

Institut für Tierwissenschaften, Abt. Tierzucht und Tierhaltung
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

**Funktionelle Analyse von PLCζ
mit Bezug zur Aktivierung boviner Eizellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades

Doktor der Agrarwissenschaft
(Dr. agr.)

der
Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt im Oktober 2005

von

Heike Müller

aus Darmstadt

D98

Referent: Prof. Dr. K. Schellander

Korreferent: PD Dr. M. Montag

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2005

Erscheinungsjahr: 2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn

http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Es gibt drei Wege, klug zu werden:
Der erste ist der Weg des Nachdenkens,
Das ist der Edelste.
Der zweite ist der Weg des Nachahmens,
Das ist der Leichteste.
Und der dritte ist der Weg der eigenen Erfahrung,
Das ist der Bitterste.

Chinesisches Sprichwort

Funktionelle Analyse von PLC ζ mit Bezug zur Aktivierung boviner Eizellen

Bei den Eizellen der Säugetiere aktiviert das fertilisierende Spermium die Entwicklung der Eizelle, indem es eine langanhaltende Folge von Oszillationen der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration auslöst. Ca²⁺-Oszillationen sind für die Initiation der Eizellaktivierung und der Embryonalentwicklung unerlässlich. Der genaue Mechanismus, der die intrazellulären Calciumoszillationen auslöst, ist immer noch ungeklärt. Es existieren jedoch vermehrt Studien, die auf einen Botenstoff, den Spermienfaktor (SF) hinweisen. Dieser Spermienfaktor wird vom fertilisierenden Spermium zum Zeitpunkt der Gametenfusion in das Ooplasma der Eizelle entlassen. Eine Theorie der Signalübermittlung bei der Fertilisation ist, dass der SF auf diese Weise die Ca²⁺-Oszillationen auslöst. Kürzlich wurde von Saunders et al. (2002) diese spermien-spezifische Protein identifiziert als eine neue Isoform der Phospholipase C (PLC ζ). Es wurde gezeigt, dass PLC ζ in der Lage ist, in unfertilisierten Mäuseizellen Ca²⁺-Oszillationen hervorzurufen.

Wir untersuchten zunächst die Ca²⁺-Oszillationsmuster in bovinen IVM Eizellen nach Mikroinjektion eines Spermienextraktes, der den SF enthielt. Es wurde beobachtet, dass die Ca²⁺-Freisetzung in einer Dosis-abhängigen Form erfolgt. Wir wiesen weiterhin nach, dass in vivo-gereifte Eizellen sensitiver auf die Anwesenheit eines Eizell-aktivierenden Faktors reagieren als IVM Eizellen. Sie exprimieren ein gleichmäßigeres Oszillationsmuster. Ferner berichten wir, dass die Injektion einer komplementären RNA der bovinen PLC ζ in verschiedenen Konzentrationen nicht in der Lage ist, in bovinen IVM Eizellen Ca²⁺-Oszillationen auszulösen. Dieses Ergebnis widerspricht den Resultaten anderer Arbeitsgruppen (Malcuit et al. 2005). Andererseits konnten wir in 2 von 5 injizierten in vivo-maturierten Eizellen sowohl eine transiente Ca²⁺-Freisetzung, als auch eine Oszillation beobachten.

In dieser Arbeit können wir die Wirkung eines Spermienextraktes auf die Ca²⁺-Ausschüttung in bovinen Eizellen aus dem in vitro-System und dem in vivo-System bestätigen. Die Detektion von Ca²⁺-Oszillationen in bovinen Eizellen unterschiedlichen Ursprungs betreffend könnte darauf hinweisen, dass PLC ζ auch beim Rind der Eizell-aktivierende Faktor sein könnte. Es bedarf jedoch noch weiterer Forschung, um die Ca²⁺-freisetzende Wirkung von PLC ζ in bovinen Eizellen zu bestätigen.

Functional analysis of PLC ζ regarding activation of bovine oocytes

In mammalian eggs, the fertilizing sperm activates development of the oocyte by inducing a prolonged series of oscillations in cytosolic free Ca²⁺ concentration. Ca²⁺ oscillations are essential for initiation of egg activation and embryonic development. Although the exact mechanism leading to initiation of intracellular calcium oscillations still remains unclear, accumulating studies suggest that a substance, termed sperm factor (SF), is delivered from the fertilizing sperm into the ooplasm after gamete membrane fusion. One theory of signal transduction at fertilization is that this SF causes the Ca²⁺ oscillations. Recently, this sperm-specific protein was identified as a novel isoform of a phospholipase C (PLC ζ) (Saunders et al. 2002). It was shown that PLC ζ triggers Ca²⁺ oscillations in unfertilized mouse oocytes.

We examined the patterns of Ca²⁺ signalling in bovine IVM oocytes upon microinjection of crude sperm extracts of different concentrations which contain the SF. It is observed that Ca²⁺ release as a response to a soluble activating SF are dose-dependent. We present evidence that in vivo matured bovine oocytes are more sensible towards the presence of an oocyte-activating factor than IVM oocytes, and elicit a more consistent oscillation pattern.

Further we report that microinjection of the complementary RNA for bovine PLC ζ in different concentrations does not cause Ca²⁺ oscillations in bovine IVM oocytes. This finding is in contradiction to earlier results (Malcuit et al. 2005). On the contrary, we could detect a transient Ca²⁺ release in 2 from 5 injected in vivo matured bovine oocytes.

In this thesis, we could confirm the effect of a sperm extract on the Ca²⁺ releasing ability of bovine IVM and in vivo oocytes. Regarding the detection of Ca²⁺ oscillations in bovine oocytes of different origins upon the injection of a cRNA of PLC ζ , we can say that PLC ζ could be the oocyte-activating factor also in the bovine. Yet, further work has to be done to confirm the Ca²⁺-releasing ability of PLC ζ in oocytes.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Weiblicher und männlicher Gamet	3
2.2	Maturation der Eizelle	4
2.3	Fertilisation	4
2.4	Aktivierung der Eizelle bei der Fertilisation	5
2.4.1	Frühe Ereignisse der Eizellaktivierung	6
2.4.2	Späte Ereignisse der Eizellaktivierung	7
2.5	Calcium	8
2.5.1	Calcium und der Zellzyklus	8
2.5.2	Calcium und die Eizelle	10
2.5.3	Calcium und Maturation	12
2.6	Entstehung der $[Ca^{2+}]_i$ -Ausschüttung	13
2.7	Aktivierungsmodelle	15
2.7.1	Das Membranrezeptor-Modell	16
2.7.1.1	Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor	16
2.7.1.2	Der Tyrosinkinase-gekoppelte Rezeptor	18
2.7.1.3	Fertilin	19
2.7.1.4	Integrine	19
2.7.2	Das Spermienfaktor-Modell	20
2.8	Kandidatenproteine	24
2.8.1	Oszillin	25
2.8.2	Truncated c-kit (tr-kit)	25
2.8.3	PT32	26
2.9	Phospholipase C	27
2.9.1	Isoformen der Phospholipase C	27
2.9.2	Unterschiedliche Reaktionswege der PLC-Isoformen	28
2.9.3	Eine neue Isoform: Phospholipase C ζ	29
2.9.4	Lokalisierung von PLC ζ	31

2.9.5	Oszillationsauslösende und speziesübergreifende Eigenschaften von PLCζ	31
3	Material und Methoden	34
3.1	Übersicht über die Versuche	34
3.2	Chemikalien	35
3.2.1	Salze	35
3.2.2	Lösungen	35
3.2.3	Weitere Reagenzien	36
3.2.4	Zusammengesetzte Reagenzien	37
3.2.5	Puffer	38
3.3	Kulturmedien	39
3.4	Kommerzielle Kits	41
3.4.1	Enzyme	41
3.5	Geräte	41
3.6	Verwendete Software	42
3.7	Molekulargenetische Methoden	42
3.7.1	RNA Isolation	42
3.7.2	cDNA-Synthese	43
3.7.3	Primer-Design	44
3.7.4	PCR-Bedingungen	45
3.7.5	DNA-Isolation aus dem Agarose-Gel	46
3.7.6	Ligation	47
3.7.7	Transformation	47
3.7.8	PCR zur Ligationskontrolle	48
3.7.9	Sequenzierung	48
3.7.10	cRNA-Synthese	49
3.8	In vitro-Methoden	51
3.8.1	Gewinnung des Bullensamens	51
3.8.2	Aufbereitung des Ejakulates	51
3.8.3	Bereitung des Spermienextraktes	52
3.8.4	Gewinnung der Ovarien	52

3.8.5	Gewinnung der Eizellen	53
3.8.6	In vitro-Maturation der Eizellen	54
3.8.7	Gewinnung in vivo-gereifter Eizellen	54
3.9	Fluoreszenzoptischer Nachweis der $[Ca^{2+}]_i$ Oszillation	55
3.9.1	Färbung der Eizellen mit dem $[Ca^{2+}]_i$ sensitiven Farbstoff Fluo 4-AM	55
3.9.2	Mikroinjektion der Eizellen	57
3.9.3	Erfassung der $[Ca^{2+}]_i$ Oszillationen	59
3.10	Statistische Auswertung	59
4	Ergebnisse	60
4.1	Erhalt der Reaktionsfähigkeit der Eizelle nach der Fluoreszenzfärbung	60
4.2	Mikroinjektion eines bovinen Spermienextraktes in Rindereizellen	62
4.2.1	Injektion boviner Spermienextrakte unterschiedlicher Konzentrationen in IVM Eizellen und Messung der Ca^{2+} -Freisetzung	62
4.2.2	Vergleich der Ca^{2+} -Freisetzung in IVM und in vivo-maturierten Eizellen nach Injektion eines bovinen Spermienextraktes	71
4.3	Mikroinjektion der PLC ζ cRNA in IVM Eizellen	75
4.3.1	Konzentrationsreihe	75
4.3.2	Ausdehnung der Messdauer	78
4.3.3	Vergleich der Ca^{2+} -Freisetzung in in vitro- und in vivo-maturierten Eizellen nach Injektion der PLC ζ cRNA	80
5	Diskussion	83
5.1	Aktivierungskompetenz der Eizellen durch Färbemethode nicht beeinträchtigt	83
5.2	Der $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen auslösende Spermienfaktor	84
5.2.1	Messung der $[Ca^{2+}]_i$ -Ausschüttung	85
5.3	Einfluss des Maturationsstatus in vitro-gereifter Eizellen auf die intrazelluläre Calciumfreisetzung im Hinblick auf ihre Aktivierungskompetenz	86
5.4	Calciumoszillationen nach Injektion des Spermienextraktes in in vivo-gereifte Rindereizellen	87

5.5	PLC ζ ist der gesuchte Spermienfaktor bei der Aktivierung der Säugetiereizelle	89
5.5.1	Bovine PLC ζ cRNA löst keine eindeutigen $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen in IVM Eizellen aus	89
5.5.2	PLC ζ cRNA Injektion in in vivo-gereifte Rindereizellen	92
5.5.3	PLC ζ könnte der aktivierende Spermienfaktor beim Rind sein	92
5.6	Ausblick	94
6	Zusammenfassung	95
7	Literaturverzeichnis	101
8	Anhang	119

Verzeichnis der Abkürzungen

AA	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
ADAM	A Disintegrin and A Metalloprotease domain
ADP	Adenosindiphosphat
AM	Acetomethylester
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-bis-(<i>O</i> -aminophenoxy)-ethane- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Celsius
Ca	Calcium
Ca _i	Intrazelluläre Calciumkonzentration
cADPr	cyclische ADP-Ribose
cdc	cell division cycle
cDNA	komplementär Desoxyribonukleinsäure
COC	Kumulus-Oocyte-Komplex
cRNS	komplementäre Ribonukleinsäure
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
dd	bidestilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotid-Triphosphat
D-PBS ⁻	Dulbecco's Phosphate buffered Saline ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
FA	Formaldehyd
FKS	Fötales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
fw	forward
G	Gauge

g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GNPDA	Glucosamin-6-Phosphat Desaminase
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTP- γ -S	Guanosin-5'-thiophosphat
h	Stunde
h	human, vom Menschen
hCG	human Chorionic Gonadotropin
I _e	Intensität des emittierten Lichts
ICSI	Intracytoplasmatische Spermieninjektion
IP ₃	1,4,5-Inositol-Trisphosphat
IP ₃ R	1,4,5-Inositol-Trisphosphat-Rezeptor
IRD	Internal Repeat Domain
IVM	In vitro-Maturation, in vitro-maturiert
k	Kilo
kb	Kilobasen
l	Liter
M	Molar
MII	zweite meiotische Reifeteilung
m	Meter
m	milli-
m	murin, von der Maus
mA	Milli-Ampere
MAP	Mitogen Activated Protein
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MDC	Metalloprotease-Disintegrin-Cystein-rich domain
min	Minute
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MPM	modifiziertes Parkermedium
μ	mikro-
MPF	Maturation Promoting Factor

MW	Molekulargewicht
NEBD	nuclear envelope breakdown
n	nano
1n	haploider Chromosomensatz
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NO	Stickoxid
OD	optische Dichte
Osm	Osmolalität
ÖCS	östrisches Kuhserum
osz.	oszillierend
p	pico-
PCR	Polymerase Chain Reaction
p.i.	post injectionem, nach der Injektion
PIP ₂	Phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
pSF	porciner Spermienfaktor
PVP	Polyvinylpyrrolidone
PT	perinukleare Theka
PTK	Protein-Tyrosinkinase
re	reverse
RGD	Aminosäuresequenz, die von Integrinen erkannt wird
RyR	Ryanodin-Rezeptor
s	simian, vom Affen
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulphate)
sec	Sekunde
SFK	Protein-Tyrosinkinasen der Src-Familie
SH2,SH3	Src-homologe Domäne 2 bzw. 3
SOAF	sperm-borne activating factor
sp	Spermien, Spermienäquivalente
SSCP	Single Strand Conformational Polymorphism
Tab.	Tabelle
TCM	Tissue Culture Medium

Tm	melting temperature, Schmelztemperatur
TPEN	membranpermeabler Metalchelator: <i>N,N,N',N'</i> -Tetrakis(2-Pyridylmethyl) Ethylendiamin
Tyr	Tyrosin
UTR	untranslated region, nicht-translatierte Region
V	Volt
W	Watt
ZP	Zona pellucida

Tabellenverzeichnis

		Seite
Tabelle 1	Identische und ähnliche Sequenzen zwischen PLC Isoformen von Säugern	30
Tabelle 2	Zusammenfassung der molekularen Eigenschaften der bisher gefundenen PLC ζ -Sequenzen verschiedener Spezies	32
Tabelle 3	Anzahl und Anteil der Eizellen, die nach Injektion eines bovinen Spermienextrakts (2 sp/pl bzw. 5 sp/pl) in IVM Rindereizellen im Messfenster 0 bis 60 min mit einer Ca ²⁺ -Freisetzung reagierten	62
Tabelle 4	Anzahl und Anteil der Oszillationsqualität boviner IVM Eizellen nach Injektion eines bovinen Spermienextraktes unterschiedlicher Konzentration (2 sp/pl, 5 sp/pl)	64
Tabelle 5	Oszillationsintervalle von [Ca ²⁺] _i in bovinen IVM Eizellen nach Injektion eines Spermienextraktes der Konzentration 2 sp/pl	68
Tabelle 6	Oszillationsintervalle von [Ca ²⁺] _i in bovinen IVM Eizellen nach Injektion eines Spermienextraktes der Konzentration 5 sp/pl	69
Tabelle 7	Darstellung des Oszillationsbeginns nach Start der Messung nach Anzahl und Anteil injizierter Eizellen der beiden Gruppen	70
Tabelle 8	Durchschnittlicher Beginn der Oszillationen nach Start der Messung und durchschnittliche Oszillationsintervalle der injizierten Eizellen	70
Tabelle 9	Anzahl und Anteil der Ca ²⁺ -Oszillation im Vergleich bei unterschiedlicher Maturationsherkunft	72
Tabelle 10	Darstellung des Oszillationsbeginns nach Start der Messung und des Oszillationsintervalls in vivo-gereifter Eizellen nach Injektion des Spermienextraktes 5 sp/pl	74

Abbildungsverzeichnis

	Seite	
Abbildung 1	Typische Struktur eines tierischen Spermiums	4
Abbildung 2	Kontrollpunkte des Zellzyklus in Hefezellen und Zellzyklus-Stops bei Eizellen unterschiedlicher Spezies	9
Abbildung 3	Schematische Darstellung des initialen Calcium-Peaks und der nachfolgenden Ca^{2+} -Oszillationen	10
Abbildung 4	Das Membranrezeptor-Modell als möglicher Mechanismus der Eizellaktivierung	17
Abbildung 5	Ein löslicher Spermienfaktor wird zum Zeitpunkt der Gametenfusion in das Cytoplasma der Eizellen entlassen	21
Abbildung 6	Schematische Darstellung von PLC ζ im Vergleich zu den bisher gefundenen PLC-Isoformen beim Säuger	29
Abbildung 7	Dendrogramm der Phylogenie übereinandergelegter PLC-Sequenzen vom Säuger	30
Abbildung 8	Schematische Darstellung der Hauptstrukturen der PLC ζ Sequenz von Mensch (h), Affe (s) und Maus (m)	32
Abbildung 9	Schematische Versuchsübersicht	34
Abbildung 10	Die bovine PLC ζ Sequenz mit einer Länge von 2096 bp	45
Abbildung 11	Plasmidkarte und Restriktionsschnittstellen des Vektors pGEM [®] -T	47
Abbildung 12	Plasmidkarte und Restriktionsschnittstellen des Vektors pTARGET [™]	50
Abbildung 13	Mikroskopische Darstellung eines maturierten Kumulus-Oozyten-Komplexes, Qualität 1, die zur Mikroinjektion herangezogen wurden	56
Abbildung 14	Darstellung der Petrischalen, die zur A Injektion und B Färbung der Eizellen eingesetzt wurden.	58
Abbildung 15	Messung der Ca^{2+} -Freisetzung in 5 individuellen Fluo 4-AM gefärbten IVM Rindereizellen bei unterschiedlicher Ionomycin-Endkonzentration	61

Abbildung 16	Ausschnitt aus der Calcium-Oszillation nach Injektion des Spermienextraktes in eine bovine MII-Eizelle	63
Abbildung 17	Darstellung der Ca^{2+} -Oszillationen von 6 individuellen bovinen IVM Eizellen nach Injektion eines bovinen Spermienextraktes der Konzentration 5 sp/pl	65
Abbildung 18	Messung der Ca^{2+} -Freisetzung anhand der Fluoreszenzintensität in 6 individuellen bovinen IVM Eizellen nach Injektion eines bovinen Spermienextraktes mit einer Konzentration von 2 sp/pl	66
Abbildung 19	Darstellung der Ca^{2+} -Oszillationen in in vivo-gereiften Rindereizellen unmittelbar nach Injektion eines bovinen Spermienextraktes (5 sp/pl)	73
Abbildung 20	Die Injektion der PLC ζ cRNA in vier unterschiedlichen Konzentrationen (5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) konnte keine Ca^{2+} -Oszillation in den gemessenen Rindereizellen auslösen	77
Abbildung 21	Messung der Ca^{2+} -Freisetzung zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion der PLC ζ cRNA	79
Abbildung 22	Darstellung der Ca^{2+} -Freisetzung in 5 in vivo-gereiften bovinen Eizellen nach PLC ζ cRNA Injektion	81
Abbildung 23	Vergleichende Darstellung der Ca^{2+} -Freisetzung nach PLC ζ cRNA Injektion in bovinen Eizellen	82
Abbildung 24	Superovulationsprotokoll zur Gewinnung in vivo-gereifter Rindereizellen (COCs)	119/120
Abbildung 25	Spülprotokoll der Gewinnung in vivo-gereifter Rindereizellen (Spendertier Stallnr.1)	121

1 Einleitung

Die Aktivierung der Embryonalentwicklung der Eizelle wird beim Säugetier durch das fertilisierende Spermium ausgelöst. Bei der tierischen Eizelle verursacht der männliche Gamet einen plötzlichen Anstieg der Konzentration freier Ca^{2+} -Ionen im Cytosol der Eizelle (Stricker 1999). Bei den Säugern führt die Verschmelzung von Spermium und Eizelle zu einer bestimmten Abfolge von cytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen, die für die anschließende Entwicklung eines gesunden Embryos unverzichtbar ist (Miyazaki et al. 1993, Stricker 1999). Dieses eindrucksvolle Phänomen der Signalfunktion von Calcium wird durch einen Anstieg der Konzentration von Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP_3), die eine durch IP_3 -Rezeptoren vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus den intrazellulären Speicherorten bewirkt.

Ähnliche „Phänomene“ können auch nach der Injektion eines Spermienextraktes verschiedener Spezies in Mäuseeizellen und genauso in Eizellen der gleichen Spezies beobachtet werden (Swann 1992, Wu et al. 1997). Vieles deutet daraufhin, dass die Calciumfreisetzung durch einen cytosolischen löslichen Faktor ausgelöst und unterhalten wird, den das Spermium bei der Fusion in das Ooplasma entlässt (Jones et al. 1998b).

Bisher wurden viele möglichen Kandidatenproteine diskutiert, doch konnte keines eindeutig ausgemacht werden, wirklich der alleinige oszillationsauslösende Faktor zu sein. Kürzlich fanden Saunders et al. (2002) eine spermien-spezifische Phospholipase C (PLC), die membranständiges Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) in die zwei Botenstoffe IP_3 und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert. Diese neue Isoform von PLC, $\text{PLC}\zeta$, induziert bei isolierter Injektion in Form ihrer cRNA in Mäuseeizellen Ca^{2+} -Oszillationen, die den durch das Spermium ausgelösten Oszillationen ähnlich sind. Weiterhin induziert $\text{PLC}\zeta$ in vitro die murine Embryonalentwicklung bis zur Blastozyste. $\text{PLC}\zeta$ verliert ihre Aktivität zur Oszillation, wenn sie zuvor mit einem Antikörper behandelt wird (Saunders et al. 2002), was stark darauf hinweist, dass $\text{PLC}\zeta$ der seit langem gesuchte aktivierende Spermienfaktor ist. Bisher wurde $\text{PLC}\zeta$ bei der Maus, dem Menschen und dem Rhesusaffen im Nebenhodengewebe identifiziert und sequenziert. Alle Studien beschäftigen sich überwiegend mit der murinen $\text{PLC}\zeta$. Auch die Injektionen erfolgen mit nur wenigen Ausnahmen ausschließlich in Mäuseeizellen (Mehlmann et al. 2001, Cox et al. 2002, Saunders et al. 2002, Rogers et al. 2004, Yoda

et al. 2004). Eine Studie aus 2005 weist die Ca^{2+} -Freisetzung in Form von Oszillationen in der Rindereizelle durch die murine PLC ζ cRNA nach (Malcuit et al. 2005).

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob eine rekombinante Form von PLC ζ vom Rind in der Lage ist, in Eizellen der gleichen Spezies Ca^{2+} -Oszillationen in vitro auszulösen. Im positiven Falle sollte erfasst werden, wann die Oszillationen in der Rindereizelle auftreten und wie sie in ihrer Frequenz aussehen. Dazu wurde die PLC ζ in Form einer cRNA in verschiedenen Konzentrationen in Rindereizellen mikroinjiziert und die Qualität und Quantität der Ca^{2+} -Freisetzung mittels Fluoreszenzoptik erfasst. Die Injektion eines Spermienextraktes eines fertilitätsgeprüften Bullen diente als Kontrolle der Reaktionsfähigkeit der Eizellen des Maturationszyklus bei jedem Versuchsdurchgang.

2 Literatur

2.1 Weiblicher und der männlicher Gamet

Die Eizelle und das Spermium sind der Ursprung eines jeden Lebewesens. Die Gametogenese resultiert in der Bildung zweier extrem hoch differenzierter, nicht-proliferativer und gleichzeitig terminierter haploider Zellen. Als Gameten stehen sie an erster Stelle der Embryonalentwicklung. Sie sind mit unterschiedlichen Fähigkeiten ausgestattet, eine erfolgreiche Befruchtung durchzuführen. Jedoch haben sie nur eine kurze Lebensdauer. Beim Rind beträgt die Lebensfähigkeit der Eizelle nach der Ovulation zwischen 20 und 24 h, beim Spermium liegt die Befruchtungsfähigkeit im Genitaltrakt bei etwa 24 bis 48 h (Tarosz 1961, Vanderplaessche and Paredis 1948).

Die Eizelle enthält Strukturen, die verhindern, dass mehr als ein Spermium eindringen kann und so die Anzahl der Chromosomensätze konstant gehalten wird. Sie ist von einer schützenden Glykoproteinschicht, der Zona pellucida (ZP), umgeben. Daneben ist sie in der Lage, nachdem ein Spermium eingedrungen ist, in Form der Kortikalreaktion die Plasmamembran chemisch so zu verändern, dass selbst ein weiteres Spermium, das die Barriere der ZP überwunden hat, nicht in das Zytoplasma der Eizelle vordringen kann.

Das Spermium (Abb. 1) besteht größtenteils aus dem Zellkern, der den einfachen Chromosomensatz (1n) enthält, Mitochondrien als Energielieferanten für die Vorwärtsbewegung, und einer Geißel (Schwanz) für die Bewegung. Es besitzt Mechanismen, die ihm das Eindringen in die Eizelle erleichtern. In seiner Kopfkappe befinden sich Stoffe, die in der Lage sind, die Eizelle zu aktivieren und dabei helfen, die männliche Erbinformation in das Zytoplasma der Eizelle zu befördern (Yanagimachi 1994).

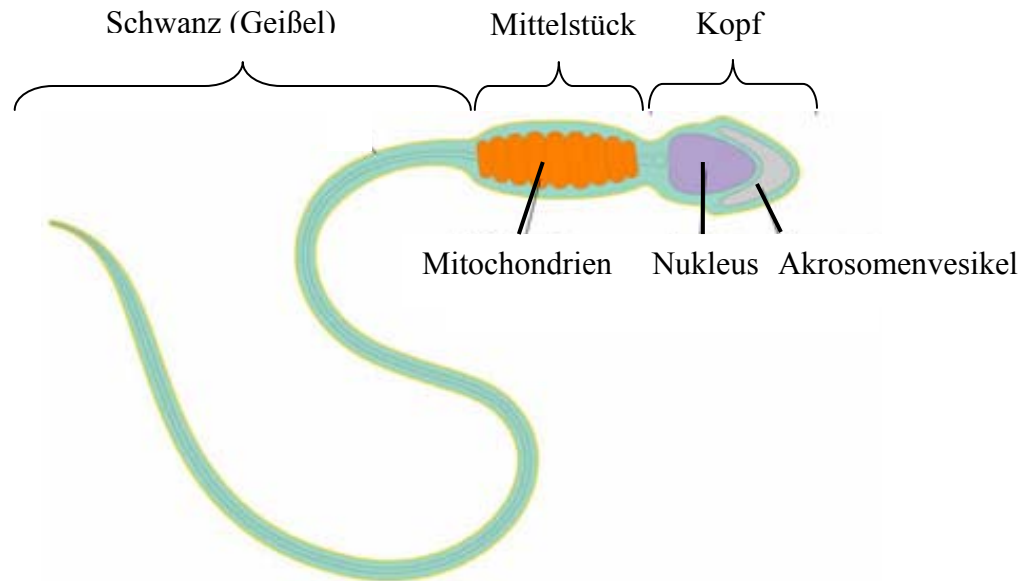


Abbildung 1: Typische Struktur eines tierischen Spermiums

2.2 Maturation der Eizelle

Während der Maturation (Reifung) erfährt die Eizelle sowohl strukturelle als auch regulatorische Veränderungen. Diese Veränderungen befähigen die Eizelle anschließend, bei der Fertilisation auf das eindringende Spermium zu reagieren. Veränderungen sind zum Beispiel das Fortschreiten des Zellzyklus bis zur Metaphase der zweiten Meiose (Yanagimachi 1994).

2.3 Fertilisation

Eine befruchtungsfähige Säugereizelle befindet sich im Stadium der Metaphase der zweiten meiotischen Reifeteilung (MII). Dieses Stadium stellt einen Ruhezustand, eine Arretierung, der Eizelle dar. Bei anderen Spezies liegt diese Arretierung entweder vor, während oder nach der Meiose (Sagata 1996).

Bei der Fertilisation aktiviert das Spermium die Eizelle zur Wiederaufnahme des Zellzyklus und dem Beginn der embryonalen Entwicklung. Das Stadium, in dem die Eizelle in ihrem Zellzyklus bis zur Befruchtung arretiert ist, variiert bei den Spezies. Zum Beispiel ist es bei *Spisula* und *Urechis* die erste meiotische Prophase, bei den

Ascidien die erste meiotische Metaphase, in fast allen Vertebraten die zweite meiotische Metaphase und beim Seeigel ist es die G1-Phase der ersten Mitose (Stricker 1999). Damit das Spermium die Eizelle erfolgreich fertilisieren kann, muss es zunächst zwei natürliche Barrieren der Eizelle überwinden. Zum einen ist dies der die Eizelle umgebende Komplex aus hyaluronsäurehaltigen Granulosazellen, die Kumuluszellschicht. An der Oberfläche trägt das Spermium Enzyme, die die Struktur des Kumulus auflösen. Erst die Hyperaktivität des Spermiums nach dessen Kapazitation (Reifung zur Befruchtungsfähigkeit) erlaubt die Durchdringung des Kumulus. Während der Durchdringung der Kumuluszellschicht kommt es bereits zur Vesikulation der Kopfkappe des Spermiums. Die zweite Barriere für das Spermium ist die Zona Pellucida (ZP). Die ZP ist eine gallertartige Matrix bestehend aus drei Glykoproteinen (ZP1, ZP2, ZP3). Durch die Bindung des Spermiums an einen Rezeptor an ZP3 an die ZP kommt es zur Freisetzung des Kopfkappeninhaltes (Akrosomreaktion). Die enzymatische Aktivität des Kopfkappeninhaltes erlaubt es nun dem männlichen Gameten, die Glykoproteinschicht der ZP zu durchdringen. Schließlich kann die Plasmamembran des postakrosomalen Bereichs des akrosomreagierten Spermiums mit der Cytoplasmamembran, dem Oolemm, der Eizelle verschmelzen (Fertilisation). Als Folge der Verschmelzung der Gameten wird die Eizelle aus ihrer Arretierung gelöst, die zweite Reifeteilung wird nun beendet. Das weibliche Erbgut formt den weiblichen Vorkern. Weiblicher und männlicher Vorkern verschmelzen schließlich (Syngamie). Die so entstandene Zygote beginnt die Embryonalentwicklung.

2.4 Aktivierung der Eizelle bei der Fertilisation

Die Eizellaktivierung induziert eine Reihe aufeinander abgestimmter morphologischer und biologischer Prozesse. Einige geschehen innerhalb von Sekunden oder Minuten nach der Interaktion von Spermium und Oolemm, andere wiederum finden über einen Zeitraum von mehreren Stunden statt (Yanagimachi 1994, Schultz and Kopf 1995).

2.4.1 Frühe Ereignisse der Eizellaktivierung

Eines der frühesten Ereignisse der Eizellaktivierung ist ein Anstieg der Konzentration an intrazellulärem Calcium $[Ca^{2+}]_i$. Bei Säugern oszillieren diese Niveaus von intrazellulärem Calcium wiederkehrend über einen Zeitraum von bis zu mehreren Stunden nach der Gametenfusion (Cuthbertson et al. 1981, Miyazaki and Igusa 1981, Miyazaki et al. 1993). Dieser oszillierende Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration löst zunächst die frühen Ereignisse der Eizellaktivierung aus. Das ist zuerst die Exozytose kortikaler Granula, die in der Rindenregion der Eizelle, unter der Plasmamembran, lokalisiert sind (Abbott and Ducibella 2001). Diese Granula enthalten Enzyme, die sobald sie in den perivitellinen Spalt der Eizelle freigesetzt werden, eine Modifikation der Zona pellucida (ZP) verursachen, das sogenannte ZP-Hardening. Diese strukturelle Veränderung der ZP verhindert ein Binden und Eindringen von weiteren Spermien an und in die Eizelle (Bleil and Wassarman 1981, Endo et al. 1987). Strukturelle Veränderungen der ZP stellen einen wichtigen Mechanismus bei einigen Säugertierarten dar. Auch beim Menschen existiert diese Reaktion, die eine Polyspermie verhindern soll. Es gibt ebenfalls Hinweise auf einen Polyspermieblock auf der Ebene der Plasmamembran. Dieser Mechanismus hat zum Beispiel bei Kaninchen eine große Bedeutung (Yanagimachi 1994).

Der Kontakt des Spermiums mit dem Zytoplasma der Eizelle verursacht Veränderungen in der Zusammensetzung der Bestandteile des Spermienkopfes. Während der Spermiogenese im Hoden wird das Spermienchromatin in einer hochkondensierten Struktur verpackt. Dieser Prozess erfordert den Austausch der Histon-Proteine gegen Protamine (Yanagimachi 1994). Zusätzlich wird der Nukleus von einer Struktur umhüllt, die perinukleare Theca (PT) genannt wird. Sie besteht aus mindestens sechs bestimmten Proteinen (Oko et al. 2001). Kurz nach der Gametenfusion kommt es zum Zusammenbruch der Kernmembran des Spermiums (sperm nuclear envelope breakdown, NEBD) und die perinukleare Theca wird entfernt. Im Anschluss an den NEBD kommt es zur Dekondensation des Spermienchromatins. Während der Dekondensation werden die Protamine, die das Chromatin umschließen, wieder gegen Histone aus dem Eizellcytoplasma zurückgetauscht.

2.4.2 Späte Ereignisse der Eizellaktivierung

Neben den frühen Ereignissen der Eizellaktivierung existieren auch späte Ereignisse. Ein kritisches Ereignis ist hier die Vollendung der zweiten meiotischen Reifeteilung. Die unbefruchtete Eizelle befindet sich zum Zeitpunkt der Fertilisation in einem metabolischen Ruhezustand. Die Eizelle steht unter dem Einfluss des maturation promoting factor (MPF) (Verlhac et al. 1993). MPF nimmt Einfluss auf den Zellzyklus. Er besteht aus zwei Untereinheiten: der p34^{cdc} Kinase und Cyclin B. MPF ist verantwortlich für die Induktion der Spindelausbildung, der Chromatinkondensation und den Zusammenbruch der Kernmembran der Eizelle (Murray and Hunt 1993). Kurz nach der Gametenfusion verursacht ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration den Abbau von Cyclin (Lorca et al. 1993). Aufgrund des Aktivitätsverlustes und der Inaktivierung von MPF kann das weibliche Chromatin in die Anaphase II eintreten (Murray and Hunt 1993).

Eine weitere Proteinkinase, die für die Regulation des meiotischen Zellzyklus wichtig ist, ist die mitogen-activated protein (MAP) Kinase. Man nimmt an, dass MAP Kinasen chromosomale Proteine phosphorylieren, die für eine Aufrechterhaltung des kondensierten Zustandes des Chromatins während des Überganges von Meiose I zu Meiose II zuständig sind. Außerdem sollen sie die Bildung der Kernmembran durch Phosphorylierung der nuklearen Schichten verhindern (Murray and Hunt 1993). Während der Eizellaktivierung beginnt die MAP Kinase etwas später als MPF ihre Aktivität zu verlieren. Dieser Aktivitätsverlust ist die Voraussetzung für eine reibungslose Bildung der Vorkernmembran (pronuclear envelope) (Moos et al. 1995).

Der Eintritt in die mitotische Zellteilung, also der Beginn der Embryonalentwicklung, kann nur erfolgen, wenn die Meiose II abgeschlossen wird. Dafür verantwortlich ist ein plötzlicher Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration im Cytosol der Eizelle (Kline and Kline 1992, Whitaker and Swann 1993). Der Zellzyklus wird durch ein Gleichgewicht aus den Aktivitäten unterschiedlicher Kinasen und Phosphatasen bestimmt, die ihrerseits die Aktivität zellulärer Proteine steuern. Morphologische Veränderungen, die bei der Vollendung der zweiten meiotischen Reifeteilung beobachtet werden können, beinhalten die Rotation der Metaphasespindel in einigen Spezies, den Eintritt in die Anaphase und die Abschnürung des zweiten Polkörpers. An diesem Punkt wird das Erbgut des weiblichen Gameten haploid (1n).

2.5 Calcium

Calcium stellt einen Botenstoff dar, der in der Kontrolle des Zellzyklus eine zentrale Rolle einnimmt.

Das primäre Ereignis der Signaltransduktion bei der Fertilisation in allen untersuchten Säuger-Eizellen ist ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, gefolgt von Oszillationen (Maus: Cuthbertson and Cobbold 1985, Hamster: Miyazaki 1991, Schwein: Sun et al. 1992, Rind: Fissore et al. 1992, Ratte: Ben-Yosef et al. 1993, Kaninchen: Fissore and Robl 1993, Mensch: Taylor et al. 1993). Calcium agiert hierbei als wichtiger sekundärer Botenstoff in allen bisher untersuchten Spezies (Miyazaki et al. 1993). Calcium wirkt als Botenstoff auf eine Reihe von Proteinen, die den Zellzyklus kontrollieren. Dynamische Messungen von $[Ca^{2+}]_i$ zeigten, dass es während der Fertilisation zu einer sichtbaren Veränderung innerhalb der Säugetiereizelle kommt.

2.5.1 Calcium und der Zellzyklus

Die verschiedenen Spezies machen sich die universelle Funktion von Calcium in ihrem Zellzyklus zunutze. Es gibt Hinweise darauf, dass die Regulation der Mechanismen zur Calciumfreisetzung in engem Zusammenhang mit dem Zellzyklus der Eizelle stehen. Während des Wachstums erlangt die Eizelle die Kompetenz zum Abbau des Germinalvesikels. Dies ist das erste Stadium, in dem die Eizelle die ersten spontanen Calciumtransienten produziert (Carroll and Swann 1992, Carroll et al. 1994). Außerdem kennzeichnen zwei Phasen einer erhöhten Sensitivität gegenüber IP_3 während der Maturation die Entwicklung von der Prometaphase zur Metaphase in jeder meiotischen Teilung (Fujiwara et al. 1993). Das lässt vermuten, dass es einen Zusammenhang zwischen den Veränderungen im Cytoplasma und dem Zellzyklus des Zellkerns gibt. Die Eizelle muss sich in der Metaphase befinden, um die Fähigkeit zu haben, auf ein Spermium reagieren zu können. In den Stadien des Zellzyklus zwischen zwei Metaphasen (Interphase, Bildung des Zellkerns) kann die Eizelle keine Ca^{2+} -Signale hervorbringen (Jones et al. 1995b).

Man hat drei unterschiedliche Kontrollpunkte im Zellzyklus identifiziert: START, ENTRY und EXIT. Diese Kontrollpunkte lassen sich auch auf die Embryonalentwicklung übertragen. Der Kontrollpunkt START bezeichnet den Punkt,

an dem die Entscheidung für Mitose, Meiose, Arretierung oder Konjugation getroffen wird. ENTRY ist der Eintritt in die Mitose, nachdem die DNS-Synthese beendet wurde, und EXIT bedeutet den Ausgang aus der Mitose nach Segregation der Chromosomen. Diese Unterteilung basiert auf den Kontrollpunkten des Zellzyklus von Hefebakterien. In Anlehnung daran lassen sich enge Homologien eukaryotischer Zellen feststellen, die ähnliche Kontrollpunkte aufweisen (Whitaker and Patel 1990). Die Eizellen verschiedener Spezies weisen nun auch verschiedene Kontrollpunkte in ihrer Arretierung auf. So sind die Eizellen von Seeigeln arretiert im Kontrollpunkt START (Yeast I, Abb. 2), die von Seestern und Venusmuschel in ENTRY (Yeast II) und die Eizellen der Säuger und Frosch in EXIT (Yeast III). Die natürliche Arretierung der Eizelle in ihrem Zellzyklus wird durch einen externen Stimulus unterbrochen. Säugetiereizellen sind in der Metaphase der zweiten meiotischen Reifeteilung arretiert, also dem Ende der Meiose. Nur ein Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$, der natürlicherweise durch ein Spermium bei der Fertilisation ausgelöst wird, beendet diesen Ruhezustand.

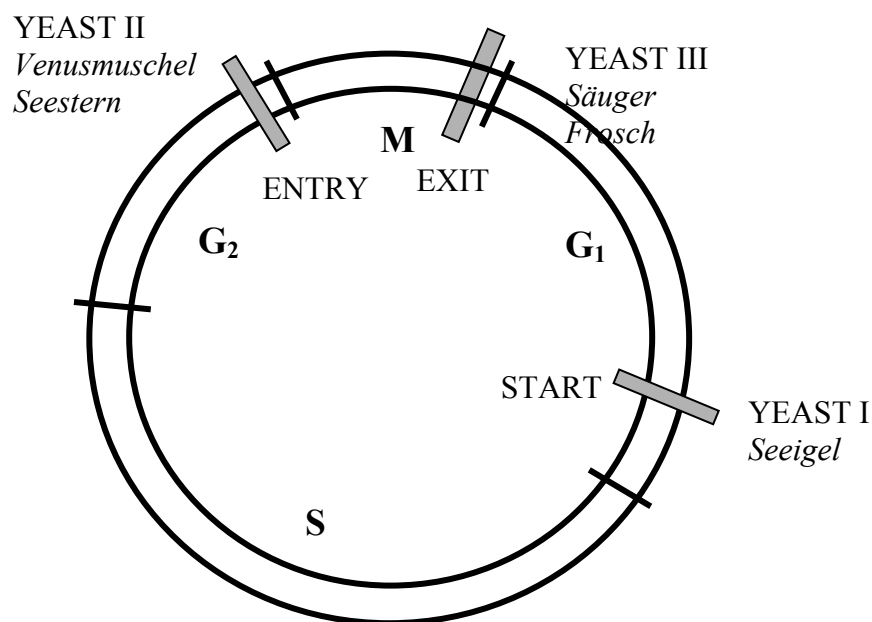


Abbildung 2: Kontrollpunkte des Zellzyklus in Hefezellen und Zellzyklus-Stops bei Eizellen unterschiedlicher Spezies (nach Whitaker and Patel 1990)

2.5.2 Calcium und die Eizelle

Wie bereits erwähnt, kennzeichnet ein Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+} eine erfolgreiche Aktivierung der Eizelle. Dabei unterscheidet man dennoch zwischen Säugern und Nicht-Säugern. Bei vielen Arten der Nicht-Säuger, Echinodermen, Fisch, Frosch und Seeigel gibt es nur einen einzelnen messbaren Konzentrationsanstieg, der sich wellenförmig, ausgehend vom Punkt der Gametenfusion über die Eizelle ausbreitet (Whitaker and Steinhardt 1982, Jaffe 1983, Nucitelli 1991, Whitaker and Swann 1993). Bei ihnen reicht bereits dieser initiale Calciumpeak aus, um Aktivierungsereignisse wie Kortikalreaktion und die Vollendung der Meiose auszulösen (Abb. 3).

Säugetiere hingegen produzieren als Folge der Verschmelzung von Spermium und Eizelle einen initialen Calciumanstieg gefolgt von einer Reihe wiederkehrender, mehrere Stunden andauernder kleinerer Anstiege (Nakada and Mizuno 1998), sogenannte Oszillationen, die bei der Maus etwa zum Zeitpunkt der ersten Interphase (Jones et al. 1995b, Marangos et al. 2003), beim Rind mit dem Eintritt in den ersten mitotischen Zellzyklus bzw. der Bildung des Vorkerns verebben (Miyazaki et al. 1993, Swann and Ozil 1994, Nakada et al. 1995, Jones 1998) (Abb. 3).

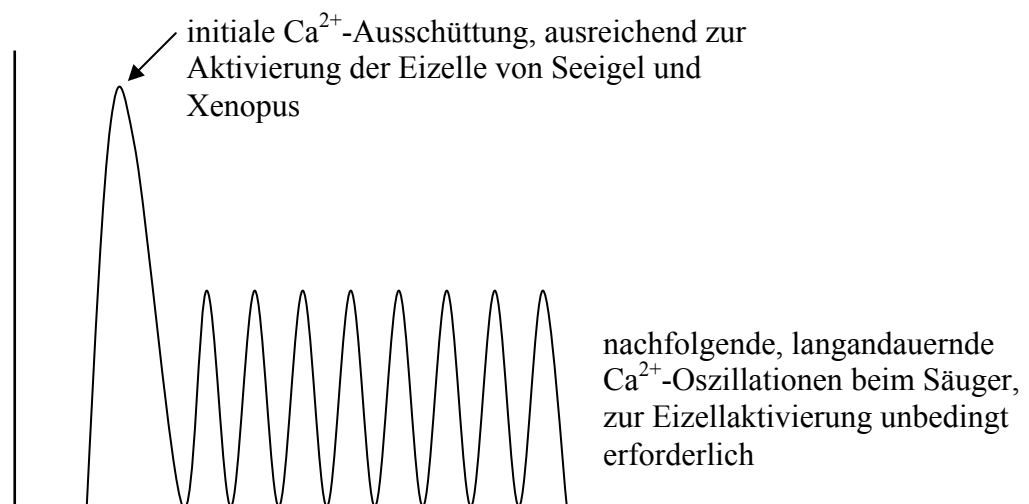


Abbildung 3: Schematische Darstellung des initialen Calcium-Peaks und der nachfolgenden Ca^{2+} -Oszillationen (nach Montag, persönliche Kommunikation).

Der erste Peak entsteht am Ort des Spermieintritts (Miyazaki et al. 1986), die folgenden Oszillationen erscheinen in der Rindenregion (Deguchi et al. 2000). Die Frequenz der Oszillationen variiert zwischen den Spezies. Bei in vitro-Fertilisation der Maus hat man Intervalle von 6 bis 31 min festgestellt (Deguchi et al. 2000), beim Rind von 8 bis 25 min (Fissore et al. 1992) beobachtet. Das Intervall verlängert sich mit fortschreitender Zeit. Die Frequenz ist abhängig von der Tierart, dem Grad an Polyspermie und wahrscheinlich auch der Methode der Calciummessung (Swann and Ozil 1994). Der basale $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel einer in MII ovulierten Säugereizelle beträgt etwa 100 nmol l^{-1} . Der initiale Calciumpeak beginnt innerhalb von 1 bis 3 min nach der Fusion von Spermium und Eizelle. Der Peak dauert etwa 3 bis 6 min mit einer Amplitude, die eine Konzentration von $1 \mu\text{M}$ erreichen kann (Kline and Kline 1992). Dann folgt eine Reihe schnell aufeinanderfolgender Transienten mit hoher Amplitude (6-8faches Basalniveau). Beim Rind dauern diese Oszillationen etwa 22 Stunden an, wobei die Amplitude etwa nach 12 bis 15 Stunden sinkt.

Zahlreiche Untersuchungen belegen die unverzichtbare Gegenwart des Anstiegs der Calciumkonzentration bei der Kortikalreaktion und der Vollendung der zweiten Meiose. Durch die Anwendung von Ca^{2+} -Ionophoren, Strontium oder Ethanol, die extern hinzugegeben, wird die Säugereizelle zu einer parthenogenetischen Aktivierung angeregt. Die Eizelle wird nach dieser Behandlung jedoch nur einen einzelnen Calciumanstieg produzieren (Ozil and Swann 1995), der aber ausreicht, die frühen und späten Aktivierungsereignisse auszulösen. Es kommt zur Kortikalreaktion, der Bildung des zweiten Polkörpers, der Vorkernbildung und DNS-Synthese, bishin zur Blastozystenbildung (Whittingham 1980, Swann and Ozil 1994, Schultz and Kopf 1995). Weitere Untersuchungen belegen die Wichtigkeit von $[Ca^{2+}]_i$ bei der Eizellaktivierung durch den Nachweis des Ausbleibens von Kortikalreaktion, der fehlenden Vollendung der Meiose und fehlender Embryonalentwicklung. Durch den Einsatz des $[Ca^{2+}]_i$ -Chelators BAPTA (1,2-bis-(*O*-aminophenoxy)-ethan-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid) wird der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration verhindert und damit auch sämtliche Aktivierungsereignisse (Kline and Kline 1992, Tombes et al. 1992). Die Aktivierungsrate nach Behandlung mit Ionophoren ist niedrig. Das begründet sich darin, dass die angewendeten Methoden nur einen einzelnen Calciumanstieg verursachen und nicht, wie bei der Fertilisation eine Reihe von Oszillationen (Ozil and Swann 1995). Simuliert man multiple $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten z.B.

durch wiederholte Elektroporation, dann verbessern sich auch die Aktivierungsraten und eine anschließende Entwicklung wird verbessert (Ozil 1990, Ozil and Swann 1995, Jones 1998).

Lawrence et al. (1998) zeigten, dass bei der Fertilisation multiple Oszillationen benötigt werden, indem sie den Ca^{2+} -Chelator TPEN einsetzten. Damit verhinderten sie die Oszillation. Sie stellten so fest, dass bei der Maus mindestens neun aufeinanderfolgende $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege erforderlich sind, um die Eizelle vollständig zu aktivieren.

2.5.3 Calcium und Maturation

Im Verlauf der Eizellreifung (Maturation) beim Säuger wächst die Sensitivität der Eizelle gegenüber Ca^{2+} -freisetzenden Agenzien oder Einflüssen (Jones et al. 1995a, Mehlmann and Kline 1994). Spermien sind in der Lage, auch in immaturren, Germinalvesikel-intakten Eizellen multiple Calciumanstiege auszulösen, doch der erste Peak ist immer viel niedriger in Amplitude und Länge. Erst zwei bis vier Stunden nach dem Zusammenbruch des Germinalvesikels erreicht die Calciumfreisetzung in der Eizelle ein ähnliches Muster wie bei einer matura Eizelle (Mehlmann and Kline 1994). Auch setzen reife Eizelle nach Injektion von IP_3 verhältnismäßig mehr Calcium frei als immature, injizierte Eizellen. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass sich das System der IP_3 -induzierten Calciumausschüttung im Verlauf der Eizellreifung entwickelt, also sozusagen ebenfalls maturiert.

Parallel zur Maturation des Gameten, entwickelt auch das System der Calciumspeicher eine höhere Sensitivität (Fujiwara et al. 1993). Neben der Sensitivität kann man mit Hilfe von Färbemethoden nachweisen, dass sich die räumliche Verteilung des ER im Verlauf der meiotischen Maturation verändert. Mehlmann et al. (1995) wiesen auf diese Weise nach, dass das ER ein filigranes Netzwerk im Cytoplasma bildet, von der Rinde bis ins Innere der Zelle. In der Rinde (Cortex) formt das ER große, helle Cluster, direkt unter der Plasmamembran. Die Calciumspiegel im Cytosol erhöhen die Sensitivität der Cluster, auf denen man eine große Anzahl IP_3 -Rezeptoren findet. Während der Eizellreifung wird die Expression des IP_3 -Rezeptors Typ1 heraufreguliert und seine räumliche Verteilung wechselt von der perinuklearen Region um den Germinalvesikel in die Rinde der MII-arretierten Eizelle (Mehlmann et al. 1995, Shiraishi et al. 1995). Immature Eizellen dagegen besitzen weniger ER cluster in der Rindenregion, dafür

finden sich im Inneren der Eizelle vermehrt Akkumulationen. Diese strukturelle Reorganisation des ER korreliert mit der spermien- bzw. IP_3 -induzierten Ca^{2+} -Ausschüttung.

Doch es gibt auch Hinweise auf den Ca^{2+} -Status der maturierten Eizelle im Verlauf ihrer Alterung. Während der Arretierungsphase der MII-Eizelle gibt es Unterschiede in der Ca^{2+} -Ausschüttung. So reagieren frisch ovulierte Mäusezellen auf die Injektion eines Spermienfaktors (1 mg/ml) mit schwachen Oszillationen, erreichen jedoch die Vorkernbildung und teilen sich normal. Gealterte Eizellen hingegen zeigen 3 h nach der Injektion eine starke zytoplasmatische Fragmentierung (Gordo et al. 2000).

2.6 Entstehung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Ausschüttung

Der Mechanismus, durch den das fertilisierende Spermium den intrazellulären Calciumanstieg in der Eizelle auslöst, ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Das Endoplasmatische Retikulum, der intracytoplasmatische Calciumspeicher, besitzt zwei Familien von Ca^{2+} -Kanälen, die bei der Eizellaktivierung eine tragende Rolle spielen: Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP_3) Rezeptor (IP_3R) und Ryanodin Rezeptor (RyR) (Lai et al. 1988, Furuichi et al. 1989, Ayabe et al. 1995, Mehlmann et al. 1996, Parrington et al. 1998). Diese Rezeptoren reagieren sensitiv auf eine Veränderung der intracytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration. Niedrige Konzentrationen stimulieren ein Öffnen der Kanäle. ab einem bestimmten Schwellenwert blockieren die Kanäle als Folge zu hoher Ca^{2+} -Ionenkonzentrationen (Bezprozvanny et al. 1991, Iino and Endo 1992). Der stimulatorische Effekt niedriger Calciumkonzentrationen verursacht die sogenannte Calcium induzierte Calciumfreisetzung (calcium induced calcium release, CICR). Dieser positive Feedbackmechanismus führt zu einem regenerativen Mechanismus der Calciumfreisetzung, der kleine Konzentrationsveränderungen in großflächige Ca^{2+} -Oszillationen amplifiziert. Nach dem Schließen der Kanäle kann Calcium mit Hilfe von ATPasen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum zurückgeführt werden und so die Speicher wieder auffüllen (Lechleiter et al. 1998, Schuster et al. 2002). Die Eizelle kehrt zu ihrem basalen Calciumspiegel zurück. Auf diese Weise entstehen wiederkehrende Oszillationen (Berridge 1993, Schuster et al. 2002). Der Hauptspeicher in den meisten Zellen für IP_3 ist wie bereits erwähnt das Endoplasmatische Retikulum, und die IP_3 -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung ist ein

gewöhnlicher Vorgang (Keizer et al. 1995). Bereits bei Frosch und Seeigel wurde gezeigt, dass es bei der Fertilisation zu einer Umwandlung von Phosphoinositiden und zur Produktion von IP_3 kommt (Ciapa et al. 1992, Stith et al. 1993). IP_3 entsteht aus der Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP_2) durch die phosphoinositid-spezifische Phospholipase C (PLC). Die Ca^{2+} -Freisetzung während der Aktivierung der Säugereizelle wird dadurch ausgelöst, dass sich IP_3 -Moleküle an ihre entsprechenden Rezeptoren, IP_3R , anlagern. Diese Rezeptoren befinden sich auf der Membranoberfläche der cytoplasmatischen Calciumspeicher der Eizelle (Miyazaki et al. 1992). Dieser Prozess ist bekannt als IP_3 -induzierte Calciumfreisetzung. Der IP_3R selbst ist ein Kationenkanal, der neben der Bindung von IP_3 zusätzlich durch Ca^{2+} -Ionen gesteuert wird. Bindet IP_3 an seinen Rezeptor, so steigt die Sensitivität des Rezeptors gegenüber Calcium-Ionen. Die Mikroinjektion von IP_3 führt zu langanhaltenden Ca^{2+} -Oszillationen bei Maus und Hamster (Miyazaki et al. 1993, Swann and Ozil 1994), jedoch ähnelt das Muster der Oszillationen nicht denen, die durch ein Spermium bei der Fertilisation ausgelöst werden. Oszillationen nach IP_3 -Injektion sind kleiner und von höherer Frequenz (Galione et al. 1994, Swann 1994, Swann and Ozil 1994, Jones 1998). Calcium kann auch über den RyR von den intrazellulären Calciumspeichern freigesetzt werden (Sorrentino and Volpe 1993). Die RyR werden durch cyclische ADP-Ribose (cADPr) aktiviert. cADPr entsteht aus β -NAD⁺ durch ADP-Ribosyl-Cyclase (Galione and White 1994). Doch der Mechanismus der Ca^{2+} -Freisetzung über RyR ist nicht bei allen Säugetierspezies wirksam. Yue et al. (1995) stellten beim Rind einen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration fest, nachdem sie die Agonisten Caffein und cyclische ADP-Ribose applizierten. Yue et al. (1995) konnten bei der Maus nach Behandlung mit cADPr Exozytose beobachten. Obwohl dieser Rezeptor in Rind und Maus funktionsfähig ist, scheint dieser Mechanismus für eine Spermien-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung nicht notwendig zu sein (Ayabe et al. 1995, Yue et al. 1995). Whitaker und Swann (1993) hingegen konnten diese Ergebnisse bei Maus und Hamster nicht bestätigen.

Zwei Tatsachen lassen eine vorherrschende Rolle des IP_3R vermuten, denn dieser Rezeptor – IP_3R Typ 1 – ist reichlich in den Eizellen von Säugern vorhanden. Für seine Detektion benötigt man im Western Blot etwa 15 Mäuseeizellen bzw. 10 Rindereizellen. Um den RyR hingegen zu detektieren, sind bereits über 1000 Mäuseeizellen und über 400 Rindereizellen notwendig (He et al. 1997). Daneben ist nur der IP_3R Typ 1 so über die Eizelle verteilt, von Rinde zu Rinde und tief in das

Cytoplasma, dass dies scheinbar der einzige Weg sein kann, wie sich die Ca^{2+} -Welle ausbreiten kann (Fissore et al. 1999). Eine neue Studie von Malcuit et al. (2005) wies durch eine Down-Regulierung des $\text{IP}_3\text{R-1}$ durch Adenophostin A, ein Analog von IP_3 , das jedoch eine höhere Affinität zum Rezeptor aufweist als IP_3 selbst, in Rindereizellen nach, dass IP_3R Typ 1 der dominierende Freisetzungskanal für Calciumionen beim Rind ist. Die Injektion von IP_3 Antagonisten wie Heparin (Wu et al. 1997) und Antikörpern zu diesem Rezeptor (Miyazaki et al. 1992) verhindert induzierte Calciumoszillationen. Der RyR ist nur in der Rindenregion lokalisiert und stellt so eine Ca^{2+} -Freisetzung, die sich über die gesamte Eizelle erstreckt, in Frage (Ayabe et al. 1995, Yue et al. 1998). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass der RyR lediglich eine ergänzende Rolle in der Amplifizierung des Calciumsignals spielt.

Fissore et al. (1992) stellten spermieninduzierte Calciumoszillationen an Zona-intakten, reifen Rindereizellen dar. Sie wiesen nach, dass, wenn eine Eizelle Ca^{2+} -Oszillationen produziert, selbige auch fertilisiert ist.

2.7 Aktivierungsmodelle

Die Fusion von Eizelle und Spermium ist das erste Ereignis, das man bei der Fertilisation beobachten kann. Indikatorstudien sind in der Lage, die Zeit der Fusion zu erfassen. Bei der Maus geschieht die Fusion der Gameten etwa fünf Minuten vor dem ersten, initialen Calciumpeak (Lawrence et al. 1997, Jones et al. 1998b). Die Vorstellung, dass das Spermium zu dem initialen Ca^{2+} -Peak beiträgt, weil es bei der Verschmelzung der Plasmamembranen der beiden Gameten in Form eines Kanals ein Einströmen von Ca^{2+} -Ionen erlaubt, ist ausgeschlossen. Der Grund hierfür liegt in der Beobachtung, dass bei Mäuseeizellen kein Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nahe der Fusionsstelle ausgemacht werden kann, und dass bei fertilisierten Eizellen die normale Calciumfreisetzung bereits bei sehr niedrigen, extrazellulären Calciumkonzentrationen auftritt (Jones et al. 1998b). Daher scheint die Calciumfreisetzung nach der Gametenfusion keine Folge erhöhter Permeabilität der Plasmamembranen zu sein. Eine wahrscheinlichere Erklärung ist die Entlassung einer Ca^{2+} -freisetzenden Verbindung seitens des Spermiums in das Cytoplasma der Eizelle im Moment der Fusion.

Es existieren zwei theoretische Modelle zur Eizellaktivierung: das Membranrezeptor-Modell und das Modell eines löslichen Spermienfaktors.

2.7.1 Das Membranrezeptor-Modell

Diese Modell basiert auf der Annahme, dass ein Ligand auf der Oberfläche des Spermiums mit einem Rezeptor auf der Eizelloberfläche interagiert. Diese Kopplung führt daraufhin zur Freisetzung von IP_3 über die Aktivierung einer Eizell-eigenen Phospholipase C (PLC) (Schultz and Kopf 1995, Foltz and Schilling 1993). Eine Fusion der Membranen ist bei dieser Hypothese nicht essentiell. Im Hinblick auf diesen Rezeptor werden zwei unterschiedliche Typen diskutiert: der G-Protein Rezeptor und ein Tyrosinkinase-gekoppelter Rezeptor. Eine schematische Darstellung des Mechanismus der Membranrezeptor-gekoppelten Aktivierung zeigt Abbildung 4.

2.7.1.1 Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor

Ein Modell der Gameteninteraktion könnte zur Stimulation eines G-Protein pathways führen. Das Zusammenspiel eines Spermienliganden mit einem der Eizelle assoziierten Rezeptor aktiviert diese Protein. Durch die Bindung wird das G-Protein selbst aktiviert, d.h. es wird in zwei Untereinheiten aufgespalten: die α -Untereinheit und das $\beta\gamma$ -Heterodimer. Eine dieser Untereinheiten könnte dann ihrerseits, neben anderen Effektormolekülen, eine Phospholipase C aktivieren (Birnbaumer 1992, Clapham and Neer 1993). Die PLC hydrolysiert PIP_2 zu IP_3 und Diacylglycerol (DAG). Jedes dieser Moleküle löst schließlich spezifische Aktivierungsereignisse aus.

In Mäuseeizellen wurden verschiedene G-Protein-Rezeptoren nachgewiesen: $G_{\alpha S}$, $G_{\alpha i1-3}$, $G_{\alpha 0}$ (Williams et al. 1998). In Untersuchungen hat man festgestellt, dass die Injektion von GDP- β -S, ein Antagonist von G-Proteinen, die Calciumfreisetzung bei der Fertilisation von Hamstereizellen verhindert (Miyazaki et al. 1993). Die Mikroinjektion von GTP- γ -S, ein Hydrolyse-resistenter G-Protein Aktivator, führt zu Ca^{2+} -Ausschüttung und wahrscheinlich auch zur Kortikalreaktion (Miyazaki 1988, Swann et al. 1989, Miyazaki et al. 1990, Swann 1992). Erfolgt vor der Injektion von GTP- γ -S eine Injektion der Eizellen mit dem Ca^{2+} -Chelator BAPTA, werden Ca^{2+} -Ausschüttung und auch jedes weitere Aktivierungselement unterbunden (Kline et al. 1991). Auch der Einsatz spezifischer G-Protein-Inhibitoren wie Pertussis-Toxin (inhibiert G_i und G_o -Proteine) und ein Antikörper gegen die Aktivierung durch G_q -Proteine inhibieren die Proteine zwar, zeigten aber keine Wirkung auf die Ca^{2+} -Freisetzung bei der Fertilisation

(Moore et al. 1994, Williams et al. 1998, Runft et al. 1999). Diese Ergebnisse belegen, dass in der Eizelle diese Signalwege zur Calciumausschüttung vorhanden sind und von außen stimuliert werden können.

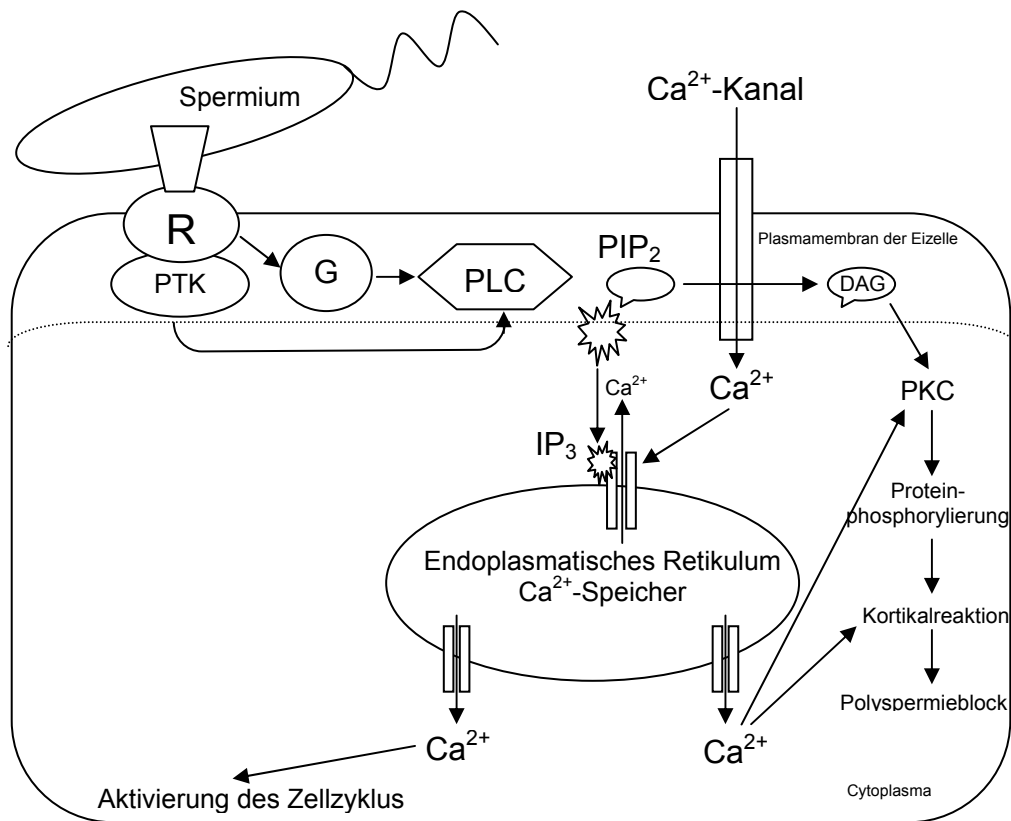


Abbildung 4: Das Membranrezeptor-Modell als möglicher Mechanismus der Eizellaktivierung. Das Spermium bindet an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (G) auf der Plasmamembran der Eizelle, oder alternativ an einen tyrosin-phosphorylierten (PTK) Rezeptor (R) und löst dadurch eine Reaktionskaskade im Cytoplasma der Eizelle aus, die sich in einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ äußert (modifiziert nach Ben Yosef and Shalgi 1998).

DAG, Diacylglycerol; IP₃, Inositol 1,4,5-trisphosphat; PIP₂, Phosphatidylinositolbisphosphat; PKC, Ca²⁺-abhängige Proteinkinase C; PLC, Phospholipase C

2.7.1.2 Der Tyrosinkinase-gekoppelte Rezeptor

Die Aktivierung dieses Rezeptors führt zu einer ähnlichen Reaktionskaskade wie der G-Protein-gekoppelte Rezeptor. Bei Seeigel, Seestern, Frosch und Ascidien beobachtet man eine fertilisations-induzierte Phosphorylierung der Protein-Tyrosinkinase (PTK) (Abassi and Foltz 1994). Für die Aktivierung einer spezifischen Tyrosinkinase könnte eine Veränderung des pH-Wertes sein, der im Verlauf der Fertilisation auftritt (Jiang et al. 1991). Eine PTK-Phosphorylierung während der Fertilisation bei der Ratte wird von Ben-Yosef et al. (1998) berichtet. Die Inhibierung der PTK resultiert in einer signifikanten Inhibierung der Fertilisation bei der Maus (Dupont et al. 1996), und ebenfalls in einer Inhibierung der parthenogenetischen Aktivierung von MII Eizellen des Schweins (Kim et al. 1999). Diese Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung der PTK an der Eizellaktivierung beim Säuger hin. In der gleichen Studie wird gezeigt, dass die Inhibierung von Tyrosinphosphatasen durch 1 mM Natriumorthovanadat zu einer vermehrten Vorkernbildung, Kortikalreaktion und einem Abfall der MAPK Aktivität führt. Diese Ereignisse werden verhindert, wenn die Eizellen mit dem Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM preinkubiert werden. Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung der PTK im Ca^{2+} -abhängigen Signalweg bei der Eizellaktivierung (Kim et al. 1999). Doch der Anstieg an PTK-Phosphorylierungen muss nicht unbedingt mit einer erhöhten Rezeptoraktivität zusammenhängen. Bis heute konnte auch noch kein Ligand auf der Spermienoberfläche identifiziert werden, der durch Bindung an die PTK-Rezeptoren eine Aktivierung auslöst.

Sato et al. (1996) charakterisierten eine Tyrosinkinase der Src-Familie in *Xenopus laevis*, Xyk. Dieses 57 kDa große Protein wird innerhalb der ersten Minute nach der Fertilisation aktiviert. In einer weiterführenden Studie wurde gezeigt, dass die Kinase-Aktivierung durch ein synthetisches RGD-Peptid, ein Integrin, parthenogenetische Eizellaktivierung herbeiführen kann (Sato et al. 1999).

GST-Fusionsproteine, die die SH2 Domäne von Src kodieren, agieren als dominant-negative Inhibitoren der Funktion der Tyrosinkinasen der Src Familie (SFK). Sie unterdrücken eine spermien-induzierte Calciumausschüttung in marinen Invertebraten (Kinsey et al. 2003).

Der Versuch, Mäuseizellen durch Injektion eines rekombinanten c-Src-Proteins oder durch deren mRNA zu aktivieren, schlug fehl (Kurokawa et al. 2004). Die Tyrosin-

phosphorylierten Proteine in den löslichen und unlöslichen Fraktionen eines porcinen Spermienextraktes korrespondierten nicht mit den aktiven Fraktionen des Spermienextraktes. Die Calciumfreisetzung in der Eizelle konnte durch Zugabe des spezifischen Src-Inhibitors PP2 (4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl)pyratol[3,4-*d*]-pyrimidin) oder Lavendustin A nicht blockiert werden. Dieses Ergebnis suggeriert, dass bei Säugetieren die Tyrosinkinase der Src-Familie keine entscheidende Rolle bei der Eizellaktivierung spielen.

2.7.1.3 Fertilin

Auf der Suche nach membranständigen Molekülen auf der Spermienoberfläche, die bei der Fertilisation an die Eizellmembran binden, fand man in Fertilin ein Protein, das neben seiner Fähigkeit, an einen Rezeptor zu binden, auch die Fusion der beiden Zellen ermöglicht. Fertilin ist ein heterodimeres Membranprotein und besteht aus einer α und β Untereinheit. Beide Untereinheiten sind Mitglieder der ADAM/MDC-Familie (A Disintegrin and A Metalloprotease domain/Metalloprotease-Disintegrin-Cystein-rich). Die Disintegrin-Domäne der β -Untereinheit sorgt dafür, dass das Spermium an die Integrine auf der Eizelloberfläche binden kann. Die α -Untereinheit ist verantwortlich für die Fusion der Gameten (Cho et al. 1998, Evans et al. 1998). Rekombinante, truncated Formen von Fertilin β , bei denen die Disintegrin-Domäne entfernt worden war, waren nicht in der Lage, an die Eizellmembran zu binden. Ebenso bei der α -Form (ADAM-1), doch Fertilin β (ADAM-2) scheint in dieser Situation eine größere Bedeutung zu haben (Evans et al. 1998).

2.7.1.4 Integrine

Integrine sind Oberflächenmoleküle auf der Plasmamembran der Eizelle. Die Bindung von Proteinen der extrazellulären Matrix oder von Fertilin an Integrine könnte der Auslöser der Aktivierungskaskade sein. Es wurde gezeigt, dass CD9, ein Protein auf der Eizellmembran, eine wichtige Rolle bei der Fusion von Spermium und Eizelle spielt (Chen et al. 1999, Kaji et al. 2000, Le Naour et al. 2000, Miyado et al. 2000). Almeida et al. (1995) identifizierten Integrin $\alpha_6\beta_1$ als Spermienrezeptor auf der Plasmamembran der Eizelle. Es scheint so zu sein, dass die Interaktion von CD9 mit dem Integrin $\alpha_6\beta_1$

die Bindungsfähigkeit des Integrins mit dem Spermienliganden beeinflusst (Chen et al. 1999, Kaji et al. 2000, Le Naour et al. 2000). Miyado et al. (2000) schlagen alternativ vor, dass das $\alpha_6\beta_1$ Integrin CD9 Signale übermittelt, um eine Fusion einzuleiten. Doch Miller et al. bewiesen in einer Studie im Jahr 2000, dass CD9 ohne Bindung an Integrin $\alpha_6\beta_1$ agiert.

Iwao and Fujimura (1996) behandelten *Xenopus* Eizellen mit Peptiden, die eine RGD-Sequenz enthielten. Sie erreichten frühe und späte Aktivierungsereignisse in Form von Calciumfreisetzung, Kortikalreaktion und Vollendung der Meiose.

2.7.2 Das Spermienfaktor-Modell

Eine alternative Hypothese, die mittlerweile allgemein anerkannt ist, besagt, dass ein Faktor im Spermium zum Zeitpunkt der Gametenfusion für die Produktion von IP_3 und die Calciumoszillationen verantwortlich ist (Abb. 5). Das Hauptargument für die Theorie des Spermienfaktors ist, dass die Injektion eines löslichen, cytosolischen Spermienextraktes in die Eizelle Calciumoszillationen hervorruft, die denen bei der Befruchtung sehr ähnlich sind. Die Fähigkeit von löslichen Spermienextrakten, eine Calciumfreisetzung auszulösen, wurde bereits bei vielen Säugetierarten beobachtet (Swann 1990, Homa and Swann 1994, Wu et al. 1997, Fissore et al. 1998).

Diese 'Spermienfaktor-Hypothese' wird durch die Tatsache unterstützt, dass Spermienextrakte vieler verschiedener Spezies nach Mikroinjektion in Eizellen sowohl Calciumoszillationen als auch andere Aktivierungsereignisse hervorrufen (Stice and Robl 1990, Swann 1990, Homa and Swann 1994). Dale et al. (1985) injizierten als erste Arbeitsgruppe einen Extrakt aus den Spermien vom Seeigel in Seeigel-Eizellen und lösten auf diese Weise die Kortikalreaktion aus. Jedoch gab es bis dahin noch keine genaue Charakterisierung des Extraktes, und sicherlich überstieg das injizierte Volumen die physiologische Menge, die bei der Fertilisation durch das Spermium ins Eizellzytoplasma gelangt. 1986 wies die gleiche Arbeitsgruppe (DeFelice et al. 1986) nach, dass ein injizierter Spermienextrakt in Ascidien-Eizellen ähnliche Potentialveränderungen hervorruft wie man bei der Fertilisation beobachtet.

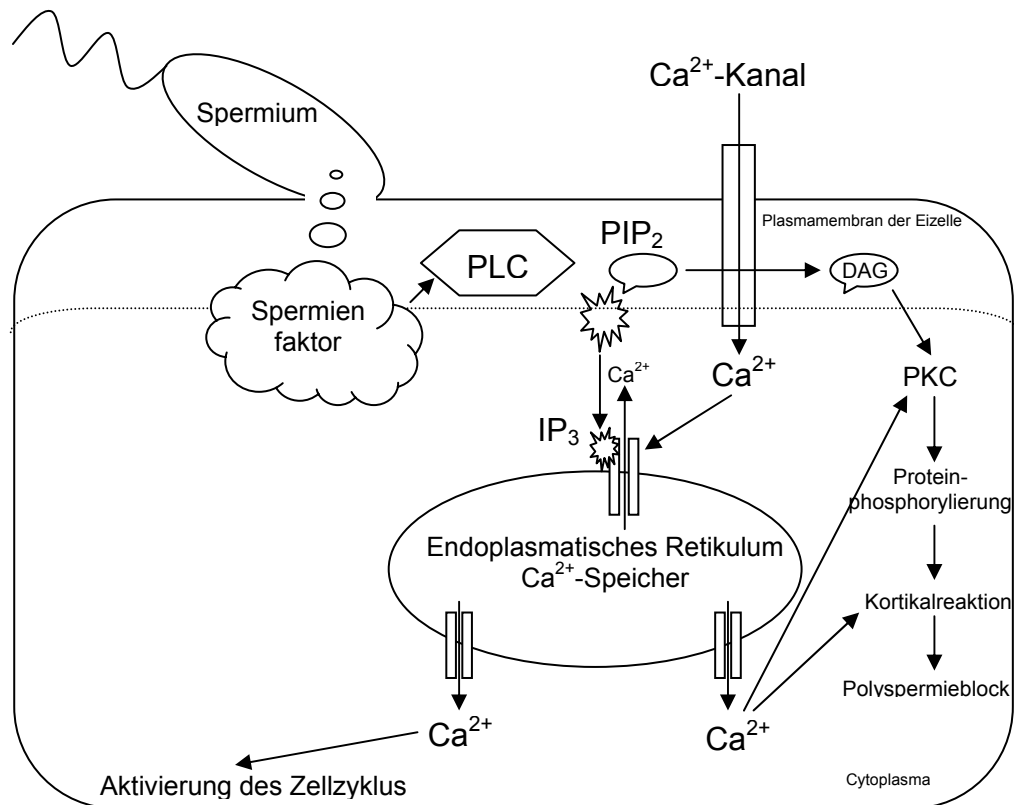


Abbildung 5: Ein löslicher Spermienfaktor wird zum Zeitpunkt der Gametenfusion in das Cytoplasma der Eizellen entlassen und löst über die Stimulation eine Phospholipase C die Reaktionskaskade aus, die zur Ca^{2+} -Freisetzung ins Cytoplasma führt (modifiziert nach Ben Yosef and Shalgi 1998).

DAG, Diacylglycerol; IP_3 , Inositol 1,4,5-trisphosphat; PIP_2 , Phosphatidylinositolbisphosphat; PKC, Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase C; PLC, Phospholipase C

Der aktive Spermienfaktor basiert auf der Charakteristik eines Proteins, denn er ist sowohl Trypsin-verdaulich als auch hitzesensitiv. Ultrafiltrations- und Gelfiltrationschromatographie-Studien haben ergeben, dass der Faktor eine Molekülmasse von über 30 kDa hat (Swann 1990, Parrington et al. 1996, Stricker 1997, Kyojuka et al. 1998, Wu et al. 1998b). Ferner scheint die Fähigkeit der Extrakte, Calciumoszillationen auszulösen, spermien-spezifisch zu sein, denn Extrakte aus anderen Geweben sind nicht in der Lage, Oszillationen hervorzurufen, wenn sie in Eizellen injiziert werden (Swann 1990, Stricker, 1997, Wu et al. 1997).

Extraktkonzentrationen von einem bis 8 Spermienäquivalenten haben sich als oszillationsauslösend herausgestellt (Nixon et al. 2000). Dieses Ergebnis belegt eine physiologische Wirkungsbreite der Spermienextrakte, wenngleich bisher nicht festgehalten wurde, wie hoch der möglich Proteinverlust bei der Extrakterstellung selbst ist. Wenn das gesamte Protein eines Spermiums extrahierbar wäre und kein Aktivitätsverlust zu verzeichnen wäre, dann wäre es möglich genau die Menge eines Spermienäquivalentes zu injizieren. Jedoch ist keine dieser Anforderungen in der Praxis realistisch durchführbar.

Eine Speziesspezifität konnte nicht bestätigt werden (Swann 1990, 1994, Homa and Swann 1994, Palermo et al. 1997, Wu et al. 1997). Dass der Spermienfaktor ein Protein ist, wurde bereits in vielen Versuchen zu Signalmechanismen in der Zelle nachgewiesen, besonders was die Fähigkeit des Spermiums zur Aktivierung der Eizelle bei der Fertilisation betrifft (Homa and Swann 1994, Palermo et al. 1997, Wu et al. 1997). Zum Einen kommt der Spermienfaktor in Verbindung mit isolierten Spermienköpfen vor (Kuretake et al. 1996) und hat etwa ein Molekulargewicht von 30 bis 100 kDa (Parrington et al. 1996, 2002, Kimura et al. 1998, Kyojuka et al. 1998). Untersuchungen mit permeabilisierten Spermien führten zu keiner Aktivierung (Dozortsev et al. 1995). Das bedeutet, dass der Faktor sich innerhalb der Spermienmembran befinden muss, nicht im Akrosom. Weiterhin verursacht der Spermienfaktor Calciumoszillationen, die denen bei der Fertilisation ähneln (Swann 1990), und wenn er mikroinjiziert wird, dann wirkt er selbst in Größenordnungen wie er in einem einzelnen Spermium vorkommt. Außerdem erfolgen die induzierten Calciumoszillationen durch den von IP_3 ausgelösten Ca^{2+} -Freisetzungsmechanismus (Oda et al. 1999). In Entwicklungsstudien wurde nachgewiesen, dass dieser Proteinbasierte Faktor nach Injektion die Ereignisse der Vollendung der zweiten meiotischen Reifeteilung und eine Embryonalentwicklung bis hin zur Blastozyste erreicht (Fissore et al. 1998, Wu et al. 1998a). Und zuletzt, wenn ein Spermienfaktor wirklich ein physiologischer Auslöser der Eizellaktivierung ist, dann sollte es möglich sein, diesen Vorgang durch Blockierung des Spermienfaktors zu unterbinden. Ein weiteres wesentliches Merkmal eines aktivierenden Spermienfaktors ist die Tatsache, dass der maternale Mechanismus der Calciumausschüttung in Form von Oszillationen im Eizellzytoplasma durch Komponenten aus dem Spermium inaktiviert wird, d.h. dieser Mechanismus kann nur einmal stattfinden. Der Spermienfaktor induziert Oszillationen

in MII Eizellen, immaturren Eizellen und parthenogenetisch aktivierten Eizellen, jedoch nicht in Zygoten (Tang et al. 2000). Die Injektion eines Spermienextrakts führt auch zu einer Embryonalentwicklung bis zur Blastozyste (Fissore et al. 1998). Das Schlüsselement dieser Injektion in die Eizelle ist das Oszillationsmuster, das dem Muster sehr ähnelt, welches bereits bei der Befruchtung beobachtet wurde. Zum Beispiel in den Eizellen von Ascidien wird die Fertilisation begleitet von zwei unterschiedlichen Oszillationsmustern. Diese beiden Muster sind durch ein Intervall getrennt, während dem der erste Polkörper abgeschnürt wird. Die gleiche zeitliche Antwort kann durch einen Spermienextrakt nachgeahmt werden, jedoch nicht durch andere Ca^{2+} -freisetzende Agenzien (Kyojuka et al. 1998, McDougall et al. 2000).

Dass das Spermium eine spezifische Proteinsequenz, die den Spermienfaktor beschreibt, wird auch noch über ein anderes Injektionsexperiment nachgewiesen. Die Injektion von mRNA, isoliert aus Spermien, löst fertilisationsähnliche Ca^{2+} -Oszillationen in Mäuseeizellen aus (Parrington et al. 2000). Bei diesem Experiment werden die Eizellen als Expressionssystem für die mRNA genutzt. Der Effekt ist abhängig von der Proteinsyntheserate in den injizierten Eizellen. Die Injektion von mRNA anderer Gewebe dagegen ruft keine Oszillationen hervor - wiederum ein Beweis, dass nur die Spermatozoa diese spezifische mRNA enthalten, die das Spermienfaktorprotein beinhaltet (Parrington et al. 2000).

Perry et al. (2000) sprechen von einem SOAF (sperm-borne activating factor). Dieser Faktor stammt aus der submembranen Matrix des Spermienkopfes und lässt sich in eine labile Fraktion, SOAF-I, und eine stabile Fraktion, SOAF-II, unterteilen. Er weist die Eigenschaften eines Proteins auf. Nur diese zwei Fraktionen gemeinsam sind in der Lage, eine Calciumausschüttung in der Eizelle herbeizuführen.

Die Wirkung eines porcinen Spermienfaktors (pSF) auf bovine Kerntransferembryonen zeigten Knott et al. (2002). Sie injizierten 5 mg/ml pSF und erhielten fertilisationsähnliche Oszillationen und eine hohe Aktivierungsrate. Ferner erreichten die auf diese Weise aktivierten Kerntransferembryonen nach Transfer auf zyklussynchrone Empfängertiere Trächtigkeiten bis zum 60. bzw. 90. Tag. Doch um die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillation über längere Zeit aufrecht zu erhalten, bedarf es wiederholter Injektion des pSF. Eine einzige Injektion war nicht in der Lage, den IP_3 -Rezeptor Typ 1 herabzuregulieren. Auch Choi et al. (2002) setzten einen Spermienextrakt, diesmal vom Hengst, erfolgreich bei der Aktivierung von equinen Kerntransferembryonen ein. Bei

einer Proteinkonzentration von 293 µg/ml erzielten sie die höchsten Aktivierungsraten (71 %, 8–10 h nach Injektion). Die Teilungsraten der rekonstruierten Embryonen hingegen war bei einer Proteinkonzentration von 1375 µg/ml am größten (51 %, 8–10 h nach Injektion). Damit liegt die Erfolgsrate in dieser Studie nach Injektion eines Spermienextraktes höher als nach chemischer Aktivierung.

Eine Konzentrationsabhängigkeit des Extraktes bei der Produktion von Ca^{2+} -Oszillationen und des Aktivierungserfolges wiesen auch Gordo et al. (2000) nach. Die Injektion eines cytosolischen Spermienfaktors mit der Konzentration 1 mg/ml verursachte Oszillationen niedriger Frequenz und Dauer und erreichte die normalen Aktivierungsereignisse und Embryonalteilung in frisch ovulierten Eizellen. Die 15fache Konzentration dagegen löste anhaltende Oszillationen hoher Frequenz aus. In dieser Gruppe kam es jedoch zu abnormen Chromosomenkonfigurationen, Inhibierung der DNA-Synthese und fehlender Ausbildung der mitotischen Spindel.

Tiefergehende Untersuchungen führten zu dem Schluss, dass es sich bei dem gesuchten Spermienfaktor um eine Phospholipase C (PLC) oder um einen Botenstoff, der auf die eizelleigene PLC wirkt, handelt. Die durch einen Spermienfaktor induzierten Calciumoszillationen lassen sich durch den Einsatz des spezifischen Inhibitors U73122 blockieren. Dieser Inhibitor hemmt die Aktivierung von PLC (Wu et al. 2001).

2.8 Kandidatenproteine

Auf der Suche nach dem Spermienfaktor wurden einige Kandidatenproteine als möglicher Spermienfaktor vorgeschlagen. Ein Ca^{2+} -aktivierender Faktor, der im Spermium vorkommt, sollte einige wichtige Eigenschaften besitzen: 1. der Faktor muss, zu einer Signalamplifikation aufgrund einer Interaktion mit einer potentiellen Zielstruktur im Zytoplasma einer MII-Eizelle in der Lage sein. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass, obwohl der Faktor im Spermium selbst in hoher Konzentration vorliegt, allein durch diesen Faktor/Protein eine schnelle und weitläufige Calciumausschüttung ohne Amplifikation erfolgen kann. Es gibt Hinweise darauf, dass eine MII Eizelle mit Mechanismen und Signalwege ausgestattet ist, die ein solche Verstärkung des Ca^{2+} -Signals bewirken, so z.B. Phospholipase C- β und γ , die mit den pathways über G-Proteine und Tyrosinkinase antworten (Dupont et al. 1996). 2. der Ca^{2+} -freisetzende Faktor muss einen CICR stimulieren können. Nur durch eine

wiederholte, pulsierende Calciumfreisetzung in der Eizelle werden langanhaltende Oszillationen erreicht, die mit Bildung der Vorkerne langsam verebben und schließlich gänzlich verschwinden (Jones et al. 1995a, Marangos et al. 2003).

2.8.1 Oszillin

Oszillin war das erste isolierte Protein, von dem man meinte, es sei der gesuchte Spermienfaktor (Parrington et al. 1996). Es handelt sich hierbei um ein Oligomer mit einer 33 kDa großen Untereinheit und weist eine 53 % Homologie in seiner Aminosäuresequenz zur bakteriellen Glucosamin-6-Phosphat Desaminase (GNPDA) auf (Parrington et al. 1996). Es ist im Äquatoralsegment des Spermienkopfes lokalisiert - die Region, die bei der Fertilisation als erstes mit der Eizelle fusioniert. Doch in der Studie wurde keine direkte Oszillationsaktivität demonstriert. So erschien bereits zwei Jahre später eine Studie von Wolosker et al. (1998), in der gezeigt wurde, dass das in *E. coli* exprimierte Protein zwar eine starke GNPDA-Aktivität besitzt, jedoch nach Injektion in Mäuseeizellen keinerlei Calciumoszillationen auslöste. Genauso zeigten Wolny et al. (1999), dass dieses Protein keine Fähigkeit hatte, Calciumoszillationen auszulösen.

2.8.2 truncated c-kit (tr-kit)

tr-kit ist ein verkürzte Form des c-kit tyrosine kinase receptors (Qiu et al. 1988, Rossi et al. 1992). tr-kit wird in Spermatischen während der Elongationsphase akkumuliert. Es ist ebenfalls in Epididymalspermien zu finden (Albanesi et al. 1996). Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass dieses Protein bei den Ereignissen der Eizellaktivierung eine Rolle spielen könnte.

Sette et al. (1997) injizierten Extrakte von Zellen, die eine rekombinante Form von truncated c-kit (tr-kit) exprimierten, in MII-Mäuseeizellen. Sie stellten fest, dass dieses Protein in der Lage ist, eine parthenogenetische Aktivierung auszulösen, bishin zur embryonalen Teilung. Der größte Anteil von tr-kit ist jedoch im residualen Spermienzytoplasma lokalisiert, der größte Anteil davon im Mittelstück des Flagellum (Sette et al. 1997). Die durch tr-kit vermittelte Calciumfreisetzung erfolgt über die Assoziation der src-ähnlichen Kinase Fyn, die Tyr161 in tr-kit phosphoryliert und

dadurch wiederum PLC γ aktiviert (Sette et al. 2002). Der Einsatz des spezifischen PLC-Inhibitors U73122 blockiert einen Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ (Sette et al. 1997). Auch die Co-Injektion von tr-kit mit Glutathion-S-transferase (GST)-Fusionsproteinen, die Src-homologe Domänen enthalten, verhindern gänzlich eine Eizellaktivierung (Sette et al. 1998, Rossi et al. 2003). Die durch tr-kit ausgelöste Eizellaktivierung wird durch ein SH3 Domäne enthaltendes Konstrukt blockiert (Sette et al. 1998), doch das gleiche Konstrukt blockiert nicht die Eizellaktivierung bei der Fertilisation (Mehlmann et al. 1998). Auch konnte eine partielle Charakterisierung der oszillationsauslösenden Fraktionen eines cytosolischen, porcinen Spermienextraktes durch Western blotting nicht bestätigen, dass tr-kit eine Ca^{2+} -freisetzende Aktivität besitzt (Wu et al. 1998b).

2.8.3 PT32

Entgegen der bisherigen Aussage, dass der Spermienfaktor eine lösliche Spermienfraktion sei, postulierten die Arbeitsgruppen um Kimura et al. (1998) und Perry et al. (2000), dass dieser Faktor in der perinuklearen Theka (PT) lokalisiert sei. Sie isolierten ein PT Protein, PT32. 2001 bestätigten Oko et al. die Funktion von PT32 als Spermienfaktor. Untermuert werden die Ergebnisse von der Tatsache, dass PT32 in der post-akrosomalen Region des Spermienkopfes lokalisiert ist. Diese Region ist eine der ersten Bereiche, die mit dem Zytoplasma der Eizelle in Kontakt treten (Sutovsky et al. 1997). Das Molekulargewicht von PT32 beträgt 32 kDa, ein weiterer Hinweis auf einen möglichen Spermienfaktor. Außerdem kann das Protein durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen oder mittels reduzierender Agenzien aus dem Spermium gelöst werden (Oko et al. 2001). Das rekombinante Protein ist in der Lage, beim Schwein Eizellaktivierung herbeizuführen. Durch die Mikroinjektion einer Menge, die ungefähr der eines einzelnen Spermiums entspricht, kommt es zur Vorkernbildung (Sutovsky et al. 2001). Allerdings liegen noch keine Aussagen zur Ca^{2+} -Freisetzung nach Mikroinjektion des rekombinanten Proteins vor, und ob eine Inhibierung des Proteins die spermien-induzierte Eizellaktivierung unterbindet.

2.9 Phospholipase C

Der interessanteste Kandidat für den Spermienfaktor ist eine spermien-assoziierte Phospholipase C (PLC). Spermien-Lysate besitzen eine messbare PLC-Aktivität (Ribbes et al. 1987, Tomes et al. 1996, Jones et al. 2000, Rice et al. 2000, Mehlmann et al. 2001). Extrakte aus Ebersperma bewirken die Produktion von IP_3 nach Zugabe zu Homogenaten von Seeigel-Eizellen (Jones et al. 1998a, Rice et al. 2000). Wurde das Eizellhomogenat zuvor mit einer PLC behandelt, konnte nach Zugabe eines Spermienextraktes weder IP_3 noch Ca^{2+} freigesetzt werden (Jones et al. 1998a). Auch der Einsatz des PLC-spezifischen Inhibitors U73122 verhindert die Entstehung von Calciumoszillationen (Wu et al. 2001). Alles Hinweist darauf, dass das Spermium IP_3 -generierende PLC besitzt.

2.9.1 Isoformen der Phospholipase C

Das Grundgerüst der Phospholipase C besteht aus verschiedenen Elementen mit unterschiedlichen Funktionen. Die X-Y Domänen sind verantwortlich für die katalytische Aktivität. Die EF Domänen binden wahrscheinlich an freie Ca^{2+} -Ionen, die C2 Region hingegen bindet an Ca^{2+} oder Phospholipide. Die PH (plextrin homology) schließlich bindet an Phosphoinositide wie PIP_2 oder an andere Proteine (Katan 1998). Bis vor Kurzem wurden vier PLC-Isoformen diskutiert: β , γ , δ und ϵ . Die Klassen der $PLC\beta$ und $PLC\gamma$ besitzen ein Molekulargewicht von 140 bis 150 kDa, $PLC\delta$ 85-90 kDa und $PLC\epsilon$ etwa 255 kDa. Die Isozyme $PLC\beta_1$, $PLC\gamma_1$, $PLC\gamma_2$ und $PLC\delta_4$ wurden in Säugetierspermien detektiert (Walensky and Snyder 1995, Dupont et al. 1996, Tomes et al. 1996, Mehlmann et al. 1998, Parrington and Swann 1999, Wu et al. 2001, Fukami et al. 2001, Mehlmann et al. 2001). $PLC\delta_1$ wurde in Mäusespermatogonien gefunden (Lee et al. 1999). Doch nur der β -Form und der γ -Form wurde eine Rolle bei der Fertilisation zugesprochen (Carroll et al. 1997, Williams et al. 1998). Weiterführende Untersuchungen, denen die aktiven Fraktionen von Spermienextrakten aufgesplittet wurden ergaben, dass $PLC\beta$ und $PLC\gamma$ nicht Teil dieser Fraktionen sind (Parrington and Swann 1999). Rekombinante oder aufgereinigte Formen von $PLC\beta_1$, γ_1 , γ_2 und δ_1 sind ebenfalls nicht in der Lage, Ca^{2+} -Oszillationen auszulösen, weder in intakten Eizellen von Mäusen noch in Eizellhomogenaten von Ascidien (Heyers et al. 2000, Jones et al.

2000). Zusätzlich fehlt dem Mäusesperma PLC δ 4; es kann aber trotzdem die Ausschüttung von Ca²⁺ nach Injektion in homologe Eizellen auslösen (Fukami et al. 2001). Mehlmann et al. (2001) wiesen dagegen nach, dass die Injektion von rekombinantem PLC γ 1 Protein in Mäuseeizellen Ca²⁺-Oszillationen verursacht, die denen bei der Fertilisation ähneln. In dieser Untersuchung wurde die gemessene PLC Aktivität in einem einzelnen Mäusespermium verglichen mit dem Minimum an PLC γ Protein, dass für die Ca²⁺-Freisetzung bei der Maus notwendig ist. Die PLC-Aktivität im Spermium war danach etwa 500-900mal geringer als die PLC-Aktivität der erforderlichen Menge an rekombinantem PLC γ 1. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die PLC aus dem Spermium nicht für die initiale Ca²⁺-Freisetzung bei der Fertilisation verantwortlich ist (Mehlmann et al. 2001).

Auch Parrington et al. (2002) postulieren, dass bisher bekannte PLC Isoformen aus dem Spermium keine Spermienfaktor-Aktivität aufweisen. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass es noch weitere Isoformen zu PLC geben muss.

2.9.2 Unterschiedliche Reaktionswege der PLC-Isoformen

In den Eizellen von Vertebraten finden wir Signalwege sowohl für G-Protein-PLC β - als auch Tyrosinkinase-PLC γ -vermittelte intracytoplasmatische Ca²⁺-Freisetzung. Dies zeigt die Fähigkeit von Frosch- und Mäuse-Eizellen zu aktivieren, nachdem sie mit exogen exprimierten Rezeptoren dieser zwei Reaktionswege behandelt wurden (Kline et al. 1988, Williams et al. 1992, Moore et al. 1993, Yim et al. 1994, Mehlmann et al. 1998, Runft et al. 1999).

In Frosch-Eizellen steigt die PLC γ -Aktivität innerhalb von 2 min nach Insemination signifikant an, und die PLC γ -Tyrosinphosphorylierung scheint ebenfalls anzusteigen (Sato et al. 2000). Ob dieser Anstieg in der PLC γ -Aktivität erforderlich für die Ca²⁺-Freisetzung ist, bleibt ungeklärt. Die Injektion von SH2 Domänen in Eizellen von Seestern, Seeigel und Ascidien verhindert die Calciumausschüttung und bescheinigt somit der PLC γ eine ausschlaggebende Rolle bei der Eizellaktivierung (Carroll et al. 1997, 1999, Shearer et al. 1999, Runft and Jaffe 2000). Doch weder die Injektion von PLC γ SH2 Domänen noch von einem G_q-Antikörper verhindern einen [Ca²⁺]_i-Anstieg bei der Fertilisation in Eizellen von Frosch oder Maus (Williams et al. 1998, Runft et al. 1999). Obwohl also IP₃ zur Freisetzung von Calcium bei der Fertilisation von Säugern

notwendig ist, und der Einsatz eines PLC-spezifischen Inhibitors auf eben diesen Reaktionsweg über die Phospholipase C hinweist, können doch die Isoformen β und γ hierfür ausgeschlossen werden.

2.9.3 Eine neue Isoform: Phospholipase C ζ

2002 identifizierten Saunders et al. bei der Maus eine neue spermien-spezifische Isoform der PLC, PLC ζ . Sie charakterisierten ein einzelnes Protein mit einem Molekulargewicht von 74 kDa, das in Spermatischen, jedoch nicht in den meiotischen Vorstufen der Spermiogenese, angereichert ist. Die neue Isoform ist kürzer als die bisher identifizierten Isoformen β , γ , δ und ϵ (Rebecchi and Scarlata 1998, Rhee 2001). Die größte Auffälligkeit im strukturellen Vergleich mit den bisher gefundenen Isoformen ist, dass der ζ -Isoform eine n-terminale PH Domäne fehlt. Diese PH Domäne ist in Interaktionen mit Membranphospholipiden verwickelt (Rebecchi and Scarlata 1998, Rhee 2001). Die übrigen Elemente, die eine Phospholipase charakterisieren wie die konservierten katalytischen Domänen X und Y, ein Tandem-Paar von EF Domänen und eine C-terminale C2 Domäne, sind auch in der ζ -Form vorhanden (Abb. 6). Man fand das Protein der neuen Isoform in ganzen Spermien sowie Spermienextrakten von Maus, Hamster, Ratte und Mensch (Cox et al. 2002, Saunders et al. 2002).

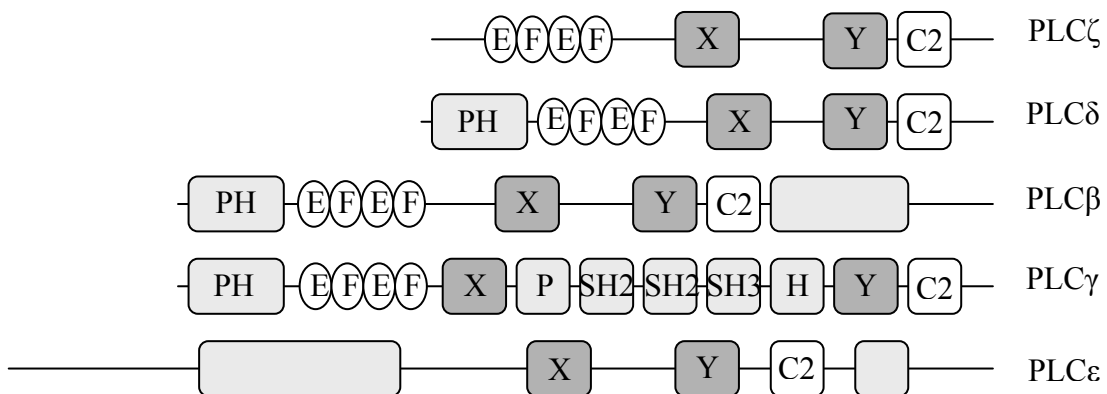


Abbildung 6: Schematische Darstellung von PLC ζ im Vergleich zu den bisher gefundenen PLC-Isoformen beim Säuger (Saunders et al. 2002). PH = Pleckstrin Homologie, EFEF = N-terminale EF Domänen, C2 = C-terminale C2 Domäne, XY = konservierte katalytische Domänen.

Ein Übereinanderlegen der verschiedenen PLC-Isoformen ergibt eine maximale Sequenz-Gleichheit mit PLC δ 1 (33 %) und eine minimale Gleichheit mit PLC ϵ (9 %) (Tab. 1).

Tabelle 1: Identische und ähnliche Sequenzen zwischen PLC-Isoformen von Säugern (Saunders et al. 2002). Kursiv = Grad der Sequenz-Ähnlichkeit zwischen PLC Isoformen des Säugers, normal = Grad der Sequenz-Gleichheit.

PLC	β	γ	δ	ϵ	ζ
β	100	<i>30</i>	<i>29</i>	<i>19</i>	<i>25</i>
γ	19	100	<i>31</i>	<i>17</i>	<i>25</i>
δ	20	20	100	<i>15</i>	<i>47</i>
ϵ	11	10	9	100	<i>14</i>
ζ	17	16	33	9	100

Dass PLC ζ eine völlig neue, eigenständige Isoform ist, belegt eine phylogenetische Analyse der 12 identifizierten PLCs des Säugers, mit dem Ergebnis, dass PLC ζ die am wenigsten abweichende Form eines hypothetischen Vorläufers ist (Abb. 7).

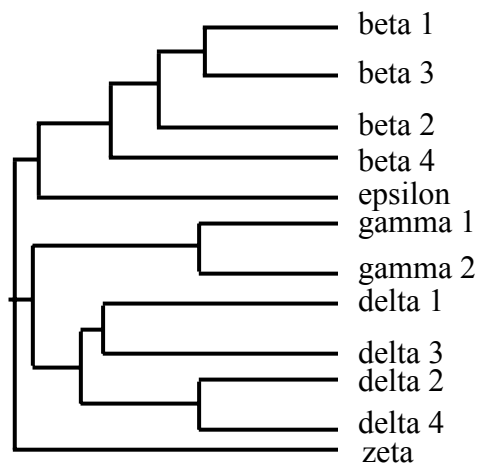


Abbildung 7: Dendrogramm der Phylogenie übereinandergelegter PLC Sequenzen vom Säuger (Saunders et al. 2002)

2.9.4 Lokalisierung von PLC ζ

Eine Northern blot Analyse ergab, dass PLC ζ vor allem in den Hoden der Maus in Form eines 2,3 kb Transkriptes reichlich vorhanden ist. Immunoblot-Analysen mit einer Reihe anderer Gewebe der Maus bestätigten diese Hoden-Spezifität, denn eine Proteinexpression von PLC ζ in anderen Geweben wurde nicht festgestellt (Saunders et al. 2002). Fujimoto et al. (2004) identifizierten einen SOAF in einem Spermienextrakt der submembranen perinuklearen Matrix von Mäusespermien. Ein Immunoblot bestätigte, dass die perinukleare Matrix der Ort ist, wo dieses 72 kDa große Protein, PLC ζ , lokalisiert ist. Immunfluoreszenzmikroskopie des Spermienkopfes zeigte, dass PLC ζ in der post-akrosomalen Region zu finden ist. Diese Region des Spermiums kommt bei der Fusion der Gameten als erstes mit dem Ooplasma der Eizelle in Kontakt (Fujimoto et al. 2004).

2.9.5 Oszillationsauslösende und speziesübergreifende Eigenschaften von PLC ζ

Die Arbeitsgruppe wies in der gleichen Studie auch nach, dass diese Isoform Ca²⁺-Oszillationen in Mäuseeizellen hervorruft, die sich nicht von den Oszillationen, die bei der Fertilisation entstehen, unterscheiden lassen. Mäuseeizellen wurden mit einer cRNA von PLC ζ injiziert, und die Calciumfreisetzung in der Eizelle gemessen. Die Injektion einer cRNA stellt ein probates Mittel zur Untersuchung der Expression spezifischer Proteine in der Eizelle dar. cRNA-Konzentrationen von 2 mg/ml bis 0,002 mg/ml waren oszillationsauslösend, wobei eine Konzentration von 0,02 mg/ml sich als physiologische Konzentration erwies. Diese Konzentration entsprach annähernd der totalen Menge, die ein einzelnes Spermium bei der Fertilisation in die Eizelle entlässt. Diese cRNA-Konzentration verursachte Calciumoszillationen innerhalb von 40 bis 50 min mit einer Frequenz wie bei der Fertilisation, die Amplitude blieb bei allen Konzentrationen unverändert. Die injizierten Eizellen wurden auch auf ihre Entwicklungsfähigkeit beobachtet. 78 % erreichten nach 24 h das 2-Zellstadium, davon erreichten weitere 62 % das Morula- und Blastozystenstadium. Weiterhin wurde ein Spermienextrakt vom Hamster mit einem spezifischen PLC ζ -Antikörper behandelt. Der Extrakt war danach nicht mehr in der Lage, Ca²⁺-Oszillationen auszulösen sowohl in einem Seeigel-Eizellhomogenat als auch in Mäuseeizellen.

Malcuit et al. (2005) injizierten eine cRNA (1 µg/µl) der Maus in MII Rindereizellen und erhielten fertilisationsähnliche Oszillationen über eine Dauer von bis zu 6 h. Die Frequenz betrug 38 ± 10 min, wobei die Frequenz im Verlauf zunahm, wahrscheinlich aufgrund einer PLC ζ -Proteinakkumulation in der Eizelle.

Neben der murinen PLC ζ (mPLC ζ) identifizierten Cox et al. (2002) die PLC ζ von Mensch (hPLC ζ) und Rhesusaffe (sPLC ζ) (Abb. 8). Diese Isoformen haben ein ähnliches Molekulargewicht wie mPLC ζ und unterscheiden sich nur minimal in ihrer Aminosäuresequenz (Tab. 2).

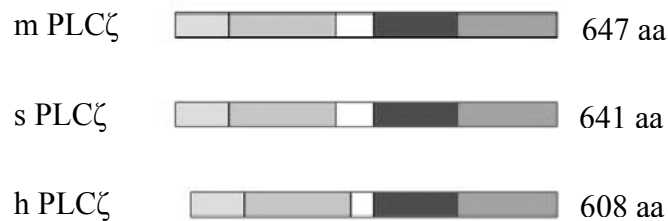


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Hauptstrukturen der PLC ζ Sequenz von Mensch (h), Affe (s) und Maus (m) (Cox et al. 2002), aa = Aminosäuren

Tabelle 2: Zusammenfassung der molekularen Eigenschaften der bisher gefundenen PLC ζ -Sequenzen verschiedener Spezies. AA = Aminosäuren, MW = Molekulargewicht

Spezies	mRNA [kb]	AA	MW [Da]	Acc. No.
Rind (b)	2.0	634	N.N.	AY646356
Mensch (h)	2.2	608	70 406	AF532185
Maus (m)	2.3	647	74 609	AF532185
Affe (s)	2.3	641	74 545	AF435950

Die PLC ζ des Menschen und die des Affen zeigen eine Gleichheitsgrad von 90 %, zur PLC ζ des Nagers besteht eine Gleichheit von 70 bzw. 71 %. Humane Eizellen, die bei der ICSI nicht befruchtet wurden, reagierten auf die Injektion der hPLC ζ mit konzentrationsabhängigen Oszillationsmustern etwa 30 min nach Injektion (Rogers et al. 2004). Malcuit et al. (2005) detektierten eine Ca²⁺-Oszillation in Rindereizellen nach Injektion mit mPLC ζ cRNA nach etwa 60 min.

Auch die Injektion des rekombinanten PLC ζ Proteins in Eizellen der Maus verursachte Ca²⁺-Oszillationen. Es war jedoch ein wenig mehr Protein zur Stimulation der Calciumfreisetzung notwendig als bei den Untersuchungen zur in vitro Expression (Kouchi et al. 2004).

3 Material und Methoden

3.1 Übersicht über die Versuche

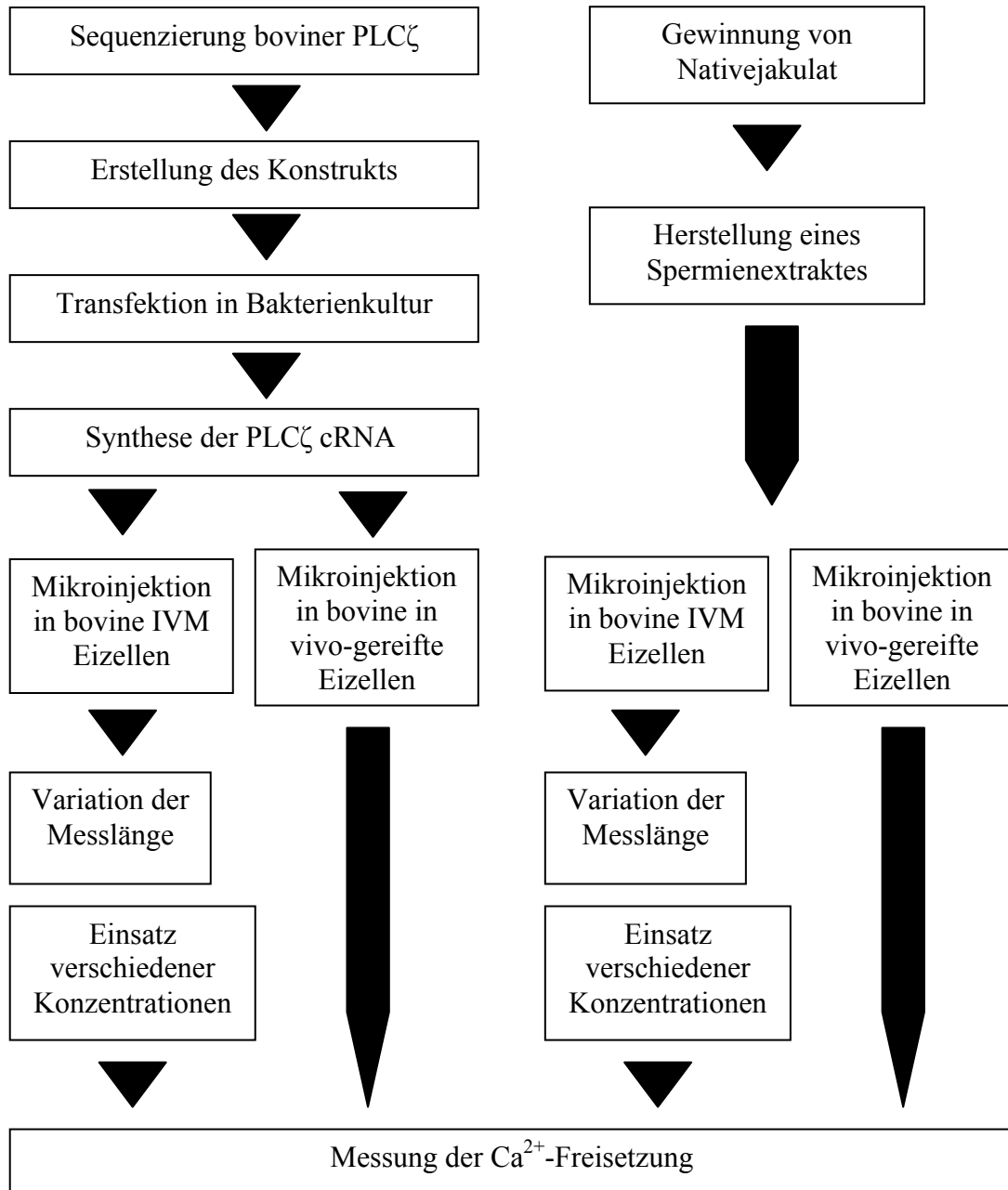


Abbildung 9: Schematische Versuchübersicht

3.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von Sigma bezogen. Alle Chemikalien waren stets „cell culture tested“. Substanzen, die für die Embryonenkultur eingesetzt wurden, trugen den Vermerk „embryo tested“

3.2.1 Salze

CaCl ₂ - anhydrous	C-2661
CaCl ₂ * 2H ₂ O	C-7902
KCl	P-5405
KH ₂ PO ₄ - anhydrous	P-5379
MgCl ₂ * 6H ₂ O	M-2393
NaCl	S-5886
NaHCO ₃	S-5761
NaH ₂ PO ₄ - anhydrous	S-5011
Albumin, Fraction V, bovine (BSA)	A-3311
Gentamycin-Sulfat	G-1264
L-Glutamin	G-8540
Hemicalciumlactat, hemicalcium salt	L-4388
Hepes	H-6147
Hyaluronidase (bovine)	H-3506
Na-pyruvat, sodium salt	P-4562
Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	D-8537
Penicillin G, potassium salt, 100.000.000 units	PEN-K
Streptomycin-Sulfat	S-1277
TCM 199 (powder)	M-2520

3.2.2 Lösungen

Acetic Acid	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Best Minimum Essentials (BME), 50x	
Chloroform	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
N,N'-Dimethylformamid	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxide (DMSO)	D-8779
Ethanol, 99,9 %	A-2795.9010 AppliChem GmbH, Darmstadt
Glacial Acetic Acid	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
ICSI TM -100 (PVP)	REF 90016 Vitrolife, Göteborg (Schweden)
Isopropanol	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Medium 199	M-2154
Mineralöl	M-8410

Nitric Acid	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Non-essential Amino Acid Solution (MEM), 100x	M-7145
Phenol/Chloroform (50:50)	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

3.2.3 Weitere Reagenzien

Agar-Agar	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ampicillin Sodium Salt	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Estrumate [®]	Essex Tierarznei, München, Deutschland
Fluo-4, AM	F-14201, Molecular Probes
Follikel-stimulierendes Hormon (FSH)	Folltropin Vetrepharm Canada Inc., London, Ontario/Canada
Ionomycin	I-0634
IPTG dioxan-frei (Isopropyl β -D-Thiogalactosid)	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcarbonat	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Receptal [®]	Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Sequagel Complete Buffer Reagent	Biozym Diagnostik, Hessisch-Oldendorf, Deutschland
Sequagel XR (6%)	SQG-XR-842, Biozym Diagnostik, Hessisch-Oldendorf, Deutschland
Silbernitrat	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Stimufol [®]	Merial Belgium nv/sa, Brüssel, Belgien
TEMED (C ₆ H ₁₆ N ₂)	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TRIzol Reagens	Gibco BRL [®] , Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
X-Gal: C ₁₄ H ₁₅ BrClNO ₆	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

3.2.4 Zusammengesetzte Reagenzien

40% Acryamid/bis-acrylamid (49:1)	39,2 g	Acrylamid
	0,8 g	N,N-methylen-bisacrylamid
	ad 250 ml	ddH ₂ O

Agarose-Gel Beladungspuffer	0,25 %	Bromphenol-Blau
	0,25 %	Xylen-Cyanol
	120 mM	EDTA

Ampicillin (10 mg/ml)	2,0 g	Ampicillin Pulver
	ad 40 ml	ddH ₂ O

sterilfiltrieren mit einem 0,45 µl Filter

Dextran-Blau Beladungspuffer	50 mg	Dextran-Blau
	50 µl	EDTA (0,5 M)
	950 µl	ddH ₂ O
	5 ml	Formamid

DEPC-behandeltes Wasser	1 ml	DEPC
	ad 1000 ml	ddH ₂ O

bei 37 °C inkubieren und hitze-inaktivieren durch Autoklavieren (121 °C, 30 min)

1% FA Gel	1,0 g	Agarose
	10,0 ml	10x FA Puffer
	1,8 ml	37 % Formaldehyd
	1,0 µl	Ethidiumbromid
	ad 90 ml	DEPC-beh. ddH ₂ O

Aufkochen!

Proteinase K-Lösung	10 mg	Proteinase K
SDS	1 % (w/v)	
SSCP Beladungspuffer	47,5 ml	Formamid
	200,0 mg	Natriumhydroxid
	125,0 mg	Bromphenol-Blau
	125,0 mg	Xylen-Cyanol
	ad 50 ml	ddH ₂ O
X-Gal	50,0 mg	X-Gal
	1,0 ml	N,N-Dimethylformamid

Lagerung bei -20 °C

3.2.5 Puffer

Alle Angaben beziehen sich auf einen Liter.

10x FA Puffer	200 mM	MOPS
	50 mM	Natriumacetat
	10 mM	EDTA
50x TAE	242,0 g	Tris Basis
	57,1 ml	Glacial Acetic Acid
	100,0 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)
10x TBE	90 mM	Trisborat (pH 8,0)
	20 mM	EDTA (pH 8,0)
10x TE	100,0 ml	1 M Tris (pH 8,0)
	1,0 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)
	990,0 ml	ddH ₂ O

Autoklavieren bei 121 °C , 30 min

3.3 Kulturmedien

LB-Agarplatte	8,0 g	NaCl
	8,0 g	Pepton
	4,0 g	Hefe-Extrakt
	12,0 g	Agar-Agar
	480,0 µl	Na-Hydroxid (40 mg/ml)
	ad 800,0 ml	ddH ₂ O

Autoklavieren bei 121 °C, 30 min

LB-Broth	8,0 g	NaCl
	8,0 g	Pepton
	4,0 g	Hefe-Extrakt
	480,0 µl	Na-Hydroxid (40 mg/ml)
	ad 800,0 ml	ddH ₂ O

Autoklavieren bei 121 °C, 30 min

TCM-air	755,0 mg	TCM 199
	2,5 mg	Gentamycin-Sulfat
	1,1 mg	Na-pyruvat
	17,5 mg	NaHCO ₃ (getrennt lösen)
	ad 50 ml	ddH ₂ O
	5,0 mg	BSA

Osmolalität: 266 mOsm

auf pH 7,2 mit 1 M NaOH einstellen,

sterilfiltrieren, max. 2 Wochen verwendbar, 4°C

TCM-Kultur	755,0 mg	TCM 199
	2,5 mg	Gentamycin-Sulfat
	1,1 mg	Na-pyruvat
	110,0 mg	NaHCO ₃ (getrennt lösen)
	ad 50 ml	ddH ₂ O
	5,0 mg	BSA

Osmolalität: 285-290 mOsm

ca. 1 h im offenen Glas rühren ⇒ pH 7,4 (kontrollieren)

sterilfiltrieren, max. 2 Wochen verwendbar, 4 °C

Medium vor Gebrauch mind. 2 h bei 39 °C, 5 % CO₂ äquilibrieren

MPM (Modified Parker Medium)

Stockmedium	Lösung 1	80,0 mg	NaHCO ₃
		140,0 mg	HEPES
		25,0 mg	Na-pyruvat
		10,0 mg	L-Glutamin
		in 100,0 ml	TCM-199
	Lösung 2	60,0 mg	Hemicalciumlactat
		in 10,0 ml	ddH ₂ O

beide Lösungen in einer sterilen Glasflasche gut mischen

Osmolalität: 280-300 mOsm

sterilfiltrieren, max. 4 Wochen verwendbar, 4 °C

Gebrauchsmedium

MPM-Stocklsg. mit 12 % ÖCS gut mischen, sterilfiltrieren,

bei 39 °C, 5 % CO₂ mindestens 2 h äquilibrieren

3.4 Kommerzielle Kits

- SequiTherm EXCEL™II (Biozym Diagnostic)
- pGEM®-T und pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega)
- Gen Elute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma)
- Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega)
- RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH)
- RQ1 RNase-free DNase (Promega)
- SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences Clontech, USA)
- Poly(A) Tailing Kit (#1350, Ambion)
- T7 RiboMAX® Large Scale RNA Production Systems (P-1300, Promega)
- Ribo m⁷G Cap Analog (Promega)

3.4.1 Enzyme

- SuperScript™II RNase H⁻Reverse Transcriptase (Gibco BRL® und Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Restriction enzymes (Promega)
- Taq DNA Polymerase (Sigma)
- AccuTaq DNA Polymerase (Sigma)

3.5 Geräte

- Zentrifuge: HERMLE Z 323K, Wehingen, Deutschland
- Elektrophorese/DNA-Analyser: Sequenzer LI-COR, DNA Analyzer, Gene Reader 4200 automated, MWG-BIOTECH
- Elektrophorese-System: Agarose-Gel – BioRad, Göttingen, Deutschland
Vertikalapparatur – Consort, Turnhout
Power Supply – PAC 3000 BioRad
- Gel-Trocknung: BioRad, München, Deutschland
- Spectrophotometer
- Thermocycler: PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc., USA)

- UV-Transilluminator: Uvi-Tec, Uni-Equip, Martinried, Deutschland

3.6 Verwendete Software

- BLAST Programm – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- DNA Alignment – <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>
- Image Analysis Programm, Version 4 – Li-COR Biotechnology, USA
- Multiple Sequence Alignment – <http://pbil.ibcp.fr/htm/index.php>
- Restriction Enzyme – <http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>
- Tm Determination – <http://alces.med.umn.edu/rawtm.html>

3.7 Molekulargenetische Methoden

3.7.1 RNA Isolation

Gewebeproben des Hodens von zwei verschiedenen Rinderrassen (Charolais und Fleckvieh) wurden für die RNA Isolation verwendet. Die gefrorenen Gewebeproben von jeweils 50 mg wurden zunächst in einem Mörser homogenisiert. 1 ml TRIZOL[®]-Reagens wurde hinzugefügt und mit Hilfe einer Spritze untergemischt. Die Proben wurden für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 0,2 ml Chloroform hinzugegeben und die homogenisierte Masse wurde durch Schütteln gleichmäßig durchmischt. Es folgte eine Inkubation von 15 min bei 15 bis 30 °C. Danach wurden die Proben bei 12000 g 15 min bei einer Temperatur von 2 bis 8 °C zentrifugiert. Die RNA befand sich ausschließlich in der oberen wässrigen Phase, die in ein neues Röhrchen überführt wurde. Die RNA der wässrigen Phase wurde dann durch Zugabe von 500 µl Isopropylalkohol gefällt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte eine weitere Zentrifugation bei 12000 g, 10 min bei 2 bis 8 °C. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet wurde einmal mit 1 ml Ethanol (75 %) gewaschen. Anschließend wurde das gewaschene Pellet luftgetrocknet und in 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Die Lagerung erfolgt bei –80 °C bis zur weiteren Verwendung.

Vor weiterem Gebrauch wurde die verbleibende DNA mit DNase aus dem Pellet entfernt. Die DNA-Verdauung wurde folgendermaßen in einem RNase-freien 0,5 ml Röhrchen durchgeführt: 25 µl RNA, 5 µl 10x Puffer, 2 µl RQ1 RNase-freie DNase, 1 µl

RNase-Inhibitor (40 U/ μ l) und 17 μ l RNase-freies Wasser. Das Gemisch wurde bei 37 °C 1 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde die RNA aufgereinigt durch den RNeasy Mini Kit (Qiagen). Zur Qualitätsbestimmung der RNA wurden 2 μ l der Probe auf einem 1 %-igen Agarosegel doppelt aufgetragen und in einer Elektrophorese überprüft. Auf DNA-Kontamination wurde mit Hilfe einer PCR mit Beta-Actin-Primern (beta actin fw –GAG AAG CTC TGC TAC GTC GC, beta actin re –CCA GAC AGC ACC GTG TTG GC) getestet. Die so gewonnene RNA wurde zur Herstellung der cDNA verwendet.

3.7.2 cDNA Synthese

Die Gesamt-RNA wurde zur Synthese des ersten cDNA-Stranges genutzt. Die Reaktion erfolgte in einem nuklease-freien Mikrozentrifugenröhrchen. 1 μ l Oligo-dT (11)N (500 μ g/ml), 1 bis 5 ng Gesamt-RNA, 1 μ l 10 mM dNTP-Mix und 12 μ l ddH₂O wurden in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß gegeben. Das Gemisch wurde für 10 min auf 70 °C erhitzt und danach sofort auf Eis gekühlt. Der Inhalt des Röhrchens wurde durch eine kurze Zentrifugation gesammelt. Vier μ l 5x Erststrang-Puffer (Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland), 2 μ l 0,1 M DDT und 1 μ l RNase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μ l) wurden hinzugefügt. Das Gemisch wurde vorsichtig gemischt und bei 40 °C für 2 min inkubiert. 1 μ l (200 Einheiten) von SuperScriptTM II RNase H Reverse Transcriptase wurde hinzugefügt und erneut inkubiert bei 42 °C für 90 min. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70 °C für 15 min inaktiviert. Die so erhaltene cDNA wurde 1:4 in RNase-freiem Wasser verdünnt. Sie wurde als Vorlage für folgende PCR-Amplifikation genutzt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

3.7.3 Primer-Design

Zunächst wurde ein Vergleich der bereits bekannten Sequenzen von PLC ζ von Mensch, Maus und Affe durchgeführt. Aus Regionen, die eine hohe Konservierung zwischen den Spezies aufwiesen, wurden Primer ausgewählt, um die bovine Sequenz zu amplifizieren. Die Primer-Paare sind unten angegeben.

PLC ζ -1 fw: GAAGATTTTAAGAACTTAGC

PLC ζ -1 re: TCTATGGTGATTCTTCCTTG

PLC ζ -2 fw: GTGAAACAGATTTTTAAGGA

PLC ζ -2 re: CAACGGCATCCTTTCACAAG

PLC ζ -3 fw: CTTTGGGGATATGTAAGTGC

PLC ζ -3 re: TTGAATTTTAGTGCCTCTGG

PLC ζ -4 fw: CCAGAGGCACTAAAATTCAA

PLC ζ -4 re: GGCTTCAAAATATATCCAGA

PLC ζ -5 fw: GGTTCTGGATATATTTTGAA

PLC ζ -5 re: ACGATAACCTTTGTTTCATGC

PLC ζ -6 fw: CATCAGTGGTATCCAGTTGC

PLC ζ -6 re: CTGACGTACCAAACATAAAC

PLC ζ -7 fw: ACAAAGCTGATACCTTAGTG

PLC ζ -7 re: TTATCTGACGTACCAAACAT

Als Ergebnis wurde die bovine PLC ζ -Sequenz mit einer Länge von 2096 bp identifiziert. Diese Länge umfasst die vollständige kodierende Region und darüber hinaus 191 bp der 5' UTR. Die gesamte Sequenz der bovinen PLC ζ ist in Abbildung 10 dargestellt.

```

1   gaagatttta agaacttagc ctccagaaca gccttcttca taaagtgaaa aggggcagtg
61  gcaacagcgg atgagtttca aggaatccct ttcttgccaa gcggcagagt taattatatt
121 tggaacctgc aacaactcat aatggagaga agcttctaag tgaggaggaa caaacttcag
181 gtcatgaaaa tatggagaac aaatggtttt tgttgatggt tcgagatgac ttcaaagggtg
241 gaaaaattac tctagaaaaa gctctgaaac tacttgaaaa attagatatt cagtgcataa
301 ctattcatgt gaaatatatt ttttaaggata atgacaggct gaaacaagga agaatcacca
361 tagaagaatt tagaacaatt tatcgaatta ttacatacag agaagaaatt attgagattt
421 tcaacacgta ttctgaaaac cggaaaattc ttttagaaaa gaacctggtc gaatttttga
481 tgcgagaaca gtatacactt gacttcaata aaagtattgc ttctgagatc attcagaagt
541 atgagcctat tgaagaagtt aaacaagcac accagatgtc atttgaaggt ttcagaagat
601 acatggattc atctgaatgt ctgctatattg ataataagtg tgatcatggt taccaagata
661 tgactcatcc attgactgat tttttattt caagttcaca taatacatac ttgatattctg
721 accaattatg gggaccaagt gacctttggg gacatataag tgcccttgty aaaggatgcc
781 gctgtctgga aattgactgc tgggatggat cacaaaatga acctgttgta taccatggct
841 atacattcac cagcaagctt ctgtttaaaa ctgttatcca agctataaac aaatatgcat
901 tcctagcatc tgagtacca gtgggtgctct ctttagaaaa tcaactgctcc cttcccaac
961 aagaagtgat ggccgacagt ttgctcgcta catttgggga tgccttgctg tcatatacgc
1021 ttgataatth ttcagacaga ctaccttcac cagaggcatt aaaattcaaa atattagtta
1081 gaaacaagaa aataggaacc ttacatgaaa cccttgaaag gaaagggttct gatatgcatg
1141 ggaaggtaga ggaatttgaa gaagaggagg agatagaaca agaggaggat ggaagtgggtg
1201 ccaaagaacc agaaccagtg ggtgattttc aagatgattt ggcaaaggaa gaacagttaa
1261 aacgggtggt cggaatccca ctcttcagga aaaagaagat aaaaatatct atggccctat
1321 ctgatcttgt tatttatact aaagttgaga agttcaaaaag ttttcatcat tcacatctat
1381 atcaacaatt taatgaaagc aactctattg gggagtccca agcccgaaaa cttacaaagt
1441 tggcagccag ggaatttatt cttcacacca ggaggttcat taccagagta tatcccaag
1501 cattaagagc tgactcttct aattttaatc ctcaagaatt ttggaatgta ggttgtcaaa
1561 tgggtggcctt aaatttccag acccctggtg tccctatgga tcttcaaat gggaaattht
1621 tggataatgg ttgttctgga tatgttttaa aaccacgctt cctaagagat aaaaaaaca
1681 agtttaatcc acataaagta caaataggea gtaatccact cacacttaca ataaggctca
1741 tcagtgggat ccagttgcct cccagttatc aaaacaaagc tgatacotta gtgattgtag
1801 aaatttttgg ggttccaaat gatcaaatga agcagcagag tcgtgtaatt aaaaaaatg
1861 cttttaatcc aagatggaat gaaacattca catttgttat tcagggtgcca gaattagcat
1921 tgattcgtht tgttgctgaa aatcaaggtt taatagctgg aatgaattht cttggacaat
1981 atactttacc agttctatgc atgaacaaag gttaccgctg tgttctctg ttttcaaaa
2041 tgggtgagag tcttgagccc gcttccctth ttatttatgt ttggtacgtc agataa

```

Abbildung 10: Die bovine PLC ζ Sequenz mit einer Länge von 2096 bp
(Acc. No. AY646356)

3.7.4 PCR-Bedingungen

Die PCR-Reaktion bestand aus 50 ng DNA Template, 0,2 μ M jedes Primers (fw, re), 50 μ M jeder dNTP, 0,5 U Taq Polymerase und 1,5 mM MgCl₂ in 1x PCR-Puffer. Die PCR wurde im Thermocycler PTC 100 (MJ Research, USA) durchgeführt. Die PCR-Amplifikation verlief nach einem Standardprotokoll. Der erste Schritt des PCR-Programms bestand darin, für 5 min auf 94 °C zu erhitzen. Danach folgten 35 Zyklen mit 30 sec bei 94 °C, 30 sec bei 65 °C - 60 °C (abhängig von der T_m der Primer) und 30 sec bei 72 °C. Die finale Extension folgte bei 72 °C für 5 min.

Von dem PCR-Produkt wurden danach 5 µl auf ein 1% Agarosegel zur Elektrophorese aufgetragen.

3.7.5 DNA Isolation aus dem Agarose-Gel

Die gesuchte Bande wurde mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in einem Zentrifugenröhrchen bei -20 °C für mindestens 1 h tiefgefroren. Die gefrorene Probe wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze zerkleinert und 500 µl TE Puffer wurden hinzugegeben. Das Gel wurde durch wiederholte Pipettieren homogenisiert. Fünfhundert µl Phenol-Chloroform (1:1) wurden zur der DNA-Lösung hinzupipettiert und ein paar Sekunden stark gevortext, dass eine Emulsion entstand. Nach der Zentrifugation bei 12000 g für 15 min wurde die obere Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Zu dieser Phase wurde das gleiche Volumen Chloroform gegeben, gevortext und wieder zentrifugiert (12000 g, 15 min), um eine Phasenseparation herbeizuführen. Die wässrige Phase wurde wiederum in ein neues Gefäß überführt. Ein Zehntel Teil von 3 M Natriumacetat (pH 5) und zwei Teile kaltes Ethanol (99 %) wurden zur DNA Probe hinzugegeben und durch Umschwenken gemischt. Diese Fällung erfolgte entweder über Nacht bei -20 °C oder bei -80 °C für mindestens 30 min. Um danach die gefällte DNA herauszufiltern wurde das Gemisch bei 12000 g und 4 °C 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das DNA-Pellet wurde in kaltem Ethanol (75 %) gewaschen (etwa 2 Teile Ethanol: 1 Teil Probe), indem es zunächst bei Raumtemperatur 5 bis 10 min inkubiert und anschließend erneut 5 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde vorsichtig mit einem Papierhandtuch abgesaugt und das DNA-Pellet anschließend luftgetrocknet. Zum Schluss wurde das Pellet in 5 µl ddH₂O gelöst.

3.7.6 Ligation

Das PCR-Fragment wurde in den pGEM-T Vektor (Abb. 11) ligiert (Promega, Mannheim, Deutschland). Bei der Ligation des PLC ζ -Fragmentes wurden 0,5 μ l des pGEM-T Vektors, 1,5 μ l des PCR-Fragments, 0,5 μ l T 4 DNA Ligase und 2,5 μ l 2x Ligationspuffer verwendet. Die Reaktion fand entweder bei Raumtemperatur während 1 h oder über Nacht bei 4 °C statt.

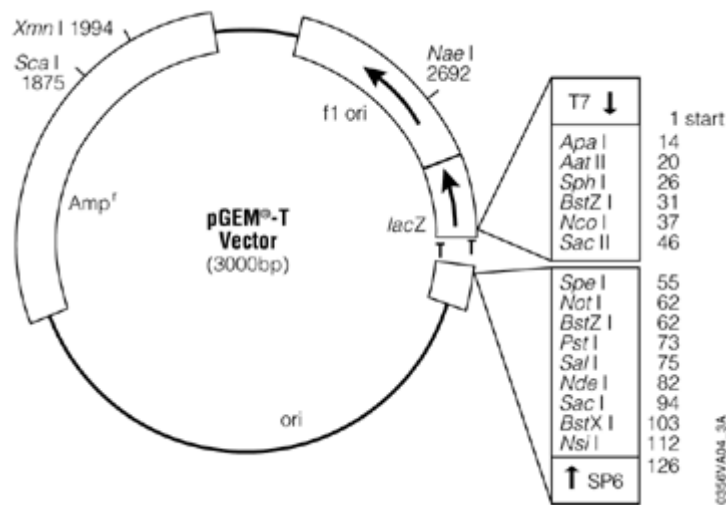


Abbildung 11: Plasmidkarte und Restriktionsschnittstellen des Vektors pGEM[®]-T (Promega 2004)

3.7.7 Transformation

Kompetente *E. coli* DH5 α (Stratagene, Amsterdam) wurden in gekühlten Polypropylenröhrchen aliquotiert. Zu 60 μ l kompetenter Zellen wurden 3 μ l des pGEM-T Ligationsgemisches zugegeben. Es folgte eine 30minütige Inkubation auf Eis. Die Zellen wurden danach bei 42 °C für 90 sec einem Hitzeschock ausgesetzt, gefolgt von einer sofortigen Abkühlung auf Eis für 2 min. Danach wurden 700 μ l LB Medium bei Raumtemperatur hinzupipettiert und das Gemisch 90 min lang bei 37 °C mit 110-150 U/min geschüttelt. Die Zelllösung wurde auf zwei LB-Kulturplatten mit Ampicillin (100 μ g/ μ l) als Selektionszusatz aufgetragen. 20 min vor Gebrauch waren mit einer Glaspipette 0,1 M IPTG und 20 μ l X-Gal auf den Platten ausgestrichen worden. Die transformierten Bakterien wurden in zweifacher Ausführung ausgesät und über Nacht

bei 37 °C bebrütet. Die erfolgreiche Integration des Inserts wurde durch eine weiße Färbung der Bakterienkolonien angezeigt. Mittels des blau/weiß Screenings wurden positive Kolonien identifiziert und mit Hilfe der PCR weiter untersucht.

3.7.8 PCR zur Ligationskontrolle

Um die Kolonie auf eine erfolgreiche Ligation zu überprüfen, wurde ein Teil der Kolonie lysiert und mittels PCR überprüft. Einzelne Kolonien wurden gepickt, kurz in 500µl LB Broth Medium getaucht und in PCR Puffer suspendiert. Die Bakteriensuspension wurde 15 min bei 95 °C gekocht. 10 µl dieses Lysats wurden zur PCR herangezogen. Die PCR-Amplifikation verlief nach einem Standardprotokoll. Das Reaktionsgemisch bestand aus 10 µl DNA Template, 0,2 µM M13 Primer (fw TTGTAAACGACGGCCAGT, re CAGGAAACAGCTATGACC), 50 µM von jedem dNTP und 0,5 U Taq Polymerase in 1x PCR-Reaktionspuffer mit 1,5 mM MgCl₂ (Sigma). Das PCR-Programm lautete wie folgt: 5 min bei 94 °C, 35 Zyklen bei 94 °C für 30 sec, bei 65 °C für 30 sec, bei 70 °C für 30 sec. Die finale Extension erfolgte bei 70 °C für 5 min.

Vom PCR-Produkt wurden 5 µl auf eine 1 %-iges Agarosegel zur Elektrophorese aufgetragen.

Diejenigen Kolonien, die in der PCR positiv waren, wurden weiter kultiviert.

3.7.9 Sequenzierung

Bei positiv getesteten Plasmiden wurde der ligierte Abschnitt nach der Kettenterminationsmethode (Sanger et al. 1977) sequenziert. Dazu wurde das SequiTherm Excel II DNA-Sequenzierkit (Epicentre Technologies, Biozym) benutzt. Für jede Sequenzierung wurden vier Reaktionen mit verschiedenen Terminationsmischungen (ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP) angesetzt. Jede Reaktion bestand aus 1 µl des Terminationsmixes und 2 µl einer vorgemischten Lösung aus 3,6 µl 3,5x Sequenzierungspuffer, 0,25 µl 10 µM SP6 Primer-800 IRD-markiert (AATTAACCTCACTAAAGGG), 0,25 µl 10 µM T7 Primer-700 IRD-markiert (TAATACGACTCACTATAGGG), 0,5 µl Taq Polymerase, 3 µl template DNA (zu überprüfendes Konstrukt), 0,9 µl deionisiertes Wasser. Die PCR wurde folgendermaßen

durchgeführt: 29 Zyklen bei 94 °C für 30 sec, 59 °C - 60 °C für 30 sec, 70 °C für 1 min. Nach der PCR wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,5 µl der Stop/loading Puffer gestoppt. Falls die Proben nicht direkt analysiert werden konnten, wurden sie bei -20 °C gelagert. Etwa 1,5 µl der durch Hitzeeinwirkung (85 °C, 5 min) denaturierten Proben wurden auf ein Standard-6 %-Polyacrylamid-Sequenzierungsgel geladen (30 ml SequaGel[®]XR, 7,5 ml SequaGel Complete Buffer, 400 µl DMSO, 300 µl 10 % APS). Die Elektrophorese wurde auf einer Sequenzierereinrichtung (DNA-Analyzer 4200, LI-COR) in 1x TBE-Puffer durchgeführt. Die Spannung betrug 1500 V, 50 mA, 50 W bei 50 °C. Die Sequenz-Daten wurden mit dem Programm Image Analysis, Version 4.10 (LI-COR Biotechnology) ausgewertet.

Nachdem die Insertion der PLCζ-Sequenz durch die Analyse bestätigt wurde, erfolgte die Extraktion des Plasmids mit Hilfe des GenElute[™] Plasmid Miniprep Kit nach den Anweisungen des Herstellers.

3.7.10 cRNA-Synthese

Zur Erstellung der cRNA wurde der pTarget Vektor (Promega) verwendet (Abb. 12). Er enthielt die bovine (b) PLCζ Sequenz in voller Länge, ausgehend von einem T7-Promotor. Die Ligation des Fragments, Transformation und Kontrolle der Ligation erfolgten wie bereits in den Kapiteln 3.7.3 bis 3.7.5 beschrieben. Dieser Plasmid wurde an der NotI Schnittstelle mit dem Restriktionsenzym linearisiert, direkt unterhalb des 3'-Endes der PLCζ Sequenz.

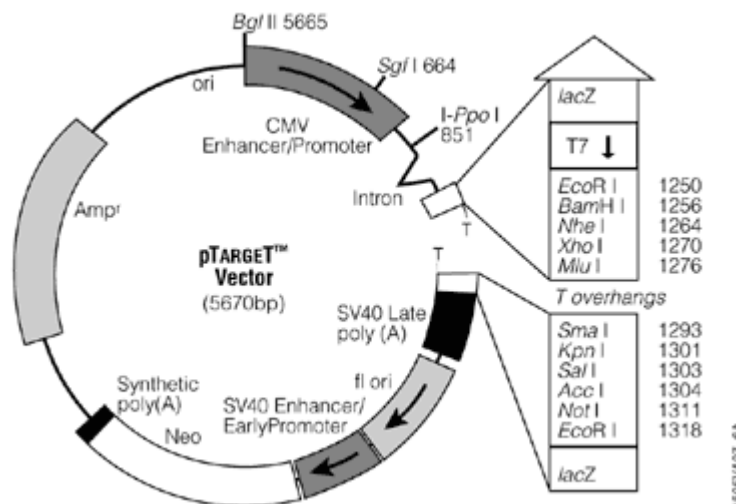


Abbildung 12: Plasmidkarte und Restriktionsschnittstellen des Vektors pTARGET™ (Promega 2004)

Die *in vitro*-Transkription der cRNA erfolgte ausgehend vom DNA Template mit dem T7 RiboMAX® Large Scale RNA Production Systems (#P1300, Promega) einschließlich eines Ribo m⁷G Cap Analog von Promega (#P1711). Diese Reaktion bewirkte eine Anlagerung eines 7-Methyl-Guanosin-Caps am 5'-Ende der cRNA. Die Reaktion wurde wie folgt durchgeführt: 10 µl T7 Transcription 5x buffer (Transkriptionspuffer), 10 µl rNTPs, 21,3 µl DNA template (Matrize), 3,7 µl Ribo Cap Analog, 5 µl Enzym Mix. Das Reaktionsgemisch wurde parallel zur Kontroll-DNA des Herstellers 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das 3'-Ende der cRNA mit Hilfe des Poly(A) Tailing Kits (#1350, Ambion) mit einem Adenin-Schwanz von etwa 150 Basen versehen.

Nach der Tailing-Reaktion wurde die RNA mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die RNA wurde in Natriumacetat und Isopropanol präzipitiert und in DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert. Zur Qualitätsbestimmung wurde 2 µl der aufgereinigten RNA doppelt auf einem 0,66 M Formaldehyd/1,2 % Agarose-Gel aufgetragen. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt (OD 260).

3.8 In vitro-Methoden

3.8.1 Gewinnung des Bullensamens

Die Gewinnung des Bullensamens erfolgte auf der Besamungsstation Borken der RUW (Rinder-Union West). Ein fertilitätsgestesteter Besamungsbulle der Rasse Deutsche Holsteins wurde von einem Techniker routinemäßig abgesamt. Dabei springt der Bulle zweimal hintereinander in einem Abstand von etwa 15 min auf ein Phantom oder einen „Untermann“, in der Regel ein Ochse. Jedes Ejakulat wird in einem Reagenzglas gesammelt, das in einer künstlichen Scheide (Hannoversches Modell) befestigt ist. Die künstliche Scheide ist mit 39 °C warmen Wasser ummantelt und bietet dem Bullen so alle zu einer erfolgreichen Ejakulation notwendigen Schlüsselreize. Unmittelbar nach der Gewinnung wird das Ejakulat bei ca. 37 °C zur weiteren Präparation in einem Kugelbad gelagert.

3.8.2 Aufbereitung des Ejakulates

Für diesen Versuch wurde das frisch gewonnene Ejakulat von der Besamungsstation gekühlt bei 7 bis 9 °C, innerhalb von zwei Stunden nach der Absamung des Bullen ins Labor transportiert, wo die weitere Aufbereitung erfolgte. Direkt nach der Absamung des Bullen erfolgte die Erfassung des Volumens über Wägung, eine photometrische Dichtemessung, sowie eine mikroskopische Motilitätsbestimmung und eine Bestimmung der Massenbewegung. Damit erhielt man Aufschluss über die Spermaqualität bzw. die Spermienanzahl im Ejakulat.

Neben den Spermien enthielt das Ejakulat u.a. noch Seminalplasma, das von den Spermien getrennt werden musste. Dazu wurde jeweils 1 Teil des Ejakulates mit 2 Teilen D-PBS⁻ (4 °C) gewaschen und in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen 15 min bei 1100 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dann wurde das Pellet erneut mit PBS⁻ aufgeschüttelt und abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Wichtig war, dass die Spermien nach der letzten Zentrifugation noch lebendig waren. Von dem resultierenden Pellet wurde eine Probe genommen und erneut auf die Spermienmotilität hin untersucht. Daneben wurde eine Probe gezogen und in einem Verhältnis in ddH₂O verdünnt (1:1000). In einer Neubauer improved-

Zählkammer wurde dann die Zellzahl bzw. die Anzahl der Spermien/ml bestimmt. Danach wurde die Spermienkonzentration entweder auf 5×10^9 Spermien/ml oder 2×10^9 Spermien/ml eingestellt und zu je 50 μ l in Kryoröhrchen (Fa. Nunc) aliquotiert. Die Spermien wurden in flüssigem Stickstoff kurz schockgefroren und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.8.3 Bereitung des Spermienextraktes

Um die Proteine der Spermien für die Injektion verwenden zu können, mussten zunächst diese aus ihrer zellulären Matrix gelöst werden. Dies geschah durch das Brechen der Membran durch wiederholtes Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen. Durch den Wechsel der Aggregatzustände werden die Zellmembranen solchen Kräften ausgesetzt, dass sie aufbrechen und der intrazelluläre Inhalt auf diese Weise freigesetzt wird.

Ein 50 μ l-Aliquot des gereinigten Ejakulates wurde nun dreimal bei 37 °C aufgetaut und danach immer sofort wieder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden die unlöslichen Spermienbestandteile durch Zentrifugation (Fa. Hermle, Z 160 M) bei 13000 g, 15 min abgetrennt. Der Überstand wurde abgehoben und erneut für 15 min bei 13000 g zentrifugiert. Der so gewonnene Spermienextrakt, der nur noch aus dem intrazellulären Inhalt der Spermien bestand, konnte so für die Injektionen eingesetzt werden. Für eine kurze Zeit konnte dieser Extrakt auf Eis oder im Kühlschrank bei 4 °C gelagert werden.

3.8.4 Gewinnung der Ovarien

Die Ovarien wurden am Schlachtband manuell mit Hilfe einer Schere vom Mesovar getrennt und, wenn erforderlich, gereinigt. Anschließend wurden sie in das Transportgefäß gegeben. Dieses Gefäß, eine Thermoskanne, war mit 0,9 %igen NaCl-Lösung mit 0,5 ml/l Procain-Penicillin (Fa. Albrecht, Aulendorf) gefüllt. Die NaCl-Lösung war zuvor auf 39 °C erwärmt worden. Innerhalb von 3 Stunden erreichten die Ovarien das Labor.

3.8.5 Gewinnung der Eizellen

Im Labor wurden die Ovarien einmal mit erwärmtem (39 °C, aus dem Wärmeschrank) Ethanol (70 %) gewaschen, anschließend zwei- bis dreimal mit der NaCl-Lösung mit Procain-Penicillin.

Die Ovarien wurden mit einer sterilen 5 ml-Spritze und einer Kanüle 18 G (1,20 x 40 mm) von Hand punktiert. Es wurden alle Follikel mit einem Durchmesser von 2 bis 8 mm punktiert. Die Follikelflüssigkeit wurde in einem auf 39 °C erwärmten, sterilen 50 ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt und etwa 10 min zur Sedimentation stehen gelassen.

Zum Auffinden der Eizellen wurde das Sediment mit einer Einmal-Pasteurpipette aus Kunststoff großzügig abgenommen und in einer großen Petrischale (Ø 10 cm). In die Rückseite der Petrischalen wurde zuvor mit einem Dorn von Hand ein Suchraster eingeritzt. In eine zusätzliche Petrischale wurde ein Tropfen TCM-air gegeben. Alle gefundenen und tauglichen Eizellen wurden in diesem Tropfen zunächst gesammelt. Nach Abnahme des Sediments der Follikelflüssigkeit wurde die verbleibende Flüssigkeit in der Zentrifuge für wenige Sekunden bei höchster Geschwindigkeit angeschleudert, das daraus gewonnene Sediment wurde ebenfalls abgenommen, in eine geritzte Petrischale gegeben und durchsucht.

Es wurden nicht alle im Punktat gefundenen Eizellen in Maturation gesetzt. Selektiert wurden nur Eizellen, die einen weitestgehend geschlossenen, unbeschädigten Kumulus aufweisen bzw. mindestens drei Lagen Kumuluszellen erkennen ließen. Weiterhin musste das Cytoplasma gleichmäßig dunkel granuliert sein, es durfte keine hellen Granula oder Vakuolisierungen enthalten, oder zwar gleichmäßig gefärbt, aber im Farbton viel zu hell sein. Eizellen, die von einem Kumulus umgeben waren, dieser aber bereits aufgedunsen, wolkig, transparent mit kleinen schwarzen Punkten durchsetzt war, waren bereits in einem Stadium der Degeneration und wurden deshalb nicht für die IVF selektiert.

Das Heraussuchen der Eizellen betrug maximal 15 min, da sonst die Gefahr bestand, dass die Eizellen durch Reste der Follikelflüssigkeit und den engen Kontakt untereinander verklebten, und so die Maturationsqualität negativ beeinflusst wurde. Die Eizellen wurden danach noch zweimal in Maturationsmedium (MPM, versetzt mit 12 %

hitzeinaktiviertem ÖCS) gewaschen und anschließend in Gruppen zu je 50 Eizellen in eine vorbereitete 4-Well-Schale gesetzt.

3.8.6 In vitro-Maturation der Eizellen

In eine Multischale (4-Well-Schale, Fa. Nunc, Dänemark) wurden in jedes Well 400 µl MPM, versetzt mit 12 % ÖCS und 4,5 µl/ml Follikel-stimulierendes Hormon (10 µg/ml) (FSH/Folltropin, Fa. Vetrepharm Inc., Kanada), gegeben und mit 400 µl Mineralöl überschichtet. Das Medium wurde zuvor bei 39°C und einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und einer Umgebungsluft von 95 % für mindestens 1 h äquilibriert. In jedes Well wurden daraufhin 50 Eizellen gegeben, die dort 22 h lang maturierten.

3.8.7 Gewinnung in vivo-gereifter Eizellen

Zur Gewinnung in vivo-maturierter Eizellen wurde das Spendertier nach einem erweiterten Ovsynch-Programm (Havlicek et al. 2005) stimuliert. Das genaue Superovulationsprogramm ist in Kapitel 8 Anhang, Abbildung 16, einzusehen.

Am Tag der geplanten Ovulation wurden unter endoskopischer Kontrolle nach Havlicek et al. (2005) beide Ovarien in vivo punktiert. Das Punktat wurde in einem 15ml-Falconröhrchen aufgefangen und direkt nach der Punktion im Labor durchsucht. Dazu wurde das Punktat zunächst durch einen Embryonenfilter (Fa. Minitüb) gegeben und mit D-PBS⁻-FKS (PBS mit 0,5 % FKS) gespült. Das detaillierte Protokoll der COCs-Punktion bzw. Spülung findet sich im Kapitel 8 Anhang, Abbildung 17. Der Rückstand im Filter wurde noch mal mit D-PBS⁻-FKS aufgeschwemmt und dann in einer großen Petrischale nach den COCs durchsucht. Um das Auffinden der großen COCs zu erleichtern, wird 1 ml Hyaluronidase (0,5 mg/ml) hinzugegeben. Die gefundenen Eizellen wurden aufgrund der geringen Anzahl nicht auf Polkörperpräsenz untersucht. Eizellen, die nach der Selektion noch nicht entkumuliert waren, wurden durch leichtes Vortexen von den noch anhaftenden Zellen befreit. Der Transport zum Ort der Injektion und Messung erfolgte in TCM-air bei 39 °C.

3.9 Fluoreszenzoptischer Nachweis der $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillation

Die Freisetzung von $[Ca^{2+}]_i$ -Ionen in der Eizelle wurde durch Fluoreszenz-Mikroskopie nachgewiesen („Imaging“). Die Visualisierung der intrazellulären $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration erfolgte mit Hilfe des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenz-Farbstoffs Fluo-4AM (Molecular Probes Inc., Oregon/USA) und wurde anhand eines computer-unterstützten Meßsystems (Fa. Hamamatsu) ausgewertet. Der Indikator wurde durch Licht mit einer Wellenlänge $\lambda = 497$ nm angeregt. Das emittierte Licht wurde von einer CCD-Kamera aufgezeichnet, und die Intensität wurde durch die Software AquaCosmos 1.3 der Fa. Hamamatsu in Form einer Messkurve dargestellt.

3.9.1 Färbung der Eizellen mit dem $[Ca^{2+}]_i$ sensitiven Farbstoff Fluo-4AM

Nach 22 h Maturation wurden die COCs dem Medium entnommen und entkumuliert. Zur Entkumulation diente eine Lösung von 1 mg/ml Hyaluronidase, 4 mg BSA/ml in D-PBS ohne Calcium und Magnesium (D-PBS⁻). Die Eizellen wurden 3 min in 500 μ l dieser Lösung gevortext. Anschließend wurden die Eizellen ohne Kumuluszellen herausgesucht und dreimal in TCM-air gewaschen. Nur die Eizellen, die einen deutlich sichtbaren ersten Polkörper hatten, wurden für die Messungen herangezogen (Abb. 13).

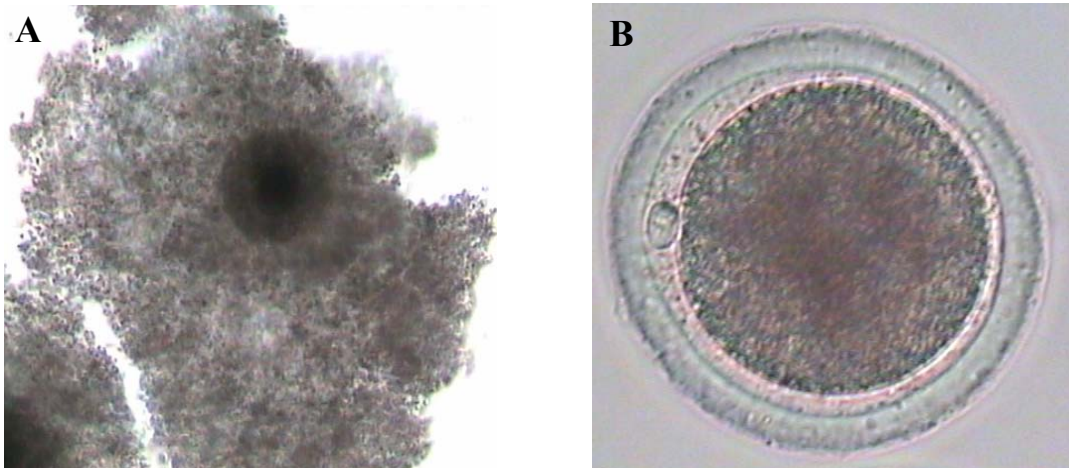


Abbildung 13: Mikroskopische Darstellung eines maturierten Kumulus-Oozyten-Komplexes (COC), Qualität 1, die zur Mikroinjektion herangezogen wurden. A COC (mit Kumuluszellen), B denudierte IVM Eizelle (MII) des Rindes

Zur Fluoreszenzfärbung wurde der Indikator Fluo-4AM verwendet. Die AM (Acetoxymethylester)-Form von Fluo-4AM verleiht dem Farbstoff die Eigenschaft der Zellpermeabilität, d.h. er diffundiert passiv durch die Zellmembran bzw. Zona pellucida, ohne der Zelle zu schaden oder dass eine Injektion nötig ist. In der Zelle wird der Indikator durch unspezifische Esterasen in zell-impermeante Bestandteile gespalten, so dass die Fluo-4 Bestandteile in der Eizelle verbleiben. Die Konzentration der Stocklösung betrug 1 mM, gelöst in DMSO.

Die entkumulierten Eizellen wurden für die Dauer von 1 h in einem 10 μ l Mikrotropfen TCM-Kultur mit einer Fluo-4AM-Endkonzentration von 100 μ M im Brutschrank bei 39 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Der Mikrotropfen wurde vorsichtig mit Mineralöl überschichtet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Eizellen mehrmals in TCM-Kultur gewaschen, bis die Waschtropfen keine Rückstände des Farbstoffs mehr aufzeigten.

3.9.2 Mikroinjektion der Eizellen

Die Injektion erfolgte an einem inversen Mikroskop der Fa. Leica, Typ DM-IRB, mit einer Mikromanipulationseinrichtung der Fa. Narishige und einer Injektionseinrichtung (CellTram vario/air, Eppendorf). Die Haltekapillare (REF 441035, Reproline medical GmbH, Rheinbach) hatte einen Innendurchmesser von 10 μm . Zur besseren Fixierung der Eizelle in der Injektionsschale war die Haltekapillare in einem Winkel von 35° abgeknickt, so konnte die Eizelle in horizontaler Ebene fixiert werden. Als Injektionskapillaren wurden die micro-injection pipettes der Fa. Cook Ltd., Irland, verwendet. Sie hatten einen Innendurchmesser von 5,5 μm , der Außendurchmesser beträgt 7 μm . Ferner waren die Kapillaren mit einem Spike versehen, die Spitze war um 35° angewinkelt.

Vor Beginn jeder Injektionsreihe mussten die Kapillaren genau eingestellt werden. Dazu wurde eine sogenannte C-Schale erstellt. Dies war eine Petrischale mit einem 10 μl Tropfen vom Injektionsmedium (TCM-air), der mit Mineralöl überschichtet war. In dieser Schale wurden die Kapillaren vor der Injektion eingestellt.

Die eigentliche Injektionsschale bestand aus einem 10 μl Tropfen TCM-air im Zentrum der Schale, einem 1 μl Tropfen mit der Injektionslösung (Spermiextrakt, cRNA oder Puffer) rechts daneben und einem 1,5 μl Tropfen ICSI-PVP 10 % darunter (Abb. 14). Die anschließende Messung erfolgte entweder in der gleichen Schale oder, je nach Versuchsaufbau in einer weiteren Schale mit einem 10 μl Tropfen TCM-air. Jede Schale war mit Mineralöl überschichtet, um eine Änderung des pH-Wertes oder der Osmolarität des Mediums zu verhindern.

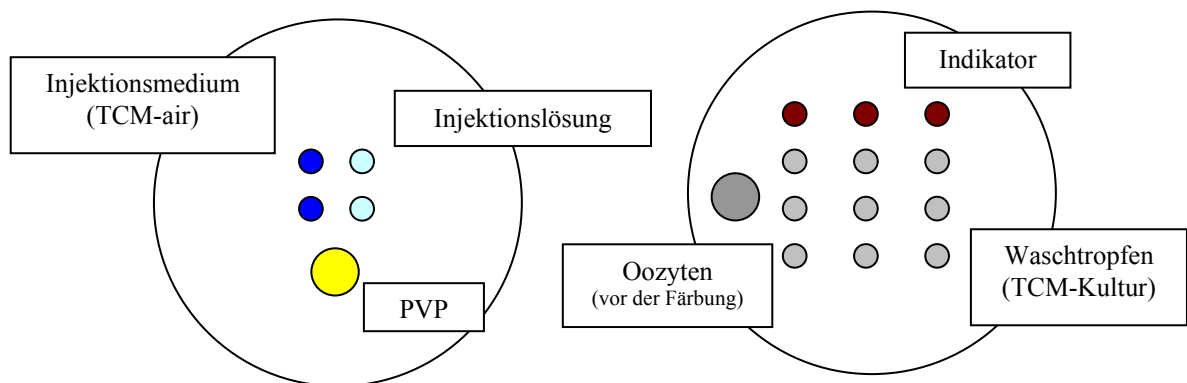


Abbildung 14: Darstellung der Petrischalen, die zur A Injektion und B Färbung der Eizellen eingesetzt wurden.

Anschließend wurde in die indikator-beladenen Eizellen ein Volumen von etwa 5 pl des Spermienextraktes oder das gleiche Volumen PLC ζ cRNA injiziert. Bei der Injektion wurden immer mehr Eizellen injiziert als anschließend gemessen werden konnten, da bei der Manipulation der Eizellen stets unvorhergesehene Verluste auftreten konnten.

Von der PLC ζ cRNA wurden die Konzentrationen 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Dies waren die in der Injektionspipette vorgelegten Konzentrationen. Das entsprach einer absoluten Menge von 50 pg, 100 pg und 200 pg cRNA in der Eizelle. Die Konzentration im Bezug auf das Eizellvolumen betrug 0,05 pg/pl, 0,1 pg/pl und 0,2 pg/pl. Das Eizellvolumen der Rindereizelle wurde mit etwa 900 pl angesetzt.

Die zur Messung vorgesehenen Eizellen wurden nach der Injektion so nah wie möglich zusammengeschoben. Nur so konnten maximal 5 bis 6 Eizellen in einer Messung erfasst werden. Bevor die Messung gestartet wurde, wurden über die Software AquaCosmos 1.3 von Hamamatsu die Parameter gewählt wie Belichtung, Helligkeit und Kontrast. Ferner wurde die Länge der Messung festgelegt, sowie der zeitliche Abstand der einzelnen Messbilder, die der Computer dann als Kurve der relativen Fluoreszenzintensität (relative intensity) in Abhängigkeit zur Zeit wiedergab. Die Messung erfolgte an einem inversen Mikroskop der Fa. Leica, Typ DM IRB. Sowohl bei der Injektion als auch während der Messung war der Objektisch des Mikroskops auf etwa 39 °C beheizt.

3.9.3 Erfassung der $[Ca^{2+}]_i$ Oszillationen

Nach erfolgreicher Injektion wurden die injizierten Eizellen gemessen. Die Messgruppen wurden unterschieden in die Negativkontrolle - PBS⁻, die Positivkontrolle - den Spermienextrakt und die PLC ζ cRNA. Alle Eizellen einer Messreihe wurden zum gleichen Zeitpunkt injiziert. Die Eizellen, die mit dem Spermienextrakt injiziert wurden, wurden in den Fenstern 5 Minuten bis 60 Minuten und teilweise auch von 60 Minuten bis 120 Minuten nach der Injektion gemessen. Die Eizellen, die mit der cRNA injiziert wurden, wurden nach der Injektion für 1 bis 1,5 h bei 39 °C, 5 % CO₂ inkubiert, um so der Eizelle Zeit für die Translation und eine Akkumulierung des Proteins zu geben. Die Messung erfolgte danach in 60 Minuten-Fenstern bis zum Zeitpunkt von 8 Stunden nach der Injektion. In einer Messung wurden 4 bis 6 Eizellen gemessen. Die injizierten Eizellen warteten in einem Tropfen TCM-Kultur im Inkubator bei 39 °C und 5 % CO₂. Für jede einzelne Messung wurde eine neue Gruppe aus diesem Pool entnommen. So konnte eine gleichbleibende Funktionsfähigkeit der Eizellen für die Dauer der Messung gewährleistet werden. Die Messungen fanden in TCM-air, unter Öl auf einem beheizten Objektisch (39 °C) statt.

3.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung bezüglich Reaktionsfähigkeit der Eizellen erfolgte mit dem χ^2 -Test. Verwendet wurde das SAS-Programm ProcFreq, Version 9.1.

4 Ergebnisse

4.1 Erhalt der Reaktionsfähigkeit der Eizelle nach der Fluoreszenzfärbung

Der Ca^{2+} -sensitive Indikator Fluo 4-AM, mit dem die Eizellen für den fluoreszenzoptischen Nachweis beladen wurden, wies eine Endkonzentration von 10% DMSO im Medium auf. Es sollte zunächst geprüft werden, ob diese hohe DMSO-Konzentration einen negativen Einfluß auf die Reaktionsfähigkeit in Hinsicht der Ca^{2+} -Freisetzung im Cytoplasma haben könnte.

Dazu wurde den zuvor gefärbten Eizellen individuell Ionomycin ins Medium zugegeben und die Ca^{2+} -Freisetzung gemessen. In einer Verdünnungsreihe wurden jeweils drei Eizellen mit den Endkonzentrationen 0,1 μM , 1 μM , 3 μM , 5 μM und 10 μM untersucht. Jede Eizellen antwortete auf die Ionomycin-Zugabe mit einem sofortigen Anstieg der intrazellulären Konzentration freier Calciumionen. Wie bereits in der Literatur beschrieben (Nakada and Mizuno 1998), produzieren die Eizellen nach Ionomycin-Zugabe nur einen einzelnen Peak. Der Ca^{2+} -Spiegel steigt rasant an. Nach Abklingen des Peaks kehrt die Eizelle nur bei einer Endkonzentration von 0,1 μM Ionomycin auf ihr basales Niveau der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zurück, bei den anderen Konzentrationen erreicht sie den basalen Wert nicht wieder (Abb. 15).

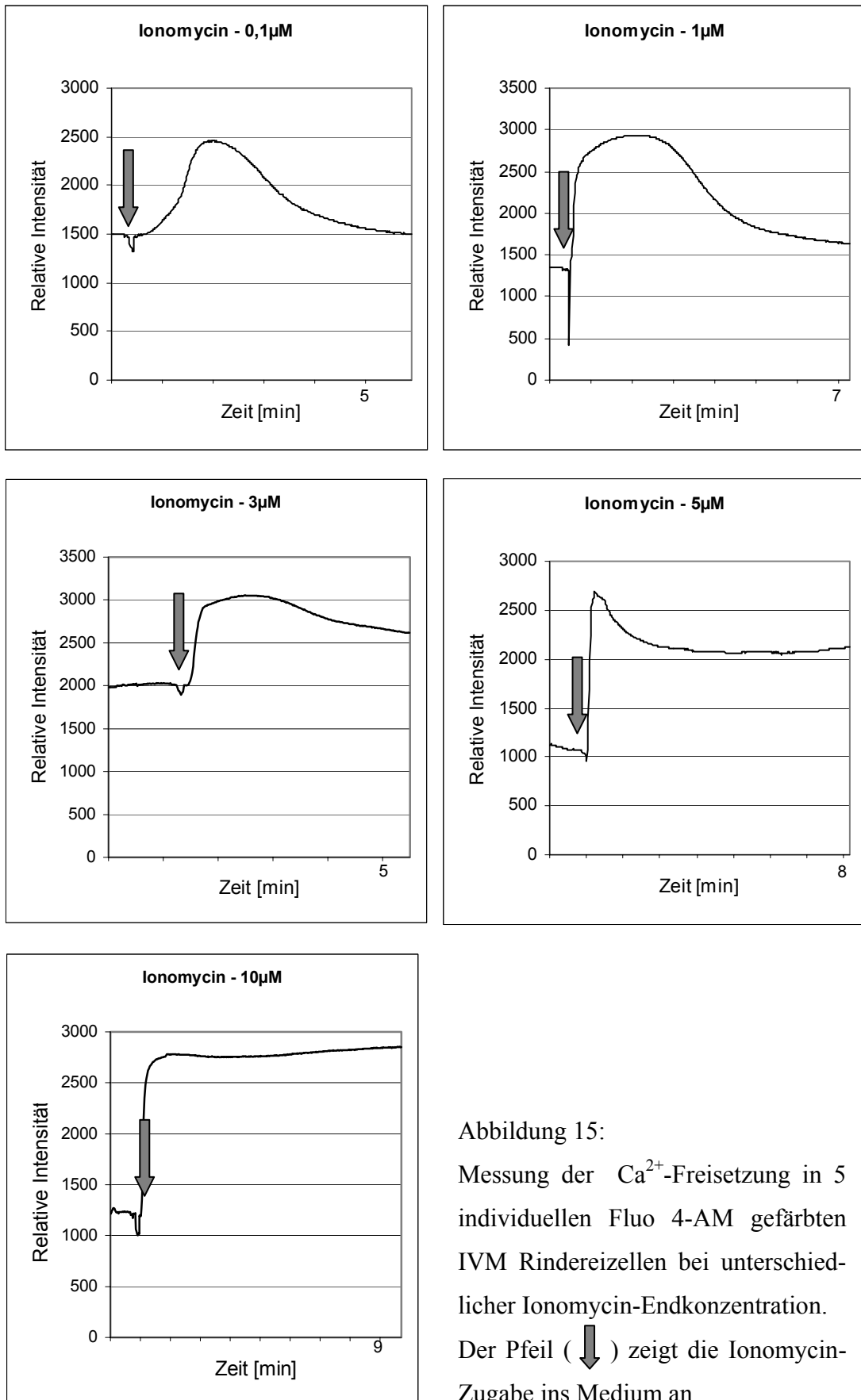


Abbildung 15:

Messung der Ca^{2+} -Freisetzung in 5 individuellen Fluo 4-AM gefärbten IVM Rindereizellen bei unterschiedlicher Ionomycin-Endkonzentration. Der Pfeil (\downarrow) zeigt die Ionomycin-Zugabe ins Medium an.

4.2 Mikroinjektion eines bovinen Spermienextraktes in Rindereizellen

Die Injektion des Spermienextraktes vom Rind diente als Positivkontrolle zur Injektion der PLC ζ cRNA. Es wurden Spermienextrakte vom Rind mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen in In vitro-maturierte (IVM) Rindereizellen injiziert. In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Ca²⁺-Freisetzung nach Extraktinjektion in IVM Eizellen verglichen mit der Reaktion in vivo-maturierter Eizellen.

4.2.1 Injektion boviner Spermienextrakte unterschiedlicher Konzentrationen in IVM Eizellen und Messung der Ca²⁺-Freisetzung

Bei der Injektion des Spermienextraktes kamen zwei Konzentrationen zum Einsatz: 2 Spermienäquivalente (sp)/pl und 5 sp/pl, bezogen auf die Konzentration des Extraktes in der Injektionskapillare. Die Messung erfolgte in Gruppen zu 4 bis 6 Eizellen unmittelbar nach der Injektion. Die Messungen dauerten jeweils bis zu 60 min.

Hatte der Spermienextrakt die Konzentration 5 sp/pl, produzierte eine signifikant höhere Anzahl der injizierten Eizellen schnell aufeinanderfolgende Ca²⁺-Peaks im gewählten Messfenster ($p \leq 0,017$, χ^2 -Test/F-Test, nv-verteilt) (Tab. 3).

Tabelle 3: Anzahl und Anteil der Eizellen, die nach Injektion eines bovinen Spermienextrakts (2 sp/pl bzw. 5 sp/pl) in IVM Rindereizellen im Messfenster 0 bis 60 min mit einer Ca²⁺-Freisetzung reagierten. Aufgeführt ist auch die Anzahl der Ca²⁺-Peaks der reagierten Eizellen.

Extrakt- konzentration	Anzahl n	1	2 – 3	> 3	Ca ²⁺ -	keine
		Ca ²⁺ -Peak n ₁ (%)	Ca ²⁺ - Peaks n ₂ (%)	Ca ²⁺ - Peaks n ₃ (%)	Oszillation vorhanden n ₁ +n ₂ +n ₃ (%)	Reaktion n (%)
2 sp/pl	38	2 (5,3)	1 (2,6)	10 (26,3)	13 (34,2)	25 (65,7)
5 sp/pl	22	1 (4,5)	4 (18,2)	10 (45,5)	16 (72,3)	7 (31,8)

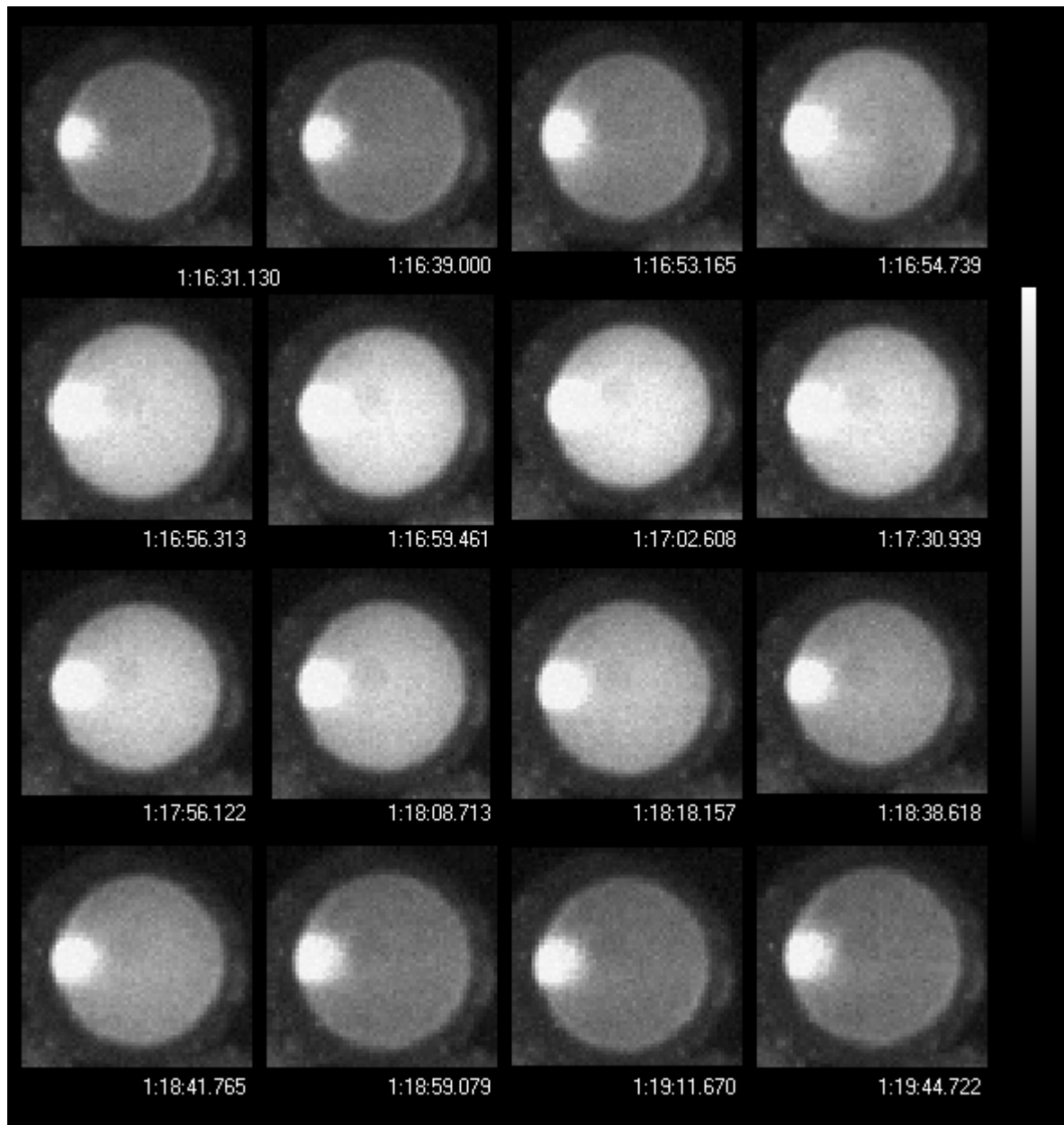


Abbildung 16: Ausschnitt aus der Calcium-Oszillation nach Injektion des Spermienextraktes in eine bovine MII-Eizelle. Der Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration wird durch das Aufhellen des Cytoplasmas der Eizelle sichtbar. Weiterhin erkennt man, dass der intrazytoplasmatische Calciumspiegel nach Ende des Peaks zu seiner Basalkonzentration zurückkehrt. Der helle weiße Fleck auf Position 9 Uhr ist der erste Polkörper. Er hat den Ca^{2+} -Indikator Fluo-4 AM akkumuliert und zeigt durch sein Leuchten eine hohe Calciumkonzentration.

Es war auch zu beobachten, dass signifikant mehr Eizellen gleichmäßig oszillierten, d.h. in ihrem individuellen Oszillationsmuster eine homologe Amplitude und Frequenz aufwiesen (Abb. 17), wenn sie mit der höheren Konzentration des Extraktes injiziert wurden ($p \leq 0,038$, χ^2 -Test) (Tab. 4). Bei den Eizellen, die mit der niedrigeren Konzentration injiziert worden waren, beobachtete man überwiegend ungleichmäßige Oszillationsmuster, die mit einem Peak hoher Amplitude begannen und danach mehrere kleinere Peaks produzierten (Abb. 18). Ein Calcium Peak nach Injektion des Spermienextraktes ist als Einzelbildfolge in Abbildung 16 dargestellt. Man erkennt den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration an der Aufhellung des Zytoplasmas. Für keine der beiden Gruppen konnte jedoch ein standardisiertes Oszillationsmuster festgelegt werden.

Tabelle 4: Anzahl und Anteil der Oszillationsqualität boviner IVM Eizellen nach Injektion eines bovinen Spermienextraktes unterschiedlicher Konzentration (2 sp/pl, 5 sp/pl)

Extraktkonzentration	Anzahl der Eizellen mit Ca^{2+} -Oszillation n	gleichmäßige Oszillation n (%)	inhomologe Oszillation n (%)
2 sp/pl	12	6 (50,0)	6 (50,0)
5 sp/pl	15	13 (86,7)	2 (13,3)

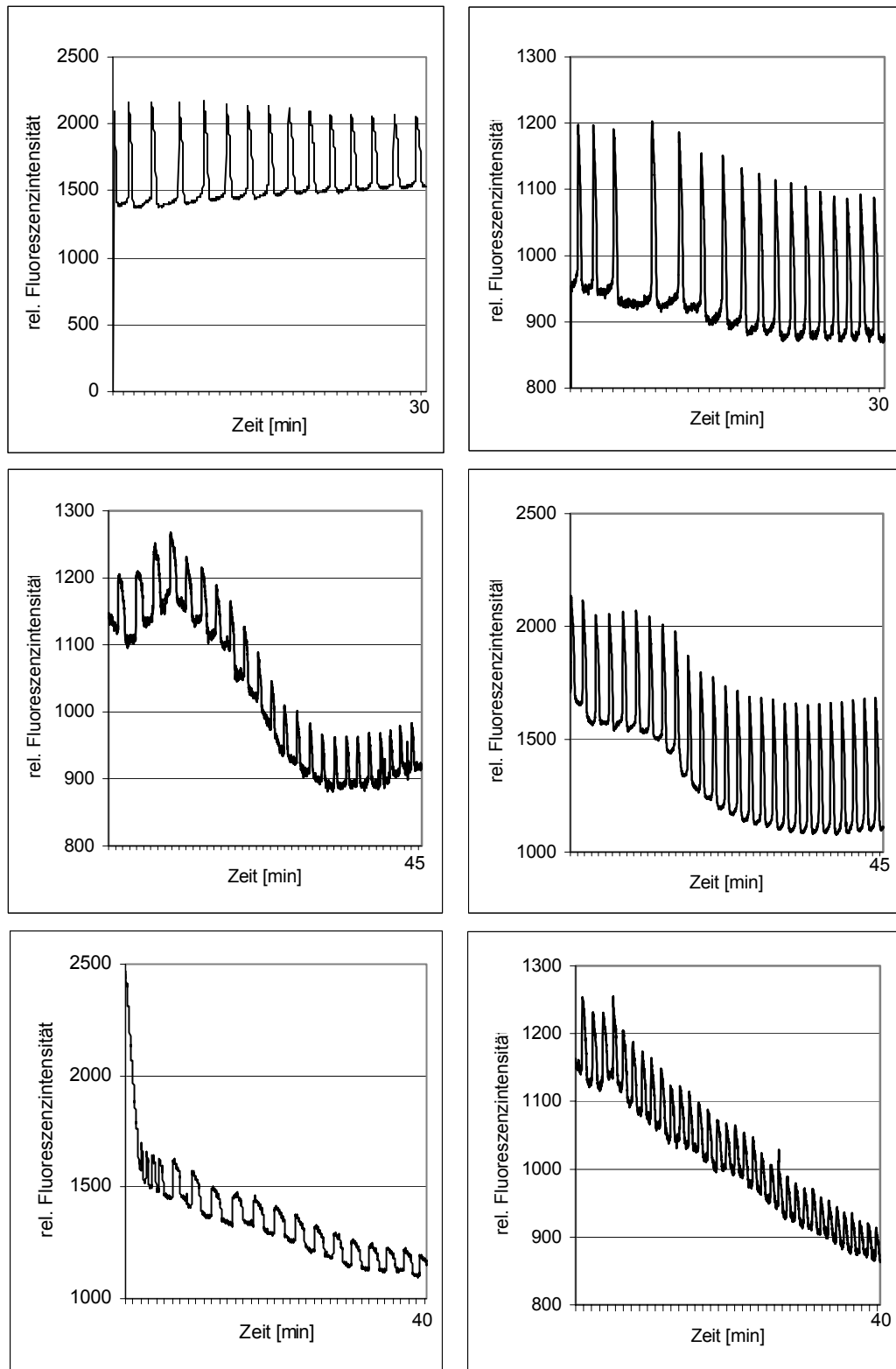


Abbildung 17: Darstellung der Ca^{2+} -Oszillationen von 6 individuellen bovinen IVM Eizellen nach Injektion eines bovinen Spermienextraktes der Konzentration 5 sp/pl.

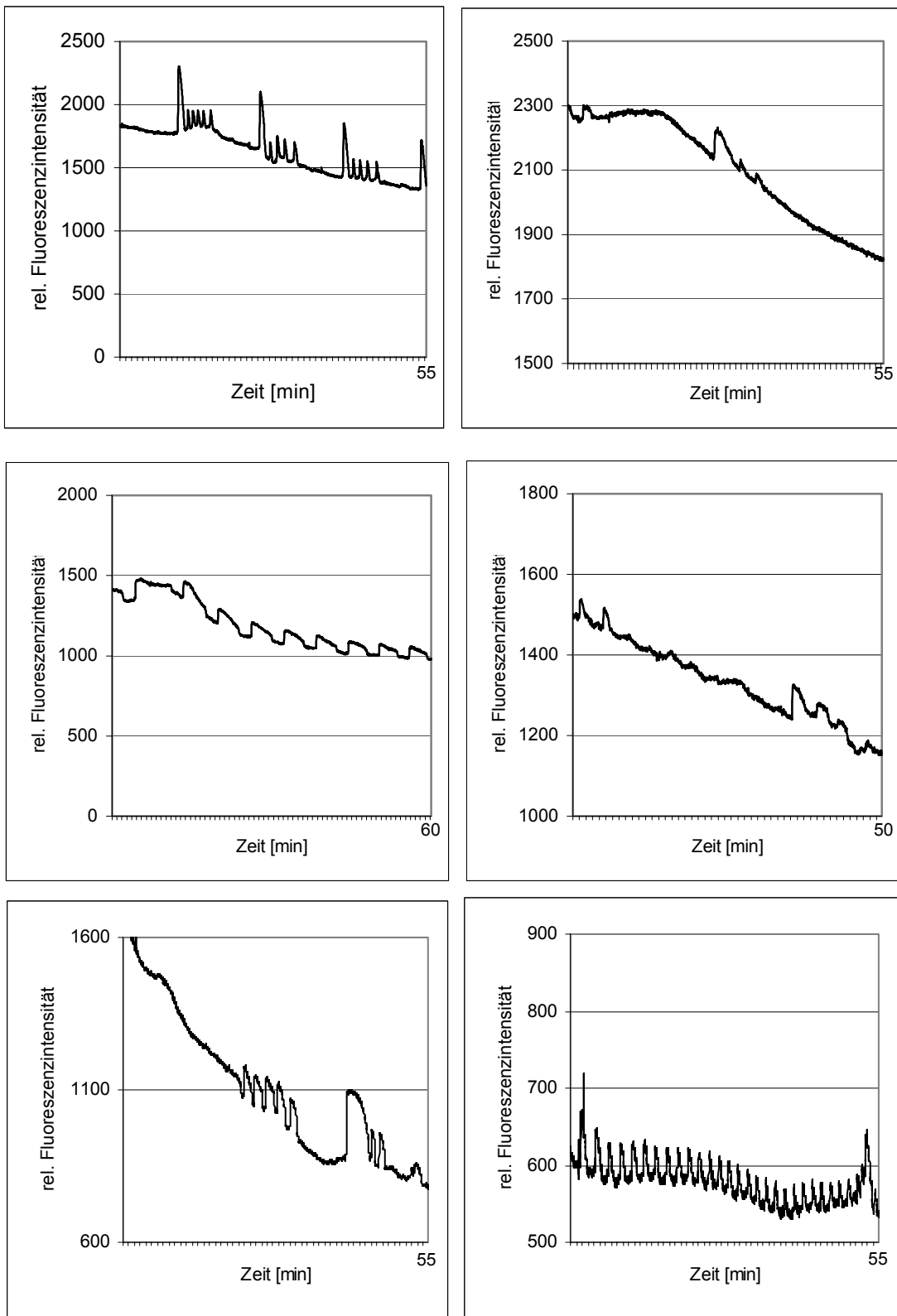


Abbildung 18: Messung der Ca^{2+} -Freisetzung anhand der Fluoreszenzintensität in 6 individuellen bovinen IVM Eizellen nach Injektion eines bovinen Spermienextraktes mit einer Konzentration von 2 sp/pl.

Das Einsetzen der Oszillation war individuell verschieden. Erfasst wurde der Start der Ca^{2+} -Freisetzung innerhalb der ersten 5 min nach erfolgter Injektion. Bei den Eizellen C5, D4, G1 und N1 wurde die Messung erst 8, 55, 20 bzw. 80 min nach der Injektion gestartet. Für diese Eizellen lässt sich keine Aussage über das Einsetzen der Ca^{2+} -Freisetzung machen. Aus Tab. 4 lässt sich entnehmen, dass bei einer Extraktkonzentration von 2 sp/pl in vitro-gereifte Rindereizellen zu individuellen Zeitpunkten eine Oszillation beginnen. Dieser Zeitpunkt kann sowohl bei etwa 5 min als auch bei über 80 min nach Injektion liegen.

Intervalle wurden bei allen Eizellen erfasst, die mehr als einen Calciumpeak produzierten. Die Eizellen B1, B5 und N1 produzierten nur einen Calciumpeak. Es waren individuelle Unterschiede festzustellen (Tab. 5). Das minimale Intervall zwischen zwei Peaks betrug 78,7 sec, das maximale 820,1 sec. Weiterhin fiel auf, dass bei dieser Konzentration bei den Eizellen A2, D4, N1, O1 und O2 „konservierte Oszillationsmuster“ auftraten. Diese Oszillationsmuster bestehen aus einer wiederkehrenden Abfolge einer Oszillationsserie, die durch ein verlängertes Intervall gekennzeichnet sind. Teilweise werden diese Abfolgen von einem dem Initialpeak ähnlichen Ca^{2+} -Anstieg eingeleitet (Abb. 18). Zwischen den „konservierten Mustern“ wurden Intervalle von $778,3 \pm 41,7$ sec, $1325,9$ sec, $693,6$ sec erfasst. Innerhalb der konservierten Oszillationsmuster betrug das Oszillationsintervall $114,9 \pm 36,2$ sec, $127,7 \pm 10,7$ sec, $168,2 \pm 5,4$ sec, $118,5 \pm 25,9$ sec und $125,4 \pm 24,2$ sec. Zusätzlich war festzustellen, dass, wenn das Muster mit einem Initialpeak eingeleitet wurde, diese Intervall Initialpeak-Folgepeak im Vergleich zu den übrigen Intervallen innerhalb des Musters, verlängert war (Tab. 5).

Tabelle 5: Oszillationsintervalle von $[Ca^{2+}]_i$ in bovinen IVM Eizellen nach Injektion eines Spermienextraktes der Konzentration 2 sp/pl

Eizelle	Beginn nach Start der Messung [min]	Intervall zwischen Peaks [sec]	Intervall zw. konservierten Mustern [sec]	Intervall innerhalb des Musters (ohne Initialpeak) [sec]	Intervall Initialpeak zu Folgepeak [sec]
A1	77,1	225,1			
A2	16,1	449,4 ± 370,7	778,3 ± 41,7	114,9 ± 36,2	155,9 ± 3,2
A3	77,7	283,3			
A4	1,5	201,5			
B1	29,9				
B5	36,0				
C5	3,2	298,5 ± 36,5			
D4	1,6	462,1 ± 345,1	807,2	127,7 ± 10,7	138,3
G1	23,4	260,7 ± 46,9			
N1	81,4		1325,9	168,2 ± 5,4	
O1	23,8	392,9 ± 300,7	693,6	118,5 ± 25,9	258,6
O2	2,1	140,0 ± 38,8		125,4 ± 24,2	178,8

Bei einer Extraktkonzentration von 5 sp/pl reagierten mehr Eizellen mit gleichmäßig wiederkehrenden Oszillationen in kurzem Intervall (Tab. 6, Abb. 17). Eine Eizelle, Q1, zeigte ein „konserviertes Oszillationsmuster“, Eizelle P5 zeigte ebenfalls ein „konserviertes Muster“, im betrachteten Messfenster jedoch keine Wiederholung. Die Messungen wurden unmittelbar nach jeder Injektion gestartet. Zu beobachten ist, dass bei der höheren Extraktkonzentration signifikant mehr Eizellen innerhalb der ersten 20 min nach erfolgter Injektion mit der Ca^{2+} -Freisetzung beginnen als bei der Konzentration 2 sp/pl (Tab. 7).

Tabelle 6: Oszillationsintervalle von $[Ca^{2+}]_i$ in bovinen IVM Eizellen nach Injektion eines Spermienextraktes der Konzentration 5 sp/pl

Eizelle	Beginn nach Start der Messung [min]	Intervall zwischen Peaks [sec]	Intervall zw. konservierten Mustern [sec]	Intervall innerhalb des Musters (ohne Initialpeak) [sec]	Intervall Initialpeak zu Folgepeak [sec]
P2	0,9	76,4 ± 10,0			
P4	2,3	197,3 ± 153,7			
P5	5,4	115,8	1095,0		
P6	22,9	127,5 ± 16,2			
Q1	9,7	423,6 ± 334,6	648,9 ± 109,3	112,7 ± 23,7	109,3 ± 1,4
Q2	20,3	1899,5			
Q3	0,1	141,7 ± 14,9			
Q5	2,0	163,9 ± 53,3			
R2	12,3	1814,5			
R3	24,8	2221,9			
R4	40,6				
R5	13,9	135,6 ± 15,5			
R6	12,3	112 ± 5,4			
S1	1,9	171,1 ± 35,2			
S5	0,9	194,7 ± 95,4			

Tabelle 7: Darstellung des Oszillationsbeginns nach Start der Messung nach Anzahl und Anteil injizierter IVM Eizellen der beiden Gruppen (2 sp/pl und 5 sp/pl)

Extrakt- konzentration	Anzahl osz. Eizellen n	Beginn der Oszillation nach Start der Messung		
		0 bis 20 min	21 bis 50 min	> 50 min
		n (%)	n (%)	n (%)
2 sp/pl	12	4 (33,3)	4 (33,3)	4 (33,3)
5 sp/pl	15	11 (73,3)	4 (26,7)	0 (0,0)

Tabelle 8 zeigt, dass die höhere Konzentration des Extraktes früher eine Ca^{2+} -Ausschüttung in der Eizelle auslöst. Die folgenden Oszillationen folgen in einem kürzeren Intervall aufeinander ($169,8 \pm 126,3$ sec vs. $206,9 \pm 128,2$ sec). Sofern „konservierte Oszillationsmuster“ entstehen, sind auch hier bei der höheren Extraktkonzentration die Intervalle kürzer und haben eine geringere Varianz zwischen den gemessenen Eizellen.

Tabelle 8: Durchschnittlicher Beginn der Oszillationen nach Start der Messung und durchschnittliche Oszillationsintervalle der injizierten IVM Eizellen

Extrakt- konz.	Beginn nach Start der Messung [min]	Intervall zwischen Peaks*	Intervall zw. konservierten Mustern	Intervall innerh. des Musters (ohne Initialpeak)	Intervall Initialpeak zu Folgepeak
2 sp/pl	$39,6 \pm 38,1$	$206,9 \pm 128,2$	$1009,8 \pm 316,2$	$128,8 \pm 50,1$	$198,5 \pm 60,2$
5 sp/pl	$24,8 \pm 23,9$	$169,8 \pm 126,3$	$817,3 \pm 277,7$	$112,7 \pm 23,7$	$109,3 \pm 1,4$

* nur Eizellen mit mindestens 3 Ca^{2+} -Anstiegen

4.2.2 Vergleich der Ca^{2+} -Freisetzung in IVM und in vivo-maturierten Eizellen nach Injektion eines bovinen Spermienextraktes

Ob die Herkunft der gereiften Eizellen bzw. das Maturationssystem einen Einfluß auf die Qualität und Quantität der Ca^{2+} -Freisetzung in der Eizelle hat, sollte mit einer vergleichenden Studie von In vitro- und In vivo-Maturation festgestellt werden. Die Verwendung des Spermienextraktes mit der Konzentration von 5 sp/pl erwies sich als geeignet, da diese eine größere Sicherheit in der Auslösung der Ca^{2+} -Oszillation bei in vitro-gereiften Eizellen bewiesen hatte.

Die in vitro-gereiften Eizellen wurden 24 h nach Einsetzen in das Maturationsmedium selbigem entnommen, entkumuliert und mit dem Indikator beladen. Die in vivo-gereiften Eizellen wurden 24 h nach hCG-Applikation aus dem lebenden Tier unter endoskopischer Kontrolle gewonnen. Nach der Auffindung im Punktat wurden diese Eizellen ebenfalls denudiert und gefärbt. Es konnte so gewährleistet werden, dass die Eizellen einen weitestgehend identischen Zeitraum in der Umgebung verweilten, die die Bedingungen einer Maturation ermöglicht. Die Messung erfolgte auch hier wieder unmittelbar nach der Injektion und hatte eine Dauer von 60 min.

Anhand der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messkurve war zu erkennen, dass die in vivo-gereiften Eizellen auf den Spermienextrakt früher mit der erwarteten Ca^{2+} -Ausschüttung reagieren. Weiterhin wird ein im Vergleich zu den in vitro-gereiften Eizellen homologeres Muster mit hoher Frequenz und konstanter Amplitude sichtbar (Abb. 19). Vereinzelt erkennt man auch hier einen Initialpeak, gefolgt von Oszillationen mit geringerer Amplitude. Die Oszillationsrate ist gegenüber IVM Eizellen leicht erhöht (Tab. 9). Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs der in vivo-Gruppe war es nicht möglich, signifikante Unterschiede in der Reaktionsfähigkeit zwischen den in vitro- und in vivo-Eizellen festzustellen.

Tabelle 9: Anzahl und Anteil der Ca^{2+} -Oszillationen im Vergleich bei unterschiedlicher Maturationsherkunft bei 5 sp/pl

Maturationsherkunft	Anzahl n	1	2 – 3	> 3	keine
		Ca^{2+} -Peak n (%)	Ca^{2+} -Peaks n (%)	Ca^{2+} -Peak n (%)	Reaktion n (%)
in vitro	22	1 (4,5)	4 (18,2)	10 (45,5)	7 (31,8)
in vivo	6	0 (0,0)	0 (0,0)	5 (83,7)	1 (16,7)

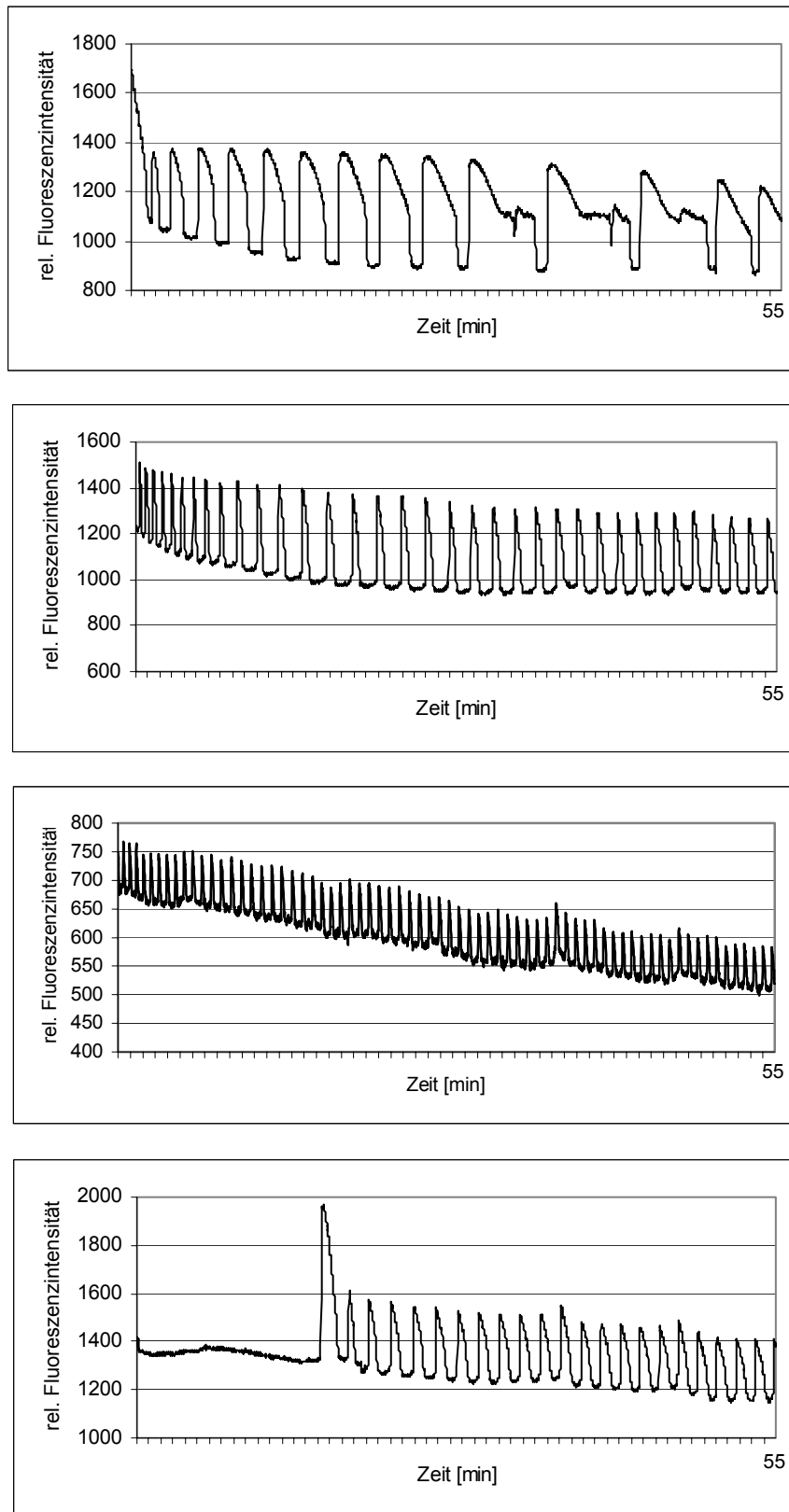


Abbildung 19: Darstellung der Ca^{2+} -Oszillationen in 4 in vivo-gereiften Rindereizellen unmittelbar nach Injektion eines bovinen Spermienextraktes (5 sp/pl)

Bei den in vivo-gereiften Eizellen konnte kein spezifischer Oszillationsbeginn gefunden werden. Die Oszillationen setzten zwischen 5,3 min und 37,9 min nach Beginn der Messung ein (Tab. 10). Hinzu kommt jeweils eine 5-minütige Verzögerung, die zum Start der Software und der Einstellung der Parameter benötigt wurde. Doch sind die Werte vergleichbar mit denen der in vitro-gereiften Eizellen, die mit der gleichen Extraktkonzentration injiziert wurden (Tab. 8). Eventuell findet die initiale Ca^{2+} -Freisetzung in in vivo-maturierten Eizellen tendenziell früher statt als in in vitro-gereiften Rindereizellen. Um diese Hypothese zu untermauern, bedarf es jedoch eines größeren Stichprobenumfangs. Das Oszillationsintervall war bei allen untersuchten Eizellen verschieden. Es rangierte von $92,1 \pm 25,8$ sec bis $1374,8 \pm 25,8$ sec (Tab. 10). Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs lässt sich zu diesem Parameter keine eindeutige Aussage machen.

Tabelle 10: Darstellung des Oszillationsbeginns nach Start der Messung und des Oszillationsintervalls in vivo-gereifter Eizellen nach Injektion des Spermienextraktes 5 sp/pl

Eizelle	Beginn nach Start der Messung [min]	Intervall zwischen Peaks [sec]
in vivo 1	2,2	$303,2 \pm 202,5$
in vivo 2	6,5	$1374,8 \pm 25,8$
in vivo 3	0,3	$92,1 \pm 51,5$
in vivo 4	32,9	$46,7 \pm 10,4$
in vivo 5	17,3	$125,2 \pm 20,4$

4.3 Mikroinjektion der bovinen PLC ζ cRNA in gereifte Rindereizellen

Saunders et al. (2002) isolierten bei der Maus eine neue Isoform der Phospholipase C, PLC ζ . Sie wiesen in ihren Studien nach, dass diese PLC in Form einer cRNA in der Lage ist, nach Mikroinjektion in Mäuseeizellen Ca²⁺-Oszillationen auszulösen, die den bei der Fertilisation beobachteten Oszillationen ähnlich sind. In dieser Arbeit soll nun festgestellt werden, ob eine bovine PLC ζ als cRNA ebenfalls kompetent ist, in reifen Eizellen der homologen Spezies, dem Rind, eine Ca²⁺-Freisetzung zu stimulieren, die fluoreszenzoptisch nachweisbar ist.

Im Folgenden wurde zunächst geprüft, ob es eine Konzentration der cRNA gibt, die beim Rind eine Reaktion in Form einer Calciumfreisetzung oder sogar Ca²⁺-Oszillationen auslöst. Es war weiter von Interesse, wann diese Reaktion oder Oszillationen auftreten. In einer dritten Versuchsreihe wurde untersucht, ob das Maturationsystem einen Einfluß auf die Reaktionsfähigkeit der Eizelle hat.

4.3.1 Konzentrationsreihe

Da das injizierte Volumen möglichst gering sein sollte, um negative Effekte der Mikroinjektionstechnik zu vermeiden, musste die Konzentration der cRNA dementsprechend hoch sein. Saunders et al. (2002) verwenden in ihrer Studie cRNA-Konzentrationen in der Injektionskapillare von 0,002 bis 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Die Endkonzentration in der Eizelle der Maus bei einem Injektionsvolumen von 3 bis 5 % des Eizellvolumens beträgt die PLC ζ cRNA-Konzentration in der Eizelle nach der Injektion zwischen 0,0004 und 0,04 pg/pl .

Die ursprüngliche Überlegung war, dieses Verhältnis auf das System Rind zu übertragen. Bei einem Injektionsvolumen von 2 bis 5 pl und einer cRNA-Konzentration in der Kapillare von 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ gelangen 20 bis 50 pg cRNA in die Eizelle. Umgerechnet auf das Eizellvolumen des Rindes befinden sich nach der Injektion 0,02 bis 0,055 pg/pl in der Eizelle. Das Volumen der Rindereizelle mit einem Durchmesser von 120 μm wird hierbei mit ~ 900 pl angenommen. Diese Endkonzentration liegt im Rahmen der bereits veröffentlichten Studien an der Maus (Saunders et al. 2002, Cox et al. 2002).

Es wurden jeweils 6 Eizellen 5 μl der Konzentrationen 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ PLC ζ cRNA injiziert. Etwa 1 h nach der Injektion wurde die Messung gestartet. So hatten die Eizellen Zeit für die Translation der RNA in das Protein, das dann über die Reaktionskaskade die Ca²⁺-Freisetzung auslöst. Die Messung dauerte 1 bis 1,5 h. Ein Zeitfenster, das groß genug war, um Oszillationen zu erfassen. Es wurde damit gerechnet, dass die Eizelle mit Einsetzen der Calciumfreisetzung zunächst einen Initialpeak unbekannter Größe und danach folgend mehrere kleine Peaks über den gesamten Zeitraum der Messung produzierte. Jedoch war bei keiner der injizierten Konzentrationen eine Reaktion in Form einer Ca²⁺-Ausschüttung zu erkennen (Abb. 20). Die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration scheint im Verlauf der Messung abzusinken. Dies ist auf das Verblässen des Fluoreszenzfarbstoffes zurückzuführen und nicht auf die Calciumkonzentration in der Eizelle. Bei sehr wenigen Eizellen steigt die Messkurve langsam und stetig an bis sie eine Sättigung erreicht zu haben scheint. In diesem Fall geht man davon aus, dass die Membranintegrität des Oolemm nachlässt, und so Ca²⁺-Ionen aus dem umgebenden Medium ins Cytoplasma diffundieren. Parallel zu den Messungen mit der cRNA lief stets eine Positivkontrolle mit dem Spermienextrakt, die bestätigte, dass die Eizellen vital und zur Ca²⁺-Freisetzung in der Lage waren.

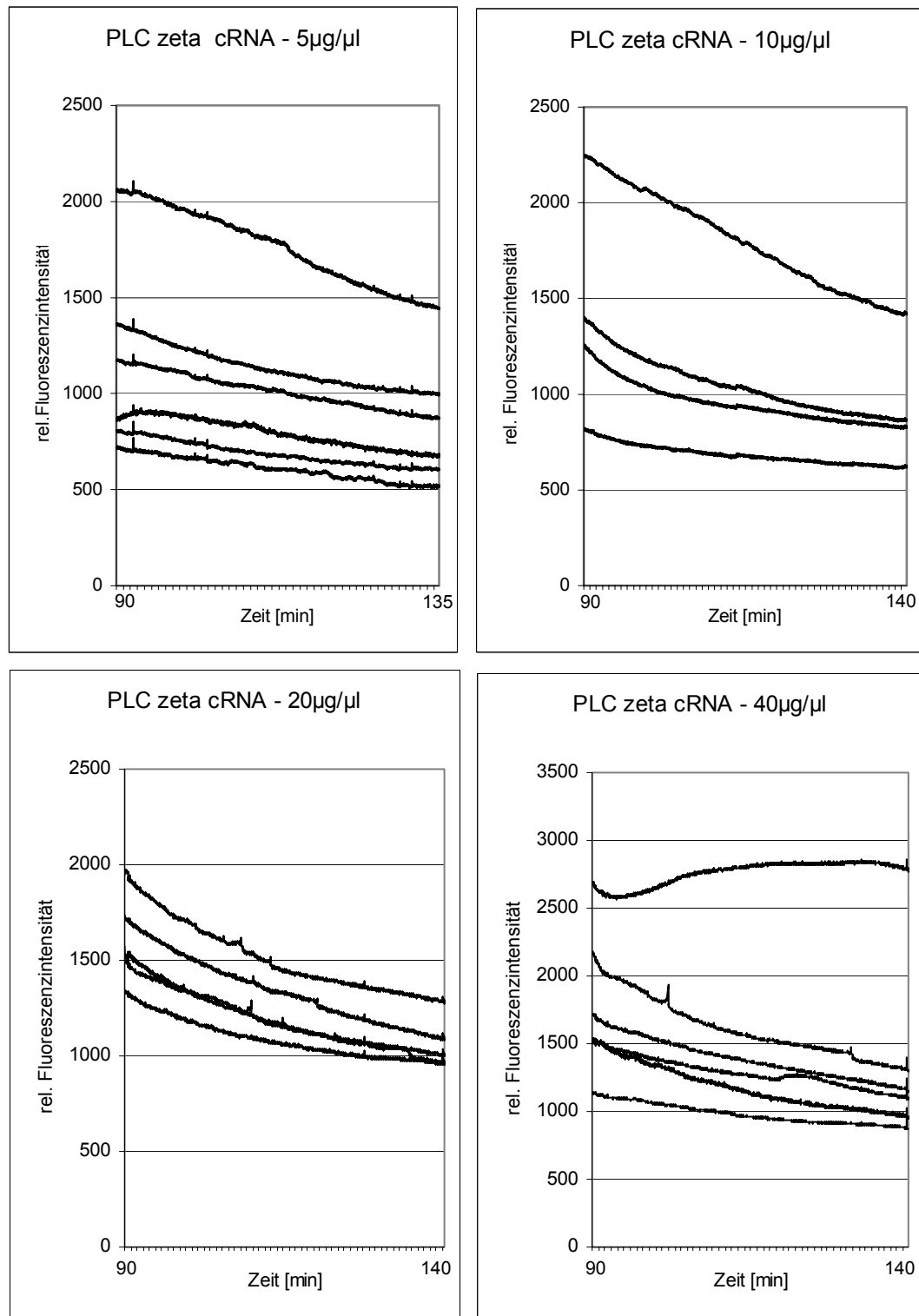


Abbildung 20: Die Injektion der PLC ζ cRNA in vier unterschiedlichen Konzentrationen (5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) konnte keine Ca^{2+} -Oszillationen in den gemessenen Rindereizellen auslösen. Dargestellt sind die Messkurven von 4 bis 6 IVM Eizellen nach Injektion mit der jeweiligen PLC ζ cRNA Konzentration.

4.3.2 Ausdehnung der Messdauer

Es stellte sich nun die Frage, ob bei der Spezies Rind die Ca^{2+} -Oszillationen stark verzögert auftreten. Dies würde den Aussagen in der Literatur bezüglich des homologen Systems der Maus, wo die Oszillationen je nach Konzentration zwischen 30 und 70 min (Saunders et al. 2002) bzw. beim Rind (Malcuit et al. 2005) nach etwa 60 min widersprechen. Das Messfenster wurde vergrößert bis auf 360 min. Die Messung wurde 90 min nach der cRNA-Injektion gestartet. Es wurden folgende Messfenster gebildet: 90 bis 160 min, 165 bis 230 min, 235 bis 300 min, 305 bis 365 min. In jedem Fenster wurden zwischen 4 und 6 Eizellen gleichzeitig gemessen. Davon war eine Eizelle als Negativkontrolle mit PBS^- injiziert. Die Messungen in jedem Fenster wurden in drei Wiederholungen durchgeführt. Die Gesamtzahl mit PLC ζ cRNA injizierter Eizellen betrug 62, verteilt auf die vier Messfenster: 16 Eizellen bei 90 bis 160 min, 17 Eizellen bei 165 bis 230 min, 18 Eizellen bei 235 bis 300 min, 11 Eizellen bei 305 bis 360 min. Für diese Versuchsreihe stand nur die cRNA-Konzentration 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ zur Verfügung. Die Messkurven sind in Abb. 21 dargestellt. Bemerkenswert war, dass in Messfenster 3 (235 bis 300 min) bei einer Wiederholung bei drei Eizellen um den Zeitpunkt 260 min post injectionem relativ zeitgleich ein Doppelpeak mit einem Intervall $4,3 \pm 0,3$ min auftrat. Bei der vierten gemessenen Eizelle entstanden 4 Peaks zu dem Zeitpunkten 244 min, 255 min, 260 min und 265 min post injectionem. Das Intervall zwischen dem ersten und zweiten Peak betrug 11,2 min, zwischen dem zweiten und dritten und zwischen dem dritten und vierten Peak betrug $4,9 \pm 0,2$ min (Abb. 21).

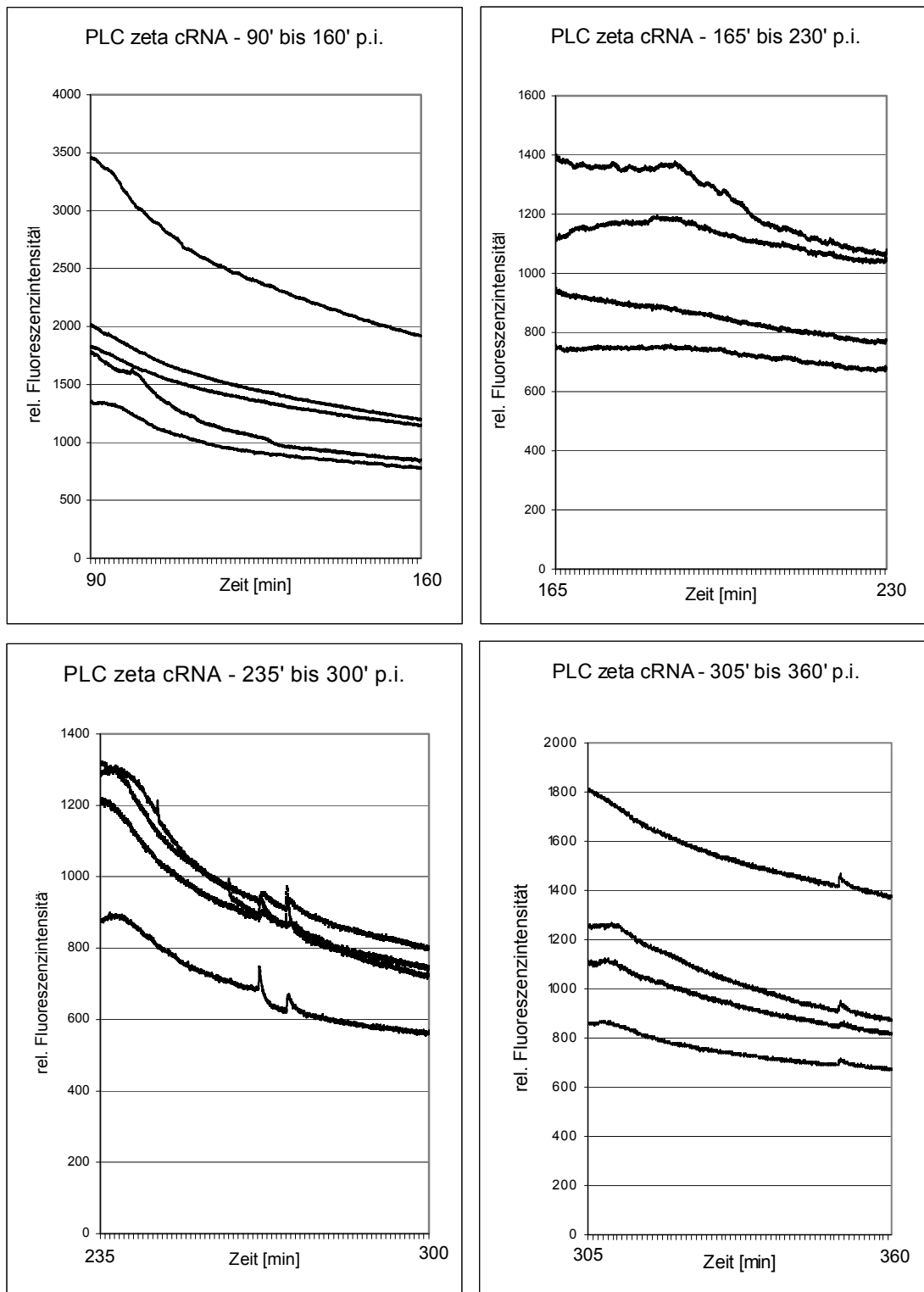


Abbildung 21: Messung der Ca^{2+} -Freisetzung zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion der PLC ζ cRNA ($10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). Dargestellt sind die Messkurven von jeweils 4 bzw. 5 unterschiedlichen IVM Rindereizellen in jedem Messfenster.

4.3.3 Vergleich der Ca^{2+} -Freisetzung in in vitro- und in vivo-matürten Eizellen nach Injektion der PLC ζ cRNA

Genauso wie bei der Injektion des Spermienextraktes wurde mit der cRNA geprüft, ob das Maturationssystem der Eizellen, also in vitro vs. in vivo, einen Einfluß auf die Ca^{2+} -Freisetzung hat.

Bei Betrachtung der Messergebnisse zeigte sich, dass die Messkurven eine große Anzahl bei allen Eizellen der Messgruppe gleichzeitig auftretender Peaks geringer Amplitude aufwiesen. Diese sogenannten Artefakte im Messgraphen sind jedoch nicht als Anstiege des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in den Eizellen zu werten. Es war vielmehr der Fall, dass sich im Verlauf der Messung eine Ölblase oberhalb des Mediumtropfens gebildet hatte, in dem die Eizellen zur Messung lagen. Aufgrund der Verzerrung des emittierten Lichts, lieferte die Kamera deshalb diese Schwankungen in der Grafik.

2 von 5 gemessenen in vivo-gereiften Eizellen reagieren auf die injizierte cRNA (Abb. 22 A). Diese zwei Messkurven sind in Abb. 22 B und C noch einmal separat dargestellt. In Abb. 22 B produziert die Eizelle einen Ca^{2+} -Anstieg hoher Amplitude 30 min nach Start der Messung. Das entspricht einer Gesamtzeit von 1,5 h nach der cRNA-Injektion. Die zweite Eizelle produziert drei Ca^{2+} -Anstiege. Den ersten Anstieg bei 10,5 min, den zweiten 35,7 min und den dritten 57,9 min nach Start der Messung, d.h. 70,5, 95,7 bzw. 117,9 min nach der Injektion. Die Intervalle zwischen den Ca^{2+} -Peaks betragen 25,2 min und 22,2 min. Diese Intervalle entsprechen den in der Literatur angegebenen Werten für gemessene $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationen boviner Eizellen nach Fertilisation (Nakada and Mizuno 1998).

In den Abbildungen 22 und 23 werden die Graphen der Ca^{2+} -Messung von cRNA in in vivo und in vitro-gereiften Eizellen vergleichend dargestellt. Es ist zu erkennen, dass im identischen Zeitfenster bei den in vitro-gereiften Eizellen nach Injektion der gleichen Konzentration der cRNA mit dem gleichen Injektionsvolumen keine Reaktion der Eizellen erfolgte.

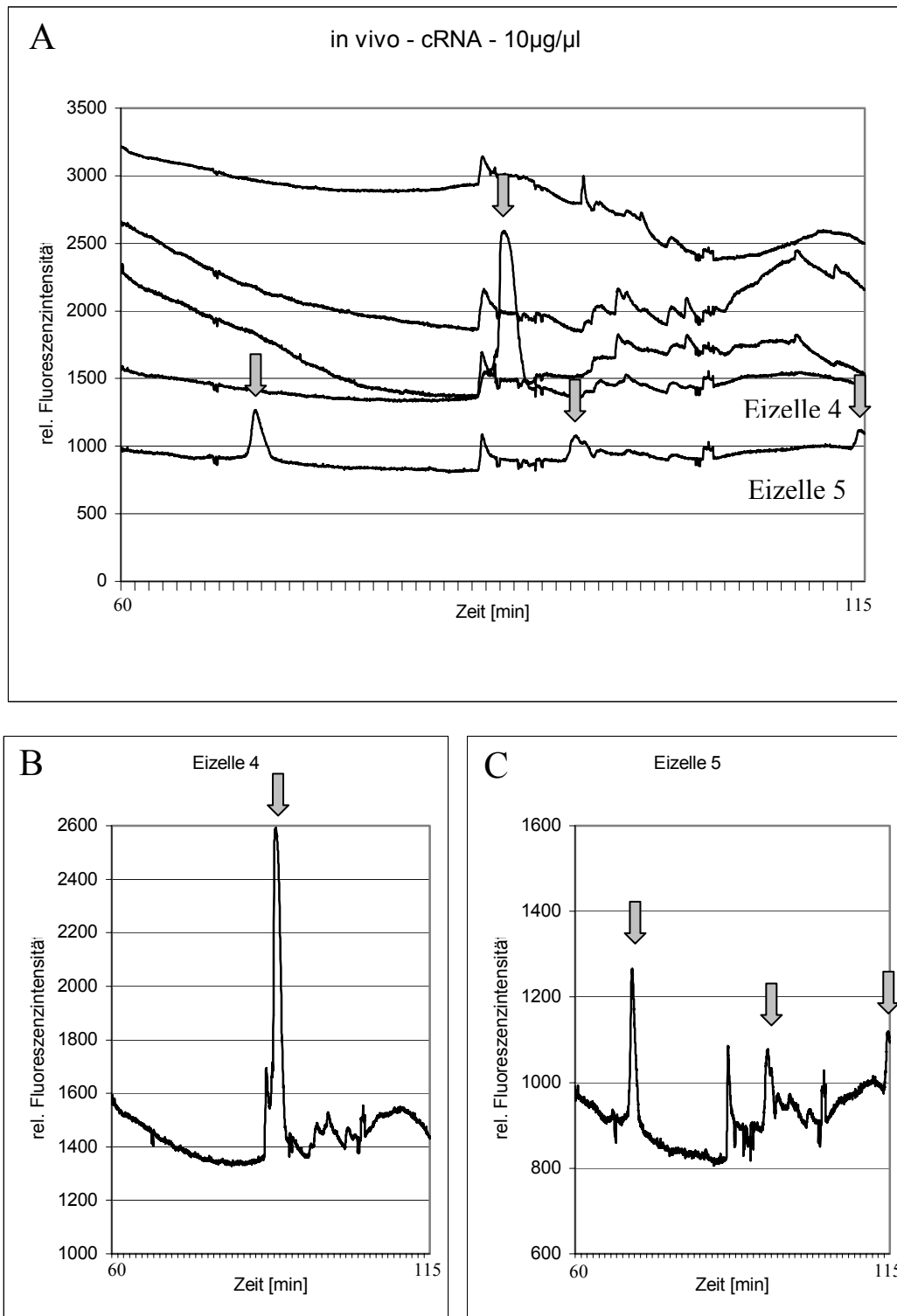


Abbildung 22: Darstellung der Ca^{2+} -Freisetzung in 5 in vivo-gereiften bovinen Eizellen nach PLC ζ cRNA Injektion. (A) Messkurven der gesamten Messgruppe. (B), (C) zeigen vergrößert die Messkurven der zwei Eizellen, die nach der cRNA-Injektion sichtbar mit einer Ca^{2+} -Freisetzung reagierten, die Peaks sind mit einem Pfeil (↓) markiert.

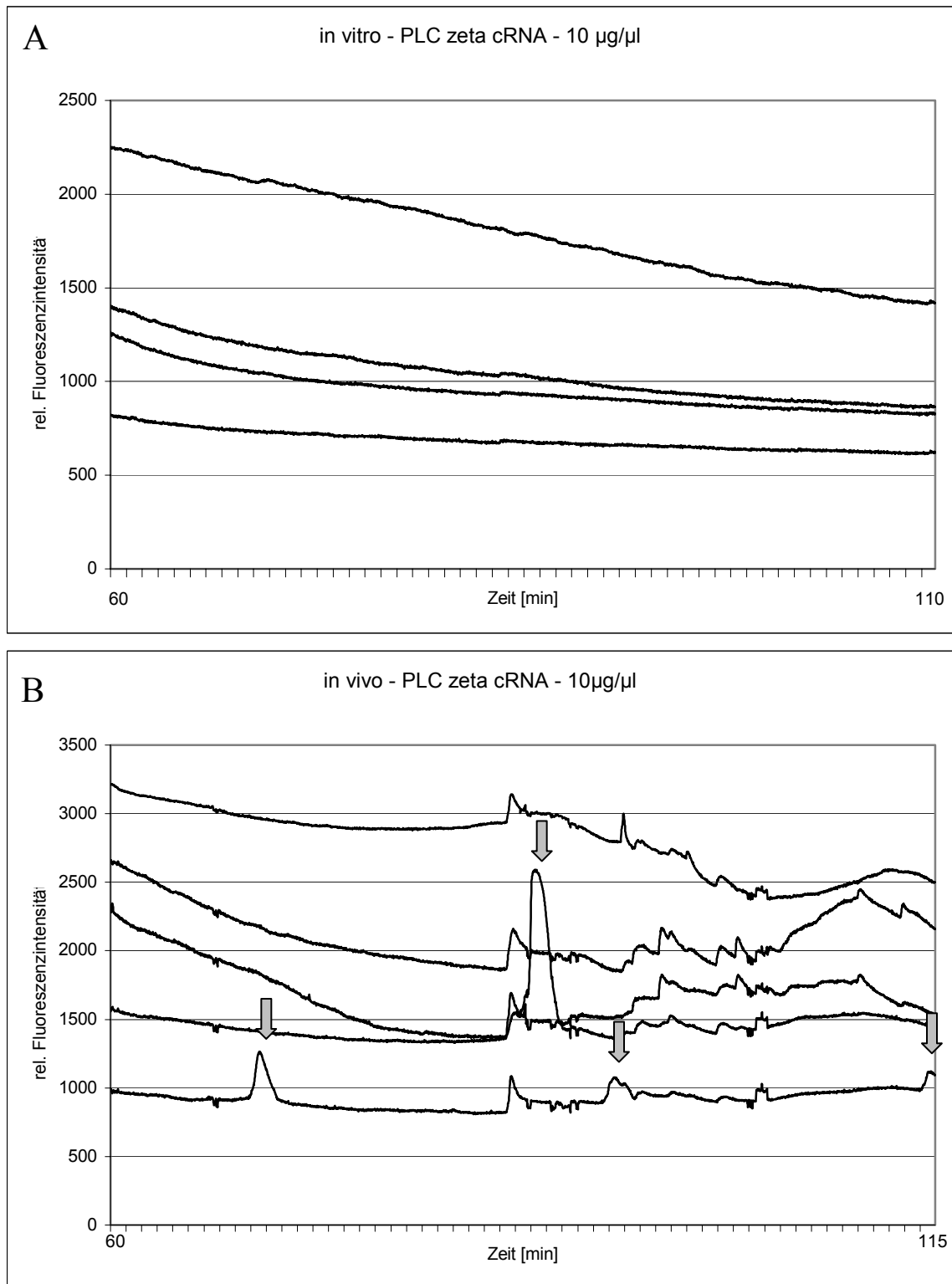


Abbildung 23: Vergleichende Darstellung der Ca^{2+} -Freisetzung nach PLC ζ cRNA Injektion in bovinen Eizellen. (A) in vitro-gereifte Eizellen (n=4), (B) in vivo-gereifte Eizellen (n=5). Peaks, die eine Ca^{2+} -Freisetzung anzeigen, sind mit einem Pfeil (\Downarrow) markiert

5 Diskussion

Im Zusammenhang mit Aktivierungsversuchen durch einen Spermienextrakt findet man in der Literatur überwiegend Injektionsstudien im heterologen System. Das heißt, die Eizellen und der Spermienextrakt stammen von unterschiedlichen Spezies. Für diese Studie war es interessant, im Hinblick auf reproduktions-biotechnologische Aspekte die Versuchsreihen auf die Spezies Rind zu konzentrieren. Alle Arbeiten wurden somit im homologen System durchgeführt. In der Literatur findet man vielfach die Verwendung von Schweinesperma und Mäuseeizellen. Ein Grund dafür sind sicherlich die Vereinfachung der Laborarbeiten durch Homogenität des Eizellmaterials, kürzere Zellzyklen und eine höhere Spermaausbeute bei diesen Spezies.

5.1 Aktivierungskompetenz der Eizellen durch Färbemethode nicht beeinträchtigt

Um zu prüfen, ob der DMSO-Gehalt von 10% im Färbegrad einen negativen Einfluß auf die Reaktionskompetenz der Eizellen zur Calciumausschüttung hat, wurde in einem Vorversuch die Ca^{2+} -Freisetzung im Cytoplasma der Eizelle nach einmaliger Zugabe von Ionomycin in einer Verdünnungsreihe gemessen. Die Eizellen reagierten auf die Zugabe der Reagenz wie erwartet mit einem zeitig minimal verzögerten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Dieser Anstieg war monoton und konnte an derselben Eizelle nicht reproduziert werden. Durch den plötzlichen raschen Calcium-Einstrom in die Eizelle aufgrund der permeabilisierenden Wirkung des Ionomycins war nur ein Calciumanstieg messbar. Dass die Eizelle den plötzlichen Einstrom von Calcium aus dem umgebenden Medium nicht sofort und nicht vollständig ausschleusen kann, zeigt das erhöhte Basalniveau nach Abklingen des Peaks. Dieses Ergebnis bestätigt Untersuchungen von Knott et al. (2002) und Ware et al. (1989).

5.2 Der $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen auslösende Spermienfaktor

Eine zentrale Aussage, die mit dieser Arbeit gemacht werden konnte, ist, dass die zytoplasmatischen Bestandteile der Bullenspermien, die hier in Form eines Rohextraktes injiziert wurden, einen Faktor enthalten, der eine $[Ca^{2+}]_i$ -oszillierende Wirkung auf Rindereizellen besitzt. Dieses Ergebnis untermauert die vorangegangenen Untersuchungen beim Schwein (Wu et al. 1997, 1998a, 2001, Fissore et al. 1998, Knott et al. 2002), Mensch (Palermo et al. 1997) und Rind (Okitsu et al. 2001).

Wie bereits in früheren Veröffentlichungen gezeigt, ist diese Reaktion der Calciumausschüttung im Zytoplasma der gereiften Eizelle abhängig von der Konzentration des Spermienextraktes (Stice and Robl 1990, Wu et al. 1997, Knott et al. 2002). Die Injektion eines Spermienextraktes niedriger Konzentration versagte in der Auslösung von Calciumoszillationen und ein hoher Anteil der Eizellen blieb im Stadium der Metaphase II (MII) stehen. Dieses Phänomen wurde auch bei Rindereizellen beschrieben, die nach 24stündiger Maturation aufgrund einer unzureichenden Ca^{2+} -Stimulation in der MII arretierten (First et al. 1992).

Dabei spielt die Herstellung des Extraktes, ob durch Ultraschallbehandlung oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen keine Rolle im Erfolg der Oszillationsauslösung (Palermo et al. 1997). Die Oszillationsmuster, die durch die Injektion des Spermienextraktes in zwei unterschiedlichen Konzentrationen hervorgerufen wurden, unterschieden sich eindeutig in ihrer Frequenz. Eizellen, die mit der niedrigeren Extraktkonzentration injiziert waren, zeigten deutlich inhomogene Oszillationsmuster. Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Konzentration an Gesamtprotein in beiden Extrakten können keine Angaben zur Proteinkonzentration gemacht werden. Als Anhaltspunkt dient deswegen der Gehalt an Spermienäquivalenten pro Picoliter (sp/pl).

Eine potentielle Unzulänglichkeit ist, dass bei allen Untersuchungen zu einem spermiengebundenen löslichen Eizell-aktivierenden Protein die Extrakte aus Sperma bereitet wurden, das noch keinen die Akrosomreaktion-auslösenden Bedingungen ausgesetzt war. Deshalb enthalten die Extrakte akrosomale Stoffe, die bei normaler Fertilisation nicht zugegen sind. Doch neuere Studien zeigen, dass Eizellen der Maus auch durch Injektion demembranisierter Spermienköpfe aktiviert werden können. Dies legt die Vermutung nahe, dass das aktivierende Protein Teil des perinuklearen Materials

des Spermiums sein könnte (Kuretake et al. 1996, Kimura et al. 1998). Spermienköpfe verlieren nach Behandlung mit Triton X-100 vollständig ihre Membran. Es fehlt ihnen demnach die Kopfkappe, das Akrosom, und andere cytoplasmatische Bestandteile. Sie behalten hingegen jedoch die perinukleare Matrix, die den Kern umgibt.

Intrazelluläre Calciumoszillationen stimulieren die Entwicklung der Eizelle, indem sie die Genexpression entwicklungsrelevanter Gene (Dolmetsch et al. 1998) begünstigen oder durch die Förderung der Entstehung maternaler mRNAs und posttranslationaler Modifikationen von Proteinen die Regulation früher Teilungsstadien kontrollieren (Xu et al. 1994).

5.2.1 Messung der $[Ca^{2+}]_i$ -Ausschüttung

Es existieren einige Veröffentlichungen zur Eizellaktivierung und Embryonalentwicklung nach Injektion eines löslichen Spermienextraktes, jedoch wenige, die auch eine Calciumfreisetzung in der Eizelle gemessen haben. Dozortsev et al. (1995) bedienten sich eines humanen cytosolischen Spermienfaktors, um Eizellen von Mensch und Maus zu aktivieren, die nach ICSI keine Teilung durchlaufen hatten. Bei 83 % kam es zu einer Vorkernbildung nach Extraktinjektion. Knott et al. (2002) erreichten bei 82 % der Eizellen das Vorkernstadium. 2001 erhielten Okitsu et al. bei 75 % der injizierten Eizellen das Vorkernstadium. Mittlerweile gibt es eine große Anzahl Untersuchungen, die sich mit der Calciumfreisetzung in der Eizelle beschäftigen. Es ist bisher nicht geklärt, welcher Mechanismus genau den intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg als Reaktion auf den Spermienextrakt herbeiführt. Man kann anhand dieser Ergebnisse nicht sagen, ob die Calciumfreisetzung von den peripheren Speicherorten (Tesarik and Sousa 1996) ausgeht oder durch einen Calciumgradienten zwischen der Peripherie und dem Zentrum des Cytoplasmas (Berridge 1996). Bei der natürlichen Fertilisation wird der Spermienfaktor nach Fusion von Spermium und Eizelle freigesetzt (Swann and Lawrence 1996).

Da die Ergebnisse der Ca^{2+} -Messungen im bovinen System durchgeführt wurden, existieren keine eindeutigen Vergleichsmöglichkeiten der Oszillationserfassung, denn lediglich Tosti et al. (2002) veröffentlichten als bisher einzige Arbeitsgruppe eine Studie, in der sowohl Eizellen als auch der Spermienextrakt von der Spezies Rind stammen. Auch sie untersuchten die Calciumfreisetzung in IVM Eizellen, jedoch in

Verbindung mit einer Membranhyperpolarisation. Deshalb sind diese Ergebnisse nicht vergleichbar.

5.3 Einfluss des Maturationsstatus in vitro-gereifter Eizellen auf die intrazelluläre Calciumfreisetzung im Hinblick auf ihre Aktivierungskompetenz

Sowohl bei den Messungen mit der geringen Konzentration des Spermienextraktes als auch bei der höheren Konzentration konnte bei in vitro-gereiften Eizellen kein standardisiertes, reproduzierbares Oszillationsmuster erreicht werden. Zwar bestanden Ähnlichkeiten zwischen den Mustern, jedoch musste man stets davon ausgehen, dass jede Eizelle individuell auf den Spermienextrakt reagiert. Die Unterschiede lagen sowohl in der Oszillationsfrequenz als auch in der Amplitude. Fissore et al. (1992) unterteilten die Oszillationsmuster nach Messung der intrazellulären Calciumfreisetzung bei Fertilisation in drei Gruppen. Als Kriterium diente die Länge des Intervalls. Außerdem kam es auch vor, dass Eizellen zwar fertilisiert waren, doch keine Anzeichen einer Calciumfreisetzung detektiert werden konnten. Es kann also eine Variabilität der Aktivierungskompetenz bei in vitro-gereiften Eizellen nicht ausgeschlossen werden.

Es liegt die Vermutung nahe, dass die Variation der intrazellulären Calciumausschüttung mit der Entwicklung der Calciumspeicher im Verlauf der Maturation der Eizelle in Verbindung steht. Mehlmann et al. (1995) untersuchten die Sensitivität des Endoplasmatischen Retikulums (ER) in maturierten und immaturren Eizellen der Maus. Sie stellten fest, dass sich das ER im Verlauf der Eizellreifung vom Inneren des Cytoplasmas in die Rindenregion verlagert. In der Rindenregion (Cortex) findet bei der Fertilisation die Spermiendekondensation statt. Bei Untersuchungen der Calciumausschüttung nach IP_3 -Injektion reagierten die immaturren Eizellen mit einem wesentlich geringen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration als die gereiften Eizellen. Auch Carroll et al. (1994) machten ähnliche Beobachtungen an murinen Eizellen. Sie kamen zu dem Schluss, dass das Auftreten und die Charakteristik spontaner $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege abhängig ist vom Entwicklungsstadium der Eizelle. Sie unterschieden bei ihren Versuchen in inkompetente Eizellen, kompetente wachsende Eizellen und voll ausgereifte kompetente Eizellen. Daneben beobachteten sie ebenso wie in dieser Arbeit unterschiedliche Calciumoszillationsmuster: gleichmäßige, ungleichmäßige und keine Oszillationen. Die Veränderungen während der Maturation,

die die Eizelle in ihrer Fähigkeit, auf einen Spermienfaktor zu reagieren, erfährt, ähneln den von Fujiwara et al. (1993) beschriebenen Reaktionen bei der Fertilisation reifer und unreifer Hamstereizellen. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Eizellreifung zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber IP_3 führt. Dabei reagieren mature Eizellen bereits bei niedrigeren IP_3 -Konzentrationen mit einer Calciumantwort als immature. Eine Erklärung für diese Reaktion ist die erhöhte Sensitivität des IP_3 -Rezeptors gegenüber IP_3 und Calciumanstiegen in maturen Eizellen (Fujiwara et al. 1993). Doch bis heute ist es nicht gelungen zu erklären, ob diese erhöhte Sensitivität des IP_3 -Rezeptors oder die eines anderen Elements der Feedback-Schleife Grund für die $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung ist. Tombes et al. (1992) hatten zuvor berichtet, dass sich bei der Maturation die intrazellulären Calciumspeicher vergrößern. Auch das könnte ein Grund für die erhöhte Reaktionsbereitschaft zur Calciumfreisetzung in maturen Eizellen sein.

Ferner wurde bei der Punktion der Ovarien zur Gewinnung der Eizellen keine Selektion der Follikelgröße unternommen. Es wurden demnach Eizellen unterschiedlicher Zellzyklusstadien in Maturation gesetzt. Alle diese Eizellen wurden gepoolt und gleichlang unter Zugabe von FSH inkubiert. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass es Eizellen gibt, die nach Ablauf der Maturationsdauer bereits gereift sind, aber auch andere, die in ihrer Entwicklung noch nicht die Metaphase-Arretierung der zweiten meiotischen Reifeteilung erreicht haben. Diese Annahme könnte begründen, warum 1. nicht alle mit Spermienextrakt erfolgreich injizierten IVM Eizellen mit einer messbaren Calciumfreisetzung reagieren und 2. sich die Muster dieser Eizellen nicht standardisieren lassen, besonders bei der geringeren Extraktkonzentration.

5.4 Calciumoszillationen nach Injektion des Spermienextraktes in in vivo-gereifte Rindereizellen

Bis heute liegt keine Studie vor, die sich mit der Calciumfreisetzung als elementares Aktivierungselement in in vivo-gereiften Rindereizellen beschäftigt. Die Mehrheit der Veröffentlichungen arbeitet, wie bereits erwähnt, mit Eizellen der Maus. Auch diese Eizellen werden stets ex vivo gewonnen, sind also in vivo gereift, und durch eine punktgenaue hormonelle Stimulation kann davon ausgegangen werden, dass diese Eizellen in ihrem Zellzyklus nahezu homogen sind, d. h. sie besitzen alle den gleichen Maturationsstatus zum Zeitpunkt ihrer Gewinnung bzw. der Injektion. In der

vorliegenden Arbeit wurde eine kleine Gruppe von murenen Eizellen direkt ex vivo aus dem Rind gewonnen. Diese Eizellen befanden sich in Follikeln, die 2 bis 4 Stunden vor der Ovulation standen. Weiterhin stammten die Eizellen aus demselben Tier. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die vorausgegangene hormonelle Stimulation des Tieres allen Eizellen gleichermaßen zuteil wurde. Aufgrund der aufwändigen Manipulation am und im Tier stand nur diese kleine Anzahl Eizellen zur Verfügung.

Nach Injektion des Spermienextraktes der Konzentration 5 sp/pl war bei 5 von 6 injizierten Eizellen eine Reaktion in Form einer messbaren Ca^{2+} -Freisetzung zu beobachten. Bei 4 von diesen 5 reagierenden Eizellen erfolgte die intrazelluläre Calciumfreisetzung bereits vor dem Start der Messung, innerhalb der fünfminütigen Verzögerung, die zur Positionierung der Eizellen und Justierung der Mess-Software benötigt wurde. Wie aus Abbildung 15 zu entnehmen, startet die Oszillation mit einem hohen Initialpeak und setzt sich dann in vielen kleineren Anstiegen kurzen Intervalls fort. Aufgrund der hohen Konzentration des Spermienextraktes war die Reaktion der Eizelle nicht physiologisch, doch ausreichend als Kontrolle der Reaktionsfähigkeit der Eizellen auf einen aktivierenden Spermienfaktor im injizierten Extrakt.

Auch bei diesen Eizellen stellt sich die Frage, warum die in vivo-gereiften Eizellen früher und gleichmäßiger auf den injizierten Spermienextrakt reagieren als die in vitro-gereiften Eizellen. Wie bereits erwähnt, könnte der Maturationsstatus dieser Eizellen eine bedeutende Rolle spielen. Da die Eizellen kurz vor ihrer natürlichen Ovulation standen, kann man davon ausgehen, dass sie sich in einem nahezu optimalen Reifezustand befanden. Dieser Reifezustand ist ausschlaggebend bei der Aktivierungsfähigkeit der Eizellen. Größere und sensitivere Calciumspeicher der kurz vor der Ovulation stehenden Eizellen könnten ein Grund für diesen positiven Feedback-Mechanismus durch den IP_3 -Rezeptor sein (Iino and Endo 1992). Auch Mehlmann and Kline (1994) beschreiben bei der Maus einen Anstieg der IP_3 -vermittelten Ca^{2+} -Ausschüttung im Verlauf der Maturation. Bei der murenen Eizelle ist eine erhöhte Konzentration an IP_3 -Rezeptoren festzustellen (Berridge et al. 1989). Fujiwara et al. (1993) beschreiben beim Hamster einen graduellen Anstieg der Sensitivierung in den ersten fünf Stunden der Eizellreifung. 10 bis 12 Stunden nach Beginn der Maturation kommt es dann zu einem deutlich merkbaren Sensitivitätsanstieg gegenüber IP_3 . Dieses Ereignis korreliert mit der Zeit während der Maturation, wenn das Spermium wiederkehrende Calciumoszillationen auslöst (Jones et al. 1995a). Eine weitere

Möglichkeit, den Sensitivitätsanstieg zu erklären, wäre ein Anstieg in der Expression eines oder beider Ca^{2+} -Kanäle. Alternativ könnte auch eine Veränderung der Dichte der Calciumkanäle im Endoplasmatischen Retikulum oder ein Rückgang der Ca^{2+} -Pufferkapazität im Cytosol zu diesen intensiven Oszillationen führen. Eine erhöhte Anzahl an Ca^{2+} -Kanälen bedeutet eine geringere Distanz zwischen den Kanälen, so dass Ca^{2+} -Ionen schneller diffundieren können und auf diese Weise weitere Kanäle aktivieren. Das Ergebnis ist eine größere Fähigkeit zur Produktion von Calciumwellen (Parys and Bezprozanny 1995).

5.5 PLC ζ ist der gesuchte Spermienfaktor bei der Aktivierung der Säugetiereizelle

2002 veröffentlichten Saunders et al. die Klonierung einer neuen Isoform der Phospholipase C, PLC ζ . Sie klonierten PLC ζ aus einer Testis-Bank von Mäusen mittels ESTs. PLC ζ trat in den gleichen aufgereinigten Fraktionen eines Spermienextraktes auf, der auch in Mäuseeizellen Calciumoszillationen auslöste. Weitere Untersuchungen wie die Depletion des Spermienextraktes von PLC ζ und die Co-Injektion von Spermienextrakt mit PLC ζ -spezifischen Antikörpern ließen den Schluss zu, dass es sich bei diesem Protein um den so lange gesuchten Eizell-aktivierenden Spermienfaktor handelt.

5.5.1 Bovine PLC ζ cRNA löst keine eindeutigen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationen in IVM Eizellen aus

In dieser Arbeit sollte, aufbauend auf die Ergebnisse von Saunders et al. (2002), Cox et al. (2002), Parrington et al. (2002) und Fujimoto et al. (2004) untersucht werden, ob die bovine PLC ζ beim Rind der aktivierende Spermienfaktor ist.

Um herauszufinden, ob PLC ζ in der Eizelle eine Veränderung der Calciumkonzentration hervorruft, wählten wir in dieser Arbeit die Injektion einer cRNA, die PLC ζ codierte. Die Injektion von cRNA wurde bereits zuvor als effektives Mittel zur Expression spezifischer Proteine in Mäuseeizellen eingesetzt. Parrington et al. (2000) zeigten bereits, dass die Injektion von Mäuseeizellen mit einer mRNA aus Spermienvorläuferzellen fertilisations-ähnliche Calciumoszillationen hervorruft. Dieses Ergebnis weist also daraufhin, dass die Mäuseeizelle in der Lage ist, eine injizierte

mRNA des Spermienfaktors in ihrem Cytoplasma in eine aktive Form zu translatieren. Die Methode der RNA-Injektion vermeidet daneben auch Probleme, die bei der Injektion eines Proteins entstehen können, das zuvor in einem anderen Expressionssystem produziert wurde. Außerdem wird durch die Verwendung einer synthetisch hergestellten RNA verhindert, dass bei der Injektion kontaminierende Moleküle aus dem Zellsystem der Proteinproduktion der rekombinaten PLC ζ in die Eizelle gelangen.

In dieser Arbeit konnte nicht gezeigt werden, dass die Injektion einer bovinen PLC ζ cRNA in unterschiedlichen Konzentrationen (5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) in gereiften Rindereizellen eine messbare Ca^{2+} -Freisetzung herbeiführt. Weder im Zeitfenster der bereits veröffentlichten Arbeiten zur Maus und zum Menschen (Saunders et al. 2002, Cox et al. 2002, Rogers et al. 2004), noch in einem erweiterten Zeitfenster von bis zu 8 Stunden nach der Injektion der cRNA konnten eindeutige Calciumoszillationen detektiert werden.

Es ist möglich, dass der Spermienfaktor und damit die PLC ζ -Konzentration bei manchen Spezies stärker sein muss als bei anderen. Da das Eizellvolumen der Rindereizelle um ein Vielfaches größer ist als das der Mäuseizelle, ist auch der Verdünnungseffekt stark erhöht. Auch ist es möglich, dass es Unterschiede in der Sensitivität der Eizelle gegenüber dem aktivierenden Faktor zwischen den verschiedenen Spezies gibt. Zum Beispiel reagieren die Eizellen der Maus wesentlich sensitiver auf eine Spermienfaktor-induzierte Calciumfreisetzung als die Eizellen anderer Spezies wie zum Beispiel dem Hamster (Parrington et al. 1996). Außerdem ist es möglich, dass es Unterschiede im Gehalt an PLC ζ in den Spermatozoa der verschiedenen Arten gibt. Es könnte also eine Korrelation zwischen der Sensitivität der Eizelle und der Konzentration an PLC ζ existieren. Diese Vermutungen werden von der Tatsache unterstützt, dass die Konzentration der injizierten cRNA in Rindereizellen nicht vergleichbar ist mit den Injektionen in Mäuseizellen. Die erhöhte Sensitivität der Mäuseizelle zeigt sich auch daran, dass die Maus einen schnelleren Zellzyklus besitzt. So tritt der Block der Umschaltung der Genexpression von der maternalen Komponente auf die embryonale bei der Maus bereits im 2-Zell-Stadium auf, beim Rind hingegen im 8-Zell-Stadium. Der Mensch liegt dazwischen mit einem 4-Zell-Block. Auch Rogers et al. (2004) berichten von einer herabgesetzten Sensitivität bei gealterten Eizellen des Menschen. Sie benötigten zur Auslösung von Ca^{2+} -Oszillationen in diesen Eizellen eine

10fach höhere Konzentration der humanen PLC ζ cRNA als zuvor die Arbeitsgruppe um Cox et al. (2002).

Bei den Versuchen zur Calciumfreisetzung nach cRNA-Injektion wurde versucht, über die Konzentration und das Injektionsvolumen die Menge an PLC ζ cRNA, die in die Eizelle gelangt, proportional auf das Eizellvolumen des Rindes umzurechnen und so die Vorgehensweise an die bereits veröffentlichten Untersuchungen anzupassen. Jedoch trotz erfolgreicher Positivkontrolle mit dem Spermienextrakt, was eine Inkompetenz in der Calciumfreisetzung seitens der jeweiligen Eizellcharge ausschließen konnte, wurde kein typisches Oszillationssignal in IVM Eizellen detektiert.

In 2005 veröffentlichten Malcuit et al. eine Studie, in der bovine MII Eizellen nach 24 h Maturation mit einer murinen PLC ζ cRNA der Konzentration 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ injiziert wurden. Sie detektierten Calciumoszillationen in diesen Eizellen etwa 20 min nach einer 60 minütigen Ruhezeit zur Translation des Proteins. Das Oszillationsmuster hatte ein gleichmäßiges Intervall von 38 ± 10 min. Ferner wurde die Messung, wie in der vorliegenden Arbeit auch, in verschiedenen Zeitfenstern durchgeführt. Man beobachtete eine Zunahme der Oszillationsfrequenz der Calciumpeaks im Verlauf der Messung, was auf eine Anhäufung des PLC ζ Proteins über die ausgedehnte Zeit schließen lässt. Diese Ergebnisse an Rindereizellen mit der murinen PLC ζ cRNA konnten in dieser Arbeit mit der bovinen PLC ζ cRNA nicht reproduziert werden. Die Menge an injizierter boviner PLC ζ cRNA entspricht der gleichen Menge muriner PLC ζ cRNA bei Malcuit et al. (2005). Gründe für das Ausbleiben einer Calciumfreisetzung könnten an einer herabgesetzten Reaktionsbereitschaft der IVM Eizellen gegenüber der PLC ζ cRNA liegen. Bisher liegen noch keine Erfahrungswerte zur Injektion von PLC ζ cRNA in Rindereizellen vor. Es ist noch nicht nachgewiesen, ob die Rindereizelle mit einer Konzentration an boviner PLC ζ cRNA, die proportional zur Konzentration ist, die die Mäuseizelle benötigt, Calciumoszillationen produzieren kann.

Die gemessenen Calciumpeaks im Fenster 235 min bis 300 min (siehe Abb. 13) sind nicht im eigentlichen Sinne als Calciumoszillationen zu werten, da sie nahezu zeitgleich bei allen Eizellen der Messgruppe in diesem Zeitfenster auftreten, und es danach keine Folgepeaks gibt, die die Oszillation fortsetzen. Die Ursache für dieses plötzliche Auftreten der Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist jedoch unbekannt.

5.5.2 PLC ζ cRNA Injektion in in vivo-gereifte Rindereizellen

Um eine Vergleichsmöglichkeit zwischen in vitro- und in vivo gereiften Eizellen zu haben, wurde eine kleine Anzahl in vivo-gereifter Eizellen mit der PLC ζ cRNA injiziert. Zwei von fünf injizierten Eizellen reagierten mit einem bzw. mehreren Calciumpeaks (Abb. 14). Die Eizelle, die mehrere Calciumpeaks produzierte, zeigte ein Intervall von $23,7 \pm 1,5$ min. Dies ist ein zeitlicher Abstand zwischen den Peaks, der mit der Oszillationsfrequenz fertilisierter Eizellen vergleichbar ist (Fissore et al. 1992). Dieses Ergebnis gibt Hinweise auf den Maturationsstatus der Eizellen. Die Maturation erfolgte in vivo unter hormoneller Stimulation. Die Punktion der COCs war zeitlich genau terminiert und lag nur wenige Stunden vor der natürlichen, „errechneten“ Ovulation. Man kann demnach davon ausgehen, dass die in vivo-gereifte Rindereizelle sensibler auf die PLC ζ cRNA reagiert. Sie ist in ihrer Reifung in einem definierteren Stadium, das ihr die Möglichkeit gibt, eine externe cRNA zu translatieren und auf das Protein mit einer Calciumfreisetzung zu reagieren. Bisher liegen keine Untersuchungen zu einer Injektion von PLC ζ in Form einer cRNA oder eines Proteins in Rindereizellen vor. Bisherige Untersuchungen, die mit Eizellen der Maus arbeiten, nutzen auch in vivo-gereifte Eizellen. Hier liegt kein Vergleichsstandard für Mäuseeizellen vor, die in vitro maturiert wurden. Aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Eizellen kann keine Aussage gemacht werden, wie effektiv die cRNA in diesen Zellen wirkt. Um die Reaktionen von in vitro- und in vivo-maturierten Eizellen sowohl quantitativ als auch qualitativ beschreiben zu können, bedarf es einer größeren Anzahl in der in vivo-Gruppe.

5.5.3 PLC ζ könnte der aktivierende Spermienfaktor beim Rind sein

Anhand der Ergebnisse aus dem in vivo-Versuch und der veröffentlichten Resultate von Malcuit et al. (2005), könnte es sein, dass PLC ζ auch beim Rind im homologen System in der Lage ist, als einzelner aktivierender, spermien-spezifischer Faktor Eizellen der gleichen Spezies zu einer intrazellulären Calciumausschüttung anzuregen. Wie bereits von Saunders et al. (2002), Rogers et al. (2004), Fujimoto et al. (2004), Yoda et al. (2004), Larma et al. (2004) bei der Maus und von Malcuit et al. (2005) bei Maus und Rind beschrieben agiert PLC ζ als Faktor, der in isolierter Form injiziert, das erste Ereignis der Eizellaktivierung auslöst. Ferner wurde auch bestätigt, dass die Eizelle des

Rindes in der Lage ist, eine spermienspezifische cRNA in das PLC ζ Protein zu translatieren und auf diese Weise die Reaktionskaskade der Eizellaktivierung zu starten. Dieses Element der gezielten Beeinflussung der Initiation der Embryonalentwicklung ermöglicht einen kontrollierten Eingriff in die Reaktionskaskade der Eizelle ohne Einbringen zusätzlicher fremder DNA, Proteine und anderer Faktoren durch das Spermium.

5.6 Ausblick

Weitere Zielsetzung in dieser Arbeitsgruppe wird die Optimierung der messbaren $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen als Antwort auf die Injektion der bovinen PLC ζ cRNA und des rekombinanten PLC ζ Proteins sein. Das Plasmid wurde bereits bei Fissore et al. auf seine Funktionsfähigkeit an Mäuseeizellen getestet. Die Untersuchung ergab, dass für das Hervorrufen einer Calciumoszillation eine 10fach höhere Konzentration eingesetzt werden muss als im dortigen Labor üblich (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Dieses Ergebnis wirft Fragen zur Herstellung einer funktionalen PLC ζ cRNA auf. Dies betreffend wurden die Arbeiten bereits aufgenommen. Ferner steht nun ein Antikörper zur bovinen PLC ζ zur Verfügung, so dass auch weiterführende Western Blot-Untersuchungen durchgeführt werden können.

Die Entdeckung und Charakterisierung von PLC ζ als ein neuer Vermittler der Regulation des intrazellulären Calciums wird das Verständnis des Mechanismus der Eizellaktivierung erweitern. Die Identifikation von PLC ζ als ein Teilstück des vermutlichen physiologischen Spermienfaktors könnte helfen, den molekularen Mechanismus der frühen Embryonalentwicklung als Folge der erfolgreichen Aktivierung zu verstehen. Die Analyse von PLC ζ im Sperma zuchtwertgeprüfter Bullen als Fertilitätskriterium in der Qualitätsbewertung könnte helfen, manche Fälle von verringerter Fertilität von zur Zucht untauglicher Besamungsbullen zu entdecken und auf diese Weise eine noch intensivere Selektion auf das Merkmal der paternalen Fruchtbarkeit durchzuführen. Dies wäre ein Vorteil, der sowohl den Zuchtverbänden in der früheren Auswahl der Bullen für den Feldeinsatz als auch dem Landwirt, der diese Bullen zur Steigerung des Zuchtfortschritts in der eigenen Herde einsetzt, zugute kommt. In wissenschaftlicher Hinsicht könnte der Einsatz von PLC ζ dahingehend verwendet werden, die Raten der Eizellaktivierung nach somatischem Kerntransfer zu

steigern. Der Einsatz eines physiologischen, in der Natur vorkommenden Aktivierungsfaktors könnte in der Humanmedizin die Produktion von Stammzellen zur Heilung bisher unheilbarer Krankheiten beim Menschen sowohl qualitativ als quantitativ verbessern.

6 Zusammenfassung

Die Eizellen von Säugetieren werden in einem metabolischen Ruhezustand, der Metaphase der zweiten meiotischen Reifeteilung, ovuliert. Bei der Fertilisation der Säugereizelle initiiert das Spermium, das in die Eizelle eindringt, eine Serie von Ereignissen, die als Eizell-Aktivierung bezeichnet werden. Diese Reaktion besteht in mehrere Stunden andauernden, wiederkehrenden, transienten Anstiegen der intrazellulären Calciumkonzentration in der Eizelle. Solche wiederholten Anstiege der Calciumkonzentration treten beim Rind in den ersten Stunden nach der Gametenfusion bis zur Bildung der Pronuklei in Intervallen von einigen Minuten auf. Die Oszillationen lösen die Eizelle aus ihrem Metaphase-Arrest und leiten in die Embryonalentwicklung über. Sowohl ein injiziertes Spermium als auch die Injektion von Spermienextrakten können intrazelluläre Ca^{2+} -Oszillationen in der Eizelle hervorrufen. Dies führte zu dem Schluss, dass das Spermium der Säugetiere einen löslichen, Eizell-aktivierenden Faktor enthalten muss, der nach Injektion in isolierter Form die Fähigkeit hat, Ca^{2+} aus den intrazellulären Speicherorten der Eizelle freizusetzen. Bisher wurden bereits viele mögliche Kandidatenproteine diskutiert, von denen jedoch keinem nachgewiesen werden konnte, der alleinige Auslöser der Calciumoszillationen zu sein. Kürzlich konnte eine neue Isoform der Phospholipase C, PLC ζ , identifiziert werden, die nach Injektion in Säugereizellen langanhaltende Calciumoszillationen auslöst. Sie kann als der gesuchte Eizell-aktivierende Spermienfaktor bezeichnet werden.

In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob sich die Ergebnisse von Saunders et al. (2002) und Cox et al. (2002), bei denen eine rekombinante PLC ζ cRNA in maturierte Mäuseeizellen injiziert worden war, auf die Spezies Rind übertragen lassen. Es sollte herausgefunden werden, ob PLC ζ auch beim Rind als der aktivierende Spermienfaktor bezeichnet werden kann.

Dazu wurde zum Einen zunächst aus dem Rinderhoden eines geschlachteten Bullen eine Gewebeprobe entnommen und über PCR die bovine Sequenz von PLC ζ isoliert. Von dieser Sequenz wurde dann eine cRNA erstellt, die zur Mikroinjektion in bovine IVM bzw. in vivo-gereifte Eizellen diente.

Daneben wurde ausgehend von Nativejakulaten eines zuchtwertgeprüften Red Holstein-Bullen ein unaufgereinigter Spermienextrakt gewonnen. Die Präsenz des Eizell-aktivierenden Spermienfaktors in diesem Spermienextrakt wurde durch Mikroinjektion

in gereifte (MII) Rindereizellen und anschließende Messung der Veränderung der intrazellulären Calciumoszillation nachgewiesen.

Nach Injektion des Spermienextraktes in den Konzentrationen 2 bzw. 5 sp/pl (Spermienäquivalente/Picoliter) konnte man eine Konzentrationsabhängigkeit in der Calciumfreisetzung der Eizellen feststellen. Bei einer Extraktkonzentration von 2 sp/pl reagierten 34,2 % (n=38) der Eizellen mit einem oder mehreren transienten Anstiegen der intrazellulären Calciumkonzentration. Bei einer Extraktkonzentration von 5 sp/pl betrug der Anteil der Eizellen, die mit einer messbaren Ca^{2+} -Freisetzung reagierten, bereits 72,3 % (n=22). Ferner lag der Anteil der Eizellen mit einer deutlichen Oszillation (mehr als drei wiederkehrende Calciumtransienten) bei dem Spermienextrakt mit 5 sp/pl signifikant höher als bei dem Extrakt mit 2 sp/pl (45,5 % vs. 26,3 %). Die Eizellen, die mit einer Extraktkonzentration von 2 sp/pl injiziert worden waren, zeigten bei den Messungen zur intrazellulären Calciumkonzentration ungleichmäßige Oszillationsmuster, aus denen kein Standard abgeleitet werden konnte. Die Eizellen, die mit dem höher konzentrierten Extrakt injiziert worden waren, reagierten hingegen mit gleichmäßigen Oszillationen von kurzen Intervallen. Der Zeitpunkt des Oszillationsbeginns konnte nur Eizell-individuell bestimmt werden. Bei einer höheren Konzentration des Spermienextraktes begannen die Eizellen tendenziell früher als bei der niedrigen Extraktkonzentration (24,8 min vs. 39,6 min). Auch waren die Intervalle bei 5 sp/pl kürzer als bei 2 sp/pl (169,8 sec vs. 206,9 sec). Vergleichend wurde zum Abschluss eine kleine Anzahl Eizellen mit dem Extrakt der Konzentration 5 sp/pl injiziert, die aus der in vivo-Maturation stammten. Es konnte festgestellt werden, dass diese Eizellen früher auf den Spermienextrakt reagieren und gleichmäßige, einheitliche Oszillationsmuster aufweisen.

Die PLC ζ cRNA wurde zunächst in IVM Rindereizellen injiziert. Dabei wurden zwei Ansätze verfolgt: 1. welche Konzentration der injizierten PLC ζ cRNA löst bei MII Rindereizellen eine intrazelluläre Calciumfreisetzung aus, die in Form einer Oszillation gemessen werden kann? 2. zu welchem Zeitpunkt nach der Injektion tritt diese Oszillation ein?

Bei der Durchführung einer Verdünnungsreihe der PLC ζ cRNA wurde festgestellt, dass bei keiner der eingesetzten Konzentrationen (5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) eine deutliche Ca^{2+} -Oszillation ausgelöst wurde. Zur Beantwortung der zweiten Fragestellung wurde die Messdauer ausgedehnt. Dazu wählte man die Konzentration 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Diese

Konzentration der PLC ζ cRNA kam den Konzentrationen der bereits veröffentlichten Studien an der Maus am nächsten. Es wurden Messungen in Zeitfenstern von 60 bis 70 min durchgeführt. Im Zeitfenster 235 bis 300 min wurden bei 4 von 4 gemessenen Eizellen transiente Anstiege der Calciumkonzentration erfasst. Jedoch aufgrund des fast zeitgleichen Auftretens und der fehlenden Reproduzierbarkeit ist dieses Ergebnis nicht eindeutig zu interpretieren. Wie bereits beim Spermienextrakt wurde auch mit der PLC ζ cRNA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) eine Injektionsserie an in vivo-maturierten Eizellen durchgeführt. Hierbei ergab sich bei 2 von 5 injizierten Eizellen eine Reaktion in Form eines oder mehreren deutlichen Calciumpeaks. Die Oszillationsintervalle der Eizelle, die mehrere Peaks zeigte (n=3), hatten eine Länge von 23,7 min. Dies ist eine Zeitspanne, die im Rahmen der Oszillationsintervalle von in vitro-fertilisierten Rindereizellen liegt.

Es ist uns gelungen, die Abhängigkeit der Ca²⁺-Oszillationsauslösung von in vitro-gereiften Rindereizellen im Hinblick auf die Konzentration eines löslichen Spermienfaktors in einem Spermienextrakt vom Rind darzustellen. Ferner wird in dieser Arbeit zum ersten Mal die intrazelluläre Calciumfreisetzung als Reaktion von in vivo-maturierten Rindereizellen auf einen homologen Spermienextrakt anhand von Oszillationsmessungen gezeigt. Es wurde weiterhin geprüft, ob eine PLC ζ cRNA als Auslöser der Calciumausschüttung in der MII Rindereizelle, sowohl in vitro als auch in vivo Ursprungs, agiert. Über die Calciumfreisetzung in vitro-maturierten Eizellen kann keine eindeutige Aussage gemacht werden. Hier gibt es weiteren Forschungsbedarf. Bei in vivo-maturierten Eizellen waren Reaktionen auf die PLC ζ cRNA festzustellen, die jedoch auch einer weiteren Konfirmation bedürfen. Dies gibt Hinweise auf Unterschiede im Ablauf der Maturation bei IVM und in vivo-Eizelle des Rindes.

Summary

Mammalian oocytes are ovulated in a metabolic arrest, the metaphase of the second meiotic division. At fertilisation, the penetrating sperm initiates a series of events that are called oocyte activation. This reaction consists in longlasting transient increases of intracellular calcium concentration in the oocyte. In bovine, those repeated transients of Ca^{2+} concentration occur during the first few hours after gamete fusion and last until pronuclear formation. The transients show intervals of some minutes. Due to these oscillations, the oocyte is released from its metaphase arrest and embryonic development will begin. Besides the fertilizing sperm itself, sperm extracts are able to cause intracellular Ca^{2+} oscillations after microinjection into an oocyte. This fact leads to the conclusion that mammalian sperms contain a soluble, oocyte-activating factor that will release calcium from internal stores of the oocyte after injection in an isolated form. Many candidate proteins have been discussed so far, but none of them could prove to be the sole releasing agent of calcium oscillations. Recently, a new isoform of phospholipase C, PLC ζ , has been identified. This isoform initiates longlasting calcium oscillations after injection into mammalian oocytes. This PLC ζ can be called the oocyte activation sperm factor.

This study should find out if the results from Saunders et al. (2002) and Cox et al. (2002) can be transferred to the bovine species. Saunders et al. (2002) and Cox et al. (2002) injected a recombinant PLC ζ cRNA into matured murine oocytes. The question was whether or not PLC ζ is also the activating sperm factor in the bovine species.

At the slaughterhouse, a tissue sample was taken from a bovine epididymis and the bovine PLC ζ sequence was isolated by PCR. A cRNA was made from this sequence to be injected into bovine in vitro- and in vivo-matured oocytes.

Fresh ejaculates from a proven Red Holstein bull were taken and a crude sperm extract was made. The presence of the oocyte-activating sperm factor in this extract was verified by microinjection into bovine MII oocytes and by the following measurement of intracellular calcium oscillations.

After injection of the sperm extract with 2 sp/pl and 5 sp/pl (sperm equivalents/picolitre), a dependence of concentration of the sperm extract could be observed by measuring intracellular calcium release. At a concentration of 2 sp/pl

34,2 % (n=38) of the oocytes showed one or more transient increases of the intracellular calcium concentration. Whereas at a concentration of 5 sp/pl 72,3 % (n=22) of the injected oocytes showed a measurable calcium release. Furthermore, the number of oocytes with a distinct oscillation (more than three transients) was significantly higher in the group of 5 sp/pl than in the group of 2 sp/pl (45,5 % vs. 26,3 %). Oocytes injected with an extract concentration of 2 sp/pl showed irregular oscillation patterns. No standard could be derived from these measurements. Oocytes injected with the higher concentrated extract showed homologous oscillation patterns with short intervals between the transients. The moment of starting oscillations could only be determined individually for each single oocyte. At a higher extract concentration, oocytes tended to begin earlier with calcium release (24,8 min vs. 39,6 min). The intervals with 5 sp/pl were shorter than with 2 sp/pl (169,8 sec vs. 206,9 sec). Beyond these two groups of IVM oocytes, a small number of in vivo-matured oocytes was injected with the sperm extract of 5 sp/pl. It could be observed that these oocytes reacted earlier to the sperm extract and produced more regular, uniform oscillation patterns than the IVM oocytes.

PLC ζ cRNA was injected into bovine IVM oocytes. Two major questions were dealt with: 1. Which concentration of injected PLC ζ cRNA is necessary to induce calcium release in bovine MII oocytes? 2. At which time after injection does oscillation appear? Dilution of PLC ζ cRNA to concentrations of 5, 10, 20 and 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ did not result in a clearly defined Ca $^{2+}$ oscillation. In order to answer the second question, the duration of measurement was extended. The concentration of the injected cRNA was 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. This concentration was almost equivalent to those in the literature dealing with mice. Measurements were performed in time windows of 60 to 70 min. In the window of 235 to 300 min post injection, 4 out of 4 oocytes showed Ca $^{2+}$ transient increases. But due to a simultaneous appearance of these transients and a lack of reproducibility, this result cannot be interpreted definitely. A small number of in vivo-matured MII oocytes was also injected with the PLC ζ cRNA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). 2 out of 5 oocytes showed a Ca $^{2+}$ release in form of one or more distinct transients. One oocyte produced three transients. Oscillation intervals were 23,7 min in average then. This is similar to the oscillation intervals of in vitro fertilized bovine oocytes.

We succeeded in showing the dependence of Ca $^{2+}$ release in in vitro-matured bovine oocytes with regard to the concentration of a soluble sperm factor in a bovine sperm extract. Furthermore, this study shows for the first time intracellular calcium release in

in vivo-matured bovine oocytes after injection of a homologous sperm extract by using oscillation measurement. It was investigated if a PLC ζ cRNA is the initiator of calcium release in bovine MII oocytes, both in vitro or in vivo-matured. No definite statement can be given on calcium release in in vitro-matured oocytes. More research has to be done. There was a reaction to the PLC ζ cRNA regarding in vivo-matured oocytes, but to be confirmed the results need more investigation. This fact suggests differences in the course of maturation between IVM and in vivo-derived bovine oocytes.

7 Literaturverzeichnis

1. Abassi YA, Foltz KR (1994): Tyrosine phosphorylation of the egg receptor for sperm at fertilization. *Dev Biol* 164, 430-443
2. Abbott AL, Ducibella T (2001): Calcium and the control of mammalian cortical granules exocytosis. *Front Biosci* 6, D792-D806
3. Albanesi C, Geremia R, Giorgio M, Dolci S, Sette C, Rossi P (1996): A cell- and developmental stage-specific promoter drives the expression of a truncated c-kit protein during mouse spermatid elongation. *Development* 122, 1291-302
4. Almeida EA, Huovila AP, Sutherland AE, Stephens LE, Calarco PG, Shaw LM, Mercurio AM, Sonnenberg A, Primakoff P, Myles DG, White JM (1995): Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. *Cell* 81, 1095-1104
5. Ayabe T, Kopf GS and Schultz RM (1995): Regulation of mouse egg activation: presence of ryanodine receptors and effects of microinjected ryanodine and cyclic ADP ribose in uninseminated and inseminated eggs. *Development* 121, 2233-2244
6. Ben-Yosef D, Oron Y, Shalgi R (1993): Prolonged, repetitive calcium transients in rat oocytes fertilized in vitro and in vivo. *FEBS Letters* 331, 239-242
7. Ben-Yosef D, Talmor A, Schwarz L, Granot Y, Shalgi R (1998): Tyrosyl-phosphorylated proteins are involved in regulation of meiosis in the rat egg. *Mol Reprod Dev* 49, 176-185
8. Berridge MJ (1993): Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361, 315-325
9. Berridge MJ (1996): Regulation of calcium-spiking in mammalian oocytes through a combination of inositol trisphosphate-dependent entry and release. *Mol Hum Reprod* 2, 386-388
10. Berridge MJ, Irvine RF (1989): Inositol phosphates in cell signalling. *Nature* 341, 197-205

11. Bezprozvanny I, Watras J, Ehrlich BE (1991): Bell shaped calcium response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* 351, 751-754
12. Birnbaumer L (1992): Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles of $\beta\gamma$ dimers as well as α subunits. *Cell* 71, 1069-1072
13. Bleil JD, Wassarman PM (1981): Mammalian sperm-egg interaction: Fertilization of mouse eggs triggers modifications of the major zona pellucida glycoprotein, ZP2. *Dev Biol* 86, 189-197
14. Carroll J, Swann K (1992): Spontaneous cytosolic Ca²⁺ oscillations driven by inositol trisphosphate occur during in vitro maturation of mouse oocytes. *J Biol Chem* 267, 11196-11201
15. Carroll J, Abay DT, Terasaki M, Jaffe LA (1999): Identification of PLC γ -dependent and -independent events during fertilization of sea urchin eggs. *Dev Biol* 206, 232-247
16. Carroll J, Swann K, Whittingham DG, Whitaker MJ (1994): Spatiotemporal dynamics of intracellular Ca²⁺ oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes. *Development* 120, 3507-3517
17. Carroll J, Ramarao CS, Mehlmann LM, Roche S, Terasaki M, Jaffe LA (1997): Calcium release at fertilization in starfish eggs is mediated by phospholipase C γ . *J Cell Biol* 138, 1303-1311
18. Chen MS, Tung KS, Coonrod SA, Takahashi Y, Bigler D, Chang A, Yamashita Y, Kincade PW, Herr JC, White JM (1999): Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin $\alpha 6\beta 1$: implications for murine fertilisation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 11830-11835
19. Cho C, O'Dell Brunch D, Faure JE, Goulding EH, Eddy E, Primakoff P, Myles D (1998): Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin β . *Science* 281, 1857-1859
20. Choi YH, Love CC, Chung YG, Varner DD, Westhusin ME, Burghardt RC, Hinrichs K (2002): Production of nuclear transfer horse embryos by Piezo-driven injection of somatic cell nuclei and activation with stallion sperm cytosolic extract. *Biol Reprod* 67, 561-567

21. Ciapa B, Borg B, Whitaker M (1992): Polyphosphoinositide metabolism during the fertilization wave in sea urchin eggs. *Development* 115, 187-195
22. Clapham DE, Neer EJ (1993): New roles for G protein $\beta\gamma$ -dimers in transmembrane signalling. *Nature* 365:403-406
23. Cox LJ, Larman MG, Saunders CM, Hashimoto K, Swann K, Lai FA (2002): Sperm phospholipase C ζ from humans and cynomolgus monkey triggers Ca^{2+} oscillations, activation and development of mouse oocytes. *Reprod* 124, 611-623
24. Cuthbertson KSR, Cobbold PH (1985): Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes including sustained oscillations in cell Ca^{2+} . *Nature* 316, 541-542
25. Cuthbertson KS, Whittingham DG, Cobbold PH (1981): Free Ca^{2+} increases in exponential phases during mouse oocyte activation. *Nature* 294, 754-757
26. Dale B, DeFelice LJ, Ehrenstein G (1985): Injection of a soluble sperm fraction into sea urchin eggs triggers the cortical reaction. *Experientia* 41, 1068-1070
27. DeFelice LJ, Dale B, Talevi R (1986): Distribution of fertilization channels in ascidian oocyte membranes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 229, 209-214
28. Deguchi R, Shirakawa H, Oda S, Mori T, Miyazaki S (2000): Spatiotemporal analysis of Ca^{2+} waves in relation to the sperm entry site and animal-vegetal axis during Ca^{2+} oscillations in fertilized mouse eggs. *Development* 218, 299-313
29. Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS (1998): Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392, 933-936
30. Dozortsev D, Rybouchkin A, De Sutter P, Qian C, Dhont M (1995): Human oocyte activation following intracytoplasmic sperm injection: The role of the sperm cell. *Hum Reprod* 10, 403-407
31. Dupont G, McGuinness OM, Johnson MH, Berridge MJ, Borgese F (1996): Phospholipase C in mouse oocytes: characterization of β and γ isoforms and their possible involvement in sperm-induced Ca^{2+} spiking. *Biochem J* 316, 583-591

32. Endo Y, Schultz RM, Kopf GS (1987): Effects of phorbol esters and a diacylglycerol on mouse eggs: Inhibition of fertilization and modification of the zona pellucida. *Dev Biol* 119, 199-209
33. Evans JP, Schultz RM, Kopf GS (1998): Roles of the disintegrin domains of mouse fertilins α and β in fertilization. *Biol Reprod* 59, 145-152
34. First NL, Leibfried-Rutledge ML, Northey DL, Nettleman PR (1992): Use of in vitro matured oocytes 24 h of age in bovine nuclear transfer. International Embryo Transfer Society meetings, *Theriogenology* 37, 211 (Abstr.)
35. Fissore RA, Robl JM (1993): Sperm, inositol trisphosphate, and thimerosal-induced intracellular Ca^{2+} elevations in rabbit eggs. *Dev Biol* 166, 634-642
36. Fissore RA, Gordo AC, Wu H (1998): Activation and development in mammals. Is there a role for a sperm cytosolic protein? *Theriogenology* 49, 43-52
37. Fissore RA, Dobirnsky JR, Balise JJ, Duby RT, Robl JM (1992): Patterns of intracellular Ca^{2+} concentrations in fertilized bovine eggs. *Biol Reprod* 47, 960-969
38. Fissore RA, Longo FJ, Andersen E, Parys JB, Ducibella T (1999): Differential distribution of inositol triphosphate receptor isoforms in mouse oocytes. *Biol Reprod* 60, 49-57
39. Foltz KR, Schilling FM (1993): Receptor-mediated signal transduction and egg activation. *Zygote* 1, 276-279
40. Fujimoto S, Yoshida N, Fukui T, Amanai M, Isobe T, Itagaki C, Izumi T, Perry ACF (2004): Mammalian phospholipase $\text{C}\zeta$ induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix. *Dev Biol* 274, 370-383
41. Fujiwara T, Nakada K, Shirakawa H, Miyazaki S (1993): Development of inositol trisphosphate-induced calcium release mechanisms during maturation of hamster oocytes. *Dev Biol* 156, 69-79
42. Fukami K, Nakao K, Inoue T, Kataoka Y, Kurokawa M, Fissore RA, Nakamura K, Katsuki M, Mikoshiba K, Yoshida N, Takenawa T (2001): Requirement of phospholipase $\text{C}\delta 4$ for the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Science* 292, 920-923

43. Furuichi T, Yoshikawa S, Miyawaki A, Wada K, Maeda N, Mikoshiba K (1989): Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P₄₀₀. *Nature* 342, 32-38
44. Galione A, White KL (1994): A Ca²⁺ release induced by cyclic ADP ribose. *Trends Cell Biol* 4, 431-436
45. Galione A, Swann K, Georgiou P, Whitaker MJ (1994): Regenerative and non-regenerative calcium transients in hamster eggs triggered by inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Physiol* 3, 465-474
46. Gordo AC, Wu H, Chang LH, Fissore RA (2000): Injection of sperm cytosolic factor into mouse metaphase II oocytes induces different developmental fates according to the frequency of [Ca²⁺]_i oscillations and oocytes age. *Biol Reprod* 62, 1370-1379
47. Havlicek V, Wetscher F, Huber T, Gilles M, Tesfaye D, Griese J, Rings F, Mueller H, Schellander K, Brem G, Besenfelder U (2005): In vivo culture of bovine embryos: Transfer of semen pre-incubated oocytes, zygotes, and 4 to 8 cell stage embryos into the bovine oviduct. Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (IETS), 8.-12.01.2005, Kopenhagen, Dänemark. In: *Reprod Fert Dev, Proceedings of the Conference (Abstr.)*
48. He CL, Damiani P, Parys JB, Fissore RA (1997): Calcium, calcium release receptors, and meiotic resumption in bovine oocytes. *Biol Reprod* 57, 1245-1255
49. Heyers S, Sousa M, Cangir O, Schmoll F, Schellander K, van der Ven H, Montag M (2000): Activation of mouse oocytes requires multiple sperm sperm factors but not sperm PLCγ1. *Mol Cell Endocrinol* 166, 51-57
50. Homa ST, Swann K (1994): A cytosolic sperm factor triggers calcium oscillations and membrane hyperpolarizations in human oocytes. *Hum Reprod* 9, 2356-2361
51. Iino M, Endo M (1992): Calcium-dependent immediate feedback control of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release. *Nature* 360, 76-78
52. Iwao Y, Fujimura T (1996): Activation of *Xenopus* eggs by RGD-containing peptides accompanied by intracellular Ca²⁺ release. *Dev Biol* 177, 558-567
53. Jaffe LF (1983): Sources of calcium in egg activation: a review and hypothesis. *Dev Biol* 99, 265-276

54. Jiang W, Veno PA, Wood RW, Peaucellier G, Kinsey WH (1991): pH regulation of an egg cortex tyrosine kinase. *Dev Biol* 146, 81-88
55. Jones KT (1998): Ca^{2+} oscillations in the activation of the egg and development of the embryo in mammals. *Int J Biol Dev* 42, 1-10
56. Jones KT, Carroll J, Whittingham DG (1995a): Ionomycin, thapsigargin, ryanodine, and sperm induced Ca^{2+} release increase during meiotic maturation of mouse oocytes. *J Biol Chem* 270, 6671-6677
57. Jones KT, Carroll J, Merriman JA, Whittingham DG, Kono T (1995b): Repetitive sperm-induced Ca^{2+} transient in mouse oocytes are cell cycle dependent. *Development* 121, 3259-3266
58. Jones KT, Crutwell C, Parrington J, Katan M, Swann K (1998a): A mammalian sperm cytosolic phospholipase C activity generates inositol trisphosphate and causes Ca^{2+} release in sea urchin egg homogenates. *FEBS Lett* 437, 297-300
59. Jones KT, Soeller C, Cannell MB (1998b): The passage of Ca^{2+} and fluorescent markers between the sperm and egg after fusion in the mouse. *Development* 125, 4627-4635
60. Jones KT, Matsuda M, Parrington J, Katan M, Swann K (2000): Different Ca^{2+} -releasing abilities of sperm extracts compared with tissue extracts and phospholipase C isoforms in sea urchin egg homogenate and mouse eggs. *Biochem J* 346 (Pt 3), 743-749
61. Kaji K, Oda S, Shikano T, Ohnuki T, Uematsu Y, Sakagami J, Tada N, Miyazaki S, Kudo A (2000): The gamete fusion process is defective in eggs of CD9-deficient mice. *Nat Genet* 24, 279-282
62. Katan M (1998): Families of phosphoinositide-specific phospholipase C: structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1436, 5-17
63. Keizer J, Li YX, Stojilkovic S, Rinzel J (1995): InsP_3 induced Ca^{2+} excitability of the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 6, 945-951
64. Kim JH, Do HJ, Wang WH, Machaty Z, Han YM, Day BN, Prather RS (1999): Protein tyrosine phosphatase inhibitor, sodium orthovanadate, causes parthenogenetic activation of pig oocytes via an increase in protein tyrosine kinase activity. *Biol Reprod* 61, 900-905

65. Kimura Y, Yanagimachi R, Kuretake S, Bortkiewicz H, Perris ACF, Yanagimachi H (1998): Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm perinuclear material. *Biol Reprod* 58, 1407-1415
66. Kinsey WH, Wu W, McGregor E (2003): Activation of Src-family PTK activity at fertilization: role of the SH2 domain. *Dev Biol* 264, 255-62
67. Kline D and Kline JT (1992): Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol* 149, 80-89
68. Kline D, Kopf GS, Muncy LF, Jaffe LA (1991): Evidence for the involvement of a pertussis toxin-insensitive G-protein in egg activation of the frog, *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 98, 116-127
69. Kline D, Simoncini L, Mandel G, Maue RA, Kado RT, Jaffe LA (1988): Fertilization events induced by neurotransmitters after injection of mRNA in *Xenopus* eggs. *Science* 241, 464-467
70. Knott JG, Kurokawa M, Fissore RA, Schultz RM, Williams CJ (2004): Transgenic RNAi reveals role for mouse sperm phospholipase C ζ in triggering Ca²⁺ oscillations during fertilisation. *Biol Reprod* 72, 992-996
71. Knott JG, Poothapillai K, Wu H, He CL, Fissore RA, Robl JM (2002): Porcine sperm factor supports activation and development of bovine nuclear transfer embryos. *Biol Reprod* 66, 1095-1103
72. Kouchi Z, Fukami K, Shikano T, Oda S, Nakamura Y, Takenawa T, Miyazaki S (2004): Recombinant phospholipase C ζ has high Ca²⁺ sensitivity and induces Ca²⁺ oscillations in mouse eggs. *J Biol Chem* 279, 10408-10412
73. Kuretake S, Kimura Y, Hoshi K, Yanagimachi R (1996): Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. *Biol Reprod* 55, 789-795
74. Kurokawa M, Sato K, Smyth J, Wu H, Fukami K, Takenawa T, Fissore RA (2004): Evidence that activation of Src family kinase is not required for fertilization-associated [Ca²⁺]_i oscillations in mouse eggs. *Reprod* 127, 441-454
75. Kyozuka K, Deguchi R, Mohri T, Miyazaki S (1998): Injection of sperm extracts mimics spatiotemporal dynamics of Ca²⁺ responses and progression of meiosis at fertilization of ascidian oocytes. *Development* 125, 4099-4105

76. Lai FA, Erickson HP, Rousseau E, Lui QY, Meissner G (1988): Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature* 331, 315-319
77. Lawrence Y, Ozil JP, Swann K (1998): The effects of a Ca^{2+} chelator and heavy metal ion chelators upon Ca^{2+} oscillations and activation at fertilization in mouse suggest a role for repetitive Ca^{2+} increases. *Biochem J* 335, 335-342
78. Lawrence Y, Whitaker M, Swann K (1997): Sperm-egg fusion is the prelude to the initial Ca^{2+} increase at fertilization in the mouse. *Development* 124, 233-241
79. Lechleiter JD, John LM, Camacho P (1998): Ca^{2+} wave dispersion and spiral wave entrainment in *Xenopus laevis* oocytes overexpressing Ca^{2+} ATPases. *Biophys Chem* 72, 123-129
80. Lee WK, Kim JK, Seo MS, Cha JH, Lee KJ, Rha HK, Min DS, Jo YH, Lee KH (1999): Molecular cloning and expression analysis of a mouse phospholipase C-delta1. *Biochem Biophys Res Comm* 113, 453-462
81. Le Naour F, Rubinstein E, Jasmin C, Prenant M, Boucheix C (2000): Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* 287, 319-321
82. Lorca T, Cruzalegui FH, Fesquet D, Cavadore JC, Mery J, Means A, Doree M (1993): Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* 366, 270-273
83. Malcuit C, Knott JG, He C, Wainwright T, Parys JB, Robl JM, Fissore RA (2005): Fertilization and IP_3 -induced Ca^{2+} release in type-1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor down-regulated bovine eggs. *Biol Reprod Epub ahead of print*
84. Marangos P, FitzHarris G, Carroll J (2003): Ca^{2+} oscillations at fertilization in mammals are regulated by the formation of pronuclei. *Development* 130, 1461-1472
85. McDougall A, Levasseur M, O'Sullivan AJ, Jones KT (2000): Cell cycle-dependent repetitive Ca^{2+} waves induced by a cytosolic sperm extract in mature ascidian eggs mimic those observed at fertilization. *J Cell Sci* 113, 3453-3462

86. Mehlmann LM, Kline D (1994): Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: Calcium release in response to sperm or inositol trisphosphate is enhanced after meiotic maturation. *Biol Reprod* 51, 1088-1098
87. Mehlmann LM, Mikoshiba K, Kline D (1996): Redistribution and increase in cortical inositol 1,4,5-trisphosphate receptor after meiotic maturation in the mouse egg. *Dev Biol* 180, 489-498
88. Mehlmann LM, Carpenter G, Rhee SG, Jaffe LA (1998): SH2 domain-mediated activation of phospholipase C γ is not required to initiate Ca²⁺ release at fertilization of mouse eggs. *Dev Biol* 203, 221-232
89. Mehlmann LM, Chattopadhyay A, Carpenter G, Jaffe LA (2001): Evidence that phospholipase C from the sperm is not responsible for initiating Ca²⁺ release in mouse eggs at fertilization. *Dev Biol* 236, 492-501
90. Mehlmann LM, Terasaki M, Jaffe LA, Kline D (1995): Reorganization of the endoplasmic reticulum during meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol* 170, 607-615
91. Miller BJ, Georges-Labouesse E, Primakoff P, Myles DG (2000): Normal fertilisation occurs with eggs lacking the integrin $\alpha 6\beta 1$ and is CD9-dependent. *J Cell Biol* 149, 1289-1296
92. Miyado K, Yamada G, Yamada S, Hasuwa H, Nakamura Y, Ryu F, Suzuki K, Kosai K, Inoue K, Ogura A, Okabe M, Mekada E (2000): Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilisation. *Science* 287, 321-324
93. Miyazaki S (1988): Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release and guanine nucleotide-binding protein-mediated periodic calcium rises in golden hamster eggs. *J Cell Biol* 106, 345-353
94. Miyazaki S (1991): Repetitive calcium transients in hamster oocytes. *Cell Calcium* 12, 205-216
95. Miyazaki S and Igusa Y (1981): Fertilization potential in golden hamster eggs consists of recurring hyperpolarization. *Nature* 290, 702-704
96. Miyazaki S, Katayama Y, Swann K (1990): Synergistic activation by serotonin and GTP analogue and inhibition by phorbol ester of cyclic Ca²⁺ rises in hamster eggs. *J Physiol* 426, 209-227

97. Miyazaki SI, Hashimoto N, Yoshimoto Y, Kishimoto T, Igusa Y, Hiramoto Y (1986): Temporal and spatial dynamics of the periodic increase in intracellular free calcium at fertilization of golden hamster eggs. *Dev Biol* 118, 259-267
98. Miyazaki SI, Shirakawa H, Nakada K, Honda Y (1993): Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol* 158, 62-78
99. Miyazaki SI, Yuzaki M, Nakada K, Shirakawa H, Nakanishi S, Nakade S, Mikoshiba K (1992): Block of Ca^{2+} wave and Ca^{2+} oscillation by antibody to the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science* 257, 251-255
100. Moore KL, Kopf GS, Schultz RM (1993): Complete mouse egg activation in the absence of sperm by stimulation of an exogenous G protein-coupled receptor. *Dev Biol* 159, 669-678
101. Moore KL, Ayabe T, Visconti PE, Schultz RM, Kopf GS (1994): Roles of heterotrimeric and monomeric G proteins in sperm-induced activation of mouse eggs. *Development* 120, 3313-3323
102. Moos J, Visconti PE, Moore GD, Schultz RM, Kopf GS (1995): Potential role of mitogen-activated protein kinase in pronuclear envelope assembly and disassembly following fertilization of mouse eggs. *Biol Reprod* 53, 692-699
103. Murray A, Hunt T (1993): *The Cell Cycle*. Oxford University Press, Oxford, UK, 251
104. Nakada K, Mizuno J (1998): Intracellular calcium responses in bovine oocytes induced by spermatozoa and by reagents. *Theriogenology* 50, 269-282
105. Nakada K, Mizuno J, Shiraishi K, Endo K, Miyazaki S (1995): Initiation, persistence, and cessation of the series of intracellular Ca^{2+} responses during fertilization of bovine eggs. *J Reprod Dev* 41, 77-84
106. Nixon VL, McDougall A, Jones KT (2000): Ca^{2+} oscillations and the cell cycle at fertilization of mammalian and ascidian eggs. *Biol Cell* 92, 187-196
107. Nucitelli R (1991): How do sperm activate eggs? *Curr Top Dev Biol* 25, 1-16
108. Oda S, Deguchi R, Mohri T, Shikano T, Nakanishi S, Miyazaki S (1999): Spatiotemporal dynamics of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise induced by microinjection of sperm extract into mouse eggs: preferential induction of a Ca^{2+} wave from the

- cortex mediated by the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Dev Biol* 209, 172-185
109. Okitsu O, Yamano S, Aono T (2001): Activation of bovine oocytes induced by spermatozoa and by reagents. *Theriogenology* 50, 269-282
110. Okitsu O, Yamano S, Aono T (2001): Activation of bovine oocytes matured in vitro by injection of bovine and human spermatozoa or their cytosolic fractions. *Zygote* 9, 89-95
111. Oko R, Aul RB, Wu A, Sutovsky P (2001): The sperm head cytoskeleton. In: Robaire B, Chemes H, Morales CR (Hrsg.): *Andrology in the 21st century*. Medimond Publishing Co., Englewood, NJ, USA, 37-51
112. Ozil JP (1990): The parthenogenetic development of rabbit oocytes after pulsatile stimulation. *Development* 109, 117-127
113. Ozil JP, Swann K (1995): Stimulation of repetitive calcium transients in mouse oocytes. *J Physiol* 483, 331-336
114. Palermo GD, Avrech OM, Colombero LT, Wu H, Wolny Y, Fissore RA, Rosenwaks Z (1997): Human sperm cytosolic factor triggers Ca^{2+} oscillations and overcomes activation failure of mammalian oocytes. *Mol Hum Reprod* 3, 367-374
115. Parrington J, Swann K (1999): Phospholipase C γ and β isozymes are present in boar sperm but are not associated with the ability of sperm extracts to cause Ca^{2+} release in egg. *J Physiol* 518P, 103P
116. Parrington J, Lai FA, Swann K (2000): The soluble mammalian sperm factor protein that triggers Ca^{2+} oscillations in eggs: evidence for expression in mRNA(s) coding for sperm factor(s) in spermatogenic cells. *Biol Cell* 92, 1-9
117. Parrington J, Brind S, De Smedt H, Gangeswaren R, Lai FA, Wojcikiewicz R, Carroll J (1998): Expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in mouse oocytes and early embryos: the type I isoform is upregulated in oocytes and downregulated after fertilization. *Dev Biol* 203, 451-456
118. Parrington J, Jones ML, Tunwell R, Devader C, Katan M, Swann K (2002): Phospholipase C isoforms in mammalian spermatozoa: potential components of the sperm factor that causes Ca^{2+} release in eggs. *Reproduction* 123, 31-39

119. Parrington J, Swann K, Shevchenko VI, Sesay AK, Lai FA (1996): Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* 379, 364-368
120. Parys JB, Bezprozanny I (1995): The inositol trisphosphate receptor of Xenopus oocytes. *Cell Calcium* 18, 353-363
121. Perry AC, Wakayama T, Cooke IM, Yanagimachi R (2000): Mammalian oocyte activation by the synergistic action of discrete sperm head components: induction of calcium transients and involvement of proteolysis. *Dev Biol* 217, 386-393
122. Qiu F, Ray P, Barker PE, Jhanwar S, Ruddle FH, Besmer P (1988): Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family – oncogene activation of v-kit involved deletion of extracellular domain and C-terminus. *EMBO J* 7, 1003-1011
123. Rebecchi MJ, Scarlata S (1998): Pleckstrin homology domains: a common fold with diverse functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27, 503-528
124. Rhee SG (2001): Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* 70, 281-312
125. Ribbes H, Plantavid M, Bennet PJ, Chap H, Douste-Blazy L (1987): Phospholipase C from human sperm specific for phosphoinositides. *Biochim Biophys Acta* 919, 245-54
126. Rice A, Parrington J, Jones KT, Swann K (2000): Mammalian sperm contain a Ca^{2+} -sensitive phospholipase C activity that can generate $InsP_3$ from PIP_2 associated with intracellular organelles. *Dev Biol* 228, 125-135
127. Rogers NT, Hobson E, Pickering S, Lai FA, Braude P, Swann K (2004): Phospholipase $C\zeta$ causes Ca^{2+} oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes. *Reprod* 128, 697-702
128. Rossi P, Dolci S, Sette C, Geremia R (2003): Molecular mechanisms utilized by alternative c-kit gene products in the control of spermatogonial proliferation and sperm-mediated egg activation. *Andrologia* 35, 71-78
129. Rossi P, Marziali G, Albanesi C, Charlesworth A, Geremia R, Sorrentino V (1992): A novel c-kit transcript, potentially encoding a truncated receptor, originates within a kit gene intron in mouse spermatids. *Dev Biol* 152, 203-207

130. Runft LL, Jaffe LA (2000): Sperm extract injection into ascidian eggs signals Ca^{2+} release by the same pathway as fertilization. *Development* 127, 3227-3236
131. Runft LL, Watras J, Jaffe LA (1999): Calcium release at fertilization of *Xenopus* eggs requires type I IP_3 receptors, but not SH2 domain-mediated activation of $\text{PLC}\gamma$ or G_q mediated activation of $\text{PLC}\beta$. *Dev Biol* 214, 399-411
132. Sagata N (1996): Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: its mechanisms and biological significance. *Trend Cell Biol* 6, 22-28
133. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467
134. Sato K, Tokmakov AA, Iwasaki T, Fukami Y (2000): Tyrosine kinase-dependent activation of phospholipase $\text{C}\gamma$ is required for calcium transient in *Xenopus* egg fertilization. *Dev Biol* 224, 453-469
135. Sato K, Aoto M, Mori K, Akasofu S, Tokmakov AA, Shara S, Fukami Y (1996): Purification and characterization of a Src-related p57 protein-tyrosin kinase from *Xenopus* oocytes. Isolation of an active form of the enzyme and its activation and translocation upon fertilization. *J Biol Chem* 271, 13250-13257
136. Sato K, Iwao Y, Fujimura T, Takamaki I, Ogawa K, Iwasaki T, Tokmakov AA, Hatano O, Fukami Y (1999): Evidence for the involvement of a Src-related tyrosine kinase in *Xenopus* egg activation. *Dev Biol* 209, 308-320
137. Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA (2002): $\text{PLC}\zeta$: a sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development. *Development* 129, 3533-3544
138. Schultz RM, Kopf GS (1995): Molecular basis of mammalian egg activation. *Current Topics Dev Biol* 30, 21-62
139. Schuster S, Marhl M, Hofer T (2002): Modelling of simple and complex calcium oscillations. *Eur J Biochem* 269, 1333-1355
140. Sette C, Bevilacqua A, Bianchini A, Mangia F, Geremia R, Rossi P (1997): Parthenogenetic activation of mouse eggs by microinjection of a truncated c-kit tyrosin kinase present in spermatozoa. *Development* 124, 2267-2274

141. Sette C, Bevilacqua A, Geremia R, Rossi P (1998): Involvement of phospholipase C γ 1 in mouse egg activation induced by a truncated form of the c-kit tyrosin kinase present in spermatozoa. *J Cell Biol* 142, 1063-1074
142. Sette C, Paronetto MB, Bevilacqua A, Geremia R, Rossi P (2002): Tr-kit-induced resumption of the cell cycle in mouse eggs requires activation of a Src-like kinase. *EMBO J* 21, 5386-5395
143. Shearer J, DeNadai C, Emily-Fenouil F, Gache C, Whitaker M, Ciapa B (1999): Role of phospholipase C gamma at fertilization and during mitosis in sea urchin eggs and embryos. *Development* 126, 2273-2284
144. Shiraishi K, Okada A, Shirakawa H, Nakanishi S, Mikoshiba K, Miyazaki S (1995): Developmental changes in the distribution of the endoplasmic reticulum and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and the spatial pattern of Ca²⁺ release during maturation of hamster oocytes. *Dev Biol* 170, 594-606
145. Sorrentino V, Volpe P (1993): Ryanodine receptors: How many, where, and why? *Trend Pharmacol Sci* 14, 98-113
146. Stice SL, Robl JM (1990): Activation of mammalian oocytes by a factor obtained from rabbit sperm. *Mol Reprod Dev* 25, 272-280
147. Stith BJ, Goalstone M, Silva S, Jaynes C (1993): Inositol 1,4,5-trisphosphate mass changes from fertilization through first cleavage in *Xenopus laevis*. *Mol Biol Cell* 4, 435-443
148. Stricker SA (1997): Intracellular injections of a soluble sperm factor trigger calcium oscillations and meiotic maturation in unfertilized oocytes of a marine worm. *Dev Biol* 186, 185-201
149. Stricker SA (1999): Comparative biology of calcium signalling during fertilization and egg activation in animals. *Dev Biol* 211, 157-176
150. Sun FZ, Hoyland X, Huang W, Moor RM (1992): A comparison of intracellular changes in porcine eggs after fertilization and electroactivation. *Development* 115, 947-956
151. Sutovsky P, Oko R, Hewitson L, Schatten G (1997): The removal of the sperm perinuclear theca and its association with the bovine oocyte surface during fertilization. *Biol Reprod* 55, 1195-1205

152. Sutovsky P, Wu A, Takahashi D, Benmusa A, Schatten G, Dominko T, Oko R (2001): Oocyte activation by mammalian sperm perinuclear theca proteins PT 32 and tyrosine kinase c-Yes. *Mol Biol Cell* 12 (Suppl.), 114a
153. Swann K (1990): A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development* 110, 1295-1302
154. Swann K (1992): Different triggers for calcium oscillations in mouse eggs involve a ryanodine sensitive calcium store. *Biochem J* 287, 79-84
155. Swann K (1994): Ca^{2+} oscillations and sensitization of Ca^{2+} release in unfertilized mouse oocytes injected with a sperm factor. *Cell Calcium* 15, 331-339
156. Swann K, Lawrence Y (1996): How and why spermatozoa cause calcium oscillations in mammalian oocytes. *Mol Hum Reprod* 2, 388-390
157. Swann K, Ozil JP (1994): Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian oocyte activation. *Int Rev Cytol* 152, 183-222
158. Swann K, Igusa Y, Miyazaki S (1989): Evidence for an inhibitory effect of protein kinase C on the G protein-mediated repetitive calcium transients in hamster eggs. *EMBO J* 8, 3711-3718
159. Tang T, Dong J, Huang X, Sun F (2000): Ca^{2+} oscillations induced by a cytosolic sperm protein factor are mediated by a maternal machinery that functions only once in mammalian eggs. *Development* 127, 1141-1150
160. Tarosz S (1961): Obtaining fertilized and unfertilized ova following spontaneous and induced ovulation in cows. *Zwisch. nuk. Wylsz Szisz Szkal raln Krkawie, Zootech Z* 2, 105
161. Taylor CT, Lawrence YM, Kingsland CR, Biljan MM, Cuthbertson KSR (1993): Oscillations in intracellular free calcium induced by spermatozoa in human oocytes at fertilization. *Hum Reprod* 8, 2174-2179
162. Tesarik J, Sousa M (1996): Mechanism of calcium oscillations in human oocytes: a two-store model. *Mol Hum Reprod* 2, 383-386
163. Tombes RM, Simerly C, Borisy GG, Schatten G (1992): Meiosis, egg activation, and nuclear envelope breakdown are differentially reliant on Ca^{2+} , whereas germinal vesicle breakdown is Ca^{2+} independent in the mouse oocyte. *J Cell Biol* 117, 799-811

164. Tomes CN, McMaster CR, Saling PM (1996): Activation of mouse sperm phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-phospholipase C by zona pellucida is modulated by tyrosine phosphorylation. *Mol Reprod Dev* 43, 196-204
165. Tosti E, Boni R, Cuomo A (2002) : Fertilization and activation currents in bovine oocytes. *Reprod* 124, 835-846
166. Vanderplaessche M, Paredis F (1948) : Preservation of the fertilizing capacity of bull semen in the genital tract of the cow. *Nature* 162, 813
167. Verlhac MH, de Pennart H, Maro B, Cobb MH, Clarke HJ (1993): MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 158, 330-340
168. Walensky LD, Snyder SH (1995): Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J Cell Biol* 130, 857-869
169. Ware CB, Barnes FL, Maiki-Laurila, First NL (1989): Age dependence of bovine oocyte activation. *Gam Res* 22, 265-275
170. Whitaker M, Patel R (1990): Calcium and cell cycle control. *Development* 108, 525-541
171. Whitaker MJ, Steinhardt RA (1982): Ionic regulation of egg activation
172. Whitaker M, Swann K (1993): Lighting the fuse at fertilization. *Development* 117, 1-12
173. Whittingham DG (1980): Parthenogenesis in mammals. *Oxford Rev Reprod Biol* 2, 205-231
174. Williams CJ, Schultz GS, Kopf RM (1992): Role of G proteins in mouse egg activation: stimulatory effects of acetylcholine on the ZP2 to ZP2_f conversion and pronuclear formation in eggs expressing a functional m1 muscarinic receptor. *Dev Biol* 151, 288-296
175. Williams CJ, Mehlmann LM, Jaffe LA, Kopf GS, Schultz RM (1998): Evidence that G_q family G proteins do not function in mouse egg activation at fertilization. *Dev Biol* 198, 116-127
176. Wolny YM, Fissore RA, Wu H, Reis MM, Colombero LT, Ergün B, Rosenwaks Z, Palermo GD (1999): Human glucosamine-6-phosphate

- isomerase, a homologue of hamster oscillin, does not appear to be involved in Ca^{2+} release in mammalian oocytes. *Mol Reprod Dev* 52, 277-287
177. Wolosker H, Kline D, Bian Y (1998): Molecularly cloned mammalian glucosamine-6-phosphate desaminase localizes to transporting epithelium and lacks oscillin activity. *FASEB J* 12, 91-99
178. Wu H, He CL, Fissore RA (1997): Injection of a porcine sperm factor triggers calcium oscillations in mouse oocytes and bovine eggs. *Mol Reprod Dev* 46, 176-189
179. Wu H, He CL, Fissore RA (1998a): Injection of a porcine sperm factor induces activation in mouse eggs. *Mol Reprod Dev* 49, 37-47
180. Wu H, He CL, Jehn B, Black SJ, Fissore RA (1998b): Partial characterization of the calcium-releasing activity of porcine sperm cytosolic extracts. *Dev Biol* 203, 369-381
181. Wu H, Smyth J, Luzzi V, Fukami K, Takenawa T, Black SL, Allbritton NL, Fissore RA (2001): Sperm factor induces intracellular free calcium oscillations by stimulating the phosphoinositide pathway. *Biol Reprod* 64, 1338-1349
182. Xu Z, Kopf GS, Schultz RM (1994): Involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca^{2+} release in early and late events of mouse egg activation. *Development* 120, 1851-1859
183. Yanagimachi R (1994): Mammalian fertilization. In: Knobil E and Neill JD (Hrsg.): *The physiology of reproduction*. Raven Press Ltd., New York, 189-317
184. Yim DL, Opresko LK, Wiley HS, Nuccitelli R (1994): Highly polarized EGF receptor tyrosine kinase activity initiates egg activation in *Xenopus*. *Dev Biol* 162, 41-44
185. Yoda A, Oda S, Shikano T, Kouchi Z, Awaji T, Shirakawa H, Kinoshita K, Miyazaki S (2004): Ca^{2+} oscillation-inducing phospholipase C zeta expressed in mouse eggs is accumulated to the pronucleus during egg activation. *Dev Biol* 268, 245-257
186. Yue C, White KL, Reed WA, Bunch TD (1995): The existence of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and ryanodine receptors in mature bovine oocytes. *Development* 121, 2645-2654

-
187. Yue C, White KL, Reed WA, King E (1998): Localization and regulation of ryanodine receptor in bovine oocytes. *Biol Reprod* 58, 608-614

Spender-Tier				
Tag	Datum	Manipulation	Progr.-Tag	Uhrzeit
Fr	11.03.05	PG abends		
Sa	12.03.05			
So	13.03.05	GnRH		
Mo	14.03.05	Brunstbeob.	d0	
Di	15.03.05	Brunstbeob.	d1	
Mi	16.03.05		d2	
Do	17.03.05		d3	
Fr	18.03.05		d4	
Sa	19.03.05		d5	
So	20.03.05		d6	
Mo	21.03.05		d7	
Di	22.03.05		d8	
Mi	23.03.05		d9	
Do	24.03.05	PG	d10	morgens
Fr	25.03.05			
Sa	26.03.05	GnRH		morgens
So	27.03.05	Brunstbeob.	d0	
Mo	28.03.05	Brunstbeob.	d1	
Di	29.03.05		d2	
Mi	30.03.05		d3	
Do	31.03.05		d4	
Fr	01.04.05		d5	
Sa	02.04.05		d6	
So	03.04.05		d7	
Mo	04.04.05		d8	
Di	05.04.05		d9	
Mi	06.04.05	DP	d10	08:00
Do	07.04.05	1. FSH	d11	20:00
Fr	08.04.05	2. FSH	d12	08:00

		3. FSH		20:00
Sa	09.04.05	4. FSH 5. FSH	d13	08:00 20:00
So	10.04.05	6. FSH + PG 7. FSH + PG	d14	08:00 20:00
Mo	11.04.05	8. FSH GnRH	d-2	08:00 22:00
Di	12.04.05	OPU	d-1	12:00

Abbildung 24: (mit Vorseite) Superovulationsprotokoll zur Gewinnung in vivo-gereifter Rindereizellen (COCs)

PG = Prostaglandin, DP = Punktion des dominanten Follikels, GnRH = Gonadotropin Releasing Hormon, FSH = Follikel-stimulierendes Hormon

I

OPU- Bericht Gruppe: OPUI Datum: 12.04.05

Tier-Nr.: 1 DE-Nr.: 56 100 Uhrzeit: 12:18 - 12:42 (re)
12:44 - 12:47 (li)

Stimulationsprogramm: FSH III

Endoskopisch: Ultraschall:

Punktionsseite: links: rechts: beide:

Anzahl CL: links: - rechts: -

Anzahl Follikel: links: ca. 15 rechts: 17 ca. 22

Punktierte Follikel: links: 3 rechts: 17

Tiermedikation: Procapsol 3ml ; Uterusveloxan 5ml

Bemerkungen: Aufnahme ohne Ohrmarken; Tier sehr gut reagiert
aber sehr ärrig; ohne Spermiu; Tier ~~sch~~ soll besamt werden
↳ daher Punktion abgebrochen

Ergebnisse:

Anzahl:	Stadium:	Qualität:
<u>10</u>	<u>matuierte</u>	- + ++ <u>+++</u>
<u>14</u>	<u>matuierte</u>	<u>(-)</u> + ++ +++
		- + ++ +++
		- + ++ +++
		- + ++ +++
	<u>(24)</u>	- + ++ +++
		- + ++ +++
		- + ++ +++

Weiterführende Verwendung / Verbleib: Heike injiziert!

IVF: IVF-Nr.: _____ Genexpression:
 Sonstige: _____

Abbildung 25: Spülprotokoll der Gewinnung in vivo-gereifter Rindereizellen (Spendertier Stallnr.1)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Schellander für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit. Herrn PD Dr. M. Montag danke ich insbesondere für die vielfältige Unterstützung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die kontinuierliche Begleitung der Versuche. Ich möchte mich bedanken für die unermessliche Geduld, das Vertrauen und die stete Hilfsbereitschaft, die mir entgegengebracht wurden.

Ich danke Frau Dr. Siritwadee Chomdej und ihren Kollegen für die unermüdliche Durchführung der molekulargenetischen Arbeiten, ohne die mir nicht die cRNA zur Verfügung gestanden hätte. Darüber hinaus gilt mein Dank den Kollegen im biotechnologischen Labor des Versuchsgutes Frankenforst Franca Rings, Markus Gilles und Eva Schmölder. Ich bedanke mich für die große Unterstützung und die guten Tipps, wenn es mal hakte. Auch die unzähligen, interessanten Diskussionen zu allen uns beschäftigenden Thematiken waren stets eine Bereicherung für mich. Herrn Prof. Dr. Urban Besenfelder und Herrn Dr. Vita Havlicek danke ich für die Unterstützung bei der Gewinnung der in vivo-gereiften Rindereizellen. Daneben danke ich natürlich Herrn Konrad Fischer und Herrn Martin Meier für die Betreuung der Versuchstiere und Herrn Dr. Griese für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche am Tier. Ich danke Maria Köster, die immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir Mut zusprach, wenn es nötig war. Bei Sandra König bedanke ich mich für das intensive Korrekturlesen und das Einweihen in die molekulargenetischen Zusammenhänge.

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich besonders für alles, was sie für mich getan haben. Ohne ihre Unterstützung und den Glauben an mich wäre ich nie soweit gekommen. Mein größter Dank gilt allerdings Rainer, der immer für mich da war, der mit unendlicher Geduld und Liebe diese Zeit mit mir durchlebt hat und immer an mich geglaubt hat.

Doch zum Schluss möchte ich mich bei meinem himmlischen Vater bedanken, der in jeder noch so verzweifelten Situation an meiner Seite war, und ohne den rein gar nichts gelungen wäre!