



Heike Müller (Autor)
**Funktionelle Analyse von PLC ζ mit Bezug zur
Aktivierung boviner Eizellen**



universität**bonn**

Arbeiten aus dem
Institut für Tierwissenschaften
Abt. Tierzucht und Tierhaltung
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

Heike Müller

**Funktionelle Analyse von PLC ζ
mit Bezug zur Aktivierung boviner Eizellen**

Heft: 132

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2209>

Copyright:
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

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