

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluß einer 24-stündigen Proteinsynthesehemmung durch Cycloheximid auf den weiteren Eizellreifungsverlauf und die Kumulusexpansion zu charakterisieren. Im zweiten Teil der Arbeit sollte der Einfluß des MAPK-Kinase-Inhibitors PD 98059 auf die Eizell- und Kumulusreifung untersucht werden. PD 98059 hemmt selektiv die Phosphorylierung und Aktivierung der MAPK-Kinase und damit indirekt die Aktivierung der MAP-Kinase. Durch die Unterbrechung des Signaltransduktionswegs sollte die Beteiligung dieser Kinase bei der Wiederaufnahme der Meiose, beim weiteren Reifungsverlauf und bei der Kumulusexpansion analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden die Aktivitäten der MAP-Kinase und des MPF in den Eizellen und in den Kumuluszellen bestimmt.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Nach einer Proteinsynthesehemmung über 24 Stunden mit Cycloheximid befinden sich 100 % der KOKs im GV-Stadium. Es kommt zu einer Kondensation der Chromosomen bei intakter Kernmembran. Es findet keine Expansion des Kumuluszellverbandes statt. Der Einfluß von Cycloheximid ist vollständig reversibel.
2. Der Reifungsverlauf nach einer vorübergehenden Proteinsynthesehemmung ist durch folgende Charakteristika gekennzeichnet: Nach 2 Stunden Kultivierungszeit verbleiben noch 96 % der KOKs im GV-Stadium. Bereits nach der 8. Stunde sind dies nur noch 10 %. Die Stadien der Diakinese lassen sich ungefähr von der 2. - 14. Stunde, die der Metaphase I von der 4. - 20. Stunde und die der Ana- und Telophase I ab der 6. Stunde nachweisen. Eine Zunahme der Metaphase II-Stadien ist ab der 16. Stunde zu verzeichnen und zeigt ab der 22. Stunde ein Maximum.
3. Für die durchschnittliche Dauer der Kernreifungsstadien nach einer 24-stündigen Proteinsynthesehemmung wurden 6,2 Stunden für das GV-Stadium, 1,2 Stunden für die Diakinese, 8 Stunden für die Metaphase I, 2,6 Stunden für die Anaphase I und 0,9 Stunden für die Telophase I ermittelt.

4. Der Vergleich des Kernreifungsverlaufs von KOKs bester und guter Qualität verzeichnet nach einer 6-stündigen Weiterkultivierung einen signifikanten Unterschied. Im weiteren Kultivierungsverlauf treten keine Differenzen mehr auf.
5. Durch eine Kultivierung von KOKs mit Cycloheximid über 24 Stunden kann keine vollständige Synchronisation im Kernreifungsverlauf erreicht werden
6. Nach einer 48-stündigen Kultivierung von KOKs kommt es ab einer PD 98059 Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zu einer signifikanten Verringerung an Eizellen, die die Metaphase II erreichen (23 %). Eine fast vollständige Inhibition der Eizellreifung ist ab einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  zu verzeichnen. Bei denudierten Eizellen führt eine Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  PD 98059 zu einer signifikanten Verringerung der Eizellen, die die Metaphase II (40 %) erreichen und zu einer signifikanten Erhöhung der Oozyten, die im GV-Stadium (35 %) sowie in den Stadien der Meta -, Ana- und Telophase I (33 %) verbleiben. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die MAP-Kinase für den GVBD und für den Übergang von der Metaphase I zur Metaphase II benötigt wird.
7. Der Einfluß des Inhibitors PD 98059 auf die Kultivierung von intakten KOKs und denudierten Eizellen ist vollständig reversibel. Nach einer 48-stündigen Inhibition und anschließender 48-stündiger inhibitorfreier Weiterkultivierung erreichen 78 % der KOKs und 52 % der denudierten Oozyten die Metaphase II
8. Eine Inhibition der Eizellreifung ist nach einer bereits eingeleiteten Kultivierung von 6 bzw. 24 und 26 Stunden nicht mehr möglich. Die Aktivierung der MAPK-Kinase in porcinen Eizellen kann auf einen Zeitraum von 6 Stunden nach der Reifungsinduktion begrenzt werden.
9. PD 98059 verringert in porcinen Eizellen und Kumuluszellen die MAP-Kinase- und MPF-Aktivität signifikant. Vermutlich ist die MAP-Kinase in die Induktion der MPF-Aktivierung involviert. Beide Enzyme beeinflussen sich wahrscheinlich gegenseitig über einen positiven Rückkopplungsmechanismus
10. Eine Inhibition der MAPK-Kinase beeinflusst die Kumulusreifung, indem sie eine vollständige Kumulusexpansion verhindert. Basierend auf diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, daß die MAP-Kinase direkt oder indirekt eine Rolle in der Expansion des Kumuluszellverbandes spielt

## 7 SUMMARY

Anke Schilling: Experimental investigations of protein synthesis inhibition and MAP kinase inhibition in porcine oocytes during *in vitro* maturation

The aim of the present study was to analyse the effect of an initial protein synthesis inhibition on the subsequent nuclear maturation and cumulus expansion of COCs in inhibitor-free medium. Furthermore, the influence of PD 98059 an inhibitor of the MAPK kinase on nuclear and cumulus maturation was determined. PD 98059 is a selective inhibitor of the phosphorylation and activation of MAPK kinase and prevents in consequence the activation of the MAP kinase indirectly. The aim was to determine the participation of the MAP kinase in the induction of nuclear maturation and cumulus expansion. The dynamics of MAP kinase and MPF activities were investigated in oocytes as well as in cumulus cells.

The following results were obtained:

1. Inhibition of protein synthesis by cycloheximide for 24 hours prevented GVBD. The oocytes showed highly condensed chromatin and an intact nuclear membran. Cumulus cell expansion did not occur. The influence of cycloheximide was fully reversible.
2. The determination of the nuclear progression after removal of the inhibition of protein synthesis led to the following results: After a culture period of 2 hours 96 % of the oocytes remained in the GV stage. The diakinesis could be observed from 2 - 14 h, the metaphase I stage after 4 h, the anaphase I and telophase I stages after 6 h and the metaphase II stage after 16 hours of cultivation.
3. After an incubation period of 24 hours with cycloheximide oocytes spent mean times of 6.2 h in GV, 1.2 h in diakinesis, 8 h in metaphase I, 2.6 h in anaphase I and 0.9 in telophase I.
4. Nuclear progression after removal of the protein synthesis inhibitor did not differ between oocytes of good and excellent quality except after inhibition of protein synthesis and 6 hours of subsequent culture in inhibitor-free medium.
5. Cultivation with cycloheximid could not synchronise nuclear maturation

6. Concentrations of  $\geq 10 \mu\text{M}$  PD 98059 led to a significant decrease in the proportion of COCs reaching the metaphase II stage after 48 hours of cultivation. In denuded oocytes concentrations of  $\geq 20 \mu\text{M}$  led to a significant decrease in the proportion of oocytes reaching the metaphase II stage and concomitantly to a significant increase of oocytes remaining in the GV or in the metaphase I to telophase I stages. This suggests that the MAP kinase is involved in both, the transition from the GV stage to metaphase I and from metaphase I to metaphase II.
7. The influence of the inhibitor PD 98059 is reversible. In total 78 % of the COCs and 52 % of denuded oocytes reached the metaphase II stage after inhibition for 48 hours and subsequent cultivation for 48 hours in inhibitor-free medium.
8. Incubation with PD 98059 after a culture period of 6, or 24, and 26 hours in inhibitor-free medium did not prevent nuclear maturation in porcine oocytes.
9. PD 98059 led to a significant drop of the activities of MAP kinase and MPF in the oocytes as well as in the cumulus cells. It is possible that the regulation of the activities of both enzymes is linked by a feedback loop and that the MAP kinase induces the increase in MPF activity.
10. Inhibition of MAPK kinase prevented a complete cumulus cell expansion. Based on this results it is suggested that the MAP kinase is directly or indirectly involved in this process.