanay C, Wenschuh H, Bienert M (2003): Complex polyfluoride additives in Fmoc-amino acid fluoride coupling processes. Enhanced reactivity and avoidance of stereomutation. *Org. Lett.* 5 (7), 975-977

Carter CN (1990): Pet population control: Another decade without solutions? *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 197 (2), 192-195

Christiansen, J (1984): Gynaecology of the normal female. In: *Reproduction in dog and cat* (Hrsg.: Christiansen J), Bailliere Tindall, London, Philadelphia, Toronto, 225-251

Churcher PB, Lawton JH (1987): Predation by domestic cats in an English village. *J. Zool.* 212, 439-455

Cohnen K (1995): Reproduktionskontrolle bei Zootieren. *Dissertation*. Tierärztliche Hochschule Hannover

- Dean J (1992): Biology of Mammalian Fertilisation: Role of the zona pellucida. *J. Clin. Invest.* 89, 1055-1059
- Dean J, Millar SE (1990): Zona pellucida: Target for a contraceptive vaccine. In: *Gamete interaction: Prospects for immunocontraception* (Hrsg.: Alexander NJ, Griffin PD, Spieler JM, Waites GMH), Wiley-Liss, New York, 313-326
- Dietl J, Freye J, Mettler L (1982): Fertility inhibition using low-dose immunization with porcine zonae pellucidae. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2 (3), 153-156
- Drell DW, Dunbar BS (1984): Monoclonal antibodies to rabbit and pig zonae pellucidae distinguish species-specific and shared antigenic determinants. *Biol. Reprod.* 30 (2), 445-457
- Dunbar BS (1989a): Ovarian antigens and infertility. *Am. J. Reprod. Immunol.* 21 (1), 28-31
- Dunbar BS, 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 development expression. *Reprod. Fertil. Dev.* 6 (3), 331-347
- Dunbar BS, Kaul G, Prasad M, Skinner SM (2002): Molecular approaches for the evaluation of immune responses to zona pellucida (ZP) and development of second-generation ZP vaccines. *Reprod. Suppl.* 60, 9-18 Review
- Dunbar BS, Lo C, Powell J, Stevens VC (1989b): Use of a synthetic peptide adjuvant for the immunization of baboons with denaturated and deglycosylated pig zona pellucida glycoproteins. *Fertil. Steril.* 52 (2), 311-318
- Dunbar BD, Schwoebel E (1988): Fertility studies for the benefit of animals and human beings: development of improved sterilization and contraceptive methods. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193 (9), 1165-1170
- Eldridge JH, Gilley RM, Staas JK, Moldoveanu Z, Meulbroek JA, Tice TR (1989): Biodegradable microspheres: vaccine delivery system for oral immunization. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 146, 59-66
- Eldridge JH, Staas JK, Chen D, Marx PA, Tice TR, Gilley RM (1993): New advances in vaccine delivery systems. *Semin. Hematol.* 30 (4 Suppl. 4), 16-25 Review
- Epifano O, Dean J (1994): Biology and structure of the zona pellucida: a target for immunocontraception. *Reprod. Fertil. Dev.* 6 (3), 319-330
- Fitzgerald BM (1988): Die Nahrung domestizierter Katzen und Auswirkungen auf die Beutetierbestände. In: *Die domestizierte Katze* (Hrsg.: Turner DC, Bateson P), Albert Müller Verlag, Rüschlikon-Zürich, 148-182
- Florman HM, Bechtol KB, Wassarman PM (1984): Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm. *Dev. Biol.* 106 (1), 243-255

- Florman HM, Wassarman PM (1985): O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell*. 41 (1), 313-324
- Freistedt P, Stojkovic M, Wolf E (2001): Efficient *in vitro* production of cat embryos in modified synthetic oviduct fluid medium: effects of season and ovarian status. *Biol. Reprod.* 65 (1), 9-13
- Frank R (1992): The spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* 48 (42), 9217-9232
- Goodloe RB (1991): Immunocontraception, genetic management and demography of feral horses on four eastern U.S. barrier islands. *Dissertation*. Athens, GA: University of Georgia
- Gorman SP, Levy JK, Hampton AL, Collante WR, Harris AL, Brown RG (2002): Evaluation of a porcine zona pellucida vaccine for the immunocontraception of domestic kittens (*Felis catus*). *Theriogenology* 58 (1), 135-149
- Govind CK, Gupta SK (2000): Failure of female baboons (*Papio anubis*) to conceive following immunization with recombinant non-human primate zona pellucida glycoprotein-B expresses in *Escherichia coli*. *Vaccine* 18 (26), 2970-2978
- Govind C, Hasegawa A, Koyama K, Gupta SK (2000): Delineation of a conserved B cell epitope on bonnet monkey (*Macaca radiata*) and human zona pellucida glycoprotein-B by monoclonal antibodies demonstrating inhibition of sperm-egg binding. *Biol. Reprod.* 62 (1), 67-75
- Greulich WW (1934): Artificially induced ovulation in the cat (*Felis domestica*). *Anat. Rec.* 58, 217-224
- Greve JM, Salzman GS, Roller RJ, Wassarman PM (1982): Biosynthesis of the major zona pellucida glycoprotein secreted by oocytes during mammalian oogenesis. *Cell*. 31, 749-59
- Griffin PD (1990): Strategy of vaccine development. In: *Gamete interaction: Prospects for immunocontraception* (Hrsg.: Alexander NJ, Griffin PD, Spieler JM, Waites GMH), Wiley-Liss, New York, 501-522
- Grootenhuis AJ, Philipsen HL, de Breet-Grijsbach JT, van Duin M (1996): Immunocytochemical localization of ZP3 in primordial follicles of rabbit, marmoset, rhesus monkey and human ovaries using antibodies against human ZP3. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 50, 43-54
- Gulyas BJ (1980): Cortical granules of mammalian eggs. *Int. Rev. Cytol.* 63, 357-392
- Gulyas BJ, Gwatkin RBL, Yuan LC (1983): Active immunization of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with porcine zonae pellucidae. *Gamete Res.* 4, 299-307
- Gupta SK, Kaul R, Rajalakshmi S, Sahai P, Yurewicz EC, Sacco AG (1994): Immunoreactivity with native zona pellucida of antibodies against a 19 amino acid synthetic peptide corresponding to human ZP3. *J. Reprod. Immunol.* 27 (3), 241-7

- Gwatkin RBL, Williams DT (1978): Immunization of female rabbits with heat-solubilized bovine zonae: Production of anti-zona antibody and inhibition of fertility. *Gamete Res.* 1, 19-26
- Hall L, Sacco AG, Yurewicz EC, Moghissi KS (1994): Characterization and contraceptive potential of antibodies against synthetic peptides of porcine zona pellucida ZP3. *Society for Gynecologic Investigation, 41st Annual Meeting*, 129 Abstract
- Hamilton JB, Hamilton RS, Mestler GE (1969): Duration of life and causes of death in domestic cats: influence of sex, gonadectomy and inbreeding. *J. Gerontol.* 24 (4), 427-437
- Harris JD, Hibler DW, Fontenot GK, Hsu KT, Yurewicz EC, Sacco AG (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 (6), 361-393
- Hedrick JL (1996): Comparative structural and antigenic properties of zona pellucida glycoproteins. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 50, 9-17
- Herr, JC (1996): Immunocontraceptive approaches. In: *Contraceptive research and development* (Hrsg.: Harrison PF, Rosenfield A), National Academy Press, Washington, DC
- Hinsch E, Groeger S, Oehninger S, Hinsch KD (2003): Localization and functional importance of a conserved zona pellucida 2 protein domain in the human and bovine ovary using monoclonal anti-ZP2 peptide antibodies. *Theriogenology* 60 (7), 1331-44
- Hoffmann W, Hauser F (1993): The P-domain or trefoil motif: a role in renewal and pathology of mucous epithelia? *Trends Biochem. Sci.* 18 (7), 239-43 Review
- Hopp TP, Woods KR (1981): Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (6), 3824-3828
- Hruby DE (1993): Vaccinia Virus: a novel approach for molecular engineering of peptide vaccines. *Semin. Hematol.* 30 (4 Suppl 4), 35-44 Review
- Hughes DC, Barratt CL (1999): Identification of the true human orthologue of the mouse Zp1 gene: evidence for greater complexity in the mammalian zona pellucida? *Biochim. Biophys. Acta.* 1447 (2-3), 303-306
- Hughes KL, Slater MR (2002): Implementation of a feral cat management program on a university campus. *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* 5 (1), 15-28
- Ivanova M, Petrov M, Klissourska D, Mollova M (1995): Contraceptive potential of porcine zona pellucida in cats. *Theriogenology* 43, 969-981
- Janeway CA, Travers P (1995): *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 49-52; 582-583
- Jewgenow K, Fickel J (1999): Sequential expression of zona pellucida protein genes during the oogenesis of domestic cats. *Biol. Reprod.* 60 (2), 522-526

Jewgenow K, Rohleder M, Wegner I (2000): Differences between antigenic determinants of pig and cat zona pellucida proteins. *J. Reprod. Fert.* 119 (1), 15-23

Jewgenow K, Rudolph M (2001): Timing and location of zona pellucida synthesis during oogenesis in domestic cats - an ultrastructural immunohistological investigation. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 57, 23-29

Jones WR (1983): The immunological manipulation of reproduction. In: *Immunological fertility regulation*, Blackwell Scientific Publisher, Oxford and London, 1-75

Jones WR (1994): Gamete immunology. *Hum. Reprod.* 9 (5), 828-841 Review

Jones E, Coman BJ (1982): Ecology of the feral cat, *Felis catus* (L.), in South-Eastern Australia III. Home ranges and population ecology in semi-arid northwest Victoria. *Aust. J. Wildl. Res.* 9, 404-420

Jones GR, Sacco AG, Subramanian MG, Kruger M, Zhang S, Yurewicz EC, Moghissi KS (1992): Histology of ovaries of female rabbits immunized with deglycosylated zona pellucida macromolecules of pig. *J. Reprod. Fert.* 95 (2), 513-525

Kagnoff MF (1993): Immunology of the intestinal tract. *Gastroenterology* 105 (5), 1275-80 Review

Kalz B (2001): Populationsbiologie, Raumnutzung und Verhalten verwilderter Hauskatzen und der Effekt von Maßnahmen zur Populationskontrolle. *Dissertation*, Humboldt-Universität Berlin

Kaul R, Afzalpurkar A, Gupta SK (1996): Strategies for designing an immunocontraceptive vaccine based on zona pellucida synthetic peptides and recombinant antigen. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 50, 127-134

Kerr PJ, Jackson RJ, Robinson AJ, Swan J, Silvers L, French N, Clarke H, Hall DF, Holland MK (1999): Infertility in female rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) alloimmunized with the rabbit zona pellucida protein ZPB either as a purified recombinant protein or expressed by recombinant myxoma virus. *Biol. Reprod.* 61 (3), 606-613

Kharat I, Nair NS, Dhall K, Sawhney H, Krishna U, Shahani SM, Banerjee A, Roy S, Kumar S, Hingorani V, et al. (1990): Analysis of menstrual records of women immunized with anti-hCG vaccines inducing antibodies partially cross-reactive with hLH. *Contraception* 41 (3), 293-299

Kimura N, Konno Y, Miyoshi K, Matsumoto H, Sato E (2002): Expression of hyaluronan synthases and CD44 messenger RNAs in porcine cumulus-oocyte complexes during *in vitro* maturation. *Biol. Reprod.* 66 (3), 707-717

Kinloch RA, Mortillo S, Stewart CL, Wassarman PM (1991): Embryonal carcinoma cells transfected with ZP3 genes differentially glycosylate similar polypeptides and secrete active mouse sperm receptor. *J. Cell. Biol.* 115 (3), 655-664

- Kirkpatrick JF, Liu IKM, Turner JW Jr (1990): Remotely-delivered immunocontraception in feral horses. *Wildl. Soc. Bull.* 18, 326-330
- Kirkpatrick JF, Liu IKM, Turner, JW Jr, Naugle R, Keiper R (1992): Long-term effects of porcine zonae pellucidae immunocontraception on ovarian function in feral horses (*Equus caballus*). *J. Reprod. Fertil.* 94 (2), 437-444
- Kirkpatrick JF, Turner JW (1991): Reversible fertility control in nondomestic animals. *J. Zoo Wildl. Med.* 22 (4), 392-408
- Kölle S, Sinowatz F, Boie G, Palma G (1998): Differential expression of ZPC in the bovine ovary, oocyte, and embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 49 (4), 435-43
- 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 (6), 441-7
- Krause A (2000): Herstellung und Charakterisierung E-Selektin-gerichteter Immunoliposomen zur Anwendung im Rahmen einer neuartigen antiinflammatorischen Therapie. *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Kreeger TJ (1997): Overview of delivery systems for the administration of contraceptives to wildlife. In: *Contraception in Wildlife Management* (Hrsg.: Kreeger TJ). USDA/APHIS Technical Bulletin No. 1853, 29-48
- Kyrein HJ (1983): Der Radioimmunoassay für Steroidhormone - Grundlagen, Entwicklung und Anwendung radioimmunologischer Testverfahren. Teil II. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 177, 426-438
- Lee VH, Dunbar BS (1993): Developmental expression of the rabbit 55-kDa zona pellucida protein and messenger RNA in ovarian follicles. *Dev. Biol.* 155 (2), 371-382
- Lee VH, Soch JF, Dunbar BS (1992): Effects of immunization with zona pellucida proteins on ovarian development in the guinea pig. *Biol. Reprod.* 46 (Suppl. 1), 131
- Leiser R (1979): Blastozystenimplantation bei der Hauskatze. *Anat. Histol. Embryol.* 8 (1), 79-96
- Leiser R (1982): Development of the trophoblast in the early carnivore placenta of the cat. *Bibl. Anat.* 22, 93-107
- Lengwinat T, Blottner S (1994): *In vitro* fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryconserved epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 35, 291-301
- Levy JK, Gale DW, Gale LA (2003): Evaluation of the effect of long-term trap-neuter-return and adoption program on a free-roaming cat population. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222 (1), 42-46

- Liberg O, Sandell M (1988): Räumliche Organisation und Fortpflanzungsstrategien der domestizierten Katze und anderer Feliden. In: *Die domestizierte Katze* (Hrsg.: Turner DC, Bateson P), Albert Müller Verlag, Rüschlikon-Zürich, 103-123
- Lou YH, Bagavant H, Ang J, McElveen MF, Thai H, Tung KS (1996): Influence of autoimmune ovarian disease pathogenesis on ZP3 contraceptive vaccine design. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 50, 159-163
- Lou Y, Tung KS (1993): T cell peptide of a self-protein elicits autoantibody to the protein antigen. Implications for specificity and pathogenetic role of antibody in autoimmunity. *J. Immunol.* 151 (10), 5790-5799
- Mahi-Brown CA (1996): Primate response to immunization with a homologous zona pellucida peptide. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 50, 165-174
- Mahi-Brown CA, McGuinness RP, Moran F (1992): The cellular immune response to immunization with zona pellucida antigens. *J. Reprod. Immunol.* 21 (1), 29-46
- Mahi-Brown CA, Moran F (1995): Response of cynomolgus macaques to immunization against a synthetic peptide from the human zona pellucida. *J. Med. Primatol.* 24 (4), 258-70
- Mahi-Brown CA, Yanagimachi R, Hoffman JC, Huang TT Jr (1985): Fertility control in the bitch by active immunization with porcine zonae pellucidae: use of different adjuvants and patterns of estradiol and progesterone levels in estrous cycles. *Biol. Reprod.* 32 (4), 761-772
- Mahi-Brown CA, Yanagimachi R, Nelson ML, Yanagimachi H, Palumbo N (1988): Ovarian histopathology of bitches immunized with porcine zonae pellucidae. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 18 (3), 94-103
- Mahlow JC, Slater MR (1996): Current issues in the control of stray and feral cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209 (12), 2016-2020
- Maresh GA, Dunbar BS (1987): Antigenic comparison of five species of mammalian zonae pellucidae. *J. Exp. Zool.* 244 (2), 299-307
- Martinez ML, Fontenot GK, Harris JD (1996): The expression and localization of zona pellucida glycoproteins and mRNA in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Reprod. Fert. Suppl.* 50, 35-41
- Martinez ML, Harris JD (2000): Effectiveness of zona pellucida protein ZPB as an immunocontraceptive antigen. *J. Reprod. Fertil.* 120 (1), 19-32
- Meyer HH (1989): *Enzymimmunologische Meßverfahren zur Hormonanalytik*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- Millar SE, Chamow SM, Baur AW, Oliver C, Robey F, Dean J (1989): Vaccination with a synthetic zona pellucida peptide produces long-term contraception in female mice. *Science* 246 (4932), 935-938

- Miller LA (1997): Delivery of immunocontraceptive vaccines for wildlife management. In: *Contraception in Wildlife Management* (Hrsg.: Kreeger TJ), USDA/APHIS Technical Bulletin No. 1853, 49-58
- Morell V (1993): Australien pest control by virus causes concern. *Science* 261 (5122), 683-684
- Moss B (1991): Vaccine virus: a tool for research and vaccine development. *Science* 252 (5013), 1662-1667
- Muller LI, Warren RJ, Evans DL (1997): Theory and practice of immunocontraception in wild mammals. *Wildl. Soc. Bull.* 25 (2), 504-514
- Naz RK, Sacco A, Singh O, Pal R, Talwar GP (1995): Development of contraceptive vaccines for humans using antigens derived from gametes (spermatozoa and zona pellucida) and hormones (human chorionic gonadotrophin): current status. *Hum. Reprod.* 1 (1), 1-18
- Neville PF (1989): Feral cats: management of urban populations and pest problems by neutering. In: *Mammals as pests* (Hrsg.: Putnam RJ), Chapman & Hall, London, 262-267
- Neville PF, Remfry J (1984): Effect of neutering two groups of feral cats. *Vet Rec.* 114 (18), 447-450
- Olson PN (1999): Vaccination of stray cats against emerging and reemerging zoonotic pathogens. *Adv. Vet. Med.* 41, 333-346
- Olson PN, Johnston SD (1993): Animal welfare forum: overpopulation of unwanted dogs and cats. New developments in small animal population control. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 15, 202 (6), 904-9
- Otto B, Wright N (1994): Trefoil peptides. Coming up clover. *Curr. Biol.* 4 (9), 835-838
- Ownby CL, Shivers CA (1972): Antigens of the hamster ovary and effects of anti-ovary serum on eggs. *Biol. Reprod.* 6 (2), 310-318
- Paterson M, Koothan PT, Morris KD, O'Byrne KT, Braude P, Williams A, Aitken RJ (1992): Analysis of the contraceptive potential of antibodies against native and deglycosylated porcine ZP3 *in vivo* and *in vitro*. *Biol. Reprod.* 46 (4), 523-534
- Paterson M, Wilson MR, Jennings ZA, van Duin M, Aitken RJ (1999): Design and evaluation of a ZP3 peptide vaccine in a homologous primate model. *Mol. Hum. Reprod.* 5 (4), 342-352
- Paterson M, Wilson MR, Morris KD, van Duin M, Aitken RJ (1998): Evaluation of the contraceptive potential of recombinant human ZP3 and human ZP3 peptides in a primate model: their safety and efficacy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 40 (3), 198-209
- Paterson M, Wilson MR, van Duin M, Aitken RJ (1996): Evaluation of zona pellucida antigens as potential candidates for immunocontraception. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 50, 175-182

- Patronek GJ (1998): Free-roaming and feral cats – their impact on wildlife and human beings. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212 (2), 218-226 Review
- Porter CW (1965): Ovarian antibodies in female guinea pigs. *Int. J. Fertil.* 10 (3), 257-60
- Prakash BS, Meyer HH, Schallenberger E, van de Wiel DF (1987): Development of a sensitive enzyme immunoassay (EIA) for progesterone determination in unextracted bovine plasma using the second antibody technique. *J. Steroid. Biochem.* 28 (6), 623-7
- Primakoff P, Lathrop W, Woolman L, Cowan A, Myles D (1988): Fully effective contraception in male and female guinea pigs immunized with the sperm protein PH-20. *Nature* 335 (6190), 543-546
- Rath A, Batra D, Kaur R, Vrati S, Gupta SK (2003): Characterization of immune response in mice to plasmid DNA encoding dog zona pellucida glycoprotein-3. *Vaccine* 21 (17-18), 1913-1923
- Reineke U, Kramer A, Schneider-Mergener J (1999): Antigen sequence- and library-based mapping of linear and discontinuous protein-protein-interaction sites by spot synthesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 243, 23-36 Review
- Remfry J (1996): Feral cats in the United Kingdom. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208 (4), 520-523
- Repin VS, Akimova IM (1976): A study of protein composition of the zona pellucida of mammalian oocytes and zygotes by a method of microelectrophoresis in polyacrylamide gel. *Biokhimiia* 41 (1), 50-57
- Rhim SH, Millar SE, Robey F, Luo AM, Luo YH, Yule T, Allen P, Dean J, Tung KS (1992): Autoimmune disease of the ovary induced by a ZP3 peptide from the mouse zona pellucida. *J. Clin. Invest.* 89 (1), 28-35
- Rolle M, Mayr A (2002): *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Enke Verlag Stuttgart, 7. Auflage, 45 ff
- Romeis B (1989): *Mikroskopische Technik* (Hrsg.: Böck P), Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 235-236
- Roth TL, Munson L, Swanson WF, Wildt DE (1995): Histological characteristics of the uterine endometrium and corpus luteum during early embryogenesis and the relationship to embryonic mortality in the domestic cat. *Biol. Reprod.* 53 (5), 1012-1021
- Sacco AG (1981a): Immunocontraception: consideration of the zona pellucida as a target antigen. *Obstet. Gynecol. Annu.* 10, 1-26 Review
- Sacco AG, Pierce DL, Yurewicz EC, Subramanian MG, Yurewicz EC, Dukelow WR (1987): Ovaries remain functional in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) immunized with porcine zona pellucida 55,000 macromolecule. *Biol. Reprod.* 36 (2), 481-490

- Sacco AG, Shivers CA (1973): Effects of reproductive tissue-specific antisera on rabbit eggs. *Biol. Reprod.* 8 (4), 481-90
- Sacco AG, Subramanian MG, Yurewicz EC (1981b): Active immunization of mice with porcine zonae pellucidae: immune response and effect on fertility. *J. Exp. Zool.* 218 (3), 405-18
- Sacco AG, Subramanian MG, Yurewicz EC, DeMayo FJ, Dukelow, WR (1983): Heteroimmunization of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) with a purified porcine zona antigen (PPZA): immune response and biologic activity of antiserum. *Fertil. Steril.* 39 (3), 350-358
- Sacco AG, Yurewicz EC (1989): Use of the zona pellucida as an immunocontraceptive target antigen. In: *The mammalian egg coat: structure and function* (Hrsg.: Dietl J), Springer-Verlag, Berlin, New York
- Sacco AG, Yurewicz EC, Subramanian MG (1986): Carbohydrate influences the immunogenic and antigenic characteristics of the ZP3 macromolecule (Mr 55000) of the pig zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.* 76 (2), 575-585
- Sacco AG, Yurewicz EC, Subramanian MG, YeLian F, Dukelow WR (1991): Immunological response and ovarian histology of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) immunized with porcine zona pellucida ZP3 (Mr = 55,000) macromolecules. *Am. J. Primatol.* 24, 15-28
- Sadler K, Bird PH, Brown LE, Jackson DC (2000): The antigenic and immunogenic properties of synthetic peptide immunocontraceptive vaccine candidates based on gamete antigens. *Vaccine* 18 (5-6), 416-425
- Saling PM (1989): Mammalian sperm interaction with extracellular matrices of the egg. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* 11, 339-388 Review
- Schneider-Mergener J, Kramer A, Reineke U (1996): Peptide libraries bound to continuous cellulose membranes: tools to study molecular recognition. In: *Combinatorial Libraries* (Hrsg.: Cortese R), W. de. Gruyter, Berlin, 53-68
- Schwoebel ED, Vandervoort CA, Lee VH, Lo YK, Dunbar BS (1992): Molecular analysis of the antigenicity and immunogenicity of recombinant zona pellucida antigens in a primate model. *Biol. Reprod.* 47 (5), 857-865
- Scott KC, Levy JK, Gorman SP, Newell SM (2002): Body condition of feral cats and the effect of neutering. *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* 5 (3), 203-213
- Shigeta M, Hasegawa A, Hamada Y, Koyama K (2000): Analysis of B cell epitopes of a glycoprotein porcine zona pellucida (pZP1). *J. Reprod. Immunol.* 47 (2), 159-168
- Shivers CA, Dudkiewicz AB, Franklin LE, Fussel EN (1972): Inhibition of sperm-egg interaction by specific antibody. *Science* 178 (66), 1211-1213

- Sivapurapu N, Upadhyay A, Hasegawa A, Koyama K, Gupta SK (2003): Efficacy of antibodies against *Escherichia coli* expressed chimeric recombinant protein encompassing multiple epitopes of zona pellucida glycoproteins to inhibit *in vitro* human sperm-egg binding. *Mol. Reprod. Dev.* 65 (3), 309-317
- Skinner SM, Mills T, Kirchick HJ, Dunbar BS (1984): Immunization with zona pellucida protein results in abnormal ovarian follicular differentiation and inhibition of gonadotropin-induced steroid secretion. *Endocrinology* 115 (6), 2418-2432
- Skinner SM, Niu EM, Bundman DS, Lo C, Dunbar BS (1987): Use of immunoaffinity purified antibodies to zona pellucida to compare alloimmunization of male and female rabbits. *J. Repr. Immun.* 12 (2), 81-92
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150 (1), 76-85 Erratum in: *Anal. Biochem.* 163 (1), 279 (1987)
- Spargo SC, Hope RM (2003): Evolution and nomenclature of the zona pellucida gene family. *Biol. Reprod.* 68 (2), 358-362
- Spindler RE, Wildt DE (1999): Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic cat. *Biol. Reprod.* 61 (1), 188-194
- Spittler H (1978): Untersuchungen zur Nahrungsbiologie streunender Hauskatzen (*Felis sylvestris f. catus L.*). *Zeitschrift für Jagdwissenschaften* 24 (1), 33-44
- Spittler H (1999): Peterle lässt das Wildern nicht. *Jäger – Zeitschrift für das Jagdrevier* 4, 48-49
- Steeves TE, Gardner DK (1999): Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. *Biol. Reprod.* 61 (3) 731-740
- Stevens VC (1995): Prospects of antifertility vaccines. In: *Frontiers in Endocrinology: Immunocontraception* (Hrsg.: Nilsson O, Mattsson R), Ares-Serono Symposia Publications, Rome, Italy, 257-275
- Swanson WF, Roth TL, Brown JL, Wildt DE (1994): *In vivo* embryogenesis, embryo migration, and embryonic mortality in the domestic cat. *Biol. Reprod.* 51 (3), 452-464
- Swanson WF, Roth TL, Brown JL, Wildt DE (1995): Relationship of circulating steroid hormones, luteal luteinizing hormone receptor and progesteron concentration, and embryonic mortality during early embryogenesis in the domestic cat. *Biol. Reprod.* 53 (5) 1022-1029
- Tabor R (1981): General biology of feral cats. In: *The ecology and control of feral cats*, The Universities Federation for Animal Welfare, Potters Bar, England, 5-11
- Tabor R (1983): *The Wildlife of the domestic cat*. Arrow Books, London

- Tesarik J (1995): Targeting the zona pellucida for immunocontraception: a minireview. *Hum. Reprod.* 10 Suppl. 2, 132-139 Review
- Thomson DL Jr (2000): Immunization against GnRH in male species (comparative aspects). *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 459-469
- Tung KS, Lou YH, Luo AM, Ang J (1994): Contraceptive vaccine assessment based on a murine ZP3 mini-autoantigen. *Reprod. Fertil. Dev.* 6 (3), 349-355
- Turner JW, Liu IKM, Kirkpatrick JF (1992): Remotely delivered immunocontraception in captive white-tailed deer. *J. Wildl. Manage.* 56, 154-157
- Tuytens FAM, Macdonald DW (1998): Sterilisation as an alternative strategy to control wildlife diseases: bovine tuberculosis in European badgers as a case study. *Biodivers. Conserv.* 7, 705-723
- Tyndale-Biscoe CH (1994): Virus-vectored immunocontraception of feral mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* 6 (3), 281-287
- Upadhyay SN, Thillai-Koothan P, Bamezai A, Jayaraman S, Talwar GP (1989): Role of adjuvants in inhibitory influence of immunization with porcine zona pellucida antigen (ZP-3) on ovarian folliculogenesis in bonnet monkeys: a morphological study. *Biol. Reprod.* 41 (4), 665-673
- Van der Ven H (2002): Zur Wirksamkeit verschiedener Adjuvantien in bakteriellen bestandsspezifischen Vakzinen für Puten. *Dissertation.* Tierärztliche Hochschule Hannover
- VandeVoort CA, Schwoebel ED, Dunbar BS (1995): Immunization of of monkeys with recombinant cDNA expressed zona pellucida proteins. *Fertil. Steril.* 64 (4), 838-47
- Van Duin M, Polman JE, De Breet IT, van Ginneken K, Bunschoten H, Grootenhuis A, Brindle J, Aitken RJ (1994): Recombinant human zona pellucida protein ZP3 produced by chinese hamster ovary cells induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm-egg fusion. *Biol. Reprod.* 51 (4), 607-617
- Verhage HG, Beamer NB, Brenner RM (1976): Plasma levels of estradiol and progesterone in the cat during polyestrus, pregnancy and pseudopregnancy. *Biol. Reprod.* 14 (5), 579-585
- Wassarman PM (1988): Zona pellucida glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 415-442 Review
- Wassarman PM (1990): Profile of a mammalian sperm receptor. *Development* 108 (1), 1-17 Review
- Wassarman PM, Mortillo S (1991): Structure of the mouse egg extracellular coat, the zona pellucida. *Int. Rev. Cytol.* 130, 85-110 Review

- Wegner I (2000): Untersuchungen zum antigenen Potential von Zona Pellucida Proteinen der Hauskatze (*Felis domestica*) und des Schweins (*Sus scrofa*). *Dissertation*. Freie Universität Berlin
- White LM, Smith PM, Miller CC, Fayrer-Hosken RA, Warren RJ (1993): Development of an anti-sperm immunocontraceptive for white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Theriogenology* 39, 339 Abstract
- Wickings EJ, Nieschlag E (1980): Suppression of spermatogenesis over two years in rhesus monkeys actively immunized with follicle-stimulating hormone. *Fertil. Steril.* 34 (3), 269-274
- Willis P, Heusner GL, Warren RJ, Kessler D, Fayrer-Hosken RA (1994): Equine immunocontraception using porcine zona pellucida: a new method for remote delivery and characterization of the immune response. *J. Equine Vet. Sci.* 14, 364-370
- Wood DM, Liu C, Dunbar BS (1981): Effect of alloimmunization and heteroimmunization with zonae pellucidae on fertility in rabbits. *Biol. Reprod.* 25 (2), 439-450
- Wright NA, Hoffmann W, Otto WR, Rio M-C, Thim L (1997): Rolling in the clover: trefoil factor family (TFF)-domain peptides, cell migration and cancer. *FEBS Lett.* 408 (2), 121-3
Review
- Yamasaki N, Richardson RT, O'Rand MG (1995): Expression of the rabbit sperm protein Sp17 in cos cells and interaction of recombinant Sp17 with the rabbit zona pellucida. *Mol. Reprod. Dev.* 40 (1), 48-55
- Yanagimachi R (1982): *In vitro* sperm capacitation and fertilization of golden hamster eggs in a chemically defined medium. In: *In vitro Fertilization and Embryo Transfer* (Hrsg.: Hafez ESE, Semm K), MIT Press, Lancaster, UK
- Yanagimachi R (1994): The physiology of reproduction. In: *Mammalian fertilization* (Hrsg.: Knobil E, Neill JD), Raven Press, Ltd, New York, 189–317
- Yurewicz EC, Pack BA, Armant DR, Sacco MG (1993a): Porcine zona pellucida ZP3 alpha a glycoprotein mediates binding of the biotin-labeled Mr 55,000 family (ZP3) to boar sperm membrane vesicles. *Mol. Reprod. Dev.* 36 (3), 382-389
- Yurewicz EC, Zhang S, Sacco, MG (1993b): Generation and characterization of site-directed antisera against an amino-terminal segment of a 55 kDa sperm adhesive glycoprotein from zona pellucida of pig oocytes. *J. Reprod. Fert.* 98, 147-152
- Zaunbrecher KI, Smith RE (1993): Neutering of feral cats as an alternative to eradication programs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203 (3), 449-452

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schema der Follikulogenese im Ovar (entnommen folgender Homepage: http://www.colorado.edu/epob/epob4480tsai/ovary).....	10
Abb. 2	Phylogenetischer Stammbaum der ZP Genfamilie.....	13
Abb. 3	Schema der in dieser Arbeit durchgeführten <i>in vitro</i> Kultur (Gewinnung, Reifung, Befruchtung, Auswertung) von Katzenoozyten.....	46
Abb. 4	Epitop-Mapping: Charakterisierung der Immunreaktion des Kaninchen Anti-fZP Antiserums gegen überlappende, die gesamte Aminosäuresequenz des felinen ZPB2 Proteins umfassende, Peptid-Epitope auf der Nitrozellulosemembran.....	58
Abb. 5	Charakterisierung der Stärke der Immunreaktion der überlappenden Peptidsequenzen der Epitope 3 und 6.....	60
Abb. 6	Darstellung des Antigenitätsindex für die Aminosäuresequenz der Peptide P3 (a) und P6 (b).....	61
Abb. 7	Lage der entgültigen (modifizierten) Peptidsequenzen auf der Gesamtsequenz des fZPB2.....	61
Abb. 8	Detektion von Anti-Peptid Antikörpern im Serum immunisierter Ratten mittels Dot Immunoassay.....	64
Abb. 9	a-e) Beurteilung der Spermien-bindung, Kernstruktur und Zellteilung an gefärbten Oozyten/ Embryonen.....	65
Abb. 10	Titerentwicklung (Doppelbestimmung) der Katze 4, immunisiert mit P6-Vakzin.....	71
Abb. 11	Verlauf der Anti-Peptid Antikörpertiter der Katzen K1-K9 über 28 Wochen.....	74
Abb. 12	Histologische Darstellung der Gelbkörperstruktur ausgewählter Katzen (200fache Vergrößerung).....	77
Abb. 13	Verlauf der durchschnittlichen (+/- SEM) Serum 17β -Östradiol und Progesteron Konzentrationen bei Hauskatzen (n = 47) nach natürlicher Verpaarung und Ovulation.....	93

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Auszug aus der Liste charakterisierter Gene der ZP Genfamilie nach (SPARGO & HOPE, 2003).....	14
Tab. 2	Zusammenfassung von Ovarfunktionalität und Pathologien in Modelltieren nach Immunisierung mit Zona pellucida Proteinen modifiziert nach DUNBAR et al. (2002)	20
Tab. 3	Überblick über die Versuchsparameter der in dieser Studie durchgeführten Dot Immunoassays.....	39
Tab. 4	Überblick über die Versuchsparameter der durchgeführten ELISA.....	42
Tab. 5	Zeitschema der Immunisierung von Katzen, Blutentnahmen und abschließender Kastration.....	55
Tab. 6	Aminosäurepositionen der sechs synthetischen Peptide in der ZPB2 Gesamtsequenz, basierend auf den identifizierten Epitopen und Reaktivität zum Anti-fZP Antiserum in Dot Immunoassay und ELISA.....	63
Tab. 7	Bindung vorinkubierter frischer Nebenhodenspermien an die feline Zona pellucida <i>in vitro</i> gereifter bzw. ungereifter (nackter) Oozyten.....	66
Tab. 8	<i>In vitro</i> Fertilisation von Katzenoozyten mit frischen Nebenhodenspermien, welche mit entweder 1 µg/ml Peptid P3 oder P6 für 1 h vorinkubiert wurden.....	66
Tab. 9	Bindung frischer bzw. kryokonservierter Spermien an die feline Zona pellucida <i>in vitro</i> gereifter und ungereifter (nackter) Oozyten in Anwesenheit von jeweils 10%igem Ratten-normalserum (Kontrolle), bzw. Ratten Anti P3-Antiserum oder Ratten Anti-P6 Antiserum.....	68
Tab. 10	<i>In vitro</i> Fertilisation von Katzenoozyten und frischen bzw. kryokonservierten Spermien in Anwesenheit von jeweils 10% der folgenden Antiseren: Rattennormalserum (Kontrolle), Ratten Anti-P3 Antiserum oder Ratten Anti-P6 Antiserum. Die Befruchtungsrates bezieht sich auf die Anzahl gereifter Oozyten....	68
Tab. 11	Ergebnis der Titerbestimmung aus den Katzen Anti-Peptid Antiseren gemessen via Dot Immunoassay.....	70
Tab. 12	Ergebnis der Titerbestimmung aus den Katzen Anti-Peptid Antiseren gemessen via ELISA.....	73
Tab. 13	Vergleich der Maximaltiter der 9 immunisierten Katzen, ermittelt via Dot Immunoassay bzw. ELISA.....	73

Tab. 14 Ergebnisse visueller Untersuchung der Gonaden immunisierter und kastrierter Katzen.....	75
Tab. 15 Ergebnisse der Messung der Östradiol- und Progesteronwerte immunisierter Katzen aus dem Präimmunserum (1. Serum) und der letzten Blutentnahme 6 Monate später (7. Serum)	79
Tab. 16 Trächtigkeitsbefund für die Katzen 1-9 anhand der Uterus- und Gelbkörperbefunde sowie der Östradiol- und Progesteronwerte.....	80

8.4 Verzeichnis der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Herstellerbezeichnung	Hersteller	Land
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	Roche Diagnostics GmbH	Deutschland
4,4-Dicarboxy-2,2-biquinolin-Na ₂	Bicinchoninic acid disodium salt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
Antibiotische-antimykotische Lösung	Antibiotic Antimycotic Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
Atipamezolhydrochlorid Antisedan	Antisedan	Pfizer Inc.	USA
BSA	Albumin, Bovine (A-9418)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Dimethyl sulfoxide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
ECL Advance Western Blotting Detection Kit	ECL Advance Western Blotting Detection Kit	Amersham Biosciences	USA
ECL Western Blotting Detection Reagents Kit	ECL Western Blotting Detection Reagents Kit	Amersham Biosciences	USA
EDC (1-Ethyl-3-[3-Dimethylamino-propyl] Carbodiimid-Hydrochlorid)	Cyanamide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
Freundsches Adjuvans	Freund's Adjuvant, complete	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
FSH	Follicle Stimulating Hormone from porcine pituitary	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
Gentamizin	Gentamicin solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
H ₂ O ₂ -Harnstoff	Harnstoff -Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland
Heparin	Heparin sodium	Serva Electro-phoresis GmbH	Deutschland
HEPES-Lösung	HEPES buffer solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
Hoechst 33258	Hoechst 33258	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
Inkomplettes Freundsches Adjuvans	Freund's Adjuvant, incomplete	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
Ketamin-Hydrochlorid	(Ketamine™ 10%)	Essex Pharma GmbH	Deutschland
KLH	Imject® Maleimide Activated mcKLH Kit	Pierce Biotechnology Inc.	USA
LH	Luteinizing Hormone from equine pituitary	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
M199	M199 with Earle's salts, L-Glutamine und sodium bicarbonate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
Milchpulver	Magermilchpulver Instant	Töpfer GmbH	Deutschland
N,N-Dimethylformamid (DMF)	N,N-Dimethylformamide (DMF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
Natrium-Azid	Sodium azide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
Natrium-Lactat	Sodium DL-lactate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
Natrium-Pyruvat	Sodium pyruvate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
Orcein	Orcein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
Paraformaldehyd	Paraformaldehyde	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
POD konjugiertes Kaninchen Anti-Katzen-IgG	Polyclonal antibody to felines IgG – HRP (Kaninchen)	Acris Antibodies GmbH	Deutschland
POD konjugiertes Kaninchen Anti-Ratten-IgG	Rabbit Anti-Rat IgG - Peroxidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland

Bezeichnung	Herstellerbezeichnung	Hersteller	Land
POD-konjugiertes Ziege Anti-Kaninchen-IgG	Goat Anti-Rabbit IgG - Peroxidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
Rattennormalserum	Rat Serum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
Soja Lezithin	Soja Lezithin (Phospholipon G90)	Nattermann GmbH	Deutschland
TES	TES N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]2-aminoethanesulfonic acid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
Triton-X100	Triton® X –100 solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
Tyrode-Salzlösung (Nr. T 2397)	Tyrode's Salts, liquid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
Xylazin-Hydrochlorid	Xylazine Hydrochlorid (Xyla™ 2%)	Interchemie werken De Adelaar Eesti AS	Niederlande
Zystein	L-Cystein, free base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland

Danksagung

Mein Dank geht zunächst an Prof. Dr. Heribert Hofer für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Ich danke Dr. Katarina Jewgenow für die Überlassung des Themas sowie insbesondere dafür, dass sie mir als fachliche Betreuerin und Lehrerin jederzeit hilfreich zur Seite stand.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Burkhard Micheel für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit seitens der Universität Potsdam, sowie für die fachlichen Ratschläge und Hilfestellungen bedanken.

Für die Bereitstellung des Probenmaterials danke ich dem Tierheim Berlin.

Herzlichen Dank allen Mitarbeitern des Instituts für Zoo- und Wildtierforschung, die mich unterstützten, insbesondere jedoch der Forschungsgruppe Reproduktionsbiologie für die tatkräftige Hilfe und die Aufnahme in die Gemeinschaft.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Marlies Rohleder und Christiane Franz für die geduldige, tatkräftige und lehrreiche Unterstützung im Labor.

Ich danke Dr. Alexa Greube für die Herstellung der Liposomen und die Unterstützung bei den Kopplungen, sowie Dr. Sergei Naidenko für die kompetente Betreuung der Katzen am „A.N. Severtsov Institut für Ökologie und Evolution“ in Tschernogolovka. Für die Einarbeitung in die Kryokonservierungstechnik danke ich Dr. Steffen Blottner.

Ein herzliches Dankeschön den fleißigen Korrekturlesern Dr. Gunnar Steidel, Klaus Ringleb und Martina Thoms.

Vielen herzlichen Dank an Dr. Jenni Schön für beständige Freundschaft, gemeinsame Leidenschaften und die histologische Aufarbeitung der Ovarien und Uteri.

Mein besonderer Dank gilt Andrea Krause für die Freundschaft, die Geduld und Nachsicht mit mir und ihren unermüdlichen Einsatz uns heitere Stunden zu bereiten.

Dr. Matthias Brede danke ich für den nötigen Rückhalt während der Endphase meiner Arbeit.

Vielen Dank allen Familienmitgliedern und Freunden für Verständnis, Geduld und Unterstützung.

Für einen Ausgleich ganz besonderer Art und die unglaublich phantastische Erfahrung, eine Pandabärin zu trainieren, sorgten „Yenne“ und viele fleißige Mitarbeiter des Zoos Berlin – vielen Dank Euch allen dafür.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Jennifer Ringleb
Geburtsdatum: 19. November 1974 in Hannover
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1988 – 1994
Gymnasium Uetze
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung:

1994 – 1996
Grundstudium der Biologie
Technische Universität Braunschweig

1996 – 2000
Hauptstudium in der Spezialisierungsrichtung „Ökologie und Naturschutz“
Universität Potsdam
Abschluß: Diplom Biologin

1999 – 2000
Diplomarbeit mit dem Thema „Auswirkung der Kastration auf das Verhalten und die Größe freilebender Gruppen der Hauskatze“

2000 – 2004
Doktorandin am Institut für Zoo- und Wildtierforschung.
Thema der Dissertation: „Identifikation antigener Determinanten des ZPB2 Proteins der Hauskatze und Charakterisierung ihrer kontrazeptiven und immunogenen Eigenschaften“

Weitere Tätigkeiten:

2000 – 2002
Weiterbildung am Institut für angewandte Ethologie und Tierpsychologie (I.E.T.), Hirzel, Schweiz
Abschluß: Tierpsychologische Beraterin (I.E.T.)

2002 – 2004
Leitung des Konditionierungs-Trainings eines weiblichen Großen Pandas (Zoo Berlin) zur Durchführung von transabdominalen Ultraschalluntersuchungen sowie artifizieller Insemination

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 05.06.2004

Jennifer Ringleb