

**Einfluss des mTor-Inhibitors der neuen Generation Torin2 auf die
Reifung boviner Oozyten**

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

Sophia Ostermeier

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und
Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz,

Professur für Molekulare Reproduktionsmedizin, der

Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. C. Wrenzycki

und

dem Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie des Leibniz-Instituts für

Nutztierbiologie, Dummerstorf

Betreuer: Dr. W. Tomek

Einfluss des mTor-Inhibitors der neuen Generation Torin2 auf die Reifung boviner Oozyten

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades einer

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Sophia Ostermeier

Tierärztin aus Regensburg

Gießen 2022

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Stefan Arnhold

Gutachter: Prof. Dr. C. Wrenzycki
PD Dr. rer. nat. habil. J. Vanselow

Tag der Disputation: 25. April 2023

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	7
Eigene Publikation	7
Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung.....	12
2. Literaturübersicht	15
2.1. Oogenese und Follikulogenese.....	15
2.2. Meiotische Maturation.....	16
2.3. Translation	18
2.3.1 Translationsinitiation	20
2.3.2 Translationsfaktoren	22
2.3.2.1 5´-Faktoren	22
2.3.2.1.1 eIF4E	24
2.3.2.1.2 4E-BP1	27
2.3.2.2 3´-Faktoren	32
2.3.3 Translationssignalkaskaden	33
2.3.3.1 Beteiligte Kinasen	33
2.3.3.2 mTor.....	35
2.4. Inhibitoren	40
2.4.1 Rapamycin	40
2.4.2 Torin2.....	41
3. Zielstellung.....	43
4. Material und Methoden	45

4.1 In-vitro-Maturation boviner Oozyten.....	45
4.1.1 Oozytengewinnung und Vorbereitung	45
4.1.2 Selektion und Klassifizierung.....	46
4.1.3 Maturation.....	48
4.2 Versuchsanordnung und -ablauf	48
4.3 Morphologische Beurteilung der Oozyten	50
4.3.1 Vorgehen nach der Maturation	50
4.3.2 Fixierung	51
4.3.3 Färbung.....	53
4.3.4 Untersuchung der Chromatinkonfiguration	53
4.4 Biochemische Untersuchung der Oozyten	55
4.4.1 Elektrophorese und Western blot	55
4.4.1.1 Vorbereitung der Zellen	55
4.4.1.2 SDS- und Phos-tag-PAGE.....	56
4.4.1.3 Western blot-Analyse	58
4.4.1.4 Antikörper im Western blot.....	59
4.4.2 Immunpräzipitations-Analysen von eIF4E.....	61
4.4.3 Untersuchung spezifischer Substratphosphorylierungen bestimmter Kinasen	61
4.5 Statistische Auswertung	64
5. Ergebnisse.....	66
5.1 Vorversuche.....	66
5.1.1 Pilotversuche vor Verwendung von Torin2 hinsichtlich der Morphologie	66
5.1.1.1 Untersuchung von GV , M I und M II Oozyten nach ihrer Chromatinkonfiguration	66
5.1.1.2 Der Lösungsvermittler DMSO.....	68

5.1.2 Pilotversuche vor Verwendung von Torin2 hinsichtlich biochemischer Parameter	69
5.1.2.1 Untersuchung von GV- und M II- Oozyten bezüglich der TL-Initiationsfaktoren und Kinasen	69
5.1.2.2 Expression der Repressoren 4E-BP1, 4E-BP2 und 4E-BP3 in GV-Oozyten.....	71
5.1.2.3 Phosphorylierungsstatus von 4E-BP1 im Verlauf der IVM	72
5.2 Inhibitorversuche	74
5.2.1 Morphologische Untersuchungen von Torin2 behandelten Oozyten	74
5.2.1.1 Ermittlung der wirksamen Inhibitorkonzentration	74
5.2.1.2 Beurteilung der Kumulusexpansion	81
5.2.1.3 Auswirkungen auf die Chromatinkonfiguration von Torin2 behandelten EZ ...	82
5.2.2 Biochemische Untersuchungen von Torin2 behandelten Oozyten	86
5.2.2.1 Auswirkung der Torin2-Behandlung auf die Phosphorylierung von 4E-BP1	86
5.2.2.1.1 SDS-PAGE Western blot-Analyse	86
5.2.2.1.2 Phos-tag-PAGE Western blot-Analyse	88
5.2.2.1.3 Auswertung der Wirkung von Torin 2 auf die Thr37/46-Phosphorylierung	91
5.2.2.2 Auswirkung der Torin2-Behandlung auf Expression und Phosphorylierung von mTor, Raptor und Rictor	93
5.2.2.3 Auswirkung der Torin2-Behandlung auf translationsrelevante Kinasesysteme	96
5.2.2.4 Auswirkung der Torin2-Behandlung auf die eIF4E/4E-BP1-Bindung	98
6. Diskussion.....	100
7. Zusammenfassung.....	118
8. Summary.....	120
9. Literaturverzeichnis	121

10. Anhang.....	142
11. Danksagung	153
12. Selbstständigkeitserklärung.....	155

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Stark schematisierter Aufbau der mRNA.....	21
Abb. 2: Schematisiertes Modell der „closed-loop“-Formation mit den wichtigsten Faktoren	23
Abb. 3: Schematisierte Darstellung sämtlicher Einflüsse auf die eIF4E-Aktivität	27
Abb. 4: Schematischer Aufbau des 4E-BP1 mit seinen regulatorischen Motiven und Phosphorylierungen	30
Abb. 5: Vereinfachte Darstellung des mTor-Signalweges	38
Abb. 6: Strukturformel von Rapamycin	41
Abb. 7: Strukturformel von Torin2	42
Abb. 8: Eizellen von Rindern der Klassen 1 und 2	47
Abb. 9: Bildliche Darstellung des Fixiervorgangs der Oozyten	52
Abb. 10: Schema des gesamten Versuchsplans	65
Abb. 11: Oozyten ohne Behandlung nach verschiedenen In-vitro-Maturationszeiten.....	67
Abb. 12: Vergleich der Oozyten nach 24 h IVM mit und ohne DMSO-Zusatz.....	68
Abb. 13: Analyse von Oozyten hinsichtlich des Vorkommens verschiedener Proteine und Kinasen und deren Phosphorylierungsstatus mittels Western blot zu zwei Reifungszeitpunkten	70
Abb. 14: Western blot-Analyse mittels Dekaprobe der 4E-Bindungsproteine 1, 2 und 3 von EZ im GV-Stadium.....	72
Abb. 15: Western blot-Analyse mittels Dekaprobe des 4E-BP1	73
Abb. 16: Vergleich der Anwendung verschiedener Torin2-Konzentrationen (10 nM, 100 nM, 200 nM) an Oozyten nach 24 h IVM.....	75
Abb. 17: Anwendung einer Torin2-Konzentration von 1 mikroM an Oozyten nach 24 h IVM.	76
Abb. 18: Anwendung einer Torin2-Konzentration von 2 mikroM an Oozyten nach 24 h IVM.	77
Abb. 19: Anwendung einer Torin2-Konzentration von 3 mikroM an Oozyten nach 24 h IVM.	78
Abb. 20: Anwendung einer Torin2-Konzentration von 5 mikroM an Oozyten nach 24 h IVM.	79
Abb. 21: Vergleich der Anzahl degenerierter EZ bei unterschiedlichen Torin2-Konzentrationen nach 24 h IVM.....	80

Abb. 22: Fotografien der Kumulusexpansion	81
Abb. 23: Anwendung einer Torin2-Konzentration von 3 mikroM an Oozyten nach 24 h IVM. 83	
Abb. 24: Bovine Oozyte im M I-Arrest nach 24 h IVM mit 3 mikroM Torin2 im Medium.....	84
Abb. 25: Oozyten für 48 h IVM [24h mit 3µM Torin2 (24 h IVM + Torin2) und anschließend 24 h weitergereift nur mit DMSO ohne Inhibitorzusatz (24 h IVM – Torin2)].....	85
Abb. 26: Herkömmliche SDS-PAGE Western blot_Analyse mittels Dekaprobe von eIF4E, pEIF4E Ser209, 4E-BP1 und p4E-BP1 T37/46	87
Abb. 27: Western blot-Analyse von p eIF4E an Ser209 und 4E-BP1	89
Abb. 28: Western blot-Analyse des kompletten Proteins 4E-BP1 (pan) und eine seiner Phosphorylierungsstellen (Thr37/46).....	90
Abb. 29: Darstellung der Wirkung des Inhibitors Torin2 auf die Phosphorylierung von 4E-BP1 an Thr37/46 in Relation zur Ladungskontrolle ATCB	91
Abb. 30: Vergleich der Phosphorylierung von 4E-BP1 an Thr37/46 zwischen unbehandelten Oozyten im M I-Stadium (10) und 24 h Torin2-behandelten (24 Torin) mittels Western blot. 92	
Abb. 31: Analyse von mTor und seiner Phosphorylierung an Ser2448	93
Abb. 32: Analyse von Raptor und seiner Phosphorylierung an Ser792	94
Abb. 33: Analyse von Rictor und seiner Phosphorylierung an Thr1135	95
Abb. 34: Analyse der Substratphosphorylierung der Ser/Thr-Kinasen PKA, PKB, PKC, CDKs, ATM/ATR, MAPK/CDK (Substrate-P) und der Expression und Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 (MAPK) mittels Western blot	97
Abb. 35: Immunpräzitationsanalyse mit immobilisiertem anti-eIF4E-AK.....	99

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Klassifizierungsschema boviner Oozyten.....	46
Tab. 2: Auflistung der Inhibitor- und Kontrollgruppen	50
Tab. 3: Übersicht über die verschiedenen Meiosestadien boviner Oozyten	54/55
Tab. 4: Auflistung der im Western blot verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen .	60
Tab. 5: Übersicht der spezifischen Antikörper.....	63

Eigene Publikation

MAYER S. (ehemaliger Ehename von OSTERMEIER S.), WRENZYCKI C., TOMEK W. (2014):

Inactivation of mTor arrests bovine oocytes in the metaphase-I Stage, despite reversible inhibition of 4E-BP1 phosphorylation

Mol. Reprod. Dev. 81(4): 363-375.

Daten, welche in dieser Promotionsschrift dargestellt werden, wurden dort bereits publiziert.

Abkürzungsverzeichnis

4E-BP1	eukaryotische Translations Initiationsfaktor 4E-Bindungsprotein 1
4E-BPs	eukaryotische Translations Initiationsfaktor 4E-Bindungsproteine
4EGI-1	eIF4E/eIF4G interaction Inhibitor
4E-T	eIF4E-Transporterprotein
ACTB	β-Aktin
AK	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
AMPK	Adenosinmonophosphat-activated Kinase
Ana I	Anaphase I
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
asTORi	active-site mTor-Inhibitor
ATM/ATR	Ataxia Telangiectasia Mutated -/Ataxia Telangiectasia and Rad3-related Kinase
ATP	Adenosintriphosphat
BCB	Brilliant Cresyl Blue
Bcl-xl	B-cell lymphoma-extra large
BL 1	Butyrolacton 1
BP	Bindungsprotein
BSA	Bovines Serumalbumin
BVN	Besamungsverein Neustadt an der Aisch
cdc2	p34 ^{cdc2} Kinase = cell division control kinase
cdk 1	cyclin dependent kinase 1
CDKs	Cyclin Dependent Kinases
Cl ₂	Chlorgas
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPE	Cytoplasmic Polyadenylation Element
CPEB	Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein
CPSF	Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor

deg.	degeneriert
Deptor	DEP-domain-containing mTor-interacting protein
Diss.	Dissertation
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIFs	eukaryotische Translations Initiationsfaktoren
ERK	Extracellular Regulated Kinase
EZ	Eizellen
FKBP12	FK506-Bindungsprotein 12
FRB	FKBP12-Rapamycin-Bindung
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GβL	G protein beta subunitlike
GTP	Guanosintriphosphat
GV	Germinalvesikel
GVBD	Germinalvesikel breakdown
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
IRES	Internal Ribosome Entry Site
IVC	In-vitro-culture
IVF	In-vitro-Fertilisation
IVM	In-vitro-Maturation
IVP	In-vitro-Produktion
kDa	Kilodalton
KOK	Kumulus-Oozyten-Komplex
KTR	Kontrolle
M I	Metaphase I
M II	Metaphase II

m7GpppN	7-Methylguanosin-Cap
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MEK	MAP Kinase Kinase
Met-tRNAi	Methionyl initiator transfer RNA
MLP	Maskin Like Protein
mLST8	mammalian lethal with Sec13 protein8
Mn ²⁺	Mangan (II)
Mnk	MAPK-interacting Kinase
MPF	Maturation/M-Phase Promoting Faktor
mRNA	messenger RNA
mSin1	mammalian Stress-activated protein kinase interacting protein 1
MTOCs	Microtubule Organizing Centers
mTor	mammalian/mechanistic Target of rapamycin
mTorC	mTor Complex
MW	Molekulargewicht
nCBC	nuclear Cap Binding Complex
OPU	Ovum Pic Up
p	phosphoryliert
PABP	Poly-A-Bindungsprotein
Paip	Poly-A-Bindungsprotein interacting protein
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDK1	Phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PHAS 1	Phosphorylated Heat- and Acid-Stable protein regulated by insulin I
Phos-tag	Phosphat-bindendes Tag-Molekül
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIKK	Phosphatidylinositol 3-Kinase-related Kinase
PK	Polkörperchen
PKA,-B,-C,-Cα	Proteinkinase A, -B, -C, -Cα
Poly(A)	Poly-Adenosin

PRAS 40	Proline-Rich Akt Substrate of 40 kDa
Protor	Protein observed with rictor
PRR5	Proline-Rich protein 5
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
Raptor	regulatory associated protein of mTor
RAIP	Rapid apoptosis inducing protein
Rictor	rapamycin-insensitive companion of mTor
RNA	Ribonukleinsäure
RPS6	ribosomales Protein S6
S6K1	ribosomal protein S6 Kinase 1
SDS	Sodium Dodecylsulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
Ser	Serin
SGK1	Serum/Glucocorticoid regulierte Kinase 1
TBS	Tris Buffer Saline
TCM	Tissue Culture Medium
Telo I	Telophase I
TEMED	NNN'N'-Tetramethylethylenediamine
Thr	Threonin
TL	Translation
TOP	Terminal Oligopyrimidin
TOS	mTor signaling
TTBS	Tween-Tris-Buffered saline
Tween 20	Polyoxyethylenesorbitanmonolaurate
UE	Untereinheit
UTR	Untranslated Region
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZK	Zellkern

1. Einleitung

Um in der heutigen Zeit einen landwirtschaftlichen Betrieb mit Viehhaltung aufrechterhalten zu können, ist es essentiell, ein leistungsorientiertes und modernes Unternehmen zu führen. Besonders in der Milchviehhaltung besteht ein ständiges Streben nach leistungsstarken Kühen und vielversprechenden Nachzuchten, um den hohen Anforderungen der Milchproduktion gerecht werden zu können.

Ein großes Problem hierbei jedoch stellt für viele Betriebe unter anderem (u.a.) die unzureichende Fertilität dar. Viele Faktoren, wie zum Beispiel (z.B.) Fütterung, Haltung, Gesundheit oder Management wirken sich auf die Fruchtbarkeit einer Kuh aus und die ständige Optimierung dieser Bereiche ist sehr wichtig. Auch im Hinblick auf die Etablierung und Aufrechterhaltung einer Trächtigkeit wird ständig Forschung betrieben, um bessere Ergebnisse in den Trächtigkeitsraten zu erzielen.

Neben der instrumentellen Besamung tragen seit Langem weitere Reproduktionstechniken, wie die Embryonengewinnung nach Superovulation und die In-vitro-Produktion (IVP) von Embryonen dazu bei, möglichst viele, genetisch wertvolle Nachkommen zu erhalten.

Beim klassischen Embryotransferprogramm wird die Kuh mittels Hormongaben zur Superovulation stimuliert, dann besamt und die in vivo produzierten Embryonen mit Hilfe eines speziellen Verfahrens aus dem Uterus gespült und entweder direkt in sogenannte (sog.) Trägartiere übertragen oder kryokonserviert (HOFMANN 2005). Die Empfängertiere tragen dann das Kalb aus. Die Trächtigkeitsrate nach Embryotransfer beträgt heute in etwa 55-65% (MÜLLER 2011).

Bei der IVP von Embryonen werden Oozyten entweder mittels ultraschallgesteuerter Follikelpunktion (OPU; PIETERSE et al. 1988) der lebenden Spenderkuh entnommen oder aus den Ovarien frisch geschlachteter Kühe. Diese werden dann in vitro gereift (In-vitro-Maturation, IVM), in vitro befruchtet (In-vitro-Fertilisation, IVF), in vitro kultiviert (In-vitro-Culture, IVC) und die entstandenen Embryonen dann ebenfalls in Trägartiere übertragen oder kryokonserviert.

Die IVP von Rinderembryonen befindet sich seit der Geburt des ersten in vitro produzierten Kalbes zu Beginn des Jahres 1981 (BRACKETT et al. 1982) im Fokus hoher wissenschaftlicher Aufmerksamkeit. Obwohl sich die Technologien der IVP von Embryonen seitdem ständig weiterentwickelt haben, die Verfahren heute auf einem sehr hohen Stand sind und mittlerweile Befruchtungsraten von 70-90% mittels IVF vorliegen (LABRECQUE und SIRARD 2014; WRENZYCKI et al. 2007), erreichen dennoch nur 25-40% der Eizellen das Entwicklungsstadium der Morula oder Blastozyste (KESKINTEPE u. BRACKETT 1996). Die Trächtigkeitsrate nach Transfer von IVP-Embryonen ist etwas niedriger als jene nach Transfer von gespülten Embryonen und liegt heute in etwa bei 50% (MÜLLER 2011; CORCORAN et al. 2006).

Um die sehr arbeits- und kostenintensive IVP von Embryonen effizient praktisch nutzen zu können, ist es notwendig, die Raten transfertauglicher Embryonen, deren Qualität und dadurch die Trächtigkeitsraten weiter zu erhöhen.

Um dies zu erreichen, wurden bereits zahlreiche Optimierungsversuche in technischer, wie auch biologischer Hinsicht unternommen.

Die Kultivierungssysteme der IVP sind z.B. ein wichtiger Ansatzpunkt für Verbesserungen. Ständige Modifizierung der verwendeten Medien oder Versuche, wie z.B. die Zwischenkultivierung in vitro produzierter Embryonen im Eileiter (MÜLLER 2011) oder die verlängerte Zwei-Schritt-Kultivierung (reversible Unterdrückung der spontanen Maturation mit Hilfe eines Inhibitors) Germinalvesikel (GV)-intakter Oozyten, welche die Reifung der Eizellen (EZ) verzögern soll um mit ausreichend Zeit die volle meiotische Kompetenz zu entwickeln (KUBELKA et al. 2000), brachten bisher nur mäßigen Erfolg.

Auch die Selektion der gewonnenen Oozyten, um einen homogeneren Ausgangspool an EZ mit hoher Qualität zu erhalten, ist ein wichtiger Forschungsansatz, denn deren Qualität ist der bestimmende Faktor für die Blastozystenrate (LONERGAN et al. 2003; RIZOS et al. 2002).

Die morphologische Selektion der EZ ist oft subjektiv und ungenau und deswegen allein nicht ausreichend, um kompetente Oozyten herauszufiltern (TORNER et al. 2008). Eine genauere Methode wäre die Brilliant Cresyl Blue (BCB)-Färbung, auf Basis der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH)-Aktivität. Mit dieser Färbung ist die Trennung von unreifen, sich noch im Wachstum befindlichen (BCB negativ) EZ von den entwicklungs kompetenten EZ, mit bereits

abgeschlossenem Wachstum (BCB positiv), möglich. Es hat sich gezeigt, dass BCB positive EZ in einer höheren Blastozystenrate resultieren als BCB negative (TORNER et al. 2008). Doch haben nicht alle EZ das Potential, das Blastozystenstadium zu erreichen, weshalb weitere zusätzliche Marker für eine genauere Vorselektion notwendig sind (JANOWSKI et al. 2012).

Um nun neben den oben genannten Ansätzen neue und effizientere Wege zu finden, bei der IVP von Rinderembryonen die Blastozystenrate zu verbessern, ist die intensive Erforschung der molekularbiologischen Vorgänge in den EZ während der Reifung und der frühen Embryonalphase die Voraussetzung. Trotz jahrelanger, intensiver Forschung auch in diesem Bereich gibt es immer noch Prozesse auf molekularer Ebene, welche noch nicht ausreichend beschrieben sind oder bei welchen noch Unklarheiten bestehen.

Diese Dissertation beschäftigt sich nun im Detail mit speziellen Vorgängen während der meiotischen Reifung von Rinder-Oozyten in vitro.

2. Literaturübersicht

2.1. Oogenese und Follikulogenese

Bei Säugetieren differenzieren sich durch Vermehrung, Wachstum und Reifung die Urkeimzellen im Verlauf der Oogenese in den Follikeln des Ovars zu befruchtungsfähigen Oozyten.

Während der fetalen Entwicklung eines Kalbes entstehen aus den Primordialkeimzellen durch Teilungen eine Vielzahl von Oogonien. Diese vermehren sich mitotisch weiter und entwickeln sich dann, nach Abschluss ihres Wachstums, im Zuge der ersten Reifeteilung zu primären Oozyten. Diese Oozyten I. Ordnung verharren dann in den Primordialfollikeln, umgeben von einschichtigen Epithelzellen, den Granulosazellen, in einem meiotischen Arrest im Diplotän (Diktyotän) der ersten meiotischen Prophase, im GV-Stadium (TOMEK und SMILJAKOVIC 2005; KUBELKA et al. 2000; BAKER und HUNTER 1978). Dieser Arrest bleibt in vivo von der Geburt bis kurz vor der Ovulation bestehen, wenn gonadotrope Hormone den Germinalvesikel Breakdown (GVBD) auslösen (GREVE und MADISON 1991; BAKER und HUNTER 1978). In vitro können die Oozyten die Meiose auch ohne hormonellem Stimulus spontan fortsetzen, sobald sie aus den Follikeln entnommen und in ein geeignetes Kultivierungsmedium verbracht werden (TOMEK und SMILJAKOVIC 2005; TOMEK et al. 2002a; KUBELKA et al. 2000; GREVE und MADISON 1991; BAKER und HUNTER 1978).

Die Vermehrung der Oogonien ist bereits kurz vor der Geburt des Kalbes abgeschlossen und limitiert so die Anzahl der letztendlich ovulationsfähigen Oozyten (BAKER und HUNTER 1978). Der Prozess des Oozytenwachstums ist langwierig und verbunden mit einer verstärkten Synthese und Akkumulation von mRNA und Proteinen, welche essentiell für die weitere Oozytenreifung und frühe Embryonalentwicklung sind. Oozyten mit einem Durchmesser von unter 110 μm befinden sich noch im Wachstum und zeigen eine hohe RNA-Synthese. Hat eine Oozyte aber den Durchmesser von 110 μm erreicht und befindet sich in einem ca. 3mm großen Follikel, so hat sie die volle Kompetenz erreicht, die meiotische Reifung zu vollenden (LABRECQUE und SIRARD 2014; JANOWSKI et al. 2012; HYTTEL et al. 2001; FAIR et al. 1995).

Das Wachstum der Oozyten steht in enger Verbindung mit dem Follikelwachstum. Die Primordialfollikel entwickeln sich bis zur Pubertät des Jungrindes über Primär- und Sekundärfollikel zu ovulationsfähigen Tertiärfollikeln, wobei die somatischen Begleitzellen der EZ zum wandständigen „Stratum granulosum“ und den, die Oozyte vielschichtig umgebenden, Kumuluszellen differenzieren.

Doch nur ein Follikel der Kohorte der Tertiärfollikel einer Welle, der sog. dominante Follikel, schafft es, zu einem Graaf'schen Follikeln zu reifen und auch wirklich zur Ovulation zu gelangen. Der restliche Teil der Follikel erfährt den programmierten Zelltod und unterliegt der Atresie (KRYSKO et al. 2008).

Für die Entwicklungskompetenz der Oozyte ist ein enger Kontakt und Interaktion mit den Follikelzellen essentiell. Die EZ produziert Substanzen für die Follikelzellularfunktion und umgekehrt haben auch die Follikelzellen Einfluss auf die Maturation, Fertilisation und Embryonalentwicklung der Oozyte (JANOWSKI et al. 2012). Der Austausch dieser Stoffe erfolgt via Gap junctions. Durch lange Zytoplasmaausläufer der Follikelzellen, welche die Zona Pellucida penetrieren, ist diese Kommunikation möglich (ANDERSON und ALBERTINI 1976).

2.2. Meiotische Maturation

Als nukleäre Maturation (Reifung) wird die wieder aufgenommene Meiose der EZ vom GV-Stadium bis zum Metaphase II (M II) -Stadium bezeichnet (TOMEK und SMILJAKOVIC 2005). Während dieser erfolgt die erste meiotische Teilung (Reduktionsteilung) der diploiden Oozyte zu einer haploiden Oozyte II. Ordnung (MURKEN et al. 2011).

Die finale EZ-Reifung ist, im Gegensatz zum Oozytenwachstum, ein kurzer Prozess, welcher beim Rind 24h dauert (TOMEK und WOLLENHAUPT 2012).

In vitro kann die Maturation, also die spontane Fortsetzung der Meiose, mit dem Punktieren der Oozyten aus den Follikeln beziehungsweise (bzw.) dem Slicing der Ovaroberfläche und der

Transferierung in ein geeignetes Kultivierungsmedium beginnen (TOMEK und SMILJAKOVIC 2005; TOMEK et al. 2002a; TOMEK et al. 2002b; KUBELKA et al. 2000). Zu Beginn befinden sich die EZ arretiert im GV-Stadium (BHOJWANI et al. 2006; ELLEDEROVÁ et al. 2006; TOMEK und SMILJAKOVIC 2005; TREMBLAY et al. 2005). Die Fortsetzung der Meiose ist durch bedeutende morphologische Veränderungen, wie die Auflösung der Kernmembran (GVBD), die Chromatinkondensation und die Umgruppierung des Mikrotubuli-Netzwerkes (meiotische Spindelbildung) charakterisiert (ELLEDEROVÁ et al. 2006; TOMEK und SMILJAKOVIC 2005; TREMBLAY et al. 2005; TOMEK et al. 2002b; KUBELKA et al. 2000). Der GVBD beginnt beim Rind nach 7-8 h IVM (KUBELKA et al. 2000), und nach 10 h IVM befinden sich nahezu alle Zellen im GVBD-Stadium (TOMEK et al. 2002b).

Sind diese Umstrukturierungen abgeschlossen, erreicht die EZ die erste meiotische Metaphase/das Metaphase I (M I) -Stadium (ELLEDEROVÁ et al. 2006; KUBELKA et al. 2000). Im M I-Stadium ist die Kernmembran komplett aufgelöst und die maximal verdichteten Chromosomen ordnen sich in der Äquatorialebene an (MURKEN et al. 2011). Bovine Oozyten erreichen die M I nach 12-14 h IVM (KUBELKA et al. 2000).

Danach durchlaufen die EZ direkt, nach 14-16 h IVM, ohne sichtbare Dekondensation der Chromosomen, die Anaphase I (Ana I) und die Telophase I (Telo I; KUBELKA et al. 2000). Die Chromosomen werden in der Ana I zu den Polen des Spindelapparats gezogen und in der Telo I erfolgt dann die Trennung der Chromosomen und es kommt zur Zellteilung (MURKEN et al. 2011). Das genetische Material verteilt sich gleichmäßig, aber das Zytoplasma wird ungleichmäßig verteilt. Eine größere sekundäre Oozyte und ein kleines, nicht funktionsfähiges Polkörperchen (PK) I sind entstanden (ŠŮŠŮR et al. 2015; LEE et al. 2012; ELLEDEROVÁ et al. 2006; LIEBICH 2004).

Ist die erste Reifeteilung abgeschlossen, beim Rind nach 24 h IVM (TOMEK et al. 2002b; KUBELKA et al. 2000), so erreicht die nun haploide EZ, die nach Ausschleusung des PK I als sekundäre Oozyte bezeichnet wird, das M II-Stadium. Nach Erreichen der M II tritt die Zelle erneut in eine Ruhephase ein (LEE et al. 2012; MURKEN et al. 2011; ELLEDEROVÁ et al. 2006; TOMEK und SMILJAKOVIC 2005; KUBELKA et al. 2000). Erst die Befruchtung oder eine parthenogenetische Aktivierung lässt die EZ den M II-Arrest überwinden und führt zu einer Fortsetzung der Meiose mit der zweiten meiotischen Teilung, der Äquationsteilung (LEE et al.

2012; MURKEN et al. 2011; TORNER et al. 2001; KUBELKA et al. 2000). Es entstehen hier, wiederum durch ungleichmäßige Teilung, eine befruchtungsfähige haploide EZ und das PK II (SŮSŮR et al. 2015; LIEBICH 2004).

Doch die Oozyte benötigt für eine ausreichende Entwicklung nicht nur die beschriebenen Veränderungen im Zellkern (ZK, nukleäre Maturation), sondern auch zahlreiche Reifungsvorgänge im Ooplasma (zytoplasmatische Maturation) sind für eine optimal befruchtungsfähige EZ essentiell (EL-RAEY und NAGAI 2014; BHOJWANI et al. 2006; SIRARD et al. 2006; SIRARD et al. 2003; TORNER et al. 2001) Es geschehen ultrastrukturelle Veränderungen, wie z.B. die Erweiterung des perivitellinen Raumes, die räumliche Umverteilung von Organellen oder die Verkleinerung der Golgi-Komplexe sowie des glatten endoplasmatischen Retikulums (FERREIRA et al. 2009; TREMBLAY et al. 2005; HYTTEL et al. 1986).

2.3. Translation

Für die Maturation der Oozyten, insbesondere um deren Fortgang der Meiose steuern zu können, ist die Biosynthese von Proteinen essentiell (ELLEDEROVÁ et al. 2008; ELLEDEROVÁ et al. 2006). Die Proteinbiosynthese ist ein mehrstufiger Prozess, der mit der Transkription von nukleärer DNA, welche die genetische Information beinhaltet, in Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) beginnt und nachfolgend die mRNA in Polypeptidketten translatiert (SANGES et al. 2013). Die Transkription nimmt ab dem GVBD-Stadium rapide ab (LABRECQUE und SIRARD 2014; TOMEK et al. 2002b), da das Chromatin immer mehr kondensiert wird und so keine Transkription mehr in der EZ stattfinden kann (EL-RAEY und NAGAI 2014 ; TOMEK und WOLLENHAUPT 2012). Also wird die Genexpression ab dem Stadium des GVBD nur noch auf Ebene der Translation gespeicherter mRNAs geregelt (SŮSŮR et al. 2015; TOMEK und WOLLENHAUPT 2012; SŮSŮR et al. 2008; ELLEDEROVÁ et al. 2006). Dies geschieht bis zu dem Zeitpunkt, an dem das embryonale Genom aktiviert wird (TOMEK und WOLLENHAUPT 2012;

SIEMER et al. 2009; SŮSŮR et al. 2008). Die Hauptaktivierung des embryonalen Genoms findet nach der Befruchtung in der frühen Embryogenese, im 8- bis 16-Zellstadium der Blastozyste, statt (GRAF et al. 2014; WRENZYCKI 2008; MEMILI und FIRST 2000; BARNES und FIRST 1991). Die Oozyten akkumulieren und speichern während ihres Wachstums ausreichend große Mengen maternaler, zunächst translational-inaktiver mRNA. Im Zuge der Eizellreifung und frühem Embryonalentwicklung werden diese dann aktiviert und translatiert (SŮSŮR et al. 2008; TREMBLAY et al. 2005; TOMEK et al. 2002a). Eine regulierte TL der mRNAs beeinflusst viele biologische Vorgänge wie Zellzyklus, Wachstum, Embryogenese und Keimzellentwicklung (SŮSŮR et al. 2008) und ist der Schlüsselpunkt der Kontrolle der eukaryotischen Genexpression (ELLEDEROVA et al. 2006). Absolut notwendig ist eine genaue Regulation und strenge Kontrolle der TL (SANGES et al. 2013), um auf wechselnde Bedingungen oder neue Situationen sofort reagieren zu können (SCHEPER und PROUD 2002), was durch die Verwendung bereits bestehender, fertiger mRNAs möglich ist (TOMEK und WOLLENHAUPT 2012). Ein Versagen der TL-Kontrolle kann weitreichende Konsequenzen haben, wie z.B. die Inhibition oder Induktion von Apoptosevorgangen (SANGES et al. 2013).

Im Allgemeinen aktivieren Bedingungen wie Hormone, Wachstumsfaktoren, vasoaktive Substanzen, Zytokine und Nährstoffe (Aminosäuren (AS), Zucker,...) die TL. Oxidativer oder osmotischer Stress, DNA-Schäden oder Nährstoffmangel hingegen führen generell zu einer Unterdrückung der TL (SCHEPER und PROUD 2002).

Die Regulation der TL geschieht meist über Signalkaskaden von Kinasen, welche Prozesse wie Phosphorylierungen, Dephosphorylierungen oder Polyadenylierungen vermitteln (SCHEPER und PROUD 2002; TOMEK et al. 2002A; KUBELKA et al. 2000).

2.3.1 Translationsinitiation

Die TL lässt sich grob in vier Abschnitte gliedern: die Initiation, die Elongation, die Termination und das Recycling (SANGES et al. 2013; SONENBERG 2008; WANG und PROUD 2006).

Davon scheint die TL-Initiation, obwohl auch während der Elongation regulierende Vorgänge stattfinden, der limitierende Schritt zu sein (ELLEDEROVÁ et al. 2008) und die Gesamt-TL zu kontrollieren (SŮSÖR et al. 2015; SCHEPER und PROUD 2002).

Die Initiation findet vom GV- bis zum M II-Stadium in der EZ statt. Die Gesamtproteinsynthese ist im GV-Stadium niedrig, steigt dann auf ein Vielfaches an (TOMEK und WOLLENHAUPT 2012; TOMEK et al. 2002b), mit einem Maximum zwischen GVBD und M I (zwischen 10-18 h), und sinkt dann wieder auf ein mit dem im GV vergleichbares, niedriges Niveau im M II-Stadium (TOMEK et al. 2002a).

Bei Eukaryonten wird die Hauptmenge der mRNAs in einem Cap-abhängigen Prozess translatiert, nur kleine Mengen mRNA werden von z.B. einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) aus unmittelbar translatiert (TOPISIROVIC et al. 2011).

Die Cap-Struktur am 5'-Ende der mRNA ist über eine 5'-5'-Phosphodiesterbindung an das erste Nukleotid gebunden und besteht aus einem Guanosintriphosphat-Teil, der an Position 7 der Base methyliert ist (m^7GpppN ; TOMEK und WOLLENHAUPT 2012; SCHEPER und PROUD 2002). Das Capping der pre-mRNA geschieht während der Transkription, sobald die RNA eine bestimmte Länge hat. Die folgende N⁷-Methylierung der Guaninbase ist essentiell für eine ausreichende Bindungsaffinität von Cap-bindenden Proteinen und wird speziell reguliert (TOPISIROVIC et al. 2011).

Die 5'-Cap-Struktur schützt die mRNA, ist wichtig für den RNA-Stoffwechsel und fördert Transkription, Polyadenylierung, Splicing, den Transport der mRNA aus dem ZK und ist verantwortlich für eine optimale TL. Es wurde vielfach gezeigt, dass eine mRNA ohne Cap-Struktur schnell abgebaut wird (TOPISIROVIC et al. 2011).

Cap-bindende Proteine binden spezifisch an die Cap-Struktur der mRNA und vermitteln deren Funktionen an die Zelle. Hauptproteine wie der eukaryotische Initiationsfaktor 4E (eIF4E; ELLEDEROVÁ et al. 2008) im Zytoplasma (wichtig für TL-Initiation) und der nukleäre Cap-

bindende Komplex (nCBC, wichtig für den nukleären mRNA-Stoffwechsel wie pre-mRNA-Splicing und den nukleären Export) vermitteln die Genexpression über das Cap (TOPISIROVIC et al. 2011).

Die Cap-abhängige TL-Initiation wird eingeleitet, indem sich das 5'-Ende mit dem 3'-Ende der mRNA mittels Proteinfaktoren, den eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIFs) und weiteren Bindungsproteinen verbindet. Es kommt so zu einer Zirkulierung der mRNA, dem sog. „Closed-Loop“ (TOMEK und WOLLENHAUPT 2012; SONENBERG und HINNEBUSCH 2007). Erst wenn der Closed-Loop gebildet ist, löst sich die Sekundärstruktur der mRNA, die Ribosomen können andocken und die TL starten (THOREEN 2013; TOMEK und WOLLENHAUPT 2012).

Die TL-Initiationsphase endet und geht in die Elongation über, sobald sich das vollständige 80S-Ribosom fest an die mRNA gebunden hat, sich die eIFs wieder lösen und die Synthese der AS-Kette beginnt (TOPISIROVIC et al. 2011; SCHEPER und PROUD 2002).

Jede mRNA besteht normalerweise aus bestimmten Nukleotidsequenzen in bestimmten Bereichen (siehe Abb. 1). Wichtig für eine regulierte und effiziente TL sind neben der 5'-Cap-Struktur, die 5'- und 3'-untranslatierten Bereiche (UTRs) und der Poly-A-Schwanz (SIEMER et al. 2009; TOMEK et al. 2002a).



Abb. 1: Stark schematisierter Aufbau der mRNA

Grafik angefertigt nach HORN et al. 2005

2.3.2 Translationsfaktoren

Die TL-Initiation wird maßgeblich durch beachtliche Veränderungen in der Menge und/oder der Phosphorylierung der 5´- und 3´-End-assoziierten Faktoren reguliert (SIEMER et al. 2009).

2.3.2.1 5´-Faktoren

Ein zentraler Knotenpunkt der TL-Kontrolle und die elementare Voraussetzung für die TL ist die Bildung des eIF4F-Komplexes am 5´-Ende der mRNA (TOPISIROVIC et al. 2011). Die Steuerung der eIF4F-Komplexbildung erfolgt durch Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungsvorgänge oder mittels Repressoren wie den 4E-Bindungsproteinen (4E-BPs; TOMEK und WOLLENHAUPT 2012). Der eIF4F-Komplex besteht aus den TL-Faktoren eIF4A, eIF4E und eIF4G (SÜSÖR et al. 2015; O'LEARY et al. 2013; TOMEK und WOLLENHAUPT 2012; TOPISIROVIC et al. 2011; SCHEPER und PROUD 2002).

Das kleine Protein eIF4E von ungefähr 24 kDa Masse (SCHEPER und PROUD 2002) kann direkt an die methylierte Guaninbase der Cap-Struktur am 5´-Ende binden und rekrutiert dadurch die TL-Initiationsfaktoren eIF4A und eIF4G für die Bildung des eIF4F-Komplexes an die mRNA (O'LEARY et al. 2013; TOMEK und WOLLENHAUPT 2012; TOPISIROVIC et al. 2011). Das größere Gerüstprotein eIF4G interagiert direkt mit den eIF4F-Komplexkomponenten eIF4E und eIF4A, sowie mit eIF3 und dem durch Paip1, an den Poly-A-Schwanz des 3´-Endes der mRNA gebundenen Protein, PABP (SIEMER et al. 2009). Durch die Bindung von eIF4G an das PABP verbinden sich das 3´- mit dem 5´-Ende und es kommt so zur Zirkularisation und Aktivierung der mRNA (SANGES et al. 2013, siehe Abb. 2).

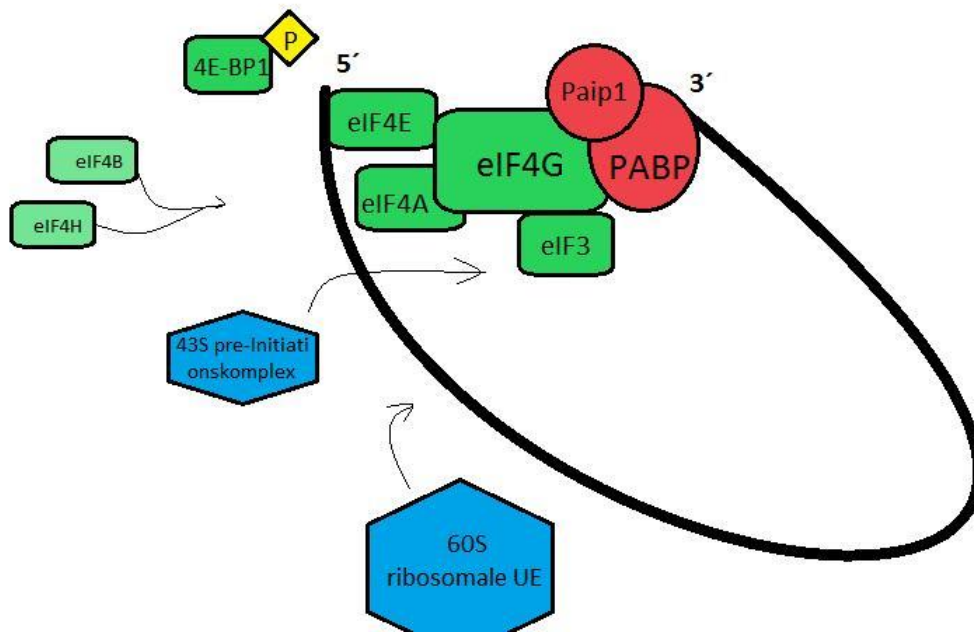


Abb. 2: Schematisiertes Modell der „closed-loop“-Formation mit den wichtigsten Faktoren

(grün: 5'-Faktoren; rot: 3'-Faktoren, gelb: phosphorylierter Zustand von 4E-BP1); nicht alle Faktoren aufgeführt und Größenverhältnisse nicht berücksichtigt; Grafik modifiziert nach MAGNUS et al. 2003.

Sobald die Zirkularisation erfolgt ist, lenkt eIF3 den eIF4F-Komplex an die kleine ribosomale Untereinheit (UE; SIEMER et al. 2009) und rekrutiert den 43S pre-Initiationskomplex (= 40S ribosomale UE + eIF2-GTP-Met-tRNA_i + eIF1 + eIF1A + eIF5) an die mRNA, wodurch dann der 48S-Komplex entsteht (SANGES et al. 2013; TOPISIROVIC et al. 2011; WANG und PROUD 2006). Der 48S-Komplex beginnt nun in der 5' untranslatierten Region (UTR), in 5'→3'-Richtung, das Startcodon auszumachen (TOPISIROVIC et al. 2011; SCHEPER und PROUD 2002). Währenddessen entwindet die DEAD-box RNA-Helikase eIF4A, stimuliert durch eIF4B und eIF4H, die Sekundärstruktur der mRNA (SANGES et al. 2013; TOPISIROVIC et al. 2011; TOMEK et al. 2002a). Mit Erreichen des Startcodons, begünstigen eIF5 und eIF4B die Hydrolyse des Guanosintriphosphats (GTP), woraufhin sich die eIFs lösen und sich die 60S ribosomale UE anfügt (TOPISIROVIC et al. 2011). Das Ribosom ist nun vollständig und der 80S-Initiationskomplex kann geschlossen an die mRNA gebunden die Elongationsphase der TL einleiten (SANGES et al. 2013; TOPISIROVIC et al. 2011; SCHEPER und PROUD 2002).

2.3.2.1.1 eIF4E

Der eukaryotische Initiationsfaktor 4E ist von entscheidender Wichtigkeit für die mRNA-TL und deren Regulation (SŮSÖR et al. 2015; RICHTER und SONENBERG 2005; BEUGNET et al. 2003). Er ist essentieller Teil des eIF4F-Komplexes, bindet an die 5'-Cap-Struktur und rekrutiert andere TL-Faktoren sowie die 40S ribosomale UE an die mRNA (SŮSÖR et al. 2008; BEUGNET et al. 2003; WANG et al. 2003; SCHEPER und PROUD 2002).

Das Protein eIF4E spielt eine Schlüsselrolle bei der Proliferation, dem Überleben und dem programmierten Tod von Zellen (BEUGNET et al. 2003).

Im eIF4F-Komplex ist eIF4G über eine hydrophobe Region an der konkaven dorsalen Oberfläche von eIF4E mit diesem verbunden (SCHEPER und PROUD 2002). Um die Bindung genau dieser Bindungsstelle von eIF4E konkurrieren auch die 4E-BP Repressorproteine, insbesondere 4E-BP1, und hemmen dadurch die Bindung mit eIF4G und somit auch die eIF4F-Komplexbildung kompetitiv (SANGES et al. 2013; BEUGNET et al. 2003; SCHEPER und PROUD 2002; TOMEK et al. 2002a). Die translationale Aktivität von eIF4E ist also, neben dessen Phosphorylierung, stark von dessen Verfügbarkeit abhängig (ELLEDEROVÁ et al. 2006). Ist viel hypophosphoryliertes 4E-BP1 vorhanden, so bindet dieses viel eIF4E (diese Bindung ist unabhängig vom Phosphorylierungszustand von eIF4E (TOMEK et al. 2002a)) und es steht nur noch wenig eIF4E für die Bindung mit eIF4G und so für die TL-Initiation zur Verfügung (ELLEDEROVÁ et al. 2006). Die Menge von eIF4E an sich hingegen ist, entgegen früherer Vermutungen, nicht ausschlaggebend, denn es ist in ausreichendem Maße vorhanden und der Spiegel bleibt im Verlauf der IVM annähernd gleich (ELLEDEROVÁ et al. 2008).

Die eIF4E-Cap-Bindung wird von einer Bindung von eIF4E mit dem Repressor 4E-BP1 nicht verhindert (SŮSÖR et al. 2008; TOMEK et al. 2002a). Auch die Bindung mit eIF4G beeinflusst die eIF4E-Cap-Bindung nicht negativ. Es wird angenommen, dass durch strukturelle Veränderungen infolge dieser Bindung die Cap-Bindungsaffinität von eIF4E verstärkt und die Bindung selbst stabilisiert wird (TOPISIROVIC et al. 2011).

Im GV-Stadium der Zelle ist nur wenig eIF4E an die 5'-Cap-Struktur gebunden, obwohl zu diesem Zeitpunkt nichts wesentlich die Affinität beeinträchtigt (TOMEK und WOLLENHAUPT 2012). Im Verlauf der IVM kommt es dann zu einer erhöhten eIF4E-Cap-Bindung und zu einer

gesteigerten Formation von eIF4F-Komplexen (SIEMER et al. 2009; ELLEDEROVÁ et al. 2006). Ebenso wird eIF4E selbst während der Maturation immer mehr phosphoryliert. Die Phosphorylierung erfolgt an Serin (Ser) 209, welches sich nahe der Cap-Bindungsstelle von eIF4E befindet und wird von den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) interagierenden Kinasen Mnk1 und Mnk2 reguliert (THOREEN 2013; SŮSŮR et al. 2008; ELLEDEROVÁ et al. 2006; UEDA et al. 2004; SCHEPER und PROUD 2002).

Im GV-Stadium ist eIF4E zu 95 % unphosphoryliert, ab dem GVBD steigt die Phosphorylierung, in M I sind 30-70% und in M II 95% phosphoryliert (TOMEK und WOLLENHAUPT 2012; TOMEK et al. 2002a). Frühere Studien stellten daher die Vermutung an, dass die Phosphorylierung von eIF4E Auswirkung auf die Cap-Affinität hat. MINICH et al. 1994 nahmen an, dass die Phosphorylierung die Bindungsaffinität an die Cap-Struktur erhöht. Doch nachfolgende biophysikalische Studien von SCHEPER et al. 2002 oder ZUBEREK et al. 2003 besagen das Gegenteil. Sie sind der Meinung, dass die Phosphorylierung von eIF4E dessen Bindungsaffinität an die Cap-Struktur eher senkt. Dies wäre im Einklang mit der Annahme, dass sich eIF4E nach der TL-Initiation einer mRNA wieder zügig von dieser löst, um die weitere TL verschiedener mRNAs, besonders die von Unterrepräsentierten, voranzutreiben (SŮSŮR et al. 2008). Der Rückgang der Gesamtproteinsynthese, aber die gleichzeitig gesteigerte TL spezifischer mRNAs wären so ebenfalls erklärbar (ELLEDEROVÁ et al. 2008).

Versuche mit nicht-phosphorylierbaren eIF4E-Mutanten haben jedenfalls gezeigt, dass die Phosphorylierung von eIF4E keine Auswirkungen auf die Gesamtproteinsynthese hat (UEDA et al. 2004) und sie für die TL nicht essentiell ist (TOPISIROVIC et al. 2011).

Der Widerspruch, dass es im Verlauf der Maturation von Eizellen, trotz gesteigerter Formation aktiver eIF4F-Komplexe, in M II nur zu einer niedrigen Gesamtproteinsynthese kommt, wurde in der Vergangenheit viel diskutiert und es wurden einige Hypothesen dazu aufgestellt (TOMEK und WOLLENHAUPT 2012; ELLEDEROVÁ et al. 2006).

Interessant hierbei ist, dass nicht alle mRNAs gleichbehandelt translatiert werden und es eine Sonderstellung der sog. „eIF4E-sensitiven“ mRNAs gibt (TOPISIROVIC et al. 2011). Diese spezielle Unterklasse von mRNAs kodiert für bestimmte Proteingruppen, verfügt über besondere strukturelle Merkmale und wird gezielt Cap-abhängig translatiert. Die gesteigerte

eIF4F-Bildung im Zuge der IVM führt also schon zu einer Stimulation der TL, doch nur der ausgewählten Gruppe an mRNAs; während die Gesamtproteinsynthese jedoch keinen Anstieg erfährt (GKOGKAS et al. 2013; THOREEN 2013; TOPISIROVIC et al. 2011; DOWLING et al. 2010; SIEMER et al. 2009; WANG et al. 2003).

In Bezug auf ihre Struktur weisen „eIF4E-sensitive“ mRNAs lange, in ihrer Sekundärstruktur hochstrukturierte 5'-UTRs auf (TOPISIROVIC et al. 2011; WANG et al. 2003) oder sie enthalten Oligopyrimidin-Sequenzen, die sog. 5'-TOP Motive an ihrem 5'-Ende (GKOGKAS et al. 2013; THOREEN 2013; DOWLING et al. 2010). Sie kodieren für einige TL-Initiationsfaktoren (THOREEN 2013) und hauptsächlich für protoonkogene Proliferations- und Überlebensproteine, wie z.B. Cycline, vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (VEGF) oder Protoonkogene, wie c-Myc oder Bcl-xl (TOPISIROVIC et al. 2011). Diese Gegebenheit lässt die Rolle von eIF4E in der Zellregulierung sehr kritisch für den Organismus werden (SCHEPER und PROUD 2002). Eine Überexpression von eIF4E hat nämlich einen starken Anstieg der TL „eIF4E-sensitiven“ mRNAs zur Folge (THOREEN 2013; TOPISIROVIC et al. 2011), was dann zu einer Fehlregulation der zellulären Wachstumskontrolle und zu maligner Transformation der Zelle führt (TOPISIROVIC et al. 2011; BEUGNET et al. 2003; WANG et al. 2003). Auf Grund der möglichen tumorösen Entartung oder der Auslösung einer Krebserkrankung, im Zusammenhang mit einer Überexpression von eIF4E, ist eine strenge Regulierung der eIF4E-Aktivität extrem wichtig. Im besonderen Fokus der Forschung und auch dieser Dissertation stehen deswegen eIF4E beeinflussende Faktoren (siehe Abb. 3). Die Regulierung der eIF4E-Aktivität wird einmal gesteuert durch die Transkriptionskontrolle von eIF4E-Genen, dann durch die Phosphorylierung von eIF4E durch Mnk und zudem ganz gravierend über den mammalian oder mechanistic target of rapamycin (mTor) -Signalweg mit den 4E-BP Repressorproteinen (STEAD und PROUD 2013; TOPISIROVIC et al. 2011). Ein Einfluss weiterer Bindungsproteine, wie eIF4E-Transporter Protein (4E-T), Cup, Maskin oder Homebox-Proteine, welche ein eIF4E-Bindungsmotiv besitzen, wird außerdem vermutet (NISHIMURA et al. 2015; IGREJA und IZARRALDE 2011; TOPISIROVIC et al. 2011; RHOADS 2009).

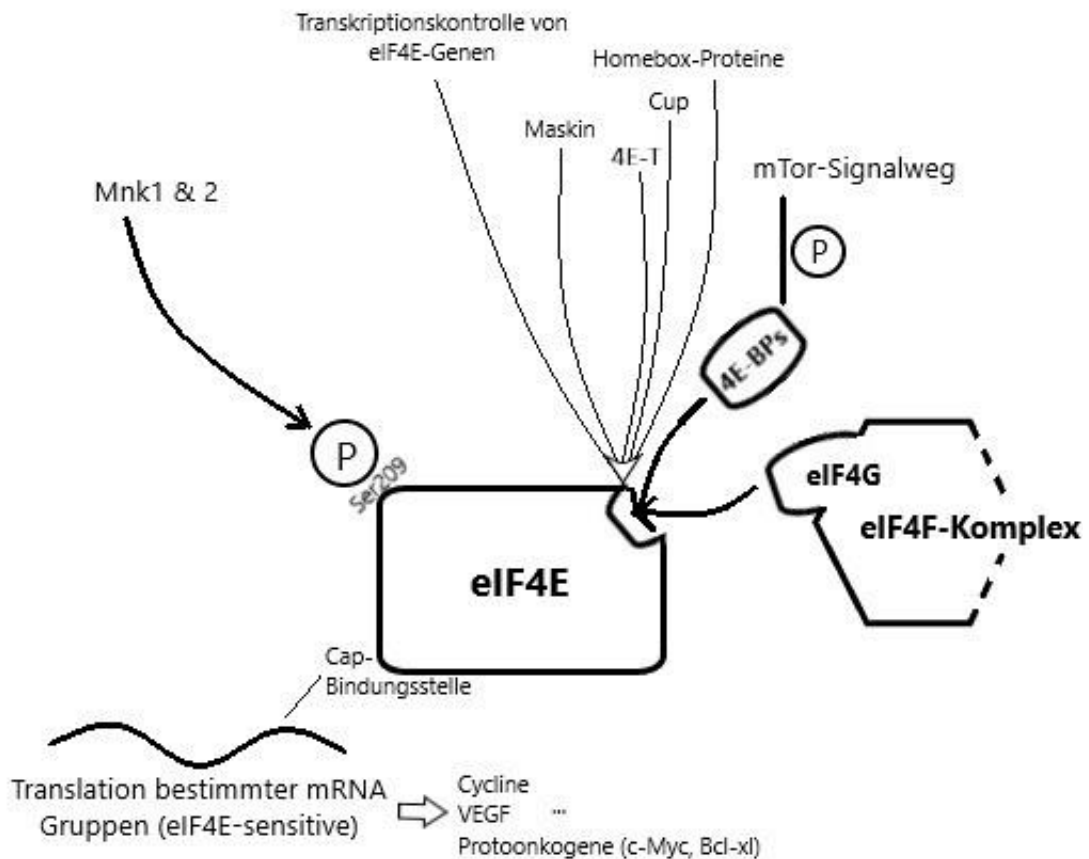


Abb. 3: Schematisierte Darstellung sämtlicher Einflüsse auf die eIF4E-Aktivität, welche folgend die Translation beeinflussen; Grafik angefertigt nach NISHIMURA et al. 2015, SIDDIQUI und SONENBERG 2015 und TOPISIROVIC et al. 2011.

2.3.2.1.2 4E-BP1

Eine weitere Komponente der 5'-mRNA-assoziierten Faktoren stellt die Proteinfamilie der 4E-Bindungsproteine dar. Die 4E-BPs (4E-BP1, 2 und 3) sind kleine, hitzestabile Repressorproteine mit niedrigem Molekulargewicht (4E-BP1: 16 kDa; TOPISIROVIC et al. 2011; HALL und TAMANOI 2010; RHOADS 2009; SÜSÖR et al. 2008; WANG et al. 2003). Sie unterdrücken die Cap-abhängige TL indem sie die eIF4E-eIF4G-Bindung blockieren und so die Bildung des

Initiationskomplexes eIF4F verhindern (ROMASKO et al. 2013; SANGES et al. 2013; TOPISIROVIC et al. 2011; SONENBERG und HINNEBUSCH 2009; TOMEK et al. 2002a).

Das Protein 4E-BP1, auch Phosphorylated Heat- and Acid-Stable Protein – induced by Insulin (PHAS I; DUNCAN und SONG 1999) genannt, ist das am intensivsten erforschte dieser Gruppe und kommt u.a. auch im Ovarialgewebe des Rindes vor (SHANG et al. 2012; BEUGNET et al. 2003; TOMEK et al. 2002a). 4E-BP1 liegt im GV-Stadium der EZ hypophosphoryliert vor, wird im Zuge der meiotischen Maturation immer mehr phosphoryliert und ist im M II-Stadium dann vollphosphoryliert. Dies wurde bereits in früheren Studien, neben denen vom Rind (SIEMER et al. 2009), für weitere Tierarten belegt (Schwein (ELLEDEROVÁ et al. 2006), Maus (ROMASKO et al. 2013)). Im Verlauf der IVM werden die eIF4E-4E-BP1-Bindungen immer weniger (ELLEDEROVÁ et al. 2006), da nur unphosphoryliertes 4E-BP1 an eIF4E binden kann (SŮŠŔ et al. 2008; SONENBERG und HINNEBUSCH 2009; TOMEK et al. 2002a). Die Phosphorylierung regelt also die biologische Aktivität von 4E-BP1 und stimuliert durch dessen Inaktivierung die eIF4F-Komplexbildung (SIEMER et al. 2009; SŮŠŔ et al. 2008; DUNCAN und SONG 1999). Ist eIF4E an die Cap-Struktur gebunden, so fördert dies die Affinität von eIF4E für 4E-BP1 (MODRAK-WOJCIK et al. 2013). Zugleich stabilisiert die Bindung von eIF4E und 4E-BP1 die eIF4E-Cap-Bindung (VOLPON et al. 2006).

Doch keine Form von 4E-BP1 (weder phosphoryliert noch unphosphoryliert) stimuliert per se die TL, da die Gesamtproteinsynthese in M II niedrig ist, obwohl der Repressor 4E-BP1 hyperphosphoryliert, also inaktiv ist (SIEMER et al. 2009; ELLEDEROVÁ et al. 2006) und Versuche mit nicht-phosphorylierbaren 4E-BP1-Mutanten auch zu keinem relevanten Anstieg der Gesamtproteinsynthese geführt haben (TOPISIROVIC et al. 2011).

Reguliert wird die Aktivität von 4E-BP1 über den mTor-Signalweg, genauer den mTorC1-Kinasekomplex mTor/Raptor (BEUGNET et al. 2003), und ist daher ein kritischer Mediator der mTorC1-Funktion (DOWLING et al. 2010). Das Repressorprotein spielt eine Schlüsselrolle in Bereichen der Zellproliferation, der Zellzyklusprogression und dem Überleben der Zelle (DOWLING et al. 2010; WANG et al. 2003). Eine Überexpression von 4E-BP1 kann eine eIF4E-Überexpression abfangen und so tumorunterdrückend wirken (BEUGNET et al. 2003; WANG et al. 2003). Ebenfalls antitumorös agiert das vor nicht allzu langer Zeit entdeckte kleine

Molekül, eIF4E/eIF4G interaction inhibitor 1 (4EGI-1), welches die Loslösung von eIF4E von eIF4G bewirkt und die Bindung von eIF4E an 4E-BP1 fördert (SEKIYAMA et al. 2015).

Bei der Krebserkrankung ist der mTor-Signalweg oft fehlreguliert, weswegen die Tumorsuppressoren, also die 4E-BPs, nicht adäquat agieren können (SEKIYAMA et al. 2015; DOWLING et al. 2010).

Bestimmte externe Stimuli, wie Aminosäuren, Wachstumsfaktoren, Nährstoffe oder Hormone, können Einfluss auf die Phosphorylierung von 4E-BP1 nehmen (TOPISIROVIC et al. 2011; BEUGNET et al. 2003; CHOI et al. 2003; SCHEPER und PROUD 2002; GINGRAS et al. 2001). Zum Beispiel stimuliert Insulin die Phosphorylierung von 4E-BP1, was zur Loslösung von eIF4E führt und die eIF4F-Formation stimuliert (SHANG et al. 2012; WANG et al. 2003).

Die Phosphorylierung von 4E-BP1 an sich ist ein komplexer Prozess an multiplen Stellen (siehe Abb. 4) und folgt einem geordneten hierarchischen Prinzip. Es werden in der Literatur verschieden viele Phosphorylierungsstellen beschrieben (LIVINGSTONE und BIDINOSTI 2012; SIEMER et al. 2009; BEUGNET et al. 2003; GINGRAS et al. 2001), wobei mindestens vier von entscheidender Bedeutung sind. Initial wird 4E-BP1 im G₁-Stadium an den zwei N-terminalen Threoninen Thr37 und Thr46 phosphoryliert (TOMEK und WOLLENHAUPT 2012; WANG et al. 2003). Dieses Ereignis alleine ist nicht ausreichend, um bestehende eIF4E-4E-BP1-Bindungen zu lösen, doch es ist essentiell für die weitere Phosphorylierung des Proteins an Thr70 und Ser65 (TOMEK und WOLLENHAUPT 2012; TOPISIROVIC et al. 2011; SCHEPER und PROUD 2002). Zudem kann die Phosphorylierung an Thr46 die Vereinigung von noch ungebundenem eIF4E mit 4E-BP1 verhindern (LIVINGSTONE und BIDINOSTI 2012). Die zusätzliche Phosphorylierung an Thr70 erfolgt im M I-Stadium des Zellzyklus und ist notwendig für die Loslösung von eIF4E von 4E-BP1 (TOMEK und WOLLENHAUPT 2012; TOPISIROVIC et al. 2011; WANG et al. 2003; GINGRAS et al. 2001). Die in M II folgende Phosphorylierung an Ser65 verhindert die erneute Bindung zwischen den beiden Proteinen (TOMEK und WOLLENHAUPT 2012; WANG et al. 2003). Es wird bei somatischen Zellen beschrieben, dass für die Phosphorylierung von Ser65 zwei vorangehende Ereignisse notwendig sind: einmal die Phosphorylierung an Thr70 und zudem die an Ser101, einer neu-identifizierten Stelle am C-Terminus von 4E-BP1 (WANG et al. 2003).

Eine weitere Stelle im C-terminalen Bereich, Ser112, wird bei somatischen Zellen beschrieben. Diese beeinflusst direkt die eIF4E-4E-BP1-Bindung ohne Auswirkungen auf andere Phosphorylierungsereignisse. Es wird vermutet, dass Ser112 gemeinsam mit Thr70 die Bindungsaffinität zwischen den beiden Proteinen schwächt (WANG et al. 2003).

Neben diesen multiplen Phosphorylierungsstellen beinhaltet 4E-BP1 zudem zwei regulatorische Sequenzen. Zum einen das nach seiner Sequenz benannte, RAIP-Motiv im N-Terminus und zum anderen das sog. TOS-Motiv im C-Terminus. Diese beiden Motive spielen unterschiedliche Rollen bei der Regulierung der Phosphorylierung von mTor-abhängigen Stellen von 4E-BP1 und auch deren Mutationen zeigen unterschiedliche Auswirkungen.

Das RAIP-Motiv scheint, unabhängig von der Raptor-4E-BP1-Interaktion, Insulin- und mTor-abhängige Einflüsse auf 4E-BP1 zu vermitteln und ist notwendig für die Phosphorylierungen am N- und C-Terminus. Mutationen im RAIP-Motiv haben drastische Auswirkungen auf die mTor-abhängige Phosphorylierung und senken diese, selbst wenn eine starke externe Stimulation vorliegt (BEUGNET et al. 2003; CHOI et al. 2003).

Das TOS-Motiv hingegen scheint für die Raptor-4E-BP1-Bindung nötig zu sein und wirkt primär auf die Phosphorylierung von Thr70 und Ser65. Mutationen im TOS-Motiv zeigen, im Gegensatz zu solchen im RAIP-Motiv, nur Effekte auf die C-terminale Region und diese von geringerem Ausmaß (BEUGNET et al. 2003; CHOI et al. 2003).



Abb. 4: Schematischer Aufbau des 4E-BP1 mit seinen regulatorischen Motiven und Phosphorylierungen (gelb); Grafik modifiziert nach WANG und PROUD 2006.

Interessant bezüglich dieser sämtlichen regulatorischen Phosphorylierungen und Sequenzen von 4E-BP1 ist, dass sie sich am C- oder N-Terminus des Repressors befinden und trotzdem

Auswirkungen auf dessen Zentrum (eIF4E-Bindungsstelle) haben, obwohl es sich bei 4E-BP1 um ein sehr unstrukturiertes, nahezu ungefaltetes Protein handelt (ROMASKO et al.2013; WANG et al. 2003). Entweder es geschehen dort besondere Langstrecken-Interaktionen zwischen den Enden und dem Zentrum oder das Protein erfährt durch die Phosphorylierungen oder die Bindung mit eIF4E Strukturveränderungen, wodurch es eine stärker gefaltete Form erhält (ROMASKO et al.2013; TAIT et al. 2010; WANG et al. 2003).

Neueste Untersuchungen von ROMASKO et al. 2013 bei Mäuseeizellen weisen auf eine räumlich-zeitlich regulierte TL-Kontrolle durch mTor und den Repressor 4E-BP1 während der Meiose hin. 4E-BP1 lässt sich während der meiotischen Metaphasen nämlich am Spindelapparat und den Kinetochoren angereichert finden. Zudem wird es von mRNAs begleitet, welche u.a. für Zytoskelett-, Chromatin- und Spindelproteine kodieren. Durch dynamische, komplexe und räumlich sowie zeitlich festgelegte eIF4E-BP1-Phosphorylierungsmuster können so lokalisierte mRNA-Translationsprozesse gefördert werden, um Spindelbildung, -erhaltung, -funktion und Nebenprozesse zu unterstützen und zu koordinieren. Auch das phosphorylierte ribosomale Protein S6 (RPS6), welches ein Marker für eine aktive TL ist, wurde ebenfalls an den Spindel-Chromosomen-Komplexen gefunden (ROMASKO et al. 2013).

Um das Verständnis dieser anscheinend räumlich-zeitlich regulierten TL-Kontrolle während der meiotischen Maturation zu verbessern, wäre eine spezifische Blockade der Phosphorylierung von 4E-BP1 und somit einer Hemmung der TL-Initiation ein nützliches Hilfsmittel.

Nun ist die Phosphorylierung von 4E-BP1 sehr komplex und lässt sich durch den Inhibitor Rapamycin, welcher zwar einige Funktionen des mTor-Signalweges spezifisch hemmt, nur teilweise blockieren (BALLOU und LIN 2008; BEUGNET et al. 2003). Die Phosphorylierung an Thr37/46 zeigte sich nämlich nicht sensitiv auf Rapamycin (LIVINGSTONE und BIDINOSTI 2012). Auch andere Kinasehemmer, wie z.B. Wortmannin, LY294002 oder Analoga von Rapamycin führen nicht zu einer dauerhaften, vollständigen, spezifischen Hemmung der 4E-BP1 Phosphorylierung (SIEMER et al. 2009; BALLOU und LIN 2008).

2.3.2.2 3'-Faktoren

Neben den 5'-End assoziierten Faktoren, welche maßgeblich die TL beeinflussen und im Fokus dieser Arbeit stehen, spielen auch 3'-mRNA-Komponenten eine wichtige regulatorische Rolle (SIEMER et al. 2009).

Der seit der Ausschleusung der RNA aus dem ZK gekürzte Poly-A-Schwanz wird, um die RNA wieder zu stabilisieren und deren Fähigkeit zur TL zu erhöhen, wieder verlängert (TOMEK et al. 2002b). Diese zytoplasmatische Polyadenylierung, welche bis zum M II-Zellzyklusstadium stetig ansteigt, wird durch regulatorische Komponenten in der 3'UTR geregelt und ist damit ein wichtiges Element der TL-Kontrolle (MA et al. 2013; SIEMER et al. 2009; CORCORAN et al. 2006; TOMEK et al. 2002b). Zwei Sequenzen in der 3'UTR einer mRNA sind dabei entscheidend. Zum einen das Kernpolyadenylierungsmotiv AAUAAA gebunden an den spezifischen Faktorkomplex CPSF, und zum anderen die Sequenz UUUUUAU gebunden an das zytoplasmatische Poly-A-Element CPE und das Bindungsprotein CPEB (TOMEK und WOLLENHAUPT 2012; SIEMER et al. 2009). CPEB wird von der Aurora A Kinase phosphoryliert (SIEMER et al. 2009) und bindet an CPSF, wodurch es zur Aktivierung einer Poly-A-Polymerase kommt, wodurch die Verlängerung des Poly-A-Schwanzes, die Zirkulierung der mRNA und somit die TL stimuliert wird (TOMEK und WOLLENHAUPT 2012).

Das Gegenteil, also eine Unterdrückung der Closed Loop-Bildung, bewirken die Menge oder die Phosphorylierung/Dephosphorylierung dieser Faktoren oder 3'-End-assoziierte Repressoren, wie das PABP interagierende Protein Paip2 oder das Maskin-ähnliche Protein MLP (SIEMER et al. 2009). Paip2 bindet an das eigentlich die TL stimulierende Protein Paip1 und destabilisiert auf diesem Weg die PABP-eIF4G-Bindung. MLP bindet an CPEB und eIF4E und unterbindet so die eIF4F-Komplexbildung und die zytoplasmatische Polyadenylierung (TOMEK und WOLLENHAUPT 2012; ELLEDEROVÁ et al. 2006).

2.3.3 Translationssignalkaskaden

2.3.3.1 Beteiligte Kinasen

Zelluläre Prozesse, wie Proliferation, Differenzierung und Maturation, werden bekanntlich von Signalkaskaden ausgelöst. Die Signaltransduktion funktioniert mittels Proteinkinasen, welche durch Phosphorylierung die, z.B. für den Fortgang der Meiose von Eizellen verantwortlichen Proteine, aktivieren oder deaktivieren (TOMEK und SMILJAKOVIC 2005; TOMEK et al. 2002a). Die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), die MAPKs, die Proteinkinasen A, B und C (PKA, PKB, PKC) und die Ataxia telangiectasia mutierten/Ataxia telangiectasia und Rad3 verwandten Kinasen (ATM/ATR) sind allesamt Ser/Thr-Kinasen. Sie sind Hauptfaktoren bei der Regulierung des Zellzyklus, der Zytoskelettdynamik und der Maturation von Eizellen (KALOUS et al. 2009; TOMEK und SMILJAKOVIC 2005).

Eine wichtige CDK ist die Zellteilung-kontrollierende Kinase cdk1, auch genannt cdc2 oder p34^{cdc2}Kinase (TOMEK et al. 2002a). Sie ist neben der MAPK eine der zwei Haupt-M-Phase Kinasen. Die p34^{cdc2}Kinase fungiert als katalytische Untereinheit des Maturation Promoting Faktor (MPF)-Komplexes und regelt als Schlüsselfaktor den G2/M-Übergang in EZ und somatischen Zellen (KUBELKA et al. 2000). Der MPF ist ein Universalregulator für den Zellzyklusphasenübergang in eukaryotischen Zellen, und seine Aktivierung erfolgt auf 2 Ebenen (TOMEK und SMILJAKOVIC 2005; KUBELKA et al. 2000). Einmal wird er durch die Vereinigung der p34^{cdc2}Kinase mit der regulatorischen Untereinheit Cyclin B aktiviert und zudem durch die Phosphorylierung oder Dephosphorylierung verschiedener Stellen an der p34^{cdc2}Kinase selbst. Die p34^{cdc2}Kinase bzw. der MPF scheinen einige morphologische Veränderungen während der IVM direkt zu regulieren (KUBELKA et al. 2000). Der Interphasestatus der Mikrotubuli wird in die Metaphase-Konfiguration umgewandelt, zudem agiert die p34^{cdc2}Kinase als Laminkinase (die Phosphorylierung von Laminen führt zu der, für den GVBD essentiellen, Kernmembranauflösung (TOMEK und SMILJAKOVIC 2005, KUBELKA et al. 2000)) und sie phosphoryliert in vitro das Histon H1 (dies ist ein Marker für

Chromosomenkondensation; TOMEK et al. 2002a). Die Aktivität der p34^{cdc2}Kinase ist während der IVM nicht immer gleich. Nach einer nicht messbaren Aktivität im GV-Stadium steigt sie kurz vor dem GVBD auf ein erstes Maximum an, sinkt dann zwischen M I und M II nach 16 h stark ab und erhöht sich dann aber wieder in M II mit Erreichen eines zweiten Maximums nach 24 h (SIEMER et al. 2009; TOMEK et al. 2002A; KUBELKA et al. 2000).

Die zweite Haupt-M-Phase Kinase, die an der Regulation der Genexpression beteiligt ist, ist die Proteinkinase MAPK, auch extrazellulär-signalregulierte Kinase (ERK) genannt (TORNER et al. 2008; TOMEK et al. 2002A; KUBELKA et al. 2000; SEGER und KREBS 1995).

Eine mitogen-aktivierte Phosphorylierungskaskade aktiviert die MAPK über die Phosphorylierung zweier Reste durch die MAP Kinase Kinase (MEK; TOMEK et al. 2002a; KUBELKA et al. 2000; MATSUDA et al. 1993). Ist die MAPK aktiv, so aktiviert sie zahlreiche Substrate (TOMEK et al. 2002a). Durch die Aktivierung der direkten Substrate Mnk1 und Mnk2 ist der ERK1/2 MAPK-Signalweg an der Phosphorylierung von eIF4E beteiligt (STEAD und PROUD 2013; TOPISIROVIC et al. 2011; SIEMER et al. 2009; ELLEDEROVÁ et al. 2008). Im GV-Stadium des Zellzyklus ist die MAPK inaktiv und wird dann ab dem GVBD stetig aktiver, mit Erreichen eines Maximums nach 12 h IVM (TOMEK und SMILJAKOVIC 2005, KUBELKA et al. 2000). Dies würde mit der ähnlich ansteigenden Phosphorylierung von eIF4E im Zuge der IVM übereinstimmen (TOMEK et al. 2002a). Die Menge der sehr ähnlichen Substrate Mnk1 und Mnk2 (SCHEPER und PROUD 2002) bleibt während der Maturation gleich, doch hinsichtlich ihrer Aktivität unterscheiden sie sich voneinander. Während die basal hohe Aktivität von Mnk2 konstant ist (STEAD und PROUD 2013; TOPISIROVIC et al. 2011; ELLEDEROVÁ et al. 2008), steigt die zuerst niedrig basale Phosphorylierung von Mnk1 in gleicher Weise wie die Aktivität der MAPK während der Meiose an (STEAD und PROUD 2013; ELLEDEROVÁ et al. 2008; SCHEPER und PROUD 2002). Da die Aktivität der MAPK nicht wie die der p34^{cdc2}Kinase zwischen M I und M II sinkt, liegt die Vermutung nahe, dass die MAPK für die Erhaltung der Mikrotubuli- und Chromosomenmodifikationen in diesem Zeitraum verantwortlich ist. Da die MAPK nachgewiesenermaßen bei Mäuseeizellen mit den Mikrotubuli-organisierenden Zentren (MTOCs) assoziiert ist, ist eine Rolle der MAPK auch in der Spindelorganisationsregulation möglich (KUBELKA et al. 2000; VERLHAC et al. 1994).

Neben den zwei Haupt-M-Phase Kinasen ist die Proteinkinase B, auch Akt genannt, eine Ser/Thr-Kinase von entscheidender Bedeutung für die Eizelle, da sie in die mTor-Aktivierungskaskade und somit in die 4E-BP1-Phosphorylierung involviert ist (SIEMER et al. 2009). Die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) aktiviert über eine Signalkaskade das Onkoprotein Akt, welches dann zum einen über Rheb (ein G-Protein mit 20-30 kDa (HALL und TAMANOI 2010)) die Kinase mTor aktiviert und zum anderen anti-apoptotische Vorgänge in Gang bringt (FOSTER und FINGAR 2010; KALOUS et al. 2009; SANCAK et al. 2008; SARBASSOV et al. 2005a). Akt ist während der meiotischen Maturation in konstanter Menge verfügbar, aber seine Aktivität ist nur in M I hoch (TOMEK und SMILJAKOVIC 2005).

2.3.3.2 mTor

Die hochkonservierte (THOREEN 2013) Ser/Thr-Proteinkinase mTor, ein Mitglied der Phosphatidylinositol 3-Kinase-verwandten Kinasen (PIKK) -Familie (BALLOU und LIN 2008; WANG und PROUD 2006), ist nach ihrer charakteristischen Hemmbarkeit durch das Immunsuppressivum Rapamycin benannt (LIVINGSTONE und BIDINOSTI 2012).

Diese Kinase wird von AS, Hormonen, Wachstumsfaktoren und Nährstoffen (TOPISIROVIC et al. 2011; DOWLING et al. 2010; SANCAK et al. 2008; BEUGNET et al. 2003; WANG et al. 2003) über die bereits oben erwähnte PI3K/Akt-Signalkaskade aktiviert (siehe Abb. 5). Sind zu wenig AS verfügbar, die Energiereserven ungenügend oder herrscht Sauerstoffmangel in der Zelle, so wird die Aktivität von mTor herunterreguliert (KIM et al. 2013; DOWLING et al. 2010; BALLOU und LIN 2008; WANG und PROUD 2006). Die mTor-Effektoren ribosomale Protein S6 Kinase 1 (S6K1) und 4E-BP1 senden außerdem bei ausreichender Aktivierung ein negatives Feedback, damit die mTor-Aktivierung wieder gehemmt wird (BALLOU und LIN 2008; WANG und PROUD 2006).

In der Zellphysiologie übernimmt mTor Schlüsselaufgaben, indem es die Proteinsynthese von Initiations- und Elongationsfaktoren sowie die Biogenese von Ribosomen reguliert (WANG und PROUD 2006).

mTor überträgt Kinaseaktivitäten, um die TL zu kontrollieren (GKOGKAS et al. 2013) und reguliert so Wachstum (Anstieg der Zellmasse; BEUGNET et al. 2003; WANG et al. 2003), Proliferation (Anstieg der Zellzahl) und Überleben der Zelle (DOWLING et al. 2010; BALLOU und LIN 2008). Durch die Förderung der TL von „eIF4E-sensitiven“ mRNAs begünstigt mTor die Zellproliferation (DOWLING et al. 2010; WANG und PROUD 2006).

Das Enzym mTor bindet als katalytische UE an verschiedene regulatorische Untereinheiten und bildet so die zwei individuellen Komplexe mTorC1 und mTorC2 mit unterschiedlicher Signalfunktion und Sensitivität auf mTor-Inhibitoren (THOREEN 2013; BALLOU und LIN 2008). mTorC1 ist zuständig für die Phosphorylierung der Proteinkinase S6K1 und des Repressorproteins 4E-BP1 (LIVINGSTONE und BIDINOSTI 2012). 4E-BP1 ist das Hauptziel des mTORC1-Komplexes und stellt so einen kritischen Mediator der mTorC1-Funktion dar.

Die mTor-abhängige Phosphorylierung an Thr389 der S6K1 (LIVINGSTONE und BIDINOSTI 2012) aktiviert diese und führt über sie zu einer Regulierung einer Vielzahl von TL-Komponenten (Initiationsfaktoren, deren Regulatoren und ribosomalen Proteinen; FOSTER und FINGAR 2010; TOMEK et al. 2002a).

Durch die Phosphorylierung von 4E-BP1 an mehreren Stellen bewirkt mTor eine Inaktivierung des Repressorproteins, was zur Loslösung dessen von eIF4E führt und auf diesem Weg die TL stimuliert (GKOGKAS et al. 2013; THOREEN 2013; LIVINGSTONE und BIDINOSTI 2012; BEUGNET et al. 2003).

Die Aktivierung von 4E-BP1 hat Auswirkung auf die Proliferation somatischer Zellen, die der S6K1 hingegen auf deren Zellgröße (DOWLING et al. 2010).

Zudem hat der mTorC1-Komplex Auswirkung auf den Zellstoffwechsel und die reduzierte mTorC1-Signalgebung fördert Makroautophagie. Makroautophagie ist ein Abbauprozess einer Zelle, der durch die Zerlegung eigener intrazellulärer Bestandteile das Überleben dieser im Falle geringerer Nährstoffverfügbarkeit sichert (FOSTER und FINGAR 2010).

Der mTorC1-Komplex besitzt neben mTor, mammalian lethal with Sec13 protein8/G protein beta subunitlike (mLST8/GβL), DEP-domain-containing mTor-interacting protein (Deptor) und proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) das regulatorische Protein Raptor (KOGASAKA et al. 2013; FOSTER und FINGAR 2010; LAPLANTE und SABATINI 2009; BALLOU und LIN 2008), welches für die Substratbindung notwendig ist und damit die mTorC1-Signalgebung verstärkt

(DOWLING et al. 2010; FOSTER und FINGAR 2010; GWINN et al. 2008; WANG und PROUD 2006).

Auf den Inhibitor Rapamycin reagiert mTorC1, zumindest teilweise, sensitiv (GKOGKAS et al. 2013; BALLOU und LIN 2008). Die S6K1-Phosphorylierung lässt sich durch Rapamycin ganz blockieren (WANG et al. 2003), die an 4E-BP1 jedoch nur unvollständig (LIVINGSTONE und BIDINOSTI 2012; FELDMAN et al. 2009; THOREEN et al. 2009).

Der zweite Komplex, mTorC2, setzt sich aus mTor, mLST8, Deptor, mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1 (mSin1), proline-rich protein 5 (PRR5)/protein observed with rictor (Protor) und dem Regulatorprotein Rictor zusammen, welches als Gerüstprotein die mTorC2-Bildung fördert und die mTorC2-Signalübertragung vermittelt (KOGASAKA et al. 2013; FOSTER und FINGAR 2010; LAPLANTE und SABATINI 2009; BALLOU und LIN 2008).

mTorC2 phosphoryliert die Kinase Akt an Ser473, Serum/Glucocorticoid regulierte Kinase 1 (SGK1) an Ser422 und die Proteinkinase C α (PKC α) an Ser657 (FOSTER und FINGAR 2010).

Die biologischen Funktionen von mTorC2 sind nicht so eindeutig wie die von mTorC1.

Via Akt beeinflusst mTorC2 Proliferation, Überleben, Migration und metabolische Prozesse der Zelle (FOSTER und FINGAR 2010). Der mTorC2-Komplex spielt außerdem eine Rolle bei der Organisation des Aktin-Zytoskeletts (BALLOU und LIN 2008) und der Kontrolle über Zellgröße und des Zellzyklus (ROSNER et al. 2009).

Die Behandlung mit Rapamycin beeinflusst mTorC2 initial nicht; der Komplex zeigt sich, im Gegensatz zu mTorC1, bei akuter Behandlung Rapamycin-resistent (BALLOU und LIN 2008). Später aber wurde bewiesen, dass verlängerte Exposition mit Rapamycin auch bei mTorC2 zu einer Hemmung führt (LAPLANTE und SABATINI 2009; SARBASSOV et al. 2005b).

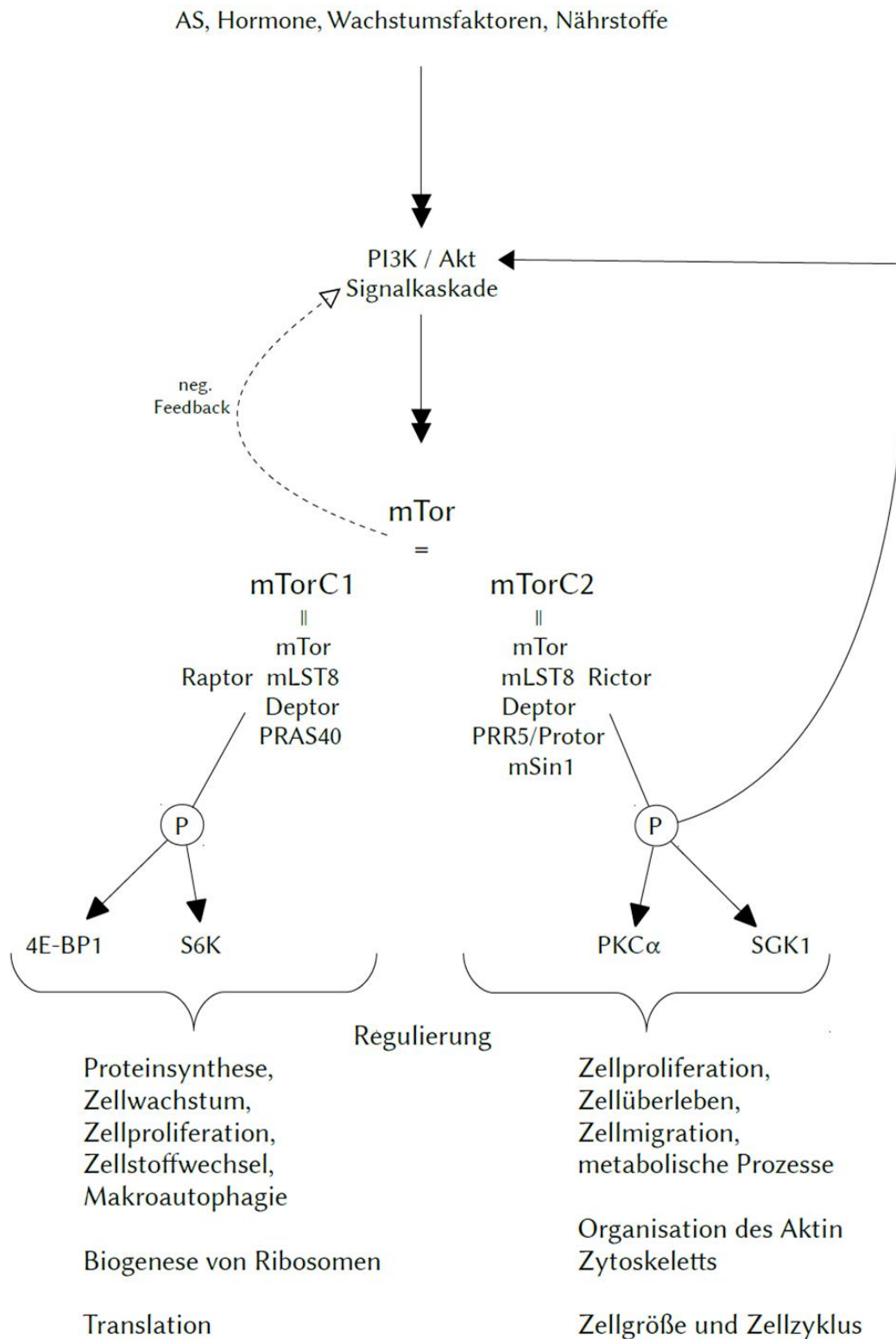


Abb. 5: Vereinfachte Darstellung des mTor-Signalweges (mit Aufbau der Multiproteinkomplexe mTorC1 und mTorC2) mit seinen regulierenden Funktionen (angefertigt nach TOPISIROVIC et

al. 2011; DOWLING et al. 2010; FOSTER und FINGAR 2010; LAPLANTE und SABATINI 2009; BALLOU und LIN 2008).

Fehlregulierungen der Komponenten des PI3K/Akt/mTor-Signalweges führen zu einem Versagen der TL-Kontrolle und zu anormalen TL-Ergebnissen (SANGES et al. 2013). Eine erhöhte Aktivierung von mTor (speziell mTorC1) zum Beispiel, bewirkt u.a. eine erhöhte 4E-BP1-Phosphorylierung, daher eine Hemmung dieses Tumorsuppressorproteins, somit einen Überschuss an ungebundenen eIF4E und eine Erhöhung der TL, speziell derer „eIF4E-sensitiver“ mRNAs (SEKIYAMA et al. 2015; GKOGKAS et al. 2013; TOPISIROVIC et al. 2011). Diese oft bei Krankheiten wie Diabetes oder Krebserkrankungen erhöhte TL kann dann unkontrolliertes Zellwachstum und Zellproliferation zur Folge haben (BALLOU und LIN 2008; BEUGNET et al. 2003).

Einige Faktoren sprechen für eine räumlich-zeitlich regulierte TL-Kontrolle durch mTor und 4E-BP1 während der Meiose. Untersuchungen an Mäuseoozyten haben gezeigt, dass phosphoryliertes mTorC1 gleichmäßig im Ooplasma verteilt ist, aber auch nahe dem meiotischen Spindel-Chromosomen-Komplex vermehrt zu finden ist (KOGASAKA et al. 2013). Auch 4E-BP1 ist, begleitet von mRNAs, welche u.a. für Zytoskelett-, Chromatin- und Signalproteine kodieren, während der Metaphasen der Meiose am Spindelapparat und den Kinetochoren angereichert. Zudem weisen die Bereiche der Spindel-Chromosomen-Komplexe einen Marker für aktive TL auf, das phosphorylierte RPS6 (ROMASKO et al. 2013). mTorC2 ist während dem Meiose-M I-Stadium im Bereich der Spindelpole lokalisiert (KOGASAKA et al. 2013).

2.4. Inhibitoren

2.4.1 Rapamycin

Der spezifische mTor-Inhibitor (BEUGNET et al. 2003) Rapamycin (siehe Abb. 6), auch bekannt unter dem Namen Sirolimus (LIU et al. 2013; BALLOU und LIN 2008; GINGRAS et al. 2001), ist ein makrozyklisches Antibiotikum natürlichen Ursprungs, welches antifungal und immunsuppressiv wirkt (THOREEN 2013; BALLOU und LIN 2008). Es findet klinische Verwendung als Immunsuppressivum (WANG und PROUD 2006) und in der Krebstherapie (LIVINGSTONE und BIDINOSTI 2012).

Rapamycin bindet an den intrazellulären Rezeptor FK-Bindungsprotein 12 (FKBP12); dieser Komplex kann dann an die FKBP12-Rapamycin Bindungsstelle (FRB) an mTor binden und so einige Funktionen von mTor blockieren (LIU et al. 2013; LIVINGSTONE et al. 2010; BALLOU und LIN 2008; WANG und PROUD 2006; BROWN et al. 1994).

Es existieren mehrere Rapamycin-Analoga in der Transplantationsmedizin und Krebstherapie, z.B. das RAD001, die den gleichen Wirkmechanismus über den FKBP12-Komplex haben und die, wie Rapamycin selbst, nur auf den mTorC1-Komplex wirken (BALLOU und LIN 2008).

Der Einsatz von Rapamycin und seinen Analoga als Medikament ist in der Humanmedizin oft sehr effektiv, doch diese Behandlung kann auch zu Problemen führen (BALLOU und LIN 2008). Bei der Verwendung dieser Immunsuppressiva kann es zu einer Reaktivierung und Hochregulierung der Proteinkinase Akt kommen, was zum Überleben von eigentlich für die Apoptose vorgesehenen Zellen führt und so in einem aggressiveren Tumorwachstum resultiert. Um dieses Problem zu lösen, könnte entweder Rapamycin in Kombination mit einem potenten Akt-Inhibitor oder ein dualspezifischer Inhibitor, der mTor und PI3K gleichzeitig spezifisch blockiert, verwendet werden. Ein weiterer Ansatz zur Therapieverbesserung wäre der Einsatz eines selektiven mTor-Kinasehemmers der neuen Generation, wie Torin2, welcher mTorC1 und mTorC2 vollständig hemmt (BALLOU und LIN 2008). Damit könnten die Nebenwirkungen durch die Reaktivierung von Akt vermieden werden und die, bisher durch

Rapamycin nur ineffizient gehemmte, Phosphorylierung an Thr37/46 von 4E-BP1, effektiv gehemmt werden (LIVINGSTONE und BIDINOSTI 2012; DOWLING et al. 2010; CHOO und BLENIS 2009).

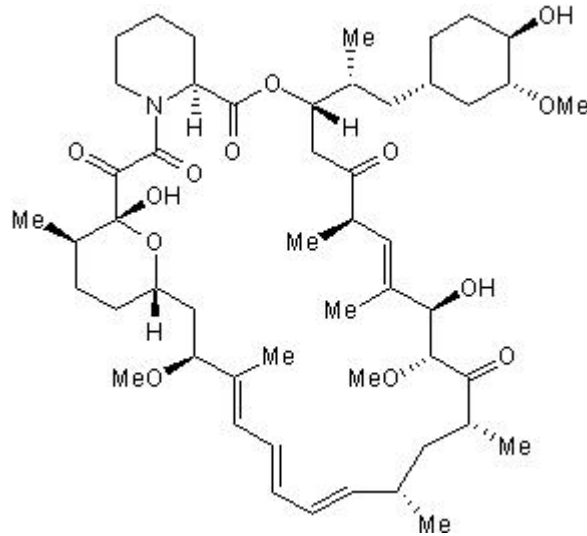


Abb. 6: Strukturformel von Rapamycin

2.4.2 Torin2

Torin2 (siehe Abb. 7) ist ein sog. active-site-mTor-Inhibitor (asTORi), der ATP-kompetitiv die katalytische Bindungsstelle von mTor blockiert und ohne Reaktivierung von Akt alle Funktionen der Kinase mTor hemmt. Der katalytische Bereich von mTor liegt separat zur Rapamycin-Bindungsstelle FRB und ähnelt dem der PI3Ks (BALLOU und LIN 2008). Bei somatischen Zellen wurde bereits eine hohe Selektivität von Torin2 auf mTorC1 und mTorC2 nachgewiesen. Mit einer finalen Konzentration von 100 nM Torin2 im Kultivierungsmedium konnten bei mehreren somatischen Zelllinien beide mTor-Komplexe inhibiert werden (LIU et al. 2013).

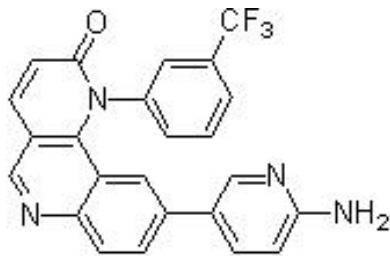


Abb. 7: Strukturformel von Torin2

Zur neuen Klasse der asTORis gehören auch die Inhibitoren Torin1 und PP242. Versuche mit Torin1 oder PP242 behandelten Zellen haben gezeigt, dass die asTORis die Rapamycin-resistente Phosphorylierung von 4E-BP1 blockieren und es dadurch zu einem stärkeren Rückgang der eIF4E-4E-BP1-Komplexen als nach Rapamycin-Behandlung kommt (LIVINGSTONE und BIDINOSTI 2012; DOWLING et al. 2010). Versuche mit 4E-BP-Doppelknockout-Mäusezellen lassen darauf schließen, dass die hemmende Wirkung der asTORis auf die eIF4F-Formation und somit auf die TL, größtenteils 4E-BP-vermittelt ist und der inhibitorische Effekt der asTORis auf die Zellgröße, auf Wirkung der S6K1 zurückzuführen ist. Die asTORis-vermittelte Hemmung der TL bezieht sich aber keineswegs auf die Gesamtheit der mRNA, sondern nur auf die Teilmenge der „eIF4E-sensitiven“ mRNAs (DOWLING et al. 2010).

3. Zielstellung

Die Proteinbiosynthese und somit die Translation im Zuge der Maturation von Oozyten ist essentiell, um den Fortgang der Meiose zu kontrollieren, da die Regulierung der Genexpression in diesem Stadium nicht mehr während der Transkription geregelt ist (ELLEDEROVÁ et al. 2008). Die Regulierung der Genexpression erfolgt hauptsächlich auf der translationellen Ebene bis das embryonale Genom aktiviert wird (TOMEK u. WOLLENHAUPT 2012; SIEMER et al. 2009; SŮSÖR et al. 2008). Deshalb ist es unumgänglich, dass die TL fein und in strengen Bahnen reguliert wird, damit sich die TL-Maschinerie sofort auf wechselnde Bedingungen einstellen kann und tadellos funktioniert (SANGES et al. 2013; SCHEPER und PROUD 2002). Ein Versagen der TL-Kontrolle kann schwerwiegende Konsequenzen haben (SANGES et al. 2013).

Die Regulierung der TL geschieht im Wesentlichen über Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von Proteinen und Kinasen, welche über verschiedene Signalwege vermittelt werden. Deswegen gilt es bezüglich der unterschiedlichen Phosphorylierungen und deren Regulierungen weitere Untersuchungen anzustellen.

Im Fokus dieser Arbeit nun steht die Proteinkinase mTor, welche an regulatorischen Prozessen während der meiotischen Maturation und der Translationskontrolle maßgeblich beteiligt ist (THOREEN 2013). Aufgrund der vorangegangenen Forschungen an Mäuseeizellen, und um mehr über die räumlich-zeitlich regulierte TL-Kontrolle zu erfahren, wurde in dieser Arbeit versucht, bei Rindereizellen die 4E-BP1-Phosphorylierung über mTor spezifisch und vollständig zu hemmen.

Viele mTor-Inhibitoren, wie z.B. Wortmannin, LY294002, Theophyllin oder Coffein, weisen das Problem auf, dass sie nicht sehr selektiv, nicht sehr potent oder nicht sehr spezifisch sind und z.B. andere Enzyme der PI3Ks ebenfalls hemmen (BALLOU und LIN 2008).

Und da selbst der eigentlich wirkungsvollste Hemmer, Rapamycin, 4E-BP1, nur unvollständig hemmt, weil die mTorC1 vermittelte Phosphorylierung an Thr37/46 Rapamycin-insensitiv ist (LIVINGSTONE und BIDINOSTI 2012) und Rapamycin den mTorC2-Komplex nicht beeinflusst, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Inhibitor einer neuen Generation mTor-Inhibitoren erstmals an bovinen Oozyten angewendet:

Der bisher wenig erforschte selektive mTor-Kinasehemmer Torin2.

Dieser ATP-kompetitive Hemmer wirkt bei somatischen Zellen mit hoher Selektivität auf beide mTor-Komplexe (LIU et al. 2013) und blockiert Funktionen, welche bisher resistent auf den Inhibitor Rapamycin waren (LIVINGSTONE und BIDINOSTI 2012; DOWLING et al. 2010; CHOO und BLENIS 2009) und es wäre von großem Interesse, die Auswirkungen der spezifischen Blockade der 4E-BP1 Phosphorylierung auf den Fortgang der Meiose zu untersuchen. Auch im Hinblick auf das bessere Verständnis der räumlich-zeitlich regulierten TL-Kontrolle im Zuge der Meiose könnte diese Hemmung sehr hilfreich sein.

Nach den nötigen Pilotversuchen sollte auf folgende Fragestellungen Antworten gefunden werden:

- Ab welcher Konzentrationsspanne des Inhibitors Torin2 sind Auswirkungen auf die Reifung der Rinder-Oozyten zu verzeichnen?
- Wie sehen die morphologischen Auswirkungen der Torin2-Behandlung auf die meiotische Oozyten-Maturation hinsichtlich der Kumulusexpansion und des Chromatinstatus aus?
- Welche Auswirkungen auf biochemischer Ebene hat die Anwendung von Torin2 auf die Reifung der bovinen Eizellen?
 - > Kann die Phosphorylierung von 4E-BP1 durch Torin2 vollständig blockiert werden?
 - > Welche Auswirkungen hat der Inhibitor auf andere TL-Faktoren (z.B. die eIF4E/4E-BP1 Bindung)?
 - > Wie sieht der Einfluss auf die wichtigen TL-Komponenten mTor, Raptor und Rictor aus?
 - > Welche Nebeneffekte hat die Behandlung mit Torin2 auf andere an der TL beteiligten Kinasesysteme?

4. Material und Methoden

4.1 In-vitro-Maturation boviner Oozyten

4.1.1 Oozytengewinnung und Vorbereitung

Als Ausgangsmaterial für die Versuche dienten Ovarien frisch geschlachteter Kühe aus dem Schlachthof in Erlangen (Bayern). Die Spendertiere waren adspektorisch gesunde Jungrinder und Kühe verschiedenen Alters, überwiegend der Rasse Deutsches Fleckvieh angehörig.

Die Eierstöcke wurden zeitnah (ca. 20 min) im Anschluss an die Tötung der Tiere über einen medianen Zugang ventral in die Bauchhöhe entnommen. Die Abtrennung der Ovarien vom Uterus und aus der Bursa ovarica erfolgte unter möglichst keimfreien Bedingungen mittels einer chirurgischen Schere. Sofort nach der Entnahme kamen die Ovarien in einen Behälter mit steriler, auf ca. 25 – 30 °C temperierter, 0,9 %iger physiologischer Kochsalzlösung (s. Anhang 10.1.1) und binnen zwei Stunden erfolgte der Transport in diesem Thermobehälter zum IVP-Labor des Besamungsvereins Neustadt an der Aisch (BVN).

Unverzüglich nach der Ankunft wurden die Eierstöcke in frischer, ca. 34 °C warmer, physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Zur weiteren Verarbeitung gelangten nur in Farbe, Form und Größe optisch einwandfreie Organe (ohne Hinweis auf Pathologien wie z.B. Entzündungen, Zubildungen, Zysten oder Verwachsungen).

Die Gewinnung der Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOKs) geschah mit Hilfe der sog. Slicing-Methode (ECKERT und NIEMANN 1995).

Die gesamte Oberfläche der mit einer Arterienklemme am Mesovar fixierten Ovarien wurde mit einer Mehrfachklinge (6 parallel in einem Halter angeordnete Rasierklingen, Fa. Wilkinson Sword, Solingen) eingeschnitten und die KOKs dann mit ca. 30 °C warmer PBS+ -Lösung (s. Anhang 10.1.2) aus den so eröffneten Follikeln in eine gläserne Petrischale gespült. Die gewonnene Flüssigkeit wurde, um größere Gewebestücke zu entfernen, durch ein Metallsieb in ein Becherglas überführt und danach filtriert (Analysesieb, Maschenweite 50 µm, Fa.

Edinger, Leinburg). Nach dem Auswaschen des Materials, welches im Sieb verblieben war, mit PBS+, erfolgte eine Überführung dessen in spezielle gerasterte Petrischalen (Keimzählschale, graduert, 94 mm Durchmesser, Greiner Bio-One, Frickenhausen) und danach eine erneute Zugabe von PBS+.

4.1.2 Selektion und Klassifizierung

Die Flüssigkeit in den Keimzählschalen wurden dann systematisch unter einem Stereomikroskop (SMZ 1000, Fa. Nikon, Düsseldorf) in 10 - 20facher Vergrößerung durchsucht. Es erfolgte eine Selektion und Überführung der KOKs in kleinere, PBS+ gefüllte Sammelschalen (Petrischale, 35 mm Durchmesser, Greiner Bio-One, Frickenhausen).

Die gewonnenen KOKs wurden anschließend unter 40 -60facher Vergrößerung klassifiziert. Die Klassifizierung erfolgte wie in Tabelle (Tab.) 1 ersichtlich ist modifiziert auf Grundlage der Beurteilung nach LEIBFRIED und FIRST 1979 hinsichtlich der Beschaffenheit des Ooplasmas und der die EZ umgebenden Kumuluszellschicht in 5 Kategorien.

Klasse 1	Dunkles, homogenes Ooplasma; Oozyten von mindestens 5-lagigem, kompakt anliegendem Kumulus oophorus umgeben
Klasse 2	Dunkles, homogenes Ooplasma; Oozyten von mindestens 3-lagigem, hauptsächlich kompakt anliegendem Kumulus oophorus umgeben
Klasse 3	Dunkles, homogenes, Ooplasma; Oozyten von mehrlagigem, aufgelockertem Kumulus oophorus umgeben
Klasse 4	Dunkles, homogenes oder granuliertes Ooplasma; Oozyten von expandiertem Kumulus oophorus umgeben
Klasse 5	Dunkles, homogenes oder granuliertes oder degeneriertes Ooplasma; Oozyten von geringem oder keinem Kumulus oophorus umgeben

Tab. 1: Klassifizierungsschema boviner KOK

(modifiziert nach LEIBFRIED und FIRST 1979).

Für die Versuche dieser Arbeit wurde ausschließlich mit KOK der Klassen 1 und 2 gearbeitet (siehe Abb. 8).

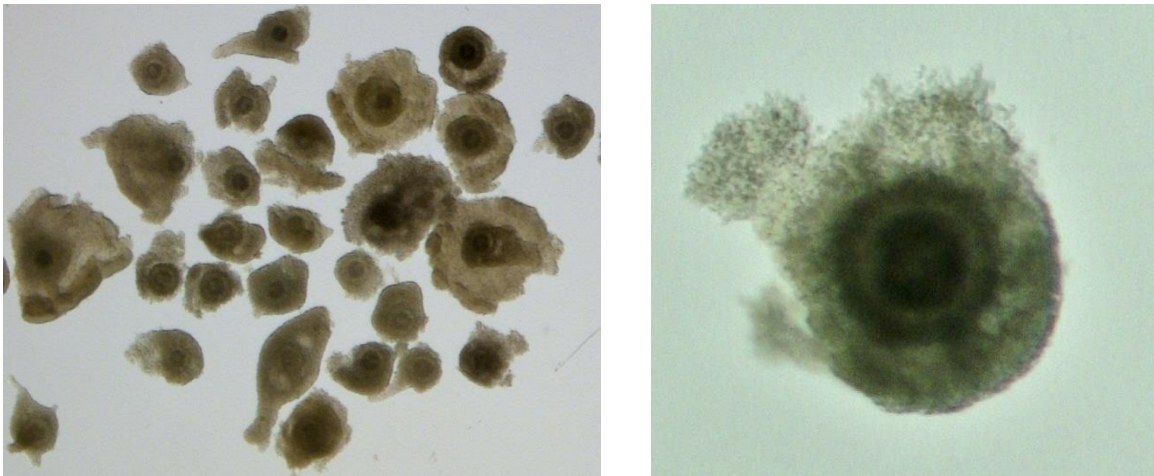


Abb. 8: Bovine KOK der Klassen 1 und 2

links: nach den Kriterien aus Tab. 1 selektierte Klasse 1 und 2 KOK;

rechts: KOK der Klasse 1. Viele Lagen kompakter Kumuluszellen umgeben eine gleichmäßig runde Oozyte mit homogenem Zytoplasma. Die Kumuluszellen umgeben die Eizelle u.a. in Form einer tief-dunklen Corona radiata.

Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Wärmeplatten (Fa. Minitüb, Tiefenbach), welche die Medien und KOKs ohne Unterbrechung auf einem konstanten Temperaturniveau von ca. 33 °C gehalten haben. Die Umsetzung der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Mikro-Pipettierhelfers (micro-classic, Fa. Brand, Wertheim) mit 20 µl gläsernen Einmal-Mikropipetten (Blaubrand intraMARK, Fa. Brand, Wertheim). Das Pipettieren der Medien erfolgte mittels manueller Pipetten (Reference, 10/100/1000 µl, Fa. Eppendorf, Hamburg) mit entsprechenden sterilen Spitzen (Eppendorf epT.I.P.S., Fa. Fisher Scientific, Schwerte).

4.1.3 Maturation

Nach der Klassifizierung wurden die KOKs dreimal in Reifungsmedium (s. Anhang 10.1.4) gewaschen und schließlich in 4-well Maturationsschalen umgesetzt (Multiplatte Nunclon 4 Wells, runder Boden, Fa. Fisher Scientific, Schwerte). Die Anzahl KOKs pro Well betrug konstant ca. 30 - 40 Stück. Die Medien wurden mindestens 3 h vor Verwendung frisch vorbereitet (TCM-Grundmedium mit 3 mg/ml BSA versetzt), in die entsprechenden Schalen gegeben und zur Äquilibration des pH-Wertes des Mediums in den Brutschrank (CO₂-Brutschrank INCOmed, Fa. Memmert, Schwabach) bei 38,5 °C, 5 % CO₂ und feuchtigkeitsgesättigtem Milieu gegeben. Das TCM-Grundmedium selbst wurde, nachdem es steril hergestellt wurde, in Glasfläschchen luftdicht verschlossen und im Kühlschrank für eine Dauer von maximal zwei Wochen gelagert. Nur die entsprechende Menge für die Ansätze wurde jeweils am Versuchstag mit einer sterilen Spritze entnommen.

Pro Well einer Maturationsschale wurden 396 µl fertiges Reifungsmedium verwendet.

Dem TCM-Grundmedium wurde einzig bovines Serumalbumin (BSA, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) in einer Konzentration von 3 mg/ml zugesetzt, da sonstige Zugaben wie Hormone oder Serum im Reifungsmedium, die Analysen nachteilig beeinflusst hätten.

Die Medien wurden stets mit einem sterilen Filter (Infufil Air, Fa. Fresenius Kabi, Bad Homburg) in die entsprechenden Schalen bzw. Flaschen filtriert.

Grundlage für die Maturation der KOKs war die Methode beschrieben von TORNER et al. 2001.

4.2 Versuchsanordnung und -ablauf

Aus dem Inhibitor Torin2 (Fa. Tocris Bioscience - R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt), welcher in Pulverform vorlag, wurde eine 20 mM Stocklösung hergestellt, indem das Pulver in entsprechender Menge (s. Anhang 10.2) Dimethylsulfoxid (DMSO, Fa. Serva, Heidelberg) gelöst wurde. Diese Stocklösung wurde dann mit DMSO entsprechend weiter verdünnt, um dann im Reifungsmedium, durch Zugabe von 4 µl der Verdünnung, eine finale Konzentration

von 1, 2, 3 bzw. 5 μM zu erhalten. Jeweils 20 μl einer Verdünnung wurde in Reaktionsgefäße (Eppendorf Safe-Lock Tubes 0,5 ml, Fa. Fisher Scientific, Schwerte) aliquotiert und bei -20°C tiefgefroren. So ließen sich mögliche Verfälschungen der Ergebnisse durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen vermeiden. Die maximale Lagerungsdauer der tiefgefrorenen Stammlösung und Verdünnungen von Torin2 betrug einen Monat.

Der Inhibitor bzw. das reine DMSO bei den Kontrollen (KTR) wurden in einem Volumen von 4 μl dem entsprechenden Well unmittelbar vor Beginn der Überführung der Maturationschalen in den Brutschrank zugegeben.

Die KOK zum Zeitpunkt 0 h wurden sofort nach der Klassifizierung ohne Inkubation weiterverarbeitet.

Der Gruppe KOK, welche 10 h IVM erfahren sollten wurden mit 4 μl reinem DMSO in 396 μl Maturationsmedium versetzt in den Brutschrank gegeben.

Alle anderen wurden pro Konzentrationsansatz in 4 Gruppen für die Maturation eingeteilt.

Es wurden jeweils zwei Kontrollgruppen angelegt, von denen die eine 24 h und die andere 48 h lang mit 4 μl reinem DMSO in 396 μl Maturationsmedium versetzt in den Brutschrank kam.

Dann wurden jeweils zwei Inhibitorgruppen gebildet, welche beide für 24 h mit dem entsprechend konzentrierten, in DMSO gelösten Torin2 versetzt wurden (die finalen Konzentrationen betragen 1, 2, 3 und 5 μM). Nach 24 h wurde dann die eine Gruppe aus der Maturation genommen und weiterverarbeitet und die andere Gruppe wurde für weitere 24 h, jedoch nur in Kontrollmedium ohne Torin2, erneut inkubiert. Eine Übersicht der Versuchsgruppen des Hauptversuches ist in Tab. 2 ersichtlich.

Kontrollgruppen	0 h	KOK direkt nach Entnahme; keine Maturation
	10 h	KOK 10 h IVM; Zugabe von 4 µl DMSO in 396 µl Maturationsmedium; keine Zugabe von Torin2
	KTR 24 h	KOK 24 h IVM; Zugabe von 4 µl DMSO in 396 µl Maturationsmedium; keine Zugabe von Torin2
	KTR 48 h	KOK 48 h IVM; Zugabe von 4 µl DMSO in 396 µl Maturationsmedium; keine Zugabe von Torin2
Inhibitorgruppen	24 h Torin2	KOK 24 h IVM; Zugabe von 4 µl Torin2 (einer bestimmten Konzentration) in 396 µl Maturationsmedium
	48 h +/- Torin2	KOK 24 h mit 4 µl Torin2 (in 396 µl Maturationsmedium) IVM und anschließend 24 h ohne Torin2 IVM (nur mit 4 µl DMSO in 396 µl Maturationsmedium)

Tab. 2: Auflistung der Inhibitor- und Kontrollgruppen

Bezeichnung der Gruppe in Spalte 2; Spalte 3: Angabe der jeweiligen Maturationszeit in Stunden und der dem Reifungsmedium zugefügten Substanzen.

Die Reifungsbedingungen im Inkubator blieben für alle Gruppen konstant bei einer Temperatur von 38,5 °C, einer CO₂-Konzentration von 5 % und maximal gesättigter Luftfeuchtigkeit.

4.3 Morphologische Beurteilung der Oozyten

4.3.1 Vorgehen nach der Maturation

Mit dem Ende der Maturationszeit wurden die KOKs dem Brutschrank entnommen und initial die Kumulusexpansion beurteilt. Dies geschah mit Hilfe einer digitalen Mikroskopkamera (DS-Fi2, Fa. Nikon, Düsseldorf) und zugehöriger Software (NIS-Elements F), welche es ermöglichte, durch das Abfotografieren der einzelnen Wells, die KOKs der einzelnen Gruppen miteinander zu vergleichen.

Nachdem dies erfolgt war, wurden die KOKs innerhalb ihrer Gruppen aus dem Reifungsmedium in 4-Well Schalen mit 400 µl PBS+ umgesetzt.

Anschließend wurden die Kumuluszellen von 50 EZ durch vorsichtiges wiederholtes Pipettieren (maximale Pipettiereinstellung: 50 µl) von den Oozyten getrennt und in separate Wells mit frischem PBS+ überführt.

Die wenigen, noch den EZ anhaftenden restlichen Kumuluszellen wurden dann durch die zweiminütige Behandlung mit Hyaluronidase-Lösung (s. Angang 10.1.5) und anschließendem wiederholtem Auf- und Abpipettieren (maximale Pipettiereinstellung: 70 µl) vollständig entfernt und verworfen. Die EZ wurden im Anschluss mehrmals in PBS+ gewaschen, um die Hyaluronidase-Lösung vollständig zu entfernen und deren Wirkung zu aufzuheben.

Die nun denudierten Oozyten wurden dann entweder für die morphologische Beurteilung ihres Chromatinstatus fixiert und gefärbt oder um weitere molekularbiologische Analysen im Leibniz-Institut für Nutztierbiologie in Dummerstorf durchzuführen, vorerst bei -196°C in flüssigem Stickstoff tiefgefroren (siehe Kapitel 4.4.1.1).

Die gewonnenen Kumuluszellen von 50 EZ wurden ebenfalls unter Beibehaltung ihrer ursprünglichen Gruppierung in Reaktionsgefäßen (Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 ml, Fa. Fisher Scientific, Schwerte) in jeweils 10 µl PBS- (s. Anhang 10.1.6) bei -196 °C tiefgefroren.

Bis zur Fixierung bzw. dem Einfrieren erfolgten seit Ende der Maturation alle Arbeitsschritte wieder auf Wärmeplatten und mit vorgewärmten Flüssigkeiten.

4.3.2 Fixierung

Um die EZ hinsichtlich ihres meiotischen Zellzyklusstandes beurteilen zu können, wurde deren Chromatinkonfiguration ermittelt. Dazu mussten die vollständig denudierten Oozyten zunächst fixiert werden.

Es war wichtig, dass vor dem Fixieren keine Kumuluszellen mehr an den EZ haften, da dies die morphologische Auswertung behindert hätte.

Eine Fixierlösung, hergestellt aus drei Teilen Ethanol (E. absolut, Fa. VWR, Darmstadt) und einem Teil Eisessig (Essigsäure 100 %, Fa. VWR, Darmstadt), wurde für mehrere Versuchsreihen im Kühlschrank gelagert.

Eine weitere Vorbereitung bestand darin, mehrere Objektträger (geschliffen mit Mattrand, Fa. VWR, Darmstadt) mit je vier feinen parallelen Streifen mittelvisköser Silikonpaste (Baysilone, Fa. Fisher Scientific, Schwerte) zu versehen. Unter einem Auflichtmikroskop wurden dann jeweils ca. 7 - 10 Eizellen in einem 5 μ l PBS+ Tropfen mittig zwischen zwei Silikonstreifen pipettiert und unverzüglich mit einem Deckgläschen (18x18 mm, Fa. VWR, Darmstadt) abgedeckt (s. Abb. 9). Das Deckgläschen wurde dann vorsichtig an den Silikonrändern nach unten gedrückt, um die Oozyten zu fixieren. Wichtig hierbei war, dass der Druck gleichmäßig und nicht zu stark erfolgte, da die EZ sonst platzten. Sobald die Zellen zwischen Objektträger und Deckglas fixiert waren, wurde dieser Raum unter dem Deckgläschen komplett mit oben genannter (o.g.) Fixierlösung aufgefüllt, sodass die Oozyten vollständig von dieser umgeben waren. Die fertigen Objektträger wurden dann in gläserne Küvetten gegeben, die gerade soweit mit Fixierlösung gefüllt waren, dass die EZ nicht austrockneten. Die mit Verschlussfolie (Parafilm, Fa. Fisher Scientific, Schwerte) luftdicht verschlossenen Küvetten wurden dann bis zur Färbung und anschließender Auswertung maximal eine Woche im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

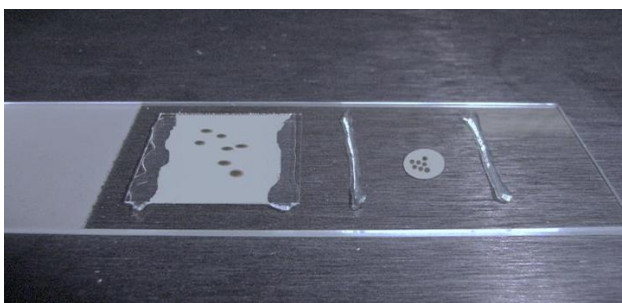


Abb. 9: Bildliche Darstellung des Fixiervorgangs der Oozyten

rechts: EZ in PBS+ Tropfen zwischen Silikonstreifen; links: EZ fixiert unter Deckgläschen.

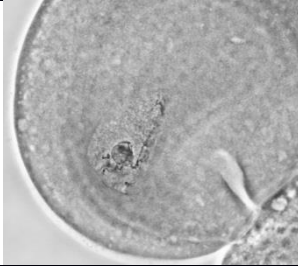
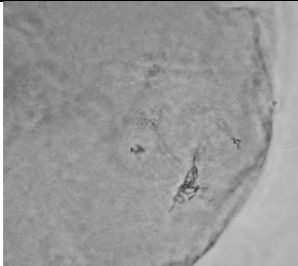
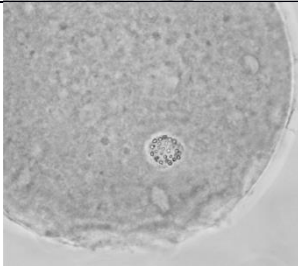

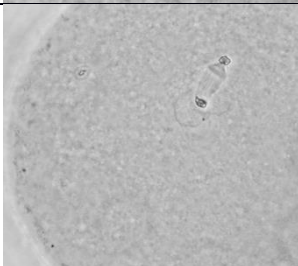
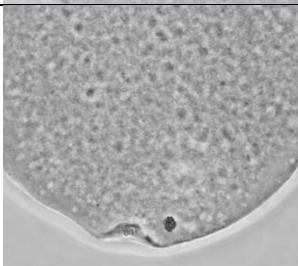
4.3.3 Färbung

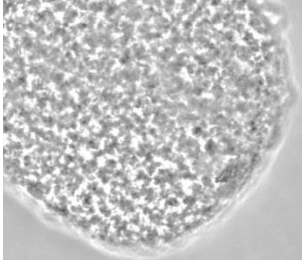
Um das Chromatin der einzelnen Zellen mikroskopisch sichtbar zu machen, wurden die fixierten Oozyten mit einer 2 %igen Aceto-Orcein-Lösung (s. Anhang 10.3) gefärbt.

Dazu wurden die Objektträger aus der Fixierlösung genommen, abgetupft und die Färbelösung durch Kapillarsogwirkung mit einer Pasteurpipette aus Glas (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) und einem Streifen Filterpapier (OWL FP-1, Fa. VWR, Darmstadt) unter das Deckgläschen gebracht. Die Zellen wurden der Färbung 10 min lang ausgesetzt. Nach dieser Periode wurde die Farbstofflösung mittels 30 %iger Essigsäure (Fa. AppliChem, Darmstadt) wieder entfernt und die Objektträger bis zur mikroskopischen Beurteilung in feuchten, geschlossenen Glasschalen gelagert, um ein Austrocknen zu verhindern.

4.3.4 Untersuchung der Chromatinkonfiguration

Unter einem Phasenkontrastmikroskop (Eclipse E400, Fa. Nikon, Düsseldorf) wurde dann das meiotische Zellzyklusstadium jeder Oozyte bestimmt. Bei 100 - 400facher Vergrößerung wurden die EZ nach ihrer gefärbten Chromatinkonfiguration in die Entwicklungsstadien GV, GVBD, M I, Ana I, Telo I und M II eingeordnet und die degenerierten Zellen (deg.) vermerkt (s. Tab. 3). Von jeder Versuchsgruppe (s. Tab. 2) wurden mindestens 200 Rinder-Oozyten gefärbt und ausgewertet.

GV		<p>Großer ZK vorhanden Germinalvesikel-Membran sichtbar Deutlicher Nukleolus Chromatin relativ fädig</p>
GVBD		<p>Abbau der Germinalvesikel-Membran Chromatin beginnt zu kondensieren, Chromosomenpaarung beginnt</p>
M I		<p>GV vollständig aufgelöst Chromatin vollständig zu Chromosomen kondensiert Maximal verdichtete Chromosomen ordnen sich in Äquatorialebene an</p>
Ana I		<p>Umgruppierung des Mikrotubuli-Netzwerkes zum Spindelapparat abgeschlossen Chromosomen werden aus Äquatorialebene heraus, zu den Spindelpolen gezogen und geschoben</p>
Telo I		<p>Spindelapparat noch sichtbar Chromatiden werden getrennt Vollständige Trennung des genetischen Materials an beide Spindelpole</p>
M II		<p>Erste Reifeteilung ist abgeschlossen Ein haploider Chromosomensatz bleibt bestehen PK I bildet sich und schleust überschüssiges genetisches Material aus</p>

<p>Deg.</p>		<p>Degenerierte Oozyte Zytoplasma ist wabig-schollig fragmentiert Zellmembran undeutlich</p>
--------------------	---	--

Tab. 3: Übersicht über die verschiedenen Meiosestadien boviner Oozyten

Spalte 1: Jeweiliges Meiosestadium der Eizelle; Spalte 2: entsprechende Fotos fixierter, mit Aceto-Orcein gefärbter Oozyten; Spalte 3: genaue Beschreibung des jeweiligen Bildes; Beschreibungen in Anlehnung an SÜSS et al. 1988 und MURKEN et al. 2011.

4.4 Biochemische Untersuchung der Oozyten

4.4.1 Elektrophorese und Western blot

4.4.1.1 Vorbereitung der Zellen

Die denudierten Oozyten, welche für die weiteren molekularbiologischen Untersuchungen verwendet werden sollten, wurden wie folgt eingefroren. Dazu wurden die EZ zweimal in PBS-gewaschen, um sämtliche noch vorhandenen Proteinreste zu entfernen. Im Anschluss daran wurden exakt 50 Oozyten in genau 5 µl PBS- in jeweils ein Reaktionsgefäß (Eppendorf Safe-Lock Tubes 0,5 ml, Fa. Fisher Scientific, Schwerte) pipettiert und in flüssigem Stickstoff bei ca. -196 °C schockgefroren und gelagert.

Die tiefgefrorenen Proben wurden auf Trockeneis (Fa. Cleanas, Willingen) für die weiteren Analysen nach Dummerstorf ins Leibniz-Institut für Nutztierbiologie gebracht (maximale Transportzeit auf Trockeneis 20 h).

4.4.1.2 SDS- und Phos-tag-PAGE

Für die Durchführung des herkömmlichen Western blots mittels Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI 1970 wurden die jeweiligen Proben zunächst in dreifach konzentriertem SDS-Probenpuffer Blue Loading Buffer (siehe Anhang 10.4.1) lysiert und dann für 3 min auf eine Temperatur von 95 °C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Im Anschluss daran wurden die nun linearisierten Proteine (jeweils von exakt 50 Oozyten) entweder unverzüglich nach Zentrifugation auf das fertige, vertikale und wassergekühlte Elektrophoresegel [siehe unten (s.u.)] aufgetragen oder bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C tiefgefroren und gelagert. Zusätzlich zu den Eizellproteinen wurde als Molekülmassenstandard ein geprüfter Proteinmarker [Color Prestained Protein Standard, Broad Range 11 – 245 kDa; New England BioLabs (NEB), Frankfurt] zugesetzt.

Die Matrix, auf der die Proteine nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt wurden, wurde je nach zu erwartendem Molekulargewicht (MW) gewählt. Für sehr kleine Proteine mit einem MW < 20 kDa wurde mit einem 15 %igen, für Proteine mit einem MW von 10 – 100 kDa wurde mit einem 12,5 %igen und für große Proteine wurde mit einem 7,5 %igem Gel gearbeitet (Polyacrylamid-Trenngele s. Anhang 10.4.2). Das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid der Matrix betrug stets 30 : 0,8. Nach 2 h bei Raumtemperatur war die Polymerisation abgeschlossen und das Gel erfuhr eine Glättung mit Isobutanol (gesättigt; Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim). Auf dieses Trenngel wurde dann ein 5,0 %iges Sammelgel (s. Anhang 10.4.3) gegeben und dabei mittels eines Kamms Taschen für die Proben ausgespart. Das System wurde dann mit einem Elektrophoresepuffer nach LAEMMLI (s. Anhang 10.4.4) befüllt.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte im Gel mittels einer Stromstärke von 30 mA von der Anode zur Kathode bei einer angelegten Spannung von 450 V. Der im Ladungspuffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau zeigte das Erreichen des Endes des Gels als Laufmittelfront an. Sobald der Marker die Matrix komplett passiert hatte, wurde die Elektrophorese beendet.

Für die Analyse der spezifischen Phosphorylierungsstellen bestimmter Proteine (hier von 4E-BP1) nach der von AGUILAR et al. 2011 beschriebenen Phos-tag-SDS-PAGE wurde ein

binukleärer Metallkomplex, welcher als selektives Phosphat-bindendes Tag-Molekül (Phos-tag) agiert, im 12,5 %igen Gel (s. Anhang 10.4.2) verwendet.

Bei der Phos-tag-SDS-PAGE handelte es sich um eine Modifikation der herkömmlichen SDS-PAGE, welche die spezifische Auftrennung von Phosphorproteinen im Zuge einer Elektrophorese ermöglichte. Durch den analogen Phos-tag Metallkomplex mit zwei Mangan(II, Mn^{2+}) Ionen, welcher vor der eigentlichen Gelelektrophorese in die Polyacrylamidgel-Matrix eingebracht wurde, verzögerte sich die Migration des Proteins proportional zu dessen Phosphorylierung.

Durch die verzögerte Wanderung der phosphorylierten Protein-Isoformen konnte so ein einzelnes Protein in multiple Banden aufgetrennt werden, von denen jede mit einem unterschiedlichen Phosphorylierungsstatus des Proteins in Verbindung stand. Dies ermöglichte neben der Entdeckung neuer Phosphorylierungen eines Proteins auch die Quantifizierung des einzelnen Phosphorylierungsstatus bzw. der einzelnen Phospho-Isotypen (AGUILAR et al. 2011).

Das Phosphat-Bindungsmarker-Reagenz [Mn^{2+} -Phos-tag; Fa. Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan] und Mangan(II)-chlorid [$MnCl_2$; Sigma Aldrich, Steinheim] wurden beide in einer finalen Konzentration von 50 μM in der Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung dem Gel vor der Polymerisation zugesetzt. Nach dem Ende der Elektrophorese wurden die zweiwertigen Mangan-Ionen vom Gel entfernt, indem die Matrix für insgesamt 20 min 3 mal in SDS-Pufferlösung mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; Sigma Aldrich, Steinheim, 1,5 mM Endkonzentration) inkubiert und anschließend noch einmal für 10 min in SDS-Puffer ohne EDTA gewaschen wurde. Die Anzahl der Oozyten pro Probe belief sich auch bei der Phos-tag-SDS-PAGE auf 50 Eizellen.

Für alle hier durchgeführten Polyacrylamidgel-Elektrophoresen wurde das Mighty Small SE 250 Elektrophoresesystem (Hofer, Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet.

4.4.1.3 Western blot-Analyse

Nach dem Beenden der Elektrophorese wurden die nun aufgetrennten Proteine fixiert und nach der Methode von KYHSE-ANDERSEN 1984 elektrophoretisch auf eine Polyvinylidene Difluorid (PVDF)-Membran (Immobilon; Fa. Millipore, Darmstadt) mit 0,45 µm Porengröße, übertragen. Hierbei kam ein Semi-Dry Elektroblotting-Gerät (Pierce™ Power Blotter; Fa. Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) zum Einsatz.

Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membranen erfolgte mittels eines Semi-Dry Sandwich-Blot-Verfahrens, der Verwendung eines Drei-Puffer-Systems nach Towbin (s. Anhang 10.4.5) und mit einer angelegten Stromstärke von 1 mA pro Quadratcentimeter für 60 min.

Nach dieser Übertragung wurden die PVDF-Membranen zweimal mit einer frischen Tris-gepufferten Kochsalzlösung mit Polyoxyethylenesorbitanmonolaurate (Tween20) -Detergens (TTBS; s. Anhang 10.4.6) versetzt, gewaschen und anschließend für eine Stunde bei 4 °C Temperatur in mit 5 % fettfreiem Trockenmilchpulver (pH-Wert 7,4) versetzter TTBS inkubiert. Diese Behandlung diente dazu, die freien unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Dann erfolgte eine dreimalige Waschung mit TTBS.

Nachfolgend wurde pro Blot jeweils der entsprechende spezifische Erstantikörper (Verdünnungen der Antikörper s. Tab. 4) aufgetragen und die Blots über Nacht mit 5 % BSA gelöst in TTBS bei 4 °C inkubiert.

Anschließend folgte nach drei zehninütigen Waschungen in TTBS die Inkubation mit dem jeweiligen sekundären, mit dem Marker-Enzym Meerrettichperoxidase (HRP; horseradish peroxidase) konjugierten Antikörper (s. Tab. 4) in 5 % fettfreiem Trockenmilchpulver gelöst in TTBS für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur.

Nach der erneuten dreimaligen Waschung in TTBS und einmal in doppelt destilliertem Wasser war der Blot fertig für die Auswertung.

Es folgte eine Auswertung der Western blots mit verstärktem Chemolumineszenzverfahren (ECL).

Nach Inkubation der Membran in ECL Prime Reagens (Fa. GE Healthcare, München, Deutschland; RPN 2236; s. Anhang 10.4.7), wie vom Hersteller angegeben (je nach Substratmenge zwischen 2 und 5 min Inkubationszeit), wurden in der Dunkelkammer die Signale auf Amersham Hyperfilm ECL (Fa. GE Healthcare, München; 28906837) unterschiedlichen Belichtungszeiten (wenige Sekunden bis zu 15 min) ausgesetzt.

Danach wurden die Filme mit dem Camilla Camera System (Fa. Raytest, Straubenhardt, Deutschland) digitalisiert und mit Hilfe der Aida Software (Fa. Raytest, Straubenhardt, Deutschland) quantitativ und qualitativ ausgewertet.

4.4.1.4 Antikörper im Western blot

Sämtliche im Western blot verwendete AK (s. Tab. 4) wurden von der Firma Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA) bezogen, außer der 4E-BP3-AK, welcher von der Firma Abcam (Cambridge, UK) erworben wurde.

<u>Antikörper 1</u>	<u>Verdünnung AK 1</u>	<u>Antikörper 2</u>	<u>Verdünnung AK 2</u>
4E-BP1	1:500	Anti-Rabbit IgG aus der Ziege (HRP-markiert)	1:1500
p4E-BP1 für Thr37/46 und Thr70	1:350		1:1050
4E-BP2	1:500		1:1500
4E-BP3	1:500		1:1500
eIF4E	1:3000		1:9000
peIF4E für Ser209	1:500		1:1500
MAPK	1:4000		1:12000
pMAPK für Thr202/Tyr204	1:3000		1:9000
mTor	1:1000		1:3000
pmTor für Ser2448	1:700		1:2100
Raptor	1:1200		1:3600
pRaptor für Ser792	1:1000		1:3000
Rictor	1:700		1:2100
pRictor für Ser1135	1:700		1:2100
ACTB	1:600		1:1800
PKA, PKB, PKC	1:400		1:1200
ATM/ATR	1:400	1:1200	
CDKs	1:1000	1:3000	

Tab. 4: Auflistung der im Western blot verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen

Erstantikörper (Spalte 1) wurde mit TTBS mit 5 % BSA verdünnt (Spalte 2) und Zweitantikörper (Spalte 3) mit TTBS mit 5 % Trockenmilchpulver (Spalte 4).

4.4.2 Immunpräzitations-Analysen von eIF4E

Für die Durchführung der eIF4E-Immunpräzitation erhielten die Proben von je 200 Oozyten eine Zugabe von 100 µl Zell-Lysis-Puffer (s. Anhang 10.4.8) und 1,5 µl Lösung Anti-eIF4E-Antikörper. Bei dem Antikörper handelte es sich um einen monoklonalen anti-eIF4E Immunglobulin G aus der Maus als Konjugat mit Agarose (Fa. Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland). Die oben genannte Lösung kam bei 4 °C und unter konstanter Bewegung über Nacht zur Inkubation.

Danach wurde die Agarose (Protein G PLUS-Agarose; Fa. Santa Cruz, Heidelberg) drei Mal mit Lysis-Puffer gewaschen und jeder Probe 20 µl davon zugegeben.

Nachdem die Proben zwei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt wurden, kamen sie anschließend zwei Mal mit je 100 µl Lysis-Puffer für jeweils 1 min bei 13000 rpm zum Waschen in die Zentrifuge. Die gebundenen Proteine wurden dann durch Zentrifugieren mit dreifach konzentriertem SDS-Probenpuffer (s. Anhang 10.4.1) für 5 min bei 13000 rpm herausgelöst. Nachdem die Denaturierung des Überstandes der zentrifugierten Proben für 2 min bei 95 °C erfolgt war, wurden die Proben auf das Gel aufgetragen.

Zur Auswertung diente schließlich ebenfalls das unter 4.4.1.3 beschriebene verstärkte ECL-Verfahren.

4.4.3 Untersuchung spezifischer Substratphosphorylierungen bestimmter Kinasen

Die spezifische Phosphorylierung an bestimmten Stellen von Substraten durch individuelle Kinasen wurde mit dem Analyse-Set Phospho-(Ser/Thr) Kinase Substrate Antibody Sampler Kit No. 9920 (Fa. Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA) untersucht. Dieses Nachweis-Kit liefert AK für spezifische AS-Sequenzmotive (s. unten Tab. 5), welche in ihrer phosphorylierten Form auf Western blots erkannt werden.

Zum Einsatz hierfür kamen Deca-Probe-Unit Apparaturen (PR 150 Deca-Probe Incubation Manifold; Fa. GE Healthcare, Freiburg), welche es ermöglichten, eine Probe (aus 150 Eizellen) zeitgleich auf die substratspezifische Phosphorylierung vieler Kinasen hin zu untersuchen.

Vor dem eigentlichen Blotting wurden hier präparative Taschenformer (Hoefer Comb for SE 250/SE 260 1/1 Wells; Fa. Fisher Scientific, Schwerte) über die gesamte Matrix eingeführt. Mit dieser Dekaprobe-Maske war es dann möglich, ein und dieselbe Probe mit verschiedenen Antikörpern (bis zu 10 verschiedene bei einer Probe von 150 Eizellen) gleichzeitig zu beproben (s. auch WOLLENHAUPT et al. 2013). Dies brachte u.a. den enormen Vorteil, dass mehrere Parameter mit weniger Material zu analysieren waren. Dies war auf Grund der sehr aufwändigen Gewinnung und oft geringen Anzahl gewonnener Oozyten von Rindern eine sehr vorteilhafte Methode.

Bei dieser Untersuchung erfolgten die Elektrophorese, der Membrantransfer, das Immunoblotting und die Auswertung wie oben in Kapitel 4.4.1 beschrieben; wobei alle phosphospezifischen Antikörper 1:1000 in TTBS mit 5 % BSA verdünnt wurden.

Spezifische Antikörper für Substrate von:	Spezifische Phosphorylierungsstellen, die der Antikörper erkennt
PKA	Motiv RRXS*/T*
PKB	Proteinsequenzen, die phosphoryliertes Serin/Threonin mit vorhergehendem Arginin an Position -5 und -3 enthalten, wobei diese Phosphorylierungsstellen von umgebenden Aminosäuresequenzen größtenteils unabhängig sind
PKC	Proteinsequenzen, wenn diese an Serin-Stellen, umgeben von Arginin oder Lysin an den Positionen -2 und +2 und von einem hydrophoben Rest an Position +1, phosphoryliert sind
CDKs	phosphoryliertes Serin im Motiv (K/R)(S*)PX(K/R)
ATM/ATR	Proteinsequenzen, die phosphoryliertes Serin/Threonin enthalten, dem eine hydrophobe Aminosäure an Position -1 vorangeht und dem Glutamin an Position +1 folgt
MAPK/CDK	phosphoryliertes Threonin, wenn Prolin folgt, unabhängig vom übrigen Umfeld

Tab. 5: Übersicht der spezifischen Antikörper

(Spalte 1) für spezifische Phosphorylierungsstellen der Substrate (Spalte 2) von PKA, PKB, PKC, CDKs, AMT/ATR und MAPK/CDK;

4.5 Statistische Auswertung

Die Absorption der Western blot-Signale wurde von fünf unabhängigen Versuchsansätzen auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht, mit dem Camilla Camera System (Fa. Raytest, Straubenhardt) digitalisiert und mit Hilfe der Aida Image Analyzer Software (Fa. Raytest, Straubenhardt) quantifiziert. Um die Expressionslevel der Ergebnisse zu normalisieren und um sicherzustellen, dass die Proteinmengen gleichmäßig verteilt waren kam bei jedem Western blot als Ladungskontrolle β -Actin (Ladungskontroll-Protein; ACTB) zum Einsatz.

Die Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen zur Erstellung von Diagrammen erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel (Windows).

Signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) zwischen den Versuchsgruppen wurden mittels t-Test, Chi-Quadrat-Test und Mann-Whitney-U-Test beurteilt. Statistische Auswertungen der Daten der biochemischen Untersuchungen wurden am Leibniz-Institut für Nutztierbiologie in Dummerstorf mit der SAS-Software

Version 9.4 (Fa. SAS-Institute, Cary, NC, USA) durchgeführt.

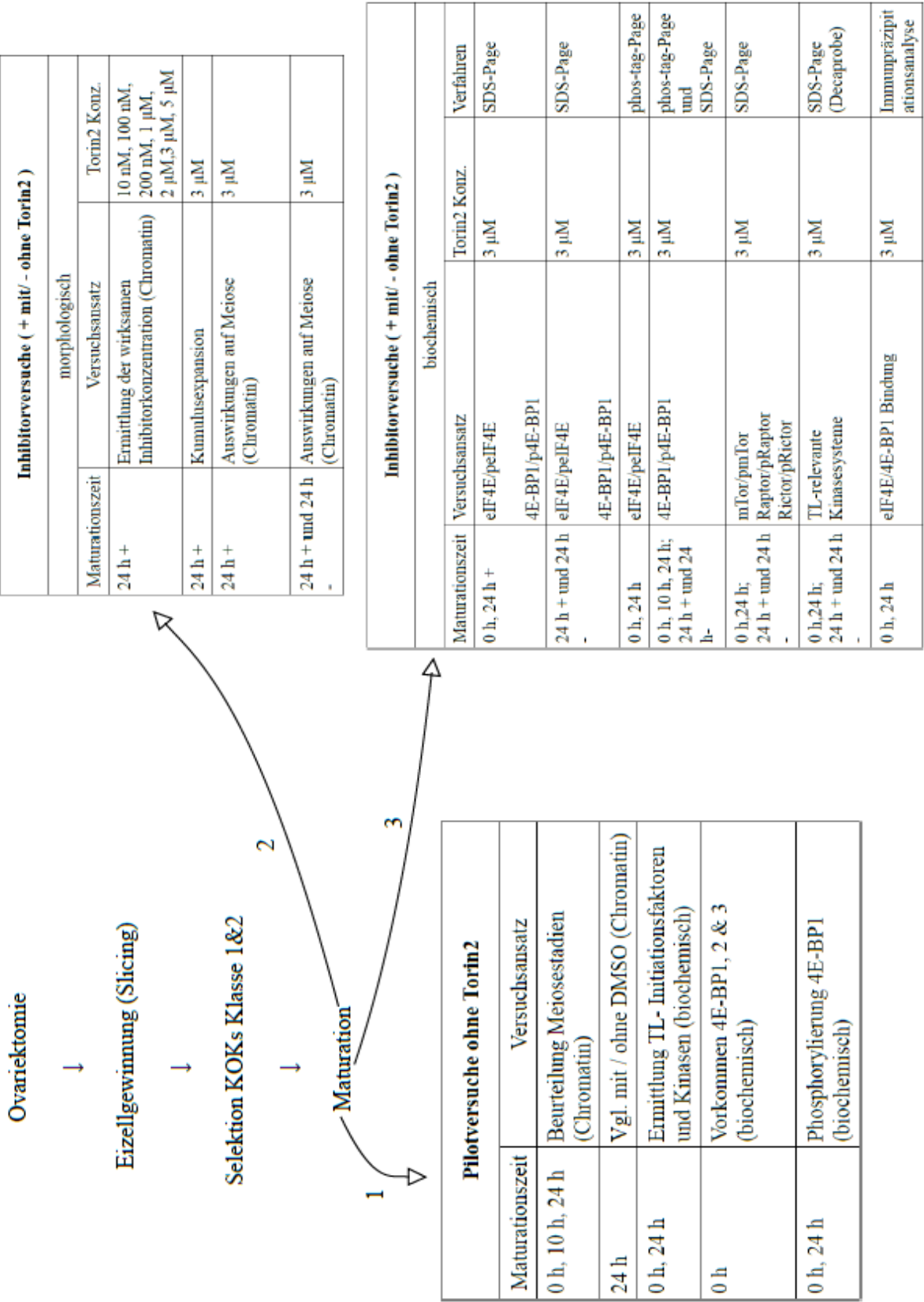


Abb. 10: Schema des gesamten Versuchsplans

5. Ergebnisse

5.1 Vorversuche

5.1.1 Pilotversuche vor Verwendung von Torin2 hinsichtlich der Morphologie

5.1.1.1 Untersuchung von GV , M I und M II Oozyten nach ihrer Chromatinkonfiguration

Um sicherzustellen, dass die Oozyten dem Versuchsansatz entsprechend in vitro reifen und nach bestimmten Zeiten bestimmte Meiosestadien erreichen, wurden zunächst Untersuchungen an unbehandelten EZ durchgeführt.

Dabei wurden in 66 Einzelversuchen insgesamt 730 EZ für 0 h, in 54 Einzelversuchen 614 EZ für 10 h und in 60 Einzelversuchen 1184 EZ für 24 h inkubiert, anschließend fixiert, gefärbt und die Chromatinkonfiguration bestimmt.

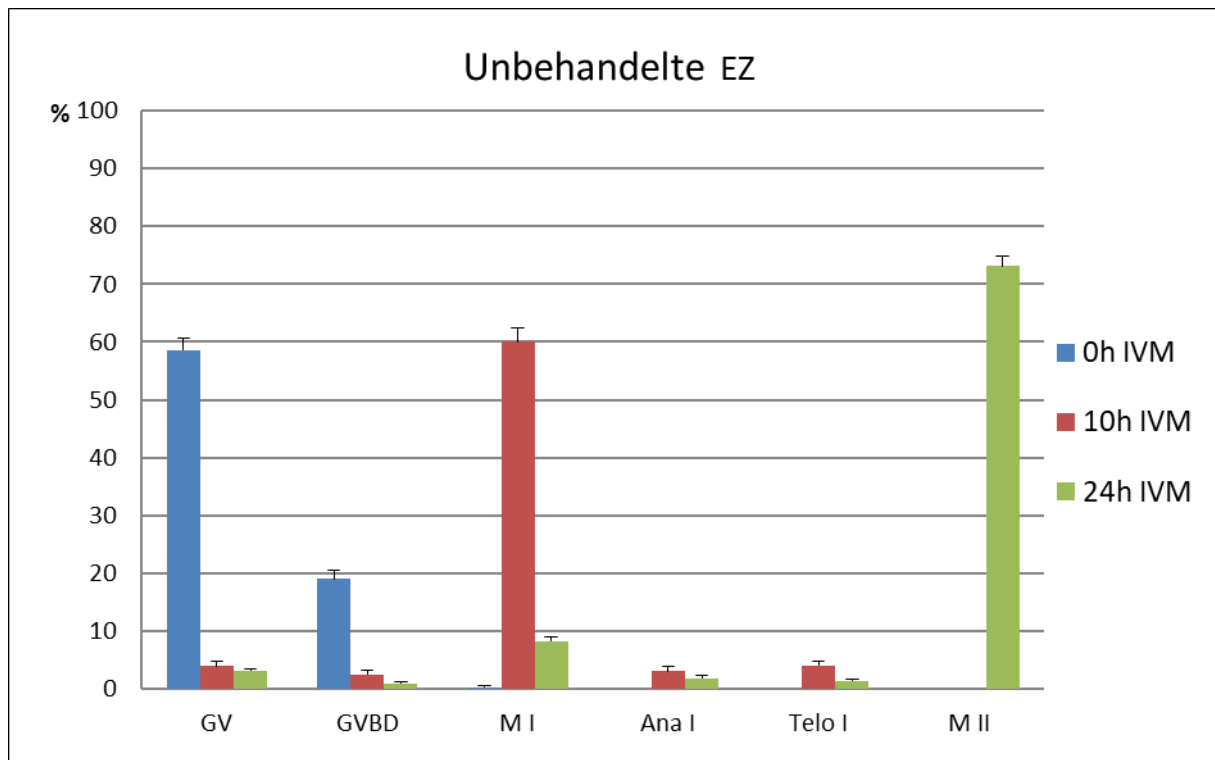


Abb. 11: Oozyten ohne Behandlung nach verschiedenen In-vitro-Maturationszeiten

beurteilt wurde die Chromatinkonfiguration; ermittelte Werte als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt.

Die Auswertungen ergaben, wie in Abb. 11 graphisch dargestellt, dass sich, abzüglich der nicht auswertbaren (geplatzt oder degeneriert) Zellen, nach 0 h IVM nahezu 80 % der EZ im GV- oder GVBD-Stadium befanden. Nach einer IVM von 10 h waren ca. 60 % der EZ im M I-Stadium und nach 24 h IVM knappe 75 % im MII-Stadium der Meiose.

5.1.1.2 Der Lösungsvermittler DMSO

Da es ohne den Lösungsvermittler DMSO nicht möglich war, die Inhibitorstudien durchzuführen, wurde vor Beginn der Hauptversuche dessen Einfluss untersucht. Dazu wurden Oozyten in Medium mit und ohne DMSO in vitro maturiert (siehe Abb. 12). Die zugesetzte DMSO-Menge entsprach der in den Inhibitorstudien eingesetzten 4 µl (1 % Anteil der Gesamtlösung). Die Stoffmengenkonzentration von DMSO im Maturationsmedium belief sich auf 0,14 M.

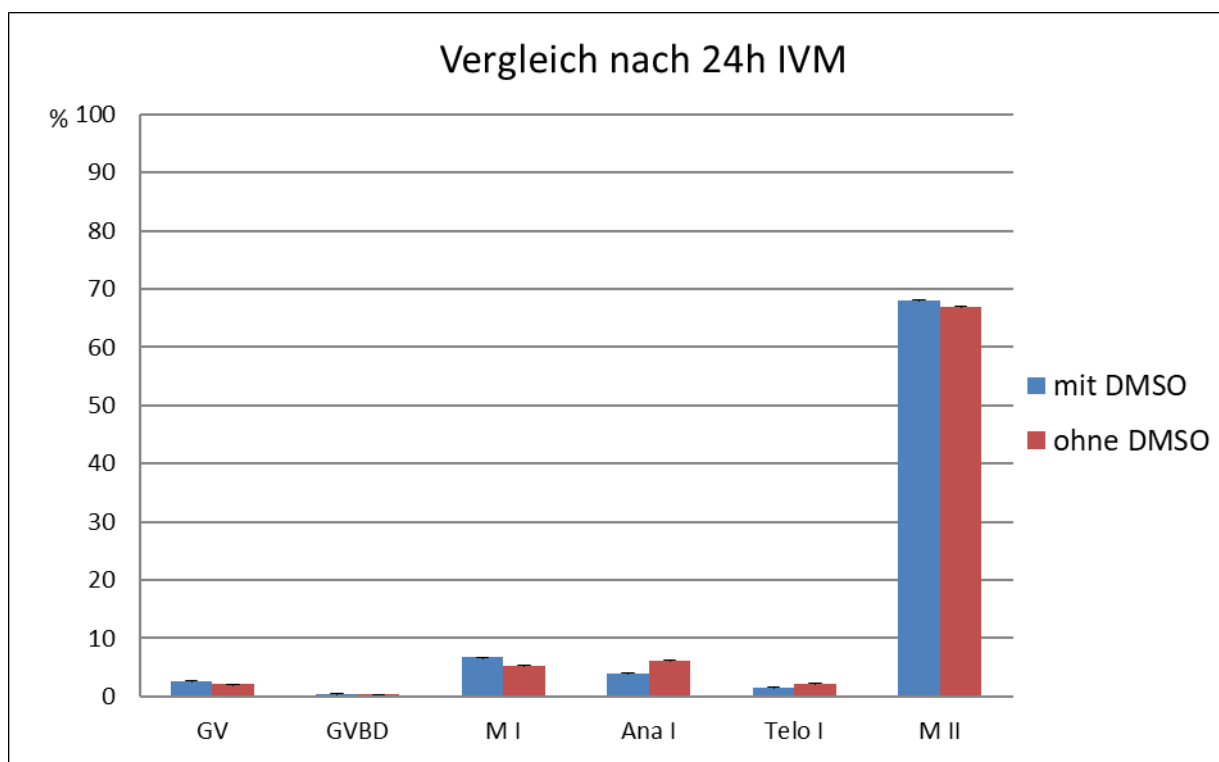


Abb. 12: Vergleich der Oozyten nach 24 h IVM mit und ohne DMSO-Zusatz

hinsichtlich der Chromatinkonfiguration; ermittelte Werte als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt.

Wie in Abb. 12 ersichtlich, konnte kein signifikanter Unterschied ($P > 0,05$) zwischen den Oozyten beider Gruppen (436 EZ mit bzw. 387 ohne DMSO-Zusatz) festgestellt werden.

5.1.2 Pilotversuche vor Verwendung von Torin2 hinsichtlich biochemischer Parameter

5.1.2.1 Untersuchung von GV- und M II- Oozyten bezüglich der TL-Initiationsfaktoren und Kinasen

Vor den eigentlichen biochemischen Analysen der Inhibitor-behandelten Zellen wurden ebenfalls Vorversuche durchgeführt.

Die vorerst notwendige Anzahl an EZ für ein gutes Signal im Western blot wurde ermittelt. Mit dem Auftragen von Extrakten von 50 Oozyten pro Spur ließen sich spezifische, stabile und kräftige Signale erreichen. Für den Ansatz einer Dekaprobe (s. Kapitel 4.4.3) wurde Lysat von 150 EZ verwendet.

Außerdem wurden grundlegende biochemische Vorgänge, die in bestimmten Zeitabschnitten der IVM geschehen, analysiert.

Je 500 EZ im GV- und MII-Stadium wurden bezüglich des Vorkommens und des Phosphorylierungsstatus verschiedener ausgewählter Proteine und Kinasen untersucht. Dazu wurde die Dekaprobe mit präparativer Tasche und entsprechender Maske verwendet.

Die Funktionalität der verwendeten AK wurde bereits in vorhergehenden Arbeiten bestätigt (SIEMER et al. 2009).

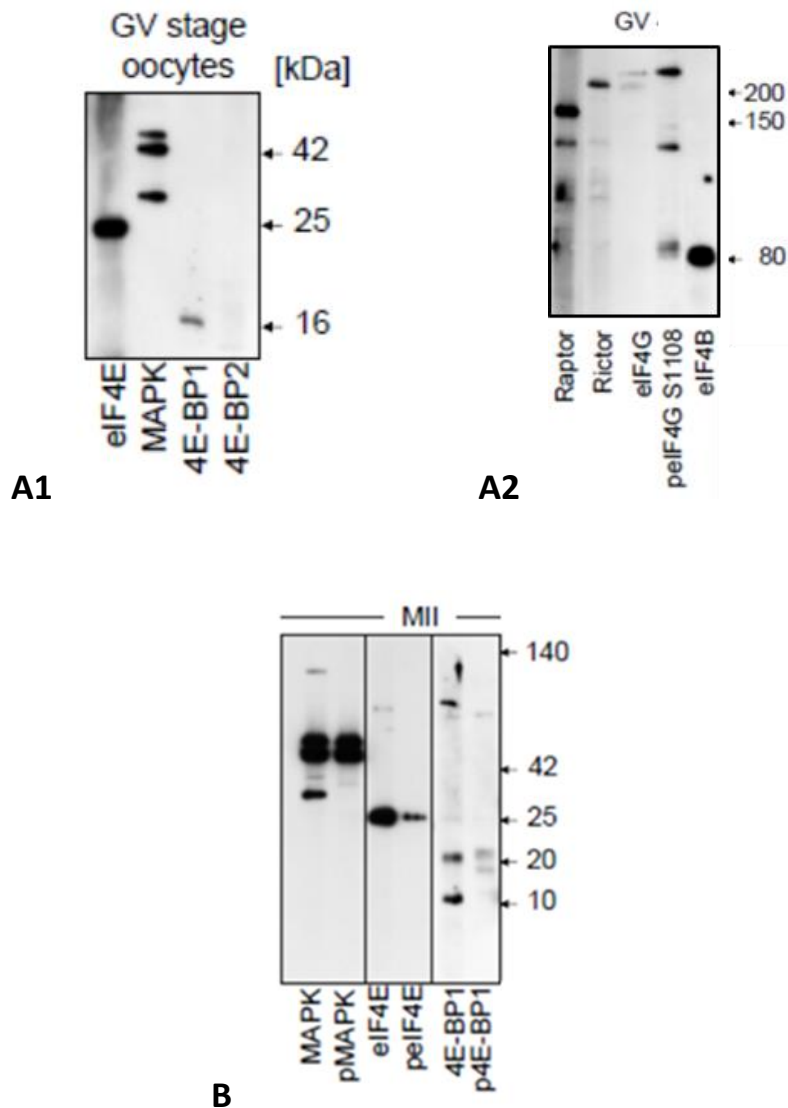


Abb. 13: Analyse von Oozyten hinsichtlich des Vorkommens verschiedener Proteine und Kinasen und deren Phosphorylierungsstatus mittels Western blot zu zwei Reifungszeitpunkten A1 und A2 im GV-Stadium und B im MII-Stadium

Die Grafik A1 und A2 der Abb. 13 zeigt Gesamtproteinsignale der im GV-Stadium analysierten Oozyten im Western blot. In A1 wird die Expression der MAPK und die vom freien eIF4E und 4E-BP1 im GV-Stadium durch deutliche Banden bewiesen. 4E-BP2 hingegen fehlt im GV-Stadium, da hier kein Signal zu erkennen ist.

A2 verdeutlicht das Vorkommen von Raptor, Rictor und eIF4B im GV-Stadium. Zudem beweist die Analyse, dass eIF4G im GV-Stadium nur in phosphorylierter Form vorkommt und freies eIF4G fehlt.

Die Grafik B der Abb.: 13 veranschaulicht Gesamtproteinsignale und die Signale der jeweiligen Phosphorproteine. In diesem Western blot B ist ersichtlich, dass im MII-Stadium MAPK sowohl in freier als auch in phosphorylierter Form vorliegt. Ebenso liegt eIF4E im Gegensatz zum GV-Stadium in MII ebenfalls phosphoryliert vor. Die Expressionen lassen zudem deutlich erkennen, dass 4E-BP1 im MII-Stadium einen Bandenshift erfährt, welcher die starke Phosphorylierung dort im Gegensatz zum GV-Stadium sichtbar macht.

Somit wurde die Funktionalität des hier angewendeten In-vitro-Reifungssystems bewiesen.

5.1.2.2 Expression der Repressoren 4E-BP1, 4E-BP2 und 4E-BP3 in GV-Oozyten

Da es derzeit noch keine eindeutigen Erkenntnisse zum Vorkommen der Repressorproteine 4E-BP2 und 4E-BP3 bei Rindereizellen gibt, wurden EZ im GV-Stadium hinsichtlich deren Expression untersucht.

Die Funktionalität der 4E-BP2 und 4E-BP3 spezifischen Antikörper (AK) wurde bereits früher an Schweinezellen (WOLLENHAUPT et al. 2010) getestet. Die Überprüfung der Bandenintensität erfolgte durch die parallele Analyse von eIF4E und MAPK. Als Ladungskontrolle fungierte β -Aktin (ACTB), welches durch seine konstant kräftigen Signale eine gleichmäßige Ladung in allen Geltaschen und ein ordnungsgemäßes Übertragen der Proteine auf die Membran des Western blots anzeigt. ACTB wurde nach dem Entfernen der Dekaprobeamaske und Beprobung des gesamten Blots mit entsprechenden AK analysiert.

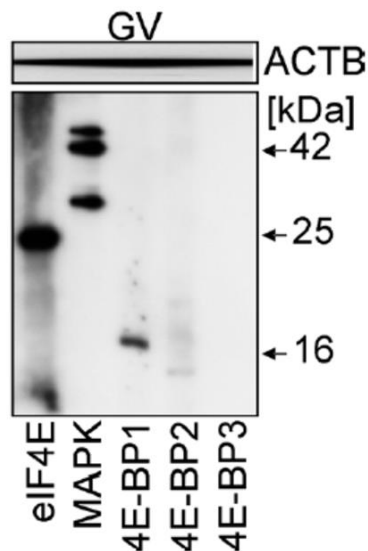


Abb. 14: Western blot-Analyse mittels Dekaprobe der 4E-Bindungsproteine 1, 2 und 3 von EZ im GV-Stadium

Ladungskontrolle: ACTB

Die Analysen zeigen, dass im Gegensatz zum Repressorprotein 4E-BP1, die Isoformen 4E-BP2 und -3 in Rinderoozyten nicht wesentlich exprimiert werden. Die Bande der 4E-BP1-Spur im Bereich von 18kDa ist deutlich sichtbar. Im Vergleich dazu ist bei 4E-BP2 nur ein äußerst schwaches und bei 4E-BP3 gar kein Signal zu erkennen.

5.1.2.3 Phosphorylierungsstatus von 4E-BP1 im Verlauf der IVM

Da das Hauptziel des in dieser Arbeit verwendeten mTor-Inhibitors Torin2 die Blockierung der Phosphorylierung von 4E-BP1 ist, wurde anfangs das Phosphorylierungsmuster des Bindungsproteins während der IVM bei unbehandelten EZ untersucht.

Mit Hilfe der Dekaprobe konnten gleichzeitig 4E-BP1 als solches und drei seiner Phosphorylierungsstellen bei GV- und M II-EZ analysiert werden.

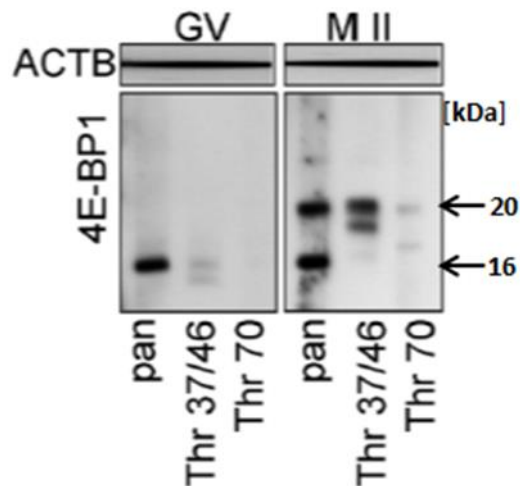


Abb. 15: Western blot-Analyse mittels Dekaprobe des 4E-BP1

Pan und dessen Phosphorylierungen an Thr37/46 und Thr70 von EZ im GV- und M II-Stadium im Vergleich; Ladungskontrolle: ACTB

Die Zellen im GV-Stadium zeigen die Expression des Bindungsproteins 1, wie im vorhergehenden Versuch, mit einem deutlichen Signal zwischen einem Molekulargewicht (MW) von 16 – 18 kDa. Weder die spezifischen Antikörper für die Phosphorylierungsstelle Thr37/46 noch für die an Thr70 lassen bei den GV-Oozyten Signale entstehen.

Dies zeigt, dass das Repressorprotein 4E-BP1 bei Oozyten im GV-Stadium an diesen Stellen nicht phosphoryliert ist.

Bei M II-EZ hingegen ist ein deutlicher Bandenshift des 4E-BP1 als solches auf ein MW von ca. 20 kDa zu erkennen. Zudem sind nun Signale an den Phosphorylierungsstellen sichtbar, wobei die Banden für Thr37/46 deutlicher sind als die für Thr70. Bei den Oozyten im M II-Stadium liegt 4E-BP1 demnach in phosphorylierter Form vor, was bedeutet, dass es im Zuge der IVM schrittweise phosphoryliert wird.

5.2 Inhibitorversuche

5.2.1 Morphologische Untersuchungen von Torin2 behandelten Oozyten

5.2.1.1 Ermittlung der wirksamen Inhibitorkonzentration

Zu Beginn wurden EZ im GV-Stadium für 24h mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors Torin2 versetzt, um die Konzentration zu ermitteln, ab welcher eine inhibitorische Wirkung erkennbar ist.

Da Torin2 bisher nur bei Versuchen mit somatischen Zellen verwendet wurde, dienten diese Versuche zur anfänglichen Orientierung. LIU et al. 2013 beschreibt eine Hemmung beider mTor-Komplexe, mTorC1 und mTorC2 in verschiedenen somatischen Zelllinien nach Behandlung mit einer finalen Konzentration von 100 nM Torin2 im Zellkulturmedium für somatische Zellen [Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)].

Daher wurden initial finale Konzentrationen von 10 nM, 100 nM und 200 nM Torin2 im Maturationsmedium verwendet (siehe Abb. 16). Pro Konzentration wurden jeweils zwischen 50 und 100 EZ untersucht.

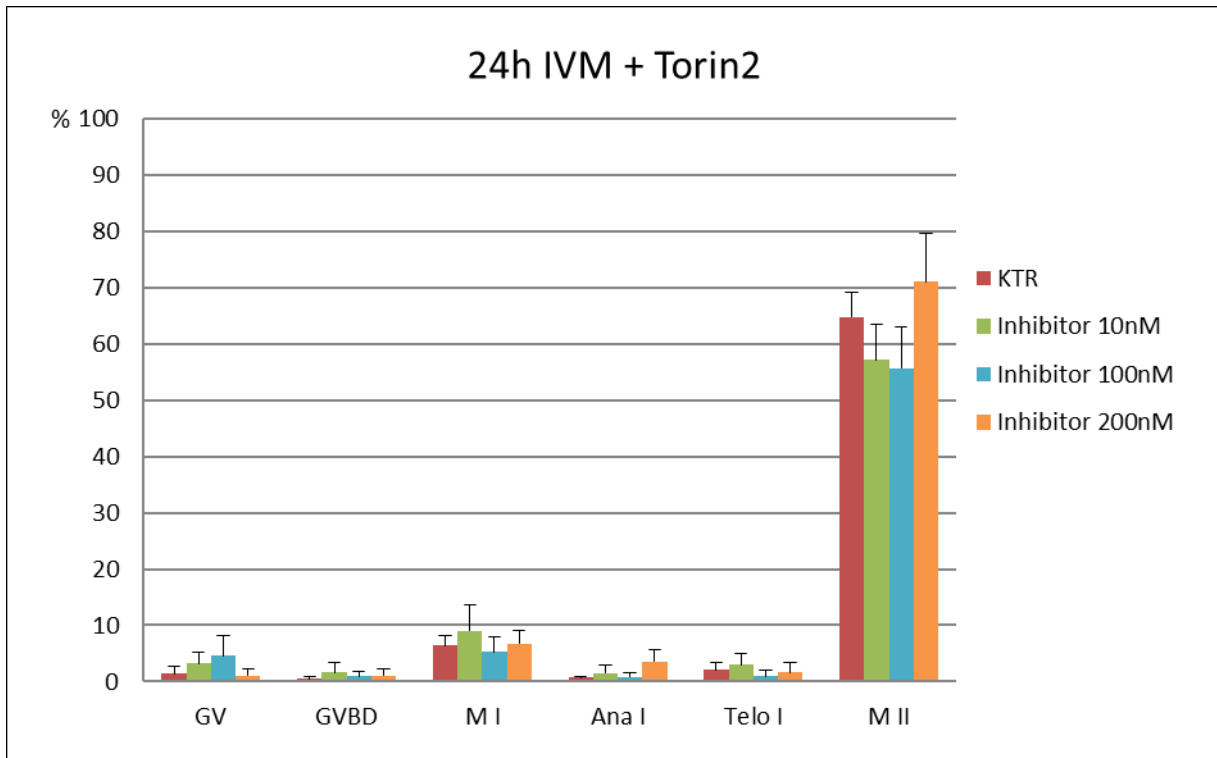


Abb. 16: Vergleich der Anwendung verschiedener Torin2-Konzentrationen (10 nM, 100 nM, 200 nM) an Oozyten nach 24 h IVM (KTR = Kontrollgruppe); beurteilt nach der Chromatinkonfiguration; ermittelte Werte als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt.

Es konnte in diesem Konzentrationsbereich kein signifikanter Unterschied ($P > 0,05$) zwischen den Torin2-behandelten EZ und den Kontrollen festgestellt werden.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden daraufhin höhere Inhibitorkonzentrationen (200 EZ pro Konzentrationsstufe), 1 μM , 2 μM , 3 μM und 5 μM getestet.

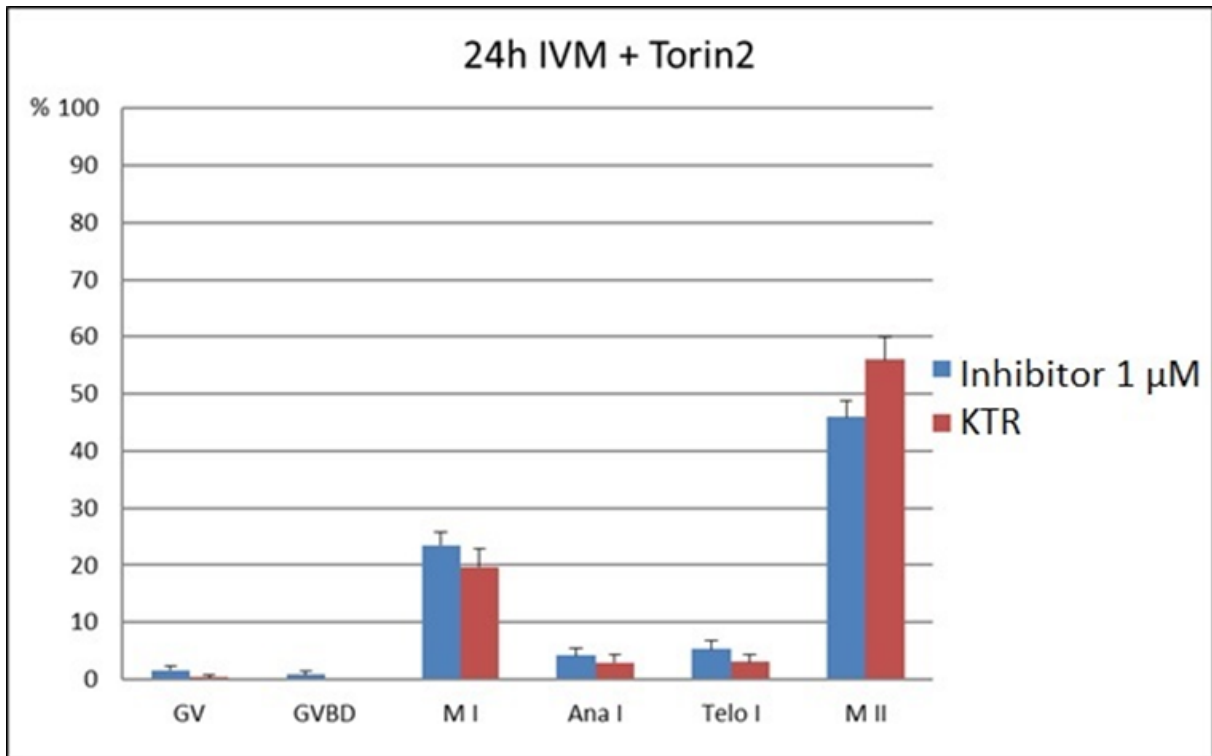


Abb. 17: Anwendung einer Torin2-Konzentration von 1 μ M an Oozyten nach 24 h IVM (KTR = Kontrollgruppe);

beurteilt nach der Chromatinkonfiguration; ermittelte Werte als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt.

In den Zellen aller Phasen besteht kein signifikanter Unterschied ($P > 0,05$) zwischen der Inhibitor- und der Kontrollgruppe.

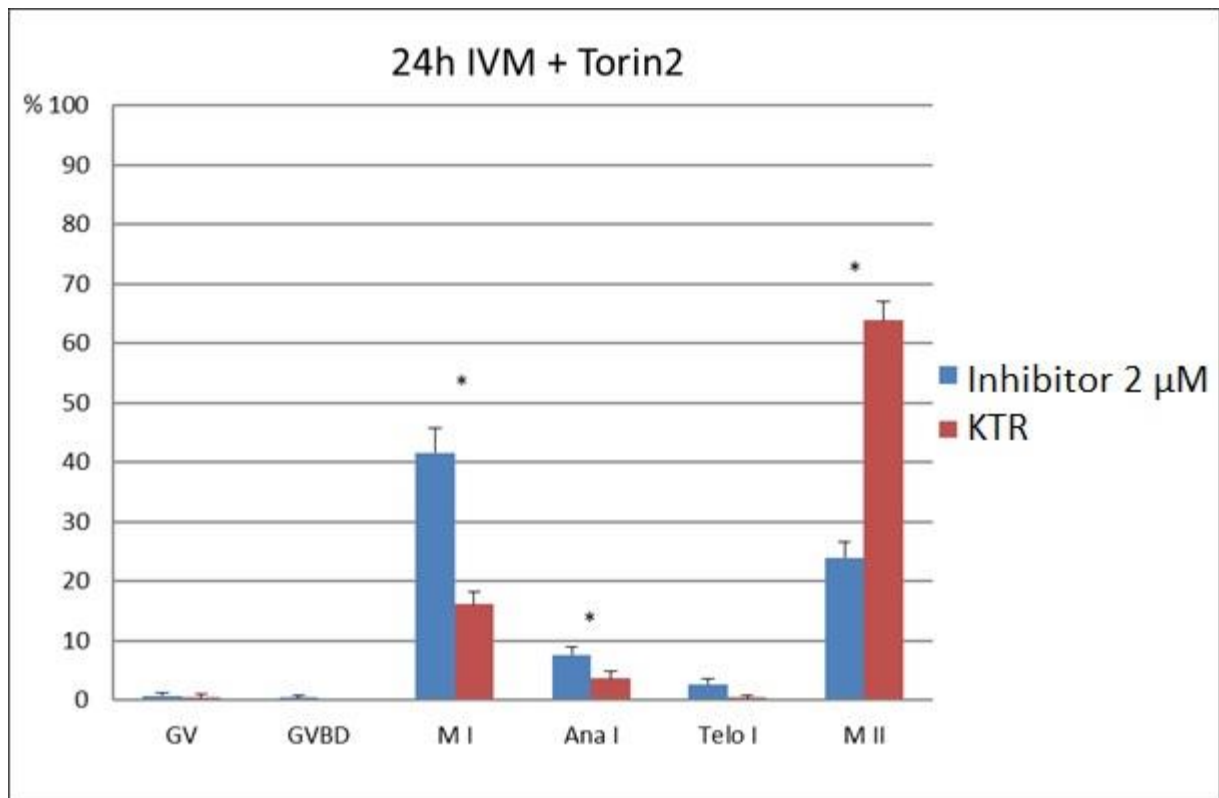


Abb. 18: Anwendung einer Torin2-Konzentration von 2 μ M an Oozyten nach 24 h IVM (KTR = Kontrollgruppe);

beurteilt nach der Chromatinkonfiguration; ermittelte Werte als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt.

Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Inhibitor- und der Kontrollgruppe ($P < 0,05$).

Die Unterschiede für M I, Ana I und M II sind signifikant (mit * markiert).

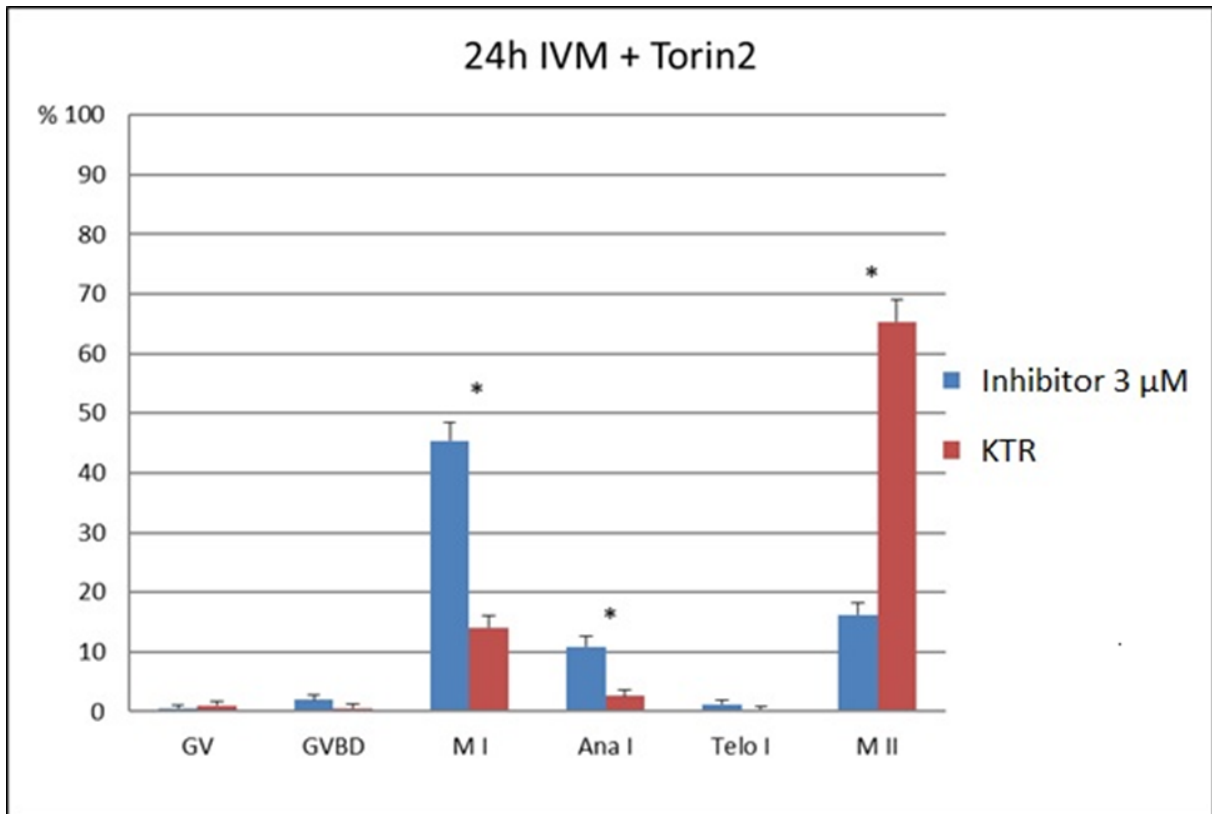


Abb. 19: Anwendung einer Torin2-Konzentration von 3 µM an Oozyten nach 24 h IVM (KTR = Kontrollgruppe);

beurteilt nach der Chromatinkonfiguration; ermittelte Werte als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt.

Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Inhibitor- und der Kontrollgruppe ($P < 0,05$).

Die Unterschiede für M I, Ana I und M II sind hoch signifikant (mit * markiert).

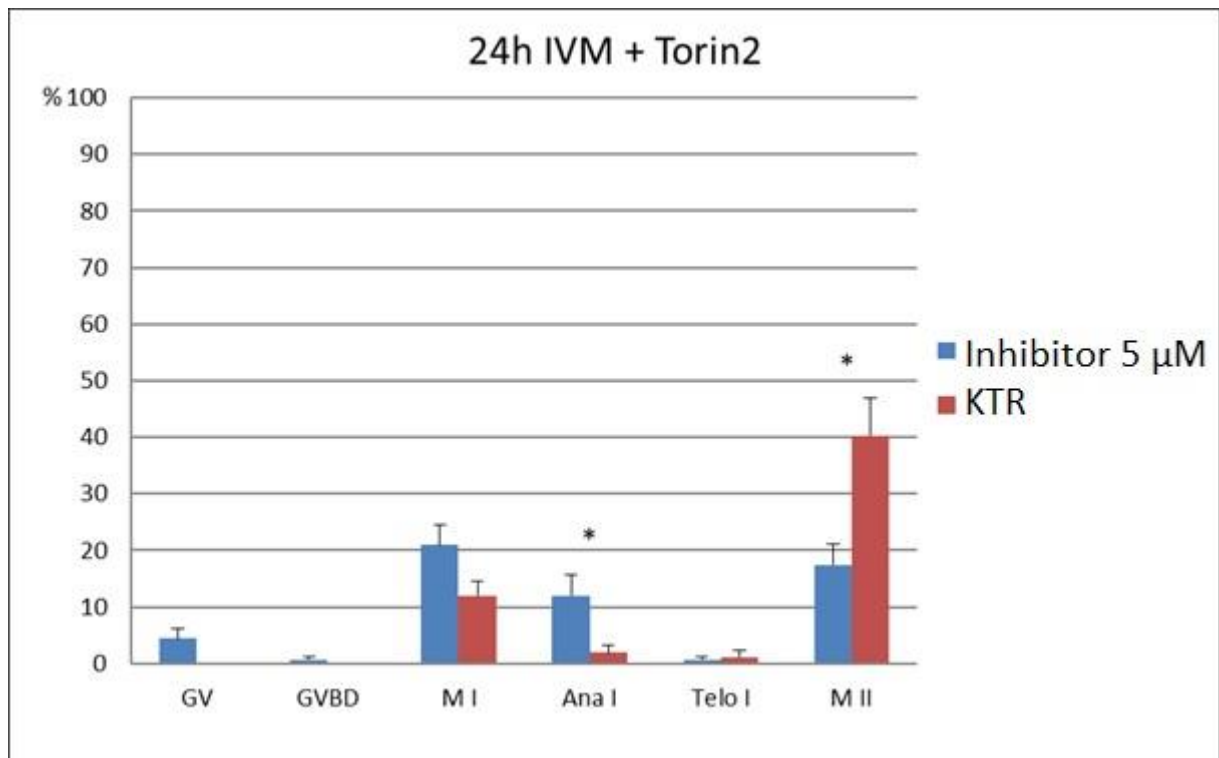


Abb. 20: Anwendung einer Torin2-Konzentration von 5 µM an Oozyten nach 24 h IVM (KTR = Kontrollgruppe);

beurteilt nach der Chromatinkonfiguration; ermittelte Werte als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt.

Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Inhibitor- und der Kontrollgruppe ($P < 0,05$).

Die Unterschiede für Ana I und M II sind signifikant (mit * markiert). Der Unterschied in M I hingegen zeigt sich nicht signifikant ($P > 0,05$).

Zusammenfassend ist nach eingehenden statistischen Untersuchungen (s. Kapitel 4.5) festzustellen, dass erst ab einer finalen Torin2-Konzentration von 1 µM im Maturationsmedium sich erste, aber noch nicht sehr deutliche Veränderungen bei den Torin2-behandelten EZ im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe erkennen ließen.

Die Untersuchung abermals höherer Konzentrationsstufen ließ diese Effekte immer deutlicher werden, und bei einer finalen Konzentration von 3 μM Torin2 im Medium (siehe Abb. 19) konnte der Effekt des Inhibitors am eindeutigsten nachgewiesen werden.

Konzentrationen von 5 μM Torin2 (siehe Abb. 20) zeigten ebenfalls eine klare Wirkung auf die EZ. Jedoch stieg bei einer Konzentration $> 3 \mu\text{M}$ Torin2 die Anzahl degenerierter Zellen deutlich an. Während bei 3 μM Torin2 ca. 14 % degenerierte Zellen zu verzeichnen waren, waren es nach einer Konzentrationserhöhung auf 5 μM ca. 38 %.

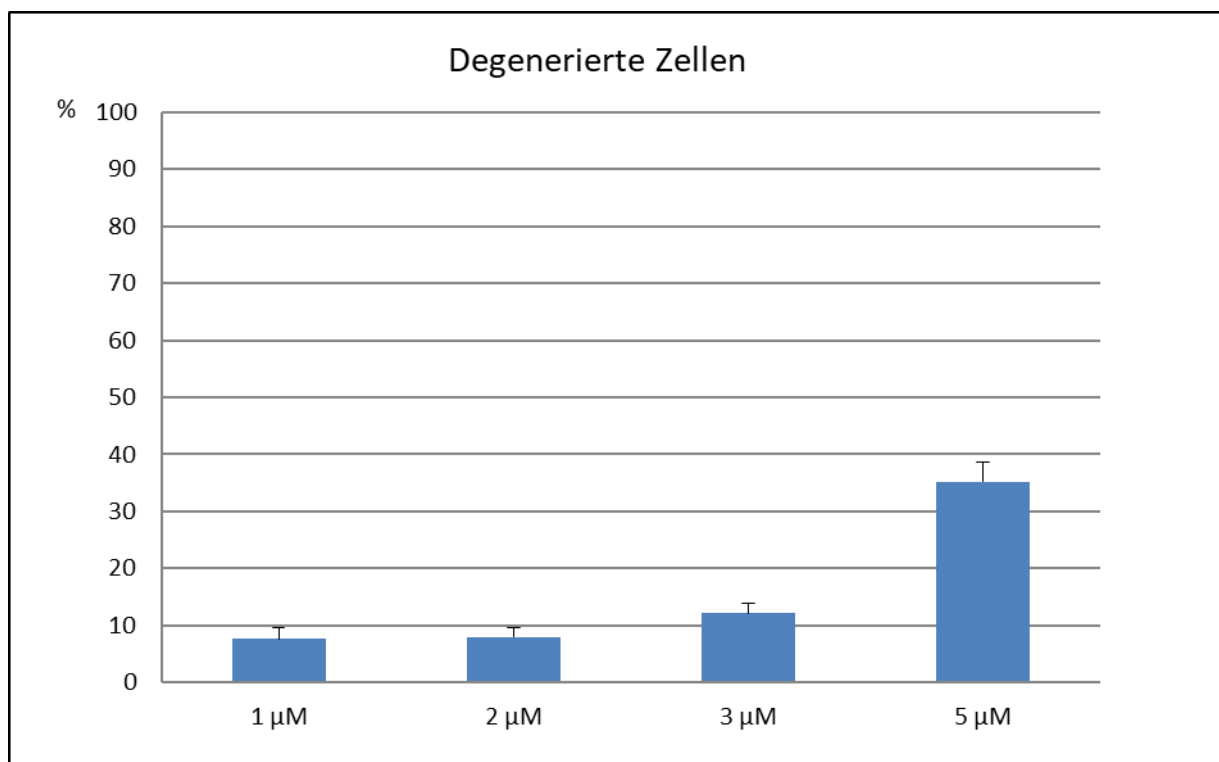


Abb. 21: Vergleich der Anzahl degenerierter EZ bei unterschiedlichen Torin2-Konzentrationen nach 24 h IVM

beurteilt nach der Chromatinkonfiguration; ermittelte Werte als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt.

5.2.1.2 Beurteilung der Kumulusexpansion

Das Ergebnis des wirksamen Konzentrationsbereiches von Torin2 spiegelt sich ebenfalls in der Kumulusexpansion nach der IVM wieder.

Die Beurteilung der KOKs erfolgte stets direkt im Anschluss an die Reifung, indem jedes Well der Maturationsplatte, ohne die Zellen zu verändern, abfotografiert wurde.

Ab einer Inhibitorkonzentration von 1 μM im Medium konnten optisch leichte Lockerungen der der Oozyten anliegenden Kumuluszellschichten Torin2-behandelter EZ im Vergleich zu der der Kontrollgruppe nach 24h IVM festgestellt werden. Diese Veränderungen zeigten sich bei 3 μM Torin2 im Medium stärker. Die ursprünglich kompakt anliegenden Kumuluszellschichten erschienen zunehmend aufgelockerter.

Um zu sehen, wie sich die Zellen im Anschluss an 24h IVM verhalten, wurden die der Kontrollgruppe und die der Inhibitorgruppe nach 24 h Reifung nochmals 24 h nur mit DMSO (ohne weitere Zusätze) inkubiert. Diese Zellen sollten zeigen, ob die Wirkung des Inhibitors reversibel ist oder nicht. Generell waren die Auswirkungen des Inhibitors auf die Kumulusexpansion bei den EZ, welche 24 h mit und anschließend nochmals 24 h ohne Torin2 kultiviert wurden, am deutlichsten zu sehen.

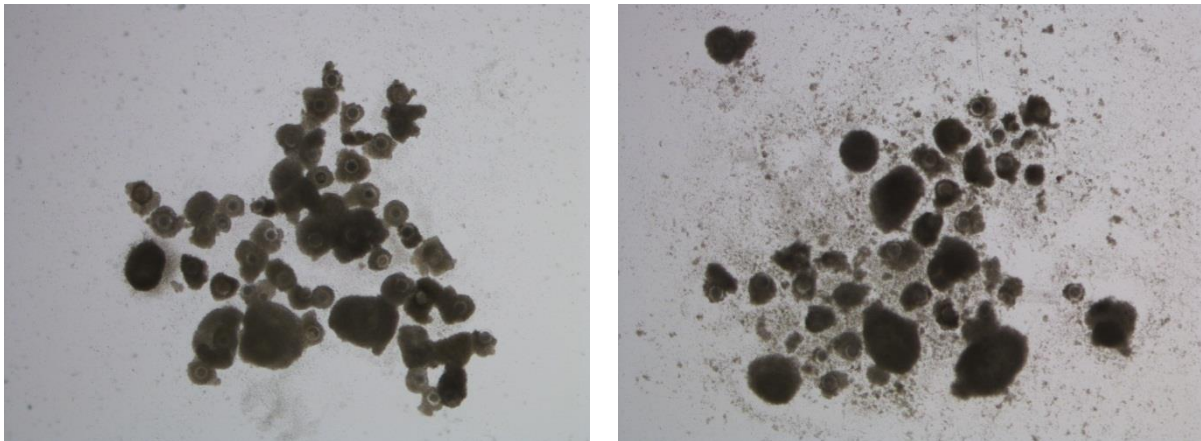


Abb. 22: Fotografien der Kumulusexpansion

Vergleich: links: Kontrollgruppe - KOK nur mit DMSO 48 h gereift; rechts: Inhibitorgruppe - KOK 24h mit 3 μM Torin2 und anschließend weitere 24 h ohne Torin2 gereift

Die KOK der Kontrollgruppe weisen nach 48 h IVM immer noch kompakte, dicht anliegende, mehrlagige Kumuluszellverbände auf, welche die Oozyten umschließen. Das Medium ist klar und nur einzelne Kumuluszellen liegen frei vor.

In der Inhibitorgruppe hingegen zeigten sich sehr viele lose Kumuluszellen und Fragmente von Kumuluszellplatten im Maturationsmedium. Die eigentlich komplexen Verbände um die EZ scheinen deutlich zerstört.

Sehr auffällig war zudem, dass das Entfernen der Kumuluszellen bei den Inhibitor-behandelten Gruppen ab einer Konzentration von 1 μM um einiges schneller und einfacher zu bewerkstelligen war als bei denen der Kontrollgruppen. Die Kontroll-KOKs die 48 h ohne Zusatz gereift waren, ließen sich nur schwer denudieren und es nahm dadurch deutlich mehr Zeit in Anspruch.

5.2.1.3 Auswirkungen auf die Chromatinkonfiguration von Torin2 behandelten EZ

Da mit einer finalen Konzentration von 3 μM Torin2 im Maturationsmedium die deutlichste Inhibitorwirkung im Vergleich zu den Kontrollen zu verzeichnen war, wurden sämtliche nachfolgende Versuche in dieser Konzentrationsstufe durchgeführt.

Zur Feststellung, welchen Einfluss genau das Torin2 auf die meiotische Reifung der bovinen Oozyten hat, wurden die EZ wieder durch Beurteilung ihrer Chromatinkonfiguration in die verschiedenen Zellzyklusstadien eingeteilt. Es wurden 200 EZ pro Gruppe nach 24 h IVM mit/ohne Torin2 beurteilt. Den Zellen der Kontrollgruppen wurden generell außer DMSO keine weiteren Substanzen zum Reifungsmedium zugeführt (s. Kapitel 4.2, Tab. 2).

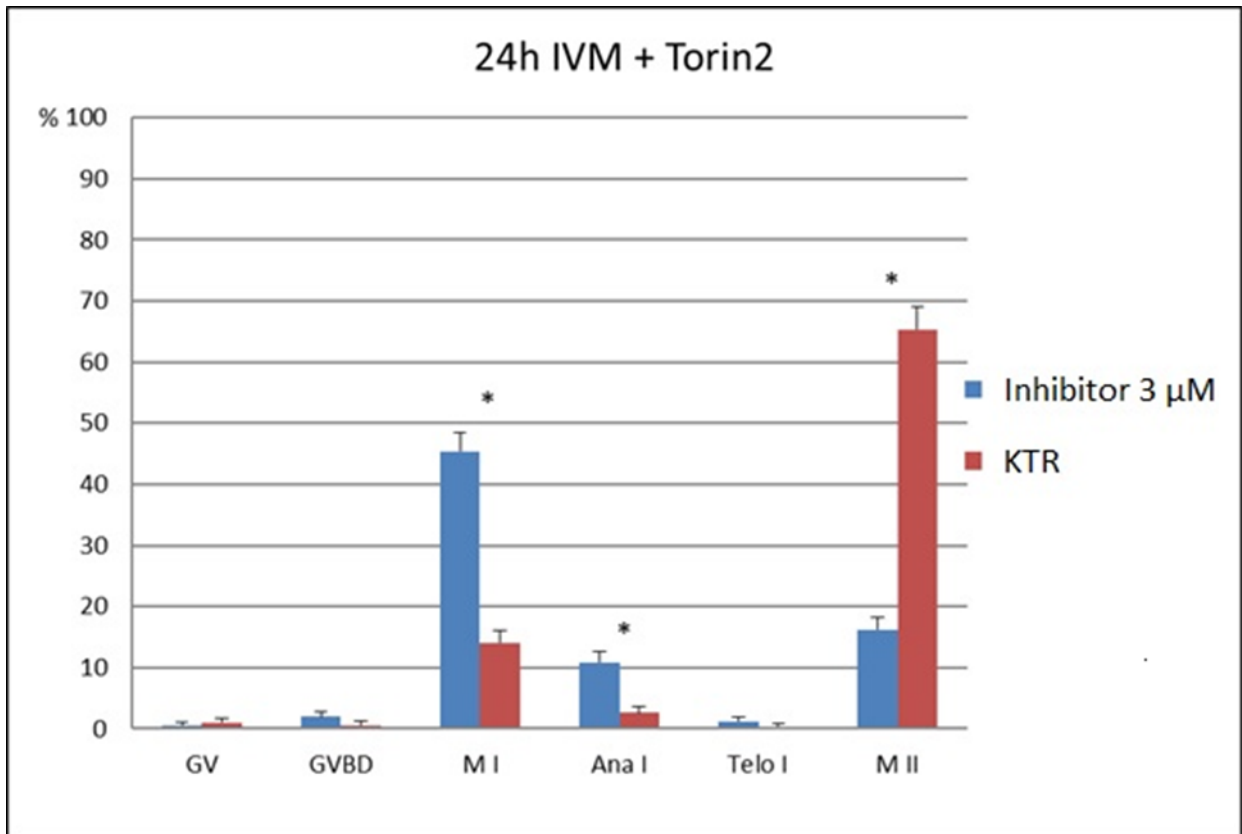


Abb. 23: Anwendung einer Torin2-Konzentration von 3 µM an Oozyten nach 24 h IVM (KTR = Kontrollgruppe);

beurteilt nach der Chromatinkonfiguration; ermittelte Werte als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt.

Die hoch signifikanten Unterschiede ($P < 0,05$) für M I, Ana I und M II sind mit * markiert.

Die Versuche lassen einen deutlichen Effekt der Torin2-Behandlung auf den Verlauf der meiotischen Reifung erkennen. Im Mittel 60 % der Inhibitor-behandelten EZ verbleiben nach 24 h IVM im M I-Stadium der Meiose und nur annähernd 20 % erreichen das M II-Stadium. Im Vergleich dazu erreichen ca. 80 % der EZ der Kontrollgruppe in Torin2-freiem Medium nach 24 h IVM das M II-Stadium der Meiose. Torin2 scheint also zu einem M I-Arrest boviner Oozyten zu führen.

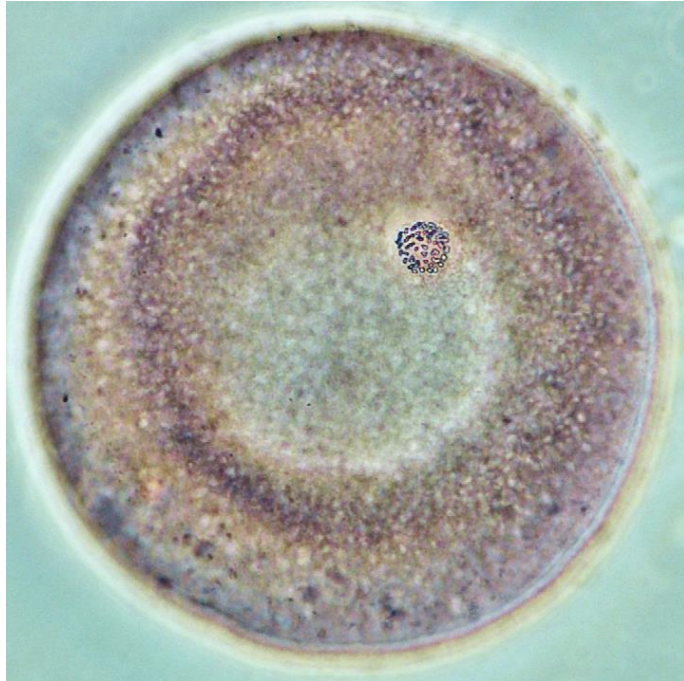


Abb. 24: Bovine Oozyte im M I-Arrest nach 24 h IVM mit 3 μ M Torin2 im Medium

Um nun die Reversibilität dieses M I-Arrestes durch Torin2-Behandlung zu überprüfen, kamen die EZ vorerst, wie oben beschrieben für 24 h mit 3 μ M Torin2 in den Inkubator und wurden anschließend für weitere 24 h in Torin2-freiem Medium gereift. Die Kontrollen reiften 48 h in Torin2-freiem Maturationsmedium. Es wurden 400 EZ pro Gruppe untersucht.

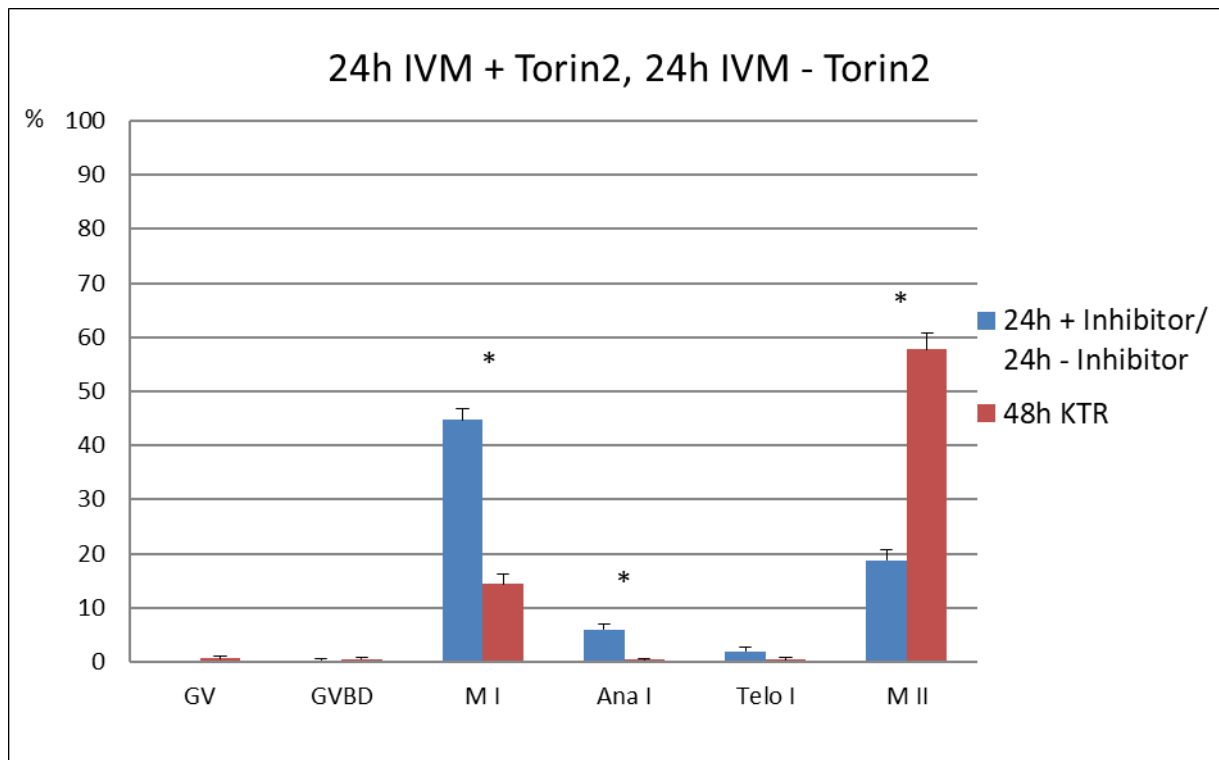


Abb. 25: Oozyten für 48 h IVM [24h mit 3 μ M Torin2 (24 h IVM + Torin2) und anschließend 24 h weitergereift nur mit DMSO ohne Inhibitorzusatz (24 h IVM – Torin2)] (KTR = Kontrollgruppe); beurteilt nach der Chromatinkonfiguration; ermittelte Werte als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt.

beurteilt nach der Chromatinkonfiguration. Der Standardfehler ist jeweils angegeben.

Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Eizellen der Inhibitor- und der Kontrollgruppe ($P < 0,05$).

Die Unterschiede für M I, Ana I und M II sind hoch signifikant (mit * markiert).

Die Untersuchungen zeigen deutlich, dass der M I-Arrest der Torin2-behandelten EZ bestehen bleibt. Oozyten der Kontrollgruppe zeigen nach 48 h IVM eine vergleichbare Verteilung der Zellen in den jeweiligen Zyklusstadien gegenüber der 24 h IVM gereiften EZ.

5.2.2 Biochemische Untersuchungen von Torin2 behandelten Oozyten

5.2.2.1 Auswirkung der Torin2-Behandlung auf die Phosphorylierung von 4E-BP1

5.2.2.1.1 SDS-PAGE Western blot-Analyse

Um die Wirkung von Torin2 auf das Phosphorylierungsmuster des Repressorproteins 4E-BP1 im Verlauf der IVM zu untersuchen, wurde zunächst auch hier die passende Konzentration des Inhibitors im Medium gewählt.

Da Versuche mit einer finalen Konzentration von 1 μM bzw. 2 μM Torin2 im Maturationsmedium nur schwache Auswirkungen zeigten und morphologische Analysen ebenfalls bei 3 μM Torin2 die deutlichsten Ergebnisse brachten, wurde diese Konzentrationsstufe ebenfalls für die biochemischen Untersuchungen ausgewählt. Zusätzlich wurden hier, um die Reversibilität der Inhibitorwirkung sicher beurteilen zu können, EZ der Konzentration von 5 μM Torin2 im Medium untersucht.

Mittels Dekaprobe wurden im herkömmlichen SDS-PAGE Western blot zunächst Oozyten im GV- und M II-Stadium hinsichtlich der Menge und Phosphorylierung der Proteine eIF4E und 4E-BP1, ohne Torin2-Behandlung, analysiert (s. Abb. 26 linker Rahmen).

Anschließend wurden die gleichen Parameter an Eizellen untersucht, die 24 h mit 3 μM bzw. 5 μM Torin2-Konzentration bzw. 24 h mit und 24 ohne Torin2 in entsprechender Konzentration im Medium, inkubiert wurden (s. Abb. 26 rechter Rahmen).

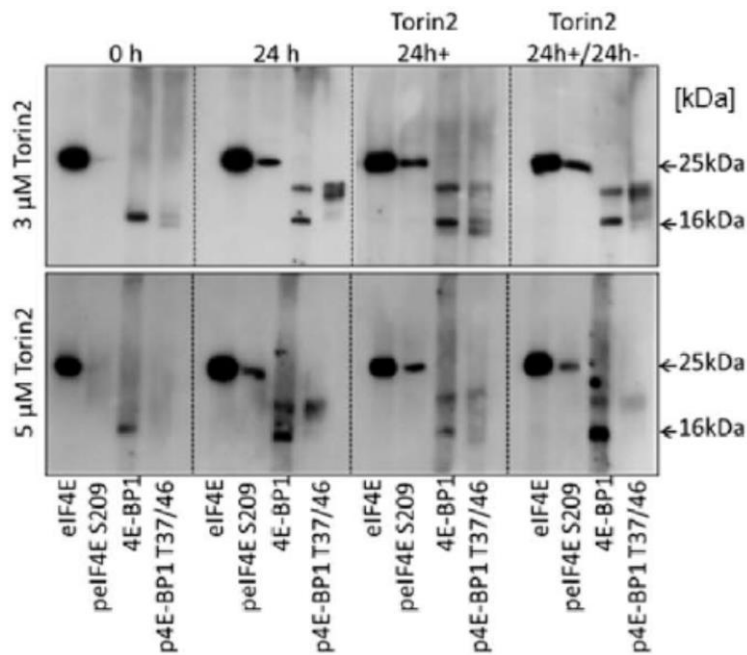


Abb. 26: Herkömmliche SDS-PAGE Western blot-Analyse mittels Dekaprobe von eIF4E, peIF4E Ser209, 4E-BP1 und p4E-BP1 T37/46

von unbehandelten EZ im GV- (0 h) und M II-Stadium (24 h; linker Rahmen) im Vergleich mit 3 μ M (obere Reihe) bzw. 5 μ M (untere Reihe) Torin2 behandelten (24h+) und 24 h mit und anschließend 24 h ohne Torin2 (24h+/-) behandelten EZ (rechter Rahmen)

Die Analyse der unbehandelten EZ ergab, dass im GV-Stadium der Meiose die beiden Proteine in hypophosphorylierter Form vorliegen. Im M II-Stadium befindliche Oozyten weisen hingegen eine hohe Phosphorylierung von eIF4E und 4E-BP1 auf. Diese Feststellungen sind deutlich erkennbar an den fehlenden Banden für peIF4E S209 (Phosphorylierung von eIF4E an Ser 209) und für p4E-BP1 T37/46 (Phosphorylierung von 4E-BP1 an Thr37 und Thr 46) bei den unreifen im Vergleich zu den vorhandenen Banden bei den 24 h gereiften EZ.

Die Phosphorylierung an Ser209 von eIF4E zeigt durch die Behandlung der Zellen für 24 h mit 3 μ M bzw. 5 μ M Torin2 keine Veränderung. Eine deutliche Bande, gut vergleichbar mit der für 24 h unbehandelt maturierte EZ, weist auf eine hohe Phosphorylierung von eIF4E nach 24 h IVM mit Torin2 hin. Durch die weitere Maturation für 24 h in Torin2-freiem Medium ist ebenfalls das gleiche Bandenmuster erkennbar.

Im Gegensatz dazu zeigte sich die Phosphorylierung von 4E-BP1 von der Torin2-Behandlung beeinflusst.

Die für 24 h mit 3 μ M bzw. 5 μ M Torin2-behandelten EZ wiesen deutlich schwächere Bandensignale bei den Phosphorylierungsantikörpern und eine erhöhte elektrophoretische Mobilität auf. Diese Tatsache belegt eine reduzierte Phosphorylierung von 4E-BP1 an Thr 37/46 durch die 24 h Torin2-Behandlung.

Die weitere Kultivierung von Torin2-behandelten EZ für zusätzliche 24 h in Kontrollmedium, ergab wieder eine Zunahme der Signale an den Phosphorylierungsbanden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass diese Wirkung des Inhibitors reversibel ist und das Protein ähnlich hoch phosphoryliert vorliegt wie bei den Eizellen der unbehandelten Kontrollen nach 24 h IVM.

5.2.2.1.2 Phos-tag-PAGE Western blot-Analyse

Auf Grund dieser unter 5.2.2.1.1 gewonnenen Erkenntnisse war nun die genaue Wirkung von Torin2 auf die 4E-BP1-Phosphorylierung, besonders auch auf die anderen, multiplen, Phosphorylierungsstellen von 4E-BP1 von großem Interesse. Jedoch konnten bisher im herkömmlichen SDS-PAGE-Western blot nur für die Phosphorylierungsstelle Thr37/46 ausreichend starke Signale erreicht werden. Die für die anderen Phosphorylierungsstellen, z.B. für Thr70 oder Ser65, spezifischen AK zeigten nur sehr schwache Banden (s. Kapitel 5.1.2.3, Abb. 15 und ELLEDEROVA et al. 2006).

Deswegen wurde hier versucht, über eine modifizierte SDS-PAGE, die Phos-tag SDS-PAGE, mehr Informationen über die multiplen Phosphorylierungen an 4E-BP1 im Zuge der IVM zu bekommen (s. Kapitel 4.4.1.2).

Als erstes wurde, um die Methode zu überprüfen, der TL-Faktor eIF4E analysiert. Dieser hat eine einzelne Phosphorylierungsstelle an Ser209, welche bei EZ im GV-Stadium weitgehend unphosphoryliert ist, im M II-Stadium der Meiose aber hoch-phosphoryliert vorliegt.

Es wurde in der herkömmlichen SDS-PAGE ein AK gegen p eIF4E an Ser209 und in der Phos-tag-PAGE ein AK gegen das gesamte Protein eIF4E verwendet.

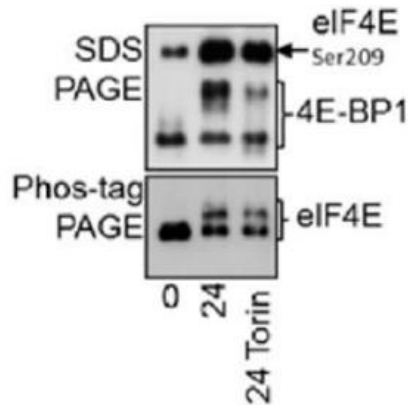


Abb. 27: Western blot-Analyse von p eIF4E an Ser209 und 4E-BP1

mit konventioneller SDS-PAGE (oberer Rahmen) im Vergleich zur Analyse von eIF4E mit Phos-tag SDS-PAGE (unterer Rahmen); es wurden Oozyten im GV- (0), M II-Stadium (24) und nach 24 h Torin2-Behandlung (24 Torin) analysiert

Die Ergebnisse der konventionellen SDS-PAGE bestätigen, wie bereits in Kapitel 5.2.2.1.1 beschrieben, den hypophosphorylierten Zustand beider Proteine im GV-Stadium und die hohe Phosphorylierung von eIF4E und 4E-BP1 im M II-Stadium. Ebenfalls wiederholt sichtbar ist, dass die Torin2-Behandlung die 4E-BP1-Phosphorylierung reduziert, aber die von eIF4E nicht beeinflusst.

In der Phos-tag-PAGE-Analyse wird der Phosphoproteincharakter von eIF4E durch einen deutlichen Bandenshift bei den 24h unbehandelt gereiften, und den Torin2-behandelten EZ bestätigt.

Im direkten Vergleich der beiden Methoden ist deutlich zu sehen, dass durch die Phos-tag-PAGE eine gut sichtbare Auftrennung des Gesamt-Proteins eIF4E nach seiner Phosphorylierung möglich ist.

Nach der erfolgreichen Überprüfung der Funktionalität der Phos-tag-PAGE wurde dann der Phosphorylierungsstatus des Repressorproteins 4E-BP1 unter verschiedenen Bedingungen analysiert.

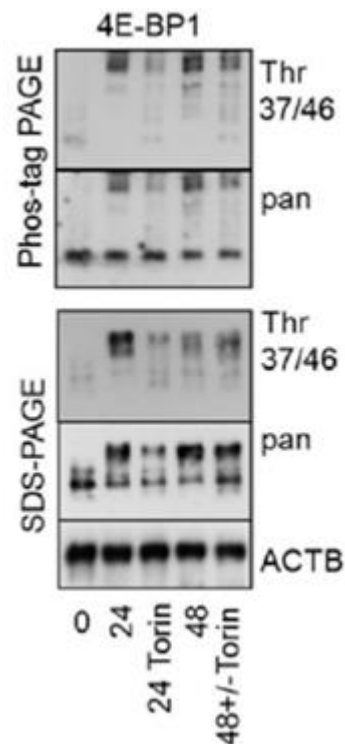


Abb. 28: Western blot-Analyse des kompletten Proteins 4E-BP1 (pan) und eine seiner Phosphorylierungsstellen (Thr37/46)

Phos-tag SDS-PAGE (oberer Kasten) verglichen mit konventioneller SDS-PAGE (unterer Kasten); es wurden Oozyten nach 0 h, 24 h und 48 h IVM und EZ nach 24 h Torin2-Behandlung (24 Torin) sowie nach 24 h mit Torin2 und weiteren 24 h ohne Torin2 (48 +/- Torin) analysiert; Ladungskontrolle bei SDS-PAGE: ACTB

Die Analyse mit der Phos-tag-SDS-PAGE verifiziert abermals die zunehmende Phosphorylierung des Proteins im Verlauf der meiotischen Reifung bei unbehandelten EZ, die Reduzierung des Phosphorylierungsstatus nach 24 h Torin2-Behandlung und die Reversibilität dieser nach 48 h.

Im Vergleich zur herkömmlichen SDS-PAGE zeigt sich zwar bei der Phos-tag-PAGE ein deutlicherer Bandenshift, jedoch kann kein spezifisches Phosphorylierungsmuster ausgemacht werden, welches eine wirkliche Unterscheidung zwischen verschiedenen phosphorylierten Formen des Proteins, abgesehen von der Phosphorylierung an Thr37/46, zugelassen hätte.

5.2.2.1.3 Auswertung der Wirkung von Torin 2 auf die Thr37/46-Phosphorylierung

Die hemmende Wirkung von Torin2 auf die Phosphorylierung an Thr37/46 wurde anschließend bewertet. Es wurden die Signale dieser Phosphorylierungsstelle von fünf unabhängigen Western blot-Analysen ermittelt, quantifiziert und in Relation zur Ladungskontrolle gesetzt.

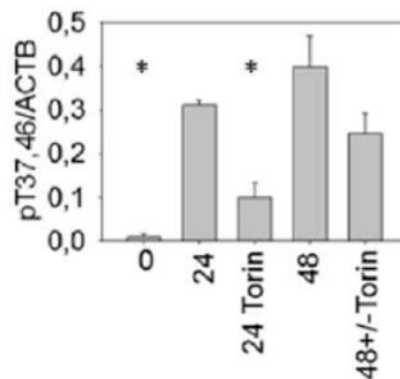


Abb. 29: Darstellung der Wirkung des Inhibitors Torin2 auf die Phosphorylierung von 4E-BP1 an Thr37/46 in Relation zur Ladungskontrolle ACTB;

es wurden Signale von Oozyten nach 0 h, 24 h und 48 h IVM und von EZ nach 24 h Torin2-Behandlung (24 Torin) sowie nach 24 h mit Torin2 und weiteren 24 h ohne Torin2 (48 +/- Torin) analysiert; ermittelte Werte als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt; die mit Stern (*) markierten Säulen unterscheiden sich signifikant ($P < 0,05$) von denen ohne Markierung.

Die Grafik lässt deutlich erkennen, dass die Torin2-Behandlung die Phosphorylierung von 4E-BP1 an Thr37/46, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, um das nahezu Dreifache reduziert und diese Reduzierung nach zusätzlicher Maturation für 24 h in Torin2-freiem Medium wieder aufgehoben wird.

Da die Torin2-Behandlung einen Arrest der EZ im M I-Stadium der Meiose bewirkt, wurde als nächstes ermittelt, ob die Signale von den, für 24 h Torin2-behandelten EZ den Banden von unbehandelten Oozyten im M I-Stadium entsprechen und somit 4E-BP1 in einem gleichen

Phosphorylierungsstatus vorliegt. Es wurde im Western blot die Phosphorylierung von 4E-BP1 an Thr37/46 von für 10 h unbehandelt gereiften EZ und Torin2-behandelten miteinander verglichen.

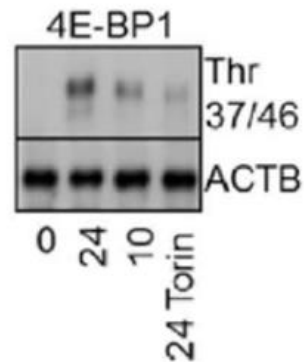


Abb. 30: Vergleich der Phosphorylierung von 4E-BP1 an Thr37/46 zwischen unbehandelten Oozyten im M I-Stadium (10) und 24 h Torin2-behandelten (24 Torin) mittels Western blot EZ im GV- (0) und M II- (24) Stadium fungierten als Kontrollgruppen; Ladungskontrolle: ACTB

Es ist deutlich erkennbar, dass unter den unbehandelten Zellen, die 10 h gereiften M I-Eizellen im Vergleich zu den GV- (hypophosphoryliert) und M II- (hoch-phosphoryliert) Oozyten, in einem mittleren Phosphorylierungsgrad vorliegen.

Die Torin2-behandelten Zellen jedoch zeigen ein deutlich schwächeres Signal als die unbehandelten EZ im M I-Stadium.

Dies bedeutet, dass bei den 24 h mit Torin2 behandelten Oozyten das Repressorprotein 4E-BP1 an Thr37/46 weniger phosphoryliert vorliegt als bei den 10 h unbehandelt gereiften EZ, obwohl sich die Oozyten morphologisch im gleichen Status der Meiose befinden.

5.2.2.2 Auswirkung der Torin2-Behandlung auf Expression und Phosphorylierung von mTor, Raptor und Rictor

Als nächstes wurden die Effekte der Torin2-Behandlung boviner Oozyten auf die Ser/Thr-Kinase mTor und deren Regulatorproteine Raptor und Rictor im Verlauf der IVM näher betrachtet.

Dazu wurden die jeweiligen Proteine als Ganzes und je eine Phosphorylierungsstelle derselben, mittels herkömmlichem SDS-Page-Western blot untersucht (jeweils linke Darstellung). In allen Experimenten wurde eine finale Torin2-Konzentration von 3 μ M im Maturationsmedium verwendet und alle Versuche wurden jeweils zweimal wiederholt.

Die Ergebnisse der Expression der einzelnen Proteine wurden in Relation zur Ladungskontrolle ACTB gesetzt (jeweils mittleres Diagramm) und bei den Untersuchungen bezüglich der jeweiligen Phosphorylierungen wurde der Phosphorylierungsgrad im Verhältnis zum Vorkommen des ganzen Proteins dargestellt (jeweils rechtes Diagramm).

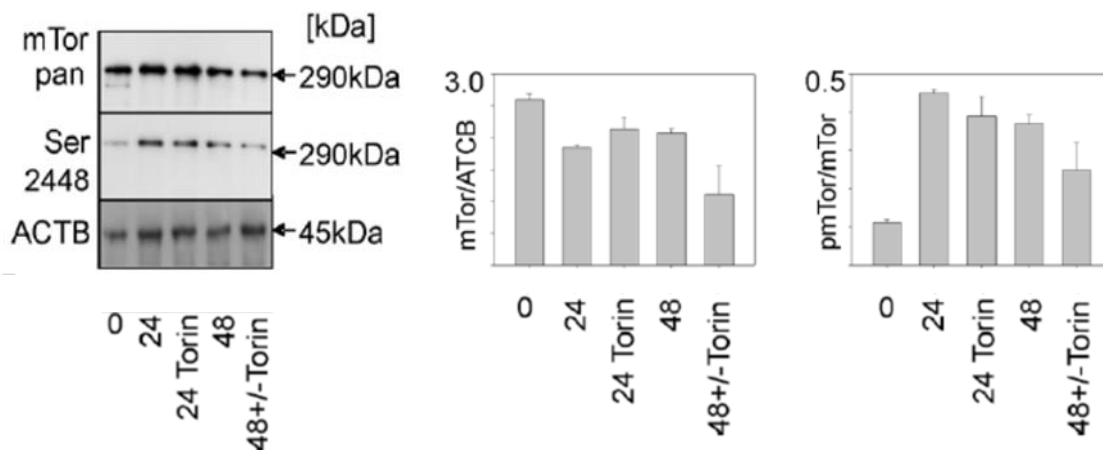


Abb. 31: Analyse von mTor und seiner Phosphorylierung an Ser2448

mittels Western blot (links); es wurden unbehandelte Oozyten nach 0 h, 24 h und 48 h IVM und EZ nach 24 h Torin2-Behandlung (24 Torin) sowie nach 24 h mit Torin2 und weiteren 24 h ohne Torin2 (48 +/- Torin) analysiert; Ladungskontrolle: ACTB;

die beiden rechten Diagramme zeigen die Expression bzw. Phosphorylierung von mTor in Relation zur Ladungskontrolle bzw. zur Gesamtexpression des Proteins; ermittelte Werte wurden als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt

Die Proteinkinase mTor zeigt im Verlauf der IVM und auch nach 24 h Torin2-Behandlung keine signifikanten Veränderungen ($P > 0,05$) bezüglich ihrer vorkommenden Menge.

Die Phosphorylierung von mTor an Ser2448 steigt im Verlauf der IVM von den 0h gereiften zu den 24 h gereiften, unbehandelten EZ deutlich an.

Die Ergebnisse zeigen keinen Einfluss der Torin2-Behandlung auf die Phosphorylierung von mTor im Vergleich zum Status unbehandelter Oozyten im MII-Stadium.

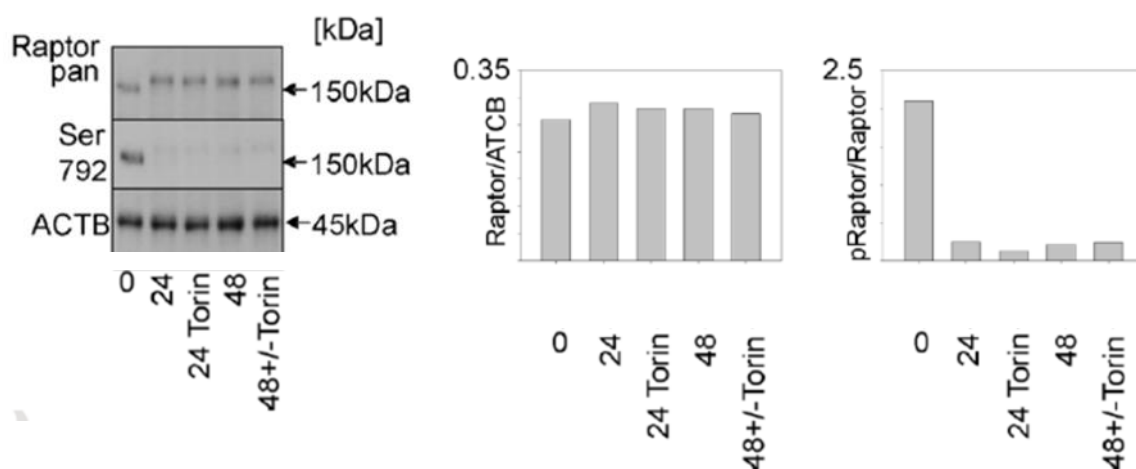


Abb. 32: Analyse von Raptor und seiner Phosphorylierung an Ser792

mittels Western blot (links); es wurden unbehandelte Oozyten nach 0 h, 24 h und 48 h IVM und EZ nach 24 h Torin2-Behandlung (24 Torin) sowie nach 24 h mit Torin2 und weiteren 24 h ohne Torin2 (48 +/- Torin) analysiert; Ladungskontrolle: ACTB;

die beiden rechten Diagramme zeigen die Expression bzw. Phosphorylierung von Raptor in Relation zur Ladungskontrolle bzw. zur Gesamtexpression des Proteins; ermittelte Werte wurden als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt

Das Regulatorprotein Raptor zeigt sich hinsichtlich seines Vorkommens in gleichem Muster wie die Kinase mTor.

Die Analysen der Phosphorylierung bei Raptor ergaben ein gegensätzliches Bild im Vergleich zu mTor oder Rictor. Raptor liegt bei EZ im GV-Stadium an Ser792 hochphosphoryliert vor. Im

Verlauf von 24 h IVM und auch nach 48 h befindet sich Raptor in einem deutlich weniger phosphorylierten Zustand.

Aber auch bei Raptor zeigt die Behandlung der EZ mit Torin2 keinen Einfluss auf dessen Phosphorylierungsstatus im Vergleich zu dem Phosphorylierungsstatus unbehandelt M II gereifter EZ.

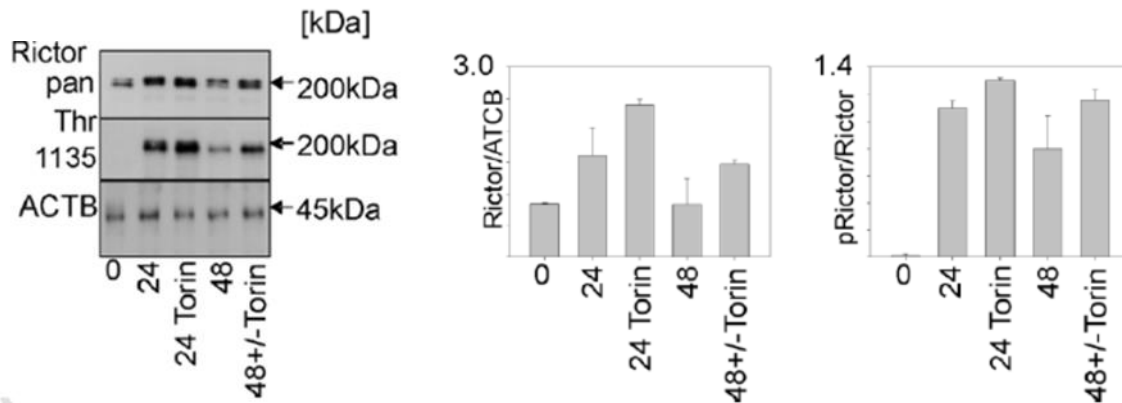


Abb. 33: Analyse von Rictor und seiner Phosphorylierung an Thr1135

mittels Western blot (links); es wurden unbehandelte Oozyten nach 0 h, 24 h und 48 h IVM und EZ nach 24 h Torin2-Behandlung (24 Torin) sowie nach 24 h mit Torin2 und weiteren 24 h ohne Torin2 (48 +/- Torin) analysiert; Ladungskontrolle: ACTB;

die beiden rechten Diagramme zeigen die Expression bzw. Phosphorylierung von Rictor in Relation zur Ladungskontrolle bzw. zur Gesamtexpression des Proteins; ermittelte Werte wurden als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt

Nur das Regulatorprotein Rictor unterscheidet sich teilweise in seiner Expression von Raptor und mTor.

Es ist bei den EZ im GV-Stadium nur wenig vorhanden, hingegen im M II-Stadium und bei den 24h Torin2-behandelten Zellen hoch exprimiert.

Bezüglich des Phosphorylierungsstatus verhält sich Rictor ähnlich dem Protein mTor. Die Phosphorylierung von Rictor an Thr1135 steigt zwischen den GV-Stadium- und den M II-

Stadium-Oozyten deutlich an und zeigt sich ebenfalls von der Torin2-Behandlung unbeeinflusst.

Zusammenfassend zeigt sich, dass der Inhibitor Torin2 die Expression und die Phosphorylierung weder von mTor, noch von Raptor oder Rictor, verglichen mit den für 24 h unbehandelt gereiften EZ, signifikant beeinträchtigt.

5.2.2.3 Auswirkung der Torin2-Behandlung auf translationsrelevante Kinasesysteme

Ein sehr wichtiger Abschnitt der Untersuchungen dieser Arbeit bezieht sich auf die möglichen Effekte der Torin2-Behandlung von bovinen Oozyten auf die Kinasen, die für die TL von entscheidender Bedeutung sind. Die Proteinkinasen PKA, PKB, PKC, CDKs, ATM und ATR sowie die MAPKs erfüllen wichtige regulatorische Eigenschaften während des Zellzyklus, der Entwicklung des Zytoskeletts und der Reifung von EZ (KALOUS et al. 2006 und TOMEK und SMILJAKOVIC 2005).

Um mögliche Nebeneffekte des Inhibitors im Verlauf der IVM zu analysieren, wurden die Kinasesysteme hinsichtlich der spezifischen Phosphorylierung bestimmter Stellen ihrer Substrate untersucht. Dies geschah mit Hilfe des speziellen Analyse-Sets, welches in Kapitel 4.4.3 genau beschrieben ist. Zudem wurden die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 mittels herkömmlichem Western blot analysiert.

Es wurde auch hier eine finale Torin2-Konzentration von 3 μ M im Maturationsmedium verwendet und das Experiment wurde zweimal wiederholt. Alle AK wurden unter Anwendung der Dekaprobeamaske zeitgleich an 150 EZ pro Gruppe getestet.

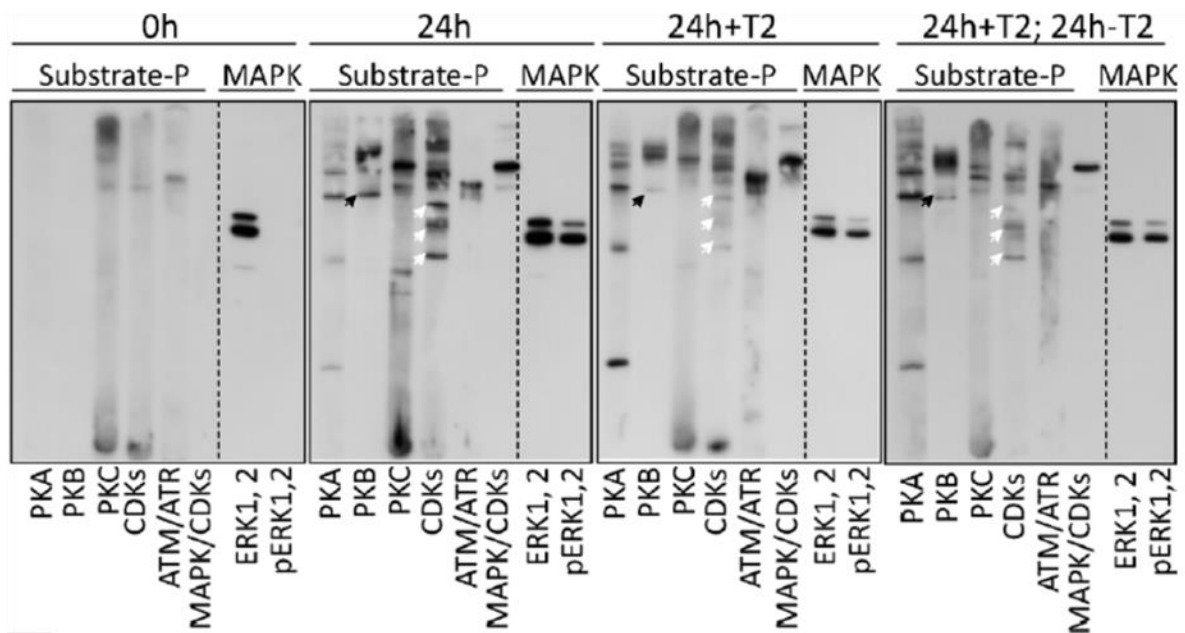


Abb. 34: Analyse der Substratphosphorylierung der Ser/Thr-Kinasen PKA, PKB, PKC, CDKs, ATM/ATR, MAPK/CDK (Substrate-P) und der Expression und Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 (MAPK) mittels Western blot

es wurden unbehandelte Oozyten nach 0 h und 24 h IVM und EZ nach 24 h Torin2-Behandlung (24h+T2) sowie nach 24 h mit Torin2 und weiteren 24 h ohne Torin2 (24h+T2;24h-T2) analysiert; relevante Unterschiede wurden mit Pfeilen markiert (schwarz: PKB; weiß: CDKs);

Die Analysen ergaben, dass im GV-Stadium unbehandelte EZ alle Substrate in einem niedrig-phosphorylierten Zustand vorliegen. Auch die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 kommen bei unreifen EZ unphosphoryliert vor.

Bei 24 h unbehandelt gereiften EZ im M II-Stadium wurde hingegen eine deutliche Phosphorylierung der Substrate sichtbar. Und auch ERK1 und ERK2 sind nach 24 h IVM hoch-phosphoryliert.

Die Analyse der Oozyten mit Inhibitorbehandlung lässt auf die Kinasen PKA, PKC, ATM und ATR sowie die MAPKs keine Nebeneffekte ersichtlich werden. Die Phosphorylierungsmuster der

Substrate verändern sich weder bei den 24 h Torin2-behandelten noch bei den 24 h mit und weitere 24 h ohne Torin2-Behandlung Eizellen maßgeblich.

Ebenso zeigt sich die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 von Torin2 unbeeinflusst.

Bei der Proteinkinase B (Akt, schwarzer Pfeil) und den CDKs (weiße Pfeile) verursacht die Behandlung der Zellen für 24 h mit Torin2 im Vergleich zu den unbehandelt 24 h gereiften EZ eine deutliche Reduktion der Bandenintensitäten.

Jene Signale werden bei den 24 h mit und weiteren 24 h ohne Torin2 gereiften Oozyten wieder deutlicher, was auf eine Reversibilität des Inhibitoreffekts hinweist.

5.2.2.4 Auswirkung der Torin2-Behandlung auf die eIF4E/4E-BP1-Bindung

Da die Torin2-Behandlung der Rindereizellen zu einer deutlichen Reduktion der Phosphorylierung von 4E-BP1 führt, stellt sich nun die Frage, wie sich die Inhibitorbehandlung auf die Bindung des Repressorproteins mit eIF4E und somit auf die TL-Initiation auswirkt. Um dies festzustellen, wurden Immunpräzipitationsanalysen durchgeführt.

Es wurde ein anti-eIF4E-AK verwendet und bei den behandelten Zellen stets eine finale Torin2-Konzentration im Medium von 3 μ M eingesetzt.

Die eingegebene Fraktion (Input, I) und die gebundene Fraktion (Bound, B) wurden in Bezug auf eIF4E und dem Gesamtprotein 4E-BP1 analysiert.

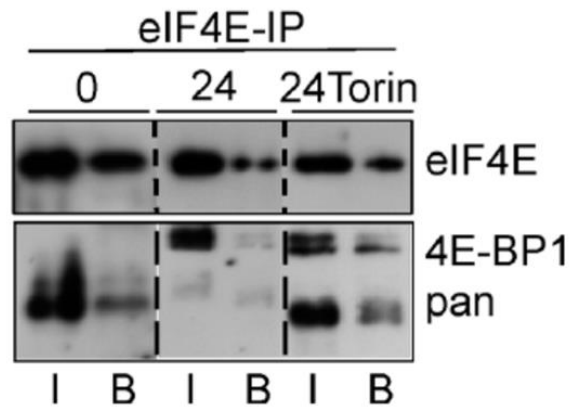


Abb. 35: Immunpräzitationsanalyse mit immobilisiertem anti-eIF4E-AK;

beprobte nach eIF4E und gesamt-4E-BP1 (4E-BP1 pan); es wurden unbehandelte EZ nach 0 h und 24 h IVM, sowie EZ nach 24 h Torin2-Behandlung (24 Torin) analysiert; jeweils Darstellung der eingebrachten Fraktion (I) gegenüber der eIF4E-gebundenen Fraktion (B)

Die Untersuchungen bei unbehandelten EZ im GV-Stadium, nach 0 h IVM, verdeutlichen, dass 4E-BP1 klar hypophosphoryliert vorliegt und an eIF4E gebunden ist. Nach 24 h IVM ist 4E-BP1 komplett in einen phosphorylierten Zustand übergegangen und, deutlich erkennbar, nicht mehr an eIF4E gebunden.

Der Vergleich zwischen 24 h unbehandelt gereiften M II-EZ mit 24 h Torin2-behandelten offenbart sichtbare Unterschiede. 4E-BP1 liegt bei den Inhibitor-behandelten Zellen erwartungsgemäß in drastisch reduzierter phosphorylierter Form, im Vergleich zu den 24 h-Kontrollen, vor. Zudem zeigt sich ein unverkennbarer Teil des Repressors bei den Inhibitor-behandelten EZ an eIF4E gebunden.

6. Diskussion

Die Analyse der Reifungs- und Wachstumsvorgänge von Zellen sind Bestandteil zahlreicher Forschungsarbeiten. Im Gegensatz zu den somatischen Zellen bedürfen die Keimzellen der verschiedenen Spezies besonderes Augenmerk. Unter ausschließlicher Verwendung von Oozyten geschlachteter Rinder wurden in dieser Dissertation die Maturation der Eizellen auf morphologischer und biochemischer Ebene *in vitro* untersucht. Damit speziellen Signalkaskaden detaillierter auf den Grund gegangen werden konnte, kam die Anwendung eines selektiven Inhibitors der neuen Generation (Torin2) zum Einsatz.

Um stabile Ausgangsbedingungen für die Hauptversuche zu schaffen, wurde zu Beginn das *in vitro*-Reifungssystem überprüft.

Vorversuche ergaben, dass sich entnommene bovine Oozyten nach einer Reifungsdauer von 0 h zu nahezu 100 % im GV- bzw. GVBD-Stadium, von 10 h zu ca. 70 % im M I-Stadium und von 24 h zu knappen 80 % im M II-Stadium befanden. Diese Ergebnisse stehen prinzipiell gut im Einklang mit früheren Beschreibungen an Rindereizellen (MELO STERZA 2003). Die Tatsache, dass nach 10 h bzw. 24 h nur 80 % bzw. 85 % der EZ das Stadium der M I bzw. M II erreichten anstatt 90-95 %, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Maturationsmedium aller Versuche nur mit 3mg/ml BSA versetzt war, und keine anderen Zusätze enthielt. Die Zugabe von Hormonen oder Seren könnte nämlich den Effekt einer Inhibitor-Behandlung beeinflussen (KUBELKA et al. 2000).

Obwohl durch frühere Untersuchungen von STINSHOFF et al. 2014 und AVERY und GREVE 2000 auch der Verdacht eines Einflusses des verwendeten Lösungsvermittlers DMSO auf den Reifungsprozess der Eizellen und anschließende embryonale Entwicklung nahe lag, konnte dies hier durch Vorversuche ausgeschlossen werden. Die Verwendung von 1 % DMSO im Maturationsmedium hatte auf Ebene der Chromatinkonfiguration keinen sichtbaren Einfluss auf die Oozyten nach 24 h IVM.

Weitere vorbereitende Versuche wurden auf molekularer Ebene an unreifen und 24 h gereiften Eizellen durchgeführt. Die Untersuchungen auf relevante TL-Initiationsfaktoren und

Kinasen (s. Kapitel 5.1.2.1) deckten sich mit den Ergebnissen früherer Forschungen (SIEMER et al. 2009).

Gestützt auf diese Erkenntnisse wurden nachfolgend die geplanten Hauptversuche mit Verwendung des asTORis Torin2 auf morphologischer und biochemischer Ebene durchgeführt.

6.1 Die aussagekräftigste Konzentration des Inhibitors Torin2 auf Rinder-Oozyten ist bei 3 μ M zu verzeichnen

Um der Frage nachzugehen, ob und inwiefern der Inhibitor Torin2 Auswirkungen auf die Meiose von Rindereizellen hat, wurde zunächst die wirksamste Konzentration ermittelt. Durch Erkenntnisse von LIU et al. 2013 bei somatischen Zellen erfolgte anfangs eine Zugabe von Torin2 im Nanomolar-Bereich. Versuche ab 2 nM Torin2 im Maturationsmedium brachten bis zu einer Konzentration von 1 μ M keine Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Ab 1 μ M des Inhibitors waren morphologisch erste Einflüsse zu erkennen, aber erst eine Konzentration von 3 μ M Torin2 im Reifungsmedium führte zu einem eindeutigen Beweis der Wirkung des Stoffes.

Dass die wirksame inhibitorische Konzentration bei den Ansätzen mit humanen Krebszellen im unteren nM-Bereich (10 - 100 nM) lag und so um einiges geringer war als die hier festgestellte benötigte Dosis bei den Oozyten ist auffällig. Scheinbar ist es bei Keimzellen nötig eine deutlich höhere Konzentration eines Pharmakons anzuwenden, um einen ausreichenden inhibitorischen Effekt zu erzielen, was auch am Beispiel von Rapamycin zu sehen ist. LEE et al. 2012 behandelte die Oozyten von Mäusen für einen ausreichend hemmenden Effekt mit 10 μ M Rapamycin. TUHÁCKOVÁ et al. 1999 erreichte hingegen bei Hamsterfibroblasten mit einer finalen Rapamycin-Konzentration von nur 20 nM im Medium ausreichende Wirkung. Auch beim Akt-Inhibitor SH-6 waren sicher wirksame Konzentrationen bei somatischen Zellen bei 10 μ M zu verzeichnen (KRECH et al. 2010), bei bovinen Oozyten jedoch erst in einer Konzentrationsspanne von 20 μ M - 75 μ M (TOMEK und SMILJAKOVIC 2005). Ein ähnliches Bild beschrieb KUBELKA et al. 2000 über die Verwendung von BL 1. Verifizierbare Ergebnisse

wurden bei somatischen Zellen mit 20 μM - 50 μM BL 1, jedoch bei Rindereizellen erst zwischen 100 μM und 200 μM erzielt.

Eine mögliche Ursache des Konzentrationsunterschiedes könnte die Größe und Wandbeschaffenheit der Zellen sein. Die EZ des Rindes ist mindestens viermal so groß wie eine somatische Zelle und hat einen Durchmesser von ca. 100 μm und die Zelle selbst ist von einer Hülle, der Zona pellucida, umgeben und diese wiederum von der Corona radiata (mehrschichtige Granulosazellen in der Zona pellucida verankert). Diese Gegebenheiten könnten das Eindringen eines Stoffes erschweren und somit die Wirksamkeit niedriger Konzentrationen beeinträchtigen.

Das Arbeiten mit verhältnismäßig hohen Inhibitor-Konzentrationen lässt jedoch das Risiko ungewollter Nebeneffekte steigen. Dies ergaben hier die Ergebnisse der Versuche mit 5 μM Torin2 im Reifungsmedium. Zwar zeigte der Inhibitor eine deutliche Wirkung, doch führte diese Konzentration zu einem klaren Anstieg degenerierter Zellen, was ein Hinweis auf toxische Effekte sein könnte. Diesen sollte in künftigen Versuchen noch genauer auf den Grund gegangen werden.

Da die am besten wirksame Menge eingesetzten Torin2 ermittelt war, wurde bei den weiteren Versuchen stets die Konzentration von 3 μM verwendet.

6.2 Torin2 beeinflusst die Kumulusexpansion und führt zu einem Arrest der Eizellen im Metaphase I-Stadium der Meiose

Auf die Fragestellung, inwiefern sich die Inhibitor-Behandlung genau auf die meiotische Oozyten-Maturation hinsichtlich der Kumulusexpansion und des Chromatinstatus auswirkt, brachten die morphologischen Untersuchungen Erkenntnisse.

Die KOKs nach 24 h IVM der Torin2 behandelten Gruppen wiesen mikroskopisch deutlich aufgelockerte Kumuluszellverbände auf und im Medium befanden sich deutlich mehr lose

Zellen und Fragmente von Kumuluszellplatten. Somit stellen die Kumuluszellen einen Marker für die Torin2-Wirkung dar.

Ob der Inhibitor nur Auswirkung auf die Verbindungen zwischen den Zellen hat oder auf die Kumuluszellen selbst, ist nicht klar. Hierfür könnte die Proteomanalyse der Kumuluszellen weitere Informationen liefern. Besonders die Transmembranproteine (Connexine) und deren Phosphorylierung könnten von Interesse sein um Einflüsse des Inhibitors auf die Zellverbindung zu sehen. Es liegt jedoch die Vermutung nahe, dass Torin2 direkte Auswirkungen auf die Kumuluszellen hat, da bei somatischen Zellen die Verwendung einer so hohen Inhibitor-Konzentration sehr wahrscheinlich toxische Effekte hat. Zudem ist eine starke apoptotische Wirkung des Pharmakons bereits in niedrigen Dosen bei somatischen Zellen beschrieben (WANG et al. 2015).

Die morphologischen Beurteilungen hinsichtlich des Chromatinstatus unbehandelter im Vergleich zu Torin2-behandelter Rinder-Oozyten ließen einen Arrest der Inhibitor-behandelten Zellen im M I-Stadium der Meiose erkennen.

Jedoch führte die 24-stündige Behandlung mit der am besten wirksamen festgestellten finalen Konzentration von 3 μ M Torin2 im Medium nur zu einem Verharren von ca. 60 % der EZ in der Metaphase I. Der Rest der Oozyten fand sich in fortgeschrittenen Reifungsstadien. Ungefähr 15% befanden sich in Ana I oder Telo I und ca. 20 % der Zellen erreichten sogar das M II-Stadium der Meiosereifung.

Der Grund für diese unvollständige Hemmung ist bisher noch nicht geklärt.

Eine mögliche Hypothese basiert auf der Tatsache, dass die Zellen, um von der M I in die M II übergehen zu können, der Aktivität spezieller Kinasen bedürfen.

Es besteht die Vermutung, dass die Oozyten im GV-Stadium zum Anfangszeitpunkt der Experimente nicht alle mit den gleichen Grundgegebenheiten in die Reifung eintreten. Es ist möglich, dass Untergruppen bestehen, in denen manche Kinasen schon aktiv sind, hingegen in anderen noch inaktiv.

Die Subpopulation mit den, bereits am Anfang der IVM voll-aktiven Kinasen könnte so ihre Signalkaskaden bereits vor einer Hemmung durch Torin2 in Gang setzen, Substrate phosphorylieren und somit trotz nachfolgender Inhibitor-Behandlung vollständig reifen.

Es ist auffällig, dass die Hemmung der Proteinkinase B durch den spezifischen Akt-Inhibitor, dem Phosphatidylinositol-Analogon SH-6, ein ähnliches Bild zeigt (TOMEK und SMILJAKOVIC 2005). Morphologische Untersuchungen ergaben auch dort einen M I-Arrest von ca. 60 % der SH6-behandelten bovinen Oozyten. Die restlichen 40 % der EZ erreichten aber trotz der stark hemmenden Wirkung des Inhibitors das M II-Stadium der Meiose.

Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass unter den Zellen im GV-Stadium einige Zellen existieren, welche bereits eine beachtliche Menge an aktivem Akt besitzen (TORNER et al. 2008). Diese höhere Basalaktivität könnte es dieser Zellgruppe nun ermöglichen, trotz Inhibitor-Behandlung den M I-Arrest zu überwinden und die Meiosereifung zu vollenden.

Die unvollständige Inhibierung durch Torin2 könnte ebenfalls auf eine erhöhte basale Aktivität von Akt bei einem Teil der Zellen zurückzuführen sein. Denn der aktiven Kinase Akt könnte es so möglich sein, noch vor vollem Wirkungseintritt von Torin2, die Signalkaskade in Gang zu setzen und mTorC1 zu aktivieren (WOLLENHAUPT et al. 2013).

Um diese Vermutungen zu verifizieren, wäre eine Vorselektion der EZ im GV-Stadium sinnvoll. Eine Methode wäre die Brilliant Cresyl Blue (BCB)-Färbung, auf Basis der G6PDH-Aktivität. Mit dieser Färbung ist die Trennung von unreifen, sich noch im Wachstum befindlichen (hohe G6PDH-Aktivität; BCB negativ) EZ von den entwicklungs kompetenten EZ, mit bereits abgeschlossenem Wachstum (niedrige G6PDH-Aktivität; BCB positiv), möglich. Es hat sich gezeigt, dass BCB positive EZ in einer höheren Blastozystenrate resultieren als BCB negative (TORNER et al. 2008).

Versuchsansätze mit diesen nun getrennten Gruppen würden dann Aussagen über die Relevanz der ursprünglich vorhandenen Basalaktivitäten der Kinasen zulassen. Sollte die Behandlung der BCB-negativen EZ mit Torin2 dann zu einem kompletten M I-Arrest der Zellen führen, die der BCB-positiven jedoch zu einer Mehrheit Zellen, die den Arrest überwinden können, so kann von einem gravierenden Einfluss der basalen Kinaseaktivität auf die Inhibitorwirkung gesprochen werden.

Dieser Ansatz sollte Gegenstand künftiger Untersuchungen sein.

Eine weitere Möglichkeit der Homogenisierung der Ausgangszellen wäre der Einsatz eines reversiblen Inhibitors, wie Butyrolacton 1 (BL 1) in einer Zwei-Phasen-Kultivierung.

Während der Behandlung mit BL 1, welches den GVBD der Meiose blockiert, könnten die EZ durch die verlängerte Kultur im GV-Stadium eine verbesserte Meiose- und Entwicklungskompetenz erreichen (KUBELKA et al. 2000). Somit wäre die Gruppe homogener und könnte nach dem Entfernen des Inhibitors unter einheitlicheren Bedingungen die Maturation fortsetzen.

Die Auswirkungen dieses Kultursystems auf die Ergebnisse einer Torin2-Behandlung wären sehr interessant.

Außerdem zu erforschen wären die Auswirkungen einer Behandlung der EZ mit Torin2 zu einem späteren Zeitpunkt der IVM. Eine dadurch veränderte Verteilung der Zellen in den jeweiligen Meiosestadien könnte ebenfalls aufschlussreiche Erkenntnisse bringen.

Ein weiterer Punkt, der im Interesse künftiger Versuche steht, ist die Prüfung des 4E-BP1-Phosphorylierungsstatus bei den EZ, welche trotz Torin2-Behandlung die Metaphase II erlangen konnten. Sollte sich bei den Zellen dieser Gruppe herausstellen, dass das Repressorprotein in hoch-phosphorylierter Form vorliegt, wovon auszugehen ist, dann würde dies beweisen, dass diese Oozyten von der Inhibitor-Wirkung absolut nicht beeinflusst wurden.

Abgesehen von der Überlegung, warum ein Drittel der Oozyten die M II trotz Inhibitor-Behandlung erreicht, stellt sich die Frage, was genau den M I-Arrest der anderen zwei Drittel verursacht.

Bei der Klärung dieser Fragestellung lag der Fokus auf biochemischen Analysen der einzelnen Proteine (insbesondere dem Repressorprotein 4E-BP1), Kinasen und deren Phosphorylierungsstatus.

Der eukaryotische Initiationsfaktor 4E, welcher eine Schlüsselrolle für die TL spielt, zeigte sich in den Vorversuchen sowohl im GV- als auch im M II-Stadium in ausreichender Menge exprimiert. Bei unreifen Oozyten lag eIF4E erwartungsgemäß (SIEMER et al. 2009; TOMEK et

al. 2002a) in hypo-phosphorylierter Form (fehlende Bande s. Kapitel 5.1.2.1, Abb. 13, Grafik A1) vor und erlangte im Zuge der Reifung in M II einen hoch-phosphorylierten Zustand an Ser209 (deutliche Bande an pEIF4E s. Kapitel 5.1.2.1, Abb. 13, Grafik B). Der Widerspruch, dass im M II-Stadium der Initiationsfaktor im phosphorylierten Zustand vorliegt, aber die TL-Rate in M I am höchsten ist, ist Gegenstand einiger Hypothesen. TOMEK und WOLLENHAUPT 2012 sind der Annahme, dass nicht die Phosphorylierung per se die TL steigert, sondern der Wechsel (Turnover) der Zustände.

Die Versuche mit Torin2 ließen keine Veränderung des Phosphorylierungsstatus von eIF4E erkennen. Dass der Initiationsfaktor von dem Inhibitor unbeeinflusst bleibt, lässt sich gut durch die Tatsache erklären, dass die Phosphorylierung von eIF4E über den MAPK-Signalweg via Mnk1 und Mnk2 gesteuert wird (STEAD und PROUD 2013; TOPISIROVIC et al. 2011; SIEMER et al. 2009; ELLEDEROVÁ et al. 2008), Torin2 aber ein selektiver mTor-Kinasehemmer ist.

6.3 Die Phosphorylierung von 4E-BP1 wird durch Torin2 blockiert

Die 4E-Bindungsproteine regulieren die Cap-abhängige TL via eIF4E, indem sie mit eIF4G um die Bindungsstelle am Initiationsfaktor konkurrieren.

Das Vorkommen und die Interaktion mit eIF4E aller drei 4E-Bindungsproteine wurde schon früh bei somatischen Zellen bewiesen (POULIN et al. 1998).

Um zu klären, ob in Rindereizellen neben 4E-BP1 auch die Repressorproteine 4E-BP2 und -BP3 eine tragende Rolle spielen, wurden EZ im GV-Stadium nach deren Vorkommen getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass 4E-BP2 und -BP3 in unreifen bovinen Oozyten nicht wesentlich exprimiert werden. 4E-BP1 zeigt im Gegensatz dazu ein ausreichend großes Vorkommen im GV- sowie im M II-Stadium.

Die Tatsache, dass 4E-BP2 und 4E-BP3 nicht oder nicht messbar gering in bovinen Oozyten vorkommen, beweist, dass die Hemmung der eIF4E/eIF4G-Bindung durch 4E-BP1 allein zustandekommt und die anderen Isoformen dabei nicht von Bedeutung sind.

Das Substrat der Ser/Thr-Kinase mTor, 4E-BP1, wurde also wichtiger Hauptbestandteil der biochemischen Versuche dieser Arbeit.

Besonderes Interesse galt der Aktivität und somit dem Phosphorylierungsstatus des Repressorproteins.

Wie schon früher beim Schwein (ELLEDEROVÁ et al. 2006) und beim Rind (SIEMER et al. 2009) beschrieben, konnte auch hier gezeigt werden, dass 4E-BP1 im GV-Stadium weder an Thr37/46 noch an Thr70 phosphoryliert vorliegt. Im M II-Stadium ist es aber dann an allen untersuchten Stellen in phosphorylierter Form vorhanden, wobei die Bandenintensität bei Thr70 etwas schwächer ist.

Die abgeschwächte Bande bei Thr70 lässt sich dadurch erklären, dass die Signalintensitäten der 4E-BP1 Phosphorylierungsstellen im herkömmlichen Western blot bei Keimzellen bisher nur bei Thr37/46 solide waren und sämtliche andere trotz spezifischer Antikörper nur schwache Banden zeigten (ELLEDEROVÁ et al. 2006). Deswegen gestaltete sich die Untersuchung des komplexen Expressionsmusters der Phosphorylierungen von 4E-BP1 schwierig.

Zunächst wurde die Wirkung des Inhibitors auf die für die TL essentielle Stelle Thr37/46 getestet. Die Ergebnisse zeigten, durch eine deutliche Abschwächung der Bande im Western blot, eine Reduzierung der Phosphorylierung von 4E-BP1 an Thr37/46 nach 24 h IVM um das Dreifache im Vergleich zu unbehandelt 24 h IVM gereiften Eizellen (s. Kapitel 5.2.2.1.3 Abb. 29). Nach 48 h IVM (24 h +/- Torin2) verstärkte sich das Signal der Bande dann wieder, was auf einen erneuten Anstieg der Phosphorylierung schließen lässt. Die Reduktion der Phosphorylierung ist somit reversibel.

Die, bei bovinen Oozyten erstmalige, Anwendung des asTORis Torin2 in einer Konzentration von 3 μ M blockierte also nachweislich die Phosphorylierung von 4E-BP1 an Thr37/46. Diese Hemmung führt demnach dazu, dass sämtliche weitere Phosphorylierungsereignisse an 4E-BP1 nicht stattfinden (hierarchisches Phosphorylierungsmuster; s. Kapitel 2.3.2.1.2).

Ist die 4E-BP1-Phosphorylierung in toto blockiert, so bindet 4E-BP1 wieder an eIF4E und hindert es so daran, den TL-Initiationskomplex eIF4F zu bilden und damit die TL in Gang zu bringen. Die gesteigerte Bindung von 4E-BP1 an eIF4E durch Torin2-Behandlung als Ergebnis der Immunpräzipitationsanalysen (s. Kapitel 5.2.2.4) bestätigt dies. Ebenfalls spiegelt sich diese Tatsache im, in dieser Arbeit festgestellten, Arrest der EZ im M I-Stadium der Meiose (s.

Kapitel 5.2.1.3) wider. Torin2 verhindert die TL, senkt somit die TL-Rate, welche in M I physiologischer Weise am höchsten ist (TOMEK et al. 2002a; TOMEK et al. 2002b), und die Oozyte kann die Meiose nicht mehr vollenden, da der Reifungsprozess gestört wird.

Diese Erkenntnis, dass der mTor-Inhibitor die Phosphorylierung eines mTor-Substrates hemmt, deckt sich mit vorherigen Untersuchungen anderer bei somatischen Zellen (LIVINGSTONE und BIDINOSTI 2012; FELDMAN et al. 2009; THOREEN et al. 2009), bei denen die asTORis die mTor-Funktionen vollständig blockieren.

Auffällig bei den Ergebnissen der Western blots der 4E-BP1-Phosphorylierungen war, dass, obwohl die morphologischen Untersuchungen eine Blockierung der EZ im Metaphase I-Stadium der Meiose infolge Torin2-Behandlung ergeben haben, die Bandenintensitäten der 4E-BP1 Phosphorylierung von 10 h unbehandelt gereiften Oozyten nicht denen der 24 h Torin2-behandelten entsprachen.

Die Signale der unbehandelten EZ zeigten sich stärker als die des Inhibitor-Ansatzes. Somit liegt 4E-BP1 bei den Torin2-behandelten Zellen schwächer phosphoryliert vor als bei den 10 h unbehandelt gereiften. Da sich beide Zellgruppen im M I-Stadium des Zellzyklus befinden, ist diese Tatsache interessant.

Eine Erklärung dafür wäre, dass Torin2 die Phosphorylierung an Thr37/46 von 4E-BP1 vollständig blockiert, und so angenommen wird, dass die M I-arretierten EZ nach Torin2-Behandlung nur noch weitgehend unphosphoryliertes 4E-BP1 aufweisen. Und die dennoch vorhandene schwache Bande bei der Inhibitorgruppe stammt mit großer Wahrscheinlichkeit von jenen 20 % der EZ, welche nach 24 h IVM trotz Torin2-Behandlung das M II-Stadium der Meiose erreicht haben. Diese 20 % wären dann resistent gegenüber Torin2 und somit in M II in phosphoryliertem Zustand.

Um dem komplexen Expressionsmuster der Phosphorylierung von 4E-BP1 noch besser auf den Grund zu gehen, wurde hier zusätzlich zum herkömmlichen Verfahren ein modifizierter Western blot erprobt.

Die Phos-tag-PAGE zeigte sich in der Vergangenheit als vielversprechende Methode den Phosphorylierungsstatus relevanter Proteine und Kinasen besser zu visualisieren als mit der

herkömmlichen SDS-PAGE (SUGIYAMA et al. 2015; KINOSHITA et al. 2009; KINOSHITA-KIKUTA et al. 2007; KINOSHITA et al. 2006).

Die Verwendung dieser Elektrophorese machte zwar deutlich sichtbar, dass Torin2 die Phosphorylierung an 4E-BP1 an Thr37/46 binnen 24 h IVM reduziert und die von eIF4E an Ser209 unbeeinflusst bleibt, doch waren auch in dieser PAGE die Signale anderer Banden zu schwach, um Schlüsse auf den Einfluss des Inhibitors auf die anderen Phosphorylierungsstellen von 4E-BP1 ziehen zu können.

Da die Phos-tag-PAGE-Analyse keine neuen Erkenntnisse bezüglich des Phosphorylierungsmusters des hoch-konservierten Proteins ergeben hatte, lag der Fokus somit hauptsächlich auf der bisher Rapamycin-resistenten Phosphorylierung an Thr37/46.

6.4 Der durch Torin2 verursachte M I-Arrest ist im Gegensatz zur Hemmung der Phosphorylierung von 4E-BP1, irreversibel

Eine besondere Feststellung im Rahmen dieser Arbeit wurde bezüglich der Reversibilität der inhibitorischen Wirkung von Torin2 gemacht.

Während sich die zunächst geschehene Blockierung der Phosphorylierung von 4E-BP1 durch 24 h Torin2-Behandlung nach Kultivierung der Oozyten für weitere 24 h in Torin2-freiem Medium als reversibel zeigte (erneuter Anstieg), ergab die Wirkung auf den Fortgang der Meiose ein anderes Bild. Die Arretierung boviner EZ in der M I der Meiose durch 24 h Behandlung mit Torin2 blieb auch nach Inkubation für weitere 24 h in Inhibitor-freiem Medium bestehen. Morphologisch konnte der M I-Arrest also als irreversibel eingestuft werden.

Somit stellt sich nun die Frage, warum die Blockierung der 4E-BP1-Phosphorylierung einen reversiblen Vorgang darstellt, der Arrest der Zellen im M I-Stadium des Zellzyklus jedoch irreversibel ist.

Ein Ansatz der Erklärung dieses Widerspruchs liegt in der räumlich-zeitlich regulierten Kontrolle der Translation, in welche 4E-BP1 maßgeblich involviert ist.

Die Vermutung ist, dass die Inhibitor-Behandlung Prozesse, die eigentlich vom aktiven Repressorprotein reguliert werden, durch dessen blockierte Phosphorylierung irreversibel aus

dem Gleichgewicht gebracht werden, und so ein Fortgang der Maturation für die EZ trotz nachträglich phosphoryliertem 4E-BP1 nicht mehr möglich ist.

Bei Mäuseeizellen wurden bereits einige Erkenntnisse über die lokale Regulierung der TL veröffentlicht (ROMASKO et al. 2013).

In der Oozyte führen der GVBD und die folgende Chromatinkondensation mit Reorganisation der Mikrotubuli (SUN et al. 2001) zur Bildung des Spindelapparates der M I (LEE et al. 2012).

Diese Meiose-Spindel ist an sich eine komplexe Struktur, die im Verlauf der Evolution erhalten geblieben ist. Über 1100 spindelassoziierte Proteine, von denen 400 spindelspezifisch sind, gewährleisten an Ort und Stelle die Bildung, Funktion und Erhaltung der Spindel (ROMASKO et al. 2013).

ROMASKO et al. 2013 untersuchte den Spindel-Chromosomen-Komplex genau und stellte dort eine Anreicherung spezifischer maternaler mRNAs und Proteine fest.

Interessant im Hinblick auf die TL ist zum einen die Anreicherung des RPS6 in phosphorylierter Form. Dieses Protein stellt, aufgrund seiner Assoziation mit der Bildung funktionsfähiger TL-Initiationskomplexe und dem Vorkommen von Polysomen einen gebräuchlichen Marker für aktive TL dar.

Zum anderen ist die beschriebene Anreicherung des phosphorylierten 4E-BP1 am Spindelapparat von Bedeutung. Wobei zu erwähnen ist, dass die Phosphorylierungsereignisse von 4E-BP1 an verschiedenen Orten an der Spindel zu unterschiedlichen Meiose-Zeitpunkten ermittelt wurden (ROMASKO et al. 2013).

Daher besteht die Annahme, dass die räumlich-zeitlich regulierte Phosphorylierung von 4E-BP1 lokalisiert die TL bestimmter mRNAs kontrolliert. Dadurch werden Spindelbildung, -erhaltung und -funktion unterstützt und andere, für den Fortgang des Zellzyklus nötigen Prozesse möglich.

Werden nun diese mRNAs wegen der Blockierung der 4E-BP1-Phosphorylierung nicht translatiert, so kommt es dadurch vermutlich zur Blockade der Maturation im Metaphase I-Stadium der Meiose. Zudem werden die im Wachstum der EZ sehr stabilen mRNAs, seit Beginn der Maturation zunehmend instabiler. Dies führt zur Annahme, dass es folglich zu einer Degradation dieser, nicht-translatierten mRNAs kommt, was eine spätere TL jener unmöglich

macht. So kann auch die spätere Phosphorylierung von 4E-BP1 den Fortgang der Meiose nicht mehr in Gang setzen.

Ein weiteres Beispiel für einen räumlich-zeitlich festgelegten Prozess am Spindelapparat wurde von LEE et al. 2012 beschrieben.

Er bewies eine Anreicherung von mTor am Spindel-Chromosomen-Komplex und eine maßgebliche Beteiligung von diesem an der Kontrolle des Zytoskeletts während der IVM von Mäuseeizellen.

Unabdingbar für den physiologischen Ablauf der Meiose von EZ ist die asymmetrische Zellteilung, wodurch eine hoch-polarisierte Oozyte und ein ausgeschleustes PK I entsteht. Notwendig für diese ordnungsgemäße Teilung sind die Migration und Verankerung des Spindelapparates, also die kortikale Reorganisation und Polarisation der EZ innerhalb einer bestimmten Zeitspanne.

Wird nun die Kinase mTor mittels Behandlung mit selektiven Inhibitoren wie Rapamycin oder mittels Injektion von anti-mTor-Antikörpern blockiert, so kommt es wegen der notwendigen Beteiligung von mTor an der Polarisation der EZ zur Beeinträchtigung der kortikalen Reorganisation und einer pathologischen asymmetrischen Teilung der Zelle. Die Reifung ist somit ebenfalls irreversibel gestört.

Von einer weiteren Störung der Reifung berichtete KALOUS et al. 2009. Die Behandlung von Schweineeizellen mit dem Akt-Inhibitor SH-6 führte zu einem Arrest der Eizellen im M I-Stadium der Meiose und es zeigten sich defekte M I-Spindeln. Diese defekten Spindeln sind mit hoher Wahrscheinlichkeit die Ursache für die Störung der Reifung.

Auf Grund dieser beschriebenen zeitlich und örtlich eng regulierten, wichtigen Vorgänge in den EZ von Mäusen und Schweinen, liegt die Vermutung sehr nahe, dass die irreversibel blockierte Reifung der Rinder-Oozyten in dieser Studie auch darin begründet liegt. Weitere Erkenntnisse diesbezüglich könnten in der Zukunft mittels immun-histochemischer Untersuchungen erlangt werden.

6.5 Die Behandlung mit Torin2 zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die TL-Komponenten mTor, Raptor und Rictor

Da die Aktivität des Repressorproteins 4E-BP1 über den mTorC1-Kinasekomplex reguliert wird und Rapamycin mTor bekanntlich unvollständig hemmt (mTorC2 ist insensitiv auf Rapamycin), war es von großem Interesse, die Expression und Phosphorylierung der TL-Komponenten mTor, Raptor und Rictor in den bovinen Oozyten zu untersuchen sowie den Einfluss von Torin2 auf diese.

Die Auswahl der analysierten Phosphorylierungsstellen wurde in Anlehnung an frühere Publikationen getroffen. Demnach war Thr1135 aus 28 beschriebenen Stellen für Rictor gewählt worden, da dies bei allen Vertebraten vorkommt und die Phosphorylierung dort die deutlichsten Effekte im Zusammenhang mit mTorC2 gezeigt hat (HALL und TAMANOI 2010).

Von Raptor wurde nach Beschreibungen von GWINN et al. 2008 aus 10 sicher existenten Phosphorylierungsstellen Ser792 analysiert. Und bei mTor fiel die Wahl aus 4 identifizierten Stellen auf Ser2448, welche durch das mTorC1-Substrat S6K1 phosphoryliert wird (HALL und TAMANOI 2010).

Die Inhibitor-Versuche dieser Forschungsarbeit haben gezeigt, dass Torin2 die Expression und die Phosphorylierung weder von mTor noch von Raptor oder Rictor, verglichen mit den für 24 h unbehandelt gereiften EZ, signifikant beeinträchtigt.

Eine scheinbar leichte Tendenz des Rückgangs der Expression von mTor und Rictor nach 48h +/-Torin2 und auch bei den 48 h unbehandelten EZ bei Rictor (s. Kapitel 5.2.2.2, Abb. 31 und 33) konnte mit der bisher untersuchten Menge an Proben nicht ausreichend verifiziert werden. Die Standardabweichung zeigte sich dort sehr groß.

Um der Entwicklung nach 48 h weiter auf den Grund zu gehen, bedarf es künftig zusätzlicher Experimente.

Die Untersuchungen haben aber eine unterschiedliche Aktivität der zwei mTor-Komplexe während der Meiosereifung belegt, was eine Verbindung zur Aktivität des Repressorproteins 4E-BP1 entstehen lässt.

Der Western blot macht, bei gleichbleibender Expression, eine steigende Phosphorylierung an Ser2448 von mTor selbst während der IVM boviner Oozyten deutlich. Dieses Resultat stimmt mit vorher beschriebenen Erkenntnissen bei Mäuseeizellen überein (KOGASAKA et al. 2013).

Das Regulatorprotein des für die Kontrolle der mRNA-TL und der Ribosomenbiogenese wichtigen mTorC1-Komplexes, Raptor, zeigte sich während der Meiosereifung immer ausreichend vorhanden. Seine Phosphorylierung an Ser792 ist im GV-Stadium hoch und nimmt aber während der Maturation stetig ab.

Dies weist, da diese Phosphorylierung eine Inaktivität des Regulators bedeutet (HALL und TAMANOI 2010; TREINS et al. 2010; GWINN et al. 2008), auf einen im GV-Stadium inaktiven und im M II-Stadium aktiven mTorC1-Komplex hin.

Im Gegensatz dazu stellte sich die Expression des Regulators des, für die Phosphorylierung von Akt essentiellen mTorC2-Komplexes, Rictor, im GV-Stadium auf einem niedrigen Niveau dar. Außerdem lag es im GV-Stadium in einem an Thr1135 nahezu unphosphoryliertem Zustand vor. Bis zum M II-Stadium stieg das Vorkommen und die Phosphorylierung von Rictor dann stetig an.

Der mTorC2-Komplex ist im GV-Stadium zwar scheinbar aktiv, da Rictor, welcher in phosphorylierter Form ebenfalls einen potentiell hemmenden Effekt auf den Komplex ausübt (JULIEN et al. 2010; TREINS et al. 2010; DIBBLE et al. 2009), nahezu unphosphoryliert ist. Aber nur wenig mTorC2-Komplexbildung ist möglich, da der Bestandteil Rictor nicht ausreichend exprimiert ist.

Bezüglich des 4E-BP1 erklären diese Gegebenheiten dessen niedrige Phosphorylierung im GV-Stadium der Meiose, da ein inaktiver mTorC1-Komplex 4E-BP1 nicht phosphoryliert.

Die bis zum M II-Stadium vorhandene steigende Aktivität des mTorC1-Komplexes, aufgrund der Reduktion der Raptor-Phosphorylierung, ist folgend erklärend für die hohe Phosphorylierung von 4E-BP1 im M II-Stadium.

Der mTorC2-Komplex scheint in der Metaphase II zwar ausreichend gebildet zu sein, aber der immer mehr phosphorylierte Regulator Rictor inaktiviert vermutlich dessen Funktion zunehmend.

Die beginnende Reduktion der 4E-BP1-Phosphorylierung, welche an der schwächeren Bande (s. Kapitel 5.2.2.1.2, Abb. 28, zweite Grafik) nach 48 h IVM sichtbar wurde, ist ein ebenfalls stimmiges Ergebnis. Wissenschaftler früherer Untersuchungen (Rind: SIEMER et al. 2009 und Schwein: SÜSÖR et al. 2008) berichten von einer ebenfalls schwächer werdenden Expression und Phosphorylierung des Repressorproteins nach 48 h IVM und in frühen Embryonalstadien. Zudem wurde die Kinaseaktivität von Akt, welche mTorC1 hoch- und mTorC2 herunterreguliert, in der Metaphase I des Zellzyklus am höchsten beschrieben (BALLOU und LIN 2008). Dies passt genau zu der ermittelten zunehmenden mTorC1-Aktivitätssteigerung und 4E-BP1-Phosphorylierung und der abnehmenden mTorC2-Aktivität in diesem Zellzyklusstadium.

6.6 Nebeneffekte der Torin2-Behandlung auf andere TL-relevante Kinasesysteme

Die letzte große Versuchsreihe sollte Aufschluss geben, wie sich andere an der TL beteiligten Kinasesysteme im Verlauf der IVM hinsichtlich ihrer Substratphosphorylierung verhalten und welchen Effekt die Behandlung der Zellen mit Torin2 hat.

Untersucht wurden zunächst die Ser/Thr-Kinasen PKA, PKB, PKC, CDKs, ATM und ATR sowie die MAPKs ERK1 u ERK2 ohne Verwendung des Inhibitors. Ergebnisse zeigten, dass alle Proteinkinasen im GV-Stadium der Meiose nicht-phosphoryliert vorliegen und im M II-Stadium deutlich phosphoryliert sind.

Diese charakteristischen Phosphorylierungsmuster der Substrate bei M II-gereiften EZ decken sich mit früheren Untersuchungen von SIEMER et al. 2009.

Bei den folgenden Inhibitor-Versuchen verursachte der Einsatz von 3 μ M Torin2 im Maturationsmedium keine Effekte auf PKA und PKC sowie den MAPKs ERK1 und ERK2. Auch

ATM und ATR, deren Aktivität bei somatischen Zellen von Torin2 potent gehemmt wurde (LIU et al. 2013), blieben bei bovinen Oozyten vom Inhibitor unbeeinträchtigt.

Dass die Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 unbeeinflusst bleibt, korrespondiert gut mit der vorher beschriebenen, durch den Inhibitor unbeeinträchtigten, stabilen Phosphorylierung von eIF4E (s. Kapitel 5.2.2.1.1).

Die Proteinkinase B (Akt) und die Cyclin-abhängigen Kinasen zeigten sich aber auf die Anwendung des Inhibitors sensitiv.

Nach 24 h IVM mit Torin2 reduzierte sich die Substratphosphorylierung von Akt und den CDKs deutlich (s. Kapitel 5.2.2.3, Abb. 34). Nach weiteren 24 h folgender IVM ohne Inhibitor (48 h Gesamtreifungszeit) erhöhte sich bei beiden Kinasen der phosphorylierte Anteil wieder, was auf eine reversible Hemmung der Phosphorylierungen durch Torin2 schließen lässt.

Die Kinase Akt ist ein mTorC2-Substrat und wird von diesem Komplex direkt an Ser473 phosphoryliert. Dies geschieht schon zu einem gewissen Grad im GV-Stadium und steigert sich zunehmend bis zum GVBD-Stadium der Meiose. Die Phosphorylierung der zweiten Stelle an Akt an Thr308 erfolgt später (zwischen GVBD- und M I-Stadium) durch Phosphoinositide-dependent Kinase 1 (PDK1) und benötigt aber die Phosphorylierung an Ser473 als vorangegangenes Ereignis. Da Akt am Übergang von der Metaphase I in die Metaphase II involviert ist, führt die Verwendung des spezifischen Akt-Inhibitors SH-6 zu einer reversiblen Hemmung der Phosphorylierung von Akt und zu einem Arrest der Oozyten im M I-Stadium. Dies bewiesen TOMEK und SMILJAKOVIC 2005 bei Rindereizellen und KALOUS et al. 2009 bei Schweineeizellen.

Dass die Aktivierung von Akt durch Torin2 gehemmt wird, beweist folglich einen wirksamen direkten Einfluss des Inhibitors auf den, bisher Rapamycin-insensitiven, mTorC2-Komplex.

Die oben gestellte Hypothese, dass die Subpopulation von Eizellen, welche bereits im GV-Stadium eine sehr hohe Akt-Aktivität innehaben, den M I-Arrest überwinden und das M II-Stadium erreichen, passt zu diesen Ergebnissen. Diese Subpopulation ist nämlich nicht mehr auf die Aktivierung von Akt angewiesen und somit auch für Torin2 nicht angreifbar.

Eine Verminderung der Bandenintensitäten der Substratphosphorylierung durch 24h Torin2-Behandlung ist ebenfalls bei den CDKs zu registrieren. Dies lässt sich dadurch erklären, dass eine Unterdrückung der Akt-Aktivität in einem bewiesenen Zusammenhang mit einem Abfall der CDK1-Aktivität steht (KALOUS et al. 2009; TOMEK und SMILJAKOVIC 2005). Die CDK1 (=p34^{cdc2}) fungiert als katalytische Untereinheit zusammen mit der regulatorischen Untereinheit Cyclin B, welche zusammen den Maturation promoting Faktor (MPF) bilden. Der MPF, welcher u.a. als Regulator der Meiose in allen eukaryotischen Zellen tätig ist, scheint jedoch trotz der Verminderung der CDK1-Aktivität durch Torin2 aktiv zu sein. Der MPF ist verantwortlich für den GVBD der EZ (TOMEK und SMILJAKOVIC 2005; KUBELKA et al. 2000). Ist dieser Faktor nicht aktiv, so verbleibt die Zelle im GV-Stadium und die weitere Maturation ist blockiert. Da die bovinen Oozyten nach Inhibitor-Behandlung jedoch zumindest bis ins M I-Stadium reifen, scheint die Aktivität des MPF von Torin2 doch weitgehend unbeeinflusst zu sein.

Es ist also zusammenfassend festzustellen, dass die Behandlung boviner Oozyten mit dem Inhibitor Torin2 wahrscheinlich reversible Nebeneffekte auf die spezifische Substratphosphorylierung der Kinasen PKB und CDKs bewirkt, die anderen Kinasesysteme jedoch nicht beeinflusst.

Somit ist Torin2 auch bei Rindereizellen nun nachgewiesenermaßen ein selektiver, wirksamer und spezifischer Inhibitor einer neuen Generation, der es ermöglicht, bisher resistente Stellen des mTor-Signalweges zu hemmen und die Keimzellen in ihrer Maturation in vitro zu blockieren.

Torin2 blockiert selektiv das Repressorprotein 4E-BP1, was eine Hemmung des mTorC1-Komplexes voraussetzt. Zudem hat Torin2 einen hemmenden Effekt auf den bisher Rapamycin-insensitiven mTorC2-Komplex, da er die Akt-Aktivität reduziert.

Der Inhibitor hemmt spezifisch den mTor-Signalweg. Er beeinflusst eIF4E nur indirekt über die 4E-BP1-Bindung und zeigt sonst auch nahezu keine Nebeneffekte auf andere TL-relevante Kinasesysteme (MAPK, PKA, PKC, ATM/ATR).

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen im Einklang mit vorangehenden Untersuchungen von LIU et al. 2013. Sie bewiesen diese herausragende Wirkung von Torin2 auf beide mTor-Komplexe bei somatischen Zelllinien. Torin2 zeigte dort hohe Selektivität und blockierte langanhaltend die Phosphorylierungen der mTor-Substrate ohne, wie z.B. Rapamycin, die Kinase Akt zu reaktivieren.

Im Vergleich zu den anderen ATP-kompetitiven Inhibitoren, wie Torin1 oder PP242, zeigte Torin2 eine verlängerte, potentere und breitere Wirkung sowie vorteilhaftere pharmakologische Eigenschaften. Eine orale Bioverfügbarkeit und bessere Löslichkeit im Gegensatz zu Torin1 wurden beschrieben, was im Hinblick auf einen möglichen Einsatz in der Krebstherapie von Bedeutung ist.

7. Zusammenfassung

Der mehrstufige Prozess der Proteinbiosynthese ist für jede Zelle und somit jedes Lebewesen essentiell. Ab dem frühen Meiosestadium des GVBD-Stadiums bei Eizellen wird die Genexpression nahezu ausschließlich über die Translation vorher transkribierter, gespeicherter RNA kontrolliert.

Der mRNA-cap-bindende Komplex eIF4F (bestehend aus dem Gerüstprotein eIF4G, der RNA-Helikase eIF4A und dem mRNA-cap-bindenden Protein eIF4E) ist der zentrale Knotenpunkt der Kontrolle der Translation. Die Formation des Komplexes wird zum einen über Phosphorylierung der Komponenten geregelt und zum anderen über das Bindungsprotein 4E-BP1. Durch die Bindung an eIF4E kann 4E-BP1, dessen Aktivität über den mTor-Signalweg reguliert wird, die Initiation der TL unterdrücken. Um die maturationspezifische Proteinbiosynthese detaillierter zu erforschen, kam im Rahmen dieser Arbeit erstmals bei bovinen Oozyten ein Mitglied einer neuen Generation der mTor-Inhibitoren, der active-site-mTor-Inhibitor Torin2, zum Einsatz. Die Auswirkungen während der IVM von Rindereizellen durch die Behandlung mit Torin2 wurden morphologisch durch Beurteilung der Kumuluszellexpansion und des Chromatinstatus überprüft. Zudem erfolgte auf biochemischer Ebene eine Analyse der Effekte mittels SDS-PAGE, phos-tag-SDS-PAGE, Western blot und Immunpräzipitationsuntersuchungen.

Eine zuvor ermittelte wirksame Konzentration von 3 μ M Torin2 im Maturationsmedium führte zu einem irreversiblen Arrest von 60 % der Oozyten im M I-Stadium der Meiose. Die Versuche bewiesen eine effektive, spezifische und reversible Blockade der Rapamycin-insensitiven Phosphorylierung von 4E-BP1 an Thr37/46 ohne Nebeneffekt auf eIF4E oder sämtliche andere Kinasesysteme (MAPK, PKA, PKC, ATM/ATR). Eine herausragende Wirkung auf mTor mit hemmendem Einfluss auf beide mTor-Komplexe, mTorC1 und mTorC2, konnte auf molekularer Ebene nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Stimulation der TL durch die Phosphorylierung von 4E-BP1 für die meiotische Reifung der Eizelle von der M I in die M II notwendig ist. Jedoch scheint die TL dort ein örtlich und zeitlich eng regulierter Vorgang zu sein, da der durch Torin2

verursachte Arrest der Oozyten in der M I bestehen bleibt obwohl sich die 4E-BP1 Phosphorylierung reversibel inhibiert zeigt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die spezifische Wirkung des active-site-mTor-Inhibitors Torin2 ein gutes Mittel für künftige Forschung im Bereich der Eizellreifung und der frühen Embryonalentwicklung darstellt.

8. Summary

The multiple phases of the protein biosynthesis process are a core processes for all cells and therefore essential for all living things. At the GVBD stage of meiosis, the gene expression will be almost exclusively checked by the translation of former transcribed, stored RNA.

The mRNA-cap-binding complex eIF4F (existing of the scaffold protein eIF4G, the RNA helicase eIF4A and the mRNA-cap-binding protein eIF4E) is the central hub of the translation check. The formation of the complex will be regulated on the one hand by a phosphorylation of components and on the other hand by the binding protein 4E-BP1. The binding of the eIF4E the 4E-BP1, whose activity will be regulated via the mTor-signaling pathway, can suppress the initiation of the TL. Within the scope of this work we used for the first time a member of the new generation of mTor inhibitors, the active site mTor-inhibitor Torin2, on bovine oocytes to explore the more detailed maturation specifics of the proteinbiosynthesis. The effects of Torin2 treatment on maturing bovine oocytes were morphologically checked by evaluation of the cumulus cell expansion and the chromatin status. In addition, the effects were also analyzed at a biochemical level by means of SDS-PAGE, phos-tag-SDS-PAGE, western blot and immune precipitation studies.

An already determined, the effective concentration of 3 μ M Torin2 in maturation medium led to an irreversible arrest of 60 % of the oocytes at the M I stage of the meiosis. The experiments gave proof of an effective, specific and reversible blockage of the rapamycin-insensitive phosphorylation of 4E-BP1 to Thr37/64 without side effects on eIF4E or all other kinases systems (MAPK, PKA, PKC, ATM/ATR). An outstanding effect on mTor with inhibiting effects on both mTor-complexes, mTorC1 and mTorC2, was proven at the molecular level.

These results show that stimulation of TL by phosphorylation of 4E-BP1 is necessary for meiotic maturation of the oocyte from M I to M II. However, it seems that there is a local and more time-regulated TL occurrence, because Torin2 caused arrest of oocytes in M I which will still exist although 4E-BP1 shows to inhibit phosphorylation reversibly.

In summary, the specific effect of the active-site-mTor-inhibitor Torin2 represents a good source for future research on oocyte maturation and early embryonic development.

9. Literaturverzeichnis

AGUILAR, H.N., TRACEY, C.N., TSANG, S.C., MCGINNIS, J.M. und MITCHELL, B.F. (2011):
Phos-tag-based analysis of myosin regulatory light chain phosphorylation in human uterine myocytes.
PLOS One 6(6): e20903.

ANDERSON, E. und Albertini, D.F. (1976):
Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary.
Journal of Cell Biology 71(2): 680-6.

AVERY, B. und GREVE, T. (2000):
Effects of ethanol and dimethylsulphoxide on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine cumulus-oocyte complexes.
Molecular Reproduction and Development 55(4): 438-45.

BAKER, T.G. und HUNTER, R.H.F. (1978):
Interrelationships between the oocyte and somatic cells within the Graafian follicle of mammals.
Annales de Biologie animale Biochimie Biophysique 18(2B): 419-426.

BALLOU, L.M. und LIN, R.Z. (2008):
Rapamycin and mTOR kinase inhibitors.
Journal of Chemical Biology 1(1-4): 27–36.

BARNES, F.L. und FIRST, N.L. (1991):
Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos.
Barnes FL1, First NL.

Molecular Reproduction and Development 29(2): 117-23.

BEUGNET, A., WANG, X. und PROUD, C.G. (2003):

Target of rapamycin (TOR)-signaling and RAIP motifs play distinct roles in the mammalian TOR-dependent phosphorylation of initiation factor 4E-binding protein 1.

Journal of Biological Chemistry 278(42): 40717-22.

BHOJWANI, M., RUDOLPH, E., KANITZ, W., ZUEHLKE, H., SCHNEIDER, F. und TOMEK, W. (2006):

Molecular analysis of maturation processes by protein and phosphoprotein profiling during in vitro maturation of bovine oocytes: a proteomic approach.

Cloning and Stem Cells 8(4): 259-74.

BRACKETT, B.G., BOUSQUET, D., BOICE, M.L., DONAWICK, W.J., EVANS, J.F. und DRESSEL, M.A.

(1982):

Normal development following in vitro fertilization in the cow.

Biology of Reproduction 27(1): 147-58.

BROWN, E.J., ALBERS, M.W., SHIN, T.B., ICHIKAWA, K., KEITH, C.T., LANE, W.S. und SCHREIBER,

S.L. (1994):

A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex.

Nature 369(6483): 756-8.

CHOI, K.M., MC MAHON, L.P. und LAWRENCE, J.C.JR. (2003):

Two motifs in the translational repressor PHAS-I required for efficient phosphorylation by mammalian target of rapamycin and for recognition by raptor.

Journal of Biological Chemistry 278(22): 19667-73.

CHOO, A.Y. und BLENIS, J. (2009):

Not all substrates are treated equally: implications for mTOR, rapamycin-resistance and cancer therapy.

Cell Cycle 8(4): 567-72.

CORCORAN, D., FAIR, T., PARK, S., RIZOS, D., PATEL, O.V., SMITH, G.W., COUSSENS, P.M., IRELAND, J.J., BOLAND, M.P., EVANS, A.C. und LONERGAN, P. (2006):

Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in in vitro compared with in vivo cultured bovine embryos.

Reproduction 131(4): 651-60.

DIBBLE, C.C., ASARA, J.M. und MANNING, B.D. (2009):

Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1.

Molecular and Cellular Biology 29(21): 5657-70.

DOWLING, R.J.O., TOPISIROVIC, I., ALAIN, T., BIDINOSTI, M., FONSECA, B.D., PETROULAKIS, E., WANG, X., LARSSON, O., SELVARAJ, A., LIU, Y., KOZMA, S., THOMAS, G. und SONENBERG, N. (2010):

mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs

Science 328(5982): 1172–1176.

DUNCAN, R.F. und SONG, H.J. (1999):

Striking multiplicity of eIF4E-BP1 phosphorylated isoforms identified by 2D gel electrophoresis regulation by heat shock.

European Journal of Biochemistry 265(2): 728-43.

ECKERT, J. und NIEMANN, H. (1995):

In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media.

Theriogenology 43(7): 1211-25.

ELLEDEROVÁ, Z., CAIS, O., ŠŮŠŮR, A., UHLÍROVÁ, K., KOVÁROVÁ, H., JELÍNKOVÁ, L., TOMEK, W. und KUBELKA, M. (2008):

ERK1/2 map kinase metabolic pathway is responsible for phosphorylation of translation initiation factor eIF4E during in vitro maturation of pig oocytes.

Molecular Reproduction and Development 75(2): 309-17.

ELLEDEROVÁ, Z., KOVÁROVÁ, H., MELO STERZA, F.A., LIVINGSTONE, M., TOMEK, W. und KUBELKA, M. (2006):

Suppression of translation during in vitro maturation of pig oocytes despite enhanced formation of cap-binding protein complex eIF4F and 4E-BP1 hyperphosphorylation.

Molecular Reproduction and Development 73: 68–76.

EL-RAEY, M. und NAGAI, T. (2014):

Different aspects of cattle oocyte in vitro maturation: review

Journal of Reproduction and Infertility 5(1): 01-13.

FAIR, T., HYTTEL, P. und GREVE, T. (1995):

Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity.

Molecular Reproduction and Development 42(4): 437-42.

FELDMAN, M.E., APSEL, B., UOTILA, A., LOEWITH, R., KNIGHT, Z.A., RUGGERO, D. und SHOKAT, K.M. (2009):

Active-Site Inhibitors of mTOR Target Rapamycin-Resistant Outputs of mTORC1 and mTORC2

PLOS Biology 7(2): e1000038.

FERREIRA, E.M., VIREQUE, A.A., ADONA, P.R., MEIRELLES, F.V., FERRIANI, R.A. und NAVARRO, P.A. (2009):

Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence.

Theriogenology 71(5): 836-48.

FOSTER, K.G. und FINGAR, D.C. (2010):

Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony.

Journal of Biological Chemistry 285(19): 14071-7.

GINGRAS, A.C., RAUGHT, B., GYGI, S.P., NIEDZWIECKA, A., MIRON, M., BURLEY, S.K., POLAKIEWICZ, R.D., WYSLOUCH-CIESZYNSKA, A., AEBERSOLD, R. und SONENBERG, N. (2001):

Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1.

Genes & Development 15(21): 2852-64.

GKOGKAS, C.G., KHOUTORSKY, A., RAN, I., RAMPAKAKIS, E., NEVARKO, T., WEATHERILL, D.B., VASUTA, C., YEE, S., TRUITT, M., DALLAIRE, P., MAJOR, F., LASKO, P., RUGGERO, D., NADER, K., LACAILLE, J.C. und SONENBERG N. (2013):

Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control.

Nature 493(7432): 371-7.

GRAF, A., KREBS, S., HEININEN-BROWN, M., ZAKHARTCHENKO, V., BLUM, H. und WOLF, E. (2014):

Genome activation in bovine embryos: review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments.

Animal Reproduction Science 149(1-2): 46-58.

GREVE, T. und MADISON, V. (1991):

In vitro fertilization in cattle: a review

Reproduction Nutrition Development 31(2):147-57.

GWINN, D.M., SHACKELFORD, D.B., EGAN, D.F., MIHAYLOVA, M.M., MERY, A., VASQUEZ, D.S., TURK, B.E. und SHAW, R.J. (2008):

AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint.

Molecular Cell 30(2): 214-26.

HALL, M.N. und TAMANOI, F. (2010):

Structure, Function and Regulation of TOR complexes from Yeasts to Mammals.

Academic Press, Elsevier (Volume 27 und 28; 1st Edition; Part A und B). USA

HOFMANN, J. (2005):

Die Bedeutung verschiedener extrinsischer Faktoren für die Embryonengewinnung beim Rind.

München, Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, Dissertation (Diss.)

HORN, F., MOC, I., SCHNEIDER, N., GRILLHÖSL, C., BERGHOLD, S. und LINDENMEIER, G. (2005):

Biochemie des Menschen.

Thieme-Verlag (3. Auflage). Stuttgart

HYTTEL, P., VIUFF, D., FAIR, T., LAURINCIK, J., THOMSEN, P.D., CALLESEN, H., VOS, P.L.A.M.,

HENDRIKSEN, P.J.M., DIELEMAN, S., SCHELLANDER, K., BESENFELDER, U. und GREVE, T. (2001):

Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos.

Reproduction 122: 21–30.

HYTTEL, P., CALLESEN, H. und GREVE, T. (1986):

Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle.

Journal of Reproduction and Fertility 76(2): 645-56.

IGREJA, C. und IZAURRALDE, E. (2011):

CUP promotes deadenylation and inhibits decapping of mRNA targets.

Genes & Development 25(18): 1955-67.

JANOWSKI, D., SALILEW-WONDIM, D., TORNER, H., TESFAYE, D., GHANEM, N., TOMEK, W., EL-

SAYED, A., SCHELLANDER, K. und HÖLKER, M. (2012):

Incidence of apoptosis and transcript abundance in bovine follicular cells is associated with the quality of the enclosed oocyte.

Theriogenology 78(3): 656-69.

JULIEN, L.A., CARRIERE, A., MOREAU, J. und ROUX, P.P. (2010):

mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling.

Molecular and Cellular Biology 30(4): 908-21.

KALOUS, J., KUBELKA, M., SOLC, P., ŠŮŠŮR, A. und MOTLÍK, J. (2009):

AKT (protein kinase B) is implicated in meiotic maturation of porcine oocytes.

Reproduction 138(4): 645-54.

KESKINTEPE, L. und BRACKETT, B. G. (1996):

In vitro developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media.

Biology of Reproduction 55(2): 333-9.

KIM, J., SONG, G., WU, G., GAO, H., JOHNSON, G.A. und BAZER, F.W. (2013):

Arginine, leucine, and glutamine stimulate proliferation of porcine trophectoderm cells through the MTOR-RPS6K-RPS6-EIF4EBP1 signal transduction pathway.

Biology of Reproduction 88(5): 113.

KINOSHITA, E., KINOSHITA-KIKUTA, E. und KOIKE, T. (2009):

Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE.

Nature Protocols 4(10): 1513-21.

KINOSHITA, E., KINOSHITA-KIKUTA, E., TAKIYAMA, K. und KOIKE, T. (2006):

Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins.

Molecular & Cellular Proteomics 5(4): 749-57.

KINOSHITA-KIKUTA, E., AOKI, Y., KINOSHITA, E. und KOIKE, T. (2007):
Label-free kinase profiling using phosphate affinity polyacrylamide gel electrophoresis.
Molecular & Cellular Proteomics 6(2): 356-66.

KOGASAKA, Y., HOSHINO, Y., HIRADATE, Y., TANEMURA, K. und SATO, E. (2013):
Distribution and association of mTOR with its cofactors, raptor and rictor, in cumulus cells and oocytes during meiotic maturation in mice.
Molecular Reproduction & Development 80(4): 334-48.

KRECH, T., THIEDE, M., HILGENBERG, E., SCHÄFER, R. und JÜRCHOTT, K. (2010):
Characterization of AKT independent effects of the synthetic AKT inhibitors SH-5 and SH-6 using an integrated approach combining transcriptomic profiling and signaling pathway perturbations.
BMC Cancer 10: 287.

KRYSKO, D.V., DIEZ-FRAILE, A., CRIEL, G., SVISTUNOV, A.A., VANDENABEELE, P. und D'HERDE, K. (2008):
Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis.
Apoptosis 13(9): 1065-87.

KUBELKA, M., MOTLÍK, J., SCHULTZ, R. M. und PAVLOK, A. (2000):
Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity.
Biology of Reproduction 62: 292-302.

KYHSE-ANDERSEN, J. (1984):
Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.

Journal of Biochemical and Biophysical Methods 10(3-4): 203-9.

LABRECQUE, R. und SIRARD, M.A. (2014):

The study of mammalian oocyte competence by transcriptome analysis: progress and challenges.

Molecular Human Reproduction 20(2): 103-16.

LAEMMLI, U.K. (1970):

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature 227(5259): 680-5.

LAPLANTE, M. und SABATINI, D.M. (2009):

mTOR signaling at a glance.

Journal of Cell Science 122(Pt 20): 3589-94.

LEE, S.E., SUN, S.C., CHOI, H.Y., UHM, S.J. und KIM, N.H. (2012):

mTOR is required for asymmetric division through small GTPases in mouse oocytes.

Molecular Reproduction and Development 79(5): 356-66.

LEIBFRIED, L. und FIRST, N.L. (1979):

Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro.

Journal of Animal Science 48(1): 76-86.

LIEBICH, H.-G. (2004):

Funktionelle Histologie der Haussäugetiere

Schattauer Verlag (4. Auflage). Stuttgart

LIU, Q., XU, C., KIRUBAKARAN, S., ZHANG, X., HUR, W., LIU, Y., KWIATKOWSKI, N.P., WANG, J., WESTOVER, K.D., GAO, P., ERCAN, D., NIEPEL, M., THOREEN, C.C., KANG, S.A., PATRICELLI, M.P.,

WANG, Y., TUPPER, T., ALTABEF, A., KAWAMURA, H., HELD, K.D., CHOU, D.M., ELLEDGE, S.J., JANNE, P.A., WONG, K.K., SABATINI, D.M. und GRAY, N.S. (2013):

Characterization of Torin2, an ATP-competitive inhibitor of mTOR, ATM, and ATR.

Cancer Research 73(8): 2574-86.

LIVINGSTONE, M. und BIDINOSTI, M. (2012):

Rapamycin-insensitive mTORC1 activity controls eIF4E:4E-BP1 binding

F1000 Research 1: 4 (published online).

LIVINGSTONE, M., ATAS, E., MELLER, A. und SONENBERG, N. (2010):

Mechanisms governing the control of mRNA translation.

Physical Biology 7(2): 021001.

LONERGAN, P., RIZOS, D., GUTIERREZ-ADAN, A., FAIR, T. und BOLAND, M.P. (2003):

Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns.

Reproduction in Domestic Animals 38(4): 259-67.

MA, J., FLEMR, M., STRNAD, H., SVOBODA, P. und SCHULTZ, R.M. (2013):

Maternally recruited DCP1A and DCP2 contribute to messenger RNA degradation during oocyte maturation and genome activation in mouse.

Biology of Reproduction 88(1): 11.

MANGUS, D.A., EVANS, M.C. und JACOBSON, A. (2003):

Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression.

Genome Biology 4(7): 223.

MATSUDA, S., GOTOH, Y. und NISHIDA, E. (1993):

Phosphorylation of Xenopus mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase by MAP kinase kinase kinase and MAP kinase.

Journal of Biological Chemistry 268(5): 3277-81.

MELO STERZA, F.A. (2003):

Untersuchungen zur zytoplasmatischen Reifung von Eizellen des Rindes: Analyse der Regulation der Translation während der meiotischen Endreifung.

Hannover, Institut für Reproduktionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Diss.

MEMILI, E. und FIRST, N.L. (2000):

Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species.

Zygote 8(1): 87-96.

MINICH, W.B., BALASTA, M.L., GOSS, D.J. und RHOADS, R.E. (1994):

Chromatographic resolution of in vivo phosphorylated and nonphosphorylated eukaryotic translation initiation factor eIF-4E: increased cap affinity of the phosphorylated form.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA 91(16): 7668-72.

MODRAK-WOJCIK, A., GORKA, M., NIEDZWIECKA, K., ZDANOWSKI, K., ZUBEREK, J., NIEDZWIECKA, A. und STOLARSKI, R. (2013):

Eukaryotic translation initiation is controlled by cooperativity effects within ternary complexes of 4E-BP1, eIF4E, and the mRNA 5' cap.

FEBS Letters 587(24): 3928-34.

MÜLLER, K. (2011):

Auswirkung einer temporären In-vivo-Kultur in vitro produzierter Rinderembryonen im bovinen Eileiter auf das mRNA-Expressionsmuster entwicklungsrelevanter Gene.

Hannover, tierärztliche Hochschule, Diss.

MURKEN, J.D., GRIMM, T., HOLINSKI-FEDER, E. und ZERRES, K. (2011):

Humangenetik

Thieme-Verlag (8. Auflage). Stuttgart

NISHIMURA, T., PADAMSI, Z., FAKIM, H., MILETTE, S., DUNHAM, W.H., GINGRAS, A.C. und FABIAN, M.R. (2015):

The eIF4E-Binding protein 4E-T is a component of the mRNA decay machinery that bridges the 5' and 3' termini of target mRNAs.

Cell Reports 11(9): 1425-36.

O'LEARY S.E., PETROV, A., CHEN, J. und PUGLISI, J.D. (2013):

Dynamic recognition of the mRNA cap by *Saccharomyces cerevisiae* eIF4E.

Structure 21(12): 2197-207.

PIETERSE, M.C., KAPPEN, K.A., KRUIP, T.A. und TAVERNE, M.A. (1988):

Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries.

Theriogenology 30(4): 751-62.

POULIN, F., GINGRAS, A., OLSEN, H., CHEVALIER, S. und SONENBERG, N. (1998):

4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family.

Journal of Biological Chemistry 273(22): 14002-7.

RHOADS, R.E. (2009):

eIF4E: new family members, new binding partners, new roles.

Journal of Biological Chemistry 284(25): 16711-5.

RICHTER, J.D. und SONENBERG, N. (2005):

Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins.

Nature 433(7025): 477-80.

RIZOS, D., WARD, F., DUFFY, P., BOLAND, M.P. und LONERGAN, P. (2002):

Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality.
Molecular Reproduction and Development 61(2): 234-48.

ROMASKO, E.J., AMARNATH, D., MIDIC, U. und LATHAM, K.E. (2013):
Association of maternal mRNA and phosphorylated eIF4E-BP1 variants with the spindle in mouse oocytes: localized translational control supporting female meiosis in mammals.
Genetics 195(2): 349–358.

ROSNER, M., FUCHS, C., SIEGEL, N., VALLI, A. und HENGSTSCHLÄGER, M. (2009):
Functional interaction of mammalian target of rapamycin complexes in regulating mammalian cell size and cell cycle
Human Molecular Genetics 18(17): 3298–3310.

SANCAK, Y., PETERSON, T.R., SHAUL, Y.D., LINDQUIST, R.A., THOREEN, C.C., BAR-PELED, L. und SABATINI, D.M. (2008):
The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1.
Science 320(5882): 1496-501.

SANGES, C., MIGLIACCIO, N., ARCARI, P. und LAMBERTI, A. (2013):
Translational control in tumour progression and drug resistance
Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 5(2): a012336.

SARBASSOV, D.D., ALI, S.M. und SABATINI, D.M. (2005a):
Growing roles for the mTOR pathway.
Current Opinion in Cell Biology 17(6): 596-603.

SARBASSOV, D.D., GUERTIN, D.A., ALI, S.M. und SABATINI, D.M. (2005b):
Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex.
Science. 2005 Feb 18;307(5712):1098-101.

SCHEPER, G. und PROUD, C. (2002):

Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation?

European Journal of Biochemistry 269: 5350–5359.

SCHEPER, G.C., VAN KOLLENBURG, B., HU, J., LUO, Y., GOSS, D.J. und PROUD, C.G. (2002):

Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduces its affinity for capped mRNA.

Journal of Biological Chemistry 277(5): 3303-9.

SEGER, R. und KREBS, E.G. (1995):

The MAPK signaling cascade.

FASEB Journal 9(9): 726-35.

SEKIYAMA, N., ARTHANARI, H., PAPADOPOULOS, E., RODRIGUEZ-MIAS, R.A., WAGNER, G. und LÉGER-ABRAHAM, M. (2015):

Molecular mechanism of the dual activity of 4EGI-1: Dissociating eIF4G from eIF4E but stabilizing the binding of unphosphorylated 4E-BP1.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 112(30): E4036-45.

SHANG, Z-F., YU, L., LI, B., TU, W.-Z., WANG, Y., LIU, X.-D., GUAN, H., HUANG, B., RANG, W.-Q. und ZHOU, P.-K. (2012):

4E-BP1 participates in maintaining spindle integrity and genomic stability via interacting with PLK1

Cell Cycle 11(18): 3463–3471.

SIDDIQUI, N. und SONENBERG, N. (2015):

Signalling to eIF4E in cancer.

Biochemical Society Transactions 43(5): 763-72.

SIEMER, C., SMILJAKOVIC, T., BHOJWANI, M., LEIDING, C., KANITZ, W., KUBELKA, M. und TOMEK, W. (2009):

Analysis of mRNA associated factors during bovine oocyte maturation and early embryonic development.

Molecular Reproduction & Development 76: 1208–1219.

SIRARD, M.A., RICHARD, F., BLONDIN, P. und ROBERT, C. (2006):

Contribution of the oocyte to embryo quality.

Theriogenology 65(1): 126-36.

SIRARD, M.A., DUFORT, I., COENEN, K., TREMBLAY, K., MASSICOTTE, L. und ROBERT, C. (2003):

The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals.

Reproduction Supplement 61: 117-29.

SONENBERG, N. und HINNEBUSCH, A.G. (2009):

Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets.

Cell 136(4): 731–745.

SONENBERG, N. (2008):

eIF4E, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research.

Biochemistry and Cell Biology 86(2): 178-83.

SONENBERG, N. und HINNEBUSCH, A.G. (2007):

New modes of translational control in development, behavior, and disease.

Molecular Cell 28(5): 721-9.

STEAD, R.L. und PROUD, C.G. (2013):

Rapamycin enhances eIF4E phosphorylation by activating MAP kinase-interacting kinase 2a (Mnk2a).

FEBS Letters 587(16): 2623-8.

STINSHOFF, H., WILKENING, S., HANSTEDT, A., BOLLWEIN, H. und WRENZYCKI, C. (2014):
Dimethylsulfoxide and conjugated linoleic acids affect bovine embryo development in vitro.
Reproduction, Fertility and Development 26(4): 502-10.

SÜSS, U., WÜTHRICH, K. Und STRANZINGER, G. (1988):
Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes
matured in vitro.
Biology of Reproduction 38(4): 871-80.

SUGIYAMA, Y., KATAYAMA, S., KAMESHITA, I., MORISAWA, K., HIGUCHI, T., TODAKA, H.,
KINOSHITA, E., KINOSHITA-KIKUTA, E., KOIKE, T., TANIGUCHI, T. und SAKAMOTO, S. (2015):
Expression and phosphorylation state analysis of intracellular protein kinases using Multi-PK
antibody and Phos-tag SDS-PAGE.
MethodsX 2: 469–474.

SUN, Q.Y., LAI, L., PARK, K.W., KÜHHOLZER, B., PRATHER, R.S. und SCHATTEN, H. (2001):
Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogen-
activated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization in vitro.
Biology of Reproduction 64(3): 879-89.

SŮŠŮR, A., JANSOVA, D., CERNA, R., DANYLEVSKA, A., ANGER, M., TORALOVA, T., MALIK, R.,
SUPOLIKOVA, J., COOK, M.S., OH, J.S. und KUBELKA, M. (2015):
Temporal and spatial regulation of translation in the mammalian oocyte via the mTOR-eIF4F
pathway.
Nature Communications 6: 6078.

SŮŠŮR, A., JELÍNKOVÁ, L., KARABÍNOVÁ, P., TORNER, H., TOMEK, W., KOVÁŘOVÁ, H. und
KUBELKA, M. (2008):

Regulation of cap-dependent translation initiation in the early stage porcine parthenotes
Molecular Reproduction & Development 75: 1716–1725.

TAIT, S., DUTTA, K., COWBURN, D., WARWICKER, J., DOIG, A.J. und MC CARTHY, J.E. (2010):
Local control of a disorder-order transition in 4E-BP1 underpins regulation of translation via
eIF4E.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 107(41): 17627-32.

THOREEN, C. (2013):
Many roads from mTOR to eIF4F.
Biochemical Society Transactions 41(4): 913-6.

THOREEN, C.C., KANG, S.A., CHANG, J.W., LIU, Q., ZHANG, J., GAO, Y., REICHLING, L.J., SIM, T.,
SABATINI, D.M. und GRAY, N.S. (2009):
An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant
functions of mTORC1.
Journal of Biological Chemistry 284(12): 8023-32.

TOMEK, W., MELO STERZA, F.A., KUBELKA, M., WOLLENHAUPT, K., TORNER, H., ANGER, M. und
KANITZ, W. (2002a):
Regulation of translation during in vitro maturation of bovine oocytes: the role
of MAP kinase, eIF4E (cap binding protein) phosphorylation, and eIF4E-BP1.
Biology of Reproduction 66: 1274–1282.

TOMEK, W., TORNER, H. und KANITZ, W. (2002b):
Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic
polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro
Reproduction in Domestic Animals 37: 86–91

TOMEK, W. und SMILJAKOVIC, T. (2005):

Activation of Akt (protein kinase B) stimulates metaphase I to metaphase II transition in bovine oocytes.

Reproduction 130(4): 423-30.

TOMEK, W. und WOLLENHAUPT, K. (2012):

The "closed loop model" in controlling mRNA translation during development.

Animal Reproduction Science 134(1-2): 2-8.

TOPISIROVIC, I., SVITKIN, Y.V., SONENBERG, N. und SHATKIN, A.J. (2011):

Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression.

Wiley Interdisciplinary Reviews RNA 2(2): 277-98.

TORNER, H., GHANEM, N., AMBROS, C., HÖLKER, M., TOMEK, W., PHATSARA, C., ALM, H., SIRARD, M.A., KANITZ, W., SCHELLANDER, K. und TESFAYE, D. (2008):

Molecular and subcellular characterisation of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity.

Reproduction 135(2): 197-212.

TORNER, H., KUBELKA, M., HELEIL, B., TOMEK, W., AIM, H., KUZMINA, T. und GUIARD, V. (2001):

Dynamics of meiosis and protein kinase activities in bovine oocytes correlated to prolactin treatment and follicle size.

Theriogenology 55(4): 885-99.

TREINS, C., WARNE, P.H., MAGNUSON, M.A., PENDE, M. und DOWNWARD, J. (2010):

Rictor is a novel target of p70 S6 kinase-1.

Oncogene 29(7): 1003-16.

TREMBLAY, K., VIGNEAULT, C., MC GRAW, S. und SIRARD, M.A. (2005):

Expression of cyclin B1 messenger RNA isoforms and initiation of cytoplasmic polyadenylation in the bovine oocyte.

Biology of Reproduction 72(4): 1037-44.

TUHÁCKOVÁ, Z., SOVOVÁ, V., SLONCOVÁ, E. und PROUD, C.G. (1999):

Rapamycin-resistant phosphorylation of the initiation factor-4E-binding protein (4E-BP1) in v-SRC-transformed hamster fibroblasts.

International Journal of Cancer 81(6): 963-9.

UEDA, T., WATANABE-FUKUNAGA, R., FUKUYAMA, H., NAGATA, S. und FUKUNAGA, R. (2004):

Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development.

Molecular and Cellular Biology 24(15): 6539-49.

VERLHAC, M.H., KUBIAK, J.Z., CLARKE, H.J. und MARO, B. (1994):

Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes.

Development 120(4): 1017-25.

VOLPON, L., OSBORNE, M.J., TOPISIROVIC, I., SIDDIQUI, N. und BORDEN, K.L. (2006):

Cap-free structure of eIF4E suggests a basis for conformational regulation by its ligands.

EMBO Journal 25(21): 5138-49.

WANG, C., WANG, X., SU, Z., FEI, H., LIU, X. und PAN, Q. (2015):

The novel mTOR inhibitor Torin-2 induces autophagy and downregulates the expression of UHRF1 to suppress hepatocarcinoma cell growth.

Oncology Reports 34(4): 1708-16.

WANG, X. und PROUD C.G. (2006):

The mTOR pathway in the control of protein synthesis.

Physiology 21: 362-9.

WANG, X., LI, W., PARRA, J.L., BEUGNET, A. und PROUD, C.G. (2003):

The C terminus of initiation factor 4E-binding protein 1 contains multiple regulatory features that influence its function and phosphorylation.

Molecular and Cellular Biology 23(5): 1546-57.

WRENZYCKI, C. (2008):

Epigenetische Reprogrammierung während der frühen Embryonalentwicklung beim Rind

Vortrag (WS 2008/2009) am Lehrstuhl für Tierphysiologie & Immunologie, Wissenschaftszentrum Weißenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt; Technische Universität München

WRENZYCKI, C., HERRMANN, D. und NIEMANN, H. (2007):

Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability.

Theriogenology 68: 77-83.

WOLLENHAUPT, K., BRÜSSOW, K.P., ALBRECHT, D. und TOMEK, W. (2013):

The Akt/mTor signaling cascade is modified during placentation in the porcine uterine tissue.

Reproductive Biology 13(3): 184-94.

WOLLENHAUPT, K., REINKE, K., BRÜSSOW, K.P., ALBRECHT, D., TIEMANN, U., SEYFERT, H.M. und TOMEK, W. (2010):

Natural occurrence and physiological role of a truncated eIF4E in the porcine endometrium during implantation.

Biochemical Journal 432(2): 353-363.

ZUBEREK, J., WYSLOUCH-CIESZYNSKA, A., NIEDZWIECKA, A., DADLEZ, M., STEPINSKI, J., AUGUSTYNIAK, W., GINGRAS, A.C., ZHANG, Z., BURLEY, S.K., SONENBERG, N., STOLARSKI, R. und DARZYNKIEWICZ, E. (2003):

Phosphorylation of eIF4E attenuates its interaction with mRNA 5' cap analogs by electrostatic repulsion: Intein-mediated protein ligation strategy to obtain phosphorylated protein.
RNA 9(1): 52-61.

10. Anhang

10.1 Medien für Eizellgewinnung, Maturation und Probenvorbereitung

10.1.1 Physiologische Kochsalzlösung 0,9 % (NaCl 0,9 %)

Transportlösung für die bovinen Ovarien

<u>Menge</u>	<u>Art</u>	<u>Hersteller</u>
1000 ml	destilliertes Wasser	
9 g	Natriumchlorid	(Fa. Carl Roth, Karlsruhe)

10.1.2 Modifizierte phosphatgepufferte Salzlösung nach Dulbecco (PBS+)

Medium für Slicing und Arbeitsmedium für Selektion, Klassifizierung, Denudierung, Waschvorgänge und Umsetzungen

<u>Menge</u>	<u>Art</u>	<u>Hersteller</u>
500 ml	PBS-Dulbecco mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	(Fa. Biochrom, Berlin)
500 mg	D-(+)-Glucose	(Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)
18 mg	Sodium pyruvate	(Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)
10 mg	Penicillin G sodium salt	(Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)
20 mg	Streptomycin sulfate salt	(Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)
5,6 mg	Heparin sodium salt	(Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)
150 mg	Bovine Serum Albumin	(Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)

Die fertige Lösung wurde im Kühlschrank maximal 24h aufbewahrt.

10.1.3 TCM-Grundmedium (TCM-199)

Dient als Hauptbestandteil des Reifungsmediums

<u>Menge</u>	<u>Art</u>	<u>Hersteller</u>
100 ml	Ampuwa	(Fa. Fresenius Kabi, Bad Homburg)
220 mg	Sodium bicarbonate (NaHCO ₃)	(Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)
5 mg	Gentamycin sulfate	(Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)
2,2 mg	Sodium pyruvate	(Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)
1510 mg	Medium-199 Hepes Modification	(Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)

Alle Stoffe werden der Reihenfolge nach der halben Menge Ampuwa zugefügt, bis auf NaHCO₃, welches separat im restlichen Ampuwa gelöst wird und erst am Schluss der Lösung beigefügt wird. Die vollständige Lösung wird dann 40 min mit Hilfe eines Magnetrührers gemischt und anschließend der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Das steril filtrierte Medium ist im Kühlschrank maximal zwei Wochen haltbar.

10.1.4 Reifungsmedium (TCM-199 mit 3 mg/ml BSA)

Medium in dem die EZ zur Maturation in den Brutschrank gegeben werden

<u>Menge</u>	<u>Art</u>	<u>Hersteller</u>
20 ml	TCM-Grundmedium (TCM-199)	
60 mg	Bovine Serum Albumin	(Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)

Das BSA wurde der entsprechenden Menge TCM-199 immer erst in der Früh am jeweiligen Versuchstag frisch zugefügt.

10.1.5 Hyaluronidase-Lösung (2,5mg/ml)

Zur Ablösung der Kumuluszellen von den Oozyten

<u>Menge</u>	<u>Art</u>	<u>Hersteller</u>
2,5 mg	Hyaluronidase	(Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)
1 ml	PBS-Dulbecco mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺	(Fa. Biochrom, Berlin)

Das Gemisch wurde in Reaktionsgefäßen (Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 ml, Fa. Fisher Scientific, Schwerte) zu je 400 µl aliquotiert und bei -20 °C tiefgefroren.

10.1.6 Phosphatgepufferte Salzlösung, rein (PBS-)

Trägermedium für EZ und Kumuluszellen für biochemische Analysen

<u>Menge</u>	<u>Art</u>	<u>Hersteller</u>
200 ml	Ampuwa	(Fa. Fresenius Kabi, Bad Homburg)
1 Tablette	Phosphate buffered saline	(Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)

Die fertige Lösung wird bis zu ihrer Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

10.2 Inhibitorlösung

Stocklösung 20 mM Torin2 (Fa. Tocris Bioscience; R&D Systems, Abingdon, UK)

<u>Menge</u>	<u>Art</u>	<u>Hersteller</u>
10 mg	Torin2	(s.o.)
1,1327 ml	DMSO	(Fa. Serva, Heidelberg)

Verdünnung 0,3 mM Torin2 für Versuche mit Endkonzentration von 3 μ M Torin2

<u>Menge</u>	<u>Art</u>	<u>Hersteller</u>
10 μ l	Torin2-Stocklösung 20mM	(s.o.)
656,67 μ l	DMSO	(Fa. Serva, Heidelberg)

Diese Torin2-Lösung (0,3 mM) wurde in 0,5 ml Safe-Lock-Tubes (Fa. Eppendorf, Hamburg) in Volumina von jeweils 20 μ l aliquotiert und bei -20 °C bis zur Verwendung eingefroren aufbewahrt.

Für die Versuche wurden in ein Well zu 396 μ l Maturationsmedium jeweils 4 μ l der Torin2-Lösung mit der Konzentration von 0,3 mM hinzupipettiert um eine finale Konzentration von 3 μ M des Inhibitors im Reifungsmedium zu erreichen.

Für sämtliche andere Verdünnungen der Vorversuche wurden aus der Torin2-Stocklösung der Konzentration von 20 mM entsprechende Verdünnungsreihen und Aliquots angefertigt um auf die finalen Inhibitorkonzentrationen im Maturationsmedium zu kommen.

10.3 Färbelösung für morphologische Beurteilung (Aceto-Orcein-Lösung, 2 %ig)

Farbstofflösung zur Sichtbarmachung des Chromatins der EZ

<u>Menge</u>	<u>Art</u>	<u>Hersteller</u>
2 g	Orcein	(Fa. Merck, Darmstadt)
100 ml	Essigsäure 60%	(Fa. AppliChem, Darmstadt)

Das pulverförmige Orcein wird in 90 ml 60 %iger Essigsäure gelöst und bis kurz vor Erreichen des Siedens erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur, wird das Gemisch mit Essigsäure auf ein Volumen von 100 ml aufgefüllt und anschließend filtriert. Die Farbstofflösung wurde bei 6 °C gelagert und stets vor der Verwendung erneut filtriert.

10.4 Medien für biochemische Analysen

10.4.1 SDS-Probenpuffer Blue Loading Buffer

<u>Menge</u>	<u>Art</u>	<u>Hersteller</u>
0,9 ml	SDS Probenpuffer 3 x	(Fa. Cell Signaling Technology, USA)
100 µl	Reducing Agent 30 x	(Fa. Cell Signaling Technology, USA)

10.4.2 Polyacrylamid-Trenngel 7,5 %, 12,5 % und 15 %

<u>Menge für 7,5 %</u>	<u>Menge für 12,5 %</u>	<u>Menge für 15 %</u>	<u>Art</u>	<u>Hersteller</u>
7,5 ml	12,5 ml	15 ml	Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)	(Fa. Serva, Heidelberg)
7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	Tris 1,5 mol/l (pH 8,8)	(Fa. Roth, Karlsruhe)
14,5 ml	9,5 ml	7 ml	doppelt destilliertes Wasser	
0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	SDS 10 %	(Fa. Roth, Karlsruhe)
0,2 ml	0,3 ml	0,3 ml	APS 10 %	(Fa. Roth, Karlsruhe)
20 µl	20 µl	20 µl	TEMED	(Fa. GE Healthcare)

10.4.3 Polyacrylamid-Sammelgel 5 %

<u>Menge</u>	<u>Art</u>	<u>Hersteller</u>
2,5 ml	Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)	(Fa. Serva, Heidelberg)
3,8 ml	Tris 0,5 mol/l (pH 6,8)	(Fa. Roth, Karlsruhe)
8,5 ml	doppelt destilliertes Wasser	
0,15 ml	SDS 10 %	(Fa. Roth, Karlsruhe)
0,3 ml	APS 10 %	(Fa. Roth, Karlsruhe)
20 µl	TEMED	(Fa. GE Healthcare)

10.4.4 Elektrophoresepuffer nach Laemmli

10 fach konzentriert

<u>Menge</u>	<u>Art</u>	<u>Hersteller</u>
60,5 ml	Tris 0,5 mol/l	(Fa. Roth, Karlsruhe)
100 ml	Glycin (133 mol/l)	(Fa. GE Healthcare)
10 ml	SDS 10 %	(Fa. Roth, Karlsruhe)
1000 ml	doppelt destilliertes Wasser	

Arbeitsverdünnung: 100 ml auf 900 ml doppelt destilliertes Wasser.

10.4.5 Drei-Puffer-System nach Towbin

Stammlösung, zehnfach konzentriert

<u>Menge</u>	<u>Art</u>	<u>Hersteller</u>
144 g	Glycin	(Fa. Roth, Karlsruhe)
30 g	Tris	(Fa. Roth, Karlsruhe)
7,5 g	SDS	(Fa. Roth, Karlsruhe)
1000 ml	doppelt destilliertes Wasser	

Arbeitslösung, einfach konzentriert, 20 % Methanol

<u>Menge</u>	<u>Art</u>	<u>Hersteller</u>
100 ml	Stammlösung (s.o.)	
700 ml	doppelt destilliertes Wasser	
200 ml	Methanol	(Fa. Roth, Karlsruhe)

Tris Buffer Saline TBS 10x (pH 7,5)

<u>Menge</u>	<u>Art</u>	<u>Hersteller</u>
24,2 g	Tris 1 mol/l	(Fa. Roth, Karlsruhe)
80 g	NaCl	(Fa. Roth, Karlsruhe)
1000 ml	doppelt destilliertes Wasser	

10.4.6 Tris Buffer Saline + Tween 20 (TTBS)

<u>Menge</u>	<u>Art</u>	<u>Hersteller</u>
100 ml	TBS (s.o.)	
899 ml	doppelt destilliertes Wasser	
1 ml	Tween 20	(Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)

10.4.7 ECL-Prime Reagenz

Lösung A

<u>Menge</u>	<u>Art</u>	<u>Hersteller</u>
200 ml	Tris-HCL 0,1 mol/l (pH 8,6)	(Fa. Roth, Karlsruhe)
50 mg	Luminol	(Fa. AppliChem, Darmstadt)

Lösung B

<u>Menge</u>	<u>Art</u>	<u>Hersteller</u>
11 mg	Para-Hydroxycoumarinsäure	(Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)
10 ml	DMSO	(Fa. Roth, Karlsruhe)

Fertiges ECL-Detektionsreagens

<u>Menge</u>	<u>Art</u>	<u>Hersteller</u>
1 ml	Lösung A (s.o.)	
100 µl	Lösung B (s.o.)	
30 µl	H ₂ O ₂ (30 %)	(Fa. Roth, Karlsruhe)

10.4.8 Zell-Lysis-Puffer

<u>Menge</u>	<u>Art</u>	<u>Hersteller</u>
20 mM	Tris (pH 7,5)	(Fa. Roth, Karlsruhe)
150 mM	NaCl	(Fa. Roth, Karlsruhe)
1mM	EDTA	(Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)
1mM	EGTA	(Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)
1%	Triton X-100	(Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)
2,5 mM	Natrium-Pyrophosphat	(Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)
1 mM	β-Glycerolphosphat	(Fa. Serva, Heidelberg)
1 mM	Na ₃ VO ₄	(Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)
1 µg/ml	Leupeptin	(Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mich auf dem langen Weg dieser Arbeit begleitet und sie ermöglicht haben.

Den Mitarbeitern des Bereichs Fortpflanzungsbiologie des Leibniz-Institutes für Nutztierbiologie Dummerstorf danke ich für die gute Zusammenarbeit. Besonders Frau G. Krüger hat mich mit ihrer kompetenten, sympathischen und offenen Art bei der Vorbereitung und Durchführung der Experimente sehr unterstützt. Vielen Dank.

Der Geschäftsführung des Besamungsvereins Neustadt an der Aisch (BVN), Herrn Dr. C. Leiding und Herrn Dr. J. Aumann, bin ich sehr dankbar für die Bereitstellung des betriebseigenen IVP-Labors für die Durchführung meiner Versuche. Zudem bedanke ich mich sehr für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit durch die Dr. Dr. h.c. Karl-Eibl-Stiftung.

Der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich für die Annahme als Doktorandin und für die Erlaubnis des Einreichens dieser Promotion.

Ein weiterer wichtiger Dank gilt dem Schlachthof Erlangen für das Vertrauen und das Überlassen des Probenmaterials und besonders den Mitarbeitern für ihre Freundlichkeit, Offenheit und Hilfsbereitschaft in sämtlichen Situationen.

Meiner Doktorandenkollegin Frau A. Kehrle danke ich für ihren Beistand und ihre Freundschaft.

Für ihre engagierte und ausdauernde Hilfe bei sämtlichen statistischen Fragestellungen möchte ich Frau S. Raba und Herrn Prof. Dr. J. Grosser danken.

Frau Dr. A. Woehl-Wenigerkind spreche ich meinen besonderen Dank aus für die herzliche Aufnahme in das IVP-Labor und ihre Hilfestellung bei allen labortechnischen Fragen, die angenehme Zusammenarbeit und Arbeitsatmosphäre und für die dadurch entstandene wertvolle Freundschaft.

Mein außerordentlicher Dank gilt vor allem Herrn Dr. W. Tomek für die Überlassung des Themas und die exzellente Betreuung. Es war stets eine hervorragende Zusammenarbeit, auch über die große räumliche Distanz hinweg. Sein unglaubliches Wissen teilte er mit mir immer geduldig und unermüdlich. Seine verständnisvolle und positive Art motivierte mich auch in

schwierigen Zeiten. Es ist sehr traurig, dass ich ihm diesen Dank nicht mehr persönlich aussprechen kann.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. C. Wrenzycki, für die über so lange Zeit, unermüdliche, immer freundliche, äußerst kompetente Unterstützung und der geduldigen Hilfe beim Finalisieren meiner Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich von Herzen den Menschen, die auf den unterschiedlichsten Stationen meines Weges doch immer an mich geglaubt und mich moralisch und ab und zu auch tatkräftig unterstützt haben – sei es in statistischen Fragen, mit Korrekturlesen oder mit unverzichtbaren Motivationsversuchen.

Frau Dr. C. Wolfart und Frau Dr. J. Spitzer und auch deren Familien möchte ich für ganz besondere und einzigartige Freundschaften danken.

Meinem Verlobten M. Mehrl danke ich für seine Liebe, sein Verständnis und seine dadurch wertvolle Hilfestellung im Endspurt meiner Arbeit.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, ohne deren unermüdliche Unterstützung und über Jahre hinweg stetige Motivation es nie zu einem Fertigstellen dieser Arbeit gekommen wäre.

12. Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Sophia Ostermeier