

Manuela Kreißelmeier

Vergleich des Einflusses der mTor-Inhibitoren
Rapamycin und Torin2 auf die Reifung von Rindereizellen
und Charakterisierung der Entwicklungskompetenz
Torin2-behandelter Rindereizellen



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

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

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

Betreuerin: Prof. Dr. C. Wrenzycki

und

dem Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie des Leibniz-Instituts für
Nutztierbiologie, Dummerstorf

Betreuerin: PD Dr. J. Schön

**Vergleich des Einflusses der mTor-Inhibitoren Rapamycin
und Torin2 auf die Reifung von Rindereizellen und Charak-
terisierung der Entwicklungskompetenz Torin2-behandelter
Rindereizellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Manuela Kreißelmeier

Tierärztin aus Oettingen i. Bay.

Gießen 2017

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. C. Wrenzycki

PD Dr. J. Schön

Prof. Dr. G. Scheiner-Bobis

Tag der Disputation: 29.06.2017

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis..... V

Tabellenverzeichnis.....VII

Abkürzungsverzeichnis..... VIII

1 Einleitung 1

2 Literatur 3

 2.1 Grundlagen der Oozytenreifung beim Rind 3

 2.1.1 Wiederaufnahme und Verlauf der Oozytenreifung 3

 2.1.2 Translation und Translationskontrolle während der Oozytenreifung 5

 2.1.2.1 Grundsätzliche Mechanismen der Translation und Translationskontrolle
..... 5

 2.1.2.1.1 Ribosomen als Ort der Proteinsynthese 5

 2.1.2.1.2 Notwendigkeit der Proteinsynthese 6

 2.1.2.1.3 Bedeutung der Translationskontrolle 6

 2.1.2.1.4 Transkription bei wachsenden und reifenden Eizellen 7

 2.1.2.1.5 Mechanismen der Translationskontrolle..... 7

 2.1.2.1.6 Proteinsynthese während der Oozytenreifung 8

 2.1.2.1.7 Lokalisierte Proteinsynthese 10

 2.1.2.1.8 Translationsinitiation 10

 2.1.2.1.9 Closed-loop-Modell..... 13

 2.1.2.1.10 Am 5'-Ende der mRNA agierende Faktoren 15

 2.1.2.1.11 Am 3'-Ende der mRNA agierende Faktoren 15

 2.1.2.1.12 Wirkungsmechanismus der eukaryotic translation initiation factor
4E-binding proteins (4E-BPs) bei der Translationsinitiation..... 16

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 2.1.2.1.13 Zytoplasmatische Polyadenylierung | 18 |
| 2.1.2.1.14 Bedeutung verschiedener Proteinkinasen für die Translationskontrolle und den Ablauf der Oozytenreifung | 19 |
| 2.1.2.1.15 Translation verschiedener mRNA-Subklassen | 24 |
| 2.1.2.2 Bedeutung verschiedener Signalmoleküle für die Translationskontrolle und den Verlauf der Oozytenreifung..... | 26 |
| 2.1.2.2.1 mTor | 26 |
| 2.1.2.2.2 4E-BP1..... | 33 |
| 2.1.2.2.3 eIF4E | 35 |
| 2.3 Bei der Maturation von Eizellen eingesetzte inhibitorisch wirkende Stoffe..... | 39 |
| 2.4 Rapamycin | 41 |
| 2.5 ATP-kompetitive Active-Site-mTor-Inhibitoren..... | 43 |
| 3 Zielstellung..... | 45 |
| 4 Material und Methoden..... | 47 |
| 4.1 Übersicht über die Versuchsaufteilung | 47 |
| 4.2 Entnahme der Ovarien..... | 50 |
| 4.3 Gewinnung und Klassifizierung der KOK | 50 |
| 4.4 Maturation der Eizellen | 51 |
| 4.5 Probenvorbereitung für die morphologischen, biochemischen und immunhistochemischen Analysen | 52 |
| 4.6 Morphologische Beurteilung der Eizellen anhand der Chromatinkonfiguration | 53 |
| 4.6.1 Fixation der Eizellen | 53 |
| 4.6.2 Färbung der Eizellen..... | 53 |
| 4.6.3 Beurteilung der Eizellen..... | 54 |

| | |
|---|----|
| 4.7 In-vitro-Fertilisation | 56 |
| 4.7.1 Aufbereitung der Spermien..... | 56 |
| 4.7.2 Befruchtung..... | 57 |
| 4.8 In-vitro-Kultivierung..... | 57 |
| 4.9 Beurteilung der Teilungs- und Entwicklungsstadien | 58 |
| 4.10 Biochemische Analysen | 59 |
| 4.10.1 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) | 59 |
| 4.10.2 Proteintransfer mittels Western-Blot..... | 60 |
| 4.10.3 Blocken der Membran und Immunoblotting..... | 60 |
| 4.10.4 Untersuchung der Substratphosphorylierung verschiedener Kinasen | 62 |
| 4.10.5 Enhanced chemiluminescence (ECL)-Detektion | 62 |
| 4.11 Immunhistochemische Analysen | 63 |
| 4.12 Statistische Auswertung | 65 |
| 5 Ergebnisse..... | 67 |
| 5.1 Versuchsabschnitt 1: Morphologische Beurteilung mit Rapamycin (10 μ M) behandelter Eizellen | 67 |
| 5.2 Versuchsabschnitt 2: Ermittlung der Entwicklungskompetenz Torin2- (3 μ M) behandelter Eizellen mit gleichzeitiger Prüfung der hemmenden Wirkung von Torin2 in einer Konzentration von 3 μ M | 70 |
| 5.2.1 Versuchsabschnitt 2a: Morphologische Beurteilung mit Torin2 (3 μ M) behandelter Eizellen | 70 |
| 5.2.2 Versuchsabschnitt 2b: Ermittlung der Entwicklungskompetenz Torin2- (3 μ M) behandelte Eizellen durch Bestimmung der Blastozystenrate | 72 |
| 5.3 Versuchsabschnitt 3: Biochemische Analysen mittels Western-Blot..... | 75 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| 5.4 Versuchsabschnitt 4: Immunhistochemische Analysen mittels konfokaler Lasersanning-Mikroskopie..... | 78 |
| 6 Diskussion | 84 |
| 6.1 Bezug zu vorangegangenen Studien | 84 |
| 6.2 Versuchsabschnitt 1: Morphologische Beurteilung mit Rapamycin behandelte Rindereizellen..... | 85 |
| 6.3 Versuchsabschnitt 2: Ermittlung der Entwicklungskompetenz Torin2-behandelter Rindereizellen | 86 |
| 6.4 Versuchsabschnitt 3: Biochemische Analysen..... | 88 |
| 6.5 Versuchsabschnitt 4: Immunhistochemische Analysen..... | 96 |
| 6.6 Ausblick | 101 |
| 7 Zusammenfassung | 102 |
| 7 Summary..... | 104 |
| 8 Literaturverzeichnis | 105 |
| 9 Anhang..... | 136 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abb. 1: Während der Reifung von Rindereizellen auf molekularer Ebene stattfindende Veränderungen..... | 9 |
| Abb. 2: „Closed-loop“-Modell für die messengerRNA (mRNA)-Aktivierung während der Translationsinitiation..... | 14 |
| Abb. 3: Wirkungsmechanismus von eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) bei der Translationsinitiation..... | 17 |
| Abb. 4: Aktivität verschiedener Proteinkinasen während der Maturation von Rindereizellen | 23 |
| Abb. 5: Translation verschiedener messengerRNA (mRNA)-Subklassen bei unterschiedlicher Verfügbarkeit von eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E).... | 25 |
| Abb. 6: Aufbau der Multiproteinkomplexe mTor complex 1 (mTorc1) und mTorc2. | 27 |
| Abb. 7: Überblick über intrazelluläre Signalkaskaden, die die Translation steuern... | 31 |
| Abb. 8: Schematische Darstellung von eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1)..... | 33 |
| Abb. 9: Strukturformel Rapamycin..... | 42 |
| Abb. 10: Strukturformel Torin2 | 44 |
| Abb. 11: Übersicht über die Versuchsaufteilung | 49 |
| Abb. 12: Verschiedene Entwicklungsstadien im Verlauf der 24-stündigen Maturation von Rindereizellen | 55 |
| Abb. 13: Klassifizierung von Embryonen nach Lindner und Wright..... | 59 |
| Abb. 14: Morphologische Beurteilung von Eizellen anhand der Chromatinkonfiguration..... | 68 |
| Abb. 15: Anhand der morphologischen Beurteilung auf Basis der Chromatinkonfiguration ermittelte prozentuale Verteilung der Eizellen auf verschiedene Entwicklungsstadien (Rapamycin 10 μ M)..... | 69 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 16: Anhand der morphologischen Beurteilung auf Basis der Chromatinkonfiguration ermittelte prozentuale Verteilung der Eizellen auf verschiedene Entwicklungsstadien (Torin2 3 μ M) | 71 |
| Abb. 17: Embryonen der Versuchs- und Kontrollgruppen in verschiedenen Entwicklungsstadien | 73 |
| Abb. 18: Teilungsrate, Blastozystenrate und Anteil geschlüpfter Blastozysten, ermittelt nach Fertilisation und Kultivierung mit Torin2 (3 μ M) gereifter Eizellen..... | 74 |
| Abb. 19: Analyse der Auswirkungen der mechanistic target of rapamycin (mTor)-Inhibitoren Rapamycin und Torin2 auf die Phosphorylierung spezifischer Zielproteine mittels Western-Blotting | 76 |
| Abb. 20: Analyse der Auswirkungen von Rapamycin auf die Substratphosphorylierung verschiedener Kinasen und auf die vorhandene Menge und Phosphorylierung von extracellular-signal regulated kinase 1/2 (Erk 1/2) | 77 |
| Abb. 21: Analyse der Auswirkungen der mechanistic target of rapamycin (mTor)-Inhibierung durch Rapamycin und Torin2 auf verschiedene Zielproteine bezüglich der in der Eizelle vorhandenen Menge, des Phosphorylierungsstatus und der Verteilung innerhalb der Eizelle mittels Laserscanning-Mikroskopie (LSM)..... | 79 |
| Abb. 22: BP1-Phosphorylierung bei Torin2-behandelten Eizellen..... | 82 |
| Abb. 23: Wirkung der mechanistic target of rapamycin (mTor)-Inhibitoren Rapamycin und Torin 2..... | 95 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tab. 1: Eukaryotische Initiationsfaktoren..... | 12 |
| Tab. 2: Wirkung verschiedener bei der Maturation von Eizellen verwendeter Inhibitoren..... | 40 |
| Tab. 3: Klassifizierungsschema für Kumulus-Oozyten-Komplexe nach Leibfried und First..... | 51 |
| Tab. 4: Verwendete Verdünnungen der Antikörper für das Immunoblotting..... | 61 |
| Tab. 5: Verwendete Verdünnungen der Antikörper für die immunhistochemischen Analysen | 64 |
| Tab. 6: In der Eizelle vorhandene Gesamtmenge der untersuchten Faktoren und ihrer phosphorylierten Formen für die verschiedenen Versuchsgruppen | 147 |
| Tab. 7: Unterschiede bezüglich der insgesamt in der Eizelle vorliegenden Menge der untersuchten Faktoren und ihrer phosphorylierten Formen zwischen den Versuchsgruppen | 148 |
| Tab. 8: Unterschiede bezüglich der in der Eizelle vorliegenden Menge der untersuchten Faktoren und ihrer phosphorylierten Formen zwischen den Versuchsgruppen getrennt nach Lokalisation innerhalb der Eizelle | 149 |
| Tab. 9: An bestimmten Lokalisationen innerhalb der Eizelle vorliegende Menge der untersuchten Faktoren und ihrer phosphorylierten Formen..... | 151 |
| Tab. 10: An bestimmten Lokalisationen innerhalb der Eizelle vorliegende Menge der untersuchten Faktoren und ihrer phosphorylierten Formen getrennt nach Versuchsgruppen | 152 |
| Tab. 11: Unterschiede in der Lokalisation der untersuchten Faktoren und ihrer phosphorylierten Formen innerhalb der Eizelle..... | 153 |
| Tab. 12: Unterschiede in der Lokalisation der untersuchten Faktoren und ihrer phosphorylierten Formen innerhalb der Eizelle getrennt nach Versuchsgruppen... | 154 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|---|
| 4E-BP1 | eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 |
| 4E-BPs | eukaryotic translation initiation factor 4E-binding proteins |
| 4EGI-1 | eIF4E/eIF4G interaction inhibitor 1 |
| 4E-T | 4E-transporter |
| 5'TOP | 5'terminal oligopyrimidin |
| ALLN | N-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| AMPK | AMP-activated kinase |
| Ana I | Anaphase I |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ATM | ataxia telangiectasia mutated |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| ATR | ataxia telangiectasia and Rad3-related protein |
| BCB | Brilliant Cresyl Blue |
| BIM I | Bisindolylmaleimid I |
| BL I | Butyrolacton I |
| BME | Basal Medium Eagle |
| BSA | bovine serum albumin |
| BVN | Besamungsverein Neustadt an der Aisch |
| cdc 2 Kinase | cell division control 2 Kinase |
| cdc 42 | cell division control protein 42 homolog |
| cdk 1 | cyclin-dependent kinase 1 |
| CDKs | cyclin-dependent kinases |
| CGFD | cortical granule-free domain |
| CPEB | cytoplasmic polyadenylation element binding |
| CPSF | cleavage/polyadenylation specificity factor |

| | |
|---------|--|
| CTA | chromosomal translational area |
| cst | Cell Signaling Technology |
| Deptor | DEP-domain-containing mTor-interacting protein |
| DHx29 | DExH box protein 29 |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA-PK | DNA-dependent protein kinase |
| D-PBS | Phosphate-Buffered Saline nach Dulbecco |
| ECL | enhanced chemiluminescence |
| ECS | estrus cow serum |
| eIF | eukaryotic translation initiation factor |
| Erk | extracellular-signal regulated kinase |
| FKBP 12 | FK506-binding protein 12 |
| FRAP | FKBP 12-rapamycin-associated protein |
| FRB | FKBP 12-rapamycin-binding |
| FSH | follikelstimulierendes Hormon |
| G6PDH | Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase |
| GAPDH | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |
| GβL | G protein beta subunit -like |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GSK3β | glycogen synthase kinase 3β |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| GV | germinal vesicle |
| GVBD | germinal vesicle breakdown |
| HRP | horseradish peroxidase |
| ICM | inner-cell-mass |
| IgG | Immunglobulin G |
| IRS-1 | insulin receptor substrate-1 |
| IVF | In-vitro-Fertilisation |
| IVM | In-vitro-Maturation |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|---|
| IVP | In-vitro-Produktion |
| KOK | Kumulus-Oozyten-Komplex |
| LH | luteinisierendes Hormon |
| LKB1 | liver kinase B1 |
| LSM | Laserscanning-Mikroskopie |
| M I | Metaphase I |
| M II | Metaphase II |
| MAPK | mitogene activated protein kinase |
| MEK | mitogene activated Erk activating kinase |
| MEKK | MEK Kinase |
| MEM | Minimum Essential Medium |
| Met-tRNA _i | initiator transfer RNA |
| MLP | Maskin-like protein |
| mLST8 | mammalian lethal with Sec13 protein8 |
| Mnk | MAPK integrating kinase |
| MPF | M-phase promoting factor |
| mRNA | messenger RNA |
| mRNP | messenger ribonucleoprotein |
| mSin 1 | mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1 |
| MTOCs | microtubule organizing centers |
| mTor | mechanistic target of rapamycin |
| mTorc1/2 | mTor complex 1/2 |
| OA | okadaic acid |
| p90 RSK | p90 ribosomal S6 kinase |
| PABP | Poly(A)-binding protein |
| Paip | PABP interacting protein |
| PAP | Poly(A)Polymerase |
| PBS | Phosphate-Buffered Saline |
| PDCD4 | programmed cell death protein 4 |

| | |
|----------|---|
| PDK1 | 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 |
| PHAS I | phosphorylated heat- and acid-stable protein regulated by insulin I |
| PI3K | phosphoinositide 3-kinase |
| PIKK | phosphatidylinositol-3-kinase-like kinase |
| PKA | Proteinkinase A |
| PKB | Proteinkinase B |
| PKC | Proteinkinase C |
| Poly(A) | Poly-Adenosin |
| PRAS 40 | proline-rich Akt substrate of 40 kDa |
| Protor | protein observed with rictor |
| PRR5 | proline-rich protein 5 |
| PTA | perispindular translational area |
| PTEN | phosphatase and tensin homolog |
| PVDF | Polyvinylidene Difluoride |
| Rac 1 | Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 |
| Raf 1 | rapidly accelerated fibrosarcoma 1 |
| RAFT | rapamycin and FKBP 12 target |
| RAPT | rapamycin target |
| Raptor | regulatory associated protein of mTor |
| Ras | rat sarcoma |
| Rho A | Ras homolog gene family member A |
| Rictor | rapamycin-insensitive companion of mTor |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROI | region of interest |
| rpS6 | ribosomal protein S6 |
| S6K1 | ribosomal protein S6 kinase 1 |
| SDS | Sodium Dodecylsulfate |
| SDS-Page | SDS Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese |
| SEP | sirolimus effector protein |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|------------------------------------|
| Ser | Serin |
| SOF | synthetic oviduct fluid |
| TBS | Tris Buffer Saline |
| TBS-T | Tris Buffer Saline + Tween 20 |
| TCM 199 | tissue culture medium 199 |
| Telo I | Telophase I |
| TEMED | NNN'N'-Tetramethylethylenediamine |
| Thr | Threonin |
| TL | Tyrode's Lactate |
| TOP | terminal oligopyrimidin |
| TOS | mTor signaling |
| TSC | tuberous sclerosis complex |
| Tween 20 | Polyoxyethylenesorbitanmonolaurate |
| UTR | untranslated region |

1 Einleitung

Die Verfahren der In-vitro-Maturation (IVM) von Rindereizellen und der In-vitro-Produktion (IVP) von Rinderembryonen werden heute routinemäßig zur Realisierung von Zuchtprogrammen eingesetzt. Dennoch sind diese In-vitro-Techniken immer noch Gegenstand grundlegender Forschungsarbeiten, da in den In-vitro-Systemen nur eine Ausbeute an transfertauglichen Blastozysten von 30-40% erreicht wird. Verursacht wird dies wahrscheinlich durch nicht optimale Kultivierungsbedingungen und die unterschiedliche Entwicklungskompetenz der verwendeten Eizellen. Bislang sind die molekularen Mechanismen, die der Entwicklung von Eizellen und Embryonen zugrunde liegen, noch nicht vollständig aufgeklärt, dies gilt vor allem für die Vorgänge, die während der zytoplasmatischen Reifung der Oozyte ablaufen.

Fest steht, dass die Proteinsynthese und die Translationskontrolle, bei der unter anderem die Phosphorylierung spezifischer Translationsfaktoren eine Rolle spielt, für den Ablauf und die Vollendung der meiotischen Maturation und für die frühe embryonale Entwicklung von entscheidender Bedeutung sind. Dabei ist die Proteinsynthese während der Maturation Voraussetzung für wichtige Reifungs- und Differenzierungsprozesse. Da während der Maturationsphase die Transkription letztendlich nahezu vollständig sistiert, wird die Expression von Proteinen fast ausschließlich auf der Ebene der Translation gesteuert. Spezifische Initiationsfaktoren, deren Funktionalität durch Phosphorylierung reguliert wird, binden dabei die mRNA und steuern ihre Rekrutierung an Ribosomen. An der exakten Regulierung der Proteinsynthese während der Reifung hat der mTor-Signalweg maßgeblichen Anteil. Wesentliche Bestandteile dieses Signalwegs sind die Proteinkinase mechanistic target of rapamycin (mTor), die mit dieser Kinase assoziierten Gerüstproteine regulatory associated protein of mTor (Raptor), rapamycin-insensitive companion of mTor (Rictor) und eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E), ein Faktor, dessen Funktionalität unter anderem über eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (eIF4E-BP1) gesteuert wird.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, weitere Erkenntnisse über Translation und Translationskontrolle während der Oozytenreifung zu gewinnen. Durch die Verwendung zweier unabhängiger mTor-Inhibitoren, Rapamycin und Torin2, die beide unterschiedliche Auswirkungen auf das Fortschreiten der Maturation haben, konnten tiefere Einblicke in die komplexen Vorgänge, die an der Regulierung der Proteinsynthese während der Oozytenreifung beteiligt sind, gewonnen werden.

Um die morphologischen Auswirkungen von Rapamycin auf Rindereizellen zu untersuchen, wurden mit Rapamycin behandelte Eizellen unter dem Mikroskop an-

Einleitung

hand der Chromatinkonfiguration morphologisch beurteilt. Rapamycin wurde bei allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen in hoher Konzentration (10 μM) verwendet, da bei vorangegangenen Nachforschungen an Rindereizellen keine Auswirkungen von Rapamycin in niedrigeren Konzentrationen festgestellt werden konnten, die Anwendung einer hohen Rapamycin-Konzentration (10 μM) in einer Studie an Mauseizellen aber durchaus Effekte gezeigt hatte. Da aus einer früheren Untersuchung bekannt ist, dass 20-30% der mit Torin2 (3 μM) behandelten Rindereizellen die durch Torin2 verursachte Inhibierung überwinden können, wurden Versuche zur Bestimmung der Entwicklungskompetenz Torin2- (3 μM) behandelter Eizellen durchgeführt. Zur Ermittlung dieser Entwicklungskompetenz wurden unter dem inhibitorischen Einfluss von Torin2 gereifte Eizellen fertilisiert und kultiviert, schließlich wurde die Blastozystenrate bestimmt. Parallel wurden außerdem Torin2-behandelte Eizellen anhand der Chromatinkonfiguration morphologisch untersucht, um die hemmende Wirkung von Torin2 zu bestätigen. Für die Analyse des Auftretens und des Phosphorylierungszustandes der weiter oben bereits genannten Faktoren, die bei der Translationskontrolle während der Oozytenreifung eine Rolle spielen, wurden immunhistochemische und biochemische Untersuchungen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie und Western-Blots durchgeführt. Die Methode der Laser-Scanning-Mikroskopie wurde verwendet, da diese (im Gegensatz zu den biochemischen Analysen mittels Western-Blot) zusätzlich auch Informationen über die intrazelluläre Lokalisation der untersuchten Faktoren liefern kann. Somit bietet sie eine Möglichkeit, die Frage zu klären, ob die erwähnten Schlüsselkomponenten des mTor-Signalweges und ihre phosphorylierten Formen im Verlauf der Reifung ein spezifisches Verteilungsmuster zeigen. Daraus können wiederum Rückschlüsse über eine lokalisierte Proteinsynthese innerhalb von Rindereizellen und eine räumliche Regulierung der Translation gezogen werden.

2 Literatur

2.1 Grundlagen der Oozytenreifung beim Rind

2.1.1 Wiederaufnahme und Verlauf der Oozytenreifung

Nach Beendigung der Wachstumsphase der Eizellen kommt es zur Wiederaufnahme der meiotischen Oozytenreifung (Eichenlaub-Ritter u. Peschke 2002). Diese Periode umfasst die Entwicklung der Eizellen von der Prophase der ersten meiotischen Teilung bis zur Metaphase der zweiten meiotischen Teilung (Bhojwani et al. 2006; Tomek u. Smiljakovic 2005; Smiljakovic et al. 2003). Rindereizellen erreichen ab einem Durchmesser von circa 110 μm , was einer Follikelgröße von etwa 3 mm entspricht, die Kompetenz, die Oozytenreifung bis zur Metaphase II fortzusetzen (Hyttel et al. 2001). In vivo wird die Wiederaufnahme der meiotischen Endreifung durch den ovulatorischen LH-Peak (El-Raey u. Nagai 2014; Hyttel et al. 2001), in vitro durch das Herausnehmen voll ausgewachsener Eizellen aus ihren Follikeln (Tertiärfollikel, 3-8 mm Durchmesser) und die Überführung in ein geeignetes Kultivierungsmedium (El-Raey u. Nagai 2014; Ellederova et al. 2006; Tomek u. Smiljakovic 2005; Tomek et al. 2002b) induziert.

Der Prozess der Eizellreifung kann in die nukleäre und in die zytoplasmatische Reifung unterteilt werden (El-Raey u. Nagai 2014; Ferreira et al. 2009; Bhojwani et al. 2006; Sirard et al. 2003; Torner et al. 2001). Diese sind miteinander verbundene Vorgänge, die gleichzeitig stattfinden. Die zytoplasmatische Reifung umfasst die Umverteilung der Zellorganellen, die dynamischen Veränderungen des Zytoskeletts und die molekulare Reifung. Letztere beginnt schon während der Phase des Eizellwachstums. Sie beinhaltet wiederum die Transkription, die Lagerung und die Prozessierung (beispielsweise durch Polyadenylierung) der mRNAs und die Bereitstellung von Proteinen (beispielsweise von den Zellzyklus regulierenden Proteinkinasen wie mitogene activated protein kinase (MAPK) und M-phase promoting factor (MPF) oder von antioxidativen Enzymen), für die diese mRNAs als Vorlage dienen (Ferreira et al. 2009). Die meisten Proteine und Faktoren, die an der Wiederaufnahme der Meiose bei Rindereizellen beteiligt sind, werden während der ersten Stunden der In-vitro-Maturation synthetisiert (Ferreira et al. 2009; Tremblay et al. 2005). Neben Änderungen der Proteinsynthese spielen auch Änderungen des Phosphorylierungszustandes von Proteinen bei der molekularen Maturation eine wichtige Rolle. Es finden zahlreiche Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsvorgänge statt (Bhojwani et al. 2006; Wang et al. 2004; Tomek et al. 2002a; Kubelka et al. 2000). Durch Phosphorylierungsvorgänge werden Proteine, die für die Wiederaufnahme und das Fortschrei-

Literatur

ten der Oozytenreifung verantwortlich sind (beispielsweise Proteinkinasen wie MAPK und MPF), aktiviert oder deaktiviert (Tomek u. Smiljakovic 2005; Vigneron et al 2004; Chian et al. 2003; Kishimoto 2003; Meinecke u. Krschek 2003; Tomek et al. 2002a).

Die nukleäre Reifung beinhaltet hauptsächlich die Segregation der Chromosomen (Ferreira et al. 2009). Dabei erreicht das maternale Chromatin definierte Stadien der Meiose zu spezifischen Zeitpunkten nach Beginn der In-vitro-Maturation (Torner et al. 2001; Sirard et al. 1989). Vor Beginn der nukleären Reifung sind Säugetiereizellen in ihren Follikeln im Diplotän-Stadium der ersten meiotischen Prophase, dem sogenannten germinal vesicle (GV)- Stadium arretiert (Bhojwani et al. 2006; Ellederova et al. 2006; Tomek u. Smiljakovic 2005; Mehlmann et al. 2004; Sagata 1996). Mit Einsetzen der Maturation kommt es zu morphologischen Veränderungen wie germinal vesicle breakdown (GVBD), Kondensation der Chromosomen, Ausbildung der meiotischen Metaphase I-Spindel durch Reorganisation der Mikrotubuli, Wanderung der Spindel zum Kortex der Eizelle, Segregation der homologen Chromosomen, Ausschleusung des ersten Polkörpers und Bildung der Metaphase II-Spindel (Susor et al. 2015; Kogasaka et al. 2013; Lee et al. 2012; Bhojwani et al. 2006; Ellederova et al. 2006; Tomek u. Smiljakovic 2005). Die Eizellen entwickeln sich dabei vom GV-Stadium über das GVBD-Stadium zum Metaphase I (M I)- Stadium weiter, durchlaufen die Anaphase I (Ana I) und die Telophase I (Telo I) ohne erkennbare Dekondensation der Chromosomen und erreichen so schließlich die Metaphase II (M II), in der sie erneut arretiert werden (Lee et al. 2012; Ellederova et al. 2006; Tomek u. Smiljakovic 2005; Smiljakovic et al. 2003; Kubelka et al. 2000), bis die Eizelle durch Spermien-Penetration wieder aktiviert wird (Lee et al. 2012; Torner et al. 2001). Morphologisch ist zu erkennen, dass der meiotische Apparat in der Metaphase II kleiner ist als in der Metaphase I, was durch die Reduzierung der Chromosomenanzahl auf die Hälfte erklärt werden kann (Ferreira et al. 2009; Li et al. 2005). Die Ausschleusung des ersten Polkörpers beginnt schon in der Anaphase I, der Polkörper trennt sich aber erst dann vollständig von der Eizelle, wenn sie die M II-Phase erreicht (Li et al. 2005).

Meiotische Teilungen bei Eizellen sind typischerweise extrem asymmetrisch, was die Entstehung einer großen Eizelle und eines kleinen Polkörpers zur Folge hat (Susor et al. 2015; Kogasaka et al. 2013; Brunet u. Verlhac 2011; Gönczy 2008; Verlhac et al. 2000). Die Asymmetrie der ersten meiotischen Teilung hängt von der Polarisierung der Eizelle ab. Diese Polarisierung erfordert wiederum die Migration der im Zentrum der Eizelle gebildeten M I-Spindel zum Kortex der Eizelle (Kogasaka et al. 2013; Sun u. Kim 2013; Brunet u. Verlhac 2011; Wang et al. 2008; Verlhac et al. 2000), Spindelverankerung und kortikale Reorganisation (Sun u. Kim 2013; Lee et al. 2012; Brunet u. Verlhac 2011; Sun u. Schatten 2006).

Die kortikale Reorganisation umfasst dabei die Anreicherung von Mikrofilamenten und die Bildung einer Aktinkappe, die Entstehung einer granule-free domain (CGFD) und den Verlust von Mikrovilli in einer Region, die die Spindel überlagert (Lee et al. 2012; Deng et al. 2003; Van Blerkom u. Bell 1986).

Die Chromosomen-Segregation bei Säugetiereizellen wird vermittelt durch eine Mikrotubulus-Spindel, der Zentrosomen fehlen (Schuh u. Ellenberg 2007). Die Spindelbildung erfolgt durch microtubule organizing centers (MTOCs), die sich in der Prophase aus einem zytoplasmatischen Mikrotubulus-Netzwerk bilden und die funktionell die Zentrosomen, die bei der Mitose die Spindelbildung bewerkstelligen, ersetzen (Susor et al. 2015; Kogasaka et al. 2013; Schuh u. Ellenberg 2007). Die Migration der Spindel und die Polarisierung der Eizelle werden durch Aktin-Filamente mediiert (Lee et al. 2012; Sun u. Schatten 2006; Verlhac et al. 2000).

2.1.2 Translation und Translationskontrolle während der Oozytenreifung

2.1.2.1 Grundsätzliche Mechanismen der Translation und Translationskontrolle

2.1.2.1.1 Ribosomen als Ort der Proteinsynthese

Der Prozess der mRNA-Translation (auch Proteinsynthese genannt) findet an den Ribosomen statt (Sanges et al. 2013; Hershey u. Merrick 2000). Das ribosomale Protein S6 (rpS6) dient im Allgemeinen als ein Marker aktiv stattfindender Translation (Romasko et al. 2013; Duncan u. McConkey 1982). Der gesamte Vorgang der Translation kann in drei Phasen unterteilt werden, die Initiation, die Elongation und die Termination (Sonenberg 2008; Mathews et al. 2007; Wang u. Proud 2006). Jedes Stadium involviert eine Reihe von Proteinfaktoren, die bezüglich der Ribosomen extrinsisch sind und die unter anderem durch Phosphorylierung reguliert werden (Wang u. Proud 2006). Die mRNA liegt im Zytoplasma, wo die Translation stattfindet (Livingstone et al. 2010), in messenger ribonucleoprotein (mRNP)-Komplexen vor (Hershey u. Merrick 2000). Die Initiation der Proteinsynthese an einem mRNP-Komplex führt zur Mobilisierung der mRNA in ein Monosom und zusätzliche Initiations-Vorgänge wandeln die mRNA in ein Polysom um (Hershey u. Merrick 2000). Wenn mRNAs um die Ribosomenbindung konkurrieren, ist das synergistische Zusammenwirken zweier Strukturelemente der mRNA, der Cap-Struktur und des Poly(A)-Schwanzes, erforderlich, um die Rekrutierung von Ribosomen an das 5'-Ende zu vermitteln und eine effiziente Translation zu bewerkstelligen. Eine einzige mRNA, die von vielen Ribosomen effizient translatiert wird, kann mRNAs, die in

großer Menge vorliegen, aber schwach translatiert werden, an Bedeutung übertreffen (Livingstone et al. 2010; Axelsen u. Sneppen 2004).

2.1.2.1.2 Notwendigkeit der Proteinsynthese

Für das Fortschreiten der Maturation von Eizellen ist die Translation von entscheidender Bedeutung (Susor et al. 2015; Ferreira et al. 2009; Ellederova et al. 2008; Ellederova et al. 2006; Vasudevan et al. 2006; Gebauer et al. 1994), genau wie für die frühe embryonale Entwicklung (Susor et al. 2015; Ferreira et al. 2009; Groisman et al. 2002; Oh et al. 2000). Sowohl die Rindereizelle als auch die Rinderzygote und der Rinderembryo haben einen hohen Bedarf an Proteinsynthese (Torner et al. 2008). Erfolgreiche In-vitro-Maturation von Rindereizellen hängt von dem Stattfinden von Proteinsynthese ab (Wu et al. 1996). Der Erwerb einer hohen Entwicklungskompetenz ist ebenfalls abhängig von hohen Raten an Proteinsynthese (Torner et al. 2008; Eichenlaub-Ritter u. Peschke 2002).

2.1.2.1.3 Bedeutung der Translationskontrolle

Während der meiotischen Reifung von Eizellen ist nicht nur die Translation an sich, sondern genauso die Regulierung dieser Translation essentiell (Siemer et al. 2009; Standart u. Minshall 2008; Vasudevan et al. 2006; Charlesworth et al. 2004). Translationskontrolle ist vor allem in Situationen wichtig, in denen die Korrelation zwischen einer bestimmten mRNA und der vorhandenen Menge des zugehörigen Proteins niedrig ist. Dies ist während der Maturation von Eizellen und der frühen embryonalen Entwicklung bis zur Aktivierung des embryonalen Genoms der Fall (Tomek u. Wollenhaupt 2012; Bhojwani et al. 2006). Die Menge an vorhandener mRNA in der Eizelle ist dabei bei weitem höher als die Menge an mRNA, die für die Proteinsynthese benötigt wird (Scantland et al. 2011; Tomek et al. 2002b). Die besondere Bedeutung der Translationskontrolle bei Rindereizellen wird dadurch bestätigt, dass während der Maturation von Rindereizellen die Menge an polyribosomaler RNA (aber nicht die Gesamtmenge an RNA oder die Menge an polyadenylierter RNA) mit der vorhandenen Menge der zugehörigen Proteine korreliert. Außerdem liegt polyribosomale RNA in verschiedenen Stadien der Eizellreifung (GV, GVBD, MII) in unterschiedlicher Menge innerhalb der Eizelle vor, was allerdings kaum eine Korrelation mit der Gesamtmenge an RNA oder der Menge an polyadenylierter RNA zeigt (Scantland et al. 2011).

2.1.2.1.4 Transkription bei wachsenden und reifenden Eizellen

Während der Wachstumsphase von Eizellen findet aktive Transkription statt (Susor et al. 2015; Torner et al. 2008; De La Fuente et al. 2004; Eichenlaub-Ritter u. Peschke 2002; Wassarman u. Kinloch 1992). Dabei wird in den wachsenden Eizellen eine große Menge an mRNA-Molekülen akkumuliert, die nicht sofort translatiert, sondern in einer stabilen, aber inaktiven Form bis zu ihrer Rekrutierung während der meiotischen Oozytenreifung und der frühen embryonalen Entwicklung aufbewahrt werden (Mehlmann 2013; Susor et al. 2008; Bhojwani et al. 2006; Fair et al. 2004; Tomek et al. 2002b; Oh et al. 2000).

Im Gegensatz dazu kommt es während der Oozytenreifung ab dem Zeitpunkt, an dem das Chromatin kurz vor Einsetzen des GVBD kondensiert wird, zur Unterdrückung der Transkription (Siemer et al. 2009; Susor et al. 2008; Bhojwani et al. 2006; Ellederova et al. 2006; Vasudevan et al. 2006; De La Fuente et al. 2004; Abb.1). So ergaben Studien an Rindereizellen, dass es mit dem Eintritt des GVBD zu einer starken Verringerung der Transkriptionsraten kommt. Bei Eizellen, die sich in der M II-Phase befinden, kann fast keine Transkription mehr beobachtet werden (Tomek et al. 2002b; Memili et al. 1998). Somit hängen das Fortschreiten und die Vollendung der Meiose und die frühe embryonale Entwicklung von der Translation der gespeicherten maternalen mRNAs ab (Susor et al. 2015; Mehlmann 2013; Siemer et al. 2009; Bettegowda u. Smith 2007; Curtis et al. 1995). Deswegen findet die Kontrolle der Genexpression bei Eizellen fast ausschließlich auf Ebene der Translation und der mRNA-Stabilisierung statt (Susor et al. 2016; Susor et al. 2015; Tomek u. Wollenhaupt 2012; Siemer et al. 2009; Eichenlaub-Ritter u. Peschke 2002).

2.1.2.1.5 Mechanismen der Translationskontrolle

An der Aktivierung translatorisch inaktiver mRNAs und an ihrer Rekrutierung an Polysomen sind im Allgemeinen mehrere Mechanismen beteiligt (Ferreira et al. 2009; Ellederova et al. 2008; Tomek et al. 2002a; Tomek et al. 2002b). Dies schließt die Phosphorylierung und Dephosphorylierung einer Reihe von Initiationsfaktoren und ihrer Regulatoren (beispielsweise von eIF4E und BP1; Beugnet et al. 2003; Morley u. Pain 1995; Thach 1992; Hershey 1991), die Phosphorylierung von rp6S (Kim et al. 2013; Romasko et al. 2013; Gavin u. Schorderet-Slatkine 1997; Brown u. Schreiber 1996), die zytoplasmatische Polyadenylierung von mRNAs (Brevini et al. 2002; Brevini-Gandolfi et al. 1999; Richter 1999; Barkoff et al. 1998) und die Bindung von sequenzspezifischen oder unspezifischen Proteinen (Jackson et al. 2010; Sonenberg u.

Hinnebusch 2009; Stutz et al. 1998; Curtis et al. 1995) und von microRNAs (Jackson et al. 2010; Sonenberg u. Hinnebusch 2009) an die mRNA ein.

2.1.2.1.6 Proteinsynthese während der Oozytenreifung

In somatischen Zellen korreliert die Zunahme der Proteinsynthese mit gesteigerter Phosphorylierung von eIF4G, eIF4E, BP1 und rpS6 sowie mit gesteigerter eIF4F-Bildung und verminderter BP1-eIF4E-Komplexbildung (Morley u. Naegele 2002).

Bei Eizellen hingegen lässt sich keine so eindeutige Korrelation zwischen dem Grad der stattfindenden Proteinsynthese und der Phosphorylierung von Initiationsfaktoren beobachten (Siemer et al. 2009). Die Translationsraten sind bei Rindereizellen im GV-Stadium niedrig, steigen mit Eintritt des GVBD und im M I-Stadium an und sinken mit Erreichen der M II-Phase wieder auf basale Werte ab (Smiljakovic et al. 2003; Tomek et al. 2002a; Tomek et al. 2002b; Wu et al. 1996; Kastrop et al. 1990). Sowohl die BP1-Phosphorylierung und die eIF4E-Phosphorylierung als auch die eIF4F-Bildung steigen aber im Laufe der Maturation an und erreichen in der M II-Phase einen Höhepunkt (Mayer et al. 2014; Siemer et al. 2009; Abb.1). Dies bedeutet, dass im M II-Stadium trotz Hyperphosphorylierung von BP1 und starker eIF4F-Komplexbildung nur basale Proteinsyntheseraten zu finden sind, was nahelegt, dass BP1 nicht für die Unterdrückung der Translation in dieser Phase verantwortlich sein kann (Tomek u. Wollenhaupt 2012; Siemer et al. 2009). Auch die in der Eizelle vorhandene Menge an polyadenylierter mRNA und Faktoren wie Maskin-like protein (MLP) und cytoplasmic polyadenylation element binding (CPEB) können für die niedrigen Raten der globalen Proteinsynthese in der M II-Phase keine Erklärung liefern. Es wird vermutet, dass andere Faktoren, die mit dem 3'-Ende der mRNA interagieren, für die Unterdrückung der Translation bei Eizellen im M II-Stadium verantwortlich sind. Poly(A)-binding protein (PABP) könnte dabei eine wichtige Rolle spielen (Tomek u. Wollenhaupt 2012). Die Abnahme der globalen Proteinsynthese, die auch bei Mauseizellen beobachtet werden kann, hat vermutlich eine physiologische Bedeutung (Ellederova et al. 2006; Schultz et al. 1978).

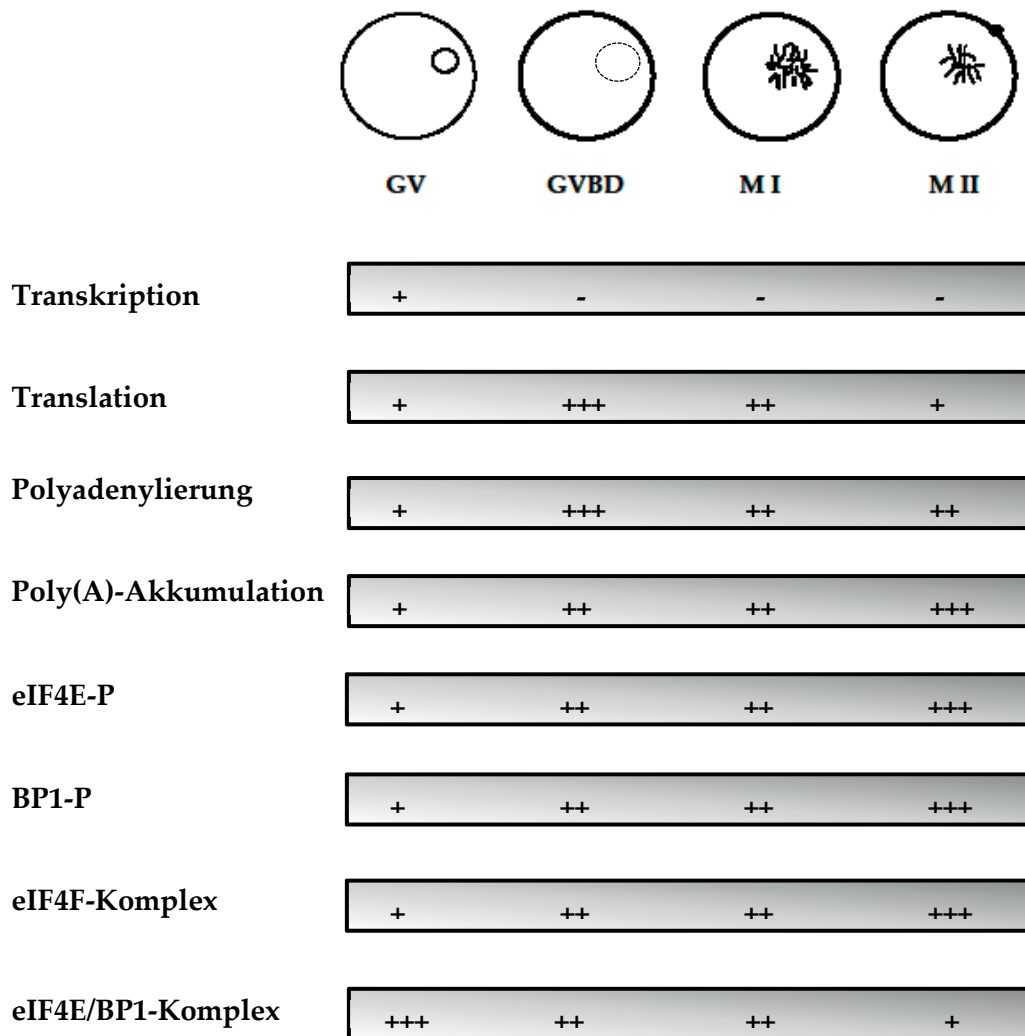


Abb.1: Während der Reifung von Rindereizellen auf molekularer Ebene stattfindende Veränderungen (nach Mayer et al. 2014; Siemer et al. 2009; Tomek et al. 2002a; Tomek et al. 2002b): Transkription findet nur im Germinalvesikel (GV)-Stadium statt, Translation und Polyadenylierung erreichen im germinal vesicle breakdown (GVBD)- und Metaphase I (M I)-Stadium ihren Höhepunkt. Die Phosphorylierung von eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) und eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (BP1) nimmt im Verlauf der In-vitro-Maturation stark zu, ebenso wie die Ausbildung des eIF4F-Komplexes. Im Gegensatz dazu nimmt die eIF4E/BP1-Komplexbildung zum Metaphase II (M II)-Stadium hin ab. Poly(A): Poly-Adenosin.

2.1.2.1.7 Lokalisierte Proteinsynthese

Bei vielen Spezies, beispielsweise bei *Xenopus* oder *Drosophila* kommt es durch Kompartimentierung von mRNA zu einer Lokalisierung der Proteinsynthese innerhalb der Eizelle (Susor et al. 2015; Romasko et al. 2013; Holt u. Bullock 2009; Dubowy u. Macdonald 1998). Bei *Drosophila* spielt dies eine bedeutende Rolle bei der Etablierung der Körperachsen (Holt u. Bullock 2009).

Im Gegensatz dazu ist über die Lokalisation von mRNA innerhalb von Säugetiereizellen wenig bekannt, Berichte über eine Ansammlung von RNA im Kortex der Eizelle ausgenommen (Susor et al. 2015; Flemr et al. 2010; Li et al. 2008). Eine weitere Ausnahme sind außerdem Erkenntnisse bezüglich der intrazellulären Lokalisierung maternaler mRNAs, die die Ausbildung und den Erhalt der meiotischen Spindel unterstützen (Romasko et al. 2013). So konnte bei Mauseizellen eine Anreicherung maternaler mRNAs, die für Spindelproteine kodieren, am Metaphase-Spindelapparat gesehen werden. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass die lokalisierte Translation dieser mRNAs einen Beitrag zur Spindelbildung leisten könnte (Romasko et al. 2013). Eine weitere Studie an Mauseizellen kam zu dem Ergebnis, dass, obwohl die ganze Eizelle translatorisch aktiv ist, nach Einsetzen des GVBD zwei Gebiete mit besonders ausgeprägter Translation innerhalb der Eizelle erkennbar werden, nämlich zum einen ein Gebiet in der unmittelbaren Umgebung der Chromosomen, chromosomal translational area (CTA) genannt, zum anderen ein die Spindel umgebendes Gebiet, perispindular translational area (PTA) genannt. Die Schlüsselkomponenten des mTor-eIF4E-Signalwegs sind in diesen Regionen der Eizelle lokalisiert und vermitteln dort vermutlich die Translation spezifischer mRNAs, die wichtig sind für die korrekte Ausbildung der Spindel und die akkurate Positionierung der Chromosomen. Dies stellt ein Beispiel für lokalisierte Proteinsynthese und zeitlich und räumlich regulierte Translationskontrolle während der Reifung von Säugetiereizellen dar (Susor et al. 2015). Für Rindereizellen gibt es diesbezüglich bislang noch keine Erkenntnisse.

2.1.2.1.8 Translationsinitiation

Die Kontrolle der Cap-abhängigen Translation findet hauptsächlich auf der Ebene der Initiation, die für die Gesamtproteinsynthese ratenbegrenzend ist, statt (Susor et al. 2015; Tomek u. Wollenhaupt 2012; Siemer et al. 2009; Ellederova et al. 2006; Hershey u. Merrick 2000). Die Initiation der Translation ist der Prozess der Bildung elongationskompetenter 80S Ribosomen an der mRNA, bei dem eine Basenpaarung zwischen dem Startkodon und der Antikodonschleife der Initiator tRNA (Met-

tRNA_i, Met_i) stattfindet (Jackson et al. 2010). Dieser Initiationsvorgang umfasst also die Rekrutierung von mRNAs an Ribosomen und erfordert die Ausbildung des eIF4F-Komplexes (Susor et al. 2015; Wollenhaupt et al. 2012; Wollenhaupt et al. 2011; Ellederova et al. 2008; Susor et al. 2008). Dabei ist vermutlich eIF4E, das bei der Rekrutierung von mRNA in Polysomen als Teil des eIF4F-Komplexes agiert (Wang et al. 2003; Mader et al. 1995), in somatischen Zellen der limitierende Faktor (Watkins u. Norbury 2002; Shi et al. 2003; Raught u. Gingras 1999), da eIF4E verglichen mit anderen Initiationsfaktoren in der Zelle in limitierenden Mengen vorhanden ist (Pyronnet et al. 1999; Duncan et al. 1987).

Die Initiation ist eine komplexe Phase der Translation, die ein Zusammenwirken mehrerer eukaryotischer Initiationsfaktoren (Tab.1) und Signalwege erfordert (Goggin et al. 2004; Martin u. Blenis 2002; Watkins u. Norbury 2002; Morley 2001). Die Aktivität der meisten Faktoren, die an der mRNA-Ribosomen-Bindung mitwirken, wird hauptsächlich durch Phosphorylierung geregelt (Susor et al. 2008; Ellederova et al. 2006; Morley 1997; Pain 1996).

Tab.1: Eukaryotische Initiationsfaktoren (Jackson et al. 2010): Dargestellt sind die wichtigsten Funktionen der Haupt- und Hilfs-Initiationsfaktoren.

| Haupt-Initiationsfaktoren | Funktion |
|---------------------------|---|
| eIF2 | Bildet einen eIF2-GTP-Met-tRNA ⁱ -Dreifachkomplex, der an die 40S-Untereinheit bindet und mediiert auf diese Weise die ribosomale Rekrutierung der Met-tRNA ⁱ . |
| eIF3 | Bindet an die 40S-Untereinheit, eIF1, eIF4G und eIF5; stimuliert die Bindung des eIF2-GTP-Met-tRNA ⁱ -Komplexes an die 40S-Untereinheit; fördert die Anbindung des 43S-Komplexes an die mRNA und den darauf folgenden Scanning-Prozess; besitzt Aktivitäten, die die Dissoziation von Ribosomen stärken und die Assoziation von Ribosomen d.h. das Zusammenfügen der 40S- und der 60S-Untereinheit verhindern. |
| eIF1 | Stellt die Genauigkeit der Erkennung des Start-Kodons sicher; fördert den ribosomalen Scanning-Prozess; stimuliert die Bindung des eIF2-GTP-Met-tRNA ⁱ -Komplexes an die 40S-Untereinheit; verhindert frühzeitige eIF5-induzierte Hydrolyse von eIF2-gebundenem GTP und P _i Ablösung. |
| eIF1A | Stimuliert die Bindung des eIF2-GTP-Met-tRNA ⁱ -Komplexes an die 40S-Untereinheit und kooperiert mit eIF1 bei der Förderung des ribosomalen Scanning-Prozesses und der Selektion des Start-Kodons. |
| eIF4E | Bindet an die m ⁷ GpppG5' terminale Cap-Struktur der mRNA |
| eIF4A | DEAD-box ATPase und ATP-abhängige RNA-Helikase |
| eIF4G | Bindet eIF4E, eIF4A, eIF3, PABP, SLIP1 und die mRNA und verstärkt die Helikase-Aktivität von eIF4A. |
| eIF4F | Ein cap-bindender Komplex bestehend aus eIF4E, eIF4A und eIF4G; windet die 5'proximale Region der mRNA auf und mediiert die Anbindung des 43S-Komplexes an die mRNA; unterstützt ribosomale Komplexe während des Scanning-Prozesses. |
| eIF4B | Ein RNA-bindendes Protein, das die Helikase-Aktivität von eIF4A verstärkt. |
| eIF4H | Ein RNA-bindendes Protein, das die Helikase-Aktivität von eIF4A verstärkt und homolog zu einer Untereinheit von eIF4B ist. |
| eIF5 | Ein GTPase-aktivierendes Protein, spezifisch für GTP-gebundenes eIF2, das die Hydrolyse von eIF2-gebundenem GTP bei Erkennung des Start-Kodons induziert. |
| eIF5B | Eine Ribosomen-abhängige GTPase, die die Zusammenführung der ribosomalen Untereinheiten mediiert. |
| eIF2B | Ein Guanosin-Nukleotid-Austausch-Faktor, der den GDP-GTP-Wechsel an eIF2 fördert. |
| Hilfsfaktoren | |
| DHX29 | Ein DExHbox-enhaltendes Protein, das an die 40S-Untereinheit bindet und den ribosomalen Scanning-Prozess an mRNAs mit langen, hoch strukturierten 5'-UTRs fördert. |
| Ded1 | Eine DEADbox-enhaltende NTPase und RNA-Helikase, die möglicherweise den Scanning-Prozess bei <i>Saccharomyces cerevisiae</i> fördert. |
| eIF6 | Ein Anti-Assoziations-Faktor, der an die 60S-Untereinheit bindet und diese an der Anbindung an die 40S-Untereinheit hindert. |
| p97 | Eng verwandt mit den carboxy-terminalen zwei Dritteln von eIF4G; bindet eIF4A und eIF3; fördert die Initiation möglicherweise auf mRNA spezifische Art und Weise. |
| PABP | Bindet an den 3'-Poly(A)-Schwanz der mRNA, eIF4G und eIF3; fördert die Bindung von eIF4F an die Cap-Struktur; erleichtert möglicherweise die Rekrutierung von recycelten Post-Termination-40S-Untereinheiten zurück an das 5'-Ende der mRNA. |

2.1.2.1.9 Closed-loop-Modell

Das gebräuchlichste Modell für den Beginn der Translationsinitiation ist derzeit das sogenannte „Closed-loop“-Modell, bei dem es vermittelt durch Proteinfaktoren zu einer physischen Brückenbildung zwischen dem 5'-Ende und dem 3'-Ende der mRNA kommt (Tomek u. Wollenhaupt 2012; Wollenhaupt et al. 2010; Sonenberg u. Hinnebusch 2009; Mangus et al. 2003; Abb.2). Dabei interagiert der 3'-Poly(A)-Schwanz über PAPB, das wiederum an eIF4G als Teil des Cap-bindenden eIF4F-Komplexes bindet, mit der 5'-Cap-Struktur (Wollenhaupt et al. 2011; Brook et al. 2009; Siemer et al. 2009; Borman et al. 2000). Dies führt zu einer 3'-5'-Zirkularisierung der mRNA und zu einer Stimulierung der Translation (Brook et al. 2009; Siemer et al. 2009; Susor et al. 2008; Khaleghpour et al. 2001). Diese Stimulierung wird dadurch erreicht, dass Sekundärstrukturen der mRNA aufgelöst werden und der Zugang der Ribosomen zur mRNA erleichtert wird (Tomek u. Wollenhaupt 2012). Außerdem könnte die mRNA-Zirkularisierung sicherstellen, dass nur intakte mRNA translatiert wird und die Reinitiation, das heißt das Recycling von Ribosomen an der mRNA, fördern (Tomek u. Wollenhaupt 2012; Topisirovic et al. 2011; Sonenberg u. Hinnebusch 2009; Kahvejian et al. 2005; Mangus et al. 2003; Gingras et al. 1999a). Hinzu kommt, dass die Verankerung von eIF4F über PAPB am 3'-Poly(A)-Schwanz sicherstellt, dass eIF4F an die mRNA angebunden bleibt, selbst wenn die Kontakte mit dem 5'-Ende der mRNA unterbrochen werden, sodass es somit nicht *de novo* aus dem freien eIF4F-Pool rekrutiert werden muss (Jackson et al. 2010).

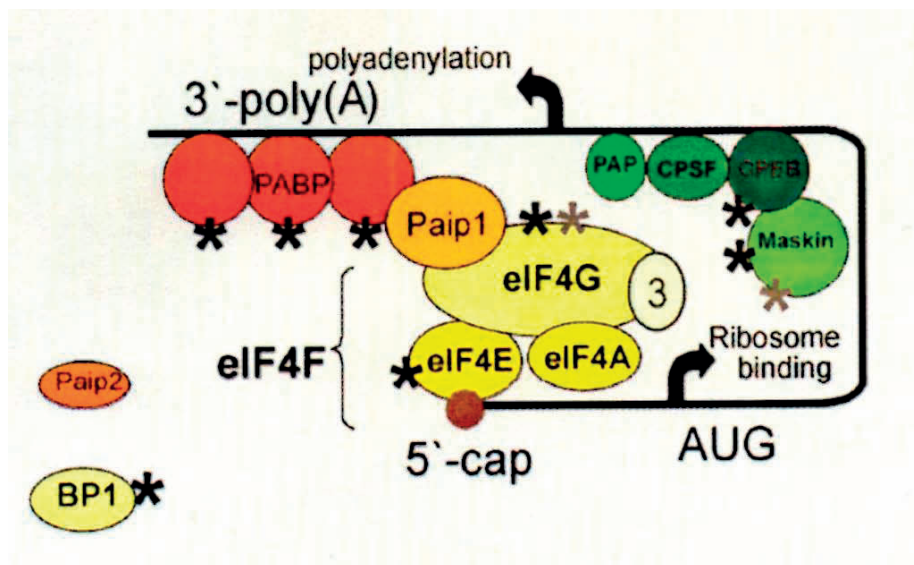


Abb.2: „Closed-loop“-Modell für die messengerRNA (mRNA)-Aktivierung während der Translationsinitiation (Tomek u. Wollenhaupt 2012): Die physische Brückenbildung zwischen dem 5'- und dem 3'-Ende der mRNA wird durch mehrere Proteinfaktoren mediiert. Proteine mit stimulierenden Phosphorylierungsstellen sind mit schwarzen Sternen markiert, unterdrückende Phosphorylierungsstellen sind mit grauen Sternen gekennzeichnet. Hypophosphoryliertes eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (BP1) bindet an eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) und verhindert die eIF4F-Komplexbildung. PABP interacting protein 2 (Paip 2) konkurriert mit Paip 1 um die Bindung an Poly(A)-binding protein (PAPB) und inhibiert die eIF4G/PAPB-Interaktion. Abhängig vom Phosphorylierungsstatus bindet Maskin an cytoplasmic polyadenylation element binding (CPEB) und eIF4E und verhindert so die eIF4F-Komplexbildung und die zytoplasmatische Polyadenylierung der mRNA. Alle diese Prozesse verhindern die Interaktion zwischen dem 5'- und dem 3'-Ende der mRNA und unterdrücken auf diese Weise die Translationsinitiation. CPSF: cleavage/polyadenylation specificity factor; PAP: Poly(A)Polymerase; Poly(A): Poly-Adenosin.

2.1.2.1.10 Am 5'-Ende der mRNA agierende Faktoren

Die am 5'-Ende der mRNA agierenden Faktoren vermitteln die Funktion der mRNA-Cap-Struktur (Tomek u. Wollenhaupt 2012). Die Interaktion von eIF4F mit translativ unterdrückter mRNA ist absolut notwendig für eine effiziente Initiation der Translation dieser mRNA (Von der Haar et al. 2004; Tomek et al. 2002a).

Der eIF4F-Komplex besteht aus drei Untereinheiten (Susor et al. 2015; O'Leary et al. 2013; Tomek u. Wollenhaupt 2012; Topisirovic et al. 2011; Gingras et al. 1999a): eIF4E, das an die Cap-Struktur am 5'-Ende der mRNA bindet, der ATP-abhängigen RNA-Helikase eIF4A, die verantwortlich ist für das Aufwinden von Sekundärstrukturen der mRNA und dem großen Gerüstprotein eIF4G, das die Integrität des Komplexes gewährleistet (Wollenhaupt et al. 2011; Wollenhaupt et al. 2010; Sonenberg 2008; Ellederova et al. 2006; Tomek et al. 2002a). eIF4G besitzt Bindungsstellen nicht nur für eIF4E und eIF4A, sondern auch für eIF3, das Bindeglied zwischen eIF4E und der kleinen ribosomalen Untereinheit, für PAPB, für MAPK integrating kinase (Mnk), die Kinase, die eIF4E direkt phosphoryliert und auch für mRNA (Wollenhaupt et al. 2011; Wollenhaupt et al. 2010; Ellederova et al. 2006). Die eIF4G-PAPB-Bindung scheint dabei die Affinität von eIF4E für die Cap-Struktur zu erhöhen (Borman et al. 2000) und die Effizienz der Translation zu steigern, aber für die Rekrutierung von Ribosomen nicht absolut notwendig zu sein (Von der Haar et al. 2004).

Während der In-vitro-Maturation von Rinder- und Schweineeizellen bleibt die vorhandene Menge an eIF4E, eIF4A und eIF4G weitgehend konstant (Tomek u. Wollenhaupt 2012; Siemer et al. 2009; Ellederova et al. 2006; Tomek et al. 2002a) und die Phosphorylierung von eIF4E nimmt immer mehr zu (Mayer et al. 2014; Siemer et al. 2009; Ellederova et al. 2008; Ellederova et al. 2006; Tomek et al. 2002a). Die Phosphorylierung von eIF4G bei Rindereizellen sinkt in diesem Zeitraum dagegen nach und nach ab (Siemer et al. 2009). Bei Rinder- wie auch bei Schweineeizellen lässt sich vom GV-Stadium zum M II-Stadium hin eine erhöhte Bindung von eIF4E an die Cap-Struktur und eine gesteigerte eIF4F-Komplexbildung beobachten (Tomek u. Wollenhaupt 2012; Siemer et al. 2009; Ellederova et al. 2006).

2.1.2.1.11 Am 3'-Ende der mRNA agierende Faktoren

PAPB, PAPB interacting protein 1 u. 2 (Paip 1 u. 2) und CPEB sind für die Translationsinitiation wichtige Faktoren, die mit dem 3'-Ende der mRNA assoziiert sind. Dabei bindet PABP an den Poly(A)-Schwanz der mRNA (Mangus et al. 2003), mediiert die Bildung der „Closed-loop“-Struktur (Sonenberg u. Hinnebusch 2007; Mangus et al. 2003; Tarun u. Sachs 1996) und stabilisiert und verstärkt die Bindung von eIF4F an

die Cap-Struktur (Sonenberg u. Hinnebusch 2009; Pestova et al. 2007; Sonenberg u. Hinnebusch 2007; Kahvejian et al. 2005). Die PABP-Aktivität wird durch Paip1 und Paip2 reguliert (Ellederova et al. 2006). Paip 1 stimuliert die Translation (Ellederova et al. 2006; Craig et al. 1998), indem es die PABP-eIF4G-Bindung durch Interaktion mit eIF3 stabilisiert (Siemer et al. 2009; Martineau et al. 2008). Im Gegensatz dazu unterdrückt Paip2, das mit Paip1 um die Bindung an PABP konkurriert, die Translation, indem es die Bindung von PABP an das polyadenylierte Ende der mRNA verhindert (Ellederova et al. 2006; Khaleghpour et al. 2001) und die Bindung von eIF4G an PABP inhibiert (Sonenberg u. Hinnebusch 2007; Karim et al. 2006). CPEB bindet an eine Sequenz in der 3'-UTR von mRNAs (Mendez u. Richter 2001) und spielt sowohl bei der Stimulierung der Translation durch Polyadenylierung (Uzbekova et al. 2008) als auch bei der Unterdrückung der Translation (Standart u. Minshall 2008) eine wichtige Rolle.

PABP 1, PABP 3, Paip1 und Paip2 werden während der In-vitro-Maturation von Rindereizellen konstant exprimiert (Tomek u. Wollenhaupt 2012; Siemer et al. 2009). Die vorhandene Menge an CPEB ist dagegen im M II-Stadium signifikant reduziert (Tomek u. Wollenhaupt 2012; Siemer et al. 2009; Uzbekova et al. 2008), was darauf hinweist, dass CPEB im M II-Stadium keinen herausragenden Einfluss auf die Gesamtproteinsynthese hat, sondern wahrscheinlich eher die Translation einer kleinen Subklasse von mRNAs mit hoher regulatorischer Relevanz steuert (Tomek u. Wollenhaupt 2012). PABP wird vermutlich wenigstens zum Teil während der In-vitro-Maturation von Rindereizellen dephosphoryliert (Tomek u. Wollenhaupt 2012; Smiljakovic et al. 2004). Dies führt aufgrund der niedrigeren Affinität von hypophosphoryliertem PABP für Poly(A) (Le et al. 2000) folglich zu einer Behinderung der „Closed-loop“-Formation (Tomek u. Wollenhaupt 2012).

2.1.2.1.12 Wirkungsmechanismus der eukaryotic translation initiation factor 4E-binding proteins (4E-BPs) bei der Translationsinitiation

Die Bildung des eIF4F-Komplexes wird unter anderem durch die 4E-BPs reguliert (Wollenhaupt et al. 2012). Diese 4E-BPs (darunter 4E-BP1) konkurrieren mit eIF4G um die Bindung an eine gemeinsame dorsale Bindungsstelle von eIF4E (Ellederova et al. 2006; Volpon et al. 2006; Ptushkina et al. 1999; Haghghat et al. 1995; Mader et al. 1995). 4E-BP1 bindet in der hypophosphorylierten Form an eIF4E, verhindert so die eIF4E-eIF4G-Bindung und damit die eIF4F-Komplexbildung und unterdrückt auf diese Weise die Translation (Siemer et al. 2009; Susor et al. 2008; Duncan u. Song 1999; Lin et al. 1995; Abb.3). Wenn 4E-BP1 phosphoryliert wird, löst es sich von eIF4E ab, was eIF4E für eIF4G verfügbar macht und die Ausbildung eines aktiven eIF4F-

Komplexes ermöglicht (Susor et al. 2008; Ellederova et al. 2006; Fraser et al. 1999; Haghghat et al. 1995).

Die Bindung von eIF4E an die Cap-Struktur verstärkt die Affinität von eIF4E für BP1 (Modrak-Wojcik et al. 2013; Tomoo et al. 2005; Von der Haar et al. 2004; Shen et al. 2001). Umgekehrt behindert die Assoziation von BP1 mit eIF4E die Bindung von eIF4E an die Cap-Struktur nicht (Tomek et al. 2002a; Sonenberg u. Gingras 1998), sie stabilisiert die Bindung von eIF4E an die Cap-Struktur sogar (Volpon et al. 2006; Tomoo et al. 2005; Von der Haar et al. 2004; Ptushkina et al. 1999) und die unterdrückte mRNA wird so wahrscheinlich vor dem Entfernen der Cap-Struktur und vor einem Ribonukleaseangriff geschützt (Tomek u. Wollenhaupt 2012).

Vor kurzem wurde ein kleines Molekül, eIF4E/eIF4G interaction inhibitor 1 (4EGI-1), entdeckt, das die Bindung von BP1 an eIF4E verstärkt und die eIF4E-eIF4G-Interaktion unterbricht. Die gleichzeitige Bindung von 4EGI-1 und BP1 an eIF4E trägt dazu bei, das Gleichgewicht in Richtung der Inhibierung der Translationsinitiation zu verschieben (Sekiyama et al. 2015).

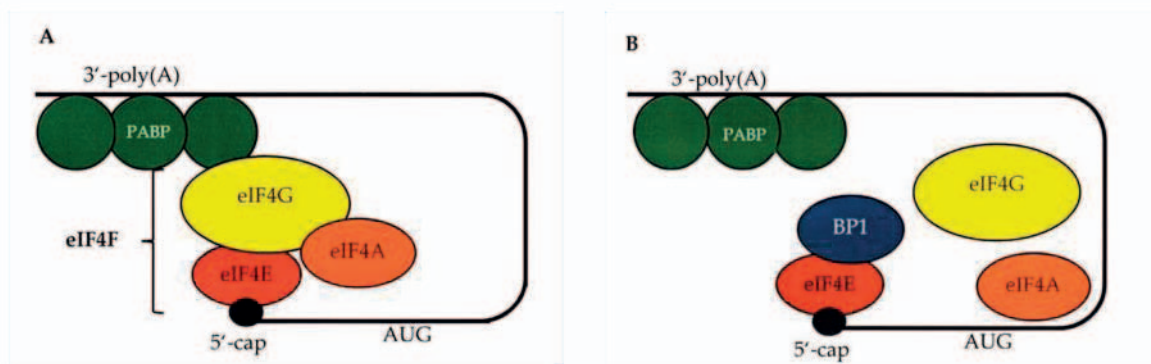


Abb.3: Wirkungsmechanismus von eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) bei der Translationsinitiation (nach Tomek u. Wollenhaupt 2012; Susor et al. 2008; Volpon et al. 2006; Mangus et al. 2003):

A: Eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) bindet an eIF4E, der eIF4F-Komplex (bestehend aus eIF4E, eIF4G und eIF4A) wird gebildet, was die Ausbildung der „Closed-loop“-Formation ermöglicht, die Translation wird auf diese Weise stimuliert.

B: 4E-BP1 konkurriert mit eIF4G um eine gemeinsame dorsale Bindungsstelle an eIF4E, verhindert so die eIF4F-Komplexbildung und die Ausbildung der „Closed-loop“-Formation und unterdrückt auf diese Weise die Translation.

PABP: Poly(A)-binding protein; Poly(A): Poly-Adenosin.

2.1.2.1.13 Zytoplasmatische Polyadenylierung

Neben der 5'-Cap-Struktur besitzen nahezu alle eukaryotischen mRNAs ein weiteres wichtiges Strukturelement, den Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende. Die Länge dieses Poly(A)-Schwanzes ist zusammen mit der Cap-Struktur bei der Regulierung der Stabilität von mRNAs und bei der Translationskontrolle von entscheidender Bedeutung (Mehlmann 2013; Corcoran et al. 2006; Collier u. Parker 2004).

Zytoplasmatische mRNAs unterliegen sowohl einer Verlängerung als auch einer Kürzung ihres Poly(A)-Schwanzes durch zytoplasmatische Enzyme, wobei Deadenylierung und Polyadenylierung gleichzeitig stattfinden können, sodass die Balance zwischen beiden Aktivitäten die Länge des Poly(A)-Schwanzes festlegt (Curtis et al. 1995). Die zytoplasmatische Verlängerung von Poly(A)-Sequenzen kann die Rekrutierung von Ribosomen an die mRNA regulieren (Tomek et al. 2002a; Richter 1999; Gebauer et al. 1994). Die Mehrheit der bislang untersuchten mRNAs wird in Eizellen (der Spezies Maus, Xenopus und Drosophila) nicht effektiv translatiert, wenn sie nur kurze Poly(A)-Schwänze besitzen (Tomek et al. 2002b; Curtis et al. 1995). Es wurde gezeigt, dass der translatorische Vorteil von polyadenylierten gegenüber nicht polyadenylierten mRNAs am größten unter Bedingungen starker Konkurrenz für begrenzte Initiationsfaktoren und/oder Ribosomen ist (Jackson et al. 2010; Borman et al. 2000). Darüber hinaus ist der Poly(A)-Schwanz eine wichtige Determinante der mRNA-Stabilität (Jackson u. Standart 1990), er inhibiert die Entfernung der Cap-Struktur (Collier u. Parker 2004). Dabei spielt auch PABP eine entscheidende Rolle, indem es die mRNA vor Deadenylierung schützt (Vasudevan et al. 2006; Wilkie et al. 2005).

Die zytoplasmatische Polyadenylierung ist ein wichtiger Mechanismus der Translationskontrolle während der meiotischen Maturation von Eizellen (Vasudevan et al. 2006; Lequarre et al. 2004; Hake u. Richter 1994; Vassalli et al. 1989). So kommt es während der In-vitro-Maturation von Rindereizellen zur Polyadenylierung von mRNA (Tomek et al. 2002b). Der Anstieg der Polyadenylierung, der vor allem im Zeitraum zwischen GVBD und M I-Stadium stattfindet, wird von einem Anstieg der Gesamt-Proteinsynthese begleitet (Smiljakovic et al. 2003; Tomek et al. 2002b), zum M II-Stadium hin nimmt die Polyadenylierung von mRNA nur mäßig ab (Tomek et al. 2002b; Abb.1). Eine Studie, in der der Gesamt-mRNA-Gehalt und die vorhandenen Mengen an polyadenylierter mRNA und an polyribosomaler mRNA für ausgewählte Transkripte vergleichend untersucht wurden, zeigt allerdings, dass die polyadenylierte Form einer bestimmten mRNA im Verlauf der Maturation von Rindereizellen kaum mit der polyribosomalen mRNA korreliert. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass die Polyadenylierung allein bei Rindereizellen nicht aus-

schlaggebend für die Rekrutierung von mRNA an Ribosomen ist (Scantland et al. 2011).

2.1.2.1.14 Bedeutung verschiedener Proteinkinasen für die Translationskontrolle und den Ablauf der Oozytenreifung

Die zahlreichen nukleären und zytoplasmatischen Vorgänge, die während der Oozytenreifung stattfinden, vor allem die Veränderungen des Phosphorylierungszustandes von Proteinen (darunter Translationsfaktoren und spezifische mRNA-bindende Proteine), werden durch die unterschiedlichen Aktivitäten einer Reihe von Proteinkinasen verursacht (Tomek et al. 2002a; Torner et al. 2001). Kinasen wie MPF, MAPK, Akt und Aurora A zeigen im Verlauf der Maturation charakteristische Aktivierungsmuster und eine typische räumliche Verteilung. Zudem beeinflussen sie den GVBD, die Spindelbildung oder den Übergang von der M I- zur M II-Phase, was sie für einen korrekten Ablauf der Meiose essentiell macht (Mayer et al. 2014; Kalous et al. 2009; Bhojwani et al. 2006; Kalous et al. 2006; Tomek u. Smiljakovic 2005; Tomek et al. 2002a).

Die Substratphosphorylierung bestimmter Phospho-(Ser/Thr)Kinasen (PKA, PKB, PKC, CDKs, ATM/ATR und MAPKs) kann zur Bestimmung der Aktivität dieser Kinasen verwendet werden. Phospho-(Ser/Thr)Kinasen phosphorylieren Serin oder Threonin innerhalb eines spezifischen Protein-Sequenzmotives ihrer jeweiligen Substrate. Durch einen Antikörper, der phosphoryliertes Serin oder Threonin innerhalb eines solchen spezifischen Sequenzmotives erkennt, kann somit die Kinase-Aktivität der jeweiligen Kinase ermittelt werden.

PKA, PKB, PKC, CDKs, ATM/ATR und MAPKs sind bedeutende Faktoren bei der Regulation des Zellzyklus, der dynamischen Abläufe am Zytoskelett und der Maturation von Eizellen (Mayer et al. 2014; Kalous et al. 2006; Tomek u. Smiljakovic 2005). Diese Kinasen phosphorylieren ihre Substrate im GV-Stadium kaum, im M II-Stadium dagegen findet die Phosphorylierung dieser Substrate in hohem Maße statt und es lassen sich charakteristische Phosphorylierungsmuster beobachten. Dadurch wird deutlich, dass sich die Aktivität der Kinasen im Verlauf der meiotischen Oozytenreifung verändert (Mayer et al. 2014; Siemer et al. 2009). Die Substratphosphorylierung reflektiert aber nicht notwendigerweise das exakte Timing der Kinaseaktivitäten, weil die Phosphorylierung auch nach Abnahme der Kinaseaktivität noch für mehrere Stunden stabil sein kann (Siemer et al. 2009).

Von besonderer Bedeutung für die Maturation ist MPF (Anger et al. 2004; Kubelka et al. 2000). Dieser Faktor setzt sich zusammen aus der cell division control 2 Kinase (cdc2 Kinase), die auch cyclin-dependent kinase 1 (cdk 1) oder Histon H1 Kinase ge-

Literatur

nannt wird, und Cyclin B (Dorée u. Hunt 2002; Robert et al. 2002; Torner et al. 2001; Jessus u. Beach 1992; Motlik u. Kubelka 1990). Dabei ist die cdc2 Kinase der katalytische Teil von MPF, der nur dann aktiv ist, wenn er mit der regulatorischen Untereinheit Cyclin B assoziiert ist (Tomek et al. 2002a; Norbury et al. 1991; Solomon et al. 1990). Die Aktivierung von MPF findet auf zwei Ebenen statt. Die erste ist dabei die Assoziation der cdc2 Kinase mit Cyclin B, die zweite Ebene umfasst Dephosphorylierungsvorgänge an der cdc2 Kinase selbst (Kubelka et al. 2000; Jessus u. Beach 1992; Norbury et al. 1991; Solomon et al. 1990). Diese MPF-Aktivierung, die bei Eizellen großer Säugetiere Proteinsynthese erfordert, ist essentiell für das Verlassen des GV-Stadiums (Mayer et al. 2014; Anger et al. 2004; Kubelka et al. 2000; Levesque u. Sirard 1996). So werden beim Rind die Aktivierung des MPF und die Wiederaufnahme der Meiose durch die Translation von Cyclin B-mRNA und durch die folgende Akkumulation von Cyclin B initiiert (Robert et al. 2002; Levesque u. Sirard 1996).

MAPK ist Teil einer Signalkaskade, die erwiesenermaßen an der Regulation der Translation während der Maturation von Eizellen beteiligt ist (Ellederova et al. 2008; Susor et al. 2008; Tomek u. Smiljakovic 2005; Fan u. Sun 2004; Tomek et al. 2002a). Es wird dabei von der mitogene activated Erk activating Kinase (MEK; wird auch MAPK Kinase genannt) phosphoryliert und damit aktiviert (Tomek et al. 2002a; Seeger u. Krebs 1995; Matsuda et al. 1993). MEK wird durch die Aktivität der Raf1 Kinase, die wiederum durch Ras Typ G Proteine positiv reguliert wird, aktiviert. Raf1 ist jedoch nicht der einzige MEK-Aktivator, andere Proteinkinasen wie c-mos und die MEK Kinase (MEKK) können MEK ebenfalls aktivieren (Tomek et al. 2002a; Campbell et al. 1995; Davis 1995; Seeger u. Krebs 1995; Kosako et al. 1994). Zu den MAPKs gehören sowohl die extracellular-signal regulated kinases (Erks) als auch die p38 MAPKs (Waskiewicz et al. 1997; Seeger u. Krebs 1995). Die Erk-Kaskade wird durch Wachstumsfaktoren, die p38 MAPK-Kaskade dagegen durch Stress aktiviert (Waskiewicz et al. 1997). Die MAPKs haben viele Substrate, darunter die p90 ribosomal S6 Kinase (p90 RSK) und Mnk1 und 2 (Hay 2010; Tomek et al. 2002a; Kalab et al. 1996; Davis 1995; Blenis 1993). Mnk1 und 2 phosphorylieren eIF4E in vivo (Hay 2010; Tomek et al. 2002a; Scheper et al. 2001; Waskiewicz et al. 1999), während p90 RSK an der Regulierung der eIF4B-Phosphorylierung beteiligt ist (Raught u. Gingras 2007). Obwohl es kontrovers ist, ob p90 RSK für die Phosphorylierung von rpS6 von Bedeutung ist, unterstützen Ergebnisse von Studien an reifenden *Xenopus*-Eizellen eine solche Funktion (Pende et al. 2004; Schwab et al. 1999).

Während der meiotischen Maturation von Säugetiereizellen nimmt die MAPK-Kaskade mehrere Funktionen wahr (Fan u. Sun 2004). Die MAPK-Aktivierung ist zwar für eine spontane Wiederaufnahme der Meiose nicht nötig (Fan u. Sun 2004; Ye et al. 2003; Dedieu et al. 1996), für die Gonadotropin-induzierte Wiederaufnahme der

Meiose ist allerdings eine Aktivierung von MAPK in den Kumuluszellen erforderlich (Fan u. Sun 2004). Nach Einsetzen des GVBD ist MAPK an der Bildung der meiotischen Spindel beteiligt und stellt die Asymmetrie der ersten meiotischen Teilung sicher. Außerdem ist die Aktivierung von MAPK essentiell für die Aufrechterhaltung der M II-Arretierung (Fan u. Sun 2004; Tian et al. 2002; Dedieu et al. 1996).

Während der Maturation von Rindereizellen beginnt die Aktivierung der cdc2 Kinase und von MAPK zur Zeit des GVBD (Tomek et al. 2002a; Torner et al. 2001), wobei die cdc2 Kinase gleichzeitig mit oder kurz vor MAPK aktiviert wird (Tomek et al. 2002a; Kubelka et al. 2000; Fissore et al. 1996; Abb.4). Sowohl MAPK als auch die cdc2 Kinase erreichen in der M I-Phase maximale Aktivität, allerdings nimmt die Aktivität der cdc2 Kinase im Zeitraum zwischen M I- und M II-Phase vorübergehend ab und erreicht schließlich in der M II-Phase ein zweites Maximum. Im Gegensatz dazu bleibt die MAPK-Aktivität von der M I- bis zur M II-Phase konstant hoch (Torner et al. 2001; Kubelka et al. 2000; Fissore et al. 1996; Abb.4). Es werden aber, zumindest zu Beginn der Maturation von Eizellen, weder die MAPK-Aktivität noch die cdc2 Kinase-Aktivität für die Kondensation der Chromosomen benötigt (Kubelka et al. 2000).

Eine weitere Kinase, die an der Regulierung der Cap-abhängigen Translation beteiligt ist und die eine Rolle bei der Reifung von Eizellen spielt, ist Akt, die auch PKB genannt wird (Tomek u. Smiljakovic 2005; Hoshino et al. 2004). Die Aktivierung von Akt hängt von der Phosphorylierung an Thr308 und Ser473 ab. Akt wird von 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) an Thr308 phosphoryliert (Yang u. Guan 2007; Tomek u. Smiljakovic 2005; Troussard et al. 2003; Scheid et al. 2002). PDK1 wird wiederum, initiiert durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone, durch phosphoinositide 3-kinase (PI3K) aktiviert, wobei dieser Vorgang von phosphatase and tensin homolog (PTEN) negativ reguliert wird (Hou et al. 2012; Chappell et al. 2011; Abb.7). Für die Phosphorylierung von Akt an Ser473 ist der mTorc2-Komplex verantwortlich (Yang u. Guan 2007; Zeng et al. 2007; Sarbassov et al. 2005; Tomek u. Smiljakovic 2005). Akt aktiviert den mTorc1-Komplex (Mayer et al. 2014; Wollenhaupt et al. 2013; Yang u. Guan 2007) und reguliert auf diesem Weg die Phosphorylierung von BP1 (Siemer et al. 2009; Tomek u. Smiljakovic 2005; Gingras et al. 2001a; Gingras et al. 1999b), die Phosphorylierung von eIF4G und über die Phosphorylierung der ribosomal protein S6 Kinase (S6K) die Phosphorylierung von eIF4B (Raught u. Gingras 2007; Sonenberg u. Hinnebusch 2007; Abb.7). In somatischen Zellen hat Akt Anteil an Netzwerken, die von Bedeutung für Wachstum, Überleben und Proliferation von Zellen sind. Über die Funktion von Akt während der Maturation von Eizellen ist weniger bekannt (Tomek u. Smiljakovic 2005). Resultate aus Versuchen an Seestern-Eizellen legen nahe, dass Akt den meiotischen G2/M-

Literatur

Phase Übergang stimuliert, was allerdings nicht notwendigerweise die Situation bei Säugetiereizellen reflektiert (Tomek u. Smiljakovic 2005; Okumura et al. 2002).

Während der Maturation von Rindereizellen bleibt die Gesamtexpression von Akt konstant. Die Phosphorylierung von Akt an Thr308 und Ser473, die strikt mit der Aktivität der Kinase korreliert, ist im GV- und im M II-Stadium niedrig. Mit Eintritt des GVBD beginnt der Anstieg der Akt-Phosphorylierung und die maximale Aktivität wird schließlich in der M I-Phase erreicht (Tomek u. Smiljakovic 2005; Abb.4). Akt ist damit genau zu dem Zeitpunkt (nämlich im GVBD- und M I-Stadium) aktiv, zu dem die Proteinsynthese während der In-vitro-Maturation von Rindereizellen ihr Maximum erreicht (Tomek u. Smiljakovic 2005; Tomek et al. 2002a; Tomek et al. 2002b), was nahelegt, dass Akt an der Steuerung dieser Proteinsynthese beteiligt ist (Tomek u. Smiljakovic 2005). Abgesehen davon gibt es eine Subpopulation von Rindereizellen, die, verglichen mit anderen Eizellen, eine höhere Entwicklungskompetenz haben und im GV-Stadium eine erhöhte Akt-Aktivität besitzen (Mayer et al. 2014; Torner et al. 2008). Dies ermöglicht es ihnen vermutlich, eine durch den Inhibitor SH6 verursachte Arretierung im M I-Stadium zu überwinden (Mayer et al. 2014; Tomek u. Smiljakovic 2005).

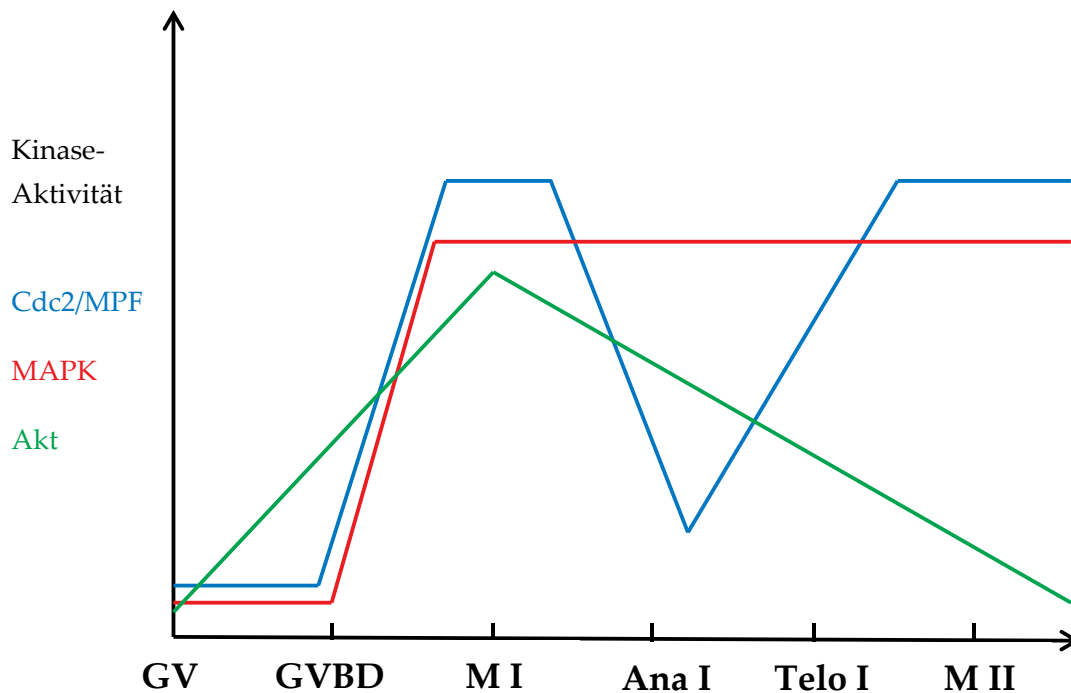


Abb.4: Aktivität verschiedener Proteinkinasen während der Maturation von Rindereizellen (nach Tomek u. Smiljakovic 2005; Tomek et al. 2002a; Torner et al. 2001; Kubelka et al. 2000): Die Akt-Aktivität ist im Germinalvesikel (GV)- und im Metaphase II (M II)-Stadium niedrig, mit Eintritt des germinal vesicle breakdown (GVBD) beginnt der Anstieg der Akt-Aktivität, wobei das Maximum im Metaphase I (M I)-Stadium erreicht wird.

Die Aktivierung der cell division control 2 Kinase (Cdc2-Kinase) und der mitogene activated protein Kinase (MAPK) beginnt ebenfalls zur Zeit des GVBD (die Cdc2-Kinase wird kurz vor MAPK aktiviert) und beide Kinasen erreichen im M I-Stadium maximale Aktivität. Während die MAPK-Aktivität bis zur M II-Phase konstant hoch bleibt, sinkt die Cdc2-Kinase-Aktivität im Zeitraum zwischen M I- und M II-Phase vorübergehend ab, um in der M II-Phase schließlich ein zweites Maximum zu erreichen. Ana I: Anaphase I; MPF: M-phase promoting factor; Telo I: Telophase I.

2.1.2.1.15 Translation verschiedener mRNA-Subklassen

Bei der translatorischen Regulierung muss zwischen Translationskontrolle, die die meisten zellulären mRNAs und damit die Gesamt-Proteinsynthese beeinflusst und die meist durch Veränderungen der Aktivität basaler Translationsfaktoren mediiert wird, und der Translationskontrolle, die nur spezifische mRNAs betrifft, unterschieden werden. Diese spezifische Translationskontrolle wird durch bestimmte Sequenzen, die innerhalb dieser mRNAs lokalisiert sind, ermöglicht. Dies erfolgt zum Teil durch Mechanismen, an denen Sequenz-spezifische mRNA-bindende Proteine oder microRNAs beteiligt sind (Jackson et al. 2010; Brook et al. 2009; Morley 1997).

Es gibt eIF4E-sensitive mRNAs, die lange, hoch strukturierte 5'-UTRs besitzen und für Proteine, die die Zellproliferation fördern, kodieren (beispielsweise für Cycline oder c-Myc). Daneben gibt es nicht eIF4E-sensitive mRNAs, deren 5'-UTRs relativ kurz und unstrukturiert sind und die für Housekeeping-Proteine wie Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) und Aktin kodieren (Jia et al. 2012; Tomek u. Wollenhaupt 2012; Topisirovic et al. 2011; Graff et al. 2008; De Benedetti u. Graff 2004; Koromilas et al. 1992). Die meisten zellulären mRNAs benötigen für ihre Translation basale Mengen an eIF4E (Gkogkas et al. 2013; Koromilas et al. 1992). Da aber exzessive Sekundärstrukturen in der 5'-UTR von mRNAs sowohl die Rekrutierung der Ribosomen und das Scannen als auch das Hinzufügen zusätzlicher Initiationsfaktoren verhindern (Thoreen 2013; Livingstone et al. 2010), sind mRNAs mit komplexeren 5'-UTRs mehr auf die Funktion von eIF4A als Teil des eIF4F-Komplexes (Aufwinden der mRNA) und damit auf die Verfügbarkeit von eIF4E angewiesen (Susor et al. 2015; Thoreen 2013; Topisirovic et al. 2011; Svitkin et al. 2001; Koromilas et al. 1992). Die Translation dieser eIF4E-sensitiven mRNAs ist also bei geringer Verfügbarkeit von eIF4E stark eingeschränkt. Erst wenn ein übermäßiges Angebot an eIF4E vorliegt, können diese mRNAs vermehrt translatiert werden. Umgekehrt werden nicht eIF4E-sensitive mRNAs auch dann effizient translatiert, wenn die vorhandene Menge an eIF4E begrenzt ist (Jia et al. 2012; Wollenhaupt et al. 2012; Graff et al. 2008; Koromilas et al. 1992; Abb.5).

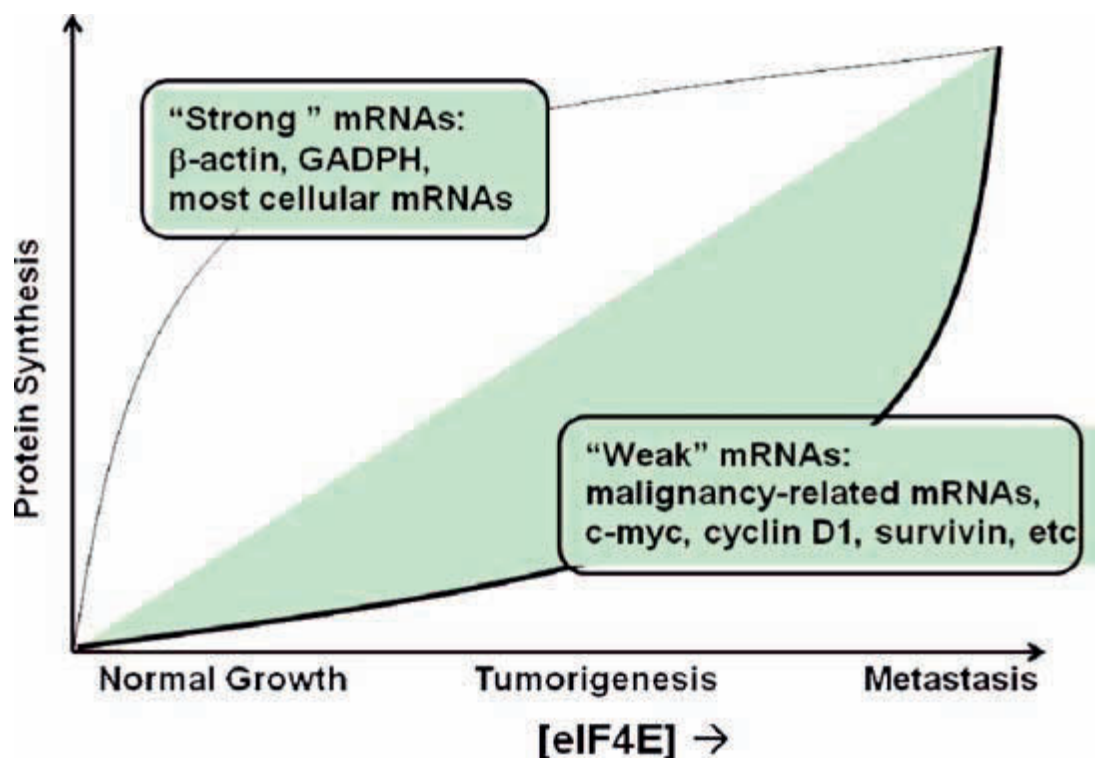


Abb.5: Translation verschiedener messengerRNA (mRNA)-Subklassen bei unterschiedlicher Verfügbarkeit von eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) (Jia et al. 2012, mod. nach Graff et al. 2008): Nicht-eIF4E-sensitive (starke) mRNAs haben eine wenig strukturierte 5'-untranslated region (UTR) und werden effizient translatiert, auch wenn eIF4E nur in geringer Menge verfügbar ist. Im Gegensatz dazu haben eIF4E-sensitive (schwache) mRNAs eine hoch strukturierte 5'-UTR und werden nur dann effektiv translatiert, wenn die vorliegende eIF4E-Menge nicht limitiert ist.

mTor reguliert über die 4E-BPs die Verfügbarkeit von eIF4E und hat daher auf eIF4E-sensitive mRNAs deutlich mehr Einfluss als auf nicht eIF4E-sensitive mRNAs (Gkogkas et al. 2013; Wollenhaupt et al. 2012; Topisirovic et al. 2011; Lynch et al. 2004). Eine Studie, bei der der mTor-Inhibitor Torin1 verwendet wurde, zeigt, dass die Translation von mRNAs, die für Housekeeping-Proteine kodieren (und damit die Translation des Großteils der in der Zelle vorhandenen mRNA), durch die mTor-Signalgebung nicht beeinflusst wird (Dowling et al. 2010). Auch die Tatsache, dass es bei Rindereizellen, die sich in der M II-Phase befinden, zu verstärkter Ausbildung des eIF4F-Komplexes kommt (Mayer et al. 2014; Siemer et al. 2009), während die Gesamt-Proteinsynthese nur basale Werte erreicht (Tomek et al. 2002a; Tomek et al.

2002b), legt nahe, dass die vermehrte Ausbildung eines aktiven eIF4F-Komplexes nur für die Translation einer kleinen Gruppe spezifischer mRNAs benötigt wird.

Neben mRNAs mit hoch strukturierter 5'-UTR zählt auch die Gruppe der terminal oligopyrimidin-mRNAs (TOP-mRNAs), die durch 5'-terminale Oligopyrimidin-Motive (5'TOP-Motive) charakterisiert sind, zur Subklasse der eIF4E-sensitiven mRNAs (Mayer et al. 2014; Thoreen 2013; Thoreen et al. 2012). TOP-mRNAs codieren vor allem für ribosomale Proteine, Elongations- und Initiationsfaktoren (Thoreen 2013; Huo et al. 2012; Livingstone et al. 2010; Meyuhas 2000; Tuhackova et al. 1999). Auch die Translation von TOP-mRNAs wird durch mTor-Signalgebung bevorzugt gesteigert (Thoreen 2013; Hsieh et al. 2012; Huo et al. 2012; Thoreen et al. 2012; Patursky-Polischuk et al. 2009). Wie mTor die Translation von TOP-mRNAs reguliert und warum die Translation von TOP-mRNAs besonders abhängig von der vorhandenen Menge an frei verfügbarem eIF4E und von der Ausbildung eines aktiven eIF4F-Komplexes ist, ist bislang unklar (Thoreen 2013; Thoreen et al. 2012; Livingstone et al. 2010; Wang u. Proud 2006).

2.1.2.2 Bedeutung verschiedener Signalmoleküle für die Translationskontrolle und den Verlauf der Oozytenreifung

2.1.2.2.1 mTor

mTor ist eine Serin/Threonin-Kinase, ein Mitglied der phosphatidylinositol-3-kinase-like kinase (PIKK)-Familie, zu der auch ATR, ATM DNA-PK und SMG-1 gehören (Liu et al. 2013; Yan-Chang u. Cai-Rong 2009; Yu et al. 2008; Abraham 2004; Murakami et al. 2004) und wird auch FKBP 12-rapamycin-associated protein (FRAP), rapamycin and FKBP 12 target (RAFT), rapamycin target (RAPT) oder sirolimus effector protein (SEP) genannt (Wullschleger et al. 2006). Dieses Signalmolekül spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Translation, der Zellproliferation und des Zellwachstums (Mayer et al. 2014; Gkogkas et al. 2013; Liu et al. 2013; Dowling et al. 2010; Martin u. Blenis 2002), wird sowohl durch mitogene (Wachstumsfaktoren, Insulin) als auch durch nährstoffbedingte (Aminosäuren, Glukose) Signale aktiviert und nimmt außerdem eine Bandbreite an Stress-Signalen (Energie- und Sauerstoffgehalt der Zelle) wahr (Dibble u. Cantley 2015; Mayer et al. 2014; Thoreen 2013; Yu et al. 2008; Guertin u. Sabatini 2007; Wullschleger et al. 2006). Die mTor-Signalgebung beeinflusst nur die Translation einer kleinen Untergruppe von mRNAs (Dowling et al. 2010). Dies hat aber dennoch wichtige funktionelle Konsequenzen, da diese mRNAs unter anderem für bedeutende Regulatoren des Zellzyklus kodieren (Thoreen 2013).

mTor agiert als katalytische Untereinheit zweier unterschiedlicher großer Multiproteinkomplexe, die jeweils verschiedene regulatorische Proteine, nämlich Raptor oder Rictor enthalten (Mayer et al. 2014; Thoreen 2013; Zoncu et al. 2011; Ballou u. Lin 2008; Sarbassov et al. 2004). Der mTorc1-Komplex setzt sich zusammen aus mTor, Raptor, mammalian lethal with Sec13 protein8 (mLST8; auch G protein beta subunit-like (GβL) genannt), DEP-domain-containing mTor-interacting protein (Deptor) und proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) und ist teilweise sensitiv gegenüber dem mTor-Inhibitor Rapamycin. Der mTorc2-Komplex enthält dagegen mTor, Rictor, mLST8, Deptor, mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1 (mSin1) und proline-rich protein 5 (PRR5)/protein observed with rictor (Protor) und ist Rapamycin-insensitiv (Mayer et al. 2014; Kogasaka et al. 2013; Lee et al. 2012; Laplante u. Sabatini 2009; Ballou u. Lin 2008; Abb.6). Raptor agiert als Gerüstprotein, das die mTor-Kinase mit mTorc1-Substraten verbindet, indem es direkt an mTor signaling (TOS)-Motive dieser Zielmoleküle bindet. Dadurch verstärkt es die mTorc1-Signalgebung (Foster u. Fingar 2010; Gwinn et al. 2008; Wang u. Proud 2006; Nojima et al. 2003). Rictor fördert die mTorc2-Bildung und -Signalübertragung, wobei es ebenfalls als Gerüstprotein fungiert, das die Bindung von mTor an mTorc2-Substrate vermittelt (Kogasaka et al 2013; Foster u. Fingar 2010).

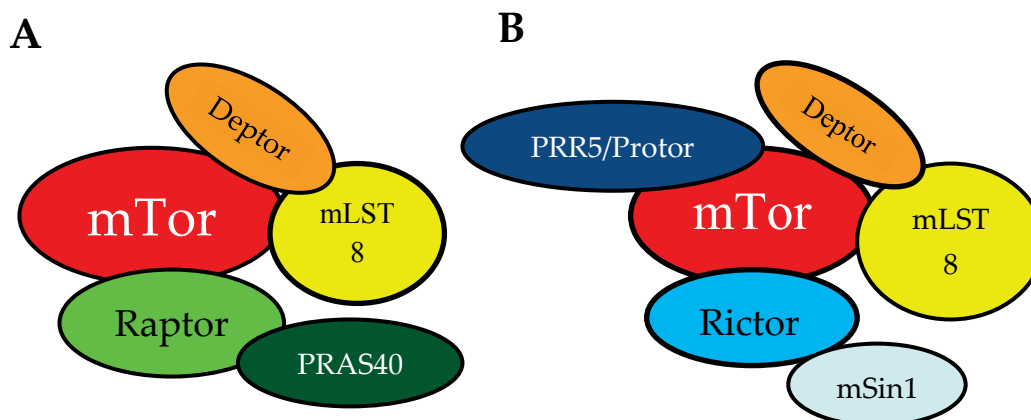


Abb.6: Aufbau der Multiproteinkomplexe mTor complex 1 (mTorc1) und mTorc2 (mod. nach Foster u. Fingar 2010): mTorc1 besteht aus mechanistic target of rapamycin (mTor), regulatory associated protein of mTor (Raptor), mammalian lethal with Sec13 protein8 (mLST8), DEP-domain-containing mTor-interacting protein (Deptor) und proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) (A), während mTorc2 mTor, rapamycin-insensitive companion of mTor (Rictor), mLST8, Deptor, mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1 (mSin1) und proline-rich protein 5 (PRR5)/protein observed with rictor (Protor) enthält (B).

Literatur

mTor wird durch Phosphorylierung aktiviert (Kogasaka et al. 2013; Soliman et al. 2010; Lawrence et al. 2004). Gewöhnlich wird die Phosphorylierung von zwei Downstream-Effektoren von mTor, 4E-BP1 und S6K1, als Marker der mTor-Aktivität verwendet (Dann u. Thomas 2006; Goggin et al. 2004; Boylan et al. 2001; Jiang et al. 2001).

Raptor hat mehrere Phosphorylierungsstellen, die von Bedeutung für die Regulierung der mTorc1-Aktivität sind (Kogasaka et al. 2013; Foster u. Fingar 2010). Wenn mTorc1 aktiviert wird, phosphoryliert mTor Raptor an mehreren Stellen (Ser863, Ser696, Thr706, Ser855, Ser859, Ser877), was wiederum eine Steigerung der mTorc1-Aktivität zur Folge hat. Diese Phosphorylierungsvorgänge laufen hierarchisch ab, wobei die Phosphorylierung an Ser863 die Voraussetzung für die Phosphorylierung an anderen Stellen ist (Foster et al. 2010; Foster u. Fingar 2010; Wang et al. 2009). Die Aktivierung des MAPK-Signalwegs führt zu p90 RSK-medierter Raptor-Phosphorylierung an Ser719, Ser721 und Ser722, was ebenfalls die mTorc1-Aktivität erhöht (Foster u. Fingar 2010; Carrière et al. 2008). Im Gegensatz dazu bewirkt die durch die AMP-activated Kinase (AMPK) mediierte Raptor-Phosphorylierung an Ser722 und Ser792 eine Inhibierung der mTor-Signalgebung (Foster u. Fingar 2010; Shaw 2009; Gwinn et al. 2008). Auch Rictor wird an mehreren Stellen, deren Bedeutung zum Großteil unbekannt ist, phosphoryliert (Foster u. Fingar 2010; Julien et al. 2010; Dibble et al. 2009). Dabei phosphoryliert S6K1, ein Substrat von mTorc1, Rictor an Thr1135. Obwohl dies die mTorc2-Bildung und die In-vitro-Kinase-Aktivität nicht beeinflusst, wird so die mTorc2- und die Akt-Signalgebung inhibiert (Julien et al. 2010; Dibble et al. 2009). Die Phosphorylierung von Raptor und Rictor an multiplen Stellen legt nahe, dass die Phosphorylierung von Partner-Proteinen zur Feinabstimmung der mTorc1- und mTorc2-Signalgebung beiträgt (Foster u. Fingar 2010; Julien et al. 2010; Dibble et al. 2009).

Verschiedene Signalwege regulieren als Antwort auf eine Vielzahl von Umweltsignalen die mTorc1-Aktivität, wobei die Phosphorylierung von tuberous sclerosis complex (TSC) als ein Integrationspunkt für mehrere dieser Signalwege dient (Ballou u. Lin 2008; Gwinn et al. 2008; Wullschleger et al. 2006; Abb.7). Der am besten charakterisierte positive Effektor ist dabei der PI3K/Akt-Signalweg, der durch Wachstumsfaktoren und Insulin aktiviert wird (Sanges et al. 2013; Ballou u. Lin 2008; Yu et al. 2008; Dann u. Thomas 2006; Wang u. Proud 2006). Akt wirkt allerdings nicht nur über TSC, sondern auch über PRAS40 auf mTorc1 ein. Wenn PRAS40 durch Akt phosphoryliert wird, verliert es seine inhibitorische Wirkung auf die mTorc1-Aktivität (Gwinn et al. 2008; Sancak et al. 2007). Darüber hinaus wird mTorc1 auch durch einen energieabhängigen Signalweg über TSC beeinflusst (Shaw 2009; Ballou u. Lin 2008; Wang u. Proud 2006; Inoki et al. 2006). Die Inhibierung von mTorc1 als Ant-

wort auf niedrige intrazelluläre Energielevel wird durch AMPK und ihren Aktivator, die Proteinkinase LKB1 mediiert (Ballou u. Lin 2008; Alessi et al. 2006; Shaw et al. 2004). AMPK unterdrückt die mTorc1-Aktivität aber nicht nur durch die Phosphorylierung von TSC, sondern auch durch die Phosphorylierung von Raptor, das ein direktes Substrat von AMPK ist (Gwinn et al. 2008). Im Gegensatz dazu wird mTorc1 durch den MAPK-Signalweg über TSC aktiviert (Stead u. Proud 2013; Wang u. Proud 2006; Ma et al. 2005; Roux et al. 2004). Außerdem sind Aminosäuren, besonders Leucin und Arginin essentiell für die mTorc1-Aktivierung. Allerdings ist der exakte Mechanismus, wie die Aminosäuren mTorc1 regulieren, bislang noch weitgehend unklar (Jewell et al. 2013; Jewell u. Guan 2013; Kim et al. 2013; Kim et al. 2011; Dann u. Thomas 2006). Es wird berichtet, dass Insulin und Aminosäuren auch den mTorc2-Signalweg aktivieren (Brina et al. 2015; Kim et al. 2013), dennoch ist über die Regulierung des mTorc2-Komplexes wenig bekannt (Sanges et al. 2013).

mTorc1 phosphoryliert die 4E-BPs und S6K (Abb.7) und ist daher für die Ausbildung aktiver eIF4F-Komplexe und für die Regulierung der Cap-abhängigen Translation von herausragender Bedeutung (Susor et al. 2015; Mayer et al. 2014; Liu et al. 2013; Hou et al. 2012; Thoreen et al. 2012; Zoncu et al. 2011). S6K wird durch die mTorc1-medierte Phosphorylierung aktiviert und phosphoryliert wiederum rpS6 (Sanges et al. 2013; Dowling et al. 2010; Wang u. Proud 2006; Wang et al. 2003; Avruch et al. 2001; Abb.7). Bei Säugetieren gibt es S6K1 und S6K2. Die physiologische Hauptkinase für rpS6 ist vermutlich eher S6K2, obwohl auch S6K1 an der rpS6-Phosphorylierung beteiligt ist (Roux u. Topisirovic 2012; Wang u. Proud 2006; Pende et al. 2004). Die Phosphorylierung von rpS6 trägt zur Ausbildung von Translations-Initiations-Komplexen und Polysomen bei und wird folglich gewöhnlich als ein Marker für aktive Translation verwendet (Susor et al. 2015; Mayer et al. 2014; Fumagalli u. Thomas 2000; Peterson u. Schreiber 1998; Brown u. Schreiber 1996; Duncan u. McConkey 1982). Darüber hinaus phosphoryliert S6K auch eIF4B, das die Helikase-Aktivität von eIF4A verstärkt (Abb.7), und stimuliert so die eIF4B-Funktion (Thoreen 2013; Shahbazian et al. 2006; Wang u. Proud 2006; Holz et al. 2005; Raught et al. 2004). Da eIF4B auch ein Zielmolekül von p90 RSK, einem Effektor des MAPK-Signalweges, ist, stellt es einen Konvergenzpunkt zweier bedeutender Signalwege dar (Thoreen 2013; Shahbazian et al. 2006). Ein weiteres Target von S6K ist das programmed cell death protein 4 (PDCD4). Dieses Protein wirkt inhibitorisch auf eIF4A und wird nach Phosphorylierung durch S6K abgebaut (Thoreen 2013; Dennis et al. 2012; Sonenberg u. Hinnebusch 2007; Dorrello et al. 2006; Abb.7). Somit kann mTorc1 auf verschiedenen Wegen die Aktivität von eIF4A zusätzlich steigern (Thoreen 2013). Zudem ist neben der Ausbildung des eIF4F-Komplexes auch diese durch mTorc1-medierte Phosphorylierung von eIF4B und PDCD4 essentiell, um den Erhalt der Ge-

Literatur

samt-Proteinsyntheseraten zu gewährleisten (Dennis et al. 2012). mTor c1 phosphoryliert außerdem auch eIF4G (Thoreen 2013; Sonenberg u. Hinnebusch 2009; Harris et al. 2006; Hay u. Sonenberg 2004).

mTorc2 phosphoryliert und aktiviert Akt, das dann wiederum mTorc1 aktiviert, und PKC (Mayer et al. 2014; Treins et al. 2010; Alessi et al. 2009; Ikenoue et al. 2008; Sarbassov et al. 2006; Abb.7).

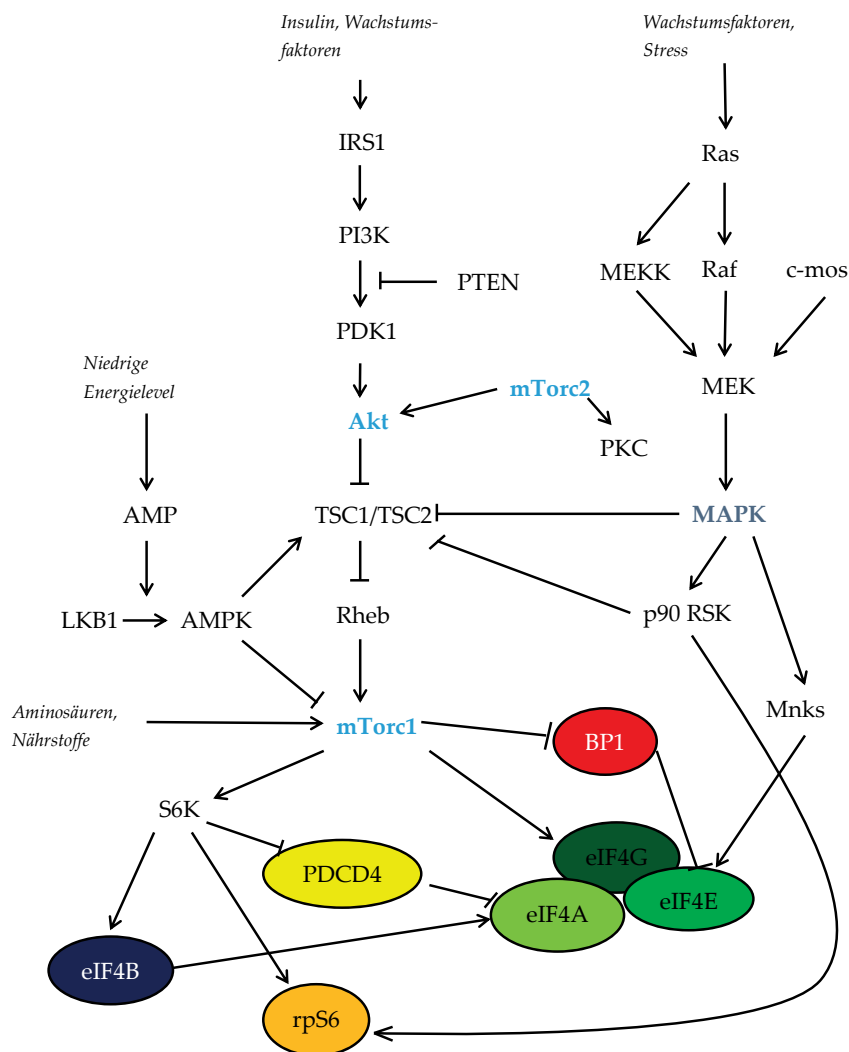


Abb.7: Überblick über intrazelluläre Signalkaskaden, die die Translation steuern (nach Jewell u. Guan 2013; Roux u. Topisirovic 2012; Foster u. Fingar 2010; Yang u. Guan 2007; Wullschlegler et al. 2006; Seeger u. Krebs 1995): Die Translation wird auf komplexe Art und Weise durch verschiedene Signalkaskaden wie den PI3K/Akt/mTor- oder den MAPK-Signalweg über Translationsfaktoren wie eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) und Signalmoleküle wie eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (BP1) reguliert.

AMP: Adenosinmonophosphat; AMPK: AMP-activated kinase; IRS-1: insulin receptor substrate-1; LKB1: liver kinase B1; MAPK: mitogene activated protein kinase; MEK: mitogene activated Erk activating kinase; MEKK: MEK Kinase; Mnk: MAPK integrating kinase; mTor: mechanistic target of rapamycin; mTorc1/2: mTor complex 1/2; p90 RSK: p90 ribosomal S6 kinase; PDCD4: programmed cell death protein 4; PDK1: 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1; PI3K: phosphoinositide 3-kinase; PKC: Proteinkinase C; Raf: rapidly accelerated fibrosarcoma 1; Ras: rat sarcoma; Rheb: Ras homolog enriched in brain; rpS6: ribosomal protein S6; S6K: ribosomal protein S6 kinase; TSC: tuberous sclerosis complex.

Literatur

Neben der Proteinsynthese, dem Zellwachstum und der Zellproliferation kontrolliert mTorc1 auch Prozesse wie die Autophagie, die Ribosomenbiogenese, die Transkription und den Zellmetabolismus (Kogasaka et al. 2013; Liu et al. 2013; Zoncu et al. 2011; Wullschleger et al. 2006; Harris u. Lawrence 2003). Die Hauptfunktionen von mTorc2 sind dagegen die Regulierung des Zellüberlebens und die Organisation des Aktin-Zytoskeletts (Liu et al. 2013; Zoncu et al. 2011; Ballou u. Lin 2008; Yang u. Guan 2007; Jacinto et al. 2004). So aktiviert mTorc2 zusammen mit mTorc1 kleine GTPasen wie RhoA, Rac1 und Cdc42, die eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Aktin-Zytoskeletts spielen (Lee et al. 2012; Liu et al. 2010; Heasman u. Ridley 2008).

Während der Oozytenreifung ist mTor an der Spindelbildung und -migration und an der asymmetrischen Zellteilung mit Ausschleusung des ersten Polkörpers beteiligt (Kogasaka et al. 2013; Lee et al. 2012; Yan-Chang u. Cai-Rong 2009). Dabei reguliert mTorc1 vermutlich die Bildung und die Funktion der meiotischen Spindel, während mTorc2 wahrscheinlich die Migration der meiotischen Spindel kontrolliert und einen Beitrag zur Aktin-abhängigen asymmetrischen Teilung leistet (Kogasaka et al. 2013). Die Ergebnisse einer Studie an Mauseizellen legen nahe, dass der mTor-Signalweg während der Eizellreifung die globale Proteinsynthese kaum beeinflusst, sondern die Translation einer Untergruppe von mRNAs reguliert, die für spezifische Proteine kodieren, die für eine normale Spindelfunktion und für die ordnungsgemäße Aufteilung der Chromosomen benötigt werden (Susor et al. 2015). Während der Maturation von Rindereizellen verändert sich die vorhandene Menge an mTor und Raptor nicht, während Rictor im GV-Stadium in geringen Mengen und im M II-Stadium in großen Mengen vorliegt. Die Phosphorylierung von mTor (Ser2448) und Rictor (Thr1135) ist im GV-Stadium niedrig und steigt zum M II-Stadium hin an, bei Raptor (Ser792) ist es umgekehrt (Mayer et al. 2014). Wenn man davon ausgeht, dass die Phosphorylierung von Raptor und Rictor den jeweiligen Komplex inhibiert (Treins et al. 2010; Dibble et al. 2009; Shaw 2009; Gwinn et al. 2008), lässt sich folgern, dass mTorc1 im GV-Stadium inaktiv und im M II-Stadium aktiv ist, während mTorc2 im GV-Stadium aktiv und im M II-Stadium inaktiv ist (Mayer et al. 2014).

Eine Studie an Mauseizellen ergab, dass mTor, Raptor und Rictor jeweils bestimmte Verteilungsmuster innerhalb der Eizelle zeigen. Dabei teilen mTor, phosphoryliertes mTor (an Ser2448 und Ser2481) und Raptor eine ähnliche mit dem Spindelapparat und den Chromosomen assoziierte Lokalisation, während Rictor im M I-Stadium um die Pole der meiotischen Spindel und im M II-Stadium ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert ist (Kogasaka et al. 2013). Auch andere Studien an Mauseizellen bestätigen eine bevorzugte Assoziierung von mTor mit den Chromosomen und der meiotischen Spindel (Susor et al. 2015; Lee et al. 2012; Yan-Chang u. Cai-Rong 2009).

2.1.2.2.2 4E-BP1

Die 4E-BP-Familie umfasst BP1, BP2 und BP3. Diese Proteine sind untereinander homolog, wobei die zentrale Region der Moleküle, die das eIF4E-Bindungsmotiv enthält, die höchste Homologie aufweist (Wollenhaupt et al. 2012; Gingras et al. 2001b; Poulin et al. 1998). Das am besten charakterisierte Mitglied der 4E-BP-Familie ist BP1 (Shang et al. 2012), das auch phosphorylated heat- and acid-stable protein regulated by insulin I (PHAS I) genannt wird (Duncan u. Song 1999). Der Wirkungsmechanismus dieses eIF4E-bindenden Proteins wird weiter oben im Text erläutert (siehe 2.1.2.1.12).

BP1 wird auf komplexe hierarchische Weise an mehreren Stellen phosphoryliert (Mayer et al. 2014; Beugnet et al. 2003; Wang et al. 2003; Gingras et al. 2001a; Mothesatney et al. 2000a; Gingras et al. 1999b). Dabei sind bislang sieben Serin/Threonin Phosphorylierungsstellen bekannt, nämlich Thr 37, Thr46, Ser65, Thr70, Ser83, Ser101 und Ser112 (Romasko et al. 2013; Abb.8). Die Phosphorylierung an Thr37/46 ist die Voraussetzung für die Phosphorylierung an den anderen Stellen (Mayer et al. 2014; Livingstone u. Bidinosti 2012; Gingras et al. 2001a; Gingras et al. 1999b). Aller Wahrscheinlichkeit nach ist Thr 46 die initiale Phosphorylierungsstelle (Livingstone u. Bidinosti 2012; Herbert et al. 2002). Danach erfolgt Phosphorylierung an Thr37, anschließend an Thr70, dann vermutlich an Ser101 und schließlich an Ser65, wobei jeder dieser Phosphorylierungsvorgänge notwendig ist für die jeweils anschließend stattfindenden Phosphorylierungen (Livingstone u. Bidinosti 2012; Wang et al. 2003; Gingras et al. 2001a).

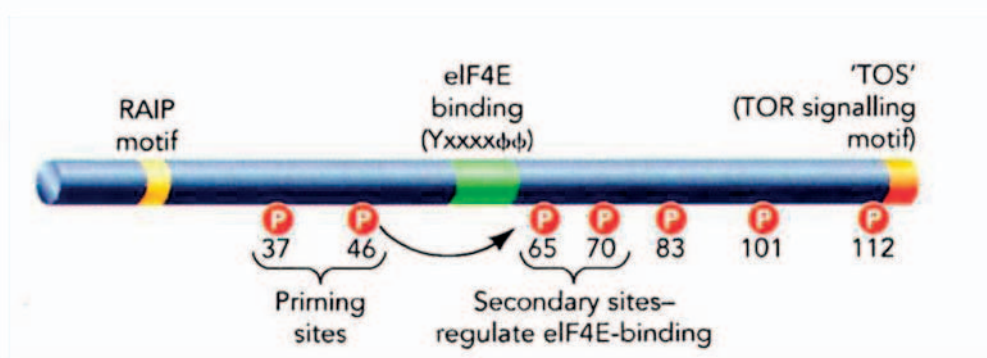


Abb.8: Schematische Darstellung von eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) (Wang u. Proud 2006): Dargestellt sind alle bekannten Phosphorylierungsstellen (P), das eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-Bindungsmotiv und die regulatorischen Motive RAIP und mTor signaling (TOS).

Literatur

Sowohl die BP1-Phosphorylierung an Thr37/46 als auch an Thr70 und Ser65 wird durch mTor reguliert (Mayer et al. 2014; Gingras et al. 2001a; Mothe-Satney et al. 2000a; Gingras et al. 1999b; Burnett et al. 1998).

Zwei Sequenzmotive, die in BP1 vorkommen, nämlich zum einen das in der Nähe des N-Terminus gelegene RAIP-Motiv und zum anderen die QFEMDI-Sequenz, die auch TOS-Motiv genannt wird und am extremen C-Terminus lokalisiert ist, sind unabdingbar für die Phosphorylierung von BP1. RAIP ist absolut notwendig für die Phosphorylierung an Thr37/46 und somit aufgrund des hierarchischen Ablaufs der BP1-Phosphorylierung auch für die Phosphorylierung an Ser65/Thr70, während TOS die Phosphorylierung an Ser65/Thr70 reguliert (Mayer et al. 2014; Wollenhaupt et al. 2012; Beugnet et al. 2003; Choi et al. 2003). Beide Motive binden mTor, allerdings interagiert Raptor als Teil des mTorc1-Komplexes zwar mit TOS, aber nicht mit RAIP (Mayer et al. 2014; Beugnet et al. 2003; Choi et al. 2003; Schalm et al. 2003). Durch seine Wirkung als Gerüstprotein, das TOS und damit BP1 mit mTor verbindet (Foster u. Fingar 2010), unterstützt Raptor folglich die über TOS medierte Phosphorylierung an Ser65/Thr70. Im Gegensatz dazu scheint die durch das RAIP-Motiv vermittelte Phosphorylierung an Thr37/46 unabhängig von einer Interaktion mit Raptor gesteuert zu werden (Beugnet et al. 2003).

Darüber hinaus ist allerdings auch von einer Beteiligung anderer Kinasen an der BP1-Phosphorylierung auszugehen (Yoon u. Roux 2013; Goggin et al. 2004). In vitro können verschiedene Kinasen BP1 phosphorylieren, darunter MAPK (Erk, p38), PKC und ATM (Gingras et al. 1999b; Fadden et al. 1997). MAPK phosphoryliert BP1 in vitro an Thr37/46, Thr70 und bevorzugt an Ser65 (Fadden et al. 1997). ATM spielt sowohl in vitro als auch in vivo eine Rolle bei der Phosphorylierung von BP1 an Ser112 (Yang u. Kastan 2000). Außerdem phosphoryliert die cdc2 Kinase bei somatischen Zellen BP1 an Thr70 (Heesom et al. 2001). Vor kurzem wurde gezeigt, dass BP1 bei somatischen Zellen zudem durch die glycogen synthase Kinase 3 β (GSK3 β) an Thr37/46 phosphoryliert wird (Shin et al. 2014; Yoon u. Roux 2013).

Um eine De novo-Bindung von BP1 an eIF4E zu verhindern, ist eine Phosphorylierung von BP1 an Thr37/46, genauer gesagt an Thr46, alleine ausreichend (Livingstone u. Bidinosti 2012; Mothe-Satney et al. 2000b; Yang et al. 1999; Burnett et al. 1998). Dagegen ist für eine Loslösung von bereits an eIF4E gebundenem BP1 vermutlich die Gesamtheit der hierarchischen Phosphorylierungsvorgänge, die schließlich zur Phosphorylierung von BP1 an Ser65 führen, notwendig (Livingstone u. Bidinosti 2012; Hay u. Sonenberg 2004; Gingras et al. 2001a). Dies würde auch die Beobachtung erklären, dass die Phosphorylierung von BP1 an Thr37/46 alleine keinen Einfluss auf die Dissoziation einer bereits bestehenden eIF4E-BP1-Bindung hat und dass an Thr37/46 phosphoryliertes BP1 im Komplex mit eIF4E an der Cap-Struktur gefun-

den werden kann (Livingstone u. Bidinosti 2012; Gingras et al. 1999b; Heesom u. Denton 1999).

Bei Rindereizellen hängt die Unterdrückung der eIF4E-Funktion im Gegensatz zu diversen somatischen Zellen ausschließlich von BP1 ab, da BP2 und BP3 nicht in ausschlaggebendem Maße exprimiert werden (Mayer et al. 2014). BP1 dagegen ist während der Maturation vom GV-Stadium bis zum M II-Stadium vorhanden (Smiljakovic et al. 2003; Tomek et al. 2002a). Dieses Signalmolekül wird während der Reifung von Rindereizellen nach und nach phosphoryliert. Im GV-Stadium ist BP1 hypophosphoryliert, im M I-Stadium mittelgradig phosphoryliert und im M II-Stadium vollständig phosphoryliert. Folglich ist im GV-Stadium eine vermehrte Bindung von BP1 an eIF4E zu beobachten, die die Ausbildung aktiver eIF4F-Komplexe verhindert, während im M II-Stadium die hyperphosphorylierten BP1-Formen nicht an eIF4E binden, was eine gesteigerte eIF4F-Bildung zur Folge hat (Mayer et al. 2014; Siemer et al. 2009). Sowohl bei Rindereizellen als auch bei Schweineeizellen können nur mit dem anti-Thr37/46 Antikörper robuste Signale erzeugt werden, die für Thr70 oder Ser65 spezifischen Antikörper ergeben nur schwache Banden, obwohl sie spezifisch sind (Mayer et al. 2014; Ellederova et al. 2006).

Bei Mauseizellen im M I-Stadium ist BP1 gleichmäßig im Zytoplasma verteilt, bei Eizellen im M II-Stadium zeigt es zudem eine Anreicherung an der meiotischen Spindel. Phosphoryliertes BP1 (an Thr 37/46, an Ser65 oder an Thr 70) ist bei Mauseizellen sowohl im M I- als auch im M II-Stadium bevorzugt um die Spindel-Chromosomen-Komplexe, die außerdem mit bestimmten mRNAs und Ribosomen assoziiert sind, lokalisiert (Susor et al. 2015; Romasko et al. 2013).

2.1.2.2.3 eIF4E

eIF4E ist für die Regulierung der Translationsinitiation einer der wichtigsten Faktoren (Susor et al. 2015; Ellederova et al. 2008; Sonenberg u. Gingras 1998), da es in der Zelle in limitierender Menge vorliegt und so ein attraktives Ziel der Translationskontrolle darstellt (Wollenhaupt et al. 2012; Ellederova et al. 2008). Dieses Signalmolekül ist ein allgemeiner Translations-Initiations-Faktor, der für die effiziente Cap-abhängige Translation aller zellulärer mRNAs notwendig ist (Topisirovic et al. 2011; Rhoads 2009; Sonenberg u. Hinnebusch 2009). Es bindet an die Cap-Struktur der mRNA und rekrutiert so andere Initiations-Faktoren und die kleine ribosomale Untereinheit an deren 5'-Ende (Rhoads 2009; Proud 2002; Scheper u. Proud 2002).

Die Aktivität von eIF4E kann auf verschiedenen Ebenen kontrolliert werden. Dies geschieht zum einen durch die eIF4E-Phosphorylierung an Ser209, hauptsächlich jedoch durch die Interaktion von eIF4E mit 4E-BPs (Wollenhaupt et al. 2011; Wollen-

Literatur

haupt et al. 2010; Ellederova et al. 2006). eIF4E wird von Mnk1 und Mnk2 an Ser209 phosphoryliert (Ellederova et al. 2006; Scheper et al. 2001; Pyronnet 2000; Waskiewicz et al. 1999). Die Mnks binden an eIF4G und werden so an eIF4E rekrutiert (Topisirovic et al. 2011; Pyronnet et al. 1999). Mnk1 und 2 können durch verschiedene MAPK-Signalwege (sowohl durch Erk1/2 als auch durch p38 MAPK) phosphoryliert und damit aktiviert werden (Ellederova et al. 2006; Ueda et al. 2004; Scheper et al. 2001; Scheper u. Proud 2002; Wang et al. 1998; Waskiewicz et al. 1997). Dabei zeigt Mnk1 eine niedrige basale Aktivität, die durch Faktoren, die entweder die Erk-Signalwege (Insulin, Wachstumsfaktoren) oder die p38 MAPK-Signalwege (Zytokine, Stress) aktivieren, stark erhöht werden kann (Ellederova et al. 2008; Scheper et al. 2001; Wang et al. 1998; Waskiewicz et al. 1997). Im Gegensatz dazu hat Mnk2 eine hohe basale Aktivität, die durch Erk/p38 MAPK-Signalgebung kaum verstärkt wird. Dies reflektiert vermutlich die Tatsache, dass phosphorylierte, aktive MAPK an Mnk2 aber nicht an Mnk1 stabil binden kann, was die kontinuierliche Aktivierung von Mnk2 verursacht (Stead u. Proud 2013; Ellederova et al. 2008; Parra et al. 2005; Ueda et al. 2004; Scheper et al. 2001). Somit ist Mnk1 verantwortlich für die induzierbare eIF4E-Phosphorylierung, während die basale Phosphorylierung von eIF4E weitgehend von Mnk2 abhängt (Ueda et al. 2004). Folglich wird die eIF4E-Phosphorylierung in Zellen, die hauptsächlich Mnk1 enthalten, durch die MAPK-Aktivität und durch die Ausbildung des eIF4F-Komplexes reguliert, wohingegen in Zellen, die vor allem Mnk2 enthalten, die Phosphorylierung von eIF4E primär durch die eIF4F-Komplexbildung gesteuert wird (Scheper u. Proud 2002).

Die Resultate mehrerer Studien an somatischen Zellen legen nahe, dass eine erhöhte eIF4E-Phosphorylierung direkt mit gesteigerten Translationsraten korreliert (Walsh u. Mohr 2004; Fraser et al. 1999; Pain 1996; Morley u. Pain 1995; Kaspar et al. 1990). Es gibt allerdings auch gegensätzliche Berichte, wonach vermehrte eIF4E-Phosphorylierung die Translationsraten nicht beeinflusst (Ueda et al. 2004; Saghir et al. 2001; Herbert et al. 2000) oder sogar eine Verringerung der Proteinsyntheseraten zur Folge hat (Knauf et al. 2001). Zudem kommen einige Studien zu dem Ergebnis, dass die Phosphorylierung von eIF4E für das Stattfinden von Proteinsynthese nicht benötigt wird (Morley u. Naegele 2002; Scheper u. Proud 2002; McKendrick et al. 2001). Allem Anschein nach hat die eIF4E-Phosphorylierung keinen Einfluss auf die Bindung von eIF4E an BP1 oder eIF4G (Morley u. Naegele 2002; Scheper et al. 2002; Scheper u. Proud 2002; Herbert et al. 2000) und ist für die eIF4F-Komplexbildung nicht erforderlich (Susor et al. 2008; Morley u. Naegele 2002; Scheper u. Proud 2002; McKendrick et al. 2001; Saghir et al. 2001), beeinflusst allerdings die Bindung von eIF4E an die Cap-Struktur (Ellederova et al. 2006; Slepnev et al. 2006; Scheper u. Proud 2002). Dies stimmt mit dem strukturellen Aufbau von eIF4E überein, da die

Region an der dorsalen Oberfläche von eIF4E, an die sowohl BP1 als auch eIF4G bindet, weit entfernt ist von Ser209, das sich in der Nähe der Cap-bindenden Tasche befindet (Ellederova et al. 2006; Scheper u. Proud 2002; Marcotrigiano et al. 1997). Entgegen früherer Annahmen (Marcotrigiano et al. 1997; Minich et al. 1994) bewirkt die Phosphorylierung von eIF4E eine Verringerung der Bindung von eIF4E an die Cap-Struktur, was vor allem durch eine gesteigerte Dissoziationsrate zustande kommt (Zuberek et al. 2003; Scheper et al. 2002; Scheper u. Proud 2002).

Scheper und Proud schlagen zwei Modelle vor, die beschreiben, welche Konsequenzen diese durch eIF4E-Phosphorylierung verursachte Ablösung von eIF4E von der Cap-Struktur für den Ablauf der Translation haben könnte. Eines dieser Modelle besagt, dass die eIF4E-Phosphorylierung dazu dient, die Ablösung von eIF4E von der Cap-Struktur zu steigern, sodass phosphoryliertes eIF4E mit geringerer Wahrscheinlichkeit mit der Cap-Struktur der gleichen mRNA assoziiert bleibt als unphosphoryliertes eIF4E. Nach diesem Modell ist das losgelöste eIF4E somit, nachdem es wieder dephosphoryliert wurde, für die Bindung an andere mRNAs verfügbar, was die Translation von mRNAs, die gewöhnlich wenig oder gar nicht translatiert werden, ermöglicht (Scheper u. Proud 2002). Daraus lässt sich schließen, dass weder der phosphorylierte noch der unphosphorylierte Faktor per se, sondern der Turnover der eIF4E-Phosphorylierung steigende Translationsraten bewirkt (Tomek u. Wollenhaupt 2012; Scheper u. Proud 2002). Dies stimmt auch mit Studien an somatischen Zellen überein, deren Resultate nahelegen, dass sehr hohe Level an phosphoryliertem eIF4E die Cap-abhängige Translation unter physiologischen Bedingungen behindern (Knauf et al. 2001).

Bei fast allen Eukaryoten werden mehrere eIF4E-Familienmitglieder exprimiert. Diese können verschiedene Funktionen in der Zelle haben. Manche sind an der Gesamttranslation beteiligt, während andere nur die Rekrutierung einer Subklasse von mRNA stimulieren und spezielle Funktionen, einschließlich Repression der Translation, ausüben (Rhoads 2009). Es wurde vorgeschlagen, dass es in jedem Organismus ein eIF4E-Familienmitglied gibt, das kontinuierlich und ubiquitär exprimiert wird und so die globale Proteinsynthese gewährleistet (Rhoads 2009; Hernández u. Vazquez-Pianzda 2005). Das gewöhnlich als eIF4E bezeichnete Protein ist eigentlich eIF4E-1 (Joshi et al. 2005; Joshi et al. 2004).

Neben den 4E-BPs existieren noch andere eIF4E-bindende Proteine wie 4E-T, Maskin oder Cup. Diese interagieren einerseits mit eIF4E und andererseits gleichzeitig auch mit mRNA-bindenden Proteinen wie CPEB oder Smaug, die wiederum mit spezifischen Sequenzmotiven in der 3'-UTR bestimmter mRNAs assoziiert sind. Die eIF4E-bindenden Proteine vermitteln auf diese Weise die Bindung von eIF4E an spezifische mRNAs. Manche dieser Proteine inhibieren die Translation, während andere mRNA-

Literatur

Abbau bewirken oder sogar die Translation verstärken (Nishimura et al. 2015; Kamenska et al. 2014; Rhoads 2009; Nelson et al. 2004; Stebbins-Boaz et al. 1999).

eIF4E liegt während der Maturation von Rindereizellen in nahezu unveränderter Menge vor (Siemer et al. 2009; Tomek et al. 2002a). Die Phosphorylierung dieses Faktors nimmt im Verlauf der Reifung immer mehr zu, dabei ist eIF4E im GV-Stadium zu etwa 95% unphosphoryliert und im M II-Stadium zu etwa 95% phosphoryliert (Mayer et al. 2014; Tomek u. Wollenhaupt 2012; Siemer et al. 2009; Tomek et al. 2002a).

Während der Maturation von Schweineezellen korreliert die eIF4E-Phosphorylierung stark mit der Aktivität von Erk1/2 und Mnk1. Sowohl die eIF4E-Phosphorylierung als auch die Aktivierung von Erk1/2 und Mnk1 beginnt zur Zeit des GVBD, nimmt nach und nach zu und zeigt schließlich im M II-Stadium ein Maximum. Im Gegensatz dazu nimmt die Aktivität von p38 MAPK gegen Ende der Reifung ab und die Aktivität von Mnk2 ändert sich im Verlauf der Maturationsphase nicht. Daraus wurde abgeleitet, dass die Phosphorylierung von eIF4E während der Reifung von Schweineezellen durch Erk1/2 über Mnk1 reguliert wird und dass p38 MAPK nicht an der Phosphorylierung von eIF4E beteiligt ist (Ellederova et al. 2008). Auch während der Maturation von Rindereizellen lässt sich eine hohe Korrelation zwischen der eIF4E-Phosphorylierung und der Aktivierung von Erk1/2 beobachten. Beide beginnen mit Einsetzen des GVBD, steigen an und erreichen im M II-Stadium maximale Werte (Tomek et al. 2002a).

Die Vermutung, dass der Turnover der eIF4E-Phosphorylierung der entscheidende Faktor bei der Steigerung der Translationsraten ist, wird durch die Ergebnisse von Studien an Rinder- und Schweineezellen bekräftigt. Unphosphoryliertes eIF4E, das im GV-Stadium vorliegt und der komplett phosphorylierte Faktor im M II-Stadium ergeben nämlich beide nur niedrige, basale Translationsraten. Zur Zeit des GVBD und im M I-Stadium, wenn nur eine Teilmenge des Faktors phosphoryliert ist, kommt es dagegen zu einer deutlichen Stimulation der Proteinsynthese (Tomek u. Wollenhaupt 2012; Siemer et al. 2009; Ellederova et al. 2006; Tomek et al. 2002a; Tomek et al. 2002b).

Eine Studie an Mauseizellen ergab, dass eIF4E bei Eizellen im M I-Stadium bevorzugt um die Chromosomen herum lokalisiert ist. Auch für phosphoryliertes eIF4E lässt sich eine fokale Anreicherung um die Chromosomen-Spindel-Komplexe beobachten (Susor et al. 2015).

2.3 Bei der Maturation von Eizellen eingesetzte inhibitorisch wirkende Stoffe

Eine Vielzahl an Inhibitoren wurde bereits während der Oozytenreifung angewendet, um weitere Erkenntnisse insbesondere bezüglich molekularer Vorgänge im Verlauf der Reifung zu erlangen (Tab.2).

Tab.2: Wirkung verschiedener bei der Maturation von Eizellen verwendeter Inhibitoren: Aufgeführt sind Auswirkungen auf die Aktivität für das Fortschreiten der Meiose bedeutender Proteinkinase und auf den Ablauf der meiotischen Endreifung, die sich bei Anwendung bestimmter Inhibitoren bei Eizellen verschiedener Spezies zeigen.

| Inhibitor | Anwendung bei | Auswirkungen | Quelle |
|--|------------------------------|---|---|
| BL I (Cdc2-Kinase-Inhibitor) | Rinder- u. Schweine-Eizellen | Inhibierung der Cdc2-Kinase- und MAPK-Aktivität und der eIF4E-Phosphorylierung Arretierung der Eizellen im GV-Stadium unter Bildung hoch kondensierter Chromosomen-Bivalente innerhalb der intakten Germinal-Vesikel | Ellederova et al. 2008; Bhojwani et al. 2006; Tomek et al. 2002a; Kubelka et al. 2000 |
| Roscovitine (Cdc2-Kinase-Inhibitor) | Rindereizellen | Inhibierung der Cdc2-Kinase- und MAPK-Aktivität Arretierung der Eizellen im GV-Stadium | Vigneron et al. 2004; Lonergan et al. 2003 |
| | Mauseizellen | Inhibierung der hemmenden Phosphatase 1-Phosphorylierung Arretierung der Eizellen im GV-Stadium | Wang et al. 2004 |
| OA (Phosphatase 1 u. 2a-Inhibitor) | Rindereizellen | Erhöhung der Cdc2-Kinase- und MAPK-Aktivität Frühzeitige Phosphorylierung von eIF4E | Tomek et al. 2002a; Kubelka et al. 2000 |
| PD 098059 (MEK-Inhibitor) | Rindereizellen | Verspätetes Einsetzen der Cdc2-Kinase- und MAPK-Aktivierung, der eIF4E-Phosphorylierung und des GVBD, dennoch keine Beeinflussung der Weiterentwicklung zur M II-Phase | Tomek et al. 2002a |
| | Schweineeizellen | Dauerhafte Inhibierung der Cdc2-Kinase- und MAPK-Aktivität Arretierung der meisten Eizellen in ihrer Entwicklung | Meinecke u. Krischek 2003 |
| U0126 (MAPK-Inhibitor) | Mauseizellen | Vollständige Inhibierung der MAPK-Phosphorylierung Keine Beeinflussung des Einsetzens des GVBD, dennoch keine Weiterentwicklung zur M I-Phase Bei Behandlung nach GVBD: Abnormale Spindelbildung und Chromosomen-Segregation bei normaler Polkörper-Extrusion und ungestörten Aktin-Dynamiken | Lee et al. 2007 |
| SH6 (Akt-Inhibitor) | Rindereizellen | Spezifische Reduzierung der Akt-Aktivität Arretierung von ca. 60% der Eizellen im M I-Stadium | Tomek u. Smiljakovic 2005 |
| | Schweineeizellen | Verringerung der Akt-Aktivität Arretierung in der M I-Phase | Kalous et al. 2009 |
| Cycloheximid (Inhibitor der Proteinbiosynthese) | Rindereizellen | Je nach Zeitpunkt der Zugabe zum Reifungsmedium Arretierung im GV/GVBD-Stadium, im Stadium der Chromatin-Kondensation oder im M I-Stadium | Sirard et al. 1989 |
| | Mauseizellen | Keine Beeinflussung des GVBD aber Beeinflussung der darauffolgenden Spindelbildung | Hashimoto u. Kishimoto 1988 |
| ALLN/MG-132 (Inhibitoren des Ubiquitin-Proteasom-Signalwegs) | Mauseizellen | Inhibierung der M I-Spindelbildung und des CyclinB1-Abbaus, der normalerweise während des Metaphase-Anaphase-Übergangs stattfindet | Huo et al. 2004 |
| BIMI (PKC-Inhibitor) | Mauseizellen | Förderung des Einsetzens der Ana I-Phase | Viveiros et al. 2004 |
| Brefeldin A (Inhibitor der Golgi-basierten Membran-fusion) | Mauseizellen | Inhibierung der asymmetrischen Positionierung des M I-Spindels und der Polkörperbildung | Wang et al. 2008 |

2.4 Rapamycin

Rapamycin (Abb.9), das auch als Sirolimus bezeichnet wird, ist ein von *Streptomyces hygroscopicus* isoliertes makrozyklisches Antibiotikum, das entscheidend zum Verständnis der mTor-Funktionen beigetragen hat (Liu et al. 2013; Ballou u. Lin 2008; Gingras et al. 2001b; Sabatini et al. 1994). Voraussetzung für eine effektive Wirkung dieses mTor-Inhibitors ist die Komplexbildung mit dem intrazellulären Rezeptor FK 506-binding protein 12 (FKBP 12). Der FKBP 12-Rapamycin-Komplex bindet an die FKBP 12-Rapamycin-Bindungs-(FRB)Domäne von mTor (Liu et al. 2013; Livingstone et al. 2010; Ballou u. Lin 2008; Choi et al. 1996; Brown et al. 1994). Zwar kann Rapamycin auch ohne Assoziation mit FKBP 12 an die FRB-Domäne binden, allerdings geschieht dies mit deutlich geringerer Affinität und hat unter physiologischen Bedingungen wenig Auswirkungen (Ballou u. Lin 2008; Banaszynski et al. 2005).

FKBP 12/Rapamycin interagiert mit mTorc1, nicht aber mit mTorc2 (Sarbassov et al. 2006; Sarbassov et al. 2004), wobei der genaue molekulare Wirkmechanismus dieses inhibitorischen Komplexes bislang unklar ist (Foster u. Fingar 2010; Oshiro et al. 2004). Manche vermuten, dass durch Rapamycin induzierte Veränderungen der FRB-Domäne einen allosterischen Einfluss auf die katalytische Domäne ausüben könnten (Ballou u. Lin 2008; MacMahon et al. 2002), allerdings herrscht Uneinigkeit bezüglich der Auswirkungen von Rapamycin auf die mTor-Kinase-Aktivität (Soliman et al. 2010; Gingras et al. 2001b; Peterson et al. 2000; Scott et al. 1998). Im Gegensatz dazu legen einige andere Studien nahe, dass Rapamycin mTorc1 durch Destabilisierung der mTor-Raptor-Verbindung inhibiert (Oshiro et al. 2004; Hara et al. 2002; Kim et al. 2002).

Es wurde lange angenommen, dass durch Rapamycin die mTorc2-Funktionen nicht, die mTorc1-Funktionen aber vollständig inhibiert werden (Patursky-Polischuk et al. 2009; Sarbassov et al. 2006). Dies wurde durch Studien unterstützt, die ergaben, dass Rapamycin die Phosphorylierung von S6K und von BP1, den Hauptsubstraten von mTorc1, verhindert (Herbert et al. 2000; Jefferies et al. 1997; Beretta et al. 1996; Kuo et al. 1992). Spätere Studien, in denen eine neue Klasse ATP-kompetitiver mTor-Inhibitoren verwendet wurde, offenbarten allerdings, dass viele mTorc1-Funktionen in Wirklichkeit Rapamycin-resistent sind (Feldman et al. 2009; Thoreen et al. 2009). Auch andere Untersuchungen bekräftigen diese Resultate, die besagen, dass zwar die S6K-Phosphorylierung und die BP1-Phosphorylierung an Ser65/Thr70 Rapamycin-sensitiv sind, die Phosphorylierung von BP1 an Thr37/46 jedoch durch Rapamycin kaum beeinflusst wird (Feldman et al. 2009; Thoreen et al. 2009; Fan et al. 2006; Wang et al. 2005; McMahon et al. 2002; Mothe-Satney et al. 2000a; Gingras et al. 1999b). Es wird außerdem berichtet, dass bei manchen Zelltypen durch verlängerte

Literatur

Rapamycin-Behandlung (für 24 Stunden) die S6K-Phosphorylierung kontinuierlich gehemmt wird, während die BP1-Phosphorylierung (Thr37/46, Ser65 und Thr70) nur vorübergehend in den ersten Stunden unter Rapamycin-Einfluss inhibiert wird, so dass schon nach 12 Stunden eine nahezu vollständige Rephosphorylierung von BP1 beobachtet werden kann (Choo u. Blenis 2009; Choo et al. 2008). Einige andere Studien kommen zu dem Ergebnis, dass, obwohl Rapamycin keine akuten Effekte auf die mTorc2-Funktion ausübt, eine verlängerte Rapamycin-Behandlung (für 24 Stunden) die mTorc2-Aktivität durch Destabilisierung der mTorc2-Komplexbildung inhibiert (Zeng et al. 2007; Sarbassov et al. 2006). Bei mehreren Zelltypen wurde zudem eine durch Rapamycin gesteigerte eIF4E-Phosphorylierung beobachtet (Wang et al. 2007; Goggin et al. 2004). Dabei erhöht Rapamycin sowohl die eIF4E-Phosphorylierung als auch die Mnk2-Aktivität, die Erk-Aktivität wird allerdings nicht beeinflusst. Der diesen Vorgängen zugrunde liegende Mechanismus ist bislang unbekannt (Eckerdt et al. 2014; Stead u. Proud 2013).

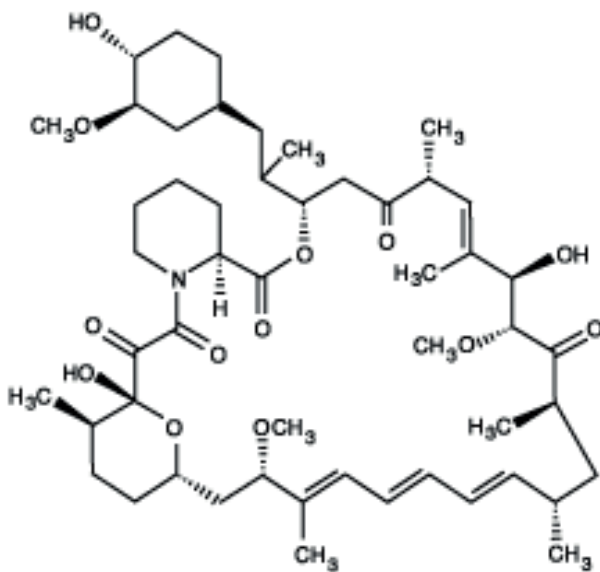


Abb.9: Strukturformel Rapamycin

Die meisten Erkenntnisse bezüglich der Wirkungsweise von Rapamycin wurden durch Versuche an somatischen Zellen gewonnen, im Gegensatz dazu existieren zur Anwendung von Rapamycin in Eizellen nur wenige Berichte. Während der Maturation von *Xenopus*-Eizellen hemmt Rapamycin (2 nM) die S6K-Aktivierung, die rpS6-Phosphorylierung wird aber nicht signifikant beeinflusst (Schwab et al. 1999). Bei der In-vitro-Maturation von Schweineeizellen wird durch Rapamycin (1 nM) die Autophagie induziert, was sowohl zu einer verbesserten nukleären als auch zu einer verbesserten zytoplasmatischen Reifung führt (Lee et al. 2015; Song et al. 2014). Die Be-

handlung von Mauseizellen mit Rapamycin in einer Konzentration von 100 nM bewirkt eine signifikante Abnahme der Phosphorylierung von BP1 an Thr70, eine geringgradige Verringerung der S6K-Phosphorylierung und schwere Fehler bei der Chromosomen-Aufteilung und bei der Ausbildung der Spindel. Bei behandelten Eizellen können dennoch sowohl eine Weiterentwicklung durch die M I-Phase hindurch als auch eine Polkörper-Extrusion beobachtet werden (Susor et al. 2015). Eine weitere Studie an Mauseizellen, bei der jedoch eine deutlich höhere Rapamycin-Konzentration (10 μ M) verwendet wurde, ergab, dass Rapamycin in dieser Konzentration eine Inhibierung der Spindel-Migration und der asymmetrischen Teilung der Eizellen (einschließlich der Ausschleusung des ersten Polkörpers) zur Folge hat (Lee et al. 2012). Während der Maturation von Rindereizellen werden weder nukleare Reifungsvorgänge wie das Fortschreiten der Eizellen zur M II-Phase noch zytoplasmatische Reifungsvorgänge wie die Phosphorylierung von BP1 (Thr37/46) und eIF4E durch verschiedene Rapamycin-Konzentrationen (100 nM-1 μ M) beeinflusst (nicht veröffentlichte Daten).

2.5 ATP-kompetitive Active-Site-mTor-Inhibitoren

Im Gegensatz zu Rapamycin binden Active-Site-Inhibitoren wie PP242 und Torin1 direkt an die ATP-Bindungsstelle in mTor, hemmen so die katalytische Aktivität sowohl von mTorc1 als auch von mTorc2 und bewirken dabei anders als Rapamycin eine vollständige Inhibierung der mTorc1-Funktionen. So kommt es nach Behandlung somatischer Zellen mit ATP-kompetitiven Inhibitoren nicht nur zu einer starken Verringerung der Akt-Phosphorylierung sondern auch zur Unterdrückung der Rapamycin-resistenten BP1-Phosphorylierung an Thr37/46. Darüber hinaus wird auch die Phosphorylierung von BP1 an Ser65 deutlich stärker gehemmt als durch Rapamycin (Livingstone u. Bidinosti 2012; Feldman et al. 2009; Thoreen et al. 2009). Obwohl Active-Site-mTor-Inhibitoren die BP1-Phosphorylierung (an Thr37/46, Ser65 und Thr70), die S6K-Phosphorylierung und die eIF4F-Komplexbildung stark inhibieren und eine vermehrte BP1-eIF4E-Komplexbildung verursachen, verhindern sie nur die Translation einer kleinen Subgruppe aller zellulären mRNAs, zu der beispielsweise die CyclinD3-mRNA gehört. Die Translation der großen Mehrheit der zellulären mRNAs, die für Housekeeping-Proteine kodieren, wird dagegen nicht beeinflusst. Daraus lässt sich ableiten, dass die mTor-Signalkaskade nicht für alle mRNAs von gleich großer Bedeutung ist (Dowling et al. 2010).

Torin2 (Abb.10) ist ein potenter und selektiver ATP-kompetitiver mTor-Inhibitor, der wie andere Active-Site-Inhibitoren auch sowohl die mTorc1- als auch die mTorc2-Aktivität unterdrückt und daher neben der S6K-Phosphorylierung auch die Akt-

Literatur

Phosphorylierung und die Phosphorylierung von BP1 an Thr37/46 inhibiert. In einigen somatischen Zelllinien werden die mTor-Funktionen durch eine Torin2-Konzentration von 100 nM effektiv gehemmt (Liu et al. 2013). Torin2 wurde 2014 in einer Studie zur In-vitro-Maturation von Rindereizellen zum ersten Mal bei Eizellen angewendet. Diese ergab, dass die inhibitorische Wirkung von Torin2 auf Rindereizellen bei einer Konzentration von 3 μ M am größten ist und dass nach 24-stündiger Reifung durch Torin2 in dieser Konzentration 60% der Eizellen im M I-Stadium arretiert werden, während 20-30% trotz Torin2-Behandlung das M II-Stadium erreichen. Weiterhin zeigte sich, dass Torin2 die vorhandene Menge an mTor, Raptor und Rictor, die MAPK-Aktivität und die eIF4E-Phosphorylierung, die Substratphosphorylierung von PKA, PKC und ATM/ATR und die Phosphorylierung von mTor, Raptor und Rictor nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu wurde eine Verringerung der BP1-Phosphorylierung (Thr37/46) um etwa 60%, eine gesteigerte BP1-eIF4E-Komplexbildung und eine Reduktion der Akt-Substratphosphorylierung beobachtet. Es wurde gefolgert, dass diese Veränderungen vermutlich für den Torin2-medierten M I-Arrest ursächlich sind (Mayer et al. 2014).

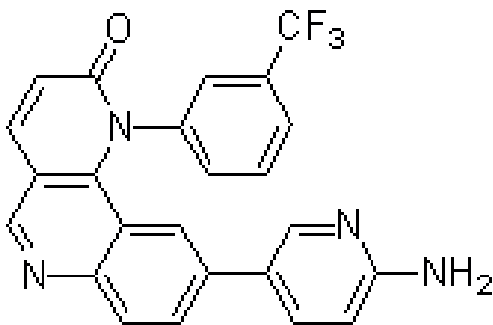


Abb.10: Strukturformel Torin2

3 Zielstellung

Die In-vitro-Maturation von Rindereizellen ist ein wesentlicher Bestandteil der In-vitro-Produktion von Rinderembryonen. Für einen ungestörten Ablauf der Maturation (insbesondere der zytoplasmatischen Reifung) ist die in der Eizelle stattfindende Proteinsynthese von entscheidender Bedeutung. Dabei spielt vor allem auch eine exakte Regulierung dieser Proteinsynthese (Translationskontrolle), an der der mTor-Signalweg maßgeblichen Anteil hat, eine wichtige Rolle.

Rapamycin und Torin2 sind mTor-Inhibitoren mit unterschiedlicher Wirkungsweise, die bereits in Versuchen an Eizellen Verwendung fanden. In einer vorangegangenen Studie wurde festgestellt, dass Torin2 einen effektiven und spezifischen inhibitorischen Einfluss auf die Maturation von Rindereizellen hat. Daraus wurde gefolgert, dass Torin2 ein Wirkstoff ist, der in weiterführenden Nachforschungen zur Vertiefung der Erkenntnisse bezüglich der während der Maturation stattfindenden Proteinsynthese eingesetzt werden kann. Da der hemmende Effekt bei einer Konzentration von 3 μM in dieser Studie am höchsten war, wurde diese Konzentration bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen ebenfalls verwendet. Obwohl Rapamycin in der erwähnten Studie an Rindereizellen keinerlei Auswirkungen zeigte, wurde es in den hier vorgestellten Versuchen dennoch nochmals bei Rindereizellen angewendet, wobei aber eine deutlich höhere Rapamycin-Konzentration (10 μM) verwendet wurde. Dies liegt darin begründet, dass Rapamycin in dieser hohen Konzentration in einer Studie an Mauseizellen deutliche Effekte auf die Eizellreifung gezeigt hatte. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten durch die Verwendung dieser verschiedenen mTor-Inhibitoren (Rapamycin und Torin2) somit weitere Erkenntnisse über Translation und Translationskontrolle während der Maturation von Eizellen gewonnen werden. Ein langfristiges Ziel solcher Nachforschungen wäre die Möglichkeit, die Erfolgsraten der IVP beim Rind zu verbessern.

Konkret sollten folgende Hypothesen überprüft/bestätigt werden:

- Rapamycin in einer Konzentration von 10 μM inhibiert die asymmetrische Zellteilung einschließlich der Ausschleusung des ersten Polkörpers auch bei Rindereizellen. Eine derartige Wirkung von Rapamycin in dieser Konzentration auf Mauseizellen ist bereits bekannt. Im Falle einer Bestätigung dieser Hypothese sollten die diesem Effekt zugrunde liegenden molekularbiologischen Veränderungen ermittelt werden.
- Mit Torin2 behandelte Eizellen besitzen die Fähigkeit, sich zu Blastozysten weiterzuentwickeln.

Eine vorangegangene Studie ergab, dass 70-80% der mit Torin2 (3 μM) behandelten Eizellen in der M I-Phase arretiert werden. Zwanzig bis dreißig Prozent entwickeln

Zielstellung

sich auch unter Torin2-Einfluss bis zur M II-Phase weiter. Die möglichen Auswirkungen dieser Inhibierung durch Torin2 auf die Blastozystenrate sollten im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden.

- Auch bei Rindereizellen spielt nicht nur die zeitliche, sondern ebenso die räumliche Regulierung der Translation eine Rolle für den Ablauf der Maturation.

Es existieren diesbezüglich bereits Studien an Mauseizellen. Sollte diese Hypothese zutreffen, könnten Erkenntnisse darüber, welche mRNAs im Verlauf der Maturation an bestimmten Lokalisationen innerhalb der Eizelle bevorzugt translatiert werden, dazu beitragen, Informationen über Proteine, die für bestimmte Abschnitte der Eizelreifung eine wichtige Rolle spielen, zu gewinnen.

4 Material und Methoden

4.1 Übersicht über die Versuchsaufteilung

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen lassen sich in 4 Versuchsabschnitte untergliedern (Abb.11). Die im Folgenden beschriebene Gewinnung, Klassifizierung und Reifung der Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) bildet dabei die Grundlage für jeden dieser Versuchsabschnitte.

In Abschnitt 1 wurde jeweils eine mit Rapamycin (10 μ M) behandelte Gruppe von Eizellen und eine Kontrollgruppe unbehandelter Eizellen (jeweils annähernd 100 Eizellen) nach 24-stündiger Reifung fixiert, angefärbt und anhand der Chromatinkonfiguration morphologisch beurteilt. Dieser Versuch wurde dreimal durchgeführt.

Versuchsabschnitt 2 setzt sich aus zwei Teilen zusammen. Der eine Teil umfasst dabei die Fixierung, Färbung und morphologische Beurteilung jeweils einer mit Torin2 (3 μ M) behandelten Gruppe von Eizellen und einer unbehandelten Kontrollgruppe nach 24-stündiger Reifung, während der andere Teil die Fertilisation und Kultivierung jeweils einer mit Torin2 (3 μ M) behandelten Eizellgruppe und einer unbehandelten Kontrollgruppe mit anschließender Bestimmung der Blastozystenrate beinhaltet. Dafür wurden die für 24 Stunden mit bzw. ohne Torin2 gereiften Eizellen nach der Maturation so aufgeteilt, dass insgesamt für einen Versuchsdurchgang 4 Eizellgruppen gesondert beurteilt werden konnten (Kontrolle 24h, morphologische Auswertung; Torin2 24h, morphologische Auswertung; Kontrolle 24h, Beurteilung der Blastozystenrate; Torin2 24h, Beurteilung der Blastozystenrate). Es wurden 4 Versuchsdurchgänge durchgeführt. Für die morphologische Auswertung wurden in jedem Versuchsdurchgang pro Versuchsgruppe (Kontrolle 24h; Torin2 24h) jeweils ca. 50 Eizellen, für die Beurteilung der Blastozystenrate in jedem Versuchsdurchgang pro Versuchsgruppe (Kontrolle 24h; Torin2 24h) durchschnittlich 100 Eizellen untersucht.

Für Versuchsabschnitt 3 (biochemische Analysen) und Versuchsabschnitt 4 (Immunhistochemische Analysen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie) wurden sowohl unreife Eizellen (Kontrolle 0h) als auch gereifte Eizellen (Kontrolle 24h, Rapamycin 10 μ M 24h, Torin2 3 μ M 24h) verwendet. Im Rahmen der biochemischen Analysen, die Western-Blots zur Untersuchung der Substratphosphorylierung verschiedener Kinasen ausgenommen, wurden für jeden Antikörper pro Versuchsgruppe (Kontrolle 0h, Kontrolle 24h, Rapamycin 10 μ M 24h, Torin2 3 μ M 24h) jeweils 50 Eizellen untersucht. Für die Bestimmung der Substratphosphorylierung mittels Decca-Probe-Unit (ermöglicht eine zeitgleiche Analyse derselben Probe mit bis zu 10 verschiedenen Antikörpern) wurden pro Versuchsgruppe (Kontrolle 0h, Kontrolle

Material und Methoden

24h, Rapamycin 10 μM 24h) je 150 Eizellen verwendet. Alle Untersuchungen mittels Western-Blot wurden zweimal wiederholt. Im Zuge der immunhistochemischen Analysen wurden für jeden Antikörper pro Versuchsdurchgang (es wurden 3 Versuchsdurchgänge durchgeführt) und Versuchsgruppe (Kontrolle 0h, Kontrolle 24h, Rapamycin 10 μM 24h, Torin2 3 μM 24h) jeweils ca. 5 Eizellen ausgewertet. Für die jeweiligen weiterführenden Untersuchungen (biochemische/immunhistochemische Analysen) wurden die gesammelten Eizellen der verschiedenen Versuchsgruppen ins Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, FBN Dummerstorf versandt. Alle anderen bereits erwähnten Versuche und Untersuchungen wurden im IVP-Labor des Besamungsvereins Neustadt an der Aisch (BVN) durchgeführt.

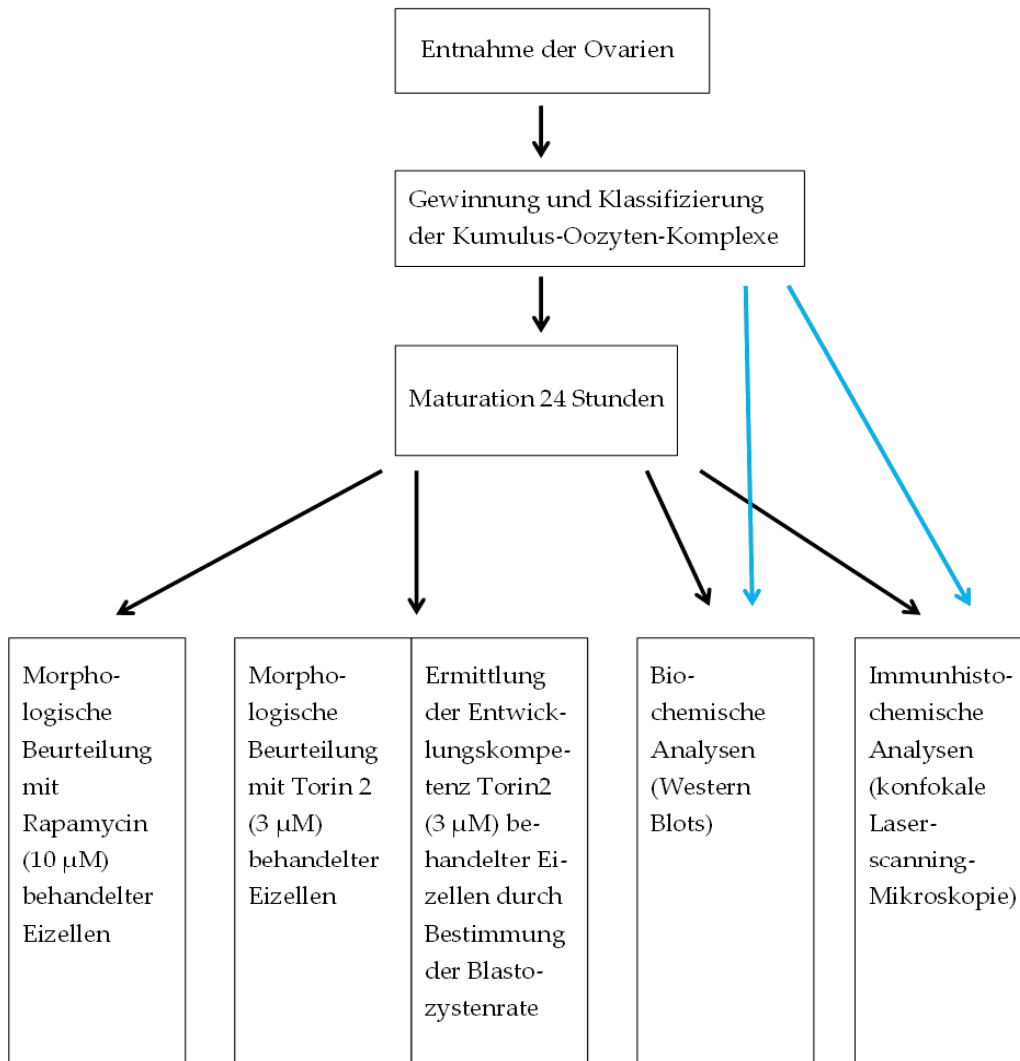


Abb.11 : Übersicht über die Versuchsaufteilung: In Versuchsabschnitt 1 (Morphologische Beurteilung mit Rapamycin 10 µM behandelte Eizellen) und Versuchsabschnitt 2 (Ermittlung der Entwicklungskompetenz Torin2 3 µM behandelte Eizellen mit gleichzeitiger Prüfung der hemmenden Wirkung von Torin2 in einer Konzentration von 3 µM) wurden für 24 Stunden mit Inhibitor (Rapamycin 10 µM 24h/Torin2 3 µM 24h) bzw. ohne Inhibitor (Kontrolle 24h; Dimethylsulfoxid (DMSO), das als Lösungsmittel für die Inhibitoren diente, wurde zugesetzt, DMSO-Konzentration im Reifungsmedium: 1,25 % v/v) gereifte Eizellen untersucht. Im Rahmen der Versuchsabschnitte 3 und 4 (biochemische und immunhistochemische Analysen) wurden neben den gereiften Eizellen (Rapamycin 10 µM 24h; Torin2 3 µM 24h; Kontrolle 24h, DMSO wurde dem Reifungsmedium wie in den Versuchsabschnitten 1 und 2 zugesetzt) zusätzlich auch unreife Eizellen (Kontrolle 0h) ausgewertet.

4.2 Entnahme der Ovarien

Die für die Versuche benötigten Eizellen wurden aus den Ovarien geschlachteter Kühe und Jungrinder gewonnen, wobei der Großteil der Spendertiere der Rasse Deutsches Fleckvieh angehörte und die Rassen Deutsche Schwarzbunte und Gelbvieh nur zu einem geringen Anteil vertreten waren. Die Entnahme der Eierstöcke erfolgte auf dem Schlachthof Erlangen etwa 20 Minuten nach der Schlachtung, unmittelbar nach dem Eröffnen der Bauchhöhle mit Hilfe einer chirurgischen Schere. Es wurden dabei ausschließlich Ovarien ohne erkennbare pathologische Veränderungen entnommen. Diese wurden sofort nach der Entnahme in ein mitgebrachtes Thermogefäß gefüllt mit auf 30-35°C temperierter physiologischer Kochsalz-Lösung verbracht und innerhalb von 3 Stunden zur weiteren Verarbeitung ins IVP-Labor des BVN Neustadt an der Aisch transportiert.

4.3 Gewinnung und Klassifizierung der KOK

Die Gewinnung der KOK erfolgte mittels Follikelpunktion. Dabei wurden alle Follikel mit einem Durchmesser von 3-8 mm mit Hilfe einer 5 ml Spritze (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) und aufgesetzter Kanüle (1,2 x 40 mm, Fa. Terumo Deutschland, Eschborn) punktiert. Die aspirierte Flüssigkeit wurde aus der Spritze vorsichtig und mit abgesetzter Kanüle, um die KOK nicht zu beschädigen, in ein Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden (50 ml, Fa. Greiner, Frickenhausen), das im Wasserbad (temperiert auf 37°C) warmgehalten wurde, gegeben.

Nach Beendigung der Follikelpunktion wurden die gefüllten Zentrifugenröhrchen aus dem Wasserbad genommen und für 10 Minuten stehen gelassen, um eine Sedimentation der gewonnenen KOK zu ermöglichen. Das Sediment wurde anschließend mit einer Pasteur-Pipette (7 ml, Fa. VWR, Darmstadt) aus den Röhrchen entnommen (viermalige Entnahme von jeweils ungefähr 5 ml pro Röhrchen) und in gerasterte Petrischalen mit einem Durchmesser von 90 mm (Fa. Greiner, Frickenhausen; Suchschalen) gegeben. Daraufhin wurde in jede Suchschale etwas warme (37°C) modifizierte Phosphat-gepufferte Salzlösung nach Dulbecco (D-PBS, Fa. Biochrom, Berlin) hinzugegossen und die Suchschalen wurden auf eine auf 33°C eingestellte Wärmeplatte (Fa. Minitube, Tiefenbach) überführt.

Mit Hilfe eines Stereomikroskops (Fa. Nikon, Düsseldorf) wurden die KOK bei 15-facher Vergrößerung aus den gerasterten Petrischalen in eine kleinere Petrischale (Durchmesser 35 mm, Fa. Greiner, Frickenhausen; Sammelschale), gefüllt mit 37°C warmer D-PBS-Lösung, transferiert. Zum Umsetzen der KOK wurde dabei wie auch für die nachfolgenden Schritte bis zum Einsetzen der KOK in die Maturationschalen

die Pipettierhilfe MicroClassic (Fa. Brand, Wertheim) in Kombination mit 20 µl Mikropipetten (Fa. Brand, Wertheim) verwendet.

Nach der Gewinnung der KOK wurde ein auf 45-fache Vergrößerung eingestelltes Stereomikroskop benutzt, um die KOK anhand der Qualität der Kumuluszellen und des Ooplasmas nach den von Leibfried und First (1979) aufgestellten Kriterien zu klassifizieren:

Tab.3: Klassifizierungsschema für Kumulus-Oozyten-Komplexe nach Leibfried und First (1979)

| | |
|----------|--|
| Klasse 1 | Oozyten mit dunklem, homogenem Zytoplasma und einem kompakten, mindestens fünflagigen Cumulus oophorus |
| Klasse 2 | Oozyten mit dunklem, homogenem Zytoplasma und einem kompakten Cumulus oophorus, der stellenweise weniger als fünf Lagen aufweist |
| Klasse 3 | Oozyten mit dunklem, homogenem Zytoplasma mit einem kompakten, mehrlagigen Cumulus oophorus mit leichter Zellexpansion |
| Klasse 4 | Oozyten mit voll expandiertem Cumulus oophorus |
| Klasse 5 | Oozyten mit dunklem oder degeneriertem Zytoplasma mit weniger als dreilagiger Kumuluszellschicht und denudierte Oozyten |

Für alle Versuche wurden ausschließlich KOK der Klassen 1-3 verwendet.

4.4 Maturation der Eizellen

Nach der Klassifizierung wurden die Eizellen dreimal in Reifungsmedium gewaschen und anschließend in Reifungsmedium, das mit Torin2- oder Rapamycin-Lösung bzw. mit Dimethylsulfoxid (DMSO; diente als Lösungsmittel für die Inhibitoren und wurde daher allen Kontrollgruppen zugegeben; die DMSO-Konzentration im Maturationsmedium der Kontrollgruppen betrug 1,25 % v/v) versetzt war, überführt. Als Reifungsmedium diente tissue culture medium 199 (TCM 199), dem vor Gebrauch bovine serum albumin (BSA; 3 mg/ml, Fa. Sigma, Taufkirchen) zugesetzt wurde.

Die ersten beiden Waschgänge erfolgten in je einer Petrischale (Durchmesser 35 mm, Fa. Greiner, Frickenhausen) gefüllt mit sterilfiltriertem Reifungsmedium. Für den dritten Waschgang und als Maturationsschalen wurden 4-Well-Multischalen (Fa. Nunc, Wiesbaden) verwendet. Dabei enthielten die Waschschen 400 µl Reifungs-

Material und Methoden

medium pro Well, während in jedes Well der Maturationschalen 395 μl Reifungsmedium und zusätzlich 5 μl Rapamycin-Lösung (Konzentration 800 μM), 5 μl Torin2-Lösung (Konzentration 240 μM) oder 5 μl DMSO (für die Kontrollgruppen) pipettiert wurden. Dadurch wurde bei einem Gesamtvolumen von 400 μl pro Well in den Versuchsgruppen eine Rapamycin-Konzentration von 10 μM bzw. eine Torin2-Konzentration von 3 μM pro Well erreicht.

Die Wasch- und Maturationschalen wurden ca. 5-7 Stunden vor Reifungsbeginn vorbereitet und bis zur Verwendung im Brutschrank bei 39°C, 5% CO₂ und feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre zur Einstellung von Temperatur und pH-Wert äquilibriert.

Die Reifung der in die Maturationschalen eingebrachten Eizellen (25 Eizellen pro Well) erfolgte über eine Dauer von 24 Stunden ebenfalls im Brutschrank bei 39°C, 5% CO₂ und feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre.

4.5 Probenvorbereitung für die morphologischen, biochemischen und immunhistochemischen Analysen

Die gewonnenen Eizellen wurden auf ähnliche Art und Weise für die morphologischen, biochemischen, und immunhistochemischen Untersuchungen vorbereitet. Zunächst wurden sie in D-PBS gewaschen, danach erfolgte durch wiederholtes Pipettieren eine Entfernung des Cumulus oophorus. Dabei wurden die für die morphologischen und biochemischen Analysen bestimmten Eizellen vollständig denudiert, während an den für die immunhistochemischen Untersuchungen vorgesehenen Eizellen Reste des Cumulus oophorus belassen wurden. Anschließend wurden die Eizellen je nach Bedarf weitere 3-4 Mal in D-PBS gewaschen.

Die für die biochemischen Analysen bestimmten Eizellen wurden zweimal in PBS- (PBS ohne weitere Zusätze) gewaschen und schließlich in einem Volumen von höchstens 5 μl in Gruppen von je 50 Eizellen in Safe Lock Tubes (0,5 ml, Fa. Eppendorf, Hamburg) überführt. Diese wurden bis zu ihrem Versand ins Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf, in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert.

Die für die immunhistochemischen Analysen vorgesehenen Eizellen wurden nach den Waschvorgängen in D-PBS einmal in PBS- gewaschen, dann in Paraformaldehyd-Lösung 3% mit 2% Saccharose gegeben und im Anschluss in einem möglichst großen Volumen in Eizellgruppen variabler Größe in Safe Lock Tubes (0,5 ml, Fa. Eppendorf, Hamburg) transferiert. Diese Tubes wurden bis zu ihrem Versand ins Leibniz-Institut für Nutztierbiologie im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

4.6 Morphologische Beurteilung der Eizellen anhand der Chromatinkonfiguration

4.6.1 Fixation der Eizellen

Für die Beurteilung der Entwicklungsstadien der Eizellen anhand der Chromatinkonfiguration wurden die Eizellen in einem Ethanol(absolut)-Eisessig-Gemisch (3:1; beide Komponenten von Fa. Merck, Darmstadt) fixiert, mittels Aceto-Orcein angefärbt und anschließend zytologisch untersucht. Etwa 10 Eizellen wurden jeweils in einem Tropfen von ca. 4 µl D-PBS mittig zwischen zwei dünne Silikonstreifen (Baysilone-Paste, mittlere Viskosität, Fa. Bayer, Leverkusen), die vorher im Abstand von etwa 15 mm parallel auf einen Objektträger (76 x 26 x 1 mm, Fa. Roth, Karlsruhe) aufgebracht worden waren, platziert. Auf die Silikonstreifen und den die Oozyten enthaltenden Tropfen D-PBS wurde dann ein Deckglas (18 x 18 mm, Fa. Heiland, Hamburg) aufgelegt und vorsichtig festgedrückt, sodass die Objekte leicht fixiert wurden, ohne zu zerplatzen. Daraufhin wurde ein Tropfen des Fixationsgemisches am Rand des Deckglases so abgesetzt, dass durch die Kapillarkraft der gesamte Zwischenraum zwischen Objektträger und Deckglas durchströmt wurde und die Eizellen somit vollständig von Fixationsflüssigkeit umhüllt wurden. Auf jeden Objektträger wurden 2 Tropfen mit Eizellen (d.h. auch 2 Deckgläser) aufgebracht.

Für eine längere Aufbewahrung wurden die Objektträger in Küvetten gefüllt mit Fixationsflüssigkeit gelagert. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Flüssigkeitspegel hoch genug war, um ein Eintauchen der unteren Deckglasränder in das Fixationsgemisch zu gewährleisten. Auf diese Weise sollte ein Austrocknen des Raumes zwischen Deckglas und Objektträger verhindert werden. Die Küvetten wurden mit Parafilm® verschlossen und bis zur Anfärbung und Auswertung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

4.6.2 Färbung der Eizellen

Für die Anfärbung der Eizellen wurden die Objektträger aus den Küvetten entnommen und mit einem Zellstofftuch vorsichtig abgetupft. Anschließend wurden Tropfen 2%iger Aceto-Orcein-Lösung am oberen Deckglasrand platziert. Die Farbstofflösung wurde mit Hilfe eines Filterpapierstreifens, der am unteren Deckglasrand angesetzt wurde, aufgrund der Kapillarkraft in den Raum zwischen Objektträger und Deckglas gesogen. Es folgte eine Wartezeit von 10 Minuten, um die Aceto-Orcein-Lösung einwirken zu lassen. Daraufhin wurden Tropfen 30%iger Essigsäure (Ricca Chemical, USA) am unteren Deckglasrand abgesetzt. Ein am oberen Deckglasrand angesetzter Filterpapierstreifen wurde benutzt, um die Flüssigkeit aufgrund der Ka-

pillarkraft so lange durch den Zwischenraum zwischen Objektträger und Deckglas fließen zu lassen, bis dieser Zwischenraum völlig klar war. Bis zur Auswertung wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer gelagert.

4.6.3 Beurteilung der Eizellen

Die auf diese Weise angefärbten Objektträger wurden unter einem Phasenkontrast-Mikroskop (Fa. Zeiss, Göttingen) bei 100-400-facher Vergrößerung untersucht. Die Entwicklungsstadien der Eizellen wurden anhand der Chromatinkonfiguration wie folgt klassifiziert:

Germinalvesikel (GV)-Stadium, germinal vesicle breakdown (GVBD)-Stadium, Metaphase I (M I), Anaphase I (Ana I), Telophase I (Telo I) und Metaphase II (M II; Homa, 1988; Abb.12). Bei der morphologischen Beurteilung mit Rapamycin (10 μ M) behandelter Eizellen wurde zusätzlich zwischen asymmetrisch (M II-Stadium, asymmetrisch geteilt) und symmetrisch (M II-ähnlich, symmetrisch geteilt) geteilten Eizellen unterschieden.

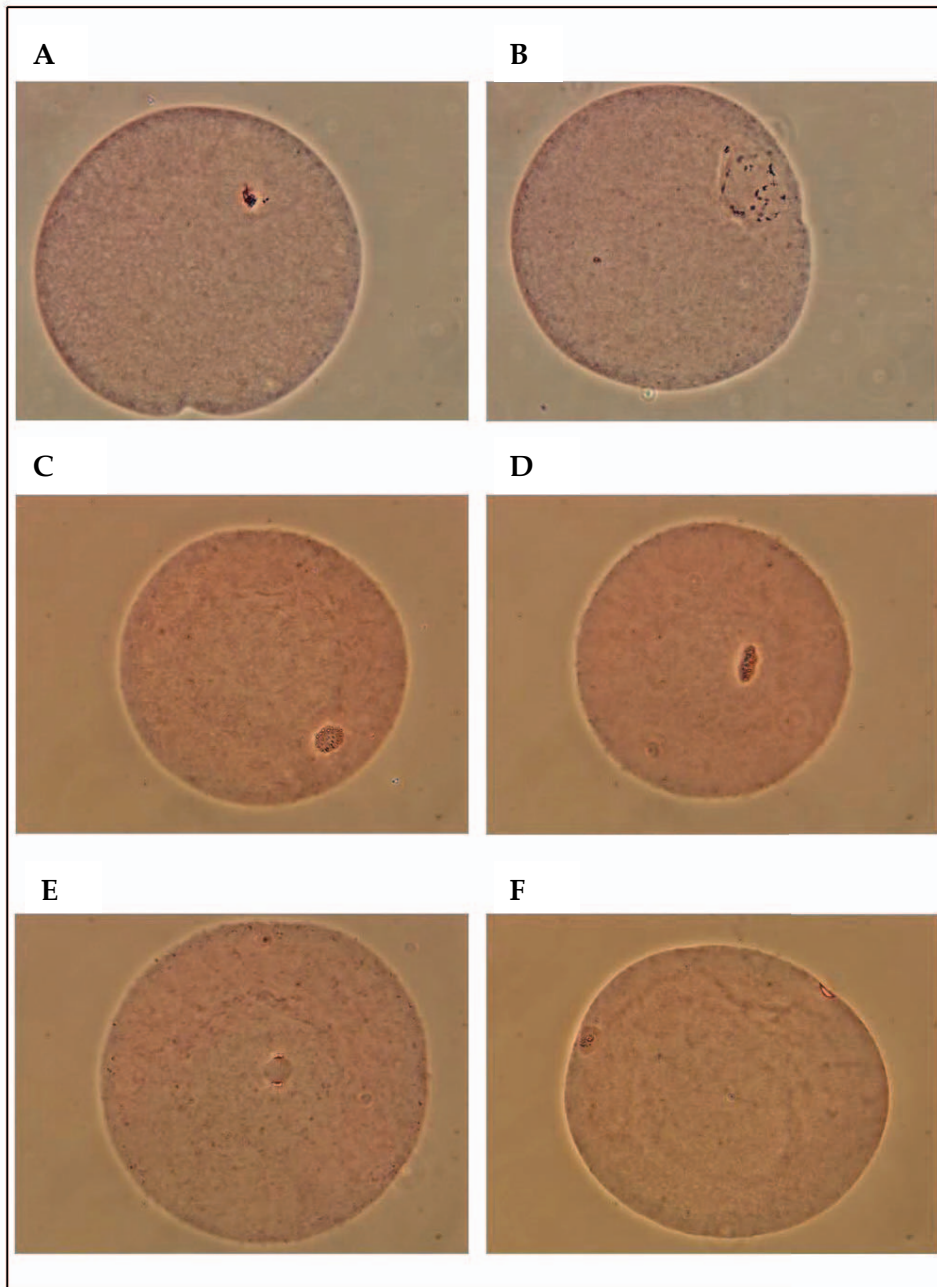


Abb.12: Verschiedene Entwicklungsstadien im Verlauf der 24-stündigen Maturation von Rindereizellen:

Die Eizellen wurden fixiert und mit Aceto-Orcein angefärbt.

A: Germinalvesikel (GV)-Stadium; **B:** germinal vesicle breakdown (GVBD)-Stadium; **C:** Metaphase I (M I)-Stadium; **D:** Anaphase I (Ana I)-Stadium; **E:** Telophase I (Telo I)-Stadium; **F:** Metaphase II (M II)-Stadium

4.7 In-vitro-Fertilisation

Als Befruchtungsmedium diente Tyrode's Lactate (TL), dem am Abend vor der Verwendung Pyruvat (2,2 mg/10 ml, Fa. Sigma, Taufkirchen) und BSA (60 mg/10 ml, Fa. Sigma, Taufkirchen) zugegeben wurde und das im Anschluss über Nacht im Brutschrank bei 39°C, 5% CO₂ und maximaler Luftfeuchtigkeit inkubiert wurde. Vor Gebrauch wurde dem Fertilisationsmedium außerdem noch Heparin (100 µg/10 ml), Gentamicin (100 µl/10 ml) und Hypotaurin-Epinephrin (360 µl/10 ml) zugesetzt.

4.7.1 Aufbereitung der Spermien

Für die Abtrennung der lebenden von den toten Spermazellen wurde BoviPure (Fa. Nidacn, Gothenburg, Schweden) verwendet. Dafür wurden zunächst 3 Tubes (1,5 ml, Fa. Eppendorf, Hamburg) wie folgt vorbereitet: 1 Tube mit 1000 µl BoviWash, 1 Tube mit 500 µl BoviPure in einer Konzentration von 40% und 1 Tube mit 500 µl BoviPure in einer Konzentration von 80%. Um eine Konzentration von 40% bzw. 80% zu erreichen, wurden 200 µl BoviPure mit 300 µl BoviDilute bzw. 400 µl BoviPure mit 100 µl BoviDilute versetzt. Daraufhin wurden die Tubes für mindestens eine halbe Stunde im Warmschrank erwärmt. Im Anschluss wurde die 40%ige BoviPure-Lösung sehr langsam und vorsichtig auf die 80%ige Lösung gegeben, um eine Durchmischung der beiden Schichten zu vermeiden. Für die Fertilisation von 100 Eizellen wurde eine tiefgefrorene Samenportion (0,25 ml Paillette, 15 x 10⁶ Spermien) des Bullen Büffel (Hb.-Nr.: 166419; Ejakulat-Nr.: 27308) für 10 Sekunden in warmem Wasser (temperiert auf ca. 35°C) aufgetaut. Danach wurde das Sperma vorsichtig auf die beiden BoviPure-Schichten gegeben, das Tube verschlossen und bei 300 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und verworfen, sodass nur das die Spermien enthaltende Pellet zurückblieb. Dieses Pellet wurde in das mit BoviWash gefüllte Tube überführt und darin behutsam resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 300 x g für 5 Minuten, woraufhin wiederum der Überstand abgenommen und verworfen und das Spermien-Pellet zurückgelassen wurde. Dieses wurde schließlich in 100 µl Befruchtungsmedium resuspendiert (Spermasuspension). Um eine Spermienzahl von ca. 100 000 Spermien pro Befruchtungstropfen (60 µl) zu gewährleisten, wurde die Konzentration der Spermasuspension in einer Zählkammer nach Bürker (Fa. Brand, Wertheim) bestimmt. Dazu wurden 10 µl dieser Spermasuspension mit 990 µl Aqua dest. in einem Reaktionsgefäß vermischt. Anschließend wurde die vorbereitete Zählkammer mit 10 µl der Verdünnung befüllt. Die Auszählung erfolgte unter Phasenkontrast bei 400-facher Vergrößerung. Dabei wurden 4 x 16 große Felder ausgezählt. Daraufhin wurde die Dich-

te der Spermasuspension berechnet (Dichte = Anzahl gezählter Spermien/Anzahl ausgezählter Felder $\times 25 \times 10 \times 100$). Mithilfe dieser konnte das Volumen der Spermasuspension, das für eine Spermienzahl von ca. 100 000 Spermien pro Befruchtungstropfen (60 μl) benötigt wurde, errechnet werden.

4.7.2 Befruchtung

Die Koinkubation von Spermien und gereiften KOK erfolgte in Befruchtungstropfen. In Vorbereitung für die Befruchtung von 100 Eizellen wurden in eine Petrischale (Durchmesser 35 mm, Fa. Greiner, Frickenhausen) 4 Tropfen (je 60 μl) des Befruchtungsmediums pipettiert, die anschließend vollständig mit Mineralöl (Fa. Sigma, Taufkirchen) überschichtet wurden. Außerdem wurden zwei viergeteilte Waschschaalen (Durchmesser 35 mm, Fa. Greiner, Frickenhausen) mit je 200 μl Befruchtungsmedium pro Vertiefung vorbereitet. Die Schale mit den Befruchtungstropfen, die Waschschaalen und das restliche Befruchtungsmedium, das zum Teil für die Aufbereitung der Spermien genutzt wurde, wurden für mindestens 4 Stunden im Brutschrank bei 39°C, 5% CO₂ und maximaler Luftfeuchtigkeit äquilibriert.

Die nach 24-stündiger Reifungszeit aus der Maturationschale entnommenen KOK wurden unter Beibehaltung der Gruppen zweimal gewaschen und in die Befruchtungstropfen umgesetzt. Daraufhin wurde die Spermasuspension in einem der Konzentration dieser Suspension entsprechenden Volumen zu den Befruchtungstropfen zugegeben. Spermien und KOK wurden im Brutschrank bei 39°C, 5% CO₂ und maximaler Luftfeuchtigkeit für 18-22 Stunden koinkubiert.

4.8 In-vitro-Kultivierung

Die Kultivierung der befruchteten Eizellen erfolgte in 2 Abschnitten. Zunächst wurden die Eizellen mit ihren Kumuluszellen für 24 Stunden in Maturationsmedium, im Anschluss daran in denudiertem Zustand in synthetic oviduct fluid (SOF; Kultivierungsmedium) kultiviert.

Für 100 vermeintlich befruchtete Eizellen wurde eine 4-Well-Multischale mit 400 μl Maturationsmedium pro Well vorbereitet und bis zum Gebrauch im Brutschrank bei 39°C, 5% CO₂ und maximaler Luftfeuchtigkeit aufbewahrt.

Dem Kultivierungsmedium wurde am Vorabend der Verwendung Na-Pyruvat (3,3 mg/9 ml, Fa. Sigma, Taufkirchen), Basal Medium Eagle (BME; 200 μl /9 ml, Fa. Sigma, Taufkirchen), Minimum Essential Medium (MEM; 100 μl /9 ml, Fa. Sigma, Taufkirchen) und estrus cow serum (ECS; 1 ml/9 ml) zugesetzt. Daraufhin wurde es über Nacht im Brutschrank bei 38°C, 5% CO₂, 5% O₂ und maximaler Luftfeuchtigkeit äqui-

libriert. Am folgenden Tag wurden für 100 vermeintlich befruchtete Eizellen eine 4-Well-Multischale mit je 400 µl Kultivierungsmedium pro Well (Waschschale) und eine 4-Well-Multischale mit je 500 µl Kulturmedium pro Well, das mit Mineralöl überschichtet wurde (Kultivierungsschale), vorbereitet. Beide Schalen wurden vor ihrer Verwendung für mindestens eine halbe Stunde im Brutschrank bei 38°C, 5% CO₂, 5% O₂ und maximaler Luftfeuchtigkeit gelagert.

Nach Ablauf der Fertilisationszeit wurden die vermeintlich befruchteten Eizellen aus den Befruchtungstropfen entnommen, unter Beibehaltung der Gruppen in die 4-Well-Multischale mit Maturationsmedium eingesetzt und für 24 Stunden bei 39°C, 5% CO₂ und maximaler Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die vorbereitete Waschschale mit Kultivierungsmedium genutzt, um die Zellen durch wiederholtes Pipettieren mittels einer auf 70 µl eingestellten Pipette (Fa. Eppendorf, Hamburg) vollständig zu denudieren und zu waschen. Danach wurden die Zellen in die Kultivierungsschale umgesetzt und bis zur Beurteilung der Blastozystenrate im Brutschrank bei 38°C, 5% CO₂, 5% O₂ und maximaler Luftfeuchtigkeit kultiviert.

4.9 Beurteilung der Teilungs- und Entwicklungsstadien

Die Teilungs- und Entwicklungsstadien wurden während der Kultivierung folgendermaßen beurteilt:

Am zweiten Tag der Kultivierung wurde die Teilungsrate unter einem Stereomikroskop bei 15-facher Vergrößerung bestimmt. Embryonen, die gleichmäßige Blastomeren aufwiesen, wurden als geteilt eingestuft.

Am 7., 8. und 9. Tag der Kultivierung wurde die Blastozystenrate bestimmt. Dabei wurden die Blastozysten nach dem Schema von Lindner und Wright (1983) beurteilt (Abb.13):

- **Beginnende Blastozyste:** Blastozyste mit deutlicher Blastozoelbildung und einer glatten Abgrenzung zum perivitellinen Raum.
- **Expandierte Blastozyste:** Blastozyste mit ausgedünnter Zona pellucida, dabei ist der gesamte Embryo vergrößert, der perivitelline Raum ist verschwunden und die ICM (inner-cell-mass) und der Trophoblast sind deutlich voneinander abzugrenzen.
- **Schlüpfende Blastozyste:** Die Blastozyste hat die Zona pellucida teilweise verlassen.
- **Geschlüpfte Blastozyste:** Die Blastozyste hat die Zona pellucida vollständig verlassen.

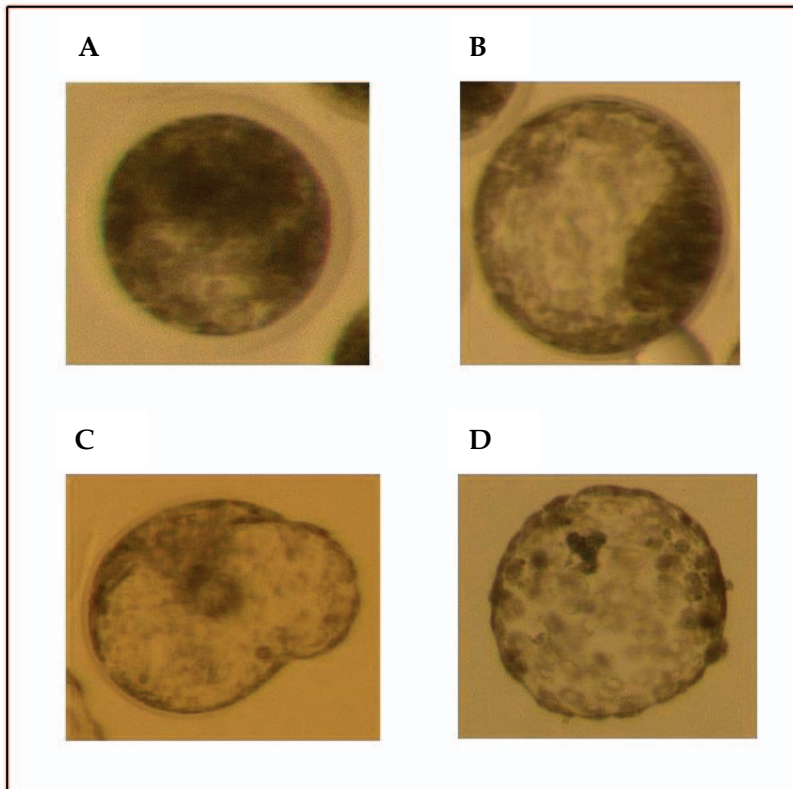


Abb.13: Klassifizierung von Embryonen nach Lindner und Wright:

Dargestellt sind in verschiedenen Entwicklungsstadien befindliche Blastozysten. **A:** beginnende Blastozyste; **B:** expandierte Blastozyste; **C:** schlüpfende Blastozyste; **D:** geschlüpfte Blastozyste

4.10 Biochemische Analysen

4.10.1 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE nach Laemmli (1970) wurde ein SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophoresesystem der Firma Hoefer (Mighty Small SE 250, Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Dafür wurden die Polyacrylamid-Gele in einer Konzentration von 12,5- 13,5 % hergestellt. Das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid betrug 30:0,8. Die Polymerisation erfolgte für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur. Das Gel wurde mit gesättigtem Isobutanol geglättet. Auf das Trenngel wurde das 5,0 % Sammelgel gegossen, wobei ein Probenkamm für die Aussparung der benötigten Taschen verwendet und für ca. eine Stunde belassen wurde. Anschließend wurden die Platten mit dem polymerisierten Gel in das verti-

Material und Methoden

kale Elektrophoresesystem eingesetzt und mit Elektrophoresepuffer nach Laemmli befüllt. Um eine komplette Denaturierung der Proteine zu erreichen und vollständig entfaltete Polypeptidketten mit gleichartigen Ladungseigenschaften zu erhalten, wurden die Proben (je 50 Eizellen) mit Loading-Puffer versetzt und für 3 Minuten bei 95°C erhitzt. Als Loading-Puffer wurde dreifach konzentrierter SDS-Probenpuffer verwendet. Das Gel wurde mit den Proben und einem geprüften Proteinmarker (Color Prestained Protein Standard, Broad Range 11-245 KDa) beladen und an eine Wasserkühlung angeschlossen. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur mit einer angelegten Spannung von 450 V und einer Stromstärke von 20-30 mA bis das Bromphenolblau das untere Ende des Gels erreicht hatte und die gewünschte Auftrennung der Proben an den Markerproteinen ablesbar war.

4.10.2 Proteintransfer mittels Western-Blot

Die zuvor im Gel getrennten Proteine wurden dann dauerhaft auf einer Membran fixiert. Unter Verwendung eines Puffers nach Towbin wurden die aufgetrennten Proteine in einem Semi-Dry Elektrobloiting-Gerät (Pierce™ Power Blotter, Fa. Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) nach der Methode von Kyhse-Anderson et al. (1984) vom Gel auf eine Polyvinylidene Difluoride (PVDF)-Membran (Immobilon, Fa. Millipore, Darmstadt) mit einer Porengröße von 0,45 µm übertragen. Dafür wurden mehrere Schichten aufeinandergelegt, die im Folgenden beschrieben werden (von unten nach oben): 2 Blotpapiere, alle in Towbinpuffer getränkt; das Gel, vorher 10 Minuten in Towbinpuffer äquilibriert; die Membran, zuerst mit Methanol benetzt, dann mit ddH₂O gewaschen und ebenfalls für mindestens 10 Minuten in Towbinpuffer äquilibriert; nochmals 2 in Towbinpuffer getränkte Blotpapiere.

Der Transfer erfolgte bei 1 mA pro cm² Gel für eine Stunde.

4.10.3 Blocken der Membran und Immunoblotting

Nachdem die PVDF-Membran 1x mit Tris Buffer Saline + Tween 20 (TBS-T) gewaschen worden war, wurde sie mit 0.5% in TBS-T gelöstem fettfreiem Trockenmilchpulver (pH 7,4) bei Raumtemperatur geblockt, um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Dazu wurde die Blocking-Lösung im Snap-System (Fa. Millipore, Darmstadt) durchgesaugt. Anschließend wurde die Membran 3x mit TBS-T gewaschen. Dann wurde der Blot mit einem spezifischen Erstantikörper (Verdünnung je nach Antikörper verschieden, siehe Tab.4) bei 4°C über Nacht in 5% BSA gelöst in TBS-T inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte in TBS-T. Im Anschluss wurde der Blot mit einem sekundären Antikörper (für die jeweils angewendete Verdün-

nung siehe Tab. 4) für 1,5 Stunden in 0.5-5.0 % Trockenmilch gelöst in TBS-T bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem zweiten Antikörper wurde die Membran wieder 3x in TBS-T, daraufhin einmal in doppelt destilliertem H₂O (2 Minuten) gewaschen. Bei allen Arbeitsschritten (Inkubationen, Waschschrinen usw.) wurde die Membran konstant bewegt. Soweit nicht anders gekennzeichnet, stammten die verwendeten Antikörper von Cell Signaling Technology (cst).

Tab.4: Verwendete Verdünnungen der Antikörper für das Immunoblotting:
 Entsprechend der Arbeitsanweisungen für die jeweiligen verwendeten Antikörper fand eine geringgradige Modifizierung der Antikörper-Verdünnungen statt. Die Antikörper wurden in TBS-T mit 5% BSA (1. Antikörper) bzw. mit 0.5-5.0% Trockenmilch (2. Antikörper) verdünnt.

| 1. Antikörper | Verdünnung | 2. Antikörper | Verdünnung |
|-------------------------------------|-------------------|--|--------------------|
| eIF4E no. 9742 | 1:1000 | Anti-Rabbit IgG aus der Ziege (HRP-markiert) no. 7074 | 1:4000 |
| P-eIF4E (Ser 209) no. 9741 | 1:700 bzw. 1:1000 | | 1:2100 bzw. 1:3000 |
| 4E-BP1 no. 9452 | 1:400 bzw. 1:800 | | 1:2000 |
| P-4E-BP1 (Thr 37/46) no. 2855 | 1:400 | | 1:1500 |
| RPS6 no. 2217 | 1:500 | | 1:1500 |
| P-RPS6 (Ser 235/236) no. 4858 | 1:500 | | 1:2000 |
| PKA no. 9624 | 1:600 bzw. 1:1000 | | 1:1800 bzw. 1:3000 |
| PKB no. 9614 | 1:600 bzw. 1:1000 | | 1:1800 bzw. 1:3000 |
| PKC no. 2261 | 1:600 bzw. 1:1000 | | 1:1800 bzw. 1:3000 |
| CDKs no. 2324 | 1:800 bzw. 1:1000 | | 1:2400 bzw. 1:3000 |
| ATM/ATR no. 2851 | 1:1000 | | 1:3000 |
| ERK1/2 Santa Cruz no. sc-94 | 1:8000 | | 1:15000 |
| P-ERK1/2 (Thr 202/204) | 1:8000 | | 1:15000 |
| MAPK | 1:1500 | Anti-Mouse IgG no. 7076 | 1:3500 |

4.10.4 Untersuchung der Substratphosphorylierung verschiedener Kinasen

Für die Western-Blots zur Untersuchung der Substratphosphorylierung verschiedener Kinasen wurden zwei Deca-Probe-Unit-Apparaturen (PR 150 Deca-Probe Incubation Manifold, Fa. GE Healthcare, Freiburg) verwendet. Eine Deca-Probe-Unit ermöglicht eine zeitgleiche Analyse derselben Probe mit bis zu 10 verschiedenen Antikörpern (Wollenhaupt et al. 2013). Bei Gebrauch der beiden Deca-Probe-Unit-Apparaturen wurde im Rahmen der Elektrophorese für die Aussparung der benötigten Taschen ein präparativer Kamm der Firma Hoefer (Hoefer Comb for SE 250/SE 260 1/1 Wells, Fa. Fisher Scientific, Schwerte) eingesetzt. Von den beiden durch den präparativen Kamm entstandenen Taschen wurde die eine mit jeweils 150 Eizellen, die andere mit einem geprüften Proteinmarker beladen. Die Substratphosphorylierung durch die unterschiedlichen Kinasen wurde mit Hilfe des Kits von Cell Signaling Technology (Phospho-(Ser/Thr) Kinase Substrate Antibody Sampler Kit No. 9920, Fa. Cell Signaling Technology, Danvers, MA) analysiert. Dieser Kit bietet Antikörper gegen die phosphorylierte Form spezifischer Sequenzmotive der Kinase-Substrate. Untersucht wurde die Substratphosphorylierung durch PKA (RRXS*/T*), PKB (erkannt werden Proteine, die phosphoryliertes Serin/Threonin mit vorhergehendem Arginin an Position -5 und -3 enthalten, wobei diese Phosphorylierungsstellen von umgebenden Aminosäuresequenzen größtenteils unabhängig sind), PKC (bindet Proteine nur, 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 (erkennt phosphoryliertes Serin im Motiv (K/R)(S*)PX(K/R)), ATM/ATR (reagiert mit Proteinen, die phosphoryliertes Serin/Threonin, dem eine hydrophobe Aminosäure an Position -1 vorangeht und dem Glutamin an Position +1 folgt, enthalten) und MAPK/CDK (erkennt phosphoryliertes Threonin, wenn Prolin folgt, unabhängig vom übrigen Umfeld). Die Elektrophorese, der Proteintransfer, das Blocken der Membran und das Immunoblotting wurden wie oben beschrieben durchgeführt (siehe 4.10.1, 4.10.2, 4.10.3). Als Kontrollen wurden für alle biochemischen Analysen sowohl unreife (Kontrolle 0h), als auch gereifte Eizellen (Kontrolle 24h mit DMSO) verwendet.

4.10.5 Enhanced chemiluminescence (ECL)-Detektion

Zur Auswertung der Blots wurde das Chemilumineszenz-Verfahren verwendet. Dabei wurde die Membran für 2 Minuten in ECL-Lösung inkubiert. Bei sehr geringen Proteinexpressionen (Substratmengen) wurde 5 Minuten in ECL-Prime Lösung (Fa. GE Healthcare, München, no. RPN 2236) inkubiert. Anschließend wurden die Pro-

teinbanden in der Dunkelkammer auf Amersham Hyperfilm ECL (Fa. GE Healthcare, München, no. 28906837) exponiert. Die Belichtung erfolgte je nach Probenmaterial, Antikörperverdünnung und Häufigkeit der Neubeprobung der Membran für sehr unterschiedliche Zeiten (wenige Sekunden bis 15 Minuten). Die Digitalisierung der Filme erfolgte mittels Camilla Camera System (Fa. Raytest, Straubenhardt).

4.11 Immunhistochemische Analysen

In Vorbereitung für die immunhistochemischen Analysen mittels Laserscanning-Mikroskopie wurden die in der Fixationslösung (3% Paraformaldehyd mit 2% Saccharose) gelagerten Oozyten einmal in PBS⁻ bei Raumtemperatur gewaschen. Nach 5 Minuten bei 0°C in Permeabilisierungspuffer folgte ein viermaliger Waschschrift in Waschpuffer bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Eizellen für 2 Stunden bei Raumtemperatur geblockt (Roti-Immuno-Block 1:50, Fa. Roth, Karlsruhe). Ohne weiteren Waschschrift erfolgte daraufhin die Inkubation mit dem 1. Antikörper (Verdünnung je nach Antikörper verschieden, Tab.5) über Nacht bei 4°C. Danach wurden die Eizellen viermal in Waschpuffer gewaschen und dann für 5 Stunden bei Raumtemperatur und Dunkelheit mit dem 2. Antikörper (Tab.5) inkubiert. Im Anschluss erfolgte nach erneutem viermaligem Waschen in Waschpuffer das Gegenfärben der Kerne mit SYBR Green Nucleic Acid Gel Stain (1:500, Fa. MoBiTec, Göttingen). Daraufhin wurden die Oozyten wiederum viermal in Waschpuffer gewaschen, bei 4°C über Nacht in 2% Paraformaldehyd fixiert und anschließend in Glyceringelantine (Fa. Merck, Darmstadt) eingedeckelt. Soweit nicht anders gekennzeichnet stammten die verwendeten Antikörper von Cell Signaling Technology (cst).

Tab.5: Verwendete Verdünnungen der Antikörper für die immunhistochemischen Analysen:

Entsprechend der Arbeitsanweisungen für die jeweiligen verwendeten Antikörper fand eine geringgradige Modifizierung der Antikörper-Verdünnungen statt.

| 1. Antikörper | Verdünnung | 2. Antikörper | Verdünnung |
|---------------------------------|------------|---|------------|
| BP1 no. 9452 | 1:100 | Alexa Fluor® 546 goat anti rabbit IgG, Fa. MoBiTec, Göttingen) no. A11071 | 1:200 |
| P-BP1 (Thr 37/46) no. 2855 | 1:200 | | |
| eIF4E no. 9742 | 1:50 | | |
| P-eIF4E (Ser 209) no. 9741 | 1:25 | | |
| mTor no. 2983 | 1:100 | | |
| P-mTor (Ser 2448) no. 5536 | 1:100 | | |
| Raptor no. 2280 | 1:100 | | |
| P-Raptor (Ser 792) no. 2083 | 1:50 | | |
| Rictor no. 2114 | 1:50 | | |
| P-Rictor (Thr 1135) no. 3806 | 1:100 | | |

Die Auswertung erfolgte am inversen Mikroskop (Axiovert 200M, Fa. Zeiss, Jena) bei 40-facher Vergrößerung (Öl) mittels eines konfokalen Laserscankopfes (LSM5 Pascal, Fa. Zeiss, Jena). Zwei verschiedene Laser wurden zur Fluoreszenzanregung verwendet, ein Argon-Laser bei 488 nm (30 mW) und ein HeNe-Laser bei 543 nm (1 mW). Mit Hilfe der Software Zen 2007 sp1 (Fa. Zeiss, Jena) wurden Bildstapel (3D-Stacks, $\Delta z = 1\mu\text{m}$) aufgenommen. Die Scanauflösung betrug 1024x1024 Pixel.

Für die Stackauswertung mittels der Software ImageJ wurde die Ebene mit Kern (am größten/hellsten) ausgewählt, anschließend wurden drei regions of interest (ROIs)

immer gleichen Durchmessers über Kern, Zytoplasma mittig und Zytoplasma Membrannähe (ROI berührt Membran, geht aber nicht darüber hinaus) gelegt. Danach erfolgte eine integrale Helligkeitsmessung in den ROIs. Die erhaltenen Werte wurden statistisch ausgewertet und bilden die Grundlage für die Tabellen 6, 9 und 10 (siehe 9.6.5.).

Als Kontrollen wurden für die immunhistochemischen Analysen sowohl unreife (Kontrolle 0h), als auch gereifte Eizellen (Kontrolle 24h mit DMSO) verwendet.

4.12 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit der SAS-Software Version 9.4 für Windows (Copyright, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) ausgewertet. Deskriptive Statistiken und der Test auf Normalverteilung der Signalintensitäten bei den Laserscanning-Analysen wurden mit der SAS-Prozedur UNIVARIATE berechnet.

Morphologische Untersuchung Rapamycin- und Torin2-behandelter Eizellen, Fertilisation und Kultivierung Torin2-behandelter Eizellen:

Sowohl die Daten für die Entwicklungsstadien (für Rapamycin- und Torin2-behandelte Eizellen) als auch die Teilungsrate, die Blastozystenrate und der Anteil geschlüpfter Blastozysten wurden mit einem logistischen Modell und der SAS-Prozedur GLIMMIX ausgewertet. Hierzu wurden im „model statement“ der Prozedur die Binominalverteilung („distribution=binomial“) und die logistische Linkfunktion („link=logit“) gewählt. Fester Faktor im logistischen Modell war die Behandlung (mit den Stufen Kontrolle 24h und Rapamycin 10 μ M 24h/Torin2 3 μ M 24h). Die relativen Häufigkeiten der Behandlungsgruppen und deren Standardfehler sowie die entsprechenden Konfidenzintervalle für die relativen Häufigkeiten wurden mittels „ILINK-Option“ im „LSMEANS-statement“ von GLIMMIX berechnet.

Immunhistochemische Analysen:

Die Signalintensität wurde mittels einer zweifachen Varianzanalyse mit Wechselwirkung und wiederholten Messungen am gleichen Objekt mit der SAS-Prozedur MIXED ausgewertet. Das Varianzanalysemodell enthielt die festen Faktoren Versuchsgruppen (mit den Stufen Kontrolle 0h, Kontrolle 24h, Rapamycin 10 μ M 24h und Torin2 3 μ M 24h) und Position (mit den Stufen Kern, Mitte und Rand) sowie deren Wechselwirkung Gruppe x Position. Wiederholte Messungen am gleichen Objekt wurden mittels „repeated statement“ der SAS-Prozedur MIXED berücksichtigt. Dabei war Position die Variable, die die wiederholten Messungen am gleichen Objekt Eizelle („subject=Eizelle“) beschreibt. Für die resultierende blockdiagonale Restkovarianzmatrix wurde der unstrukturierte Typ („Type=UN“) für die Blöcke gewählt. Mit dem „slice statement“ von MIXED wurden außerdem die Positionen in-

Material und Methoden

nerhalb der Gruppen und die Gruppen innerhalb der Positionen getestet (F-Tests und multiple Mittelwertvergleiche mittels Tukey-Kramer-Test). Für die Darstellung der Ergebnisse wurden LS-Means und deren Standardfehler für alle festen Faktoren des oben beschriebenen Modells berechnet.

Effekte und Differenzen werden als signifikant betrachtet, falls $p < 0,05$ ist.

5 Ergebnisse

5.1 Versuchsabschnitt 1: Morphologische Beurteilung mit Rapamycin (10 μ M) behandelter Eizellen

In insgesamt drei Versuchsdurchgängen wurden die aus den Ovarien geschlachteter Rinder gewonnenen Eizellen einer 24-stündigen Reifung unter Zugabe von Rapamycin (Versuchsgruppen) bzw. von DMSO (Kontrollgruppen) unterzogen. Die Rapamycin-Konzentration im Reifungsmedium der Versuchsgruppen betrug dabei 10 μ M. Diese Konzentration wurde gewählt, da in einer vorangegangenen Studie bei Behandlung von Rindereizellen mit Rapamycin in einer Konzentration von 100 nM bis 1 μ M kein Effekt auf die Eizellmorphologie festgestellt werden konnte (nicht veröffentlichte Daten), Rapamycin aber in einer Studie an Mauseizellen in der Konzentration von 10 μ M Auswirkungen auf die asymmetrische Zellteilung (einschließlich der Ausschleusung des ersten Polkörpers) gezeigt hatte (Lee et al. 2012). Im Anschluss an die Reifung wurden die Entwicklungsstadien der Eizellen der mit Rapamycin behandelten Gruppen im direkten Vergleich mit den Entwicklungsstadien der Eizellen der Kontrollgruppen anhand der Chromatinkonfiguration beurteilt. Innerhalb eines Versuchsdurchgangs wurden jeweils annähernd 100 Eizellen pro Gruppe analysiert. Insgesamt wurden 269 mit Rapamycin (10 μ M) behandelte Eizellen ausgewertet (Kontrollgruppe: 272 Eizellen).

Die Auswertung der Eizellen der Kontrollgruppen ergab, dass 75-80% der Eizellen nach 24-stündiger Maturation das M II-Stadium erreicht haben (Abb.15). Dabei zeigt sich eine asymmetrische Anordnung des Chromatins innerhalb der Eizelle (große Metaphase-Platte mit einzeln erkennbaren Chromosomen und kleiner Polkörper) und es wird eine Ausschleusung des Polkörpers aus der jeweiligen Eizelle beobachtet (Abb.14D). Im Gegensatz dazu liegt bei einem bestimmten Anteil (20-25%) der während der Reifung dem Einfluss von Rapamycin ausgesetzten Eizellen eine vollkommen symmetrische Anordnung des Chromatins innerhalb der Eizelle vor (M II-ähnlich; Abb.15), wobei eine Polkörperbildung und -ausschleusung unterbleibt (Abb.14A-C). Dieses Phänomen kann bei den Eizellen der Kontrollgruppen zwar ebenfalls, allerdings zu einem deutlich niedrigeren Prozentsatz beobachtet werden (Abb.15). Behandlung von Rindereizellen mit Rapamycin in einer Konzentration von 10 μ M verursacht demnach eine Verringerung des prozentualen Anteils von Eizellen, die sich nach 24-stündiger Reifung in der M II-Phase befinden ($P < 0,01$) und eine Steigerung des Anteils symmetrisch segregierter Eizellen ($P < 0,01$). Bezüglich des prozentualen Anteils an Eizellen, die sich in den anderen Entwicklungsstadien befinden (M

Ergebnisse

I, Ana I, Telo I) und des Anteils degenerierter Eizellen kann zwischen den Versuchsgruppen und den Kontrollgruppen kein signifikanter Unterschied gefunden werden.

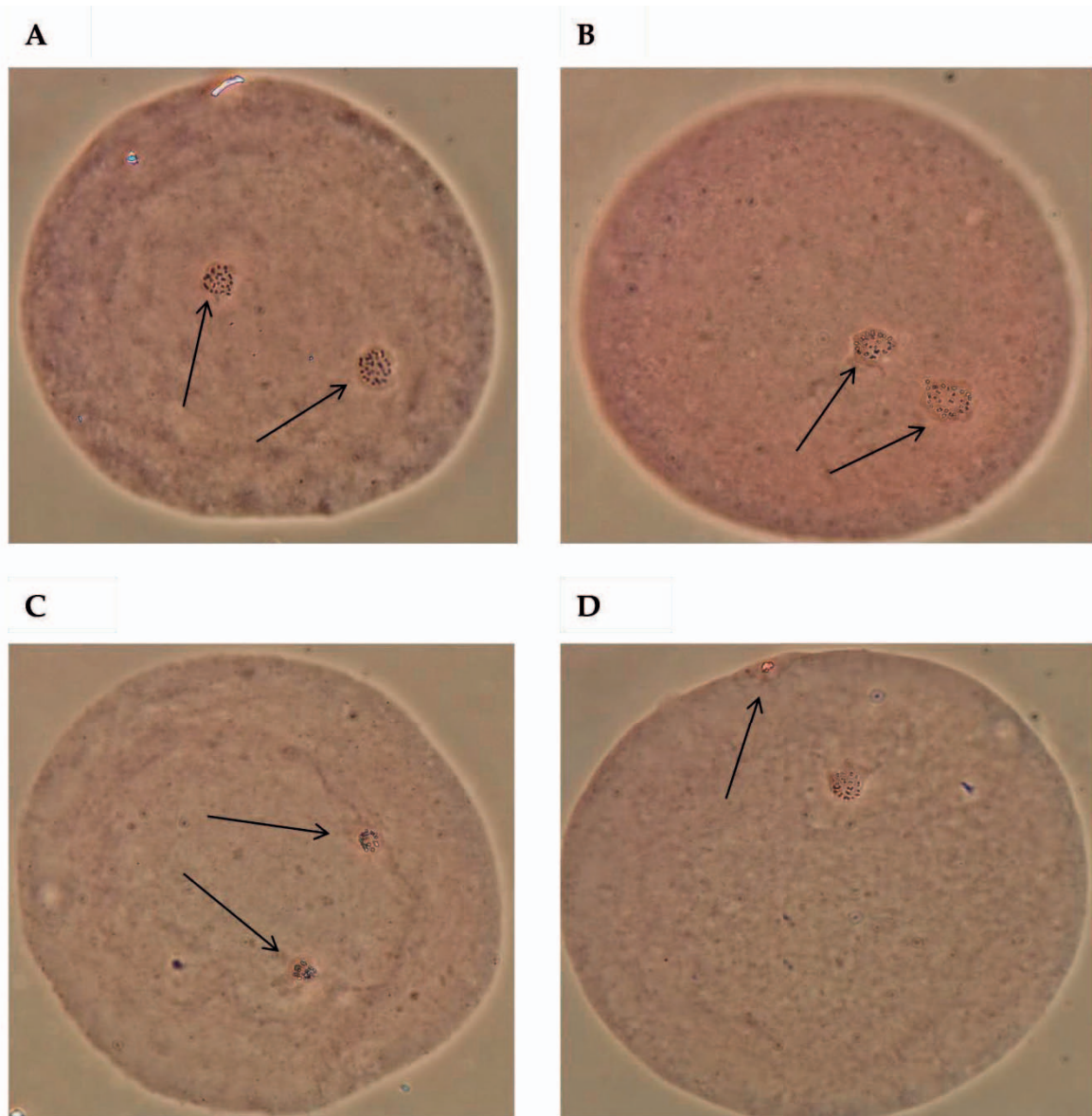


Abb.14: Morphologische Beurteilung von Eizellen anhand der Chromatinkonfiguration:

Zur Beurteilung wurden für eine Zeitspanne von 24 Stunden mit (A-C) oder ohne (D) Rapamycin in einer Konzentration von 10 μ M gereifte Eizellen herangezogen.

A-C: symmetrisch segregiertes Chromatin (Pfeile), keine Polkörperbildung

D: asymmetrisch segregiertes Chromatin, es wurde ein Polkörper (Pfeil) gebildet

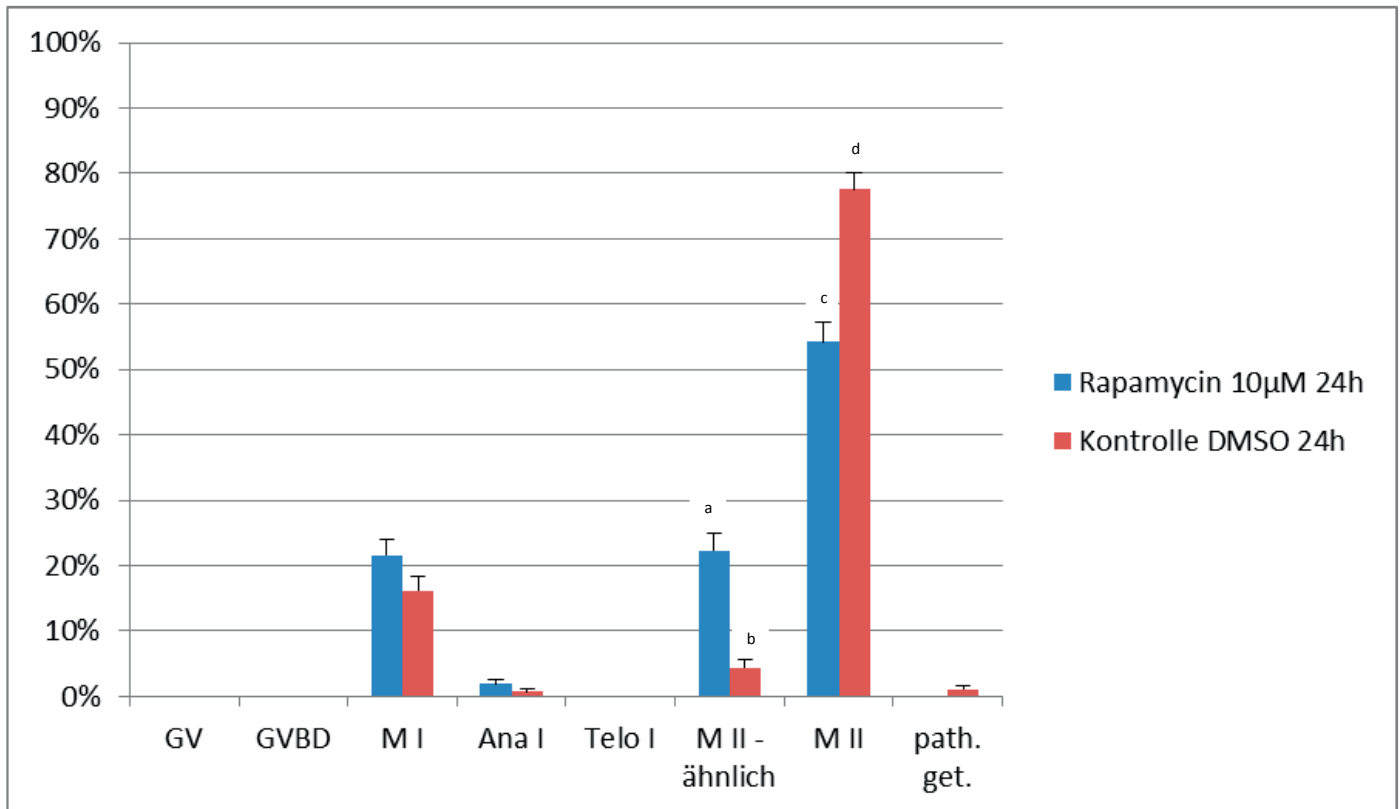


Abb. 15: Anhand der morphologischen Beurteilung auf Basis der Chromatinkonfiguration ermittelte prozentuale Verteilung der Eizellen auf verschiedene Entwicklungsstadien (Rapamycin 10 µM):

Es wurden über eine Reifungszeit von 24 Stunden mit Rapamycin (10 µM) behandelte Eizellen im Vergleich mit unbehandelten Eizellen der Kontrollgruppen beurteilt. Der Standardfehler ist jeweils angegeben und die mit unterschiedlichen Buchstaben markierten Säulen unterscheiden sich signifikant ($P < 0,01$ jeweils für a,b und c,d). Es wurden 3 Versuchsdurchgänge durchgeführt, wobei innerhalb eines Versuchsdurchgangs jeweils annähernd 100 Eizellen pro Gruppe (Rapamycin 10 µM 24h; Kontrolle DMSO 24h) analysiert wurden. Insgesamt wurden 269 mit Rapamycin behandelte Eizellen ausgewertet (Kontrollgruppe: 272 Eizellen).

GV: Germinalvesikel-Stadium; GVBD: germinal vesicle breakdown-Stadium; M I: Metaphase I; Ana I: Anaphase I; Telo I: Telophase I; M II: Metaphase II; path. get.: pathologisch geteilt; DMSO: Dimethylsulfoxid.

5.2 Versuchsabschnitt 2: Ermittlung der Entwicklungskompetenz Torin2- (3 μ M) behandelter Eizellen mit gleichzeitiger Prüfung der hemmenden Wirkung von Torin2 in einer Konzentration von 3 μ M

Zur Bestätigung der inhibitorischen Torin2-Wirkung bei einer angewendeten Konzentration von 3 μ M wurden begleitend zu den Befruchtungsversuchen morphologische Untersuchungen der Eizellen durchgeführt. Dabei war die Quelle der für die morphologischen Untersuchungen herangezogenen und der befruchteten Eizellen identisch. Erst nach der 24-stündigen Reifungszeit unter dem inhibitorischen Einfluss von Torin2 wurden die Eizellen aufgeteilt und ihrem jeweiligen Verwendungszweck (Befruchtung oder morphologische Auswertung) zugeführt. Es wurden insgesamt 4 aus 2 Teilen (morphologische Untersuchung und Befruchtungsversuch) bestehende Versuchsdurchgänge durchgeführt.

5.2.1 Versuchsabschnitt 2a: Morphologische Beurteilung mit Torin2 (3 μ M) behandelte Eizellen

Nach einer 24-stündigen Reifungszeit in Maturationsmedium mit (Versuchsgruppen) oder ohne (Kontrollgruppen; Zugabe von DMSO) Torin2 in einer Konzentration von 3 μ M wurden die Entwicklungsstadien der mit Torin2-behandelten Eizellen und außerdem zum Vergleich die Entwicklungsstadien der Eizellen der Kontrollgruppen anhand der Chromatinkonfiguration ermittelt. Innerhalb eines Versuchsdurchganges wurden um die 50 Eizellen pro Gruppe analysiert. Es wurden insgesamt 219 mit Torin2 behandelte Eizellen ausgewertet (Kontrolle: 242 Eizellen).

In den Kontrollgruppen erreichen ca. 80% der Eizellen das M II-Stadium, nur 10-20% der Eizellen befinden sich noch im M I-Stadium (Abb.16). Im Gegensatz dazu werden in den mit Torin2 behandelten Versuchsgruppen 50-70% der Eizellen im M I-Stadium arretiert. Trotz der inhibitorischen Torin2-Wirkung schaffen es 20-30% der Eizellen dennoch, das M II-Stadium zu erreichen (Abb.16).

Torin2 bewirkt somit bei Rindereizellen eine Verringerung des Anteils an Eizellen, die nach 24-stündiger Reifung die M II-Phase erreichen ($P < 0,001$) und erhöht den Anteil der in der M I-Phase arretierten Eizellen ($P < 0,001$).

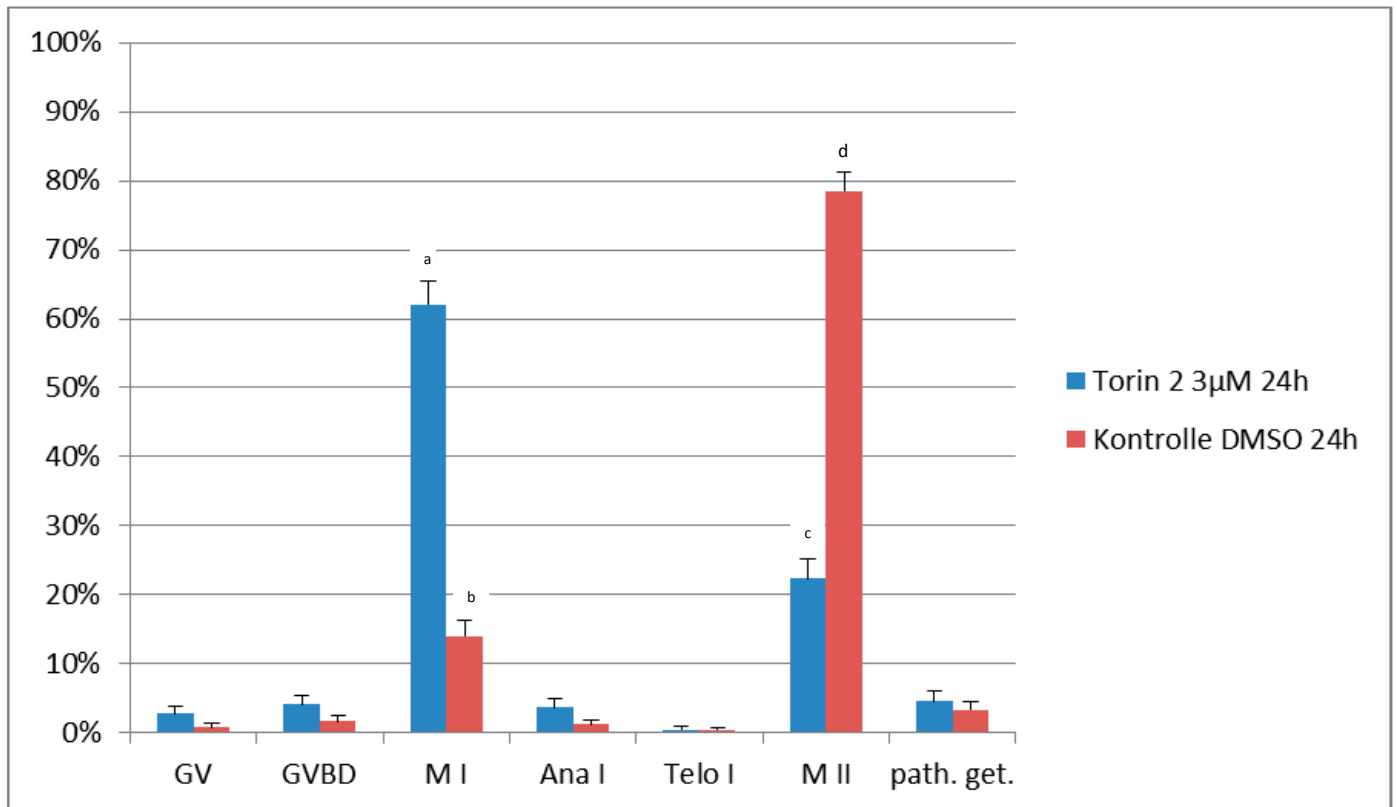


Abb.16: Anhand der morphologischen Beurteilung auf Basis der Chromatinkonfiguration ermittelte prozentuale Verteilung der Eizellen auf verschiedene Entwicklungsstadien (Torin2 3 µM):

Zur Beurteilung herangezogen wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden mit bzw. ohne Torin2 (3 µM) gereifte Eizellen. Der Standardfehler ist jeweils angegeben und die mit unterschiedlichen Buchstaben markierten Säulen unterscheiden sich signifikant ($P < 0,001$ jeweils für a,b und c,d). Es wurden 4 Versuchsdurchgänge durchgeführt, wobei innerhalb eines Versuchsdurchgangs ca. 50 Eizellen pro Gruppe (Torin2 3 µM 24h; Kontrolle DMSO 24h) untersucht wurden. Insgesamt wurden 219 mit Torin2 behandelte Eizellen analysiert (Kontrolle: 242 Eizellen).

GV: Germinalvesikel-Stadium; GVBD: germinal vesicle breakdown-Stadium; M I: Metaphase I; Ana I: Anaphase I; Telo I: Telophase I; M II: Metaphase II; path. get.: pathologisch geteilt; DMSO: Dimethylsulfoxid.

5.2.2 Versuchsabschnitt 2b: Ermittlung der Entwicklungskompetenz Torin2- (3 μ M) behandelter Eizellen durch Bestimmung der Blastozystenrate

Zur Bestimmung der Entwicklungskompetenz von Eizellen, die für 24 Stunden unter dem inhibitorischen Einfluss von Torin2 (3 μ M) gereift worden waren, wurden diese Eizellen ebenso wie die als Kontrolle dienenden für 24 Stunden gereiften unbehandelten Eizellen (Kontrolle 24h: dem Reifungsmedium wurde DMSO zugegeben) befruchtet und kultiviert. Pro Versuchsdurchgang (es wurden 4 Versuchsdurchgänge durchgeführt) und Versuchsgruppe (Torin2 3 μ M 24h; Kontrolle 24h) wurden durchschnittlich 100 Eizellen ausgewertet. Insgesamt wurden für diesen Versuchsabschnitt 394 mit Torin2 behandelte Eizellen verwendet (Kontrolle: 341 Eizellen). Anschließend wurde sowohl für die Versuchsgruppen der Torin2-behandelten Eizellen als auch für die Kontrollgruppen der unbehandelten Eizellen die Anzahl der geteilten Eizellen, der entstandenen Blastozyten und der geschlüpften Blastozyten ermittelt und die Teilungsrate (Anzahl der geteilten Eizellen/Gesamtzahl der befruchteten Eizellen), die Blastozystenrate (Anzahl der Blastozysten/Anzahl der geteilten Eizellen) und der Anteil der geschlüpften Blastozysten (Anzahl der geschlüpften Blastozysten/Anzahl der geteilten Eizellen) bestimmt.

Bezüglich der Teilungsrate, der Blastozystenrate und des Anteils der geschlüpften Blastozysten können insgesamt nur geringgradige, statistisch nicht signifikante Unterschiede ($P > 0,05$) zwischen den mit Torin2 behandelten Versuchsgruppen und den Kontrollgruppen festgestellt werden: die Teilungsrate der mit Torin2 gereiften Eizellen beträgt für alle 4 Versuchsdurchgänge zusammengenommen 55,6% (Kontrolle: 54,8%), die Blastozystenrate 29,7% (Kontrolle: 33,2%) und der Anteil der geschlüpften Blastozysten 13,2% (Kontrolle: 12,3%; Abb.18).

Die Morphologie der aus den mit Torin2 gereiften Eizellen entstandenen Blastozysten zeigt keinerlei Abweichungen verglichen mit den Blastozysten der Kontrollgruppen (Abb.17).

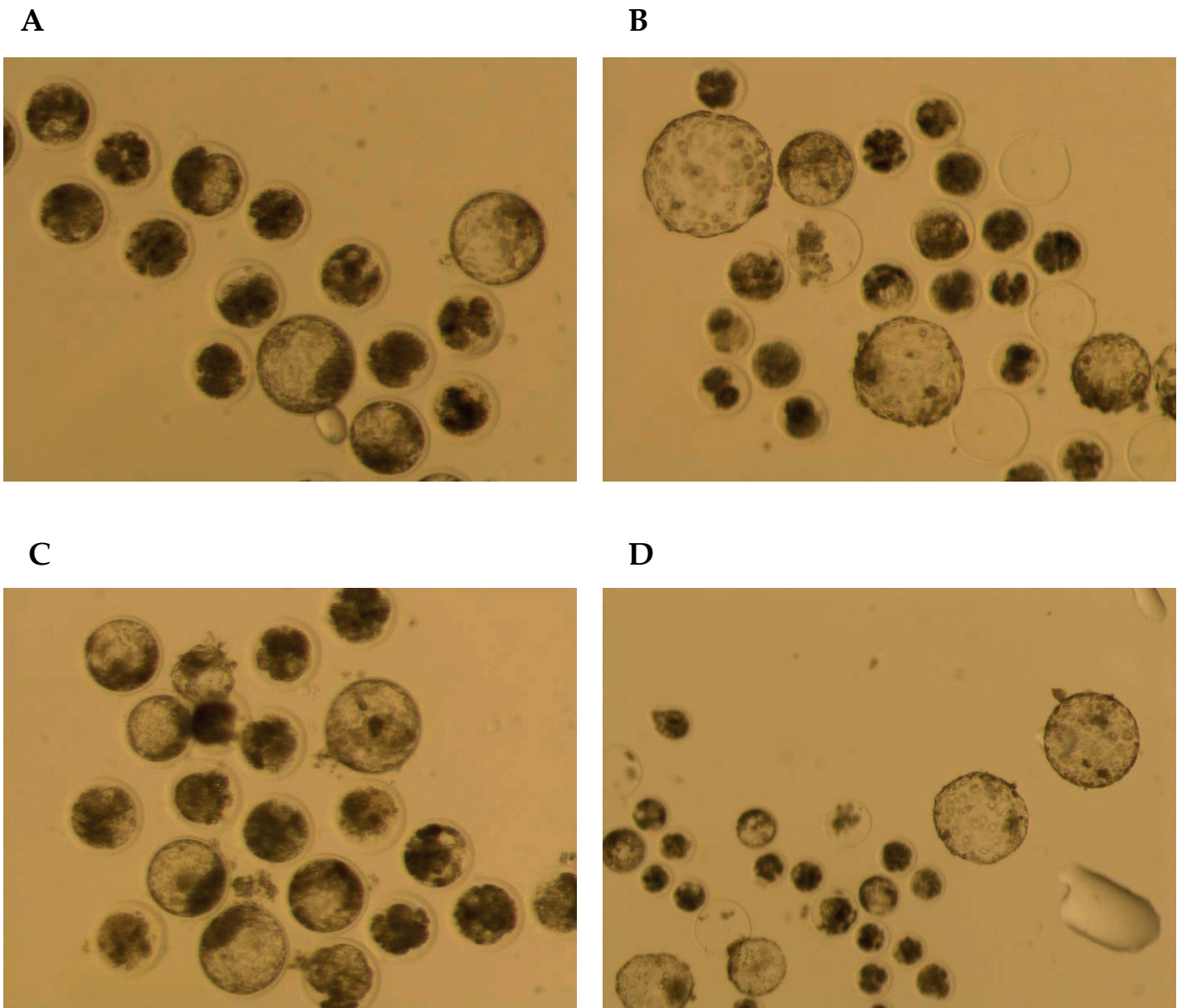


Abb. 17: Embryonen der Versuchs- und Kontrollgruppen in verschiedenen Entwicklungsstadien:

Abgebildet ist jeweils eine Auswahl der Embryonen, die aus den für 24 Stunden mit bzw. ohne Torin2 (3 μ M) gereiften Eizellen entstanden sind, an verschiedenen Tagen der Kultivierung. Bezüglich der Morphologie der Embryonen konnte kein Unterschied zwischen den Torin2- (A, B) und Kontrollgruppen (C, D) beobachtet werden.

A: Embryonen entstanden aus mit Torin2 behandelten Eizellen, Tag 8

B: Embryonen entstanden aus mit Torin2 behandelten Eizellen, Tag 9

C: Embryonen entstanden aus unbehandelten Eizellen, Tag 8

D: Embryonen entstanden aus unbehandelten Eizellen, Tag 9

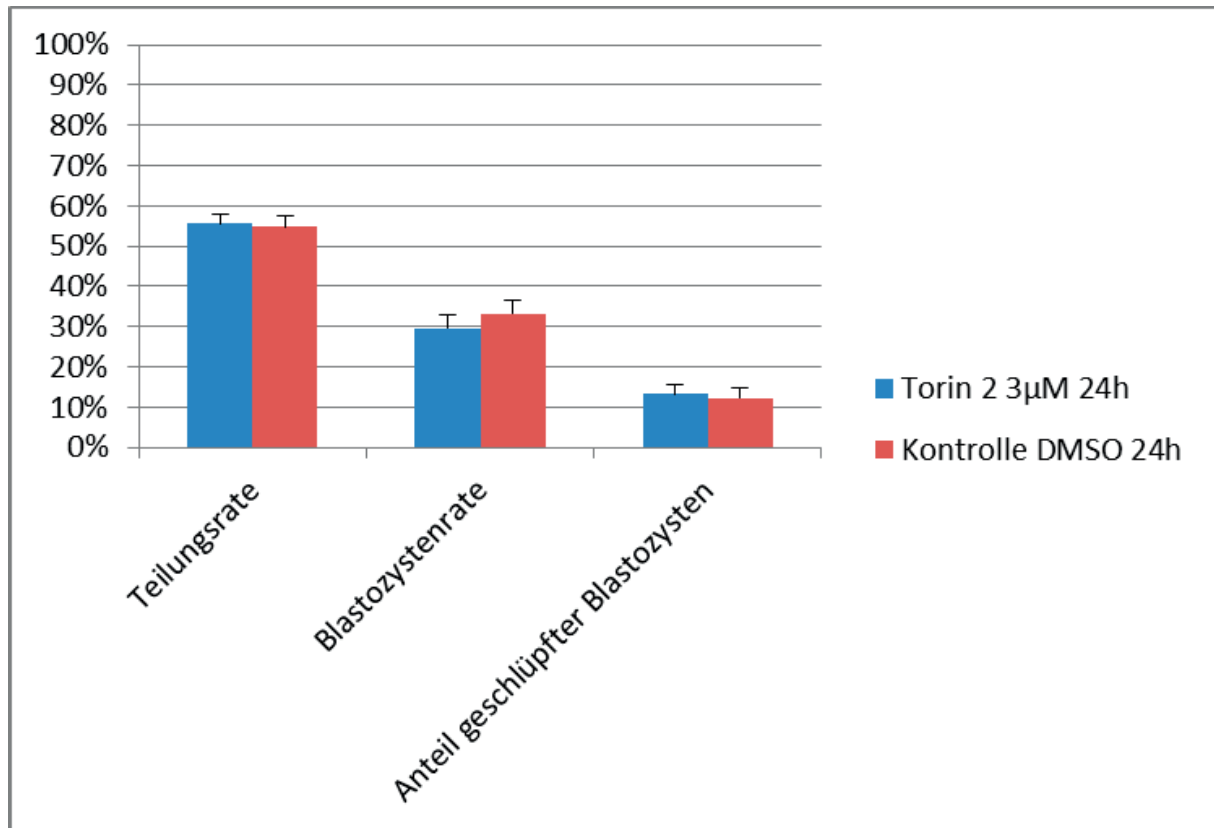


Abb.18: Teilungsrate, Blastozystenrate und Anteil geschlüpfter Blastozysten, ermittelt nach Fertilisation und Kultivierung mit Torin2 (3 µM) gereifter Eizellen:

Nach 24-stündiger Reifung mit bzw. ohne Torin2 (3 µM) wurden die Eizellen befruchtet und kultiviert. Die Anzahl der geteilten Eizellen, der Blastozysten und der geschlüpften Blastozysten wurde bestimmt und die Teilungsrate (Anzahl geteilter Eizellen/Anzahl Eizellen gesamt), die Blastozystenrate (Anzahl Blastozysten/Anzahl geteilter Eizellen) und der Anteil geschlüpfter Blastozysten (Anzahl geschlüpfter Blastozysten/Anzahl geteilter Eizellen) wurden berechnet. Es wurden insgesamt 4 Versuchsdurchgänge durchgeführt. Pro Versuchsdurchgang und Versuchsgruppe (Torin2 3 µM 24h; Kontrolle DMSO 24h) wurden durchschnittlich 100 Eizellen analysiert. Insgesamt wurden für diesen Versuchsabschnitt 394 mit Torin2 behandelte Eizellen verwendet (Kontrolle: 341 Eizellen). Der Standardfehler ist jeweils angegeben.

DMSO: Dimethylsulfoxid.

5.3 Versuchsabschnitt 3: Biochemische Analysen mittels Western-Blot

Die biochemische Untersuchung unreifer (Kontrolle 0h), gereifter unbehandelter (Kontrolle 24h; DMSO wurde dem Reifungsmedium zugegeben) und mit Rapamycin 10 μ M bzw. mit Torin2 3 μ M behandelter Eizellen (Rapamycin 10 μ M 24h; Torin2 3 μ M 24h) erfolgte mittels Western-Blot. Die verwendeten Antikörper waren dabei entweder gegen das zu untersuchende Protein an sich, die phosphorylierte Form dieses Proteins oder gegen die phosphorylierte Form eines Substrats einer zu untersuchenden Proteinkinase gerichtet. Durch letzteres sollten Rückschlüsse auf die Aktivität der jeweiligen Proteinkinase gewonnen werden. Für jeden Antikörper wurden pro Versuchsgruppe (Kontrolle 0h; Kontrolle 24h; Rapamycin 10 μ M 24h; Torin2 3 μ M 24h) je 50 Eizellen analysiert. Eine Ausnahme hiervon stellt die Untersuchung der Substratphosphorylierung verschiedener Kinasen mittels Deca-Probe-Unit dar. Hierbei wurden pro Versuchsgruppe (Kontrolle 0h; Kontrolle 24h; Rapamycin 10 μ M 24h) für mehrere Antikörper zugleich jeweils 150 Eizellen verwendet. Alle durchgeführten Western-Blots wurden zweimal wiederholt.

Die untersuchten Faktoren (BP1, eIF4E, rpS6) zeigen im Verlauf der IVM keine Veränderung bezüglich der in der Eizelle vorhandenen Menge. Diese wird auch durch Rapamycin oder Torin2 nicht beeinflusst (Abb.19A-C).

Bezüglich des Phosphorylierungszustandes werden im Verlauf der IVM allerdings Veränderungen festgestellt. Die Phosphorylierung von BP1 (Thr 37/46), eIF4E (Ser 209) und rpS6 (Ser235/236) nimmt während der 24-stündigen Reifungsphase deutlich zu. Rapamycin beeinflusst dabei keinen der genannten Faktoren in seiner Phosphorylierung, während Torin2 eine Reduzierung aber keine vollständige Hemmung der BP1-Phosphorylierung verursacht. Im Gegensatz dazu hat Torin2 auf die Phosphorylierung von eIF4E und rpS6 keinen Einfluss (Abb.19A-C).

Auch die Substratphosphorylierung der Kinasen PKA, PKB (=Akt), PKC, ATM/ATR, MAPK und der CDKs wird durch Rapamycin nicht inhibiert, genauso wenig wie die Phosphorylierung von Erk 1 und 2 (Abb.20).

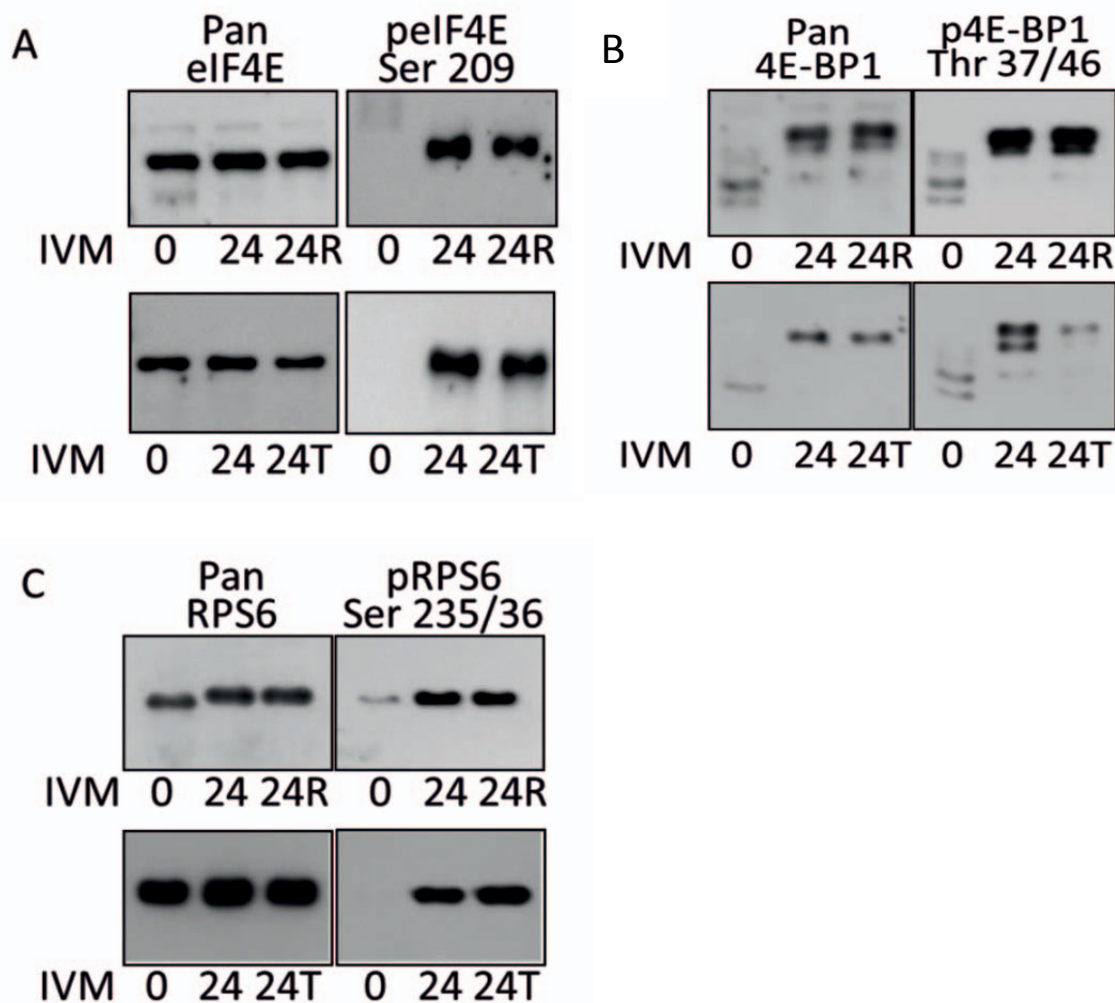


Abb.19: Analyse der Auswirkungen der mechanistic target of rapamycin (mTor)-Inhibitoren Rapamycin und Torin2 auf die Phosphorylierung spezifischer Zielproteine mittels Western-Blotting:

Abgebildet sind Western-Blots, die die vorhandene Menge an eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) (A), eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) (B) und ribosomal protein S6 (rpS6) (C) ermittelt durch Pan-Antikörper (immer in der linken Spalte dargestellt) zeigen, und die entsprechenden Blots, aus denen der Phosphorylierungsstatus von 4E-BP1 (Thr37/46), eIF4E (Ser 209) und rpS6 (Ser 235/236; immer in der rechten Spalte dargestellt) ablesbar ist. Untersucht wurden Eizellen vor Beginn der In-vitro-Maturation (IVM) (0), nach 24 Stunden IVM (24; Zusatz von DMSO) und nach 24-stündiger Behandlung mit Rapamycin 10 μ M (24R) oder Torin2 3 μ M (24T). Für jeden Antikörper wurden pro Versuchsgruppe (Kontrolle 0h; Kontrolle 24h; Rapamycin 10 μ M 24h; Torin2 3 μ M 24h) je 50 Eizellen analysiert. Dieser Versuch wurde zweimal wiederholt, dargestellt sind repräsentative Blots.

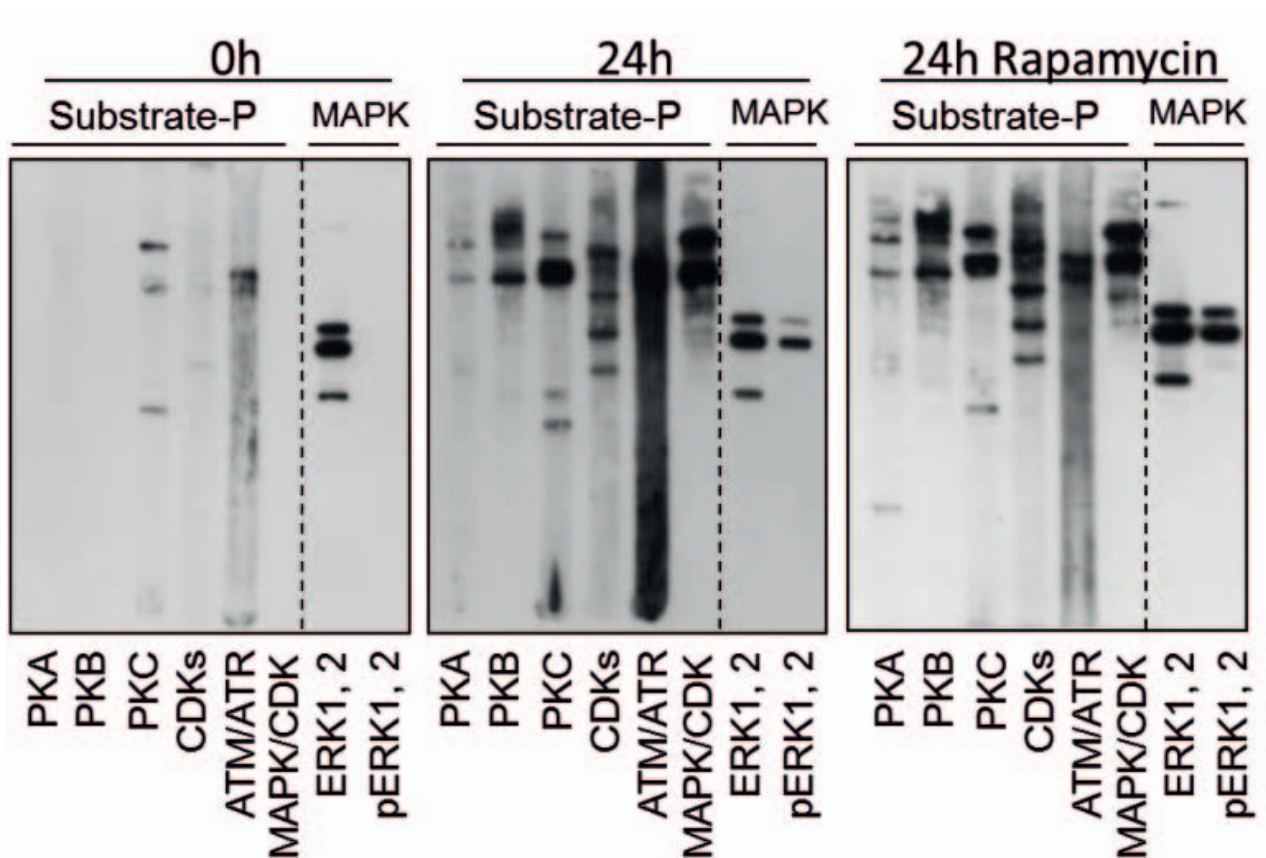


Abb.20: Analyse der Auswirkungen von Rapamycin auf die Substratphosphorylierung verschiedener Kinasen und auf die vorhandene Menge und Phosphorylierung von extracellular-signal regulated kinase 1/2 (Erk 1/2):

Mithilfe der Deca-Probe-Unit wurden Eizellen vor Beginn der In-vitro-Maturation (IVM) (0h), nach 24-stündiger Maturation (24h; Zusatz von DMSO) und nach 24-stündiger Maturation unter dem inhibitorischen Einfluss von Rapamycin (24h Rapamycin) untersucht. Die angewendete Rapamycin-Konzentration betrug dabei 10 μ M. Pro Versuchsgruppe (Kontrolle 0h, Kontrolle 24h, Rapamycin 10 μ M 24h) wurden jeweils 150 Eizellen verwendet. Dieser Versuch wurde zweimal wiederholt, dargestellt sind repräsentative Blots.

PKA: Proteinkinase A; PKB: Proteinkinase B; PKC: Proteinkinase C; CDKs: cyclin-dependent kinases; ATM: ataxia telangiectasia mutated; ATR: ataxia telangiectasia and Rad3-related protein; MAPK: mitogene activated protein kinase.

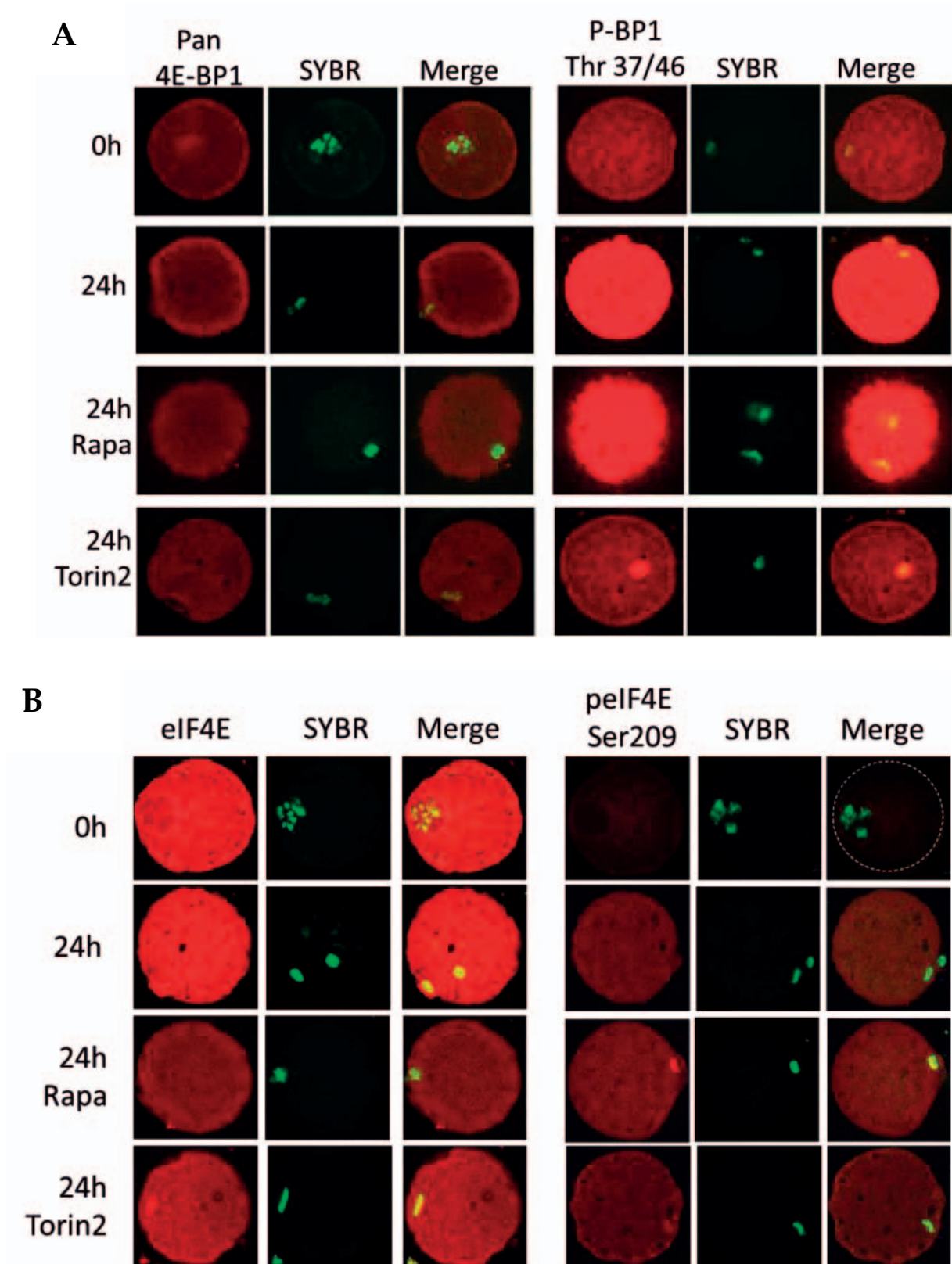
5.4 Versuchsabschnitt 4: Immunhistochemische Analysen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie

Um ausgewählte Faktoren (BP1, eIF4E, mTor, Raptor und Rictor) bezüglich der in der Eizelle vorhandenen Menge, des Phosphorylierungsstatus und der Verteilung innerhalb der Eizelle beurteilen zu können, wurden immunhistochemische Analysen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie durchgeführt. Untersucht wurden dabei sowohl unreife Eizellen (Kontrolle 0h) als auch für 24 Stunden mit oder ohne Inhibitorzusatz gereifte Eizellen (Kontrolle 24h, DMSO wurde dem Reifungsmedium zugegeben; Rapamycin 10 μ M 24h; Torin2 3 μ M 24h). Für jeden Antikörper wurden pro Versuchsdurchgang (es wurden 3 Versuchsdurchgänge durchgeführt) und Versuchsgruppe (Kontrolle 0h; Kontrolle 24h; Rapamycin 10 μ M 24h; Torin2 3 μ M 24h) jeweils ca. 5 Eizellen analysiert. Insgesamt wurden in diesem Versuchsabschnitt 602 Eizellen ausgewertet.

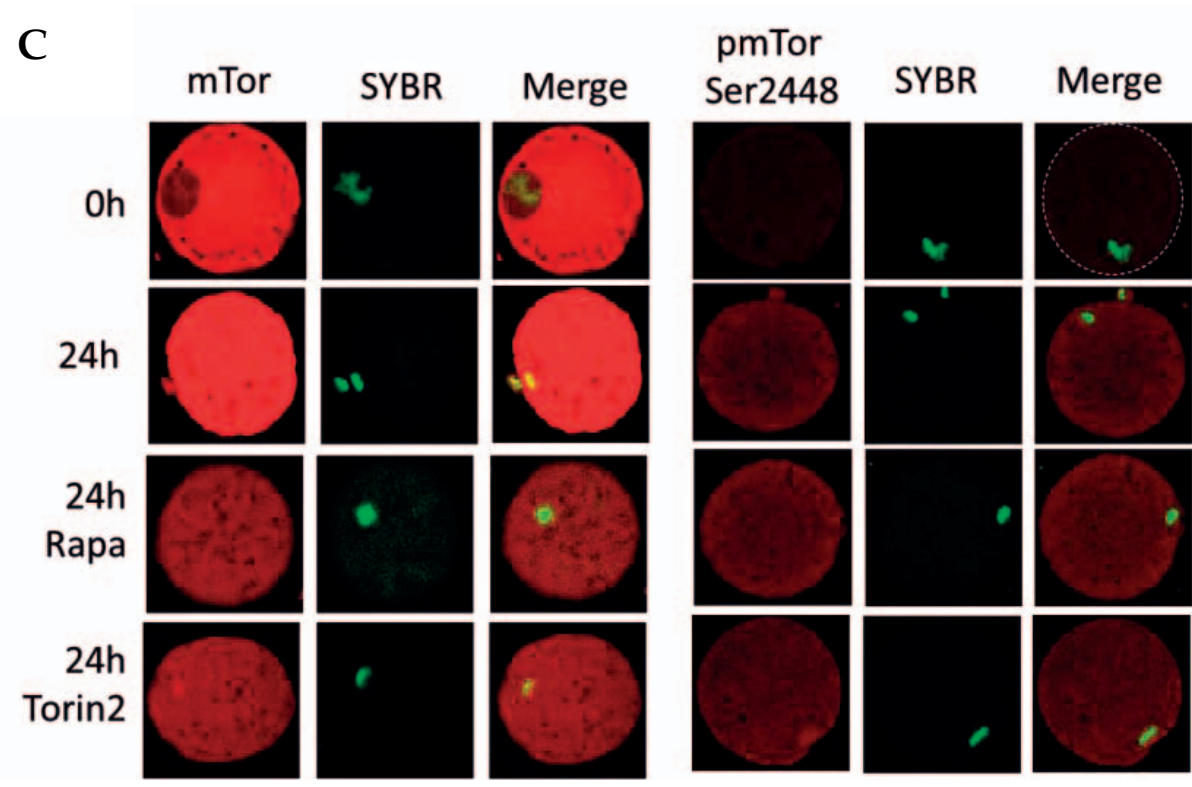
Die Untersuchungen ergaben, dass sich die insgesamt in der Eizelle vorhandene Menge der genannten Faktoren im IVM-Verlauf nicht signifikant verändert und auch durch die Behandlung mit Rapamycin oder Torin2 nicht signifikant beeinflusst wird. Die einzige Ausnahme hiervon ist Rictor, das bei Eizellen im GV-Stadium in geringerer Menge vorliegt als bei für 24 Stunden gereiften Eizellen (Abb.21A-E, Tab.6 siehe 9.6.5, Tab.7 siehe 9.6.5). Wird allerdings die in der Eizelle vorhandene Menge der Faktoren getrennt für verschiedene Lokalisationen innerhalb der Eizelle (Kern, Mitte, Rand) betrachtet, zeigt sich für eIF4E (mäßig), mTor (geringgradig) und Raptor (deutlich) in der Kernregion und für eIF4E und Raptor auch am Rand der Eizelle nach 24-stündiger Maturation eine Steigerung der vorhandenen Menge verglichen mit der in GV-Eizellen vorliegenden Menge (Tab.8 siehe 9.6.5, Tab.10 siehe 9.6.5). Die in der Eizelle vorhandene mTor-Menge wird durch Torin2-Behandlung geringgradig verringert (Tab.6 siehe 9.6.5, Tab.7 siehe 9.6.5).

BP1 (Thr 37/46), eIF4E (Ser 209), mTor (Ser 2448) und Rictor (Thr 1135) werden während der 24-stündigen Reifung phosphoryliert, wohingegen Raptor (Ser 792) in diesem Zeitraum dephosphoryliert wird. Rapamycin zeigt keinerlei Einfluss auf die Phosphorylierung dieser Faktoren, während Torin2 einzig die BP1-Phosphorylierung inhibiert (Abb.21A-E, Tab.6 siehe 9.6.5, Tab.7 siehe 9.6.5). Was das Ausmaß der Inhibition der BP1-Phosphorylierung durch Torin2 angeht, lassen sich bei den einzelnen untersuchten Eizellen Unterschiede beobachten (Abb.22). Die beschriebenen Veränderungen des Phosphorylierungszustandes von BP1 und eIF4E sind in nahezu gleichem Ausmaß sowohl in der Kernregion, als auch in der Mitte und am Rand der Eizelle zu sehen. Im Gegensatz dazu zeigt sich die Änderung des Phosphorylierungsstatus von mTor und Rictor vor allem in der Kernregion und auch am Rand der

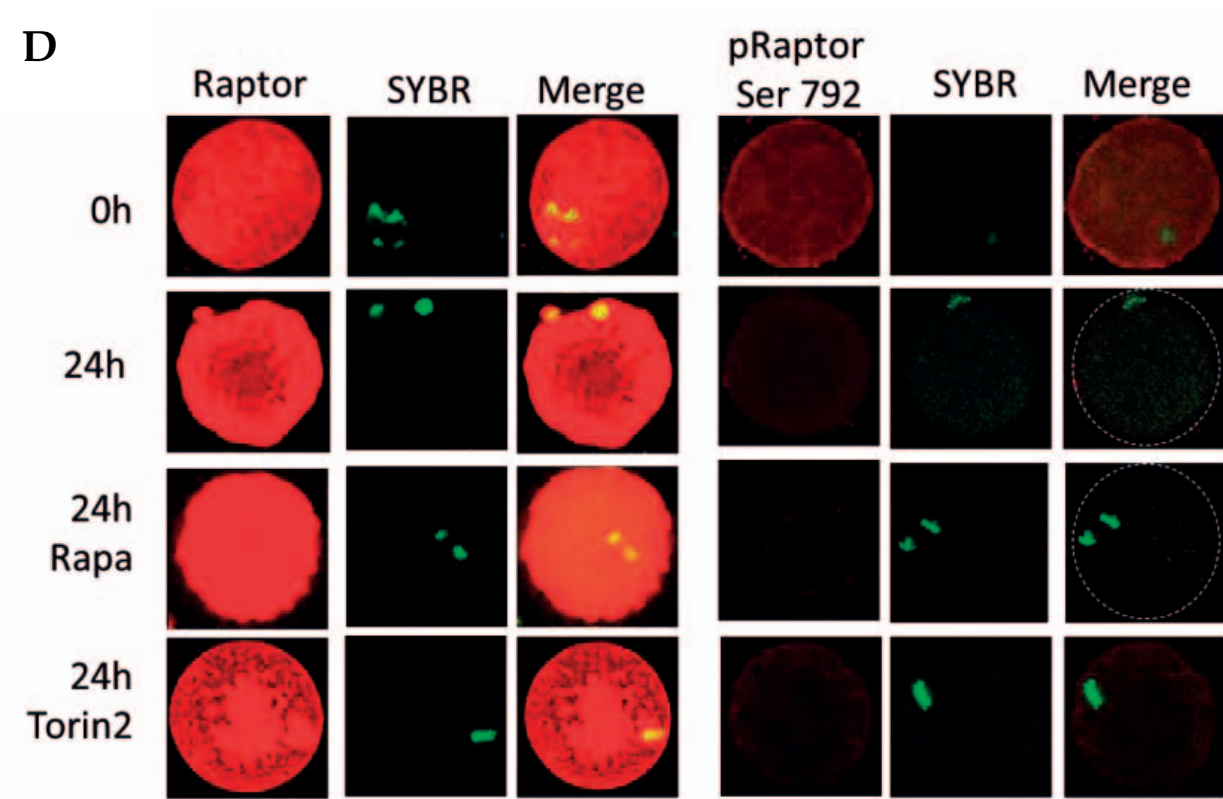
Eizelle, während der bezüglich der Phosphorylierung von Raptor beschriebene Effekt vor allem in der Mitte der Eizelle deutlich wird (Tab.8 siehe 9.6.5, Tab.10 siehe 9.6.5).



C



D



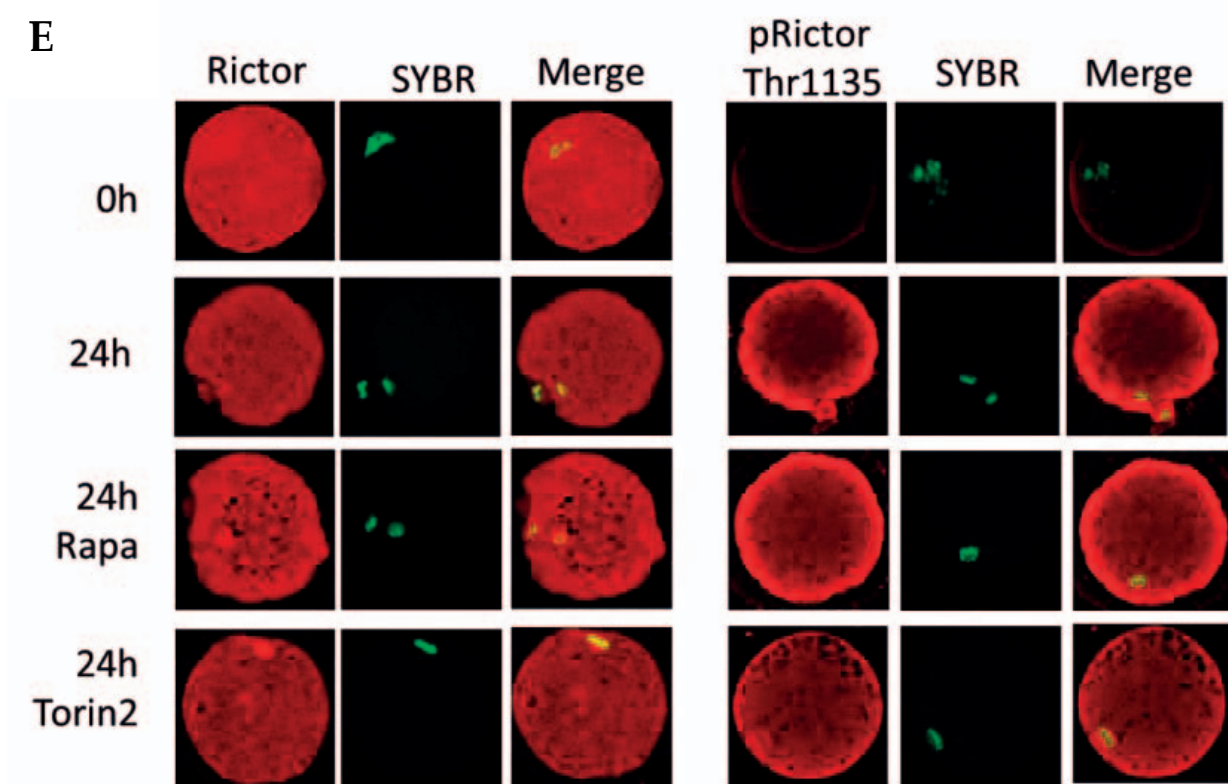


Abb.21: Analyse der Auswirkungen der mechanistic target of rapamycin (mTor)-Inhibierung durch Rapamycin und Torin2 auf verschiedene Zielproteine bezüglich der in der Eizelle vorhandenen Menge, des Phosphorylierungsstatus und der Verteilung innerhalb der Eizelle mittels Laserscanning-Mikroskopie (LSM):

Gezeigt sind die durch den Pan-Antikörper für eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (BP1; **A**), eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E; **B**), mechanistic target of rapamycin (mTor; **C**), regulatory associated protein of mTor (Raptor; **D**) und rapamycin-insensitive companion of mTor (Rictor; **E**) erzielten Resultate (immer links dargestellt) und die Ergebnisse für die phosphorylierten Formen der Proteine (**A**: BP1 an Thr 37/46; **B**: eIF4E an Ser 209; **C**: mTor an Ser 2448; **D**: Raptor an Ser 792; **E**: Rictor an Thr 1135; immer rechts dargestellt). Untersucht wurden Eizellen vor Beginn der In-vitro-Maturation (0h), nach 24-stündiger Maturation (24h; mit DMSO) und nach 24-stündiger Behandlung mit Rapamycin 10 μ M (24h Rapa) oder Torin2 3 μ M (24h Torin2). Die linke Reihe (rot) zeigt die Antikörper-Färbung, die mittlere Reihe (grün) zeigt das mittels SYBR Green Nucleic Acid Gel Stain (SYBR) angefärbte Chromatin und die rechte Reihe zeigt das zusammengefügte Bild (Merge). Für jeden Antikörper wurden pro Versuchsdurchgang (es wurden 3 Versuchsdurchgänge durchgeführt) und Versuchsgruppe (Kontrolle 0h; Kontrolle 24h; Rapamycin 10 μ M 24h; Torin2 3 μ M 24h) jeweils ca. 5 Eizellen analysiert. Insgesamt wurden in diesem Versuchsabschnitt 602 Eizellen ausgewertet. Für jeden Antikörper ist pro Versuchsgruppe eine repräsentative Eizelle dargestellt.

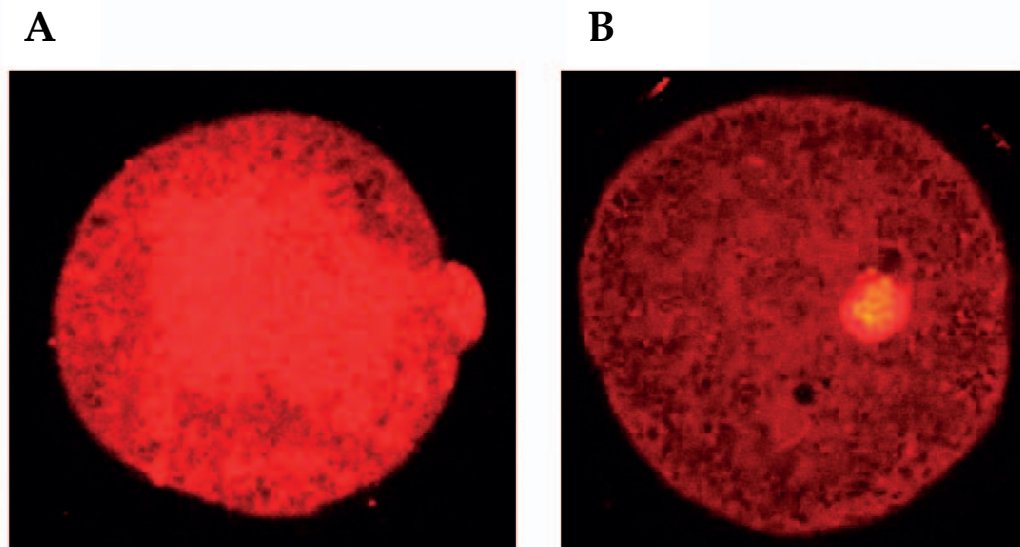


Abb.22: BP1-Phosphorylierung bei Torin2-behandelten Eizellen:

Die Signalintensitäten hervorgerufen durch den gegen phosphoryliertes (an Thr 37/46) eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (BP1) gerichteten Antikörper wurden bei insgesamt 16 für 24 Stunden unter Zusatz von Torin2 (3 μ M) gereiften Eizellen untersucht. Dargestellt sind zwei für die unterschiedlichen Signalintensitäten innerhalb dieser Gruppe von Eizellen repräsentative Eizellen (A, B).

Bei Betrachtung der Lokalisierung der untersuchten Faktoren und ihrer phosphorylierten Formen innerhalb der Eizelle fällt auf, dass die meisten dieser Faktoren sowohl in ihrer unphosphorylierten als auch in ihrer phosphorylierten Form insgesamt bevorzugt in der Kernregion und weniger in der Mitte der Eizelle lokalisiert sind (Tab.9 siehe 9.6.5, Tab.11 siehe 9.6.5).

BP1, eIF4E, Raptor und Rictor zeigen bei Eizellen im GV-Stadium eher keine bevorzugte Lokalisierung, nach 24-stündiger Reifung lässt sich jedoch ein vermehrtes Vorkommen in der Kernregion und am Rand der Eizelle feststellen (Tab.10 siehe 9.6.5, Tab.12 siehe 9.6.5). Bei einigen mit Torin2 behandelten Eizellen erzeugt der Raptor-Antikörper auch im Zytoplasma hohe Signalintensitäten (Abb.21D). mTor ist bei GV-Eizellen in der Kernregion in verringerter Menge zu finden, nach 24-stündiger Reifung ist es gleichmäßig innerhalb der Eizelle verteilt (Abb.21C, Tab.10 siehe 9.6.5, Tab.12 siehe 9.6.5). Phosphoryliertes BP1 (P-BP1) ist sowohl bei unreifen als auch bei

gereiften Eizellen vermehrt in der Kernregion zu finden (Tab.10 siehe 9.6.5, Tab.12 siehe 9.6.5). Dabei ist insbesondere eine bevorzugte Lokalisierung um die Metaphase I-Platte Torin2-behandelter Eizellen auffällig (Abb.21A, Tab.10 siehe 9.6.5, Tab.12 siehe 9.6.5). P-eIF4E liegt bei Eizellen im GV-Stadium eher in der Mitte der Eizelle und weniger in der Kernregion vor, während es nach 24-stündiger Reifung sowohl in der Mitte als auch in der Kernregion der Eizelle lokalisiert ist. Auch für P-eIF4E zeigt sich eine bevorzugte Lokalisierung um die Metaphase I-Platte Torin2-behandelter Eizellen (Tab.10 siehe 9.6.5, Tab.12 siehe 9.6.5). Wie mTor ist P-mTor bei GV-Eizellen ebenfalls nur in verringerter Menge in der Kernregion zu finden, bei gereiften Eizellen ist dies nicht der Fall (Tab.10 siehe 9.6.5, Tab.12 siehe 9.6.5). P-Raptor und P-Rictor liegen bei Eizellen im GV-Stadium gleichmäßig verteilt vor, während nach 24-stündiger Reifung die Signalintensitäten für beide Antikörper in der Kernregion und am Rand der Eizelle deutlich höher sind als in der Mitte der Eizelle (Abb.21D,E, Tab.10 siehe 9.6.5, Tab.12 siehe 9.6.5).

6 Diskussion

6.1 Bezug zu vorangegangenen Studien

Die vorliegende Arbeit stellt eine Fortführung der Forschungsarbeit von Mayer et al. (2014) dar. Wie auch bei Mayer et al. erreichten 70-80% der für 24 Stunden ohne Inhibitor, aber mit Zusatz einer entsprechenden Menge DMSO, das als Lösungsmittel für die Inhibitoren diente, gereiften Eizellen die M II-Phase. Dieser Prozentsatz ist relativ niedrig verglichen mit den üblicherweise unter Standard-Bedingungen erzielten M II-Raten von mehr als 90%, ist aber dadurch erklärbar, dass serum-freies, BSA-supplementiertes Medium ohne Zusatz von follikelstimulierendem Hormon (FSH) für die Maturation verwendet wurde, da Serum und FSH jeden inhibitorischen Effekt behindern (Kubelka et al. 2000). Außerdem wurde dem Reifungsmedium DMSO zugesetzt. Die zugegebene DMSO-Menge wurde zwar möglichst niedrig gehalten (die DMSO-Konzentration im Maturationsmedium betrug 1,25 % v/v), in einer Studie an Rindereizellen wurde jedoch nachgewiesen, dass sich DMSO selbst in geringen Konzentrationen (0,4 bzw. 1 % v/v) negativ auf die In-vitro-Maturation und die anschließende embryonale Entwicklung auswirken kann (Avery u. Greve 2000).

Zur Bestätigung der inhibitorischen Torin2-Wirkung im Hinblick auf die Befruchtungsversuche wurde eine morphologische Untersuchung Torin2-behandelter Eizellen durchgeführt. Diese ergab, wie die Studie von Mayer et al., dass nach 24-stündiger Maturation von Rindereizellen unter dem inhibitorischen Einfluss von Torin2 ca. 60% der Oozyten in der M I-Phase arretiert werden, während 20-30% der Eizellen den Reifungsprozess trotz Torin2-Behandlung unbeeinflusst bis zu M II-Phase durchlaufen. Bei der Behandlung von Eizellen muss berücksichtigt werden, dass die Inhibitoren über die Zona pellucida in die relativ große Eizelle eindringen müssen. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, verglichen mit somatischen Zellen, deutlich höhere Konzentrationen (10- 100-fach höher) anzuwenden, um einen Effekt beobachten zu können, was das Risiko ungewollter Nebeneffekte steigert. Daher ist es wichtig, die niedrigste Konzentration, durch die deutliche und reproduzierbare Auswirkungen erzielt werden können, zu ermitteln. Diese Konzentration wurde für die Torin2-Behandlung von Rindereizellen von Mayer et al. bestimmt, sie beträgt in diesem Zusammenhang 3 μ M.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten biochemischen und immunhistochemischen Analysen zeigen, dass die untersuchten Faktoren (wird das Vorkommen in der Eizelle als Ganzes betrachtet) mit Ausnahme von Rictor, das in GV-Eizellen insgesamt in geringeren Mengen vorliegt, während der In-vitro-Maturation in praktisch unveränderter Menge innerhalb der Eizelle vorhanden sind. BP1, eIF4E, mTor und

Rictor werden im Verlauf der Maturation phosphoryliert, während Raptor in diesem Zeitraum dephosphoryliert wird. Dabei hat Rapamycin keinerlei Einfluss auf diese Phosphorylierungsvorgänge und Torin2 vermindert spezifisch die BP1-Phosphorylierung an Thr37/46. Diese Resultate stimmen ebenfalls mit den Ergebnissen früherer biochemischer Untersuchungen überein (Mayer et al. 2014; Tomek et al 2012; Siemer et al. 2009; Ellederova et al. 2006; Tomek et al 2002a).

6.2 Versuchsabschnitt 1: Morphologische Beurteilung mit Rapamycin behandelte Rindereizellen

Nach Behandlung von Rindereizellen mit Rapamycin in einer Konzentration von 100 nM bis 1 μ M konnten keine stabilen, reproduzierbaren Effekte weder auf morphologischer Ebene noch auf molekularer Ebene (Phosphorylierung von Zielmolekülen) beobachtet werden (nicht veröffentlichte Daten). Eine Untersuchung an Mauseizellen brachte dagegen zu Tage, dass Rapamycin in einer hohen Konzentration (10 μ M) eine Hemmung der für Eizellen charakteristischen asymmetrischen Zellteilung (einschließlich der Ausschleusung des ersten Polkörpers), ein Fehlschlagen der dieser zugrunde liegenden Eizellpolarisierung, dabei vor allem der peripheren Spindelmigration, und somit abnormale M II-ähnliche Eizellen verursacht (Lee et al. 2012).

Daraus ergab sich die Fragestellung, ob Rapamycin in dieser hohen Konzentration auch bei Rindereizellen Auswirkungen zeigen würde, weswegen eine morphologische Untersuchung von Eizellen, die während ihrer 24-stündigen Maturationsphase einer Rapamycin-Konzentration von 10 μ M ausgesetzt waren, durchgeführt wurde. Tatsächlich konnte auch bei Rindereizellen nach 24-stündiger Reifung in Medium, das Rapamycin in einer Konzentration von 10 μ M enthielt, ein verglichen mit der Kontrollgruppe erhöhter Anteil an symmetrisch geteilten, M II-ähnlichen Eizellen beobachtet werden. Mit 20-25% war der Anteil an Eizellen mit abnormaler Zellteilung allerdings deutlich niedriger als der im Rahmen der Studie an Mauseizellen ermittelte, der bei ungefähr 50% lag. Bei der Maus wurde bei einem Großteil der Eizellen ($55 \pm 20\%$) trotz Rapamycin-Behandlung eine Polkörper-Ausschleusung gesehen (Lee et al. 2012). Dies stimmt mit den hier erzielten Ergebnissen überein, auch beim Rind zeigten um die 50% der mit Rapamycin behandelten Eizellen dennoch asymmetrisch segregiertes Chromatin und der erste Polkörper wurde ausgeschleust. Bei einem kleinen Anteil (um die 4%) der unbehandelten Rindereizellen lag das Chromatin nach 24-stündiger Reifung ebenfalls symmetrisch segregiert vor, was wiederum den für Mauseizellen ermittelten Wert (bis zu 2%; Lee et al. 2012) übersteigt. Die Tatsache, dass symmetrisch geteilte Eizellen auch innerhalb der Kontrollgruppe vorka-

men, kann damit erklärt werden, dass bei Eizellen niedriger Qualität ebenfalls eine Störung der asymmetrischen Teilung zu finden ist (Lee et al. 2012).

Die unterschiedliche Ausprägung der beschriebenen Effekte bei Rinder- und Mauseizellen kommt vermutlich dadurch zustande, dass die Größe und besonders die Beschaffenheit der Zona pellucida bei den Eizellen dieser Spezies verschieden ist. Dies macht sich auch bei der Anwendung niedrigerer Rapamycin-Konzentrationen bei Maus- und Rindereizellen bemerkbar. So wurden nach der Behandlung von Mauseizellen mit 100 nM Rapamycin sowohl Auswirkungen auf die Morphologie der Eizellen (schwere Fehler bei der Chromosomen-Aufteilung und bei der Ausbildung der Spindel trotz Weiterentwicklung der Eizellen durch die M I-Phase hindurch und Ausschleusung des ersten Polkörpers) als auch auf molekulare Mechanismen, die während der Maturation von Bedeutung sind, beobachtet (Susor et al. 2015). Im Gegensatz dazu wurden, wie bereits weiter oben erwähnt, bei Rindereizellen, die Rapamycin-Konzentrationen von 100 nM bis 1 μ M ausgesetzt waren, keinerlei Effekte gesehen (nicht veröffentlichte Daten). Zwar stimmen die beiden erwähnten Studien (Susor et al. 2015; Lee et al. 2012) an Mauseizellen insofern überein, dass Rapamycin die Spindelbildung und Chromosomensegregation während der Meiose stört und die Weiterentwicklung durch die M I-Phase hindurch nicht verhindert, allerdings berichten Lee et al. von einer Inhibierung der Polkörper-Extrusion, wohingegen laut Susor et al. die Polkörper-Extrusion nicht beeinflusst wird. Diese Diskrepanz lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass Rapamycin jeweils in verschieden hoher Konzentration angewendet wurde.

Die vorliegenden Ergebnisse werfen die Frage auf, welche molekularen Mechanismen der beobachteten Hemmung der Ausschleusung des ersten Polkörpers bei einem Teil der mit Rapamycin behandelten Rindereizellen zugrunde liegt. Dies wird in nachfolgenden Abschnitten dieser Arbeit (6.4 und 6.5) genauer erörtert.

6.3 Versuchsabschnitt 2: Ermittlung der Entwicklungskompetenz Torin2-behandelter Rindereizellen

Unter Standard-IVP-Bedingungen erreichen um die 90% der Eizellen nach 24-stündiger IVM das M II-Stadium (Rodrigues-Cunha et al. 2016), es können von diesen Eizellen aber nur 30-40% transfertaugliche Blastozysten produziert werden (Wrenzycki u. Stinshoff 2013). Dies führt zu der Annahme, dass bei manchen Eizellen möglicherweise zwar die Kernreifung, nicht aber die zytoplasmatische Reifung optimal abläuft. Dies würde bedeuten, dass diese Asynchronität der nukleären und zytoplasmatischen Reifung während der In-vitro-Maturation (zusammen mit anderen Faktoren) für die niedrigen Blastozystenraten verantwortlich sein könnte. Zur

Beurteilung der zytoplasmatischen Reifung können biochemische und/oder molekulare Analysen angewendet werden, die untersuchten Eizellen sind allerdings im Anschluss für die Embryonen-Produktion meist untauglich.

Zur Charakterisierung der zytoplasmatischen Reifung wurden bereits zahlreiche Versuche durchgeführt, in vielen Fällen unter Verwendung verschiedener Kinase-Inhibitoren (Susor et al. 2015; Ellederova et al. 2008; Bhojwani et al. 2006; Tomek u. Smiljakovic 2005; Tomek et al. 2002a; Kubelka et al. 2000). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mit dem mTor-Inhibitor Torin2 behandelte Eizellen sowohl morphologisch untersucht als auch fertilisiert und im Anschluss kultiviert. Bei der morphologischen Untersuchung anhand der Chromatinkonfiguration lag der prozentuale Anteil der in der M I-Phase arretierten Eizellen für die Torin2-Versuchsgruppen der verschiedenen Versuchsdurchgänge bei 50-70%, 20-30% der Eizellen hatten sich bis zur M II-Phase weiterentwickelt. Dies führte zu der These, dass es sich bei den Eizellen, die es schaffen, die durch Torin2 verursachte Arretierung in der M I-Phase zu überwinden, um jene Subpopulation von Eizellen handeln könnte, die trotz Behandlung mit dem Akt-Kinase-Inhibitor SH6 nicht wie die anderen Eizellen in der M I-Phase arretiert werden, sondern sich bis zur M II-Phase weiterentwickeln (Tomek u. Smiljakovic 2005). Möglicherweise sind dies außerdem diejenigen Eizellen, die bereits im GV-Stadium eine höhere basale Akt-Aktivität und daher bereits von vorn herein ein höheres Entwicklungspotential besitzen (Torner et al. 2008). Dieses höhere Entwicklungspotential könnte eine Erklärung für das Überwinden der Arretierung liefern (Tomek u. Smiljakovic 2005). Zu dieser These passt, dass Akt upstream von mTorc1 agiert (Sancak et al. 2007), das wiederum den Phosphorylierungsstatus von BP1, der für ein ungestörtes Voranschreiten der Oozytenreifung eine wichtige Rolle spielt (Mayer et al. 2014), steuert (Dowling et al. 2010). Deswegen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, ob und in welchem Umfang Torin2 behandelte Eizellen das Potential besitzen, sich zu Blastozysten weiterzuentwickeln.

Die Teilungsrate der für 24 Stunden ohne Inhibitorzusatz gereiften Eizellen der Kontrollgruppen betrug durchschnittlich 55%, was deutlich niedriger ist als die üblicherweise unter Standard-Bedingungen erreichten Teilungsraten von um die 90% (Lee et al. 2016; Kassens et al. 2015). Die erzielten Teilungsraten können aber dadurch erklärt werden, dass bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen die Eizellen nicht unter Standardbedingungen gereift wurden (genauer erläutert in 6.1). Mit durchschnittlich 56% war die Teilungsrate der Torin2-Gruppe unerwartet hoch. Da sich nur 20-30% der Torin2-behandelten Eizellen zur M II-Phase weiterentwickeln und damit teilungsfähig werden, wäre hier eine deutlich niedrigere Teilungsrate als in der Kontrollgruppe zu erwarten gewesen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass ein bestimmter Anteil an Eizellen nach Einbringen in

das Befruchtungsmedium (dies erfolgte unmittelbar im Anschluss an die 24-stündige Reifungsphase) verspätet doch noch die M II-Phase erreichte. Dies wäre allerdings widersprüchlich zu den Ergebnissen von Mayer et al. (2014), wonach die Reduzierung der BP1-Phosphorylierung durch Torin2 zwar reversibel ist, die Arretierung in der M I-Phase jedoch nicht. Andererseits unterscheidet sich die weitere Vorgehensweise dieser Studie insofern, dass die Eizellen nach der Maturation unter Torin2-Einfluss nicht in Befruchtungsmedium verbracht, sondern für weitere 24 Stunden in Torin2-freiem Maturationsmedium gereift und anschließend anhand der Chromatin-konfiguration morphologisch analysiert wurden (48h nach Beginn der Maturation). Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit wurde die Teilungsrate am zweiten Tag der Kultivierung (etwas weniger als 72 Stunden nach Beginn der Maturation) beurteilt. Aussagen über den Entwicklungsstand der Eizellen im Zeitraum zwischen dem Einsetzen in das Befruchtungsmedium und der Beurteilung der Teilungsrate können nicht getroffen werden, da die Eizellen in diesem Zeitraum nicht morphologisch untersucht wurden. Um diesen Sachverhalt zu klären, müssten weitergehende Untersuchungen über den genauen Verlauf der Entwicklung der Eizellen im genannten Zeitrahmen durchgeführt werden. Die Blastozystenrate der Kontrollgruppen betrug 30-40%, was für die In-vitro-Produktion von Embryonen im üblichen Bereich liegt (Wrenzycki u. Stinshoff 2013).

Die hier durchgeführten Versuche zeigen, dass mit Torin2 behandelte Rindereizellen die Fähigkeit besitzen, sich zu Blastozysten weiterzuentwickeln. Dies stärkt die These, dass die 20-30% der Torin2-behandelten Eizellen, die sich trotz 24-stündiger Reifung unter Torin2-Einfluss zur M II-Phase weiterentwickeln, diejenigen Eizellen sein könnten, die eine erhöhte basale Akt-Aktivität und eine höhere Entwicklungskompetenz als andere Eizellen besitzen. Für eine Bestätigung dieser Hypothese müssten allerdings weitergehende Untersuchungen durchgeführt werden (genauer erläutert in 6.6.).

6.4 Versuchsabschnitt 3: Biochemische Analysen

Um abzuklären, welche molekularen Veränderungen den infolge der Inhibitorbehandlungen (Rapamycin 10 μ M, Torin2 3 μ M) beobachteten morphologischen Erscheinungen zugrunde liegen, und um weitere Erkenntnisse über molekulare Mechanismen, die für die Maturation von Rindereizellen von Bedeutung sind, zu erlangen, wurden unter anderem biochemische Analysen mittels Western-Blot durchgeführt. Eine Asynchronität zwischen nukleärer und zytoplasmatischer Reifung ist neben anderen Faktoren mit hoher Wahrscheinlichkeit für die niedrigen Blastozystenraten in Standard-IVP-Systemen verantwortlich. Neue Erkenntnisse über molekulare

Vorgänge, die im Zuge der zytoplasmatischen Reifung stattfinden, können zu einer Verbesserung dieser Systeme beitragen. Dies trug zur Zielsetzung eines besseren Verständnisses der zytoplasmatischen Reifung bei. Spezifische mTor-Inhibierung durch membrangängige Hemmstoffe wie Rapamycin und Torin2 kann als Mittel zur Erforschung dieser Asynchronität dienen, da Rapamycin und Torin2 einen unterschiedlichen Einfluss auf die Chromatin-Konfiguration und den Phosphorylierungsstatus zytoplasmatischer Faktoren haben, und kann einen Beitrag zum Erkenntnisgewinn bezüglich bestimmter Signalkaskaden leisten. Die Wirkung der Inhibitoren ist speziesspezifisch, was eine klare Einschränkung der hier verwendeten Methodik darstellt. Nichtsdestotrotz kann die mTor-Inhibierung durch Substanzen wie Rapamycin und Torin2 ein wertvolles Werkzeug zur Erforschung der nukleären und zytoplasmatischen Reifung von Eizellen sein.

Die biochemischen Untersuchungen ergaben, dass die Faktoren eIF4E und BP1 nach Ende der Maturationsphase (24h) in der gleichen Menge innerhalb der Eizelle vorliegen wie vor Beginn der Maturationsphase (0h) und dass eIF4E und BP1 im Laufe der Maturation phosphoryliert werden. Der Phosphorylierungszustand von eIF4E während der IVM (0h: hypophosphoryliert, 10h: teils hypo-, teils hyperphosphoryliert, 24h: hyperphosphoryliert) passt zu der Erkenntnis, dass bei Rindereizellen die höchsten Translationsraten zur Zeit des GVBD und in der M I-Phase zu finden sind (um die 10h nach IVM-Beginn), während sowohl im GV-Stadium (0h) als auch im M II-Stadium (24h) nur basale Translationsraten auftreten (Smiljakovic et al. 2003; Tomek et al. 2002a; Tomek et al. 2002b), ausgehend von der Annahme, dass weder der phosphorylierte, noch der unphosphorylierte Faktor per se, sondern der Turnover (der Wechsel zwischen der hypo- und der hyperphosphorylierten Form) der eIF4E-Phosphorylierung steigende Translationsraten bewirkt (Tomek u. Wollenhaupt 2012; Scheper u. Proud 2002).

Im Gegensatz dazu kann der Phosphorylierungszustand von BP1 während der IVM (0h: hypophosphoryliert, 10h: teils hypo-, teils hyperphosphoryliert, 24h: hyperphosphoryliert) angesichts der Tatsache, dass hypophosphoryliertes BP1 vermehrt an eIF4E bindet, eIF4G von der Bindung an die gemeinsame dorsale Bindungsstelle an eIF4E abhält, es so aus der Komplexbildung mit eIF4E verdrängt und somit die eIF4F-Komplexbildung inhibiert (Siemer et al. 2009; Susor et al. 2008; Volpon et al. 2006; Duncan u. Song 1999; Lin et al. 1995), zwar eine Erklärung für die basalen Translationsraten zu Beginn der Maturation (0h), nicht aber für die niedrigen Proteinsyntheseraten am Ende der Reifungsphase (24h) liefern.

Durch Torin2 wird die Phosphorylierung von eIF4E nicht beeinflusst, die Phosphorylierung von BP1 an Thr37/46 dagegen reduziert. Dieses Ergebnis ist auch auf molekularer Ebene nachvollziehbar, da BP1 ein bekanntes mTor-Substrat ist (Susor et al. 2015;

Liu et al. 2013; Hou et al. 2012) und Active-site-Inhibitoren wie Torin2 die mTor-Funktionen vollständig inhibieren (Livingstone u. Bidinosti 2012; Feldman et al. 2009; Thoreen et al. 2009). Die eIF4E-Phosphorylierung wird dagegen über die MAPK-Signalkaskade gesteuert (Hay 2010; Tomek et al. 2002a; Scheper et al. 2001), auf die der mTor-Inhibitor Torin2 keinen Einfluss hat. Es wird allerdings auch berichtet, dass die eIF4E-Phosphorylierung bei somatischen Zellen durch mTor-Inhibierung, verursacht durch den Active-site-Inhibitor PP242, indirekt reduziert wird (Müller et al. 2013). Dies wurde darauf zurückgeführt, dass Mnk, die Kinase, die für die eIF4E-Phosphorylierung verantwortlich ist, an eIF4G bindet, dass diese Bindung für ein Stattfinden der eIF4E-Phosphorylierung unabdingbar ist (Scheper et al. 2001; Pyronnet 2000; Waskiewicz et al. 1999) und dass ein durch die mTor-Inhibierung hervorgerufenenes vermehrtes Vorliegen von BP1 in der hypophosphorylierten Form zu einer Verdrängung von eIF4G aus der Bindung an eIF4E und damit zu einer verringerten Phosphorylierungsaktivität von Mnk führt (Müller et al. 2013). Im Gegensatz dazu sagt eine andere Studie an somatischen Zellen, bei der unter anderem ebenfalls ein mTor-Active-site-Inhibitor, nämlich Torin1, verwendet wurde, aus, dass für die eIF4E-Phosphorylierung trotz Abhängigkeit von Mnk die Bindung von eIF4E an eIF4G und damit die eIF4F-Komplexbildung nicht erforderlich ist (Hall et al. 2014), was mit den Ergebnissen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche (keine Inhibierung der eIF4E-Phosphorylierung durch Torin2) in Einklang steht. Diese widersprüchlichen Ergebnisse können eventuell dadurch erklärt werden, dass eine durch m-Tor-Inhibierung verursachte Reduzierung der eIF4E-Phosphorylierung vermutlich vor allem bei Zellen, die hauptsächlich Mnk2 enthalten, eine Rolle spielt, da Mnk2 eine hohe basale Aktivität besitzt, die durch MAPK-Signalgebung kaum verstärkt wird (Stead u. Proud 2013; Ellederova et al. 2008; Parra et al. 2005) und da die eIF4E-Phosphorylierung daher in solchen Zellen primär über die eIF4F-Komplexbildung gesteuert wird (Scheper u. Proud 2002). Bei Eizellen hingegen ist für die eIF4E-Phosphorylierung eher Mnk1, dessen Aktivität durch die MAPK-Signalgebung stark beeinflusst wird, als Mnk2 von Bedeutung (Ellederova et al. 2008), sodass neben der eIF4F-Komplexbildung ein zweiter Mechanismus für die Steuerung der eIF4E-Phosphorylierung (Steuerung über MAPK-Signalgebung) vorhanden ist (Scheper u. Proud 2002) und dem über die eIF4F-Komplexbildung mediierten Effekt auf die eIF4E-Phosphorylierung keine Bedeutung zukommt.

Die durch Torin2 reduzierte BP1-Phosphorylierung kann eine Erklärung für die infolge einer 24-stündigen Maturation in Torin2-haltigem Medium im Rahmen der morphologischen Untersuchungen beobachtete Arretierung der Eizellen in der MI-Phase liefern, da vermehrt in der hypophosphorylierten Form vorliegendes BP1 in höherem Maße an eIF4E binden kann, was zu einer Verringerung der eIF4E-eIF4G-

Bindung und damit zu einer Abnahme der eIF4F-Komplexbildung führt (Siemer et al. 2009; Susor et al. 2008; Duncan u. Song 1999; Lin et al. 1995). Weniger aktive eIF4F-Komplexe haben eine Abnahme der Translationsraten zur Folge (Siemer et al. 2009; Raught u. Gingras 1999). Für einen ungestörten Ablauf der Oozytenreifung wird aber Proteinsynthese benötigt (Susor et al. 2015; Ferreira et al. 2009), somit ist es durchaus plausibel, dass verminderte Translationsraten eine Arretierung in der Entwicklung zur Folge haben.

Im Gegensatz dazu können die durchgeführten biochemischen Analysen keine Erklärung für die durch Rapamycin (10 μ M) verursachten morphologischen Veränderungen liefern. Rapamycin bewirkt keine Veränderung der eIF4E-Phosphorylierung, was dadurch erklärbar ist, dass es sich bei Rapamycin um einen mTor-Inhibitor handelt, eIF4E aber über die MAPK-Signalkaskade phosphoryliert wird (Hay 2010; Tomek et al. 2002a; Scheper et al. 2001). Es existieren allerdings Berichte, dass Rapamycin bei bestimmten somatischen Zelltypen über eine Beeinflussung von Mnk2 eine Steigerung der eIF4E-Phosphorylierung bewirkt, wobei der genaue Mechanismus, der dieser Erscheinung zugrunde liegt, unklar ist (Eckerdt et al. 2014; Stead u. Proud 2013; Wang et al. 2007; Goggin et al. 2004). Warum dies bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen nicht beobachtet wurde, ist unklar. Möglicherweise spielt dabei eine Rolle, dass bei den hier vorgestellten Untersuchungen ein anderes Untersuchungsmaterial (Rindereizellen) und eine andere Rapamycin-Konzentration verwendet wurden.

Auch auf die BP1-Phosphorylierung an Thr 37/46 zeigte Rapamycin in einer Konzentration von 10 μ M keine Auswirkungen. Dies stimmt mit den Ergebnissen einer Studie an somatischen Zellen überein, bei der ebenfalls eine Rapamycin-Konzentration von 10 μ M verwendet wurde (McMahon et al. 2002). Der Einfluss von Rapamycin auf die BP1-Phosphorylierung bei somatischen Zellen wird allgemein kontrovers diskutiert. Es wurde berichtet, dass die Phosphorylierung von BP1 Rapamycin-sensitiv sei (Beretta et al. 1996). Neuere Studien belegen allerdings, dass Rapamycin die BP1-Phosphorylierung uneffizient blockiert und dass die BP1-Phosphorylierung an Ser65/Thr70 zwar Rapamycin-sensitiv, die Phosphorylierung von BP1 an Thr37/46 aber Rapamycin-resistent ist (Feldman et al. 2009; Thoreen et al. 2009; Fan et al. 2006; Wang et al. 2005), was in Einklang mit den hier vorgestellten Ergebnissen steht. Des Weiteren lassen sich die Resultate einer Studie an Mauseizellen, die eine signifikante Abnahme der BP1-Phosphorylierung an Thr70 nach Rapamycin-Behandlung ergab (Susor et al. 2015), ebenfalls gut hiermit vereinbaren.

Auch durch die Untersuchung der Substratphosphorylierung verschiedener Kinasen (PKA, PKB, PKC, ATM/ATR, MAPK, CDKs) konnte nicht ermittelt werden, warum Rapamycin in einer Konzentration von 10 μ M die Ausschleusung des ersten Polkör-

Diskussion

pers bei Rindereizellen inhibiert. Die Substratphosphorylierung von keiner dieser Kinasen wurde durch Rapamycin beeinflusst.

Studien an somatischen Zellen, bei denen eine Rapamycin-Behandlung der Zellen über einen Zeitraum von 24 Stunden erfolgte, zeigten eine durch Rapamycin verursachte Hemmung von mTorc2 (Zeng et al. 2007; Sarbassov et al. 2006). Nach heutigem Kenntnisstand ist die Hauptfunktion von mTorc2 die Organisation des Aktin-Zytoskeletts (Susor et al. 2015; Liu et al. 2013; Zoncu et al. 2011), das eine wichtige Rolle bei der Polarisierung der Eizelle und damit auch beim korrekten Ablauf der asymmetrischen Teilung spielt (Sun u. Kim 2013; Brunet u. Verlhac 2011; Verlhac et al. 2000). So kommt auch eine Studie an Mauseizellen zu dem Ergebnis, dass mTorc2 wahrscheinlich die Migration der meiotischen Spindel kontrolliert und maßgeblich zur Aktin-abhängigen asymmetrischen Teilung beiträgt (Kogasaka et al. 2013). Dies alles ließe vermuten, dass auch die bei Rindereizellen beobachtete Hemmung der asymmetrischen Teilung durch Rapamycin über eine Inhibierung von mTorc2 mediert wird. Dem steht allerdings entgegen, dass Rapamycin die PKB (=Akt)-Aktivität nicht beeinflusst. Akt ist ein Substrat von mTorc2 (Zoncu et al. 2011; Foster u. Finger 2010; Alessi et al. 2009), daher wäre bei einer Beeinflussung von mTorc2 auch eine Änderung der Akt-Aktivität zu erwarten.

Die MAPK-Phosphorylierung bei Eizellen im M II-Stadium wird durch Rapamycin ebenfalls nicht gehemmt. Dies stimmt mit an Mauseizellen vorgenommenen Untersuchungen überein (Lee et al. 2012) und stützt die These, dass Rapamycin spezifisch auf einen mTor-abhängigen Signalweg einwirkt.

Ein weiterer Gegenstand der biochemischen Analysen war das ribosomale Protein S6 (rpS6). Wie bei den anderen beiden untersuchten Faktoren ließ sich im Verlauf der IVM keine Veränderung der in der Eizelle vorhandenen Menge an rpS6 feststellen. Es wurde aber eine deutliche Steigerung der rpS6-Phosphorylierung (Ser 235/236) nach der Maturationsphase (24h) verglichen mit dem Phosphorylierungsstatus von rpS6 vor Beginn der Maturation (0h) beobachtet. Dies passt eigentlich nicht zur Rolle von rpS6 als Marker für aktiv stattfindende Translation (Romasko et al. 2013; Duncan u. McConkey 1982), da die Translationsraten bei Eizellen in der M II-Phase (nach 24 Stunden Maturation) gewöhnlich ähnlich basale Werte einnehmen wie im GV-Stadium (0h; Smiljakovic et al. 2003; Tomek et al. 2002a; Tomek et al. 2002b).

Auf diesen Phosphorylierungsvorgang hatte Rapamycin genauso wenig einen Einfluss. Dies steht im Kontrast zu Nachforschungen an somatischen Zellen, die ergaben, dass Rapamycin sowohl eine Inhibierung der rpS6-Phosphorylierung als auch eine Hemmung der Aktivität der für diesen Phosphorylierungsvorgang verantwortlichen Kinase, S6K, die ein mTorc1-Substrat ist, bewirkt (Feldman et al. 2009; Thoreen et al. 2009; Wang u. Proud 2006; Goggin et al. 2004). Bei *Xenopus*-Eizellen allerdings

inhibiert Rapamycin während der Maturation zwar die S6K-Aktivierung, beeinflusst die rpS6-Phosphorylierung aber nicht signifikant (Schwab et al. 1999). Daraus wurde gefolgert, dass eine andere Kinase, nämlich p90 RSK, die über den MAPK-Signalweg aktiviert wird (Rolfe et al. 2005), bei *Xenopus*-Eizellen für die Phosphorylierung von rpS6 verantwortlich sein könnte (Schwab et al. 1999). Die Beteiligung von p90 RSK an der rpS6-Phosphorylierung ist zwar umstritten (Pende et al. 2004), es existieren aber durchaus Berichte, dass p90 RSK rpS6 phosphorylieren kann (Pende et al. 2004; Jones et al. 1988). Es wurde gezeigt, dass p90 RSK rpS6 nur an zwei (Ser 235/236) der 5 Phosphorylierungsstellen (Ser 235, Ser236, Ser 240, Ser 244, Ser 247) phosphoryliert (Pende et al. 2004). Dies sind die Stellen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Die Ergebnisse dieser Arbeit können also mit den Resultaten der an *Xenopus*-Eizellen durchgeführten Studie in Einklang gebracht werden, sodass die Vermutung nahelegt, dass während der Maturation von Rindereizellen rpS6 durch p90 RSK phosphoryliert wird.

Für diese These spricht auch, dass Torin2, ein Active-site-Inhibitor, der eine vollständige Inhibierung aller mTor-Funktionen bewirkt (Liu et al. 2013), bei Rindereizellen ebenfalls keinen Einfluss auf die rpS6-Phosphorylierung hat. Da p90 RSK durch MAPK aktiviert wird (Rolfe et al. 2005), wären auch der Anstieg der MAPK-Phosphorylierung (Torner et al. 2001; Kubelka et al. 2000) und der rpS6-Phosphorylierung während der In-vitro-Maturation gut vereinbar. Aus den bezüglich rpS6 gewonnenen Erkenntnissen ergibt sich allerdings somit ebenfalls keine Erklärung für die durch Rapamycin verursachten morphologischen Veränderungen.

Eine Studie an somatischen Zellen besagt, dass Rapamycin die Reorganisation des Zytoskeletts, das für einen korrekten Ablauf der asymmetrischen Zellteilung von herausragender Bedeutung ist (Brunet u. Verlhac 2011), zumindest teilweise durch die Herunterregulierung der Aktivität und Expression des Rho A-Proteins durch mTorc1-medierte S6K- und BP1-Signalwege inhibiert (Liu et al. 2010). Eine durch Rapamycin in einer Konzentration von 10 μ M verursachte Reduzierung der vorhandenen Menge an mRNA, die für kleine GTPasen (Rho A, Rac 1 und Cdc 42) kodiert, bei Eizellen im M II-Stadium wurde auch in der Studie an Mauseizellen, die eine Hemmung der asymmetrischen Zellteilung durch Rapamycin zu Tage brachte, beobachtet. Auch hier wurde gefolgert, dass Rapamycin vermutlich über mTor-regulierte kleine GTPasen wirkt (Lee et al. 2012). Diese kleinen GTPasen sind Schlüsselregulatoren von Dynamiken der Zytoskeletts (Heasman u. Ridley 2008) und ein wichtiges Downstream-Target für mTor (Lee et al. 2012). Komponenten des Zytoskeletts spielen eine wichtige Rolle bei der Eizell-Polarisierung, die die Grundlage für die asymmetrische Zellteilung bildet (Sun u. Kim 2013; Brunet u. Verlhac 2011; Li et al. 2005; Verlhac et al. 2000).

Diskussion

Da für Rindereizellen eine Hemmung der BP1-Phosphorylierung an Thr 37/46 ausgeschlossen wurde, bliebe noch die Möglichkeit, dass S6K oder die Phosphorylierung von BP1 an Ser65/Thr70 bei der mTorc1-mediierter Inhibierung der kleinen GTPasen eine Rolle spielen. Dies wäre im Rahmen weitergehender Untersuchungen abzuklären. Die Untersuchung der BP1-Phosphorylierung an Ser65/Thr70 bei Rinder- und Schweine-Eizellen gestaltet sich allerdings schwierig, da die Antikörper, obwohl sie spezifisch sind, nur schwache Banden ergeben (Mayer et al. 2014; Ellederova et al. 2006).

Der genaue molekulare Wirkungsmechanismus von Rapamycin und warum bestimmte mTorc1-Substrate Rapamycin-insensitiv sind, bleibt somit weiterhin unklar. Es existieren diesbezüglich lediglich Theorien.

Eine davon besagt, dass die intrinsische Kapazität einer Phosphorylierungsstelle, als ein mTorc1-Substrat zu dienen, die Sensitivität gegenüber Rapamycin festlegt. Somit sind Stellen von schlechter mTorc1-Substratqualität wie Thr389 in S6K1 Rapamycin-sensitiv, während Stellen, gegenüber denen mTor c1 eine starke In-vitro-Kinase-Aktivität zeigt, wie Thr37/46 in BP1, Rapamycin-insensitiv zu sein scheinen, da die mTor-Inhibierung durch Rapamycin für ihre vollständige Dephosphorylierung nicht ausreicht (Kang et al. 2013). Eine alternative Erklärung ist, dass Rapamycin mTorc1-Substrate wie S6K, die die FRB-Domäne für ihre Rekrutierung an die auf dem Grund der katalytischen Spalte liegende mTor-Active-Site benötigen, stärker inhibiert. Der Zugang zu dieser Substrat-bindenden Active-Site ist durch die FRB-Domäne und eine aus der katalytischen Spalte hervorragende Helix stark beschränkt und die FRB-Domäne agiert vermutlich als „Pfortner“, der mit Substraten wie S6K interagiert und ihnen so Zugang zur Aktive-Site zu gewährt (Yang et al. 2013). Eine weitere Theorie besagt, dass die uneffiziente Blockierung der BP1-Phosphorylierung dadurch erklärbar ist, dass kein Hinweis auf eine Bindung des Rapamycin-sensitiven Raptor als Teil des mTorc1-Komplexes an das RAIP-Motiv von BP1 gefunden wurde, während Raptor an das TOS-Motiv (= QFEMDI-Motiv) von BP1 bindet (Abb.23). Das RAIP-Motiv ist ausschlaggebend für die Phosphorylierung von BP1 an Thr37/46, wohingegen die Phosphorylierung von BP1 an Ser65/Thr70 über das TOS-Motiv mediiert wird (Mayer et al. 2014; Beugnet et al. 2003). Dies würde auch erklären, warum die Phosphorylierung von BP1 an Thr37/46 Rapamycin-resistent, die Phosphorylierung an Ser65/Thr70 dagegen Rapamycin-sensitiv ist (Fan et al. 2006; Wang et al. 2005; McMahon et al. 2002) und es würde bedeuten, dass Rapamycin über eine Beeinflussung der Raptor-Bindung an Zielsequenzen wirkt.

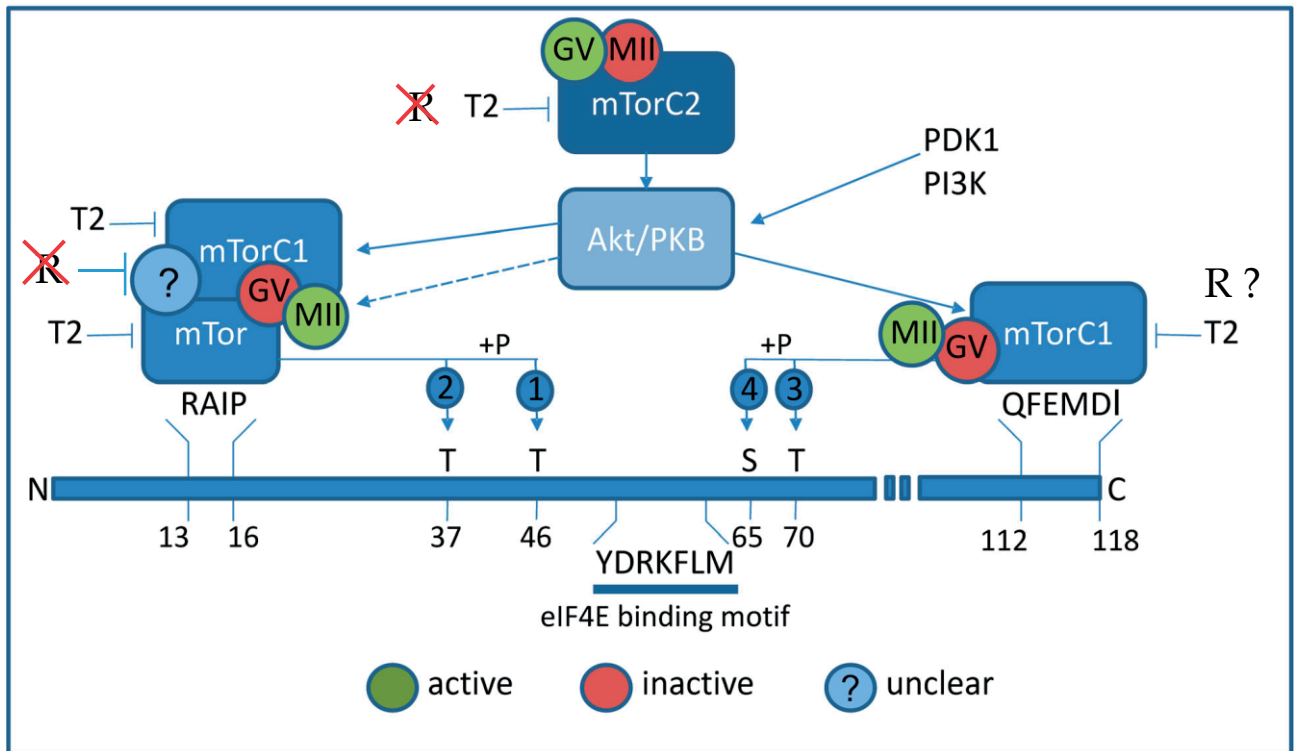


Abb.23: Wirkung der mechanistic target of rapamycin (mTor)-Inhibitoren Rapamycin und Torin 2 (mod. nach Mayer et al. 2014): Dargestellt sind das Signalmolekül eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (BP1) mit seinen verschiedenen Phosphorylierungsstellen (Thr37, Thr46, Ser65, Thr70), dem eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-Bindungsmotiv und den regulatorischen Motiven RAIP und QFEMDI, mTor als Bestandteil der Multiproteinkomplexe mTor complex 1 (mTorC1) und mTorC2 und die inhibitorische Wirkung von Rapamycin und Torin 2. Während Torin 2 (T2) auf den mTorC1-Komplex und damit auf die BP1-Phosphorylierung sowohl an Thr37/46 als auch an Ser65/Thr70 und genauso auf den mTorC2-Komplex inhibitorisch einwirkt, legen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse nahe, dass Rapamycin (R) bei der Maturation von Rindereizellen weder den mTorC2-Komplex beeinflusst, noch die Phosphorylierung von BP1 an Thr37/46 inhibiert (selbst in der hohen Konzentration von 10 μ M). Rapamycin als Bestandteil des mTorC1-Komplexes bindet zwar an das für die BP1-Phosphorylierung an Ser65/Thr70 verantwortliche QFEMDI-Motiv, nicht aber an das RAIP-Motiv, über das die BP1-Phosphorylierung an Thr37/46 bewerkstelligt wird.

GV: Germinalvesikel-Stadium; M II: Metaphase II; PDK1: 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1; PI3K: phosphoinositide 3-kinase; PKB: Proteinkinase B.

6.5 Versuchsabschnitt 4: Immunhistochemische Analysen

Um ausgewählte Faktoren (BP1, eIF4E, mTor, Raptor und Rictor) bezüglich der in der Eizelle vorhandenen Menge, des Phosphorylierungsstatus und der Verteilung innerhalb der Eizelle beurteilen zu können und damit wie durch die biochemischen Analysen auch neue Erkenntnisse über molekulare Mechanismen, die bei der Maturation von Rindereizellen eine Rolle spielen, zu gewinnen, wurden immunhistochemische Analysen Rapamycin- und Torin2-behandelter Eizellen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie durchgeführt. Diese Methode wurde zusätzlich gewählt, da im Gegensatz zu den biochemischen Analysen durch die immunhistochemischen Untersuchungen die separate Beurteilung jeder einzelnen Eizelle und eine Einschätzung des Verteilungsmusters der Faktoren innerhalb der Eizelle möglich ist.

Der bei Mauseizellen festgestellte Anstieg der vorhandenen mTor-Menge zum M II-Stadium hin und eine nach Rapamycin-Behandlung eintretenden Verringerung der mTor- Raptor- und Rictor-Expression bei Eizellen im M II-Stadium (Lee et al. 2012) wurden bei den untersuchten Rindereizellen nicht gesehen. Eine Behandlung mit Torin2 hatte aber eine geringgradige Verminderung der in der gereiften Eizelle vorhandenen mTor-Menge zur Folge. Außerdem wurde in der Kernregion der Eizellen eine durch Rapamycin und Torin2 nicht beeinflussbare Steigerung der vorhandenen Raptor-Menge im IVM-Verlauf beobachtet. Da Raptor Teil des mTorc1-Komplexes ist (Ballou u. Lin 2008), der für den Prozess der Translation von entscheidender Bedeutung ist (Liu et al. 2013), könnte vermutet werden, dass die Proteinsynthese in der Kernregion gereifter Eizellen gesteigert abläuft. Im Großen und Ganzen scheinen bei Rindereizellen für die Regulierung des Ablaufs der Meiose allerdings eher Veränderungen des Phosphorylierungszustandes der Faktoren als Veränderungen der in der Eizelle vorhandenen Menge dieser Faktoren von Bedeutung zu sein.

Die immunhistochemischen Untersuchungen ergaben, dass BP1, eIF4E mTor und Rictor im Verlauf der Maturation phosphoryliert werden, Raptor hingegen dephosphoryliert wird. Die Bedeutung der bezüglich der Phosphorylierung von BP1 und eIF4E gewonnenen Erkenntnisse wurde bereits in Abschnitt 6.4 erörtert. Hinzu kommen bei den immunhistochemischen Untersuchungen aus der separaten Betrachtung der einzelnen Eizellen abgeleitete Erkenntnisse, vor allem was die BP1-Phosphorylierung angeht. Aus den biochemischen Analysen geht hervor, dass Torin2 die BP1-Phosphorylierung nicht komplett inhibiert, sondern eine Reduzierung der Phosphorylierung auf etwa ein Drittel verglichen mit der Kontrollgruppe verursacht. Daraufhin ergab sich die Fragestellung, ob dies durch eine gleichmäßige Verringerung der Phosphorylierung bei allen Eizellen um ein Drittel zustande kommt,

oder ob die Phosphorylierung bei einem Teil der Eizellen stärker, bei einem anderen Teil weniger stark inhibiert wird.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Eizellen wurden nach Torin2-Behandlung durchaus Unterschiede in der BP1-Phosphorylierung gesehen. Um diesbezüglich eine endgültige, statistisch abgesicherte Aussage treffen zu können, müssten allerdings weitergehende Versuche mit einer höheren Anzahl analysierter Eizellen durchgeführt werden. Die Tatsache, dass bei den hier durchgeführten immunhistochemischen Analysen Unterschiede in der BP1-Phosphorylierung bei den einzelnen Eizellen festgestellt wurden, passt dennoch zu der These, dass eine Subpopulation von Eizellen existiert, die gegenüber Inhibierung durch Torin2 (und auch SH6) aufgrund einer erhöhten basalen Akt-Aktivität resistent sind und die eine erhöhte Entwicklungskompetenz besitzen (diese These wird unter 6.3 genauer ausgeführt). Die Vermutung liegt nahe, dass es diese Eizellen sind, bei denen auch die BP1-Phosphorylierung verglichen mit anderen Eizellen weniger stark inhibiert wird und die es trotz Torin2-Behandlung schaffen, sich zu Blastozysten weiterzuentwickeln. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass diese These zutrifft, reichen aber als Beleg nicht aus. Diese These müsste also noch durch zusätzliche Experimente bestätigt werden. Hierfür müssten unter Torin2-Einfluss gereifte Eizellen nach der 24-stündigen Maturation selektiert werden und es müsste eine getrennte Untersuchung der BP1-Phosphorylierung der Eizellen der beiden Gruppen (Eizellen die unter Torin2-Inhibierung das M II-Stadium erreicht haben; Eizellen, die nach Torin2-Behandlung in der M I-Phase arretiert wurden) erfolgen. Um die jeweilige Entwicklungskompetenz der Eizellen abzuklären, müsste zusätzlich ein Teil der selektierten Eizellen fertilisiert und kultiviert werden (siehe 6.6). Zur Überprüfung der These, dass es sich bei den Torin2-resistenten Eizellen um diejenigen Eizellen handelt, die eine erhöhte basale Akt-Aktivität besitzen, könnten Eizellen im GV-Stadium anhand ihrer unterschiedlichen Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH)-Aktivität und der daraus resultierenden Anfärbbarkeit mit dem Farbstoff Brilliant Cresyl Blue (BCB) in zwei Gruppen (BCB+/BCB-) aufgetrennt werden. Eine Studie an Rindereizellen ergab nämlich, dass BCB+ Eizellen eine deutlich höhere Akt-Phosphorylierung aufweisen als BCB- Eizellen (und zusätzlich auch eine größere Entwicklungskompetenz besitzen; Torner et al. 2008), sodass diese Untersuchungsmethode zur Abschätzung der basalen Akt-Aktivität bei Eizellen herangezogen werden könnte. Anschließend müssten die Eizellen dieser beiden Gruppen (BCB+/BCB-) getrennt unter Torin2-Einfluss gereift und danach anhand der Chromatinkonfiguration morphologisch untersucht werden. Weiterhin könnten anhand der BCB-Färbung separierte Eizellen auch, nach einer 24-stündigen Reifung ohne Inhibitorzusatz, auf die jeweilige BP1-Phosphorylierung untersucht werden.

Diskussion

mTor wird durch Phosphorylierung aktiviert (Kogasaka et al. 2013; Soliman et al. 2010; Lawrence et al. 2004) und BP1 wird als Downstream-Effektor von mTor als Marker für die mTor-Aktivität verwendet (Dann u. Thomas 2006; Jiang et al. 2001). Die beobachtete Phosphorylierung von mTor im Verlauf der IVM ist somit gut mit der ebenfalls in diesem Zeitraum stattfindenden BP1-Phosphorylierung vereinbar. Ausgehend von der Annahme, dass Raptor (Ser722/792)- und Rictor (Thr1135)-Phosphorylierung den jeweiligen Kinase-Komplex inaktivieren (Foster u. Fingar 2010; Julien et al. 2010; Dibble et al. 2009; Shaw 2009), liegt aufgrund der hier ermittelten Ergebnisse bezüglich der Raptor (Ser792)- und Rictor(Thr1135)-Phosphorylierung nahe, dass mTorc1 im GV-Stadium inaktiv und im M II-Stadium aktiv ist und dass die Situation für mTorc2 genau umgekehrt ist. Diese Veränderung der mTorc1-Aktivität steht ebenfalls im Einklang mit der Phosphorylierung von BP1, einem direkten mTorc1-Substrat (Ballou u. Lin 2008), da es sehr wahrscheinlich ist, dass die zwar noch nicht maximale, aber doch schon deutlich angestiegene mTorc1-Aktivität am Übergang von der M I- zur M II-Phase ausreichend ist, um die hohe BP1-Phosphorylierung am Ende der 24-stündigen Maturationsphase zu gewährleisten. Die mTorc2-Aktivität nimmt vermutlich im IVM-Verlauf ab, die in der Eizelle vorliegende Menge an Rictor steigt während der Reifung dagegen an. Folglich ist zur Zeit des GVBD und im M I-Stadium sowohl eine gewisse Rictor-Menge als auch eine gewisse mTorc2-Aktivität vorhanden. Dies passt zu der These, dass die für die Asymmetrie der ersten meiotischen Teilung unabdingbare periphere Migration der meiotischen Spindel, die nach dem GVBD stattfindet, hauptsächlich durch mTorc2 bewerkstelligt wird (Kogasaka et al. 2013). Die untersuchte Phosphorylierung von Raptor an Ser792 erfolgt durch AMPK, eine Kinase, die upstream von mTor agiert (Shaw 2009; Ballou u. Lin 2008), was eine Erklärung dafür liefert, dass die mTor-Inhibitoren Rapamycin und Torin2 die Raptor-Phosphorylierung an dieser Stelle nicht beeinflussen. Im Gegensatz dazu wäre zu erwarten, dass die Phosphorylierung von Rictor an Thr1135, für die bei somatischen Zellen S6K1, ein mTorc1-Substrat (Zoncu et al. 2011), verantwortlich ist (Julien et al. 2010; Dibble et al. 2009), durch mTor-Inhibierung sowohl durch Rapamycin als auch durch Torin2 verringert wird, auch da Berichte über die hemmende Wirkung beider Inhibitoren auf S6K bei somatischen Zellen existieren (Liu et al. 2013; Feldman et al. 2009; Thoreen et al. 2009). Eine Verringerung der Rictor-Phosphorylierung an Thr1135 nach Rapamycin- bzw. Torin2-Behandlung von Rindereizellen wurde aber nicht beobachtet. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass bei Rindereizellen eine andere Kinase als S6K, die nicht über mTor reguliert wird, Rictor an Thr1135 phosphoryliert. Für diese Theorie spricht auch, dass die S6K-Phosphorylierung und damit die S6K-Aktivität während der In-vitro-Maturation von Mauseizellen signifikant abnimmt (Susor et al. 2015),

was keine Übereinstimmung mit der während der Maturationsphase zunehmenden Rictor-Phosphorylierung zeigt.

Studien an Mauseizellen ergaben, dass bei Eizellen im M I-Stadium sowohl phosphoryliertes BP1 als auch phosphoryliertes eIF4E eine bevorzugte Lokalisierung um die meiotischen Spindel-Chromosomen-Komplexe herum zeigt (Susor et al. 2015; Romasko et al. 2013). Bei Eizellen im M II-Stadium ist BP1 genauso wie phosphoryliertes BP1 an den Chromosomen und der Spindel angereichert (Romasko et al. 2013). Dies zeigt eine Übereinstimmung mit den hier für Rindereizellen gewonnenen Erkenntnissen. Bei den für 24 Stunden gereiften Rindereizellen (M II-Stadium) war BP1 ebenso wie phosphoryliertes BP1 ebenfalls vermehrt in der Kernregion lokalisiert. Zusätzlich wurde eine Anreicherung von phosphoryliertem BP1 und phosphoryliertem eIF4E an der Metaphase I-Platte Torin2-behandelter Eizellen beobachtet, was sich genauso mit den Resultaten der Studien an Mauseizellen vereinbaren lässt.

Die bei Mauseizellen (sowohl im M I- als auch im M II-Stadium) auftretende bevorzugte Lokalisierung von mTor und phosphoryliertem mTor an der meiotischen Spindel (Kogasaka et al. 2013; Lee et al. 2012; Yan-Chang u. Cai-Rong 2009) wurde bei den untersuchten Rindereizellen nicht gesehen. Allerdings lag mTor sowohl in unphosphorylierter als auch in phosphorylierter Form im Germinal-Vesikel von GV-Eizellen in verringerter Menge vor, was bei Mauseizellen nicht der Fall ist (Lee et al. 2012; Yan-Chang u. Cai-Rong 2009). Da mTor und phosphoryliertes mTor bei gereiften Rindereizellen relativ gleichmäßig innerhalb der Eizelle verteilt waren, ergibt sich auch für Rindereizellen wie für Mauseizellen insgesamt eine Zunahme der Menge an mTor und phosphoryliertem mTor in der Kernregion. Raptor ist bei Mauseizellen im GV-Stadium im Zytoplasma und im Nukleus, im M I- und M II-Stadium punktförmig an den meiotischen Spindeln lokalisiert (Kogasaka et al. 2013). Auch bei den untersuchten Rindereizellen zeigte sich im GV-Stadium eine Verteilung von Raptor sowohl mittig im Zytoplasma als auch in der Kernregion, während bei für 24 Stunden gereiften Eizellen zwar keine punktförmige Anreicherung an der Spindel, aber eine bevorzugte Lokalisierung in der Kernregion und am Rand der Eizelle beobachtet wurde. Ein abweichendes Verteilungsmuster zeigte Raptor bei einem Teil der Torin2-behandelten Eizellen, hier war Raptor teils stark in der Eizellmitte im Zytoplasma angereichert. Dies könnte als Hinweis darauf gewertet werden, dass Torin2 zumindest bei einigen Eizellen das Expressionsmuster von Raptor verändert. Durch Untersuchungen an Mauseizellen erzielte Resultate besagen, dass Rictor im M I-Stadium um die Spindel-Pole herum und im M II-Stadium im Zytoplasma lokalisiert ist. Dies wurde als Hinweis darauf gewertet, dass Rictor an der Migration der ersten meiotischen Spindel beteiligt ist (Kogasaka et al. 2013). Dies stimmt insofern mit den an Rindereizellen durchgeführten Untersuchungen überein, als auch hier bei Zellen im

Diskussion

M II-Stadium eine Lokalisierung mittig im Zytoplasma mit nur geringgradiger Anreicherung in der Kernregion festgestellt wurden. Eizellen in der M I-Phase (für 10 Stunden gereift) wurden im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht untersucht, so dass bezüglich einer bevorzugten Rictor-Lokalisierung um die Pole der ersten meiotischen Spindel bei Rindereizellen keine Aussage getroffen werden kann. Dies müsste durch weitergehende Untersuchungen abgeklärt werden. Rictor zeigt in seiner phosphorylierten Form eine deutliche Anreicherung in der Kernregion gereifter Eizellen. Dies lässt vermuten, dass die Translation in der Kernregion anders als mittig im Zytoplasma reguliert wird. Im Gegensatz zur Rictor-Phosphorylierung, die vor allem in der Kernregion stattfindet, lässt sich der Abfall der Raptor-Phosphorylierung im Verlauf der Maturation vor allem in der Mitte der Eizelle im Zytoplasma beobachten. Dies legt nahe, dass bei Rindereizellen neben der Raptor-Phosphorylierung an Ser792, die bei somatischen Zellen durch AMPK mediiert wird und die mTor-Signalgebung inhibiert (Foster u. Fingar 2010) und die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, noch andere Phosphorylierungsstellen von Raptor die translatorische Aktivität innerhalb der Eizelle und dabei vor allem in der Kernregion beeinflussen könnten. Bei somatischen Zellen wurde beispielsweise von einer Steigerung der mTorc1-Aktivität infolge Raptor-Phosphorylierung an Ser863, Ser696, Thr706, Ser855, Ser859 und Ser877 durch mTor oder an Ser719, Ser721 und Ser722 durch p90 RSK berichtet (Foster u. Fingar 2010).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die gesteigerte Lokalisation von phosphoryliertem BP1 und phosphoryliertem eIF4E an der Metaphase I-Platte Torin2-behandelter Eizellen, die Anreicherung für die Translation wichtiger Faktoren wie BP1 (vor allem auch in seiner phosphorylierten Form), eIF4E, Raptor und Rictor (die beiden letztgenannten ebenfalls in ihrer phosphorylierten Form) in der Kernregion gereifter Eizellen und die Zunahme der mTor-Menge und -Phosphorylierung in der Kernregion im IVM-Verlauf für eine räumlich und zeitlich regulierte Proteinsynthese und für einen gesteigerten Ablauf der Translation in der Kernregion sprechen. Dies zeigt eine Übereinstimmung mit der Lokalisierung von Schlüsselkomponenten des mTor-eIF4E-Signalwegs zusammen mit bestimmten mRNAs und Ribosomen um die meiotischen Spindel-Chromosomen-Komplexe bei Mauseizellen und mit der daraus abgeleiteten Folgerung, dass in diesem Bereich der Eizelle die Translation gesteigert abläuft, wobei dort vermutlich vor allem spezifische mRNAs, die eine Rolle bei der korrekten Ausbildung der Spindel und der akkuraten Chromosomen-Segregation spielen, translatiert werden (Susor et al. 2015). Diese lokalisierte Proteinsynthese und zeitlich und räumlich regulierte Translationskontrolle findet sich, wie die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse nahelegen, mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht nur bei Mauseizellen, sondern auch bei Rindereizellen.

6.6 Ausblick

Ob die Eizellen, die sich trotz Torin2-Behandlung während der Maturation zum M II-Stadium weiterentwickeln, wirklich ein erhöhtes Entwicklungspotential besitzen, wäre im Rahmen weiterführender Untersuchungen abzuklären. Hierfür müssten die unter Torin2-Einfluss gereiften Eizellen nach der Maturation selektiert werden (Trennung der 20-30% der Eizellen, die das M II-Stadium erreicht haben von den in der M I-Phase arretierten Eizellen). Würde man anschließend nur die erstgenannte Gruppe von Eizellen fertilisieren und kultivieren, wäre für eine Bestätigung der oben erwähnten These eine deutlich erhöhte Blastozystenrate zu erwarten. Käme es zu einer solchen Bestätigung, sollte ein IVM-System unter inhibitorischen Bedingungen hervorgerufen durch Torin2 gefolgt von einer standardmäßigen In-vitro-Produktion von Embryonen eine Selektierung von Blastozysten ermöglichen, die nach Embryotransfer den Anteil geborener Kälber deutlich erhöhen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass auch bei Rindereizellen eine lokalisierte Proteinsynthese und räumliche Regulierung der Translation für den Ablauf der Eizellreifung von Bedeutung sind. Daher ist die Charakterisierung der mRNAs, die einer solchen zeitlichen, aber auch räumlichen Kontrolle unterliegen, eine der Haupt-Herausforderungen für die Zukunft. In diesem Zusammenhang können Polysomen-Profile in Kombination mit Inhibitor-Studien, wie sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgestellt wurden, wertvolle Ergebnisse liefern. Polysomen-Profile, bei denen translatorisch aktive, Ribosomen-gebundene mRNA von translatorisch unterdrückter, ungebundener mRNA getrennt wird, sind auch für Säugetier-Eizellen erstellbar. Bezüglich der unterschiedlichen Effekte der mTor-Inhibitoren Rapamycin und Torin2 auf die Chromatinkonfiguration von Rindereizellen ist es wahrscheinlich, dass der Einfluss dieser Substanzen auch zu unterschiedlichen Mustern aktiv translatierter mRNA führt. Zusammen mit RNA-Sequenz-Profilen (Reyes et al. 2015), beispielsweise, können solche Untersuchungen Informationen über Proteine, die beim GVBD, bei der Regulierung der meiotischen Spindel, beim Übergang von der M I- zur M II-Phase, bei der asymmetrischen Teilung und bei der Polkörperbildung eine Rolle spielen, liefern.

Abschließend kann gesagt werden, dass grundlegende Inhibitor-Studien, wie sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, für eine Selektierung von Eizellen entsprechend ihrer Entwicklungskompetenz von Wert sein können und ein Werkzeug für detaillierte grundlegende Forschung auf molekularer Ebene darstellen.

7 Zusammenfassung

Für einen ungestörten Ablauf der Oozytenreifung (Entwicklung vom GV- zum M II-Stadium) ist eine genaue räumliche und zeitliche Regulierung der in der Säugetier-Eizelle stattfindenden Genexpression auf Ebene der Translation von entscheidender Bedeutung. Einer der Initiationsfaktoren, die dabei eine wichtige Rolle spielen, ist eIF4E. Dieser Faktor bindet an die Cap-Struktur der mRNAs. Ebenfalls an der Kontrolle der Translation beteiligt ist mTor, eine Ser/Thr Protein-Kinase, die 4E-BP1, ein Protein, das an eIF4E bindet und die Translation unterdrückt, reguliert. mTor agiert als katalytische Untereinheit zweier Multiprotein-Komplexe. Dies sind mTorc1, das Raptor enthält, und mTorc2, das Rictor als Komponente besitzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene mTor-Inhibitoren, Rapamycin und Torin2 während der In-vitro-Maturation von Rindereizellen angewendet. Diese Substanzen können eine Abgrenzung der jeweiligen mTorc1- und mTorc2-Funktionen ermöglichen. Die infolge der Inhibitor-Behandlungen erzielten Effekte wurden mittels morphologischer Beurteilung anhand der Chromatinkonfiguration, durch biochemische Untersuchungen mittels Western-Blot und durch immunhistochemische Analysen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie überprüft.

Während Torin2 eine Arretierung von 60% der Eizellen in der M I-Phase verursacht, inhibiert Rapamycin bei einem Teil der behandelten Eizellen die asymmetrische Zellteilung einschließlich der Ausschleusung des ersten Polkörpers. Die biochemischen und immunhistochemischen Analysen ergaben ein weitgehend konstantes Vorkommen der untersuchten Faktoren und Zielmoleküle (eIF4E, BP1, mTor, Raptor, Rictor, rpS6) im Verlauf der In-vitro-Maturation. Für alle Faktoren, außer für Raptor, das sich gegensätzlich verhält, zeigt sich im GV-Stadium eine niedrige, im M II-Stadium dagegen eine hohe Phosphorylierung. Rapamycin hat keinerlei Auswirkungen auf den Phosphorylierungszustand der untersuchten Faktoren, Torin2 hingegen hemmt spezifisch die BP1-Phosphorylierung an Thr37/46. Überraschenderweise wird weder durch Rapamycin noch durch Torin2 die rpS6-Phosphorylierung blockiert. Im Rahmen der immunhistochemischen Analysen wurde außerdem für manche Faktoren ein spezifisches Verteilungsmuster innerhalb der Eizelle gesehen, was für eine nicht nur zeitlich, sondern auch räumlich regulierte Translationskontrolle bei Rindereizellen spricht. Schlussendlich konnte kein Rapamycin-sensitives Zielmolekül bei Rindereizellen identifiziert werden, das eine Erklärung für die beobachteten morphologischen Rapamycin-Effekte liefern könnte. Zusätzlich zu den bisher erwähnten Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit Torin2 behandelte Rindereizellen außerdem fertilisiert und kultiviert und die Blastozystenrate bestimmt. Es zeigte sich, dass diese Eizellen fähig sind, sich zu Blastozysten weiterzuentwickeln.

Die hier vorgestellten Untersuchungen ermöglichen Einblicke in regulatorische Mechanismen, die bei der Oozytenreifung eine Rolle spielen (insbesondere in die räumliche und zeitliche Steuerung der Translation) und können als Grundlage für weitergehende Forschung dienen. Als ein langfristiges Ziel solcher Forschung wäre die Steigerung der Erfolgsrate beim Transfer durch IVP erzeugter Embryonen anzusehen.

Summary

7 Summary

An exact spatiotemporal regulation of gene expression in mammalian oocytes at translation level is absolutely necessary to guarantee an unimpaired course of meiotic progression (transition from GV-stage to M II). One of the specific initiation factors playing an important role in this process is eIF4E. This factor binds the mRNA cap-structure. Also involved in translational control is mTor, a Ser/Thr kinase regulating 4E-BP1, a protein binding eIF4E and repressing translation. mTor acts as catalytic subunit of two multiprotein-complexes. These are mTorc1 containing Raptor and mTorc2 harboring Rictor. Within the framework of this study two different inhibitors of mTor, Rapamycin and Torin2, were used during bovine oocyte in vitro maturation. Those substances may allow discrimination between mTorc1 and mTorc2 complex functions. The effects of the inhibitors were monitored by morphological examination via reference to chromatin configuration, biochemical analysis by means of Western blotting and immunohistochemical analysis by means of confocal laser scanning microscopy.

Whereas Torin2 arrests approx. 60% of the oocytes at the M I stage, Rapamycin inhibits asymmetric division including polar body extrusion within a part of the treated oocytes. Biochemical and immunohistochemical analysis revealed broadly equal abundance of the factors and targets investigated (eIF4E, BP1, mTor, Raptor, Rictor, rpS6) in the course of IVM. Phosphorylation analysis showed low phosphorylation in GV-stage and high signals in M II for all factors except Raptor, which shows an opposite behavior. Rapamycin has no impact on the phosphorylation status of the factors investigated, Torin2 however inhibits specifically BP1 phosphorylation at Thr37/46. Surprisingly, rpS6 phosphorylation is blocked neither by Rapamycin nor by Torin2. Moreover, within the scope of immunohistochemical analysis a specific pattern of distribution within the oocyte was seen for some factors, suggesting not only a temporal but also a spatial regulation of translational control within bovine oocytes. In conclusion, no Rapamycin sensitive target explaining the morphological effects of Rapamycin observed could be identified in bovine oocytes. In addition to the investigations mentioned, within the framework of this study, Torin2 treated bovine oocytes were also fertilized and cultured. The blastocyst rate was determined. It became apparent that these oocytes are capable to develop to the blastocyst stage. The investigations presented here provide insights into the regulatory events involved in meiotic maturation (especially into spatiotemporal control of translation) and can serve as basis for further research. The improvement of the yield of offspring after transfer of IVP-derived embryos could be a long-term target of such research.

8 Literaturverzeichnis

Abraham RT. 2004. PI 3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways. *DNA Repair (Amst)* 3:883–887.

Alessi DR, Pearce LR, Garcia-Martinez JM. 2009. New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond. *Sci Signal* 2:pe27.

Alessi DR, Sakamoto K, Bayascas JR 2006. LKB1-dependent signaling pathways. *Annu Rev Biochem* 75:137-163.

Anger M, Klima J, Kubelka M, Prochazka R, Motlik J, Schultz RM. 2004. Timing of Plk1 and MPF activation during porcine oocyte maturation. *Mol Reprod Dev* 69:11-16.

Avery B, Greve T. 2000. Effects of ethanol and dimethylsulphoxide on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Mol Reprod Dev* 55:438-45.

Avruch J, Belham C, Weng Q, Hara K, Yonezawa K. 2001. The p70 S6 kinase integrates nutrient and growth signals to control translational capacity. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 26:115–154.

Axelsen JB, Sneppen K. 2004. Quantifying the benefits of translation regulation in the unfolded protein response *Phys. Biol.* 1:159–65.

Ballou LM, Lin RZ. 2008. Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *J Chem Biol* 1:27-36.

Banaszynski LA, Liu CW, Wandless TJ. 2005. Characterization of the FKBP.rapamycin.FRB ternary complex. *J Am Chem Soc* 127:4715-4721.

Barkoff A, Ballantyne S, Wickens M. 1998. Meiotic maturation in *Xenopus* requires polyadenylation of multiple mRNAs. *EMBO J* 11:3168–3175.

Beretta L, Gingras AC, Svitkin YV, Hall MN, Sonenberg N. 1996. Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *EMBO J* 15:658–664.

Bettegowda A, Smith GW. 2007. Mechanisms of maternal mRNA regulation: Implications for mammalian early embryonic development. *Front Biosci* 12:3713–3726.

Beugnet A, Wang X, Proud CG. 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. *J Biol Chem* 278:40717-22.

Bhojwani M, Rudolph E, Kanitz W, Zuehlke H, Schneider F, Tomek W. 2006. Molecular analysis of maturation processes by protein and phosphoprotein profiling during in vitro maturation of bovine oocytes: a proteomic approach. *Cloning Stem Cells*. 8:259-74.

Blenis J. 1993. Signal transduction via the MAP kinases—proceed at our own RSK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5889–5892.

Borman AM, Michel YM, Kean KM. 2000. Biochemical characterization of cap-poly(A) synergy in rabbit reticulocyte lysates: The eIF4G-PABP interaction increases the functional affinity of eIF4E for the capped mRNA 5'-end. *Nucleic Acids Res* 28:4068–4075.

Boylan JM, Anand P, Gruppuso PA. 2001. Ribosomal protein S6 phosphorylation and function during late gestation liver development in the rat. *J Biol Chem* 276:44457–44463.

Brevini TA, Lonergan P, Cillo F, Francisci C, Favetta LA, Fair T, Gandolfi F. 2002. Evolution of mRNA polyadenylation between oocyte maturation and first embryonic cleavage in cattle and its relation with developmental competence. *MolReprod Dev* 63:510–517.

Brevini-Gandolfi TAL, Favetta LA, Mauri L, Luciano AM, Cillo F, Gandolfi F. 1999. Changes in poly (A) tail length of maternal transcripts during in vitro maturation of bovine oocytes and their relation with developmental competence. *Mol Reprod Dev* 52:427–433.

Brina D, Miluzio A, Ricciardi S, Clarke K, Davidsen PK, Viero G, Tebaldi T, Offenhäuser N, Rozman J, Rathkolb B, Neschen S, Klingenspor M, Wolf E, Gailus-Durner V, Fuchs H, Hrabe de Angelis M, Quattrone A, Falciani F, Biffo S. 2015. eIF6 coordinates insulin sensitivity and lipid metabolism by coupling translation to transcription. *Nat Commun* 6:8261.

Brook M, Smith JWS, Gray NK. 2009. The DAZL and PABP families: RNA-binding proteins with interrelated roles in translational control in oocytes. *Reproduction* 137:595–617.

- Brown EJ, Schreiber SL. 1996. A signalling pathway to translational control. *Cell* 86:517–520.
- Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, Schreiber SL. 1994. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369:756–8.
- Brunet S, Verlhac MH. 2011. Positioning to get out of meiosis: the asymmetry of division. *Hum Reprod Update* 17:68-75.
- Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, Snyder SH, Sabatini DM. 1998. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:1432–1437.
- Campbell JS, Seger R, Graves JD, Graves LM, Jensen AM, Krebs EG. 1995. The MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* 50:131–159.
- Carrière A, Cargnello M, Julien LA, Gao H, Bonneil E, Thibault P, Roux PP. 2008. Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation. *Curr Biol* 18:1269-77.
- Chappell WH, Steelman LS, Long JM, Kempf RC, Abrams SL, Franklin RA, Basecke J, Stivala F, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Mazzarino MC, Nicoletti F, Libra M, Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Montalto G, Cervello M, Laidler P, Milella M, Tafuri A, Bonati A, Evangelisti C, Cocco L, Martelli AM, McCubrey JA. 2011. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget* 2:135-164.
- Charlesworth A, Cox LL, MacNicol AM. 2004. Cytoplasmic polyadenylation element (CPE)- and CPE-binding protein (CPEB)-independent mechanisms regulate early class maternal mRNA translational activation in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 279:17650–17659.
- Chian RC, Chung J, Niwa K, Sirard MA, Downey BR, Tan SL. 2003. Reversible changes in protein phosphorylation during germinal vesicle breakdown and pronuclear formation in bovine oocytes in vitro. *Zygote* 11:119–129.
- Choi KM, McMahon LP, Lawrence JC Jr. 2003. Two motifs in the translational repressor PHAS-I required for efficient phosphorylation by mammalian target of rapamycin and for recognition by raptor. *J Biol Chem.* 278:19667-73.

Literaturverzeichnis

Choi J, Chen J, Schreiber SL, Clardy J. 1996. Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* 273:239–242.

Choo AY, Blenis J. 2009. Not all substrates are treated equally: implications for mTOR, rapamycin-resistance and cancer therapy. *Cell Cycle* 8:567-72.

Choo AY, Yoon SO, Kim SG, Roux PP, Blenis J. 2008. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:17414-9.

Coller J, Parker R. 2004. Eukaryotic mRNA decapping. *Annu Rev Biochem* 73:861–890.

Corcoran D, Fair T, Park S, Rizos D, Patel OV, Smith GW, Coussens PM, Ireland JJ, Boland MP, Evans AC, Lonergan P. 2006. Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in in vitro compared with in vivo cultured bovine embryos. *Reproduction* 131:651-60.

Craig AW, Haghghat A, Yu AT, Sonenberg N. 1998. Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature* 392:520-523.

Curtis D, Lehmann R & Zamore PD. 1995. Translational regulation in development. *Cell* 81:171–178.

Dann SG, Thomas G. 2006. The amino acid sensitive TOR pathway from yeast to mammals. *FEBS Lett.* 580:2821-9.

Davis RJ. 1995. Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol Reprod Dev* 42:459–467.

De Benedetti A, Graff JR. 2004. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* 23:3189-3199.

Dedieu T, Gall L, Crozet N, Sevellec C, Ruffini S. 1996. Mitogen activated protein kinase activity during goat oocyte maturation and acquisition of meiotic competence. *Mol Reprod Dev* 45:351-358.

De La Fuente R, Viveiros MM, Burns KH, Adashi EY, Matzuk MM, Eppig JJ. 2004. Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function. *Dev. Biol.* 275:447–458.

- Deng M, Kishikawa H, Yanagimachi R, Kopf GS, Schultz RM, Williams CJ. 2003. Chromatin-mediated cortical granule redistribution is responsible for the formation of the cortical granule-free domain in mouse eggs. *Dev Biol* 257:166-176.
- Dennis MD, Jefferson LS, Kimball SR. 2012. Role of p70S6K1-mediated phosphorylation of eIF4B and PDCD4 proteins in the regulation of protein synthesis. *J Biol Chem* 287:42890-9.
- Dibble CC, Cantley LC. 2015. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends Cell Biol* 25:545-55.
- Dibble CC, Asara JM, Manning BD. 2009. Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1. *Mol Cell Biol* 29:5657-70.
- Dorée D, Hunt T. 2002. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J Cell Sci* 115:2461–2464.
- Dorrello NV, Peschiaroli A, Guardavaccaro D, Colburn NH, Sherman NE, Pagano M. 2006. S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science* 314:467-471.
- Dowling RJ, Topisirovic I, Alain T, Bidinosti M, Fonseca BD, Petroulakis E, Wang X, Larsson O, Selvaraj A, Liu Y, Kozma SC, Thomas G, Sonenberg N. 2010. mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science* 328:1172-6.
- Dubowy J, Macdonald PM. 1998. Localization of mRNAs to the oocyte is common in *Drosophila* ovaries. *Mech. Dev.* 70:193–195.
- Duncan RF, Song HJ. 1999. Striking multiplicity of eIF4E-BP1 phosphorylated isoforms identified by 2D gel electrophoresis regulation by heat shock. *Eur J Biochem* 265:728–743.
- Duncan R, McConkey EH. 1982. Rapid alterations in initiation rate and recruitment of inactive RNA are temporally correlated with S6 phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* 123:539–544.
- Duncan R, Milburn SC, Hershey JW. 1987. Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggests a role in translational control. Heat shock effects on eIF-4F. *J Biol Chem.* 262:380-8.

Literaturverzeichnis

Eckerdt F, Beauchamp E, Bell J, Iqbal A, Su B, Fukunaga R, Lulla RR, Goldman S, Plataniias LC. 2014. Regulatory effects of a Mnk2-eIF4E feedback loop during mTORC1 targeting of human medulloblastoma cells. *Oncotarget* 5:8442-51.

Eichenlaub-Ritter U, Peschke M. 2002. Expression in in vivo and in vitro growing and maturing oocytes: focus on regulation of expression at the translational level. *Human Reproduction Update* 8:21-41.

Ellederová Z, Cais O, Susor A, Uhlířová K, Kovářová H, Jelínková L, Tomek W, 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. *Mol Reprod Dev.* 75:309-17.

Ellederova Z, Kovarova H, Melo-Sterza F, Livingstone M, Tomek W, 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. *Mol Reprod Dev.* 73:68-76.

El-Raey M, Nagai T. 2014. Different Aspects of Cattle Oocyte in vitro Maturation: Review. *Journal of Reproduction and Infertility* 5:01-13.

Fadden P, Haystead TA, Lawrence Jr. JC. 1997. Identification of phosphorylation sites in the translational regulator, PHAS-I, that are controlled by insulin and rapamycin in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 272:10240-10247.

Fair T, Murphy M, Rizos D, Moss C, Martin F, Boland MP, Lonergan P. 2004. Analysis of differential maternal mRNA expression in developmentally competent and incompetent bovine two-cell embryos. *Mol Reprod Dev* 67:136-144.

Fan HY, Sun QY. 2004. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol Reprod* 70:535-547.

Fan QW, Knight ZA, Goldenberg DD, Yu W, Mostov KE, Stokoe D, Shokat KM, Weiss WA. 2006. A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma. *Cancer Cell.* 9:341-349.

Feldman ME, Apsel B, Uotila A, Loewith R, Knight ZA, Ruggero D, Shokat KM. 2009. Active-site inhibitors of mTor target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol* 7:e38.

- Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PA. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 71:836-48.
- Fissore RA, He CL, Vande Woude GF. 1996. Potential role on mitogen activated protein kinase during meiotic resumption in bovine oocytes. *Biol Reprod* 55:1261-1270.
- Flemr M, Ma J, Schultz RM, Svoboda P. 2010. P-body loss is concomitant with formation of a messenger RNA storage domain in mouse oocytes. *Biol. Reprod.* 82:1008-1017.
- Foster KG, Fingar DC. 2010. Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *J Biol Chem* 285:14071-14077.
- Foster KG, Acosta-Jaquez HA, Romeo Y, Ekim B, Soliman GA, Carriere A, Roux PP, Ballif BA, Fingar DC. 2010. Regulation of mTOR complex 1 (mTORC1) by raptor Ser863 and multisite phosphorylation. *J Biol Chem* 285:80-94.
- Fraser CS, Pain VM, Morley SJ. 1999. Cellular stress in *Xenopus* kidney cells enhances the phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor (eIF)4E and the association of eIF4F with poly(A)-binding protein. *Biochem J* 342:519-526.
- Fumagalli S, Thomas G. 2000. S6 Phosphorylation and Signal Transduction. In *Translational Control of Gene Expression* (Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews M, eds), pp. 695-718, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gavin AC, Schorderet-Slatkine S. 1997. Ribosomal S6 kinase p90rsk and mRNA cap-binding protein eIF4E phosphorylations correlate with MAP kinase activation during meiotic reinitiation of mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 46:383-391.
- Gebauer F, Xu W, Cooper GM, Richter JD. 1994. Translational control by cytoplasmic polyadenylation of *c-mos* mRNA is necessary for oocyte maturation in the mouse. *EMBO J* 13:5712-5720.
- Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, Burley SK, Polakiewicz RD, Wyslouch-Cieszynska A, Aebersold R, Sonenberg N. 2001a. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev* 15:2852-64.
- Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. 2001b. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.* 15:807-826.
- Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. 1999a. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68:913-63.

Literaturverzeichnis

Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF, Aebersold A, Sonenberg N. 1999b. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev.* 13:1422–1437.

Gkogkas CG, Khoutorsky A, Ran I, Rampakakis E, Nevarko T, Weatherill DB, Vasuta C, Yee S, Truitt M, Dallaire P, Major F, Lasko P, Ruggero D, Nader K, Lacaille JC, Sonenberg N. 2013. Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control. *Nature* 493:371-7.

Gönczy P. 2008. Mechanisms of asymmetric cell division: flies and worms pave the way. *Nat Rev* 9:355-366.

Goggin MM, Nelsen CJ, Kimball SR, Jefferson LS, Morley SJ, Albrecht JH. 2004. Rapamycin-sensitive induction of eukaryotic initiation factor 4F in regenerating mouse liver. *Hepatology* 40:537-44.

Graff JR, Konicek BW, Carter JH, Marcusson EG. 2008. Targeting the eukaryotic translation initiation factor 4E for cancer therapy. *Cancer Res* 68:631–634.

Groisman I, Jung MY, Sarkissian M, Richter JD. 2002. Translational control of the embryonic cell cycle. *Cell* 109:473–483.

Guertin DA, Sabatini DM. 2007. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer cell* 12:9–22.

Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. 2008. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30:214-26.

Haghighat A, Mader B, Pause A, Sonenberg N. 1995. Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: Competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *EMBO J* 14:5701–5709.

Hake LE, Richter JD. 1994. CPEB is a specific factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation. *Cell* 79:617–627.

Hall C, Dumstorf C, Konicek B, Robichaud N, McNulty A, Parsons S, Pelltier J, Sonenberg N, Graff JR. 2014. eIF4E phosphorylation is Mnk-dependent but does not require assembly of the eIF4F translation initiation complex. In: Proceedings of the 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. *Cancer Res* 2014;74(19 Suppl):Abstract nr LB-302.

- Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K. 2002. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110:177-189.
- Harris TE, Lawrence JC Jr. 2003. TOR signaling. *Sci STKE* 2003:re15.
- Harris TE, Chi A, Shabanowitz J, Hunt DF, Rhoads RE, Lawrence JC Jr. 2006. mTOR-dependent stimulation of the association of eIF4G and eIF3 by insulin. *EMBO J* 25:1659-1668.
- Hashimoto N, Kishimoto T. 1988. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Dev. Biol.* 126:242–252.
- Hay N. 2010. Mnk earmarks eIF4E for cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:13975-13976.
- Hay N, Sonenberg N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 18: 1926–1945.
- Heasman SJ, Ridley AJ. 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:690-701.
- Heesom KJ, Denton RM. 1999. Dissociation of the eukaryotic initiation factor-4E/4E-BP1 complex involves phosphorylation of 4E-BP1 by an mTOR-associated kinase. *FEBS Lett.* 457:489–493.
- Heesom KJ, Gampel A, Mellor H, Denton RM. 2001. Cell cycle-dependent phosphorylation of the translational repressor eIF-4E binding protein-1 (4E-BP1). *Curr. Biol.* 11:1374–1379.
- Herbert TP, Tee RA, Proud CG. 2002. The extracellular signal-regulated kinase pathway regulates the phosphorylation of 4E-BP1 at multiple sites. *J. Biol. Chem.* 277:11591–11596.
- Herbert TP, Kilhams GR, Batty IH, Proud CG. 2000. Distinct signalling pathways mediate insulin and phorbol ester-stimulated eIF4F assembly and protein synthesis in HEK 293 cells. *J. Biol. Chem.* 275:11249–11256.
- Hernández G, Vazquez-Pianzola P. 2005. Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. *Mech Dev.* 122:865-876.

Literaturverzeichnis

Hershey JWB. 1991. Translational control in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 60:717–755.

Hershey JWB, Merrick WC. 2000. Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. In *Translational Control of Gene Expression* (Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews B, eds), pp. 33–126, Cold Spring Harbor Laboratory Press

Holt CE, Bullock SL. 2009. Subcellular mRNA localization in animal cells and why it matters. *Science* 326:1212–1216.

Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, and Blenis J. 2005. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* 123:569–580.

Homa ST. 1988. Effects of cyclic AMP on the spontaneous meiotic maturation of cumulus-free bovine oocytes cultured in chemically defined medium. *J Exp Zool* 248:222-231.

Hoshino Y, Yokoo M, Yoshida N, Sasada H, Matsumoto H, Sato E. 2004. Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt participate in the FSH induced meiotic maturation of mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 69:77–86.

Hou J, Lam F, Proud C, Wang S. 2012. Targeting Mnk3 for cancer therapy. *Oncotarget* 3:118-31.

Hsieh AC, Liu Y, Edlind MP, Ingolia NT, Janes MR, Sher A, Shi EY, Stumpf CR, Christensen C, Bonham MJ, Wang S, Ren P, Martin M, Jessen K, Feldman ME, Weissman JS, Shokat KM, Rommel C, Ruggero D. 2012. The translational landscape of mTOR signaling steers cancer initiation and metastasis. *Nature* 485:55-61.

Huo Y, Iadevaia V, Yao Z, Kelly I, Cosulich S, Guichard S, Foster LJ, Proud CG. 2012. Stable isotope-labelling analysis of the impact of inhibition of the mammalian target of rapamycin on protein synthesis. *Biochem J* 444:141-151.

Huo LJ, Fan HY, Zhong ZS, Chen DY, Schatten H, Sun QY. 2004. Ubiquitin-proteasome pathway modulates mouse oocyte meiotic maturation and fertilization via regulation of MAPK cascade and cyclin B1 degradation. *Mech Dev* 121:1275–1287.

Hyttel P, Viuff D, Fair T, Laurincik J, Thomsen PD, Callesen H, Vos PL, Hendriksen PJ, Dieleman SJ, Schellander K, Besenfelder U, Greve T. 2001. Ribosomal RNA gene

expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Reproduction* 122:21-30.

Ikenoue T, Inoki K, Yang Q, Zhou X, Guan KL. 2008. Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signaling. *EMBO J.* 27:1919–31.

Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, Yang Q, Bennett C, Harada Y, Stankunas K, Wang CY, He X, MacDougald OA, You M, Williams BO, Guan KL. 2006. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* 126:955–968.

Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Rügge MA, Hall A, Hall MN. 2004. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat. Cell Biol.* 6:1122–1128.

Jackson RJ, Standart N. 1990. Do poly (A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation? *Cell* 62:15–24.

Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:113–127.

Jefferies HBJ, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, Thomas G. 1997. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J.* 16:3693–3704.

Jessus C, Beach D. 1992. Oscillation of MPF is accompanied by periodic association between cdc25 and cdc2-cyclin B. *Cell* 68:323–332.

Jewell JL, Guan KL. 2013. Nutrient signaling to mTOR and cell growth. *Trends Biochem Sci* 38:233-42.

Jewell JL, Russell RC, Guan KL. 2013. Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:133-9.

Jia Y, Polunovsky V, Bitterman PB, Wagner CR. 2012. Cap-dependent translation initiation factor eIF4E: an emerging anticancer drug target. *Med Res Rev* 32:786-814.

Jiang YP, Ballou LM, Lin RZ. 2001. Rapamycin-insensitive regulation of 4e-BP1 in regenerating rat liver. *J Biol Chem* 276:10943–10951.

Literaturverzeichnis

- Jones SW, Erikson E, Blenis J, Maller JL, Erikson RL. 1988. A *Xenopus* ribosomal protein S6 kinase has two apparent kinase domains that are each similar to distinct protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:3377-81.
- Joshi B, Lee K, Maeder DL, Jagus R. 2005. Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evol Biol* 5:48.
- Joshi B, Cameron A, Jagus R. 2004. Characterization of mammalian eIF4E-family members. *Eur J Biochem*. 271:2189-2203.
- Julien LA, Carriere A, Moreau J, Roux PP. 2010. mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol Cell Biol* 30:908-21.
- Kahvejian A, Svitkin YV, Sukarieh R, M'Boutchou MN, Sonenberg N. 2005. Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev* 19:104–113.
- Kalab P, Kubiak JZ, Verlhac MH, Colledge WH, Maro B. 1996. Activation of p90rsk during meiotic maturation and first mitosis in mouse oocytes and eggs: MAP kinase-independent and -dependent activation. *Development* 122:1957–1964.
- Kalous J, Kubelka M, Solc P, Susor A, Motlik J. 2009. AKT (protein kinase B) is implicated in meiotic maturation of porcine oocytes. *Reproduction* 138:645-654.
- Kalous J, Solc P, Baran V, Kubelka M, Schultz RM, Motlik J. 2006. PKB/AKT is involved in resumption of meiosis in mouse oocytes. *Biol Cell* 98:111-123.
- Kamenska A, Simpson C, Standart N. 2014. eIF4E-binding proteins: new factors, new locations, new roles. *Biochem Soc Trans* 42:1238-45.
- Kang SA, Pacold ME, Cervantes CL, Lim D, Lou HJ, Ottina K, Gray NS, Turk BE, Yaffe MB, Sabatini DM. 2013. mTORC1 phosphorylation sites encode their sensitivity to starvation and rapamycin. *Science* 341:1236-566.
- Karim MM, Svitkin YV, Kahvejian A, De Crescenzo G, Costa-Mattioli M, Sonenberg N. 2006. A mechanism of translational repression by competition of Paip2 with eIF4G for poly(A) binding protein (PABP) binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:9494–9499.
- Kaspar RL, Rychlik W, White MW, Rhoads RE, Morris DR. 1990. Simultaneous cytoplasmic redistribution of ribosomal protein L32 mRNA and phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E after mitogenic stimulation of Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 265:3619–3622.

- Kassens A, Held E, Salilew-Wondim D, Sieme H, Wrenzycki C, Tesfaye D, Schellander K, Hoelker M. 2015. Intrafollicular Oocyte Transfer (IFOT) of Abattoir-Derived and In Vitro-Matured Oocytes Results in Viable Blastocysts and Birth of Healthy Calves. *Biol Reprod* 92:150.
- Kastrop PM, Bevers MM, Destree OH, Kruip TA. 1990. Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation in vitro. *J Reprod Fert* 90:505–310.
- Khaleghpour K, Svitkin YV, Craig AW, DeMaria CT, Deo RC, Burley SK, Sonenberg N. 2001. Translational repression by a novel partner of human poly(A) binding protein, Paip2. *Mol Cell* 7:205–216.
- Kim J, Song G, Wu G, Gao H, Johnson GA, Bazer FW. 2013. Arginine, leucine, and glutamine stimulate proliferation of porcine trophectoderm cells through the MTOR-RPS6K-RPS6-EIF4EBP1 signal transduction pathway. *Biol Reprod.* 88:113.
- Kim JY, Burghardt RC, Wu G, Johnson GA, Spencer TE, Bazer FW. 2011. Select nutrients in the ovine uterine lumen. VII. Effects of arginine, leucine, glutamine, and glucose on trophectoderm cell signaling, proliferation, and migration. *Biol Reprod* 84:62–69.
- Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110:163-175.
- Kishimoto T. 2003. Cell-cycle control during meiotic maturation. *Curr Opin Cell Biol* 15:654–663.
- Knauf U, Tschopp C, Gram H. 2001. Negative regulation of protein translation by mitogen-activated protein kinase-interacting kinases 1 and 2. *Mol Cell Biol* 21:5500–5511.
- Kogasaka Y, Hoshino Y, Hiradate Y, Tanemura K, Sato E. 2013. Distribution and association of mTOR with its cofactors, raptor and rictor, in cumulus cells and oocytes during meiotic maturation in mice. *Mol Reprod Dev* 80:334-48.
- Koromilas AE, Lazaris-Karatzas A, Sonenberg N. 1992. mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E. *Embo. J.* 11:4153–4158.

Literaturverzeichnis

- Kosako H, Gotoh Y, Nishida E. 1994. Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in *Xenopus* oocyte maturation. *EMBO J* 13:2131–2138.
- Kubelka M, Motlík J, Schultz RM, Pavlok A. 2000. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, Without influencing chromosome condensation activity. *Biol Reprod* 62:292-302.
- Kuo CJ, Chung J, Fiorentino DF, Flanagan WM, Blenis J, Crabtree GR. 1992. Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase. *Nature* 358:70-73.
- Kyhse-Andersen J. 1984. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10:203-9.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Laplante M, Sabatini DM. 2009. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* 122:3589-94.
- Lawrence JC, Lin TA, McMahon LP, Choi KM. 2004. Modulation of the protein kinase activity of mTOR. *Curr Top Microbiol Immunol* 279:199-213.
- Le H, Browning KS, Gallie DR. 2000. The phosphorylation state of poly(A)-binding protein specifies its binding to poly(A) RNA and its interaction with eukaryotic initiation factor (eIF) 4F, eIFiso4F, and eIF4B. *J Biol Chem* 275:17452–17462.
- Lee JY, Jung YG, Seo BB. 2016. Effects of culture media conditions on production of eggs fertilized in vitro of embryos derived from ovary of high grade Hanwoo. *J Anim Sci Technol* 58:11.
- Lee J, Park JI, Yun JI, Lee Y, Yong H, Lee ST, Park CK, Hyun SH, Lee GS, Lee E. 2015. Rapamycin treatment during in vitro maturation of oocytes improves embryonic development after parthenogenesis and somatic cell nuclear transfer in pigs. *J Vet Sci* 16:373-80.
- Lee SE, Sun SC, Choi HY, Uhm SJ, Kim NH. 2012. mTOR is required for asymmetric division through small GTPases in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev.* 79:356-66.
- Lee SE, Kim JH, Kim NH. 2007. Inactivation of MAPK affects centrosome assembly, but not actin filament assembly, in mouse oocytes maturing in vitro. *Mol Reprod Dev* 74:904-911.

- Leibfried L, First NL. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci* 48:76-86.
- Lequarre AS, Traverso JM, Marchandise J, Donnay I. 2004. Poly(A) RNA is reduced by half during bovine oocyte maturation but increases when meiotic arrest is maintained with CDK inhibitors. *Biol Reprod* 71:425-31.
- Levesque JT, Sirard MA. 1996. Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B in bovine oocytes. *Biol Reprod* 55:1427-36.
- Li L, Baibakov B, Dean J. 2008. A subcortical maternal complex essential for preimplantation mouse embryogenesis. *Dev. Cell* 15:416-425.
- Li GP, Liu Y, Bunch TD, White KL, Aston KI. 2005. Asymmetric division of spindle microtubules and microfilaments during bovine meiosis from metaphase I to metaphase III. *Mol Reprod Dev* 71:220-6.
- Lin TA, Kong X, Saltiel AR, Blackshear PJ, Lawrence JC. 1995. Control of PHAS-I by Insulin in 3T3-L1 Adipocytes synthesis, degradation, and phosphorylation by rapamycin-sensitive and mitogen-activated protein kinase-independent pathway. *J Biol Chem* 270:18531-18538.
- Lindner GM, Wright RW. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20:407-416.
- Liu Q, Xu C, Kirubakaran S, Zhang X, Hur W, Liu Y, Kwiatkowski NP, Wang J, Westover KD, Gao P, Ercan D, Niepel M, Thoreen CC, Kang SA, Patricelli MP, Wang Y, Tupper T, Altabef A, Kawamura H, Held KD, Chou DM, Elledge SJ, Janne PA, Wong KK, Sabatini DM, Gray NS. 2013. Characterization of Torin2, an ATP-competitive inhibitor of mTOR, ATM, and ATR. *Cancer Res.* 73:2574-86.
- Liu L, Luo Y, Chen L, Shen T, Xu B, Chen W, Zhou H, Han X, Huang S. 2010. Rapamycin inhibits cytoskeleton reorganization and cell motility by suppressing RhoA expression and activity. *J Biol Chem* 285:38362-73.
- Livingstone M, Bidinosti M. 2012. Rapamycin-insensitive mTORC1 activity controls eIF4E:4E-BP1 binding. *F1000Res* 1:4.
- Livingstone M, Atas E, Meller A, Sonenberg N. 2010. Mechanisms governing the control of mRNA translation. *Phys Biol* 7:021001.

Literaturverzeichnis

- Lonergan P, Faerge I, Hyttel PM, Boland M, Fair T. 2003. Ultrastructural modifications in bovine oocytes maintained in meiotic arrest in vitro using roscovitine or butyrolactone. *Mol Reprod Dev* 64:369–378.
- Lynch M, Fitzgerald C, Johnston KA, Wang S, Schmidt EV. 2004. Activated eIF4E-binding protein slows G1 progression and blocks transformation by c-myc without inhibiting cell growth. *J Biol Chem* 279:3327–3339.
- Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. 2005. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 121:179–193.
- Mader S, Lee H, Pause A, Sonenberg N. 1995. The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* 15:4990–4997.
- Mangus DA, Evans MC, Jacobson A. 2003. Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol.* 4:223.
- Marcotrigiano J, Gingras AC, Sonenberg N, Burley SK. 1997. Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* 89:951–961.
- Martin KA, Blenis J. 2002. Coordinate regulation of translation by the PI 3-kinase and mTOR pathways. *Adv Cancer Res* 86:1–39.
- Martineau Y, Derry MC, Wang X, Yanagiya A, Berlanga JJ, Shyu AB, Imataka H, Gehring K, Sonenberg N. 2008. Poly(A)-binding protein-interacting protein 1 binds to eukaryotic translation initiation factor 3 to stimulate translation. *Mol Cell Biol* 28:6658–6667.
- Mathews MB, Sonenberg N, Hershey JWB. 2007. Origins and principles of translational control. In *Translational control in biology and medicine*. Edited by Mathews MB, Sonenberg N, Hershey JWB. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. pp 1-40.
- Matsuda S, Gotoh Y, Nishida E. 1993. Phosphorylation of Xenopus mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase by MAP kinase kinase kinase and MAP kinase. *J Biol Chem* 268:3277–3281.

- Mayer 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.* 81:363-375.
- McKendrick L, Morley SJ, Pain VM, Jagus R, Joshi B. 2001. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) at Ser209 is not required for protein synthesis in vitro and in vivo. *Eur J Biochem* 268:5375-85.
- McMahon LP, Choi KM, Lin TA, Abraham RT, Lawrence JC Jr. 2002. The rapamycin-binding domain governs substrate selectivity by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol* 22:7428-7438.
- Mehlmann LM. 2013. Losing mom's message: requirement for DCP1A and DCP2 in the degradation of maternal transcripts during oocyte maturation. *Biol Reprod* 88:10.
- Mehlmann LM, Saeki Y, Tanaka S, Brennan TJ, Evsikov AV, Pendola FL, Knowles BB, Eppig JJ, Jaffe LA. 2004. The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science* 306:1947-1950.
- Meinecke B, Krischek C. 2003. MAPK/ERK kinase (MEK) signalling is required for resumption of meiosis in cultured cumulus-enclosed pig oocytes. *Zygote* 11:7-16.
- Memili E, Dominko T, First NL. 1998. Transcriptional activity in bovine oocytes and embryos. *Theriogenology* 49:274.
- Mendez R, Richter JD. 2001. Translational control by CPEB: A means to the end. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:521-529.
- Meyuhas O. 2000. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur J Biochem* 267:6321-6330.
- Minich WB, Balasta ML, Goss DJ, Rhoads RE. 1994. Chromatographic resolution of in vivo phosphorylated and nonphosphorylated eukaryotic translation initiation factor eIF-4E: increased cap affinity of the phosphorylated form. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91:7668-7672.
- Modrak-Wojcik A, Gorka M, Niedzwiecka K, Zdanowski K, Zuberek J, Niedzwiecka A, Stolarski R. 2013. Eukaryotic translation initiation is controlled by cooperativity effects within ternary complexes of 4E-BP1, eIF4E, and the mRNA 5' cap. *FEBS Lett* 587:3928-34.
- Morley SJ. 2001. The regulation of eIF4F during cell growth and cell death. *Prog Mol Subcell Biol* 27:1-37.

- Morley SJ. 1997. Intracellular signalling pathways regulating initiation factor EIF4E phosphorylation during the activation of cell growth. *Biochem. Soc. Trans.* 25:503–509.
- Morley SJ, Naegele S. 2002. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor (eIF) 4E is not required for de novo protein synthesis following recovery from hypertonic stress in human kidney cells. *J Biol Chem* 36:32855–32859.
- Morley SJ, Pain VM. 1995. Translational regulation during activation of porcine peripheral blood lymphocytes: Association and phosphorylation of the alpha and gamma subunits of the initiation factor complex eIF-4F. *Biochem J* 312:627–635.
- Mothe-Satney I, Brunn GJ, McMahon LP, Capaldo CT, Abraham RT, Lawrence JC. 2000a. Mammalian target of rapamycin-dependent phosphorylation of PHAS-1 in four (S/T)P sites detected by phospho-specific antibodies. *J. Biol. Chem.* 275:33836–33843.
- Mothe-Satney I, Yang D, Fadden P, Haystead TAJ, Lawrence JC. 2000b. Multiple mechanisms control phosphorylation of PHAS-I in five (S/T)P sites that govern translational repression. *Mol. Cell. Biol.* 20:3558–3567.
- Motlik J, Kubelka M. 1990. Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. *Mol Reprod Dev* 27:366-375.
- Müller D, Lasfargues C, El Khawand S, Alard A, Schneider RJ, Bousquet C, Pyronnet S, Martineau Y. 2013. 4E-BP restrains eIF4E phosphorylation. *Translation (Austin)* 1:e25819.
- Murakami M, Ichisaka T, Maeda M, Oshiro N, Hara K, Edenhofer F, Kiyama H, Yonezawa K, Yamanaka S. 2004. mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 24:6710-8.
- Nelson MR, Leidal AM, Smibert CA. 2004. *Drosophila* Cup is an eIF4E-binding protein that functions in Smaug-mediated translational repression. *EMBO J.* 23:150-159.
- Nishimura T, Padamsi Z, Fakim H, Milette S, Dunham WH, Gingras AC, Fabian MR. 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 Rep* 11:1425-36.
- Nojima H, Tokunaga C, Eguchi S, Oshiro N, Hidayat S, Yoshino K, Hara K, Tanaka N, Avruch J, Yonezawa K. 2003. The mammalian target of rapamycin (mTOR) part-

ner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *J Biol Chem* 278:15461–15464.

Norbury C, Blow J, Nurse P. 1991. Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates. *EMBO J* 10:3321–3329.

Oh B, Hwang S, McLaughlin J, Solter D, Knowles BB. 2000. Timely translation during the mouse oocyte-to-embryo transition. *Development* 127:3795–3803.

Okumura E, Fukuhara T, Yoshida H, Hanada S, Kozutsumi R, Mori M, Tachibana K, Kishimoto T. 2002. Akt inhibits Myt1 in the signaling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition. *Nature Cell Biology* 4:111–116.

O'Leary SE, Petrov A, Chen J, Puglisi JD. 2013. Dynamic recognition of the mRNA cap by *Saccharomyces cerevisiae* eIF4E. *Structure* 21:2197–207.

Oshiro N, Yoshino K, Hidayat S, Tokunaga C, Hara K, Eguchi S, Avruch J, Yonezawa K. 2004. Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes Cells* 9:359–66.

Pain VM. 1996. Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur J Biochem* 236:747–771.

Parra JL, Buxade M, Proud CG. 2005. Features of the catalytic domains and C termini of the MAPK signal-integrating kinases Mnk1 and Mnk2 determine their differing activities and regulatory properties. *J Biol Chem* 280:37623–37633.

Patursky-Polischuk I, Stolovich-Rain M, Hausner-Hanochi M, Kasir J, Cybulski N, Avruch J, Ruegg MA, Hall MN, Meyuhos O. 2009. The TSC-mTOR pathway mediates translational activation of TOP mRNAs by insulin largely in a raptor- or rictor-independent manner. *Mol. Cell. Biol.* 29:640–9.

Pende M, Um SH, Mieulet V, Sticker M, Goss VL, Mestan J, Mueller M, Fumagalli S, Kozma SC, Thomas G. 2004. S6K1(–/–)/S6K2(–/–) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Mol Cell Biol* 24:3112–3124.

Pestova TV, Lorsch JR, Hellen CUT, eds. 2007. The mechanism of translation initiation in eukaryotes. *Translational Control in Biology and Medicine*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Literaturverzeichnis

Peterson RT, Schreiber SL. 1998. Translation control: connecting mitogens and the ribosome. *Curr. Biol.* 8:248–250.

Peterson RT, Beal PA, Comb MJ, Schreiber SL. 2000. FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. *J Biol Chem* 275:7416–23.

Poulin F, Gingras AC, Olsen H, Chevalieri S, Sonenberg N. 1998. 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. *J Biol Chem* 273:14002–14007.

Proud CG. 2002. Regulation of mammalian translation factors by nutrients. *Eur. J. Biochem.* 269:5338–5349.

Ptushkina M, von der Haar T, Karim MM, Hughes JM, McCarthy JE. 1999. Repressor binding to a dorsal regulatory site traps human eIF4E in a high cap-affinity state. *EMBO J.* 18:4068–4075.

Pyronnet S. 2000. Phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E by the MAPK-activated protein kinase Mnk1. *Biochem Pharmacol* 60:1237–1243.

Pyronnet S, Dostie J, Sonenberg N. 2001. Suppression of cap dependent translation in mitosis. *Genes & Dev* 15:2083–2093.

Pyronnet S, Imataka H, Gingras AC, Fukunaga R, Hunter T, Sonenberg N. 1999. Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits Mnk1 to phosphorylate EIF4E. *EMBO J.* 18:270–279.

Raught B, Gingras AC. 2007. Signaling to translation initiation. In *Translational Control in Biology and Medicine*, Mathews MB, Sonenberg N, Hershey JWB, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 369–400.

Raught B, Gingras AC. 1999. eIF4E activity is regulated at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol* 31:43–57.

Raught B, Peiretti F, Gingras AC, Livingstone M, Shahbazian D, Mayeur GL, Polakiewicz RD, Sonenberg N, Hershey JW. 2004. Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *EMBO J* 23:1761–1769.

Reyes JM, Chitwood JL, Ross PJ. 2015. RNA-Seq profiling of single bovine oocyte transcript abundance and its modulation by cytoplasmic polyadenylation. *Mol Reprod Dev* 82:103–114.

- Rhoads RE. 2009. eIF4E: new family members, new binding partners, new roles. *J Biol Chem* 284:16711-5.
- Richter JD. 1999. Cytoplasmic polyadenylation in development and beyond. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:446–456.
- Robert C, Hue I, McGraw S, Gagné D, Sirard MA. 2002. Quantification of cyclin B1 and p34 Cdc2 kinase in bovine-cumulus oocyte complexes and expression mapping of genes involved in the cell cycle by complementary DNA microarrays. *Biology of Reproduction* 67:1456–1464.
- Rodrigues-Cunha MC, Mesquita LG, Bressan F, Collado MD, Balieiro JC, Schwarz KR, de Castro FC, Watanabe OY, Watanabe YF, de Alencar Coelho L, Leal CL. 2016. Effects of melatonin during IVM in defined medium on oocyte meiosis, oxidative stress, and subsequent embryo development. *Theriogenology* pii:S0093-691X(16)30227-8.
- Rolfe M, McLeod LE, Pratt PF, Proud CG. 2005. Activation of protein synthesis in cardiomyocytes by the hypertrophic agent phenylephrine requires the activation of ERK and involves phosphorylation of tuberous sclerosis complex 2 (TSC2). *Biochem J* 388:973–984.
- Romasko EJ, Amarnath D, Midic U, Latham KE. 2013. Association of maternal mRNA and phosphorylated EIF4EBP1 variants with the spindle in mouse oocytes: localized translational control supporting female meiosis in mammals. *Genetics* 195:349-58.
- Roux PP, Topisirovic I. 2012. Regulation of mRNA Translation by Signaling Pathways. In *Protein Synthesis and Translational Control* (Hershey JWB, Sonenberg N, Mathews MB eds), pp. 123-146, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J. 2004. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:13489–13494.
- Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. 1994. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 78:35–43.
- Sagata N. 1996. Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: Its mechanisms and biological significance. *Trends Cell Biol* 6:22–28.

Literaturverzeichnis

- Saghir AN, Tuxworth WJ, Jr., Hagedorn CH, McDermott PJ. 2001. Modifications of eukaryotic initiation factor 4F (eIF4F) in adult cardiocytes by adenoviral gene transfer: Differential effects on eIF4F activity and total protein synthesis rates. *Biochem J* 356:557–566.
- Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, Carr SA, Sabatini DM. 2007. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell* 25:903–915.
- Sanges C, Migliaccio N, Arcari P, Lamberti A. 2013. Translational Control in Tumour Progression and Drug Resistance. In "Apoptosis" (Rudner J. eds), pp. 51-72, InTech.
- Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. 2006. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 22:159-168.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307:1098–1101.
- Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. 2004. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 14:1296–1302.
- Scantland S, Grenon JP, Desrochers MH, Sirard MA, Khandjian EW, Robert C. 2011. Method to isolate polyribosomal mRNA from scarce samples such as mammalian oocytes and early embryos. *BMC Dev Biol* 11:8.
- Schalm SS, Fingar DC, Sabatini DM, Blenis J. 2003. TOS motif-mediated raptor binding regulates 4E-BP1 multisite phosphorylation and function. *Curr Biol*. 13:797-806.
- Scheid MP, Marignani PA, Woodgett JR. 2002. Multiple phosphoinositide 3-kinase dependent steps in activation of protein kinase B. *Molecular and Cellular Biology* 22:6247–6260.
- Scheper GC, Proud CG. 2002. Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? *Eur J Biochem* 269:5350-9.
- Scheper GC, van Kollenburg B, Hu J, Luo Y, Goss DJ, Proud CG. 2002. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduces its affinity for capped mRNA. *J Biol Chem* 277:3303–3309.

- Scheper GC, Morrice NA, Kleijn M, Proud CG. 2001. The mitogen-activated protein kinase signal-integrating kinase Mnk2 is a eukaryotic initiation factor 4E kinase with high levels of basal activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 21:743–754.
- Schuh M, Ellenberg J. 2007. Self-organization of MTOCs replaces centrosome function during acentrosomal spindle assembly in live mouse oocytes. *Cell* 130:484–98.
- Schultz RM, LaMarca MJ, Wassarman PM. 1978. Absolute rates of protein synthesis during meiotic maturation of mammalian oocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:4160–4164.
- Schwab MS, Kim SH, Terada N, Edfjäll C, Kozma SC, Thomas G, Maller JL. 1999. p70(S6K) controls selective mRNA translation during oocyte maturation and early embryogenesis in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol* 19:2485–94.
- Scott PH, Brunn GJ, Kohn AD, Roth RA, Lawrence JC Jr. 1998. Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7772–7777.
- Seeger R, Krebs EG. 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9:726–735.
- Sekiyama N, Arthanari H, Papadopoulos E, Rodriguez-Mias RA, Wagner G, 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E4036–45.
- Shahbazian D, Roux PP, Mieulet V, Cohen MS, Raught B, Taunton J, Hershey JW, Blenis J, Pende M, Sonenberg N. 2006. The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *EMBO J* 25:2781–2791.
- Shang ZF, Yu L, Li B, Tu WZ, Wang Y, Liu XD, Guan H, Huang B, Rang WQ, Zhou PK. 2012. 4E-BP1 participates in maintaining spindle integrity and genomic stability via interacting with PLK1. *Cell Cycle* 11:3463–3471.
- Shaw RJ. 2009. LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol (Oxf)* 196:65–80.
- Shaw RJ, Bardeesy N, Manning BD, Lopez L, Kosmatka M, DePinho RA, Cantley LC. 2004. The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell* 6:91–99.

Literaturverzeichnis

- Shen X, Tomoo K, Uchiyama S, Kobayashi Y, Ishida T. 2001. Structural and thermodynamic behavior of eukaryotic initiation factor 4E in supramolecular formation with 4E-binding protein 1 and mRNA cap analogue, studied by spectroscopic methods. *Chem. Pharm. Bull.* 49:1299–1303.
- Shi Y, Taylor SI, Tan SL, Sonenberg N. 2003. When translation meets metabolism: multiple links to diabetes. *Endocr Rev* 24:91–101.
- Shin S, Wolgamott L, Tcherkezian J, Vallabhapurapu S, Yu Y, Roux PP, Yoon SO. 2014. Glycogen synthase kinase-3 β positively regulates protein synthesis and cell proliferation through the regulation of translation initiation factor 4E-binding protein 1. *Oncogene* 33:1690-9.
- Siemer C, Smiljakovic T, Bhojwani M, Leiding C, Kanitz W, Kubelka M, Tomek W. 2009. Analysis of mRNA associated factors during bovine oocyte maturation and early embryonic development. *Mol Reprod Dev.* 76:1208-1219.
- Sirard MA, Dufort I, Coenen K, Tremblay K, Massicotte L, Robert C. 2003. The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. *Reprod Suppl* 61:117–129.
- Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims L, First NL. 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 40:1257-1263.
- Slepenkov SV, Darzynkiewicz E, Rhoads RE. 2006. Stopped-flow kinetic analysis of eIF4E and phosphorylated eIF4E binding to cap analogs and capped oligoribonucleotides: evidence for a one-step binding mechanism. *J Biol Chem* 281:14927–14938.
- Smiljakovic T, Max M, Tomek W. 2004. Abundance of poly (A) binding protein in bovine oocytes during in vitro maturation. *Biotechnol Anim Husbandry* 20:5–13.
- Smiljakovic T, Melo Sterza F, Kubelka M, Vohnikova Z, Tomek W. 2003. Aspects of cytoplasmic maturation of bovine oocytes: interplay between MAPK, mRNA cap binding complex and cytoplasmic mRNA metabolism in regulation of translation. *Biotechnology in Animal Husbandry* 19:1–8.
- Soliman GA, Acosta-Jaquez HA, Dunlop EA, Ekim B, Maj NE, Tee AR, Fingar DC. 2010. mTOR Ser-2481 autophosphorylation monitors mTORC-specific catalytic activity and clarifies rapamycin mechanism of action. *J Biol Chem* 285:7866-79.

- Solomon MJ, Glotzer M, Lee TH, Philippe M, Kirschner MW. 1990. Cyclin activation of p34cdc2. *Cell* 63:1013–1024.
- Sonenberg N. 2008. eIF4E, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research. *Biochem Cell Biol* 86:178-83.
- Sonenberg N, Hinnebusch AG. 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136:731-45.
- Sonenberg N, Hinnebusch AG. 2007. New modes of translational control in development, behavior, and disease. *Mol Cell* 28:721-9.
- Sonenberg N, Gingras AC. 1998. The mRNA 50 cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 10:268–275.
- Song BS, Kim JS, Kim YH, Sim BW, Yoon SB, Cha JJ, Choi SA, Yang HJ, Mun SE, Park YH, Jeong KJ, Huh JW, Lee SR, Kim SH, Kim SU, Chang KT. 2014. Induction of autophagy during in vitro maturation improves the nuclear and cytoplasmic maturation of porcine oocytes. *Reprod Fertil Dev* 26:974-81.
- Standart N, Minshall N. 2008. Translational control in early development: CPEB, P-bodies and germinal granules. *Biochem Soc Trans* 36:671-676.
- Stead RL, Proud CG. 2013. Rapamycin enhances eIF4E phosphorylation by activating MAP kinase-interacting kinase 2a (Mnk2a). *FEBS Lett* 587:2623-8.
- Stebbins-Boaz B, Cao Q, de Moor CH, Mendez R, Richter JD. 1999. Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with eIF-4E. *Mol Cell* 4:1017–1027.
- Stutz A, Conne B, Huarte J, Gubler P, Volkel V, Flandin P, Vassalli JD. 1998. Masking, unmasking, and regulated polyadenylation cooperate in the translational control of a dormant mRNA in mouse oocytes. *Genes Dev* 12:2535–2548.
- Sun SC, Kim NH. 2013. Molecular mechanisms of asymmetric division in oocytes. *Microsc Microanal* 19:883-97.
- Sun QY, Schatten H. 2006. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction* 131:193-205.
- Susor A, Jansova D, Anger M, Kubelka M. 2016. Translation in the mammalian oocyte in space and time. *Cell Tissue Res* 363:69-84.

Literaturverzeichnis

- Susor A, Jansova D, Cerna R, Danylevska A, Anger M, Toralova T, Malik R, Supolikova J, Cook MS, Oh JS, Kubelka M. 2015. Temporal and spatial regulation of translation in the mammalian oocyte via the mTOR-eIF4F pathway. *Nat Commun.* 6:6078.
- Susor A, Jelinkova L, Karabinova P, Torner H, Tomek W, Kovarova H, Kubelka M. 2008. Regulation of cap-dependent translation initiation in the early stage porcine parthenotes. *Mol Reprod Dev* 75:1716-1725.
- Svitkin YV, Pause A, Haghighat A, Pyronnet S, Witherell G, Belsham GJ, Sonenberg N. 2001. The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure. *RNA* 7:382-394.
- Tarun SZ, Sachs AB. 1996. Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J* 15:7168-7177.
- Thach RE. 1992. Cap recap: the involvement of eIF-4F in regulating gene expression. *Cell* 68:177-180.
- Thoreen CC. 2013. Many roads from mTOR to eIF4F. *Biochem Soc Trans.* 41:913-6.
- Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, Sabatini DM. 2012. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* 485:109-113.
- Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, Reichling LJ, Sim T, Sabatini DM, Gray NS. 2009. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem* 284:8023-8032.
- Tian XC, Lonergan P, Jeong BS, Evans AC, Yang X. 2002. Association of MPF, MAPK, and nuclear progression dynamics during activation of young and aged bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 62:132-138.
- Tomek W, Wollenhaupt K. 2012. The "closed loop model" in controlling mRNA translation during development. *Anim Reprod Sci.* 134:2-8.
- Tomek W, Smiljakovic T. 2005. Activation of Akt (protein kinase B) stimulates metaphase I to metaphase II transition in bovine oocytes. *Reproduction.* 130:423-30.
- Tomek W, Melo Sterza FA, Kubelka M, Wollenhaupt K, Torner H, Anger M, 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. *Biol Reprod.* 66:1274-82.

- Tomek W, Torner H, Kanitz W. 2002b. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. *Reprod Dom Anim* 37:86-91.
- Tomoo K, Matsushita Y, Fujisaki H, Abiko F, Shen X, Taniguchi T, Miyagawa H, Kitamura K, Miura K, Ishida T. 2005. Structural basis for mRNA cap-binding regulation of eukaryotic initiation factor 4E by 4E-binding protein, studied by spectroscopic, X-ray crystal structural, and molecular dynamics simulation methods. *Biochem. Biophys. Acta* 1753:191–208.
- Topisirovic I, Svitkin YV, Sonenberg N, Shatkin AJ. 2011. Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2:277-98.
- Torner H, Ghanem N, Ambros C, Hölker M, Tomek W, Phatsara C, Alm H, Sirard MA, Kanitz W, Schellander K, Tesfaye D. 2008. Molecular and subcellular characterisation of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Reproduction*. 135:197-212.
- Torner H, Kubelka M, Heleil B, Tomek W, Aim H, Kuzmina T, Guiard V. 2001. Dynamics of meiosis and protein kinase activities in bovine oocytes correlated to prolactin treatment and follicle size. *Theriogenology*. 55:885-99.
- Treins C, Warne PH, Magnuson MA, Pende M, Downward J. 2010. Rictor is a novel target of p70 S6 kinase-1. *Oncogene* 18:1003-1016.
- Tremblay K, Vigneault C, McGraw S, Sirard MA. 2005. Expression of cyclin B1 messenger RNA isoforms and initiation of cytoplasmic polyadenylation in the bovine oocyte. *Biol Reprod* 72:1037–44.
- Troussard AA, Mawji NM, Ong C, Mui A, St-Arnaud R, Dedhar S. 2003. Conditional knock-out of integrin-linked kinase demonstrates an essential role in protein kinase B/Akt activation. *Journal of Biological Chemistry* 278:22374–22378.
- Tuháčková Z1, Sovová V, Sloncová E, Proud CG. 1999. Rapamycin-resistant phosphorylation of the initiation factor-4E-binding protein (4E-BP1) in v-SRC-transformed hamster fibroblasts. *Int J Cancer* 81:963-9.
- Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukuyama H, Nagata S, 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. *Mol Cell Biol* 24:6539–6549.

Uzbekova S, Arlot-Bonnemains Y, Dupont J, Dalbiès-Tran R, Papillier P, Pennetier S, Thélie A, Perreau C, Mermillod P, Prigent C, Uzbekov R. 2008. Spatio-temporal expression patterns of aurora kinases a, B, and C and cytoplasmic polyadenylation-element-binding protein in bovine oocytes during meiotic maturation. *Biol Reprod* 78:218–233.

Van Blerkom J, Bell H. 1986. Regulation of development in the fully grown mouse oocyte: chromosome-mediated temporal and spatial differentiation of the cytoplasm and plasma membrane. *J Embryol Exp Morphol* 93:213-238.

Vassalli JD, Huarte J, Belin D, Gubler P, Vassalli A, O'Connell ML, Parton LA, Rickles RJ, Strickland S. 1989. Regulated polyadenylation controls mRNA translation during meiotic maturation of mouse oocytes. *Genes Dev* 3:2163–2171.

Vasudevan S, Seli E, Steitz JA. 2006. Metazoan oocyte and early embryo development program: a progression through translation regulatory cascades. *Genes Dev* 20:138-46.

Verlhac MH, Lefebvre C, Guillaud P, Rassinier P, Maro B. 2000. Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos. *Curr Biol* 10:1303-1306.

Vigneron C, Perreau C, Dalbiès-Tran R, Joly C, Humblot P, Uzbekova S, Mermillod P. 2004. Protein synthesis and mRNA storage in cattle oocytes maintained under meiotic block by roscovitine inhibition of MPF activity. *Mol Reprod Dev* 69:457–465.

Viveiros MM, O'brien M, Eppig JJ. 2004. Protein kinase C activity regulates the onset of anaphase I in mouse oocytes. *Biol Reprod* 71:1525–1532.

Volpon L, Osborne MJ, Toposirovic I, Siddiqui N, Borden KL. 2006. Cap-free structure of eIF4E suggests a basis for conformational regulation by its ligands. *EMBO J*. 25:5138–5149.

von der Haar T, Gross JD, Wagner G, McCarthy JE. 2004. The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:503–511 Review.

Walsh D, Mohr I. 2004. Phosphorylation of eIF4E by Mnk-1 enhances HSV-1 translation and replication in quiescent cells. *Genes Dev* 18:660–672.

Wang X, Proud CG. 2006. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology (Bethesda)* 21:362-9.

- Wang L, Lawrence JC Jr, Sturgill TW, Harris TE. 2009. Mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activity is associated with phosphorylation of raptor by mTOR. *J Biol Chem* 284:14693-7.
- Wang L, Wang ZB, Zhang X, FitzHarris G, Baltz JM, Sun QY, Liu XJ. 2008. Brefeldin A disrupts asymmetric spindle positioning in mouse oocytes. *Dev. Biol.* 313:155–166.
- Wang X, Yue P, Chan CB, Ye K, Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukunaga R, Fu H, Khuri FR, Sun SY. 2007. Inhibition of mammalian target of rapamycin induces phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and Mnk-mediated eukaryotic translation initiation factor 4E phosphorylation. *Mol Cell Biol* 27:7405–7413.
- Wang X, Beugnet A, Murakami M, Yamanaka S, Proud CG. 2005. Distinct signaling events downstream of mTOR cooperate to mediate the effects of amino acids and insulin on initiation factor 4E-binding proteins. *Mol Cell Biol.* 25:2558-2572.
- Wang X, Swain JE, Bollen M, Liu XT, Ohl DA, Smith GD. 2004. Endogenous regulators of protein phosphatase-1 during mouse oocyte development and meiosis. *Reproduction* 128:493–502.
- Wang X, Li W, Parra JL, Beugnet A, Proud CG. 2003. The C terminus of initiation factor 4E-binding protein 1 contains multiple regulatory features that influence its function and phosphorylation. *Mol Cell Biol* 23:1546-57.
- Wang X, Flynn A, Waskiewicz AJ, Webb BL, Vries RG, Baines IA, Cooper JA, Proud CG. 1998. The phosphorylation of eukaryotic initiation factor eIF4E in response to phorbol esters, cell stresses, and cytokines is mediated by distinct MAP kinase pathways. *J Biol Chem* 273:9373-7.
- Waskiewicz AJ, Johnson JC, Penn B, Mahalingam M, Kimball SR, Cooper JA. 1999. Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. *Mol Cell Biol* 19:1871–1880.
- Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, Cooper JA. 1997. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J* 16:1909–1920.
- Wassarman PM, Kinloch RA. 1992. Gene expression during oogenesis in mice. *Mutation Research* 296:3–15.
- Watkins SJ, Norbury CJ. 2002. Translation initiation and its deregulation during tumorigenesis. *Br J Cancer* 86:1023–1027.

Literaturverzeichnis

- Wilkie GS, Gautier P, Lawson D, Gray NK. 2005. Embryonic poly(A)-binding protein stimulates translation in germ cells. *Mol Cell Biol* 25:2060–2071.
- Wollenhaupt K, Brüssow KP, Albrecht D, Tomek W. 2013. The Akt/mTor signaling cascade is modified during placentation in the porcine uterine tissue. *Reprod Biol* 13:184-194.
- Wollenhaupt K, Brüssow KP, Albrecht D, Tomek W. 2012. The eIF4E repressor protein 4E-BP2 is merely truncated, despite 4E-BP1 degradation in the porcine uterine tissue during implantation. *Mol Reprod Dev*. 79:767-76.
- Wollenhaupt K, Reinke K, Brüssow KP, Kanitz W, Tomek W. 2011. 4E-BP1 degradation and eIF4E truncation occur spatially distinctly in the porcine uterine epithelia and are features of noninvasive implantation in the pig. *Mol Reprod Dev*.78:895-905.
- Wollenhaupt K, Reinke K, Brüssow KP, Albrecht D, Tiemann U, Seyfert HM, Tomek W. 2010. Natural occurrence and physiological role of a truncated eIF4E in the porcine endometrium during implantation. *Biochem J*. 432:353-363.
- Wrenzycki C, Stinshoff H. 2013. Maturation environment and impact on subsequent developmental competence of bovine oocytes. *Reprod Domest Anim* 48 Suppl 1:38-43.
- Wu B, Igotz GG, Curie WB, Yang X. 1996. Temporal distinctions in the synthesis and accumulation of proteins by oocytes and cumulus cells during maturation in vitro of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 45:560–565.
- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124:471-484.
- Yan-Chang WEI, Cai-Rong Y. 2009. The expression and effect of mTOR during mouse oocyte maturation. *Prog Biochem Biophys* 36:1334.
- Yang Q, Guan KL. 2007. Expanding mTOR signaling. *Cell Research* 17:666-681.
- Yang DQ, Kastan MB. 2000. Participation of ATM in insulin signaling through phosphorylation of eIF-4E-binding protein 1. *Nat Cell Biol* 2:893–898.
- Yang H, Rudge DG, Koos JD, Vaidialingam B, Yang HJ, Pavletich NP. 2013. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature* 497:217-23.

- Yang D, Brunn GJ, Lawrence Jr. JC. 1999. Mutational analysis of sites in the translational regulator, PHAS-I, that are selectively phosphorylated by mTOR. *FEBS Lett.* 453:387–390.
- Ye J, Flint APF, Luck MR, Campell KHS. 2003. Independent activation of MAP kinase and MPF during the initiation of meiotic maturation in pig oocytes. *Reproduction* 125:645–656.
- Yoon SO, Roux PP. 2013. Rapamycin resistance: mTORC1 substrates hold some of the answers. *Curr Biol* 23:R880-3.
- Yu B, Zhang Z, Deng X, Xu X, Feng C, Li Y, Cui C, Su W, Zhao H, Yu D. 2008. Involvement of insulin in early development of mouse one-cell stage embryos. *Sci China C Life Sci* 51:767-73.
- Zeng Z, Sarbassov dos D, Samudio IJ, Yee KW, Munsell MF, Ellen Jackson C, Giles FJ, Sabatini DM, Andreeff M, Konopleva M. 2007. Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. *Blood* 109:3509-3512.
- Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. 2011. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:21–35.
- Zuberek J, Wyslouch-Ceszynska A, Niedzwiecka A, Dadlez M, Stepinski J, Augustyniak W, Gingras AC, Zhang Z, Burley SK, Sonenberg N, Stolarski R, Darzynkiewicz E. 2003. Phosphorylation of eIF4E attenuates its interaction with mRNA 5' analogs by electrostatic repulsion: Intein-mediated protein ligation strategy to obtain phosphorylated protein. *RNA* 9:52–61.

Anhang

9 Anhang

9.1 Für die Eizellgewinnung, Maturation, Fertilisation, Kultivierung und Proben- vorbereitung verwendete Medien

9.1.1 Eizellgewinnung

9.1.1.1 Modifiziertes PBS (PBS +)

| | |
|--|--------|
| PBS Dulbecco mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺ (Fa. Biochrom, Berlin) | 500 ml |
| Glucose (Fa. Sigma, Steinheim) | 500 mg |
| Sodium-Pyruvat (Fa. Sigma, Steinheim) | 18 mg |
| Penicillin (Fa. Sigma, Steinheim) | 10 mg |
| Streptomycin (Fa. Sigma, Steinheim) | 20 mg |
| Heparin (Fa. Sigma, Steinheim) | 5,6 mg |
| Bovines Serum Albumin (BSA) (Fa. Sigma, Steinheim) | 150 mg |

Aufbewahrung bei 4°C bis maximal 2-3 Tage nach Herstellung.

9.1.2 Maturation

9.1.2.1 Maturationsmedium TCM 199

| | |
|---|---------|
| Aqua ad injectabilia (Ampuwa®) (Fa. Fresenius, Bad Homburg) | 100 ml |
| NaHCO ₃ (Fa. Sigma, Steinheim) | 220 mg |
| Gentamicinsulfat (Fa. Sigma, Steinheim) | 5 mg |
| Sodium-Pyruvat (Fa. Sigma, Steinheim) | 2,2 mg |
| TCM 199 Hepes Modification (Fa. Sigma, Steinheim) | 1510 mg |

Mischen der Lösung für 40 Minuten mittels Magnetrührer, Einstellen des pH-Wertes auf 7,4, Sterilfiltration, Aufbewahrung bei 4°C bis maximal 2 Wochen nach Herstellung.

9.1.3 Fertilisation

9.1.3.1 Fertilisationsmedium TL

| | |
|--|---------|
| Aqua ad injectabilia (Ampuwa®) (Fa. Fresenius, Bad Homburg) | 100 ml |
| NaCl (Fa. Sigma, Steinheim) | 666 mg |
| KCl (Fa. Sigma, Steinheim) | 23,5 mg |
| NaHCO ₃ (Fa. Sigma, Steinheim) | 210 mg |
| NaH ₂ PO ₄ (Fa. Sigma, Steinheim) | 4 mg |
| Na-Lactat-Sirup 60% (Fa. Sigma, Steinheim) | 186 µl |
| MgCl ₂ x 6H ₂ O (Fa. Sigma, Steinheim) | 10 mg |
| CaCl ₂ x 2H ₂ O (Fa. Sigma, Steinheim) | 30 mg |
| Phenolrot (Fa. Roth, Karlsruhe) | 1 mg |

Mischen der Lösung für 40 Minuten mittels Magnetrührer, Einstellen des pH-Wertes auf 7,8, Sterilfiltration, Aufbewahrung bei 4°C bis maximal 2 Wochen nach Herstellung.

9.1.4 Kultivierung

9.1.4.1 Kultivierungsmedium SOF

| | |
|--|----------|
| Aqua ad injectabilia (Ampuwa®) (Fa. Fresenius, Bad Homburg) | 100 ml |
| NaCl (Fa. Sigma, Steinheim) | 629,2 mg |
| KCl (Fa. Sigma, Steinheim) | 53,4 mg |
| KH ₂ PO ₄ (Fa. Sigma, Steinheim) | 16,2 mg |
| CaCl ₂ x 2H ₂ O (Fa. Sigma, Steinheim) | 30 mg |
| MgCl ₂ x 6H ₂ O (Fa. Sigma, Steinheim) | 9,6 mg |
| NaHCO ₃ (Fa. Sigma, Steinheim) | 210,6 mg |
| Phenolrot (Fa. Roth, Karlsruhe) | 0,14 mg |
| Gentamycinsulfat (Fa. Sigma, Steinheim) | 5 mg |

Anhang

Mischen der Lösung für 40 Minuten mittels Magnetrührer, Einstellen des pH-Wertes auf 7,2-7,3 und der Osmolarität auf 260-280 mOsm, Sterilfiltration, Aufbewahrung bei 4°C bis maximal 4 Wochen nach Herstellung.

9.1.5 Probenvorbereitung

9.1.5.1 Modifiziertes PBS (PBS⁺)

siehe 9.1.1.1

9.1.5.2 Proteinfreies PBS (PBS⁻)

Zur Herstellung der gebrauchsfähigen Lösung wurde eine Tablette PBS (Fa. Sigma, Steinheim) in 200 ml destilliertem Wasser (Ampuwa®, Fa. Fresenius, Bad Homburg) bei Raumtemperatur gelöst. Die Aufbewahrung der fertigen Lösung erfolgte im Kühlschrank bei 4°C.

9.1.5.3 Paraformaldehyd 3% mit 2% Saccharose

Zur Herstellung einer 3%igen Paraformaldehyd-Lösung wurden 3 g Paraformaldehyd (Fa. Roth, Karlsruhe) in 100 ml proteinfreier PBS-Lösung durch Erwärmen im Wasserbad auf 75°C über den Zeitraum von einer halben Stunde gelöst. Sobald die Lösung klar war, wurden 2 g Saccharose zugegeben. Die fertige Lösung wurde bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

9.2 Medienzusätze

9.2.1 Heparin-Lösung als Zusatz zum Befruchtungsmedium

| | |
|---|------|
| Aqua ad injectabilia (Ampuwa®) (Fa. Fresenius, Bad Homburg) | 5 ml |
| Heparin (Fa. Sigma, Steinheim) | 5 mg |

Sterilfiltration der fertigen Lösung, Aliquotierung in Volumina von jeweils 100 µl in 0,5 ml Safe-Lock-Tubes (Fa. Eppendorf, Hamburg), Aufbewahrung bei -20°C im Gefrierschrank.

9.2.2 Gentamicin-Lösung als Zusatz zum Befruchtungsmedium

| | |
|---|---------|
| Aqua ad injectabilia (Ampuwa®) (Fa. Fresenius, Bad Homburg) | 12,5 ml |
| Gentamicinsulfat (Fa. Sigma, Steinheim) | 2,5 mg |

Sterilfiltration der fertigen Lösung, Aliquotierung in Volumina von jeweils 100 µl in 0,5 ml Safe-Lock-Tubes (Fa. Eppendorf, Hamburg), Aufbewahrung bei -20°C im Gefrierschrank.

9.2.3 Hypotaurin-Epinephrin-Lösung als Zusatz zum Befruchtungsmedium

Lösung 1:

| | |
|-----------------------------------|---------|
| NaCl 0,9% (Fa. Braun, Tuttlingen) | 20 ml |
| Hypotaurin (Fa. Sigma, Steinheim) | 2,19 mg |

Lösung 2:

| | |
|---|--------|
| Aqua ad injectabilia (Ampuwa®) (Fa. Fresenius, Bad Homburg) | 50 ml |
| Na-Meta-bi-sulfit (Fa. Sigma, Steinheim) | 50 mg |
| Na-Lactat-Sirup 60% (Fa. Sigma, Steinheim) | 113 µl |
| Conc. HCl (Fa. Roth, Karlsruhe) | 30 µl |

Lösung 3:

| | |
|-----------------------------------|---------|
| Lösung 2 | 40 ml |
| Epinephrin (Fa. Sigma, Steinheim) | 1,83 mg |

Anhang

Lösung 4:

| | |
|-----------------------------------|-------|
| Lösung 1 | 10 ml |
| Lösung 3 | 4 ml |
| NaCl 0,9% (Fa. Braun, Tuttlingen) | 16 ml |

Herstellung dieser Lösung unter Lichtschutz, Sterilfiltration der fertigen Lösung (Lösung 4), Aliquotierung in Volumina von jeweils 360 µl in 0,5 ml Safe-Lock-Tubes (Fa. Eppendorf, Hamburg), Aufbewahrung bei -20°C im Gefrierschrank.

9.2.4 ECS (estrus cow serum) als Zusatz zum Kultivierungsmedium

Die Herstellung erfolgte nach folgendem Schema:

- Blutentnahme bei 5-10 brünstigen Kühen oder Färsen
- Stehenlassen des Blutes zur Gerinnung mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur
- Zentrifugation des Blutes bei 500 x g für 20 Minuten
- Abgießen und Poolen des Serumüberstandes
- erneute Zentrifugation bei 500 x g für 20 Minuten
- Abgießen des Überstandes in ein Becherglas
- Erhitzen im Wasserbad bei 56°C für eine Stunde zur Inaktivierung des Komplementsystems
- Abkühlen des Serums (Raumtemperatur)
- Abfüllen des Serums in Vacutainer und Tiefgefrieren bei -20°C
- Je nach Gebrauch Auftauen eines Teils der Vacutainer und Aliquotierung von je 1000 µl Serum in 1,5 ml Safe-Lock-Tubes (Fa. Eppendorf, Hamburg) mit anschließendem erneuten Einfrieren

9.3 Inhibitorlösungen

9.3.1 Rapamycin-Lösung (800 μM)

| | |
|--|------------------|
| Rapamycin (Cell Signaling Technology, USA) | 40 nmol |
| DMSO (Fa. Serva, Heidelberg) | 50 μl |

Um eine Konzentration von 10 μM Rapamycin pro Well (Gesamtvolumen: 400 μl) zu erreichen, wurden den 395 μl Maturationsmedium pro Well jeweils 5 μl einer Rapamycin-Lösung mit einer Konzentration von 800 μM hinzugefügt. Die hergestellte Rapamycin-Lösung (800 μM) wurde in Volumina von jeweils 5 μl in 0,5 ml Safe-Lock-Tubes (Fa. Eppendorf, Hamburg) aliquotiert. Diese Portionen wurden bis zu ihrer Verwendung im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt.

9.3.2 Torin2-Lösung

Torin2-Stocklösung (20 mM)

| | |
|------------------------------|----------------------|
| Torin2 | 10 mg |
| DMSO (Fa. Serva, Heidelberg) | 1156,3 μl |

Torin2-Lösung (240 μM)

| | |
|------------------------------|-------------------|
| Torin2-Stocklösung (20 mM) | 12 μl |
| DMSO (Fa. Serva, Heidelberg) | 988 μl |

Um eine Konzentration von 3 μM Torin2 pro Well (Gesamtvolumen: 400 μl) zu erreichen, wurden den 395 μl Maturationsmedium pro Well jeweils 5 μl einer Torin2-Lösung mit einer Konzentration von 240 μM hinzugefügt. Die hergestellte Torin2-Lösung (240 μM) wurde in Volumina von jeweils 5 μl in 0,5 ml Safe-Lock-Tubes (Fa. Eppendorf, Hamburg) aliquotiert. Diese Portionen wurden bis zu ihrer Verwendung im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt.

9.4 Aceto-Orcein-Färbelösung für die morphologische Beurteilung der Eizellen

| | |
|---------------------------------------|--------|
| Orcein (Fa. Serva, Heidelberg) | 2 g |
| Essigsäure 60 % (Fa. Roth, Karlsruhe) | 100 ml |

Das Orcein wurde in einem Teil der Essigsäure (ca. 90 ml) gelöst und bis kurz vor den Siedepunkt erhitzt. Anschließend wurde es auf etwa 20°C abgekühlt und die restliche Essigsäure wurde hinzugefügt. Danach wurde die Farbstofflösung durch Filterpapier filtriert und bei einer Temperatur von 4°C gelagert.

9.5 Biochemische Analysen

9.5.1 SDS-PAGE nach Laemmli (1970)

9.5.1.1 Polyacrylamid-Trenngel 12,5%-13,5%

| Trenngel | 12,5% | 13% | 13,5% |
|--|---------|--------|---------|
| Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8) (Fa. Serva, Heidelberg) | 12,5 ml | 13 ml | 13,5 ml |
| Tris 1,5 mol/l (pH 8,8) (Fa. Roth, Karlsruhe) | 7,5 ml | 7,5 ml | 7,5 ml |
| doppelt destilliertes H ₂ O | 9,5 ml | 9,0 ml | 8,5 ml |
| SDS 10% (Fa. Roth, Karlsruhe) | 0,3 ml | 0,3 ml | 0,3 ml |
| APS 10% (Fa. Roth, Karlsruhe) | 0,3 ml | 0,3 ml | 0,3 ml |
| TEMED (Fa. GE Healthcare) | 20 µl | 20 µl | 20 µl |

9.5.1.2 Polyacrylamid-Sammelgel 5%

| | |
|---|---------|
| Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8) (Fa. Serva, Heidelberg) | 2,5 ml |
| Tris 0,5 mol/l (pH 6,8) (Fa. Roth, Karlsruhe) | 3,8 ml |
| doppelt destilliertes H ₂ O | 8,5 ml |
| SDS 10% (Fa. Roth, Karlsruhe) | 0,15 ml |
| APS 10% (Fa. Roth, Karlsruhe) | 0,3 ml |
| TEMED (Fa. GE Healthcare) | 20µl |

9.5.1.3 Elektrophoresepuffer 10fach konzentriert

| | |
|---|----------|
| Tris 0,5 mol/l (Fa. Roth, Karlsruhe) | 60,5 ml |
| Glycin (133 mmol/l) (Fa. GE Healthcare) | 100,0 ml |
| SDS 10% (Fa. Roth, Karlsruhe) | 10,0 ml |
| doppelt destilliertes H ₂ O | 1000 ml |

Arbeitsverdünnung: 100 ml auf 900 ml doppelt destilliertes H₂O.

9.5.1.4 SDS-Probenpuffer Blue Loading Buffer

| | |
|---|--------|
| SDS Probenpuffer 3 × (Cell Signaling Technology, USA) | 0,9 ml |
| Reducing Agent | 100 µl |

Anhang

9.5.2 Western-Blot

9.5.2.1 Transferpuffer nach Towbin

Stammlösung, zehnfach konzentriert

| | |
|--|---------|
| Glycin (Fa. Roth, Karlsruhe) | 144 g |
| Tris (Fa. Roth, Karlsruhe) | 30 g |
| SDS (Fa. Roth, Karlsruhe) | 7,5 g |
| doppelt destilliertes H ₂ O | 1000 ml |

Arbeitslösung, einfach konzentriert, 20% Methanol

| | |
|--|--------|
| Stammlösung | 100 ml |
| doppelt destilliertes H ₂ O | 700 ml |
| Methanol (Fa. Roth, Karlsruhe) | 200 ml |

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

| | |
|--|---------|
| Tris 1 mol/l (Fa. Roth, Karlsruhe) | 24,2 g |
| NaCl (Fa. Roth, Karlsruhe) | 80,0 g |
| doppelt destilliertes H ₂ O | 1000 ml |

9.5.2.3 Tris Buffer Saline + Tween 20 (TBS-T)

| | |
|--|----------|
| TBS | 100,0 ml |
| doppelt destilliertes H ₂ O | 899,0 ml |
| Tween 20 (Fa. Sigma, Steinheim) | 1,0 ml |

9.5.3 ECL-Detektion

| | |
|------------------------------------|--------|
| <i>Lösung A</i> | |
| Tris-HCl 0,1 mol/l (pH 8,6) | 200 ml |
| Luminol (Fa. AppliChem, Darmstadt) | 50 mg |

| | |
|--|-------|
| <i>Lösung B</i> | |
| Para-Hydroxycoumarinsäure (Fa. Sigma, Steinheim) | 11 mg |
| DMSO (Fa. Roth, Karlsruhe) | 10 ml |

| | |
|---|--------|
| <i>Fertiges ECL-Detektionsreagenz</i> | |
| Lösung A | 1 ml |
| Lösung B | 100 µl |
| H ₂ O ₂ (30%) (Fa. Roth, Karlsruhe) | 30 µl |

9.6 Immunhistochemische Analysen

9.6.1 Fixationslösung (Paraformaldehyd 3%, Glucose 2%)

siehe 9.1.5.3

9.6.2 Permeabilisierungspuffer

| | |
|--|---------|
| Destilliertes Wasser | 100 ml |
| Hepes (Fa. Serva, Heidelberg) | 476 mg |
| Saccharose (Fa. Roth, Karlsruhe) | 10,27 g |
| NaCl (Fa. Roth, Karlsruhe) | 299 mg |
| MgCl ₂ (Fa. Sigma, Steinheim) | 60,9 mg |
| 0,5 % Triton X 100 (Fa. Serva, Heidelberg) | 0,5 ml |

Einstellung des pH-Wertes auf 7,4.

9.6.3 Waschpuffer

| | |
|--------------------------------------|-------------|
| PBS ⁻ (siehe 7.1.5.2) | 200 ml |
| BSA (Fa. Roth, Karlsruhe) | 1 g |
| Triton X 100 (Fa. Serva, Heidelberg) | 100 μ l |

9.6.4 Paraformaldehyd 2%

Zur Herstellung einer 2%igen Paraformaldehyd-Lösung wurden 2 g Paraformaldehyd (Fa. Roth, Karlsruhe) in 100 ml proteinfreier PBS-Lösung durch Erwärmen im Wasserbad auf 75°C über den Zeitraum von einer halben Stunde gelöst. Die fertige Lösung wurde bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

9.6.5 Tabellen

Tab.6: In der Eizelle vorhandene Gesamtmenge der untersuchten Faktoren und ihrer phosphorylierten Formen für die verschiedenen Versuchsgruppen: Dargestellt sind die durch den jeweiligen Antikörper (BP1, P-BP1 Thr37/46, eIF4E, P-eIF4E Ser209, mTor, P-mTor Ser2448, Raptor, P-Raptor Ser792, Rictor, P-Rictor Thr1135) erzeugten Signalintensitäten für die verschiedenen Versuchsgruppen (Kontrolle 0h, Kontrolle 24h, Rapamycin 10 μ M 24h und Torin2 3 μ M 24h). In Klammern ist der Standardfehler (StdErr) und das Konfidenzintervall (Konf.-Int.) für den jeweiligen Wert angegeben.

| | Kontrolle 0h | Kontrolle 24h | Rapamycin 10μM 24h | Torin2 3μM 24h |
|-----------------|--|--|--|--|
| BP1 | 48,10 (StdErr: 4,90; Konf.-Int.: 38,30- 57,90) | 50,02 (StdErr: 4,90; Konf.-Int.: 40,22- 59,82) | 48,54 (StdErr: 5,05; Konf.-Int.: 38,44- 58,64) | 34,02 (StdErr: 5,40; Konf.-Int.: 23,23- 44,82) |
| P-BP1 | 38,85 (StdErr: 9,18; Konf.-Int.: 20,47- 57,23) | 169,65 (StdErr: 8,91; Konf.-Int.: 151,82-187,48) | 159,10 (StdErr: 10,19; Konf.-Int.: 138,71-179,49) | 82,42 (StdErr: 9,18; Konf.-Int.: 64,04- 100,80) |
| eIF4E | 67,59 (StdErr: 10,05; Konf.-Int.: 47,51-87,67) | 104,25 (StdErr: 9,79; Konf.-Int.: 84,70-123,79) | 95,81 (StdErr: 10,66; Konf.-Int.: 74,51-117,11) | 82,19 (StdErr: 10,66; Konf.-Int.: 60,89- 103,49) |
| P-eIF4E | 54,00 (StdErr: 17,04; Konf.-Int.: 19,73-88,27) | 156,36 (StdErr: 15,78; Konf.Int.: 124,63-188,09) | 123,73 (StdErr: 15,25; Konf.:Int.: 93,08-154,39) | 122,21 (StdErr: 17,80; Konf.-Int.: 86,42-158,01) |
| mTor | 91,50 (StdErr: 21,31; Konf.-Int.: 48,84-134,16) | 89,39 (StdErr: 19,34; Konf.-Int.: 50,68-128,10) | 89,69 (StdErr: 20,59; Konf.Int.: 48,48-130,90) | 62,79 (StdErr: 19,93; Konf.-Int.: 22,89- 102,69) |
| P-mTor | 38,79 (StdErr: 19,88; Konf.-Int.: - 1,17-78,76) | 114,03 (StdErr: 20,69; Konf.-Int.: 72,43-155,62) | 95,83 (StdErr: 20,69; Konf.-Int.: 54,24-137,43) | 117,87 (StdErr: 18,50; Konf.-Int.: 80,66-155,07) |
| Raptor | 167,49 (StdErr: 7,95; Konf.-Int: 151,60-183,37) | 186,96 (StdErr: 6,95; Konf.-Int.: 173,07-200,85) | 177,43 (StdErr: 6,75; Konf.-Int.: 163,93-190,92) | 176,39 (StdErr: 6,75; Konf.-Int.: 162,89- 189,89) |
| P-Raptor | 31,72 (StdErr: 5,49; Konf.-Int.: 20,65- 42,79) | 28,20 (StdErr: 6,26; Konf.-Int.: 15,58- 40,82) | 21,75 (StdErr: 5,72; Konf.-Int.: 10,23- 33,27) | 17,79 (StdErr: 5,49; Konf.-Int.: 6,73- 28,86) |
| Rictor | 125,35 (StdErr: 10,71; Konf.:Int.: 103,94-146,77) | 167,80 (StdErr: 10,41; Konf.-Int.: 146,99-188,61) | 171,04 (StdErr: 10,71; Konf.-Int.: 149,63-192,45) | 168,08 (StdErr: 12,25; Konf.-Int.: 143,59-192,56) |
| P-Rictor | 107,45 (StdErr: 20,69; Konf.-Int.: 66,04-148,87) | 151,65 (StdErr: 16,17; Konf.-Int.: 119,28-184,02) | 142,75 (StdErr: 16,64; Konf.-Int.: 109,43-176,06) | 139,17 (StdErr: 17,15; Konf.-Int.: 104,83-173,50) |

Tab.7: Unterschiede bezüglich der insgesamt in der Eizelle vorliegenden Menge der untersuchten Faktoren und ihrer phosphorylierten Formen zwischen den Versuchsgruppen:

Aufgeführt sind Unterschiede, die zwischen den Versuchsgruppen Kontrolle 0h (0hK), Kontrolle 24h (24hK), Rapamycin 10 μ M 24h (Rapa) und Torin2 3 μ M 24h (Torin2) beobachtet wurden. Die Zeile P-BP1, 0hK \downarrow <---> 24hK \uparrow , P<0,001 beispielsweise soll zum Ausdruck bringen, dass phosphoryliertes BP1 in ungereiften Eizellen (Versuchsgruppe 0hK) statistisch signifikant in geringerer Menge vorliegt als in gereiften Eizellen (Versuchsgruppe 24hK). Der statistischen Beurteilung liegen die Signalintensitäten für die jeweiligen Antikörper (BP1, P-BP1, eIF4E, P-eIF4E, mTor, P-mTor, Raptor, P-Raptor, Rictor und P-Rictor), die in Tab.6 angegeben sind, zugrunde.

| | Beobachteter Unterschied zwischen zwei Versuchsgruppen | Statistische Signifikanz |
|-----------------|--|--------------------------|
| BP1 | - | |
| P-BP1 | 0hK \downarrow <---> 24hK \uparrow | P<0,001 |
| | 0hK \downarrow <---> Rapa \uparrow | P<0,001 |
| | 0hK \downarrow <---> Torin2 \uparrow | P<0,01 |
| | 24hK \uparrow <---> Torin2 \downarrow | P<0,001 |
| | Rapa \uparrow <---> Torin2 \downarrow | P<0,001 |
| eIF4E | - | |
| P-eIF4E | 0hK \downarrow <---> 24hK \uparrow | P<0,001 |
| | 0hK \downarrow <---> Rapa \uparrow | P<0,05 |
| | 0hK \downarrow <---> Torin2 \uparrow | P<0,05 |
| mTor | 24hK \uparrow <---> Torin2 \downarrow | Stat. nicht signifikant |
| P-mTor | 0hK \downarrow <---> 24hK \uparrow | Stat. nicht signifikant |
| | 0hK \downarrow <---> Rapa \uparrow | Stat. nicht signifikant |
| | 0hK \downarrow <---> Torin2 \uparrow | P<0,05 |
| Raptor | - | |
| P-Raptor | 0hK \uparrow <---> 24hK \downarrow | Stat. nicht signifikant |
| | 0h K \uparrow <---> Rapa \downarrow | Stat. nicht signifikant |
| | 0h K \uparrow <---> Torin2 \downarrow | Stat. nicht signifikant |
| Rictor | 0h K \downarrow <---> 24hK \uparrow | P<0,05 |
| | 0h K \downarrow <---> Rapa \uparrow | P<0,05 |
| | 0h K \downarrow <---> Torin2 \uparrow | Stat. nicht signifikant |
| P-Rictor | 0h K \downarrow <---> 24hK \uparrow | Stat. nicht signifikant |
| | 0hK \downarrow <---> Rapa \uparrow | Stat. nicht signifikant |
| | 0hK \downarrow <---> Torin2 \uparrow | Stat. nicht signifikant |

Tab.8: Unterschiede bezüglich der in der Eizelle vorliegenden Menge der untersuchten Faktoren und ihrer phosphorylierten Formen zwischen den Versuchsgruppen getrennt nach Lokalisation innerhalb der Eizelle:

Die bereits in Tab.7 dargestellten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen werden hier durch Berücksichtigung der jeweiligen Lokalisation innerhalb der Eizelle (Kern, Mitte, Rand) genauer ausgeführt. So sagt die Zeile P-BP1, Kern, 0hK ↓ ↔ 24hK ↑, P<0,001 beispielsweise aus, dass phosphoryliertes BP1 am Kern ungereifter Eizellen (Versuchsgruppe 0hK) statistisch signifikant in geringerer Menge vorliegt als am Kern gereifter Eizellen (Versuchsgruppe 24hK). Der statistischen Beurteilung liegen hierbei die in Tab.10 angegebenen Signalintensitäten zugrunde.

| | Lokalisation | Beobachteter Unterschied zwischen zwei Versuchsgruppen | Statistische Signifikanz | |
|----------------|--------------|--|--------------------------|-------------------------|
| BP1 | Kern | – | | |
| | Mitte | – | | |
| | Rand | – | | |
| P-BP1 | Kern | 0hK ↓ | 24hK ↑ | P<0,001 |
| | | 0hK ↓ | Rapa ↑ | P<0,001 |
| | | 0hK ↓ | Torin2 ↑ | P<0,01 |
| | | 24hK ↑ | Torin2 ↓ | P<0,001 |
| | | Rapa ↑ | Torin2 ↓ | P<0,001 |
| | Mitte | 0hK ↓ | 24hK ↑ | P<0,001 |
| | | 0hK ↓ | Rapa ↑ | P<0,001 |
| | | 0hK ↓ | Torin2 ↑ | P<0,01 |
| | | 24hK ↑ | Torin2 ↓ | P<0,001 |
| | | Rapa ↑ | Torin2 ↓ | P<0,001 |
| | Rand | 0hK ↓ | 24hK ↑ | P<0,001 |
| | | 0hK ↓ | Rapa ↑ | P<0,001 |
| | | 0hK ↓ | Torin2 ↑ | P<0,05 |
| | | 24hK ↑ | Torin2 ↓ | P<0,001 |
| | | Rapa ↑ | Torin2 ↓ | P<0,001 |
| eIF4E | Kern | 0hK ↓ | 24hK ↑ | P<0,05 |
| | Mitte | – | | |
| | Rand | 0hK ↓ | 24hK ↑ | P<0,05 |
| P-eIF4E | Kern | 0hK ↓ | 24hK ↑ | P<0,001 |
| | | 0hK ↓ | Rapa ↑ | P<0,05 |
| | | 0hK ↓ | Torin2 ↑ | P<0,01 |
| | Mitte | 0hK ↓ | 24hK ↑ | P<0,01 |
| | Rand | 0hK ↓ | 24hK ↑ | P<0,001 |
| | | 0hK ↓ | Rapa ↑ | P<0,01 |
| mTor | Kern | 0hK ↓ | 24hK ↑ | Stat. nicht signifikant |
| | | 0hK ↓ | Rapa ↑ | Stat. nicht signifikant |
| | | 24hK ↑ | Torin2 ↓ | Stat. nicht signifikant |
| | Mitte | 24hK ↑ | Torin2 ↓ | Stat. nicht signifikant |
| | Rand | 24hK ↑ | Torin2 ↓ | Stat. nicht signifikant |

Fortsetzung Tab.8: Unterschiede bezüglich der in der Eizelle vorliegenden Menge der untersuchten Faktoren und ihrer phosphorylierten Formen zwischen den Versuchsgruppen getrennt nach Lokalisation innerhalb der Eizelle

| | Lokalisation | Beobachteter Unterschied zwischen zwei Versuchsgruppen | Statistische Signifikanz | |
|-------------------------------------|-----------------|--|-----------------------------------|-------------------------|
| P-mTor | Kern | 0hK ↓ 24hK ↑ | P<0,05 | |
| | | 0hK ↓ Rapa ↑ | Stat. nicht signifikant | |
| | | 0hK ↓ Torin2 ↑ | P<0,01 | |
| | Mitte | – | | |
| | Rand | 0hK ↓ 24hK ↑ | Stat. nicht signifikant | |
| | | 0hK ↓ Rapa ↑ | Stat. nicht signifikant | |
| | | 0hK ↓ Torin2 ↑ | P<0,05 | |
| | Raptor | Kern | 0hK ↓ 24hK ↑ | P<0,001 |
| | | | 0hK ↓ Rapa ↑ | P<0,01 |
| 0hK ↓ Torin2 ↑ | | | P<0,05 | |
| Mitte | | – | | |
| Rand | | 0hK ↓ 24hK ↑ | P<0,05 | |
| | | 24hK ↑ Torin2 ↓ | P<0,05 | |
| P-Raptor | Kern | – | | |
| | Mitte | 0hK ↑ 24hK ↓ | Stat. nicht signifikant | |
| | | 0hK ↑ Rapa ↓ | P<0,05 | |
| | | 0hK ↑ Torin2 ↓ | P<0,01 | |
| | Rand | – | | |
| Rictor | Kern | 0hK ↓ 24hK ↑ | P<0,05 | |
| | | 0hK ↓ Rapa ↑ | P<0,01 | |
| | | 0hK ↓ Torin2 ↑ | P<0,05 | |
| | Mitte | 0hK ↓ Torin2 ↑ | P<0,05 | |
| | Rand | 0hK ↓ Rapa ↑ | P<0,05 | |
| | P-Rictor | Kern | 0hK ↓ 24hK ↑ | Stat. nicht signifikant |
| 0hK ↓ Rapa ↑ | | | Stat. nicht signifikant | |
| 0hK ↓ Torin2 ↑ | | | Stat. nicht signifikant | |
| Mitte | | – | | |
| Rand | | 0hK ↓ 24hK ↑ | Stat. nicht signifikant | |
| | | 0hK ↓ Rapa ↑ | Stat. nicht signifikant | |
| | | 0hK ↓ Torin2 ↑ | Stat. nicht signifikant | |

Tab.9: An bestimmten Lokalisationen innerhalb der Eizelle vorliegende Menge der untersuchten Faktoren und ihrer phosphorylierten Formen:

Angegeben sind die Signalintensitäten, die für den jeweiligen Antikörper (BP1, P-BP1, eIF4E, P-eIF4E, mTor, P-mTor, Raptor, P-Raptor, Rictor, P-Rictor) an verschiedenen Lokalisationen (Kern, Mitte, Rand) innerhalb der Eizelle gemessen wurden. In Klammern angefügt ist der Standardfehler (StdErr) und das Konfidenzintervall (Konf.-Int.) für den jeweiligen Wert.

| | Kern | Mitte | Rand |
|-----------------|---|---|--|
| BP1 | 47,71 (StdErr: 2,48; Konf.-Int.: 42,75-52,66) | 40,63 (StdErr: 2,72; Konf.-Int.: 35,19-46,07) | 47,18 (StdErr: 2,67; Konf.-Int.: 41,84-52,51) |
| P-BP1 | 124,74 (StdErr: 5,27; Konf.-Int.: 114,20-135,28) | 103,27 (StdErr: 4,84; Konf.-Int.: 93,58-112,96) | 109,51 (StdErr.: 4,54; Konf.-Int.: 100,41-118,60) |
| eIF4E | 89,83 (StdErr: 5,33; Konf.-Int.: 79,19-100,47) | 83,87 (StdErr: 5,28; Konf.-Int.: 73,32-94,41) | 88,68 (StdErr: 5,29; Konf.-Int.: 78,19-99,25) |
| P-eIF4E | 118,81 (StdErr: 8,48; Konf.-Int.: 101,76-135,86) | 116,31 (StdErr: 8,64; Konf.-Int.: 98,93-133,69) | 107,11 (StdErr: 8,09; Konf.-Int.: 90,84-123,38) |
| mTor | 80,19 (StdErr: 10,39; Konf.-Int.: 59,49-100,99) | 86,21 (StdErr: 10,14; Konf.-Int.: 65,91-106,51) | 83,62 (StdErr: 10,06; Konf.-Int.: 63,49-103,75) |
| P-mTor | 91,80 (StdErr: 10,17; Konf.-Int.: 71,36-112,24) | 87,77 (StdErr: 9,85; Konf.-Int.: 67,95-107,58) | 95,33 (StdErr: 9,25; Konf.-Int.: 74,61-116,05) |
| Raptor | 187,45 (StdErr: 3,74; Konf.-Int.: 179,97-194,93) | 145,55 (StdErr: 5,84; Konf.-Int.: 133,88-157,23) | 198,19 (StdErr: 3,99; Konf.-Int.: 190,21-206,17) |
| P-Raptor | 29,57 (StdErr: 3,76; Konf.-Int.: 21,98-37,15) | 19,27 (StdErr: 2,29; Konf.-Int.: 14,66-23,87) | 25,77 (StdErr: 3,14; Konf.-Int.: 19,43-32,10) |
| Rictor | 170,49 (StdErr: 5,51; Konf.-Int.: 159,47-181,50) | 147,35 (StdErr: 6,09; Konf.-Int.: 135,18-159,52) | 156,36 (StdErr: 6,77; Konf.-Int.: 142,82-169,90) |
| P-Rictor | 142,03 (StdErr: 8,48; Konf.-Int.: 125,06-159,01) | 117,01 (StdErr: 10,08; Konf.-Int.: 96,83-137,19) | 146,72 (StdErr: 8,63; Konf.-Int.: 129,44-164,00) |

Tab.10: An bestimmten Lokalisationen innerhalb der Eizelle vorliegende Menge der untersuchten Faktoren und ihrer phosphorylierten Formen getrennt nach Versuchsgruppen:

Die bereits in Tab.9 dargestellte Lokalisierung der Faktoren (BP1, eIF4E, mTor, Raptor, Rictor) und ihrer phosphorylierten Formen innerhalb der Eizelle ist hier durch die separate Betrachtung der Versuchsgruppen (Kontrolle 0h, Kontrolle 24h, Rapamycin 10 μ M 24h und Torin2 3 μ M 24h) genauer aufgeführt. Angegeben ist sowohl die Signalintensität für den jeweiligen Antikörper als auch in Klammern der Standardfehler und das Konfidenzintervall für den jeweiligen Wert.

| | Kontrolle 0h | | | Kontrolle 24h | | | Rapamycin 10 μ M 24h | | | Torin2 3 μ M 24h | | |
|-----------------|--|--|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| | Kern | Mitte | Rand | Kern | Mitte | Rand | Kern | Mitte | Rand | Kern | Mitte | Rand |
| BP1 | 49,94 (4,79; 40,36- 59,52) | 45,71 (5,26; 35,18- 56,23) | 48,65 (5,16; 38,32- 58,97) | 52,88 (4,79; 43,31- 62,46) | 43,06 (5,26; 32,53- 53,58) | 54,12 (5,16; 43,79- 64,44) | 50,50 (4,94; 40,63- 60,37) | 44,19 (5,42; 33,34- 55,04) | 50,94 (5,32; 40,30- 61,58) | 37,50 (5,28; 26,95- 48,05) | 29,57 (5,80; 17,97- 41,17) | 35,00 (5,69; 23,62- 46,38) |
| PBP1 | 48,94 (10,31; 28,30- 69,58) | 31,88 (9,48; 12,91- 50,84) | 35,75 (8,90; 17,94- 53,56) | 176,24 (10,00; 156,21- 196,26) | 163,06 (9,19; 144,66- 181,46) | 169,65 (8,63; 152,37- 186,93) | 173,85 (11,44; 150,95- 196,74) | 142,46 (10,51; 121,42- 163,51) | 161,00 (9,87; 141,24- 180,76) | 99,94 (10,31; 79,30- 120,58) | 75,69 (9,48; 56,72- 94,66) | 71,63 (8,90; 53,81- 89,44) |
| eIF4E | 68,83 (10,41; 48,05- 89,62) | 68,11 (10,31; 47,53- 88,69) | 65,83 (10,33; 45,21- 86,46) | 107,74 (10,13; 87,51- 127,97) | 93,79 (10,03; 73,76- 113,82) | 111,21 (10,05; 91,14- 131,29) | 97,63 (11,04; 75,58- 119,67) | 91,56 (10,93; 69,73- 113,39) | 98,25 (10,95; 76,37- 120,12) | 85,13 (11,04; 63,08- 107,17) | 82,00 (10,93; 60,17- 103,83) | 79,44 (10,95; 57,56- 101,31) |
| P-eIF4E | 49,58 (17,52; 14,35- 84,81) | 63,00 (17,86; 27,09- 98,91) | 49,42 (16,72; 15,80- 83,03) | 161,50 (16,22; 128,88- 194,12) | 161,57 (16,53; 128,33- 194,81) | 146,00 (15,48; 114,88- 177,12) | 124,07 (15,67; 92,56- 155,85) | 122,93 (15,97; 90,82- 155,05) | 124,20 (14,95; 94,14- 154,26) | 140,09 (18,30; 103,29- 176,89) | 117,73 (18,65; 80,22- 155,23) | 108,82 (17,46; 73,71- 143,93) |
| mTor | 70,93 (21,80; 27,28- 114,57) | 104,36 (21,29; 61,74- 146,97) | 99,21 (21,12; 56,96- 141,47) | 90,47 (19,79; 50,86- 130,08) | 89,06 (19,32; 50,39- 127,73) | 88,65 (19,16; 50,30- 126,99) | 91,07 (21,06; 48,90- 133,23) | 87,87 (20,57; 46,70- 129,04) | 90,13 (20,39; 49,31- 130,95) | 68,31 (20,40; 27,49- 109,14) | 63,56 (19,91; 23,70- 103,42) | 56,50 (19,75; 16,98- 96,02) |
| P-mTor | 27,92 (20,25; -12,79- 68,64) | 46,46 (19,63; 7,00- 85,93) | 42,00 (20,53; 0,72- 83,28) | 117,17 (21,08; 74,79- 159,54) | 105,42 (20,43; 64,34- 146,49) | 119,50 (21,37; 76,54- 162,46) | 99,50 (21,08; 57,12- 141,88) | 85,58 (20,43; 44,51- 126,66) | 102,42 (21,37; 59,46- 145,38) | 122,60 (18,85; 84,70- 160,50) | 113,60 (18,27; 76,86- 150,34) | 117,40 (19,11; 78,97- 155,83) |
| Raptor | 158,46 (8,35; 141,76- 175,16) | 160,46 (13,04; 134,39- 186,53) | 183,54 (8,91; 165,72- 201,36) | 204,29 (7,30; 189,69- 218,90) | 139,65 (11,41; 116,85- 162,45) | 216,94 (7,79; 201,36- 232,52) | 196,33 (7,10; 182,14- 210,52) | 127,78 (11,08; 105,62- 149,94) | 208,17 (7,57; 193,02- 223,31) | 190,72 (7,10; 176,53- 204,91) | 154,33 (11,08; 132,18- 176,49) | 184,11 (7,57; 168,97- 199,25) |
| P-Raptor | 30,92 (7,19; 16,44- 45,41) | 32,23 (4,39; 23,43- 41,04) | 32,00 (6,01; 19,90- 44,10) | 36,60 (8,19; 20,09- 53,11) | 18,70 (4,98; 8,66- 28,74) | 29,30 (6,85; 15,50- 43,10) | 27,58 (7,48; 12,51- 42,66) | 14,75 (4,55; 5,59- 23,91) | 22,92 (6,25; 10,32- 35,52) | 23,15 (7,19; 8,67- 37,64) | 11,38 (4,37; 2,58- 20,19) | 18,85 (6,01; 6,74- 30,95) |
| Rictor | 134,71 (10,69; 113,34- 156,08) | 116,24 (11,81; 92,63- 139,84) | 125,12 (13,14; 98,85- 151,39) | 178,83 (10,39; 158,07- 199,60) | 155,50 (11,47; 132,56- 178,44) | 169,06 (12,77; 143,53- 194,59) | 184,18 (10,69; 162,81- 205,55) | 154,06 (11,81; 130,45- 177,67) | 174,88 (13,14; 148,61- 201,15) | 184,23 (12,22; 159,79- 208,67) | 163,62 (13,50; 136,62- 190,61) | 156,38 (15,02; 126,34- 186,43) |
| P-Rictor | 103,91 (19,76; 64,35- 143,47) | 109,00 (23,50; 61,97- 156,03) | 109,45 (20,12; 69,18- 147,73) | 166,94 (15,45; 136,02- 197,87) | 120,72 (18,37; 83,96- 157,49) | 167,28 (15,73; 135,80- 198,76) | 151,53 (15,90; 119,71- 183,35) | 110,82 (18,90; 72,99- 148,66) | 165,88 (16,18; 133,49- 198,28) | 145,75 (16,39; 112,95- 178,55) | 127,50 (19,48; 88,50- 166,50) | 144,25 (16,68; 110,86- 177,64) |

Tab.11: Unterschiede in der Lokalisation der untersuchten Faktoren und ihrer phosphorylierten Formen innerhalb der Eizelle:

Dargestellt sind Unterschiede in der Lokalisation der Faktoren BP1, eIF4E, mTor, Raptor und Rictor und ihrer phosphorylierten Formen innerhalb der Eizelle. Die Zeile BP1, Kern↑ <--> Mitte↓, P<0,001 bedeutet beispielsweise, dass BP1 statistisch signifikant mehr am Kern als in der Mitte der Eizelle lokalisiert ist. Der statistischen Beurteilung liegen die in Tab.9 aufgeführten Signalintensitäten zugrunde.

| | Beobachteter Unterschied zwischen zwei Lokalisationen | Statistische Signifikanz |
|-----------------|---|--------------------------|
| BP1 | Kern ↑ ←————→ Mitte ↓ | P<0,001 |
| | Rand ↑ ←————→ Mitte ↓ | P<0,001 |
| P-BP1 | Kern ↑ ←————→ Mitte ↓ | P<0,001 |
| | Kern ↑ ←————→ Rand ↓ | P<0,001 |
| | Rand ↑ ←————→ Mitte ↓ | P<0,01 |
| eIF4E | Kern ↑ ←————→ Mitte ↓ | P<0,05 |
| P-eIF4E | Kern ↑ ←————→ Rand ↓ | P<0,001 |
| | Mitte ↑ ←————→ Rand ↓ | P<0,01 |
| mTor | Mitte ↑ ←————→ Kern ↓ | P<0,01 |
| P-mTor | Rand ↑ ←————→ Mitte ↓ | P<0,01 |
| Raptor | Kern ↑ ←————→ Mitte ↓ | P<0,001 |
| | Rand ↑ ←————→ Kern ↓ | P<0,05 |
| | Rand ↑ ←————→ Mitte ↓ | P<0,001 |
| P-Raptor | Kern ↑ ←————→ Mitte ↓ | P<0,01 |
| | Rand ↑ ←————→ Mitte ↓ | P<0,001 |
| Rictor | Kern ↑ ←————→ Mitte ↓ | P<0,001 |
| | Kern ↑ ←————→ Rand ↓ | P<0,001 |
| P-Rictor | Kern ↑ ←————→ Mitte ↓ | P<0,001 |
| | Rand ↑ ←————→ Mitte ↓ | P<0,001 |

Tab.12: Unterschiede in der Lokalisation der untersuchten Faktoren und ihrer phosphorylierten Formen innerhalb der Eizelle getrennt nach Versuchsgruppen:

Die bereits in Tab.11 dargestellten Unterschiede werden hier durch separate Betrachtung der einzelnen Versuchsgruppen (Kontrolle 0h, Kontrolle 24h, Rapamycin 10 μ M 24h, Torin2 3 μ M 24h) genauer ausgeführt. So soll die Zeile BP1, Kontrolle 24h, Kern \uparrow \leftrightarrow Mitte \downarrow , $P < 0,001$ zum Ausdruck bringen, dass BP1, betrachtet man ausschließlich die Versuchsgruppe Kontrolle 24h, statistisch signifikant mehr am Kern als in der Mitte der Eizelle lokalisiert ist. Der statistischen Beurteilung liegen hierbei die in Tab.10 angegebenen Signalintensitäten zugrunde.

| Antikörper | Versuchsgruppe | Beobachteter Unterschied zwischen zwei Lokalisationen | | Statistische Signifikanz |
|------------------|----------------|---|--------------------|--------------------------|
| BP1 | Kontrolle 0h | - | | |
| | Kontrolle 24h | Kern \uparrow | Mitte \downarrow | $P < 0,001$ |
| | | Rand \uparrow | Mitte \downarrow | $P < 0,001$ |
| | Rapamycin | Kern \uparrow | Mitte \downarrow | Stat. nicht signifikant |
| | | Rand \uparrow | Mitte \downarrow | $P < 0,01$ |
| | Torin2 | Kern \uparrow | Mitte \downarrow | $P < 0,05$ |
| Rand \uparrow | | Mitte \downarrow | $P < 0,05$ | |
| P-BP1 | Kontrolle 0h | Kern \uparrow | Mitte \downarrow | $P < 0,01$ |
| | Kontrolle 24h | Kern \uparrow | Mitte \downarrow | $P < 0,05$ |
| | Rapamycin | Kern \uparrow | Mitte \downarrow | $P < 0,001$ |
| | | Rand \uparrow | Mitte \downarrow | $P < 0,001$ |
| | Torin2 | Kern \uparrow | Mitte \downarrow | $P < 0,001$ |
| | | Kern \uparrow | Rand \downarrow | $P < 0,001$ |
| eIF4E | Kontrolle 0h | - | | |
| | Kontrolle 24h | Kern \uparrow | Mitte \downarrow | $P < 0,01$ |
| | | Rand \uparrow | Mitte \downarrow | $P < 0,001$ |
| | Rapamycin | - | | |
| | Torin2 | - | | |
| P-eIF4E | Kontrolle 0h | Mitte \uparrow | Kern \downarrow | Stat. nicht signifikant |
| | | Mitte \uparrow | Rand \downarrow | $P < 0,05$ |
| | Kontrolle 24h | Kern \uparrow | Rand \downarrow | $P < 0,05$ |
| | | Mitte \uparrow | Rand \downarrow | $P < 0,01$ |
| | Rapamycin | - | | |
| | Torin2 | Kern \uparrow | Mitte \downarrow | $P < 0,01$ |
| | | Kern \uparrow | Rand \downarrow | $P < 0,001$ |
| mTor | Kontrolle 0h | Mitte \uparrow | Kern \downarrow | $P < 0,001$ |
| | | Rand \uparrow | Kern \downarrow | $P < 0,001$ |
| | Kontrolle 24h | - | | |
| | Rapamycin | - | | |
| | Torin2 | Kern \uparrow | Rand \downarrow | $P < 0,01$ |
| Mitte \uparrow | | Rand \downarrow | $P < 0,05$ | |

Fortsetzung Tab.12: Unterschiede in der Lokalisation der untersuchten Faktoren und ihrer phosphorylierten Formen innerhalb der Eizelle getrennt nach Versuchsgruppen

| Antikörper | Versuchsgruppe | Beobachteter Unterschied zwischen zwei Lokalisationen | | Statistische Signifikanz |
|-----------------|----------------|---|---------|--------------------------|
| P-mTor | Kontrolle 0h | Mitte ↑ | Kern ↓ | P<0,05 |
| | Kontrolle 24h | Rand ↑ | Mitte ↓ | P<0,01 |
| | Rapamycin | Rand ↑ | Mitte ↓ | P<0,01 |
| | Torin2 | - | | |
| Raptor | Kontrolle 0h | Rand ↑ | Kern ↓ | P<0,01 |
| | Kontrolle 24h | Kern ↑ | Mitte ↓ | P<0,001 |
| | | Rand ↑ | Mitte ↓ | P<0,001 |
| | Rapamycin | Kern ↑ | Mitte ↓ | P<0,001 |
| | | Rand ↑ | Mitte ↓ | P<0,001 |
| | Torin2 | Kern ↑ | Mitte ↓ | P<0,01 |
| Rand ↑ | | Mitte ↓ | P<0,05 | |
| P-Raptor | Kontrolle 0h | - | | |
| | Kontrolle 24h | Kern ↑ | Mitte ↓ | P<0,01 |
| | | Rand ↑ | Mitte ↓ | P<0,01 |
| | Rapamycin | Kern ↑ | Mitte ↓ | P<0,05 |
| | | Rand ↑ | Mitte ↓ | P<0,05 |
| | Torin2 | Kern ↑ | Mitte ↓ | Stat. nicht signifikant |
| Rand ↑ | | Mitte ↓ | P<0,05 | |
| Rictor | Kontrolle 0h | - | | |
| | Kontrolle 24h | Kern ↑ | Mitte ↓ | P<0,05 |
| | Rapamycin | Kern ↑ | Mitte ↓ | P<0,01 |
| | Torin2 | Kern ↑ | Rand ↓ | P<0,01 |
| P-Rictor | Kontrolle 0h | - | | |
| | Kontrolle 24h | Kern ↑ | Mitte ↓ | P<0,001 |
| | | Rand ↑ | Mitte ↓ | P<0,001 |
| | Rapamycin | Kern ↑ | Mitte ↓ | P<0,001 |
| | | Rand ↑ | Kern ↓ | P<0,01 |
| | | Rand ↑ | Mitte ↓ | P<0,001 |
| | | Kern ↑ | Mitte ↓ | P<0,05 |
| | | Rand ↑ | Mitte ↓ | Stat. nicht signifikant |

Danksagung

Mein besonderer, herzlicher Dank gilt Herrn Dr. W. Tomek für die Überlassung des Themas, die wertvollen Anregungen und die große fachliche Unterstützung sowohl bei der Durchführung meiner Versuche als auch beim Abfassen der Dissertation. Er stand mir bei allen Fragen jederzeit mit umfassendem Wissen, Freundlichkeit und Geduld zur Seite.

Für die Möglichkeit, meine Dissertation an der Justus-Liebig-Universität Gießen einreichen zu dürfen, sowie für die sachverständige Unterstützung beim Verfassen der Arbeit möchte ich Frau Prof. Dr. C. Wrenzycki meinen herzlichen Dank aussprechen. Bei Herrn Dr. R. Pöhland bedanke ich mich herzlich für die Betreuung des immunhistochemischen Abschnitts meiner Arbeit und für die kompetenten Hilfestellungen beim Anfertigen der Dissertation. Bei letzterem stand mir auch Frau PD Dr. J. Schön mit Rat und Tat zur Seite, wofür ich ihr meinen herzlichen Dank aussprechen möchte.

Frau G. Krüger und Frau P. Reckling danke ich sehr für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung des experimentellen Teils meiner Arbeit, insbesondere auch für das geduldige Beantworten meiner zahlreichen Fragen.

Herrn Dr. A. Tuchscherer möchte ich für seine Hilfe bei den statistischen Auswertungen danken.

Herrn Dr. G. Viereck danke ich für die Unterstützung bei der Literatur-Beschaffung. Des Weiteren danke ich auch den anderen Mitarbeitern des Bereichs Fortpflanzungsbiologie des Leibniz-Institutes für Nutztierbiologie Dummerstorf für die freundliche Aufnahme in ihren Forschungsbereich.

Mein herzlichster Dank gilt außerdem der Geschäftsführung des Besamungsvereins Neustadt an der Aisch (BVN), Herrn Dr. C. Leiding und Herrn Dr. J. Aumann, 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.

Allen Mitarbeitern des BVN danke ich für die herzliche Aufnahme und die Hilfsbereitschaft, die mir beim Anfertigen meiner Arbeit von großem Nutzen war.

Besonders danken möchte ich Frau Dr. A. Woehl-Wenigerkind, die mich geduldig und fachkundig in die Laborpraxis der In-vitro-Produktion eingeführt hat und stets ein offenes Ohr für Fragen und Probleme jedweder Art hatte.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meiner Vorgängerin im IVP-Labor, Sophia Mayer, für ihre hilfreichen Tipps und Ratschläge, insbesondere was die praktische Durchführung der Versuche im IVP-Labor angeht.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meiner Familie, die in den letzten Jahren immer für mich da war, für ihr Verständnis und ihre liebevolle Unterstützung.

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.

Manuela Kreißelmeier



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6593-5

