

6 Zusammenfassung

Die präovulatorische Eizelreifung beginnt mit der Überwindung der seit der fetalen Entwicklungsperiode bestehenden meiotischen Arretierung. Die genauen Wechselwirkungen zwischen der germinativen und somatischen Follikelkomponente in diesem Prozeß sind nicht bekannt. Bessere Kenntnisse versprechen eine Erweiterung des Wissens bezüglich der Zellzyklusregulation in Keimzellen und können helfen, die Ergebnisse der IVM-Techniken zu verbessern.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Interaktion zwischen Kumuluszellen und Eizelle in porzinen Kumulus-Oozyten-Komplexen im Prozeß der Wiederaufnahme der Meiose genauer zu untersuchen. Dazu wurde der Einfluß einer Translations-, Transkriptions- und Polyadenylierungshemmung auf die beiden zellzyklusassoziierten Enzyme MPF und MAP-Kinase in Eizellen bestimmt, die als Kumulus-Oozyten-Komplexe kultiviert wurden. Als Vergleichswerte und zur Evaluierung der Methode wurden die Kernreifungskinetik und die Aktivitätsprofile der beiden Enzyme während einer 48-stündigen Kultivierung analysiert. Änderungen auf Ebene der Transkription in Kumuluszellen wurden mit Hilfe der neu etablierten Technik des *Differential-Display* dargestellt. Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefaßt werden:

1. 86,5 % der Eizellen befinden sich direkt nach Isolation aus dem Follikel im GV I-Stadium. Nach 6-stündiger Kultivierung treten vermehrt Eizellen im GV II-, nach 11 Stunden im GV III- und nach 14-stündiger Inkubation im GV IV-Stadium auf. Die Meiosestadien Diakinese, Metaphase I, Ana-/Telophase I und Metaphase II sind im Kultivierungsintervall 21 - 33 Stunden, 26 - 34 Stunden, 29 - 46 Stunden und nach der 35. Stunde der Inkubation nachzuweisen.
2. Für die durchschnittliche Dauer der Kernreifungsstadien wurden 25 Stunden für das GV-Stadium, 0,9 Stunden für die Diakinese, 9,6 Stunden für die Metaphase I, 2,8 Stunden für die Anaphase I und 1,9 Stunden für die Telophase I der Meiose ermittelt.
3. Die MPF-Aktivität weist einen biphasischen Verlauf mit zwei Maxima zwischen der 27. und 32. Stunde und den letzten beiden Stunden der Kultivierungsperiode auf. Die Zeiten einer hohen Enzymaktivität entsprechen dem Auftreten von Eizellen in den Meiosestadien Metaphase I und II. Während sich die meisten Eizellen in der Ana- und Telophase I befinden, kommt es zu einer Reduktion der Enzymaktivität (33.-38. Kultivierungsstunde).

4. Die Aktivität der MAP-Kinase steigt während der gesamten Kultivierungsphase bis zu einem Maximum nach 47-stündiger Inkubation an. Das Enzym zeigt eine signifikante Steigerung seiner Aktivität vor einem entsprechenden Anstieg des MPF.
5. Eine 24-stündige Hemmung der Transkription (α -Amanitin) und/oder Polyadenylierung (Cordycepin) führt zur einer Verhinderung der Eizellreifung. Die Aktivität der beiden Kinasen bleibt auf dem Niveau, das in ungereiften Eizellen gemessen wird. Während einer 24-stündigen Weiterkultivierung ohne Inhibitoreinfluß nehmen mit Cordycepin blockierte Eizellen die Reifung auf, während α -Amanitin eine irreversible Wirkung zeigt.
6. Eine Translationshemmung (Cycloheximid) führt zu einem nichtsignifikanten Anstieg der Kinaseaktivitäten und zu einer Kondensation der Chromosomen in intakter Zellkernmembran. Bei 24-stündiger Weiterkultivierung ohne Inhibitoreinfluß beenden die Eizellen die Maturation. Der MPF und die MAP-Kinase erreichen Aktivitäten, die nach 48-stündiger unbeeinflußter Inkubation erreicht werden.
7. Eine kombinierte Transkriptions- und Translationshemmung führt zu einer Aufhebung der irreversiblen Wirkung einer Transkriptionsblockade auf die Eizellreifung. Dies ist von einer signifikanten Steigerung der MPF- und MAP-Kinaseaktivität begleitet.
8. Mit der *Differential-Display*-Technik können aus geringen Mengen RNA differenzierungsspezifische *RNA-Fingerprints* dargestellt werden. Diese Technik eignet sich dazu, differentiell exprimierte Transkripte zu isolieren und zu reamplifizieren. Sie bietet damit die Grundlage für weiterführende molekularbiologische Techniken.
9. Alpha-Amanitin bewirkt nach 2-stündiger Inkubation eine generelle Reduktion der Transkription in den Kumuluszellen.
10. Basierend auf den vorgelegten und früheren Ergebnissen der Arbeitsgruppe wird ein Modell zur Kumulus-Eizell-Interaktion während der Reifungsinduktion vorgeschlagen. Ein Proteinfaktor, der in der Eizelle oder in den Kumuluszellen lokalisiert ist, verhindert die spontane Aufnahme der Maturation. Die Existenz dieses Faktors steht unter dem Einfluß der somatischen Zellen. Durch ein Transkriptionsereignis in den Kumuluszellen wird seine Hemmwirkung überwunden. Die Kondensation der Chromosomen ist von einem leichten Anstieg der MPF- und MAP-Kinaseaktivitäten begleitet. Für eine Auflösung der Kernmembran ist ein signifikanter Anstieg der MPF-Aktivität notwendig. Dies setzt eine aktive Proteinsynthese in der Eizelle voraus.

6.1 Summary

Axel Wehrend: Investigations of gene expression in porcine cumulus oocyte complexes during *in vitro* maturation

Meiotic arrest of oocytes at the dictyate stage is maintained by follicular cells before the preovulatory gonadotrophin surge. The communication between the oocyte and companion somatic cells in the regulation of meiotic maturation is not known so far. A better knowledge of these biochemical events is important to understand the molecular basis of oocyte maturation and to help to improve IVM techniques.

The aim of the present study is to examine the RNA and protein synthesis as well as the polyadenylation requirements for the resumption of meiosis. The Differential Display technique was established and used as a tool to generate RNA fingerprints of cumulus cells. Furthermore, the timing of nuclear progression and the dynamics of MPF and MAP kinase were investigated at the end of each 1-h interval during 48 h of cultivation.

The following results were obtained:

1. 86,5 % of the oocytes were in the GV I stage immediately after isolation. Progression to GV II, GV III and GV IV occurred after 6, 11 and 14 h of incubation respectively. The diakinesis stage can be observed from 21 - 33 h, the metaphase I stage between 26 - 34 h, the anaphase I and telophase I stages between 29 - 46 h and the metaphase II stage after 35 h of cultivation.
2. Oocytes spend the mean time of 25 h in the GV, 0,9 h in the diakinesis, 9,6 h in the metaphase I, 2,8 h in the anaphase I and 1,9 h in the telophase I of the first meiotic division.
3. The MPF activity oscillated during the culture period with two maxima: one maximum was observed between 27 - 32 h and a second after 46 h of incubation when most of the oocytes were in the metaphase I or II stages. There was a decline in activity at 33 - 38 h, which corresponded to the anaphase and telophase stages.
4. MAP kinase activity increased during the whole culture period and reached maximal levels after 47 h. The MAP kinase was activated before the MPF.
5. The addition of α -amanitin or cordycepin on its own or in combination prevented resumption of meiosis and kinase activation. The influence of cordycepin was reversible.

6. Inhibition of protein synthesis by cycloheximide for 24 h prevented the activation of MPF and MAP kinase and disintegration of the nuclear envelope. The influence of cycloheximide was fully reversible. During a second culture period in inhibitor free medium the enzyme activities increased and the oocytes showed GVBD.
7. During the concomitant inhibition of protein and hnRNA synthesis in the course of the first 24 h of culture MPF and MAP kinase activities increased and oocytes resumed meiosis in the subsequent culture period under inhibitor free conditions.
8. It was possible to detect different transcription patterns between cumulus cells that have been subject to different environments.
9. Incubation with α -amanitin for 2 h resulted in a generally suppression of mRNA synthesis in the cumulus cells visualised by RNA fingerprints.
10. Based on the results of this and previous studies it is suggested that a protein factor in the oocyte or in the companion somatic cells inhibits resumption of meiosis. A transcriptional event in the cumulus cells is able to overcome the inhibitory effect of this factor. Chromosome condensation occurs without a significant increase of MPF or MAP kinase activity, but not disintegration of the nuclear envelope. A significant activation of MPF and MAP kinase requires protein synthesis.