



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



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>

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).

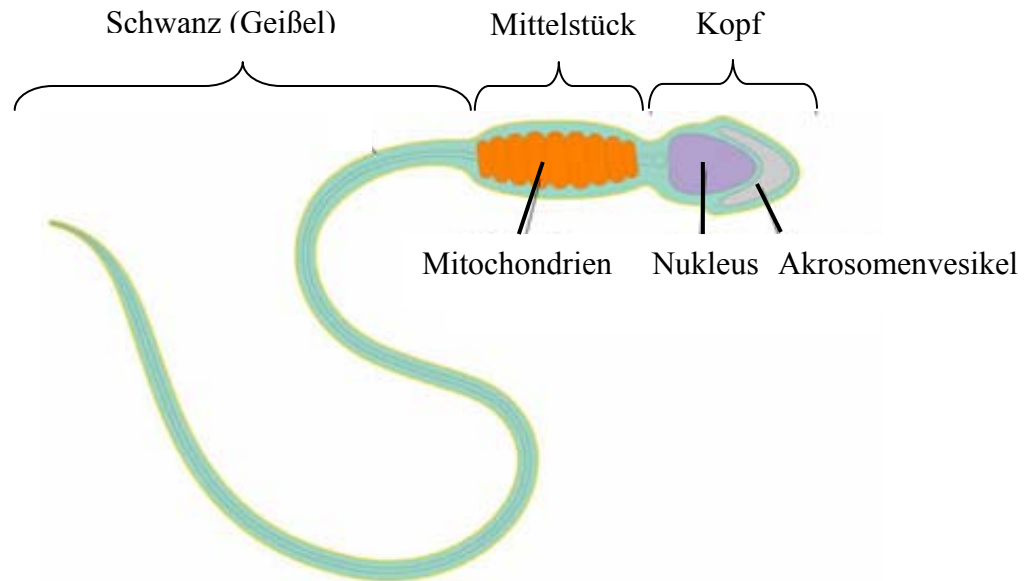


Abbildung 1: Typische Struktur eines tierischen Spermiums

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 Spermio-genese 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.

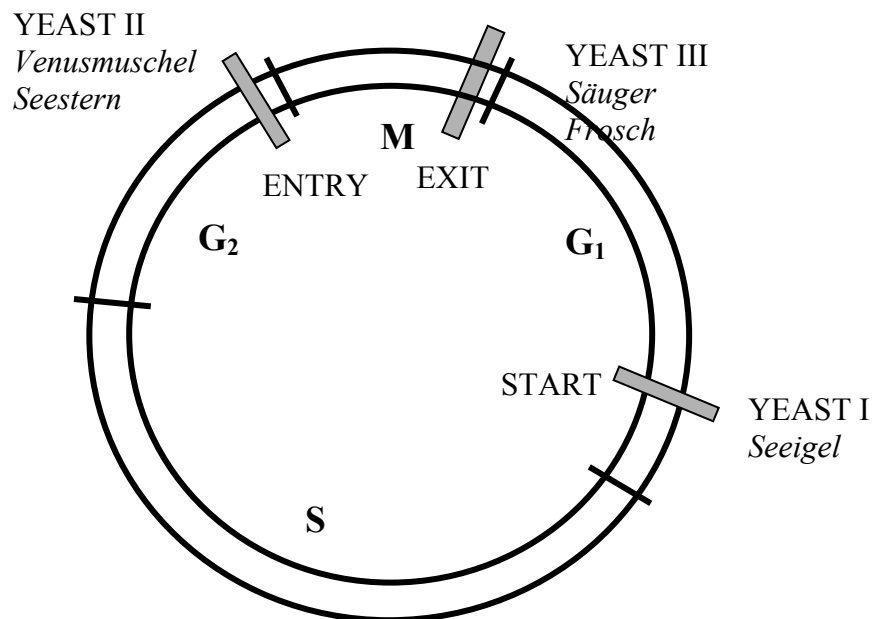


Abbildung 2: Kontrollpunkte des Zellzyklus in Hefezellen und Zellzyklus-Stops bei Eizellen unterschiedlicher Spezies (nach Whitaker and Patel 1990)