

Aus dem „Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen“
Betreuer: Prof. Dr. Dr. h. c. R. Leiser

und

„Zentrum für Dermatologie und Andrologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen“
Betreuerin: Prof. Dr. E. Hinsch

Untersuchung

zur funktionellen Bedeutung von VDAC in weiblichen Gameten des Rindes und des Marmoset-Affen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Dorothee Uhl
Tierärztin aus Stuttgart

Gießen 2008

1	EINLEITUNG	9
1.1	VDAC (Voltage-dependent anion channel)	9
1.1.1	Vorkommen von VDAC in Eukaryonten	9
1.1.2	VDAC in Oozyten	12
1.1.3	Funktionelle Bedeutung von VDAC	13
1.1.3.1	Transport von Ionen und Metaboliten	13
1.1.3.2	Apoptose	13
1.1.3.3	Interaktion von VDAC mit Proteinkomplexen	14
1.1.3.4	Interaktion von VDAC mit dem Zytoskelett	14
1.1.3.5	Die Bedeutung von VDAC bei der Volumenregulation	14
1.2	Die Oozyte	16
1.2.1	Morphologie der Oozyten	16
1.2.2	Oogenese und Follikulogenese	17
1.2.3	Volumenregulation weiblicher Gameten	19
1.3	Das Tiermodell	20
1.4	Zielsetzung der Arbeit	21
2	MATERIALIEN UND METHODEN	22
2.1	Materialien	22
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	22
2.1.2	Medien und Pufferlösungen	26
2.1.3	Verwendete Kits	28
2.1.4	Geräte	29
2.1.5	Untersuchungsmaterial	31
2.2	Methoden	32
2.2.1	Gewinnung von Rinder-Oozyten	32
2.2.2	Gewinnung von Marmoset-Oozyten	33
2.2.3	Nachweis der VDAC-Genexpression in bovinen und Marmoset-Oozyten	33
2.2.3.1	Isolierung von gesamt-RNA aus bovinen und Marmoset-Oozyten	33
2.2.3.2	DNA-Isolierung aus bovinem und Marmoset-Ovargewebe	34
2.2.3.3	Reverse Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion)	34
2.2.3.4	Oligonukleotid-Primer	34
2.2.3.5	Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR)	34

2.2.3.6	Gelelektrophorese der PCR-Produkte	35
2.2.3.7	Sequenzierung der PCR-Produkte	36
2.2.4	Immunhistochemischer Nachweis von VDAC-Subtypen im bovinen und Marmoset-Ovar	38
2.2.4.1	Verwendete anti-VDAC-Antikörper	38
2.2.4.2	Herstellung von Paraffinschnitten aus Rinder- und Marmoset-Ovarien	38
2.2.4.3	Immunhistochemischer Nachweis von VDAC-Subtypen in Ovarschnitten	39
2.2.5	Immunzytochemischer Nachweis von VDAC-Subtypen in bovinen Oozyten	40
2.2.5.1	Indirekte Immunfluoreszenz mit lichtmikroskopischer Auswertung	40
2.2.5.2	Indirekte Immunfluoreszenz mit konfokalmikroskopischer Auswertung	41
2.2.6	Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen	42
2.2.6.1	Herstellung der Schnittpräparate für die Immunelektronenmikroskopie	43
2.2.6.2	Immunogoldreaktion auf Ultradünnschnitten	44
2.2.7	Funktionelle Untersuchungen zum Regulatory Volume Decrease boviner Oozyten	45
2.2.7.1	Inaktivierung des Komplementsystems in anti-VDAC-Antiseren und Präimmunseren	46
2.2.7.2	Inkubation der Oozyten mit anti-VDAC-Antikörpern	46
2.2.7.3	Injection der anti-VDAC-Antikörper in die Oozyten	46
2.2.7.4	Hypotone Stimulation der Oozyten	47
2.2.7.5	Fotografische Dokumentation der Größenveränderung der Oozyten	47
2.2.7.6	Statistische Auswertung der Ergebnisse zum RVD	47
3	ERGEBNISSE	48
3.1	Nachweis der Expression VDAC-kodierender Gene	48
3.1.1	VDAC-RNA-Expression in bovinen Oozyten	48
3.1.2	VDAC-RNA-Expression in Marmoset-Oozyten	49
3.1.3	Sequenzierung der PCR-Fragmente	50
3.2	Immunhistochemische Identifizierung der VDAC-Proteine im Ovar	51
3.2.1	Nachweis von VDAC-Protein im bovinen Ovar	52
3.2.2	Nachweis von VDAC-Protein im Marmoset-Ovar	54
3.3	Subzelluläre Lokalisation der VDAC-Proteine in bovinen Oozyten	58
3.3.1	Immunzytochemische Identifizierung von VDAC-Proteinen in bovinen Oozyten	58
3.3.1.1	Lichtmikroskopischer Nachweis von VDAC mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz	58

3.3.1.2	Nachweis von VDAC mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie	60
3.3.2	Immunelektronenmikroskopische Identifizierung der VDAC1- und VDAC3-Proteine in bovinen Kumulus-Oozyten-Komplexen	63
3.4	Untersuchungen zur funktionelle Bedeutung von VDAC bei der Volumenregulation boviner Oozyten	63
3.4.1	Einfluss von anti-VDAC1-Antikörpern auf das RVD boviner Oozyten	65
3.4.1.1	Einfluss nach Antikörperinkubation	65
3.4.1.2	Einfluss nach Antikörperinjektion	66
3.4.2	Einfluss von anti-VDAC2-Antikörpern auf das RVD boviner Oozyten	68
3.4.2.1	Einfluss nach Antikörperinkubation	68
3.4.2.2	Einfluss nach Antikörperinjektion	69
3.4.3	Einfluss von anti-VDAC3-Antikörpern auf das RVD boviner Oozyten	71
3.4.3.1	Einfluss nach Antikörperinkubation	71
3.4.3.2	Einfluss nach Antikörperinjektion	72
4	DISKUSSION	75
4.1	Nachweis der Expression VDAC-kodierender Gene	75
4.2	Anti-VDAC-Antikörper	76
4.3	Immunhistochemische Identifizierung der VDAC-Proteine im Ovar	77
4.4	Subzelluläre Lokalisation der VDAC-Proteine in bovinen Oozyten	81
4.5	Funktionelle Relevanz von VDAC-Antikörpern bezüglich des Regulatory Volume Decrease boviner Oozyten	86
5	ZUSAMMENFASSUNG	92
6	SUMMARY	94
7	LITERATURVERZEICHNIS	96
8	ANHANG	107
8.1	Danksagung	107