

Aus der Universität Rostock
und
dem Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie des
Leibniz-Institutes für Nutztierbiologie,
Dummerstorf

**Charakterisierung different entwicklungscompetenter
boviner Oozyten und deren umgebenen Follikelzellen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Dana Janowski
geb. am 11.11.1979 in Greifswald

Rostock 2010

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dieter G. Weiss
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
Universität Rostock
2. PD Dr. Helmut Torner
Leibniz-Institut für Nutztierbiologie
Dummerstorf

Tag der Verteidigung: 09.05.2011

„Was wir wissen, ist ein Tropfen; was wir nicht wissen – ein Ozean.“

Sir Isaac Newton

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-------------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Abkürzungsverzeichnis | IV |
| Abbildungsverzeichnis | VI |
| Tabellenverzeichnis | VIII |
| 1. Einleitung | 1 |
| 2. Literatur | 3 |
| 2.1. Oogenese und Follikulogenese | 3 |
| 2.1.1. Interaktion zwischen Oozyten und Follikelzellen | 4 |
| 2.2. Oozytenkompetenz | 6 |
| 2.2.1. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität in Oozyten | 8 |
| 2.2.2. Follikelatresie | 9 |
| 2.3. Bedeutung der Mitochondrien in der Oogenese | 9 |
| 2.4. Bedeutung von Proteinkinasen in der Oogenese und Follikulogenese | 11 |
| 2.4.1. Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) | 11 |
| 2.4.2. Proteinkinase Akt | 12 |
| 2.5. Apoptose | 12 |
| 2.5.1. Charakteristik der Apoptose | 12 |
| 2.5.2. Signalwege der Apoptose | 13 |
| 2.5.3. Caspasen | 15 |
| 2.5.4. Intrazelluläre Regulationsmechanismen der Apoptose | 16 |
| 2.5.4.1. Bcl-2 Proteinfamilie | 16 |
| 2.5.4.2. Mitochondrien | 16 |
| 2.5.4.3. Proteinkinasen | 17 |
| 2.6. Genexpression in Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen | 18 |
| 3. Material und Methoden | 20 |
| 3.1. Medien | 20 |
| 3.2. Untersuchungsmaterial und Versuchsplanung | 24 |
| 3.3. Gewinnung und Klassifizierung der Cumulus-Oozyten-Komplexe | 25 |
| 3.3.1. Brilliant-Cresylblau-Färbung | 26 |
| 3.4. Entwicklungskompetenz von Oozyten | 27 |
| 3.5. Aggregation und Aktivität von Mitochondrien und Chromatinkonfiguration in Oozyten | 28 |
| 3.6. Auftreten und Aktivität von MAP-Kinase und Proteinkinase Akt | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 3.7. Nachweis apoptotischer Veränderungen | 31 |
| 3.7.1. Auftreten und Aktivität von Caspase-3 | 31 |
| 3.7.2.. Modifikation der Zellmembran – Annexin-V-Färbung | 32 |
| 3.7.2.1. Charakterisierung von Granulosazellen | 33 |
| 3.7.3. DNA-Fragmentierung – TUNEL-Färbung | 36 |
| 3.8. Genexpressionsanalysen | 37 |
| 3.9. Statistische Auswertung | 39 |
| 4. Ergebnisse | 41 |
| 4.1. Entwicklungskompetenz von Oozyten unterschiedlicher BCB-Klassen | 41 |
| 4.2. Aggregation und Aktivität der Mitochondrien in ungereiften Oozyten | 42 |
| 4.2.1. Mitochondriale Aggregation | 42 |
| 4.2.2. Mitochondriale Aktivität | 43 |
| 4.2.3. Zusammenhang zwischen Aggregation und Aktivität der Mitochondrien | 44 |
| 4.3. Chromatinkonfiguration in Oozyten | 45 |
| 4.4. Auftreten und Aktivität von Proteinkinasen in Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen | 48 |
| 4.4.1. MAPK-Phosphorylierung | 48 |
| 4.4.2. Proteinkinase Akt-Phosphorylierung | 49 |
| 4.4.3. Zusammenhang zwischen der Aktivität von MAPK und Akt | 50 |
| 4.5. Charakterisierung der Granulosazellen | 51 |
| 4.6. Apoptosebestimmung in Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen | 53 |
| 4.6.1. Caspase-3 | 53 |
| 4.6.2. Annexin-V-Färbung | 54 |
| 4.6.3. TUNEL-Färbung | 54 |
| 4.7. Genexpressionsanalysen | 56 |
| 5. Diskussion | 61 |
| 5.1. Aggregation und Aktivität der Mitochondrien in ungereiften Oozyten | 62 |
| 5.2. Chromatinkonfiguration in ungereiften Oozyten | 63 |
| 5.3. Proteinkinasen | 65 |
| 5.4. Charakterisierung der Granulosazellpopulation | 66 |
| 5.5. Untersuchungen zu apoptotischen Veränderungen | 67 |
| 5.5.1. Apoptose in Cumulus- und Granulosazellen | 67 |
| 5.5.2. Aktivität der Caspase-3 in Oozyten | 70 |
| 5.6. Genexpressionsanalysen | 71 |
| 6. Zusammenfassung | 76 |

| | |
|----------------------------------|------------|
| 7. Summary | 79 |
| 8. Literaturverzeichnis | 81 |
| 9. Anhang | 101 |
| Danksagung | |
| Selbständigkeitserklärung | |
| Lebenslauf | |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| A | Adenin |
| Abb. | Abbildung |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AIF | engl.: apoptosis inducing factor |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCB | Brilliant-Cresylblau |
| BMP | engl.: bone morphogenic protein |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| Ca | Calcium |
| CAD | Caspase-aktivierte DNase |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| c.C. | kondensiertes Chromatin |
| cDNA | engl.: copy DNA |
| COK | Cumulus-Oozyten-Komplex |
| DAPK | engl.: death-associated protein kinase |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTPs | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ERK | extrazellulär regulierte Kinase |
| FADH ₂ | reduziertes Flavin-Adenindinukleotid |
| FC | engl.: fold change |
| FDR | engl.: false discovery rate |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FSH | Follikel-stimulierendes Hormon |
| GnRH | Gonadotropin-Releasing-Hormon |
| GV | Germinalvesikel |
| GVBD | Germinalvesikel-Breakdown |
| G6PDH | Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase |
| HBS | engl.: HEPES buffered saline |
| HCG | humanes Choriongonadotropin |
| IAP | engl.: inhibitor of apoptosis |
| IgG | Immunglobulin G |

| | |
|---------|--|
| IVM | <i>In-vitro</i> -Maturation |
| IVP | <i>In-vitro</i> -Produktion |
| kDa | Kilodalton |
| LH | luteinisierendes Hormon |
| MAPK | engl.: mitogen-activated protein kinase (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) |
| Mg | Magnesium |
| MPF | engl.: maturation promoting factor |
| mRNA | engl.: messenger RNA |
| mtDNA | mitochondriale DNA |
| M I | Metaphase I |
| M II | Metaphase II |
| NADH | reduziertes Nikotinsäureamid-Adenindinukleotid |
| NADPH | Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat |
| OXPPOS | oxidative Phosphorylierung |
| Page | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PARP | Poly-ADP-Ribose-Polymerase |
| PBS | engl.: phosphat buffered saline |
| PI | Propidiumiodid |
| PTP | engl.: permeability transition pore |
| qRT-PCR | quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion |
| RNA | engl.: ribonucleic acid (Ribonukleinsäure) |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | engl.: sodium dodecyl sulphate (Natriumdodecylsulfat) |
| SOF | engl.: synthetic oviductal fluid |
| T | Thymin |
| TCM | engl.: tissue culture medium |
| TdT | Terminale Deoxynukleotidyl-Transferase |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TTBS | engl.: Tween tris buffered saline |
| UV | ultraviolett |
| z.B. | zum Beispiel |
| Ø | Durchmesser |
| µA | Microamper |

Abbildungsverzeichnis

2. Literatur

- Abb. 2.1: Bestimmung der Aktivität von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. 8
- Abb. 2.2: Signalwege der Apoptose. 14

3. Material und Methoden

- Abb. 3.2: Versuchsplanung. 24
- Abb. 3.2: Verwendete COK-Klassen. 26
- Abb. 3.3: Probensammlung zur Bestimmung von MAP-Kinase und Proteinkinase Akt. 30
- Abb. 3.4: Nachweis früher Apoptose von Granulosazellen. 33
- Abb. 3.5: Durchflußzytometrische Messung der DNA nach Propidiumiodid-Färbung von Granulosazellen. 34

4. Ergebnisse

- Abb. 4.1: Stereomikroskopische Abbildung von Embryonen. 42
- Abb. 4.2: Aggregationsmuster von Mitochondrien in Oozyten. 43
- Abb. 4.3: Abhängigkeit der mitochondrialen Aktivität / Oozyte von der mitochondrialen Aggregation in BCB^+ und BCB^- Oozyten. 44
- Abb. 4.4: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Chromatins von Oozyten. 46
- Abb. 4.5: Auftreten und Phosphorylierung von MAP-Kinase in Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen. 49
- Abb. 4.6: Auftreten und Phosphorylierung von Proteinkinase Akt in Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen verschiedener BCB-Gruppen. 50
- Abb. 4.7: Aktivitäten von MAPK und Akt in Cumulus- und Granulosazellen verschiedener BCB-Gruppen. 51
- Abb. 4.8: Auftreten und Aktivierung von Caspase-3 in Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen verschiedener BCB-Gruppen. 52
- Abb. 4.9: Relative Aktivität von Caspase-3 in Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen verschiedener BCB-Klassen. 53
- Abb. 4.10: Zellzyklusverteilung von Granulosazellen zu Beginn und nach BCB-Färbung. 54
- Abb. 4.11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Granulosazellen nach TUNEL-Färbung. 55
- Abb. 4.12: Apoptoserate von Cumulus- und Granulosazellen verschiedener BCB-Gruppen. 56
- Abb. 4.13: Heatmap und Cluster differentiell exprimierter Gene in BCB^+ und BCB^- Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen. 57

| | | |
|------------------|---|-----|
| Abb. 4.14: | Einteilung differentiell exprimierter Gene zwischen BCB^+ und BCB^- Oozyten hinsichtlich der biologischen Prozesse. | 58 |
| Abb. 4.15: | Validierung differentiell exprimierter Gene mittels qRT-PCR. | 60 |
| 9. Anhang | | |
| Abb. 9.3: | Heatmap und Cluster differentiell exprimierter Gene. | 103 |
| Abb. 9.2: | Einteilung differentiell exprimierter Gene zwischen der BCB^+ - und BCB^- -Gruppe hinsichtlich der biologischen Prozesse. | 104 |

Tabellenverzeichnis

3. Material und Methoden

| | | |
|--------------|--|----|
| Tabelle 3.1: | Klassifizierung der Cumulus-Oozyten-Komplexe. | 27 |
| Tabelle 3.2: | Antikörper für die Bestimmung der MAP-Kinase und Protein-kinase Akt. | 32 |
| Tabelle 3.3: | Antikörper für die Bestimmung von Caspase-3. | 33 |
| Tabelle 3.4: | CD11b-Antikörper und deren Verdünnung. | 36 |
| Tabelle 3.5: | Antikörper zur Untersuchung von Granulosazellen auf FSH-Rezeptoren. | 37 |

4. Ergebnisse

| | | |
|---------------|--|----|
| Tabelle 4.1: | Furchungsrate der eingesetzten COKs. | 41 |
| Tabelle 4.2: | Blastozystenrate bezogen auf die Furchungsrate. | 42 |
| Tabelle 4.3: | Aggregationsmuster von Mitochondrien in Oozyten in Abhängigkeit von der BCB-Färbung. | 43 |
| Tabelle 4.4: | Aktivität der Mitochondrien in Oozyten verschiedener BCB-Klassen (BCB ⁺ , BCB ⁻). | 44 |
| Tabelle 4.5: | Chromatinkonfiguration ungereifter Oozyten in Abhängigkeit von der BCB-Gruppe. | 47 |
| Tabelle 4.6: | Relative Aktivitätsraten von MAPK (ERK1, ERK2) in Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen unterschiedlicher BCB-Gruppen. | 49 |
| Tabelle 4.7: | Relative Aktivitätsraten von Proteinkinase Akt (Ser473) in Cumulus- und Granulosazellen verschiedener BCB-Gruppen. | 50 |
| Tabelle 4.8: | Anteil CD11b positiver Zellen an der Granulosazellpopulation. | 52 |
| Tabelle 4.9: | Auftreten früher Apoptose von Granulosazellen unterschiedlicher BCB-Klassen. | 54 |
| Tabelle 4.10: | Anzahl der nach TUNEL-Färbung ausgewerteten Cumulus- und Granulosazellen (BCB ⁺ und BCB ⁻) aus Follikeln mit 3-5 mm und 5-8 mm Durchmesser. | 55 |
| Tabelle 4.11: | Stärker exprimierte Gene in BCB ⁺ Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen. | 59 |

9. Anhang

| | | |
|--------------|------------------------------------|-----|
| Tabelle 9.1: | Eingesetzte Primer in der qRT-PCR. | 101 |
|--------------|------------------------------------|-----|

1. Einleitung

Die *In-vitro*-Produktion (IVP) von Rinderembryonen stellt eine wichtige Grundlage für die Tierzucht und die biotechnologische Forschung dar. Trotz intensiver Bemühungen, die Erfolgsraten dieser Biotechnik zu verbessern, entwickeln sich bisher nur 30-40% der Oozyten zu transfertauglichen Blastozysten (LONERGAN *et al.*, 2003).

Der Grund für die geringe Effektivität der IVP wird hauptsächlich in der mangelnden Oozytenqualität und in der stark ausgeprägten Variabilität bei den Oozyten gesehen (OPIELA *et al.*, 2008; LONERGAN UND FAIR, 2008; LI *et al.*, 2009). In der IVP werden hauptsächlich im Schlachthof gewonnene Oozyten eingesetzt, die gekennzeichnet sind durch eine heterogene Qualität und Entwicklungskompetenz (GORDON UND LU, 1990).

Der Einfluß der Oozytenqualität auf die Embryonenerzeugung *in vitro* wurde beim Rind bisher intensiv untersucht (SIRARD *et al.*, 2006). Trotz allem konnte die Effektivität der IVP nicht gesteigert werden. Jedoch ist ein variabler Teil der Oozyten vor ihrer finalen Reifung in der Lage, sich zu Blastozysten zu entwickeln. Es ist demnach wichtig entwicklungs kompetente Oozyten und deren Follikel noch besser zu charakterisieren (BLONDIN *et al.*, 1996), um genau diese aus einer heterogenen Oozytenpopulation anhand zuverlässiger Kriterien selektieren zu können. Die Entwicklungskompetenz von Oozyten wird dabei häufig als ein Qualitätsmerkmal der IVP genutzt (DURANTHON UND RENARD, 2001).

Ein Faktor, der diese Entwicklungskompetenz beeinflusst, ist der Atresiegrad der umgebenen Follikel (OPIELA *et al.*, 2008).

Oozyten besitzen nach Abschluss ihres Wachstums bereits die Basiskompetenz für die weitere embryonale Entwicklung nach der Befruchtung, benötigen jedoch eine zusätzliche „Prämaturation“, um diese zu exprimieren (HYTTEL *et al.*, 1986; SIRARD *et al.*, 1999). Follikel mit einem geringen Anteil atretischer Cumulus- und Granulosazellen üben einen positiven Effekt auf die Entwicklungskompetenz von Oozyten aus (BLONDIN UND SIRARD, 1995; HENDRIKSEN *et al.*, 2000). Dieses führt zur Hypothese, dass ein leichter Grad an Atresie im Follikel als „prämaturationsähnlicher Effekt“ wirkt (HYTTEL *et al.*, 1986; SIRARD *et al.*, 1999).

In der Prämaturationsphase vor dem eigentlichen Start der finalen Oozytenreifung konnte ebenfalls eine Hoch- bzw. Runterregulation der Genaktivität bzw. der Synthese von Proteinen in der Oocyte und den Cumuluszellen beobachtet werden (DIELEMAN *et al.*, 2002). Die Analyse zellphysiologischer und molekularer Parameter an different

entwicklungskompetenten Oozytenpopulationen in diesem bedeutsamen Zeitraum könnte dabei Kriterien der Oozytenqualität näher definieren.

Für die eigenen Untersuchungen wurden Oozyten aus zwei Follikelpopulationen (3-5 mm und 5-8 mm) genutzt. Eine Einzelaspiration der Follikel ermöglichte es, die Follikelzellen den jeweiligen Oozyten zuordnen zu können. Für das Rind konnte gezeigt werden, dass der Farbstoff Brilliant-Cresylblau (BCB) für die Selektionentwicklungskompetenter Oozyten geeignet ist (ALM *et al.*, 2005). Die Klassifizierung der Oozyten hinsichtlich ihrer Entwicklungskompetenz mittels BCB-Färbung in entwicklungskompetente (BCB⁺) und weniger entwicklungskompetente (BCB⁻) Oozyten diente als Grundlage für die weitere Charakterisierung der Oozyten und deren umgebenen Cumulus- und Granulosazellen.

Die Zielstellung der vorliegenden Arbeit bestand in der Charakterisierung der folliculären Umgebung einer entwicklungskompetenten bovinen Oozyte vor der finalen Reifung. Es sollte überprüft werden, ob different entwicklungskompetente Oozyten Unterschiede in Bezug auf den Apoptosestatus oder die Genexpression in ihrer folliculären Umgebung (Cumuluszellen und Granulosazellen) aufweisen.

Die Ergebnisse dienten der Identifikation neuer Kriterien der Selektion von entwicklungskompetenten Oozyten für die Embryonenerzeugung *in vitro* beim Rind.

2. Literatur

2.1. Oogenese und Follikulogenese

Im Ovar von Säugetieren entwickeln sich die Oozyten in Follikeln (IRVING-RODGERS *et al.*, 2001). Zwischen der Follikel- und Oozytenentwicklung besteht eine enge gegenseitige Wechselbeziehung.

Die Oogenese beginnt im Embryonalstadium mit der Entstehung der Primordialkeimzellen und endet mit der Ovulation (BAKER, 1972). Die Primordialkeimzellen vermehren sich mitotisch zu Oogonien (RÜSSE, 1983). Der Übergang der Oogonien zu primären Oozyten findet mit der ersten Reifeteilung bis zum Diplotän-Stadium der Prophase I, dem sogenannten Germinalvesikel (GV), statt. Die primäre Oozyte ist nun umgeben von einschichtigen Epithelzellen, den Granulosazellen. In diesem Stadium arretiert die Oozyte bis zur Ovulation (MANABE *et al.*, 2004). Die funktionelle Einheit aus primärer Oozyte und Epithelzellen wird Primordialfollikel genannt. Beim Rind ist die Bildung des Primordialfollikel bereits pränatal abgeschlossen (HIRSHFIELD, 1991).

Mit Beginn der reproduktiven Phase tritt jeweils ein Teil des ruhenden Primordialfollikelpools in die Wachstumsphase ein (DRIANCOURT, 1991). Dieser Prozess, auch Rekrutierung genannt, zeigt einen wellenförmigen Verlauf (ADAMS, 1999). Das Follikelwachstum bis zum Tertiärfollikel ist eng mit einer Zunahme des Oozytenvolumens verbunden. In dieser Phase differenzieren sich die Granulosazellen zu dem wandständigem „Stratum Granulosum“ und den Cumuluszellen, die die Oozyte vielschichtig umgeben (WIEKING, 2001). In der Phase des Oozytenwachstums werden verstärkt mRNA und Proteine synthetisiert und akkumuliert, die für die weitere Entwicklung der Oozyte und deren frühe Embryonalentwicklung von Bedeutung sind (FAIR *et al.*, 1995; HYTTEL *et al.*, 2001)

In der darauffolgenden Selektionsphase wird die Zahl der rekrutierten Follikel auf die ovulatorische Follikelzahl durch Atresie reduziert (GOODMAN UND HODGEN, 1983). Nach einem plötzlichen Anstieg der LH-Ausschüttung (Luteinisierendes Hormon) aus der Hypophyse setzt die präovulatorische Follikelreifung ein (HYTTEL *et al.*, 1997). Ein selektierter Follikel (dominanter Follikel) wird nun unterstützt weiterzuwachsen, während die subdominanten Follikel der Atresie unterliegen (GOODMAN UND HODGEN, 1983).

Im Tertiärfollikel mit einem Durchmesser von 3 mm hat die Oozyte beim Rind ihre volle Größe mit einem Durchmesser von 115-120 µm erreicht (MOTLIK UND KUBELKA, 1990; FAIR

et al., 1995). Damit aus der primären Oozyte eine befruchtungsfähige Oozyte wird, muss diese jedoch noch eine Reihe von umfassenden Veränderungen am Kern (Kernreifung) und im Zytoplasma (zytoplasmatische Reifung) während der präovulatorischen Follikelreifung durchlaufen (HYTTEL *et al.*, 1986; BEVERS *et al.*, 1997). Diese Endreifung erstreckt sich bei Rindereizellen durchschnittlich über 24 h (WEHREND UND MEINECKE, 2001).

Die nukleäre Maturation beinhaltet die Fähigkeit der Oozyte die Meiose wiederaufzunehmen (DURANTHON UND RENARD, 2001). Mit dem sogenannten GVBD (Germinalvesikel-Breakdown) beendet die primäre Oozyte die erste meiotische Teilung bis zur Metaphase II (M II) und es kommt zur Ausschleusung des ersten Polkörpers (sekundäre Oozyte). Bis zur Befruchtung tritt die Oozyte in eine erneute Entwicklungspause ein. *In vivo* beginnt die Kernreifung mit dem präovulatorischen LH-Anstieg, während sie *in vitro* spontan mit dem Entfernen der Oozyte aus dem Follikel induziert wird (SIRARD UND BLONDIN, 1996; MELO STERZA, 2003).

Im Zytoplasma ist dagegen eine Umverteilung von Zellorganellen zu beobachten. So kommt es zum Beispiel zur Bildung kortikaler Granula und zu einer Vergrößerung des perivitellinen Raums. Die Mitochondrien ordnen sich gemeinsam mit Fetttropfen verstärkt im zentralen Zytoplasma an und die Anzahl der Golgi-Apparate wird reduziert (HYTTEL *et al.*, 1986; HYTTEL *et al.*, 1997; FERREIRA *et al.*, 2009).

2.1.1. Interaktion zwischen Oozyten und Follikelzellen

Die sich aus den Granulosazellen differenzierten Cumuluszellen sind in eine extrazelluläre Matrix eingebettet (YUDIN *et al.*, 1988). Sie bilden um die Oozyte den Cumulus oophorus (Eihügel). Zusammen mit der Oozyte stellen die Granulosazellen und die Cumuluszellen ein Synzytium dar (BUCCIONE *et al.*, 1990).

Die enge Verknüpfung der Oogenese mit der Follikulogenese basiert auf der Kommunikation zwischen der Oozyte und den Follikelzellen. Diese erfolgt entweder humoral oder über Zell-Zell-Kontakte, die Gap junction (THIBAUT, 1987; EPPIG, 1991; KELLY *et al.*, 2007).

Humorale Kommunikation

In Säugern üben entwicklungsrelevante Hormone ihre Aktivität auf die somatischen Zellen des Follikels aus, die das Signal anschließend auf die Oozyte übertragen. Aus der Hypophyse werden die Gonadotropine FSH (Follikel-stimulierendes Hormon) und LH ausgeschüttet. Das FSH bewirkt die Proliferation und Differenzierung von Follikelzellen. Im Gegensatz dazu

wird durch das LH das Fortschreiten der Oozyte durch die Meiose und die Ovulation hervorgerufen (MATOVA UND COOLEY, 2001).

Granulosazellen besitzen neben den LH-Rezeptoren auch die GnRH-Rezeptoren (Gonadotropin Releasing Hormone; EPPIG *et al.*, 1997; BILLIG *et al.*, 1994). Das Hormon GnRH wirkt auf das FSH und somit auf die Follikelmaturation inhibierend.

Kommunikation über Gap junction

Zwischen den Follikelzellen als auch zwischen der Oozyte und den somatischen Zellen bestehen direkte Kontakte, die Gap junction (LARSEN *et al.*, 1986; MATOVA UND COOLEY, 2001). Sie dienen zum einem dem bidirektionalen Austausch nutritiver Faktoren und zum anderen sind sie an der Regulation der Entwicklung, des Wachstums und der Reifung von Oozyten und Follikelzellen beteiligt (BROWER UND SCHULTZ, 1982; VOZZI *et al.*, 2001; LARSEN *et al.*, 1986; MATOVA UND COOLEY, 2001)

Die Granulosazellen versorgen die Oozyte beispielsweise mit dem als Energiequelle nutzbarem Pyruvat (EPPIG, 1976). Sie sind ebenfalls verantwortlich für die Aufrechterhaltung des meiotischen Arrests der Oozyte durch Produktion des Oozyten-Meiose-Inhibitors (OMI) (THIBAULT *et al.*, 1987; SIRARD *et al.*, 1992; AYOUB UND HUNTER, 1993). Da die Cumuluszellen den Faktor an die Oozyte weiterleiten, kann der inhibitorische Effekt nur durch den engen Kontakt zwischen den Cumulus- und Granulosazellen aufrechterhalten werden. Wird der Cumulus-Oozyten-Komplex (COK) aus dem Follikel entfernt und der Kontakt aufgehoben, ist die Oozyte in der Lage die nukleäre Reifung spontan wieder aufzunehmen (DEKEL *et al.*, 1981, SIRARD UND BILODEAU, 1990). Zu Beginn der finalen Reifung lösen die Granulosazellen die Protein- und Polypeptidsynthese in der Oozyte aus (THIBAULT *et al.*, 1987).

In der finalen Reifungsphase stellen die Cumuluszellen der Oozyte Nährstoffe zur Verfügung (GILCHRIST *et al.*, 2008). Der Cumulus ist durch die Abgabe von cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) ebenfalls in der Lage, die meiotische Oozytenreifung zu inhibieren. Durch einen leichten Anstieg der FSH-Konzentration während des präovulatorischen LH-Peaks wird aus den Cumuluszellen Hyaluronsäure sezerniert. Dies führt zur Expansion des Cumulus und damit zum Verlust der meiotischen Inhibierung (BALL *et al.*, 1983; EPPIG, 1991). Die Kommunikation zwischen Cumulus und Oozyte ist in bovinen Oozyten für die Aufrechterhaltung des meiotischen Arrests oder den Fortgang der Meiose von entscheidender Bedeutung (GHANEM, 2009).

Die Oozyte sezerniert Faktoren, die verschiedene Funktionen (Proliferation, Differenzierung, Metabolismus und Genexpression) in den Cumuluszellen regulieren (VANDERHYDEN *et al.*,

1992; GILCHRIST *et al.*, 2008; GHANEM, 2009). Mit Abgabe der parakrinen Faktoren GDF9 (Growth Differentiation Factor 9) und BMP15 (Bone Morphogenic Protein 15) induziert die Oozyte ebenfalls die Cumulusexpansion und ruft somit ihre Kernreifung selbst hervor (HUSSEIN *et al.*, 2006). Weiterhin stimuliert GDF9 die Proliferation von Granulosazellen (HAYASHIE *et al.*, 1999).

2.2. Oozytenkompetenz

Als Entwicklungskompetenz von Oozyten wird die Fähigkeit einer Oozyte definiert die Reifung, die Fertilisation und die Entwicklung bis zur Blastozyste und zum lebensfähigen Nachkommen zu durchlaufen (DURANTHON UND RENARD, 2001; SIRARD, 2001; TROUNSON *et al.*, 2001). Da nicht jeder Embryo transferiert werden kann, wird in der Praxis das Erreichen des Blastozystenstadiums als Indikator genutzt (LONERGAN *et al.*, 2003). Oozyten haben bereits mit Ende ihres Wachstums die volle meiotische Kompetenz für die weitere Entwicklung erworben (MOTLIK *et al.*, 1984; FAIR *et al.*, 1995) und sind in der Lage nach Entfernung aus dem Follikel die Meiose spontan wieder aufzunehmen. *In vitro* besitzen bovine Oozyten jedoch eine geringere Entwicklungskompetenz als *in vivo* (SIRARD UND BLONDIN, 1996; HASHIMOTO, 2009). Bisher sind nur etwa 40% der Oozyten in der Lage, nach IVP Blastozysten zu bilden (LONERGAN *et al.*, 2003). Die Entwicklungskompetenz ist demnach nicht nur von der meiotischen sondern auch von der zytoplasmatischen Reifung abhängig (FAIR *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu sind aber auch Oozyten aus Follikeln vor der finalen Reifung fähig, *in vitro* eine Blastozyste zu bilden (BLONDIN *et al.*, 1997). HENDRIKSEN *et al.* (2000) geben an, dass eine Oozyte in einem Follikel mit einer Größe von 3 mm zwar die Kapazität für die Entwicklungskompetenz erworben hat, sie aber noch eine zusätzliche Prämaturation benötigt, um diese zu exprimieren (HYTTEL *et al.*, 1986). Diese sogenannte Prämaturationsphase findet *in vivo* vor dem Germinalvesikel-Breakdown (GVBD), d.h. vor der eigentlichen finalen meiotischen Reifung während der präovulatorischen Entwicklung statt (GREVE *et al.*, 1995, BLONDIN *et al.*, 1997, HENDRIKSEN *et al.*, 2000).

Der Grund für die geringe Effektivität der IVP wird hauptsächlich in der Oozytenqualität gesehen (OPIELA *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2009). Der Einfluss der Oozytenqualität auf das Entwicklungspotential wurde beim Rind bisher intensiv untersucht (SIRARD *et al.*, 2006). Basierend auf vorliegenden Ergebnissen werden für die *In-vitro*-Reifung Oozyten anhand nicht invasiver, morphologischer Merkmale wie der Kompaktheit des Cumulus oder der

Homogenität des Ooplasmas ausgewählt (OPIELA *et al.*, 2008). Trotz allem konnte die Effektivität der IVP bisher nicht gesteigert werden.

Andererseits zeigte sich, dass auch die Follikelzellen die Oozytenmaturation regulieren (MOOR UND DAI, 2001). Um Faktoren zu identifizieren, die mit einer erhöhten Entwicklungskompetenz zusammenhängen, wurde der Einfluss der Follikelgröße, der Follikelgesundheit, des Hormonprofils (OUSSAID *et al.*, 1999) und des Ovarzustandes (HAGEMANN *et al.*, 1999, DE WIT *et al.*, 2000) untersucht. Es ist bekannt, dass sich eine zunehmende Größe des Follikels positiv auf die Entwicklungskompetenz auswirkt (PAVLOK *et al.*, 1992; LONERGAN *et al.*, 1994). Follikel mit einem Durchmesser von <3 mm zeigten eine geringere Entwicklungskompetenz als größere Follikel (BLONDIN UND SIRARD, 1995; PAVLOK *et al.*, 1992). Da die Oozytengröße mit der Follikelgröße im positiven Zusammenhang steht, nimmt die Entwicklungskompetenz mit beidem zu (ARLOTTO *et al.*, 1996; GHANEM *et al.*, 2007). Unabhängig von der Follikelgröße, wird die Entwicklungskompetenz einer Oozyte ebenfalls vom Status des Follikels beeinflusst (VASSENA *et al.*, 2003; GHANEM *et al.*, 2007). Interessanterweise zeigten Oozyten eine bessere Entwicklung zu Blastozysten, wenn die nach visuellen Merkmalen ausgewählten COKs Zeichen einer frühen Atresie (leicht expandierter Cumulus und geringe Granulation des Ooplasmas) besaßen (HAZELEGER UND STUBBINGS, 1992; BLONDIN UND SIRARD, 1995; DE WIT UND KRUIP, 2001; BILODEAU-GOESELS UND PANICH, 2002). Gleichzeitig erhöhte sich die Oozytenkompetenz mit zunehmender Follikelatresie. Die Ausnahme bildeten stark atretische Follikel (BLONDIN UND SIRARD, 1995; DE WIT *et al.*, 2000). In Follikeln von 3-8 mm wiesen die während der Prämaturation und der Atresie hervorgerufenen morphologischen Veränderungen Ähnlichkeiten auf (DIELEMAN *et al.*, 1983; ASSEY *et al.*, 1994). Merkmale, die während dem präovulatorischen Stadium auftraten, wurden ebenfalls bei der Follikelatresie beobachtet. Dazu gehörten beispielsweise abnehmende Zellverbindungen zwischen den Follikelzellen und eine verringerte Östradiolproduktion (WISE *et al.*, 1994; BLONDIN *et al.*, 1997). BLONDIN UND SIRARD (1995) konnten ebenfalls aus leicht atretischen Follikeln kompetente Oozyten gewinnen, während gesunde Follikel inkompetente Oozyten enthielten. Weiterhin besitzen präovulatorische Follikel und leicht atretische Follikel von 3-8 mm Gemeinsamkeiten in der Genexpression (DIELEMAN *et al.*, 2002).

Aus den aufgeführten Beobachtungen wurde abgeleitet, dass in kleineren Follikeln die Atresie als prämaturationsähnlicher Effekt auf die Oozyte wirkt (HYTTEL *et al.*, 1986; SIRARD *et al.*, 1999; HENDRIKSEN *et al.*, 2000).

2.2.1. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität in Oozyten

Der Farbstoff Brilliant-Cresylblau (BCB) dient der nicht invasiven Selektion entwicklungscompetenter Oozyten vor der *In-vitro*-Maturation (IVM). Immature Oozyten synthetisieren eine große Anzahl Proteine, u.a. das Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH; WASSARMAN, 1988). Das Enzym ist eine Komponente des Pentose-Phosphat-Zyklus, der Energie für die Nukleotidbiosynthese und NADPH als Elektronen- und Protonendonator für Biosynthesereaktionen bereitstellt (TIAN *et al.*, 1998). In wachsenden Oozyten ist G6PDH aktiv und in ausgewachsenen Oozyten besitzt es eine verringerte Aktivität (WASSARMAN, 1988). BCB wird durch die Enzymaktivität von blau zu farblos reduziert (Abbildung 2.1; ERICSON *et al.*, 1993). Oozyten, die eine blaue Färbung des Zytoplasmas zeigen, haben demnach ihr Wachstum abgeschlossen (BCB⁺). Dagegen weisen wachsende Oozyten ein farbloses Zytoplasma auf (BCB⁻). Es konnte in verschiedenen Spezies gezeigt werden, dass das Entwicklungspotential von BCB positiven Oozyten größer ist als das der BCB negativen Oozyten (Schwein: ERICSSON, 1993; Ziege: RODRIGUEZ-GONZALES *et al.*, 2002; Färse: PUJOL *et al.*, 2004; Rind: ALM *et al.*, 2005; Maus: WU *et al.*, 2007). Da sich nur ein Teil der ausgewachsenen Oozyten (34% beim Rind; ALM *et al.*, 2005) zu Blastozysten entwickelt, scheint diese Population inhomogen zu sein. Es ist demnach nötig zusätzliche Faktoren zu identifizieren, die das Entwicklungspotential von BCB selektierten Oozyten bestimmen (WU *et al.*, 2007).

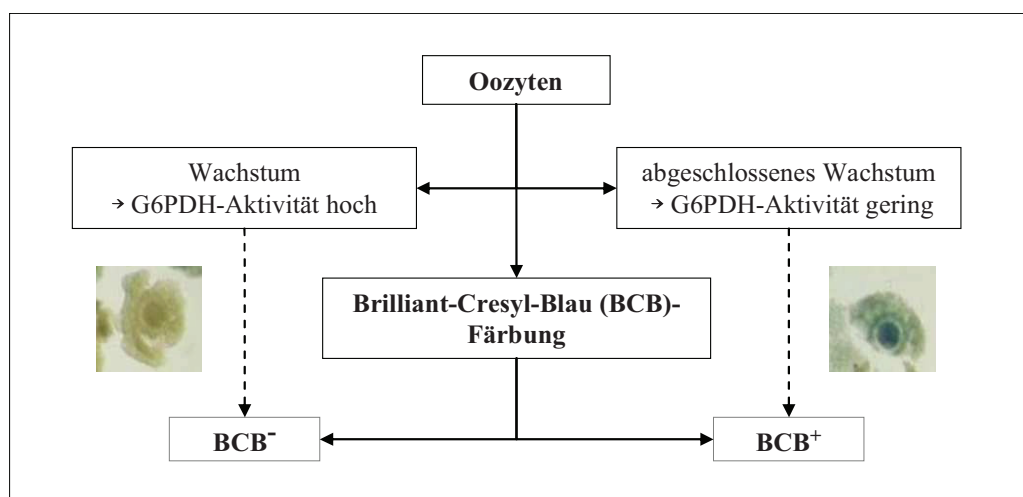


Abb. 2.1: Bestimmung der Aktivität von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) mittels Brilliant-Cresylblau-Färbung (BCB) von Cumulus-Oozyten-Komplexen (COK) als ein Marker der Entwicklungscompetenz (modifiziert nach GHANEM, 2009).

BCB negativ: ungefärbtes Ooplasma; BCB positiv: blaues Ooplasma.

2.2.2. Follikelatresie

Bei Geburt enthalten bovine Ovarien einen Follikelpool von mehreren hunderttausenden Primordialfollikeln, von denen weniger als 0,5% die Ovulation erreicht (IRVING-RODGERS *et al.*, 2001). Die restlichen Follikel unterliegen in allen Stadien ihrer Entwicklung einem selektiven degenerativen Prozess, der Atresie (HSUEH *et al.*, 1996; MANABE *et al.*, 2004). Die Follikelatresie unterliegt dem molekularen Mechanismus der Apoptose (AARON *et al.*, 1994), auf die im Verlauf der Arbeit noch näher eingegangen wird.

Die Follikelatresie ist wie folgt charakterisiert: (I) vereinzelt Auftreten pyknotischer Zellkerne in den Granulosazellen, (II) Abtrennung der Granulosazellschicht von der Follikelmembran, (III) beginnende Fragmentierung der Basalmembran, (IV) Auftreten von Zelldebris und Makrophagen und (V) dem letztendlichen Untergang des Follikels (MANABE *et al.*, 2004). Die Apoptose von Granulosazellen wirkt demnach als das initiiierende Symptom. In bovinen Ovarien beginnen die apoptotischen Veränderungen in den Granulosazellen der äußeren Schicht der Follikelwand. Im frühen Stadium der Atresie wird keine Apoptose in den Cumuluszellen, in der Oozyte oder in Zellen der internen bzw. externen Theka beobachtet. Im Verlauf der Atresie zeigt die Oozyte jedoch Chromatinveränderungen, gefolgt von Fragmentierung und Trennung der Oozyten-Cumulus-Verbindungen. Durch eine zunehmende FSH-Konzentration, kurz vor dem LH-Anstieg, wird der enge Kontakt der Cumuluszellen zur Oozyte unterbrochen (HOST *et al.*, 2000; RÜPING, 2005). Als vergleichbar späte Ereignisse werden dagegen die Zerstörung der Oozyte, die Resorption von Follikelflüssigkeit und die Apoptose der Cumuluszellen angesehen (GREENWALD UND TERRANOVA, 1988).

Eine andere Rolle der Follikelatresie neben der Rekrutierung und Selektionierung von Eizellen aus dem Primordialpool (DE POL *et al.*, 1997) sehen GUTHRIE UND GARETT (2001) darin, dass sie als Barriere in der Ovulation von Oozyten, die nicht im meiotischen Arrest verblieben sind, wirkt. Sie fanden heraus, dass viele der atretischen Follikel Oozyten enthielten, die ihre meiotische Reifung wiederaufgenommen hatten.

2.3. Bedeutung der Mitochondrien in der Oogenese

Mitochondrien spielen eine wichtige Rolle im zellulären Energiemetabolismus (CHIARATTI *et al.*, 2010). Sie dienen als Speicher von intrazellulärem Calcium und proapoptotischer Faktoren und stellen Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) bereit (TORNER *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2009). Ein Großteil der von der Oozyte benötigten Energie für die

Maturation, Fertilisation und Embryonalentwicklung wird daher über die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) in den Mitochondrien generiert (CUMMINS, 2004). An der Intermediärmembran der Mitochondrien wird über einen Protonengradienten durch Redoxreaktionen Energie erzeugt, die auf Adenosindiphosphat (ADP) übertragen und in Form von ATP gespeichert wird. Als Elektronen- und Protonendonatoren in den Redoxreaktionen dienen NADH und FADH₂, die im Citratzyklus, der Glykolyse und der β -Oxidation von Fettsäuren produziert werden. Während der Eizellentwicklung steigt die Anzahl der Mitochondrien stark an. In den Primordialkeimzellen liegen etwa 10 Mitochondrien vor, während die Anzahl in den Oogonien 200 Mitochondrien beträgt. Die primären Oozyten enthalten dagegen ca. 6000 Mitochondrien. Während der Oozytenreifung erhöht sich die Zahl der Mitochondrien auf über 100000 pro Zelle (CUMMINS, 2004; FERREIRA *et al.*, 2009). Die Mitochondrien durchlaufen in diesem Zeitraum weitere markante Veränderungen. Im GV-Stadium liegt im Ooplasma eine homogene mitochondriale Verteilung vor (TORNER *et al.*, 2004). Mit dem GVBD bis zur M II sind die Mitochondrien dagegen heterogen verteilt. Der Wechsel der homogenen zur heterogenen Verteilung bis hin zur Clusterbildung ist aufgrund des hohen Bedarfs einzelner Kompartimente der Oozyte an ATP und Calcium während der zytoplasmatischen Reifung nötig. Eine inadäquate Umverteilung der Mitochondrien während der zytoplasmatischen Reifung resultiert somit in einer schlechten Fertilisation der Oozyte (AU *et al.*, 2005). Die Intensität der mitochondrialen Atmungskette oder OXPHOS kann über spezifische Fluoreszenzfarbstoffe ermittelt werden, die nur von aktiven Mitochondrien gebunden werden. Für different entwicklungs kompetente Oozyten, die nach BCB-Färbung selektiert wurden, konnten unterschiedliche mitochondriale Aktivitäten (TORNER *et al.*, 2008) nachgewiesen werden.

Mit der Funktion der Mitochondrien ist ebenfalls der Gehalt an maternaler mitochondrialer DNA (mtDNA) assoziiert (JENG *et al.*, 2008). Der Gehalt an mtDNA kann jedoch zwischen einzelnen Oozyten variieren, weshalb viele Autoren die mtDNA Menge mit der Befruchtungsfähigkeit in Verbindung bringen (REYNIER *et al.*, 2001). Eine verringerte Anzahl wird durch eine ungenügende zytoplasmatische Maturation oder Biogenese der Mitochondrien hervorgerufen. Oozyten mit einem verringerten mtDNA Gehalt sind somit weniger kompetent die Embryonalentwicklung zu durchlaufen als solche mit einem hohen Gehalt an mtDNA (CHIARATTI *et al.*, 2010).

2.4. Bedeutung von Proteinkinasen in der Oogenese und Follikulogenese

Die zelluläre Proliferation, Differenzierung oder Maturation wird herbeigeführt durch eine Signalkaskade, die die Wirkung von Proteinkinasen benötigt. Die Kinasen sind an der spezifischen Phosphorylierung von Proteinen beteiligt, wodurch diese aktiviert oder deaktiviert werden (CHIAN *et al.*, 2003, KISHOMOTO, 2003).

2.4.1. Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)

Die MAP-Kinase gehört zur Gruppe der Serin- oder Threonin-Kinasen, die aus drei Untergruppen besteht. Eine davon sind die extrazellulär-signal-regulierten Kinasen (ERK) (ROBINSON UND COOB, 1997). Die ERK1 und ERK2, auch bekannt als p42 und p44 MAPK, werden durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert. Dazu gehören Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone und Neurotransmitter (SCHÄFER UND WILLIAMS, 2000; SALEHIN, 2003). Die Aktivierung der MAPK erfolgt durch Phosphorylierung über eine MAPK-Kaskade (SALEHIN, 2003). Die Phosphorylierung der MAPK hat einen Einfluss auf das Zytoplasma, den Zellkern, das Zytoskelett und auf die Zellmembran. Sie reguliert die Transkription und Translation von Proteinen, die für das Zellwachstum von Bedeutung sind (ANDERSON, 1997). Die Aktivierung der MAPK-Kaskade ist in Oozyten verschiedener Spezies mit der Wiederaufnahme der Meiose assoziiert (VORONINA UND WESSEL, 2003). In der Meiose reguliert die MAPK die Spindel-Bildung und die Arretierung in der M II. Die Fortführung der Meiose wird über den Erhalt der MPF-Aktivität (Maturation Promoting Factor) kontrolliert (GORDO *et al.*, 2001).

In bovinen Oozyten liegt die MAPK im GV-Stadium als inaktive dephosphorylierte Form vor. Mit dem einsetzenden GVBD wird sie aktiviert (TOMEK *et al.*, 2002) und erreicht in der M II maximale Werte (TOMEK *et al.*, 2002, TÖRNER *et al.*, 2001).

In Schweineoozyten kann die MAPK-Aktivität im Zytosol als ein Indikator der zytoplasmatischen Reifung angesehen werden. Eine geringe Aktivität erhöht die Sensitivität gegenüber parthenogenetischer Aktivierung. Im Gegensatz dazu deutet ein hoher Aktivierungsgrad nicht auf eine erhöhte Fertilisierbarkeit hin (SETIADI *et al.*, 2009).

In Granulosazellen der Maus ist die MAPK auch mit der Expansion des Cumulus oophorus assoziiert (SU *et al.*, 2003). Im präovulatorischen Follikel wird die Proteinkinase in den Granulosazellen durch den LH-Anstieg aktiviert (FAN *et al.*, 2009).

2.4.2. Proteinkinase Akt

Die Proteinkinase Akt ist von Bedeutung für die Oozytenreifung bei verschiedenen Säugetieren wie z.B. Maus, Schwein und Rind (HOSHINO, 2004; VIGNERON *et al.*, 2004). Sie bewirkt den Übergang vom GV zur M II in der meiotischen Reifung (CHIAN *et al.*, 2003, KISHOMOTO, 2003; TOMEK UND SMILJAKOVIC, 2005). In bovinen Oozyten ist im M I-Stadium die Phosphorylierung von Akt am höchsten. Dagegen konnten im GV und M II-Stadium nur basale Werte beobachtet werden (TOMEK UND SMILJAKOVIC, 2005). Die Aktivierung der Proteinkinase Akt hängt ab von der Phosphorylierung an Thr308 und Ser473 (TROUSSARD *et al.*, 2003, KALOUS *et al.*, 2009). In somatischen Zellen steuert die Akt-Aktivität das Wachstum und die Proliferation (Maus und Rind: MASSAGUE, 2004). Sie stimuliert hier weiterhin die Translation.

Entwicklungs kompetente bovine Oozyten (BCB⁺) zeigten eine verstärkte Phosphorylierung der Proteinkinasen MAPK und Akt (TORNER *et al.*, 2008).

2.5. Apoptose

Der Begriff Apoptose wurde im Jahr 1972 erstmals von KERR *et al.* benutzt, um diese spezifische Art des Zelltodes von Zelluntergängen durch Nekrose abzugrenzen. Sie wird als Synonym für den von der Aktivierung von Genen abhängigem Zelltod, dem „Programmierten Zelltod“, benutzt (JÖRß, 2005). Apoptotische Vorgänge spielen in der Entwicklung und der Gewebsdifferenzierung von vielzelligen Organismen eine große Rolle (GLUCKSMANN, 1951, ABASTADO, 1996; DEROUET-HÜMBERT, 2007). Weiterhin dient die Apoptose der Kontrolle und Aufrechterhaltung von Funktionen des Immunsystems (ROSLER *et al.*, 1992; DEROUET-HÜMBERT, 2007).

2.5.1. Charakteristik der Apoptose

Die Apoptose ist ein aktiver, Energie (in Form von ATP) verbrauchender und genetisch kontrollierter Prozess (HSUEH, 1994). Sie ist charakterisiert durch das Schrumpfen der Zelle, Ablösen von Nachbarzellen, der Kondensation und Fragmentierung des Chromatins und der Abschnürung membranumschlossener Vesikel, den apoptotischen Körperchen (KERR *et al.*, 1972; ARENDS UND WYLLIE, 1991). Als ein frühes Ereignis im Laufe der Apoptose wird Phosphatidylserin von der dem Zytosol zugewandten Innenseite auf die Außenseite der

Zellmembran transloziert. Die Veränderung dient den Makrophagen als Erkennungssignal (FADOK *et al.*, 1992, MARTIN *et al.*, 1995; WILLIAMSON *et al.*, 2002).

Die Zellorganellen bleiben bis auf den Zellkern intakt. Im Zellkern sind jedoch Veränderungen des Kernskeletts, der Kernmembran und der DNA erkennbar. Es erfolgt u.a. die Proteolyse von Kernlamina (PETER *et al.*, 1990). Das Chromatin kondensiert und lagert sich halbmondförmig an die Kernmembran an (WYLLIE *et al.*, 1984). Aufgrund einer erhöhten $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -abhängigen Endonukleaseaktivität wird die DNA internukleosomal in Fragmente von ca. 180 Basenpaaren gespalten (ARENDS *et al.*, 1991).

Zum Ende der Apoptose kommt es zum Abbau des ATP-Pools und der daraus resultierenden Inaktivierung ATP-abhängiger Pumpen. Weitere Ereignisse sind die Vakuolisierung von Organellen und das Anschwellen der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums (DANIEL, 2002).

Eine inflammatorische Reaktion unterbleibt bei der Apoptose, da die apoptotischen Körperchen von Makrophagen oder benachbarten Zellen erkannt und aufgenommen werden (WYLLIE *et al.*, 1980; KERR *et al.*, 1994). Ein Ausbleiben der Phagozytose resultiert in einer Entzündungsreaktion, der sekundären Nekrose (SHERIDAN *et al.*, 1981).

2.5.2. Signalwege der Apoptose

Die bisher am intensivsten untersuchten einleitenden Signalwege der Apoptose stellen der extrinsische, rezeptorabhängige und der intrinsische, mitochondriale Signalweg dar (Abbildung 2.2). In beiden Wegen kommt es zur Auslösung einer Caspase-Kaskade.

Die Initiation des apoptotischen Signals erfolgt beim extrinsischen Weg über die Bindung eines extrazellulären Liganden an einen membranständigen Todesrezeptor (GRÜTTER, 2000). Der Rezeptor wird daraufhin durch eine Trimerbildung aktiviert (BANNER *et al.*, 1993). Bisher sind sechs Rezeptoren der TNF (Tumornekrosefaktor)-Familie (Fas/CD95/Apo-1, $\text{TNF}\alpha$ -R, DR3/Wsl/TRAMP, DR4/Trail-R1/Apo-2, DR5/Trail-R2, DR6) bekannt (SCHULZE-OSTHOFF *et al.*, 1998). Im cytoplasmatischen Teil besitzen die Rezeptoren eine Todesdomäne (DD, Death Domain). Die Todesdomäne von Adaptermolekülen, z.B. das FADD (Fas-associated death domain), bindet daran. An die Adaptermoleküle angelagerte Procaspase-8-Proteine geraten somit in Nachbarschaft zueinander und aktivieren sich autoproteolytisch (DENAULT UND SALVESEN, 2002).

Beim intrinsischen Signalweg führen extra- und intrazelluläre Stimuli (Chemotherapeutika, oxidativer Stress, UV- und γ -Strahlung, DNA-Schäden) zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytoplasma (GREEN UND REED, 1998). Cytochrom C bindet an

Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) und vermittelt dessen Oligomerisierung unter Hydrolyse von dATP (ZOU *et al.*, 1997; ROTHBART, 2007). Die Procaspase-9 lagert sich an den Apaf-1-Komplex an und es bildet sich ein sogenanntes Apoptosom. Die Caspase-9 wird daraufhin autoproteolytisch aktiviert (LI *et al.*, 1997; SALVESEN UND DIXIT, 1999).

Unabhängig von den bereits beschriebenen Signalwegen tritt ein Apoptosemechanismus auf, der über das endoplasmatische Retikulum (ER) ausgelöst wird. Durch ER-Stresssignale, z.B. Störungen der Calcium-Homöostase, wird die Caspase-12 und anschließend die Caspase-9 aktiviert (DANIEL, 2002).

Weiterhin existiert ein von Caspasen unabhängiger Weg der Apoptoseinitiation. Dabei tritt ein AIF (Apoptosis Inducing Factor) aus dem Intermembranraum der Mitochondrien ins Cytosol aus. Dort aktiviert der AIF Endonukleasen, die im Zellkern für Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung verantwortlich sind (GREEN UND KROEMER, 1998).

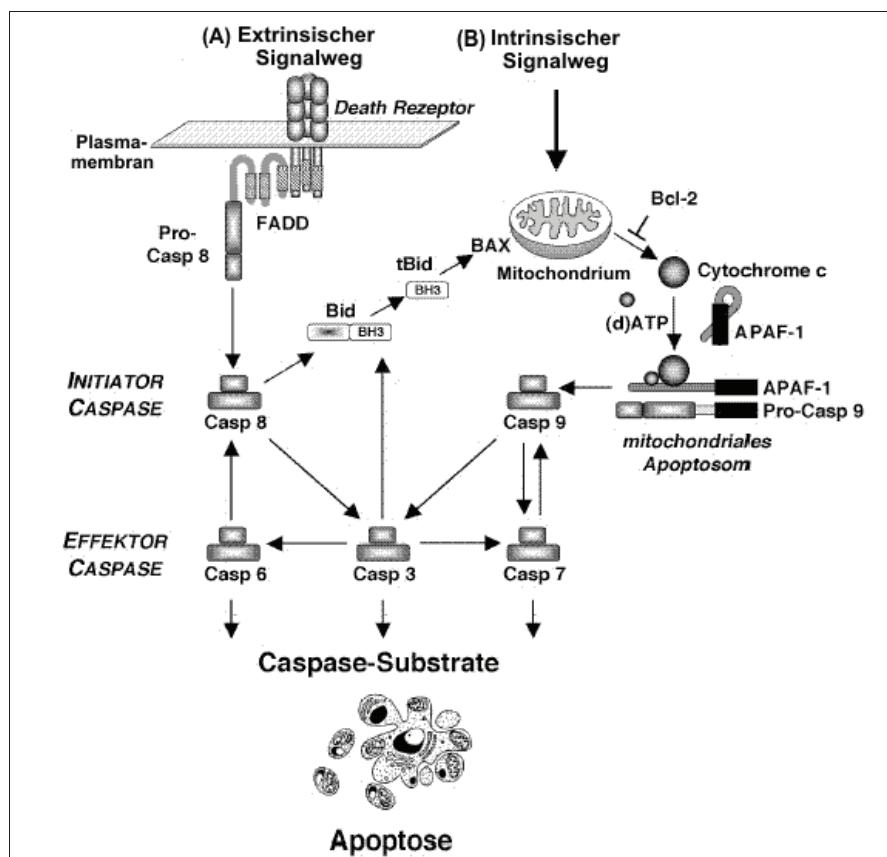


Abb. 2.2: Signalwege der Apoptose (modifiziert nach DANIEL, 2002).

A: Extrinsischer Signalweg über spezifische Liganden-Todesrezeptor-Bindung.

B: Intrinsischer Signalweg über Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien.

2.5.3. Caspasen

Charakteristische morphologische Veränderungen von Zellen im Zuge der Apoptose sind Resultate einer zunehmenden Protease- und Endonukleaseaktivität. Verantwortlich dafür sind intrazelluläre Cystein-Proteasen, die Caspasen (Cysteinyl-Aspartat-Proteinase). Sie verfügen in ihrem aktiven Zentrum über einen Cysteinrest und schneiden ihre Substrate spezifisch auf der Carboxylseite von Aspartatresten (ALNEMRI *et al.*, 1996).

Von den bisher in Säugern identifizierten 14 Caspasen (WOLF UND GREEN, 1999), sind 11 Caspasen (Caspase-1 bis -10 und Caspase-14) humanen Ursprungs (ALNEMRI *et al.*, 1996; PISTRITTO *et al.*, 2002). Die bovine Caspase-13 ist homolog der Caspase-4 (KOENIG *et al.*, 2001) und die Caspase-11 und -12 stellt ein murines Homolog der Caspase-4 und -5 dar (LAMKANFI *et al.*, 2002).

Die Caspasen werden als inaktive Proform synthetisiert. Diese sogenannten Zymogene bestehen aus einer N-terminalen Prodomäne, gefolgt von einer großen (ca. 20 kDa) und einer kleinen (ca. 10 kDa) Untereinheit (COHEN, 1997). Durch proteolytische Prozessierung werden die Untereinheiten gespalten und die Prodomäne entfernt (RAMAGE *et al.*, 1995; YAMIN *et al.*, 1996, DEGTEREV *et al.*, 2003). Die aktiven Caspasen liegen als Heterotetramere aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten vor (ROTONDA *et al.*, 1996).

Anhand ihrer Funktion lassen sich die Caspasen in 2 Subfamilien einteilen. Eine Gruppe trägt zur Reifung inflammatorischer Zytokine bei (Caspase-1, -4 und -5) und die andere Gruppe ist an der Apoptose beteiligt. Letztere lässt sich weiter in Apoptose-Initiatoren (Caspase-2, -8, -9, -10) und Apoptose-Effektoren (Caspase-3, -6 und -7) differenzieren (NICHOLSON, 1999). Die Initiatorcaspasen besitzen große Prodomänen (>10 kDa) und sind in der Lage sich über Autoproteolyse selbst zu aktivieren (SLEE *et al.*, 1999). Die Prodomäne der Effektorcaspasen besteht aus weniger als 30 Aminosäuren, und sie werden durch Initiator- oder auch andere Caspasen proteolytisch aktiviert. Caspasen bilden also eine Hierarchie, in der Initiator-Caspasen die Effektor-Caspasen kaskadenartig aktivieren (COHEN, 1997; STRASSER *et al.*, 2000; CIKALA, 2005), wodurch das initiale Signal verstärkt wird (DANIEL, 2002).

An die Caspase-Kaskaden schließt sich die gezielte, limitierte Proteolyse zellulärer Proteine an (DONEPUDI *et al.*, 2002). Die Zielproteine der Caspasen lassen sich in 6 Hauptkategorien eingeteilt: (I) apoptotische und inflammatorische Regulatoren, z.B. Bcl-2 und Caspasen, (II) Regulatoren des Zellzyklus, z.B. Cyclin, (III) Proteinkinasen und andere Transduktions-Regulatoren, z.B. Akt und Proteinkinase C, (IV) Strukturproteine des Cytosols und des Kerns, z.B. Aktin, Fodrin, Lamin, (V) Proteine der DNA-Synthese, -Spaltung und -Reparatur, z.B. Caspase-aktivierte DNase (CAD), und (VI) krankheitszugehörige Proteine, z.B. Huntingtin

(COHEN, 1997; STROH UND SCHULZE-OSTHOFF, 1998; DEGTEREV *et al.*, 2003). Zusammengefasst führt die Spaltung der Substrate zum Arrest des Zellzyklus, zur Inaktivierung von DNA-Reparaturmechanismen, zum Verlust der Zell-Zell-Kontakte, zur Markierung der apoptotischen Zellen für die Phagozytose und zur Desintegration der Zelle (STROH UND SCHULZE-OSTHOFF, 1998).

Inhibiert werden die Caspasen u.a. durch die IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins), z.B. XIAP, und Survivin (WRIGHT UND DUCKETT, 2005).

Die Caspase-3 stellt in der Apoptose ein Schlüsselenzym dar, da sie für einen großen Teil der proteolytischen Spaltung von Substraten verantwortlich ist (COHEN, 1997; HIRATA *et al.*, 1998; PORTER UND JÄNICKE, 1999). Dazu gehört die indirekte Aktivierung endogener Nukleasen (THORNBERRY UND LAZEBNIK, 1998), die Spaltung des Zytoskelettproteins α -Fodrin und des Aktin-depolymerisierenden Enzyms Gelsolin (JÄNICKE *et al.*, 1998). Weiterhin ist sie beteiligt an der Spaltung von PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase), einem wichtigen Enzym der DNA-Reparatur (COHEN, 1997). Die Caspase-3 gilt als Hauptziel der Caspase-8 (STENNICKE *et al.*, 1998) und des Cytochrom C (SUSIN *et al.*, 1997).

2.5.4. Intrazelluläre Regulationsmechanismen der Apoptose

2.5.4.1. Bcl-2 Proteinfamilie

Zu den zentralen Regulatoren der Apoptose gehören Mitglieder der Bcl-2-Familie, welche die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien kontrollieren. Die Familie besteht aus den antiapoptotischen Proteinen: Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, A1/Bfl-1, Boo/Diva, Mcl-1 und den proapoptotischen Proteinen: Bax, Bad, Bak, Bcl-x_S, Bid, Bim, Bik/Nbk, Blk, Bok/ Mtd und Hrk/DP5 (REED *et al.*, 1998; CORY *et al.*, 2003; ROTHBART, 2007).

Als Beispiel soll die Proteolyse von Bid durch die Caspase-8 genannt werden. Die proapoptotischen Bcl-2-Mitglieder Bax und Bak werden durch das aktive Bid-Protein oligomerisiert und damit die Cytochrom C-Freisetzung erhöht (Abbildung 2.2; KLUCK *et al.*, 1997; KORSMEYER *et al.*, 2000). In diesem Fall ist erkennbar, dass es zur Verknüpfung des extrinsischen mit dem intrinsischen Signalweg kommen kann.

2.5.4.2. Mitochondrien

Wie zuvor beschrieben, spielen die Mitochondrien eine zentrale Rolle in der Signalkette der intrinsischen Apoptoseauslösung. Als bedeutend ist hier die Freisetzung proapoptotischer Faktoren wie Cytochrom C, Smac (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase) und

Diablo (Antagonisten der IAPs) ins Zytosol anzusehen (GREEN *et al.*, 1998; VERHAGEN *et al.*, 2000). Die Freisetzung wird von den bereits erwähnten antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie kontrolliert. Zum einen sind diese in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert (Bcl-2 und Bcl-x_L) und zum anderen befinden sie sich im Zytoplasma und gelangen erst durch ein zytotoxisches Signal in die Mitochondrienmembran (CORY UND ADAMS, 2002; LIM *et al.*, 2002; BORNER, 2003). Die Proteine unterbinden in den Mitochondrien die Ausschüttung proapoptotischer Faktoren und hemmen die proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie. Es existieren mehrere Hypothesen, wie die Mitochondrien beeinflusst werden. Eine Hypothese besagt, dass Oligomere von Bak oder Bax in der äußeren Mitochondrienmembran Poren bilden (KORSMEYER *et al.*, 2000; NECHUSHTAN *et al.*, 2001). Ein anderes Modell beschreibt die Öffnung spannungsabhängiger Anionenkanäle durch proapoptotische Moleküle, während sie durch antiapoptotische Proteine geschlossen werden (PARONE *et al.*, 2002). Weitere Arbeiten sagen aus, dass die Bcl-2-Familie in die Regulation intermembraner Kanäle, der sogenannten PTP (Permeability Transition Pore), eingreift. Die PTP wird durch das proapoptotische Bax soweit geöffnet, dass Wasser und gelöste Moleküle osmotisch in die Mitochondrienmatrix einströmen. Daraufhin schwillt das Mitochondrium an, die Mitochondrienmembran platzt und proapoptotische Faktoren werden ins Cytoplasma entlassen (VANDER HEIDEN *et al.*, 1997; CROMPTON, 1999; GREEN UND KROEMER, 1998; JÖRß, 2005). Lang anhaltende Veränderungen in der Membranpermeabilität führen zu Störungen der respiratorischen Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran, wodurch die ATP-Synthese geblockt oder auch ROS generiert werden (GREEN UND KROEMER, 1998; THOUAS *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2009).

In den Mitochondrien sind ebenfalls Procaspasen lokalisiert (STRASSER *et al.*, 2000). Die Funktion der Procaspasen liegt in der Apoptoseauslösung beim Auftreten geschädigter Mitochondrien (Gulbins *et al.*, 2003).

2.5.4.3. Proteinkinasen

Die Aktivierung einer Reihe von Proteinkinasen führt entweder zur Inhibierung oder zur Verstärkung der Apoptose.

Zu den antiapoptotischen Proteinkinasen gehört die Proteinkinase Akt (BACHELDER *et al.*, 1999). Sie ist an der indirekten Hemmung proapoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie, wie Bad und Bax, beteiligt, indem sie den für die Expression dieser Moleküle wichtigen Transkriptionsfaktor Forkhead inhibiert (DEL PESO *et al.*, 1999; NICHOLSON *et al.*, 2002). Die

Akt-Proteinkinase inaktiviert weiterhin die Caspase-9 und wirkt indirekt initiiierend auf die Transkription der IAPs (BRUNET *et al.*, 1999; NICHOLSON *et al.*, 2002).

Die MAPK (ERK1 und ERK 2) trägt zur Apoptose bei, indem sie z.B. die Akt-Kinase hemmt (AMARAVADI *et al.*, 2005) und das proapoptotische Protein DAPK (Death Associated Protein-Kinase) aktiviert (CHEN *et al.*, 2005). Andererseits trägt sie auch durch Hemmung des proapoptotischen Bad zum Überleben der Zelle bei (BONNI *et al.*, 1999; MEBRATU UND TESFAIGZI, 2009).

2.6. Genexpression in Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen

Die Entwicklungskompetenz der Oozyten wird von der Speicherung von Genprodukten (mRNA oder Proteine) beeinflusst. Diese sind vor allem bedeutend, um die frühen Stadien der Embryonalentwicklung zu unterstützen (MERMILLOD *et al.*, 2008). Die mRNA und Proteine werden zum Teil auch noch für das Oozytenwachstum benötigt oder gespeichert. Mit der Akkumulation erwirbt die Oocyte ihre Entwicklungskompetenz (HYTTEL *et al.*, 2001). Die Zusammensetzung des Oozytentranskriptom und die Identifikation von exprimierten Genen, die eine wichtige regulatorische Rolle in der Follikulogenese und frühen embryonalen Entwicklung spielen, sind bisher unvollständig (YAO *et al.*, 2004; GHANEM, 2009).

In globalen Genexpressionsanalysen von ungereiften und gereiften bovinen Oozyten wurde nachgewiesen, dass 54% der 23000 Transkripte des verwendeten Arrays in den Oozyten vorhanden waren (FAIR *et al.*, 2007). In den beiden Gruppen waren insgesamt 821 Transkripte unterschiedlich exprimiert, von denen in den Oozyten nach Reifung 209 hoch- und 612 herunterreguliert waren. Die Mehrzahl der Gene war an regulatorischen Prozessen, z.B. der Regulation der MAPK-Aktivität, der Translation und Transkription, beteiligt.

Die Genexpression boviner Oozyten mit unterschiedlicher Entwicklungskompetenz ergab, dass entwicklungs kompetente Oozyten (BCB⁺) mit Genen der Transkriptionsregulation (SMARCA5), des Zellzyklus (NASP) und der Proteinbiosynthese (RPS274A) angereichert waren. Dagegen zeigten weniger entwicklungs kompetente Oozyten (BCB⁻) eine erhöhte Expression von Genen, die mit der ATP-Synthese (ATP5A1), dem mitochondrialen Elektronentransport (FL405), der Calcium-Ionenbindung (S100A10) und der Aktivität von Wachstumsfaktoren (BMP15) verbunden sind (TORNER *et al.*, 2008).

Ungereifte und *in vitro* gereifte bovine Oozyten, die nach der G6PDH-Aktivität unterschieden wurden, exprimierten in BCB⁺ Oozyten beider Gruppen verstärkt Gene der mtDNA-Replikation (POLG, TFAM, NFR1, COX1) (OPIELA *et al.*, 2010).

GHANEM (2009) untersuchte zwei Modelle für die Entwicklungskompetenz boviner Oozyten. Im ersten Modell wurden Oozyten aus der Wachstumsphase (hohe Entwicklungskompetenz) und Dominanzphase (geringere Entwicklungskompetenz) der Follikel genutzt, und im zweiten Modell wurden Oozyten nach ihrer G6PDH-Aktivität unterschieden. Der Vergleich der Genexpression beider Modelle zeigte, dass in den entwicklungs kompetenten Oozyten (Wachstumsphase und BCB⁺) Gene der Proteinbiosynthese (RPL24), des Translationselongationsfaktors (EEF1A1), der Chromosomorganisation und der Biogenese (H2AFZ) und Signaltransduktion (GNB2L1) hochreguliert waren. Die Gene RPL24 und MSX1 als Mitglieder der Familie ribosomaler Proteine und Transkriptionsfaktoren konnten als Marker der Entwicklungskompetenz von Oozyten identifiziert werden. RPL24 war in Oozyten und Cumuluszellen der BCB⁺ Gruppe und wachsender Follikel hochreguliert, wogegen MSX1 herunterreguliert war (GHANEM *et al.*, 2007).

Bei anderen Tierarten wurde beschrieben, dass für die Fertilität die Expression des Genes MARCKS in Oozyten von großer Bedeutung ist (ELIYAHU *et al.*, 2005).

Es ist interessant, dass im Prozess der Ovulation die verstärkte Expression von Genen auftrat, die für das inflammatorische Geschehen bedeutsam sind. Die Ovulation ist demnach vergleichbar mit der Inflammation (RICHARDS, 2007; LIU *et al.*, 2008). Die Cumuluszellen besitzen dabei eine ähnliche Funktion wie Immunzellen (LIU *et al.*, 2008). In ovulatorischen Cumulus- und Granulosazellen wurden z.B. Gene der Toll-like-Rezeptor-Familie verstärkt exprimiert (RICHARDS, 2007; LIU *et al.*, 2008). In equinen COKs wurden immunabhängige Gene (AREG, EREG und BTC) im Stadium der Ovulation hochreguliert (HERNANDEZ-GONZALEZ *et al.*, 2006).

Auf die Entwicklungskompetenz von Oozyten wirkt sich eine erhöhte Expression von STAR, COX2, AREG, SCD1 und SCD5 in Cumuluszellen positiv aus (Mensch: FEUERSTEIN *et al.*, 2007). Weiterhin spielen Gene, die für die Cumulusexpansion wichtig sind, eine große Rolle für die Etablierung der Oozytenkompetenz. Zu den exprimierten Faktoren gehören in Cumuluszellen ADAM17 (Schwein: YAMASHITA *et al.*, 2009) und in den Granulosazellen BMPR (Maus: EDSON *et al.*, 2010) und Has (Hyaluronsynthase; RICHARDS, 2007). Gene, die wichtig sind für die Ovulation, stellen in Granulosazellen PGR (Progesteron Rezeptor), PPAR (Peroxisome Proliferator-activated Rezeptor) und ADAMTS1 dar (RICHARDS, 2007).

Bovine Cumuluszellen mit einer erhöhten Transkriptanreicherung für Cathepsin deuteten dagegen auf eine verringerte Entwicklungskompetenz der Oozyte hin (BETTEGOWDA *et al.*, 2008).

3. Material und Methoden

3.1. Medien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Medienzusätze von der Firma Sigma-Aldrich, Steinheim bezogen.

In-vitro-Maturation, In-vitro-Fertilisation, In-vitro-Kultivierung

| | | |
|--|--|----------|
| FSH Stammlösung: | FSH (Fa. Ovagen [®] , Auckland, NZ) | 3,3 mg |
| | NaCl | 1 ml |
| HCG Stammlösung: | HCG (Fa. Intervet, Unterschleißheim) | 3,3 mg |
| | NaCl | 1 ml |
| Östradiol Stammlösung: | Östradiol | 2 mg |
| | Ethanol | 1 ml |
| PHE Stammlösung: (Penicillamin-Hypotaurin- Epinephrin Stammlösung) | Lösung 1: | |
| | Na-Metabisulfit | 0,2003 g |
| | Na-Lactat | 0,6562 g |
| | NaCl | 200 ml |
| | → pH 4,0 einstellen | |
| | Hypotaurin-Stammlösung: | |
| | Hypotaurin | 0,011 g |
| | NaCl | 100 ml |
| | Penicillamin Stammlösung: | |
| | Penicillamin | 0,0301 g |
| NaCl | 100 ml | |
| Epinephrin Stammlösung: | Epinephrin | 1,85 mg |
| | Lösung 1 | 40 ml |
| | | |
| PHE Stammlösung: | Epinephrin Stammlsg. | 16 ml |
| | Penicillamin Stammlsg. | 20 ml |
| | Hypotaurin Stammlsg. | 20 ml |
| | NaCl | 32 ml |
| | | |
| Gentamycin Stammlösung: | Gentamycin | 50 mg |
| | NaCl | 5 ml |

| | | |
|----------------------|---------|-------|
| Heparin Stammlösung: | Heparin | 40 mg |
| | NaCl | 5 ml |

| | | |
|----------------------|---|--|
| Östrisches Kuhserum: | - Blut aus 5 Tieren zusammenfassen | |
| | - Gerinnung mind. 1 h | |
| | - Zentrifugation (20 min, 500g, RT) | |
| | - Überstand zentrifugieren (20 min, 500g, RT) | |
| | - Serum einfrieren | |

Reifungsmedium TCM 199

| | | |
|----------------------|--------------------------------------|---------|
| TCM 199 Stammlösung: | TCM Pulver (M-2520) | 1,510 g |
| | NaHCO ₃ | 0,220 g |
| | Gentamycin Stammlösung | 250 µl |
| | H ₂ O für Embryo-Transfer | 100 ml |
| | → pH 7,4 einstellen | |

| | | |
|----------------------|--------------------------------|--------|
| TCM 199 Tagesansatz: | FSH Stammlösung | 10 µl |
| | HCG Stammlösung | 10 µl |
| | Östradiol Stammlösung | 5 µl |
| | östrisches Kuhserum | 0,5 ml |
| | (inaktiviert: 30 min bei 56°C) | |
| | TCM 199 Stammlösung | 9,5 ml |

Kapazitationsmedium (Sperm-Talp)

| | | |
|-------------------------|---|-------------------|
| Sperm-TALP Stammlösung: | NaCl | 0,5840 g |
| | KCl | 0,0231 g |
| | NaHCO ₃ | 0,2100 g |
| | NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O | 0,0041 g |
| | CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 0,2940 g |
| | MgCl ₂ | 0,0038 g |
| | Phenolrot | 0,0010 g |
| | Na-Lactat (60%) | 310 µl = 0,4035 g |
| | Hepes | 0,2384 g |
| | H ₂ O für Embryo-Transfer | 100 ml |
| | → pH 7,4 einstellen | |

| | | |
|----------------------|------------------------|--------|
| Sperm-TALP Komplett: | Sperm-Talp Stammlösung | 10 ml |
| | Na-Pyruvat | 1,1 mg |
| | BSA | 60 mg |

| | | |
|-----------------------|---------------------|--------|
| Sperm-TALP + Heparin: | Sperm-TALP Komplett | 2 ml |
| | Heparin Stammlösung | 4,2 µl |

Befruchtungsmedium (Fert-Talp)

| | | |
|------------------------|---|-------------------|
| Fert-Talp Stammlösung: | NaCl | 0,6658 g |
| | KCl | 0,0239 g |
| | NaHCO ₃ | 0,2100 g |
| | NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O | 0,0041 g |
| | CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 0,0294 g |
| | MgCl ₂ | 0,0048 g |
| | Phenolrot | 0,0010 g |
| | Na-Lactat (60%) | 143 µl = 0,1860 g |
| | Gentamycin Stammlösung | 100 µl |
| | H ₂ O für Embryo-Transfer | 100 ml |
| | → pH 7,4 einstellen | |
| Fert-Talp I: | Fert-Talp Stammlösung | 10 ml |
| | Na-Pyruvat | 0,3 mg |
| | BSA | 60 mg |
| Fert-Talp + Heparin: | Fert-Talp I | 0,833 ml |
| | Heparin Stammlösung | 10 µl |
| Fert-Talp II: | Fert-Talp I | 2,76 ml |
| | Fert-Talp + Heparin | 300 µl |
| | PHE Stammlösung | 255 µl |

Kultivierungsmedium Synthetic Oviductal Fluid (SOF)

| | | |
|------|---|--------|
| SOF: | SOF | 9 ml |
| | Na-Pyruvat | 3,3 mg |
| | BME (Basal Medium Eagle) | 200 µl |
| | MEM (Modified Eagle Medium; Fa. PAA, Pasching, A) | 100 µl |
| | östrisches Kuhserum (inaktiviert: 30 min bei 56°C) | 1 ml |
| | → mit BSA bestäuben | |

Chromatinkonfiguration

| | | |
|----------------|----------------------------------|--------|
| Hoechst 33258: | Glycerol (Fa. Serva, Heidelberg) | 750 µl |
| | PBS | 250 µl |
| | Hoechst 33258 | 2,5 g |

Verteilung und Aktivität von Mitochondrien

| | | |
|----------------------|---|--------|
| Stammlösung: | Mito Tracker Orange CMTMRos | 50 µl |
| | (M-7510, Fa. Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe) | |
| | DMSO | 117 µl |
| Mito Tracker Orange: | Stammlösung | 2 µl |
| | PBS + 0,3% BSA | 4 ml |

Biochemische Untersuchungen

| | | |
|-----------------|-----------------------------------|---------|
| Sammelgel (5%): | Acrylamid-Biacrylamid Stammlösung | 1,25 ml |
| | Tris-Puffer (0,5 M, pH 6,8) | 1,9 ml |
| | <i>Aqua bidest.</i> | 4,25 ml |
| | SDS (10%) | 75 µl |
| | Ammoniumperoxidsulfat (10%) | 150 µl |
| | TeMed | 10 µl |
| Trenngel (13%): | Acrylamid-Biacrylamid Stammlösung | 13 ml |
| | Tris-Puffer (1,5 M, pH 8,8) | 7,5 ml |
| | <i>Aqua bidest.</i> | 9,0 ml |
| | SDS (10%) | 0,3 ml |
| | Ammoniumperoxidsulfat (10%) | 0,3 ml |
| | TeMed | 20 µl |

TUNEL-Färbung

| | | |
|-----------------|--------------------|----------|
| Triton X-100: | Triton X-100 (10%) | 120 µl |
| | Na-Citrat (0,1%) | 11,88 ml |
| PI Stammlösung: | PI | 1 mg |
| | <i>Aqua dest.</i> | 1 ml |
| PI Färbelösung: | PI Stammlösung | 0,5 µl |
| | PBS | 500 µl |

Genexpression

| | | |
|--------------|--------------------------------|---------|
| Lysispuffer: | Igepal | 0,8% |
| | Dithiothreitol | 5 mM |
| | RNasin (Fa. Promega, Mannheim) | 40 U/µl |

3.2. Untersuchungsmaterial und Versuchsplanung

In der vorliegenden Arbeit wurden bovine Ovarien von Schlachthoftieren (Schlachthof Teterow, Mecklenburg-Vorpommern) genutzt. Die Ovarien wurden bis zur Bearbeitung in PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; Fa. BioWhittaker®, Lonza, CH), versetzt mit 60 mg/l Penicillin (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim), bei konstanter Temperatur (38,5°C) gelagert. Die Dauer der Gewinnung und des Transportes bis zur Aufarbeitung betrug 3 h. Bei den geschlachteten Rindern handelte es sich um eine heterogene Population ohne Unterscheidung hinsichtlich des Alters, der Rasse, des Gewichts und des Zyklustages.

Das gewählte Untersuchungsschema ist in Abbildung 3.1 veranschaulicht.

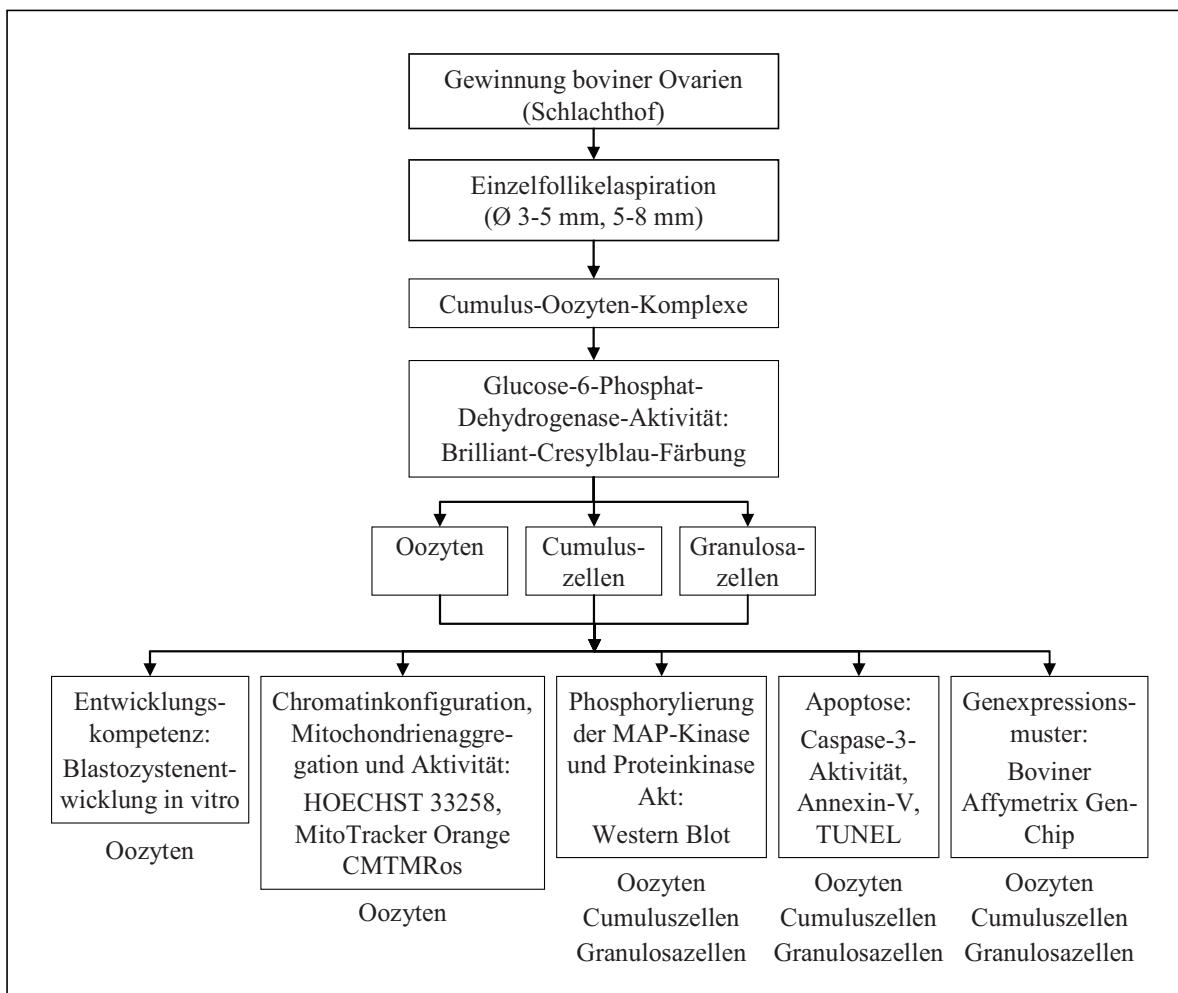


Abb. 3.1: Versuchsplanung.

Als Grundlage der Analysen diente die Klassifizierung der Oozyten hinsichtlich ihrer Entwicklungskompetenz mittels Brilliant-Cresylblau (BCB)-Färbung in entwicklungs-kompetente (BCB⁺) und gering entwicklungs-kompetente (BCB⁻) Oozyten. Die

Untersuchungen der Oozyten und deren umgebenen Cumulus- und Granulosazellen konnte anschließend entsprechend dieser Klassifizierung erfolgen.

Die Untersuchungen zur Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH)-Aktivität, Entwicklungskompetenz, Chromatinkonfiguration, mitochondrialen Aggregation und Aktivität und zu apoptotischen Veränderungen fanden im Leibniz-Institut für Nutztierbiologie in Dummerstorf im Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie in der Arbeitsgruppe Reproduktionszellbiologie statt. Das Auftreten und die Aktivität von MAP-Kinase, Proteinkinase Akt und Caspase-3 wurden in der Arbeitsgruppe Biochemie bestimmt.

Die Genexpressions-Analysen erfolgten an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn (Institut für Tierwissenschaften, Abteilung Tierzucht und Tierhaltung).

Für die Bearbeitung der Parameter wurden insgesamt 3228 Cumulus-Oozyten-Komplexe und deren zugehörigen Granulosazellen eingesetzt.

3.3. Gewinnung und Klassifizierung der Cumulus-Oozyten-Komplexe

Alle Medien wurden im Brutschrank bei 38,5°C vorgewärmt.

Nach Transport der Ovarien vom Schlachthof ins Labor wurden diese in PBS gespült. Zur Gewinnung von Cumulus-Oozyten-Komplexen und Granulosazellen erfolgte an den Ovarien eine Einzelaspiration von Follikeln (Ø:3-5 mm, 5-8 mm). Die Art der Gewinnung ermöglichte es, COKs ihren umgebenen Follikelzellen zuordnen zu können.

Die Follikel wurden mit einer Spritze (5 ml; Fa. Henry Schein, Gillingham, UK) und einer Kanüle (1,2 x 40 mm; Fa. Henry Schein, Gillingham, UK) entleert. Der Inhalt jedes Follikels wurde in je eine Vertiefung einer 48-Well-Schale (Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen) überführt. Nach jeder Aspiration wurde die Kanüle mit PBS + 0,2 % BSA (Bovines Serum Albumin; Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) gespült.

Unter dem Stereomikroskop wurden anschließend COKs der Klasse 1 und 2 (kompakter bis leicht expandierter Cumulus) aus der Follikelflüssigkeit herausgesucht (Abbildung 3.2).

Cumulus-Oozyten-Komplexe wurden aufgrund der unterschiedlichen Morphologie des Cumulus oophorus und des Ooplasmas in verschiedene Klassen unterteilt (Tabelle 3.1). Dem verwendeten Klassifizierungsschema lagen die Kriterien von LEIBFRIED UND FIRST (1979) und OTZDORFF (2006) zugrunde.

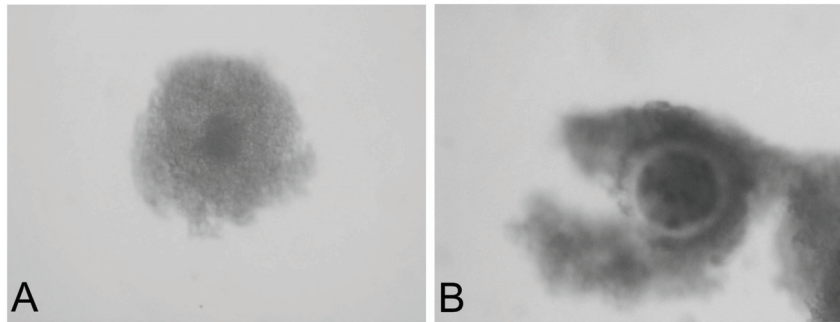


Abb. 3.2: Verwendete COK-Klassen (Stereomikroskop, 63x).

A, Oozyte mit kompaktem Cumulus (COK-Klasse I); **B**, Oozyte mit leicht expandiertem Cumulus (COK-Klasse II).

Tabelle 3.1: Klassifizierung der Cumulus-Oozyten-Komplexe.

| | |
|-----------------|--|
| Klasse 1 | Oozyten mit dunklem, homogenem Eizellplasma und einem kompaktem, mindestens fünfblättrigem Cumulus oophorus |
| Klasse 2 | Oozyten mit dunklem, homogenem Ooplasma und einem kompaktem, mehrlagigem Cumulus oophorus mit leichter Zellexpansion |
| Klasse 3 | Oozyten mit voll expandiertem Cumulus oophorus |
| Klasse 4 | Oozyten mit dunklem oder degeneriertem Ooplasma, mit geringerer Cumuluszellschicht und nackte Oozyten (fehlender Cumulus oophorus) |

3.3.1. Brilliant-Cresylblau-Färbung

Die in Abschnitt 3.3 entnommenen COKs wurden einzeln in 48-Well-Schalen überführt. Die folliculäre Herkunft der COKs wurde protokolliert, um eine genaue Zuordnung zu deren Granulosazellen treffen zu können.

Die BCB-Färbung erfolgte, wie bei ALM *et al.* (2005) beschrieben. Die COKs wurden in 26 μ M Brilliant-Cresylblau-Lösung (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) gefärbt (90 min, 38,5°C, dunkel). Anschließend wurden die COKs unter dem Stereomikroskop (SMZ800; Fa. NIKON, Düsseldorf) nach ihrer Anfärbbarkeit unterteilt. Die BCB⁺ COKs wiesen eine Blaufärbung des Ooplasma auf, während bei den BCB⁻ COKs keine Blaufärbung auftrat.

Die COKs und die Granulosazellen wurden anhand ihrer BCB-Einteilung und Follikelgröße zusammengefasst. Die weitere Aufarbeitung der Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen erfolgte versuchsabhängig.

3.4. Entwicklungskompetenz von Oozyten

Das Entwicklungspotential der Oozyten wurde nach *In-Vitro*-Maturation, -Fertilisation und -Kultivierung untersucht. Als Parameter der präimplantativen Entwicklungsfähigkeit wurden die Furchungsrate und Blastozystenrate der eingesetzten Oozyten bestimmt. Für die *In-Vitro*-Untersuchungen erfolgte die Nutzung einer im Leibniz-Institut für Nutztierbiologie etablierten Standardmethode.

Insgesamt wurden 309 BCB⁺ und 292 BCB⁻ COKs analysiert. Die Zusammensetzung der verwendeten Medien ist in Abschnitt 3.1 ersichtlich.

In-Vitro-Maturation (IVM)

Nach Klassifizierung der COKs anhand der BCB-Färbung wurden diese je einmal in PBS + 0,2% BSA und TCM 199 Reifungsmedium gewaschen. Die Reifung der Oozyten erfolgte in 4-Loch-Schalen (Fa. Nunc, Roskilde DK) mit je 420 µl Medium je Vertiefung für 24 h bei 38,5°C feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre und 5% CO₂ in Luft.

In-Vitro-Fertilisation (IVF)

Nach Auftauen der in Stickstoff gelagerten Pailletten mit Spermisuspension in Wasser (38,5°C, 30 sec), wurde 1 ml Sperm-Talp-Medium mit 200 µl der Spermisuspension unterschichtet. Zur Gewinnung motiler Spermien erfolgte ein Swim-Up im Brutschrank (1 h, 38,5°C, 5% CO₂). 800 µl vom Überstand wurden mit 1 ml Sperm-Talp gewaschen (Zentrifugation: 10 min, 2000 U/min, RT). Das Pellet wurde in 1 ml Sperm-Talp + Heparin resuspendiert, 1 min inkubiert und anschließend zentrifugiert (10 min, 2000 U/min, RT). Darauf folgte ein zweimaliges Waschen des Pellet mit 1 ml Fert-Talp I und eine erneute Zentrifugation (10 min, 2000 U/min, RT). Die COKs wurden der Reifungsschale entnommen, in Fert-Talp I gewaschen und jeweils 10 COKs in 100 µl Fert-Talp II Befruchtungsmedium, überschichtet mit äquilibrierten Mineral-Öl (Sigma-Aldrich, Steinheim), überführt. Die COKs wurden mit 16 µl Spermisuspension (Konzentration: 10⁶ Spermien/ml) inseminiert und 18 h im Brutschrank (38,5°C, 5% CO₂) befruchtet.

In-Vitro-Kultivierung (IVC)

Nach dem Waschen der COKs in Reifungsmedium wurden sie in die Reifungsschale zurückgesetzt. Die mechanische Entfernung des Cumulus erfolgte 24 h später. Die bereits gefurchten Eizellen wurden in SOF (Synthetic Oviductal Fluid) gewaschen und in einer 4-Loch-Schale mit SOF (überschichtet mit äquilibrierten Mineral-Öl) über 7 Tage im Inkubator kultiviert (38°C, 5% CO₂, 5% O₂).

3.5. Aggregation und Intensität von Mitochondrien und Chromatinkonfiguration in Oozyten

Die Untersuchungen zur mitochondrialen Aggregation und Aktivität bzw. zur Chromatinkonfiguration der Oozyten wurde anhand einer Doppelfärbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen MitoTracker Orange CMTMRos und Hoechst 33258 durchgeführt. Es wurden 223 BCB⁺ und 110 BCB⁻ Oozyten aus Follikeln mit Ø 3-5 mm analysiert. Die Herstellung der Färbelösungen ist in Abschnitt 3.1 dargestellt.

Verteilung und Intensität der Mitochondrien

Die Färbung der Mitochondrien im Ooplasma erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Orange CMTMRos, einem Derivat des Tetramethylrosamins. Er diffundiert passiv durch die Plasmamembran und lagert sich selektiv in aktive Mitochondrien ein. Die enthaltene Chloromethylgruppe reagiert mit Thiolgruppen von Peptiden und Proteinen der mitochondrialen Atmungskette und bildet ein fluoreszierendes Konjugat. Die Fluoreszenz bleibt nach Fixierung der Zellen erhalten (Produktinformation, Fa. Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe).

Chromatinkonfiguration

Um die Chromatinkonfiguration zu bestimmen, wurden die nach der MitoTracker Orange CMTMRos-Färbung fixierten Oozyten mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 behandelt. Hoechst 33258, ein synthetisches Bisbenzimidazolderivat, passiert intakte Zellmembranen und bindet spezifisch an A-T reiche Sequenzen der DNA (BARALDI *et al.*, 2004). Daraufhin kommt es zur Verschiebung des Emissionsmaximums von 500 nm auf 460 nm (LABARCA *et al.*, 1980).

Durchführung der MitoTracker- / Hoechst - Doppelfärbung an Oozyten

In 4-Loch-Schalen wurden 500 µl der eingesetzten Lösungen pipettiert und im Brutschrank auf 38,5°C vorgewärmt. Die Durchführung der Färbungen erfolgte ebenfalls bei 38,5°C.

Nach mechanischer Entfernung des Cumulus in 10%igen Trypsin-EDTA (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) wurden die Oozyten in PBS-Lösung gewaschen. Darauf folgte die Inkubation der Oozyten für 30 min in 500 nM MitoTracker CMTMRos-Färbelösung im Dunkeln. Nach Waschen in PBS wurden die Oozyten 15 min in 3%igen Paraformaldehyd (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) fixiert. Anschließend wurden sie in 3%igen Polyvinylalkohol (PVA; Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) und zweimal in PBS gewaschen. Gruppen von je 5 Oozyten wurden in 10 µl PBS auf Objektträger (Fa. ROTH, Karlsruhe)

verbracht und mit drei Tropfen zu jeweils 2 µl Hoechst 33258-Färbelösung umgeben. Nach Abdecken der Oozyten mit Deckgläschen (Fa. ROTH, Karlsruhe), wurden die Ränder mit Nagellack versiegelt. Die Lagerung erfolgte abgedunkelt bei 4°C.

Die Auswertung der Doppelfärbung wurde am Fluoreszenzmikroskop Jenalumar (Fa. Carl Zeiss, Jena) bei einer Wellenlänge von 570 nm für MitoTracker Orange CMTMRos und 410 nm für Hoechst 33258 durchgeführt.

Die Bestimmung der mitochondrialen Intensität einzelner Oozyten, erfolgte mit einem an ein Fluoreszenzmikroskop angeschlossenen Photomultiplier der Firma Nikon P100 (Düsseldorf). Um die tatsächliche mitochondriale Aktivität zu bestimmen, wurde die Hintergrundfluoreszenz von der gemessenen Intensität abgezogen.

Die mitochondriale Aggregation wurde in feingranuliertes, grobgranuliertes und kristallines Auftreten unterschieden.

Die Einteilung der Chromatinkonfiguration erfolgte in: fibrilläres Diplotän; diffuses Diplotän; kondensiertes Chromatin (c.C.), Diakinese; Metaphase I; Metaphase II; pyknotisches Chromatin und Oozyten ohne Kernstruktur.

3.6. Auftreten und Aktivität von MAP-Kinase und Proteinkinase Akt

Um eine ausreichende Menge an Cumuluszellen für die Untersuchungen zur Verfügung zu stellen, wurden diese als Cumulus-Oozyten-Komplexe gewonnen. Die Bestimmungen erfolgten jeweils in Gruppen von 60 Oozyten und 20 COKs. Insgesamt wurden 260 Oozyten und 60 COKs je BCB-Gruppe aus Follikeln mit einem Durchmesser von 3-5 mm eingesetzt. Die Oozyten, COKs und Granulosazellen wurden, wie in Abbildung 3.3 schematisch dargestellt, für die Untersuchungen aufbereitet.

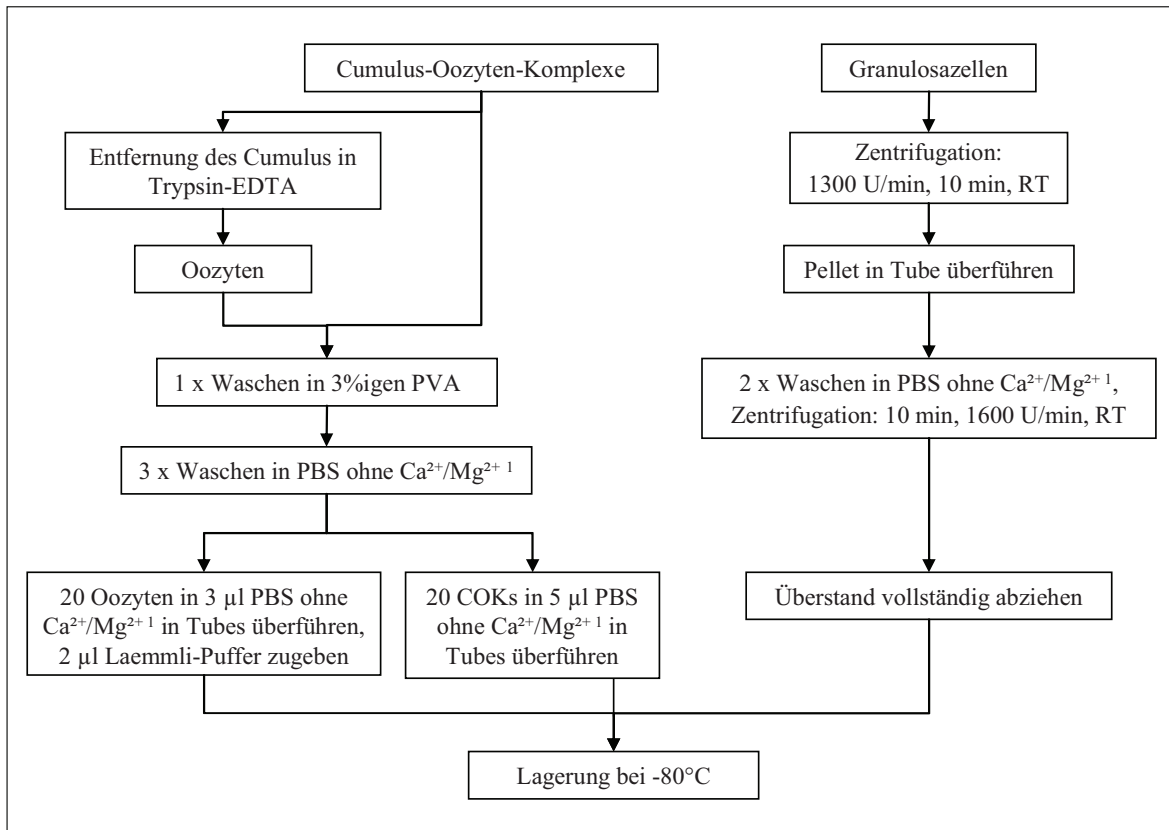


Abb. 3.3: Probensammlung zur Bestimmung von MAP-Kinase und Proteinkinase Akt in Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen mittels Western-Blot.
¹: Herstellung laut Produktinformation; Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die Proben wurden 2 min gekocht und anschließend mit Probenpuffer (Blue Loading Buffer; Fa. Cell Signaling, Frankfurt am Main) versetzt. Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels SDS-Page nach LAEMMLI (1970). Für die Elektrophorese wurde ein Gel aus einem 15%igem Sammel- und einem 13%igem Trenngel (Herstellung siehe Abschnitt 3.1) eingesetzt.

Western Blot

Die nach Größe getrennten Proteine wurden vom SDS-Gel zunächst elektrochemisch mittels einer Semidry Blot-Apparatur bei einem mA pro cm² Membranfläche auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF; Fa. Millipore, Schwalbach) übertragen (TOWBIN et al., 1979). Die Identifikation der Proteine erfolgte über spezifische Antikörper (Tabelle 3.2). Um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern, wurden freie Bindungsstellen auf der Membran vor der Antikörperbehandlung mit 0,5% fettfreier Trockenmilch in TTBS (0,1% Tween 20 in Tris Buffered Saline, pH 7,4; Fa. Sigma-

Aldrich, Steinheim) blockiert. Zum Blocken und für die Antikörper-Reaktion wurde das SNAP i.d. Protein Detection System (Fa. Millipore, Schwalbach) genutzt.

Tabelle 3.2: Antikörper für die Bestimmung der MAP-Kinase und Proteinkinase Akt mittels Western Blot.

| | MAP-Kinase | Phospho-MAP-Kinase | Akt-Proteinkinase | Phospho-Akt-Proteinkinase |
|--------------------------------------|----------------------------------|---|--------------------------|--------------------------------------|
| 1. Antikörper (polyklonal) | ERK1 (K-23) ¹ | p44/42 MAPK (p-ERK1/2) (Thr202/Tyr204) ² | Akt ² | Phospho-AKT (Ser473) ² |
| Verdünnung | 1:500 | 1:300 in TTBS + 1% BSA | 1:300 | 1:150 |
| Inkubation | 10 min | | | |
| 2. Antikörper | Anti-rabbit IgG HRP ³ | | | |
| Verdünnung | 1:1000 | 1:700 in TTBS + 0,5% fettfreie Trockenmilch | 1:700 | 1:700 |
| Inkubation | 10 min | | | |

¹: Fa. Cell Signaling, Frankfurt am Main

²: Fa. Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

³: HRP = Horseradish Peroxidase – linked antibody

Detektion der Antigen-Antikörper-Reaktion

Zur Detektion der Proteine auf der Membran wurde das ECL bzw. ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Freiburg) nach Herstellerangaben und einer Inkubationszeit von 2 min verwendet. Die Proteinbanden wurden auf Röntgenfilm (Fa. Kodak, Rochester, USA) sichtbar gemacht und deren Stärke mit der Scanalytics One-Scan Software (Scanalytics, Fairfax, USA) ausgewertet. Die relative Kinasen-Aktivität errechnete sich aus dem Verhältnis von Phospho-MAP-Kinase zu MAP-Kinase bzw. Phospho-Akt-Proteinkinase zu Akt-Proteinkinase.

3.7. Nachweis apoptotischer Veränderungen

3.7.1. Auftreten und Aktivität von Caspase-3

Bei der Initiation der Apoptose wird eine Caspase-Kaskade aktiviert. Eine Hauptrolle spielt dabei die Caspase-3 als sogenanntes Schlüsselenzym der Apoptose. Bei Aktivierung der Caspase-3 liegt diese in Form einer Cleaved Caspase-3 vor. Die aktive Form führt zur gezielten Proteolyse zellulärer Proteine (z.B. Spaltung von Strukturproteinen, Endonuklease-Aktivierung).

SDS-Page, Western Blot und Detektion

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page), der Western Blot und die Detektion der Antigen-Antikörper-Reaktion wurde, wie in Abschnitt 3.6 beschrieben, durchgeführt. In Tabelle 3.3 sind die für die Caspase-3 bzw. Cleaved Caspase-3 genutzten Antikörper und deren Verdünnung aufgeführt.

Tabelle 3.3: Antikörper für die Bestimmung von Caspase-3 mittels Western-Blot.

| | Caspase-3 | Cleaved Caspase-3 |
|--------------------------------------|--|--|
| 1. Antikörper (polyklonal) | Caspase-3 ¹ | Cleaved Caspase-3 (Asp175) ¹ |
| Verdünnung | 1:300 | 1:300 |
| | in TTBS + 1% BSA | |
| Inkubation | 10 min | |
| 2. Antikörper | Anti-rabbit IgG HRP ² | |
| Verdünnung | 1:700 | 1:700 |
| | in TTBS + 0,5% fettfreier Trockenmilch | |
| Inkubation | 10 min | |

¹: Fa. Cell Signaling, Frankfurt am Main

²: HRP = Horseradish Peroxidase – linked antibody

3.7.2. Modifikation der Zellmembran - Annexin-V- Färbung

Im Rahmen der frühen Apoptose verliert die Membran ihre Integrität. Dies führt zur Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite auf die Aussenseite der Membran. Annexin-V ist ein Protein, das für Phosphatidylserin eine hohe Affinität besitzt. Zur Abgrenzung von früher Apoptose und Nekrose ist eine gleichzeitige Propidiumiodid (PI)-Gegenfärbung nekrotischer Zellen notwendig

Die Annexin-V und PI- Färbung von Granulosazellen wurde mit dem Annexin-V-FITC Kit (Fa. Beckman Coulter, Krefeld) laut Herstellerangaben durchgeführt.

Nach Aufnahme der Follikelflüssigkeit in 5 ml PBS + 1% BSA und anschließender Zentrifugation (10 min, 1300 U/min, RT), wurde das Pellet in 5 ml PBS + 1% BSA resuspendiert. Daraus wurden 500 µl in Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (5 min, 1300 U/min, RT). Das Pellet wurde in 200 µl eiskaltem Puffer resuspendiert, mit 10 µl Annexin-V-FITC und 5 µl PI versetzt und auf Eis inkubiert (10 min, dunkel). Danach wurden 200 µl eiskalter Probenpuffer zugegeben. Als Negativkontrolle wurden 500 µl Zellsuspension ohne Annexin-V-FITC und PI mitgeführt.

Als Positivkontrolle dienten 200 μl Zellsuspension versetzt mit dem Zytotoxin Staurosporin (1 μM). Nach Inkubation (1 h, 37°C) wurden 200 μl Probenpuffer, 10 μl Annexin-V-FITC und 5 μl PI zugegeben.

Die Analyse erfolgte mittels Laserdetektion im FACSscan (engl.: Fluorescence Activated Cell Sorting) Durchflusszytometer (Coulter EPICS XL-MCL, Fa. Beckman Coulter, Krefeld). Die Fluoreszenzintensitäten von FITC (Wellenlänge: 515 nm) und PI (Wellenlänge: 560 nm) wurden bei 10^4 Zellen je Probe gemessen und die Ergebnisse in einem Punkt-Diagramm dargestellt (Abbildung 3.4), wobei jeder Punkt für eine Zelle steht. Zellen mit Annexin-V⁻/PI⁻ entsprechen der vitalen Fraktion, Zellen mit Annexin-V⁻/PI⁺ sind früh apoptotisch und Zellen mit Annexin-V⁺/PI⁺ stellen die nekrotische bzw. spät apoptotische Population dar. Signale für Annexin-V⁺/PI⁺ entstehen bei Zellfragmenten.

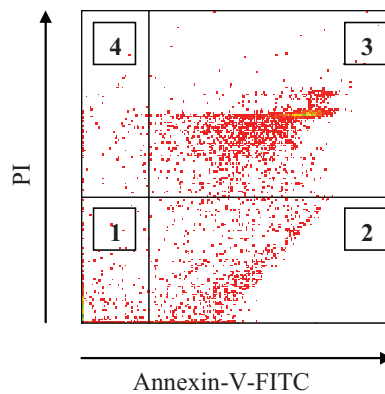


Abb. 3.4: Nachweis früher Apoptose von Granulosazellen mittels Annexin-V-FITC und Propidiumiodid (PI). Angabe der Fluoreszenzintensitäten für Annexin-V und PI bestimmt am Durchflußzytometer.

1, Annexin-V⁻/PI⁻; 2, Annexin-V⁻/PI⁺; 3, Annexin-V⁺/PI⁺; 4, Annexin-V⁺/PI⁻.

3.7.2.1. Charakterisierung von Granulosazellen

Bei der gewonnenen Granulosazellpopulation wurden Untersuchungen zum Zellzyklus und zur Homogenität durchgeführt. Letzteres erfolgte über den Nachweis und die anschließende Selektion von CD11b positiven Zellen (Oberflächenprotein bei Immunzellen) und die Detektion von Zellen mit FSH-Rezeptor (Granulosazellen).

Zellzyklusverteilung

Um Auswirkungen der *In-Vitro*-Behandlungen auf den Zellzyklus der Granulosazellen zu ermitteln, wurde der DNA-Gehalt in den Zellen bestimmt. Dazu wurden Zellen zu Beginn

(t = 0 min) und nach Ende der Brilliant-Cresylblau-Färbung (t = 90 min) fixiert und untersucht.

Die Zellzyklusuntersuchungen erfolgten nach dem Protokoll von VIERGUTZ UND LÖHRKE (2007). Die Follikelflüssigkeit mit den enthaltenen Granulosazellen wurde in 5 ml PBS + 1% BSA gewaschen, zentrifugiert (10 min, 300g, RT) und das Pellet in 5 ml PBS + 1% BSA resuspendiert. Von der Suspension wurden 200 µl in 10 ml eiskalten 70%igen Ethanol fixiert und bei -20°C gelagert. Nach Entfernen des Ethanols (Zentrifugation: 10 min, 250g, 4°C) folgte ein RNA-Verdau mit 500 µl RNase [Typ II-A, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim; 1 mg/ml HBS (16 mM Hepes, pH 7,3, 150 mM NaCl)] für 30 min bei 37°C. Im Anschluss wurde die DNA mit PI (50 µg/ml in HBS) gefärbt und die Fluoreszenz am FACScan Durchflusszytometer bestimmt. In Abbildung 3.5 ist ein Histogramm einer Zellzyklusmessung dargestellt.

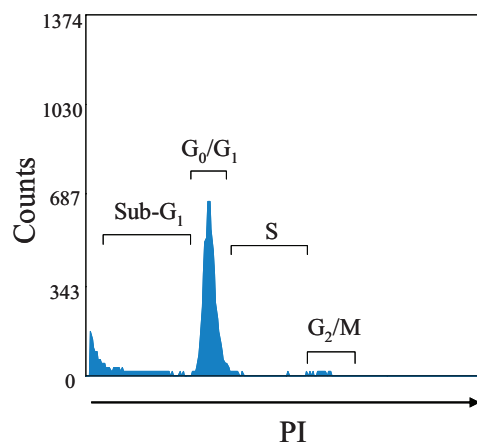


Abb. 3.5: Durchflußzytometrische Messung der DNA nach Propidiumiodid-Färbung von Granulosazellen.

G₀/G₁-Peak, diploide Zellen; S-Peak, Synthesephase; G₂/M, postreplikativer Status; Sub-G₁, Kernfragmentierung.

Nachweis CD11b positiver Zellen

Die Aspiration von Follikeln kann zur Verletzung umgebener Blutgefäße führen. Um Immunzellen aus der Follikelflüssigkeit (Leukozyten, Monozyten, neutrophile Granulozyten) zu separieren, wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen CD11b untersucht.

Die Follikelflüssigkeit mit den darin enthaltenen Granulosazellen wurde zentrifugiert (10 min, 300g, RT), das Pellet in 3 ml PBS + 1% BSA aufgenommen und resuspendiert. 150 µl der Suspension wurden mit einem FITC markierten CD11b-Antikörper (Verhältnis

1:15; Tabelle 3.4) versetzt und je 15 min bei 4°C und RT inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml PBS folgte eine Zentrifugation der Zellen (5 min, 300g, 4°C). 1 ml des Überstandes wurde entfernt und das Pellet in 300 µl PBS resuspendiert. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers auszuschließen, wurden Negativ-Kontrollen mit einem Mouse IgG2b-Antikörper mitgeführt. Die Analyse erfolgte am FACScan Durchflusszytometer. Zur Auswertung wurde die Negativkontrolle von den CD11b positiven Zellen abgezogen.

Tabelle 3.4: CD11b-Antikörper und deren Verdünnung.

| | CD11b | Negativ-Kontrolle |
|-----------------------------------|--|---|
| Antikörper (monoklonal) | Mouse Anti Bovine CD11b:FITC ¹ | Mouse IgG2b Negative Control:FITC ¹ |

¹: Fa. AbD Serotec, Düsseldorf

Die CD11b positiven Zellen wurden im Anschluss über eine MACS-Sortierung (engl. „magnetic bead activated cell sorting“) aus der Population herausgetrennt. Dafür erfolgte die Behandlung der Zellen wie zuvor beschrieben. Danach wurden sie mit einem magnetischen Anti-FITC MicroBeads-Antikörper (Fa. Miltenyl Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) im Verhältnis 1:10 versetzt (Inkubation: 15 min, 4°C, dunkel). Nach Zugabe von 1 ml PBS wurde 10 min bei 300g und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl PBS + 1% BSA resuspendiert und auf eine magnetische Säulenmatrix (MS Column, Fa. Miltenyl Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) gegeben. Um die ungebundenen Granulosazellen von der Säule zu entfernen, wurde diese zweimal mit 500 µl PBS + 1% BSA gespült. Die CD11b positiven Zellen verblieben über magnetische Bindung in der Säulenmatrix.

Nachweis von Zellen mit FSH-Rezeptor

Granulosazellen aus Follikeln von 3-5 mm Durchmesser verfügen noch nicht über LH-Rezeptoren, jedoch über FSH-Rezeptoren (VAN TOL *et al.*, 1996; NOGUEIRA *et al.*, 2007). Aufgrund dessen können Granulosazellen mit Antikörpern gegen FSH-Rezeptoren identifiziert werden. Da für das Rind keine industriellen FSH-Antikörper zur Verfügung standen, wurden die in Tabelle 3.5 aufgeführten Antikörper am bovinen System getestet.

In eiskaltem Methanol fixierte Granulosazellen wurden zentrifugiert (5 min, 400g, 6°C) und das Pellet in 450 µl PBS + 1% BSA resuspendiert. 200 µl der Zellsuspension wurden in 24-Well-Schalen überführt und mit dem 1. Antikörper im Verhältnis 1:200 versetzt. Die Inkubation erfolgte zu Beginn auf einem Schüttler (1 h) und danach über Nacht bei 4°C.

Nach Waschen mit 1 ml PBS + 1% BSA (Zentrifugation: 5 min, 100g, 4°C) wurde 1 ml vom Überstand entfernt und der 2. Antikörper im Verhältnis 1:200 zugegeben (Inkubation: 45 min, Schüttler). Anschließend wurde mit 1 ml PBS + 1% BSA gewaschen (Zentrifugation: 5 min, 100g, 4°C) und 1 ml vom Überstand entfernt. Nach Resuspension des Pellets in 300 µl PBS + 1% BSA folgte die Analyse der Probe am Durchflusszytometer. Um eine unspezifische Bindung des 2. Antikörpers auszuschließen, wurde eine Negativkontrolle ohne 1. Antikörper mitgeführt.

Tabelle 3.5: Antikörper zur Untersuchung von Granulosazellen auf FSH-Rezeptoren.

| | FSH-Rezeptor |
|--------------------------------------|---|
| 1. Antikörper (polyklonal) | Sheep Anti Human FSH Receptor (STAR88F) ¹ |
| 2. Antikörper | Donkey Anti Sheep/Goat IgG:FITC ¹ |

¹: Fa. AbD Serotec, Düsseldorf

3.7.3. DNA-Fragmentierung - TUNEL-Färbung

Während der späten Apoptose wird der DNA-Strang des Zellkerns durch die Aktivität von Endonukleasen fragmentiert. Die TUNEL-Methode (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) dient der Identifizierung der Einzel- bzw. Doppelstrangbrüche der DNA. Das Enzym TdT (Terminale Deoxynucleotidyl-Transferase) katalysiert die Anlagerung von fluoreszenzmarkierten dNTPs an das freie 3'-OH-Ende der DNA-Fragmente.

Herstellung der Präparate

Granulosa- und Cumuluszellen wurden wie folgt aufgearbeitet.

Die Follikelflüssigkeit wurde in 10 ml PBS aufgenommen und zentrifugiert (10 min, 1300 U/min, RT). Das Pellet wurde in 1000 µl PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ aufgenommen und erneut zentrifugiert (5 min, 1300 U/min, RT). Der Überstand wurde bis auf 60 µl abgezogen und das Pellet in der Restlösung resuspendiert.

Nach zweimaligem Waschen der Cumulus-Oozyten-Komplexe in 500 µl PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ wurden je 3 COKs in 20 µl dieser Lösung überführt und der Cumulus mittels Pipette entfernt. Nach Entfernen der Oozyten erfolgte eine Vereinzelung der Zellen.

Auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger (Fa. Thermo Fisher Scientific, Braunschweig) wurden 20 µl des Zelllysates ausgestrichen und diese Ausstriche bei 4°C aufbewahrt.

TUNEL-Färbung

Der Apoptosenachweis erfolgte mit dem In Situ Cell Death Fluorescein–Kit (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) laut Herstellerangaben. Die Zusammensetzung der verwendeten Reagenzien ist in Abschnitt 3.1 dargestellt.

Die Ausstriche wurden mit 4%igen Paraformaldehyd fixiert (30 min) und anschließend mit PBS (2 x 5 min) gewaschen. Nach Permeabilisierung der Zellen mit Triton X-100 (2 min, auf Eis), wurde mit PBS (2 x 5 min) gewaschen. Die Durchführung der nächsten Schritte fand abgedunkelt statt. Die Präparate wurden mit 25 µl TUNEL-Reagenz inkubiert (60 min, 37°C) und anschließend mit PBS (5 min) gewaschen. Darauf folgte die Gegenfärbung der Zellen mit PI (20 min). Nach dem Spülen mit PBS (5 min) und *Aqua dest.* wurden die Ausstriche mit 4 µl Moviol und Deckgläschen versiegelt. Die Lagerung der Objektträger erfolgte nach dem Trocknen (1 h) bei 4°C im Dunkeln.

Die Analyse wurde am Fluoreszenzmikroskop Jenalumar (Fa. Carl Zeiss, Jena) bei einer Wellenlänge von 480 nm durchgeführt. Pro Ausstrich wurden 10³ Granulosazellen ausgezählt. Apoptotische Zellen wiesen eine grüne Fluoreszenz und nicht apoptotische Zellen eine rote Fluoreszenz auf.

3.8. Genexpressionsanalysen

Sofern nicht anders angegeben, stammten die verwendeten Kits von Affymetrix Inc., Santa Clara, USA.

Probensammlung

Die Probensammlung der COKs und Granulosazellen erfolgte Follikel- und BCB-spezifisch. Die mechanisch denudierten Oozyten und der verbliebene Cumulus wurden dreimal in PBS gewaschen und in 20 µl Lysispuffer (Abschnitt 3.1) aufgenommen. Die Granulosazellen wurden zentrifugiert (10 min, 1300 U/min, RT) und 10 µl des Pellet in 20 µl Lysispuffer überführt. Die Probenlagerung erfolgte bei -80°C.

Es wurden 311 BCB⁺ und 161 BCB⁻ Oozyten und deren zugehörige Cumulus- und Granulosazellen aus 3-5 mm großen Follikeln gewonnen. Aus 5-8 mm großen Follikeln resultierten nur 27 BCB⁺ und 14 BCB⁻ Oozyten mit zugehörigen Cumulus- und Granulosazellen. Oozyten der 5-8 mm großen Follikel konnten aufgrund der geringen Anzahl nicht über einen Microarray untersucht werden.

RNA-Isolation

Die Gesamt-RNA wurde mit dem PicoPure™ RNA Isolation Kit (Fa. MDS Analytical Technologies GmbH, Ismaning) nach Gebrauchsanleitung isoliert. Die Zellen wurden in 100 µl Extraktionspuffer inkubiert (30 min, 42°C), auf Filtersäulen übertragen und zentrifugiert. Die auf dem Filter gebundene RNA, wurde mittels RNase freiem DNase Set (Fa. Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll von restlicher DNA befreit.

RNA-Amplifizierung

Die RNA-Amplifizierung erfolgte mit dem GeneChip® für Expressionanalysen laut Herstellerangaben über eine Zwei-Zyklus cDNA Synthese. Im ersten Zyklus wurde über Reverse Transkription aus RNA cDNA synthetisiert. Aus dieser wurde durch In-Vitro-Transkription (IVT) mit einem MEGAscript® T7 Kit (Fa. Ambion, Austin, USA) die cRNA hergestellt. Nach Aufreinigung der cRNA mittels GeneChip® IVT cRNA Cleanup Kit, wurde im zweiten Zyklus der cDNA-Erststrang über Reverse Transkription unter Einsatz von Random-Primern synthetisiert. Bei der cDNA-Zweitstrangsynthese wurde ein GeneChip® T7-Oligo(dT)-Primer Kit (Primersequenz: 5'GGCCAGTGAATTGTAATACG ACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)24-3') eingesetzt, um einen cDNA-Doppelstrang mit einer T7-Promotor-Sequenz zu erhalten. Über IVT und einem GeneChip® IVT Labeling Kit wurde eine Biotin-markierte cRNA hergestellt und diese anschließend fragmentiert. Um die Qualität der cRNA-Synthese zu überwachen, wurde ein eukaryotisches Poly(A)-RNA Control Kit als Positivkontrolle genutzt, welches vier Gene aus *B. subtilis* (*lys*, *phe*, *thr*, *dap*) enthielt.

Array-Hybridisierung

Als Hybridisierungskontrolle diente Biotin-markierte und fragmentierte cRNA (*bioB*, *bioC*, *bioD* aus *E. coli*, *cre* aus Bakteriophage P1). Das Hybridisierungsvolumen (markierte cRNA, 20x Kontrollen, 2x Hybridisierungsmix, DMSO, RNase freies Wasser) betrug 200 µl und wurde 5 min auf 99°C und 5 min auf 45°C erhitzt. Die Hybridisierung erfolgte für 16 h auf einem GeneChip® bovinen Genom Array, bestehend aus 24128 Transkripten. Nach Waschen und Färbung mit GeneChip® Fluidics Station 450/250, wurden die Arrays mit dem GeneChip® Scanner 3000 gescannt und mit der integrierten Affymetrix® Microarray Suite Software ausgewertet.

Datenanalyse

Die Microarray-Daten wurden mit dem Bioconductor-Paket (<http://www.bioconductor.org>) und der Statistik-Software R (<http://www.r-project.org>) analysiert. Die Normalisierung und

Hintergrundkorrektur der Daten und Berechnung des Expressionslevels wurde mit Hilfe einer Guanin Cytosin Robusten Multi-Array-Analyse (GCRMA) nach WU UND IRIZARRY (2004) und DAUGAARD *et al.* (2007) durchgeführt. Die Qualität der Microarrays wurde über die Signalintensitäten der Kontrollen bewertet. Die Beurteilung der Intensitätsverteilung und der Uniformität zwischen den Arrays erfolgte mittels Heatmaps und Boxplots aller Arrays. Differentiell exprimierte Gene wurden mit dem Linearen Modell für Microarray-Daten (LIMMA; SMYTH, 2005) identifiziert. Der Vergleich erfolgte zwischen den Expressionsdaten der jeweiligen BCB^+ und BCB^- Gruppen von Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen. Differentiell exprimierte Gene wurden hinsichtlich ihrer biologischen Prozesse, an denen sie beteiligt sind, mittels einer Gene Ontology (GO)-Analyse (<http://www.geneontology.org>; FALCON UND GENTLEMAN, 2007) unter Verwendung eines zusätzlichen Software-Paketes für die Spezies *Bos taurus* klassifiziert.

Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die Validierung der Microarrays erfolgte über eine qRT-PCR nach SALILEW-WONDIM *et al.* (2010) mit ausgewählten Kandidatengen (Primer: Anhang, Tabelle 9.1). Das Reaktionsvolumen (20 μ l) bestand aus SYBR[®] Green Supermix mit ROX (Fa. BIO-RAD, München), cDNA und Primer. Das PCR-Programm im ABI PRISM 7000 (Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA) war durch folgende Parameter gekennzeichnet: 3 min bei 96°C, 40 Zyklen von 15 s bei 95°C und 45 s bei 60°C Die Spezifität der Amplifizierung jedes Gens wurde am Ende der PCR durch eine Schmelzkurvenanalyse überprüft. Die relative Expression oder Fold Change (Verhältnis der Genexpression in Bezug auf das Grundniveau) wurde bestimmt mit der Methode der relativen Standardkurve mit Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Standard zur internen Normalisierung.

3.9. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten, mit Ausnahme der Genexpression, erfolgte mit dem Softwareprogramm SAS Version 9.2. Die Angaben in den Tabellen und Abbildungen entsprachen den Mittelwerten (LSM = Least Square Means) \pm Standardabweichung vom Mittelwert (SEM = Standard Error of the Mean). Vergleiche gepaarter Stichproben erfolgten mit einem t-Test. Für multiple Mittelwertvergleiche wurde der TUKEY-Test in der GLM-Prozedur von SAS verwendet. Die Daten der relativen Genexpressionen wurden

unter Nutzung der GLM-Prozedur von SAS Version 8.0 analysiert. Unterschiede wurden als signifikant beschrieben bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1. Entwicklungskompetenz von Oozyten unterschiedlicher BCB-Klassen

Als Parameter für die Entwicklungskompetenz wurden die Furchungs- und die Blastozystenrate von Oozyten nach *In-Vitro*-Maturation, -Fertilisation und –Kultivierung genutzt.

Furchungsrate

Die Furchungsrate, d.h. das Auftreten von Embryonen mit mindestens 2 Blastomeren, wurde am zweiten Tag nach der Fertilisation der COKs bestimmt.

Es wurde die absolute und prozentuale Anzahl von Embryonen an der Gesamtzahl eingesetzter COKs mit unterschiedlicher BCB-Klassifizierung ermittelt (Tabelle 4.1).

BCB⁺ Oozyten aus Follikeln von 3-5 mm Durchmesser wiesen eine signifikant ($p < 0,05$) höhere Furchungsrate auf.

Tabelle 4.1: Furchungsrate (n; LSM \pm SEM in %) der eingesetzten COKs.

| COK-Gruppe | Anzahl COK | Furchungsrate | Standardfehler |
|------------------|------------|-------------------------|----------------|
| | N | n (LSM [%]) | SEM [%] |
| BCB ⁺ | 309 | 202 (65,4) ^a | 2,7 |
| BCB ⁻ | 292 | 162 (55,8) ^b | 2,9 |

a:b, $p < 0,05$

Blastozystenrate

An den Tagen 8 und 9 nach der Fertilisation der COKs wurde die Blastozystenrate ermittelt. Es wurden Embryonen der Klasse 1 bzw. 2 mit erkennbarem Embryoblast und Trophoblast mikroskopisch bestimmt. Zur Überprüfung der Blastomerenanzahl in den Embryonen wurde die DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 gefärbt. In Abbildung 4.1 sind die unterschiedlichen Embryonenstadien veranschaulicht.

Die Blastozystenrate gibt den Anteil von Blastozysten an der Gesamtzahl gefurchter COKs wieder. In Tabelle 4.2 wird die absolute und prozentuale Anzahl an Blastozysten der beiden COK-Klassen angegeben.

BCB⁺ Oozyten aus Follikeln von 3-5 mm Durchmesser zeigten im Vergleich zu BCB⁻ eine signifikant ($p < 0,05$) höhere Blastozystenrate (BCB⁺: 19,3%, BCB⁻: 7,4%).

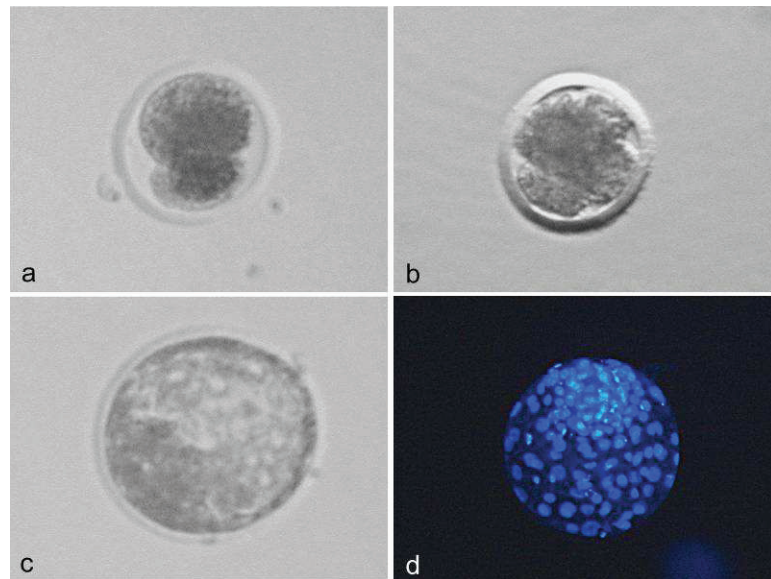


Abb. 4.1: Stereomikroskopische Abbildung von Embryonen (63x) (a-c).
a, II-Zeller d2 nach IVF; **b**, IV-Zeller d2 nach IVF; **c**, Blastozyste d8 nach IVF;
d, Fluoreszenzmikroskopische Abbildung einer Blastozyste d8 nach IVF (HOECHST 33258, 100x).

Tabelle 4.2: Blastozystenrate (LSM \pm SEM in %) bezogen auf die Furchungsrate.

| COK-Gruppe | Embryonen gefurcht | Blastozystenrate | Standardfehler |
|------------------|-----------------------|------------------------|----------------|
| | N | n (LSM [%]) | SEM [%] |
| BCB ⁺ | 202 | 39 (19,3) ^a | 2,8 |
| BCB ⁻ | 162 | 12 (7,4) ^b | 2,1 |

a:b, $p < 0,05$

4.2. Aggregation und Aktivität der Mitochondrien in ungereiften Oozyten

4.2.1. Mitochondriale Aggregation

Die mitochondriale Aggregation wurde am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die vorkommenden Aggregationsmuster wurden unterteilt in feinkörnig, grobkörnig und kristallin (Abbildung 4.2).

Das Auftreten verschiedener Aggregationsmuster (LSM \pm SEM in %) in den Oozyten ist in Tabelle 4.3 ersichtlich.

In beiden BCB-Gruppen kamen die drei Aggregationsmuster jeweils in einem ähnlichen Verhältnis vor. Zum größten Teil trat die feingranulierte Aggregation der Mitochondrien auf (BCB⁺: 78,5%, BCB⁻: 70,9%). Die grobgranulierte (BCB⁺: 13,9%, BCB⁻: 17,3%) und

kristalline (BCB^+ : 7,7%, BCB^- : 11,8%) Aggregation konnte nur zu einem geringen Anteil beobachtet werden. Die drei Aggregationen unterschieden sich im Vorkommen innerhalb einer Oozyten-Klasse signifikant ($p < 0,05$) voneinander (mit Ausnahme grobgranuliert zu kristallin in BCB^-).

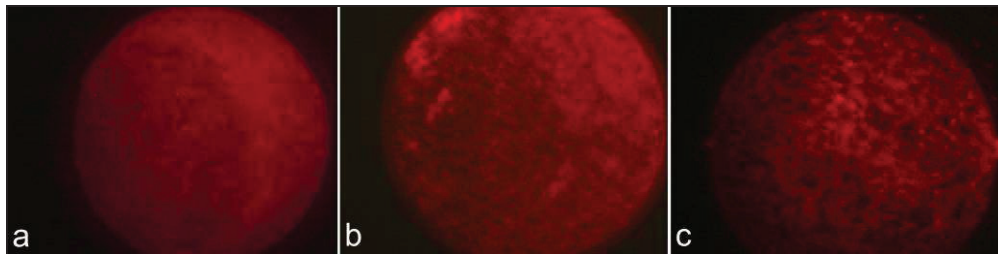


Abb. 4.2: Aggregationsmuster von Mitochondrien in Oozyten (MitoTracker Orange CMTMRos, Fluoreszenz-mikroskop, 400x).

a, fein granuliert Aggregation; b, grob granuliert Aggregation; c, kristalline Aggregation.

Tabelle 4.3: Aggregationsmuster von Mitochondrien in Oozyten in Abhängigkeit von der BCB-Färbung angegeben als prozentuale Häufigkeit (LSM \pm SEM in %).

| Oozyten-Gruppe | Aggregationsmuster | | |
|----------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | feinkörnig LSM \pm SEM [%] | grobkörnig LSM \pm SEM [%] | kristallin LSM \pm SEM [%] |
| BCB^+ | 78,5 \pm 2,8 ^a | 13,9 \pm 2,3 ^b | 7,7 \pm 1,7 ^c |
| BCB^- | 70,9 \pm 4,3 ^d | 17,3 \pm 3,6 ^e | 11,8 \pm 3,1 ^f |

a:b:c, d:e, d:f, $p < 0,05$

4.2.2. Mitochondriale Aktivität

Durch Verbindung eines Photomultiplier mit einem Fluoreszenzmikroskop konnte das Fluoreszenzsignal der Mitochondrien einer Oozyte als mitochondriale Aktivität gemessen werden. Der Farbstoff MitoTracker lagert sich selektiv in aktive Mitochondrien ein. Das Maß des Einbaus bestimmt dabei die Emmissionsfähigkeit des Farbstoffes nach spezifischer Anregung der Oozyten. Damit entspricht die Fluoreszenzintensität einer Oozyte der respiratorischen Aktivität ihrer Mitochondrien.

Die Fluoreszenzintensitäten (LSM in μA) je Oozyte in Abhängigkeit von der BCB-Gruppe sind in Tabelle 4.4 dargestellt.

Die BCB^+ Oozyten wiesen eine signifikant ($p < 0,05$) stärkere Intensität (133,5 μA) und damit eine höhere Aktivität der Mitochondrien pro Oozyte im Vergleich zu BCB^- Oozyten (84,6 μA) auf.

Tabelle 4.4: Aktivität (LSM \pm SEM in μ A) der Mitochondrien in Oozyten verschiedener BCB-Klassen (BCB⁺, BCB⁻).

| Oozyten-Gruppe | Oozyten | Fluoreszenzintensität / Oozyte |
|------------------|---------|-----------------------------------|
| | N | LSM \pm SEM [μ A] |
| BCB ⁺ | 223 | 133,5 ^a \pm 5,6 |
| BCB ⁻ | 110 | 84,6 ^b \pm 7,9 |

a:b, $p < 0,05$

4.2.3. Zusammenhang zwischen Aggregation und Aktivität der Mitochondrien

In Abbildung 4.3 ist die mitochondriale Aktivität pro Oozyte in Abhängigkeit zum Aggregationsmuster in BCB positiven und BCB negativen Oozyten dargestellt.

Innerhalb einer BCB-Gruppe traten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die mitochondriale Aktivität zwischen den drei Aggregationsmustern auf.

Die Fluoreszenzintensität pro Oozyte war jedoch different ($p < 0,05$) zwischen den BCB-Gruppen bei der feinkörnigen (BCB⁺: 135 μ A, BCB⁻: 87 μ A) und der grobkörnigen (BCB⁺: 121 μ A, BCB⁻: 71 μ A) Aggregation.

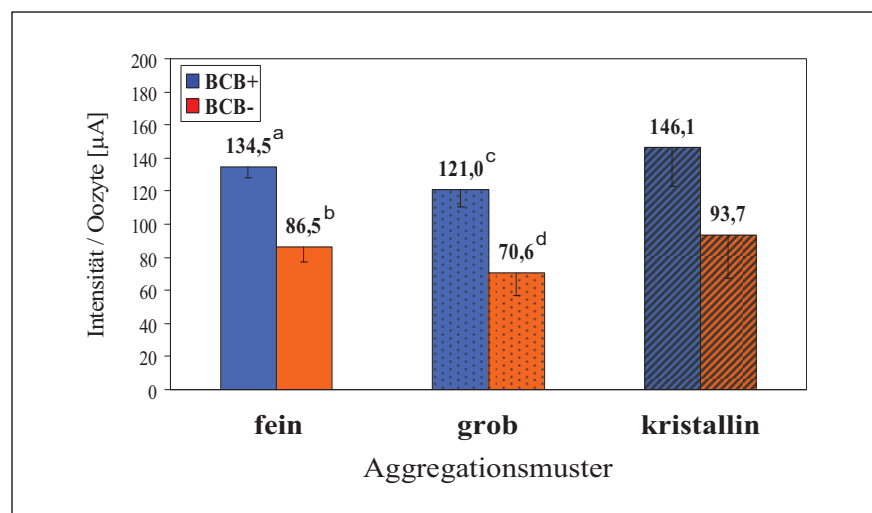


Abb. 4.3: Abhängigkeit der mitochondrialen Aktivität / Oozyte (LSM \pm SEM in μ A) von der mitochondrialen Aggregation (feingranuliert, grobgranuliert, kristallin) in BCB⁺ und BCB⁻ Oozyten analysiert mittels MitoTracker Orange CMTMRos Färbung.

a:b, c:d, $p < 0,05$

4.3. Chromatinkonfiguration in Oozyten

Der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 ermöglichte die Identifizierung der Chromatinkonfiguration in Oozyten verschiedener BCB-Gruppen. In Abbildung 4.4 ist das Chromatin ungereifter Oozyten im Germinalvesikel-Stadium beispielhaft dargestellt.

Die auftretenden Chromatinkonfigurationen wurden wie folgt eingeteilt: diffuses Diplotän, fibrilläres Diplotän, kondensiertes Chromatin (c.C.), Diakinese, Metaphase I (M I), Metaphase II (M II) und pyknotisches Chromatin.

In Tabelle 4.5 sind die absoluten Häufigkeiten und die prozentualen Anteile (LSM) der genannten Kernstadien im Verhältnis zu der Gesamtzahl der untersuchten Oozyten in Abhängigkeit von der BCB-Färbung, aufgeführt.

BCB positive Oozyten wiesen vor allem Chromatin im Stadium des fibrillären Diplotän (43,0%), kondensiertes Chromatin (20,2%) und Chromosomen in der Diakinese (22,0%) auf. In BCB negativen Oozyten waren die am häufigsten auftretenden Kernstadien diffuses Diplotän (24,8%) und kondensiertes Chromatin (35,0%).

Diese vier Chromatinkonfigurationen (diffuses bzw. fibrilläres Diplotän, kondensiertes Chromatin, Diakinese) unterschieden sich in ihren Anteilen zwischen BCB⁺ und BCB⁻ signifikant ($p < 0,05$) voneinander.

Wird diffuses und fibrilläres Diplotän nicht differenziert betrachtet, sondern als Diplotän zusammengefasst (BCB⁺: 25,0%, BCB⁻: 41,9%), so entfiel die Signifikanz zwischen beiden Stadien ($p < 0,05$).

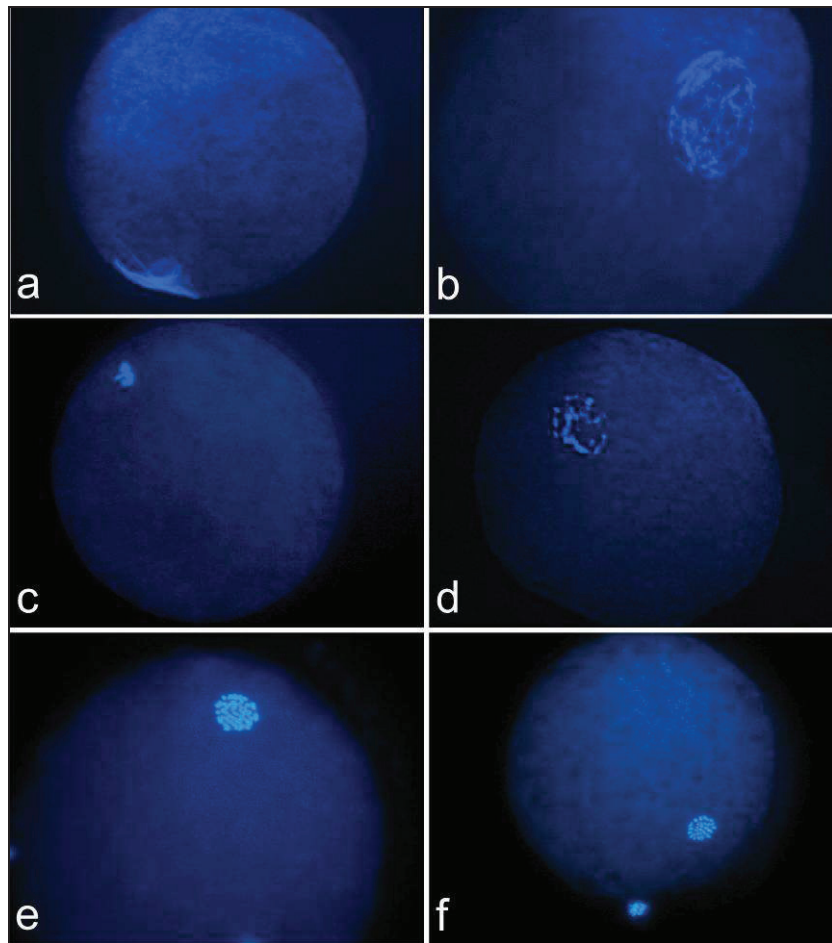


Abb. 4.4: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Chromatins von Oozyten (HOECHST 33258, 400x).

a, diffuses Diplotän; **b**, fibrilläres Diplotän; **c**, kondensiertes Chromatin.; **d**, Diakinese; **e**, Metaphase I; **f**, Metaphase II.

Tabelle 4.5: Chromatinkonfiguration ungereifer Oozyten (n, LSM in %) in Abhängigkeit von der BCB-Gruppe.

| Oozyten-Gruppe | Oozyten | diffuses Diplotän | fibrilläres Diplotän | c.C. ¹ | Diakinese | MI ² | MII ³ | pykn. C. ⁴ | ohne Kern |
|------------------------|---------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------|------------------|-----------------------|---------------|
| | N | LSM ± SEM [%] | LSM ± SEM [%] | LSM ± SEM [%] | LSM ± SEM [%] | LSM ± SEM [%] | LSM ± SEM [%] | LSM ± SEM [%] | LSM ± SEM [%] |
| BCB⁺ | 223 | 10,4 ± 1,9 ^a | 43,1 ± 3,3 ^c | 20,2 ± 2,7 ^e | 22,0 ± 2,8 ^g | 0,9 ± 0,6 | 0,5 ± 0,4 | 0 | 3,1 ± 1,2 |
| BCB⁻ | 117 | 26,5 ± 4,0 ^b | 17,1 ± 3,5 ^d | 35,0 ± 4,4 ^f | 11,1 ± 2,9 ^h | 2,6 ± 1,5 | 0 | 3,4 ± 1,7 | 4,3 ± 1,9 |

¹: c.C. (engl.: condensed chromatin) kondensiertes Chromatin

²: MI: Metaphase I

³: MII: Metaphase II

⁴: pyknot. C.: pyknotisches Chromatin

a:b, c:d, e:f, g:h, p<0,05

4.4. Auftreten und Aktivität von Proteinkinasen in Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen

Das Auftreten und die Phosphorylierung der MAP-Kinase und Proteinkinase Akt in Oozyten, in Cumulus- und Granulosazellen aus Follikeln von 3-5 mm Durchmesser wurde anhand der Western-Blot-Methode bestimmt. Aus der Phosphorylierung der Kinasen lässt sich deren Aktivität ableiten. Die Aktivität entsprach dem Verhältnis aus phosphorylierter Form zur unphosphorylierten Proteinkinase.

Aus vorangegangenen Untersuchungen (OTZDORFF, 2006) war bekannt, dass die Probenaufarbeitung für die Gelelektrophorese zu starken Zellverlusten führt. Für die Untersuchungen der Cumuluszellen wurden daher Cumulus-Oozyten-Komplexe eingesetzt. Die Oozyten in den COKs beeinflussten die Ergebnisse der untersuchten Cumuluszellen nicht, da für die Western-Blot-Analysen nur jeweils 20 COK eingesetzt wurden. Mindestens 60 Oozyten pro Western-Blot-Analyse sind jedoch notwendig, um eindeutige Signalintensitäten zu erhalten.

Die Untersuchungen der Oozyten und COKs wurde dreimal und die der Granulosazellen fünfmal wiederholt.

4.4.1. MAPK – Phosphorylierung

Die Western-Blot-Analyse der MAP-Kinase (ERK1, ERK2) ist in Abbildung 4.5 dargestellt. Die relativen Aktivitätsraten, bezogen auf die gesamt vorkommende MAP-Kinase, sind in Tabelle 4.6 aufgeführt.

MAPK und deren Phosphorylierung konnte in Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen beider BCB-Gruppen nachgewiesen werden. Die höchste Aktivität der MAPK zeigten die Granulosazellen, während sie in den Cumuluszellen am geringsten war.

Die BCB-Einteilung besaß keinen signifikanten Einfluß auf die MAPK-Aktivität bei Cumulus- und Granulosazellen. BCB⁻ Oozyten zeigten eine nicht signifikante Erhöhung der MAPK-Phosphorylierung gegenüber BCB⁺ um etwa 10%.

Die Aktivität von ERK1 (BCB⁺, BCB⁻) und von ERK2 (BCB⁺) unterschieden sich zwischen Cumulus- und Granulosazellen signifikant ($p < 0,05$).

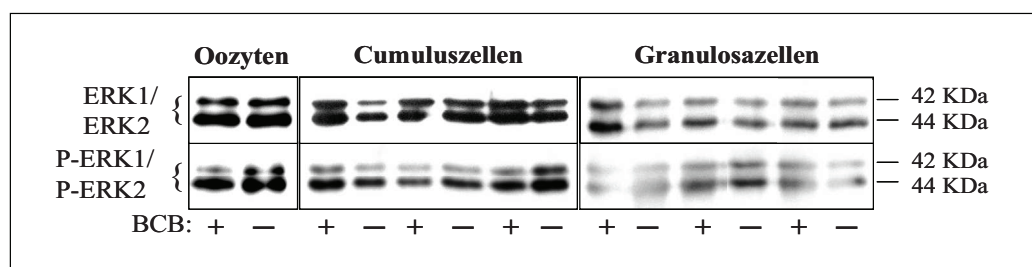


Abb. 4.5: Auftreten und Phosphorylierung von MAP-Kinase (ERK1, ERK2) in Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen verschiedener BCB-Gruppen (BCB⁺, BCB⁻) analysiert mittels Western-Blot.

Tabelle 4.6: Relative Aktivitätsraten (LSM \pm SEM) von MAPK (ERK1, ERK2) in Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen unterschiedlicher BCB-Gruppen (BCB⁺, BCB⁻) bestimmt mittels Western-Blot.

| BCB-Gruppe | Relative Aktivität MAPK | | | | | |
|------------------|------------------------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | Oozyten | | Cumuluszellen | | Granulosazellen | |
| | ERK1 | ERK2 | ERK1 | ERK2 | ERK1 | ERK2 |
| | LSM \pm SEM | | LSM \pm SEM | | LSM \pm SEM | |
| BCB ⁺ | 0,41 \pm 0,04 ^a | 0,62 \pm 0,16 | 0,27 \pm 0,08 ^a | 0,44 \pm 0,08 ^c | 0,95 \pm 0,17 ^b | 0,86 \pm 0,01 ^d |
| BCB ⁻ | 0,53 \pm 0,10 | 0,72 \pm 0,18 | 0,27 \pm 0,08 ^e | 0,47 \pm 0,08 | 0,93 \pm 0,17 ^f | 0,86 \pm 0,01 |

a:b, c:d, e:f, $p < 0,05$

4.4.2. Proteinkinase Akt - Phosphorylierung

Die Western-Blot-Analyse der Akt-Proteinkinase und die ermittelten relativen Aktivitätsraten, bezogen auf die gesamt vorkommende Proteinkinase Akt, sind in Abbildung 4.6 und Tabelle 4.7 dargestellt.

Die Proteinkinase Akt kam in Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen beider BCB-Gruppen vor. Die phosphorylierte Form konnte in Oozyten, trotz Erhöhung der eingesetzten Probenanzahl auf 80 Oozyten, nicht nachgewiesen werden. Die Cumuluszellen zeigten eine höhere Aktivität der Akt-Kinase (BCB⁺: 88%, BCB⁻: 81%) als die Granulosazellen (BCB⁺ und BCB⁻: 46%), welche in der BCB⁺ Gruppe signifikant war ($p < 0,05$).

Die Phosphorylierungsrate wies keine signifikanten Unterschiede bezüglich der BCB-Einteilung auf.

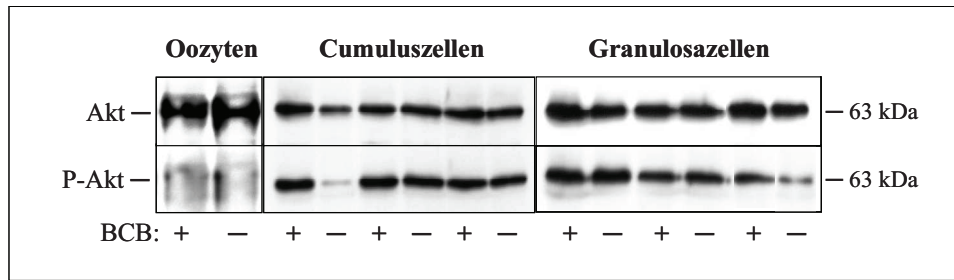


Abb. 4.6: Auftreten und Phosphorylierung von Proteinkinase Akt (Ser473) in Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen verschiedener BCB-Gruppen (BCB⁺, BCB⁻) analysiert mittels Western-Blot.

Tabelle 4.7: Relative Aktivitätsraten (LSM \pm SEM) von Proteinkinase Akt (Ser473) in Cumulus- und Granulosazellen verschiedener BCB-Gruppen (BCB⁺, BCB⁻) bestimmt mittels Western-Blot.

| BCB-Gruppe | Relative Aktivität Akt-Kinase | |
|------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | Cumuluszellen | Granulosazellen |
| | LSM \pm SEM | LSM \pm SEM |
| BCB ⁺ | 0,88 \pm 0,06 ^a | 0,46 \pm 0,10 ^b |
| BCB ⁻ | 0,81 \pm 0,06 | 0,46 \pm 0,11 |

a:b, $p < 0,05$

4.4.3. Zusammenhang zwischen der Aktivität von MAPK und Akt

Es wurde geprüft, ob zwischen den beiden Proteinkinase-Aktivitäten ein Zusammenhang besteht.

Aus Abbildung 4.7 wird ersichtlich, dass in den Cumuluszellen die Aktivität der Proteinkinase Akt im Gegensatz zur MAPK-Aktivität doppelt so hoch war, während sie in den Granulosazellen nur die Hälfte betrug.

Der Unterschied hinsichtlich der Aktivitäten beider Proteinkinasen war in den BCB⁺ Cumuluszellen für ERK1 und ERK2, in den BCB⁻ Cumuluszellen und in den BCB⁺ Granulosazellen für ERK1 signifikant ($p < 0,05$).

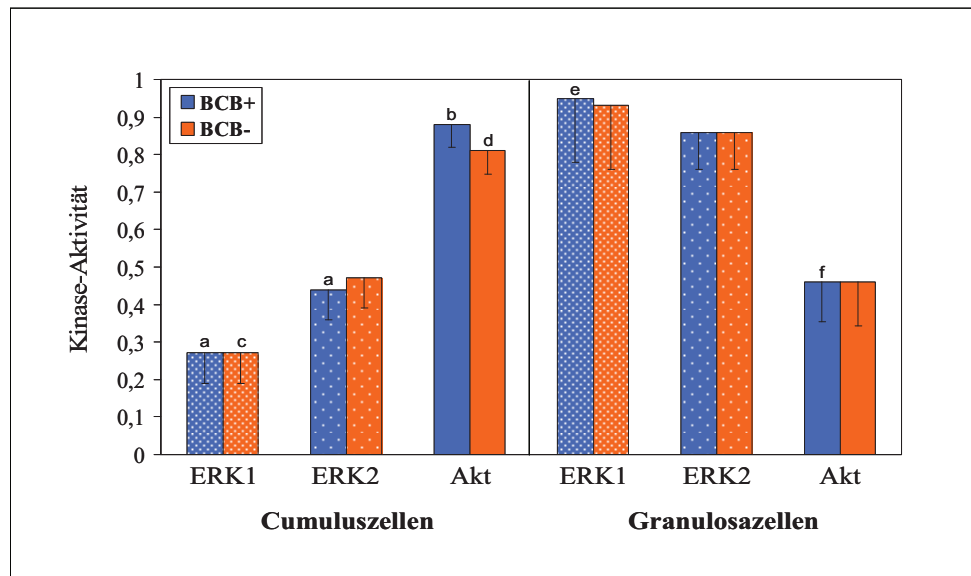


Abb. 4.7: Aktivitäten (LSM \pm SEM) von MAPK und Akt in Cumulus- und Granulosazellen verschiedener BCB-Gruppen (BCB⁺, BCB⁻). a:b, c:d, e:f, $p < 0,05$

4.5. Charakterisierung der Granulosazellen

Zellzyklusverteilung

Die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse von Granulosazellen vor (0 min) und nach der BCB-Färbung (90 min) sind in Abbildung 4.8 dargestellt. Es wurden vier Wiederholungen der Untersuchung durchgeführt.

Der größte Anteil der Zellen befand sich in der G0/G1-Phase des Zellzyklus (t_0 : 86%, BCB⁺: 87%, BCB⁻: 82%). Der Anteil an Zellen in der S-Phase war zum Zeitpunkt $t = 0$ min am geringsten (4,8%). Nach 90 min stieg die Zellrate in der S-Phase leicht an (BCB⁺: 6,4% und BCB⁻: 11,6%). Die Zellen in der G2/M-Phase sind nach 90 min von 9,2% ($t = 0$ min) auf 7,1% (BCB⁺) bzw. 6,3% (BCB⁻) leicht gesunken. Der Anteil Zellen in der G0/G1-Phase unterscheidet sich signifikant von der S- und G2/M-Phase bei $t = 0$ min, BCB⁺ und BCB⁻.

Die Zeit der BCB-Färbung besaß keinen signifikanten Einfluss auf die Zellzyklusverteilung der Granulosazellen.

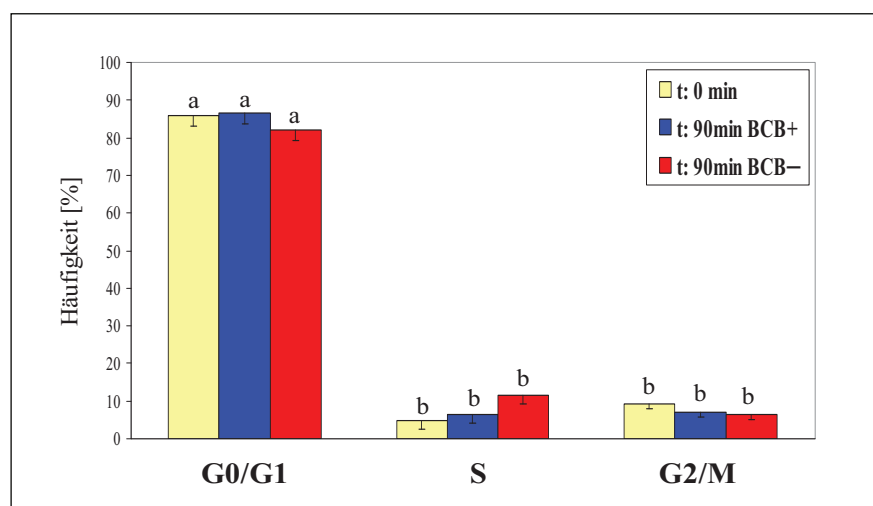


Abb. 4.8: Zellzyklusverteilung (LSM ± SEM in %) von Granulosazellen zu Beginn (0 min) und nach BCB-Färbung (90 min).
a:b, $p < 0,05$

CD11b

Der Nachweis von CD11b positiven Zellen (Immunzellen) mittels spezifischer Antikörper innerhalb der Granulosazellpopulation (BCB⁺, BCB⁻) ergab die in Tabelle 4.8 dargestellten Anteile.

Bei BCB⁺ und BCB⁻ unterschieden sich die Anteile CD11b positiver Zellen nicht voneinander. In der Population der freien Granulosazellen befanden sich 35% Immunzellen.

Tabelle 4.8: Anteil (LSM ± SEM in %) CD11b positiver Zellen an der Granulosazellpopulation analysiert mittels Durchflußzytometrie.

| BCB-Gruppe | Granulosazellen | CD11b-positive Zellen |
|------------------|-----------------|-----------------------|
| | N | LSM ± SEM [%] |
| BCB ⁺ | 30000 | 35,4 ± 3,7 |
| BCB ⁻ | 30000 | 35,1 ± 3,7 |

FSH

Mit den in dieser Arbeit eingesetzten Antikörpern zur FSH-Bestimmung war es nicht möglich bovine Granulosazellen zu identifizieren.

4.6. Apoptosebestimmung in Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen

4.6.1. Caspase-3

Das Vorhandensein und die Aktivität der Caspase-3 wurden mittels der Western-Blot-Methode unter Verwendung spezifischer Antikörper untersucht. Bei den Oozyten und den Cumuluszellen wurden drei Wiederholungen und bei den Granulosazellen fünf Wiederholungen durchgeführt.

Die Caspase-3 und die cleaved Caspase-3 konnten in ungereiften Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen nachgewiesen werden (Abbildung 4.9). Die Aktivitätsraten sind in Abbildung 4.10 dargestellt.

In allen drei Zelltypen der BCB⁺-Gruppe war die Aktivität von Caspase-3 höher als in der BCB⁻-Gruppe. In den Oozyten und Cumuluszellen wies die Aktivität von Caspase-3 eine signifikante Abhängigkeit von der BCB-Gruppe auf ($p < 0,05$).

Oozyten und Granulosazellen zeigten vergleichbare Aktivitätsraten in beiden BCB-Gruppen.

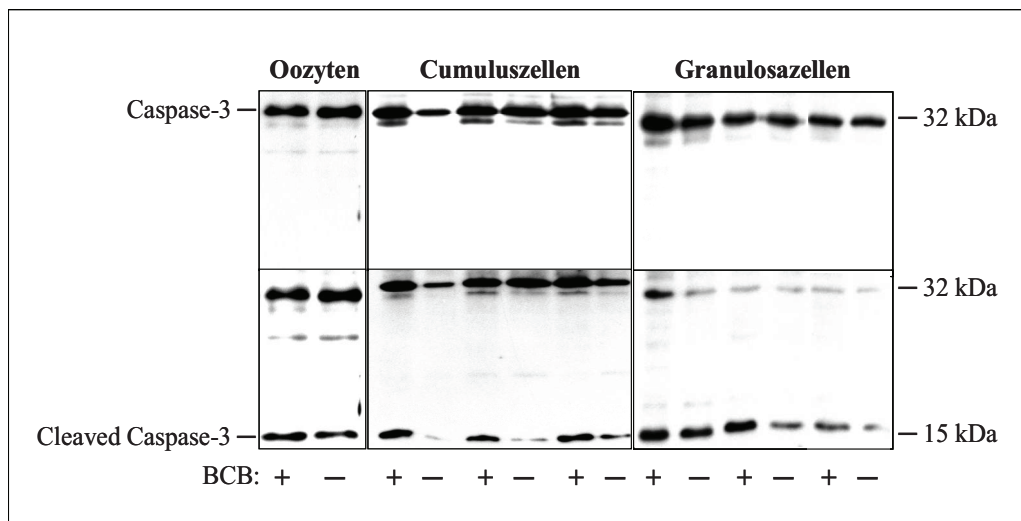


Abb. 4.9: Auftreten und Aktivierung von Caspase-3 in Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen verschiedener BCB-Gruppen (BCB⁺, BCB⁻) analysiert mittels Western-Blot.

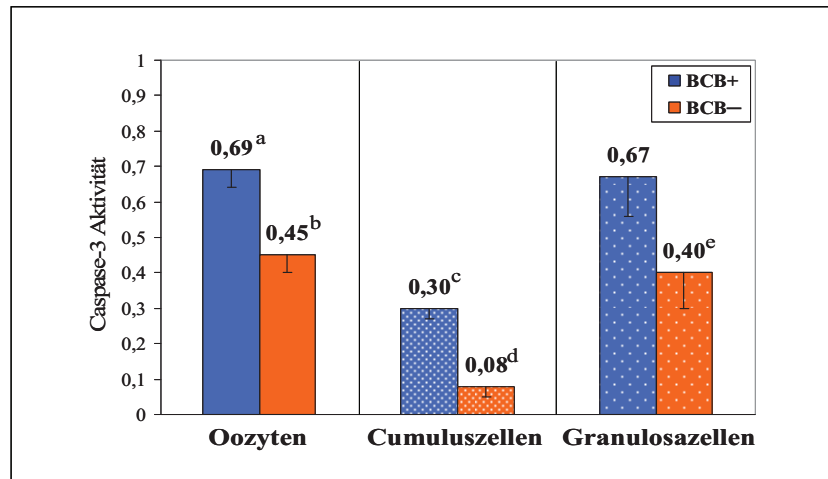


Abb. 4.10: Relative Aktivität (LSM \pm SEM) von Caspase-3 in Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen verschiedener BCB-Klassen (BCB⁺, BCB⁻) Gruppe ermittelt durch Western-Blot.

a:b, c:d, b:d, d:e, $p < 0,05$

4.6.2. Annexin-V – Färbung

Früh apoptotische Zellen sind gekennzeichnet durch eine positive Färbung mit Annexin-V und eine negative Färbung mit PI.

In Tabelle 4.9 ist zu erkennen, dass sich die Rate frühapoptotischer Granulosazellen aus 3-5 mm großen Follikeln zwischen BCB⁺ (8,5%) und BCB⁻ (7,5%) nicht signifikant unterschied.

Tabelle 4.9: Auftreten früher Apoptose (LSM \pm SEM in %) von Granulosazellen unterschiedlicher BCB-Klassen analysiert mittels Annexin-V –Färbung.

| BCB-Gruppe | Granulosazellen | Apoptoserate |
|------------------|-----------------|-------------------|
| | N | LSM \pm SEM [%] |
| BCB ⁺ | 30000 | 8,50 \pm 1,39 |
| BCB ⁻ | 30000 | 7,52 \pm 1,39 |

4.6.3. TUNEL –Färbung

Infolge einer erhöhten Endonukleaseaktivität entstehen im späten Stadium der Apoptose DNA-Fragmentierungen. Die Bestimmung der DNA-Strangbrüche erfolgte über die TUNEL-Färbung. Apoptotische Zellen wiesen bei der Auswertung am Fluoreszenzmikroskop eine grüne Färbung und nicht apoptotische Zellen eine rote Färbung auf (Abbildung 4.11).

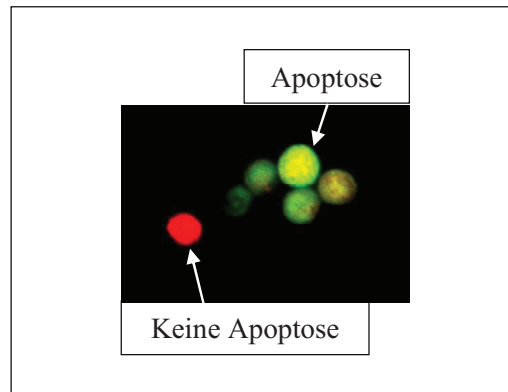


Abb. 4.11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Granulosazellen nach TUNEL-Färbung (400x). Rot: nicht apoptotische Zellen, Grün: apoptotische Zellen.

Pro Ausstrich wurden 10^3 Zellen ausgezählt. In Tabelle 4.10 ist die Anzahl der ausgewerteten Cumulus- und Granulosazellen nach der TUNEL-Färbung angegeben.

Tabelle 4.10: Anzahl (N) der nach TUNEL-Färbung ausgewerteten Cumulus- und Granulosazellen (BCB^+ und BCB^-) aus Follikeln mit 3-5 mm und 5-8 mm Durchmesser.

| BCB-Gruppe | Cumuluszellen | Granulosazellen | Cumuluszellen | Granulosazellen |
|------------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|
| | 3-5 mm | 3-5 mm | 5-8 mm | 5-8 mm |
| | N | N | N | N |
| BCB^+ | 6000 | 11600 | 6000 | 7000 |
| BCB^- | 4000 | 7000 | 4000 | 6500 |

Die Anteile apoptotischer Zellen (Cumulus- und Granulosazellen) der BCB^+ und BCB^- Gruppe aus Follikeln mit 3-5 mm und 5-8 mm Durchmesser ist in Abbildung 4.12 veranschaulicht.

Die Cumuluszellen zeigten keine Unterschiede bezüglich der Apoptoseraten zwischen den beiden BCB-Gruppen (3-5 mm, BCB^+ : 4,9% bzw. BCB^- : 4,4%; 5-8 mm, BCB^+ : 8,1% bzw. BCB^- : 7,2%). Mit Zunahme der Follikelgröße stieg die Apoptoserate der Cumuluszellen an. Diese Zunahme wies keine Signifikanz auf.

BCB^+ Granulosazellen besaßen in beiden Follikelgrößen einen signifikant ($p < 0,05$) höheren Anteil apoptotischer Zellen (3-5 mm: 17,0%; 5-8 mm: 14,7%) gegenüber BCB^- Granulosazellen (3-5 mm: 10,9%; 5-8 mm: 11,1%).

Zwischen den Cumulus- und Granulosazellen innerhalb einer BCB-Gruppe unterschieden sich die Apoptoseraten ebenfalls signifikant ($p < 0,05$) voneinander.

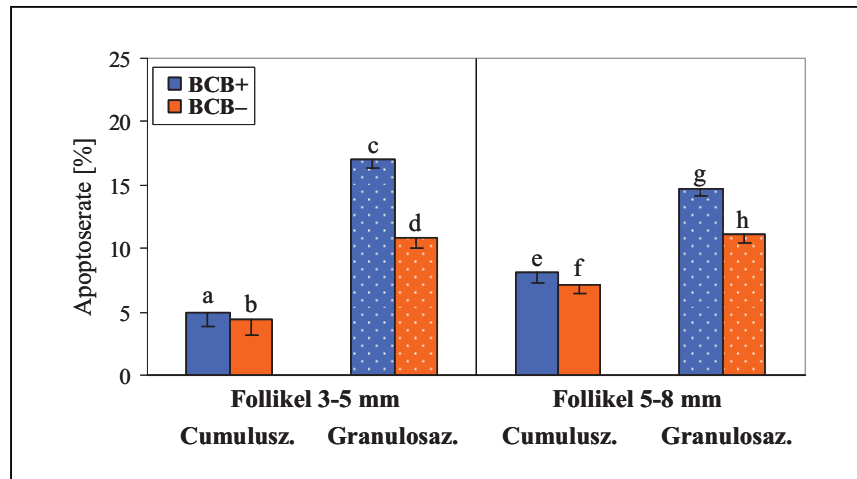


Abb. 4.12: Apoptoserate (LSM \pm SEM in %) von Cumulus- und Granulosazellen verschiedener BCB-Gruppen (BCB⁺, BCB⁻) aus Follikeln mit einem Durchmesser von 3-5 mm und 5-8 mm, analysiert mittels TUNEL-Färbung. a:c, b:d, c:d, e:g, f:h, g:h, p<0,05

4.7. Genexpressionsanalysen

Microarray

Von jeder Probe wurden drei biologische Replikate auf dem Array hybridisiert.

Die quantitative Beurteilung der Genexpression erfolgte über den Fold Change (FC). Bei positiven FC ist die Genexpression in der BCB⁺-Gruppe höher, bei negativen FC ist sie niedriger als in der BCB⁻-Gruppe.

In den Abbildungen 4.13 und 9.1 (Anhang) sind die Genexpressionsmuster zwischen den BCB-Gruppen der Oozyten, Cumulus- bzw. Granulosazellen als Heatmap veranschaulicht. Gleiche FC-Werte wurden durch gleiche Farben dargestellt.

Insgesamt waren 208 Gene zwischen BCB⁺ und BCB⁻ Oozyten differentiell exprimiert. Davon waren 144 in BCB⁺ Oozyten hochreguliert und 64 herunterreguliert.

In Cumuluszellen aus 3-5 mm großen Follikeln waren 34 Gene unterschiedlich exprimiert, von denen 16 in der Gruppe BCB⁺ stärker und 18 geringer exprimiert waren. Mit Zunahme der Follikelgröße auf 5-8 mm stieg die Zahl differentiell exprimierter Gene zwischen den Gruppen BCB⁺ und BCB⁻ auf 2247 an. Hier waren in BCB⁺ Cumuluszellen 1364 Gene höher und 883 Gene geringer exprimiert.

In Granulosazellen war ebenfalls ein Anstieg der differentiell regulierten Gene mit größerem Follikeldurchmesser zu beobachten. Die Anzahl nahm von 37 (14 hoch und 23 herunterreguliert in BCB⁺) auf 1763 Gene (477 hoch und 1286 herunterreguliert in BCB⁺) zu.

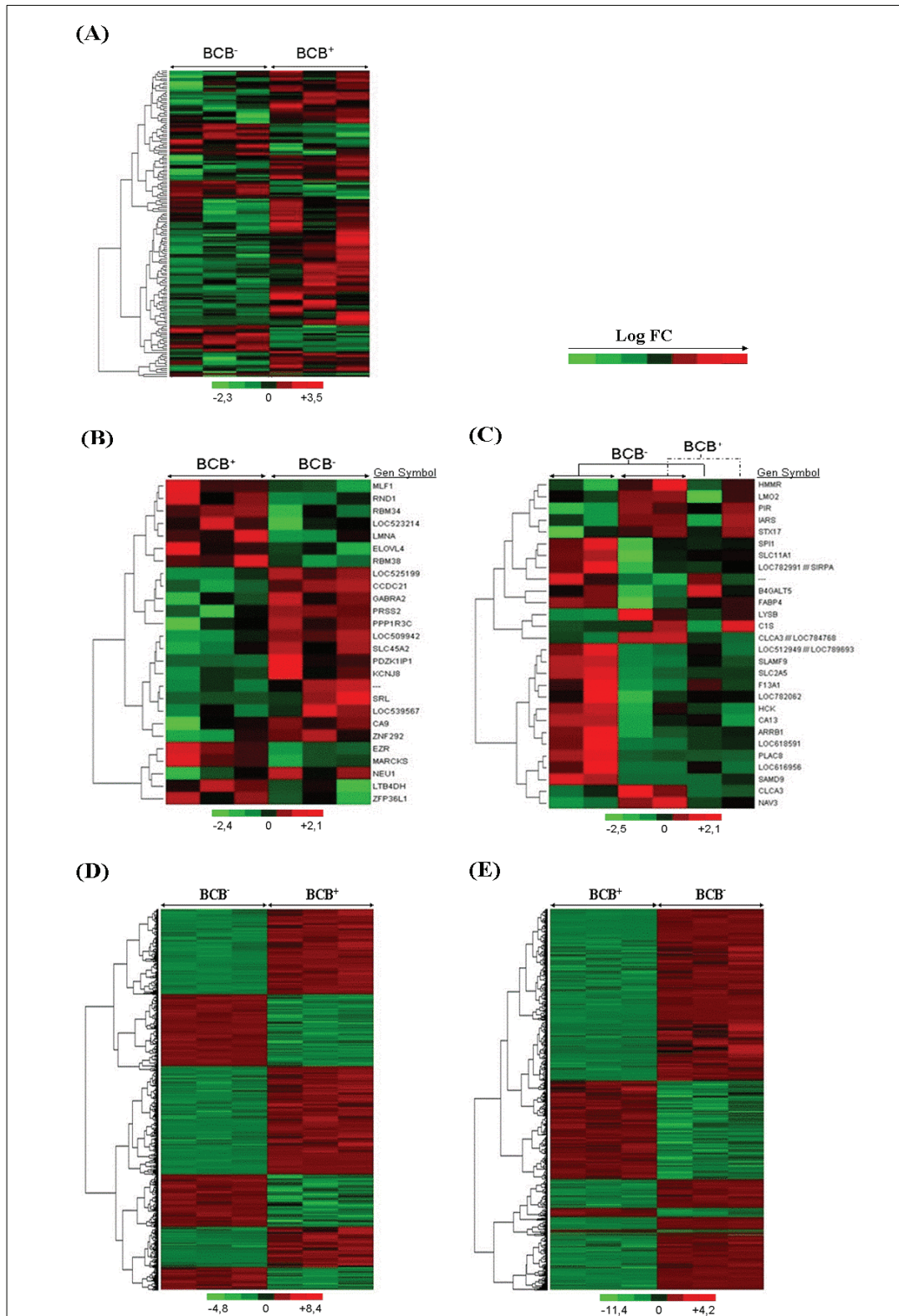


Abb. 4.13: Heatmap und Cluster differentiell exprimierter Gene in BCB⁺ und BCB⁻ Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen aus Follikeln mit Ø 3-5 mm (A-C) und Ø 8-5 mm (D,E). Rote Blöcke entsprechen stärker exprimierten Genen und grüne Blöcke schwächer exprimierten Genen in BCB⁺ Gruppen. A, Oozyten ; B, Cumuluszellen; C, Granulosazellen; D, Cumuluszellen; E, Granulosazellen.
 $p < 0,05$, $FDR < 0,3$, $FC \geq 2$

In Abbildung 4.14 sind die biologischen Prozesse, an denen die größte Anzahl der in BCB^+ und BCB^- Oozyten unterschiedlich regulierten Gene beteiligt sind, dargestellt. Die Cumulus- und Granulosazellen betreffenden biologischen Prozesse befinden sich im Anhang (Abbildung 9.2).

Es ist zu erkennen, dass mit dem Follikeldurchmesser die Anzahl der differentiell regulierten Gene in den jeweiligen GeneOntology-Kategorien stieg. In den BCB^+ -Klassen waren vorwiegend Gene exprimiert, die metabolischen Prozessen, Transport-Prozessen, dem Immunsystem (Stimuliantwort) und der Lokalisation zugehörig waren. In Oozyten und Cumuluszellen kam im Vergleich zu den Granulosazellen eine erhöhte Expression von an den mit Zellkommunikation beteiligten Gene vor. In BCB^+ Cumuluszellen (Follikel: \emptyset 3-5 mm) sind zusätzlich Gene (RND1, EZR) aufgetreten, die für die Aktinfilamentorganisation verantwortlich sind. In BCB^+ Granulosazellen aus 3-5 mm Follikeln war das Gen LYSB (Zellwandabbau-Prozesse) hyperexprimiert.

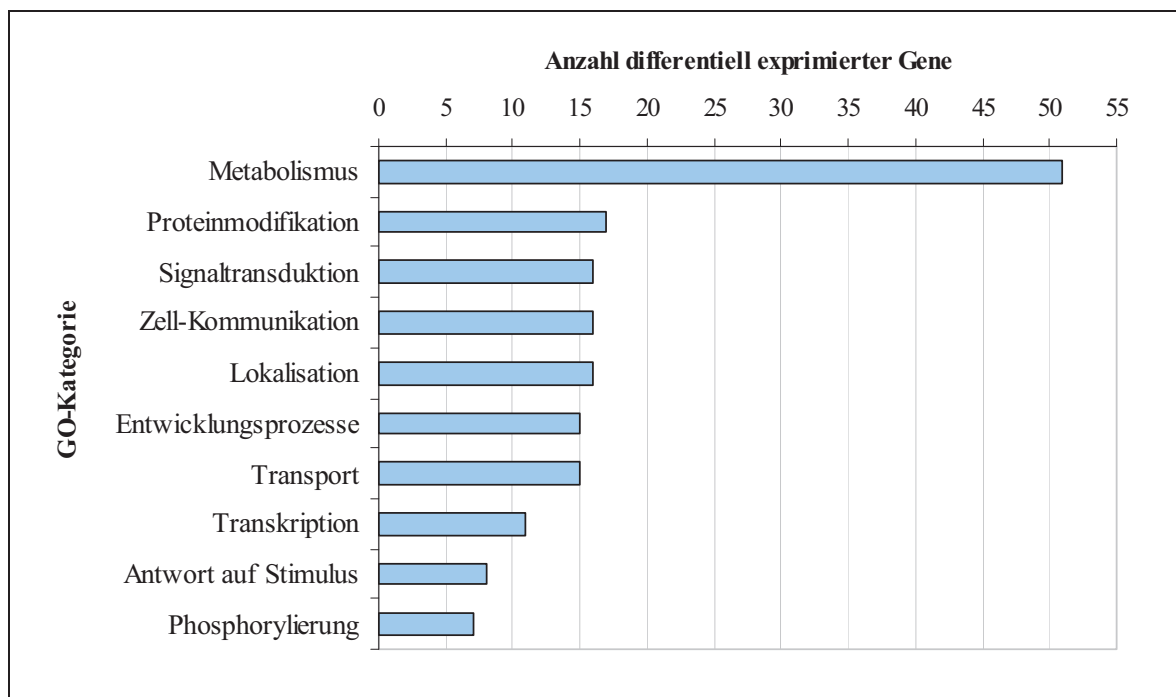


Abb. 4.14: Einteilung differentiell exprimierter Gene zwischen BCB^+ und BCB^- Oozyten hinsichtlich der biologischen Prozesse mittels GeneOntology (GO) Analyse (<http://www.geneontology.org>).

In Tabelle 4.11 sind ein Teil der in entwicklungscompetenten Oozyten und deren Cumulus- und Granulosazellen stärker exprimierten, entwicklungsrelevanten Gene und deren biologische Funktion aufgeführt.

Tabelle 4.11: Stärker exprimierte Gene in BCB+ Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen.

| | Gensymbol | Gename | Genbank-Nr. | biologische Funktion |
|--------------------------|-----------|---|-------------|--------------------------------------|
| Follikel Ø 3-5 mm | | | | |
| Oozyten | | | | |
| | PRKCSH | protein kinase C substrat 80K-H | NM_176662.1 | Transkription |
| | EIF3F | eukaryotic translation initiation factor 3, subunit F | BF654474 | Translation |
| | GSTA1 | glutathion S-transferase A1 | U49179.1 | Schutz vor oxidativen Stress |
| | HMG2L1 | high-mobility Gruppe protein 2-like 1 | BI775845 | Chromatin-Umordnung |
| | MYST4 | MYST histon acetyltransferase (monocytic leukemia) 4 | BI975522 | Gametenentwicklung |
| | ART3 | ADP-ribosyltransferase 3 | BM256348 | Proteinmodifikation |
| Cumuluszellen | | | | |
| | RND1 | Rho family GTPase 1 | CK772321 | Organisation von Aktinfilamenten |
| | EZR | ezrin | NM_174217.1 | Zell-Adhesion |
| | MARCKS | myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate | CF767596 | Aktinzytoskelett |
| Granulosazellen | | | | |
| | HMMR | hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM) | CK955661 | Hyaluronsäurebindung |
| | STX17 | syntaxin 17 | CK772059 | T transport |
| | C1S | complement component 1, s subcomponent | CK954619 | Immunantwort |
| | CLCA3 | chloride channel, calcium activated, family member 3 | AF001263.1 | T transport |
| Follikel Ø 5-8 mm | | | | |
| Cumuluszellen | | | | |
| | TLR2 | toll-like receptor 2 | NM_174197.2 | Immunantwort |
| | CD9 | CD9 molecule | NM_173900.2 | Zell-Adhesion, Spermienrezeptor |
| | STAR | steroidogenic acute regulatory protein | NM_174189.2 | Steroidgenese |
| | AREG | amphiregulin | CK947057 | Zellproliferation |
| Granulosazellen | | | | |
| | ADAM23 | ADAM metallopeptidase domain 23 | CK770316 | Zell-Zell-Interaktion, Fertilisation |
| | CYP19 | cytochrome P450, family XIX (conversion of androgen to estrogen), aromatase | U18447.1 | Steroidgenese |
| | IL6R | interleukin 6 receptor | CK774531 | Immunantwort |
| | PGR | progesterone receptor | CK983148 | Progesteronrezeptor |

p<0,05, FDR=0,3, FC>2

In BCB⁺ Oozyten war die Expression von Genen, die für die zytoplasmatische und nukleäre Reifung von Bedeutung sind, höher. In BCB⁺ Cumulus- und Granulosazellen wurden Gene stärker exprimiert, die an der Cumulus-Expansion, Ovulation und Fertilisation beteiligt sind.

qRT-PCR

Die Validierung der Microarray-Analyse mittels qRT-PCR ist in Abbildung 4.15 dargestellt. Die ausgewählten Kandidatengene zeigten, bis auf SLC45A2 und CA8, stärkere bzw. schwächere Expression (BCB⁺ zu BCB⁻), wie sie auch in der Microarray-Analyse bestimmt wurden. Insgesamt waren die mit der qRT-PCR gemessenen FC geringer als die mit Microarray ermittelten Werte. Für CYP19, DDIT3, PLAC8, SLC2A5, ARRB1 und FSHR lagen die Werte über denen mit Microarray gemessenen.

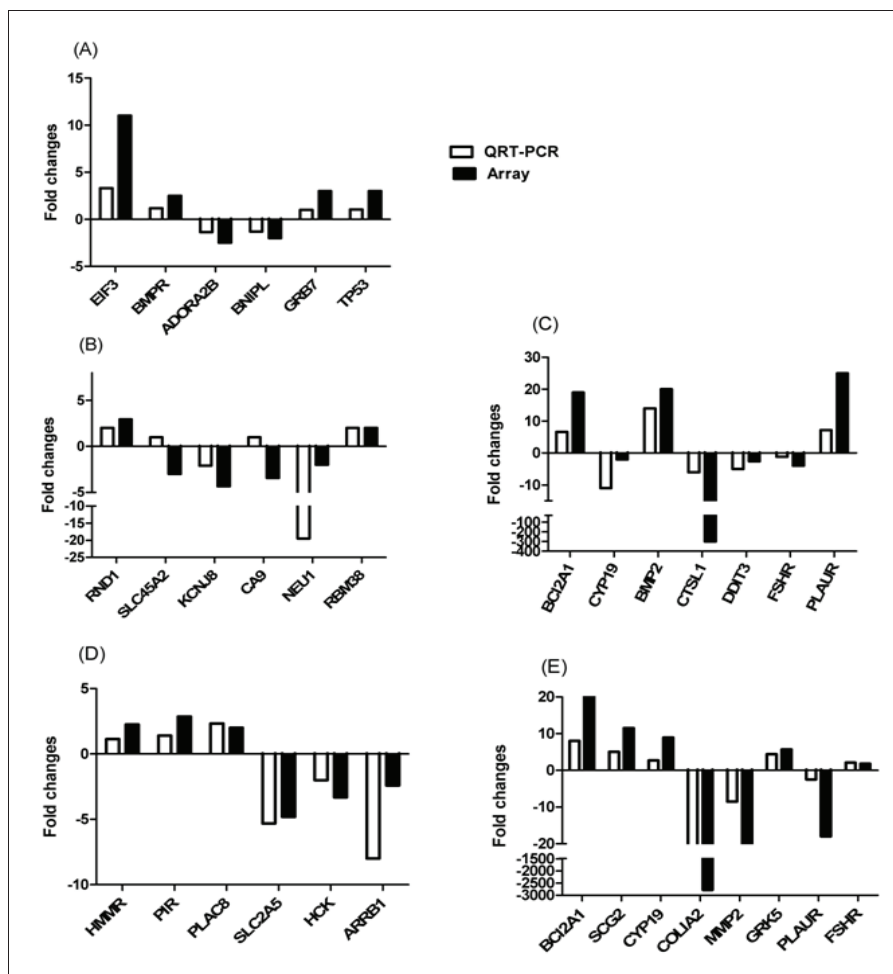


Abb. 4.15: Validierung differenziell exprimierter Gene mittels qRT-PCR.

A, Oozyten (Follikeln Ø 3-5 mm); **B**, Cumuluszellen (Follikeln Ø 3-5 mm); **C**, Cumuluszellen (Follikeln Ø 5-8 mm); **D**, Granulosazellen (Follikeln Ø 3-5 mm); **E**, Granulosazellen (Follikeln Ø 5-8 mm).

5. Diskussion

Am Beginn der Untersuchungen erfolgte die Charakterisierung different entwicklungscompetenter boviner Oozyten hinsichtlich der Verteilung und Intensität der Mitochondrien und der Konfiguration des Chromatins. Zusätzlich wurden das Auftreten und die Aktivität zweier ausgewählter Proteinkinasen (Akt, MAPK) und der Caspase-3 in den Oozyten und deren zugehörigen Cumulus- und Granulosazellen bestimmt. Der Schwerpunkt der Arbeit lag in der Untersuchung des Apoptosestatus der Cumulus- und Granulosazellen. Weiterhin wurde das Genexpressionsmuster zwischen Oozyten unterschiedlicher Entwicklungscompetenz und deren zugehörigen Cumulus- und Granulosazellen verglichen.

Die Grundlage der Untersuchung bildete die Einteilung von Oozyten hinsichtlich der Aktivität des Enzyms Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH). Die Unterschiede in der Entwicklungscompetenz von Oozyten lassen sich auf das noch nicht vollständig beendete Wachstum zurückführen, für das die G6PDH-Aktivität als Marker dient (WASSARMAN, 1988). Der Nachweis aktiver G6PDH mittels Brilliant-Cresylblau-Färbung konnte in der vorliegenden Arbeit als Selektionskriterium für entwicklungscompetente Oozyten (BCB^+) und Oozyten mit einer verringerten Entwicklungscompetenz (BCB^-) genutzt werden. Damit ließen sich vorangegangene Untersuchungen bestätigen, die ebenfalls die BCB-Färbung zur Einteilung boviner Oozyten nach ihrer Entwicklungscompetenz verwendeten (ALM *et al.*, 2005; BHOJWANI *et al.*, 2007; TORNER *et al.*, 2008).

Die positive Differenz in der Blastozystenrate von BCB^+ zu BCB^- Oozyten war in der vorliegenden Arbeit geringer (ca. 12%; Tabelle 4.2) als in den vergleichbaren Untersuchungen (ALM *et al.*, 2005: 30%; BHOJWANI *et al.*, 2007: 35%, TORNER *et al.*, 2008: 20%). Den Studien war gemeinsam, dass kompakte Cumulus-Oozyten-Komplexe (COKs) genutzt wurden. Jedoch gab es keine Angabe zur Follikelgröße, aus denen die Oozyten gewonnen wurden. Es ist bekannt, dass die Entwicklungscompetenz von Oozyten positiv mit der Follikelgröße korreliert (PAVLOK *et al.*, 1992; BLONDIN UND SIRARD, 1995). Daher ist anzunehmen, dass die verwendeten Oozyten aus einer nicht so eng begrenzten Follikelpopulation (3-8mm) wie in der vorliegenden Untersuchung (3-5 mm) stammten.

5.1. Aggregation und Aktivität der Mitochondrien in ungereiften Oozyten

Den Mitochondrien kommt im zellulären Energiemetabolismus eine wichtige Bedeutung zu. Die Hauptfunktion der Mitochondrien ist die Generierung von ATP über die oxidative Phosphorylierung sowie die Calciumspeicherung (KRISHER, 2004). Die Energie in Form von ATP bildet die Grundlage für eine erfolgreiche Maturation, Fertilisation und embryonale Entwicklung der Oozyte (CUMMINS, 2004; AU *et al.*, 2005). Die Mitochondrien besitzen somit eine wichtige Funktion im Erwerb der Oozytenkompetenz.

Weiterhin spielen die Mitochondrien eine große Rolle im apoptotischen Geschehen, da sie an der Auslösung des intrinsischen Apoptosesignalweges beteiligt sind.

TARAZONA *et al.* (2006) stellten fest, dass es zwischen unreifen und reifen bovinen Oozyten Unterschiede in der mitochondrialen Verteilung gibt. Aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass es während der zytoplasmatischen Reifung der Oozyte zu Veränderungen in der mitochondrialen Verteilung von feinkörnig homogen über grobkörnig heterogen bis hin zu kristallin kommt (TORNER *et al.*, 2004; OTZDORFF, 2006). Dies ist zurückzuführen auf den sich ändernden Bedarf an ATP innerhalb der Zelle (TORNER *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Analyse der Verteilung und Aktivität der Mitochondrien in ungereiften bovinen Oozyten mit unterschiedlicher Entwicklungskompetenz. Die mitochondriale Aggregation wurde unterteilt in feinkörnig, grobkörnig und kristallin.

Zwischen dem Auftreten der unterschiedlichen Aggregationsformen konnten keine Unterschiede zwischen den BCB-Gruppen beobachtet werden (Tabelle 4.3). Die feinkörnige Form lag in beiden Oozytengruppen am häufigsten vor.

Diese Feststellung stimmt mit anderen Untersuchungen von Oozyten überein, die im Germinalvesikel-Stadium (GV) eine feinkörnig homogene Verteilung der Mitochondrien aufwiesen (Maus: NISHI *et al.*, 2003, Schwein: TORNER *et al.*, 2004; Rind: OTZDORFF, 2006).

Hohe Level mitochondrialer Aktivität sind besonders für ATP-abhängige Reifungsprozesse notwendig. Dazu gehören die Kernreifung, die Umordnung des Zytoskeletts, die Speicherung von mRNA für die frühe Embryonalentwicklung und die Proteinsynthese (KRISHER *et al.*, 1998; STOJKOVIC *et al.*, 2001; TARAZONA *et al.*, 2006). Der Gehalt an ATP-Molekülen in morphologisch kompetenten Oozyten ist nach der IVM erhöht (STOJKOVIC *et al.*, 2001). ATP kann demnach als Marker für die Ausreifung boviner Oozyten genutzt werden.

Es gibt jedoch widersprüchliche Aussagen darüber, wie die Effizienz der respiratorischen Aktivität mit der Entwicklungskompetenz der Oozyte korreliert. Während WILDING *et al.*

(2001), STOJKOVIC *et al.* (2001), TORNER *et al.* (2004), OTZDORFF (2006), TARAZONA *et al.* (2006) und NAGANO *et al.* (2006) einen positiven Zusammenhang zwischen beiden feststellten, konnte in anderen Analysen keine Korrelation zwischen dem ATP-Gehalt der Oozyte und der Entwicklungskompetenz nachgewiesen werden (VAN BLERKOM *et al.*, 2000; FERREIRA *et al.*, 2009).

Interessanterweise zeigten die entwicklungs kompetenten Oozyten (BCB⁺) in der vorgelegten Arbeit eine signifikant höhere mitochondriale Aktivität im Vergleich zur BCB⁻-Gruppe (Tab. 4.4). Die Entwicklungskompetenz korrelierte also positiv mit der respiratorischen Aktivität.

Es wird angenommen, dass die mitochondriale Aktivität in Oozyten an Transportprozessen und der Umwandlung von Energie beteiligt ist. Eine sinkende Aktivität führt somit zu einer mitochondrialen Dysfunktion und daraus resultierend zum Block der ATP-Synthese (WANG *et al.*, 2009). Aufgrund dessen steht ein niedriger ATP-Gehalt in Oozyten mit einer reduzierten Entwicklungskompetenz im Zusammenhang (KEEFE *et al.*, 1995; BARNETT *et al.*, 1997; VAN BLERKOM *et al.*, 1998; VAN BLERKOM *et al.*, 2004; GHANEM, 2009).

Wie auch schon bei OTZDORFF (2006) konnten in der vorliegenden Untersuchung keine Unterschiede zwischen den mitochondrialen Aktivitäten der feinkörnigen, der grobkörnigen und der kristallinen Aggregation nachgewiesen werden (Abbildung 4.3). In Oozyten des Schweins konnte dagegen eine Zunahme der Aktivität bei grobkörniger mitochondrialer Aggregation und bei Anordnung der Mitochondrien in Clustern beobachtet werden (TORNER *et al.*, 2004).

Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass entwicklungs kompetente Oozyten vor der finalen Reifung durch eine hohe respiratorische Aktivität, aber nicht durch eine fortgeschrittene Umverteilung der Mitochondrien charakterisiert sind.

5.2. Chromatinkonfiguration in ungereiften Oozyten

In verschiedenen Spezies konnte gezeigt werden, dass die Chromatinkonfiguration des Germinalvesikels (GV) mit der Entwicklungsfähigkeit von Oozyten korreliert. Bisher waren jedoch nur speziesspezifische Vorhersagen, die auf der Konfiguration des Chromatins basieren, für die Reifung von Oozyten möglich (SUN *et al.*, 2009). Die Umwandlung von Chromatin in der Oozytenentwicklung spiegelt den Übergang von der transkriptionellen Aktivität in der immaturren Oozyte mit dekodensiertem, transkriptionell aktivem Chromatin

zum Ende der Oogenese mit kondensiertem, transkriptionell inaktivem Chromatin wider. Viele Studien zeigen, dass diese Modifikation mit dem Erwerb der meiotischen Kompetenz zusammenfällt (LIU UND AOKI, 2002; HINRICHS *et al.*, 2005; LODDE *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2009)

In BCB^+ Oozyten der vorliegenden Untersuchung war der Anteil von Chromatin im fibrillären Diplotän größer als in BCB^- Oozyten, bei denen prozentual häufiger das diffuse Diplotän vorlag (Tabelle 4.5). Wird das diffuse und fibrilläre Diplotän zur Konfiguration Diplotän zusammengefasst, so entfällt der signifikante Unterschied zwischen den beiden BCB -Gruppen. Darüberhinaus war das Diakinese-Stadium in der BCB^+ -Gruppe stärker vertreten als in der BCB^- -Gruppe. Im Gegensatz dazu besaßen die BCB^- Oozyten einen höheren Anteil kondensiertes Chromatin.

Diese Ergebnisse stimmen mit der Untersuchung von BCB -selektierten kompakten COKs des Rindes überein, bei der Oozyten mit verbesserter Entwicklungskompetenz am häufigsten das Diakinese-Stadium aufwiesen (TORNER *et al.*, 2008). Im Unterschied dazu enthielten die BCB^- Oozyten verstärkt Chromatin im Diplotänstadium. OTZDORFF (2006) konnte ebenfalls beobachten, dass ungeriffe Oozyten sich überwiegend im Diplotän bzw. in der Diakinese befanden.

In bovinen Oozyten deutet eine diffuse Chromatinkonfiguration auf ein ungenügendes Fortschreiten zur Metaphase II hin und nur Oozyten mit kondensiertem Chromatin besitzen eine vollständige meiotische Kompetenz (LODDE *et al.*, 2007). Da in Oozyten mit erhöhter Entwicklungskompetenz weniger diffuses Diplotän vorlag, sind diese durch eine frühere Wiederaufnahme der Meiose gekennzeichnet. Unterstützt wird diese Annahme zusätzlich durch den höheren Gehalt des Diakinese-Stadium, welches auf einen bereits vollzogenen GVBD hinweist.

Für die Spindelformation und Chromosomenanordnung während der Meiose sind Proteinkinasen verantwortlich (EICHENLAUB-RITTER, 1998), deren Aktivitäten mit Proteinphosphorylierungen korrelierten. Als Phosphatdonor dient für diese Prozesse Adenosintriphosphat (ATP). Die BCB^+ Oozyten weisen eine erhöhte respiratorische Aktivität auf, wodurch ihnen mehr ATP für die Wiederaufnahme der Meiose zur Verfügung steht. In entwicklungs kompetenteren Oozyten wirkt sich demnach die erhöhte Intensität der Mitochondrien auf die zytoplasmatische als auch auf die meiotische Reifung vorteilhaft aus. Ebenso ist es möglich, dass der Vorgang der Apoptose als ein Energie verbrauchender Prozess das gebildete ATP benötigt.

5.3. Proteinkinasen

Die Proteinkinasen Akt und MAPK sind an der zellulären Proliferation und Differenzierung beteiligt. In Oozyten steht die MAPK-Aktivität im Zusammenhang mit der Wiederaufnahme der Meiose (DUPRE *et al.*, 2002). Die Proteinkinase Akt ist in Oozyten ebenfalls an der meiotischen Reifung beteiligt (CHIAN *et al.*, 2003; TOMEK UND SMILJAKOVIC, 2005).

Für Cumulus- und Granulosazellen liegen bisher kaum Untersuchungen hinsichtlich der beiden Proteinkinasen in Abhängigkeit vom Entwicklungspotential der zugehörigen Oozyte vor. Es wird lediglich in Granulosazellen der Maus die MAPK mit der Cumulusexpansion in Verbindung gebracht (SU *et al.*, 2003).

Die MAPK konnte in dieser Untersuchung als aktive Form in ungereiften Oozyten und den zugehörigen Cumulus- und Granulosazellen nachgewiesen werden. Weiterhin trat in den Cumulus- und Granulosazellen die phosphorylierte Form der Proteinkinase Akt auf. Zwischen den BCB-Gruppen gab es jedoch keine Unterschiede in der Aktivität der Proteinkinasen (Tabelle 4.6 und 4.7).

In den Oozyten war es nicht möglich die phosphorylierte Form der Akt-Proteinkinase zu detektieren. Bisher konnte für die Akt-Proteinkinase ungereifter Oozyten eine basale Phosphorylierung nachgewiesen werden (MELO STERZA, 2003, TOMEK UND SMILJAKOVIC, 2005; TORNER *et al.*, 2008; KALOUS *et al.*, 2009), die während des GVBD ein Maximum erreichte (TOMEK UND SMILJAKOVIC, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde die Phosphorylierung der Proteinkinase Akt an Ser473 untersucht. Dies steht im Gegensatz zu den erwähnten Analysen, die zusätzlich die Phosphorylierung an Thr308 einbezogen. Möglicherweise resultiert daraus der fehlende Nachweis der phosphorylierten Proteinkinase. Im Widerspruch zu den vorliegenden Ergebnissen wurde bisher in ungereiften bovinen Oozyten nur eine geringe Aktivität der MAPK festgestellt (TOMEK *et al.*, 2002; TORNER *et al.*, 2008), die bis zur Metaphase II maximal anstieg.

Die Granulosazellen zeigten eine fast doppelt so hohe Aktivität der MAPK gegenüber der Proteinkinase Akt (Abbildung 4.7). Interessanterweise kehrte sich das Verhältnis der Aktivitäten in den Cumuluszellen um. Die Ursache dafür liegt möglicherweise in der pro-(MAPK) bzw. antiapoptotischen (Akt) Wirkung der Proteinkinasen (BACHELDER *et al.*, 1999; DEGTEREV *et al.*, 2003, AMARAVADI *et al.*, 2005). Eine Bestätigung dafür ist auch die

Apoptoserate, die in den Granulosazellen, gemessen am Auftreten spätapoptotischer DNA-Strangbrüche, ebenfalls höher war als in den Cumuluszellen.

Die Aktivitäten der Proteinkinasen in den Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen aus unterschiedlichen BCB-Gruppen waren in den eigenen Untersuchungen nicht signifikant voneinander verschieden. Sie kommen somit als Indikatoren der Entwicklungskompetenz zunächst nicht in Betracht.

5.4. Charakterisierung der Granulosazellpopulation

Studien, die Untersuchungen an frisch gewonnenen Granulosazellen der Follikelflüssigkeit durchführen, haben bisher die Charakterisierung der verwendeten Zellpopulation vernachlässigt (ZEUNER *et al.*, 2003; FENG *et al.*, 2007; LINGENFELTER *et al.*, 2008).

Um einen möglichen Einfluss der Zeit zwischen Gewinnung und Apoptosedetektion auf die Zellqualität zu ermitteln, wurde der Zellzyklus von Granulosazellen überprüft. Mit der Durchflusszytometrie ist es möglich in den Granulosazellen Atresie nachzuweisen. Die apoptotischen Zellen sind im Vergleich zu den normal vitalen Zellen durch einen verringerten DNA-Gehalt gekennzeichnet und werden als sogenannte sub-G1-Population im Histogramm der Zellzyklusanalyse dargestellt (BLONDIN *et al.*, 1996).

In der vorliegenden Untersuchung blieb die Verteilung der einzelnen Zyklusstadien über die Zeit gleich (Abbildung 4.8). Die Dauer der BCB-Färbung der Oozyten besaß demnach keinen Einfluß auf den Zellzyklus und die Apoptoserate. Auf die Zellqualität wirkt sich nach bisherigen Erkenntnissen nur eine verlängerte Lagerung postmortem negativ aus. Granulosazellen der Ratte zeigten beispielsweise erst nach 16 h ein spontanes Auftreten der Apoptose gemessen an den DNA-Fragmentierungen (TILLY *et al.*, 1991).

Aus den Ergebnissen des Nachweises CD11b-positiver Zellen wird ersichtlich (Tabelle. 4.8), dass beide BCB-Gruppen der Granulosazellen zu gleichen Anteilen Immunzellen enthielten. Diese können verschiedenen Ursprungs sein. Einerseits kann die Follikelaspiration zur COK-Gewinnung Verletzungen an umgebenen Blutgefäßen verursachen. Diese Zellen werden dann in die Analyse miteinbezogen. Andererseits gehören auch die Makrophagen zu den Immunzellen. Diese sind in der Follikelflüssigkeit vorhanden, um Zellen durch Phagozytose zu eliminieren. Dieser Prozess tritt ein, wenn beispielsweise apoptotische Zellen aus dem System beseitigt werden sollen.

Die eigenen Untersuchungen zur Charakterisierung der verwendeten Granulosazellpopulation ermöglichten eine verbesserte Identifikation und Definierung des Untersuchungsmaterials, als es in anderen Studien möglich war (ZEUNER *et al.*, 2003; LINGENFELTER *et al.*, 2008).

5.5. Untersuchungen zu apoptotischen Veränderungen

Die Untersuchungen zur Apoptose und deren Einfluss auf die Oozytenqualität besitzt eine zunehmende Bedeutung für *In-Vitro*-Techniken, bei denen eine heterogene Oozytenpopulation genutzt wird. Das Auftreten von Apoptose in Cumulus- und Granulosazellen könnte dabei als guter Marker der Entwicklungskompetenz von Oozyten dienen, da zwischen den Kompartimenten eine bidirektionale Kommunikation besteht.

5.5.1. Apoptose in Cumulus- und Granulosazellen

Für Cumuluszellen konnte bereits nachgewiesen werden, dass sie eine wichtige Rolle in der Regulation der Oozytenreifung (TANGHE *et al.*, 2002) und zum Schutz der Oozyte vor oxidativem Stress spielen (TATEMOTO *et al.*, 2000). Faktoren, die die Cumulusmorphologie betreffen, wurden schon reichlich für die Oozytenselektion untersucht (BLONDIN UND SIRARD, 1995; YUAN *et al.*, 2005). Die Untersuchungen zum Einfluss von Cumuluszellen auf die Entwicklungskompetenz von Oozyten führten bisher aber zu widersprüchlichen Ergebnissen. Einerseits führten COKs mit morphologischen Anzeichen einer frühen Atresie zu einer höheren Blastozystenrate (BLONDIN UND SIRARD, 1995; BONI *et al.*, 2002; NICHOLAS *et al.*, 2005; DE WIT *et al.*, 2000). Andererseits wurde eine negative (HOST *et al.*, 2000; YUAN *et al.*, 2005) oder gar keine Korrelation beobachtet (BILODEAU-GOESELS UND PANICH, 2002).

Für die Zelltypen des bovinen Ovars sind die Ergebnisse aus Untersuchungen zur Abhängigkeit der Oozytenkompetenz vom Apoptosestatus der Cumulus- und Granulosazellen bisher unvollständig. Zusätzlich enthielten diese viele Widersprüche. Häufig wird das Vorhandensein TUNEL positiver Granulosazellen zur Identifikation atretischer Follikel verwendet (ISOBE UND YOSHIMURA, 2000; FERANIL *et al.*, 2005). Andere Arbeiten nutzten dagegen die Caspase-3-Aktivität in Granulosazellen als Kennzeichen der folliculären Atresie (BOONE *et al.*, 1998, FENWICK UND HURST, 2002; NICHOLAS *et al.*, 2005).

Deshalb war es in der vorliegenden Arbeit wichtig, das Auftreten von Apoptose in den Cumulus- und Granulosazellen durch verschiedene Methoden zu bestimmen. Dies waren: (I) der Nachweis der Caspase-3-Aktivität, um die Apoptoseinitiation zu detektieren; (II) die

Annexin-V-Färbung, um früh apoptotische Zellen mit Verlust der Membranasymmetrie nachzuweisen und (III) die TUNEL-Färbung, um Zellen mit fragmentierter DNA im späten Stadium der Apoptose zu identifizieren. Dadurch ist abgesichert, dass ein breites und zeitlich definiertes Spektrum apoptotischer Veränderungen erfasst werden konnte.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Entwicklungskompetenz boviner Oozyten durch einen leichten Anstieg apoptotischer Granulosazellen im Follikel und einer höheren Aktivität des Enzyms Caspase-3 in den Granulosazellen positiv beeinflusst wurde. Die Cumuluszellen von Oozyten mit erhöhter Entwicklungskompetenz zeichnen sich ebenfalls durch eine verstärkte Caspase-3-Aktivität, jedoch nicht durch eine erhöhte manifestierte Apoptose aus. Ein geringer Level an apoptotischen Granulosazellen scheint demnach positiv auf die Entwicklungskompetenz von Oozyten zu wirken. Es wird angenommen, dass die Oozyte mit Beendigung ihres Wachstums und der RNA-Synthese vor der finalen Reifung ein Stadium der sogenannten Prämaturation durchlaufen muss. Diese Prämaturation findet *in vivo* während der präovulatorischen Entwicklung statt. In kleinen Follikeln ist es jedoch möglich, dass diese prämaturationsähnlichen Veränderungen durch folliculäre Atresie induziert werden (HENDRIKSEN *et al.*, 2000).

Moderate apoptotische Veränderungen im Follikel scheinen somit die prämaturationsähnlichen Veränderungen der Oozyte zu unterstützen, wohingegen Oozyten nichtatretischer Follikel in ihrer Reifung blockiert werden (HENDRIKSEN *et al.*, 2000; ZEUNER *et al.*, 2003). ZEUNER *et al.* (2003) stellten fest, dass stets ein gewisser Grad an apoptotischen Zellen im Follikel vorkommt. So trat selbst in gesunden Follikeln Apoptose von Granulosa- und Cumuluszellen auf (Rind. BLONDIN UND SIRAD, 1995; YANG UND RAJAMAHENDRAN, 2000; ZEUNER *et al.*, 2003). Wird aber eine bestimmte Schwelle apoptotischer Zellen überschritten, kommt es zur Beeinflussung der Lebensfähigkeit der Oozyte (ZEUNER *et al.*, 2003). Ein Apoptosegrad der Granulosazellen von 5-15% wirkte sich bei Ziegen beispielsweise auf die Entwicklungsrate positiv aus, während eine höhere oder geringere Apoptoserate einen negativen Effekt auf die Entwicklungskompetenz besaß (HAN *et al.*, 2006). FENG *et al.* (2007) beobachteten beim Rind ebenfalls, dass eine Apoptoseanteil der Granulosazellen von 10-40% die Blastozystenrate positiv beeinflusst. Bei Cumuluszellen wirkte sich ein Atresiegrad von mehr als 10% negativ auf die Blastozystenrate aus (Ziege; ANGUITA *et al.*, 2009).

In anderen Untersuchungen wird beschrieben, dass eine erhöhte Apoptoserate von Cumuluszellen einen negativen Einfluß auf die Entwicklungsfähigkeit der Oozyte besitzt (HOST *et al.*, 2000; ZEUNER *et al.*, 2003; YUAN *et al.*, 2005; FENG *et al.*, 2007). Die Ergebnisse ließen sich in den eigenen Untersuchungen nicht bestätigen, da in den

Cumuluszellen different entwicklungscompetenter Oozyten keine Unterschiede in der Apoptoserate auftreten. Oozyten mit erhöhter Blastozystenrate zeigten sogar in ihren zugehörigen Cumuluszellen einen Anstieg in der Caspase-3-Aktivität und damit einen Beginn der frühen Apoptoseinitiation.

Insgesamt konnte bei der Betrachtung der apoptotischen Veränderungen festgestellt werden, dass der Anteil apoptotischer Zellen bei den Granulosazellen höher war als bei den Cumuluszellen. Weiterhin trat wie auch schon bei ALM *et al.* (2000) eine positive Korrelation zwischen der Apoptoserate der Cumuluszellen und der Follikelgröße auf. Die Ursache für beide Beobachtungen liegt darin, dass die Follikelatresie in den Granulosazellen beginnt und sich erst sehr spät über die Cumuluszellen zur Oozyte fortsetzt (MANABE *et al.*, 2004). Die Oozyten geben weiterhin antiapoptotische Faktoren (BMP) an die Cumuluszellen ab (HUSSEIN *et al.*, 2005), wodurch in den Cumuluszellen die Atresie erst später auftritt als in den Granulosazellen.

Aus den vorliegenden Ergebnissen wird weiterhin deutlich, dass es zu Differenzen zwischen den mit der Annexin-V- und TUNEL-Methode bestimmten Apoptosegraden und der Aktivität von Caspase-3 kam. Ein Grund dafür ist, dass die Methoden verschiedene Aspekte des apoptotischen Prozesses widerspiegeln. Möglicherweise ist die Anzahl Annexin-V und TUNEL positiver Zellen geringer, da viele Zellen mit aktiver Caspase-3 durch Phagozytose entfernt werden, bevor DNA-Fragmentierungen auftreten (D'HAESSELEER *et al.*, 2006). Zusätzlich ist die Caspase-3 an der Prozessierung einer Vielzahl von Substraten mit unterschiedlicher Funktion beteiligt. Aufgrund dessen resultiert die Aktivität des Enzyms nicht ausschließlich in DNA-Fragmentierungen. In diesem Zusammenhang wäre es hilfreich zu überprüfen, ob die aktive Caspase-3 zur Spaltung von Zielproteinen führt, die die DNA-Struktur beeinflussen. Geeignet wäre dafür das Protein Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP), welches für die Reparatur von DNA-Schäden verantwortlich ist und durch Spaltung inaktiviert wird. Weiterhin sollte die Aktivität des Proteins CAD (Caspase-aktivierte DNase) analysiert werden, das am DNA-Abbau beteiligt ist (NAGATA, 2000). Dieses liegt gebunden an einem Inhibitor (ICAD) vor und wird durch die aktive Caspase-3 abgespalten.

Die Granulosa- und Cumuluszellen besitzen eine große Bedeutung für die Aufrechterhaltung des meiotischen Arrests von Oozyten (BALL *et al.*, 1983; THIBAUT *et al.*, 1987). MAYES UND SIRARD (2001) begründeten eine frühere Aufnahme der Meiose mit der Herkunft der Oozyte aus Follikeln mit atretischen Veränderungen. Durch die Aufhebung der Zellkontakte aufgrund von Apoptose wird die meiotische Inhibierung aufgehoben.

Dies wird durch die eigenen Untersuchungen bestätigt, in der die Oozyten der apoptotisch intensiveren BCB⁺-Gruppe die meiotische Reifung früher begannen als in der BCB⁻-Gruppe.

5.5.2. Aktivität der Caspase-3 in Oozyten

In früheren Arbeiten gelang es bisher nicht, in bovinen Oozyten zu Beginn der Reifung die aktive Form der Caspase-3 nachzuweisen (YUAN *et al.*, 2004; YUAN *et al.*, 2005). Es konnten lediglich nach Annexin-V- oder TUNEL-Färbung apoptotische Veränderungen in ungereiften bovinen Oozyten festgestellt werden (MATWEE *et al.*, 2000; WARZYCH *et al.*, 2006; ANGUITA *et al.*, 2007).

Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Untersuchung in den Oozyten die aktive Form von Caspase-3 detektiert werden. In den Oozyten mit erhöhter Entwicklungskompetenz verdoppelte sich die Aktivität des Enzyms im Vergleich zu Oozyten mit verringerter Entwicklungskompetenz.

In Mausovarien wurde gezeigt, dass die Follikelatresie begleitet ist durch eine Hochregulation der Caspase-3-Aktivität in den Oozyten (FENWICK UND HURST, 2002). Die Atresie in der Oozyte selbst scheint demnach nicht unbedingt abträglich auf die Oozyte zu wirken und unterstützt sogar den Erwerb der Entwicklungskompetenz (BLONDIN UND SIRARD, 1995). Die These wird spezifiziert durch ANGUITA *et al.* (2007). Sie zeigten, dass nur spätapoptotische DNA-Fragmentierungen in bovinen Oozyten einen negativen Einfluss auf die Blastozystenrate besitzen.

Zusammenhang zwischen mitochondrialer Aktivität und Aktivität der Caspase-3 in Oozyten

Die respiratorische Aktivität von Mitochondrien ist neben der Produktion von ATP mit der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verbunden. Etwa 1% des mitochondrialen Elektronenflusses führt in der oxidativen Phosphorylierung zur Bildung von Superoxidanionen (DEROUET-HÜMBERT, 2007). Als Hauptursache dafür wird das Entweichen von Elektronen aus den Elektronentransportketten angesehen. Eine Überproduktion von ROS oder ein Defizit von Antioxidantien, z.B. der reduzierten Form des Glutathion (GSH), resultiert in einer Zellschädigung und wird oxidativer Stress genannt (DEROUET-HÜMBERT, 2007, LIVINGSTON *et al.*, 2009). Eine fehlende Detoxifikation der ROS führt daher zur Apoptose.

Die Generierung des GSH hängt vom Vorkommen des Nikotin-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) ab, welches im Pentose-Phosphat-Zyklus durch das Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) gebildet wird (LEOPOLD UND LOSCALZO, 2000; DIAZ-FLORES *et al.*,

2006; Ortega-Camarillo *et al.*, 2009). Die G6PDH stellt somit ein Zellschutzenzym vor oxidativem Stress und DNA-Schädigung dar (LOPES *et al.*, 2007).

Die Mitochondrien sind nach zellulärem Stress in der Lage über Freisetzung proapoptotischer Faktoren (z.B. Cytochrom C) die Apoptose auszulösen. Das apoptotische Signal wird letztlich auf eine Effektorcaspase übertragen. Als Schlüsselenzym in der Apoptoseinitiation wird dabei die Caspase-3 angesehen.

Als Marker für die G6PDH-Aktivität wurde in der vorgelegten Untersuchung die BCB-Färbung genutzt. Oozyten mit einer geringen G6PDH-Aktivität (BCB^+) zeigten neben einer erhöhten respiratorischen Aktivität der Mitochondrien auch eine verstärkte Aktivität des Enzyms Caspase-3. Oozyten, die ihr Wachstum beendet haben (BCB^+) generieren somit weniger antioxidativ wirkendes GSH als wachsende Oozyten (BCB^-). Verbunden mit einer intensiveren respiratorischen Aktivität kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen ROS und Antioxidans auf die Seite der ROS. Daraus resultierte die verstärkte Caspase-3-Aktivität in den BCB^+ Oozyten. Das GSH wirkt möglicherweise als Inhibitor, wogegen ROS als Auslöser der Eizellreifung wirkt. In Oozyten der Ratte konnte bereits gezeigt werden, dass Antioxidanzien die spontane Wiederaufnahme der Meiose inhibierten (TAKAMI *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu induzierten ROS die Eizellreifung in den Follikeln.

5.6. Genexpressionsanalysen

Schon geringe Veränderungen auf Ebene der RNA können die Entwicklungskompetenz von Oozyten beeinflussen (DONNISON UND PFEFFER, 2004). Aufgrund dessen wurden Transkriptionsanalysen durchgeführt, um Gentranskripte zu ermitteln, die möglicherweise mit der Entwicklungskompetenz von Oozyten assoziiert sind.

Um die differentiell exprimierten Gene von entwicklungs kompetenten (BCB^+) und nicht entwicklungs kompetenten Oozyten (BCB^-), sowie von deren zugehörigen Cumulus- und Granulosazellen zu identifizieren, wurde ein cDNA Microarray (Affymetrix GeneChip Bovine Genome Array) genutzt. Danach erfolgte die Einteilung der analysierten Gene in die biologischen Prozesse oder Signalwege, in die sie involviert sind. Die Charakterisierung dieser Signalwege trägt dazu bei, in den umgebenen Cumulus- und Granulosazellen molekulare Marker der Oozytenqualität zu identifizieren.

Genexpression ungereifter Oozyten

Die Erlangung der Entwicklungskompetenz von Oozyten basiert u.a. auf einem hohen Gehalt an RNA und einer zeitlich differenzierten Proteinsynthese (EICHENLAUB-RITTER UND PESCHKE, 2002). Die maternale mRNA wird in der Oogenese als inaktive Form gespeichert und zu definierten Zeitpunkten in der Oozytenreifung oder frühen Embryogenese rekrutiert (BACHVAROVA, 1992, GHANEM, 2009). Zum Zeitpunkt des GVBD sind die Oozyten durch einen Anstieg der Transkription bzw. der Proteinbiosynthese gekennzeichnet (HYTTEL *et al.*, 2001; RODRIGUEZ UND FARIN, 2004; PACZKOWSKI UND KRISHER, 2010).

Die Oozyten mit einer erhöhten Entwicklungskompetenz zeigten in der vorliegenden Untersuchung eine verstärkte Aktivierung von Genen, die an der Regulation der Transkription (PRKCSH), der Translation (EIF3F) und der Proteinmodifikation (ART3) beteiligt sind. Bei ihnen ist demnach im Vergleich zu BCB⁻ Oozyten eine verstärkte Proteinbiosynthese ermöglicht.

Das Ergebnis wird unterstützt durch Studien, die für BCB⁺ Oozyten einen Anstieg in der Transkription und Proteinexpression nachweisen konnten (TATEMOTO UND HORIUCHI, 1995; SPIKINGS *et al.*, 2007, TORNER *et al.*, 2008). OPIELA *et al.* (2008) nehmen an, dass mit Beendigung des Oozytenwachstums bereits eine vollständige Translationsmaschinerie vorhanden ist, wodurch die BCB⁺ Oozyten schneller in ihrer Proteinsynthese reagieren können. Damit sind sie eher in der Lage ihre finale Reifung aufzunehmen und zu vollenden.

Das Gen HMG2L1 war in BCB⁺ Oozyten ebenfalls stärker exprimiert. Für Proteine der HMGN2 Gruppe wurde beschrieben, dass sie in der Kernreifung von Oozyten für eine erfolgreiche Umwandlung des Chromatins verantwortlich sind (BASTOS *et al.*, 2008; KANKA *et al.*, 2009).

Oozyten mit erhöhter Entwicklungskompetenz enthielten auch verstärkt das Transkript MYST4, das für die Gameten- und Embryoentwicklung von Bedeutung ist (MC GRAW *et al.*, 2007).

Weiterhin sind in BCB⁺ Oozyten verstärkt aktive Gene vorhanden gewesen, die an Transportprozessen beteiligt sind wie z.B. die ATPase ABCA4. Wie bereits gezeigt, besitzen diese Oozyten eine erhöhte respiratorische Aktivität. WANG *et al.* (2009) vermuten, dass eine ansteigende mitochondriale Aktivität in den Oozyten für eine Zunahme der Transportprozesse verantwortlich ist. Die BCB⁺ Oozyten aus den eigenen Untersuchungen versuchen dem oxidativen Stress, der aus der hohen Aktivität der Mitochondrien resultiert, durch die Expression der antioxidativ wirkenden Glutathion-S-Transferase (GSTA1) entgegenzuwirken.

In Oozyten konnten bereits antioxidative Enzyme als Marker der zytoplasmatischen Ausreifung identifiziert werden (EL MOUATASSIM *et al.*, 1999). Die in den eigenen Untersuchungen nachgewiesene Expression von GSTA1, ist dafür ebenfalls ein Indiz.

Gene mit Bedeutung für apoptotische Veränderungen zeigten in unterschiedlich entwicklungscompetenten Oozyten keine differentielle Expression. Es besteht die Vermutung, dass die erhöhte Aktivität von Caspase-3 in BCB⁺ Oozyten nicht zwangsläufig zum Ablauf des apoptotischen Prozesses führen muss. Die Apoptoseinitiation ist eventuell an diesem Punkt noch reversibel.

Andererseits wurde in der BCB⁺-Gruppe eine verstärkte Transkription der Polymerase PARP12 festgestellt. Dieses Enzym ist für die Reparatur von DNA-Schäden notwendig. Die Oozyten reagieren anscheinend auf die verstärkte Apoptoseinitiation, die durch die Caspase-3 oder durch den bereits erwähnten erhöhten oxidativen Stress verursacht wird, indem sie dem Zelluntergang entgegenwirken. Interessant wäre zu untersuchen, ob es in den BCB⁺ Oozyten zum Anstieg spätapoptotischer Veränderungen kommt. Ist dies der Fall, so scheint die Apoptose positiv auf die Entwicklungskompetenz der Oozyte zu wirken. Zeigen die Apoptoseraten von den Oozyten beider BCB-Gruppen keine Unterschiede, so ist es möglich, dass durch die Caspase-3 ein Signalweg aktiviert wird, der sich positiv auf die Erwerb der Entwicklungskompetenz der Oozyte auswirkt.

Genexpression in Cumulus- und Granulosazellen

Der Anstieg differentiell exprimierter Gene mit der Follikelgröße (Abb. 4.13) veranschaulicht die zunehmende Differenzierung der Cumulus- und Granulosazellen in der Follikulogenese und Oogenese.

Die Ovulation stellt einen komplexen Prozess dar, der mit dem präovulatorischen LH-Anstieg ausgelöst wird. Er ist charakterisiert durch die Expansion des Cumulus und der Freisetzung einer reifen Oozyte (HERNANDEZ-GONZALES *et al.*, 2006). Die Cumulus- und Granulosazellen von Oozyten mit erhöhter Entwicklungskompetenz waren durch eine verstärkte Transkription der Gene STAR, ADAM und AREG gekennzeichnet. Für diese konnte gezeigt werden, dass sie für Follikel im Stadium der Ovulation charakteristisch sind und die Reifung der Oozyte unterstützen (HERNANDEZ-GONZALES *et al.*, 2006; FEUERSTEIN *et al.*, 2007; YAMASHITA *et al.*, 2009).

Es ist ebenfalls von Bedeutung, dass die Oozyte während der Reifung von den umgebenen Zellen mit Nährstoffen und Energie versorgt wird. Dies wird deutlich in der starken Regulation von Transportprozessen zwischen den einzelnen Kompartimenten der BCB-

Gruppen. In BCB⁺ Granulosazellen gehören dazu Gene, die an der Bildung eines Chlorid-Kanals (CLCA3) und am intrazellulären Proteintransport (STX17) beteiligt sind.

Zu den in den Cumuluszellen exprimierten Faktoren, die an der Fertilisation der Oozyte beteiligt sind, gehören Spermienrezeptoren (CD9; ZHOU *et al.*, 2009) und Faktoren für die Exozytose kortikaler Granula (MARCKS; ELIYAHU *et al.*, 2005). Letztere tragen gemeinsam mit ADAM, AREG und HMMR zur Bildung und Stabilisierung einer extrazellulären Hyaluronsäure haltigen Matrix bei. Die Ablagerung der extrazellulären Matrix wird durch das Zytoskelett der Cumuluszellen beeinflusst (SUTOVSKY *et al.*, 1995, OTZDORFF, 2007). RND1 und MARCKS, die verstärkt aktiviert in der BCB⁺-Gruppe nachgewiesen wurden, spielen dabei eine wichtige Rolle, da sie mit der Organisation von Aktinfilamenten in Zusammenhang stehen.

Die aus der Matrixbildung resultierende Cumulusexpansion führt zur Lockerung der Verbindungen zwischen der Oozyte und ihren zugehörigen Cumulus- und Granulosazellen. Auch aus den Genexpressionsanalysen ist erkennbar, dass der durch die Cumulus- und Granulosazellen aufrecht erhaltene meiotische Arrest in BCB⁺ Oozyten früher aufgehoben wird.

Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Cumulus- und Granulosazellen der BCB⁺-Gruppe eine Genexpression zeigten, die die Oozyte in ihrer meiotischen und zytoplasmatischen Reifung unterstützt.

Die Steroidgenese scheint ebenfalls einen Einfluß auf die Entwicklungskompetenz von Oozyten zu besitzen. In der BCB⁺-Gruppe waren Gene verstärkt aktiv, die in diesem Signalweg involviert sind (STAR, CYP19). BAO *et al.* (1997) stellte fest, dass CYP19 in Granulosazellen des dominanten Follikels hochreguliert wird. Es kann somit als ein folliculärer Marker für die Entwicklungskompetenz der Oozyte genutzt werden. Die Granulosazellen exprimierten ebenfalls verstärkt den Progesteronrezeptor PGR, für den angenommen wird, dass er mit der Ovulation assoziiert ist (PARK UND MAYO, 1991; SRIRAMAN *et al.*, 2003; RICHARDS, 2007).

Die Zellabwehr stellt in der vorliegenden Untersuchung einen der hauptsächlich differentiell regulierten Prozesse zwischen den BCB-Gruppen der Cumulus- und Granulosazellen dar. Wie auch schon in anderen Arbeiten (RICHARDS, 2007; ASSIDI *et al.*, 2008) beschrieben, wurden in der BCB⁺-Gruppe verstärkt Gene transkribiert, die für Immunzell-abhängige Prozesse verantwortlich sind (CD9, TLR). Es wird angenommen, dass die inflammatorischen Faktoren

Effekte auf die Cumulusexpansion, die Ovulation, den Transport und die Fertilisation ausüben (LIU *et al.*, 2008).

Im Auftreten apoptotisch relevanter Gene konnten in der vorliegenden Arbeit nur geringe Unterschiede zwischen den BCB-Gruppen festgestellt werden. In BCB⁻ Granulosazellen ist nur der Gehalt an mRNA des antiapoptotischen Bcl-2A1 erhöht. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass diese auch eine geringere Apoptoserate (TUNEL) aufwiesen. In den BCB⁻ Cumuluszellen zeigten PRSS2 und PPP1R3C eine Hochregulation. Sie sind beteiligt an der Apoptose von Cumuluszellen, die einen negativen Einfluss auf die Entwicklungskompetenz der Oozyte besitzen (BETTEGOWDA *et al.*, 2008). In BCB⁻ Cumuluszellen konnte in der vorliegenden Untersuchung jedoch keine erhöhte Apoptoserate beobachtet werden.

Bislang existieren differente Meinungen darüber, ob die Expression von apoptotisch bedeutsamen Genen überhaupt eine Aussagekraft für die Apoptosedetektion besitzt. OPIELA *et al.* (2008) untersuchten hierzu den Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Bax und Bcl-2 auf Gen- bzw. Proteinebene. Sie stellten fest, dass die auf Proteinebene gefundenen signifikanten Unterschiede auf der Transkriptionsebene geringer waren. VANDAELE *et al.* (2008) konnten die Expression von Bax, Bcl-2 und Caspase-3 ebenfalls nicht als Kriterium in der Apoptosedetektion nutzen.

Demnach scheint es wichtig zu sein, das Auftreten apoptotisch relevanter Gene in die Genexpressionsstudien miteinzubeziehen und deren Expression auf Proteinebene weiter zu untersuchen.

6. Zusammenfassung

Charakterisierung different entwicklungscompetenter boviner Oozyten und deren umgebenen Follikelzellen

Die Zielstellung der vorliegenden Untersuchung bestand in der Charakterisierung der folliculären Umgebung entwicklungscompetenter boviner Oozyten vor ihrer finalen Reifung. Es wurde überprüft, ob different entwicklungscompetente Oozyten Unterschiede in Bezug auf den Apoptosestatus oder die Genexpression in ihren umgebenen Cumuluszellen und Granulosazellen aufweisen.

Für die Untersuchung wurden Oozyten verwendet, die in ihrem Zytoplasma- und Cumuluszustand keine morphologischen Unterschiede aufwiesen. Sie wurden aus Follikeln definierter Größe (3-5 mm, 5-8 mm) gewonnen. Die differente Entwicklungscompetenz der Oozyten beruht demnach auf Unterschieden in der subzellulären Ebene der Oozyten oder ihrer umgebenen Follikelzellen. Aufgrund dessen war es von Bedeutung, wodurch diese beeinflusst wird. Es sollten physiologische und molekulare Parameter gefunden werden, die sich zur Selektion entwicklungscompetenter Oozyten aus einer heterogenen Population eignen.

Die Klassifikation der Oozyten nach Brilliant-Cresylblau-Färbung in Oozyten mit verringerter G6PDH-Aktivität (BCB^+) und Oozyten mit erhöhter G6PDH-Aktivität (BCB^-) konnte als Kriterium für die Entwicklungscompetenz genutzt werden. BCB^- Oozyten zeigten eine verringerte Blastozystenrate im Vergleich zu BCB^+ Oozyten (7,4% vs. 19,3%).

Für den Parameter Verteilung der Mitochondrien in den Oozyten konnte kein Zusammenhang mit der Entwicklungscompetenz nachgewiesen werden. In beiden Oozyten-Klassen lag überwiegend eine fein homogene mitochondriale Verteilung vor (BCB^+ : 78,5%; BCB^- : 70,9%). Im Gegensatz dazu wurde eine positive Korrelation der Entwicklungscompetenz mit der respiratorischen Aktivität von Mitochondrien festgestellt. Diese war in entwicklungscompetenten Oozyten signifikant höher als in BCB^- Oozyten. Die BCB^+ Oozyten zeigten demnach eine erhöhte ATP-Produktion, die sowohl für Reifungsprozesse der Oozyte als auch für den energieabhängigen Prozess der Apoptose benötigt wird.

Zwischen den different entwicklungscompetenten Oozyten zeigten sich nur geringe Unterschiede in der Chromatinkonfiguration. Annähernd die Hälfte der Oozyten befand sich im Germinalvesikel-Stadium. Die Oozyten mit erhöhter Entwicklungscompetenz lagen

vergleichsweise stärker im Stadium der Diakinese und des fibrillären Diplotänstadiums vor (65,1%), während Oozyten mit verringerter Entwicklungskompetenz stärker kondensiertes Chromatin (35,0%) aufwiesen. In beiden Oozytengruppen fand demnach eine Wiederaufnahme der meiotischen Reifung statt, die in den entwicklungs kompetenten Oozyten schon fortgeschrittener war.

Im Auftreten und der Phosphorylierung der Proteinkinasen Akt und MAPK konnte kein Einfluss auf die Entwicklungskompetenz der Oozyte beobachtet werden. Die Proteinkinasen zeigten zwischen den BCB-Gruppen der Oozyten, Cumulus- und Granulosazellen keine Unterschiede in ihren Aktivitäten.

Bei der Initiation der Apoptose besitzt die Caspase-3 eine besondere Bedeutung. Das Enzym wird dabei als sogenanntes Schlüsselenzym angesehen. Zwischen unterschiedlich entwicklungs kompetenten Oozyten und deren zugehörigen Cumulus- und Granulosazellen kommt es zu Veränderungen in der Aktivität des Enzyms. Die aktive Form der Caspase-3 trat in entwicklungs kompetenten Oozyten und deren zugehörigen Cumulus- und Granulosazellen verstärkt auf. Inwieweit diese Zunahme für apoptotische Veränderungen verantwortlich ist, bedarf weiterer Analysen.

Es konnte jedoch auch in Granulosazellen entwicklungs kompetenter Oozyten ein signifikant leichter Anstieg (6%) spätapoptotischer Veränderungen nachgewiesen werden. Der Apoptosestatus von Granulosazellen eignete sich demnach als Marker für die Entwicklungskompetenz der korrespondierenden Oozyte. Im Gegensatz dazu ließ sich für den Apoptosegrad von Cumuluszellen kein Einfluss auf die Entwicklungskompetenz feststellen.

Zwischen den differenten BCB-Gruppen der Oozyten und der Follikelzellen ließen sich deutliche Unterschiede im Genexpressionsmuster nachweisen. In entwicklungs kompetenten Oozyten waren die Gene stärker aktiv, die für die Proteinbiosynthese und somit für die zytoplasmatische bzw. nukleäre Reifung von Bedeutung sind. In den Cumulus- und Granulosazellen der entwicklungs kompetenten Oozyten waren dagegen Gene verstärkt transkribiert, die für Follikel im Stadium der Ovulation charakteristisch sind. Als Marker für die Entwicklungskompetenz der Oozyte scheinen dabei in den Cumuluszellen AREG und in den Granulosazellen ADAM gut geeignet zu sein. Weiterhin waren Gene hochreguliert, die für die Trennung von Zell-Zell-Kontakten verantwortlich sind. Daraus könnte eine frühere Aufhebung des meiotischen Arrests in Oozyten mit erhöhter Entwicklungskompetenz resultieren.

Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass in der Oozyte und den zugehörigen Cumulus- und Granulosazellen eine Vielzahl von Faktoren den Erwerb der Entwicklungskompetenz beeinflusst. Das folliculäre Milieu einer entwicklungs kompetenten Oozyte ist durch einen leichten Anstieg apoptotischer Vorgänge charakterisiert. Die spezifische Genregulation bei entwicklungs kompetenten Oozyten und deren umgebenen folliculären Zellen bietet günstige Voraussetzungen für weiterführende Untersuchungen zur Definierung molekularer Marker mit prospektiver Bedeutung für die Oozytenqualität.

7. Summary

Characterization of different developmental competent bovine oocytes and their surrounding follicle cells

The aim of the present investigation was the characterization of the follicular surroundings of developmental competent bovine oocytes before their final maturation. It was examined whether different developmental competent oocytes show differences concerning the status of apoptosis or the gene expression in their surrounding cumulus and granulosa cells.

For the investigation oocytes were used which showed no morphological differences in the status of the cytoplasm and cumulus. They were recovered from follicles of defined sizes (3- 5 mm, 5-8 mm). Therefore, the different developmental competence of the oocytes is based on differences in the subcellular level of the oocytes or their surrounding follicle cells. On account of that it was relevant by which it was influenced. The physiological and molecular parameters which can be suitable for the selection of developmental competent oocytes from a heterogeneous population should be found.

The classification of the oocytes after brilliant cresyl blue staining in oocytes with decreased G6PDH activity (BCB^+) and oocytes with increased G6PDH activity (BCB^-) was used as a criterion of the developmental competence. BCB^- oocytes showed a reduced blastocyst rate in comparison to BCB^+ oocytes (7.4% vs. 19.3%).

For the parameter distribution of the mitochondria in the oocytes no correlation with the developmental competence could be proved. In both groups of oocytes a homogeneous mitochondrial distribution was mainly found (BCB^+ : 78.5%; BCB^- : 70.9%). In contrast, a positive correlation of the developmental competence with the respiratory activity of the mitochondria was established. This was significantly higher in developmental competent oocytes than in BCB^- oocytes. Therefore, the BCB^+ oocytes showed an increased ATP production which is required for maturation processes of the oocyte as well as for the energy-dependent process of apoptosis.

Between the different developmental competent oocytes only slightly differences appeared in the configuration of the chromatin. Approximately half of the oocytes were in the germinal vesicle stage. The oocytes with increased developmental competence were present mainly in the stage of the diakinesis and fibrillar diplotene stage (65.1%), while oocytes with decreased developmental competence showed more condensed chromatin (35.0%). Therefore, in both

groups of oocytes a resumption of the meiotic maturation took place which was quite advanced in the developmental competent oocytes.

The appearance and the phosphorylation of the protein kinases Akt and MAPK did not influence the developmental competence of the oocyte. The protein kinases showed no differences in their activities between the BCB groups of the oocytes, cumulus and granulosa cells.

With the initiation of the apoptosis the Caspase-3 has a special meaning. The enzyme seems to be considered a so-called key enzyme. Changes in the activity of the enzyme occur between different developmental competent oocytes and their corresponding cumulus and granulosa cells. The active form of the Caspase-3 increased in developmental competent oocytes and their corresponding cumulus and granulosa cells. To what extent this increase is responsible for apoptotic changes, needs further analyses.

Nevertheless, a significantly light increase (6%) of late apoptotic changes could be also proved in granulosa cells of developmental competent oocytes. Therefore, the apoptotic status of granulosa cells was qualified as a marker for the developmental competence of the corresponding oocyte. In contrast, no influence on the developmental competence can be determined for the rate of apoptosis from cumulus cells.

Clear differences could be proved in the gene expression pattern between the oocytes and the follicle cells of the different BCB groups. In developmental competent oocytes genes were stronger active which are relevant to the proteinsynthesis and therefore for the cytoplasmic or nuclear maturation. In cumulus and granulosa cells of the developmental competent oocytes the genes were transcribed increasingly which are typical for follicles in the stage of the ovulation. It seems that AREG in the cumulus cells and ADAM in the granulosa cells can be suitable as markers for the developmental competence of the oocytes. Furthermore, genes which are responsible for the separation of cell-cell contacts were highly adjusted. This could result in an earlier resumption of meiosis in oocytes with increased developmental competence.

The obtained results show clearly that in the oocyte and the corresponding cumulus and granulosa cells a big number of factors influence the acquisition of the developmental competence. The follicular environment of a developmental competent oocyte is characterized by a slightly increase of apoptotic processes. The specific gene regulation in developmental competent oocytes and their surrounding follicular cells offers advantageous conditions for further investigations to define molecular marker with prospective meaning for the quality of the oocyte.

8. Literaturverzeichnis

ABASTADO, J.P. (1996): Apoptosis: Function and regulation of cell death. *Research in Immunology*, **147** (7): 443-456.

ADAMS, G.P. (1999): Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.*, **54**: 17-32.

ALM, H.; TORNER, H.; HELEIL, B.; SRSEN, V. & KUZMINA, T. (2000): Apoptosis and pyknosis in cumulus cells from bovine cumulus-oocyte complexes before and after maturation in vitro. *Theriogenology*, **53** (1): 447-447.

ALM, H.; TORNER, H.; LOHRKE, B.; VIERGUTZ, T.; GHONEIM, I.M. & KANITZ, W. (2005): Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology*, **63** (8): 2194-2205.

ALNEMRI, E.S.; LIVINGSTON, D.J.; NICHOLSON, D.W.; SALVESEN, G.; THORNBERRY, N.A.; WONG, W.W. & YUAN, J.Y. (1996): Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, **87** (2): 171-171.

AMARAVADI, R. & THOMPSON, C.B. (2005): The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets. *Journal of Clinical Investigation*, **115** (10): 2618-2624.

ANDERSON, P. (1997): Kinase cascades regulating entry into apoptosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **61** (1): 33-46.

ANGUITA, B.; VANDAELE, L.; MATEUSEN, B.; MAES, D. & VAN SOOM, A. (2007): Developmental competence of bovine oocytes is not related to apoptosis incidence in oocytes, cumulus cells and blastocysts. *Theriogenology*, **67** (3): 537-549.

ANGUITA, B.; PARAMIO, M.T.; MORATO, R.; ROMAGUERA, R.; JIMENEZ-MACEDO, A.R.; MOGAS, T. & IZQUIERDO, D. (2009): Effect of the apoptosis rate observed in oocytes and cumulus cells on embryo development in prepubertal goats. *Animal Reproduction Science*, **116**: 95-106.

ARENDS, M.J. & WYLLIE, A.H. (1991): Apoptosis - Mechanisms and roles in pathology. *International Review of Experimental Pathology*, **32**: 223-254.

ARLOTTO, T.; SCHWARTZ, J.L.; FIRST, N.L. & LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. (1996): Follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*, **45** (5): 943-956.

ASSEY, R.J.; HYTTEL, P.; GREVE, T. & PURWANTARA, B. (1994): Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Molecular Reproduction and Development*, **37** (3): 335-344.

ASSIDI, M.; DUFORT, I.; ALI, A.; HAMEL, M.; ALGRIANY, O.; DIELEMANN, S. & SIRARD, M.A. (2008): Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine cumulus cells matured with follicle-stimulating hormone and/or phorbol myristate acetate in vitro. *Biology of Reproduction*, **79** (2): 209-222.

- AU, H.K.; YEH, T.S.; KAO, S.H.; TZENG, C.R. & HSIEH, R.H. (2005): Abnormal mitochondrial structure in human unfertilized oocytes and arrested embryos. Role of the Mitochondria in Human Aging and Disease: from Genes to Cell Signaling, **1042**: 177-185.
- BACHELDER, R.E.; RIBICK, M.J.; MARCHETTI, A.; FALCIONI, R.; SODDU, S.; DAVIS, K.R. & MERCURIO, A.M. (1999): p53 inhibits alpha 6 beta 4 integrin survival signaling by promoting the caspase 3-dependent cleavage of AKT/PKB. *Journal of Cell Biology*, **147** (5): 1063-1072.
- BACHVAROVA, R.F. (1992): A maternal tail of poly(A) - the long and the short of it. *Cell*, **69** (6): 895-897.
- BAKER, T.G. (1972): Oogenesis and ovulation. In: *Reproduction in mammals*. Austin, C.R. & Short, R.V. Cambridge University Press, London, 14-45.
- BALL, G.D.; LEIBFRIED, M.L.; LENZ, R.W.; AX, R.L.; BAVISTER, B.D. & FIRST, N.L. (1983): Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Biology of Reproduction*, **28** (3): 717-725.
- BANNER, D.W.; DARCY, A.; JANES, W.; GENTZ, R.; SCHOENFELD, H.J.; BROGER, C.; LOETSCHER, H. & LESSLAUER, W. (1993): Crystal-structure of the soluble human 55 kd Tnf receptor-human Tnf-beta complex - Implications for Tnf receptor activation. *Cell*, **73** (3): 431-445.
- BAO, B.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; SALFEN, B.E. & YOUNGQUIST, R.S. (1997): Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450 side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biology of Reproduction*, **56** (5): 1158-1168.
- BARALDI, P.G.; BOVERO, A.; FRUTTAROLO, F.; PRETI, D.; TABRIZI, M.A.; PAVANI, M.G. & ROMAGNOLI, R. (2004): DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents. *Medicinal Research Reviews*, **24** (4): 475-528.
- BARNETT, D.K.; CLAYTON, M.K.; KIMURA, J. & BAVISTER, B.D. (1997): Glucose and phosphate toxicity in hamster preimplantation embryos involves disruption of cellular organization, including distribution of active mitochondria. *Molecular Reproduction and Development*, **48** (2): 227-237.
- BASTOS, G.M.; GONCALVES, P.B.D. & BORDIGNON, V. (2008): Immunolocalization of the high-mobility group N2 protein and acetylated histone H3K14 in early developing parthenogenetic bovine embryos derived from Oocytes of high and low developmental competence. *Molecular Reproduction and Development*, **75** (2): 282-290.
- BETTEGOWDA, A.; PATEL, O.V.; LEE, K.B.; PARK, K.E.; SALEM, M.; YAO, J.B.; IRELAND, J.J. & SMITH, G.W. (2008): Identification of novel bovine cumulus cell molecular markers predictive of oocyte competence: Functional and diagnostic implications. *Biology of Reproduction*, **79** (2): 301-309.
- BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; VANDENHURK, R. & IZADYAR, F. (1997): Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology*, **47** (1): 13-22.

- BHOJWANI, S.; ALM, H.; TORNER, H.; KANITZ, W. & POEHLAND, R. (2007): Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer. *Theriogenology*, **67** (2): 341-345.
- BILLIG, H.; FURUTA, I. & HSUEH, A.J.W. (1994): Gonadotropin-releasing-hormone directly induces apoptotic cell-death in the rat ovary - Biochemical and in-situ detection of deoxyribonucleic-acid fragmentation in granulosa-cells. *Endocrinology*, **134** (1): 245-252.
- BILODEAU-GOESEELS, S. & PANICH, P. (2002): Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, **71** (3-4): 143-155.
- BLONDIN, P. & SIRARD, M.A. (1995): Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, **41** (1): 54-62.
- BLONDIN, P.; DUFOUR, M. & SIRARD, M.A. (1996): Analysis of atresia in bovine follicles using different methods: Flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay, and classic histology. *Biology of Reproduction*, **54** (3): 631-637.
- BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUILBAULT, L.A. & SIRARD, M.A. (1997): In vitro production of bovine embryos: Developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology*, **47** (5): 1061-1075.
- BONI, R.; CUOMO, A. & TOSTI, E. (2002): Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. *Biology of Reproduction*, **66** (3): 836-842.
- BONNI, A.; BRUNET, A.; WEST, A.E.; DATTA, S.R.; TAKASU, M.A. & GREENBERG, M.E. (1999): Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science*, **286** (5443): 1358-1362.
- BOONE, D.L. & TSANG, B.K. (1998): Caspase-3 in the rat ovary: Localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. *Biology of Reproduction*, **58** (6): 1533-1539.
- BORNER, C. (2003): The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular Immunology*, **39** (11): 615-647.
- BROWER, P.T. & SCHULTZ, R.M. (1982): Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: existence and possible nutritional role during oocyte growth. *Developmental Biology*, **90** (1): 144-153.
- BRUNET, A.; BONNI, A.; ZIGMOND, M.J.; LIN, M.Z.; JUO, P.; HU, L.S.; ANDERSON, M.J.; ARDEN, K.C.; BLENIS, J. & GREENBERG, M.E. (1999): Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell*, **96** (6): 857-868.
- BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.C. & EPPIG, J.J. (1990): Interactions between somatic-cells and germ-cells throughout mammalian oogenesis. *Biology of Reproduction*, **43** (4): 543-547.
- CHEN, C.H.; WANG, W.J.; KUO, J.C.; TSAI, H.C.; LIN, J.R.; CHANG, Z.F. & CHEN, R.H. (2005): Bidirectional signals transduced by DAPK-ERK interaction promote the apoptotic effect of DAPK. *Embo Journal*, **24** (2): 294-304.

- CHIAN, R.C.; CHUNG, J.T.; NIWA, K.; SIRARD, M.A.; DOWNEY, B.R. & TAN, S.L. (2003): Reversible changes in protein phosphorylation during germinal vesicle breakdown and pronuclear formation in bovine oocytes in vitro. *Zygote*, **11** (2): 119-129.
- CHIARATTI, M.R.; BRESSAN, F.F.; FERREIRA, C.R.; CAETANO, A.R.; SMITH, L.C.; VERCESI, A.E. & MEIRELLES, F.V. (2010): Embryo mitochondrial DNA depletion is reversed during early embryogenesis in cattle. *Biology of Reproduction*, **82** (1): 76-85.
- CIKALA, M. (2005): Molekulare Analyse von Caspasen, AIF und PSR in Hydra zur Untersuchung der Evolution des programmierten Zelltods. Dissertation, Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- COHEN, G.M. (1997): Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*, **326**: 1-16.
- CORY, S. & ADAMS, J.M. (2002): The BCL2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, **2** (9): 647-656.
- CORY, S.; HUANG, D.C.S. & ADAMS, J.M. (2003): The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, **22** (53): 8590-8607.
- CROMPTON, M. (1999): The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochemical Journal*, **341**: 233-249.
- CUMMINS, J.M. (2004): The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, **115**: S23-S29.
- D'HAESELEER, A.; COCQUYT, G.; VAN CRUCHTEN, S.; SIMOENS, P. & VAN DEN BROECK, W. (2006): Cell-specific localisation of apoptosis in the bovine ovary at different stages of the oestrous cycle. *Theriogenology*, **65** (4): 757-772.
- DANIEL, P. (2002): Deregulation von Zellzyklus und Apoptose als molekulare Grundlage der Therapieresistenz von Tumoren. Dissertation: Medizinische Fakultät Charité der Humboldt-Universität, Berlin.
- DAUGAARD, M.; KIRKEGAARD-SORENSEN, T.; OSTENFELD, M.S.; AABOE, M.; HOYER-HANSEN, M.; ORNTOFT, T.F.; ROHDE, M. & JAATTELA, M. (2007): Lens epithelium-derived growth factor is an Hsp70-2 regulated guardian of lysosomal stability in human cancer. *Cancer Research*, **67** (6): 2559-2567.
- DE POL, A.; VACCINA, F.; FORABOSCO, A.; CAVAZZUTI, E. & MARZONA, L. (1997): Apoptosis of germ cells during human prenatal oogenesis. *Human Reproduction*, **12** (10): 2235-2241.
- DE WIT, A.A.C.; WURTH, Y.A. & KRUIP, T.A.M. (2000): Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *Journal of Animal Science*, **78** (5): 1277-1283.
- DE WIT, A.A.C. & KRUIP, T.A.M. (2001): Bovine cumulus-oocyte-complex-quality is reflected in sensitivity for alpha-amanitin, oocyte-diameter and developmental capacity. *Animal Reproduction Science*, **65** (1-2): 51-65.

- DEGTEREV, A.; BOYCE, M. & YUAN, J.Y. (2003): A decade of caspases. *Oncogene*, **22** (53): 8543-8567.
- DEL PESO, L.; GONZALEZ, V.M.; HERNANDEZ, R.; BARR, F.G. & NUNEZ, G. (1999): Regulation of the forkhead transcription factor FKHR, but not the PAX3-FKHR fusion protein, by the serine/threonine kinase Akt. *Oncogene*, **18** (51): 7328-7333.
- DENAULT, J.B. & SALVESEN, G.S. (2002): Caspases: Keys in the ignition of cell death. *Chemical Reviews*, **102** (12): 4489-4499.
- DEROUET-HÜMBERT, E. (2007): Apoptose-Induktion durch mitochondriale Ferredoxine. Dissertation, Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, Universität des Saarlandes.
- DIAZ-FLORES, M.; IBANEZ-HERNANDEZ, M.A.; GALVAN, R.E.; GUTIERREZ, M.; DURAN-REYES, G.; MEDINA-NAVARRO, R.; PASCOE-LIRA, D.; ORTEGA-CAMARILLO, C.; VILAR-ROJAS, C.; CRUZ, M. & BAIZA-GUTMAN, L.A. (2006): Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and NADPH/NADP(+) ratio in liver and pancreas are dependent on the severity of hyperglycemia in rat. *Life Sciences*, **78** (22): 2601-2607.
- DIELEMAN, S.J.; KRUIP, T.A.M.; FONTIJNE, P.; DEJONG, W.H.R. & VANDERWEYDEN, G.C. (1983): Changes in estradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of Luteinizing-Hormone. *Journal of Endocrinology*, **97** (1): 31-42.
- DIELEMAN, S.J.; HENDRIKSEN, P.J.; VIUFF, D.; THOMSEN, P.D.; HYTTEL, P.; KNIJN, H.M.; WRENZYCKI, C.; KRUIP, T.A.; NIEMANN, H.; GADELLA, B.M.; BEVERS, M.M. & VOS, P.L. (2002): Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology*, **57** (1): 5-20.
- DONEPUDI, M. & GRUTTER, M.G. (2002): Structure and zymogen activation of caspases. *Biophysical Chemistry*, **101**: 145-153.
- DONNISON, M. & PFEFFER, P.L. (2004): Isolation of genes associated with developmentally competent bovine oocytes and quantitation of their levels during development. *Biology of Reproduction*, **71** (6): 1813-1821.
- DRIANCOURT, M.A.; WEBB, R. & FRY, R.C. (1991): Does follicular dominance occur in ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, **93** (1): 63-70.
- DUPRE, A.; JESSUS, C.; OZON, R. & HACCARD, O. (2002): Mos is not required for the initiation of meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Embo Journal*, **21** (15): 4026-4036.
- DURANTHON, V. & RENARD, J.P. (2001): The developmental competence of mammalian oocytes: A convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology*, **55** (6): 1277-1289.
- EDSON, M.A.; NALAM, R.L.; CLEMENTI, C.; FRANCO, H.L.; DEMAYO, F.J.; LYONS, K.M.; PANGAS, S.A. & MATZUK, M.M. (2010): Granulosa cell-expressed BMPR1A and BMPR1B have unique functions in regulating fertility but act redundantly to suppress ovarian tumor development. *Molecular Endocrinology*, **24** (6): 1251-1266.
- EICHENLAUB-RITTER, U. (1998): Genetics of oocyte ageing. *Maturitas*, **30** (2): 143-169.

- 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** (1): 21-41.
- EL MOUATASSIM, S.; GUERIN, P. & MENEZO, Y. (1999): Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. *Molecular Human Reproduction*, **5** (8): 720-725.
- ELIYAHU, E.; TSAADON, A.; SHTRAIZENT, N. & SHALGI, R. (2005): The involvement of protein kinase C and actin filaments in cortical granule exocytosis in the rat. *Reproduction*, **129** (2): 161-170.
- EPPIG, J.J. (1991): Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic-cells. *Bioessays*, **13** (11): 569-574.
- ERICSSON, S.A.; BOICE, M.L.; FUNAHASHI, H. & DAY, M. (1993): Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue. *Theriogenology*, **39**: 214.
- FADOK, V.A.; VOELKER, D.R.; CAMPBELL, P.A.; COHEN, J.J.; BRATTON, D.L. & HENSON, P.M. (1992): Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of Immunology*, **148** (7): 2207-2216.
- FAIR, T.; HYTTEL, P. & GREVE, T. (1995): Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Molecular Reproduction and Development*, **42** (4): 437-442.
- FAIR, T.; CARTER, F.; PARK, S.; EVANS, A.C.O. & LONERGAN, P. (2007): Global gene expression analysis during bovine oocyte in vitro maturation. *Theriogenology*, **68**: S91-S97.
- FAN, H.Y.; LIU, Z.L.; SHIMADA, M.; STERNECK, E.; JOHNSON, P.F.; HEDRICK, S.M. & RICHARDS, J.S. (2009): MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science*, **324** (5929): 938-941.
- FENG, W.G.; SUI, H.S.; HAN, Z.B.; CHANG, Z.L.; ZHOU, P.; LIU, D.J.; BAO, S. & TAN, J.H. (2007): Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: A study using the well-in-drop culture system. *Theriogenology*, **67** (8): 1339-1350.
- FENWICK, M.A. & HURST, P.R. (2002): Immunohistochemical localization of active caspase-3 in the mouse ovary: growth and atresia of small follicles. *Reproduction*, **124** (5): 659-665.
- FERANIL, J.B.; ISOBE, N. & NAKAO, T. (2005): Apoptosis in the antral follicles of swamp buffalo and cattle ovary: TUNEL and caspase-3 histochemistry. *Reproduction in Domestic Animals*, **40** (2): 111-116.
- FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A. & NAVARRO, P.A. (2009): Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, **71** (5): 836-848.

- FEUERSTEIN, P.; CADORET, V.; BIES-TRAN, R.; GUERIF, F.; BIDAULT, R. & ROYERE, D. (2007): Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. *Human Reproduction*, **22** (12): 3069-3077.
- GHANEM, N.; HOLKER, M.; RINGS, F.; JENNEN, D.; THOLEN, E.; SIRARD, M.A.; TORNER, H.; KANITZ, W.; SCHELLANDER, K. & TESFAYE, D. (2007): Alterations in transcript abundance of bovine oocytes recovered at growth and dominance phases of the first follicular wave. *Bmc Developmental Biology*, **7**.
- GHANEM, N. (2009): Molecular genetic analysis of bovine oocytes with different developmental potentials. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn; Institut für Tierwissenschaften, Abt. Tierzucht und Tierhaltung.
- GILCHRIST, R.B.; LANE, M. & THOMPSON, J.G. (2008): Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update*, **14** (2): 159-177.
- GLUCKSMANN, A. (1951): The histogenesis of radiation-induced and of benzpyrene-induced epidermal tumours in the mouse. *Journal of Pathology and Bacteriology*, **63** (1): 176-177.
- GOODMAN, A.L.H.G.D. (1983): The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent progress in hormone research*, **39**: 1-73.
- GORDO, A.C.; HE, C.L.; SMITH, S. & FISSORE, R.A. (2001): Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, **59** (1): 106-114.
- GORDON, I. & LU, K.H. (1990): Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. *Theriogenology*, **33**: 77-87.
- GREEN, D. & KROEMER, G. (1998): The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends in Cell Biology*, **8** (7): 267-271.
- GREEN, D.R. & REED, J.C. (1998): Mitochondria and apoptosis. *Science*, **281** (5381): 1309-1312.
- GREENWALD, G.S. & TERRANOVA, P.F. (1988): Follicular selection and its control. 387-435. In: *The Physiology of Reproduction*. Knobil, E. & Neill, J. Raven Press, New York.
- GREVE, T.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P.; HOIER, R. & ASSEY, R. (1995): The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology*, **43** (1): 41-50.
- GRUTTER, M.G. (2000): Caspases: key players in programmed cell death. *Current Opinion in Structural Biology*, **10** (6): 649-655.
- GULBINS, E.; DRESCHERS, S. & BOCK, J. (2003): Role of mitochondria in apoptosis. *Experimental Physiology*, **88** (1): 85-90.
- GUTHRIE, H.D. & GARRETT, W.M. (2001): Apoptosis during folliculogenesis in pigs. *Reproduction*, **58**: 17-29.

- HAGEMANN, L.J.; BEAUMONT, S.E.; BERG, M.; DONNISON, M.J.; LEDGARD, A.; PETERSON, A.J.; SCHURMANN, A. & TERVIT, H.R. (1999): Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: Interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Molecular Reproduction and Development*, **53** (4): 451-458.
- HAN, Z.B.; LAN, G.C.; WU, Y.G.; HAN, D.; FENG, W.G.; WANG, J.Z. & TAN, J.H. (2006): Interactive effects of granulosa cell apoptosis, follicle size, cumulus-oocyte complex morphology, an cumulus expansion on the developmental competence of goat oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Reproduction*, **132** (5): 749-758.
- HASHIMOTO, S. (2009): Application of In Vitro Maturation to Assisted Reproductive Technology. *Journal of Reproduction and Development*, **55** (1): 1-10.
- HAZELEGER, N.L. & STUBBINGS, R.B. (1992): Developmental potential of selected bovine oocyte cumulus complexes. *Theriogenology*, **37**: 219.
- HENDRIKSEN, P.J.M.; VOS, P.L.A.M.; STEENWEG, W.N.M.; BEVERS, M.M. & DIELEMAN, S.J. (2000): Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology*, **53** (1): 11-20.
- HERNANDEZ-GONZALES, I.; GONZALES-ROBAYNA, I.; SHIMADA, M.; WAYNE, C.M.; OCHSNER, S.A.; WHITE, L. & RICHARDS, J.S. (2006): Gene expression profiles of cumulus cell oocyte complexes during ovulation reveal cumulus cells express neuronal and immune-related genes: does this expand their role in the ovulation process? *Molecular Endocrinology*, **20** (6): 1300-1321.
- HINRICHS, K.; CHOI, Y.H.; LOVE, L.B.; VARNER, D.D.; LOVE, C.C. & WALCKENAER, B.E. (2005): Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: Changes post mortem and relationship to meiotic and developmental competence. *Biology of Reproduction*, **72** (5): 1142-1150.
- HIRATA, H.; TAKAHASHI, A.; KOBAYASHI, S.; YONEHARA, S.; SAWAI, H.; OKAZAKI, T.; YAMAMOTO, K. & SASADA, M. (1998): Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, **187** (4): 587-600.
- HIRSHFIELD, A.N. (1991): Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology-A Survey of Cell Biology*, **124**: 43-101.
- 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** (1): 77-86.
- HOST, E.; MIKKELSEN, A.L.; LINDENBERG, S. & SMIDT-JENSEN, S. (2000): Apoptosis in human cumulus cells in relation to maturation stage and cleavage of the corresponding oocyte. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, **79** (11): 936-940.
- HSUEH, A.J.W.; BILLIG, H. & TSAFRIRI, A. (1994): Ovarian follicle atresia - a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Reviews*, **15** (6): 707-724.
- HSUEH, A.J.W.; EISENHAEUER, K.; CHUN, S.Y.; HSU, S.Y. & BILLIG, H. (1996): Gonadal cell apoptosis. *Recent Progress in Hormone Research*, **51**: 433-456.

- HUSSEIN, T.S.; FROILAND, D.A.; AMATO, F.; THOMPSON, J.G. & GILCHRIST, R.B. (2005): Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *Journal of Cell Science*, **118** (22): 5257-5268.
- HYTTEL, P.; CALLESEN, H. & GREVE, T. (1986): Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, **76** (2): 645-656.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H. & GREVE, T. (1997): Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, **47** (1): 23-32.
- HYTTEL, P.; VIUFF, D.; FAIR, T.; LAURINCIK, J.; THOMSEN, P.D.; CALLESEN, H.; VOS, P.L.A.M.; HENDRIKSEN, P.J.M.; DIELEMAN, S.J.; SCHELLANDER, K.; BESENFELDER, U. & GREVE, T. (2001): Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Reproduction*, **122** (1): 21-30.
- IRVING-RODGERS, H.F.; VAN WEZEL, I.L.; MUSSARD, M.L.; KINDER, J.E. & RODGERS, R.J. (2001): Atresia revisited: two basic patterns of atresia of bovine antral follicles. *Reproduction*, **122** (5): 761-775.
- ISOBE, N. & YOSHIMURA, Y. (2000): Localization of apoptotic cells in the cystic ovarian follicles of cows: A DNA-end labeling histochemical study. *Theriogenology*, **53** (4): 897-904.
- JÄNICKE, R.U.; NG, P.; SPRENGART, M.L. & PORTER, A.G. (1998): Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, **273** (25): 15540-15545.
- JENG, J.Y.; YEH, T.S.; LEE, J.W.; LIN, S.H.; FONG, T.H. & HSIEH, R.H. (2008): Maintenance of mitochondrial DNA copy number and expression are essential for preservation of mitochondrial function and cell growth. *Journal of Cellular Biochemistry*, **103** (2): 347-357.
- JÖRB, B. (2005): Untersuchungen zur Apoptose von Thekazellen des Rinderovars. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- 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** (4): 645-654.
- KANKA, J.; KEPKOVA, K. & NEMCOVA, L. (2009): Gene expression during minor genome activation in preimplantation bovine development. *Theriogenology*, **72** (4): 572-583.
- KEEFE, D.L.; NIVENFAIRCHILD, T.; POWELL, S. & BURADAGUNTA, S. (1995): Mitochondrial deoxyribonucleic-acid deletions in oocytes and reproductive aging in women. *Fertility and Sterility*, **64** (3): 577-583.
- KELLY, J.M.; KLEEMANN, D.O.; RUDIGER, S.R. & WALKER, S.K. (2007): Effects of grade of oocyte-cumulus complex and the interactions between grades on the production of blastocysts in the cow, ewe and lamb. *Reproduction in Domestic Animals*, **42** (6): 577-582.
- KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H. & CURRIE, A.R. (1972): Apoptosis - basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, **26** (4): 239-257.

- KERR, J.F.R.; WINTERFORD, C.M. & HARMON, B.V. (1994): Apoptosis - its significance in cancer and cancer-therapy. *Cancer*, **73** (8): 2013-2026.
- KISHIMOTO, T. (2003): Cell-cycle control during meiotic maturation. *Current Opinion in Cell Biology*, **15** (6): 654-663.
- KLUCK, R.M.; BOSSYWETZEL, E.; GREEN, D.R. & NEWMAYER, D.D. (1997): The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, **275** (5303): 1132-1136.
- KOENIG, U.; ECKHART, L. & TSCHACHLER, E. (2001): Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **285** (5): 1150-1154.
- KORSMEYER, S.J.; WEI, M.C.; SAITO, M.; WELLER, S.; OH, K.J. & SCHLESINGER, P.H. (2000): Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death and Differentiation*, **7** (12): 1166-1173.
- KRISHER, R. (2004): The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science*, **82**: 14-23.
- KRISHER, R.L. & BAVISTER, B.D. (1998): Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology*, **49** (1): 103-114.
- LAMKANFI, M.; DECLERCQ, W.; KALAI, M.; SAELENS, X. & VANDENABEELE, P. (2002): Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death and Differentiation*, **9** (4): 358-361.
- LARSEN, W.J.; WERT, S.E. & BRUNNER, G.D. (1986): A dramatic loss of cumulus cell gap-junctions is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes. *Developmental Biology*, **113** (2): 517-521.
- LEIBFRIED, L. & FIRST, N.L. (1980): Effect of bovine and porcine follicular-fluid and granulosa-cells on maturation of oocytes in vitro. *Biology of Reproduction*, **23** (4): 699-704.
- LEOPOLD, J.A. & LOSCALZO, J. (2000): Cyclic strain modulates resistance to oxidant stress by increasing G6PDH expression in smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **279** (5): H2477-H2485.
- LI, H.J.; LIU, D.J.; CANG, M.; WANG, L.M.; JIN, M.Z.; MA, Y.Z. & SHORGAN, B. (2009): Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. *Animal Reproduction Science*, **114** (1-3): 89-98.
- LI, P.; NIJHAWAN, D.; BUDIHardjo, I.; SRINIVASULA, S.M.; AHMAD, M.; ALNEMRI, E.S. & WANG, X.D. (1997): Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91** (4): 479-489.
- LIM, M.L.R.; LUM, M.G.; HANSEN, T.M.; ROUCOU, X. & NAGLEY, P. (2002): On the release of cytochrome c from mitochondria during cell death signaling. *Journal of Biomedical Science*, **9** (6): 488-506.

- LINGENFELTER, B.M.; DAILEY, R.A.; INSKEEP, E.K.; VERNON, M.W.; POOLE, D.H.; RHINEHART, J.D. & YAO, J.B. (2008): Microarray analysis of gene expression in granulosa cells from persistent follicles in cattle. *Animal Reproduction Science*, **104** (2-4): 405-413.
- LIU, H.L. & AOKI, F. (2002): Transcriptional activity associated with meiotic competence in fully grown mouse GV oocytes. *Zygote*, **10** (4): 327-332.
- LIU, Z.; SHIMADA, M. & RICHARDS, J.S. (2008): The involvement of the Toll-like receptor family in ovulation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **25** (6): 223-228.
- LIVINGSTON, T.; RICH, K.; MACKENZIE, S. & GODKIN, J.D. (2009): Glutathione content and antioxidant enzyme expression of in vivo matured sheep oocytes. *Animal Reproduction Science*, **116** (3-4): 265-273.
- LODDE, V.; MODINA, S.; GALBUSERA, C.; FRANCIOSI, F. & LUCIANO, A.M. (2007): Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: Interplay with gap junction functionality and developmental competence. *Molecular Reproduction and Development*, **74** (6): 740-749.
- LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M.P. & GORDON, I. (1994): Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in-vitro. *Molecular Reproduction and Development*, **37** (1): 48-53.
- LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T. & BOLAND, M.P. (2003): Oocyte and embryo quality: Effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reproduction in Domestic Animals*, **38** (4): 259-267.
- LONERGAN, P. & FAIR, T. (2008): In vitro-produced bovine embryos - Dealing with the warts. *Theriogenology*, **69** (1): 17-22.
- LOPES, A.S.; WRENZYCKI, C.; RAMSING, N.B.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H.; LOVENDAHL, P.; GREVE, T. & CALLESEN, H. (2007): Respiration rates correlate with mRNA expression of G6PD and GLUT1 genes in individual bovine in vitro-produced blastocysts. *Theriogenology*, **68** (2): 223-236.
- MANABE, N.; GOTO, Y.; MATSUDA-MINEHATA, F.; INOUE, N.; MAEDA, A.; SAKAMAKI, K. & MIYANO, T. (2004): Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: Regulation of granulosa cell apoptosis during atresia. *Journal of Reproduction and Development*, **50** (5): 493-514.
- MARTIN, S.J.; OBRIEN, G.A.; NISHIOKA, W.K.; MCGAHON, A.J.; MAHBOUBI, A.; SAIDO, T.C. & GREEN, D.R. (24-3-1995): Proteolysis of fodrin (nonerythroid spectrin) during apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, **270** (12): 6425-6428.
- MASSAGUE, J. (2004): G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, **432** (7015): 298-306.
- MATOVA, N. & COOLEY, L. (2001): Comparative aspects of animal oogenesis. *Developmental Biology*, **231** (2): 291-320.
- MATWEE, C.; BETTS, D.H. & KING, W.A. (2000): Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote*, **8** (1): 57-68.

- MAYES, M.A. & SIRARD, M.A. (2001): The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. *Theriogenology*, **55** (4): 911-922.
- MCGRAW, S.; MORIN, G.; VIGNEAULT, C.; LECLERC, P. & SIRARD, M.A. (2007): Investigation of MYST4 histone acetyltransferase and its involvement in mammalian gametogenesis. *Bmc Developmental Biology*, **7**.
- MEBRATU, Y. & TESFAIGZI, Y. (2009): How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death is subcellular localization the answer? *Cell Cycle*, **8** (8): 1168-1175.
- MELO STERZA, F. (2003): Untersuchungen zur zytoplasmatischen Reifung von Eizellen des Rindes: Analyse der Regulation der Translation während der meiotischen Endreifung. Dissertation, Tierärztlichen Hochschule Hannover; Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere in Dummerstorf.
- MERMILLOD, P.; BIES-TRAN, R.; UZBEKOVA, S.; THELIE, A.; TRAVERSO, J.M.; PERREAU, C.; PAPILLIER, P. & MONGET, P. (2008): Factors affecting oocyte quality: Who is driving the follicle? *Reproduction in Domestic Animals*, **43**: 393-400.
- MOOR, R. & DAI, Y. (2001): Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *Reproduction*, **58**: 91-104.
- MOTLIK, J.; CROZET, N. & FULKA, J. (1984): Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*, **72** (2): 323-328.
- MOTLIK, J. & KUBELKA, M. (1990): Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, **27** (4): 366-375.
- NAGANO, M.; KATAGIRI, S. & TAKAHASHI, Y. (2006): Relationship between bovine oocyte morphology and in vitro developmental potential. *Zygote*, **14** (1): 53-61.
- NAGATA, S. (2000): Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental Cell Research*, **256** (1): 12-18.
- NECHUSHTAN, A.; SMITH, C.L.; LAMENSDORF, I.; YOON, S.H. & YOULE, R.J. (2001): Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *Journal of Cell Biology*, **153** (6): 1265-1276.
- NICHOLAS, B.; ALBERIO, R.; FOULADI-NASHTA, A.A. & WEBB, R. (2005): Relationship between low-molecular-weight insulin-like growth factor-binding proteins, caspase-3 activity, and oocyte quality. *Biology of Reproduction*, **72** (4): 796-804.
- NICHOLSON, D.W. (1999): Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation*, **6** (11): 1028-1042.
- NICHOLSON, K.M. & ANDERSON, N.G. (2002): The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling*, **14** (5): 381-395.
- NISHI, Y.; TAKESHITA, T.; SATO, K.; ARAKI, T. (2003): Change of the mitochondrial distribution in mouse ooplasm during in vitro maturation. *Journal of Nippon Medical School*, **70** (5): 408-415.

- NOGUEIRA, M.F.G.; BURATINI, J.; PRICE, C.A.; CASTILHO, A.C.S.; PINTO, M.G.L. & BARROS, C.M. (2007): Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: Changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, **74** (6): 680-686.
- OPIELA, J.; KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; LIPINSKI, D.; SLOMSKI, R.; BZOWSKA, A. & RYNSKA, B. (2008): Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and developmental competence following IVP in cattle. *Theriogenology*, **69** (5): 546-555.
- OPIELA, J.; LIPINSKI, D.; SLOMSKI, R. & KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L. (2010): Transcript expression of mitochondria related genes is correlated with bovine oocyte selection by BCB test. *Animal Reproduction Science*, **118** (2-4): 188-193.
- ORTEGA-CAMARILLO, C.; GONZALEZ-GONZALEZ, A.; VERGARA-ONOFRE, M.; GONZALEZ-PADILLA, E.; AVALOS-RODRIGUEZ, A.; GUTIERREZ-RODRIGUEZ, M.E.; ARRIAGA-PIZANO, L.; CRUZ, M.; BAIZA-GUTMAN, L.A. & DIAZ-FLORES, M. (2009): Changes in the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in granulosa cells during follicular atresia in ewes. *Reproduction*, **137** (6): 979-986.
- OTZDORFF, C. (2006): Untersuchungen zur Aggregation und Aktivität von Mitochondrien im Ooplasma von Cumulus-Oozyten-Komplexen des Rindes während der In-vitro-Reifung. Dissertation, Tierklinik für Fortpflanzung, Freie Universität Berlin; Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie landwirtschaftlicher Nutztiere, Dummerstorf.
- OUSSAID, B.; MARIANA, J.C.; POULIN, N.; FONTAINE, J.; LONERGAN, P.; BECKERS, J.F. & COGNIE, Y. (1999): Reduction of the developmental competence of sheep oocytes by inhibition of LH pulses during the follicular phase with a GnRH antagonist. *Journal of Reproduction and Fertility*, **117** (1): 71-77.
- PACZKOWSKI, M. & KRISHER, R. (2010): Aberrant protein expression is associated with decreased developmental potential in porcine cumulus-oocyte complexes. *Molecular Reproduction and Development*, **77** (1): 51-58.
- PARK, O.K. & MAYO, K.E. (1991): Transient expression of progesterone-receptor messenger-Rna in ovarian granulosa-cells after the preovulatory Luteinizing-Hormone surge. *Molecular Endocrinology*, **5** (7): 967-978.
- PARONE, P.A.; JAMES, D. & MARTINOU, J.C. (2002): Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie*, **84** (2-3): 105-111.
- PAVLOK, A.; LUCASHAHN, A. & NIEMANN, H. (1992): Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*, **31** (1): 63-67.
- PETER M.; NAKAGAWA, J.D.; DORÉE, M.; LABBÉ, J.C.; NIGG, E.A. (1990): In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell*, **61** (4): 591-602.
- PORTER, A.G. & JANICKE, R.U. (1999): Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, **6** (2): 99-104.

- PUJOL, M.; LOPEZ-BEJAR, M. & PARAMIO, M.T. (2004): Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology*, **61** (4): 735-744.
- RAMAGE, P.; CHENEVAL, D.; CHVEI, M.; GRAFF, P.; HEMMIG, R.; HENG, R.; KOCHER, H.P.; MACKENZIE, A.; MEMMERT, K.; REVESZ, L. & WISHART, W. (1995): Expression, refolding, and autocatalytic proteolytic processing of the Interleukin-1-Beta converting-enzyme precursor. *Journal of Biological Chemistry*, **270** (16): 9378-9383.
- REED, J.C.; JURGENSMEIER, J.M. & MATSUYAMA, S. (1998): Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, **1366** (1-2): 127-137.
- REYNIER, P.; MAY-PANLOUP, P.; CHRETIEN, M.F.; MORGAN, C.J.; JEAN, M.; SAVAGNER, F.; BARRIERE, P. & MALTHIERY, Y. (2001): Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Molecular Human Reproduction*, **7** (5): 425-429.
- RICHARDS, J.S. (2007): Genetics of ovulation. *Seminars in Reproductive Medicine*, **25** (4): 235-242.
- ROBINSON, M.J. & COBB, M.H. (1997): Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Cell Biology*, **9** (2): 180-186.
- RODRIGUEZ-GONZALEZ, E.; LOPEZ-BEJAR, M.; VELILLA, E. & PARAMIO, M.T. (2002): Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology*, **57** (5): 1397-1409.
- RODRIGUEZ, K.F. & FARIN, C.E. (2004): Gene transcription and regulation of oocyte maturation. *Reproduction Fertility and Development*, **16** (1-2): 55-67.
- ROSLER, A.; LEIBERMAN, E. & COHEN, T. (1992): High-frequency of congenital adrenal-hyperplasia (classic 11-beta-hydroxylase deficiency) among jews from Morocco. *American Journal of Medical Genetics*, **42** (6): 827-834.
- ROTHBART, A.H.O. (2007): Untersuchung apoptotischer Signaltransduktionswege in kernlosen humanen Blutzellen. Dissertation, Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik, Tübingen.
- ROTONDA, J.; NICHOLSON, D.W.; FAZIL, K.M.; GALLANT, M.; GAREAU, Y.; LABELLE, M.; PETERSON, E.P.; RASPER, D.M.; RUEL, R.; VAILLANCOURT, J.P.; THORBERRY, N.A. & BECKER, J.W. (1996): The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nature Structural Biology*, **3** (7): 619-625.
- RÜPING, K. (2005): Klinisch experimentelle Untersuchungen zum prädiktiven Wert der Apoptoseaktivitätsbestimmung mittels Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) an Cumuluszellen im Rahmen der assistierten Fertilisation. Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität, Lübeck.
- RÜSSE, I. (1983): Oogenesis in cattle and sheep. *Bibliotheca anatomica*, **24**: 77-92.
- SALEHIN, B. (2003): Phosphorylierung von MAP-Kinasen (ERK-2 und p38) in Azinuszellen des Pankreas durch oxidativen Stress in vivo. Dissertation, Medizinische Klinik und Poliklinik, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

- SALILEW-WONDIM, D.; HOLKER, M.; RINGS, F.; PHATSARA, C.; MOHAMMADI-SANGCHESHMEH, A.; THOLEN, E.; SCHELLANDER, K. & TESFAYE, D. (2010): Depletion of BIRC6 leads to retarded bovine early embryonic development and blastocyst formation in vitro. *Reproduction Fertility and Development*, **22** (3): 564-579.
- SALVESEN, G.S. & DIXIT, V.M. (1999): Caspase activation: The induced-proximity model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96** (20): 10964-10967.
- SCHAFFER, C. & WILLIAMS, J.A. (2000): Stress kinases and heat shock proteins in the pancreas: possible roles in normal function and disease. *Journal of Gastroenterology*, **35** (1): 1-9.
- SCHULZE-OSTHOFF, K.; FERRARI, D.; LOS, M.; WESSELBORG, S. & PETER, M.E. (1998): Apoptosis signaling by death receptors. *European Journal of Biochemistry*, **254** (3): 439-459.
- SETIADI, M.A.; TRUMPA, M.; RATH, D. & MEINECKE, B. (2009): Elevated histone H1 (MPF) and mitogen-activated protein kinase activities in pig oocytes following in vitro maturation do not indicate cytoplasmic maturation. *Reproduction in Domestic Animals*, **44** (2): 235-240.
- SHERIDAN, J.W.; BISHOP, C.J. & SIMMONS, R.J. (1981): Biophysical and morphological correlates of kinetic change and death in a starved human-melanoma cell-line. *Journal of Cell Science*, **49**: 119-137.
- SIRARD, M.A. & BLONDIN, P. (1996): Oocyte maturation and IVF in cattle. *Animal Reproduction Science*, **42** (1-4): 417-426.
- SIRARD, M.A.; PICARD, L.; DERY, M.; COENEN, K. & BLONDIN, P. (1999): The time interval between FSH administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. *Theriogenology*, **51** (4): 699-708.
- SIRARD, M.A. (2001): Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, **55** (6): 1241-1254.
- SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P. & ROBERT, C. (2006): Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, **65** (1): 126-136.
- SLEE, E.A.; HARTE, M.T.; KLUCK, R.M.; WOLF, B.B.; CASIANO, C.A.; NEWMAYER, D.D.; WANG, H.G.; REED, J.C.; NICHOLSON, D.W.; ALNEMRI, E.S.; GREEN, D.R. & MARTIN, S.J. (1999): Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: Hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *Journal of Cell Biology*, **144** (2): 281-292.
- SMYTH, G.K.; MICHAUD, J. & SCOTT, H.S. (2005): Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics*, **21** (9): 2067-2075.
- SPIKINGS, E.C.; ALDERSON, J. & JOHN, J.C.S. (2007): Regulated mitochondrial DNA replication during oocyte maturation is essential for successful porcine embryonic development. *Biology of Reproduction*, **76** (2): 327-335.

- SRIRAMAN, V.; SHARMA, S.C. & RICHARDS, J.S. (2003): Transactivation of the progesterone receptor gene in granulosa cells: Evidence that Sp1/Sp3 binding sites in the proximal promoter play a key role in luteinizing hormone inducibility. *Molecular Endocrinology*, **17** (3): 436-449.
- STENNICKE, H.R.; JURGENSMEIER, J.M.; SHIN, H.; DEVERAUX, Q.; WOLF, B.B.; YANG, X.H.; ZHOU, Q.; ELLERBY, H.M.; ELLERBY, L.M.; BREDESEN, D.; GREEN, D.R.; REED, J.C.; FROELICH, C.J. & SALVESEN, G.S. (1998): Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *Journal of Biological Chemistry*, **273** (42): 27084-27090.
- STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONCALVES, P.B. & WOLF, E. (2001): Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: Correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biology of Reproduction*, **64** (3): 904-909.
- STRASSER, A.; O'CONNOR, L. & DIXIT, V.M. (2000): Apoptosis signaling. *Annual Review of Biochemistry*, **69**: 217-245.
- SU, Y.Q.; DENEGRE, J.A.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.L.; O'BRIEN, M.J. & EPPIG, J.J. (2003): Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex. *Developmental Biology*, **263** (1): 126-138.
- SUN, X.; LI, Z.; YI, Y.; DING, W.; CHEN, J.; ENGELHARDT, J.F. & LENO, G.H. (2009): Chromatin configurations in the ferret germinal vesicle that reflect developmental competence for In Vitro maturation. *Reproduction in Domestic Animals*, **44** (2): 320-325.
- SUSIN, S.A.; ZAMZAMI, N.; CASTEDO, M.; DAUGAS, E.; WANG, H.G.; GELEY, S.; FASSY, F.; REED, J.C. & KROEMER, G. (1997): The central executioner of apoptosis: Multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, **186** (1): 25-37.
- SUTOVSKY, P.; FLECHON, J.E. & PAVLOK, A. (1995): F-Actin Is Involved in Control of Bovine Cumulus Expansion. *Molecular Reproduction and Development*, **41** (4): 521-529.
- TAKAMI, M.; PRESTON, S.L.; JONES, E.E. & BEHRMAN, H.R. (1998): Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis. *Biology of Reproduction*, **58**: 142-142.
- TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; NAUWYNCK, H.; CORYN, M. & DE KRUIF, A. (2002): Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, **61** (3): 414-424.
- TARAZONA, A.M.; RODRIGUEZ, J.I.; RESTREPO, L.F. & OLIVERA-ANGEL, M. (2006): Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. *Reproduction in Domestic Animals*, **41** (1): 5-11.
- TATEMOTO, H. & HORIUCHI, T. (1995): Requirement for protein-synthesis during the onset of meiosis in bovine oocytes and its involvement in the autocatalytic amplification of maturation-promoting factor. *Molecular Reproduction and Development*, **41** (1): 47-53.

- TATEMOTO, H.; SAKURAI, N. & MUTO, N. (2000): Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during in vitro maturation: Role of cumulus cells. *Biology of Reproduction*, **63** (3): 805-810.
- THIBAUT, C.; SZOLLOSI, D. & GERARD, M. (1987): Mammalian oocyte maturation. *Reproduction Nutrition Development*, **27** (5): 865-896.
- THORNBERRY, N.A. & LAZEBNIK, Y. (1998): Caspases: Enemies within. *Science*, **281** (5381): 1312-1316.
- THOUAS, G.A.; TROUNSON, A.O.; WOLVETANG, E.J. & JONES, G.M. (2004): Mitochondrial dysfunction in mouse oocytes results in preimplantation embryo arrest in vitro. *Biology of Reproduction*, **71** (6): 1936-1942.
- TIAN, W.N.; BRAUNSTEIN, L.D.; PANG, J.D.; STUHLMEIER, K.M.; XI, Q.C.; TIAN, X.N. & STANTON, R.C. (1998): Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *Journal of Biological Chemistry*, **273** (17): 10609-10617.
- TILLY, J.L.; KOWALSKI, K.I.; JOHNSON, A.L. & HSUEH, A.J.W. (1991): Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology*, **129** (5): 2799-2801.
- TOMEK, W.; TORNER, H. & KANITZ, W. (2002): Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. *Reproduction in Domestic Animals*, **37** (2): 86-91.
- TOMEK, W. & SMILJAKOVIC, T. (2005): Activation of Akt (protein kinase B) stimulates metaphase I to metaphase II transition in bovine oocytes. *Reproduction*, **130** (4): 423-430.
- TORNER, H.; KUBELKA, M.; HELEIL, B.; TOMER, W.; ALM, 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** (4): 885-899.
- TORNER, H.; BRUSSOW, K.P.; ALM, H.; RATKY, J.; POHLAND, R.; TUCHSCHERER, A. & KANITZ, W. (2004): Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation. *Theriogenology*, **61** (9): 1675-1689.
- TORNER, H.; GHANEM, N.; AMBROS, C.; HOLKER, M.; TOMER, W.; PHATSARA, C.; ALM, H.; SIRARD, M.A.; 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** (2): 197-212.
- TOWBIN, H.; STAHELIN, T. & GORDON, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets - procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76** (9): 4350-4354.
- TROUNSON, A.; ANDERIESZ, C. & JONES, G. (2001): Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction*, **121** (1): 51-75.

- TROUSSARD, A.A.; MAWJI, N.M.; 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** (25): 22374-22378.
- VAN BLERKOM, J.; SINCLAIR, J. & DAVIS, P. (1998): Mitochondrial transfer between oocytes: potential applications of mitochondrial donation and the issue of heteroplasmy. *Human Reproduction*, **13** (10): 2857-2868.
- VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P. & ALEXANDER, S. (2000): Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Human Reproduction*, **15** (12): 2621-2633.
- VAN BLERKOM, J. (2004): Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction*, **128** (3): 269-280.
- VANDAELE, L.; GOOSSENS, K.; PEELMAN, L. & VAN SOOM, A. (2008): mRNA expression of Bcl-2, Bax, caspase-3 and -7 cannot be used as a marker for apoptosis in bovine blastocysts. *Animal Reproduction Science*, **106** (1-2): 168-173.
- VANDERHYDEN, B.C.; TELFER, E.E. & EPPIG, J.J. (1992): Mouse oocytes promote proliferation of granulosa-cells from preantral and antral follicles in vitro. *Biology of Reproduction*, **46** (6): 1196-1204.
- VAN TOL, H.T.A.; VAN EIJK, M.J.T.; MUMMERY, C.L.; VANDEN HURK, R. & BEVERS, M.M. (1996): Influence of FSH and hCG on the resumption of meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. *Molecular Reproduction and Development*, **45** (2): 218-224.
- VASSENA, R.; MAPLETOFT, R.J.; ALLODI, S.; SINGH, J. & ADAMS, G.P. (2003): Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology*, **60** (5): 923-932.
- VERHAGEN, A.M.; EKERT, P.G.; PAKUSCH, M.; SILKE, J.; CONNOLLY, L.M.; REID, G.E.; MORITZ, R.L.; SIMPSON, R.J. & VAUX, D.L. (2000): Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, **102** (1): 43-53.
- VIERGUTZ, T. & LOHRKE, B. (2007): Role of the platelet-activating factor and its receptor in the proliferative regulation of bovine ovarian granulosa cells. *Cell Proliferation*, **40** (6): 949-960.
- VIGNERON, C.; PERREAU, C.; BIES-TRAN, R.; JOLY, C.; HUMBLLOT, P.; UZBEKOVA, S. & MERMILLOD, P. (2004): Protein synthesis and mRNA storage in cattle oocytes maintained under meiotic block by roscovitine inhibition of MPF activity. *Molecular Reproduction and Development*, **69** (4): 457-465.
- VORONINA, E. & WESSEL, G.M. (2003): The regulation of oocyte maturation. *Current Topics in Developmental Biology*, **58**: 53-110.

- VOZZI, C.; FORMENTON, A.; CHANSON, A.; SENN, A.; SAHLI, R.; SHAW, P.; NICOD, P.; GERMOND, M. & HAEFLIGER, J.A. (2001): Involvement of connexin 43 in meiotic maturation of bovine oocytes. *Reproduction*, **122** (4): 619-628.
- WANG, L.Y.; WANG, D.H.; ZOU, X.Y. & XU, C.M. (2009): Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. *Journal of Zhejiang University-Science B*, **10** (7): 483-492.
- WARZYCH, E.; WRENZYCKI, C.; PEIPPO, J. & LECHNIAK, D. (2007): Maturation medium supplements affect transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produced in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, **74** (3): 280-289.
- WASSARMAN, M. (1988): The mammalian ovum. In: *The physiology of reproduction*. Knobil, E. & Neil, J.D.. Raven Press, New York, 69-102.
- WEHREND, A. & MEINECKE, B. (2001): Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during in vitro maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. *Animal Reproduction Science*, **66** (3-4): 175-184.
- WIEKING, M. (2001): Experimentelle Untersuchungen zur Verbesserung der Effizienz der ultraschallgeleiteten, transvaginalen Follikelpunktion bei präpuberalen Rindern durch intraovarielle Verabreichung von Gonadotropinen. Dissertation, Institut für Tierzucht und Tierverhalten, Mariensee; Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig.
- WILDING, M.; DALE, B.; MARINO, M.; DI MATTEO, L.; ALVIGGI, C.; PISATURO, M.L.; LOMBARDI, L. & DE PLACIDO, G. (2001): Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction*, **16** (5): 909-917.
- WISE, T. & MAURER, R.R. (1994): Follicular Development, Oocyte Viability and Recovery in Relation to Follicular Steroids, Prolactin and Glycosaminoglycans Throughout the Estrous Period in Superovulated Heifers with A Normal Lh Surge, No Detectable Lh Surge, and Progestin Inhibition of Lh Surge. *Domestic Animal Endocrinology*, **11** (1): 35-58.
- WOLF, B.B. & GREEN, D.R. (1999): Suicidal tendencies: Apoptotic cell death by caspase family proteinases. *Journal of Biological Chemistry*, **274** (29): 20049-20052.
- WRIGHT, C.W. & DUCKETT, C.S. (2005): Reawakening the cellular death program in neoplasia through the therapeutic blockade of IAP function. *Journal of Clinical Investigation*, **115** (10): 2673-2678.
- WU, Z.J. & IRIZARRY, R.A. (2004): Preprocessing of oligonucleotide array data. *Nature Biotechnology*, **22** (6): 656-658.
- WU, Y.G.; LIU, Y.; ZHOU, P.; LAN, G.C.; HAN, D.; MIAO, D.Q. & TAN, J.H. (2007): Selection of oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining: a study using the mouse model. *Cell Research*, **17** (8): 722-731.
- WYLLIE A.H.; KERR, J.F.; CURRIE, A.R. (1980): Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology-A Survey of Cell Biology*, **68**: 251-306.

- WYLLIE, A.H.; MORRIS, R.G.; SMITH, A.L. & DUNLOP, D. (1984): Chromatin cleavage in apoptosis - association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular-synthesis. *Journal of Pathology*, **142** (1): 67-77.
- YAMASHITA, Y.; HISHINUMA, M. & SHIMADA, M. (2009): Activation of PKA, p38 MAPK and ERK1/2 by gonadotropins in cumulus cells is critical for induction of EGF-like factor and TACE/ADAM17 gene expression during in vitro maturation of porcine COCs. *Journal of Ovarian Research*, **24** (2): 20.
- YAMIN, T.T.; AYALA, J.M. & MILLER, D.K. (1996): Activation of the native 45-kDa precursor form of interleukin-1-converting enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, **271** (22): 13273-13282.
- YANG, M.Y. & RAJAMAHENDRAN, R. (2000): Involvement of apoptosis in the atresia of nonovulatory dominant follicle during the bovine estrous cycle. *Biology of Reproduction*, **63** (5): 1313-1321.
- YAO, J.B.; REN, X.N.; IRELAND, J.J.; COUSSENS, P.M.; SMITH, T.P.L. & SMITH, G.W. (2004): Generation of a bovine oocyte cDNA library and microarray: resources for identification of genes important for follicular development and early embryogenesis. *Physiological Genomics*, **19** (1): 84-92.
- YUAN, Y.Q.; PEELMAN, L.J.; WILLIAMS, J.L.; VAN ZEVEREN, A.; KRUIF, A.; LAW, A. & VAN SOOM, A. (2004): Mapping and transcription profiling of CASP1, 3, 6, 7 and 8 in relation to caspase activity in the bovine cumulus-oocyte complex. *Animal Genetics*, **35** (3): 234-237.
- YUAN, Y.Q.; VAN SOOM, A.; LEROY, J.L.M.R.; DEWULF, J.; VAN ZEVEREN, A.; DE KRUIF, A. & PEELMAN, L. (2005): Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology*, **63** (8): 2147-2163.
- YUDIN, A.I.; CHERR, G.N. & KATZ, D.F. (1988): Structure of the Cumulus Matrix and Zona Pellucida in the Golden-Hamster - A New View of Sperm Interaction with Oocyte-Associated Extracellular Matrices. *Cell and Tissue Research*, **251** (3): 555-564.
- ZEUNER, A.; MULLER, K.; REGUSZYNSKI, K. & JEWGENOW, K. (2003): Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during in vitro maturation. *Theriogenology*, **59** (5-6): 1421-1433.
- ZOU, H.; HENZEL, W.J.; LIU, X.S.; LUTSCHG, A. & WANG, X.D. (1997): Apaf-1, a human protein homologous to C-elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, **90** (3): 405-413.
- ZHOU, G.B.; LIU, G.S.; MENG, Q.G.; LIU, Y.; HOU, Y.P.; WANG, X.X.; LI, N. & ZHU, S.E. (2009): Tetraspanin CD9 in Bovine Oocytes and Its Role in Fertilization. *Journal of Reproduction and Development*, **55** (3): 305-308.

9. Anhang

Tabelle 9.1: Eingesetzte Primer in der qRT-PCR.

| Gen | Genbank Accession-Nr. | Primer Sequenz (5'-3') | Größe (bp) |
|---------|--------------------------------|--|------------|
| GAPDH | NM_001034034 | F: AATGGAGCCATCACCATC R: GTGGTTCACGCCCATCACA | 240 |
| EIF3F | XM_591540 | F: CCATGTACGCAGTTGTCAAAG R: GGTGCAGTTGAAAGAAGTTGG | 249 |
| GRB7 | NM_001046014 | F: CGGACTCAGAGTGGGTAGAAG R: TTCTCCCATAGTGCCTGTCC | 216 |
| TP53I3 | NM_001075378 | F: CCGGTTCTGGACAGAGTCTAC R: GGAGAAATAGGGGGTTACAGG | 229 |
| BMPR1A | NM_001076800 | F: GAAATGGCTCGTCGTTGTATC R: TAAGTCTGGAGGCTGGATTGT | 223 |
| ADORA2B | NM_001075925 | F: ATAAACACAGCCATCCTCCTG R: TTAGTCTGGAGGCTGGATTGT | 226 |
| BNIP1 | NM_001079621 | F: CCCTAAACCTGAGCTGTTTTG R: GATTTGCCCAAGGTTCTACAG | 223 |
| RND1 | NM_001046016 | F: CAGAGCCACTGAGAAGGAAAC R: CCGACTCCAAAGACAAGAGTC | 247 |
| RBM38 | XM_612948 | F: CACATAGTGTGCGCTGCTGTA R: GTGTCCCTGAGGTAGGTCTGA | 202 |
| KCNJ8 | NM_001040482 | F: AGTGGTCAAGAAAACCACGAC R: AATGCCAGTAGTTTCGACCAC | 232 |
| CA9 | XM_866456 | F: ACTTCCGATATGAGGGGTCTC R: GGAAGGAGGCCTCAATTATTC | 201 |
| SLC45A2 | XM_001251343 / XM_582396 | F: GGGCTTGTGCATCAACTCTAT R: TGATACACAGCGATGAGGGTA | 237 |
| NEU1 | NM_001083642 | F: GGAGGAGCCTAGAGGACAGTT R: TTAATGCTACAGGCCACCTA | 239 |
| PIR | NM_001102358 | F: TGAGAGAAGCCACTTTGTCCT R: CACTAAATGGGTGGGTGTCA | 243 |
| HMMR | XM_590028 | F: GAAGCAGAGAAACAGGCTTTG R: CCTCCTGAAGTTTTGCTTCAC | 223 |
| SLC2A5 | NM_001101042 | F: AGGGCTTCTGTGCAGTTCTTA R: TGTGGCTACCAGAAGACAATG | 237 |
| HCK | NM_001037141 / NM_001110194 | F: CCGGAAGAGCTCTACAACATC R: GGTGGGTGTCTGAGAATAGGA | 227 |
| ARRB1 | NM_174243 | F: CACTCTCATGCACTAGGATGC R: GGAATGGAGAAGTGATGCAGT | 203 |
| PLAC8 | NM_001025325 | F: TGGCAGTACCCTTTTGAAGTC R: GGTCCGATACATTGTCCTCAT | 241 |
| BCL2A1 | NM_001037100 | F: GACGAAGTGGAAGGACTCTG R: TCCATGTCTGAGGCAATACAC | 203 |
| CYP19 | NM_174305 | F: ACTTATCCTTGCATCCAGACG R: GTCTCCTGCCTAGCTGACAAC | 240 |
| BMP2 | NM_001099141 | F: GCTGGACTGGCCAAAGTATTA R: GCTGATGGAACAGAGAAGTGG | 233 |
| CTSL1 | NM_001083686 | F: TGCTGTAGATGCACACAATCC R: CGATTCCACAGTGGTTGTTC | 233 |
| DDIT3 | NM_001078163 | F: GAGGAAGACCAAGGAAGAACC R: CTTGGTGCAGATTAACCATCC | 220 |

| | | | |
|--------|-----------|--|-----|
| FSHR | NM_174061 | F: TCCAAGTCAAAGATCCTCCTG R: CATTAGTAACCCTGGGAGCTG | 229 |
| PLAUR | NM_174423 | F: CTTCTTTGTCAGCCTGCTCTT R: GTTCTCACAGCCCTCTCTCTG | 216 |
| SCG2 | NM_174176 | F: GCTGGAATACCTCAACCAAGA R: TGAAGCAGACACTCCAGTGAA | 229 |
| COL1A2 | NM_174520 | F: ATGCCTCTCAGAACATCACCT R: GGTGCAATATCAAGGATAGGC | 250 |
| MMP2 | NM_174745 | F: TGCTGGCTGCCTTAGAACTAT R: CCATCCAGTGAAGGAAGTGAC | 232 |
| GRK5 | NM_174331 | F: AGCCTGGACCCTTCTTCTTAG R: AGAGACACGTCCAATCCATCT | 201 |

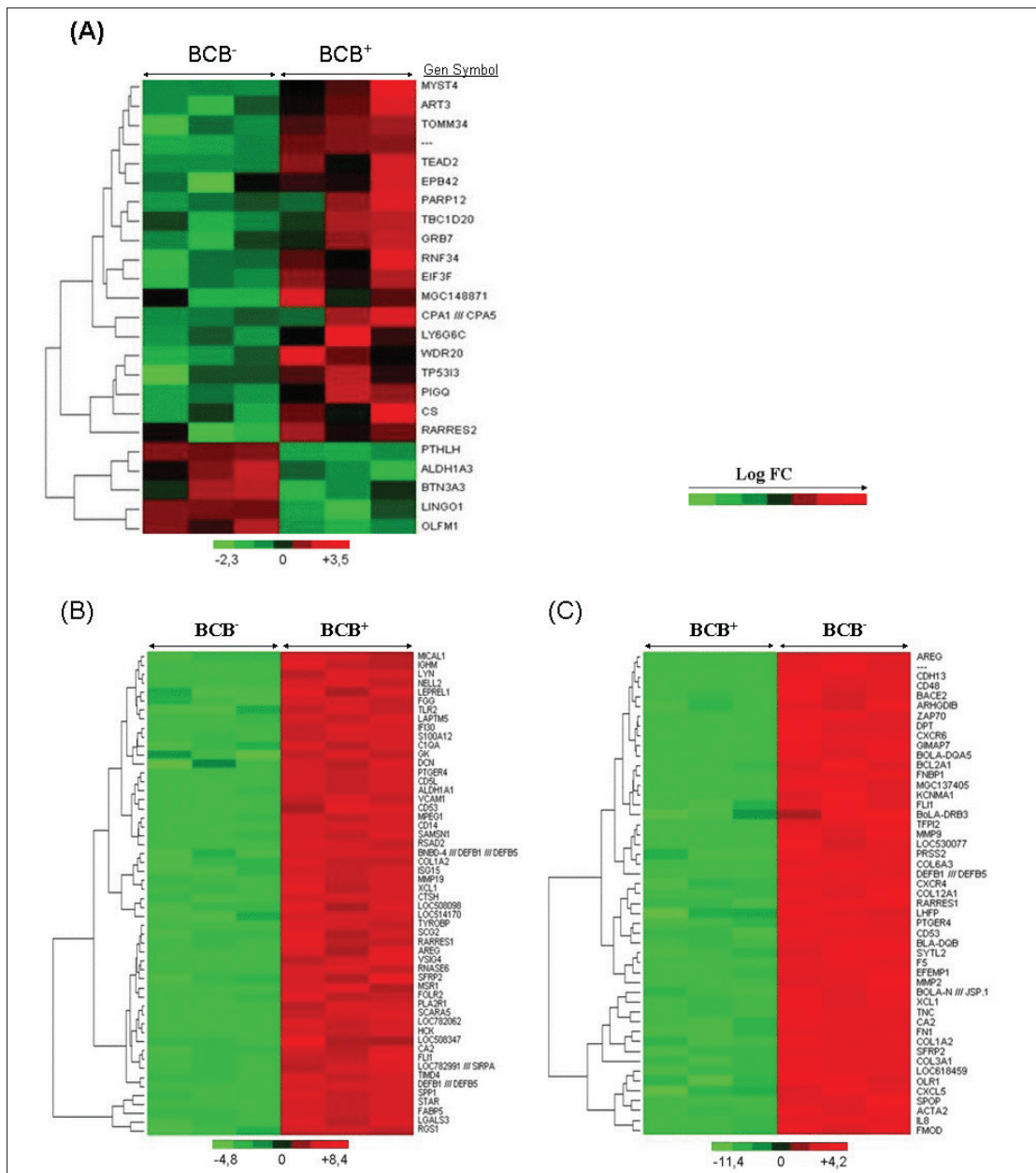


Abb. 9.1: Heatmap und Cluster differenziell exprimierter Gene. Rote Blöcke entsprechen stärker und grüne Blöcke geringer exprimierten Genen in BCB⁺ Gruppen.
A, Oozyten (Follikel Ø 3-5 mm), $p < 0,05$, $FDR < 0,3$, $FC \geq 2,5$;
B, Cumuluszellen (Follikel Ø 5-8 mm), **C**, Granulosazellen (Follikel Ø 5-8 mm),
 $p < 0,05$, $FDR < 0,3$, $FC \geq 3,2$

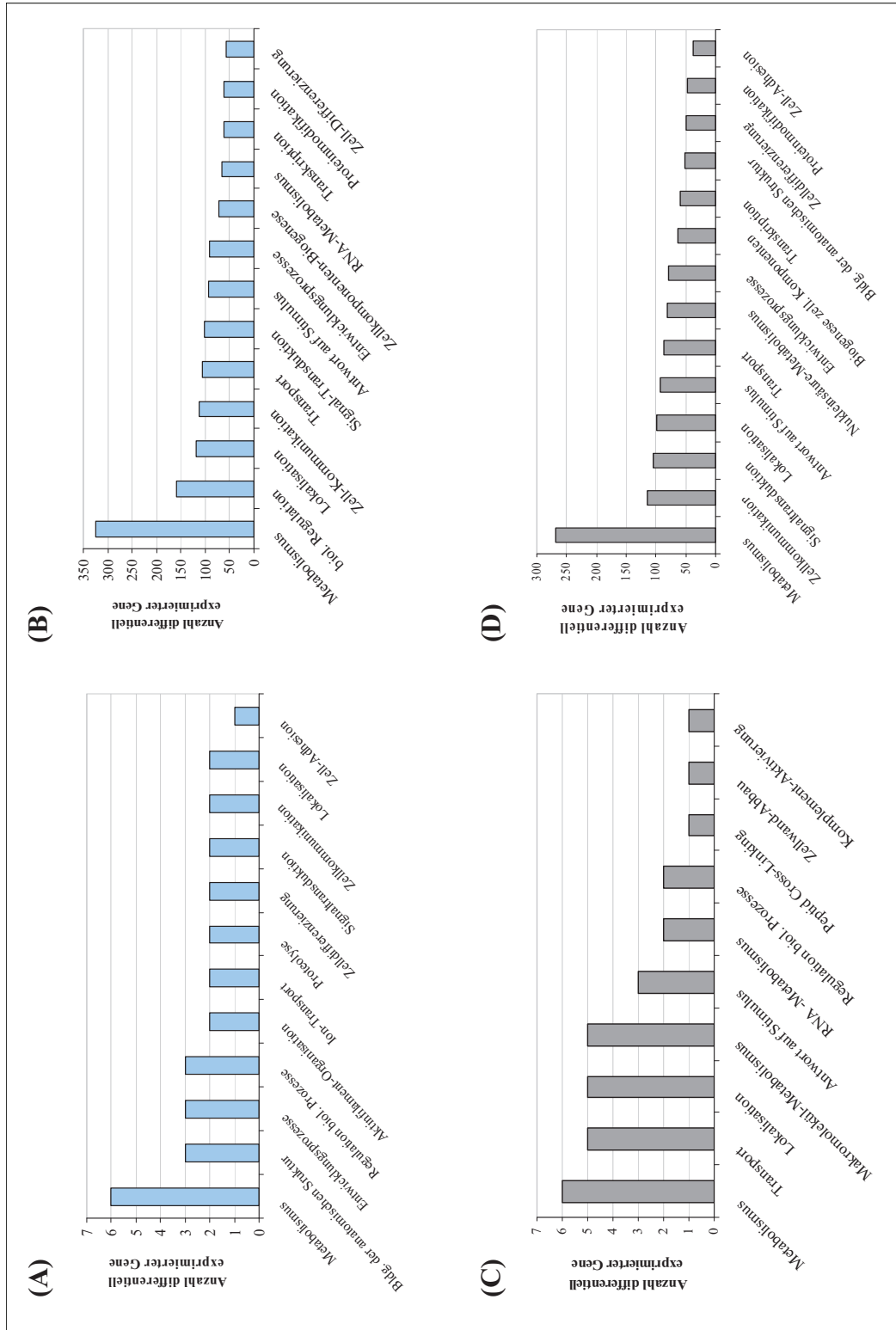


Abb. 9.2: Einteilung differenziell exprimierter Gene zwischen der BCB⁺- und BCB⁻-Gruppe hinsichtlich der biologischen Prozesse mittels GeneOntology Analyse (<http://www.geneontology.org>).
A, Cumuluszellen (Follikel Ø 3-5 mm); **B**, Cumuluszellen (Follikel Ø 5-8 mm); **C**, Granulosazellen (Follikel Ø 3-5 mm); **D**, Granulosazellen (Follikel Ø 5-8 mm).