

---

## 2. Literatur

### 2.1. Follikulogenese und Oogenese

#### 2.1.1. Follikulogenese

Die Population der ovariellen Follikel kann in einen ruhenden (Primordialfollikel) und einen wachsenden (Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikel) Follikelpool unterteilt werden (SCHUFFENHAUER et al. 1987, Kanitz et al. 2001, Kanitz 2003).

Der Begriff Follikulogenese wird in der Literatur zum einen für die Beschreibung des Prozesses der Follikelentstehung und zum anderen für die Entwicklung der Follikel verwendet. Unter Follikelentwicklung wird der Prozess verstanden, indem einige Follikel den ruhenden Pool verlassen und sich über verschiedene Entwicklungsstadien bis zur Ovulationsreife bzw. bis zur Atresie entwickeln (GORDON 2003).

#### *Follikeldynamik*

Die Follikulogenese stellt einen dynamischen Prozess dar, bei dem regelmäßig eine Kohorte der ruhenden Primordialfollikel aktiviert wird und in die Wachstumsphase eintritt. Die Follikelentwicklung wechselt von einem kontinuierlichen zu einem wellenförmigen Wachstum (FORTUNE 1994).

RAJAKOWSKI stellte 1960 erstmals die Hypothese auf, dass das Follikelwachstum beim Rind in regelmäßigen Wellenmustern stattfindet. Heute gilt es als gesichert, dass Rinder in der Regel zwei bis drei Follikelwellen während des Zyklus aufweisen (SIRIOS, FORTUNE 1988; FORTUNE 1994; KASTELIC 1994; KANITZ 2003; VASSENA et al. 2003).

#### *Genese der Primordialfollikel und Entwicklung der wachsenden Follikelpopulation*

Ab dem 90. Trächtigkeitstag sind im fetalen Ovar alle Entwicklungsstadien von Follikeln feststellbar. Die fetalen und präpuberalen tertiären Follikel gehen jedoch stets durch Atresie zugrunde (SCHNORR 1996, TANAKA et al. 2001).

Beim Rind werden bereits vor der Geburt die Oogonien bzw. primären Oozyten von einem einschichtigen flachen Plattenepithel umgeben und bilden zusammen den Primordialfollikel (RÜSSE, SINOWATZ 1991). Die sich um die Oozyten formierenden somatischen Zellen stammen aus der Markregion des Ovars. Intra partum befinden sich ca. 200.000 Oozyten in Primordialfollikeln im bovinen Ovar (GORDON 2003). Oozyten, die nicht in einem

Primordialfollikel eingeschlossen sind, gehen durch Atresie zugrunde (SCHNORR 1996). Für die Bildung der Primordialfollikel ist die Anwesenheit der Oozyte essentiell.

Follikel der frühen Wachstumsphase zeichnen sich durch das Vorkommen von flachen und kubischen Follikelzellen aus. Follikel, die sowohl flache als auch kubische Follikelzellen aufweisen, werden als Intermediärfollikel (Primaten: GOUGEON 1996), aktivierte Primordialfollikel (Rind: FAIR et al. 1997) oder als frühe Primärfollikel (Ratte: OKTAY et al. 1995) bezeichnet. Der Eintritt in die Wachstumsphase ist charakterisiert durch die Proliferation der Granulosazellen und die Größenzunahme der Oozyte.

SCHNORR (1996) definiert einen Follikel mit kubischen bis zylindrischen Epithelzellen als Primärfollikel. In dieser Phase beginnt um die Oozyte der Aufbau der Zona pellucida. Im Sekundärfollikel entsteht aus dem Follikelepithel durch mitotische Teilungen das Stratum granulosum. Um das Stratum granulosum entwickelt sich die Theka folliculi mit der Theka interna und Theka externa. Durch die sekretorische Leistung der Granulosazellen entsteht der Liquor follicularis und schließlich das Antrum folliculare. Man spricht nun von einem Antralfollikel, Tertiärfollikel oder Graafschen Follikel. Um die Oozyte bildet sich der Cumulus oophorus und aus den umgebenen Granulosazellen der Oozyte entsteht die Corona radiata.

### *Follikelatresie*

Die Follikelatresie ist ein physiologischer Prozess, der in allen Follikelwachstumsphasen auftritt. Der Anteil atretischer Follikel ist abhängig von der Follikelgröße und die Follikelatresie kann als Funktion des Follikeldurchmessers beschrieben werden (RAJAKOWSKI 1960, SCHUFFENHAUER et al. 1987, HIRSHFIELD 1991, SCHNORR 1996).

MOSIMANN und KOHLER (1990) beschreiben folgenden Ablauf der Follikelatresie, der mikroskopisch nachweisbar ist. Bei der Atresie von Primär- und Sekundärfollikeln kommt es zunächst zu einer Schrumpfung der Oozyte und zu einer Vesikulierung. Es folgt eine Trennung und Auflösung der Follikelepithelien. Die Basalmembran verschwindet. Die Zona pellucida kollabiert zunächst wellenförmig und nach einiger Zeit löst sie sich unter Vesikelbildung auf. Schließlich wird der atretische Follikel durch Bindegewebszellen aus dem Ovarialstroma überwuchert. Bei Tertiärfollikeln kommt es als erstes zu atretischen Veränderungen an den Follikelepithelzellen und anschließend zu Degenerationserscheinungen an der Oozyte.

---

*Follikulärer Einfluss auf die Entwicklungskompetenz von Oozyten in vitro*

Die Entwicklungskompetenz einer Oozyte, die für die In-vitro-Fertilisation genutzt wird, wird beeinflusst von der Qualität des Follikels aus dem diese Oozyte stammt. In der Literatur finden sich Angaben darüber, dass die Follikelgröße, der Zyklusstand, der Atresieanteil und das Auftreten eines dominanten Follikels einen Einfluss auf die Entwicklungskompetenz der gewonnenen Eizellen haben (PAVLOK et al. 1992, LONERGAN et al. 1994, YANG et al. 1998, HAGEMANN 1999).

Der positive Zusammenhang zwischen Follikelgröße und Entwicklungskompetenz der dazugehörigen Cumulus-Oozyten-Komplexe (COK) wurde in der Literatur mehrfach beschrieben (PAVLOK et al. 1992, LONERGAN et al. 1994, BLONDIN, SIRARD 1995, HELEIL 1999, JOHNSON et al. 2001, MACHATKOVA et al. 2004). BRACKETT und ZUELKE (1993) konnten nachweisen, dass die Mehrzahl der Oozyten aus Follikeln mit einem Durchmesser von 2-6 mm in vitro reifen, aber nur mit einem geringen Prozentsatz das Blastozystenstadium erreichen.

Die Follikelgröße hatte keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Gewinnungsrate von Cumulus-Oozyten-Komplexen (PAVLOK et al. 1992, HELEIL 1999). Für den Einfluss der Follikelgröße auf die Cumulusmorphologie liegen in der Literatur unterschiedliche Angaben vor. HELEIL (1999) konnte eine Häufung von kompakten COK bei Follikeln mit einer Größe von 3-5 mm bei ansonsten gleichmäßiger Verteilung der COK-Klassen nachweisen. Die Untersuchungen von LONERGAN (1994) deuten auf eine Häufung von kompakten COK in Follikeln von > 6 mm hin. BLONDIN et al. (1997) gewannen den größten Anteil kompakter COK aus 2-8 mm großen Follikeln. HELEIL (1999) untersuchte die Chromatinkonfiguration von Oozyten aus verschiedenen Follikelgrößen. Oozyten mit einem Diplotänkern wurden vermehrt in Follikeln ab einer Größe von 3 mm aufgefunden. Für die Reifungskompetenz von Oozyten, definiert durch das Erreichen des Metaphase II-Stadiums, konnte kein Einfluss der Follikelgröße festgestellt werden.

Das Auftreten eines dominanten Follikels hat einen großen Einfluss auf die Entwicklungskompetenz von Oozyten anderer Follikel. Vor dem Auftreten eines dominanten Follikels zeigt ein großer Anteil der Oozyten während der Follikelwachstumsphase eine hohe Entwicklungskompetenz (HAGEMANN 1999). Dies äußert sich in einer erhöhten Blastozystenrate (HAGEMANN et al. 1999). MACHATKOVA et al. (2004) konnten nachweisen, dass der dominante Follikel durch die Inhibition untergeordneter Follikel einen negativen Einfluss auf die Entwicklungskompetenz von Oozyten aus großen und kleinen, nicht jedoch aus Follikeln mittlerer Größe (6-10 mm) besitzt. BLONDIN und SIRARD (1995) konnten bei Follikeln mittlerer Größe unter dem Einfluss eines dominanten Follikels einen

erhöhten Anteil atretischer Follikel nachweisen. Dies hatte jedoch keine Bedeutung für die Entwicklungskompetenz der in den Follikeln enthaltenen Oozyten.

Im Verlauf einer Follikelwelle ist die Entwicklungskompetenz der Oozyten am Tag 1 gering, am Tag 2-5 am höchsten und am Tag 7-8 erneut gering. Diese Dynamik begründet sich in der inhibitorischen Wirkung des dominanten Follikels, der sich ab Tag 3-5 formiert (HANENBERG et al. 1997, HAGEMANN et al. 1999, MACHATKOVA et al. 2000, HENDRIKSEN et al. 2004).

Interessant erscheint die Aussage, dass die beginnende Atresie eines Follikels scheinbar einen günstigen Effekt auf die Entwicklungskompetenz der enthaltenen Oozyte besitzt (WURTH et al. 1992, HENDRIKSEN et al. 2000, VASSENA et al. 2003). Dies wird durch die Untersuchungen von BLONDIN und SIRARD (1995) und von DE WITT und KRUIP (2001) unterstützt, die in atretischen Follikeln eine erhöhte Anzahl COK mit dunklem Cumulus oophorus nachwiesen. Den positiven Einfluss atretischer Follikel auf die Entwicklungskompetenz von Oozyten erklären HENDRIKSEN et al. (2004) mit der Prämaturation von Oozyten (HYTTEL et al. 1997). Prämaturation findet in der Regel während der letzten Phase der präovulatorischen Reifung vor dem LH-Peak statt. Ähnliche Veränderungen konnten jedoch auch in atretischen Follikeln nachgewiesen werden (HYTTEL et al. 1997, SIRARD et al. 1999, HENDRIKSEN et al. 2000).

### **2.1.2. Oogenese**

#### *Bildung und Migration der Primordialkeimzellen*

Die Oogenese beginnt mit der Bildung und Migration der Primordialkeimzellen (Urkeimzellen). Diese Zellen lassen sich beim Rinderembryo ab Tag 18 und beim Menschen in der 4. Schwangerschaftswoche im Entoderm des Dottersackes nachweisen (KANITZ et al. 2001, SCHNORR 1996).

Die Migration der Primordialkeimzellen beginnt beim Rind ab einer Fetustlänge von 15 mm (GORDON 2003). Die Zellen wandern durch amöboide Bewegung vom Entoderm des Dottersackes über das dorsale Gekröse des Enddarmes und die Nierenanlage bis zur Keimdrüsenanlage (Mensch: WITSCHI 1948; Maus: CHIQUOINE 1954; Rind: SCHNORR 1996). Während der Migration durchlaufen die Primordialkeimzellen einige Mitosen. Nach dem Eintreffen der Keimzellen in der Genitalleiste, proliferiert diese und wird im Rinderembryo um den 28. Tag sichtbar.

Die Primordialkeimzellen stammen aus dem germinativen Plasma bestimmter Blastomeren (SCHNORR 1996). Es handelt sich um große Zellen mit rundem Nucleus und einem oder mehreren Nucleoli, kleinen Mitochondrien, endoplasmatischem Retikulum, Polyribosomen,

einzelnen Golgi-Apparaten und Mikrofilamenten, Glykogen und Lipidtropfen (MOTTA et al. 1997). Die Primordialkeimzellen lassen sich durch die hohe Aktivität ihrer alkalischen Phosphatase identifizieren.

### *Oogonien*

Ab dem 41. Trächtigkeitstag sind die Ovarien differenziert. Ab Tag 45 ist die Cortex erkennbar und die Primordialkeimzellen bilden durch Interzellularbrücken sogenannte Keimballen. Es beginnt die Differenzierung zu Oogonien. Diese verlieren die Fähigkeit zur amöboiden Fortbewegung und besitzen eine kugelförmige Gestalt (PICTON 2001). Die Oogonien durchlaufen mehrere Mitosezyklen. Am Ende der mitotischen Proliferation treten die Oogonien in die Prophase der ersten meiotischen Reifeteilung ein und entwickeln sich zu primären Oozyten. Kurz nach dem Erreichen des Diplotänstadium der ersten meiotischen Reifeteilung arretieren die primären Oozyten in dieser Phase (Dictyotän). Als Ergebnis der Proliferation entstehen ca. 2 Millionen Oogonien, von denen jedoch nur ca. 5% zum Zeitpunkt der Geburt noch vorhanden sind.

Seit 1929 hat in der Reproduktionsbiologie die These Gültigkeit, dass die Gesamtpopulation an Keimzellen im weiblichen Organismus, im Gegensatz zum männlichen, mit der Differenzierung von Oogonien zu primären Oozyten festgelegt ist und die Anzahl sich nur noch durch Ovulationen und Atresie verringern kann (PEARL, SCHOPPE 1929).

JOHNSON et al. (2004) liefern in einer aktuellen Untersuchung bei der Maus Hinweise darauf, dass eine Neubildung von Follikeln möglich ist.

### **2.1.3. Oozytenreifung**

Die Oozytenreifung (Maturation) wird definiert als der Prozess zur Erlangung der Fähigkeit zur Fortführung und Vollendung der ersten meiotischen Reifeteilung, die spätere Entwicklung bis zur Metaphase II und das Erlangen der zytoplasmatischen Reife für eine erfolgreiche Fertilisation (EPPIG 1993). Bei der Reifung der Oozyte handelt es sich nicht um die einfache Aktivierung einer ruhenden Gamete, sondern um das Zusammenspiel mehrerer vorbereitender Prozesse. Das Ziel der Oozytenreifung ist die Produktion einer haploiden sekundären Oozyte, die mit dem für eine erfolgreiche Befruchtung und embryonale Entwicklung benötigten biologischen Material ausgestattet ist. Die Maturation stellt das Schlüsselereignis im Verlauf der In-vitro-Produktion von Rinderembryonen dar. Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass die Maturation in vitro schlechtere Resultate liefert als die in vivo (HYTTEL et al. 1986a, 1987, 1989).

Auf den Prozess der Oozytenmaturation wirken sowohl reifungshemmende als auch reifungsfördernde Faktoren ein (HYTTEL et al. 1987, 1997).

Neben Reifungsvorgängen im Nukleus sind für eine erfolgreiche Oozytenreifung strukturelle und biochemische Veränderungen im Zytoplasma (THIBAUT 1977, MOOR et al. 1981, EPPIG 1993) und an den Cumuluszellen (MOOR et al. 1980, EPPIG 1993, ZHANG et al. 1995) von Bedeutung. Zytoplasmatische und nukleäre Reifungsvorgänge laufen parallel ab (HEGELE-HARTUNG et al. 1999). Die nukleäre Reifung verläuft *in vitro* ähnlich wie *in vivo*. Die zytoplasmatischen Reifungsvorgänge zeigen hingegen *in vitro* deutliche Unterschiede (MOTLIK, FULKA 1976). Das Kernstadium einer Oozyte eignet sich daher nicht als alleiniger Parameter für die Qualität eines IVP-Systems (LONERGAN et al. 2003, RODRIGUEZ, FARIN 2004b).

Für den Erwerb der vollen Entwicklungskompetenz müssen die Vorgänge der nukleären und der zytoplasmatischen Reifung aufeinander abgestimmt sein (HEGELE-HARTUNG et al. 1999).

### *Wachstumsphase*

Primäre Oozyten, die sich in der Wachstumsphase befinden, haben nicht die Fähigkeit auf Reifungssignale zu antworten und sind im Diplotän arretiert. Im Verlauf der Wachstumsphase vergrößert die Oozyte ihren Durchmesser von ca. 30 µm auf bis zu 100-130 µm (HYTTEL et al. 1997). Der Durchmesser einer Oozyte ist ein wichtiger Parameter für deren Entwicklungskompetenz.

Oozyten in der Wachstumsphase zeichnen sich durch einen großen Nukleus, auch Germinalvesikel (GV) genannt, aus (SIRARD et al. 1989).

Die Wachstumsphase ist geprägt durch RNA- und Proteinsynthese. In dieser Phase werden die Reserven angelegt, die essentiell sind für die Maturationsvorgänge und die spätere Fertilisation (SHIMIZU et al. 1983). Der angelegte Pool an mRNA ist auch für die Regulation der frühen embryonalen Entwicklung notwendig, da das embryonale Genom erst in einer späteren Entwicklungsphase aktiv ist (MEMILI, FIRST 1999). Dies verdeutlicht, was für eine enorme Bedeutung die Wachstumsphase für die Oozyte besitzt. Die „gelagerte“ mRNA wird nach einem bestimmten Zeitregime translatiert. Dieser Vorgang wird durch zytoplasmatische Polyadenylierungs-Reaktionen gesteuert (RICHTER 1999). KRISCHEK und MEINECKE (2002) konnten *in vitro* bei bovinen COK eine Polyadenylierung bzw. eine Aktivierung von mRNA für Proteine, die für den Germinal vesicle breakdown (GVBD) und die Chromatinkondensation essentiell sind, in den ersten 6 Stunden der Kultivierung feststellen. Von der Synthese bis zur Verwendung der mRNA bzw. der Proteine können einige Wochen vergehen. Hier wird die erstaunliche Leistung der Oozyte deutlich, die als ruhende Zelle bereits Moleküle für ihre spätere Entwicklung synthetisiert und lagert.

---

Nach Abschluss der Wachstumsphase erlangt die Oozyte die Fähigkeit auf Gonadotropine als Reifungssignale zu reagieren.

### *Meiotische Kompetenz und Entwicklungskompetenz*

Während der Follikulogenese ist es für die spätere Entwicklung essentiell, dass die Oozyte eine Reihe von Leistungsmerkmalen erwirbt, die das Entwicklungspotential beeinflussen. Diese Leistungsmerkmale (Kompetenz) beziehen sich auf die Wiederaufnahme und Fortführung der meiotischen Teilung, die Durchführung zytoplasmatischer Reifungsvorgänge, die erfolgreiche Befruchtung mit Verhinderung einer Polyspermie sowie die frühe Phase der embryonalen Entwicklung und die Entwicklung bis hin zu einer transfertauglichen Blastozyste. Man spricht hier von dem Erwerb der Entwicklungskompetenz.

Erst nach dem Abschluss der Wachstumsphase erlangt die Oozyte ihre meiotische Kompetenz (SORENSEN, WASSARMAN 1976; FAIR et al. 1995b; YONG et al. 1997). Die in der Wachstumsphase synthetisierten Transkripte und Proteine sind dabei essentiell für den Erwerb der meiotischen Kompetenz (HYTTEL et al. 1997). Der Begriff der meiotischen Kompetenz bezieht sich nicht auf den Erwerb der Kompetenz für die gesamte Maturation.

Nach EPPIG (1993) lassen sich zwei Phasen im Rahmen des Erwerbes der meiotischen Kompetenz unterscheiden. Die Oozyte muss zunächst die Kompetenz zur Durchführung des Germinal vesicle breakdown (GVBD) bis zum Erreichen der Metaphase I erlangen (GVBD-Kompetenz). Erst nach einer weiteren Entwicklungsphase kann die Oozyte die Kompetenz zur Fortführung der ersten meiotischen Reifeteilung sowie für den Eintritt in die zweite meiotische Reifeteilung bis zur Arretierung in der Metaphase II erlangen (SZYBEK 1972, IWAMATSU, YANAGIMACHI 1975, SORENSEN, WASSARMAN 1976). FAIR et al. (1995) beschreiben den Erwerb der meiotischen Kompetenz während der Wachstumsphase als dreiphasigen Ablauf. Zunächst erwirbt die Oozyte die Fähigkeit zur Durchführung des GVBD. Im zweiten Schritt kann die Oozyte nun die Fähigkeit zum Erreichen der Metaphase I erlangen und im dritten Schritt zum Erreichen der Metaphase II. Der Erwerb der Kompetenz darf nicht als einphasiger, sondern muss als mehrphasiger Prozess gesehen werden, bei dem Differenzierungsvorgänge im Nukleus sowie im Zytoplasma notwendig sind (Maus: KONO et al. 1996).

Die Kompetenz zur Durchführung des GVBD wird *in vitro* in einem ähnlichen Zeitschema wie *in vivo* erreicht. CANIPARI et al. konnten dies bei Mäuseoozyten vor allem bei der Maturation in Cokultur mit somatischen Zellen feststellen.

WICKRAMASINGHE et al. (1991) haben die Unterschiede von GVBD-kompetenten und GVBD-nicht kompetenten Oozyten untersucht. Bei inkompetenten Oozyten befindet sich das Chromatin diffus verteilt im Nukleus (Germinalvesikel – GV), während das Chromatin in kompetenten Oozyten sich zu einem dichten Ring um die Nukleoli formiert. Diese Formierung wird in der Literatur auch als Sn (surrounded nucleolus)-Konfiguration bezeichnet. Sie ist zum Zeitpunkt der Antrumbildung des Follikels, der Unterdrückung der Transkription in der Oozyte sowie zum Zeitpunkt des Imprinting der maternalen Allele nachweisbar (BAO et al. 2000, DE LA FUENTE, EPPIG 2001). Während der Erlangung der meiotischen Kompetenz kommt es zu einer charakteristischen Umorganisation der Mikrotubuli (EPPIG 1993, COMBELLES, ALBERTINI 2001). Diese Mikrotubuli zeigen in inkompetenten Oozyten eine diffuse Verteilung im Zytoplasma, während in kompetenten Oozyten eine Verringerung und Zentrierung der Mikrotubuli perinukleär nachweisbar ist (MATTSON, ALBERTINI 1990, WICKRAMASINGHE et al. 1991). Des Weiteren lassen sich in kompetenten Oozyten bestimmte Proteine nachweisen, die in meiotisch inkompetenten Oozyten fehlen. In kompetenten Oozyten konnten WICKRAMASINGHE et al. (1991) das für die M-Phase spezifische Phosphoprotein MPM-2 identifizieren.

Der Erwerb der meiotischen Kompetenz ist assoziiert mit einem Anstieg der Proteinkinase p34<sup>cdc2</sup> (STOJKOVIC et al. 1999). Untersuchungen an wachsenden Oozyten der Maus konnten jedoch zeigen, dass der Erwerb der meiotischen Kompetenz nicht allein von p34<sup>cdc2</sup> abhängig ist, sondern dass eine posttranslatorische Veränderung stattfinden muss (FULKA et al. 1998).

Unter Entwicklungskompetenz wird im Allgemeinen die Fähigkeit einer Oozyte verstanden, sich nach erfolgreicher Fertilisation zu einer Blastozyste zu entwickeln. Als Parameter für die Entwicklungskompetenz einer Oozyte wird daher häufig die Blastozystenrate herangezogen. Dies wird jedoch von einigen Autoren auch kritisch diskutiert (DURANTHON, RENARD 2001).

Die Identifizierung von Faktoren, die den Erwerb der meiotischen Kompetenz bzw. der Entwicklungskompetenz beeinflussen, sowie die Identifizierung von Merkmalen kompetenter Oozyten sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Wie unter Kapitel 2.1.1. bereits erläutert spielt die Follikelgröße und –morphologie eine zentrale Rolle bei dem Erwerb der Entwicklungskompetenz durch die Oozyte.



Des Weiteren wurde die Oozytengröße als bedeutsam in diesem Zusammenhang dargestellt. HYTTEL et al. (1997) konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass die Mehrzahl der Oozyten mit einem Durchmesser von 100 µm eine meiotische Kompetenz aufwies. Ab einem Durchmesser von 110 µm hatte die Mehrzahl der Oozyten die Fähigkeit erlangt, die Metaphase II zu erreichen. ARLOTTA et al. (1996) wiesen bei Oozyten mit einem Durchmesser von 110 µm vermehrt die Kompetenz zur embryonalen Entwicklung nach. Der Anstieg der Entwicklungskompetenz mit der Zunahme des Oozytendurchmessers und die Tatsache, dass Oozyten mit einem Durchmesser von 110-130 µm die größte Reifungs- und Entwicklungskompetenz aufweisen, wird durch zahlreiche Untersuchungen bestätigt (GAVIN et al. 1991, FAIR et al. 1995, HYTTEL et al. 1997, 1999, BECKERS et al. 1996, OTOI et al. 1997, ALBERTINI et al. 2003).

DE LOOS et al. (1992) beschreiben eine große morphologische Variabilität bei entwicklungs kompetenten Oozyten. Die Untersuchungen von COGNIE et al. (1998) an Oozyten von Schafen, bei denen eine Genmutation vorlag, konnten den Hinweis auf einen genetischen Einfluss im Bezug auf den Erwerb der meiotischen Kompetenz bzw. der Entwicklungskompetenz liefern.

ROBERT et al. (2001) untersuchten die Eignung der Genexpression in bovinen somatischen Follikelzellen als Marker für die Entwicklungskompetenz von Eizellen und konnten in diesem Bereich Zusammenhänge nachweisen.

Die intakte Verbindung zwischen der Oozyte und ihren umgebenen Cumuluszellen ist nicht nur essentiell für eine physiologische Follikelentwicklung, sondern besitzt des Weiteren eine Bedeutung für den Erwerb der Entwicklungskompetenz (EPPIG et al. 2002, MATZUK et al. 2002).

Die Tatsache, dass in vivo gereifte Oozyten im Vergleich zu in vitro gereiften ein besseres Entwicklungspotential besitzen, zeigt die Möglichkeit der Verbesserung der In-vitro-Maturation auf. Durch die Aufklärung der in vivo Bedingungen kann eine Verbesserung der in vitro-Bedingungen erreicht werden. Das häufigste Ziel bei Manipulationen im Rahmen der In-vitro-Maturation zur Verbesserung des Entwicklungspotentials von Oozyten ist die Hemmung der nukleären Reifung, um der Oozyte Zeit für die Vollendung der wichtigen zytoplasmatischen Reifung zu geben. BLONDIN et al. (2002) konnten durch eine Manipulation des Follikelwachstums in vivo durch FSH-Gaben bzw. durch eine anschließende Restriktion eine Verbesserung der Entwicklungskompetenz bei bovinen Oozyten erreichen. Durch die Manipulation der follikulären Wachstumsrate wird der Erwerb der Entwicklungskompetenz durch eine verbesserte zytoplasmatische Reifung positiv beeinflusst. Dies ist zu erklären durch den inhibitorischen Effekt, den der Follikel auf die nukleäre Reifung der Oozyte ausübt.

Ein anderer Ansatz zur Manipulation der Oozytenmaturation wird mit der Blockierung der Kernreifung durch die Verwendung von reversiblen Meioseinhibitoren (z.B. Butyrolacton) oder anderen Faktoren (FSH, Progesteron, cAMP-Analoga) in Reifungsmedien verfolgt (KUBELKA et al. 2000, LONERGAN et al. 2000, MERMILLOD et al. 2000, GUIXUE et al. 2001, PONDERATO et al. 2001, SIRARD 2001, HASHIMOTO et al. 2002). Auch für diesen Ansatz gilt das bereits oben diskutierte Prinzip.

## **2.2. Ultrastrukturelle Vorgänge während der Maturation**

### **2.2.1.1. Reifungsvorgänge im Zellkern**

Die In-vitro-Maturation bei Säugetieroozyten wurde zuerst 1935 von PINCUS und ENZMANN beschrieben.

Als Kernreife wird das Erreichen des Metaphase-Stadiums der zweiten meiotischen Teilung verstanden (TROUNSON et al. 1977). Der Ablauf der nukleären Reifung ist in seinen Grundzügen bei allen Wirbeltieren ähnlich.

*Wiederaufnahme der Meiose und Germinal Vesicle Breakdown (GVBD)*

Vor dem Beginn der nukleären Maturation befindet sich der Nukleus (Germinalvesikel – GV) der primären Oozyte im Diplotän der Prophase der ersten meiotischen Teilung (Diktyotänstadium). In dieser Phase liegen die Chromosomen als diffuse Bivalente im Karyoplasma vor (WASSARMAN, ALBERTINI 1994). In vivo vollzieht sich die Wiederaufnahme der Meiose als Antwort auf den LH-Peak vor der Ovulation (SIRARD et al. 1989).

Schon sehr früh wurde das Phänomen beschrieben, das die Wiederaufnahme der Meiose in vitro spontan erfolgt (PINCUS, ENZMANN 1935, EDWARDS 1965). Als deutliches Zeichen für die Wiederaufnahme der Meiose gilt im Allgemeinen die Auflösung der Kernmembran (GORDON 2003). Beim Hund (TESORIERO 1982) gehört auch eine gesteigerte Lipidsynthese zu den ersten Zeichen der beginnenden Maturation. Die Auflösung der Kernmembran wird als Germinal vesicle breakdown (GVBD) bezeichnet (EPPIG 1993, WASSARMAN, ALBERTINI 1994) und wird über die Phosphorylierung von MPF (maturation promoting factor) durch eine Zerstörung des laminären Netzwerkes verursacht (EPPIG 1993). Nach SIRARD et al. (1989) ist der GVBD in vitro bei der Mehrzahl der bovinen Oozyten nach ca. 6,5 h Kultivierung nachweisbar. In vivo wird der GVBD ca. 4-8 h nach dem LH-Peak beobachtet (GORDON 2003). Tabelle 1 zeigt die Terminierung des GVBD in vitro bei verschiedenen Spezies.

**Tab. 1** Terminierung des GVBD bei verschiedenen Spezies (nach EPPIG 1993)

Spezies	Maturationszeit (h)	Literatur
Maus	1-2	SCHULTZ et al. 1983
Ratte	3-4	DEKEL, BEERS 1978
Rind	6-8	SIRARD et al. 1989
Schwein	16-24	MOTLIK, FULKA 1976

Neben der Auflösung der Kernmembran ist der GVBD durch die Auflösung des Nucleolus, die Chromatinkondensation und den Aufbau des Spindelapparates gekennzeichnet (Maus: DONAHUE 1968, Mensch: SANTHANANTHAN et al. 1991, Pferd: GRONDAHL et al. 1995, Schwein: MOTLIK, FULKA 1976, CRAN 1985, Rind: MOTLIK et al. 1978, KRUIP et al. 1983, HYTTEL et al. 1986b). In Oozyten von Kaninchen wird die Chromatinkondensation bereits vor dem Beginn der Maturation beobachtet (MOTLIK et al. 1989).

In porcinen, bovinen und ovinen Oozyten ist eine aktive Proteinsynthese für die Durchführung des GVBD essentiell (INOUE et al. 1996, GORDON 2003). In den Oozyten der Maus spielt die Proteinsynthese keine Rolle im Rahmen des GVBD, sondern erst in späteren Meiosestadien (SCHULTZ, WASSARMAN 1977, MOTLIK, RIMKEVICOVA 1990).

Die spontane Auslösung des GVBD in vitro beruht auf der Freisetzung der Oozyte aus ihrem Follikel und dem damit verbundenen Wegfall des Einflusses follikulärer Inhibitoren (MOTLIK, FULKA 1986, MOOR, CROSBY 1986, HUNTER, MOOR 1987). Über die genaue Wirkungsweise dieser Inhibitoren herrscht noch nicht vollständige Klarheit. Als gesichert gilt, dass die Auslösung des GVBD nicht alleine durch die Wirkung von Hormonen initiiert wird (PINCUS, ENZMANN 1935, EDWARDS 1965). Auch ohne eine hormonelle Stimulation kommt es in vitro zu einer spontanen Wiederaufnahme der Meiose. Die hormonelle Schlüsselrolle bei der Regulation der Maturation in vitro spielt wahrscheinlich FSH. LH spielt eher eine untergeordnete Rolle (murine Oozyten: RODRIGUEZ et al. 2002). Die Wirkung von FSH auf die Wiederaufnahme der Meiose wird über cAMP als Second messenger vermittelt (WEBB et al. 2002). Es liegen jedoch auch Hinweise dafür vor, dass die nukleäre Reifung durch FSH verzögert wird (Rind: IZADYAR et al. 1998).

Für die Wirkung von LH als Auslöser des GVBD in vivo werden verschiedene Hypothesen diskutiert. Zum einen ist es möglich, dass LH eine Lockerung der Gap junctions auslöst und dadurch der Übertritt inhibitorischer Substanzen blockiert wird (LARSEN et al. 1987).

Dies wäre auch eine mögliche Erklärung für den Ablauf des spontanen GVBD in vitro nach der Entfernung aus dem Follikel. Eine andere Möglichkeit wäre die Produktion eines GVBD-induzierenden Signals in den Granulosazellen als Antwort auf LH (DOWNS et al. 1988).

Eine entscheidende Rolle bei der Regulation zur Wiederaufnahme der Meiose spielen die somatischen Zellen des Follikels (AKUFO et al. 1988). Durch eine Kokultivierung von Oozyten mit Granulosa- oder Thekazellen kann der GVBD verhindert werden. Dieser inhibitorische Effekt ist jedoch dosis- und zeitabhängig und kann durch Serum- oder Gonadotropinzusätze verhindert werden. Geringere Mengen an Granulosazellen sind in Kombination mit Gonadotropinen sogar in der Lage die Fortführung der Meiose zu stimulieren (SIRARD, BILODEAU 1990, EPPIG 1993, RICHARD, SIRARD 1996). Der inhibitorische Effekt der Granulosazellen wird verstärkt, wenn der Kontakt zwischen Granulosazellen, Cumuluszellen und Oozyte bestehen bleibt und/oder Follikelflüssigkeit vorhanden ist (Rind: SIRARD et al. 1992, Maus, Hamster: RACOWSKY, BALDWIN 1989). Es werden hauptsächlich zwei mögliche Reaktionswege für inhibitorische Faktoren diskutiert. Es besteht die Möglichkeit, dass diese Faktoren in den somatischen Zellen gebildet werden und entweder über die Follikelflüssigkeit oder über Gap junctions auf die Oozyte einwirken (RICHARD, SIRARD 1996, 1996b, DOWNS 2001). Des Weiteren kommt auch die Bildung inhibitorischer Faktoren durch die Oozyte selbst in Betracht. Die Produktion eines maturationshemmenden Faktors (OMI) konnte bei Granulosazellen nachgewiesen werden. Bei dem Erhalt des Kontaktes zwischen Granulosazellen und Cumuluszellen wird OMI gleichmäßig an die Oozyte weitergegeben (SIRARD et al. 1992). Den Einfluss von Faktoren (z.B. Purine, Nukleotide) in der Follikelflüssigkeit auf die Wiederaufnahme der Meiose konnten DOWNS et al. (1989) für Oozyten der Maus nachweisen. Beim Rind scheinen im Rahmen der Regulation Unterschiede zu den Verhältnissen bei der Maus vorzuliegen (SIRARD et al. 1988).

Kurz vor Beginn des GVBD wird ein Abfall des intrazellulären cAMP-Spiegels ( $cAMP_i$ ) in der Oozyte beobachtet (DOWNS, EPPIG 1984, EPPIG 1989, DOWNS 1995, RODRIGUEZ, FARIN 2004b). Dieser Abfall wird vermutlich durch den Wegfall eines folliculären Signals nach der Entfernung der Oozyte aus dem Follikel verursacht. Der Abfall von  $cAMP_i$  führt zu einer Inaktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A, zu einer Aktivierung der Phosphodiesterase 3A und zur Auslösung des GVBD (RICHARD et al. 2001, CONTI et al. 2002). Durch die Zugabe von Faktoren zum Kultivierungsmedium, die hohe cAMP-Werte in der Oozyte gewährleisten (Phosphodiesterase-Inhibitoren, cAMP-Analoga, Stimulatoren der Adenylatzyklase), kann eine spontane Maturation in vitro verhindert werden (ABERDAM et al. 1987, EPPIG 1989, CONTI et al. 1998).

Neben cAMP konnte auch für Purine und Adenosine ein Einfluss im Rahmen der Regulation der Meiose festgestellt werden (EPPIG 1993).

Der Einfluss von freiem Calcium wird in der Literatur kontrovers beschrieben. In einigen Untersuchungen wurde eine Induktion des GVBD durch den Anstieg von freiem Calcium nachgewiesen (Maus: POWERS et al. 1982, Hamster: RACOWSKY 1986), während in neueren Untersuchungen kein Einfluss von Calcium festgestellt werden konnte (TOMBES et al. 1992).

### *Strukturelle Vorgänge während der Meiose*

Im Anschluss an den GVBD treten die Chromosomen in die Metaphase der ersten meiotischen Teilung (Metaphase I - MI) ein. Der Spindelapparat bildet sich aus und die Chromosomen ordnen sich im Bereich der Äquatorialebene an (HYTTEL et al. 1987). Die korrekte Positionierung der Chromosomen wird durch Mikrotubuli und Mikrofilamente gewährleistet (KIM et al. 2000). In der folgenden Anaphase (AI) werden die homologen Chromosomen durch die Spindelfasern zu den Polen gezogen. Die Telophase (TI) ist gekennzeichnet durch die Zytoplasmateilung. Die erste Reifeteilung wird mit der Ausschleusung des 1. Polkörpers abgeschlossen.

Die Oozyte tritt nun in die Metaphase (Metaphase II – MII) der zweiten meiotischen Teilung ein. Das Chromatin kondensiert erneut und die Chromosomen werden sichtbar. Es erfolgt die Trennung der Chromatiden und die Ausschleusung des 2. Polkörpers. Die Oozyte arretiert in der MII und die zweite Reifeteilung wird erst durch die Penetration eines Spermiums oder durch die Aktivierung der Oozyte beendet (SCHNORR 1996, GORDON 2003).

### *Bedeutung von Kinasen im Rahmen der Regulation der Maturation*

Im Rahmen der Maturation spielen die Kinasen MPF (Maturation-promoting factor) und MAPK (Mitogen-activated protein kinase) durch die Regulierung von Proteinphosphorylierungen und Dephosphorylierungen eine entscheidende Rolle (FAN, SUN 2004).

**MPF** gilt als ein universeller Regulator des Zellzyklus im Bereich der Mitose und der Meiose. Es handelt sich um eine Proteinkinase, die aus zwei Untereinheiten besteht: p34<sup>cdc2</sup> als katalytische Einheit und Cyclin B als regulatorische Einheit (GAUTIER et al. 1989). Für die Erhaltung der Arretierung der Oozyte in der MII ist die hohe Aktivität des MPF verantwortlich (NURSE 1990). Wie bereits erwähnt ist im Zusammenhang mit dem Erwerb der meiotischen Kompetenz ein Anstieg von p34<sup>cdc2</sup> feststellbar.

MPF zeigt während der Maturation einen typischen Verlauf. Vor dem GVBD ist die Aktivität von MPF gering, während sie in der MI und der MII die höchsten Werte aufweist. Zwischen diesen beiden Phasen fällt die Aktivität auf ein Minimum ab (GORDON 2003). Dieser Verlauf zeigt die Bedeutung von MPF für den GVBD und die Chromatinkondensation (MOTLIK, KUBELKA 1990b). Bei bovinen Oozyten konnten WU et al. (1997) einen Abfall der MPF-Aktivität nach 30 Stunden Reifungszeit feststellen und nach 40 Stunden wies die Mehrzahl der Oozyten nur noch minimale Aktivitätswerte auf. Die Aktivierung von MPF ist an die Aktivität von MAPK gekoppelt. Eine Ausnahme stellen hierbei die Oozyten der Maus dar (STOJKOVIC et al. 1999).

**MAPK** (extracellular-regulated kinase – ERK) ist eine Proteinkinase, die in 2 Isoformen (ERK1, ERK2) vorkommt. Aktiviert wird diese durch die Phosphorylierung von Threonin und Tyrosin durch die MAPK-Kinase (SUN et al. 1999). Die MAPK-Kinase wird durch MOS, das Produkt des Protoonkogens c-mos, aktiviert. MOS gilt im Allgemeinen als übergeordneter Regulator für MPF und MAPK.

Tabelle 2 fasst die Funktionen der MAPK im meiotischen Zellzyklus bei Säugetieren zusammen.

**Tab. 2** Funktionen der MAPK im meiotischen Zellzyklus beim Säugetier

(mod. nach Sun, Fan 2004)

Meioseprozess	Funktion der MAPK
Wiederaufnahme der Meiose	notwendig bei gonadotropin-induzierter Wiederaufnahme, nicht bei spontaner Wiederaufnahme
GVBD - MI	Regulierung der Formierung des Spindelapparates
MI - MII	Regulierung der asymmetrischen Teilung
Arretierung in der MII	Beibehaltung der Arretierung, Regulierung des Spindelapparates
Ausschleusung des 2. Polkörpers	Beteiligung an dem Prozess der Ausschleusung

Der Ablauf der MAPK-Aktivierung ist speziesabhängig. In bovinen Oozyten wird eine Aktivierung von MAPK und MPF nach ca. 6 h Reifungszeit beobachtet (FISSORE et al. 1996). In caprinen Oozyten hingegen tritt eine Aktivierung der MAPK erst nach 10 - 12 h (DEDIEU et al. 1996) und in porcinen Oozyten erst nach einer Reifungszeit von 18 h auf (INOUE et al. 1995). Die Aktivierung der MAPK beginnt etwas später als die des MPF und steigt mit dem Verlauf der ersten meiotischen Teilung bis zur MI an. Im Gegensatz zum Verlauf der Aktivität des MPF weist die Aktivität der MAPK zwischen MI und MII keinen Abfall

auf, sondern verbleibt auf hohem Niveau (SUN, FAN 2004). Untersuchungen haben gezeigt, dass die spontane Auslösung des GVBD nicht abhängig von der MAPK-Aktivität ist, aber dass ein künstlich herbeigeführter Anstieg dieser Aktivität einen beschleunigten GVBD hervorruft (FISSORE et al. 1996, JOSEFSBERG et al. 2003).

In Oozyten des Schweines und der Maus wurde ein Zusammenhang zwischen der MAPK und der Formierung des Spindelapparates festgestellt (FAN, SUN 2004).

### **2.2.1.2. Reifungsvorgänge im Zytoplasma**

Die zytoplasmatische Reifung begleitet die Kernreifungsprozesse und steht mit diesen in Wechselwirkung (EPPIG 1993, 1996). Das Ziel dieser zytoplasmatischen Reifungsvorgänge besteht in der Vorbereitung des Zytoplasmas auf eine erfolgreiche, monosperme Befruchtung und die spätere embryonale Entwicklung. Da die zytoplasmatische Reifung länger dauert als die Kernreifung, bedeutet eine abgeschlossene Kernreifung nicht zwangsläufig, dass die Oozyte die vollständige Befruchtungs- und Entwicklungskompetenz besitzt (Kaninchen: CHANG 1955, Rind: LEIBFRIED-RUTLEDGE et al. 1987). Die Veränderungen während der Zytoplasmareifung betreffen sowohl die Ultrastruktur des Ooplasmas als auch biochemische Funktionen (THIBAUT 1977, THIBAUT et al. 1987, EPPIG 1993, HYTTEL et al. 1987, 1997) und verlaufen in vivo und in vitro nach einem ähnlichen Prinzip (HYTTEL 1986, 1986b, 1989). Für eine physiologische zytoplasmatische Maturation sind Makromoleküle und andere Faktoren notwendig (EPPIG 1993). Nach MERMILLOD et al. (1999) ist die zytoplasmatische Reifung essentiell für den Erwerb der Entwicklungskompetenz. SCHOEVERS et al. (2003) führen Defizite in der Entwicklungskompetenz auf Abnormalitäten der zytoplasmatischen Reifung zurück, während die Kernreifung scheinbar normal abläuft.

Die Bestimmung von Parametern für eine erfolgreiche zytoplasmatische Reifung ist im Gegensatz zu den Verhältnissen bei der Kernreifung aufgrund der komplexen Veränderungen schwierig. In der Literatur werden als Parameter häufig die Polarität der Oozyte, die räumlichen Verteilungsmuster der Organellen und/oder die Lokalisation der kortikalen Granula herangezogen (GARDNER 1996). FUNAHASHI und DAY (1993) definierten für ihre Untersuchungen beim Schwein die Formierung der Vorkerne als Parameter für eine erfolgreich abgelaufene zytoplasmatische Reifung.

Im Verlauf der zytoplasmatischen Reifung wird die während der Oogenese akkumulierte mRNA der Translation zugeführt (EPPIG 1993). Während der zytoplasmatischen Reifungsvorgänge kommt es zu einer Veränderung des produzierten Proteinmusters (BLERKOM 1977, MOTLIK, FULKA 1986, EROGLU, MEINECKE 1990, SCHRÖTER, MEINECKE 1995).

Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Zugabe von Hormonen, vor allem von FSH, die zytoplasmatische Reifung positiv beeinflusst (KEEFER et al. 1993, SCHOEVERS et al. 2003).

Bereits während der Wachstumsphase der Oozyte kommt es zu zahlreichen Umstrukturierungen der einzelnen Organellen im Zytoplasma (HYTTEL et al. 1997).

Die Anzahl der **Golgi-Apparate** steigt im Verlauf der Wachstumsphase an (FAIR et al. 1995b). Die Sacculae der Golgi-Apparate werden deutlicher und es sind vermehrt Vakuolen und Lipidtropfen nachweisbar. Nach Beginn der Reifung fällt die Anzahl der Golgi-Apparate bei Oozyten in der MI stark ab. Bei der Mehrzahl der Oozyten, die sich in der MII befinden werden keine Golgi-Apparate mehr beobachtet (HYTTEL et al. 1997). SATHANANTHAN (2003) beschreibt die höchste Aktivität der Golgi-Komplexe bei humanen Oozyten in der Wachstumsphase und im GV-Stadium.

Das **glatte endoplasmatische Retikulum (sER bzw. gER)** kann in 2 unterschiedlichen Formen im Ooplasma vorliegen. Zum einen als isolierte vesikulierte Form, die im Ooplasma gleichmäßig verteilt vorkommt oder in Form von großen peripheren Aggregaten. Während der präovulatorischen Reifung kann ein Anstieg des sER beobachtet werden. Die Funktion des sER im Ooplasma liegt wahrscheinlich in der Synthese von Lipiden und Steroiden (Mensch: SATHANANTHAN 2003).

Das **rauhe endoplasmatische Retikulum (rER)** ist in wachsenden Oozyten nachweisbar und fehlt in reifen Oozyten. Erst in der späteren embryonalen Entwicklung im Stadium der Morula bzw. der Blastozyste werden rER erneut beobachtet (Mensch: SATHANANTHAN, TROUNSON 2000).

**Lysosomen** kommen in verschiedenen Formen im Ooplasma vor. Primäre Lysosomen sind klein und kommen in reifen Oozyten nur vereinzelt vor. Ihre Anzahl nimmt im Verlauf der embryonalen Entwicklung zu. Sekundäre und tertiäre Lysosomen sind in Oozyten im GV-Stadium nachweisbar. Lysosomen werden zusammen mit Phagosomen oder in multivesikulären Körperchen gefunden (Mensch: SATHANANTHAN 2003).

Eine erste geringgradige Ansammlung von **cortikalen Granula** wird in Oozyten der Sekundärfollikel beobachtet. Sie entstehen in den oberflächigen Golgi-Komplexen während der Wachstumsphase und dem GV-Stadium (Mensch: SATHANANTHAN, TROUNSON 1982, Rind: GORDON 2003). Im frühen Tertiärfollikel steigt die Anzahl dieser Granula und eine Clusterbildung ist nachweisbar. In maturen Oozyten formieren sich die cortikalen Granula in ein bis zwei Lagen entlang des Oolemma. Diese Formierung ist essentiell für die Ausbildung des Polyspermieblockes (SZÖLLÖSI et al. 1967, CONNORS et al. 1988).

Die **Mitochondrien** stellen die stärkste Organellenfraktion im Ooplasma dar (SATHANANTHAN 2003). Sie zeigen in meiotisch aktiven und reifen Oozyten eine



Umverteilung im Ooplasma und eine Veränderung ihrer Form (s. Kap. 2.2.2.). In Oozyten der Primordialfollikel sind bereits Mitochondrien nachweisbar. Sie besitzen eine runde Form und formieren sich um den Nukleus. Im frühen Tertiärfollikel steigt die Anzahl an Mitochondrien und es treten vermehrt längliche Mitochondrien auf. Während der Reifung finden sich häufig Aggregationen von Mitochondrien mit Lipidtropfen (HYTTEL et al. 1997).

Im Allgemeinen ist das Zytoplasma einer unreifen Oozyte durch cortikale Granula in Clusterform, viele membrangebundene Vesikel, ein ausgedehntes sER, periphere Mitochondrien sowie gut entwickelte periphere Golgi-Apparate gekennzeichnet (KRUIP et al. 1983; Hyttel et al. 1986b). Die mature Oozyte zeichnet sich durch reduzierte Golgi-Apparate, diffus verteilte Mitochondrien sowie eine gleichmäßige Verteilung der cortikalen Granula im Bereich des Oolemma aus (HYTTEL et al. 1986b). Im Verlauf der zytoplasmatischen Reifung kommt es zu einer Vergrößerung des perivitellinen Spaltraumes (KRUIP et al. 1983). Die Verteilung der cortikalen Granula gilt als eines der letzten strukturellen Ereignisse der Maturation (HYTTEL et al. 1989).

Obwohl die Veränderungen während der zytoplasmatischen Maturation *in vivo* und *in vitro* in ihren Grundzügen ähnlich sind, können einige Unterschiede festgestellt werden (DE LOOS et al. 1989, 1992). *In vivo* ist die Cortikalregion nach der zytoplasmatischen Umstrukturierung frei von Organellen und nur die cortikalen Granula sind in der Nähe der Plasmamembran aufgereiht. Bei *in vitro* maturierten Oozyten fehlt diese freie Cortikalregion oft, vor allem bei Oozyten mit expandiertem Cumulus oophorus. Des Weiteren fehlt bei diesen Oozyten häufig die Formierung der cortikalen Granula. Als eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wird bei humanen Oozyten von SZÖLLÖSI et al. (1986) eine Exozytose vor der Reifung angegeben. Die *in vivo* charakteristische Assoziation von Lipiden und endoplasmatischem Retikulum fehlt bei ca.  $\frac{3}{4}$  der *in vitro* gereiften humanen Oozyten. Des Weiteren finden sich nach *In-vitro*-Maturation häufiger degenerative Erscheinungen.

### **2.2.1.3. Reifungsvorgänge in den Cumuluszellen und ihre Bedeutung**

Während der Reifung kommt es neben den Veränderungen am Nukleus und dem Zytoplasma zu Reifungsvorgängen in den Cumuluszellen. Die Cumuluszellen erfüllen eine wichtige Funktion im Rahmen der Regulation der nukleären und zytoplasmatischen Maturation und beeinflussen die Vorgänge der Ovulation und der Fertilisation.

Die Cumuluszellen werden definiert als eine spezielle Gruppe von Granulosazellen, die in einer extrazellulären Matrix eingebettet sind (YUDIN et al. 1988). Sie bilden den Cumulus

oophorus (Eihügel) um die Oozyte. Dieser besteht bei der Maus aus ca. 3000-5000 Cumuluszellen (ZHUO, KIMATA 2001). Die Cumuluszellen formieren zusammen mit muralen Granulosazellen und der Oozyte ein Synzytium (BUCCIONE et al. 1990).

Im Verlauf der Reifung kommt es zu einer Cumulusexpansion (MOOR et al. 1980, ZHANG et al. 1995) bzw. Muzifikation (EPPIG 1982). Diese ist gekennzeichnet durch eine enorme Größenzunahme des Cumulus oophorus und der Bildung einer extrazellulären Matrix (ZHUO, KIMATA 2001). Die extrazelluläre Matrix ist reich an Hyaluronsäure, Proteoglykanen und Proteinen. Die Sekretion der Hyaluronsäure erfolgt durch die Cumuluszellen. In vivo kann erstmals 2-3 Stunden nach einer Gonadotropinstimulation eine Syntheseaktivität nachgewiesen werden. Die Synthese der Hyaluronsäure erreicht ein Maximum nach 4-10 Stunden und ist nach 18 Stunden nicht mehr nachweisbar (BUCCIONE et al. 1990, TIRONE et al. 1997). Die Ablagerung der extrazellulären Matrix wird durch das Zytoskelett der Cumuluszellen beeinflusst (SUTOVSKY et al. 1995). Nach Gonadotropinstimulation sind eine Elongation und Polarisation der Cumuluszellen sowie eine Umverteilung der Mikrofilamente und eine Ausdehnung der Mikrotubuli nachweisbar. ALLWORTH UND ALBERTINI (1993) konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass nach 10 Stunden Reifung aktinreiche Areale überwiegen, während gegen Ende der Reifungszeit nach 24 Stunden die aktinreichen Bezirke abnehmen und dafür vermehrt mikrotubulireiche Bereiche nachweisbar sind.

GILULA et al. (1978) vermuten als Auslöser der Cumulusexpansion einen Plasminogenaktivator, der von Oozyten und Cumuluszellen sezerniert wird (CHOI et al. 1998). Als Wirkungsweise wird die Umwandlung des in der Follikelflüssigkeit enthaltenen Plasminogen in eine Plasminprotease durch den Plasminogenaktivator postuliert. Diese Umwandlung resultiert in der Desintegration des Cumulus-Oozyten-Komplexes.

Die Kommunikation zwischen somatischen Zellen und Oozyte ist essentiell für eine physiologische Oogenese und Follikulogenese (BUCCIONE et al. 1990). Sie wird zum einen vermittelt durch humorale (kontaktunabhängig) Interaktion und zum anderen über Gap junctions (kontaktabhängig) (GRAZUL-BILSKA et al. 1997, EPPIG 1991b, 2000, GRANOT-DEKEL 2002).

Diese enge Verbindung ist notwendig zum Austausch metabolischer Stoffe und von Signalmolekülen (GILULA et al. 1978, BUCCIONE et al. 1990). Dadurch beeinflussen die Cumuluszellen die Oozyte und gleichzeitig hat die Oozyte Einfluss auf die Expansion der Cumuluszellen. Es handelt sich also bei der Kommunikation zwischen Cumuluszellen und Oozyte um eine reziproke Beziehung.

Durch die Cumulusexpansion werden die Verbindungen zwischen den Cumuluszellen und zwischen den Cumuluszellen und der Oozyte gelockert (HYTTEL et al. 1986, SÜSS et al.

1990, EPPIG 1991, SUZUKI et al. 2000). In vivo ist der Kontakt 19 Stunden nach dem LH-Peak vollständig aufgehoben (HYTTEL et al. 1989).

Die Verbindung zwischen den Cumuluszellen untereinander und mit der Oozyte wird durch Gap junctions vermittelt. Bei Gap junctions handelt es sich um einen Zell-Zell-Kanal. Ein Kanal besteht aus zwölf Molekülen Connexin, einem Transmembranmolekül. Aus sechs Molekülen entsteht ein Connexon bzw. Hemikanal. Zwei Connexone bilden den vollständigen Kanal (STRYER 1996). Connexine werden über ihr Molekulargewicht klassifiziert und bei den verschiedenen Spezies kommen unterschiedliche Formen vor (GRAZUL-BILSKA et al. 1997). Connexin 43 ist das häufigste Connexin und spielt eine zentrale Rolle im Rahmen der Keimzellentwicklung und der postnatalen Follikulogenese (HAEFLIGER et al. 2001). Connexin 43 ist bei den meisten Spezies im Bereich der Zellgrenzen zwischen Granulosazellen und Cumuluszellen, an der Schnittstelle von Cumuluszellen und Oozyte sowie auf der Innenseite der Zona pellucida nachweisbar (Rind: JOHNSON et al. 1999, NUTTINCK et al. 2000, Schaf: PANT et al. 2005, Schwein: LENHART et al. 1998). Die Anzahl nachweisbarer Gap junctions nimmt mit der Größe der Follikel zu und der Gehalt an Connexin 43 nimmt am Ende der Reifung ab (PANT et al. 2005).

**Tab. 3** Einfluss der Cumuluszellen auf die Oozyte

<b>Einfluss der Cumuluszellen auf die Oozyte</b>	<b>Autoren</b>
Formierung der Primordialfollikel	EPPIG 1997
Versorgung der wachsenden Oozyte mit nutritiven Faktoren (Kohlenhydratvorstufen, Aminosäuren, Nucleotide)	BROWER, SCHULTZ 1982
Modulierung der Transkriptionsaktivität	DE LA FUENTE, EPPIG 2001
Koordinierung der nukleären und zytoplasmatischen Reifung	CARABATSOS et al. 2000
Bedeutung bei der Wiederaufnahme der Meiose	VOZZI et al. 2001
Fertilisation	GORDON 2003
Regulierung der RNA-Synthese	GORDON 2003
Förderung der Aufnahme der ovulierten Oozyte durch den Eileiter in vivo	GORDON 2003

Durch den engen Kontakt mit der Oozyte beeinflussen die Cumuluszellen das Wachstum der Oozyte und die zytoplasmatische Reifung, ermöglichen die Bereitstellung von

Energiesubstraten und sind beteiligt an der Inhibition wie auch der Wiederaufnahme der Meiose (EPPIG 1991b, DOWNS 1995, LARSEN et al. 1996, CARABATSOS et al. 2000). Die Oozyte beeinflusst dabei die Organisation der Follikel, die Proliferation der Granulosazellen, die Differenzierung, Funktion und Expansion der Cumuluszellen (VANDERHAYDEN et al. 1992, EPPIG 2001, GRANOT, DEKEL 2002) sowie die Funktion der Gap junctions der Cumuluszellen (Schaf: PANT et al. 2005). Für die Auslösung der Cumulusexpansion ist die Anwesenheit der Oozyte nicht notwendig (Rind: RALPH et al. 1995). COLLEONI et al. (2004) konnten in ihren Untersuchungen Hinweise für einen saisonalen Einfluss auf die Kommunikation zwischen Cumuluszellen und Oozyten beim Pferd aufzeigen. Tabelle 3 und 4 zeigen die verschiedenen Einflüsse der somatischen Zellen auf die Oozyte und umgekehrt.

**Tab. 4** Einfluss der Oozyte auf die Cumuluszellen

Einfluss der Oozyte auf die Cumuluszellen	Autoren
Bestimmung des Phänotyps der Cumuluszellen über GDF-9	LI et al. 2000
Beeinflussung der Funktion der Gap junction	PANT et al. 2005
Proliferation der Granulosazellen, Differenzierung und Funktion der Cumuluszellen	EPPIG 2001

Die Cumuluszellfortsätze, die durch die Zona pellucida hindurch treten, enden als spezialisierte Gap junctions auf dem Oolemm (MOTTA et al. 1994). Im Verlauf der Maturation lösen sich die Fortsätze und entfernen sich von der Oberfläche der Oozyte.

DE LOOS et al. (1991) konnten in ihrer Untersuchung drei verschiedene Typen von Cumuluszellfortsätzen nachweisen. Zum einen Fortsätze, die die Cortex der Oozyte durchziehen und Gap junctions mit dem Oolemm bilden und zum anderen Fortsätze, die die Cortex nicht durchziehen. Die dritte Form stellt eine Intermediärform dar.

Die Gap junctions sind essentiell für eine erfolgreiche Maturation (EPPIG 1991b). Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Entfernung des Cumulus oophorus vor der IVM das Ergebnis der anschließenden Fertilisation negativ beeinflusst (Rind: ZHANG et al. 1995).

Zahlreiche Untersuchungen beschäftigen sich mit der Bedeutung einer intakten Verbindung zwischen Cumuluszellen und Oozyte für die Fertilisation. Dieser Punkt ist vor allem für die Verwendung unterschiedlicher COK-Klassen in der praktischen Anwendung der IVF von Interesse. In der Literatur gilt es als gesichert, dass der Cumulus oophorus eine positive Auswirkung auf die Befruchtung hat (SAEKI et al. 1994, ZHANG et al. 1995, VAN SOOM et al. 2002, TANGHE et al. 2003), da die Entfernung des Cumulus oophorus vor der IVF in

---

einer reduzierten Fertilisationsrate resultiert (COX et al. 1993). Durch die Cokultivierung von denudierten Oozyten mit Cumuluszellen kann der Erfolg der Fertilisation gesteigert werden (TANGHE et al. 2003).

Die Beeinflussung der Fertilisation durch die Cumuluszellen scheint in vivo und in vitro speziesabhängig zu sein (VAN SOOM et al. 2002). In der Literatur finden sich jedoch auch Studien, die keinen oder sogar einen negativen Einfluss der Cumuluszellen auf die Fertilisation nachweisen konnten (BALL et al. 1983, COX 1991, BEHALOVA, GREVE 1993).

Als Erklärung für die Wirkungsweise der Cumuluszellen im Rahmen der Fertilisation gibt es verschiedene Ansätze. Zum einen wird diskutiert, ob der Cumulus oophorus als eine Art „Auffangmechanismus“ für die Spermien fungiert, durch den motile Spermien zur Oocyte geleitet werden und abnorme Spermien am Erreichen der Oocyte gehindert werden (VAN SOOM et al. 2002, TANGHE et al. 2003). Dies könnte auch als eine Art chemotaktische Wirkung verstanden werden (CHIAN et al. 1996). Des Weiteren wird ein Einfluss der Cumuluszellen auf die Kapazitation, die Akrosomenreaktion und die Penetration der Spermien diskutiert (PARK et al. 1989, FUKUI 1990). Beim Rind wird eine Beeinflussung der Kapazitation z.B. durch die Sekretion von Heparin durch die Cumuluszellen vermutet (COX et al. 1993). Bei humanen Oozyten konnte HASSAN (2001) in seinen Untersuchungen zeigen, dass eine Vorinkubation von denudierten Oozyten mit intakten Cumuluszellen das Ergebnis der Intrazytoplasmatischen Spermieninjektion verbessert. MATTIOLI et al. (1998) kamen in ihren Untersuchungen beim Schwein zu dem Ergebnis, dass der expandierte Cumulus oophorus die Akrosomenreaktion induziert und die Penetration fördert. Es liegen Hinweise vor, dass die Bildung des männlichen Vorkernes ebenfalls durch die Anwesenheit von Cumuluszellen während der Maturation und der Fertilisation beeinflusst wird (MORI et al. 2000).

Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung der Fertilisation durch die Cumuluszellen ist die Schaffung einer für die Penetration günstigen Umgebung durch die Sekretion bestimmter Faktoren (VAN SOOM et al. 2002). Des Weiteren wird diskutiert, ob die Cumuluszellen an der Prävention von Veränderungen in der Oocyte, die unvorteilhaft für die Fertilisation sind, beteiligt sind. Eine solche Veränderung stellt eine prämatüre kortikale Exozytose dar, die in einer Härtung der Zona pellucida und damit in einer reduzierten Fertilisationsrate resultiert (Schwein: GALEATI et al. 1991). Die Cumuluszellen können dieses Aushärten der Zona pellucida eventuell verhindern (DOWNS et al. 1986, KATSKA et al. 1989, BUCCIONE et al. 1990, VAN SOOM et al. 2002).

## 2.3. Mitochondrien

### 2.3.1. Bedeutung der Mitochondrien im zellulären Stoffwechsel

#### *Struktur*

Die Feinstruktur der Mitochondrien wurde in den 1950er Jahren durch elektronenmikroskopische Arbeiten von G.E. Palade und F.S.Sjöstrand aufgeklärt (KLEINIG, SITTE 1999).

Die Mitochondrien werden definiert als DNA-haltige, flexible, formveränderliche, runde bis länglich-ovale, evtl. verzweigte Zellorganellen, die von zwei Membranen umschlossen sind. Sie stellen den Ort der aeroben Energiegewinnung (Citratzyklus, Elektronentransportkette, ATP-Synthase) in der Zelle dar.

Mitochondrien sind ca. 2 bis 8  $\mu\text{m}$  lang und besitzen einen Durchmesser von ca. 0,2 bis 1  $\mu\text{m}$  (HÖFFELER 2003, KLEINIG, SITTE 1999). Sie kommen in fast allen eukaryontischen Zellen vor. Die Anzahl der Mitochondrien in der Zelle ist sehr unterschiedlich und richtet sich nach den energetischen Anforderungen der Zelle. In einer murenen humanen Oocyte sind ca. 100.000 bis 800.000 Mitochondrien nachweisbar (CUMMINS 2004).

Das Mitochondrium wird von zwei hochspezialisierten Membranen umgeben. Dies stellt einen Hinweis auf ihren bakteriellen Ursprung dar. Durch das Vorliegen zweier Membranen werden zwei Kompartimente (Matrix, perimitochondrialer Spalt) geschaffen.

Die **äußere Membran** des Mitochondriums geht auf die Plasmamembran der Wirtszelle zurück, die bei der Entstehung internalisiert wurde (symbiontophore Vakuole) (KLEINIG, SITTE 1999). Diese Membran besteht aus einer großen Anzahl an Molekülen des Kanalproteins Porin. Moleküle bis zu einer Größe von 5000 Dalton können die äußere Membran passieren. Enzyme sind nur in geringer Anzahl vertreten. Nachgewiesen wurde z.B. die Monoamin-Oxidase. In der äußeren Membran besteht ein Protein-Lipid-Verhältnis von 1:1 und es kann ein hoher Anteil Cholesterin nachgewiesen werden.

Der **intermembranäre Raum** wird von der äußeren und der inneren Membran begrenzt. Begründet durch die Durchlässigkeit der äußeren Membran besitzt die Flüssigkeit des Intermembranraumes annähernd die gleiche biochemische Zusammensetzung wie das umgebende Zytoplasma und unterscheidet sich lediglich in Bezug auf den Proteingehalt (HÖFFELER 2003). Der Intermembranraum besitzt eine relativ hohe Enzymausstattung, die zusammen mit ATP für die Phosphorylierung von Nucleotiden verantwortlich ist (ALBERTS 2001). Das Leitenzym stellt die Cytochrom-c-Peroxidase dar (KLEINIG, SITTE 1999).

Die **innere Membran** des Mitochondriums ist der Ort des mitochondrialen Elektronentransportes (LÖFFLER 1999). Sie ist hochspezialisiert und nur permeabel für  $H_2O$ ,  $O_2$  und  $CO_2$ . Sie besitzt jedoch eine Anzahl an Transportproteinen, durch die Metabolite wie ATP, ADP,  $Ca^{2+}$ , Pyruvat und Phosphat die Membran passieren können. Diese Undurchlässigkeit der Membran ist nötig, um den Protonengradienten für die Elektronentransportkette aufzubauen. Die innere Membran umschließt die mitochondriale Matrix (Mitoplasma). Von der Membran ziehen Invaginationen (Cristae mitochondriales) in die Matrix hinein. Dies führt zu einer Oberflächenvergrößerung. Die Invaginationen können flächig, tubulusförmig oder unregelmäßig vorliegen. In der Leberzelle z.B. stellt die innere Membran der Mitochondrien ein Drittel der gesamten Membranen der Zelle dar. In atmungsintensiven Zellen ist der Anteil der Cristae höher. In der inneren Membran befinden sich drei hauptsächliche Proteinklassen: Enzyme der Atmungskette, ATP-Synthasen und Transportproteine. Das Protein-Lipid-Verhältnis beträgt 3:1. Es wurde kein Cholesterin in der Membran festgestellt. Eine Besonderheit stellt das Auftreten von Cardiolipinen dar. Diese kommen ansonsten nur bei Bakterien vor. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Gültigkeit der Endosymbionten-Hypothese (KLEINIG, SITTE 1999, HÖFFELER 2003, ALBERTS 2001, PLATTNER, HENTSCHEL 1997).

Die **mitochondriale Matrix (Mitoplasma)** stellt den Innenraum des Mitochondriums dar. In ihr befindet sich die zirkuläre DNA in der Regel in 5-10 Kopien. Des Weiteren sind in der Matrix 70S-Ribosomen, RNAs sowie Enzyme des Citrat-Zyklus, der beta-Oxidation und alle benötigten Cofaktoren und Substrate vorhanden (HÖFFELER 2003, KLEINIG, SITTE 1999).

Das **mitochondriale Genom** stellt ebenfalls eine Besonderheit des Mitochondriums dar. Erstmals wurde die mitochondriale DNA (mtDNA) 1963 von M.M.K. Nass und S. Nass nachgewiesen. Die DNA ist doppelsträngig, zirkulär und liegt in der Supercoil-Form vor. Die Mitochondrien sind semiautonome Organellen. Sie besitzen zwar ein eigenes Genom, dieses reicht jedoch nicht für die Kodierung aller mitochondrialer Proteine aus (KLEINIG, SITTE 1999, ALBERTS 2001). Das mitochondriale Genom hat eine Größe von 16,6 kb und kodiert für 13 Komponenten der Atmungskette, 2 rRNA und 22 tRNA (KLEINIG, SITTE 1999, ALBERTS 2001, CUMMINS 2002, VAN BLERKOM 2004). 95% der benötigten Proteine sind kerncodiert (KLEINIG, SITTE 1999).

Die Vererbung der mtDNA erfolgt uniparental, beim Säuger in der Regel maternal (KLEINIG, SITTE 1999). Die maternale Vererbung der Mitochondrien beim Säuger gibt schon einen Hinweis auf die Bedeutung dieser Organellen in der Oozyte und für die Reproduktion. Es wurde nachgewiesen, dass während der Befruchtung eventuell auch ein geringer Anteil paternalen Mitochondrien in die Oozyte gelangen kann. Während der frühen embryonalen

Entwicklung werden diese Mitochondrien jedoch eliminiert. Dies wird ermöglicht durch eine Markierung des Oberflächenproteins Prohibitin der Mitochondrien in den Spermien mit Ubiquitin während der Spermiogenese. Im Nebenhoden während der Reifungszeit wird diese Markierung durch Disulfidbindungen „maskiert“. Diese Bindungen werden in der glutathionreichen Umgebung der frühen embryonalen Entwicklung reduziert. Der zugrundeliegende Erkennungsmechanismus ist unbekannt, scheint aber speziesspezifisch zu sein. Die eigentliche Eliminierung der paternalen Mitochondrien erfolgt durch spezifische Proteolyse. Es liegen Hinweise vor, dass es sehr selten einigen paternalen Mitochondrien durch Fusion mit maternalen Mitochondrien gelingt, dem Eliminationsprozeß zu „entkommen“ (CUMMINS 2002, CUMMINS 2004).

Die mtDNA ist anfällig für Mutationen. Dies ist unter anderem auf das Fehlen von protektiven Histonen zurückzuführen. Zum Schutz vor Mutationen der mtDNA wird das Vorliegen eines „mitochondrialen Flaschenhalses“ in der mütterlichen Keimbahn postuliert (BERGSTROM, PRITCHARD 1998). Diese Annahme resultiert aus der Beobachtung, dass Oozyten zwar eine Vielzahl an Mitochondrien aufweisen, die Primordialkeimzellen zu Beginn der Entwicklung jedoch nur < 10 Mitochondrien (KLEINIG, SITTE 1999, CUMMINS, 2002, VAN BLERKOM 2004).

Embryonen sind in der Regel in Bezug auf die Mitochondrien homoplasmatisch. Untersuchungen bei Kühen haben gezeigt, dass bei Vorliegen einer Heteroplasmie nach 2-3 Generationen wieder eine Homoplasmie nachweisbar ist. Heteroplasmie während der Embryogenese hat eine Bedeutung in der Ätiologie degenerativer Erkrankungen v.a. des Muskel- und Nervengewebes (z.B. LHON = Leber's hereditary optic neuropathy) (KLEINIG, SITTE 1999).

### *Atmungskette und Oxidative Phosphorylierung*

Die Lokalisation der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien wurde 1948 von Eugene Kennedy und Albert Lehninger beschrieben (LEHNINGER 1994). Als Grundlage für die oxidative Phosphorylierung gilt die chemiosmotische Theorie, die 1961 von Peter Mitchell formuliert wurde (STRYER 1996).

In Folge des Citratzyklus, der Glykolyse und der  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren fallen im zellulären Stoffwechsel die energiereichen Moleküle NADH und FADH<sub>2</sub> an. Diese besitzen je ein Elektronenpaar mit hohem Übertragungspotential. Bei der Übertragung von Elektronen auf molekularen Sauerstoff wird viel Energie frei. Die Energie wird im Mitochondrium durch die oxidative Phosphorylierung zur Synthese von ATP verwendet (STRYER 1996). Die



Atmungskette/oxidative Phosphorylierung ist die einzige Methode, Stoffwechselenergie in einem großen Umfang nutzbar zu machen (KREUZIG 1993).

Im engeren Sinne bezeichnet man als Atmungskette, die in mehreren Stufen hintereinander geschalteten Redoxreaktionen, die mit der Übertragung von Wasserstoff bzw. Elektronen einhergehen. Aufgrund der Lokalisation spricht man auch von dem mitochondrialen Elektronentransport. Während der Atmungskette kommt es zur Ansammlung von Protonen im Intermembranraum des Mitochondriums. Es entsteht ein Protonengradient, der nun in der oxidativen Phosphorylierung als „Motor“ für die ATP-Synthese genutzt wird. Oxidation und Phosphorylierung sind über den Protonengradienten an die innere Mitochondrienmembran gekoppelt (STRYER 1996). Das Elektronenübertragungspotential von NADH und FADH<sub>2</sub> wird in das Phosphorylgruppenübertragungspotential des ATP umgewandelt (STRYER 1996).

Im engeren Sinne versteht man unter oxidativer Phosphorylierung die Konservierung der freiwerdenden Energie aus der Atmungskette in Form von ATP. Die oxidative Phosphorylierung ist eng an den Elektronentransport gekoppelt (LÖFFLER 1998).

Die Atmungskette besteht aus einer Reihe Elektronencarriern. Die Elektronen fließen spontan von Carriern mit niedrigem Redoxpotential zu Carriern mit höherem Redoxpotential. (LEHNINGER 1994).

Die Atmungskette kann unterteilt werden in einen Wasserstoff- und einen Elektronentransport, der über 3 Kaskaden abläuft. In den Transport sind die zwei Hilfssubstrate Ubichinon und Cytochrom c eingeschaltet. Dazwischen liegen die Multienzymkomplexe für den Wasserstoff- bzw. Elektronentransport.

Als Redoxsysteme sind eine Reihe von Wasserstoff- bzw. Elektronen-übertragenden Coenzymen in die Atmungskette eingeschaltet. Diese Coenzyme sind Bestandteile von Dehydrogenasen und sind in 4 Multienzymkomplexen (Komplex I-IV) gebunden (LÖFFLER 1998).

### **2.3.2. Mitochondrien und ihre Funktion in Oozyten**

Die Mitochondrien spielen eine wichtige Rolle im Stoffwechsel der Oozyte durch die Bereitstellung von ATP für Maturation, Fertilisation, spätere Teilungsvorgänge und als Ca<sup>2+</sup>-Speicher. Während der Maturation stellen die Mitochondrien die stärkste Organellenfraktion dar. In humanen murenen Oozyten befinden sich bis zu 1 Million Mitochondrien im Ooplasma (MOTTA et al. 2000, CUMMINS 2002, BARRITT et al. 2002). Strukturelle, räumliche und genetische Veränderungen und Störungen der Mitochondrien führen zu einer sinkenden ATP-Produktion und beeinflussen dadurch die Formierung des Spindelapparates, die

Trennung der Chromosomen, den Ablauf des Zellzyklus sowie die Kompaktierung, Blastocoelbildung und das Schlüpfen der späteren Embryonen negativ (VAN BLERKOM 2004). Zahlreiche Untersuchungen in der Humanmedizin haben den Nachweis erbracht, dass die Mitochondrien der Oozyte einen großen Einfluss auf das Ergebnis einer IVF-Behandlung aufweisen (CHRISTODOULOU 2000, HOWELL et al. 2000, JANSEN 2000, CUMMINS 2002, 2004, CHINNERY 2004, EICHENLAUB-RITTER et al. 2004). In der Humanmedizin besitzen vor allem Defekte der mitochondrialen DNA (mtDNA) eine klinische Bedeutung. Dysfunktionen der Mitochondrien spielen in der Ätiologie der Infertilität, vor allem bei älteren Patientinnen, eine Rolle. Viele Untersuchungen beschäftigen sich mit den Möglichkeiten der Behandlung einer solchen „mitochondrialen Infertilität“ (COHEN et al. 1997, BRENNER et al. 1998, ST JOHN et al. 2004).

Gegenstand der Forschung sind vor allem Untersuchungen zur Verwendung von Mitochondrien als Parameter für Oozytenqualität und Entwicklungskompetenz (STOJCOVIK et al. 2000, WILDING et al. 2001). Interessant wäre eine Nutzung mitochondrialer Parameter als nicht invasives Verfahren zur Selektion entwicklungscompetenter Oozyten bzw. Embryonen. THOUAS et al. (2004) bezeichnen die Mitochondrien der Oozyte als Regulatoren der frühen embryonalen Entwicklung.

Als mitochondriale Parameter sind besonders die Verteilung der Mitochondrien im Ooplasma, die Aktivität der Mitochondrien und die Morphologie der Mitochondrien von Interesse. Die Rolle der Mitochondrien im Rahmen der Maturation, Fertilisation und embryonalen Entwicklung ist zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt. Ein Vergleich der Ergebnisse von vorliegenden Arbeiten und Studien gestaltet sich schwierig aufgrund der verschiedenen Versuchsansätze und -bedingungen sowie der verschiedenen untersuchten Spezies.

### *Morphologie der Mitochondrien während der Oogenese*

Die Morphologie und die Anzahl der Mitochondrien verändern sich im Verlauf der Oogenese und der embryonalen Entwicklung. In noch nicht migrierten Primordialkeimzellen befinden sich weniger als 10 Mitochondrien. In Oogonien sind ca. 200 Mitochondrien gebogener Form nachweisbar. Bis zu 6000 Mitochondrien befinden sich in den Oozyten der Primordialfollikel. Vor der Ovulation kommt es zu einem starken Anstieg (Maus: 92.500 Mitochondrien) der Mitochondrien (CUMMINS 2004).

In den verschiedenen Phasen der Oogenese und der Maturation werden vermehrt enge Beziehungen der Mitochondrien zu Strukturen im Zytoplasma nachgewiesen. Neben der bereits erwähnten speziellen Beziehung zu Mikrotubuli findet sich vor allem eine Verbindung mit Bestandteilen des glatten endoplasmatischen Retikulums, mit Vakuolen und Lipidtropfen

(HYTTEL et al. 1986, 1989, DE LOOS et al. 1989, CUMMINS 2004, TORNER et al. 2004, VAN BLERKOM 2004). Die Verbindung von Mitochondrien und glattem endoplasmatischem Retikulum sorgt für die Erstellung eines Energiereservoirs und ist bei der Regulierung des Calciumstoffwechsels von Bedeutung.

Anhand der Morphologie der Mitochondrien lassen sich undifferenzierte und differenzierte Mitochondrien unterscheiden. Undifferenzierte Mitochondrien zeichnen sich durch eine kugelförmige Form, eine dichte Matrix und eine geringe Anzahl von Cristae aus (VAN BLERKOM, MOTTA 1979, MAKABE, VAN BLERKOM 2004). Differenzierte Mitochondrien besitzen eine längliche Form, eine Matrix mit geringerer Dichte und zahlreiche transversale Cristae (JANSEN, DE BOER 1998, MOTTA et al. 2000).

MOTTA et al. (2000) untersuchten die Veränderungen der Morphologie der Mitochondrien in humanen Oozyten. In Primordialkeimzellen sind große, runde Mitochondrien mit vesikulären Cristae nachweisbar. In Oogonien weisen die Mitochondrien vermehrt eine ovoide Form auf und die Cristae verlieren ihre vesikuläre Struktur. In der Wachstumsphase behalten die Mitochondrien zumeist ihre kugelförmige Gestalt und lediglich das Muster der Cristae verändert sich. Im Diplotän zeigen die Cristae eine bogenförmige Anordnung.

Auch die Dichte der mitochondrialen Matrix unterliegt Veränderungen. In der Wachstumsphase steigt die Dichte der Matrix an. Oozyten im Zygotän und im Pachytän zeichnen sich durch eine hohe Dichte ihrer mitochondrialen Matrix aus, während die Dichte im Diplotän gering ist (GONDOS et al. 1971, POZO et al. 1990).

Während der Maturation porciner Oozyten sinkt möglicherweise die Anzahl an Mitochondrien, das Volumen jedoch nimmt zu (CRAN 1985).

Vor der Fertilisation finden sich teilweise differenzierte Mitochondrien im Ooplasma. Es kommt jedoch häufig zu einer starken Heterogenität und neben differenzierten treten auch die undifferenzierten Formen auf. Diese Heterogenität könnte nach JANSEN und DE BOER (1998) durch eine unterschiedliche Reaktion der Mitochondrien auf bestimmte zytoplasmatische Signale verursacht werden. Ab dem Stadium der Morula sind vorwiegend differenzierte Mitochondrien nachweisbar (MOTTA et al. 2000).

#### *Verteilung der Mitochondrien im Ooplasma*

Es gilt als gesichert, dass die Verteilung der Mitochondrien dynamischen Veränderungen bei den verschiedenen Spezies unterliegt (STOJKOVIC et al. 2000, WILDING et al. 2001, TORNER et al. 2004).

Es liegen Hinweise vor, dass ein bestimmtes Verteilungsmuster der Mitochondrien im Ooplasma während der Maturation und Fertilisation mit der späteren embryonalen Entwicklungskompetenz korreliert (SQUIRRELL et al. 2003). Informationen über die

Verteilung der Mitochondrien während der Oozytenmaturation bzw. der embryonalen Entwicklung sind auch von Bedeutung, um den Einfluss von Kulturbedingungen *in vitro* festzustellen und um die Auswirkungen reproduktionsbiologischer Techniken (Kryokonservierung, Zytoplasmtransfer, ICSI) zu beurteilen. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Veränderung der Kulturbedingungen die Verteilung und die Morphologie der Mitochondrien in Oozyten und Embryonen beeinflusst (Maus: MUGGLETON-HARRIS, BROWN 1988, Hamster: BARNETT et al. 1997, SQUIRRELL et al. 2001, LUDWIG et al. 2001, Rind: KRISHER, BAVISTER 1997, Schwein: HYTTEL, NIEMANN 1990). Die Regulierung der Umverteilung der Mitochondrien wird durch ein Netzwerk aus Mikrotubuli gewährleistet (VAN BLERKOM 1991, SUN et al. 2001, BREVINI et al. 2005).

Untersuchungen an Oozyten von **Xenopus laevis** zeigten die Lokalisation einiger Mitochondrien während der Reifung als kortikale Schicht in der vegetativen Hemisphäre, während ein weiterer Anteil der Mitochondrien sich um den Nukleus formiert (TOURTE et al. 1984).

O'BRIEN et al. untersuchten 1996 die Verteilung der Mitochondrien in *in vitro* und *in vivo* gereiften Oozyten von adulten und präpubertären **Schafen**. Sie konnten eine Umverteilung der Mitochondrien während der Maturation von der Peripherie in den Rindenbereich der Oozyte feststellen. Die Mehrzahl der Mitochondrien war in Form von Aggregaten im Zytoplasma verteilt. In den Oozyten der erwachsenen Schafe befanden sich die Mitochondrien vor allem im Rindenbereich, während die Mitochondrien in den Oozyten der präpubertären Schafe vermehrt im Zentrum des Ooplasmas verteilt waren. CRAN et al. (1980) konnten vor der Reifung eine periphere Lokalisation der Mitochondrien in den Oozyten von Schafen beobachten.

Die Verteilung der Mitochondrien in 3 unterschiedlichen COK-Klassen zu verschiedenen Reifungszeiten *in vitro* bei der **Ziege** untersuchten RAJIKIN et al. (1994). In den Oozyten mit 5 oder mehr Lagen Cumuluszellen konnten direkt nach der Gewinnung keine Mitochondrien nachgewiesen werden. Nach 20 h IVM waren voll entwickelte Mitochondrien gleichmäßig verteilt im Zytoplasma nachweisbar und nach 40 h wurden vermehrt größere Ansammlungen von Mitochondrien festgestellt. In den Oozyten mit 2-4 Lagen Cumuluszellen wurden zu Beginn der Reifung undifferenzierte Mitochondrien in der Peripherie nachgewiesen. Nach 20 h IVM ähnelte das Verteilungsmuster dem der ersten Gruppe, obwohl die meisten Mitochondrien in der Peripherie beobachtet wurden. Bei denudierten Oozyten wurden wenige, undifferenzierte Mitochondrien festgestellt.

Die Verhältnisse in **equinen** Oozyten wurden von TORNER et al. (2003) untersucht. Bei dieser Studie wurde unter anderem die Verteilung der Mitochondrien in drei verschiedenen COK-Klassen zu verschiedenen Maturationszeiten ermittelt. Die Verteilung wechselte im Verlauf der Maturation von einer homogen-feinen Verteilung zu einer heterogenen Verteilung mit Clustern und zeigte eine Abhängigkeit von der Cumulismorphologie zum Zeitpunkt der Gewinnung.

TORNER et al. (2004) untersuchten die Verteilung der Mitochondrien in ex-vivo gewonnenen Oozyten von **Schweinen**. Hierbei konnte eine homogene Verteilung der Mitochondrien vor allem in der frühen Phase der präovulatorischen Reifung beobachtet werden, während ein heterogenes Verteilungsmuster in Oozyten, die sich in einem fortgeschrittenen Meiosestadium befanden, nachgewiesen wurde. Mit zunehmender Reifung wechselt das Verteilungsmuster von homogen zu granuliert mit Clustern. Auch bei dieser Untersuchung zeigte sich eine Korrelation zwischen der Cumulismorphologie und der mitochondrialen Verteilung. In den Untersuchungen von SUN et al. (2001) wurden die Verhältnisse in vitro und in vivo verglichen. Die Einteilung der Verteilungsmuster erfolgte in dieser Studie vor allem unter dem Gesichtspunkt der räumlichen Lokalisation der Mitochondrien während der Reifung und Fertilisation. Bei Oozyten im GV-Stadium zeigten die Mitochondrien eine vermehrte Lokalisation im Bereich der Cortex. Vor dem GVBD war eine vermehrte Aggregation der Mitochondrien um den Nukleus (GV) zu beobachten. Im Anschluss an den GVBD in der Metaphase I und Anaphase I formierten sich die Mitochondrien perinukleär im Bereich des entstehenden Spindelapparates. Unter in vitro Bedingungen fehlte diese perinukleäre Aggregation. Charakteristisch waren eine Akkumulation im Bereich des Polkörpers nach der MI und MII sowie eine Akkumulation im Bereich der Vorkerne nach der Fertilisation. In dieser Studie wurde deutlich, dass die Verteilung der Mitochondrien unter in vitro Bedingungen unvollständig verläuft. BREVINI et al. (2005) verglichen in ihrer Studie die Verteilungsmuster der Mitochondrien von entwicklungs-kompetenten und inkompetenten Oozyten des Schweines unter in vitro Bedingungen. Bei der Gewinnung zeigte die Mehrzahl der Oozyten eine periphere Verteilung. Nach 46 h IVM behielt die Mehrzahl der Oozyten in der inkompetenten Gruppe die periphere Verteilung bei, während die Mehrzahl der Oozyten der kompetenten Gruppe eine diffuse Verteilung aufwies. LUOH und WU (1996) beobachteten in ihren Untersuchungen beim Schwein ebenfalls eine kortikale Lokalisation der Mitochondrien in unreifen Oozyten und eine perinukleäre Lokalisation gegen Ende der Maturation.

Eine Reihe von Studien zur mitochondrialen Verteilung beschäftigt sich mit den Verhältnissen in den Oozyten der **Labortiere**. CALARCO (1995) wies für mature

Mäuseoozyten eine Polarität der Mitochondrienverteilung nach. Die Mehrzahl der Mitochondrien akkumulieren während der Chromatinkondensation im Bereich des Nukleus und begleiten nach der Formierung den Spindelapparat zur Cortex (ALBERTINI 1987, VAN BLERKOM 1991). Die kortikale Anordnung der Mitochondrien in den meisten reifen Mäuseoozyten könnte ein Hinweis auf die Lokalisation des Spindelapparates der 1. meiotischen Teilung sein. Oozyten, die eine unvollständige Maturation aufwiesen zeigten ein anderes mitochondriales Verteilungsmuster der Mitochondrien. Die Polarisierung der Mitochondrien im Bereich des Spindelapparates wurde unter in vivo und in vitro Bedingungen festgestellt. Die Untersuchungen von VAN BLERKOM (1991) zur Verteilung der Mitochondrien bei Mäuseoozyten während der Maturation zeigten, ähnlich wie beim Schwein, eine Umverteilung der Mitochondrien im Verlauf der Reifung zur perinukleären Region entlang der Mikrotubuli und die spätere Akkumulation im Bereich der MI- bzw. MII-Spindel. Bei Oozyten von Ratten wurde ein Wechsel von einer perinukleären Lokalisation zu einer kortikalen Lokalisation beobachtet (ZERNICKA-GOETZ et al. 1993). FULKA (2004) untersuchte in seiner Studie, die Verteilung der Mitochondrien in rekonstruierten Mäuseoozyten nach Mikromanipulation. Nach Rekonstruktion konnte eine schnelle gleichmäßige Verteilung festgestellt werden. Dieses Ergebnis ist von Bedeutung im Rahmen der Untersuchungen zur Behandlung mitochondrialer Infertilität in der Humanmedizin durch Transfer des Germinalvesikels einer Spenderoozyte in eine Empfängereizelle. Die Untersuchungen von TOKURA et al. (1993) befassten sich mit der Verteilung von Mitochondrien in Oozyten, die in vivo maturiert wurden. Sie konnten drei verschiedene Verteilungsmuster (Aggregation, homogen, perinukleär) zu unterschiedlichen Zeiten nach Injektion von humanem Choriongonadotropin (hCG) beobachten. Vor der hCG-Gabe zeigten die Mitochondrien eine homogene Verteilung. Nach 8-9 h erreichten die Mitochondrien eine perinukleäre Akkumulation, um nach 10-14 h nach hCG erneut eine homogene Verteilung aufzuweisen und nach 24 h und 31 h zu einer perinukleären Akkumulation zurückzukehren. Unter den Bedingungen einer in vitro Maturation zeigte sich eine gehemmte Umverteilung der Mitochondrien.

VAN BLERKOM und RUNNER (1984) wiesen ebenfalls die Umverteilung der Mitochondrien zur perinukleären Region während der Formierung der Metaphasenspindel der ersten meiotischen Reifeteilung und eine spätere Verteilung im Zytoplasma nach der Ausschleusung des 1. Polkörpers nach.

Die mitochondriale Formierung der Mitochondrien um die Vorkerne nach der Fertilisation konnte bei Oozyten von Nagern nachgewiesen werden (Maus: VAN BLERKOM, RUNNER 1984; Hamster: BAVISTER, SQUIRRELL 2000). In den meisten untersuchten Hamsteroozyten wiesen BARNETT et al. (1996, 1997) eine homogene Verteilung der Mitochondrien nach sowie eine perinukleäre Lokalisation im späten Vorkernstadium und in

---

frühen Teilungsstadien. Während der Maturation konnte keine Umverteilung nachgewiesen werden, sondern nur während der Fertilisation.

Die meisten Untersuchungen in Bezug auf die Verteilung der Mitochondrien beschäftigen sich mit den Verhältnissen in Oozyten des **Menschen**. Dysfunktionen der Mitochondrien besitzen in der Humanmedizin eine Bedeutung in Bezug auf verschiedene Erkrankungen (vorzeitiges Altern, Myopathien, neurodegenerative Erkrankungen) sowie auf die Ätiologie von weiblicher und männlicher Infertilität (REYNIER et al. 1998; TROIANO et al. 1998). Im Fokus steht hier besonders die mitochondriale DNA durch ihre hohe Mutationsrate. Aber auch die Verteilung der Mitochondrien ist von großem Interesse. Das Wissen über die physiologische Verteilung der Mitochondrien ist notwendig für eine Therapie der mitochondrialen Infertilität durch Zytoplasmatransfer. Zu berücksichtigen ist hierbei jedoch, dass diese Behandlung aus ethischen und biologischen Gesichtspunkten kontrovers zu diskutieren ist.

WILDING et al. (2001) beobachteten bei unreifen humanen Oozyten im GV-Stadium vor allem ein granuliertes Verteilungsmuster mit bevorzugter Lokalisation im Bereich der Plasmamembran. Während der Maturation tritt neben diesem Verteilungsmuster auch eine feine homogene Verteilung der Mitochondrien auf, die eine Potenzierung im Zentrum der Oozyte zeigt. Bei Embryonen konnten sie eine Konzentrierung der Mitochondrien im Bereich der Nuklei nachweisen (VAN BLERKOM 2004). Die Embryonen mit schlechter Qualität zeigten vor allem eine feine Verteilung der Mitochondrien, während die Embryonen guter Qualität eine feine und granuliert verteilte Verteilung aufwiesen.

Nach der Fertilisation wird auch in humanen Zygoten eine Akkumulation der Mitochondrien um die Vorkerne beobachtet (VAN BLERKOM 2000, MOTTA et al. 2000, SATHANANTHAN, TROUNSON 2000). Da diese Akkumulation sowohl nach Polyspermie als auch nach Monospermie auftritt, scheint es sich um einen physiologischen Vorgang zu handeln (NOTO et al. 1993, VAN BLERKOM 2000). Untersuchungen an Oozyten von Rhesusaffen (SQUIRRELL et al. 2003) zeigten eine sanduhrförmige Verteilung zwischen den Vorkernen. Dies scheint ein typisches Verteilungsmuster in den Oozyten von Primaten zu sein und könnte eventuell auch durch eine Kompression des Zytoplasmas während der Migration der Vorkerne verursacht werden. Interessant ist die Heterogenität der mitochondrialen Verteilung in den Oozyten des Rhesusaffen im Vergleich zu der homogenen Verteilung in Hamsteroozyten (BARNETT et al. 1996, SQUIRRELL et al. 2003). In den Oozyten von Rhesusaffen konnten SQUIRRELL et al. (2003) zum Zeitpunkt der Gewinnung drei verschiedene Verteilungsmuster beobachten: homogen, kleine Cluster, große Cluster. Die

Oozyten mit großen mitochondrialen Clustern zeigten 12 h post inseminationem die größte Rate an Vorkernformierung.

Bei MOTTA et al. (2000) finden sich Ergebnisse zur mitochondrialen Verteilung bei Oozyten in verschiedenen Stadien der Maturation. Während der Wachstumsphase der Oozyte befand sich die Mehrzahl der Mitochondrien im Bereich der Peripherie.

Im Leptotän wurde eine homogene Verteilung nachgewiesen, während im Zygotän eine perinukleäre Lokalisation vorliegt. Dieses wird auch durch die Untersuchung von CUMMINS (2004) bestätigt. In einigen Oozyten erfolgte nach dieser Lokalisation die Formierung einer halbmondförmigen Ansammlung um eine bestimmte Kernregion (POZO et al. 1990). In maturaen Oozyten wurde eine homogene mitochondriale Verteilung im Ooplasma beobachtet.

Beim **Rind** gibt es nur wenige Untersuchungen in Bezug auf die Verteilung der Mitochondrien während der IVM. STOJKOVIC et al. (2001) berücksichtigten in ihrer Studie 4 unterschiedliche COK-Klassen. Unreife Oozyten mit kompaktem Cumulus oophorus (Klasse I) zeigten eine homogene Verteilung und Oozyten mit weniger Cumuluszelllagen (Klasse II) zeigten eine Verteilung mit vermehrt peripherer Anordnung. Oozyten mit 3-4 Lagen Cumuluszellen (Klasse III) wiesen zytoplasmatische Vakuolen auf, die von Mitochondrien umgeben waren. Denudierte Oozyten (Klasse IV) zeichneten sich durch wenige Mitochondrien in peripheren Clustern aus. Nach der Maturation wurden in den Klassen I und II größere Ansammlungen von Mitochondrien beobachtet, die auch im Zentrum der Oozyte nachweisbar waren. Die Oozyten der Klasse III wiesen vermehrt Vakuolen auf und die Oozyten der Klasse IV zeigte keinerlei sichtbare mitochondriale Umverteilung. Die Bedeutung der Mitochondrienverteilung wird durch die Ergebnisse der Untersuchung von RHO et al. (2002) deutlich, in der diese als Parameter für die Lebensfähigkeit von aufgetauten Oozyten genutzt wurde. Bei Oozyten im GV-Stadium wurde von KRISHER und BAVISTER (1997) eine homogene Verteilung der Mitochondrien im Bereich der Cortex beobachtet, sowie eine bessere Entwicklungskompetenz bei den Oozyten, die eine deutliche kortikale Lokalisation der Mitochondrien aufwiesen.

Die Umverteilung der Mitochondrien lässt auf eine Modulation des Metabolismus der Oozyten schließen und ist ein wichtiger Bestandteil der zytoplasmatischen Reifung (KRUIP et al. 1983, HYTTEL et al. 1986b). Die unvollständige oder fehlerhafte Verteilung der Mitochondrien könnte ein Grund für eine schlechte Entwicklungskompetenz von Oozyten sein (STOJKOVIC et al. 2001). Die Umverteilung während der Reifung wird wahrscheinlich durch Hormone und Energiesubstrate beeinflusst (BAVISTER 2000). Durch die verschiedenen bisher vorliegenden Untersuchungen wird die Speziespezifität in Bezug auf den zeitlichen Verlauf und die Ausprägung der mitochondrialen Verteilung deutlich. Eine



fehlende Umverteilung der Mitochondrien zeigt nach BREVINI et al. (2005) keinen Einfluss auf den ATP-Gehalt, aber beeinflusst die  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulierung der Eizellaktivierung. Es liegen Hinweise vor, dass die mitochondriale Verteilung auch Einfluss auf die Antwort der Oozyte auf Estradiol-17beta durch den Östrogenrezeptor beta auf der Oberfläche der Mitochondrien nimmt (LIU et al. 2001, YANG et al. 2004). Die Nähe zum Nukleus wiederholt sich mehrmals während Oogenese und Fertilisation und ist damit ein Zeichen für den erhöhten Energiebedarf durch die Umstrukturierungen von Kernmaterial.

### *Respiratorische Aktivität und ATP-Produktion der Mitochondrien*

Die mitochondriale respiratorische Aktivität kommt als Parameter für einen intakten Metabolismus der Oozyte in Frage. Sie wird beeinflusst durch das Fortschreiten der Reifung, die Cumulusexpansion, die Meiosekonfiguration und die Verteilung der Mitochondrien.

Bei **humanen** und **murinen** Oozyten verändert sich die Aktivität der Mitochondrien während der Maturation nicht (VAN BLERKOM et al. 1995, WILDING et al. 2001). Studien zeigten jedoch, dass die respiratorische Aktivität mit dem Alter der Patientin negativ und mit der Entwicklungsrate humaner Embryonen positiv korreliert ist. Mit zunehmendem Alter der Patientin sinkt die respiratorische Aktivität und damit die embryonale Entwicklungsrate. Die Gründe hierfür werden zum einen in der Akkumulation von Mitochondrien mit Mutationen der mtDNA gesehen (SHIGENAGA et al. 1994) und zum anderen durch eine Akkumulation von  $\text{O}_2$ -Radikalen (PEREZ et al. 2000).

VAN BLERKOM (2004) beschreibt eine geringe mitochondriale Aktivität bei unreifen humanen Oozyten bis zum Stadium der Morula. Dies wird auf die hohe Anzahl unreifer Mitochondrien in immaturren Oozyten zurückgeführt. Eine geringe mitochondriale Aktivität zu Beginn der Reifung ist durchaus sinnvoll, da eine zu hohe Aktivität zu einer Ansammlung von Sauerstoffradikalen durch die oxidative Phosphorylierung führen kann. Eine weitere Erklärung für eine geringe respiratorische Aktivität der Mitochondrien könnte in einem Sauerstoffmangel nach der Isolierung aus dem folliculären Milieu begründet sein. ATP wird in diesem Fall anaerob über die Glykolyse oder exogen über die Gap junction der Granulosazellen produziert (ALBERTINI 2004). Durch die Cumulusexpansion kommt es zu einem Verlust der anaeroben ATP-Versorgung und die mitochondriale ATP-Produktion wird aktiviert (VAN BLERKOM 2004).

DUMOLLARD et al. (2004) beschreiben eine Abhängigkeit der Regulierung der respiratorischen Aktivität vom Stadium der Oozyte. VAN BLERKOM (2004) führt die Up- und Down-Regulation der respiratorischen Aktivität auf Änderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zurück.

In **Schweine**oocyten ist die mitochondriale Aktivität mit dem Fortschreiten der Meiose und der Cumulusexpansion assoziiert. Kurz vor der Ovulation ist die höchste Aktivität nachweisbar (TORNER et al. 2004).

TORNER et al. (2003) untersuchten die Verhältnisse im Bezug auf die respiratorische Aktivität bei **equinen** in vivo gereiften Oocyten und stellten eine Abhängigkeit der Aktivität von der Cumulummorphologie fest. Die Aktivität stieg im Verlauf der Reifung an.

Die Rate der zellulären Atmung ist abhängig von der Fähigkeit zur Umwandlung metabolischer Faktoren im Zytoplasma und der Effektivität der oxidativen Phosphorylierung (WILDING et al. 2001).

In den Untersuchungen von STOJKOVIC et al. (2001) war die ATP-Produktion bei bovinen unreifen Oocyten mit kompaktem Cumulus oophorus höher als bei denudierten Oocyten und während der Reifung war in allen COK-Klassen ein Anstieg nachzuweisen. Beim Schwein konnte dies nicht nachgewiesen werden (BREVINI et al. 2005). CUMMINS (2002) beschreibt, dass humane Oocyten bestimmte ATP-Werte benötigen, um ein normales Entwicklungspotential zu erreichen. Es liegen jedoch Hinweise vor, dass der Beitrag der Mitochondrien zur ATP-Produktion in der frühen Entwicklungsphase nur gering ist (Maus: TRIMARCHI et al. 2000).

## 2.4. Apoptose

Die Apoptose als sogenannter „programmierter Zelltod“ bzw. als Suizidprogramm der Zelle ist schon seit Jahrzehnten bekannt. Jedoch wurden die morphologischen Veränderungen erst 1972 durch KERR et al. beschrieben und der Begriff „Apoptose“ erstmalig geprägt. Bei der Apoptose handelt es sich um ein genetisch gesteuertes Programm, und sie steht im Kontrast zum Zelltod durch Nekrose. Die Apoptose ist essentiell für die physiologische Entwicklung aller multizellulären Organismen. Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose energieabhängig und benötigt adäquate ATP-Konzentrationen (VAUX 1993).

Für die Auslösung der Apoptose werden zahlreiche Signalwege beschrieben. Zu Beginn der Apoptose verringert sich das Zellvolumen der betroffenen Zelle durch die Spaltung von Lamin und Aktin. Die Organellen der Zelle bleiben intakt. Der Zellkern schrumpft und das Chromatin verdichtet sich. An der Zytoplasmamembran werden Ausstülpungen und Bläschen sichtbar. Schließlich erfolgt das Abschnüren der „apoptotic bodies“ (membranumschlossene Vesikel). Diese werden von phagozytierenden Zellen aufgenommen. Bei der Apoptose kommt es im Gegensatz zur Nekrose nicht zu einer Entzündungsreaktion (KLEINIG, SITTE 1999, UDE, KOCH 2002).

### **2.4.1. Bedeutung der Apoptose während Follikelentwicklung und Oogenese**

Apoptotische Vorgänge spielen im Verlauf der folliculären Atresie, als Regulation der embryonalen Entwicklung und in der Aufrechterhaltung der Homöostase der Zellen eine zentrale Rolle (TILLY et al. 1991, RAFF 1992, OOSTERHUIS et al. 1998). Des Weiteren spielt die Apoptose im Rahmen der Rekrutierung und Selektion von Oozyten aus dem Pool der Primordialfollikel eine Rolle. In humanen Oozyten konnte eine Bedeutung der Apoptose auch im Rahmen des ovariellen Abbaus im Verlauf von Alterungsvorgängen nachgewiesen werden (DE POL et al. 1997, WU et al. 2000, ALISCH et al. 2003). Apoptotische Veränderungen werden in Thekazellen, Granulosazellen, Cumuluszellen und Oozyten gefunden (Mensch: HOST et al. 2000, LEE et al. 2001). In den Granulosazellen und den Cumuluszellen wurde eine erhöhte Apoptoserate während der Maturation der COK nachgewiesen, vor allem zum Zeitpunkt der Wiederaufnahme der Meiose durch die Oozyte (BILLIG et al. 1996, VINATIER et al. 1996, DRIANCOURT, THUEL 1998, IKEDA et al. 2003). Über die Interaktionen der Oozyte und der somatischen Zellen im Rahmen apoptotischer Vorgänge ist wenig bekannt (DRIANCOURT, THUEL 1998).

Bei der folliculären Atresie der frühen Antralfollikel zeigen vor allem die muralen Granulosazellen apoptotische Veränderungen, später sind auch die Thekazellen involviert, während die Cumuluszellen und die Oozyte zunächst nicht durch das apoptotische Geschehen beeinflusst werden (MANABE et al. 1996, YANG, RAJAMAHENDRAN 2000).

Es liegen Hinweise vor, dass die Apoptose der Cumuluszellen die Qualität und die Fertilisierbarkeit der Oozyten beeinflusst (HOST et al. 2000, 2002, MIKKELSEN et al. 2001, ALISCH et al. 2003). Die Untersuchung der Apoptoserate in den Cumuluszellen ist demnach bei den verschiedenen Spezies als möglicher Parameter der Eizellqualität von grossem Interesse.

TORNER et al. (2003b) untersuchten die Apoptoserate bei COK von Kamelen. Sie konnten einen Anstieg der Apoptoserate bei Cumuluszellen während der IVM nachweisen und einen Unterschied zwischen trächtigen und nichtträchtigen Spendertieren feststellen. In den Cumuluszellen von nichtträchtigen Spendertieren wurden höhere Apoptoseraten nachgewiesen.

Eine besondere Bedeutung haben Untersuchungen zur Eignung der Apoptoserate in Cumuluszellen als Parameter der Eizellqualität in der humanmedizinischen IVF-Praxis. Besonders in Deutschland ist die Entwicklung solcher Parameter und eines minimal invasiven Verfahrens zur Auswahl von Vorkernstadien aufgrund der Beschränkungen durch die derzeitigen Gesetze von großer Bedeutung. Zahlreiche Untersuchungen konnten zeigen, dass Oozyten mit einer höheren Apoptoserate der umgebenden Cumuluszellen eine

geringere Fertilisation, eine schlechtere embryonale Weiterentwicklung sowie daraus resultierende negative Implantationsergebnisse aufwiesen (OOSTERHUIS et al. 1998, HOST et al. 2000, LEE et al. 2001, ALISCH et al. 2003). Es liegen jedoch auch Untersuchungen vor, die die Verwendung der Apoptoserate als Parameter der Oozytenqualität anzweifeln bzw. einen positiven Einfluss der apoptotischen Cumuluszellen auf die Oozyte feststellen konnten (NAKAHARA et al. 1997, RAMAN et al. 2001). LEE et al. (2001) konnten einen Zusammenhang zwischen der Apoptoserate der Cumuluszellen und einer ovariellen Stimulationsbehandlung feststellen.

Untersuchungen in der humanen Reproduktionsmedizin erbrachten einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem Alter der Patientin und der Apoptoserate. Bei älteren Patientinnen wurde eine erhöhte Apoptoserate bei Cumuluszellen und eine schlechtere Fertilisation der betreffenden Oozyten festgestellt (LEE et al. 2001, MOFFATT et al. 2002, CORN et al. 2005). Auch bei Tieren konnte dieser Zusammenhang festgestellt werden (PEREZ, TILLY 1997).

DE LOS SANTOS et al. (2000) konnten in ihren Untersuchungen an humanen COK einen Anstieg der Apoptose bei Cumuluszellen nach 24 h IVM beobachten.

Beim Rind liegen zahlreiche Untersuchungen über das Apoptosegeschehen in Follikeln oder kultivierten Granulosazellen (JOLLY et al. 1994, QUIRK et al. 2000, YANG, RAJAMAHENDRAN 2000) vor, jedoch nur wenige Untersuchungen über den Verlauf der Apoptose während der IVM.

Bisherige Analysen haben gezeigt, dass es während der IVM zu einem Anstieg der Apoptose in den Cumuluszellen kommt (ALM et al. 2000, IKEDA et al. 2003).

KÖLLE et al. (2003) stellten in ihren Untersuchungen eine Induktion der Apoptose in den Cumuluszellen während der IVM durch das Wachstumshormon (GH – growth hormon) fest.

ZEUNER et al. (2003) untersuchten die Apoptose in den Cumuluszellen von drei verschiedener COK-Klassen. Sie konnten eine erhöhte Apoptoserate in Cumuluszellen der COK-Klasse 3 (expandierter Cumulus oophorus) nachweisen.

### **2.4.2. Die Bedeutung der Mitochondrien im apoptotischen Geschehen**

Mitochondrien erfüllen in der Zelle durch ihre Beteiligung am Energiemetabolismus und am Ablauf der Apoptose eine Doppelfunktion.

Die Apoptose stellt ein multifaktorielles Geschehen dar. Die Mitochondrien nehmen hierbei durch ihre Beteiligung an der Aktivierung und der Regulation apoptotischer Prozesse eine

Schlüsselstellung ein (GREEN, REED 1998). Über die Mitochondrien kommt es zur Auslösung einer caspaseabhängigen und/oder caspaseunabhängigen Apoptose.

**Tab. 5** Möglichkeiten der Beeinflussung der Apoptose durch Mitochondrien

<b>Möglichkeiten der Beeinflussung der Apoptose durch Mitochondrien</b>
Freisetzung von Caspaseaktivatoren (Cytochrom c, AIF, Caspasen)
Änderungen im Elektronentransport, Absinken der ATP-Produktion
Verlust des Membranpotentials durch Öffnen der Mitochondrial permeability transition pore (PTP)
Freisetzung von pro- und/oder antiapoptotische Bcl-2-Proteine
Veränderungen des zellulären Redoxpotentials

Als Aktivator der caspaseabhängigen Apoptose spielt Cytochrom C eine zentrale Rolle. Cytochrom C wird nukleär als inaktives Apo-Cytochrom C codiert und gelangt durch die äußere Mitochondrienmembran in den intermembranären Spalt. Dort kommt es durch die Anlagerung einer Häm-Gruppe zu einer Konformationsänderung und zu der Bildung des „reifen“ Holo-Cytochrom C (RAVAGNAN et al. 2002, REGULA et al. 2003). Holo-Cytochrom C ist als Elektronencarrier an der Atmungskette beteiligt. (BOSSY-WETZEL, GREEN 1999). Bei Vorliegen eines apoptotischen Signals (z.B. intensive UV-Strahlung, Stauroporin, Überexpression von Bax) kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C aus dem intermembranären Spalt. Über die Art der Freisetzung liegen verschiedene Theorien vor. Zum einen könnte die Freisetzung über eine Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran nach vorherigem Anschwellen des Mitochondriums erfolgen. Ein Anschwellen der Matrix mit anschließender Ruptur der äußeren Membran kann über das Öffnen der PTP (mitochondrial permeability transition pore) vermittelt werden. PTP ist ein nicht spezifischer Ionenkanal zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran, der nach Einwirken eines proapoptotischen Signals eine Passage von Molekülen über 1500 Da erlaubt (REGULA et al. 2003). Das Öffnen der PTP verursacht eine Depolarisation mit einem Einstrom von H<sup>+</sup>-Ionen und dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Die Matrix vergrößert sich und es kommt schließlich zur Ruptur der äußeren Membran (BERNARDI et al. 1998). Als Ursachen für das Öffnen der PTP wurden ansteigende Calciumkonzentrationen, Sauerstoffradikale, Fettsäuren, Proteine der Bcl-2-Familie (Bax, Bak, Bim, Bid) und Caspaseaktivierung nachgewiesen. Dies führt zu einem Abfall des Membranpotentials und zu einer Entkopplung der Atmungskette (GREEN, REED 1998, BOSSY-WETZEL, GREEN 1999). Das Öffnen der PTP scheint jedoch zum Teil nach der Aktivierung der Caspasekaskade zu erfolgen und führt

dann zu einer Verstärkung des apoptotischen Signals durch erneute Caspaseaktivierung aufgrund der Freisetzung von Cytochrom C und AIF (apoptosis inducing factor).

Eine andere Möglichkeit wäre die Freisetzung des Cytochrom C durch bestimmte Kanäle in der äußeren Mitochondrienmembran (GREEN, REED 1998).

Das freigesetzte Cytochrom C bildet im Zytosol zusammen mit APAF-1 und Procaspase-9 das sogenannte „Apoptosom“, das zur Aktivierung der Procaspase-9 zur aktivierten Caspase-9 fähig ist (RAVAGNAN et al. 2002). Das mitochondriale Apoptosom ist ein hochmolekularer caspaseaktivierender Komplex (CAIN et al. 1999). Im Anschluss kommt es zur weiteren Aktivierung von Caspasen (z.T. durch Autoaktivierung) (LI et al. 1997). Beim Vorliegen von hohen Konzentrationen von Caspaseinhibitoren im Cytosol einer Zelle, wird durch die Cytochrom C-Freisetzung keine caspaseabhängige Apoptose ausgelöst, sondern die Kaskade entwickelt sich eher in Richtung eines nekrotischen Verlaufes (GREEN, REED 1998).

Der Mechanismus der zur Freisetzung von Cytochrom C führt ist noch nicht vollständig geklärt. Eine große Bedeutung wird Mitgliedern der Bcl-2-Familie zugeordnet (GROSS et al. 1999, ADRIAN, MARTIN 2001). Nach dem Einwirken von zellulärem Stress translozieren proapoptische Moleküle dieser Familie (Bid, Bax, Bad, Bak, Bik) zur äußeren Mitochondrienmembran und führen dort (z.B. durch die Bildung von Poren) zur Freisetzung von Cytochrom C. Bcl-2 und Bcl-XL sind Inhibitoren der Apoptose (antiapoptische Moleküle) und blockieren die Freisetzung von Cytochrom C durch die Dimerisierung von proapoptischen Molekülen (GROSS et al. 1999, ADRAIN, MARTIN 2001).

Neben Cytochrom C kommt es als Antwort auf ein apoptotisches Signal auch zur Freisetzung des Flavoproteins AIF (apoptosis inducing factor). AIF löst eine caspaseunabhängige Apoptose aus (SUSIN et al. 1996, ZAMZAMI et al. 1996) und wird als inaktive Vorstufe in das Mitochondrium eingeschleust, wo sich durch Konformationsänderung das aktive AIF-Molekül bildet. Nach dem Auftreten eines apoptotischen Signals wird AIF ins Cytosol freigesetzt und bewirkt am Nukleus die Kondensation des Chromatins sowie DNA-Fragmentierung. AIF spielt eine große Rolle bei apoptotischen Verläufen in der frühen Embryogenese (JOZA et al. 2001).

Die Mitochondrien einiger Zellen enthalten Procaspase-2, -3 und -9, die nach einer Freisetzung eine caspaseabhängige Apoptose auslösen können. Die Aktivierung dieser Kaskade und die Bedeutung von Procaspasen in Mitochondrien sind noch unklar (MANCINI et al. 1998). Wahrscheinlich ermöglichen die Procaspasen eine Aktivierung weiterer Caspasen und die Auslösung der Apoptose beim Vorliegen von beschädigten Mitochondrien in einer Zelle (GULBINS et al. 2003).

Die Unterbrechung des Elektronentransportes im Mitochondrium und das daraus resultierende Absinken der ATP-Produktion kann zur Apoptose beitragen, ist aber nach Literaturangaben kein potenter Auslöser der Apoptose (GREEN, REED 1998).

### 2.4.3. Caspasen

Bei Caspasen (cysteine-aspartic acid-specific proteases) handelt es sich um Proteasen mit hoher Spezifität, die zur Spaltung bestimmter Substrate fähig sind. Die Spaltung der Substrate erfolgt im Anschluß nach einem Aspartatrest (THORNBERRY, LAZEBNIK 1998).

Die Bedeutung der Caspasen im Verlauf und bei der Aktivierung der Apoptose wurde zuerst durch Untersuchungen an der Nematodenart *Caenorhabditis elegans* beschrieben (METZSTEIN et al. 1998, RAVAGNAN et al. 2002). Es wurde erkannt, dass das Gen Ced-3 von *C.elegans*, das für den programmierten Zelltod verantwortlich ist, verwandt ist mit dem Interleukin-1beta-converting Enzym (ICE, Caspase-1) bei Säugetieren (THORNBERRY et al. 1992). Die Caspase-1 war somit das erste identifizierte Mitglied in der Familie der Caspasen. Zurzeit sind 14 Caspasen beim Säugetier nachgewiesen worden. Sie sind in der Regulation der Apoptose sowie bei Entzündungsreaktionen involviert (EARNSHAW et al. 1999).

Beim Rind gibt es wenige Untersuchungen zur Charakterisierung boviner Caspasen und ausschließlich Caspase-13 wurde eindeutig identifiziert (KOENIG et al. 2001). Caspasen liegen in der Zelle als inaktive Procaspasen vor, die zu Beginn der Apoptose durch Adaptermoleküle bzw. durch Autoaktivierung in aktive Moleküle umgewandelt werden (ADRAIN, MARTIN 2001). Die Procaspasen bestehen jeweils aus drei Untereinheiten: eine NH<sub>2</sub>-terminale Prodomäne sowie eine große und eine kleine Untereinheit. Bei der Aktivierung des Proenzym durch proteolytische Prozesse bilden die beiden Untereinheiten ein Heterodimer (THORNBERRY, LAZEBNIK 1998).

Nach ihrer Funktion und Position im Verlauf der Apoptose werden die Caspasen in Initiator-(upstream) oder Effektor(downstream)caspasen unterteilt. Initiatorcaspasen werden nach dem Auftreten eines proapoptotischen Signals durch Proteolyse aktiviert und aktivieren anschließend nachfolgende Effektorcaspasen durch Spaltungsreaktionen (BOATRIGT, SALVESEN 2003). Diese Effektorcaspasen (v.a. Caspase-3, -6 und -7) sind verantwortlich für die Mehrzahl der Substratproteolysen und der Kernveränderungen während der Apoptose (EARNSHAW et al. 1999). Als Proteasen können Caspasen ihre Aktivierung selbständig durch positive und negative Feedbacks regulieren (THORNBERRY, LAZEBNIK 1998) und besitzen jeweils einen speziellen Inhibitor. Diese Caspaseinhibitoren verhindern eine spontane Aktivierung von Procaspasen (THORNBERRY, LAZEBNIK 1998).

**Tab. 6** Einteilung von Caspasen

Initiator-/Apikalcaspasen	Effektorcaspasen	Inflammatorische Caspasen
Caspase-2	Caspase-3	Caspase-1
Caspase-8	Caspase-6	Caspase-4
Caspase-9	Caspase-7	Caspase-5
Caspase-10		Caspase-6
Caspase-12		Caspase-11
Caspase-14		

FISCHER et al. (2003) beschreiben eine Klassifizierung von Caspasen aufgrund der bevorzugten Spaltungsstelle (Tab. 7).

Caspasen tragen über verschiedene Wege zum Tod einer Zelle bei. Zum einen inaktivieren bestimmte Caspasen Proteine, die die Zelle vor Apoptose schützen (z.B. Proteine der Bcl-2-Familie) (CHENG et al. 1997, XUE, HORVITZ 1997).

**Tab. 7** Einteilung von Caspasen nach ihrer bevorzugten Spaltungsstelle (FISCHER et al. 2003)

Gruppe I (Trp-Glu-His-Asp)	Gruppe II (Asp-Glu-X-Asp)	Gruppe III ((Leu/Val)-Glu-X-Asp)
Caspase-1	Caspase-2	Caspase-6
Caspase-4	Caspase-3	Caspase-8
Caspase-5	Caspase-7	Caspase-9
		Caspase-10

Caspasen sind aber auch direkt an der Zerlegung von Zellstrukturen beteiligt, wie z.B. durch die Zerstörung der Kernlamina, durch die Spaltung von Proteinen des Zytoskeletts (KOTHAKOTA et al. 1997) oder durch die Spaltung von Proteinen der DNA-Reparation bzw. -Replikation sowie des mRNA-Splicing (CRYNS, YUAN 1998).

Die Aktivierung der Caspasen kann über verschiedene Wege erfolgen. Eine Möglichkeit ist die Aktivierung über sogenannte „Todesrezeptoren“ (death receptor) auf der Oberfläche der Zelle. Nach der Bindung eines „Todesliganden“ (death ligand) an den entsprechenden Rezeptor kommt es über Adaptermoleküle (z.B. FADD bzw. TRADD) zu einer Aktivierung der Procaspase-8 (THORNBERRY, LAZEBNIK 1998). Aktive Caspase-8 aktiviert nun zum einen weitere Procaspase-8-Moleküle durch Autoaktivierung und zum anderen werden verschiedene Effektorcaspasen (z.B. Caspase-3) aktiviert (BOSSY-WETZEL et al. 1999,



ADRAIN, MARTIN 2001). Dieser Ablauf stellt den extrinsischen Weg der Apoptoseauslösung dar (BOATRRIGHT, SALVESEN 2003).

Eine andere Möglichkeit der Caspaseaktivierung führt über das Mitochondrium und über die Bildung des Apoptosoms mit anschließender Aktivierung der Caspase-9. Dies stellt den intrinsischen Weg der Apoptoseauslösung dar (BOATRRIGHT, SALVESEN 2003).

In einigen Zellen scheint die rezeptorassoziierte Aktivierung der Procaspase-8 nicht ausreichend zu sein, um Effektorcaspasen zu aktivieren. In diesem Fall kann durch Caspase-8 eine Proteolyse von Bid erfolgen. Bid führt anschließend an der äußeren Mitochondrienmembran zur Oligomerisation von Bax und/oder Bak. Die Oligomerisation von Bak führt zur Freisetzung von Cytochrom C aus dem intermembranären Spalt. Cytochrom C führt zu den bereits beschriebenen Veränderungen (ADRAIN, MARTIN 2001).

Die Serinprotease Granzym-B zytotoxischer T-Lymphozyten kann ebenfalls zu einer Caspaseaktivierung führen. Entweder die Aktivierung erfolgt direkt oder über die Spaltung von Bid und den mitochondrialen Weg.

Die Inaktivierung von Caspasen wird unter anderem durch IAPs (inhibitors of apoptosis) verursacht (ADRAIN, MARTIN 2001, REGULA et al. 2003).

Die Apoptoserate in Oozyten und Cumuluszellen gibt, wie bereits erwähnt, einen Hinweis auf die Entwicklungskompetenz von Oozyten (LEE et al. 2001). Die Aktivität von Caspasen im Cumulus-Oozyten-Komplex könnte ebenfalls als Parameter für die Entwicklungskompetenz interessant sein. Untersuchungen zur Caspaseaktivität in Cumulus-Oozyten-Komplexen liegen nur sehr wenige vor. YUAN et al. (2004) untersuchten die Transkription von Caspase-1, -3, -6, -7 und -8 in Beziehung zur Caspaseaktivität in bovinen Cumulus-Oozyten-Komplexen. Die enzymatische Aktivität von Caspase-3, -8 und -9 in Oozyten und Zygoten von Mäusen wurde von PAPANDILE et al. (2004) untersucht.

## **2.5. In-vitro Maturation von Rinderembryonen**

### **2.5.1. Gewinnung und Klassifizierung von Cumulus-Oozyten-Komplexen (COK) für die IVM**

#### *Gewinnung*

Die Gewinnung von COK aus Ovarien geschlachteter Kühe und Rinder stellt zum heutigen Zeitpunkt eine anerkannte Methode im Rahmen der In-vitro-Produktion von Rinderembryonen dar. Der Transport der Ovarien vom Schlachthof zum Labor sollte die Dauer von 4 h nicht überschreiten. Als Transportmedium wird zumeist eine

phosphatgepufferte Salzlösung nach DULBECCO (PBS) bzw. eine physiologische Natriumchloridlösung verwendet (MADISON et al. 1992, SEKINE et al. 1992, CAROLAN et al. 1994, OCANA-QUERO et al. 1994). Über die optimale Lagerungstemperatur von Schlachtovarien während des Transportes liegen unterschiedliche Angaben vor. Es gilt jedoch als gesichert, dass eine Abkühlung (4-0°C) eine negative Auswirkung auf die Entwicklungskompetenz der COK besitzt (MARQUES et al. 1997, WU et al. 1998). Der optimale Temperaturbereich scheint im Bereich von 30-39°C zu liegen (BLONDIN et al. 1995, GORDON 2003).

Zur Gewinnung von Oozyten aus Schlachtovarien liegen verschiedene erprobte Verfahren vor.

In den Anfängen der IVM in den 1980er Jahren erfolgte die Gewinnung vor allem über die **Isolierung** intakter Follikel mit anschließendem kontrolliertem Eröffnen (GORDON 2003). Diese Methode ist minimal invasiv in Bezug auf die COK. Sie ermöglicht eine Gewinnung von COK aus Follikelkategorien (PAVLOK et al. 1992, HAGEMANN et al. 1999b) und die Gewinnung qualitativ hochwertiger COK bei möglichst geringer Manipulation und Beschädigung des Cumulus oophorus (CAROLAN et al. 1994). Der Nachteil des Herausschälens einzelner Follikel liegt in dem hohen Arbeitsaufwand und damit in der längeren Gewinnungsdauer.

Die **Aspiration** von COK aus Antralfollikeln stellt eine weitere Möglichkeit der Gewinnung aus Schlachtovarien dar. Diese kann mit einer Pipette, einer Spritze mit aufgesetzter Kanüle oder einer Aspirationsnadel mit angeschlossenem Vakuum erfolgen (GORDON 2003). Bei dieser Methode können nur aus ca. 30-60% der punktierten Follikel COK gewonnen werden. Durch Aspiration kann es abhängig von dem verwendeten Vakuum zu einer Schädigung des Cumulus oophorus kommen (FRY et al. 1997, HASHIMOTO et al. 1999). Der Vorteil dieser Methode liegt im Gegensatz zur Isolierung in der deutlich schnelleren Handhabung (GORDON 2003).

Das Zerschneiden der Oberfläche von Schlachtovarien (**Slicing**-Methode) stellt eine schnelle Methode zur Gewinnung einer grossen Anzahl von COK dar. Diese Methode wurde erstmalig von SUSS und MADISON (1983) beschrieben. Bei dieser Methode wird die Oberfläche der Ovarien mit einer oder mehreren Rasierklingen bzw. einer Skalpellklinge gleichmäßig eingeschnitten. Die Oberfläche wird mit einem Slicing-Medium gespült und die COK werden anschließend aus dem Spülgut unter einem Stereomikroskop aufgesucht und beurteilt. Die Anzahl der gewonnenen COK ist bis zu dreimal höher als bei der Aspirationsmethode (HAMANO, KUWAYAMA 1993, CAROLAN et al. 1994).

Die Beeinflussung des Cumulus oophorus ist bei dieser Methode gering und die Durchführung kann auch von ungeübtem Personal schnell und sicher durchgeführt werden (VINCENTI et al. 1998, MALENKO 1999, MANTOVANI et al. 1999). HAMANO und

KUWAYAMA (1993) konnten in ihrer Untersuchung einen höheren Anteil an qualitativ guten Oozyten durch die Slicing-Methode im Vergleich zur Aspirationsmethode feststellen.

Durch das Slicing tieferer ovarieller Gewebeschichten ist die Gefahr der Gewinnung unreifer Oozyten grösser als bei den anderen Methoden. Die Gefahr einer Kontamination der COK durch den Slicingvorgang lässt sich durch Antibiotikaeinsatz im Slicing-Medium und durch hygienisches Arbeiten reduzieren.

Die Schabetechnik (**Scraping**) kommt vor allem bei der Gewinnung von COK aus equinen Schlachtovarien zum Einsatz. Hierbei wird die Granulosazellschicht nach der Öffnung des Follikels mit einem Skalpell (DEL CAMPO et al. 1990) oder einem Knochenschaber (HINRICHS und DIGIORGIO 1991) abgelöst. Bei der Gewinnung von bovinen Oozyten besitzt diese Methode eine untergeordnete Bedeutung.

#### *Klassifizierung von Cumulus-Oozyten-Komplexen*

Die Beurteilung der Qualität der gewonnenen COK besitzt im Verfahren der IVP eine besondere Bedeutung. Vor allem für die Anwendung reproduktionsbiologischer Maßnahmen (z.B. Kerntransfer) sind eine Klassifizierung und eine Selektion von Oozyten mit hoher Entwicklungskompetenz vor Reifungsbeginn von grosser Bedeutung.

Das morphologische Erscheinungsbild ist das am häufigsten verwendete Hilfsmittel zur Beurteilung der Oozytenqualität (GORDON 2003). Es ermöglicht eine schnelle lichtmikroskopische Beurteilung der COK. Zur Beurteilung wird die Oozyte sowie der Cumulus oophorus herangezogen. Als Beurteilungskriterium dienen hierbei die Kompaktheit des Cumulus oophorus und die Anzahl der Cumuluszelllagen, die Größe der Oozyte sowie die Beschaffenheit des Zytoplasmas der Oozyte. Eine Oozyte guter Qualität weist ein dunkles gleichmäßig granuliertes Zytoplasma auf und ist von einem kompakten, nicht expandierten, mehrlagigen Cumulus oophorus umgeben. Oozyten schlechterer Qualität zeichnen sich durch ein helles oder ungleichmäßig granuliertes Zytoplasma und einen expandierten, verminderten bzw. völlig fehlenden Cumulus oophorus aus (MADISON et al. 1992, HAWK, WALL 1994, GORDON 2003). Diese Oozyten befinden sich bei der Gewinnung bereits in einem fortgeschrittenen Zustand der Maturation und eignen sich nicht für den Prozess der IVM.

Obwohl von verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche Klassifizierungsschemata entwickelt wurden, sind die Grundsätze der Klassifizierung ähnlich. HAWK und WALL (1994) definieren in ihren Untersuchungen drei verschiedene Klassen (Tab. 8). TORNER et al. (2003) beschreiben in ihren Untersuchungen beim Pferd, beim Schwein und beim Kamel 4 verschiedene COK-Klassen (Tab. 9).

**Tab. 8** Klassifizierungsschema für Oozyten nach HAWK und WALL (1994)

<b>gute Qualität</b>	kompakter, mehrlagiger Cumulus oophorus und gleichmäßiges, dichtes, fein granuliertes Ooplasma
<b>mittlere Qualität</b>	kompakter Cumulus mit wenigen Zelllagen, teilweise Hälfte der Zona pellucida nicht von Cumulus bedeckt, fein granuliert bis grob granuliertes Zytoplasma
<b>nicht tauglich</b>	teilweise oder voll expandierter Cumulus oophorus, sehr dunkler oder sehr heller Cumulus oophorus, Oozyten nur mit Corona radiata umgeben, denudierte Oozyten, unstrukturiertes, helles, grob granuliertes Zytoplasma

**Tab. 9** Klassifizierungsschema für Oozyten nach TORNER et al. (2003)

<b>Klasse 1</b>	Oozyten mit kompaktem Cumulus oophorus und homogenem Ooplasma
<b>Klasse 2</b>	Oozyten mit aufgelockertem Cumulus oophorus und homogenem Ooplasma
<b>Klasse 3</b>	Oozyten mit expandiertem Cumulus oophorus und homogenem Ooplasma
<b>Klasse 4</b>	Corona radiata-Oozyten bzw. denudierte Oozyten

Neben den morphologischen Kriterien gibt es weitere Möglichkeiten der nicht-invasiven COK-Klassifizierung. LAURINCIK et al. (1996) nutzen die Dichte der Corona radiata als Marker für die Qualität der COK. DE WITT und KRUIP (2001) nutzten zusätzlich zu den morphologischen Kriterien die Atresierate zur Klassifizierung. Eine steigende Atresierate führt zu einem grösseren Durchmesser der Zona pellucida, einem größeren Durchmesser der Oozyte und steigender Entwicklungskompetenz.

### 2.5.2. In-vitro Maturation von bovinen Oozyten

Eine vollständige Maturation in vitro stellt die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche In-vitro-Produktion dar. Trotz zahlreicher Verbesserungen der In-vitro-Systeme in den letzten Jahren konnten bisher noch nicht die Bedingungen erreicht werden, die eine, den In-vivo-Verhältnissen vergleichbare, optimale Reifung von Oozyten in vitro ermöglichen (HYTTEL et al. 1986, 1986b, GREVE et al. 1987). Die komplexen Abläufe der Maturation sind noch nicht in allen Einzelheiten bekannt und laufen unter In-vitro-Bedingungen zum Teil fehlerhaft ab. Eine verzögerte Maturation sowie unzureichende funktionelle und biochemische Reifungsvorgänge im Ooplasma in vitro führen zu einer schlechteren

---

Entwicklungscompetenz der Oozyten (HYTTEL et al. 1986, GREVE et al. 1987, WEHREND, MEINECKE 1998).

### *Die Bedeutung der Maturationsdauer in vitro*

Die Definition der optimalen Reifungszeit in vitro spielt eine wesentliche Rolle. Nach der Reifungszeit sollen sich möglichst viele Oozyten im Reifestadium (Metaphase II) befinden. Eine zu lange gewählte Reifungszeit fördert jedoch das Auftreten von Degenerationserscheinungen und erhöht die Polyspermierate (CHIAN et al. 1992).

OCANA-QUERO et al. (1999) untersuchten die Häufigkeit von diploiden Oozyten bei verschiedenen Maturationszeiten (24, 36, 48 h). Die größte Anzahl diploider Oozyten konnten sie bei einer Maturationszeit von 48 h nachweisen, während der niedrigste Anteil bei 24 h Maturationszeit vorlag. Die Untersuchungen von ENRIGHT et al. (2000, 2000b) zeigten eine optimale Entwicklungscompetenz bei Oozyten nach einer 24 h Reifung. Diese Ergebnisse werden durch frühere Untersuchungen von SHAMSUDDIN et al. (1993) und MONAGHAN et al. (1993) bestätigt. Einige Arbeitsgruppen konnten nach 16-18 h die ersten Metaphase II-Stadien feststellen und empfehlen daher eine mindestens 18-stündige Maturationszeit (SIRARD et al. 1989, PROKOFIEV et al. 1992, TODOROV 1994).

### *Temperatur und Begasung*

Die Temperatur während der Maturation von Rinderoozyten richtet sich in der Regel nach der Körpertemperatur des Rindes von 38-39°C. Als Standard gilt die Maturation bei 39°C (GORDON 2003). Die Untersuchungen von SHI et al. (1998) zeigten, dass Temperaturveränderungen während der IVM keinen bedeutenden Effekt auf die Entwicklungscompetenz der Oozyten aufweisen.

Eine Begasung von 5% CO<sub>2</sub> während der Maturation gilt heute als Standardmethode. Die Begasung ist jedoch abhängig von dem verwendeten Maturationsmedium und dessen Eigenschaften. 1994 führten PINYOPUMMINTR und BAVISTER Untersuchungen zur optimalen Begasung während der IVM durch. Sie definierten 5% CO<sub>2</sub> und 20% O<sub>2</sub> als die optimale Begasung. MILLER und RORIE (2000) variierten in ihren Untersuchungen die Sauerstoffkonzentration und fanden einen positiven Einfluss einer Reduzierung der Sauerstoffkonzentration im Verlauf der IVM.

### *Reifungsmedien und ihre Zusätze*

In der frühen Phase der methodischen Entwicklung der IVM (1970er und 1980er Jahre) wurde von einigen Arbeitsgruppen eine Maturation der Oozyten im intakten Follikel forciert. Die Vorteile liegen in dem Verbleiben der Oozyten in den physiologischen Bedingungen. Die Methode der Isolierung intakter Follikel ist jedoch sehr zeitaufwendig und schwierig.

Bei der Entwicklung von Reifungsmedien wird versucht, die physiologische Umgebung im Follikel (Zusammensetzung der Follikelflüssigkeit) zu imitieren. Es werden zwei Arten von Medien unterschieden (GORDON 2003): einfache Medien und komplexe Medien. Bei einfachen Medien handelt es sich um bicarbonatgepufferte Salzlösungen, die mit Pyruvat, Laktat, Glukose, Serum und Antibiotika ergänzt werden. Komplexe Medien zeichnen sich zusätzlich durch einen weiteren Zusatz von Vitaminen, Aminosäuren und Purinen aus.

Das am häufigste verwendete Reifungsmedium für die In-vitro-Reifung boviner Oozyten stellt das Standardmedium TCM 199 (Tissue Culture Medium 199) dar.