

**Aus dem Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie des
Leibniz-Instituts für Nutztierbiologie
Dummerstorf**

**eingereicht über das
Institut für Veterinärbiochemie
des Fachbereichs Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin**

**Untersuchungen molekularer Mechanismen des Übergangs von
Rindereizellen zu Embryonen:**

Prozesse der Translationsregulation – Interaktion zwischen dem
5´-Initiationskomplex der Translation und 3´-Poly(A)-Bindungsproteinen
während der meiotischen Endreifung und der frühen
Embryonalentwicklung beim Rind

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

vorgelegt von
Corinna Siemer, geb. Wimmer
Tierärztin aus Ansbach

Berlin 2010

Journal-Nr.: 3449

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier
Zweiter Gutachter: PD Dr. Wilhelm Kanitz
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Heike Tönhardt

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

translation, oocyte maturation, embryonic development, cattle, regulation, binding
proteins, sds-page

Tag der Promotion: 21. März 2011

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-963-7

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	7
Abkürzungsverzeichnis.....	8
1. Einleitung:	
Die Rolle der In-Vitro-Produktion von Embryonen in der Tierzucht:	
Möglichkeiten und Probleme.....	12
2. Literatur:	
Regulationsvorgänge während der Reifung boviner Eizellen und in der frühen	
Embryonalentwicklung.....	15
<u>2.1 Meiotische Endreifung der Eizellen.....</u>	15
2.1.1 Kernreifung.....	16
2.1.2 Zytoplasmareifung.....	17
2.1.3 Biochemische Reifungsvorgänge.....	18
<u>2.2 Befruchtung und frühe Embryonalentwicklung.....</u>	20
<u>2.3 Zellzyklus der Oozyten.....</u>	21
2.3.1 Ablauf des Zellzyklus.....	21
2.3.2 Regulatoren des Zellzyklus.....	22
2.3.2.1 Der Maturation Promoting Faktor (MPF): CDKs und Cycline.....	22
2.3.2.2 Mitogen Activated Protein Kinasen (MAPK).....	24
<u>2.4 Mechanismus und Regulation der Translation.....</u>	24
2.4.1 Aufbau der mRNA.....	25
2.4.2 Ablauf der Translation.....	26
2.4.2.1 Translationsinitiation.....	27
2.4.2.2 Elongation.....	29
2.4.2.3 Termination.....	30
<u>2.5 Sonderfälle bei der Translationsinitiation.....</u>	31
<u>2.6 Möglichkeiten der Translationsregulation.....</u>	32
2.6.1 Regulation bei der Bildung des 43S-Komplexes.....	32
2.6.2 Regulation bei der Bindung des 43S-Präinitiationskomplexes.....	33
2.6.2.1 Das Closed Loop Modell.....	33
- Das Cap-Bindungsprotein eIF4E.....	35
- Das Gerüstprotein eIF4G.....	35
- Die Helikase eIF4A und der Hilfsfaktor eIF4B.....	36
- Das Poly(A)-Bindungsprotein PABP.....	37
2.6.2.2 Globale Regulationsmechanismen.....	38
- Proteolyse von eIF4G.....	38
- Phosphorylierung der Initiationsfaktoren und ihrer Interaktionspartner.....	38
- Molekulares Mimikry am Beispiel von 4E-BP1.....	40
2.6.2.3 mRNA-spezifische Regulationsmechanismen an der 5'UTR.....	42
2.6.2.4 mRNA-spezifische Regulationsmechanismen am 3'Ende der mRNA.....	44
- Die PABP-bindenden Proteine Paip 1 und 2.....	44

- Regulation der Polyadenylierung mittels des Cytoplasmic Polyadenylation Binding Proteins (CPEB).....	45
- Translationsrepression mittels der Interaktion zwischen den Proteinen Cup und Bruno.....	48
3. Hypothese:	
Regulation der Translationsrepression in der Eizellendreifung und deren Aufhebung im Embryonalstadium durch mRNA-bindende Proteine.....	49
4. Material und Methoden.....	51
<u>4.1 Gewinnung und Vorbereitung von Untersuchungsmaterial.....</u>	<u>51</u>
4.1.1 Herkunft und Gewinnung der Eizellen.....	51
4.1.2 Eizellreifung.....	52
4.1.3 In-Vitro-Fertilisation.....	53
4.1.3.1 Aufbereitung der Spermien.....	53
4.1.3.2 Vorbereitung der Eizellen.....	53
4.1.3.3 Befruchtung.....	54
4.1.4 Kultivierung.....	54
4.1.5 Gewinnung der frühen Embryonalstadien.....	54
4.1.6 Vorbehandlung und Einfrieren für weitere Untersuchungen.....	54
4.1.7 Aceto-Orcein-Färbung.....	55
<u>4.2 Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen.....</u>	<u>55</u>
4.2.1 SDS-PAGE nach Laemmli (1970).....	55
4.2.2 Western Blot.....	56
4.2.3 Membranbehandlung und Immunoblotting.....	56
4.2.4 ECL-Detektion.....	58
4.2.5 Far Western Analyse.....	58
4.2.6 eIF4E-Immunopräzipitation.....	58
4.2.7 m ⁷ GTP-Sepharose-Präzipitation.....	59
4.2.8 Analyse der Phosphorylierung verschiedener Kinasesubstrate.....	59
4.2.9 Statistische Analysen.....	60
5. Ergebnisse.....	61
<u>5.1 Gewinnung des Ausgangsmaterials.....</u>	<u>61</u>
5.1.1 Gesamtproduktion an gereiften Eizellen und Embryonen.....	61
5.1.2 Prüfung der Endreifung mittels Aceto-Orcein.....	62
5.1.3 Produktion der Embryonalstadien.....	63
<u>5.2 Analyse der Spezifität der verwendeten Antikörper bei bovinen Proben und Überprüfung der Eizellreifung anhand der Aktivierung von MAPK und eIF4E.....</u>	<u>63</u>
<u>5.3 Analyse wichtiger Faktoren der Translationsregulation von der GV-Eizelle bis zum Sechszellstadium.....</u>	<u>65</u>
5.3.1 Auftreten, Modifikationen und Interaktionen 5´-bindender Faktoren.....	66
5.3.2 Bindungsanalysen der mit der 5´-mRNA interagierenden Proteine.....	69
5.3.3 Analyse der 3´-bindenden Faktoren PABP, Paip 1 und 2.....	71
5.3.4 Analyse der 3´-bindenden Faktoren CPEB und des „Maskin like Protein“.....	74
5.3.5 Untersuchungen der Bindungseigenschaften des Maskin-ähnlichen Proteins..	74

5.3.6	Bedeutende Kinasen für die Translationsregulation während der Eizellreifung und der frühen Embryonalentwicklung.....	77
5.3.6.1	Überblick über die Proteinkinaseaktivität der wichtigsten beteiligten Kinasen bis zum Sechszellstadium.....	77
5.3.6.2	Genauere Betrachtung der für entscheidende Modifikationen verantwortlichen Kinasen im Verlauf der Eizellreifung und des Übergangs zum Embryo.....	78
6.	Diskussion.....	81
6.1	<u>Entwicklungen im Zygotenstadium.....</u>	81
6.2	<u>Regulationsmechanismen durch 5'UTR interagierende Proteine.....</u>	82
6.2.1	eIF4E kontrolliert die Bindung des Initiationskomplexes an die mRNA.....	83
6.2.2	Das Gerüstprotein eIF4G ist zentraler Vermittler des Ringschlusses.....	84
6.2.3	Das unspezifische Repressorprotein 4E-BP1 wird am Übergang der Eizelle zum Embryo inaktiviert.....	85
6.2.4	Die Helikase eIF4A hat keinen Einfluss auf die Translationsregulation in der Eizelle.....	87
6.3	<u>Regulationsmechanismen durch mit dem 3'-Ende der mRNA interagierende Proteine.....</u>	87
6.3.1	Die zytoplasmatische Polyadenylierung ist ein wichtiger Kontrollmechanismus der Translation maternaler mRNAs.....	87
6.3.2	Die Rolle des Poly(A)-Bindenden Proteins PABP und seiner embryospezifischen Variante (ePABP).....	88
6.3.3	Paip 1 und zwei haben keinen Einfluss auf die Translationsregulation im frühen Embryo.....	89
6.3.4	CPEB als zentrales Regulationselement der zytoplasmatischen Polyadenylierung.....	90
6.3.5	Das Maskin-ähnliche Protein greift in die Translationsregulation bei Rindereizellen ein.....	92
6.3.6	Weitere mRNA-spezifische Regulationssysteme sind wahrscheinlich.....	94
6.4	<u>Kinasen als Regulatoren der Translationsinitiation.....</u>	94
6.5	<u>Überblick über Aktivitäten, Modifikationen und Interaktionen regulatorischer Proteine im Verlauf der Eizellreifung und frühen Embryonalentwicklung.....</u>	96
7.	Verwendete Medien.....	107
8.	Zusammenfassung.....	110
9.	Summary.....	113
10.	Literaturverzeichnis.....	116
	Publikation.....	131
	Danksagung.....	132
	Selbstständigkeitserklärung.....	133

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Transkription und Polyadenylierung während der Eizellendreifung.....	19
Abb. 2: Translation während der Eizellendreifung.....	19
Abb. 3: mRNA-bindende Proteine.....	20
Abb. 4: „Closed Loop“-Modell nach Mangus et al., 2003.....	34
Abb. 5: Spaltung von eIF4G zur Translationsrepression.....	39
Abb. 6: Funktionsweise des 4E-Bindungsproteins als Translationsrepressor.....	41
Abb. 7: Funktionsweise des Iron Regulatory Proteins.....	44
Abb. 8: CPEB als Translationsstimulator.....	47
Abb. 9: CPEB als Repressorprotein der Translation.....	47
Abb. 10: Modell der Translationsinitiation nach Mangus et al., 2003.....	50
Abb. 11: Modelle der Translationsrepression am 3´ und 5´-Ende der mRNA.....	50
Abb. 12: Eierstock mit einem Gelbkörper in Blüte, mehreren Sekundärfollikeln und Corpora lutei in Rückbildung.....	51
Abb. 13: Eizellklassen.....	61
Abb. 14: Stadien der Endreifung der Eizellen in Aceto-Orcein-Färbung.....	62
Abb. 15: Frühe Embryonalstadien.....	63
Abb. 16: Analyse der Spezifität der verwendeten Antikörper gegenüber bovinen Proben....	64
Abb. 17: Isoelektrische Fokussierung von eIF4E.....	65
Abb. 18: Untersuchungen zur Eizellendreifung.....	66
Abb. 19: Das Cap-Bindungsprotein eIF4E.....	67
Abb. 20: Der Phosphorylierungsstatus von eIF4E während der Embryonalentwicklung.....	67
Abb. 21: Das Gerüstprotein eIF4G.....	67
Abb. 22: Der Phosphorylierungsstatus von eIF4G während der Embryonalentwicklung.....	68
Abb. 23: Die Helikase eIF4A während Eizellreifung und Embryonalentwicklung.....	68
Abb. 24: Der Translationsrepressor 4E-BP1.....	68
Abb. 25: Der Translationsrepressor 4E-BP1- grafische Darstellung.....	69
Abb. 26: Analyse der eIF4E-, eIF4G- und 4E-BP1-Bindung an das Cap mittels m ⁷ -GTP-Sepharose-Präzipitation.....	70

Abb. 27: Immunopräzipitation von eIF4E mit pelf4G.....	70
Abb. 28: eIF4G und PABP.....	71
Abb. 29: Das Poly(A)-Bindungsprotein.....	72
Abb. 30: Analyse der 3´-bindenden Faktoren PABP 1, 3, Paip 1, 2.....	72
Abb. 31: Analyse der 3´-bindenden Faktoren CPEB, Maskin-ähnliches Protein und TACC3 ..	73
Abb. 32: Analyse der Bindungseigenschaften des Maskin-ähnlichen Proteins.....	75/76
Abb. 33: Analyse der Proteinkinaseaktivität während Eizellreifung und früher Embryonalentwicklung.....	78
Abb. 34: MAP-Kinasen und ihre Phosphorylierung während der Eizellreifung und dem Übergang zum Embryo.....	79
Abb. 35: Akt und ihre Phosphorylierungsstellen während der Eizellreifung und dem Übergang zum Embryo.....	79
Abb. 36: Aurora A und B und ihre Phosphorylierung.....	80
Abb. 37: Maskin like Protein (MLP) als Translationsrepressor.....	94
Abb. 38: Das modifizierte „Closed Loop“-Modell nach Mangus et al., 2003.....	98
Abb. 39: Mögliche Translationsrepressoren im GV-Stadium.....	100
Abb. 40: Translationsrepression im MII-Stadium.....	100/101
Abb. 41: Reinitiation der Translation im frühen Embryo.....	104

Tabellenverzeichnis:

Tab. 1: Weltweite Produktion von IVP-Embryonen im Jahr 2005.....	13
Tab. 2: Eukaryotische Initiationsfaktoren und ihre Aufgaben.....	28
Tab. 3: Klassifizierungsschema für Eizellen.....	52
Tab. 4: Methodik der Membranbehandlung für das Immunoblotting.....	57
Tab. 5: Stadien der Endreifung der Eizellen in Aceto-Orcein-Färbung in Tabelle (A) und Diagramm (B).....	62
Tab. 6: Übersicht über die beteiligten Kinasen.....	80
Tab. 7: Überblick über Auftreten, Modifikationen und Interaktionen translatorisch wichtiger Proteine in der Eizellendreifung und frühen Embryonalentwicklung.....	97

Abkürzungsverzeichnis:

2C, 4C, 8C, 16C:	Zwei-, Vier-, Acht-, Sechzehnzeller
3'UTR:	3' untranslated region
4E-BP:	eIF4E-Bindungsprotein
5'TOP:	5' terminaler Oligopyrimidinkomplex
5'UTR:	5' untranslated region
A:	Adenin
A I:	Anaphase I der Meiose
ACTB:	β -Actin-Gen
ala:	Alanin
APC:	Anaphase Promoting Complex
ARE:	AU-reiche Elemente
ARS:	Autoregulatorische Sequenz
AS:	Aminosäure
A-Stelle:	Aminoacylstelle am Ribosom
ATM:	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP:	Adenosintriphosphat
ATR:	ATM and Rad3-related
BHV 1:	Bovines Herpesvirus 1
BRE:	Bruno Responsive Element
BSA:	Bovines Serum Albumin
BVDV:	Bovines Virus-Diarrhoe-Virus
BVN:	Besamungsverein Neustadt
C:	Cytosin
CBC:	Cap Binding Complex
Cdc:	Cell Division Cycle Kinase
CDK:	Cyclin Dependent Kinases
COK:	Cumulus - Oocyten Komplex
CPE:	Cytoplasmic Polyadenylation Element
CPEB:	Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein
CPSF:	Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor
CSF:	Cytostatic Factor
CSFV:	Classical Swine Fever Virus (Klassische Schweinepest)
Dcp:	Decapping Protein
DNA:	Desoxyribonucleic acid
dsRNA:	doppelsträngige RNA

DTT:	Dithiothreitol
ECL:	Enhanced Chemoluminescence
eEF:	Eukaryotic Elongation Factor
EGF:	Epidermal Growth Factor
eIF:	Eukaryotic Translation Initiation Factor
ER:	Endoplasmatisches Reticulum
eRF:	Eukaryotic Release Factor
ERK:	Extracellular Signal Regulated Kinase
E-Stelle:	Exitstelle am Ribosom
FRAP:	FKBP12 Rapamycin associated Protein
FSH:	Follikelstimulierendes Hormon
G:	Guanin
GAP:	GTPase Activating Protein
GnRH:	Gonadotropin Releasing - Hormon
GSK3:	Glycogen Synthase Kinase 3
GST:	Glutathion-S-Transferase
GTP / GDP / GMP:	Guanosintriphosphat / Guanosindiphosphat / Guanosinmonophosphat
GV:	Germinal Vesicle
GVBD:	Germinal Vesicle Breakdown
H1:	Histon 1
HCV:	Hepatitis C Virus
HRI:	Häm regulierter Inhibitor
HRP:	Horseradish Peroxidase
ICM:	Inner Cell Mass
ICSI:	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IEF:	Isoelektrische Fokussierung
IGF:	Insulin like growth factor
IRE:	Iron Response Element
IRES:	Internal Ribosomal Entry Sites
IRP:	Iron Regulatory Protein
IVF:	In-Vitro-Fertilisation
IVM:	In-Vitro-Maturation
IVP:	In-Vitro-Produktion
kDa:	Kilodalton
LH:	Luteinisierendes Hormon
M:	Stoffmengenkonzentration, Molarität (mol/L)
MI:	Metaphase I

MII:	Metaphase II
m ⁷ GTP:	7-Methyl-Guanosintriphosphat
MAPK:	Mitogen Activated Protein Kinases
MAPKK:	MAPK-Kinase
MEK:	Mitogen Activated ERK Activating Kinase
met:	Methionin
MISS:	MAPK-Interacting Spindle Stabilising Protein
MLP:	Maskin Like Protein
Mnk:	MAPK integrating kinase
MPF:	Maturation Promoting Factor
M-Phase:	Mitosephase
mRNA:	Messenger RNA
mTOR:	Mammalian Target of Rapamycin
n / 2n:	haploider / diploider Chromosomensatz
NMD:	Nonsense Mediated Decay
nt:	Nucleotide
p-:	phospho-
p.c.:	post coitum
p90rsk:	Ribosomal Protein S6 Kinase
PABP:	Poly(A) - Bindungsprotein
PAGE:	Polyacrylamidgel – Elektrophorese
Paip:	PABP- interacting protein
PAP:	Poly(A) - Polymerase
PBS:	Phosphat Buffered Saline
PCBP:	Poly C - Bindungsprotein
PDGF:	Platelet Derived Growth Factor
PERK:	PKR-ähnliche ER-Kinase
PGCs:	Primordial Germ Cells
PGF2 α :	Prostaglandin F2 alpha
PI3K:	Phosphoinositid-3-OH Kinase
PKA, PKB, PKC:	Proteinkinase A, B, C
PKR:	Proteinkinase RNA-aktiviert
Poly(A):	Poly-Adenosin
PPT:	Polypyrimidin-Trakt
PRE:	Polyadenylation Response Element
P-Stelle:	Peptidylstelle am Ribosom
PTB:	Poly-Y-Trakt-Bindungsprotein

PVDF:	Polyvinylidene Difluoride
RIPA:	Radioimmunopräzipitationsassay
RNA:	Ribonucleic Acid
RRM:	RNA Recognition Motif
rRNA:	Ribosomal RNA
S:	Svedberg (Maßeinheit für Sedimentationskoeffizient)
SDS:	Sodium Dodecylsulfate
Ser:	Serin
S-Phase:	Synthesephase der Mitose
T I:	Telophase I
TACC:	Transforming Acidic Coiled Coil
TBS:	Tris Buffered Saline
TCM:	Tissue Culture Medium
Thr:	Threonin
TNF:	Tumor Necrosis Factor
tRNA:	Transfer RNA
TTBS:	Tween Tris Buffered Saline
Tween 20:	Polyoxyethylenesorbitanmonolaurate
U:	Uridin
uORF:	Upstream Open Reading Frame
UTR:	Untranslated Region
VSIEF:	Vertical Slab Gel Isoelectric Focusing
ZNS:	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung:

Die Rolle der In-Vitro-Produktion von Embryonen in der Tierzucht: Möglichkeiten und Probleme

Im Jahre 2005 wurden weltweit über 330.000 transferfähige Embryonen in vitro produziert, von denen 80 Prozent kryokonserviert oder frisch transferiert wurden (www.iets.org). Diese Zahl ist in den vergangenen Jahren stetig gestiegen, wobei sich jedoch große Unterschiede zwischen den verschiedenen Erdteilen zeigen (Tab. 1).

Die In-Vitro-Produktion (IVP) von Rinderembryonen hat sich seit der Geburt des ersten Kalbes aus In-Vitro-Fertilisation (IVF) 1981, damals noch in vivo gereift (Brackett et al., 1982), und der ersten gelungenen Entwicklung befruchteter Eizellen in spezifischen Kulturmedien in vitro zu präimplantativen Embryonen 1988 (Goto et al.) durch ständige Weiterentwicklung in vielen Bereichen etabliert. Sie ist nicht nur eine wichtige Basistechnologie, die es ermöglicht, viele reife Eizellen und Embryonen genau definierter Stadien für die reproduktionsbiologische Grundlagenforschung zu produzieren, sie gehört auch zu den assoziierten Biotechniken, wie das vor allem in der Humanmedizin wichtig gewordene ICSI-Verfahren (Intrazytoplasmatische Spermieninjektion), Gentransfer, Geschlechtsbestimmung, Kerntransfer und Klonierung. Auch in der Nutztierproduktion ist sie bereits weit verbreitet und als Standardmethode verankert, da sie auch aus tierzüchterischer Sicht viele Vorteile bringt. So ermöglicht dieses Verfahren, das Generationsintervall zu verkürzen und die Vermehrung von Zuchttieren mit hohem genetischen Potenzial zu beschleunigen. Des Weiteren bietet IVP in Verbindung mit Kryokonservierung die Möglichkeit, Genbanken anzulegen, um das genetische Potenzial bestehender Haustierrassen oder gefährdeter Rassen zu erhalten.

Jedoch ist die In-Vitro-Produktion immer noch Ziel intensiver Forschung, da die bisher erzielbaren Ergebnisse noch nicht zufriedenstellend sind.

Rund 90 % der gewonnenen Oozyten erreichen bei der In-Vitro-Maturation (IVM) die Metaphase II (Melo Sterza, 2003). Die Befruchtungsrates liegt in Bezug auf die Gesamtzahl gewonnener Eizellen zwischen 60 und 80 % (Sirard und Blondin, 1996). Zur transferfähigen Morula oder Blastozyste entwickeln sich davon 30-40 % (Farin et al., 1997; Hagemann et al., 1998). Zieht man dann in Betracht, dass die zu erwartenden Trächtigkeitsraten nach dem Frischtransfer von IVP-Embryonen bei 40-60 % liegen und bezieht eine Abortrate von 8 % (Agca, 1998) und eine perinatale Sterblichkeit lebend geborener Kälber von 14 % (Kruip und Den Daas, 1997) mit ein, kommt man zu dem Ergebnis, dass sich aus 100 gewonnenen Eizellen im besten Fall 15 lebensfähige, gesunde Kälber entwickeln (Marx, 2002). Diese Ergebnisse rechtfertigen die Anwendung der IVP in der Nutztierzucht. Weitere Forschung zur Effizienzsteigerung des Verfahrens ist jedoch nötig, um Möglichkeiten zur Verfahrensverbesserung zu erschließen.

Tab. 1: Weltweite Produktion von IVP-Embryonen im Jahr 2005:

Im Jahr 2005 wurden von insgesamt über 330.000 gesammelten Embryonen mehr als 80 % transferiert, davon 55,5 % frisch. Die größten Anteile daran entfallen auf Südamerika, wo vor allem der Frischtransfer dominiert, und Asien, wo überwiegend gefroren transferiert wird. Europa trägt bisher nur einen geringen Anteil zur weltweiten Produktion bei.

	<u>gesammelte transferfähige Embryonen</u>	<u>transferierte Embryonen</u>		
		<u>frisch</u>	<u>gefroren/aufgetaut</u>	<u>gesamt</u>
<u>Afrika</u>	<u>383</u>		<u>8</u>	<u>8</u>
<u>Asien</u>	<u>136.553</u>	<u>49.099</u>	<u>78.396</u>	<u>127.495</u>
<u>Nordamerika</u>	<u>29.243</u>	<u>1.451</u>	<u>18</u>	<u>1.469</u>
<u>Südamerika</u>	<u>143.916</u>	<u>129.340</u>	<u>68</u>	<u>129.408</u>
<u>Europa</u>	<u>18.545</u>	<u>2.689</u>	<u>3.127</u>	<u>5.816</u>
<u>Ozeanien</u>	<u>2.007</u>	<u>898</u>	<u>897</u>	<u>1.795</u>
<u>Total</u>	<u>330.647</u>	<u>183.477</u>	<u>82.514</u>	<u>265.991</u>

Ansätze dafür sind in der Aufklärung von Prozessen der Eizellreifung und frühen Embryonalentwicklung zu suchen, jedoch sind gerade die biologischen Parameter, die Reifungs- und Entwicklungsprozesse steuern, nur bruchstückhaft bekannt. Neben einer eingeschränkten embryo-maternalen Kommunikation nach dem Transfer des IVP-Embryos in ein Empfängertier (Wolf, E. et al., 2003), liegt eine der wichtigsten Ursachen für geringe Trächtigkeitsraten nach IVP in suboptimalen Reifungssystemen. Hier sind umfangreiche Untersuchungen biologischer Grundlagen notwendig, um zellphysiologische und molekulare Veränderungen während der Eizellreifung und Embryonalentwicklung besser zu verstehen und die In-Vitro-Kultursysteme zu optimieren.

In den letzten Jahren rückte die zytoplasmatische Reifung immer mehr in den Fokus der Forschung. Als wichtige Ursache für die schlechte Ausbeute an Blastozysten aus In-Vitro meiotisch voll ausgereiften Eizellen wird eine asynchrone Kern- und Zytoplasmareifung angesehen (Eppig et al., 1994; Melo-Sterza, 2003). Auch sind einige regulatorische Prozesse im Zytoplasma nicht mit der Kernreifung korreliert (Eppig, 1996). Leibfried-Ruthledge bewies schon 1987, dass eine Eizelle mit abgeschlossener Kernreifung nicht zwangsläufig schon volle Befruchtungs- und embryonale Entwicklungskompetenz hat.

Zur Beurteilung einer vollständigen zytoplasmatischen Reifung ist das genaue Verständnis der Vorgänge während der meiotischen Endreifung, also der Spanne zwischen Prophase I und Metaphase II, unerlässlich. Gerade hier, in der vollständigen Entkoppelung von Transkription und Translation, lassen diese sich frei von anderen Einflüssen gut untersuchen.

Ein wichtiger Faktor zum besseren Verständnis ist die Analyse der Repression der Translation maternaler mRNA bis zum MII-Stadium und deren erneuter Initiation während der frühen Embryonalentwicklung. Diese wird maßgeblich auf der Ebene der Translation reguliert, wie bisherige Erkenntnisse an Eizellen von Modellorganismen wie *Xenopus* und Maus belegen (Vantéry et al., 1997; Hake und Richter, 1994).

Ziel dieser Arbeit soll also vor allem die weitere Erforschung zytoplasmatischer Faktoren sein, die an der Regulation der Translation während der meiotischen Endreifung und insbesondere der frühen Embryonalentwicklung beteiligt sind. Im Besonderen sollen hier evolutionär konservierte mRNA-Bindungsproteine, die speziell mit 5'- und 3' Bereichen der mRNA interagieren, analysiert werden. Dies sind Translationsinitiationsfaktoren des eIF4F-Komplexes und deren Interaktionspartner wie 4E-BP1 und PABP, sowie verschiedene interagierende Proteine. Konkret soll das Auftreten und potentielle posttranslatorische Modifikationen der Faktoren sowie beteiligte Signalkaskaden in den verschiedenen Reifungs- und vor allem auch Embryonalstadien untersucht werden. Die Analyse spezifischer, entwicklungsabhängiger Interaktionen der Partner soll des Weiteren Rückschlüsse über deren Wirkung und Funktion während der Eizellreifung und frühen Embryonalentwicklung ermöglichen.

2. Literaturübersicht:

Regulationsvorgänge während der Reifung boviner Eizellen und in der frühen Embryonalentwicklung

2.1 Meiotische Reifung der Eizellen

Die Initiation der Meiose beginnt in etwa gleichzeitig mit der Follikulogenese.

Die Eizellentwicklung kann in zwei Phasen unterteilt werden: eine lang andauernde Wachstumsphase mit einer immensen Größenzunahme der Eizellen und die meiotische Endreifung:

Konstant hohe Transkriptionsraten, wie sie bei wachsenden Eizellen nachgewiesen werden können, sorgen für eine Akkumulation von mRNAs, Proteinen und Nährstoffen (Motlik und Fulka, 1986) und für den Eigenbedarf und das Wachstum der Zelle. Dies dient vor allem dazu, den notwendigen Vorrat an biologisch benötigten Molekülen für die spätere Endreifung und Embryonalentwicklung anzulegen (Sirard et al., 1992; Sirard et al., 1998). Im Verlauf des Wachstums sind weder quantitativ noch qualitativ große Unterschiede in der Proteinsyntheserate zu erkennen (Paynton und Bacharova, 1994). Bei Oozyten der Maus konnten Paynton und Bacharova zeigen, dass nur ca. 15 % der akkumulierten Ribosomen ebenso wie mRNAs und Proteine an der Proteinsynthese teilnehmen und der Rest in einer inaktiven Speicherform vorliegt und erst später in der Entwicklung oder nach der Befruchtung aktiviert wird.

Als meiotische Endreifung bezeichnet man nach Leibfried-Rutledge (1989) den Übergang der Eizelle von der Prophase I zur Metaphase II. In dieser Zeitspanne vollendet die Eizelle die Meiose. Noch nicht voll meiotisch kompetente Eizellen können zwar in vitro die Metaphase I erreichen, jedoch unterbleibt eine weitere Entwicklung nach der In-Vitro-Fertilisation (Pavlok et al., 1997). Auch kann die Eizelle nun bei Entfernung aus dem Follikel, z.B. im Rahmen der In-vitro-Produktion spontan wieder in die Meiose eintreten.

Die präovulatorische Reifungsinduktion, 1989 beschrieben durch Leibfried-Rutledge et al., erfolgt in vivo durch einen LH-Peak, wird jedoch auch, z.B. im Rahmen der IVM, bei voll meiotisch kompetenten Eizellen spontan durch die Lösung aus dem Follikel ausgelöst (Sirard und Blondin, 1996). Während der meiotischen Teilung durchläuft die Eizelle große morphologische Veränderungen (Shibuya et al., 1992). Hier lassen sich auch viele qualitative und quantitative Veränderungen in der Genexpression und Translation beobachten (Kotani und Yamashita, 2002).

RNA- und Proteinsynthese werden beendet, die Kernmembran aufgelöst und das Chromatin kondensiert. Der Chromosomensatz wird von diploid auf haploid reduziert. Das Ausschleusen eines Polkörperchens in den Perivitellinspalt kennzeichnet das Ende der ersten Reifeteilung. Die sekundäre Oozyte geht direkt in das Metaphase II-Stadium über und bleibt bis zur Befruchtung darin arretiert. Die zweite Reifeteilung wird erst mit der Befruchtung vollendet.

2.1.1 Kernreifung

Innerhalb von 24 Stunden nach dem LH-Peak erreicht die Eizelle die meiotische Endreife. Die Kernreife (MII-Stadium) wird oft schon früher erreicht, jedoch ist in diesen Zellen die Zytoplasmareifung noch nicht voll abgeschlossen und somit die volle Entwicklungskompetenz noch nicht gegeben.

Die Prozesse der Kernreifung gleichen sich bei fast allen Wirbeltieren (excl. Kaninchenchromatin, das schon vor Maturationsbeginn kondensiert) und lassen sich mikroskopisch gut charakterisieren. Im Germinalvesikel (GV)-Stadium liegt das Chromatin noch diffus verteilt im Plasma des sehr prominenten Kerns (Wassarman und Albertini, 1994). In Folge des gonadotropen Stimulus kommt es bei meiotisch kompetenten Eizellen zur Auflösung der Kernhülle (Germinal Vesicle Breakdown, GVBD), die nach Motlik und Fulka (1986) begleitet ist von der Chromatinkondensation und dem Verschwinden des Nucleolus. Sie unterteilen dies in sechs mikroskopisch gut unterscheidbare Phasen. In der GV I-Phase, die bereits vor dem LH-Peak auftritt, sind Kernmembran und ein bis zwei Nucleoli (Crozet et al., 1989) als Zeichen einer aktiven RNA-Synthese noch klar erkennbar, während das Chromatin bereits zu kondensieren beginnt und in einer hufeisen- bis ringförmigen Struktur um den Nucleolus liegt. Auch in den Phasen GV II und III sind Kern und Nucleolus weiter intakt, es zeigen sich aber orceinpositive Chromatincluster nahe der Kernmembran und später auch um den Nucleolus. Die Kernmembran beginnt sich aufzulösen. Das Verschwinden des Nucleolus, der Aufbau des Spindelapparates und die irreguläre Vernetzung des Chromatins bis hin zur ersten Chromosomenbildung kennzeichnet die GV IV-Phase. Währenddessen wandert das Germinalvesikel in die Peripherie der Zelle. In der frühen Diakinese ist die Kernmembran vollends verschwunden, es erfolgt keinerlei RNA-Synthese mehr und die Bivalente liegen in der Region des früheren Nucleus. Die Kondensation der jetzt tetravalent erscheinenden Chromosomen ist in der späten Diakinese abgeschlossen.

Vervollständigt wird dieses Schema noch durch die von Sun et al. 2004 beschriebene, dem GV-Stadium ähnliche G₀-Phase, die durch diffus im gesamten Kernplasma verteilte Chromatinfäden gekennzeichnet wird, und in der die noch unreifen Eizellen auch nach dem LH-Peak verharren.

Die Auflösung des Germinalvesikels (GVBD; Germinal Vesicle Break Down) ist ca. 4-8 Stunden nach dem LH-Stimulus abgeschlossen und die Chromosomen ordnen sich innerhalb von 10 bis 15 Stunden (Sirard et al. 1998) paarweise an der Äquatorialebene an. Damit erreicht die Eizelle die Metaphase der ersten Reifeteilung (M I). In der direkt anschließenden Anaphase (A I) werden die gepaarten Chromosomen durch die Spindelfasern getrennt und zu den Polen gezogen. In der Telophase I (T I) bilden sich schließlich zwei haploide Tochterzellen, die jedoch sehr asymmetrisch ausgestattet sind. Während die sekundäre Oozyte fast alle gespeicherten mRNAs, Mitochondrien, Ribosomen, Proteine und anderen

Nährstoffe mit dem größten Teil des Zytoplasmas und somit das gesamte Entwicklungspotential enthält, beinhaltet das Polkörperchen fast nur noch den Chromosomensatz und degeneriert sehr schnell (Niemann und Meinecke, 1993). Das Ausschleusen des Polkörperchens in den Perivitellinspalt kennzeichnet das Ende der ersten Reifeteilung ca. 20 Stunden nach dem LH-Peak. Ohne Unterbrechung und ohne oder nur mit kurzer Dekondensation des Chromatins geht die Eizelle in die Metaphase der zweiten Reifeteilung (M II) über. Erneut bilden sich neue Spindeln und die Chromosomen beider Tochterzellen lagern sich auf der jeweiligen Äquatorialplatte an und teilen sich im Bereich des Zentromers. Durch Aktivierung des Cytostatischen Faktors (CSF) (Sagata et al., 1989) wird die Meiose in diesem Stadium nochmals arretiert. Dies geschieht ungefähr um den Zeitpunkt der Ovulation (Salamone et al., 2001; Fan and Sun, 2004) und hält bis zum Eindringen eines Spermiums in die Eizelle an. Erst zu diesem Zeitpunkt wird dann auch die zweite Reifeteilung vollendet. Nach einer zweiten Anaphase und Telophase entstehen erneut zwei Tochterzellen, von denen eine wieder als Polkörperchen ausgeschleust wird. Damit sind die Voraussetzungen für das Verschmelzen von weiblichem und männlichem Vorkern geschaffen.

2.1.2 Zytoplasmareifung (Veränderungen der Ultrastruktur)

Eine abgeschlossene Kernreifung ist zwar essentiell für die volle Befruchtungs- und embryonale Entwicklungsfähigkeit, jedoch erhält die Eizelle die volle Kompetenz hierfür nur durch eine vollständige Zytoplasmareifung. Hierdurch muss die Eizelle auf ihre Aktivierung und die Entwicklung bis zur Implantation vorbereitet werden. Kern- und Zytoplasmareifung stehen zwar in Wechselwirkung miteinander, doch sind einige Prozesse, wie die Bildung verschiedener zytoplasmatischer Faktoren, davon unabhängig (Eppig et al., 1996).

Zahlreiche morphologische Veränderungen lassen sich im Lauf der Oozytenreifung beobachten (Hyttel et al., 1986). Die Zahl der Mitochondrien erhöht sich, sie lösen sich vom Rand, verteilen sich vom Zytoplasma und wandeln sich vom Cristatyp in den tubulären Typ um. Auch Lipidtröpfchen vermehren sich und wandern zum Zentrum eng am Endoplasmatischen Reticulum. Die peripher liegenden Golgi-Komplexe werden weniger und kleiner (Hyttel et al., 1986). Die Anzahl der Ribosomen nimmt stark zu, oft liegen sie frei im Zytoplasma. Mikrofilamente konzentrieren sich während des GVBD um die Chromosomen, bevor sie sich dann unter der Membran gruppieren.

Kortikale Granula, die in den ersten 18 Stunden der Maturation noch in Nestern verteilt im Zytoplasma liegen, lagern sich mit Beginn des GVBD perlschnurartig in einer Schicht an der Plasmamembran an (Sun et al., 2002). Die Enzyme, die sie dort abgeben, verhindern bei der späteren Befruchtung eine Polyspermie.

2.1.3 Biochemische Reifungsvorgänge

Die oben beschriebenen Veränderungen dienen vor allem der Anpassung der Eizelle an ihre Aufgaben nach der Aktivierung. Die noch nicht vollends geklärten biochemischen Reifungsvorgänge und deren Regulation sind jedoch ein entscheidender Faktor der Endreifung und vor allem auch notwendig für die frühe Embryonalentwicklung und damit Ziel unserer Forschung.

Mit Beginn der Endreifung zeigen sich große Veränderungen in den RNA- und Proteinsyntheseraten (Wassarman und Letourneau, 1976) und ebenso in den Proteinsynthesemustern.

Am Beginn der Eizellendreifung wird durch die Kondensation des Chromatins die Transkription fast vollständig eingestellt (Abb. 1). Die intensive RNA-Synthese sinkt gegen Ende der Wachstumsphase und ist ab dem GVBD nicht mehr detektierbar (Tomek et al., 2002).

Trotzdem findet sich vermehrt polyadenylierte mRNA, die jedoch kaum translatiert wird. Stattdessen ist in MII-Eizellen die Translation stark reprimiert (Abb. 2). Damit kommt es zur Akkumulation translatorisch inaktiver mRNAs, die dem frühen Embryo vor Einsetzen der eigenen Transkription spezifisch aktivierbar zur Verfügung stehen. An diesem Punkt ist eine Regulation der Proteinbiosynthese nur noch auf der Ebene der Translation möglich.

Dies wirft die Frage auf, welche Mechanismen an dieser Reprimierung der mRNA-Translation im MII-Stadium und an deren Aktivierung im frühen Embryonalstadium beteiligt sind.

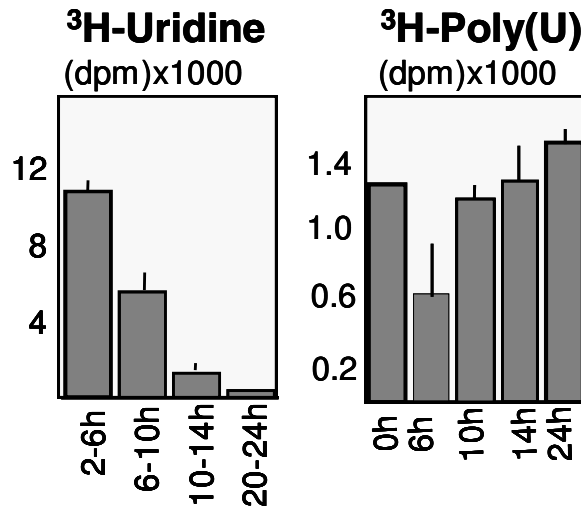
Limitierend für die Proteinsyntheserate ist die Translationsinitiation. Deshalb ist hier ein entscheidender Regulationsmechanismus zu suchen. Dieser muss für Eizellen spezifisch sein, denn, obwohl alle Faktoren in der Eizelle nachgewiesen werden können, die in somatischen Zellen essentiell für die Translation sind, bleibt in der Oocyte die Translation bis ins frühe Embryonalstadium arretiert. Von Bedeutung sind hierbei vor allem Initiationsfaktoren und andere Proteine, in Abb. 3 schematisch dargestellt, die am 5'- und 3'- Ende und der jeweiligen Untranslated Region der mRNA an spezifische Sequenzmotive binden und darüber hinaus durch Interaktionen untereinander die Translation hemmen oder stimulieren können.

Diese Interaktionen werden durch Kinasen und Phosphatasen gesteuert, die spezifisch bestimmte, regulatorisch wirksame Proteine phosphorylieren und dephosphorylieren. Die bedeutendsten sollen in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht werden.

Abb. 1:
Transkription und Polyadenylierung während der Eizellendreifung (Tomek et al., 2002)

Zur Ermittlung der Transkriptionsrate wurde der Einbau von ^3H -Uridin in mRNAs von Eizellen in verschiedenen Stadien meiotischer Endreifung gemessen. Zu denselben Stadien wurde ^3H -Poly(U) bestimmt, um den Grad der Polyadenylierung zu ermitteln. Obwohl die Transkription zum GVBD reprimiert ist, liegen im MII-Stadium (ca. 24h) gehäuft polyadenylierte mRNAs vor.

Transkription und mRNA-Akkumulation

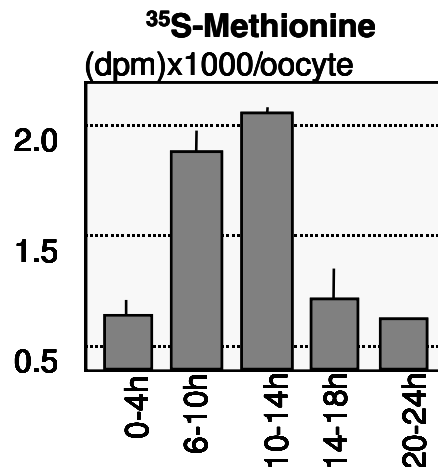


Transkription ab GVBD reprimiert

Abb. 2:
Translation während der Eizellendreifung (Tomek et al., 2002):

Durch Reifung der Eizellen über definierte Zeitintervalle (0, 6, 10, 14, 20h) und anschließende vierstündige Kultivierung mit ^{35}S -Methionin konnte gezeigt werden, dass die Translation um die MI-Phase maximal ansteigt und im MII-Stadium reprimiert wird.

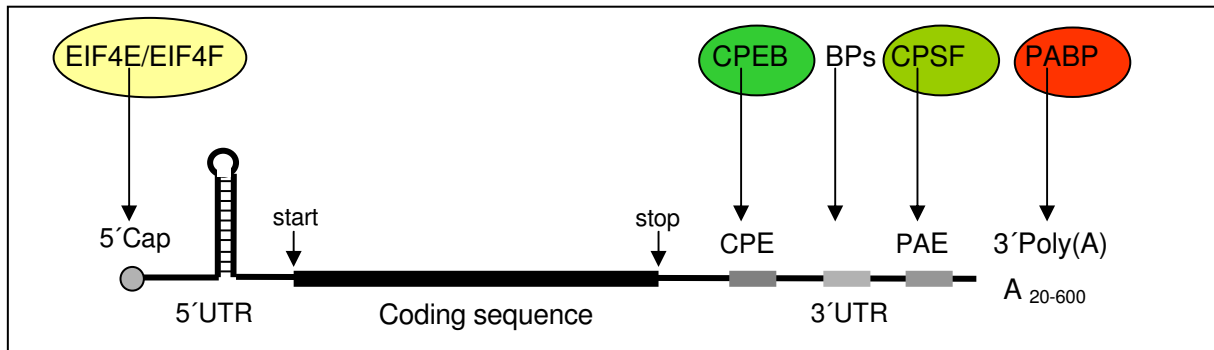
Translation



In der M II reprimiert

Abb. 3: mRNA-bindende Proteine:

Es ist zu vermuten, dass die Kontrolle der Translationsinitiation vor allem durch die Bindung spezifischer regulatorischer Proteine an die 5'- und 3'-UTR und deren Interaktion erfolgt.



2.2 Befruchtung und frühe Embryonalentwicklung

Die Befruchtung erfolgt beim Rind in der Ampulle des Eileiters. Die Eizelle bleibt nach der Ovulation für ca. 20-24 Stunden befruchtungsfähig im M II Stadium arretiert.

Die Corona-radiata-Zellen erleichtern durch chemotaktische Reize den Spermien das Auffinden der Eizelle und lösen die Akrosomenreaktion aus. In den verschmolzenen Membranen bilden sich an den Kontaktstellen mit der Eizelle Poren, aus denen hydrolysierende Enzyme des Akrosom austreten können. Das Spermium durchdringt unter Ablösung der äußeren Membran die Corona und bindet an speziesspezifische Rezeptoren an der Zona pellucida. Mittels der Protease Akrosin durchdringt es auch diese (Rüsse und Sinowatz, 1998; Gordon et al., 2003). Durch den Kontakt des Spermiums mit der Zellmembran werden verschiedene Mechanismen ausgelöst (Jaffe und Gould, 1995). Es entsteht eine Depolarisationswelle um die gesamte Eizelle, die einen stark erhöhten Einstrom von freien Ca^{2+} -Ionen herbeiführt. Dadurch kommt es zur Aktivierung der Eizelle und zu einer sofortigen Umstrukturierung der Plasmamembran. Durch das Erregungspotential werden kortikale Granula unter der Rinde zur Exozytose von Faktoren veranlasst, die die Rezeptoren der Eizelle für Spermien abbauen und durch eine partielle Proteolyse der Zona-Glycoproteine deren Struktur als Polyspermieschutz verändern. Dies wird als „Zona-Reaktion“ bezeichnet (Rüsse und Sinowatz, 1998). Der Kopf des Spermiums wird über Mikrovilli in der Eizellmembran in die Zelle aufgenommen. Durch Aufnahme von Flüssigkeit wird er größer, die Chromosomen dekondensieren und es bildet sich der haploide männliche Pronucleus. An der Aufnahmestelle des Spermiums bleibt eine leichte Erhebung, der sog. Empfängnishügel (Wassarmann und Litscher, 2008). Gleichzeitig wird durch den Calciumeinstrom die Arretierung der Eizelle in Metaphase II aufgehoben und der Stoffwechsel erneut aufgenommen. Sie vollendet die Anaphase und Telophase der zweiten Reifeteilung, ein weiteres Polkörperchen wird ausgestoßen. Da das erste Polkörperchen sich ebenfalls teilen kann, kann man gegebenenfalls drei Polkörperchen beobachten. Anschließend dekondensieren die Chromosomen, es entsteht der weibliche Vorkern.

Beide haploiden Vorkerne durchlaufen eine DNA-Synthesephase. Unter Vermittlung des Zytoskeletts bewegen sie sich aufeinander zu. Die reduplizierten Chromosomen kondensieren, die Kernmembranen beider Vorkerne lösen sich auf und ordnen sich auf der Äquatorialebene einer gemeinsamen, von der Eizelle produzierten Teilungsspindel an. Es entsteht die Zygote mit diploidem Chromosomensatz, die sofort in die Prophase der ersten meiotischen Furchungsteilung übergeht (Rüsse und Sinowatz, 1998). Beim Säuger entstehen durch totale äquale Teilung aus der Zygote gleich große, dotterarme, und zur vorhergehenden immer kleinere Blastomeren, die bis zum Blastozystenstadium in der Zona pellucida eingeschlossen bleiben. Im Zwei- und Vierzellstadium schwimmen die noch omnipotenten Blastomeren frei im Zytoplasma. In diesem Stadium können monozygote Mehrlinge entstehen. Ab dem Acht-Zell-Stadium, am dritten Tag nach der Befruchtung, sind die Blastomeren über Desmosomen und Nexus miteinander verknüpft und ihre Differenzierung beginnt. Nur vermutlich drei innenliegende Zellen entwickeln sich zum Embryoblasten, die äußeren mit Kontakt zur Zona werden zum Trophoblasten. Nur diese besitzen nach außen hin noch Mikrovilli und Lektinbindungsstellen, die Kerne wandern in eine mehr zentrale Lage. Zu diesem Zeitpunkt im späten Acht-Zellstadium passiert die Eizelle den Eileiteristhmus an der Uterushornspitze. Am fünften bis sechsten Tag entwickelt sich die Eizelle zur Morula. Ab 32 bis 64 Blastomeren bildet sich eine Höhle, das Blastozoele aus. Die außen liegenden Trophoblasten bilden einen Epithelverband mit Kittzonen und sezernieren Flüssigkeit. Am Tag sieben bis acht nach der Befruchtung bildet sich die Blastozyste. In ihr ist deutlich der Embryoblast, auch als Inner Cell Mass bezeichnet, zu erkennen. Aus dem Embryonalknoten entwickeln sich später der Embryo, der Dottersack und die Allantois, aus dem Trophoblasten das Amnion und Chorion. Währenddessen wandert der Konzeptus in den mittleren Hornabschnitt, wo nach dem Schlupf aus der Zona pellucida die Implantation erfolgt (Rüsse und Sinowatz, 1998; Gordon, 2003).

2.3 Zellzyklus der Oozyten

2.3.1 Ablauf des Zellzyklus

Auch Eizellen unterliegen einem ähnlichen Zellzyklus wie alle anderen Zellen. Dieser lässt sich in zwei Phasen unterteilen, die bereits beschriebene M-Phase (Mitose/Meiose), in der sich die Zelle teilt, und die Interphase, in der RNA-Synthese, Proteinsynthese und Zellwachstum dominieren (Alberts et al, 2004). Die Interphase lässt sich in drei Phasen einteilen, deren Benennung auf A. Howard und S. R. Pearl (1953) zurückzuführen ist. In der postmitotischen Gap 1(G1)-Phase wächst die Eizelle, regeneriert nach der Zellteilung neues Zytoplasma und Zellorganellen und synthetisiert die für die spätere DNA-Synthese nötigen RNAs, Histone, Replikationsenzyme und andere Proteine. Die S-Phase ist die Phase der DNA-Synthese, in der die DNA redupliziert wird. Darauf folgt die zweite Gap-Phase oder Postsynthesephase, die erneut für Zellwachstum und Proteinsynthese zur Vorbereitung auf die nächste Teilung genutzt wird. In jeder Gap-Phase wird an einem Kontrollpunkt geprüft, ob die Zelle alle

Voraussetzungen für die Aufnahme der DNA-Synthese bzw. der Zellteilung erfüllt. Bereits in der frühen Embryonalentwicklung beginnt die Eizelle in der S-Phase des Zellzyklus mit der DNA-Synthese. Um den Zeitpunkt der Geburt arretiert sie dann im Dictyotän am G2-Kontrollpunkt zwischen der Gap 2 (G2) und der Mitosephase (M-Phase) (Moor et al., 1990). Hier werden DNA-Anomalien repariert und Protein- und RNA-Reserven für das Erreichen der vollen meiotischen Kompetenz und die weitere Entwicklung angelegt, bevor die Eizelle in die M-Phase eintritt (Vantery et al., 1997). Für die Wiederaufnahme der Meiose müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein: Um den G2-Arrest zu überwinden, muss ein spezifischer Zytoplasmastatus erreicht sein, dann kann die durch einen Progesteronstimulus ausgelöste Signalkaskade die weitere Meiose initiieren. Die erste Reifeteilung ist einzigartig, da sie eine Reduktionsteilung ist und direkt ohne Interphase in die zweite Reifeteilung übergeht. Die Steuerungsmechanismen müssen deshalb die Trennung der homologen Chromosomen erlauben, während die Haftung der Schwesterchromatiden aneinander gewährleistet bleiben muss. Darüber hinaus muss der Eintritt in die Interphase verhindert werden.

2.3.2 Regulatoren des Zellzyklus

Die Regulation des Zellzyklus, insbesondere bei der Wiederaufnahme der Meiose umfasst weitreichende Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozesse verschiedener Proteine und weiterer Kinasen. Dieser Kontrollmechanismus beruht auf einer sukzessiven Aktivierung verschiedener Proteinkinasen, die jeweils den nächsten Schritt im Zellzyklus ermöglichen. Im Folgenden sollen zunächst die verbreitetsten Regulationsfaktoren dargestellt werden. Auf einzelne Kinasen soll dann vermehrt im speziellen Teil eingegangen werden.

2.3.2.1 Der Maturation Promoting Faktor (MPF): CDKs und Cycline

Cycline sind kurzlebige, von Abschnitt zu Abschnitt des Zellzyklus unterschiedliche Proteine, deren relative Konzentration zyklischen Schwankungen unterworfen ist und dadurch die Aktivität der langlebigeren Cyclin abhängigen Kinasen (cdk) steuert (Nigg, 1995). Sie aktivieren durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung bestimmte Enzyme und spezifische Cdk's zur Vorbereitung der Zelle auf den Eintritt in die nächste Phase und bewirken den Abbau des Inhibitors des nächsten Cyclin-cdk Komplexes, so dass der Kontrollpunkt für den folgenden Abschnitt überwunden werden kann.

Der bekannteste und am besten beschriebene dieser Komplexe ist der Maturation Promoting Faktor. Die zytoplasmatische Aktivität des MPF, der bei Fusion von unreifen und reifen Eizellen den GVBD auslösen konnte, wurde schon von Masui und Markert 1971 bei Amphibieneizellen und von Fulka 1985 bei Mäuse- und Schweineeizellen festgestellt. Seine Bezeichnung erhielt er in nahezu allen sich teilenden Zellen verschiedenster Spezies nachweisbare MPF auf Grund seiner generellen Fähigkeit, unabhängig von der Spezies der Spender- und Empfängerzelle den Eintritt in die M-Phase zu stimulieren (Kotani und Yamashita, 2002).

Seine Aktivitätsmaxima treten während des GVBD und bei MII auf. In diesen Phasen liegt er als Komplex vor, der als Lamininkinase den GVBD stimuliert und die massive Transkriptionsreduktion begünstigt (Tomek, 2002b). Damit schafft er wichtige Voraussetzungen für die meiotische Reifung. Der dimere Komplex besteht aus einer 32 kDa Serin/Threonin-Proteinkinase, der ersten beschriebenen Cdk, und einem 45kDa Phosphoprotein. Die p34^{cdc2} oder cdc2 (cell division cycle) genannte Kinase kontrolliert als katalytische Untereinheit den Zellzyklus. Bei Defekten dieser Kinase arretiert die Zelle in der G2-Phase. Das Phosphoprotein ist ein Cyclin vom B-Typ und dient als regulatorische Untereinheit (Jones et al., 2004). Die Phosphorylierung von Cyclin B hat nach Li et al. (1997) keine Bedeutung für die Aktivität, Bindung und Stabilität des Komplexes, sondern sorgt vermutlich für die richtige Lokalisation des Komplexes im Zytoplasma. Die Degradation von Cyclin B erfolgt über ein spezifisches ubiquitinabhängiges proteolytisches System, den APC (Anaphase-Promoting-Komplex). Im GV-Stadium ist nur eine basale MPF-Aktivität nachweisbar (Tomek et al., 2002b; Kubelka et al., 2000). Da cdc2 schon vorhanden ist, ist die Neubildung von Cyclin B und die Aktivität der Phosphatase cdc25 maßgeblich für den Anstieg der MPF-Komplexe ab Beginn des GVBD verantwortlich. Der genaue Mechanismus ist speziesspezifisch sehr unterschiedlich. Beim Rind werden zwei Maxima in der Aktivitätskurve des MPF beschrieben (Torner et al., 2001; Kubelka et al., 2000). Sie liegen in der MI und der MII und unterstützen jeweils den Eintritt in diese Phasen. Der Abfall dazwischen ist auf die Degradation von MPF durch APC zurückzuführen (Taieb et al., 1997). Währenddessen wird allerdings die Cyclin-B-Synthese schon wieder stimuliert (Kobayashi et al., 1991), was zur Anhäufung neuer MPF-Komplexe und dem erneuten Anstieg der Aktivität führt. Es wird vermutet, dass diese Erneuerung des MPF nötig ist, um die Neubildung der Kernhülle zu verhindern und die DNA-Replikation weiter zu unterdrücken (Wehrend und Meinecke, 2001). Nach der Aktivierung der Oozyte durch Fertilisation oder parthenogenetischen Stimulus sinkt die Aktivität des MPF ab (Collas et al., 1993). Bei Abschluss der 2. Reifeteilung wird, ähnlich wie bei der Mitose, MPF gleichzeitig mit der Trennung der Schwesterrchromatiden und dem Eintritt in die Interphase inaktiviert (Philpott and Yew, 2008).

Der MPF-Komplex hat durch direkte Phosphorylierung von Zellstrukturelementen an Serin- oder Threoninresten oder durch die Aktivierung anderer Kinasesysteme viele wichtige Funktionen insbesondere bei der Einleitung des GVBD, z.B. bei der Auflösung der Kernmembran (Heikinheimo und Gibbons, 1998), als H1-Kinase zur Förderung der Chromatinkondensation. Auch Elongationsfaktoren zählen zu den Substraten des MPF (Sun et al., 2002). Die Reorganisation des Zytoskeletts wird durch cdc2 beeinflusst, indem die Kinase in Kombination mit MAPK das Mikrotubuli assoziierte Protein p220 phosphoryliert, so dass es die Mikrotubuli nicht mehr stabilisiert (Motlik et al. 2002) und damit die Chromosomenwanderung in der Anaphase ausgelöst wird. Die Aufrechterhaltung der MPF-

Aktivität in der MII-Phase durch Unterdrückung der Cyclindegradierung ist eine der wichtigsten Aufgaben des Cytostatischen Faktors (CSF). Dieser ist hauptverantwortlich für die Arretierung der Eizellen in der M II (Kubiak et al., 1993).

2.3.2.2 Mitogen Activated Protein Kinasen (MAPK)

Sehr bedeutende Kinasen in der Eizellendreifung und frühen Embryonalentwicklung sind die MAPKinasen (Fan und Sun, 2004; Liang et al, 2007). Bei Eizellen von Säugern sind drei Formen der MAPK beschrieben. ERK1, ERK 2 (Nebreda und Hunt, 1993) und p38 MAPK (Ellederova et al., 2006) gehören zu den Serin-/ Threoninkinasen. Ihre besondere Bedeutung für die Wiederaufnahme der Meiose und die Vollendung der Endreifung zeigen Versuche von Kubelka et al. (2000) und Tomek et al. (2002b), die bewiesen, dass durch Inhibierung von MAPK und CDK durch Butyrolacton oder Roscovitin die Eizellen im GV-Stadium verbleiben.

Die MAPK treten während der Reifung in GV, GVBD, MI und MII immer in gleicher Konzentration auf, jedoch ändert sich ihre Phosphorylierung und damit ihr Aktivierungsprofil (Kubelka et al., 2000; Torner et al., 2001; Tomek et al., 2002a).

Nur im GV-Stadium liegen sie nicht phosphoryliert vor. Ca. 6 bis 10 Stunden nach dem initialen Reifungsstimulus werden sie zum Zeitpunkt des GVBD phosphoryliert und damit aktiviert (Kubelka et al., 2000; Tomek et al., 2002b). Im Reifungsverlauf steigt ihre Aktivität kontinuierlich an und erreicht ihr Maximum in der Metaphase II (Tomek et al., 2002b; Torner et al., 2001; Kubelka et al.; 2000). Die Aktivierung der MAPK in Folge eines extrazellulären Stimulus erfolgt über eine Proteinkinasekaskade mittels Ras, Raf und die bei Eizellen von *Xenopus* (Nebreda und Hunt, 1993), Maus (Verlhac et al., 2000) und Rind (Melo Sterza, 2003) nachgewiesene 39 kDa Serin/Threoninkinase c-mos. Die MAP extracellular activating kinase (MEK) ist die Kinase, die schließlich die MAPK aktiviert.

Die Wirkungsbereiche von MAPK sind vielfältig (Fan und Sun, 2004; Liang et al, 2007).

Zu den MAPK-Substraten zählt auch die Mnk (MAPK integrating kinase), die eIF4E phosphoryliert. In somatischen Zellen wirkt sie als direkte eIF4E Kinase (Waskiewicz et al., 1997/1999), dies beschrieb Tomek (2002a) auch bei Oozyten. Damit wurde gezeigt, dass in Rindereizellen MAPK über die eIF4E-Phosphorylierung direkt auf die Initiation der Translation einwirkt, was auch Teil der vorliegenden Untersuchung ist.

Weitere vor allem an der Translationsregulation bei Eizellen beteiligte Kinasen werden in späteren Kapiteln im Zusammenhang mit ihren Substraten beschrieben.

2.4 Mechanismus und Regulation der Translation

Beim Übergang der MII-Phase zum Embryo ist die Translation vollständig abgeschaltet.

Welche Mechanismen dem zu Grunde liegen, ist noch weitgehend unerforscht und soll hier am Beispiel von Rindereizellen untersucht werden. Jedoch ist es dafür nötig, erst einmal den Ablauf der Translation und die in somatischen Zellen bereits beobachteten Regulationsmechanismen zu betrachten.

2.4.1 Aufbau der mRNA:

Bei Eukaryoten erfolgt die Translation im Zytoplasma, getrennt von der Transkription im Kern. Außerdem ist der Aufbau eukaryotischer mRNA höher entwickelt. Damit bieten sich bei Eukaryoten wesentlich mehr Möglichkeiten der Regulation.

Die besonderen Modifikationen, die im Rahmen des Spleißens bereits beim Primärtranskript während dessen Synthese vorgenommen werden, sind nur bei Eukaryoten zu beobachten. Die dafür notwendigen Proteine sind der RNA-Polymerase angeheftet. Der mRNA werden noch im Kern am 5'-Ende eine Methylguanosisin-Cap-Struktur und am 3'-Ende ein Poly(A)-Schwanz angehängt (Alberts et al. 2004; Berg et al., 2006).

➤ Cap-Struktur: m⁷GpppN

Am 5'-Ende besitzt der größte Teil der zellulären mRNAs ein 7-Methylguanosisin, die sogenannte 5'Cap-Struktur.

Das Anhängen der 5'Cap-Struktur geschieht direkt nach der Synthese des 5'-Endes des Primärtranskripts durch ein dem Spleißosom aufgelagerten Capping-Enzym mit zwei aktiven Zentren, einer Triphosphatase und einer Guanylyltransferase.

Anfangs findet sich am Ende aller RNAs das Triphosphat des ersten Nucleosidtriphosphats. Die Triphosphatase spaltet ein Phosphat ab, dann fügt die Guanylyltransferase in umgekehrter Orientierung ein GMP an, so dass eine seltene 5'-5'-Triphosphatbrücke entsteht. Durch verschiedene Methyltransferasen wird das Guanosisin an der Position 7 der Guaninbase und das Nucleotid auf der Innenseite der Triphosphatbrücke an der 2'-Position der Ribose methyliert. Damit ist die Methylguanosisin-Cap-Struktur entstanden. An die fertige Struktur bindet der sogenannte Cap Binding Komplex CBC, der nach der Ausschleusung ins Zytoplasma durch eIF4E ersetzt und in den Kern zurücktransportiert wird.

Die Cap-Struktur hat verschiedene wichtige Funktionen: Zum einen verhindert sie den Abbau des 5'-Endes durch Exonucleasen; damit hat es auch stabilisierende Funktion bei nukleärer Prä-mRNA und reifer zytoplasmischer mRNA (Furuichi et al., 1977).

Zum anderen unterstützt es den Splicingvorgang und den Transport der mRNA (Rousseau et al., 1996) als ein bei allen mRNAs gleicher Ansatzpunkt für die entsprechenden Proteine.

Darüber hinaus hat es bis auf wenige Ausnahmen große Bedeutung für Initiation der mRNA-Translation, was im Weiteren noch erläutert wird.

➤ 5'Untranslated Region (5'UTR):

Die 5'UTR ist minimal 15, in der Regel aber 50 bis 100 Nucleotide (nt) lang und bestimmt sowohl durch ihre Länge als auch durch ihre Sequenz und Sekundärstruktur die Translationseffizienz der einzelnen mRNA, worauf später weiter eingegangen werden soll.

➤ Initiationscodon AUG:

Durch den genauen Beginn am Initiationscodon, gekennzeichnet durch die Nucleotidsequenz AUG, wird die Einhaltung des richtigen Leserasters bei der Translation gewährleistet.

Gewöhnlich liegt das erste AUG mehr als 15 Basenpaare vom Cap entfernt, da dies der nahestmögliche Ansatzpunkt des an der Cap-Struktur ansetzenden Translationskomplexes ist. Normalerweise liegt das AUG weiter stromabwärts und der Initiationskomplex scannt danach.

➤ Open Reading Frame (ORF)

Diese Sequenz enthält die eigentlich zu translatierenden Informationen, aus denen die Aminosäurekette eines Proteins entsteht. Sie codiert in der Regel nur für ein einziges Polypeptid, anders als die polycistronische prokaryotische mRNA.

➤ Stop-Codon:

Das Stop-Codon wird durch eine von drei möglichen Nucleotidkombinationen UAG, UAA und UGA gekennzeichnet, die von Release-Faktoren erkannt werden und zur Freisetzung des Polypeptids führen.

➤ 3' Untranslated Region:

Die 3'UTR kontrolliert die Lokalisation der mRNA und mittels stimulierender Sequenzen auch die Polyadenylierung und damit die Stabilität der mRNA. Durch spezifische Nucleotidfolgen mit Signal- oder Proteinbindungsfunktion regulieren sie auch die Translation.

➤ Poly(A)-Schwanz:

Am 3'-Ende fast aller eukaryotischer mRNAs (excl. beta-Aktin-; Histon-mRNAs: Görlach et al., 1994) wird eine Kette von 200 bis 250 Adenosingruppen ohne vorliegende Matrize angebaut (Gebauer et al., 1994). Dieser Poly(A)-Schwanz beginnt immer ca. 20 Nucleotide stromabwärts einer AAUAAA-Sequenz. Dies ist die Erkennungsstelle für den Zusammenbau eines Proteinkomplexes, der an die RNA-Polymerase gebunden ist, schon während diese das Primärtranskript im Zellkern synthetisiert. Der Komplex enthält eine Endonuclease, die die Prä-mRNA stromabwärts der Erkennungsstelle spaltet. Dann fügt eine ebenfalls enthaltene Poly(A)-Polymerase die Adenosingruppen ohne Matrize an.

In eukaryotischen Zellen gibt es zwei Mechanismen um mRNA zu polyadenylieren. Der erste Mechanismus findet im Kern statt, anschließend wird die processierte polyadenylierte mRNA begleitet vom charakteristischen Poly(A)-tail-shortening ins Zytoplasma exportiert (Dreyfuss et al., 1996). Ein zweiter Mechanismus agiert im Zytoplasma (zytoplasmische Polyadenylierung) und korreliert oft mit einer Stimulation der Translation der betreffenden mRNA in somatischen Zellen (Seli et al., 2005). Auch der Poly(A)-Schwanz schützt im Komplex mit dem assoziierten Poly(A)-bindendem Protein PABP die mRNA vor vorzeitigem Abbau durch Exonucleasen, erhöht deren Stabilität und bestimmt so die Lebensdauer der mRNA. Ebenso wie der Cap-Struktur kommt ihm eine wichtige Rolle in der Zirkularisierung der mRNA und damit der Regulation der Translationsinitiation zu.

2.4.2 Ablauf der Translation

Die Translation verläuft in drei Phasen: Initiation, Elongation und Termination.

2.4.2.1 Translationsinitiation

Bei Eukaryoten beginnt die Translation in der Regel am ersten AUG-Codon, der Translationskomplex bindet an die Cap-Struktur und scannt an der mRNA entlang. Hierfür sind viele Initiationsfaktoren notwendig, die viele verschiedene, spezifische Regulationsmöglichkeiten bieten. Eine Übersicht der wichtigsten Initiationsfaktoren ist in Tab. 2 dargestellt.

Die Translationsinitiation gilt als limitierender Faktor für die Proteinsyntheserate (Mathews et al., 1996). Vereinfachend kann man diese Phase in drei Abschnitte unterteilen (Pain, 1996):

1. die Formation des 43S-Präinitiationskomplexes,
2. die Bindung an der mRNA und das Scannen des 48S-Komplexes nach dem Startcodon sowie
3. das Erkennen des Startcodons und die Anlagerung der 60S-ribosomalen Untereinheit zur Bildung des vollständigen Ribosoms.

Vor Beginn des ersten Abschnitts liegt die kleine ribosomale Untereinheit bereits in Verbindung mit eIF3 im Zytoplasma vor, das sie stabilisiert und die Reassoziierung mit der 60S-Untereinheit verhindert. Durch Bindung von eIF1 und eIF1A wird sie auf die Anlagerung an die mRNA vorbereitet. Durch Bindung der mit Methionin beladenen Initiator-tRNA (Met-tRNA) mit eIF5 und dem durch den Komplex mit GTP aktivierten eIF2 bildet sich ein ternärer Komplex, der mittels eIF5 an die Peptidyl (P)-Stelle der vorbereiteten 40S-Untereinheit bindet.

So entsteht der 43S-Präinitiationskomplex.

2. Das Cap-Bindungsprotein eIF4E bindet an die Cap-Struktur und verdrängt dabei den nukleären Cap-Bindungs-Komplex aus den Proteinen CBP20 und CBC80, die in den Kern zurückkehren (Pestova et al., 2001). Die Bindung mit dem Gerüstprotein eIF4G erhöht die Affinität von eIF4E zum Cap (Haghighat und Sonenberg, 1997).

Gemeinsam mit dem ATP-abhängigen eIF4A bilden eIF4E und 4G den eIF4F-Komplex. Dieser bringt eIF4A in die optimale Position, um unterstützt von dem Hilfsfaktor eIF4B die Sekundärstrukturen der 5'UTR aufzuwinden (Sonenberg et al., 1988). Damit schafft sie ein einsträngiges Stück mRNA, an das der 43S-Komplex binden kann. Dieser wird über die Bindung von eIF3 ebenfalls von eIF4G herangezogen und richtig positioniert. Es entsteht der 48S-Komplex. Darüber hinaus wird durch die Bindung von eIF4E zum Poly(A)-bindenden Protein am 3'-Ende der mRNA deren Zirkularisierung erreicht, was stimulierend auf die Translation wirkt. Auf dieses „Closed-loop-Modell“ wird später noch genauer eingegangen.

Nach Erkenntnissen von Thach (1992), Pain (1996) und Sonenberg und Gingras (1998) ist die Wirkung des Cap-Bindungskomplexes eIF4F begrenzender Faktor für die Proteinsyntheserate. Hier setzen auch die meisten im Weiteren noch vorgestellten Regulationsmechanismen an. Nach dieser Anbindung des Präinitiationskomplexes an die mRNA folgt das sogenannte „Scannen“. Zuerst bindet eine instabile Form, der 48S-Komplex I, wobei die Initiator-tRNA an beliebigen, nicht komplementären Triplets anliegen kann.

Tab. 2: Eukaryotische Initiationsfaktoren und ihre Aufgaben:

Die Translationsinitiation wird durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Initiationsfaktoren mit vielfältigen Aufgaben gesteuert.

eukaryot. Initiationsfaktor (eIF)	Aufgaben
eIF1	wichtig für die Auswahl der Bindungsstelle des Präinitiationskomplexes während des Scanningvorgangs
eIF1A	bindet an 40S-ribosomale Untereinheit; hält als starkes RNA-Bindungsprotein den Präinitiationskomplex während des Scannens zusammen
eIF2	von Hefen bis zu Säugern stark konserviertes Protein, aus drei Polypeptidketten, das in der Koppelung mit GTP fähig ist, mit seiner β - und γ - Untereinheit die Initiator-t-RNA zu binden die genaue Bedeutung und Spezifität für die mRNA, tRNA oder rRNA ist noch nicht geklärt
eIF2B	von Hefen bis zu Säugern gut konserviertes Protein aus 5'-Polypeptidketten; katalysiert die Guanin-Nukleotid-Austausch-Reaktion, die für die Regeneration von eIF2-GDP in eIF2-GTP nötig ist
eIF3	multimerer Komplex aus 8 Polypeptidketten bei Säugern; bindet an die 40S-Untereinheit und verhindert deren Reassoziaton mit der 60S-Untereinheit; stabilisiert den Präinitiationskomplex; Vermittelt die Bindung an die mRNA über 4G/den eIF4F-Komplex
eIF4A	ATP-abhängige Helikase, windet die Sekundärstrukturen in der 5'UTR auf und ermöglicht so die Bindung des 43S-Komplexes; weitere im Zytoplasma frei vorliegende eIF4A und 4B können herangezogen werden, wenn besonders große Sekundärstrukturen in der 5'UTR vorliegen; Teil des eIF4F-Komplexes
eIF4B	Hilfsprotein, dass die Funktion von eIF4A unterstützt, nicht essentiell; mit starkem loop binding RRM-Motiv am N-Terminus und einer sequenzunabhängig stark bindenden basischen Region am C-Terminus
eIF4E	Cap-Bindungsprotein; zentraler Angriffspunkt vieler Regulationsmechanismen, Teil des eIF4F-Komplexes
eIF4F	Komplex aus eIF4E, eIF4G und eIF4A
eIF4G	Gerüstprotein; 2 Isoformen I. u. II.;wichtige Verbindungsfunktion zwischen 4E und 4A – vermittelt Helikase-Aktivität; vermittelt Ringschluss durch Bindung mit PABP; positioniert über eIF3-Bindung den Präinitiationskomplex an der aufgewundenen RNA
eIF5	dient als GTPase-Aktivator (GAP) für eIF2 GTP im ternären Komplex, rekrutiert mit Hilfe von eIF5B die große ribosomale Untereinheit
eIF5B	GTPase ohne eigenständige intrinsische Aktivität; Hilfsprotein zur Rekrutierung der großen ribosomalen Untereinheit

Die Faktoren eIF1 und eIF1A sind essentiell für den Übergang zum 48S-Komplex II, wenn die Initiator-tRNA stabil ans Startcodon bindet (Pestova et al., 1998). eIF1A hält als starkes Bindungsprotein den Komplex zusammen, während eIF1 für die Auswahl der Bindungsstelle notwendig ist. Das Scannen erfolgt unter Verbrauch von ATP in 5´-3´-Richtung an der mRNA entlang, entfernt alle doppelsträngigen mRNA-Abschnitte, die die Wanderung behindern würden, und scannt nach einer erkennbaren Nucleotidsequenz, i.d.R. 5´-CCACCAUGC-3´ (Kozak, 1999).

3. Beim Erreichen des Startcodons bindet die Methionyl-tRNA fest über ihr Anticodon an das AUG. Das im ternären Komplex gebundene eIF2-GTP wird hydrolysiert, wobei eIF5 als GTPase-Aktivator (GAP) und eIF5B als GTPase ohne eigene intrinsische Aktivität diesen Vorgang katalysieren. EIF2-GDP und eIF3 werden freigesetzt, so dass sich nun die große ribosomale Untereinheit anlagern kann. Der Guanin-Nucleotid-Austauschfaktor eIF2B regeneriert das eIF2-GDP zu GTP, so dass es wieder für die Translationsinitiation zur Verfügung steht. Dies ist ein wichtiger Kontrollpunkt für die globale Regulation der Translation. Das 80S-Ribosom ist nun bereit für die erste Peptidbindung. Während der weiteren Translation durchläuft das entstandene Ribosom tiefgreifende Konformationsänderungen.

Es besitzt drei Stellen für die Anlagerung der tRNA, die Aminoacylstelle (A), die Peptidylstelle (P) und die Exit-Stelle (E) am Wiederaustritt. Der Hohlraum zwischen großer und kleiner Untereinheit ist ganz mit RNA ausgekleidet. Die tRNAs binden daran und überbrücken so die Lücke zwischen den beiden Untereinheiten. Das Anticodon ragt dabei zur kleinen, die Aminosäure zur großen Untereinheit, die zum Schutz vor Hydrolyse die Peptidbindung in einer tiefen, mit rRNA ausgekleideten Spalte katalysiert. Von diesem aktiven Zentrum aus zieht ein Tunnel durch den Kern des Komplexes, durch den die Aminosäurekette nach außen tritt. Die mRNA verläuft in einem engen Kanal, der rund um den Hals der kleinen Untereinheit an A-, P- und E-Stelle vorbeiläuft. Die meisten Proteine der ribosomalen Untereinheiten besitzen mehrere mRNA-Bindungsstellen und stabilisieren so die komplizierte Tertiärstruktur des Ribosoms (Berg et al., 2006).

2.4.2.2 Elongation

Die Translationselongation besteht aus drei immer wiederkehrenden Schritten (Sonenberg et al., 2000). Als Adapterprotein für die Übertragung der Nucleotide in eine Aminosäuresequenz dienen verschiedene tRNAs unterschiedlichen Aufbaus. Die L- bis T-förmigen 73 bis 93 Nucleotide langen Moleküle tragen an einem Ende spezifisch eine der 20 Aminosäuren (21, Selenocystein wird jedoch durch Umbau von Serin hergestellt), an der gegenüberliegenden Seite bilden drei Nucleotide ein Anticodon, das für diese Aminosäure codiert und der entsprechenden Nucleotidsequenz der mRNA komplementär ist.

Die Koppelung der Aminosäuren an die richtige tRNA erfolgt im Zytoplasma unter Energieverbrauch durch spezifische Aminoacyl-tRNA-Synthetasen.

Die Auswahl der Aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) ist der längste Schritt der nur 0,05 s dauernden Elongationsphase. Nachdem die beladene Initiator-tRNA an der P-Stelle sitzt, nimmt das Ribosom an der freien A-Stelle eine zweite aa-tRNA auf. Diese muss sich vorher mit dem Elongationsfaktor eEF1alpha verbinden. Der mit GTP verbundene Faktor liefert die t-RNA zur A-Stelle. Jeder aa-tRNA-Komplex kann an diese Stelle treten, jedoch wird er nur mit einem komplementären Anticodon festgehalten. Die rRNA der kleinen ribosomalen Untereinheit erkennt die richtigen Wechselwirkungen zwischen Codon und Anticodon und hydrolysiert bei Übereinstimmung das GTP, wobei der Elongationsfaktor mit dem übrigbleibenden GDP freigesetzt wird und erneut regeneriert werden kann. Die aa-tRNA bleibt an die A-Stelle gebunden. In einem zweiten Schritt knüpft die große ribosomale Untereinheit die Peptidbindung zwischen den Aminosäuren. Die Aminosäure an der aa-tRNA der A-Stelle reagiert mit der Carbonylgruppe der Aminosäure der P-Stelle durch den räumlichen Engstand spontan ohne zusätzlich nötige Energiezufuhr. Dabei wird die t-RNA von der P-Stelle verdrängt und von ihrer Aminosäure gelöst. Die verbleibende t-RNA der A-Stelle trägt nun ein Dipeptid. Katalysiert wird diese Reaktion durch eine Peptidyltransferase, die Bestandteil der großen ribosomalen Untereinheit ist.

Indem sich das Ribosom um drei Nucleotide in 5'-3'-Richtung an der mRNA entlang verschiebt, wandert die noch über Wasserstoffbrücken an die mRNA gebundene tRNA von der A- zur P-Stelle und die deacylierte tRNA von der P- auf die E-Stelle, angetrieben von den durch GTP-Hydrolyse ausgelösten Konformationsänderungen eines weiteren Elongationsfaktors (eEF2).

In einem letzten Schritt wird die deacylierte tRNA von der E-Stelle freigesetzt. So ist der Ausgangszustand erreicht und die A-Stelle kann mit einer neuen aa-tRNA besetzt werden.

2.4.2.3 Termination

Das Ende der Translation ist erreicht, wenn auf der mRNA eines der Stopp-Tripletts UAG, UAA oder UGA auftaucht. Unter den 64 Nucleotidkombinationen gibt es nur diese drei, die nicht für Aminosäuren codieren, sondern als Stoppsignale dienen. In der Regel binden Terminationsfaktoren (release factors; RF) an das Stopp-Codon: RF1 an UAG und UAA oder RF2 an UAA und UGA. Der Faktor RF3 vermittelt die Interaktion zwischen RF1/ RF2 und dem Ribosom. Für UAA und UAG gibt es keine komplementäre tRNA. UGA nimmt eine Sonderrolle ein, da es auch für die seltene Aminosäure Selenocystein codiert. Findet sich hinter UGA eine spezielle Struktur der mRNA sorgt ein besonderer Elongationsfaktor für das Heranziehen einer tRNA^{sec} an Stelle eines Terminationsfaktors.

Die Terminationsfaktoren besetzen die A-Stelle des Ribosoms, und ein konserviertes Tripeptid am Ende des Faktors tritt in Wechselwirkung mit dem Stoppcodon, ähnlich eines Anticodons. Dann wird die Esterbindung zwischen der Polypeptidkette und der tRNA hydrolysiert und das

Polypeptid freigesetzt. Die Reaktion verbraucht Energie, die durch den GTP-bindenden eRF3 bereitgestellt wird. Der genaue Mechanismus ist noch unklar.

Danach zerfällt das Ribosom wieder in eine große und kleine Untereinheit, die für die Translation weiterer mRNAs bereitstehen.

Eine wesentlich höhere Proteinsyntheserate wird durch Polyribosomen erreicht. Sobald ein Ribosom weit genug vom Initiationscodon entfernt ist, bindet dort ein weiteres und beginnt mit der Translation.

2.5 Sonderfälle bei der Translationsinitiation:

Interne Initiation über Internal Ribosomal Entry Sites (IRES)

Mehr als 90 % der zellulären mRNAs, vor allem die von der RNA-Polymerase II produziert werden, und auch einige Viren, wie z.B. die Reoviren, besitzen eine Cap-Struktur und unterliegen dem sog. „canonischen Scanning-Mechanismus“. Sie besitzen eine 100 bis 300 Basen lange 5'UTR, an der das Scannen des Präinitiationskomplexes möglich ist. Andere mRNAs haben längere atypische 5'UTRs, die auch ein oder mehrere AUG-Codons enthalten können und deshalb schwer zu translatieren sind. Hier ist die interne Initiation über IRES (Internal Ribosomal Entry Sites) von besonderer Bedeutung. IRES sind RNA-Strukturen, die Translationsinitiationskomplexe ohne Beteiligung der Cap-Struktur direkt nahe des Initiationscodons zur Bindung heranziehen kann.

Zuerst wurde dieser cap-unabhängige Mechanismus bei Picornaviren entdeckt, der sie befähigt, der wirtseigenen Abwehr, also der Abschaltung der zellulären Proteinsynthese zu entgehen (Belsham und Sonenberg 1996).

Die cap-abhängige Translation ist durch viele zelluläre Bedingungen eingeschränkt, so z.B. bei der Mitose und Apoptose sowie durch Stressoren wie Hypoxämie und Hitzeschock. Trotzdem müssen einige mRNAs weiter translatiert werden. Dies wird oft ebenfalls über IRES initiiert. Bisher konnten über 40 zelluläre mRNAs nachgewiesen werden (www.IRESite.org), die der IRES-medierte Translation unterliegen, darunter wichtige Wachstumsfaktoren wie der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 und der Endothelien-Wachstumsfaktor, wichtige Zellzyklusproteine, das Onkogen c-myc (Hundsdoerfer et al., 2005) und auch der in der Translation so wichtigen Translationsinitiationsfaktor eIF4G (Gan et al., 1998). Er enthält in seiner 5'UTR einen starken Promotor, dessen Aktivität auf der Integrität einer PPT (Polypyrimidintrakt)-Sequenz beruht, einem entscheidenden Bestandteil einer IRES. Diese Sequenz überschneidet sich mit den Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktoren, die über ihre Bindung die Expression des Promotors kontrollieren können. Dessen biologische Funktion könnte die Produktion einer N-terminal verkürzten Form sein.

Eine Regulation aller IRES-medierte Mechanismen ist auch über die Phosphorylierung der α -Untereinheit von eIF2 möglich (Kap. 2.6.1). Fernandez et al. wiesen dies 2002 während folgender dreier zellulärer Stresssituationen nach: Aminosäuremangel, Stress des

endoplasmatischen Reticulums und doppelsträngiger RNA, die Virusinfektionen simuliert. Sie lösen alle über verschiedene Kaskaden die Phosphorylierung von eIF2 α aus.

2.6 Möglichkeiten der Translationsregulation

Die Kontrolle der mRNA-Translation spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Genexpression. Sie dient nicht nur dem wirtschaftlichen Umgang mit Ressourcen, determiniert die Größe von Zellen und letztendlich des Organismus, sondern ist auch an wichtigen Entwicklungs- und Anpassungsprozessen beteiligt, wie etwa der Reaktion auf Umweltfaktoren und Nahrungsverfügbarkeit. Der entscheidende Schritt bei der Regulation der Proteinsynthese ist die Translationsinitiation (Gebauer und Hentze, 2004; Pain, 1996; Preiss und Hentze, 1999). Dabei lassen sich die Regulationsmöglichkeiten der Proteinsynthese in zwei Hauptgruppen einteilen, die globale, quantitative Regulation, die alle mRNAs betrifft, und die spezifische, qualitative Regulation, die spezifisch die Expression bestimmter mRNA-Gruppen moduliert. Für die Regulation finden sich zwei hauptsächliche Ansatzpunkte:

- die Bindung der Methyl-tRNA an die 40S-Untereinheit, mediiert durch eIF2
- die Bindung des 43S-Präinitiationskomplexes mittels RNA-Zirkularisierung und eIF4F

2.6.1 Regulation bei der Bildung des 43S-Komplexes

Ein wichtiger Kontrollpunkt ist die Regulation der Aktivität von eIF2, denn sie wirkt global bei allen cap-abhängigen mRNAs und bei den meisten IRES. Dies ist auf verschiedene Weisen möglich. Die Phosphorylierung von Ser 51 der α -Untereinheit von eIF2, das an der Bildung des ternären Komplexes beteiligt ist, ist dabei wohl am bedeutendsten. Diese erhöht zwar die Affinität von eIF2-GDP zu seinem regenerierenden Faktor eIF2B, vermindert aber dessen Fähigkeit zum Nukleotidaustausch. Dies verringert die Menge des verfügbaren eIF2-GTP und damit die Anzahl der ternären Komplexe. Bisher sind vier eIF2 α -phosphorylierende Kinasen bekannt, die durch unterschiedliche Reize aktiviert werden (Muckenthaler und Preiss; 2008). Die doppelsträngige RNA(dsRNA)-abhängige eIF2 α -Kinase PKR reagiert auf dsRNA, wie sie z.B. bei eindringenden Viren auftreten kann, oder auch auf IFN β , das bei Virusinfektionen ausgeschüttet wird.

Eisenmangel bei der Hämbiosynthese erythroider Vorläuferzellen setzt die eIF2 α -Kinase HRI (häm-regulierter Inhibitor) frei, hemmt damit die Translation und führt zur Bildung hypochromer, mikrozytärer Erythrozyten. Die GCN2-Proteinkinase wird bei Aminosäuremangel ausgeschüttet und hemmt Translation und Zellwachstum. Im Endoplasmatischen Reticulum (ER) der Maus wurde die PKR-ähnliche ER-Kinase PERK identifiziert, die das Abschalten der Proteinbiosynthese vermittelt, sobald viele Proteine im ER vorliegen, die nicht mehr korrekt gefaltet werden können. Die Bedeutung dieses Kontrollmechanismus wird deutlich bei der experimentellen Blockade der eIF2 α -Phosphorylierung. Sie führt zur malignen Transformation der betroffenen Zellen. Viele umweltbedingte oder physiologische Stressreize wie

Temperaturschwankungen, Nährstoffmangel oder Hypoxie führen zu einer adaptiven Reaktion der Zellen, die meist eine Reduktion der generellen Translationsrate bedingt. Dies vermeidet unnötigen Verbrauch von Ressourcen. Viele davon sind auf die Hemmung der eIF2-Aktivität durch eIF2 α -Kinasen zurückzuführen (Proud, 2005). Doch auch der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor unterliegt der Regulation (Kleijn et al., 1998). Verglichen mit eIF2 liegt er in geringeren Mengen vor und scheint so limitierender Faktor der Bildung ternärer Komplexe zu sein.

2.6.2 Regulation der Bindung des 43S-Präinitiationskomplexes

Die Zirkularisierung der mRNA und die grundlegend daran beteiligte Formation des eIF4F-Komplexes vermitteln die korrekte Anlagerung des 43S-Präinitiationskomplexes. Dies ist der zweite, noch bedeutendere Regulationsmechanismus, da er nicht nur die genaue Kontrolle der globalen Proteinsynthese erlaubt, sondern auch die spezifische Translationsregulation verschiedener mRNA-Gruppen.

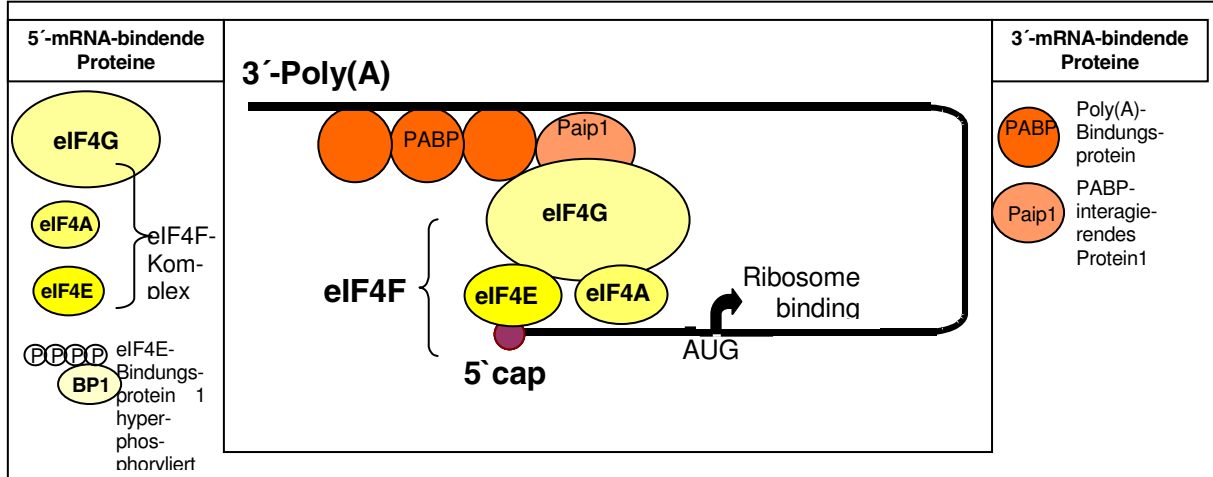
2.6.2.1 Das "Closed Loop"-Modell

Zentrales Element hierbei und Ansatzpunkt der Steuerungssysteme ist das durch viele einzelne Forschungsarbeiten und Beobachtungen zusammengesetzte, unter anderen von Mangus et al. 2003 beschriebene und mittlerweile allgemein akzeptierte „Closed Loop“-Modell. Schon Gallie beschrieb 1998, dass die Interaktion zwischen den beiden Enden der mRNA die Translation stimuliert. Auch Wells et al. 1998 beschrieben den Ringschluss zwischen Cap-Struktur und Poly(A)-Schwanz während der Translation mittels der Initiationsfaktoren. Erst dies vermittelt die Bindung der 40S-Untereinheit an die mRNA. (Tarun, Sachs 1995; Gingras, Raught, Sonenberg 1999).

Das mRNA-Bindungsprotein eIF4E bindet an die 5'-Cap-Struktur. Die Bindungsaffinität des 25 kDa großen Polypeptids wird noch durch die Bindung des N-terminalen Endes von 4G an 4E verstärkt, da sie die gegenseitige Faltung induziert, so dass sich die Proteine ineinander einpassen. Dies ändert die Konformation der Cap-Bindungsstelle hin zu einer verstärkten Bindung (Haghighat und Sonenberg, 1997). Der N-Terminus von eIF4E interagiert mit dem sich gleichzeitig einfaltenden eIF4G in einem Induced-fit-Mechanismus. Gross et al. beschreiben (2003) bei Hefe, dass sich eIF4G (AS 393 - 490) wie ein Armreif um den N-Terminus (AS 24 - 35) von eIF4E legt. Funktionell signifikante basische Reste an der Peripherie des Reifs interagieren mit konservierten aziden Regionen an der dorsalen Oberfläche von eIF4E (Gross et al., 2003). Mader et al. lokalisierten 1995 die Bindungsstelle in einer von der Hefe bis zum Menschen stark konservierten Aminosäuresequenz (Tarun und Sachs, 1997). Gemeinsam bilden eIF4G, eIF4A und eIF4E den heteromultimeren eIF4F-Komplex. Durch die zwei voneinander unabhängigen eIF4A-Bindungsstellen in der Mitte und am C-terminalen Ende auf eIF4G gemeinsam wird die ATP-abhängige Helikase an der mRNA

Abb. 4: „Closed Loop“-Modell nach Mangus et al., 2003:

Die Bildung des eIF4F-Komplexes durch eIF4G, eIF4A und eIF4E am Cap ermöglicht durch die Bindung mit PABP den Ringschluss der mRNA und über die richtige Positionierung der Helikase eIF4A die Aufwindung der Sekundärstrukturen der 5'-UTR, was die Ribosombindung erleichtert.



positioniert, um Sekundärstrukturen aufzulösen. eIF4G besitzt zentral eine eIF3-Bindungsstelle und zieht so mittels des Subunitfaktors eIF3 die 40S-Untereinheit heran, um den Scanning-Komplex zu bilden. 1997 entdeckten Tarun und Sachs bei Hefen die Interaktion von eIF4G mit Pab1p, einem an den Poly(A)-Schwanz bindenden Protein, funktionell entsprechend dem PABP (Poly(A)-bindenden Proteins) bei Säugern. Die zugehörige Bindungsstelle auf eIF4G identifizierten Imataka et al. 1998 am N-terminalen Drittel. Dies war das fehlende Bindeglied vom eIF4F-Komplex zur Zirkularisierung der mRNA. Es konnte bewiesen werden, dass diese Konstellationen für das Anbinden des 43S-Präinitiationskomplexes an die mRNA notwendig ist, was erst zu der Vermutung führte, dass der Ringschluss der mRNA zwischen Cap-Struktur und Poly(A)-Schwanz eine wichtige biochemische Basis für die Translation der mRNA darstellt (Preiss und Hentze 1999). Möglicherweise hat dies auch eine Kontrollfunktion, so dass nur vollständige, unbeschadet exportierte und nicht schon der Deadenylierung und dem Exonuclease-Abbau unterworfenene mRNAs noch translatiert werden.

Wells et al. konnten 1998 mittels rekombinanter Hefefaktoren 4E, 4G und Pab1p und synthetischen mRNAs mit Cap-Struktur und Poly(A)-Schwanz durch Rasterelektronenmikroskopie die Bildung der zirkulären Komplexe beobachten und die Notwendigkeit dieser Faktoren für den Ringschluss nachweisen. Die Bindung der Faktoren 4E, 4G und PABP miteinander in Folge der Stimulation von *Xenopus*-Nierenzellen mit zellulären Stressreizen konnte 1999 von Fraser et al. nachgewiesen werden. Der Ringschluss stimuliert die Translation zusätzlich, indem Ribosomen direkt an das 5'-Ende gebracht werden. Auch bei Säugetieren und Pflanzen können solche Interaktionen nachgewiesen werden. Die wichtigsten beteiligten Proteine sollen im Folgenden genauer betrachtet werden.

Das Cap-Bindungsprotein eIF4E, das Gerüstprotein eIF4G und die Helikase eIF4A bilden die zentrale regulatorische Einheit, den eIF4F-Komplex:

➤ Das Cap-Bindungsprotein eIF4E:

Das Cap-Bindungsprotein eIF4E ist der begrenzende Faktor der Proteinsynthese (Jones et al., 1997). Seine Überexpression stört die zelluläre Wachstumskontrolle und wird mit verschiedenen Krebsarten in Verbindung gebracht (De Benedetti, Harris 1999). EIF4E beeinflusst die Translationsrate weniger durch seine Abundanz als durch seine Verfügbarkeit für Interaktionen mit anderen Faktoren.

Beim Säugetier konnten bisher drei verschiedene Mitglieder der eIF4E-Familie identifiziert werden, die in ihrer Struktur, funktionellen Charakteristika und Expressionsmustern unterschiedlich sind (Joshi et al., 2004).

Für die hier betrachteten Vorgänge ist jedoch nur eIF4E 1 von wesentlicher Bedeutung und soll deshalb im Weiteren mit eIF4E bezeichnet werden. Das 25kDa-Polypeptid bindet spezifisch an die m⁷GpppN-Struktur. Diese Bindung wurde 1996 von Morino et al. mittels Affinitätschromatographie analysiert. Sie identifizierten acht Tryptophan-, zwei Histone- und Glu103, die eine wichtige Rolle bei der mRNA-Erkennung spielen. Sie erhöht auch die Affinität von eIF4E zu eIF4G (Niedzwicka et al., 2002).

Die Cap-Bindungsfähigkeit wird deutlich verstärkt, wenn die Bindungsstelle von eIF4E durch eIF4G oder 4E-BP1 besetzt wird (Haghighat und Sonenberg, 1997; Von der Haar et al., 2000). Die Aktivität von eIF4E wird auf verschiedenen Levels gesteuert (Raught und Gingras, 1999). Es kann auf transkriptioneller Ebene durch den Zellproliferationsregulator c-myc reguliert werden. Hohe eIF4E-Konzentrationen initiieren eine negative Feedback-Schleife, die 4E-BP und rS6-Kinase-Signalkaskaden beeinflusst. Allseits akzeptiert ist die Erkenntnis, dass erhöhte eIF4E-Level die Helikaseaktivität von eIF4A steigern und damit die Ribosomenbindung fördern. Darüber hinaus bietet es als Phosphoprotein und durch seine Interaktionen mit verschiedenen Proteinen vor allem über die eIF4G-Bindungsstelle weitere Möglichkeiten, die Translationsinitiation zu steuern.

➤ Das Gerüstprotein eIF4G

EIF4G wurde während der Evolution des eukaryotischen Genoms hochkonserviert. Es nimmt durch seine zentrale Lage im Initiationkomplex eine wichtige Rolle der Translationsinitiation ein, da es viele Interaktionen eingeht und diese koordiniert.

Wie bereits beim „Closed-Loop“-Modell beschrieben, ist es dabei kein passives Gerüst, sondern erfährt durch die Bindung von eIF4E und PABP verschiedene Konformationsänderungen, die vor allem die Festigkeit der Bindungen innerhalb des Komplexes fördern (Gross et al., 2003).

Sein N-terminales Ende (AS 1-634) enthält eine PABP-(Imataka et al., 1998) und eine von der Hefe bis zum Menschen hoch konservierte eIF4E-(Lamphear et al., 1995; Mader et al., 1995) Bindungsstelle. Dadurch vermittelt es die Verbindung des 3'- und 5'-Endes der mRNA und schafft damit eine wichtige Voraussetzung für den Beginn der Translation.

Das mittlere Drittel (AS 635-1039) bindet eIF3, das die Bindung der kleinen ribosomalen Untereinheit an die mRNA vermittelt. Darüber hinaus bietet es eine Bindungsstelle für eIF4A (Imataka et al., 1997), die für die Translation essentiell ist (Morino et al., 2000). Außerdem kann in diesem Bereich eine mRNA-Bindungs-fähigkeit nachgewiesen werden (Pestova et al., 1996), die auch für die Cap-unabhängige Translation von großer Bedeutung ist.

EIF4G trägt auf seinem C-terminalen Drittel (AS 1040-1560) eine zweite Bindungsstelle für eIF4A (Imataka et al., 1997; Lamphear et al., 1995). Morino et al. (2000) messen dieser eher eine modulatorische Rolle zu, da eine Punktmutation hier die Ribosombindung nur verringert, während eine Mutation der anderen Bindungsstelle die Translation komplett hemmt. Bei Hefen ist diese modulatorische Sequenz nicht vorhanden. Beim Menschen sind beide gemeinsam notwendig, um die Translation zu stimulieren (Imataka, Sonenberg, 1997). Durch eine Bindungsstelle für Mnk1 in diesem Bereich ist gewährleistet, dass eIF4E nur in der Bindung mit eIF4G phosphoryliert werden kann (Pyronnet et al., 1999; Waskiewicz et al., 1999).

Gradi et al. identifizierten 1998 ein zweites, zu 46% ähnliches humanes eIF4G-Gen, das sie eIF4GII nannten. Beide Proteine wanderten auf Western Blots zu annähernd 220kDa. Auch eIF4GII interagiert mit eIF4E, eIF4A und eIF3 und kann als funktionelles Homologon für eIF4GI dienen (Gradi et al., 1998). Caron et al. zeigten aber 2004, dass eIF4GII, nicht aber GI am Beginn der Zelldifferenzierung selektiv zur Cap-mRNA-Bindung herangezogen wird. Dies geht mit einer starken, langandauernden Phosphorylierung von eIF4E und der Freisetzung von 4E-BP1 ohne gleichzeitige Änderung von dessen Phosphorylierung einher. Dies kann durch Zytokine wie Thrombopoetin reguliert werden. Dies ist der erste Nachweis selektiver Funktionen beider Proteine, die bei der Translationsregulation spezifischer mRNAs wichtig sein können.

➤ Die Helikase eIF4A und der Hilfsfaktor eIF4B

Das 47kDa große Polypeptid eIF4A ist eine ATP-abhängige RNA-Helikase (Rozen et al., 1990). Durch seine Helikaseaktivität werden Sekundärstrukturen der 5'UTR aufgelöst; dies ermöglicht erst die Ribosombindung (Sonenberg, 1996). In seinem N-terminalen Drittel liegt die RNA-abhängige ATPase. Die C-terminale Domäne enthält RNA-Bindungsstellen und weitere Regionen zur Interaktion mit der ATPase zur ATP-Hydrolyse. Zwischen den zwei unterschiedlichen Polypeptiden eIF4A1 und eIF4A2 konnte noch kein funktioneller Unterschied gefunden werden, im Gegensatz zu eIF4A3 (Li et al., 1999; Li et al., 2000). Sie ist ebenso essentiell für cap-abhängige wie für die cap-unabhängige Translation (Imataka und Sonenberg, 1997). Durch die Bindung im eIF4F-Komplex wird die Helikaseaktivität deutlich gefördert, da eIF4A so optimal zur 5'UTR positioniert wird.

In seiner Helikaseaktivität wird eIF4A unterstützt von eIF4B. Der Hilfsfaktor (69kDa) spielt eine wichtige, aber nicht essentielle Rolle vor allem bei der Lokalisierung des Initiationscodons.

Er hat ein RNA-Recognition Motiv (RRM) nahe dem N-Terminus, die für die Interaktion mit dem Ribosom verantwortlich zu sein scheint, und eine zentrale Region reich an Aspartat, Arginin, Tyrosin und Glycin (die DRYG-Domäne). In der Nähe findet sich noch eine argininreiche Region, die einerseits für die RNA-Bindungsaktivität wichtig ist, andererseits für die Stimulation der Helikaseaktivität von eIF4A (Methot et al., 1997).

➤ Das Poly(A)-Bindungsprotein PABP

PABPs binden spezifisch an die 3'-Poly(A)-Sequenzen von mRNAs im Kern und im Zytoplasma (Kavejian et al., 2005). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Verkürzung des Poly(A)-Schwanzes und der Translationsinitiation. Über die Bindung mit eIF4G (Imataka et al., 1998) vermittelt das 70 kDa-Protein PABP den Ringschluss und ermöglicht die Translation (Mangus et al., 2003). PABP (Abb. 7) besteht aus vier evolutionär hochkonservierten RNA-Erkennungsmotiven (RRMs) N-terminal und einer weniger konservierten C-terminalen Region (Melo et al., 2003).

Bei Hefe ist eine Region in RRM 1 und 2 essentiell für die Interaktion mit 4G (Kessler und Sachs, 1998). Auch beim Menschen bindet Gl an die N-terminale Region von PABP. Coimmunopräzipitation von endogenem 4G mit PABP gelang hingegen nicht, wahrscheinlich, weil PABP wesentlich gehäufiger auftritt als 4G. Die Domänen 3 und 4 binden AU-reiche Elemente. Der C-Terminus enthält die PABC-Domäne und fördert die Interaktionen zwischen PABPs und die Bindung an Poly(A)-Sequenzen (Melo et al., 2003).

Kahvejian et al. erforschte 2005 den Mechanismus, wie PABP die Rekrutierung von Ribosomen und die Translation stimuliert, durch die Depletion von pabp in nuclease-behandelten zellfreien Mauskarzinom-Translationsextrakten. Ohne pabp zeigten die Extrakte stark erniedrigte Translationsraten, verminderte Effizienz der Formation von 48 und 80S-Ribosom-Initiationskomplex und ungleiche Interaktion von eIF4E mit der mRNA-Cap-Struktur. Die Supplementierung mit Wildtyp-PABP behob diese Störungen und führte zur Translation, während ein PABP mit einer Substitution von met161 durch ala, das unfähig zur Bindung mit eIF4G war, dies nicht vermochte. Kahvejian stellte die Hypothese auf, dass PABP die Translation durch mehrere verschiedene Mechanismen stimuliert. Ein Modell beinhaltet die Zirkularisierung der mRNA durch Bindung des Poly(A)-Schwanzes und von eIF4G, wodurch die Wiederverwertung des Ribosoms, durch das Verbinden des 5' und 3'-Enden der mRNA, ermöglicht werden soll. Eine andere Möglichkeit ist, dass PABP die Bindungsaffinität von eIF4G zu eIF4E erhöht, was auch zu einer stärkeren Bindung von 4E zum 5'-Ende führt.

In diesem Zusammenhang sollte noch erwähnt werden, dass in Eizellen vor allem das embryospezifische Protein ePABP an den Poly(A)-Schwanz bindet (Radford et al., 2008).

Regulatorische Proteine wie Paip 1 und 2 interagieren mit PABP zur Förderung bzw. Repression der Translation. Hierauf soll später noch eingegangen werden.

Diese zentralen Proteine bieten durch ihre Interaktionen untereinander und mit anderen Faktoren zahlreiche Ansatzpunkte für Regulationsmechanismen, die entweder die gesamte Translation oder auch spezifisch die einzelner mRNA-Gruppen steuern können. Die wichtigsten dieser Mechanismen sollen im Folgenden vorgestellt werden.

2.6.2.2 Globale Regulationsmechanismen

➤ Proteolyse von eIF4G

Die Inhibierung der zelleigenen Translation durch Unterbrechung dieser Zirkularisierung ist eine verbreitete Taktik verschiedenster Viren, um die Translationsmaschinerie für die eigene Translation viraler mRNAs zu nutzen. Viele Picornaviren spalten die eIF4E-Bindungsstelle von eIF4G ab, was die virale Translation, für die 4E nicht benötigt wird, begünstigt, da sie die zelluläre Translation inhibiert (Abb. 5). Ähnliche Vorgänge scheinen aber auch physiologisch im Rahmen der Apoptose abzulaufen (Viola et al., 2000).

➤ Phosphorylierung der Initiationsfaktoren und ihrer Interaktionspartner

Viele an der Translationsinitiation beteiligte Faktoren sind Phosphoproteine. Dies bietet die Möglichkeit über verschiedene Signalkaskaden auf externe Stimuli zu reagieren, die die Translation hemmen oder stimulieren können.

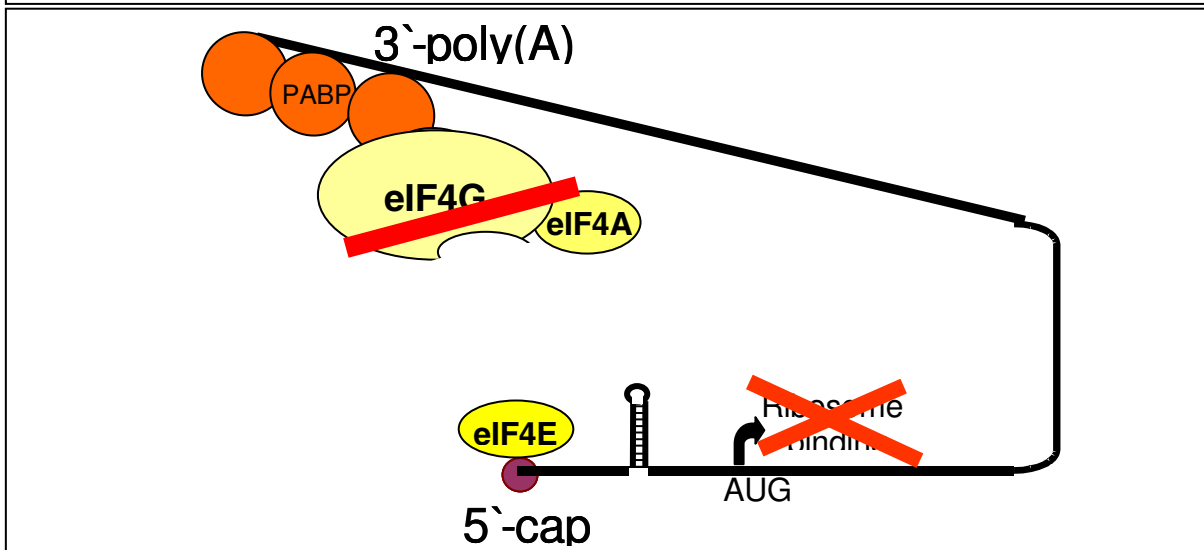
Wie bereits erwähnt ist das Cap-Bindungsprotein eIF4E der begrenzende Faktor der Initiation der Proteinsynthese. Deshalb ist es Hauptangriffspunkt spezifischer Regulationsmechanismen. Die Rolle seiner Phosphorylierung war dabei lange umstritten. Studien bei *Drosophila* weisen darauf hin, dass sie eine Schlüsselrolle für Wachstum und Lebensfähigkeit spielt (Scheper und Proud, 2002). In vivo ist nur die Phosphorylierung an Ser 209 bisher nachgewiesen und von Bedeutung. Ser 209 liegt nahe des Kanals, durch den die Cap-Struktur an ihre Bindungsstelle auf eIF4E bindet (Marcotrigiano et al., 2007) und kann so die Cap-Bindungsaffinität beeinflussen. Die Phosphorylierung kann durch viele verschiedene Reize ausgelöst werden, darunter diverse Arten zellulären Stresses, verschiedene Zytokine, Serumbehandlung von Zellen, Wachstumsfaktoren, Phorbolster und in manchen Zelltypen auch Insulin (Scheper und Proud, 2002). Die Signalkaskade erfolgt dabei über MEK und ERK (Waskiewicz et al., 1999) und wird durch MAPK-Inhibitoren blockiert (Tomek et al., 2002; Ellederova et al., 2008).

In somatischen Zellen ist eIF4E nur in seiner phosphorylierten Form im 48S-Präinitiationskomplex nachzuweisen (Joshi-Barve et al., 1990). Dies legte den Verdacht nahe, dass die Phosphorylierung an Ser 209 die Translation stimuliert, indem sie die Cap-Affinität von 4E erhöht (Minich et al., 1994). Das Gegenteil jedoch ist der Fall:

McKendrick et al zeigten schon 2001, dass die Ser 209- Phosphorylierung nicht unbedingt nötig für die Proteinsynthese ist. Waskiewicz et al. identifizierten eIF4E 1997 als potentiell Substrat der MAPK-integrating Kinasen Mnk1 und 2 bei der Maus. Jedoch besitzt es selbst keine Bindungsstelle für Mnk, sondern interagiert mit dem eIF4F-Komplex über Bindung an der C-terminalen Region von eIF4G (Pyronnet et al., 1999).

Abb. 5: Spaltung von eIF4G zur Translationsrepression:

Durch einige Picornaviren wird die eIF4E-Bindungsstelle an eIF4G abgespalten. Damit kann weder der Ringschluss noch die Bildung des Translationsinitiationskomplexes erfolgen. Stattdessen steht der Translationsapparat für virale mRNAs zur Verfügung.



Dies stellt sicher, dass 4E nur in der Bindung im eIF4F-Komplex phosphoryliert werden kann. Gross et al. stellten 2003 dar, dass bei Hefen diese Interaktion durch die Faltung des N-Terminus von 4E mit gleichzeitigem Falten von 4G in einem Induced-Fit-Mechanismus gefördert wird. eIF4E-Mutanten, die nicht an eIF4G binden können, werden kaum phosphoryliert. Scheper et al. zeigten 2002, dass die Cap-Affinität von eIF4E durch die Phosphorylierung, für die sie erstmals gezielt Mnk benutzten, um das 2,5- bis 5-Fache reduziert wird. Die stimulierende Wirkung der eIF4E-Phosphorylierung auf die Translation ist also vielmehr damit zu erklären, dass es die Ablösung von eIF4E vom Cap fördert, nachdem sich der Präinitiationskomplex gebildet und den Translationsprozess initiiert hat. Damit steht das Cap erneut für die Bildung eines neuen Translationskomplexes zur Verfügung. Mehrere Translationskomplexe können an einer mRNA agieren und die Bildung von multiribosomalen Komplexen, sog. Polysomen, wird gefördert.

Dieses Modell bietet auch eine Erklärung dafür, dass andere Stressoren, wie Hitzeschock, osmotischer oder oxidativer Stress, die Translation hemmen, obwohl auch sie den p38-MAPK-Weg aktivieren (Scheper und Proud, 2002). Sie aktivieren auch die 4E-Bindungsproteine, die die Bildung des eIF4F-Komplexes blockieren, so dass eIF4E nicht mit den Mnks in Kontakt kommt und nicht phosphoryliert wird.

Mnk 1 und 2 weisen sehr große Ähnlichkeiten vor allem in ihrer katalytischen Domäne auf, Mnk 1 zeigt aber eine niedrige Grundaktivität und kann so stark auf die MAPK-Signale reagieren. Mnk 2 hat dagegen ein hohes Aktivitätsniveau und reagiert kaum auf äußere Stimuli (Scheper und Proud, 1999). Dies scheint der Regulation der Empfindlichkeit unterschiedlicher Zelltypen auf verschiedene Stressoren zu dienen.

Der Hauptregulator der Translationsrate bleibt jedoch weiterhin die Verfügbarkeit von eIF4E, die durch 4E-BPs und anderen 4E-bindenden Faktoren bestimmt wird.

Häufig stimulierend wirkt Phosphorylierung von eIF4G auf die Translation.

EIF4G wird in vitro reaktiv auf Serumstimulation durch PI3K und FRAP-mTOR-Signalkaskaden phosphoryliert (Raught et al., 2000), in vitro infolge Phorbol ester, Insulin, EGF und Okadasäure auch durch multipotente S6 Kinase (MS6K), PKC und Pak2. Bolster et al. beschreiben 2004, dass Leucin die Translationsinitiation im Rattenskelettmuskel durch eIF4G-Phosphorylierung unabhängig von mTOR stimuliert. Die Phosphorylierung von 4G kann an einem großen Spektrum regulatorischer Ereignisse beteiligt sein. So beschreiben jedoch Ling et al. 2005, dass die Proteinkinase Pak2 (zytostatische p21-aktivierte Proteinkinase 2) durch Bindung und Phosphorylierung von 4G auf Höhe der 4E-Bindungsregion die Cap-abhängige Translation in Folge verschiedener milder Stressreize auf 37 % reduziert. Nach den Beobachtungen von Le et al. 2000 verändert die Phosphorylierung von PABP dessen Bindungsaffinität zum Poly(A)-Schwanz der mRNA und auch zu den Komponenten des Initiationskomplexes eIF4F. Von hyperphosphoryliertem PABP konnte gezeigt werden, dass es höhere Affinität zu den Poly(A)-Sequenzen hat, hypophosphoryliertes PABP interagiert mehr mit eIF4F. Dies lässt vermuten, dass die Phosphorylierung von PABP1 den Ringschluss zwischen 3'- und 5'-Ende begünstigt, wie im „Closed Loop“ Modell beschrieben. Die Phosphorylierung von eIF4A ist noch weitgehend ungeklärt. In vitro ist sie durch cAMP und cGMP stimuliert (Kleijn et al., 1998). EIF4B kann in vitro an verschiedenen Stellen durch verschiedene Kinasen phosphoryliert werden. In vivo von Bedeutung ist wahrscheinlich die PKC-abhängige Phosphorylierung in Folge wachstumsstimulierender Faktoren. Sie stimuliert die Translation.

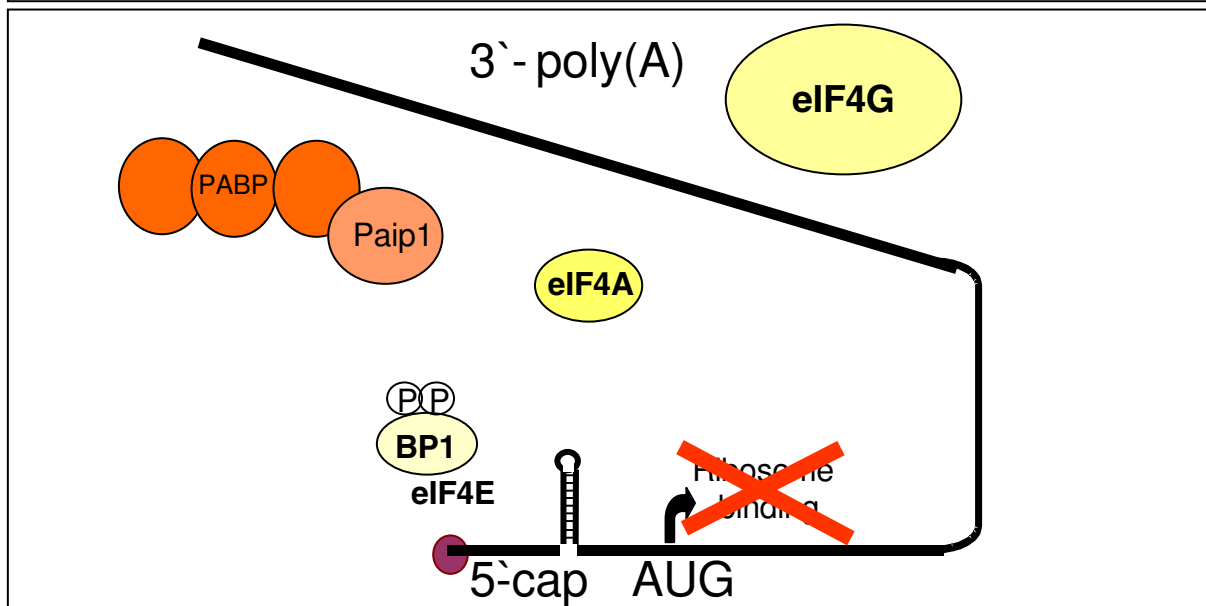
EIF1 und 1A sind keine Phosphoproteine, eIF3 und eIF5 können in vitro phosphoryliert werden, jedoch sind bisher noch keine Effekte beschrieben.

Das Zusammenspiel dieser verschiedenen Regulationsmechanismen ist sehr komplex und noch lange nicht vollständig geklärt. Aber die dadurch gegebene besondere Flexibilität bietet die Möglichkeit schneller Reaktionen auf Umweltveränderungen und ist vor allem in Systemen notwendig, in denen Transkription und Translation stark entkoppelt sind, wie Eizellen, frühen Embryonen, Reticulozyten und Blutplättchen (Mathews et al., 2000).

➤ Molekulares Mimikry am Beispiel von 4E-BP1

Auch eine weitere Regulationsstrategie wird über Phosphorylierung beeinflusst. Einige Faktoren konkurrieren mit eIF4G um die Bindung an eIF4E, indem sie eine ähnliche Sequenz aus ca. 15 Aminosäuren als Bindungsstelle anbieten (Mader et al., 1995, Haghighat et al., 1995; Richter, Sonenberg 2005). Das am besten erforschte Beispiel hierfür ist das eIF4E-Bindungsprotein (4E-BP; Abb. 6). Insgesamt konnten bisher drei 4E-BPs in somatischen Zellen gefunden werden. Pause et al. zeigten erstmals 1994 bei Fettzellen, dass eine Behandlung mit Insulin die Phosphorylierung von 4E-BP erhöhte und damit dessen Interaktion

Abb. 6: Funktionsweise des 4E-Bindungsproteins als Translationsrepressor:
 Das 4E-Bindungsprotein blockiert die eIF4G-Bindungsstelle auf eIF4E. Es verhindert damit die Bildung des eIF4F-Komplexes und in der Folge sowohl den Ringschluss als auch die Auflösung von Sekundärstrukturen zur erleichterten Anbindung des Ribosoms.



mit eIF4E verringerte, was eine erhöhte Translationsaktivität der Zellen zur Folge hatte. Sie beschrieben zwei verschiedene BPs, wobei das 118 Aminosäuren lange Protein 4E-BP1 zu 65 % identisch mit BP2 ist und in den meisten Geweben mit den höchsten Levels in Fettgewebe und Pankreas exprimiert wird. Das bisher nur in einer Prostatakarzinomzelllinie beschriebene 4E-BP3 entspricht BP1 zu 57 und BP2 zu 59 %.

Allen 4E-BPs gemeinsam ist jedoch die Fähigkeit, in der hypophosphorylierten Form mit der gleichen Bindungsaffinität wie eIF4G an 4E zu binden und durch diese Konkurrenz die Bildung des Präinitiationskomplexes zu stören (Ptushkina et al., 1998). Dabei erhöht die Repressorbindung an die dorsale Bindungsstelle von 4E dessen Cap-Affinität über den ventralen „Cap-Binding Slot“ und arretiert so die Cap-mRNA, eIF4E und 4E-BP in einem inaktiven Komplex (Ptushkina et al., 1999). Dieser Mechanismus wirkt global auf alle mRNAs mit cap-abhängiger Translation. Die hohe Bindungsaffinität der 4E-BPs erklärt, wie diese Repressoren als sehr effektive Inhibitoren der Translation wirken können, wenn sie in ihrem aktiven, hypophosphorylierten Zustand sind. Eine wichtige Aufgabe des Bindungsproteins ist zum Beispiel die Translationsrepression in der Mitosephase im Verlauf des Zellzyklus.

Eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli beeinflusst den Phosphorylierungsstatus, so unter anderem Hormone, wie Insulin und Angiotensin, Zytokine, Mitogene, G-Protein gebundene Rezeptoragonisten und Wachstumsfaktoren wie EGF, IGF I und II, PDGF und andere. Demgegenüber führt eine Verminderung von Wachstumsfaktoren oder Nährstoffen zu einer Dephosphorylierung und damit zur 4E-Bindung und Translationsrepression (Kleijn et al., 1998; Sonenberg und Gingras, 1998; Raught und Gingras 1999). Bisher identifizierte Phosphorylierungsstellen von 4E-BP sind Ser 83 und Ser 112, Thr 37, Thr 46, Ser 65 und Thr

70, wobei bisher nur den vier letztgenannten eine Funktion zugewiesen werden konnte. Die Phosphorylierung erfolgt hierarchisch (Gingras et al., 2001). Thr 37 und Thr 46 werden in vitro effizient durch FRAP/mTOR (FKBP-rapamycin associated protein / mammalian target of rapamycin) phosphoryliert (Brunn et al., 1997). Das 289 kDa große Protein mTOR entspricht den TOR-Proteinen bei Hefe und gehört zu den Phosphatidylinositol-Kinase verwandten Kinasen, die an der DNA-Rekombination und Reparatur und der Zellzykluskontrolle beteiligt sind (Raught und Gingras 1999). Dieser Schritt hat zwar keinen direkten Einfluss auf die Bindung zu eIF4E, bildet aber die Grundvoraussetzung für weitere Phosphorylierungen. Die Phosphorylierung von Ser 65 und Thr 70 ist der eigentlich aufhebende Schritt der Translationsrepression. Sie erfolgt rapamycin- und wortmanninsensitiv über eine Signalkaskade mittels Phosphoinositid-3-OH Kinase (PI3K) und deren nur rapamycinsensitive Effektor kinase Akt, auch PKB genannt (Sonenberg und Gingras 1998; Gingras et al., 1998). Die Serin-Threoninkinase Akt ist in somatischen Zellen an vielen Signalkaskaden mit Einfluss auf Wachstum, Lebensfähigkeit und Proliferation von Zellen beteiligt, z.B. CDK-Aktivierung, Inhibierung der Caspase-Aktivierung und die Regulation der Transkription. Auch in Mäuse- und Rindereizellen kann sie nachgewiesen werden (Melo Sterza, 2003; Tomek und Smiljakovic 2005). Bei einer Blockade von Akt durch den sehr spezifischen Inhibitor SH6 verbleiben ein Großteil der Oozyten im MI- Stadium. Dies lässt vermuten, dass Akt den Übergang der Eizelle zur MII-Phase katalysiert. Jedoch erreicht ein überraschend großer Teil (40% bei 50µM SH6) trotzdem das MII-Stadium, der Grund hierfür ist noch unbekannt, man nimmt an, dass eine ausreichende Menge an aktiviertem Akt schon im GV-Stadium dieser Zellen vorhanden ist.

2.6.2.3 mRNA-spezifische Regulationsmechanismen an der 5'UTR

Viele verschiedene 3'- und 5'-bindende Faktoren können durch ihre Interaktionen miteinander und mit der mRNA die Translationsinitiation auf verschiedene Weise an fast jedem Schritt der Initiation beeinflussen (Wilkie et al., 2003).

Bei der spezifischen Regulation spielen die Sequenz und die Struktur der Untranslated Regions eine sehr wichtige Rolle. Die verschiedenen sequenzgesteuerten Möglichkeiten der Initiationscodonererkennung beim Scanning wurden bereits beschrieben.

MRNAs mit kurzen, einfachen 5'UTRs werden sehr effizient übersetzt und sind unempfindlich gegen Inhibierung. Eine mRNA mit hochkomplexer Sekundärstruktur wird deutlich ineffizienter translatiert und unterliegt so weniger der globalen Steuerung. Jedoch reagiert deren Proteinsynthese so viel sensibler auf spezifische Regulationsmechanismen (Pain, 1996).

Eine lange 5'UTR findet sich oft bei mRNAs, die für Protooncogene oder deren Rezeptoren sowie Homöodomänenproteine codieren. Einige dieser Proteine werden auch über IRES translatiert. Gemeinsam ist ihnen eine sehr spezifische Möglichkeit der Translationskontrolle gerade während des Wachstums, verschiedener Stresssituationen und in der

Embryonalentwicklung, auf die später noch eingegangen werden soll. Gerade RAR β -c-mos und c-myc werden während der Embryonalentwicklung zeitweise über die 5'UTR reguliert.

Darüber hinaus ist bei verschiedenen Krebsarten eine Mutation oder veränderte Aktivität der 5'UTR nachzuweisen (Van der Velden und Thomas 1999).

Es scheint ein Schutzmechanismus vor Tumorbildung zu sein, dass gerade die an Prozessen des Zellwachstums und der Zellreifung beteiligten mRNAs über lange komplexe 5'UTRs verfügen. Prozesse, die die vorübergehende Aufhebung dieser Repression steuern, sind ein wichtiger Schlüssel in Wachstum und Zellreifung. Die dahinter stehenden Mechanismen sind zum großen Teil noch unerforscht. Verschiedene trans-agierende, an die 5'UTR bindende Faktoren medieren die Stimulation oder Repression der Translation.

➤ Iron Responsive Element (IRE) und Iron Regulatory Protein (IRP)

Ein gut erforschtes Beispiel hierfür ist die Biosynthese des intrazellulären Eisenspeichers Ferritin (Abb. 7). Dies dient der Entgiftung von überschüssigem Eisen. Die Ferritinproduktion wird durch erhöhten Eisengehalt in der Zelle stimuliert. In ihrer 5'UTR enthält die Ferritin-RNA in der Nähe des Caps eine spezifische Haarnadelschleife, das Iron Responsive Element IRE (Hentze et al., 2004).

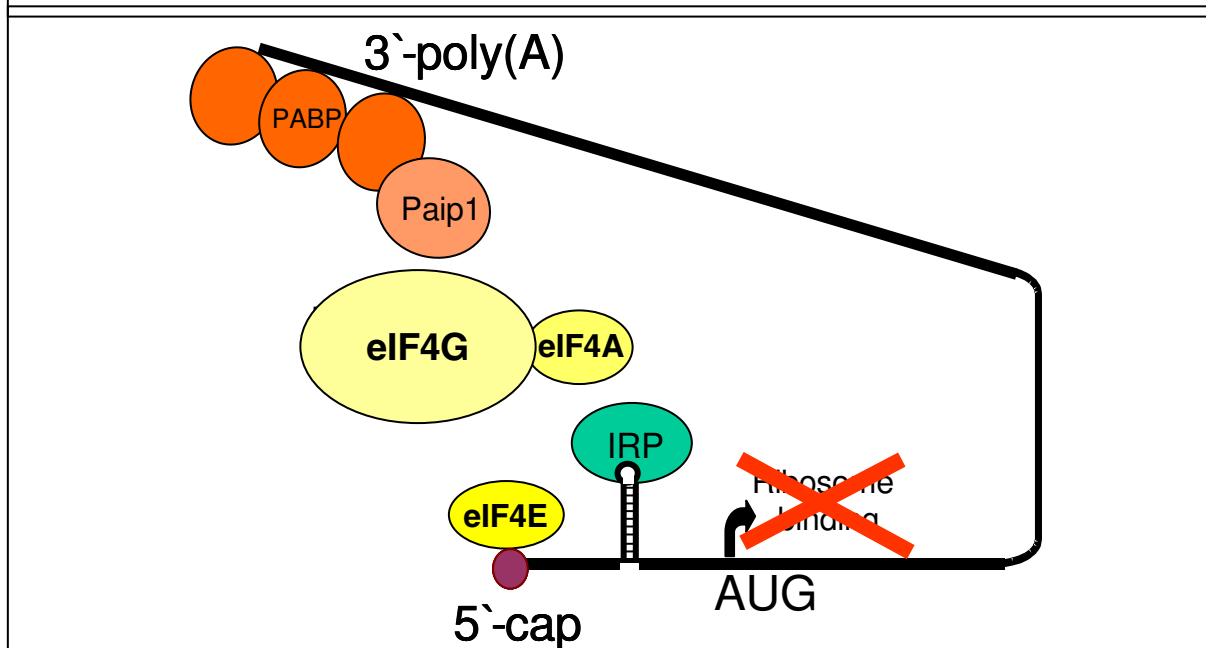
Liegt wenig Eisen in der Zelle vor, ist an diese Struktur das Iron Regulatory Protein IRP 1 und 2 gebunden, das sterisch die Anbindung des 43S-Präinitiationskomplexes durch Hemmung der eIF3-Assoziation mit der 40S-Untereinheit verhindert (Preiss und Hentze, 1999).

Weiter als 67 Basenpaare vom Cap entfernte IRE haben diese Fähigkeit nicht mehr (Goosen et al., 1990). Steigt der Eisengehalt in der Zelle, lösen sich die IRPs, und die Ferritin-mRNA kann wieder translatiert werden. Die Regulation erfolgt dabei auf zwei Wegen: Eine hohe Eisenkonzentration verringert die Affinität von IRP 1 zur Ferritin-mRNA. IRP 2 hingegen enthält eine Sequenz, die schnelle, proteasom-medierte Degradation in eisenübersättigte Zellen überträgt (Pain et al., 1996). IRP 1 und 2 kontrollieren gleichwertig über IRE-Bindung auch noch weitere Faktoren der Eisenspeicherung und der Hämsynthese, darunter die Mitochondriale Aconitase und die 5-Aminolevulinatsynthase. Zudem können sie auch unabhängig über das Signalmolekül Stickstoffmonoxid (NO) gesteuert werden und bieten als Phosphoproteine weitere Möglichkeiten der Regulation (Pain et al., 1996).

Neben den Proteinen, die durch ihre Bindung Stem-Loop-Strukturen stabilisieren und die Translation reprimieren, gibt es andere, die an einsträngige RNA binden und diese so stabilisieren, sog. Y-Box Proteine (Muckenthaler und Preiss, 2008). Auch die mRNA des Poly(A)-bindenden Proteins Pabp1 wird über adeninreiche autoregulatorische Sequenz (ARS) ihrer 5'UTR reguliert, an die Pabp1 binden kann. Bei einem Überschuss dieses Proteins wird so die Anbindung der großen 60S-ribosomalen Untereinheit an den Präinitiationskomplex verhindert und damit die Translationsinitiation und Produktion von weiterem PABP blockiert (Melo et al., 2003). Die Translation einer für die Proteinsynthese sehr wichtigen Klasse von

Abb. 7: Funktionsweise des Iron Regulatory Proteins:

Das IRP stabilisiert die Sekundärstrukturen in der 5'-UTR und verhindert so die Bildung des Translationsinitiationskomplexes und die Anbindung des Ribosoms.



mRNAs wird ebenfalls über deren 5'UTR reguliert, zu der die mRNAs ribosomaler Proteine, der Elongationsfaktoren 1A und 2 bei hämopoetischen Zellen und des Poly(A)-bindenden Proteins gehören. In ihrer 5'UTR enthalten sie nach dem Cap und einem Cytosin eine Reihe aus vier bis vierzehn Pyrimidinen, einen terminalen Oligopyrimidinkomplex (5'TOP) (Meyuhas, 2000). Diese mRNAs liegen nicht translatiert in subpolysomalen Populationen als Reservoir in ruhenden Zellen vor. So bietet sich die Möglichkeit, schnell die zu Beginn der Zellteilung benötigte Translationskapazität zu erbringen.

2.6.2.4 mRNA-spezifische Regulationsmechanismen am 3'-Ende

Auf den ersten Blick erscheint es widersinnig, dass die Kontrolle der Translation vornehmlich vom 3'-Ende ausgeht. Betrachtet man jedoch, wie spezifisch dadurch der Poly(A)-Schwanz kontrolliert werden kann und vor allem, wie nah dieses Ende durch den Ringschluss an die Cap-Struktur herangeführt wird, wird deutlich, dass sich gerade hier große Möglichkeiten der Einflussnahme bieten. Darüber hinaus stören keine weiteren Funktionen die regulativen Elemente in der 3'UTR. Die 5'UTR ist durch die Erfordernisse des Scanning-Prozesses nur eingeschränkt für regulative Sequenzen nutzbar. Noch ausgeprägter ist dies bei der codierenden Sequenz. Vor allem bei der Translationsregulation während der Eizellreifung und der frühen Embryogenese ist das 3'-Ende von großer Bedeutung.

- Die PABP-bindenden Proteine Paip 1 und 2

Die PABP-interagierenden Proteine Paip 1 (73 kDa) und 2 (14 kDa) wurden bereits bei somatischen Zellen beschrieben (Khalegpour et al., 2001; Craig et al., 1998). Beide nehmen durch ihre Bindung mit PABP Einfluss auf die Translation.

Paip 1 stimuliert die Translation. Bindungsanalysen von Craig et al. (1998) zeigen, dass es nur in Verbindung mit PABP1 sehr stark an den Poly(A)-Schwanz bindet. Darüber hinaus besitzt es eine eIF4A-Bindungsstelle, die der auf eIF4G ähnelt, und einen prolin-reichen N-Terminus. So stabilisiert es die Bindung zwischen PABP und eIF4G (Martineau et al., 2008).

Das hochazide Paip 2 wirkt translationsreprimierend, indem es die Affinität von PABP für die Poly(A)-Region senkt und die sich wiederholende Struktur des Poly(A)-Ribonukleoproteins zerstört (Khalegpour et al., 2001). Außerdem konkurriert es mit Paip 1 um die PABP-Bindung. All dies behindert die Funktion von PABP. Smiljakovic (2006) konnte zeigen, dass Paip 1 und 2 auch während der meiotischen Endreifung auftreten, jedoch im Verlauf der IVM in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert werden. Im GV-Stadium ist vor allem Paip 2 vertreten. Während der MI-Phase, in der nach Tomek et al. 2002a, b) die Translationsrate am höchsten ist, dominiert Paip 1. In der MII-Phase, in der die Translation reprimiert wird, findet sich kaum Paip 2. Somit kann es nach diesen Untersuchungen für die Translationshemmung in dieser Phase nicht verantwortlich sein. Auffällig ist weiterhin, dass bei beiden Paips vielfältige Formen beobachtet werden können. Bisher ist der Grund hierfür noch ungeklärt, da es noch kaum Untersuchungen zu posttranslationalen Veränderungen gibt.

➤ Die Regulation der Polyadenylierung mittels des Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Proteins (CPEB)

Einer der wichtigsten Regulationsmechanismen ist die Modulation der Länge des Poly(A)-Schwanzes weit über posttranskriptionale Modifikationen und altersbedingten Abbau hinaus. Dies konnte schon vor über 20 Jahren von verschiedenen Wissenschaftlern bei Eizellen und frühen Embryonen von Muscheln, Würmern, Fröschen (*Xenopus*) und Mäusen nachgewiesen werden (Jackson and Standart, 1990; Radford et al., 2008).

Stabilität und Translation werden generell durch einen längeren Poly(A)-Schwanz erhöht. In Froscheizellen liegen zum Ende der Prophase I stabile, aber translatorisch inaktive mRNAs mit einem 20-40 Nucleotide kurzen Poly(A)-Schwanz vor. Bei Wiedereintritt in die Meiose wird eine zytoplasmatische Polyadenylierung in Gang gesetzt, die den Poly(A)-Schwanz auf bis zu 80-250 Nucleotide verlängert. Damit steigt auch die Translationsrate dieser mRNAs (Radford et al., 2008). Sie enthalten in ihrer UTR zwei cis-agierende Elemente, das variable, U-reiche Cytoplasmic Polyadenylation Element (CPE, $U_{4-5}A_{1-2}U$), von dem bei *Xenopus* bisher 4 verschiedene identifiziert werden konnten, und näher am Poly(A)-Schwanz die Sequenz AAUAAA, das Consensusignal für zytoplasmatische Polyadenylierung. An AAUAAA kann das 160 kDa große Protein CPSF (Cleavage and polyadenylation specificity factor) binden, das die Poly(A)-Polymerase aktiviert. An CPE bindet ein spezifisches Protein, das Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein (CPEB), vermittelt durch eine Zinkfingerstruktur und zwei RNA-Erkennungsmotive innerhalb des Proteins (Mendez und Richter, 2001; Radford et al., 2008). Es hat die Fähigkeit, die Translation je nach auslösendem Reiz zu stimulieren oder

zu hemmen (Hake und Richter, 1994; Stebbins-Boaz et al., 1996; Groisman et al., 2002). Die Stimulation erfolgt bei *Xenopus* nach einem Progesteronstimulus, der eine Signalkaskade über Aurora A auslöst, die CPEB an Ser 174 phosphoryliert. Dieses rekrutiert dann CPSF, das ebenso wie im Kern die Poly(A)-Polymerase aktiviert (Abb. 8).

CPSF besteht im Kern aus 4 Untereinheiten (Radford et al., 2008). Dazu gehören ein 160 kDa RNA-Bindungsprotein, das die AAUAAA-Sequenz der RNA erkennt und ein 30 kDa großes Element mit einem Zinkfingermotiv, das RNA-Affinität und Endonucleaseaktivität aufweist und die Interaktion von CPSF mit der Poly(A)-Polymerase (PAP) vermittelt. Hinzu kommen zwei einander ähnliche Anteile, eine 73 kDa-große Endonuclease, die im Kern das Processing des 3'-Endes aller prä-mRNAs mediiert, die aber beim zytoplasmatischen CPSF nicht nachweisbar ist und eine 100 kDa-Einheit, deren Funktion noch nicht geklärt ist. Ein assoziierter, oft als 5. Untereinheit beschriebener Faktor, Fip 1, kann U-reiche RNA-Regionen binden und vermittelt die Interaktion mit der Poly(A)-Polymerase im Kern. Ob er jedoch auch bei der zytoplasmatischen Reifung eine Rolle spielt, ist bislang unklar. Es gibt jedoch Vermutungen, dass seine Funktion im Zytoplasma durch CPEB ersetzt wird. Die zytoplasmatische Bindung von CPEB mit der 100 kDa-Einheit wurde in *Xenopus*- Eizellextrakten nachgewiesen und ebenso die Rekrutierung und Aktivierung von PAP durch CPSF, was einen entscheidenden Schritt zur zytoplasmatischen Polyadenylierung darstellt.

Jedoch werden nicht alle mRNAs zur gleichen Zeit polyadenyliert. Dieser Mechanismus muss also zumindest teilweise auf mRNA-spezifischen Faktoren beruhen. Hierauf soll vor allem in der Diskussion weiter eingegangen werden. An den verlängerten Poly(A)-Schwanz kann das Poly(A)-bindende Protein PABP binden, das den Ringschluss vermittelt durch eIF4G fördert (Stebbins-Boaz et al., 1996; Charlesworth et al., 2004; Hodgeman et al., 2001; Abb. 8).

Die Unterschiede verschiedener mRNAs in der zeitliche Abfolge und dem Ausmaß der De- und Readenylierung bei der Endreifung oder erst der frühen Embryonalentwicklung sind zum Teil gravierend. Im Gegensatz zu den mRNAs mit CPEs werden andere mRNAs in Eizellen noch effizient übersetzt, dann aber in reifen Eizellen und frühen Embryos herunterreguliert, indem während des GVBD ein zuvor sequestriert im Kern gelagertes, deadenylierendes Enzym freigesetzt wird. Dieses scheint relativ unspezifisch zu wirken und betrifft alle mRNAs.

Dies reguliert die Synthese von Proteinen herunter, die in der frühen Embryonalentwicklung nicht benötigt werden (Pain, 1996). Die mRNAs mit CPE, zu denen auch Cyclin B1 und c-mos gehören, können hingegen wieder readenyliert werden. Der reprimierende Effekt von CPEB erfolgt bei *Xenopus*eizellen mittels Assoziation mit dem Repressorprotein Maskin, das in Konkurrenz mit eIF4G an eIF4E am Cap bindet und somit die Bildung des eIF4F-Komplexes blockiert (Abb. 9). In dieser Konstellation ist die mRNA jedoch auch gegen Abbau geschützt und kann aktivierungsbereit gelagert werden. Bei der Vollendung der Meiose nach der Befruchtung stimuliert CPEB, phosphoryliert durch Aurora A, die Verlängerung des Poly(A)-

Abb. 8: CPEB als Translationsstimulator:

Über Aurora A phosphoryliertes CPEB rekrutiert das Protein CPSF, das die Poly(A)-Polymerase (PAP) stimuliert, den Poly(A)-Schwanz zu verlängern. Damit wird die Translation gefördert.

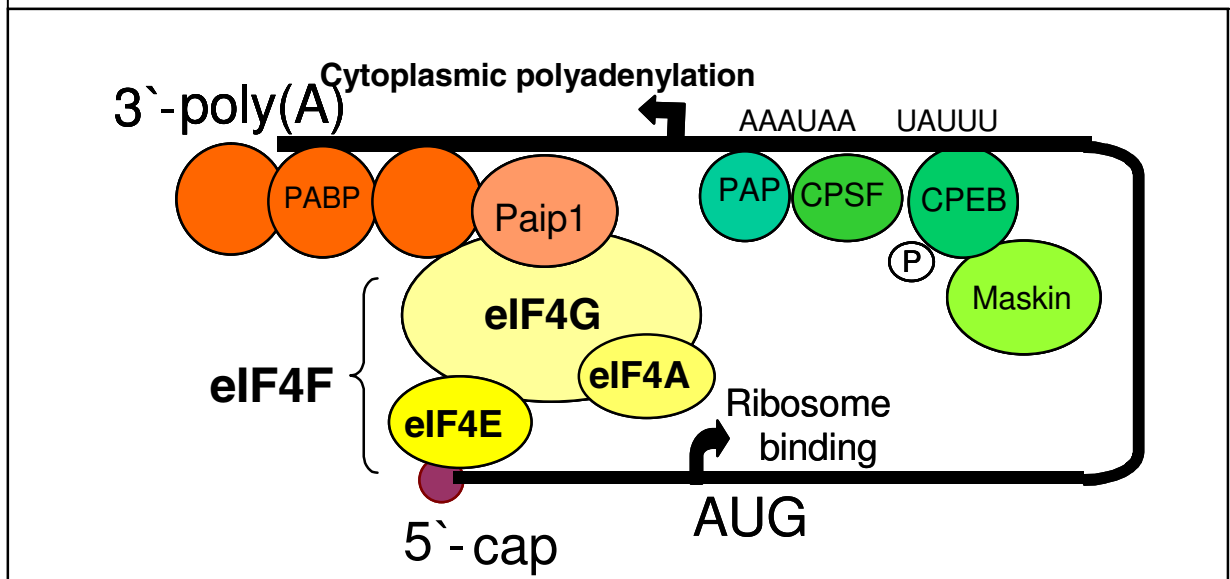
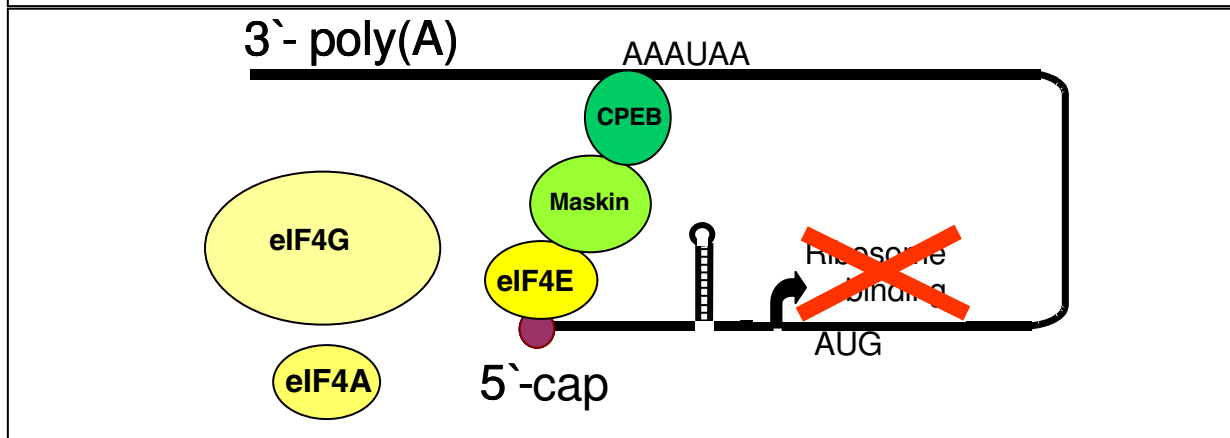


Abb. 9: CPEB als Repressorprotein der Translation:

Das Protein Maskin bindet gleichzeitig an nicht phosphoryliertes CPEB und eIF4E und fördert so einen Ringschluss der mRNA, der diese stabilisiert. Jedoch wird dabei die Translation unterdrückt, da Maskin die Bildung des Translationsinitiationskomplexes und die Anbindung des Ribosoms blockiert.



Schwanzes, woran PABP binden kann und mit 4G interagiert. In dieser Verbindung ist dessen Affinität stark genug, Maskin aus der Verbindung mit 4E zu verdrängen und die Translation zu stimulieren (Cao und Richter, 2002).

Die Serin-Threoninkinase Aurora A ist dabei ein wichtiger Regulator. Sie gehört zu den Aurora-Kinasen, die eine wichtige Rolle bei der Zellteilung und vor allem der korrekten Teilung der Chromatiden. Während Aurora A vor allem in der Prophase der Mitose die Funktion der Zentrosomen kontrolliert, wirkt Aurora B bei der Anheftung der Spindelfaser ans Zentromer. Fehlfunktionen dieser Kinasen sind oft mit der Entstehung von Tumoren assoziiert. Aurora C findet sich vor allem in Stammzellen (Bolanos-Garcia, 2005).

CPEB-abhängig ist auch die Translationsregulation von G10, c-mos, cdk2 und den Cyclinen A1, B1, B2, die für die Eizellreifung und frühe Embryonalentwicklung verantwortlich sind. Vor allem Cyclin B1, die regulatorische Untereinheit des MPF ist hier von großer Bedeutung. CPEB reguliert die Repression der Proteinsynthese dieser mRNAs in GV-Eizellen und die Polyadenylierung während der Endreifung. Eingriffe in diese Regulation, z.B. durch Cyclin B1-Antisense-mRNA, verzögern die Polyadenylierung und den Übergang vom GVBD zur MII-Phase. Ähnlich inhibiert auch die Injektion von CPEB-Antikörpern in Eizellen nicht nur die Polyadenylierung der mRNAs, sondern auch die progesteroninduzierte Eizellreifung. CPEB ist demnach essentiell für die frühe Embryonalentwicklung (Stebbins-Boaz et al., 1996).

CPEB spielt auch bei der Zellteilung der Embryonen eine wichtige Rolle. CPEB und Maskin finden sich gemeinsam mit über CPE-regulierten mRNAs in der Nähe des mitotischen Apparates bei Polyblastomeren. Inhibitoren der polyadenylierungsabhängigen Translation blockieren die Zellteilung und führen zu Spindel- und Centrosomdefekten (Groisman et al., 2000).

➤ Translationsrepression durch die 3'-interagierenden Proteine Cup und Bruno

Die 3'UTR ist neben der temporalen Kontrolle auch in der Lage, die Translation je nach Lokalisation der mRNA in der Zelle zu steuern.

Ähnlich der Repression durch Maskin funktioniert auch das Wirkprinzip der Translationsregulation über das 4E-bindende Protein Cup, das die Keimzellformation und Axisspezifikation bei *Drosophila* steuert (Richter und Sonenberg, 2005). Zu dessen Substraten gehört die Oskar-mRNA, die in Ammenzellen synthetisiert und durch Zytoplasmabrücken in die Eizelle transportiert wird, wo es sich in der caudalen Zellregion anlagert und erst dort translatiert wird. Dies ist essentiell für die Ausprägung der Körperpole des Tieres (Castagnetti et al., 2000). Für die Translationsrepression bis zum Erreichen der endgültigen Lokalisation ist das Protein Bruno verantwortlich, das am BRE, dem Bruno Responsive Element, in der 3'UTR der entsprechenden mRNA bindet und mit Cup interagiert, das dann 4E bindet und so die Bildung des eIF4F-Komplexes verhindert und die Translation reprimiert (Castagnetti et al., 2000). Castagnetti und Ephrussi bewiesen 2003 weiterhin, dass ein langer Poly(A)-Schwanz für eine effiziente Translation notwendig, aber nicht fähig ist, die BRE-medierte Repression zu überwinden. Zudem konnten Wilhelm et al. 2003 auch zeigen, dass Cup auch für die Rekrutierung von Barentz, einem Faktor des zum Pluspol gerichteten Transports von Mikrotubuli verantwortlich ist. Bruno steuert auf ähnliche Weise auch die Expression anderer Proteine und ist weithin konserviert (Webster et al., 1997).

Auch die Expression von Nanos wird durch ein Cup-abhängiges System kontrolliert (Richter und Sonenberg, 2005), die Oskar-Synthese (Kim-Ha et al., 1995). Er hemmt durch Interaktion mit Cup die Translation des mRNA-Transkriptionsaktivators Hunchback. Auch dieser ist zwar gleichmäßig im Embryo verteilt, wird aber in der hinteren Hälfte des Embryos, in der Nanos angehäuft ist, nicht exprimiert. So entsteht eine räumliche Trennung des Vorder- und

Hinterteils des Embryos. Für diese Funktion ist ein zweites Protein nötig, Pumilio. Keines der Proteine alleine ist fähig, die Translation zu reprimieren, doch alle drei bilden einen stabilen ternären Komplex, der mediiert durch Deadenylierung die Synthese von Hunchback hemmt (Padmanabhan und Richter, 2006).

Auch in neuerer Zeit werden noch weitere BRE-regulierte mRNAs entdeckt, so z.B. die Sxl (Sex lethal) mRNA MS11, die ebenfalls BREs enthält, wie Wang und Lin 2007 bei der Suche nach Zielproteinen von Bruno mittels Elektrophorese-Mobilitätsanalysen herausfanden.

3. Hypothese:

Translationsrepression in der Eizellendreifung und deren Aufhebung im Embryonalstadium durch mRNA-bindende Proteine

Trotz der vielen bisher erforschten Möglichkeiten der Translationsregulation konnte noch nicht geklärt werden, welche dieser Mechanismen für die Repression der Translation in der MII-Phase der Eizellendreifung und für deren schrittweises Wiedereinsetzen im Verlauf der frühen Embryonalentwicklung verantwortlich sind.

In dieser Arbeit soll in Anlehnung an das Closed Loop Modell von Mangus et al. (2003) das Zusammenspiel verschiedener Regulationsmechanismen untersucht werden. Vermittelt werden diese durch Veränderungen der Expression oder Phosphorylierung spezifischer 5´-und 3´-mRNA-Bindungsproteine, die einerseits für die Repression der Translation in MII-Eizellen (Abb. 11) und andererseits für die Wiederaufnahme der Translation maternaler mRNAs vor Aktivierung des embryonalen Genoms (Abb. 10) verantwortlich sind.

Der Großteil dieser Mechanismen arbeitet über die Repression bzw. Reaktivierung der zytoplasmatischen Polyadenylierung der mRNA und damit die Steuerung des Ringschlusses, der für die Translation grundlegend ist. Deshalb wurden in dieser Arbeit Translationsinitiationsfaktoren und mit ihnen interagierende Proteine untersucht, sowie die sie beeinflussenden Kinasen.

Abb. 10: Modell der Translationsinitiation modifiziert nach Mangus et al., 2003:

Durch die Hyperphosphorylierung von 4E-BP1 oder die Phosphorylierung von CPEB wird eIF4E frei für die Bildung des eIF4F-Komplexes am Cap. Von CPEB rekrutiertes CPSF stimuliert die zytoplasmatische Polyadenylierung der mRNA am 3'-Ende. An den verlängerten Poly(A)-Schwanz kann vermehrt PABP binden, was den Ringschluss mit eIF4F fördert. Die Helikase eIF4A windet in der richtigen Position die Sekundärstrukturen der 5'-UTR auf und eIF4G zieht über eIF3 den ribosomalen Präinitiationskomplex heran, damit er an die mRNA binden kann.

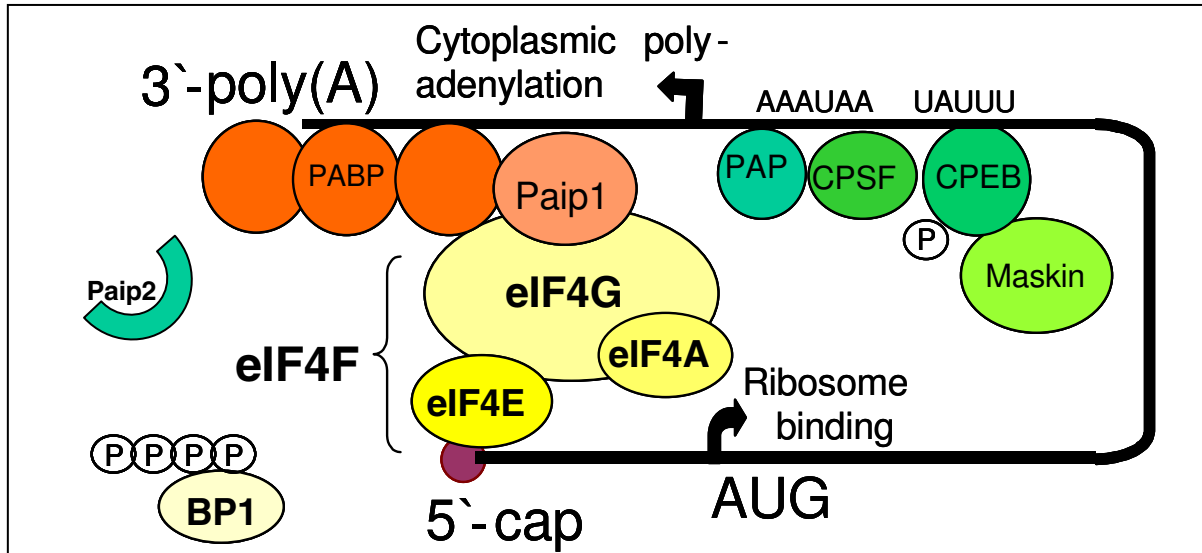
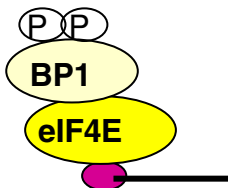


Abb. 11: Modelle der Translationsrepression am 3' und 5'-Ende der mRNA:

Das komplexe Initiationssystem der Translation bietet viele Möglichkeiten der Regulation:

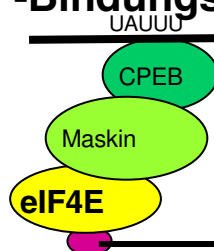
- am 5'-Ende blockiert z.B. hypophosphoryliertes 4E-BP1 die Bindung anderer Faktoren an eIF4E und damit den Ringschluss und die Bildung des Translationsinitiationskomplexes
- an der gleichen Bindungsstelle an eIF4E greift auch ein über Sequenzen der 3'-UTR kontrollierter Mechanismus an: Maskin vermittelt einen mRNA-stabilisierenden Ringschluss durch die Bindung des 3'-bindenden CPEB und des Cap-Bindungsproteins eIF4E, das dadurch für die Translationsinitiation blockiert wird.

5'-Bindungsproteine - eIF4F-Komplex:



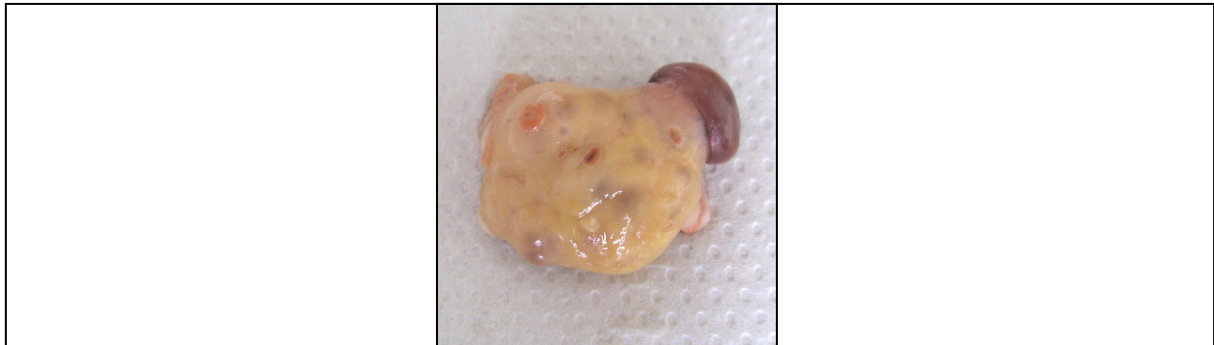
Reprimierung der eIF4F-Bildung durch 4E-BP1-eIF4E-Interaktion

3'-Bindungsproteine:



Reprimierung der eIF4F-Bildung und der Aktivität der Poly(A)-Polymerase durch eIF4E-Maskin-CPEB-Interaktion

Abb. 12:
Eierstock mit einem Gelbkörper in Blüte, mehreren Sekundärfollikeln und Corpora lutei in Rückbildung



4. Material und Methoden:

4.1 Gewinnung und Vorbereitung von Untersuchungsmaterial

4.1.1 Herkunft der Eizellen und Gewinnung

Verwendet wurden im Schlachthof Erlangen gewonnene Ovarien von gesunden Kühen und Kalbinnen der Rasse Fleckvieh mit einem Durchschnittsalter von ca. 4 Jahren (Abb. 12).

Die Entnahme der Eierstöcke erfolgte unter hygienischen Bedingungen ca. 20 min nach der Schlachtung.

Der Transport der Ovarien erfolgte in 30 - 35 °C warmer Natriumchloridlösung in einem Thermoscontainer innerhalb von maximal 2 Stunden.

Die Weiterverarbeitung erfolgte im Embryotransferlabor des Besamungsvereins Neustadt an der Aisch.

Im Labor wurden die Cumulus-Oozyten-Komplexe (COKs) sofort durch Slicing mit einer Mehrfachklinge (Eckert und Niemann, 1995) und Ausspülen mit warmer PBS+-Lösung (Anhang 7.1.1.1) gewonnen. Die gewonnene Spülflüssigkeit wurde anschließend gesiebt und durch ein Microporensieb mit einer Porengröße von 50 µm filtiert. Das im Sieb verbliebene Material wurde mit PBS+ ausgewaschen und in Rasterschalen ebenfalls mit PBS+ überführt.

Unter dem Stereomikroskop (Nikon SMZ 800) wurden die COKs mit 15-20facher Vergrößerung gesucht und auf der Grundlage der Qualitätskriterien von Leibfried-First (1979) klassifiziert.

Es wurden ausschließlich COKs der Klasse 1 bis 2 für Untersuchungen gewonnen und in kleine PBS+ gefüllte Petrischalen von 30 mm Durchmesser umgesetzt.

Es wurden Eizellen verschiedener Stadien nach unterschiedlichen Reifungszeiten von 0, 10 und 24 Stunden entnommen oder zur Embryonenproduktion bis zur Befruchtung gereift.

Tab. 3: Klassifizierungsschema für Eizellen (Leibfried-First, 1979):

Die gewonnenen Eizellen wurden nach mikroskopisch beurteilbaren Kriterien nach der Beschaffenheit ihres Cumulus und ihres Plasmas klassifiziert. Bilder zu den Eizellklassen zeigt Abb. 13.

	CUMULUS	EIZELLPLASMA
Klasse 1	kompakt, mindestens 5 Lagen	homogen, dunkel
Klasse 2	kompakt, stellenweise <5 Lagen	homogen, dunkel
Klasse 3	deutliche bis vollständige Zellexpansion	homogen bis leicht inhomogen
Klasse 4	<3 Lagen bis nackt	stark inhomogen

4.1.2 Eizellreifung

Das benötigte Maturationsmedium TCM 199 (Tissue Culture Medium Hepes Modification 25 mM) wurde nach der im Anhang (7.1.2.1) beschriebenen Vorschrift hergestellt, auf pH 7,4 eingestellt, sterilfiltriert und in luftdicht verschlossen Glasflaschen für maximal zwei Wochen im Kühlschrank bei -8 °C aufbewahrt.

Die gewonnenen COKs wurden in zwei verschiedenen Ansätzen gereift. Das TCM 199 wurde in den Anfangsversuchen mit Bovinem Serum Albumin BSA (Fa. Sigma, embryo culture tested) in der Konzentration von 3 mg/ml versetzt. Vor allem bei der Gewinnung früher Embryonalstadien wurde stattdessen aufgrund der verbesserten Teilungs- und Wachstumsraten 10 % selbst hergestelltes ECS (Estrus Cow Serum; Herstellung im Anhang 7.1.2.2) und FSH (Follikel Stimulierendes Hormon; Ovagen, Fa. ICPbio Limited) dem TCM zugesetzt.

Die Versuchsschalen mit dem jeweiligen Maturationsmedium wurden einige Stunden vor Gewinnung der Eizellen vorbereitet und zur Equilibrierung des pH-Wertes des Mediums im Brutschrank bei 39 °C, 5 % CO₂ und annähernd 100 % Luftfeuchtigkeit belassen.

In den vorbereiteten Schalen wurden die gewonnenen Eizellen zwei Mal gewaschen. Ein letzter Waschschrift erfolgte wie auch die Reifung selbst in einer Vier-Well-Schale, die mit 500 µl des gleichen Mediums gefüllt wurde. Für die Reifung der ECS-Gruppe wurde zusätzlich noch FSH (15 µl/500 µl Schale = 2,9 %) zugesetzt. Zuletzt wurden die Eizellen in die mit 300 µl Mineralöl überschichteten Maturationschalen umgesetzt und in den Brutschrank gestellt. Dort verblieben sie definierte Zeitspannen, die nach den Ergebnissen von Smiljakovic (2006) auf 10 und 24 Stunden festgesetzt wurden. Die Reifung erfolgte in Anlehnung an die von Torner et al. 2001 beschriebene Methode.

4.1.3 In Vitro Fertilisation

Zur Gewinnung früher Embryonalstadien wurden Eizellen, wie in Punkt 4.1.2 beschrieben, über 24 Stunden angereift und anschließend befruchtet. Hierzu wurde ausschließlich Spermia aus dem Ejakulat 32505 des Bullen „Romel“ (Besamungsverein Neustadt a. d. Aisch) verwendet.

Die hierfür benötigten Medien Sperm-TALP (mod. Tyrode-Laktat-Lösung nach Parrish et al., 1986; Anhang 7.1.3.1) und Fert-TALP (modifiziertes Tyrode-Laktat-Medium nach Bavister und Yanagimachi, 1977; Anhang 7.1.3.2) wurden selbst hergestellt und für maximal 2 Wochen im Kühlschrank aufbewahrt. Am Vorabend des Gebrauchs wurden die benötigten Mengen in kleine Glasflaschen abgefüllt und im Brutschrank über Nacht equilibriert. Vor Gebrauch wurde dem Fert-TALP noch Heparin (100 µl, Anhang 7.1.3.3) zur Förderung der Kapazitationsreaktion, Hypotaurin-Epinephrin (360 µl, Anhang 7.1.3.4) zur Spermienaktivierung und Gentamicin (100 µl, Anhang 7.1.3.5) als Antibiotikum hinzugefügt.

4.1.3.1 Aufbereitung der Spermien

Eine 250 µl Paillette mit etwa 15×10^6 Spermien wurde zur Befruchtung von 120-150 Eizellen verwendet.

Etwa zwei Stunden vor Ablauf der Maturationszeit wurde das tiefgekühlte Ejakulat dem Stickstoffcontainer entnommen und in 37 °C warmem Wasser für 10 Sekunden aufgetaut. Sofort darauf wurde es aus der Paillette zum Spermien-„Swim-up“ (Parrish et al., 1986) auf zwei sterile Kryoröhrchen (Fa. Nunc) mit je 1,5 ml Sperm-TALP aufgeteilt und auf deren Grund abgesetzt. Eine Stunde erhielten die Spermien im Brutschrank Zeit, in den oberen Teil der Flüssigkeit aufzuschwimmen. Mit dem oberen Teil der Flüssigkeit wurden sie dann durch Abpipettieren von 800 µl vom Bodensatz mit den Spermazusätzen und den abgestorbenen Spermien getrennt und in ein vorgewärmtes Zentrifugenröhrchen (Fa. Nunc) überführt. Durch zehnmütige Zentrifugation bei 1000 Umdrehungen, das anschließende Abziehen von 1,5 ml Überstand, die Resuspendierung mit 1,5 ml frischem Sperm-TALP und erneute Zentrifugation für 10 Minuten sollte die Spermienlösung von dem Einfriermedium Ethylenglycol und anderen für die Eizelle schädlichen Substanzen gereinigt werden. Anschließend wurde noch mal der Überstand abgezogen und 40µl des für die Eizellen vorbereiteten Fert-Talp hinzugefügt.

4.1.3.2 Vorbereitung der Eizellen

Die Eizellen wurden in gleichen Gruppen zu maximal 30 Zellen in den Vertiefungen der Vier-Well-Schale in je 200 µl Tropfen des bereits oben eingeführten Fert-TALP gewaschen und anschließend in 60 µl große Befruchtungstropfen des gleichen Mediums überführt, die bereits zuvor in einer 30 mm Petrischale vorbereitet und von Mineralöl überschichtet werden .

4.1.3.3 Befruchtung

Durch Lösung von 5 µl der Spermiesuspension in 95 µl Natriumcitrat zum Abtöten der Spermien und Zählen der Spermien in Zählkammer nach Zusatz von je 10 µl dieser Lösung unter dem Stereomikroskop wurde die benötigte Menge der Suspension ermittelt.

Erwünscht waren 120×10^3 Spermien pro Tropfen. Diese Menge wurde mit der Pipette in die Befruchtungstropfen appliziert. Im Anschluss wurden die Schalen mit den Befruchtungstropfen für 18-22 Stunden im Brutschrank inkubiert.

4.1.4 Kultivierung

Nach Ablauf der Fertilisationszeit wurden die befruchteten Eizellen zwei Mal in TCM mit 10 % ECS gewaschen und dabei durch mehrmaliges Pipettieren der Cumulus entfernt. Dann wurden sie in mit Mineralöl überschichtete Kultivierungsschalen mit TCM 199 +10 % ECS verbracht. Dies wurde als Tag 1 der Kultivierung definiert. Die Zellen wurden im Anschluss weiter im Brutschrank belassen

4.1.5 Gewinnung der frühen Embryonalstadien

Frühe Embryonalstadien wurden unter dem Stereomikroskop bei 30-60 facher Vergrößerung beurteilt und nur entnommen, wenn sie ungefähr gleichgroße regelmäßige Blastomeren enthielten.

Die Zwei-Zell-Stadien wurden am Tag 2 und 3 ab ca. 20 Stunden nach der Kultivierung entnommen. Dabei wurde ihre Entwicklung engmaschig kontrolliert, so dass sie 1 bis 2 Stunden nach ihrer Teilung gewonnen werden konnten. Ebenso wurden Vier- und Achtzeller maximal 2 Stunden, 16-Zell-Stadien höchstens 3 Stunden nach Erreichen des gewünschten Teilungsstadiums gewonnen und sofort weiterbehandelt.

4.1.6 Vorbehandlung und Einfrieren für weitere Untersuchungen

Die gewonnenen Eizellen oder Mehrzellstadien wurden alle nach derselben Methode auf das Einfrieren vorbereitet.

Zuerst wurden sie ein weiteres Mal in PBS+ gewaschen. Anschließend wurde der Cumulus durch die Behandlung mit Hyaluronidase (Anhang 7.1.5.1) und Auf- und Abpipettieren vollständig entfernt. Die so behandelten Zellen wurden anschließend je nach Bedarf weitere 2 bis 3 Mal in PBS- ohne weitere Zusätze gewaschen und anschließend in Gruppen zu 20, 50 oder 100 Zellen je nach Versuchsansatz mit einer Flüssigkeitsmenge zwischen 3 und 10 µl in Safe Lock Tubes (Fa. Eppendorf) überführt. Anschließend wurden sie durch Eintauchen in

flüssigen Stickstoff bei -196 °C schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgte max. 2 Wochen bei -30 °C in der Tiefkühltruhe.

4.1.7. Aceto-Orcein-Färbung

Um den Reifungsstatus der Eizellen und damit auch den gesamten Versuchsaufbau zu kontrollieren, wurden von frisch gewonnenen und 10 bzw. 24 h gereiften Eizellen Stichproben von 50 Eizellen entnommen und mit Aceto-Orcein gefärbt (Abb. 14).

Zur Herstellung der Färbelösung wurden 2g Orcein in 90ml Essigsäure gelöst und bis kurz vor den Siedepunkt erwärmt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Flüssigkeit mit Essigsäure auf 100 ml aufgefüllt und filtriert. Zur Färbung wurden die Oozyten in Acetalkohol (Essigsäure : Ethanol 1:3) auf einen Objektträger gesetzt und durch ein durch Wachspunkte gestütztes Deckglas abgedeckt. Mittels eines Filterpapiers wurde ein daneben abgesetzter Tropfen filtrierter Färbelösung unter das Deckglas gezogen. Nach drei Minuten Inkubationszeit wurde die Färbelösung abgesaugt und gleichzeitig durch Aceto-Glycerin aus 20% Glycerin, 20% Essigsäure und 60% Aqua dest. zur Entfärbung ersetzt. Die Eizellen wurden anschließend unter dem Mikroskop hinsichtlich der Formation ihres Kernmaterials beurteilt und in die verschiedenen Kernreifungsstadien (GV, GVBD, MI, AI, TI und MII) eingestuft.

4.2 Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen

4.2.1 SDS-PAGE nach Laemmli (1970)

Die zu analysierenden Faktoren und Kinasen wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert. Hierzu wurde zunächst das Polyacrylamid-Gel in für die jeweils zu untersuchende Probe geeigneter Konzentration von 7,5, 10, 12,5 oder 15 % hergestellt (Anhang 7.2.1.1). Für eine gute Trennung der großen Proteine eIF4G (220 kDa) und mTOR (290 kDa) wurde für diese vorwiegend ein 7,5 % Gel verwendet (Abb. 20). Für vergleichende Betrachtungen anderer Proteine wurde vor allem 12,5 % Gel verwendet.

Für die Elektrophorese wurde das Hoefer Mighty Small SE 250-Elektrophoresesystems verwendet (Hoefer, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland). Das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid betrug dabei 30 : 0,8 bzw. 29,7 : 0,3. Anschließend wurde das Gel mit gesättigtem Isobutanol geglättet und mindestens 2 Stunden zur Polymerisation bei Raumtemperatur belassen. Das Sammelgel (Anhang 7.2.1.2) wurde auf das Elektrophoresegel in die Apparatur gegossen, wobei die benötigten Taschen durch Einsatz eines Probenkammes ausgespart wurden, und erneut 1 Stunde belassen. Die Platten mit dem polymerisierten Gel

wurden in das vertikale Elektrophoresesystem eingesetzt, diese mit Elektrophoresepuffer nach Laemmli (Anhang 7. 2.1.3) befüllt und an eine Wasserkühlung angeschlossen.

Den Proben zu je 20 oder 100 Eizellen oder Mehrzellstadien wurde eine jeweils errechnete Menge (1/3 der Probenmenge) des dreifach konzentrierten SDS-Probenpuffers (Anhang 7.2.1.4) zugesetzt und die Lösung für 2 Minuten im 95 °C heißen Wasserbad denaturiert. Es folgte eine Zentrifugation der Lysate bei ca. 800 g.

Anschließend wurde das Gel mit den Proben und zusätzlichen geprüften Proteinmarkern, Negativ- und Positivkontrollen beladen und Strom mit einer Stromstärke von 20-30 mA und einer Spannung von 450 V angelegt. Bei Raumtemperatur erfolgte die Elektrophorese, bis das Bromphenolblau das untere Ende des Gels erreicht und die gewünschte Auftrennung der Proben an den vorgefärbten Markerproteinen ablesbar war.

4.2.2 Western Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden in einem Semi-Dry Elektroblothing-Gerät (OWL / peQLab, Germany) nach der Methode von Kyhse-Anderson et al. (1984) vom Gel auf eine PVDF (polyvinylidene difluorid)-Membran (Immobilon von millipore) mit 0,45 µm Porengröße geblottet, wobei ein Drei-Puffer-System verwendet wurde. Hierbei wurden mehrere Schichten aufeinander gepresst: drei in Kathodenpuffer (Anhang 7.2.2.1c) getränkte Blotpapiere, darüber das vorher 15 Minuten in Kathodenpuffer equilibrierte Gel, darauf die nacheinander zur Aktivierung zehn Sekunden in Methanol, dann in mindestens fünf Minuten in d.d. H₂O gewaschene und mindestens zehn Minuten in Anodenpuffer I (Anhang 7.2.2.1a) getränkte Membran und darüber ein Papier mit Anodenpuffer I und zwei mit Anodenpuffer II (Anhang 7.2.2.1b). Die über eine Stunde angelegte Stromstärke wurde bei 1 mA pro cm² begrenzt.

4.2.3 Membranbehandlung und Immunoblotting

Nach der Entnahme der PVDF-Membran folgten zwei Waschschrte mit vor der Verwendung frisch hergestelltem TTBS (Anhang 7.2.2.3). Bei jeder Waschung wurde die Membran über die gesamte Zeitspanne kontinuierlich geschwenkt.

Freie unspezifische Bindungsstellen auf der PVDF-Membran wurden anschließend mit 5% in TTBS gelöstem fettfreiem Trockenmilchpulver (pH 7,4) oder 5 % BSA in TBS abgesättigt und der Blot anschließend drei Mal zehn Minuten mit TTBS gewaschen.

Über eine definierte Zeitdauer (Tabelle 4) wurde der Blot dann mit spezifischen Antikörpern bei einer jeweils auf den Antikörper abgestimmten Temperatur nach Herstelleranweisung inkubiert. Die Antikörperverdünnungen wurden je nach zu bestimmendem Protein gewählt.

Tab. 4: Methodik der Membranbehandlung für das Immunoblotting:

Entsprechend der Arbeitsanweisungen für die jeweiligen verwendeten Antikörper wurde die Methodik der Membranbehandlung wie unten dargestellt bei den einzelnen Messungen geringgradig modifiziert.

1. Antikörper	Verdünnung	Inkubation	Waschen 3 x 20 min in TTBS	2. Antikörper	Verdünnung	Inkubation in TTBS	Waschen 2 x 20min in TTBS, 1 x 5-20 min in d.d.H ₂ O
eIF4E (transduction labs) für Immunopräzi- pitation	1:750	bei 4°C über Nacht in TTBS mit 5% BSA		Anti-Maus- IgG aus dem Esel (Jackson Lab)	1:10000	1,5h	
eIF4E	1:1000			Anti-Rabbit IgG aus der Ziege (HRP- markiert)	1:4000	1,5h	
peIF4E	1:1000				1:4000	1,5h	
4E-BP1	1:750				1:2000	1,5h	
p4E-BP1	1:750				1:2000	1,5h in TTBS mit 5% Milch (Roth)	
eIF4G	1:750				1:2000	1,5h	
peIF4G	1:750				1:2000	1,5h	
eIF4A (abcam)	1:500				1:4000	1,5h	
PABP1,3	1:750 1:1000				1:2000	1,5h in TTBS mit 5% Milch	
CPEB (Santa Cruz)	1:1000				1:2000	1,5h	
CPSF (Santa Cruz)	1:750				1:2000	1,5h	
ACTB (abcam)	1:1000						
TACC3 (Santa Cruz)	1:1000						
Mask (Santa Cruz)	1:1000						
MAPK (Santa Cruz)	1:1000				1:2000	1,5h	
pMAPK	1:1000				1:2000	1,5h	
Aurora A	1:750				1:2000	1,5h in TTBS mit 5% Milch	
pAurora A, B, C	1:750				1:2000	1,5h in TTBS mit 5% Milch	
Akt (Thr308)	1:750				1:3000	2h in TTBS mit 5% Milch	
Akt total	1:1000				1:3000	1,5h in TTBS mit 5% Milch	
pAkt	1:750		1:3000	1,5h in TTBS mit 5% Milch			
mTOR	1:1000		1:2000	1,5h in TTBS mit 5% Milch			

Nach Ablauf der Zeitspanne wurde die Membran drei Mal 10min in TTBS gewaschen, danach wurde ein entsprechend gewählter sekundärer Antikörper aufgebracht und 1,5 Stunden inkubiert. Vor der abschließenden Chemolumineszenzanalyse wurde die Membran noch zwei Mal in TTBS und einmal in doppelt destilliertem H₂O für 5 Minuten gewaschen.

Die genauen Verfahren und verwendeten Antikörper der einzelnen Untersuchungen sind in Tabelle 4 dargestellt. Soweit nicht anders gekennzeichnet, wurden die Antikörper von Cell Signaling Technologies verwendet.

4.2.4 ECL-Detektion

Zur Auswertung der Blots wurde das Chemolumineszenzverfahren verwendet. Die Blot-Membran wurde in der selbst hergestellten, im Anhang beschriebenen ECL-Lösung zwei Minuten inkubiert und anschließend in der Dunkelkammer auf Röntgenfilme exponiert. Diese Belichtung erfolgte je nach Probenmaterial und Häufigkeit der Neubeprobung der Membran für sehr unterschiedliche Zeitspannen zwischen wenigen Sekunden und 15 Minuten. Bei sehr geringen Substratmengen wurde ECL+ (Fa. Amersham Pharmacia) aufgrund seiner höheren Sensitivität verwendet.

4.2.5 Far Western Analyse

Um eIF4E-bindende Proteine nachzuweisen, wurde die Far Western Analyse verwendet.

Die nach Elektrophorese und Western Blot gewonnene Membran wurde mit rekombinantem, N-terminalem, GST-markiertem eIF4E kompletter Länge (abcam, 2 µg in einer TTBS-Lösung mit 5 % BSA) bei 4 °C über Nacht bei sanfter Bewegung inkubiert. Ein HRP-markierter Anti-GST-Antikörper, der 1:2000 in TTBS gelöst und mit 5 % Trockenmilch geblockt wurde, markiert bindendes eIF4E.

Die Banden wurden mittels Chemolumineszenz sichtbar und messbar gemacht.

4.2.6 eIF4E-Immunopräzipitation

Zu den Proben aus 100 Eizellen oder Zweizellstadien wurden je 100 µl Zell-Lysis-Puffer und 1,5 µl Lösung Anti-eIF4E-Antikörper hinzugefügt. Über Nacht wurden sie unter ständiger Bewegung bei 4 °C inkubiert.

Am darauf folgenden Tag wurde PolyG+ Agarose (Santa Cruz) zwei bis drei Mal gewaschen mit dem gleichen Volumen Lysis-Puffer, das vorher nach dem Absetzen entnommen wurde und zu jeder Probe davon 20 µl zugesetzt. Danach wurden die Proben bei Raumtemperatur

zwei Stunden geschüttelt, dann zwei Mal mit 100 µl Lysispuffer durch Zentrifugation bei 13000 rpm für je eine Minute gewaschen. Anschließend wurde dreifach konzentrierter Probenpuffer in einem Drittel der Probenmenge hinzugegeben, 5 min bei 13000 Umdrehungen zentrifugiert, der Überstand in neue Gefäße übertragen und für 2 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden dann auf das Gel aufgebracht. Die jeweiligen Überstände wurden gesammelt und mit je 600 µl eiskaltem Ethanol bei -20 °C gefällt und ebenfalls elektrophoretisch analysiert. Die Auswertung der Western Blots durch Chemolumineszenzverfahren erfolgte wie oben beschrieben.

4.2.7 m⁷GTP-Sepharose-Präzipitation

In 200 µl Lysispuffer unter Zusatz von 100 mM GTP und 1 mM DTT wurden pro Probe je 200 Eizellen oder Embryonen lysiert und bei 1000 g 10 Minuten lang bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden mit 20 µl m⁷GTP-Sepharose 4B (GE Healthcare, UK) drei Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen des Sediments in 1 ml RIPA-Puffer wurden die darin gebundenen Proteine mit dreifach konzentriertem SDS-Puffer ausgewaschen.

Die Lysate wurden mittels Gelelektrophorese auf 15 %- bzw. 12,5 %- SDS-Gel aufgetrennt und die jeweils gesuchten Proteine mittels Immunoblotting durch entsprechende Antikörper (Anti-eIF4E-, Anti-eIF4G bzw. Anti-4E-BP1) kenntlich gemacht. Entsprechend wurde auch der Überstand durch Elektrophorese und Immunoblotting auf ungebundene Proteine untersucht.

4.2.8 Analyse der Phosphorylierung verschiedener Kinasesubstrate

Hierfür wurde das Analyse Kit der Fa. Cell Signaling Technologies verwendet, das spezifische Antikörper für spezifische Phosphorylierungsstellen der Substrate von PKA, PKB, PKC, CDKs, AMT/ATR und MAPK enthält. Dabei erkennt der PKA-spezifische Substratantikörper das Motiv RRXS*/T*, der PKB-spezifische Antikörper Sequenzen mit pSer, pThr an Position 3 bzw. 5 nach Arg. und der PKC-spezifische nur phosphorylierte Serinreste umgeben von Arg oder Lys an der Position +2 oder -2 und einem hydrophobem Rest an der Position +1. Bei CDK-Substraten erkennt der Antikörper pSer in dem Motiv (K/R)(S*)PX(K/R), der für AMT/ATR hergestellte Antikörper bindet Proteine, die pSer/Thr enthalten, mit vorausgehender hydrophober Aminosäure und an Position +1 folgender Gln. Der für MAPK/CDK substratspezifische Antikörper reagiert nur mit phosphoryliertem Thr, wenn darauf Prolin folgt. SDS-PAGE und Western Blot erfolgten wie bereits beschrieben. Alle Membranen wurden mit 5% fettfreier Trockenmilch in TTBS geblockt. Die primären phosphospezifischen Antikörper wurden 1:1000 in TTBS mit 5 % BSA gelöst.

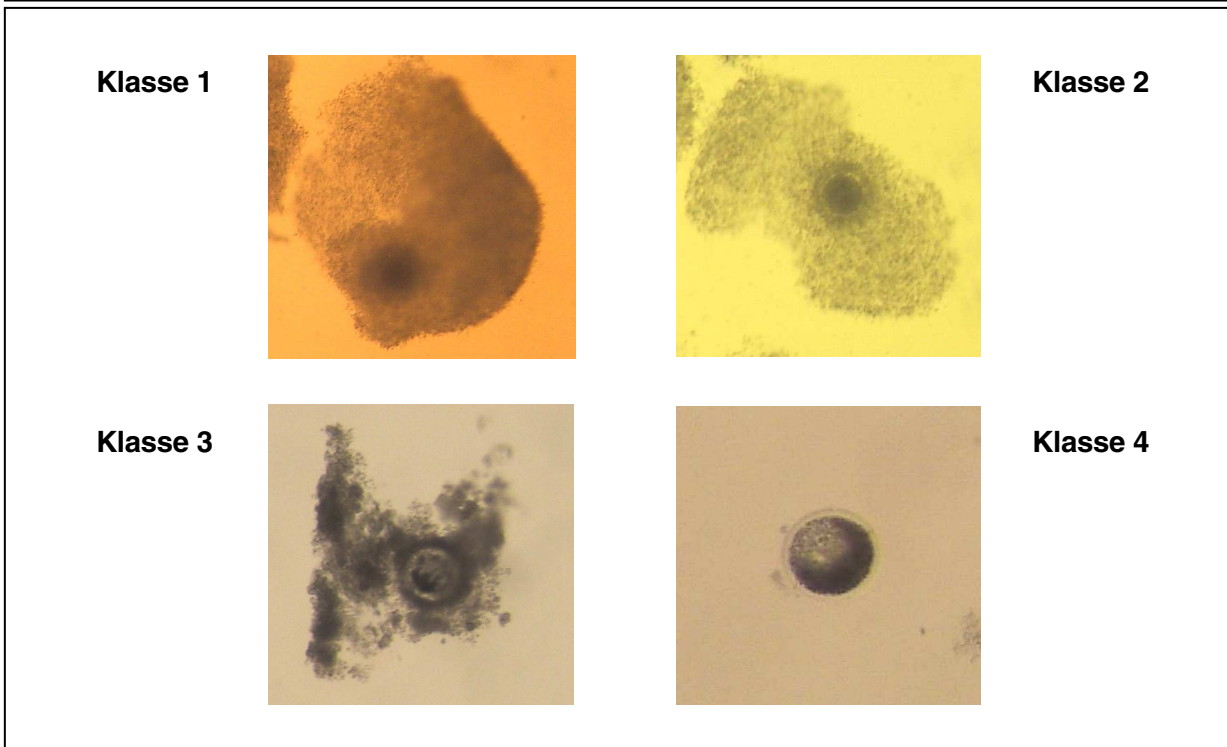
Die phosphorylierten Proteine wurden mittels des bereits beschriebenen Chemolumineszenzverfahrens sichtbar gemacht.

4.2.9 Statistische Analysen

Die optische Dichte der auf Röntgenfilmen sichtbar gemachten Banden der Western Blots wurde mittels des Camila Systems (raytest, Berlin) digitalisiert und mit der AIDA-Bildanalysesoftware quantifiziert. Die Daten wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben und durch Einfach-Varianzanalyse untersucht (One-way ANOVA, SigmaStat Statistisches Analysesystem, Jandel Scientific, San Rafael, Kalifornien). Vergleiche verschiedener Gruppen erfolgten mittels Newman-Keuls-Test. Der Grenzwert statistischer Signifikanz wurde dabei mit $\alpha=5\%$ angegeben.

Abb. 13: Eizellklassen:

Die Eizellen wurden nach den in Tab. 3 beschriebenen Kriterien klassifiziert.



5. Ergebnisse:

5.1 Gewinnung des Ausgangsmaterials

5.1.1 Gesamtproduktion an gereiften Eizellen und Embryonen

Insgesamt wurden 7850 über verschiedene Zeiten angereifte Eizellen und 6580 Embryonalstadien (2860 Zweizellstadien und jeweils 1240 Vier-, Acht- und Sechzehnzeller) für weitere Untersuchungen produziert und in Gruppen zu je 100 Stück eingefroren.

Beispiele für die verschiedenen Eizellklassen sind in Abb. 13 dargestellt.

5.1.2 Prüfung der Endreifung mittels Aceto-Orcein

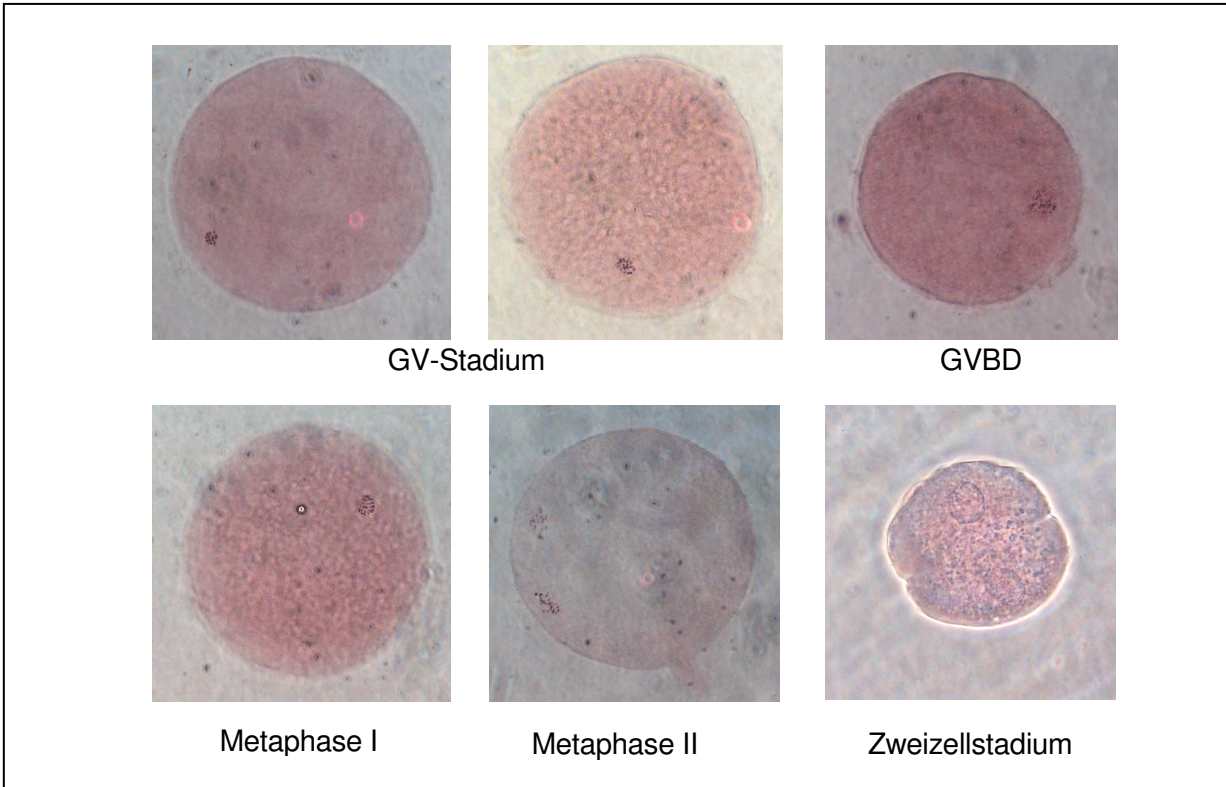
Der Reifungsablauf wurde stichprobenweise in Proben von jeweils 50 Eizellen pro Gruppe mittels der Aceto-Orceinfärbung überprüft. Dabei aufgenommene Bilder finden sich in Abbildung 14. Die von Melo Sterza (2003) ermittelten Reifungszeiten konnten hierbei bestätigt werden. So befanden sich gerade gewonnene Eizellen überwiegend (84 %) noch im GV-Stadium, einige begannen bereits kurz nach der Entnahme aus dem Follikel mit dem GVBD, der sich in der Regel erst nach 6 Stunden vollzieht.

Nach 10 Stunden hatten fast alle Eizellen die MI-Phase erreicht, nur wenige verblieben noch im GVBD. Die MII-Phase war bei 92 % der Zellen nach 24 Stunden vollendet (Tab. 5).

Damit wurde bestätigt, dass die gewählten Reifungsintervalle für die durchgeführten Versuche tauglich sind.

Abb. 14: Stadien der Endreifung der Eizellen in Aceto-Orcein-Färbung:

Die Eizellen wurden 0 (GV), 6 (GVBD), 12 (MI) und 24 (MII) Stunden gereift und für das 2C-Stadium befruchtet und kultiviert. Die Fixierung erfolgte in Ethanol / Eisessig (3:1) und die Färbung mit Aceto-Orcein. Ausgewertet wurde bei 40-facher Vergrößerung im Phasenkontrastmikroskop.



Tab. 5: Stadien der Endreifung der Eizellen in Aceto-Orcein-Färbung in Tabelle (A) und Diagramm (B)

Pro Zeitpunkt wurden 50 Eizellen untersucht und es konnte gezeigt werden, dass zu den gewählten Entnahmezeitpunkten der überwiegende Teil der Oozyten im jeweilig erwarteten Stadium vorliegt.

A:

Stadium/Reifungszeit	0h	10h	24h
GV	84 %	-	-
GVBD	16 %	6 %	-
MI	-	94 %	8 %
MII	-	-	92 %

B:

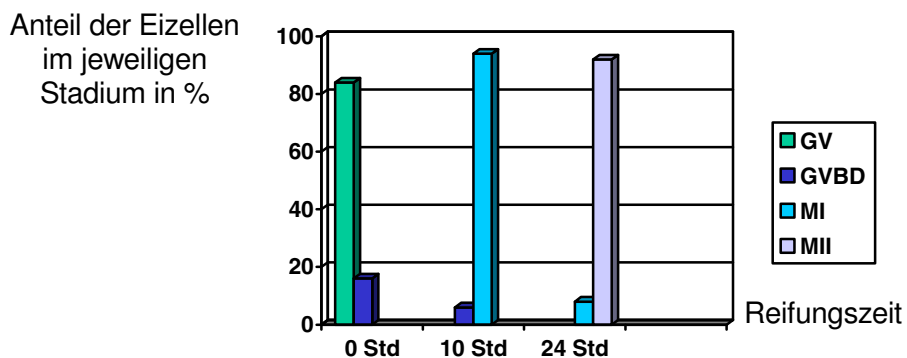
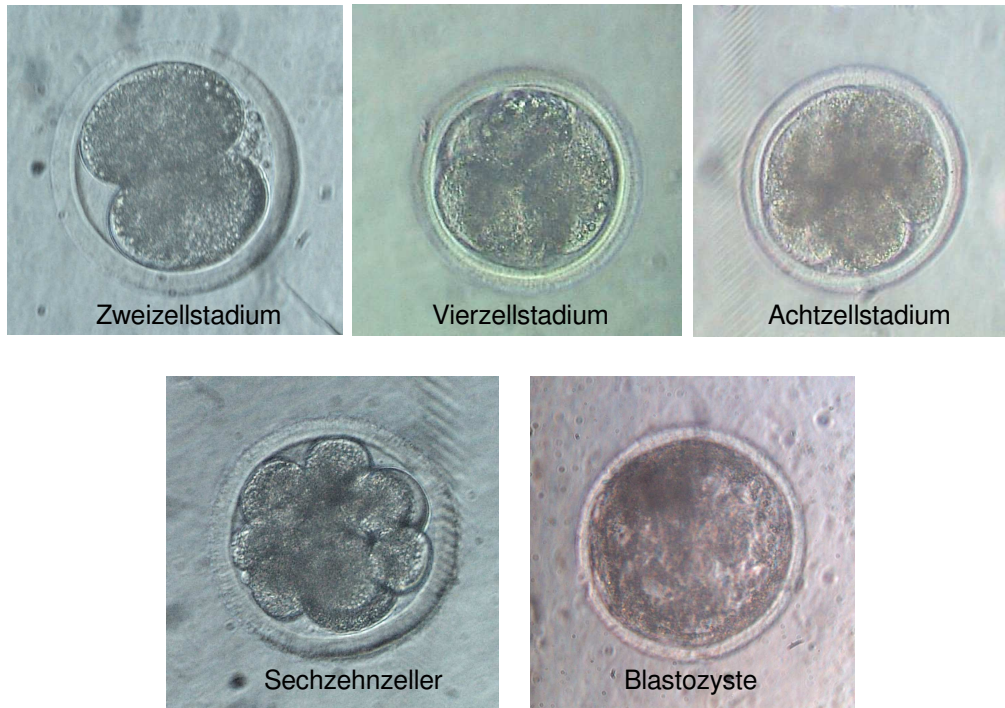


Abb. 15: Frühe Embryonalstadien:

Die befruchteten Eizellen wurden über verschiedene Zeiträume kultiviert und maximal eine Stunde nach der Teilung entnommen. Die Bilder wurden bei 40-facher Vergrößerung durch das Phasenkontrastmikroskop angefertigt.

**5.1.3 Produktion der Embryonalstadien**

Ein Großteil der Eizellen wurde nach Abschluss der Endreifung für die Produktion von Embryonen befruchtet und bis zum Erreichen verschiedener Teilungsstadien weiter kultiviert. Die Anzahl geteilter Zellen wurde 72 Stunden nach der Befruchtung ermittelt und daraus die Teilungsrate berechnet. Diese lag zwischen 55 und 85 %. Bezogen auf die geteilten Embryonen konnten am Tag sieben und acht Blastozystenraten zwischen 34 und 46 % erreicht werden. Wurden aus der Kultivierungsschale vorher Embryonen entnommen, reduzierte dies die Entwicklung der anderen Mehrzellstadien zu Blastozysten.

In Abb. 15 sind beispielhaft alle untersuchten Stadien abgebildet.

5.2 Analyse der Spezifität der verwendeten Antikörper bei bovinen Proben und Überprüfung der Eizellreifung anhand der Aktivierung von MAPK und eIF4E

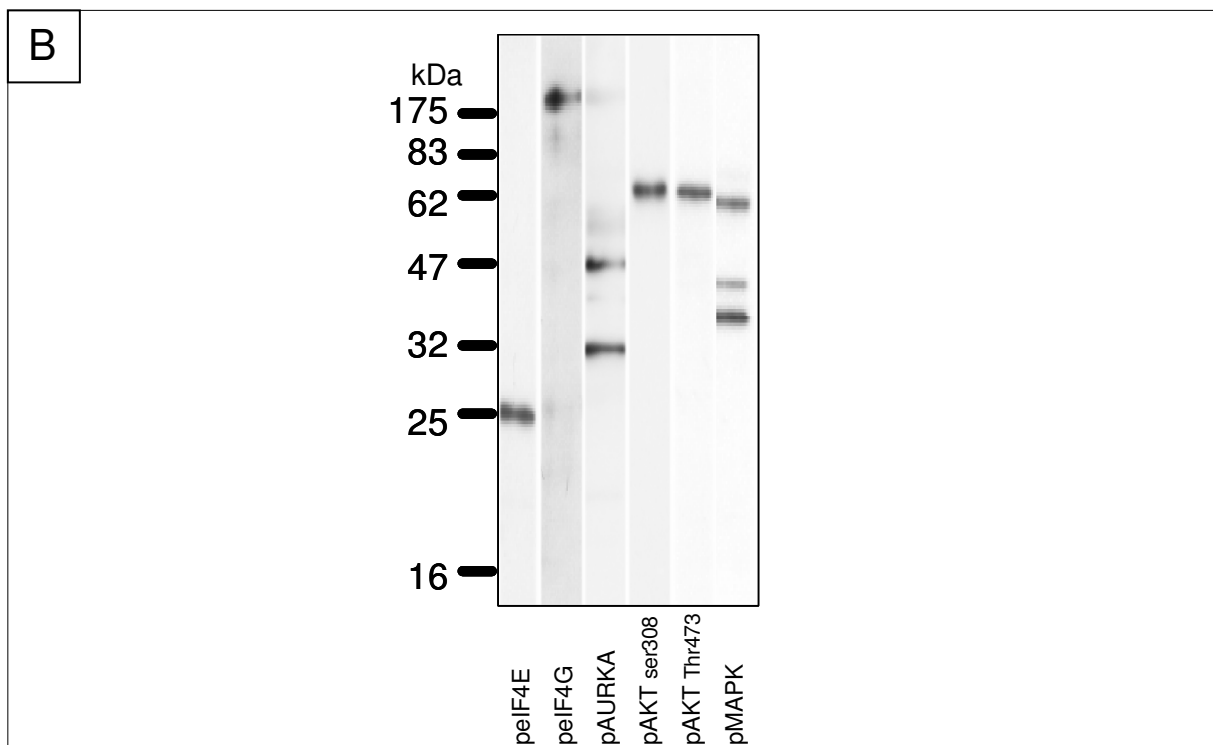
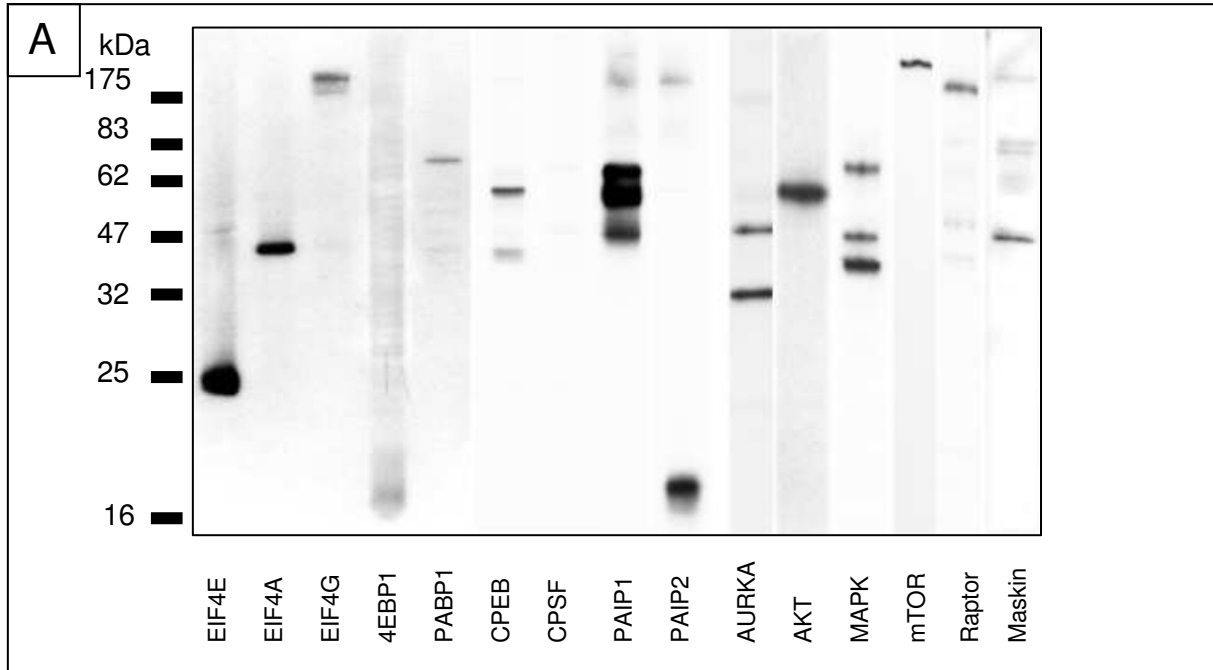
Für diese Arbeit wurden ausgewählte Proteine, die nachweislich in somatischen Zellen oder auch in Eizellen verschiedener Arten an der Translationsinitiation beteiligt sind, hinsichtlich ihres Auftretens und ihrer Phosphorylierung während der meiotischen Endreifung in bovinen Oozyten untersucht.

Abb. 16: Analyse der Spezifität der verwendeten Antikörper gegenüber bovinen Proben:

Alle verwendeten Antikörper wurden hinsichtlich ihrer Spezifität für die zu analysierenden Proteine getestet, um potentielle Fehlerquellen zu vermeiden.

A: Gesamtprotein

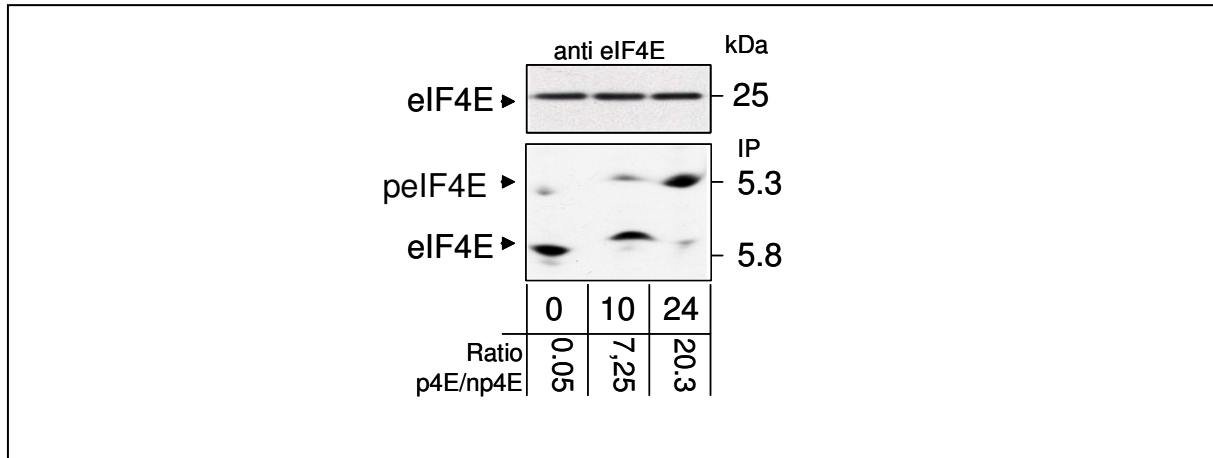
B: Phosphoprotein



Zunächst wurden die für diese Analyse benötigten Antikörper hinsichtlich ihrer Spezifität und Bindungsfähigkeit gegenüber Gesamt- und Phosphoprotein boviner Eizellen geprüft (Abb. 16 A und B), um mögliche unspezifische Bindungsreaktionen oder fehlerhaftes Bindungsverhalten

Abb. 17: Isoelektrische Fokussierung von eIF4E:

Bestimmung der Phosphorylierung von eIF4E durch VSIEF mittels eines Antikörpers für eIF4E (Transduction Lab) und anschließendes Western Blotting.



auszuschließen. Danach wurden zur Kontrolle des Reifungssystems frühere Analysen bestätigt.

Mit der Isoelektrischen Fokussierung (IEF; Abb. 17) wurde bestätigt, dass die Menge an eIF4E zwar gleich blieb, jedoch das Verhältnis von Phospho-eIF4E zu nicht phosphoryliertem eIF4E vom GV- (0,05) bis zum MII Stadium (20,3) sprunghaft anstieg.

Andere, während der Translationsinitiation damit interagierende Proteine wurden ebenfalls zur Überprüfung des Reifungssystems untersucht.

Das Gerüstprotein eIF4G (220kDa) blieb ebenfalls in seiner Konzentration relativ unverändert, jedoch nahm dessen Phosphorylierung ab der GV-Phase stetig ab (Abb. 18 A/B). PABP (73 kDa) stieg im Verlauf der Endreifung an und wies dabei vor allem in der MI- und MII-Phase einen Banden-Shift auf, der auf posttranslatorische Modifikationen schließen lässt (Abb. 18 C). Die Analyse von β -Actin im Zusammenhang mit PABP diente vor allem als Loading-Kontrolle (Abb. 18 D). Die MAP-Kinasen ERK 1 und 2 (44 und 42 kDa), die über Mnk 1 für die Phosphorylierung des Cap-Bindungsproteins eIF4E verantwortlich sind, blieben ebenfalls in ihrem Auftreten gleich. Ihre Phosphorylierung nahm allerdings analog zu der von eIF4E bis zum MII-Stadium zu (Abb. 18 E/F). Diese Ergebnisse bestätigen die Funktionalität des verwendeten Reifungssystems.

5.3 Analyse wichtiger Faktoren der Translationsregulation von der GV-Eizelle bis zum Sechzehnzellstadium

Um die Wiederaufnahme der Translation verschieden regulierter mRNA-Fractionen in der frühen Embryonalentwicklung zu untersuchen, wurde das Vorkommen der translatorisch wichtigen Proteine in Embryonen bis zum Sechzehnzeller analysiert, da beim Rind in diesem Stadium das embryonale Genom vollständig aktiviert ist (Misirlioglu et al., 2006).

Abb. 18: Untersuchungen zur Eizellendreifung:

Je 100 Eizellen pro Gruppe wurden sofort (0 Std) bzw. nach 10 und 24 Std. Reifung entnommen und bezüglich des Vorkommens und der Phosphorylierung translatorisch wichtiger Proteine (eIF4G, PABP) und Proteinkinasen (ERK1 und 2) durch SDS-Page und anschließendes Western Blotting untersucht. Durch Chemolumineszenz werden die Proteine sichtbar gemacht.

A: Analyse des Gerüstproteins eIF4G (eIF4G-Antikörper, Cell Signaling)

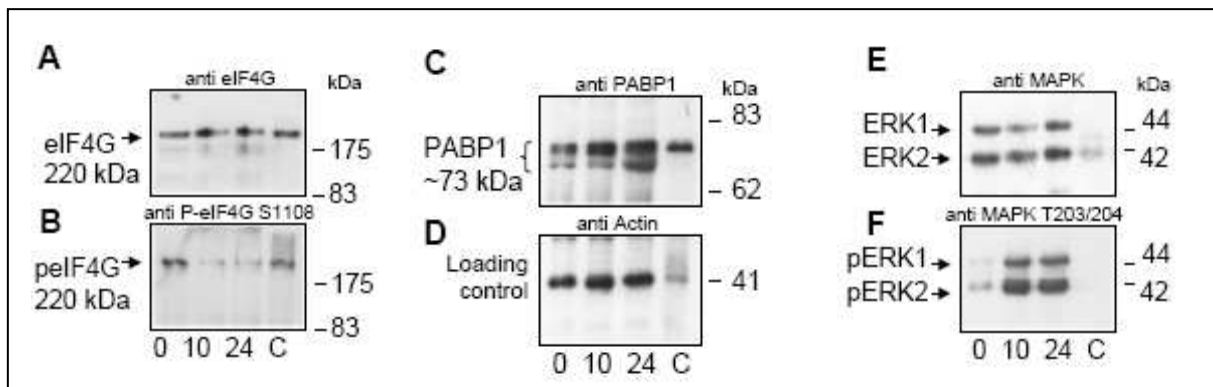
B: Analyse der Phosphorylierung mit eIF4G (p-eIF4G S1108 Antikörper, Cell Signaling)

C: Analyse des Vorkommens von PABP1 (PABP1 Antikörper, Cell Signaling)

D: Beladungskontrolle mittels Actin (Actin-Antikörper, abcam)

E: Analyse des Vorkommens von ERK1 und 2 (MAPK-Antikörper, Santa Cruz)

F: Analyse der Phosphorylierung der MAPK (p-MAPK-Antikörper, Cell Signaling)

**5.3.1 Auftreten und Modifikationen 5'-bindender Faktoren**

Das Cap-Bindungsprotein eIF4E wurde bis zum Sechszehnzeller durchgehend in gleichbleibender Menge exprimiert, stieg jedoch in seiner Phosphorylierung bis zur MII-Phase stetig an (wie auch gezeigt durch IEF, Abb. 17) und war beim Übergang zum Embryo nahezu nicht nachweisbar. In den späteren Embryonalstadien blieb die Phosphorylierung mittig zwischen diesen beiden Extremen (Abb. 19/20).

Das Gerüstprotein eIF4G wurde in der MII-Phase degradiert. In seiner Phosphorylierung verhielt es sich gegensätzlich zu eIF4E. Es war, wie in Abb. 21 und 22 zu sehen, im GV-Stadium stark phosphoryliert, zeigte dann drastisch abnehmende Phosphorylierung bis MII und stieg beim Zweizeller wieder an. Danach fiel sie dauerhaft auf ein mittleres Niveau.

Auch die dritte Komponente des eIF4F-Komplexes, die RNA-Helikase eIF4A, war durchgehend bis zum Sechszehnzeller in gleicher Konzentration vorhanden (Abb. 23). Ihre Aktivität wurde vor allem über die richtige Positionierung an der mRNA durch den Translationsinitiationskomplex gesteuert, eine posttranslatorische Modifikation war nicht nachweisbar.

Abb. 19: Das Cap-Bindungsprotein eIF4E:

Das Vorkommen und der Phosphorylierungsstatus von eIF4E während Eizellreifung und den ersten Embryonalstadien wurden durch SDS-PAGE und Western Blot in Gruppen zu 100 je Zeitpunkt mittels eIF4E und peIF4E-Antikörpern (Cell Signaling) analysiert.

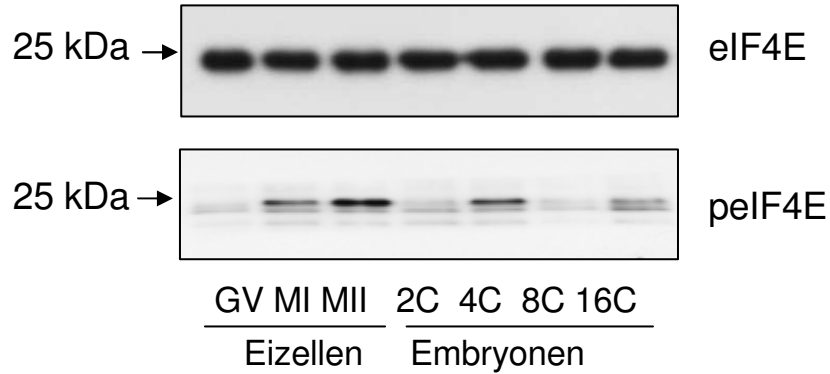


Abb. 20: Der Phosphorylierungsstatus von eIF4E während der Embryonalentwicklung:

Die Western Blots wurden mit Camila Systems (raytest, Berlin) vermessen und mit der AIDA-Bildanalysesoftware ausgewertet. So wurde der Anteil von phosphoryliertem eIF4E ermittelt. (n=3; p=0,05)

peIF4E/eIF4E

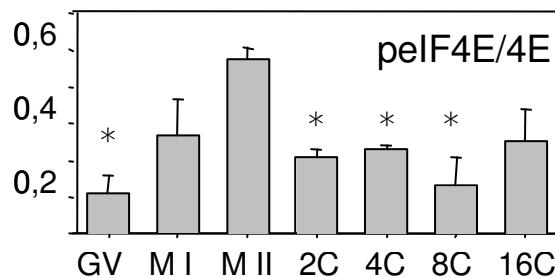


Abb. 21: Das Gerüstprotein eIF4G:

Vorkommen und Phosphorylierungsstatus von eIF4G während Eizellreifung und den ersten Embryonalstadien wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot von je 100 Eizellen bzw. Embryonen unter Einsatz von eIF4G und peIF4G-Antikörpern (Cell Signaling) analysiert.

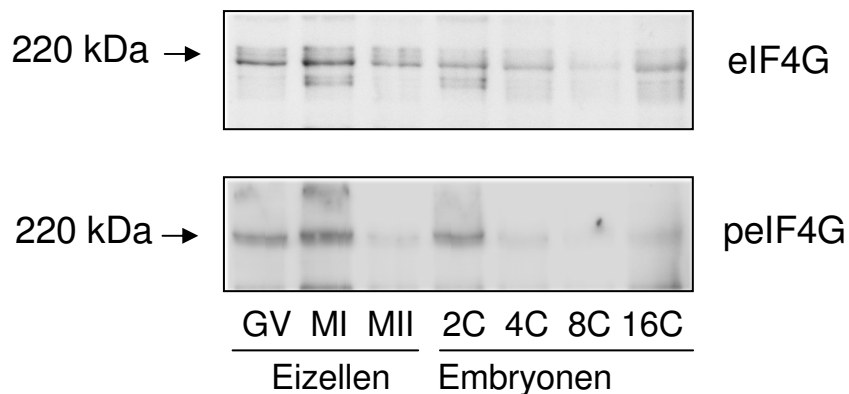


Abb. 22: Der Phosphorylierungsstatus von eIF4G während der Embryonalentwicklung: Das Verhältnis von phosphoryliertem eIF4G zu eIF4G wurde aus den Western Blots durch Camila-System bestimmt und durch die AIDA-Software analysiert. (n=3; p=0,05)

peIF4G/eIF4G

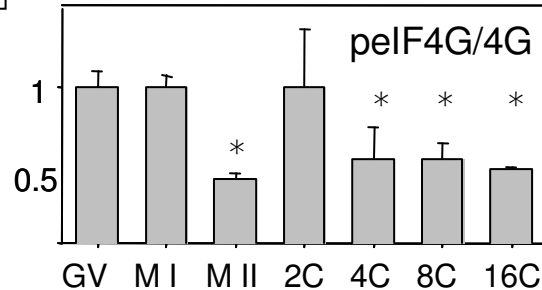


Abb. 23: Die Helikase eIF4A während Eizellreifung und Embryonalentwicklung:

Das Vorkommen der Helikase eIF4A bleibt von der Eizelle im GV-Stadium bis zum 16-zelligen Embryo konstant. Dies wurde mittels SDS-PAGE mit eIF4A-Antikörpern (abcam) und Western Blotting in Gruppen von je 100 gereiften Eizellen und Embryonen pro Zeitpunkt ermittelt.

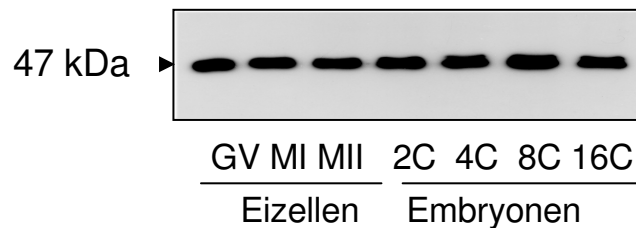


Abb. 24: Der Translationsrepressor 4E-BP1:

SDS-Page und Western Blot mit einem 4E-BP1-Antikörper (cell signaling) zeigen bis zum 16-Zeller drei verschieden stark phosphorylierte Formen: im GV Stadium die hypophosphorylierte α -Form, zur MII-Phase vor allem die stark phosphorylierte γ -Bande. Im Embryo dominieren hingegen dazwischenliegende β -Banden.

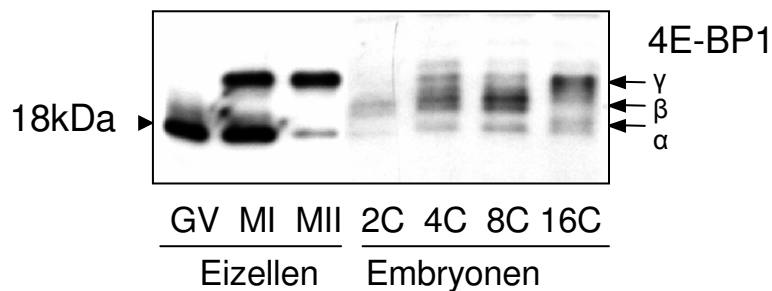
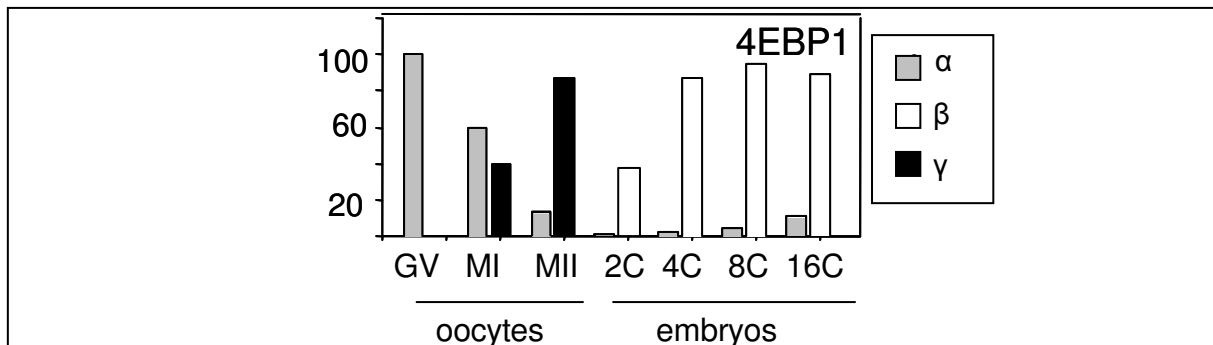


Abb. 25: Der Translationsrepressor 4E-BP1- grafische Darstellung:

Densitometrische Auswertung eines Western Blots für 4E-BP1. Dargestellt ist die hypophosphorylierte Form (graue Säulen), die hyperphosphorylierte Form (schwarz) und teilweise phosphorylierte Formen (weiß) vom GV- bis zum 16-Zell Stadium (n=1).



Der wichtige Translationsrepressor 4E-BP1 erschien in Abb. 24 im GV-Stadium als eine einzelne Bande mit hoher elektrophoretischer Mobilität (Bande α). Im MI- und MII-Stadium trat durch zunehmende Phosphorylierung ein deutlicher Banden-Shift auf, wobei nach 10 Stunden zusätzlich eine hyperphosphorylierte (γ) Bande erschien (Abb. 25), die eine ungefähr gleiche Konzentration aufwies. Ausgereifte Eizellen enthielten vor allem das Protein mit geringster elektrophoretischer Mobilität, also höherem Phosphorylierungsgrad (Ellederova et al., 2006). Im Zweizellstadium verschwand 4E-BP1 fast vollständig. Es fanden sich stattdessen im Embryo verschiedene Banden mittleren Molekulargewichts (Bande β). Es ist anzunehmen, dass hier nicht alle Phosphorylierungsstellen besetzt sind. 4E-BP wurde in diesem Stadium degradiert. In deutlich geringerem Maß, aber dennoch mit dem Entwicklungsgrad zunehmend, war wieder hypophosphoryliertes 4E-BP1 nachweisbar.

5.3.2 Bindungsanalysen der mit der 5'-mRNA interagierenden Proteine

Die Analyse der kompletten Zelllysate bestätigte die gleichmäßige Expression von eIF4E von der Eizelle bis zum Sechzehnzellstadium. Die Analyse der Bindung dieses Faktors an die Cap-Struktur mittels m^7 GTP-Sepharose zeigte aber deutliche Veränderungen. Deutlich ist in Abb. 26 A zu sehen, dass im GV-Stadium nur wenige Proteine in den Präzipitaten erscheinen; deutlich mehr fanden sich in der ungebundenen Fraktion. Während der Eizellreifung und im frühen Embryo kehrte sich dies um. Schon ab der MI-Phase wurde deutlich mehr eIF4E gebunden als im nicht präzipitierten Anteil zu finden ist. Diese Aufteilung blieb auch während der Embryonalentwicklung weitgehend konstant.

Die Analyse der Interaktion von 4E-BP1 mit dem Cap ergab, dass das Protein nicht in den Präzipitaten nachgewiesen werden konnte, dafür vollständig in der ungebundenen Fraktion erschien (Abb. 26 B). Die könnte ein Hinweis sein, dass hier andere Faktoren reprimierend auf eIF4E wirken.

Abb. 26: Analyse der eIF4E, eIF4G und 4E-BP1-Interaktion mit dem Cap mittels m⁷-GTP- Sepharose-Präzipitation:

Dargestellt sind hier repräsentative Blots der wichtigsten am 5'- Ende der mRNA interagierenden Proteine: eIF4E (A), 4E-BP1 (B) und eIF4G (C). Untersucht wurden wieder 100 Zellen pro Entwicklungsstadium. In der jeweils oberen Abbildung ist die Analyse der Gesamt-Zellextrakte zu erkennen, in der mittleren die durch m⁷GTP-Sepharose präzipitierten Anteile und in der unteren die Analyse des dazugehörigen Durchflusses.

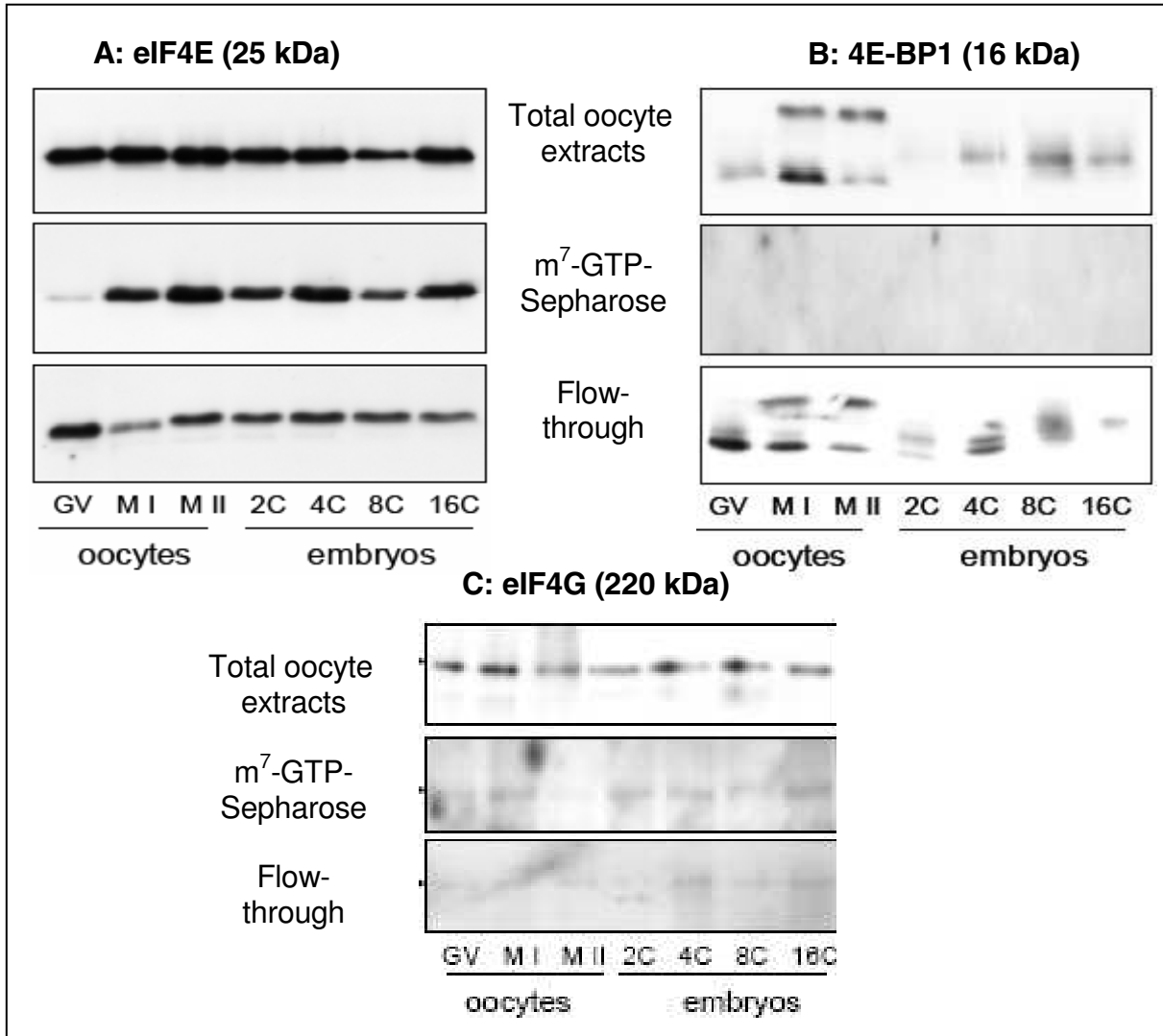


Abb. 27: Immunopräzipitation von eIF4E mit p-eIF4G:

Die Interaktion von eIF4E und phosphoryliertem eIF4G ist hier in der Endreifung und dem Übergang zum Zweizeller dargestellt. Zur Immunopräzipitation wurde dabei ein phospho-eIF4G- Antikörper von Cell Signaling verwendet.

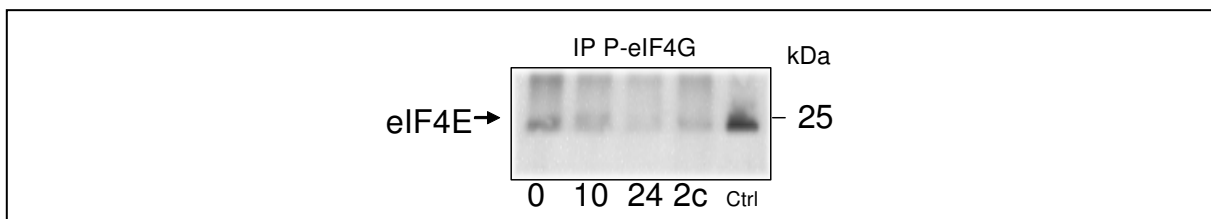
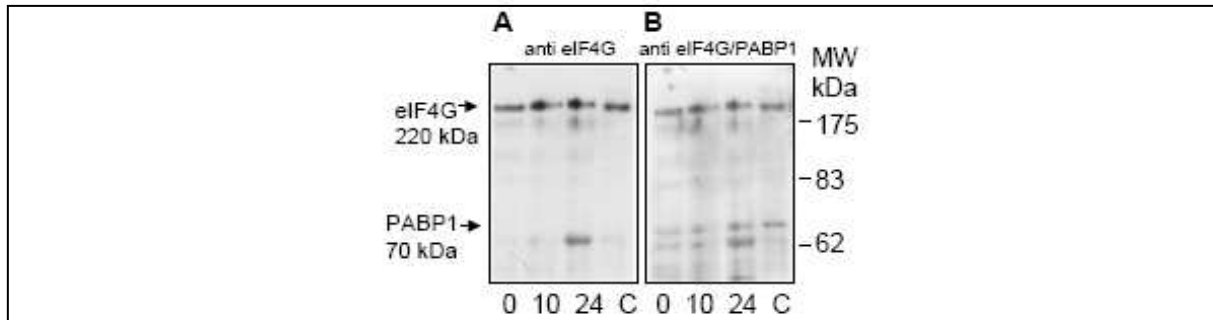


Abb. 28: eIF4G und PABP:

Die Interaktion zwischen eIF4G und PABP wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot unter Einsatz von eIF4G-Antikörper (Cell Signaling, A) und zusätzlichem PABP (Cell Signaling, B) untersucht.



Die Ergebnisse aus Abb. 26 C zeigen, dass das Gerüstprotein eIF4G vor allem im MII-Stadium kaum mit dem Cap verbunden war, was auf eine sehr geringe Bildung des eIF4F-Komplexes hinweist. Dies bestätigen auch die Ergebnisse aus Abb. 21, die zeigen, dass eIF4G im M II Stadium abgebaut wurde. Eine geringe Zunahme fand sich im Embryo.

Untermauert werden diese Ergebnisse auch durch die Resultate der Bindungsanalyse von eIF4G mit eIF4E, die in Abb. 27 dargestellt sind. Die Immunopräzipitation zeigt, dass beide Partner vor allem im GV-Stadium noch aneinander banden, dies dann bis zur MII-Phase immer mehr abnahm und im Embryo wieder geringgradig anstieg. Dies entsprach dem Anstieg der eIF4G-Phosphorylierung und erfolgte gegensätzlich zum Vorkommen von 4E-BP1. Außerdem konnte die Helikase eIF4A nicht im m^7 -GTP-Sepharosepräzipitat nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Wahrscheinlich hat dies technische Gründe. Da eIF4A über zwei Partner, nämlich über eIF4E und eIF4G mit der Cap-Struktur interagiert, ist anzunehmen, dass bei der m^7 -GTP-Sepharosepräzipitation ein artifizieller „run off“ von eIF4A aus dem Komplex zu verzeichnen war und damit dessen Nachweisgrenze unterschritten wurde (Siemer et al, 2009). Allerdings konnte eIF4A in eIF4E-Immunopräzipitaten nachgewiesen werden. Auf diese Ergebnisse wird im Abschnitt 6.2.4 eingegangen.

5.3.3 Analyse der 3'-bindenden Faktoren PABP, Paip 1 und 2

Die Expression des Poly(A)-Bindungsproteins stieg während der Eizellreifung zunächst an, fiel dann aber beim Embryo wieder auf das Niveau des GV-Stadiums (Abb. 29). Interessant ist ein Banden-Shift in den Phasen MI und MII, der auf posttranslatorische Modifikationen des PABPs schließen lässt. Die Poly(A)-Bindungsproteine PABP 1 und 3 wurden während der Eizellreifung stark exprimiert (Abb. 30 A und E). Zu Beginn der Embryonalentwicklung sank die Expressionsrate deutlich, blieb dann aber ebenfalls konstant auf dem niedrigeren Niveau. Das PABP-interacting Protein 1 (Paip 1), stieg leicht in seiner Expression vom GV- zum MII-Stadium und blieb auch im Verlauf der Embryonalentwicklung auf gleicher Höhe (Abb. 30 B). Das translationsreprimierende Paip 2 hingegen trat nur während der Eizellreifung auf und war im Embryo nicht nachweisbar (Abb. 30 C). Die in Abb. 30 und 31

Abb. 29: Das Poly(A)-Bindungsprotein:

Das Poly(A)-Bindungsprotein PABP1 wurde hier mittels SDS-PAGE und Western Blot in den Phasen der Endreifung und im Zweizeller mit PABP1-Antikörper von Cell Signaling analysiert.

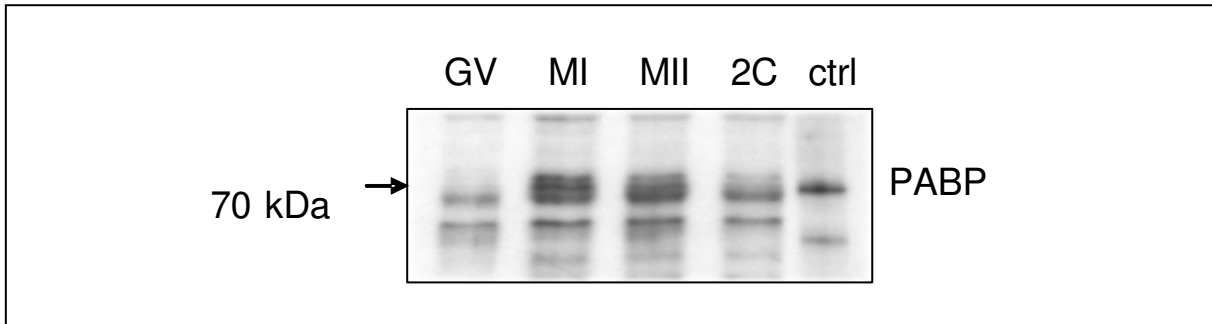


Abb. 30: Analyse der 3'-bindenden Faktoren PABP 1, 3, Paip 1, 2:

Die 3'-bindenden Proteine wurden durch SDS-PAGE und Western Blot zu je 100 Eizellen bzw. Embryonen pro Gruppe analysiert (zu E: n=3; p=0,05).

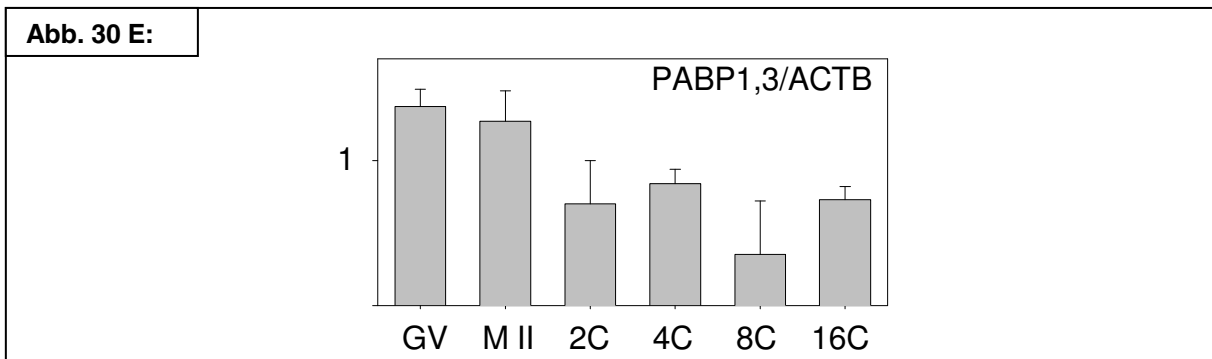
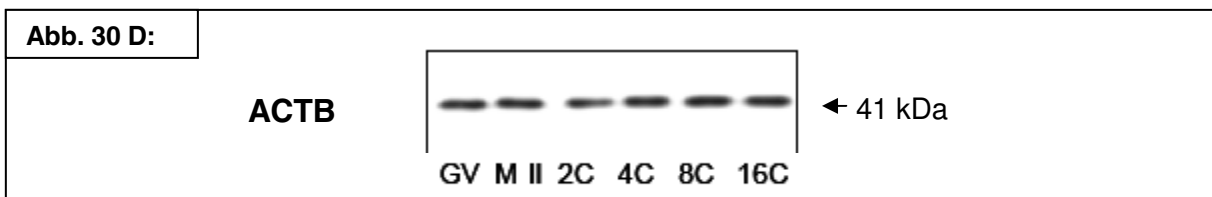
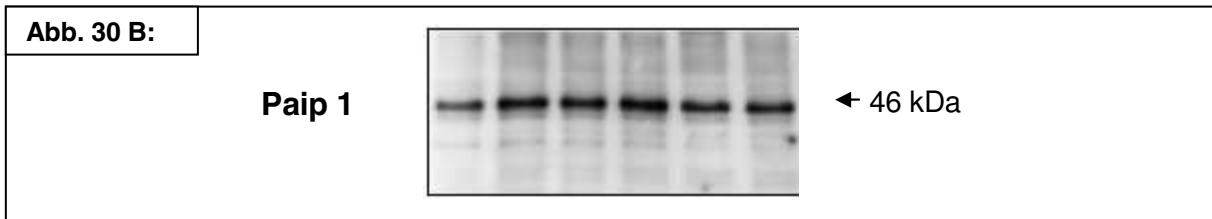
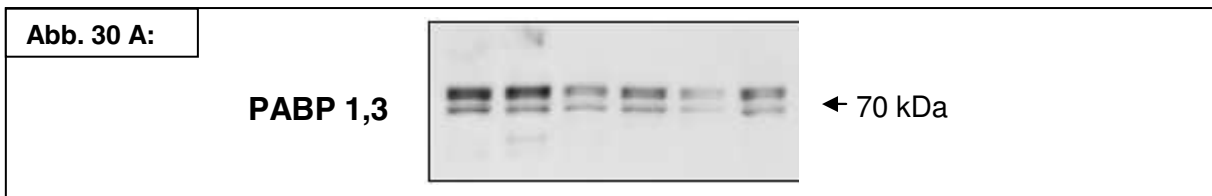
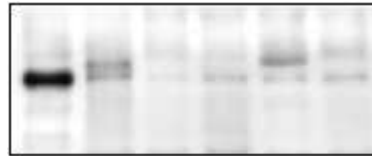


Abb. 31: Analyse der 3'-bindenden Faktoren CPEB, Maskin-ähnliches Protein und TACC3:

Je 100 Eizellen bzw. Embryonen pro Zeitpunkt wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot auf das Vorkommen von CPEB (A), dem Mask-Like Protein (B), TACC3 (C) und ACTB (D) analysiert. Dabei dient Actin als Beladungskontrolle, durch die die Ergebnisse von CPEB und Mask-Like Protein normiert werden (E+F: n=3; p=0,05)

Abb. 31 A:

CPEB 1



← 60 kDa

Abb. 31 B:

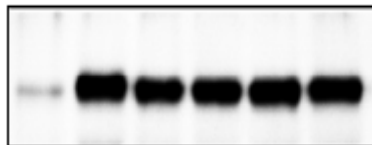
MASK like



← 55 kDa

Abb. 31 C:

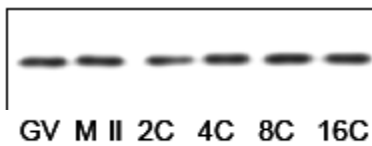
TACC3



← 95 kDa

Abb. 31 D:

ACTB



← 41 kDa

GV M II 2C 4C 8C 16C

Abb. 31 E:

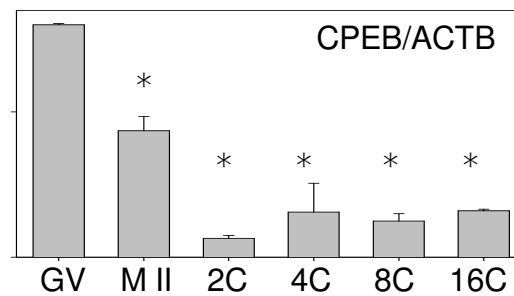
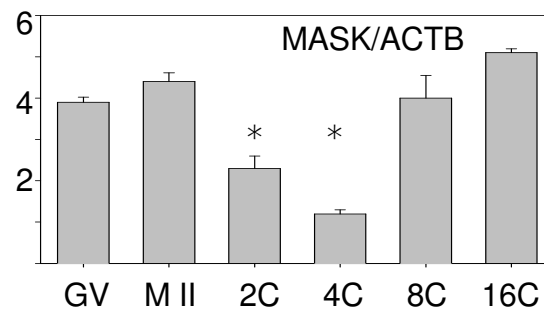


Abb. 31 F:



gezeigten Blots wurden mittels ACTB hinsichtlich konstanter Gelbeladung kontrolliert. Das Konzentrationsverhältnis der unterschiedlich exprimierten Proteine ist in Säulendiagrammen veranschaulicht.

5.3.4 Analyse der 3´-bindenden Faktoren CPEB und des Maskin-Like-Protein

CPEB (Abb. 31 A und E), das an die 3´ UTR der mRNA bindet, wurde im GV-Stadium maximal exprimiert, dies verringerte sich bis zur MII-Phase sehr deutlich und beim Zweizeller war CPEB nur noch in Spuren nachweisbar. Im Embryo stieg die Konzentration von CPEB nur sehr geringfügig. Dabei auftretende doppelte Banden wiesen auf posttranslatorische Modifikationen, evtl. auf Phosphorylierungen, hin. Der Actin-Blot diente wieder zur Kontrolle der gleichmäßigen Gelbeladung.

Bei Xenopus-Oozyten und Embryos konnte von Barnard et al. (2005) das 150 kDa große Protein Maskin nachgewiesen werden, das in seiner hypophosphorylierten Form an eIF4E bindet.

Bei den Rindereizellen erkannte der Maskin-Antikörper hingegen ein 55 kDa großes Protein, das im Folgenden als „Maskin-Like-Protein“ bezeichnet wird (Abb. 31 B und F). Während der Eizellreifung kam es in sehr hoher, gegen MII noch etwas ansteigender Konzentration vor. Im Zwei- und Vierzellstadium sank die Expression deutlich ab und stieg dann bis zum Sechzehnzeller wieder auf das Niveau der GV-Phase. In der MII-Phase und dem Acht- und Sechzehnzellstadium traten multiple Banden auf. Diese ähneln denen, die von Barnard et al. 2005 bereits bei Xenopus als phosphorylierte Formen von Maskin identifiziert werden konnten. Das Xenopus-Maskin enthält eine Doppelwendel, die der für Proteine der TACC-Familie (transforming acidic coiled coil) namensgebenden Struktur ähnelt (Stebbins-Boaz et al., 1999). Um sicher zwischen beiden Proteinen zu unterscheiden, wurden die Proben ebenfalls auf das Vorkommen von TACC 3 untersucht (Abb. 31 C). Dieses trat jedoch bei 95 kDa und mit völlig anderem Expressionsmuster auf, so dass es sicher nicht mit dem Maskin-Like-Protein identisch ist.

5.3.5 Untersuchungen der Bindungseigenschaften des Maskin-Like-Proteins

Um weitere Erkenntnisse über dieses neue Maskin-Like-Protein und seine Fähigkeit, die Translation zu beeinflussen, zu gewinnen, wurden seine Bindungseigenschaften untersucht. Da CPEB während der Eizellreifung degradiert wird und dieses Protein während der Embryonalentwicklung nur in geringsten Spuren auftritt, ist der wichtigste potentielle Interaktionspartner des Maskin-Like-Proteins das Cap-Bindungsprotein eIF4E. Die Ergebnisse des Western Blots für GV-, MII- und Zweizellstadium zeigen die gleichen Ergebnisse wie vorangegangene Experimente. Darüber hinaus konnte ein ähnliches Protein in Hepatozyten (HC) nachgewiesen werden (Abb. 32 A)

Abb. 32: Analyse der Bindungseigenschaften des Maskin-Like-Proteins

Für jede Gruppe wurden 100 Eizellen bzw. Embryonen untersucht.

A: Im Western Blot wurden Eizellen im GV und MII-Stadium, Zweizeller und Rinder-Hepatozyten (HC) analysiert; Negativkontrolle (NC) ohne primärem Antikörper.

B: Bei der Far Western Analyse wurde die Membran mit einem rekombinanten, kompletten, N-terminal GST-markierten eIF4E inkubiert. Gebundenes eIF4E wurde mit einem anti-GST-HRP-Antikörper sichtbar gemacht. Die Negativkontrolle wurde nicht mit GST-markiertem eIF4E inkubiert.

C: Bei der eIF4E-Immunopräzipitation wurden die Proben mit auf Agarose immobilisiertem Anti-eIF4E-Antikörper inkubiert und die gebundenen Proteine mit Anti-Maskin, bzw. Anti-eIF4E-Antikörpern sichtbar gemacht. Negativkontrollen ohne primäre Antikörper gegen Maskin oder eIF4E.

D: Die durch m7-GTP-Sepharose-Präzipitation erhaltene gebundene Fraktion (b) und der zugehörige Durchfluss (s) wurden gleichzeitig auf eIF4E und Maskin like Protein beprobt. Untersucht wurden GV-, MII- und 2C-Stadien.

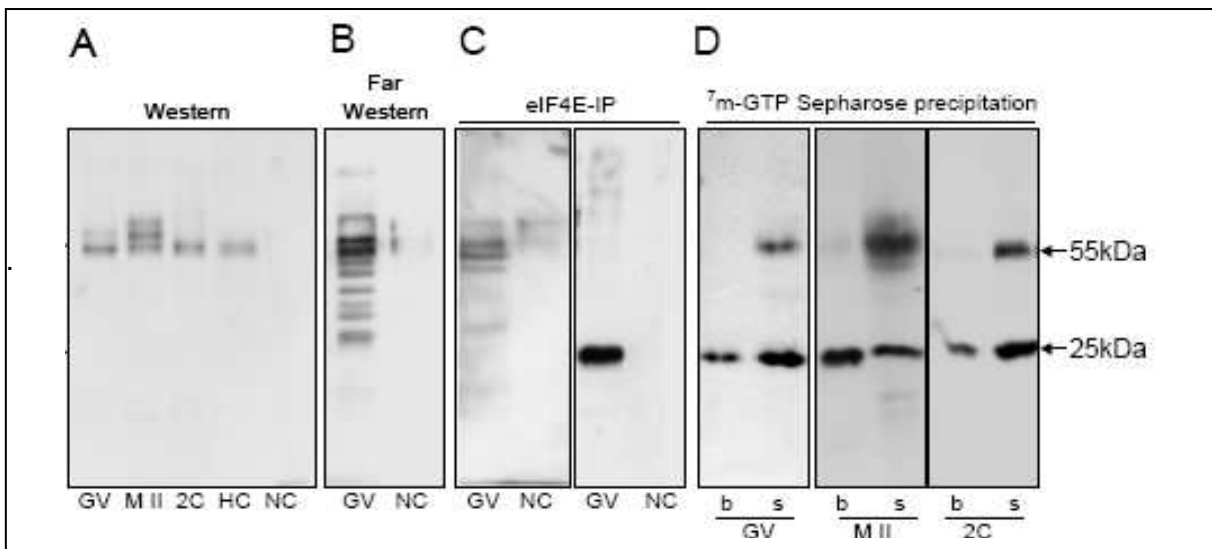


Abb. 32 E+F: eIF4E-Agarose-Präzipitation auf Maskin-like-Protein (E) und eIF4A (F):

In der jeweils oberen Abbildung wird das Auftreten von Maskin like Protein bzw. eIF4A im Gesamteizellextrakt vom GV-Stadium bis zum Sechzehnzeller dargestellt. Die mittlere Abbildung zeigt die an eIF4E gebundenen Fraktionen und die untere Abbildung den dazugehörigen Durchfluss.

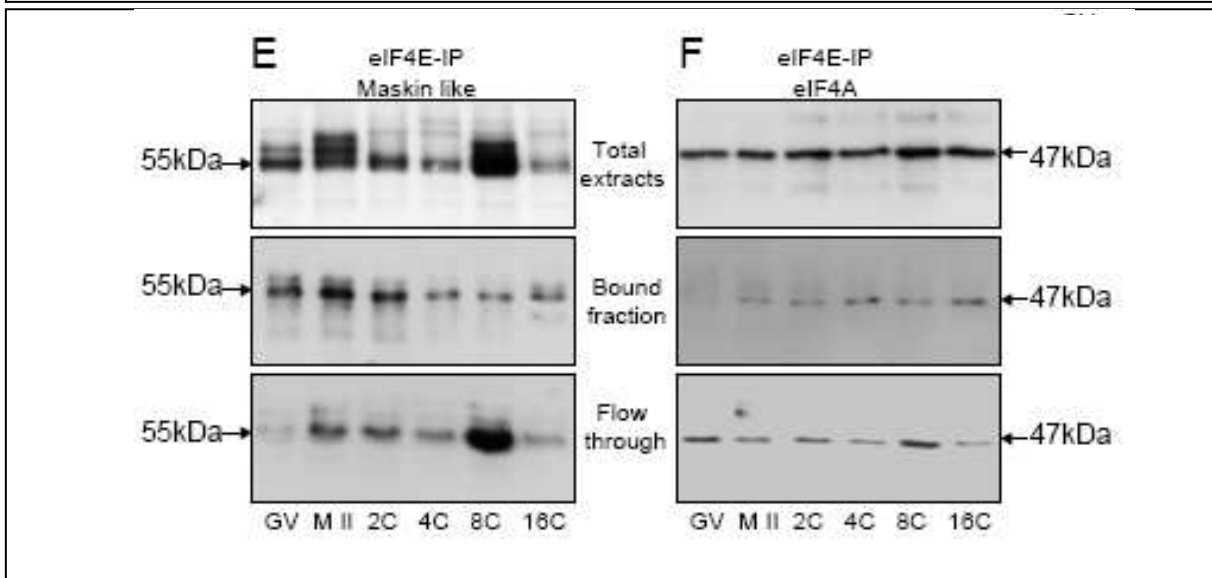
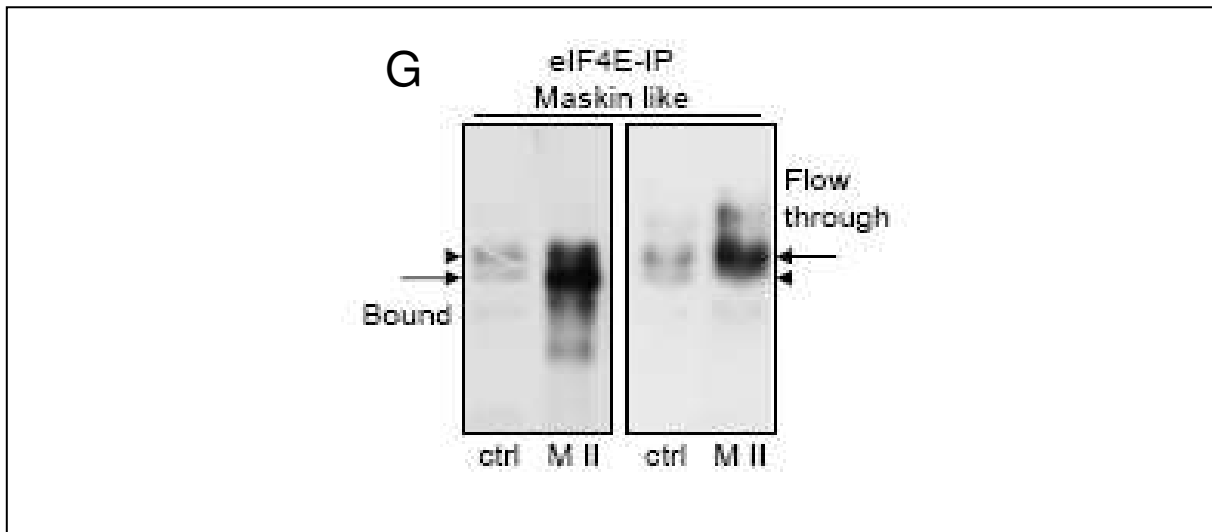


Abb. 32 G: Detaillierte Analyse der Bindung des Maskin-Like-Proteins an eIF4E:
Gegenübergestellt sind hier die durch bei eIF4E-Agarosepräzipitation bei MII-Eizellen für Maskin ermittelte gebundene Fraktion und der entsprechende Durchfluss. Als Kontrolle dienten nicht präzipitierte MII-Gruppen.



Die Far Western Analyse (Abb. 32 B) zeigte eine starke eIF4E-Bindung im Bereich des Maskin-Like-Proteins bei 55 kDa. Außerdem stellten sich noch einige schwächere Banden dar, die ebenfalls potentielle eIF4E-Bindungsproteine markieren.

Im Rahmen der m^7 -GTP-Sephrose-Präzipitation (Abb. 32 B) konnte allerdings in keiner Phase das Maskin-Like-Protein zusammen mit eIF4E in der gebundenen Fraktion nachgewiesen werden. In GV-, MII- und Zweizellstadium war das Protein nur im Durchfluss zu finden.

Zusätzlich wurde eIF4E mittels eines immobilisierten Anti-eIF4E-Antikörpers immunpräzipitiert und die Blots auf das Maskin-Like-Protein (Abb. 32 C, linke Abb.) und eIF4E (Abb. 32 C, rechte Abb.) untersucht. Diese Blots bestätigen die Coimmunopräzipitation des Maskin-Like-Proteins mit eIF4E und damit dessen Bindungsfähigkeit an das Cap-Bindungsprotein.

Bei der m^7 -GTP-Sephrose- Immunopräzipitation (Abb. 32D) konnte das Maskin-Like-Protein vom GV-Stadium bis zum Zweizeller immer nur mit eIF4E im Durchfluss, nie in der an die Cap-Struktur bindenden Fraktion nachgewiesen werden. Dies könnte ein Hinweis sein, dass das Maskin-Like- Protein eIF4E von der Capstruktur separiert.

Die Immunopräzipitation durch immobilisiertes eIF4E bestätigt die vorangegangenen Ergebnisse zu den Bindungseigenschaften des Maskin-Like-Proteins vom GV- bis zum Zweizellstadium und vervollständigen diese bis zum Sechszehnzeller. Vor allem in der vergleichenden Betrachtung von Beginn und Abschluss der Endreifung zeigte sich die regulatorische Funktion des Maskin-Like-Proteins.

Im GV-Stadium band ein großer Anteil des Maskin-Like-Proteins an eIF4E und nur wenig fand sich in der ungebundenen Fraktion. Dies ist wahrscheinlich eine wichtige Ursache für die schwache Bindung von eIF4E an die m^7 -GTP-Sephrose in diesem Stadium (Abb. 26 A).

Demgegenüber fand sich in der MII-Phase ein deutlich größerer Anteil eIF4E, das die Capstruktur band (Abb. 26 A). Entsprechend war auch der Anteil an Maskin-Like-Protein im Durchfluss der eIF4E-Immunopräzipitation deutlich größer. Daraus lässt sich schließen, dass im GV-Stadium Maskin an eIF4E bindet und damit dessen Bindung an das Cap verhindert. Im MII-Stadium lässt diese Bindung nach und eIF4E wird frei für die Interaktion mit dem Cap. Die eIF4E-Immunopräzipitation wurde auch zur Analyse der Interaktionen von eIF4A herangezogen (Abb. 32 F). Im GV-Stadium liegt es nur in geringen Anteilen an eIF4E gebunden vor, so dass es nicht zur Bildung des eIF4F-Komplexes kommen kann. Diese Bindung an eIF4E steigt bis zur MII-Phase an, immer weniger konnte in der nicht präzipitierten Fraktion nachgewiesen werden. Um zu klären, was die Interaktion des Maskin-Like-Proteins mit dem Cap-Bindungsprotein steuert, wurden gebundenes und ungebundenes Maskin-Like-Protein genauer miteinander verglichen (Abb. 32 G). Dabei fiel auf, dass die gebundene Form höhere elektrophoretische Mobilität zeigte. Dies lässt auf eine Hypophosphorylierung dieser Form schließen. Im Gegensatz dazu band die hyperphosphorylierte Form deutlich schlechter an eIF4E, weshalb sie vor allem im Durchfluss zu finden war. Auch im Embryo fanden sich diese Veränderungen.

Die Bindung des Maskin-Like-Proteins an CPEB konnte nicht nachgewiesen werden.

5.3.6 Analyse der Proteinkinaseaktivität während der Eizellreifung und der frühen Embryonalentwicklung

Wichtiges Element bei der Steuerung der Translationsinitiation sind Kinasen, die für die posttranslatorische Modifikation der beteiligten Proteine verantwortlich sind. Die übergeordneten Kinasesysteme sollen hier in einem Überblick betrachtet werden.

5.3.6.1 Überblick über die Proteinkinaseaktivität der wichtigsten beteiligten Kinasen bis zum Sechszellstadium

Die Aktivität der wichtigsten beteiligten Kinasen, in diesem Fall PKA, PKB, PKC, CDKs, ATM/ATR und MAPK wurde mittels Substratphosphorylierung dargestellt.

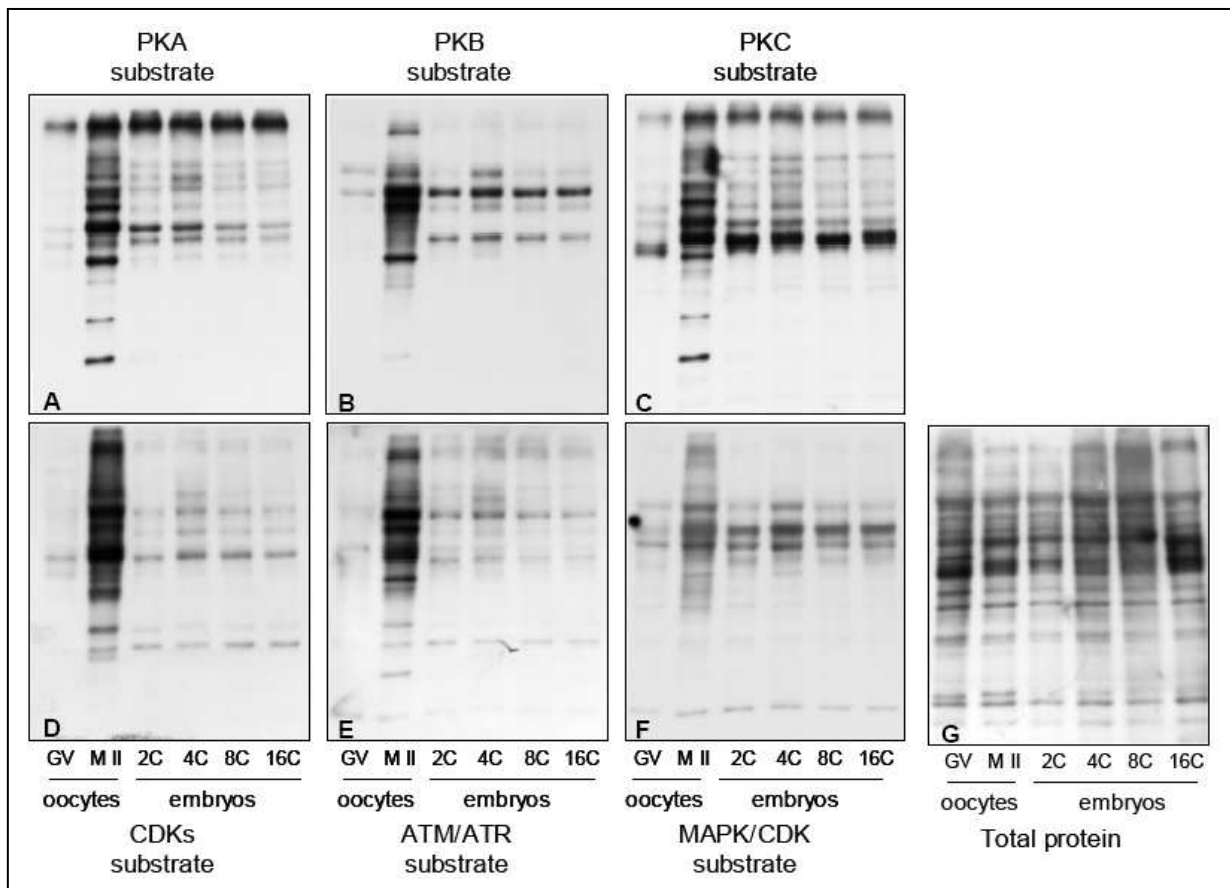
Die Ergebnisse sind in Abb. 33 dargestellt.

Im GV Stadium trat die geringste Phosphorylierung der Substrate auf. Hingegen fand sich das Phosphorylierungsmaximum bei allen Kinasesubstraten im MII-Stadium. Bei den Embryonalstadien fanden sich konstant geringere Kinaseaktivitäten. Wie auch in Abb. 33 G gut zu erkennen, unterschieden sich die Proteinmuster während der Eizellreifung kaum (Bhojwani et al., 2006). Einzig eine leichte Reduktion in Zweizellstadium und ein geringer Anstieg im Verlauf der Embryonalentwicklung fielen auf.

Abb. 33: Analyse der Proteinkinaseaktivität während Eizellreifung und früher Embryonalentwicklung:

A-F: PKA, PKB, PKC, CDKs, ATM/ATR und MAPK/CDK wurden hinsichtlich ihrer Aktivität vom GV-Stadium bis zum Sechszehnzeller in Gruppen zu je 100 Eizellen bzw. Embryonen untersucht. Hierzu wurden Western Blots mit Antikörpern gegen die phosphorylierten Formen spezifischer Zielsequenzen der einzelnen Kinasen beschickt und die Banden mittels ECL-Detektion sichtbar gemacht.

G: Das Gesamtproteinmuster von Eizellen und Embryonen wird durch Silberfärbung ermittelt.



5.3.6.2 Genaue Betrachtung der für entscheidende Modifikationen verantwortlichen

Kinasen im Verlauf der Eizellreifung und des Übergangs zum Embryo

Vor allem die Kinasen, die für Phosphorylierungen der wichtigsten translationsregulatorisch aktiven Proteine verantwortlich sind, sollen im Folgenden noch genauer betrachtet werden.

Abb. 34 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung der beiden MAP-Kinasen ERK 1 und 2. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass die phosphorylierten Kinasen bis zum MII-Stadium zwar deutlich anstiegen, im zweizelligen Embryo aber komplett verschwanden. Sie entsprachen damit dem Phosphorylierungsmuster von eIF4E.

Abb. 34: MAP-Kinasen und ihre Phosphorylierung während der Eizellreifung und dem Übergang zum Embryo:

Im Verlauf der Eizellreifung und des Übergangs zum zweizelligen Embryo wurde das Auftreten und die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK 1 und 2 untersucht. Jede Gruppe enthielt hierbei 20 Zellen.

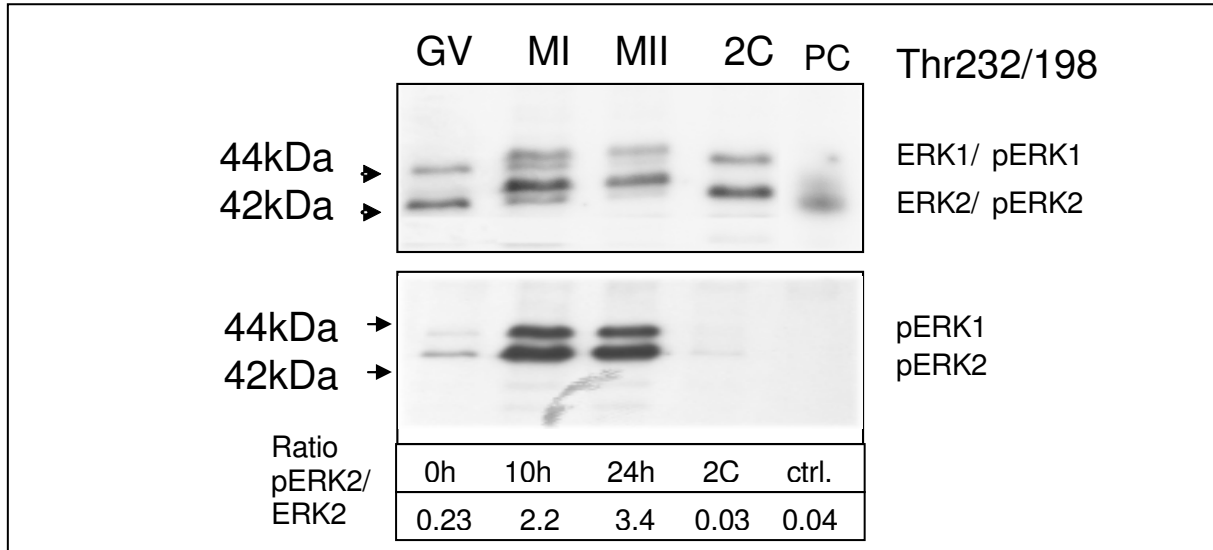
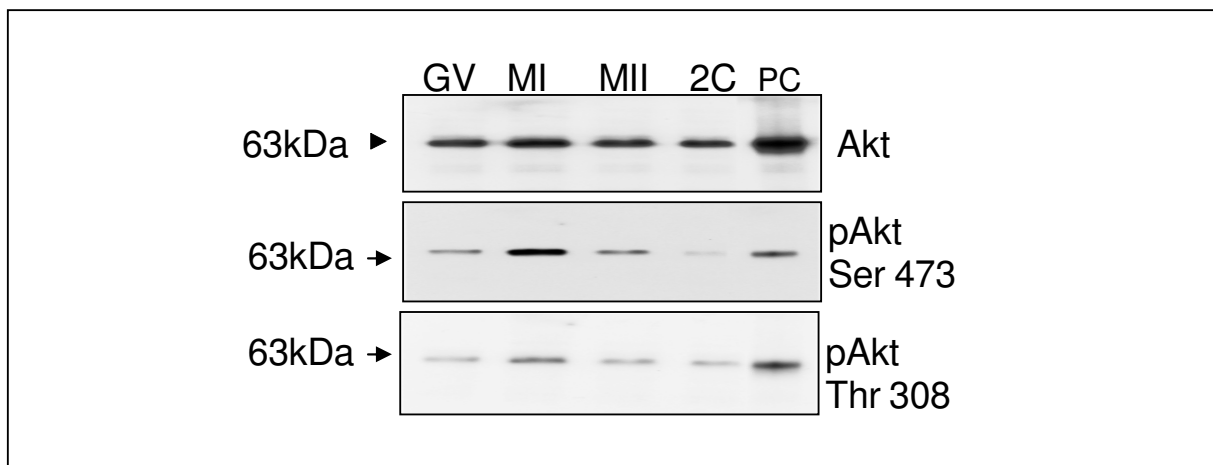


Abb. 35: Akt und ihre Phosphorylierungsstellen während der Eizellreifung und dem Übergang zum Embryo:

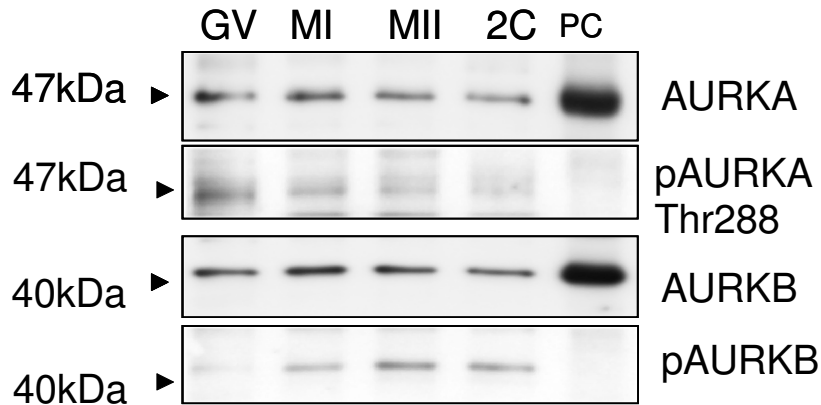
Die Kinase Akt wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot hinsichtlich ihres Auftretens und der Besetzung ihrer verschiedenen Phosphorylierungsstellen vom GV-Stadium bis zum Übergang zum Embryo untersucht.



Auch diese Kinase blieb in ihrer Expression während des gesamten Reifungs- und Entwicklungsprozesses unverändert (Abb. 35). Die Phosphorylierung an beiden Phosphorylierungsstellen Ser 473 und Thr 308 trat während des GV- und MII-Stadiums geringgradig auf, fand ihr Maximum in der MI-Phase und nahm im Zweizeller sehr stark ab. Die beiden Kinasen Aurora A und B traten während der Reifung in unveränderter Menge auf (Abb. 36). Die für die Phosphorylierung von CPEB zuständige Aurora A nahm in ihrem Phosphorylierungsstatus bis zum Zweizellstadium deutlich ab, während die Aurora B-Phosphorylierung stark zunahm.

Abb. 36: Aurora A und B und ihre Phosphorylierung:

Die Aurora-Kinasen A und B wurden hinsichtlich Vorkommen und Phosphorylierung mittels SDS-PAGE und Western Blot in Gruppen von jeweils 100 Stadien vom GV- bis zum Zweizellstadium analysiert.

**Tab. 6: Übersicht über die beteiligten Kinasen:**

Die Ergebnisse der oben gezeigten Abbildungen sind in folgender Tabelle zusammengefasst, aufsteigend von „-“ nach „++++“

		0 h / GV	10h / MI	24h / MII	2C
ERK1/2	Expr	++	++	++	++
	phos.	+	++	++++	-
AKT	Expr	+	+	+	+
	phos	+	++++	+	-
Aurora A/B	ExprA/B	+	+	+	+
	phos A	++++	++	+	-
	phos B	-	++	+++	+++

Zusammenfassend ließ sich bei den Kinasen beobachten, dass sie alle in ihrer Expression gleich blieben und sich nur in ihren Phosphorylierungsmaxima unterschieden. Es fiel ebenfalls auf, dass sie alle beim Übergang zum Embryo dephosphoryliert wurden (Tab. 6).

6. Diskussion:

Die Analyse der Vorgänge am Übergang der Eizelle zum Embryo ist Bestandteil vieler Forschungsarbeiten. Dennoch sind sie noch lange nicht vollständig entschlüsselt. Vor allem die Genexpression ist hierbei von Interesse, da sich die zuständigen Regulationsvorgänge am besten untersuchen lassen, an dem Transkription und Translation völlig abgeschaltet werden und deren Initiation von Neuem beginnt. Dies ist auch ein wichtiger Beitrag zur Untersuchung der zytoplasmatischen Reifung, um dem Problem asynchroner Kern- und Zytoplasmareifung zu begegnen.

Am Ende der meiotischen Endreifung kumulieren sich in Eizellen polyadenylierte, aber translatorisch inaktive mRNAs, die dann als Vorrat dem frühen Embryo vor Beginn der eigenen Transkription spezifisch aktivierbar zur Verfügung stehen (Abb. 1). Da jedoch schon früh die Transkription abgeschaltet ist, ist eine Kontrolle dieser Genexpression hier nur noch auf der Ebene der Translation und posttranslatorischer Modifikationen der beteiligten Proteine möglich. Die zugrunde liegenden Mechanismen sollten in unseren Untersuchungen weiter entschlüsselt werden.

Das Closed Loop Modell von Mangus et al. (2003) beschreibt die Aktivierung der Translation durch verschiedene mit dem 5'- und 3'- Ende der mRNA interagierende Proteine, die einen Ringschluss herbeiführen, der notwendige Voraussetzung für die Translationsinitiation ist (Abb. 4). In Anlehnung daran wurden ausgewählte, 3'- und 5'- bindende Proteine und deren Interaktionspartner hinsichtlich ihres Auftretens und posttranslationaler Modifikationen während der verschiedenen Phasen der Eizellreifung und der frühen Embryonalentwicklung betrachtet. So wurden erstmals als 5'- agierende Faktoren eIF4E, eIF4A, eIF4G und 4E-BP1, als 3'- agierende Proteine PABP 1, 3, Paip 1, 2, CPEB1 und Maskin und die jeweils für deren Kontrolle verantwortlichen Kinasen im Verlauf von der bovinen Eizelle im GV-Stadium zum sechzehnzelligen Rinderembryo untersucht.

Das Sechzehnzellstadium wurde ausgewählt, da hier nach Misirlioglu et al. (2006) beim Rind das embryonale Genom vollständig aktiviert ist.

6.1 Entwicklungen im Zygotenstadium

Die Betrachtung des Stadiums der einzelligen Zygote ist mit einigen Problemen verbunden. Zwar findet auch hier schon eine geringe Aktivierung des embryonalen Genoms (EGA) statt, jedoch erfolgt der größte Teil der Genexpression noch über maternale mRNA. Auf Grund dieser parallel ablaufenden Mechanismen und der sehr kleinen Mengen gestaltet sich die differenzierte Analyse dieses Stadiums noch als schwierig. Darüber hinaus spielt der Zeitfaktor der Befruchtung hier eine immens wichtige Rolle, und es müssen aus technischen Gründen für

weitere Untersuchungen gleichzeitig sehr viele (ca. 100 pro Probe) Zygoten gleichen Entwicklungsstadiums gewonnen werden. Jedoch ist es bei der in unseren Versuchen verwendeten Methode der IVF nicht praktikabel, dass alle Eizellen gleichzeitig befruchtet werden. Andere Verfahren wie ICSI, die einen definierten Befruchtungszeitpunkt haben, erlauben nicht die gleichzeitige Produktion der benötigten Menge an Embryonen.

Um dieses Problem der nicht ganz zeitgleichen Befruchtung und Embryonalentwicklung zumindest ab dem Zweizeller zu beheben, wurden die Embryonen maximal eine Stunde nach ihrer Teilung entnommen. Ebenso wurde auch bei den weiteren Teilungsstadien verfahren, um gleichmäßig entwickelte Proben zu erhalten.

Ein Lösungsansatz hierfür wäre die parthenogenetische Aktivierung von Eizellen, die es erlaubt, die Teilung vieler Oozyten gleichzeitig zu starten. Allerdings ist es hier nicht möglich, vergleichende Untersuchungen bis zum 16-Zeller anzustellen, da nur wenige dieses Stadium erreichen. Zudem ist zu prüfen, ob in diesem System die Regulationsmechanismen genauso ablaufen wie in einem durch Befruchtung erzeugten, lebensfähigen Embryo.

Susor et al. untersuchten 2008 das Vorkommen und die Phosphorylierung der Proteine des eIF4F-Komplexes, des Repressors 4E-BP1 und die zugehörige MAP-Kinasekaskade über ERK1/2 und Mnk1 bei parthenogenetisch aktivierten porcinen Zygoten von den ersten Stunden bis zum Vierzeller (48 Stunden). Bei diesen Untersuchungen wurden eIF4E und 4E-BP1 in den ersten acht Stunden nach der Aktivierung dephosphoryliert. Entsprechend sank die Aktivität von ERK1 und 2 und folglich auch die der Mnk1, die für die Phosphorylierung von eIF4E an Ser 209 verantwortlich ist. Obwohl bis zum Zweizellstadium beträchtliche Mengen an eIF4F nachgewiesen werden konnten, bildeten sich nach 9 bis 15 Stunden nur noch wenige aktive Komplexe. Susor et al. vermuten aber darin eine Grundvoraussetzung für die Translation einer kleinen Gruppe von mRNAs, während die Gesamtsyntheserate in den Zygoten von 12 bis 48 Stunden nach der Aktivierung deutlich abnimmt. Es ist wahrscheinlich, dass diese mRNAs die Grundausrüstung für erste embryonale Translations- und Transkriptionsschritte darstellen.

6.2 Regulationsmechanismen durch 5'-UTR interagierende Proteine

Die von Susor et al. ausgewählten Proteine und weitere mit dem 5'-Ende und dem 3'-Ende der mRNA interagierende Faktoren wurden in dieser Arbeit bei Eizellen und in vitro befruchteten Embryonen bis zum Sechzehnzellstadium untersucht. Dabei konnten ebenfalls deutliche Unterschiede bei Vorkommen und Phosphorylierung der einzelnen Proteine während der verschiedenen Phasen der Eizellreifung nachgewiesen werden. Daraus ergeben sich verschiedene Möglichkeiten der Translationsregulation.

6.2.1 eIF4E kontrolliert die Bindung des Initiationskomplexes an die mRNA

Eine zentrale Rolle spielt dabei sicherlich das Cap-Bindungsprotein eIF4E, das ebenso wie in somatischen Zellen auch bei Eizellen und Embryonen essentiell für die cap-abhängige Translation ist (Sonenberg und Gingras, 1998). Es ist zugleich Bestandteil und Ansatzpunkt vieler verschiedener, vom 5'- und auch vom 3'-Ende der mRNA ausgehender Kontrollmechanismen.

Zwar wurde es vom GV-Stadium bis zum Sechszehnzeller durchgehend gleich bleibend exprimiert (Abb. 19/20) und kontrolliert somit nicht durch seine bloße Anwesenheit die Translationsinitiation, doch veränderte sich sein Bindungsverhalten an das 5'-Ende der mRNA in den verschiedenen Stadien. Während noch im GV-Stadium in der m⁷GTP-Sepharose-Präzipitation wenig eIF4E an das Cap band und viel im Durchfluss zu finden war, kehrt sich dies ab der MI-Phase um. Diese erhöhte Cap-Bindung blieb auch beim Embryo konstant (Abb. 26 A). Ursächlich hierfür können verschiedene Mechanismen sein:

EIF4E ist ein Phosphoprotein, das auf eine Vielzahl verschiedener Stimuli wie Zytokine oder Wachstumsfaktoren (Proud et al., 1992; Morley et al., 1993) mit der Phosphorylierung an Ser 209 reagiert. Übereinstimmend mit den Untersuchungen von Ellederova et al. 2006 bei Schweineeizellen konnte auch in dieser Arbeit beim Rind gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von eIF4E im Verlauf der Eizellreifung anstieg, in der MII-Phase ein Maximum hatte und beim Embryo wieder fiel (Abb. 20). Dies weist eigentlich auf eine gesteigerte Bildung des eIF4F-Komplexes hin (Wang et al., 1998).

Entgegen der daraus möglichen Schlussfolgerung und auch der von Minich et al. noch 1994 propagierten Meinung erhöht jedoch die Phosphorylierung von eIF4E nicht die Affinität des Proteins zur Cap-Struktur (Scheper et al., 2002; Kap. 2.6.2.2).

Eine genauere Betrachtung der Aktivierungskaskade ist notwendig. Die verantwortliche Kinase ist hier die MAPK, die in Form von ERK 1 und 2 ebenfalls in Rindereizellen nachgewiesen werden konnte. Analog zur eIF4E-Phosphorylierung stieg die Phosphorylierung der MAPK bis zur MII-Phase an und fiel dann im Zweizeller ab (Abb. 34). Deren Substrat sind die MAPK-Integrating Kinasen Mnk1 und 2 (Waskiewicz et al., 1997, Ellederova et al., 2008). Die Mnks haben allerdings nicht direkt an eIF4E, sondern nur an eIF4G eine Bindungsstelle. Erst wenn sich also der Translationsinitiationskomplex am Cap gebildet hat und die Translation in Gang gekommen ist, wird eIF4E phosphoryliert und löst sich vom Cap. Dies hat den Sinn, dass so die Bestandteile des Translationsinitiationskomplexes für neue Initiationen bereitstehen und die Cap-Struktur für neue Bindungen frei wird, während die zuerst gestartete Elongation der mRNA weiter voranschreitet. So wird generell die Translationsrate erhöht (Scheper et al., 2002).

Bis zur MI-Phase stieg die Translationsrate analog zur Phosphorylierung von eIF4E und ERK 1 und 2 an. Jedoch gerade in der MII-Phase, in der die Translation ähnlich dem GV-Stadium nur basales Niveau aufweist, erreichte die Phosphorylierung von eIF4E ihr Maximum (Abb. 34). Dies konnte von Tomek et al. (2002) und Ellederova et al. (2006) schon nachgewiesen und in dieser Arbeit bestätigt werden.

Entgegen bisheriger Thesen, dass mit steigender Phosphorylierung von eIF4E auch die Translation stimuliert wird (Scheper und Proud 2002), ist es wahrscheinlich, dass vor allem der Turnover der eIF4E-Phosphorylierung maximale Translationsraten erzielt. Nicht phosphoryliertes eIF4E hat eine höhere Cap-Affinität und bindet deshalb leichter an die mRNA. Wird es dort im eIF4F-Komplex phosphoryliert, löst es sich im Komplex vom Cap und gibt dieses für die Bindung eines nicht phosphorylierten eIF4E frei, während der Translationsinitiationskomplex den Scanning-Prozess vollzieht. Das gelöste p-eIF4E wird dephosphoryliert und kann an eine neue mRNA binden. Stark phosphoryliertes eIF4E, wie es im MII-Stadium vorliegt, weist eine niedrigere Cap-Affinität auf und behindert so ebenso wie fest gebundenes eIF4E die Translation. Nur durch die stetige Dynamik von eIF4E-Phosphorylierung und Dephosphorylierung wird die Translation auf das in der MI-Phase auftretende Maximum gesteigert. Jedoch kann dies nicht die einzige Ursache für die vollständige Translationsrepression gerade im MII-Stadium sein. Es ist davon auszugehen, dass hier noch andere Faktoren auf die Translation Einfluss nehmen.

6.2.2 Das Gerüstprotein eIF4G ist zentraler Vermittler des Ringschlusses

Da gerade die Bindung mit eIF4G die eIF4E-Phosphorylierung steuert, soll das Gerüstprotein in diesem Zusammenhang mit betrachtet werden. Außerdem spielt es eine sehr wichtige Rolle bei der Cap-Bindung von eIF4E, da seine Bindung dessen Capaffinität stark erhöht und damit in Verbindung mit PABP den Ringschluss fördert (Haghighat und Sonenberg, 1997).

Seine Expression blieb ähnlich der des Cap-Bindungsproteins gleich stark, sank nur im MII-Stadium ab, in dem es degradiert zu werden schien (Abb. 21). Seine Phosphorylierung sank hingegen während der Endreifung stark ab. Im Zweizeller stieg sie wieder leicht an (Abb. 21).

Eine Bindungsanalyse mittels Immunopräzipitation zeigte, dass im GV-Stadium beide Proteine noch sehr deutlich aneinander banden. Dies ließ zur MII-Phase nach und stieg wieder im Embryo (Abb. 27).

Unterstützt wird dieses Ergebnis durch die m^7 GTP-Sepharosepräzipitation mit p-eIF4G. Diese ergab, dass das Gerüstprotein eIF4G vor allem zum MII-Stadium kaum mit dem Cap verbunden war. Ursächlich hierfür ist die fehlende Bindung mit eIF4E, was auf eine fehlende Bildung des eIF4F-Komplexes hinweist (Abb. 26 C).

Unter Betrachtung dieser Ergebnisse erscheint es wahrscheinlich, dass die Phosphorylierung von eIF4G die Bindung mit eIF4E fördert.

eIF4G kann in vivo reaktiv auf Serumstimulation durch PI3K und FRAP-mTOR-Signalkaskaden phosphoryliert werden (Raught et al., 2000). In vitro ist dies auch infolge Phorbolster, Insulin, EGF und Okadasäure auch durch multipotente S6 Kinase (MS6K), PKC und Pak2 möglich. Bolster et al. beschreiben 2004, dass Leucin die Translationsinitiation im Rattenskelettmuskel durch eIF4G-Phosphorylierung unabhängig von mTOR stimuliert. Die Phosphorylierung von 4G kann an einem großen Spektrum regulatorischer Ereignisse beteiligt sein, welcher Steuerung sie in Eizellen unterliegt, ist allerdings unklar.

Eine Zunahme der eIF4G-Phosphorylierung, eine vermehrte Bindung von eIF4G mit eIF4E und damit ein Wiederaufbau des eIF4F-Komplexes fanden sich ebenfalls im Zweizellstadium, was eine Grundvoraussetzung für die Wiederaufnahme der Translation ist.

Bemerkenswert ist auch, dass in der MII-Phase nach unseren Ergebnissen kaum Bindung zwischen eIF4E und 4G auftrat und deshalb keine eIF4F-Komplexe gebildet wurden, obwohl eIF4G und PABP in dieser Phase stark interagierten (Abb. 28). Dies scheint eine Ursache für die reprimierte Translation in dieser Phase sein. Ob dies allerdings nur durch die fehlende eIF4G-Phosphorylierung ausgelöst wird, ist fraglich.

Ein Lösungsansatz für diese Fragestellungen ergibt sich durch die Entdeckung des Maskin-Like-Protein im Verlauf dieser Forschungsarbeit, auf das später noch im Detail eingegangen werden soll (Kap. 6.3.5).

6.2.3 Das unspezifische Repressorprotein 4E-BP1 wird am Übergang der Eizelle zum Embryo inaktiviert

Ein weiteres Protein mit dem Potential der Translationsregulation ist das aus somatischen Zellen bekannte potente Repressorprotein 4E-BP1 (Pause et al., 1994). Eine wichtige Aufgabe von 4E-BP1 ist sein Anteil an der Translationsrepression in der Mitosephase des Zellzyklus (Groisman et al., 2002).

Durch die Bindung an eIF4E in seiner hypophosphorylierten Form verstärkt es dessen Affinität zum Cap und verhindert damit in somatischen Zellen sehr effektiv die Interaktion mit anderen Initiationsfaktoren und die Translation der mRNA. Die Phosphorylierung erfolgt hierarchisch (Gingras et al., 2001). Die Stellen Thr 37 und Thr 46 unterliegen der Kontrolle von FRAP/mTOR (Brunn et al., 1997), das zwar nicht direkt Einfluss auf die Phosphorylierung von 4E-BP1 nimmt, aber erst die Grundvoraussetzung dafür schafft. Erst die Serin-Threoninkinase Akt verhindert mit der Phosphorylierung von Ser 65 und Thr 70 die Translationsrepression vollständig. Auch sie konnte in dieser Arbeit in Rindereizellen nachgewiesen werden. Ihre Konzentration blieb unverändert, ihre Phosphorylierung stieg in der MI-Phase auf ein

Maximum, verringerte sich schon bei MII-Eizellen und war im Embryo kaum mehr nachweisbar (Tomek und Smiljakovic, 2005, Abb. 35).

Auch 4E-BP1 wird in Schweine- und Rindereizellen exprimiert (Tomek et al., 2002b).

Sein Phosphorylierungsstatus stieg stark bis zu den MII-Eizellen (Bande γ ; Abb. 24, 25; Ellederova et al., 2006).

Gerade im GV-Stadium, in dem es hypophosphoryliert vorlag (Bande α ; Abb. 24, 25), wäre deshalb zu erwarten, dass es die Translation reprimiert, indem es an eIF4E bindet und dessen Cap-Affinität erhöht, da die Repression nur über Verhinderung der eIF4F-Komplexbildung erfolgt. Stattdessen zeigte die Immunopräzipitation, dass eIF4E gerade in der GV-Phase wenig an das Cap band.

Außerdem sollte mit zunehmender Phosphorylierung von 4E-BP1, also verminderter eIF4E-Bindung, die Translation ansteigen, stattdessen steigt sie nur bis zur MI-Phase und wird dann vollständig reprimiert. Damit wird deutlich, dass es gerade in der MII-Phase nicht für die Translationsrepression verantwortlich sein kann. Ähnliche Ergebnisse erbrachten Untersuchungen von Ellederova et al. (2006) bei Schweineeizellen.

Hierzu passen auch die Ergebnisse der Immunopräzipitation mit m^7 GTP-Sepharose, bei denen 4E-BP1 in keinem Stadium in der präzipitierten eIF4E-Fraktion nachgewiesen werden konnte, sondern wieder vollständig in der ungebundenen Fraktion zu finden war.

Daran beteiligt scheint das erst in unserer Forschung entdeckte Maskin-Like-Protein zu sein, das nachweislich auch an eIF4E band, aber in keiner Phase mit eIF4E in den Sepharose-Präzipitaten nachgewiesen werden konnte (Abb. 32). Demnach verhindert das Maskin-Like-Protein die Bindung von eIF4E am Cap und beeinflusst so die Translationsrepression in der Endreifung sehr viel mehr als 4E-BP1. Direkte Beweise hierfür liegen allerdings noch nicht vor. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass auch 4E-BP1 in dieser Phase an der Regulation beteiligt ist, wenn auch nur in einem deutlich schwächeren Ausmaß.

Auf das Maskin-Like-Protein soll später noch genauer eingegangen werden, zunächst sind die ebenfalls bemerkenswerten Veränderungen von 4E-BP1 im Embryo zu betrachten.

Auffällig in den Embryonalstadien ist vor allem, dass das sonst konstant auftretende Repressorprotein im Zweizeller fast vollständig degradiert wurde. Dies wurde auch beim Seeigel durch Salaün et al. (2003 / 2005) beschrieben, die vermuteten, dass diese Degradation für die Induktion der ersten mitotischen Teilung notwendig ist. Es ist anzunehmen, dass damit sichergestellt werden soll, dass eIF4E für die Wiederaufnahme der Translation im frühen Embryo zur Verfügung steht.

Die im Zweizeller noch gefundenen wenigen Banden wiesen mittlere elektrophoretische Mobilität auf (Abb. 24, 25; Bande β). Es scheint, dass hier nicht alle Phosphorylierungsstellen besetzt sind. Diesselben Banden traten in den folgenden Embryonalstadien in wesentlich höherer Dichte auf. Es wäre sinnvoll, noch zu prüfen, welche Phosphorylierungsstellen von

4E-BP1 in diesen Stadien besetzt sind. Unter Berücksichtigung der Aktivität von Akt, die ab der MII-Phase und im Embryo kaum noch nachweisbar war, ist es wahrscheinlich, dass die von ihr kontrollierten Phosphorylierungsstellen Ser 65 und Thr 70 dephosphoryliert vorliegen. In der Zeit zwischen Vier- und Sechzehnzeller befindet sich 4E-BP1 also in einer Art Zwischenposition, in der allein der Einfluss von Akt fehlt, um den Repressor vollständig zu hemmen.

In deutlich geringerem Maß, aber dennoch mit dem Entwicklungsgrad zunehmend, fand sich wieder hypophosphoryliertes 4E-BP1, das an Reprimierungsvorgängen der Translation während der Mitose beteiligt ist.

6.2.4 Die Helikase eIF4A hat keinen Einfluss auf die Translationsregulation in der Eizelle

Das verbleibende, am 5'-Ende agierende Protein, das es auf seine Fähigkeiten zur Translationsregulation hin zu betrachten gilt, ist die RNA-Helikase eIF4A.

Sie wurde durchgehend vom GV-Stadium bis zum sechzehnzelligen Embryo gleich bleibend exprimiert (Abb. 23) und eine Regulation über Phosphorylierung konnte hier bisher nicht beobachtet werden. Ihr Anteil an der Initiationskontrolle beschränkt sich sehr wahrscheinlich darauf, dass sie nur arbeiten kann, wenn sie durch Ringschluss und Bildung des eIF4F-Komplexes richtig an der mRNA positioniert wird. Nur so kann sie Sekundärstrukturen der mRNA auflösen und den Weg für das Scanning des Translationsinitiationskomplexes ebnen (Sonenberg et al., 1988).

6.3 Regulation durch mit dem 3'-Ende der mRNA interagierende Proteine

Der schon angesprochene Ringschluss der mRNA ist eine essentielle Voraussetzung für die maximale Stimulation der Translationsinitiation (Mangus et al., 2003). Dafür sind auch Proteine nötig, die eine Verbindung schaffen zwischen dem Cap und dem 3'-Ende der mRNA, wie z.B. das Poly(A)-bindende Protein PABP. Daraus ergeben sich weitere Möglichkeiten der Translationsregulation. Als wichtige, auch bei somatischen Zellen an derartigen Mechanismen beteiligte Proteine konnten bei bovinen Eizellen in unserer Arbeit PABP 1 und 3, Paip 1 und 2 und CPEB 1 nachgewiesen werden.

6.3.1 Die zytoplasmatische Polyadenylierung ist ein wichtiger Kontrollmechanismus der Translation maternaler mRNAs

Die untersuchten Proteine sind an einem essentiellen Kontrollsystem der Translation, der zytoplasmatischen Polyadenylierung, beteiligt. Sie ist einer der Mechanismen, die bei der

Eizellreifung (c-Mos) und als erste im frühen Embryo die Translationsinitiation ausgewählter mRNAs kontrollieren.

Durch die Verlängerung des Poly(A)-Schwanzes wird die Bindung von PABPs gefördert und so die mRNA stabilisiert. Hierfür sind vor allem zwei nahe beieinander liegende Sequenzen in der 3'UTR von Bedeutung, das nucleäre Polyadenylierungsmotiv AAUAAA und das als zytoplasmatisches Polyadenylierungselement (CPE) bezeichnete Motiv UUUUUAU. Ein hormoneller Reiz stimuliert eine Signalkaskade über Aurora A, die das CPE-bindende Protein CPEB 1 an Ser 174 phosphoryliert (Uzbekova et al., 2008). Dieses zieht den Cleavage Polyadenylation Specificity Factor (CPSF) heran, der an das Polyadenylierungsmotiv bindet. Dadurch wird eine Poly(A)-Polymerase rekrutiert und aktiviert. An den so verlängerten Poly(A)-Schwanz kann das Poly(A)-bindende Protein PABP binden, das den Ringschluss mittels eIF4G fördert und dessen Affinität zu eIF4E erhöht (Kahveijan et al., 2005). Die meisten Poly(A)-Polymerasen werden durch den Einfluss von MPF beim Eintritt in die M-Phase des Zellzyklus inaktiviert (Groisman et al., 2002). Gesteuert wird dieser Mechanismus, wie unsere Ergebnisse zeigen, vor allem durch die Degradation und Expression von CPEB, worauf später noch eingegangen werden soll.

Wichtige Ziel-mRNAs der zytoplasmatischen Polyadenylierung codieren z.B. für c-Mos, Wee 1 und Cyclin B (Charlesworth et al., 2002). Die Bindung von CPEB ist allerdings auch für andere in der Eizelle vorkommende Proteine nachgewiesen, wie Smad 1 und 5, Spindlin, Bub1b, Mos, Trim61, Gdf9, H1foo und Obox1 (Racki et al., 2006).

6.3.2. Die Rolle des Poly(A)-Bindenden Proteins PABP und seiner embryospezifischen Variante (ePABP)

Schon Kahveijan et al. (2005) bewiesen bei somatischen Zellen die wichtige Rolle des Poly(A)-bindenden Proteins PABP in der Regulation der Translation durch Vermittlung der Bindung des 3'- Endes der mRNA mit dem eIF4F-Komplex. Vor allem bei der Rekrutierung der 60S-ribosomalen Untereinheit schreiben Kahveijan et al. PABP eine besondere Bedeutung zu. Ein Mangel an PABP führt über eine verminderte Bildung des Translationsinitiationskomplexes zu stark verringerten Translationsraten.

Das Poly(A)-Bindende Protein 1 und 3 wurde in dieser Untersuchung schon im GV-Stadium stark exprimiert. Dies blieb bis zum MII-Stadium erhalten, fiel dann beim Embryo ab und hielt sich in den folgenden Stadien konstant auf diesem Level (Abb. 29, 30 A). Dieses verringerte Vorkommen verursacht über eine verminderte Bildung der Closed Loop-Strukturen eine deutliche Translationsrepression.

Auffällig war die Bandenverschiebung, die auf posttranslatorische Modifikationen schließen lässt. Möglich ist, dass hier embryospezifische PABPs (ePABPs) beteiligt sind, die bei Xenopus, Maus und beim Menschen bereits beschrieben wurden (Cosson et al., 2004; Wilkie et al., 2005; Seli et al., 2005; Guzeloglu-Kayisli et al., 2008). Während der Eizellreifung und

frühen Embryonalentwicklung sind sie die vorherrschenden Poly(A)-bindenden Proteine. Zwar konnten ePABPs auch in anderen Geweben, wie Hoden, Leber und Pankreas nachgewiesen werden, doch werden sie vor allem in Eizellen und frühen Embryonen bis zur Aktivierung des embryonalen Genoms exprimiert und dann wieder durch PABP ersetzt. Beim Mensch ist dieser Zeitpunkt zwischen dem Vier- und Achtzellstadium, beim Rind eher erst im Sechszellstadium. Gerade dies lässt vermuten, dass ePABPs eine wichtige Rolle bei der Regulation der Aktivierung maternaler mRNA haben, indem sie sie vor Deadenylierung schützen und die Translation stimulieren. EPABPs sind bei allen untersuchten Spezies gut konserviert, so ist z. B. das humane EPAB zu 77% mit dem der Maus identisch (Guzeloglu-Kayisli et al., 2008).

Es konnte schon gezeigt werden, dass ePABP mit Polysomen assoziiert ist und an der Translationsinitiation von Reporter-mRNAs entscheidenden Anteil hat. Trotz einiger Unterschiede im Aufbau zu PABP 1 hat ePABP ähnliche Bindungsstellen und interagiert mit den gleichen Proteinen. Daraus lässt sich schließen, dass auch der Regulationsmechanismus der Translation ähnlich ist. Auch eine gleichzeitige Bindung beider Proteine an dieselbe mRNA und gemeinsame Regulation ist möglich, da die beiden Proteine interagieren können (Wilkie et al., 2005).

Bei *Xenopus* wurden zwei Gruppen von ePABPs gefunden, zwei ca. 30 kDa große Proteine und zwei mit einer molekularen Masse von 70 kDa (Wilkie et al., 2005). Davon konnte bisher allerdings nur die Interaktion der schwereren Proteine ePABP A und B mit dem Initiationskomplex und damit deren translationsstimulierende Wirkung nachgewiesen werden. ePABP ist zwar in Mäuseeizellen und Embryos vorherrschend vorhanden, wird aber deutlich beim Übergang der Zygote zum Zweizellstadium reduziert und ist danach fast nicht mehr nachweisbar. PABP 1 hingegen ist in der *Xenopus*-Zygote in Spuren nachweisbar und nach dem EGA steigt seine Expression stark an (Cosson et al., 2004). Das bovine PABP1 ist zu 91 % homolog zu dem PABP A und B und 83 % bis 82 % zu ePABP A oder B. Ob die in dieser Arbeit gefundenen Bandenverschiebungen auf embryospezifisches PABP zurückzuführen sind, muss noch genauer untersucht werden, ebenso wie deren Beteiligung an der Translationsregulation beim Rind. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass ePABP ebenso wie in den anderen untersuchten Spezies eine bedeutende Rolle spielt.

6.3.3 Paip 1 und 2 haben keinen Einfluss auf die Translationsregulation im frühen Embryo

Die PABP-interagierenden Proteine 1 und 2 haben entgegengesetzte Wirkungen und deutlich verschiedene Expressionsmuster. Das PABP-interacting-Protein 1 (Paip 1) fördert durch Stärkung der Verbindung zwischen eIF4G und PABP und Bindung an eIF3 generell die

Translation (Craig et al., 1998; Martineau et al., 2008). Es stieg in seiner Expression vom GV- zum MII-Stadium und blieb auch im Verlauf der Embryonalentwicklung auf gleicher Höhe (Abb. 30 B). Bei der Betrachtung des Expressionsmusters am Übergang der Eizelle zum Embryo ließ sich am Übergang der Eizelle zum Embryo kein regulativer Einfluss dieses Proteins erkennen. Das translationsreprimierende Paip 2 (Khalegpour et al., 2001) hingegen trat nur während der Eizellreifung auf. Es fiel von sehr hoher Expression im GV-Stadium sehr schnell bis zur MII-Phase und war im Embryo nicht mehr nachweisbar (Abb. 30 C). Im GV-Stadium hat es sicher einen hemmenden Einfluss, an der massiven Repression im MII-Stadium hat es mit Sicherheit keinen Anteil.

6.3.4 CPEB als zentrales Regulationselement der zytoplasmatischen Polyadenylierung

Viele für Zellzyklus und Entwicklung wichtige mRNAs enthalten in ihrer 3'-UTR ein „Cytplasmic Polyadenylation Element“ (CPE), das die spezifische Repression und Aktivierung der Translation dieser mRNAs erlaubt. Zwei Proteine sind dabei von besonderer Bedeutung: CPEB und Maskin.

Deutliche Veränderungen der Expression fanden sich während unserer Untersuchungen vor allem bei CPEB. Diese lassen darauf schließen, dass das Protein eine wichtige Rolle bei der Translationsrepression bis zum embryonalen Übergang spielt. Der zugrunde liegende Mechanismus soll deshalb hier erläutert werden.

CPEB bindet direkt an CPE. In translatorisch inaktiven Zellen, wie sie vor allem im meiotischen Arrest vorliegen, ist es an der Translationsrepression beteiligt. Es interagiert mit dem Protein Maskin, das Stebbins-Boaz et al. (1999) durch Coimmunopräzipitation mit CPEB bei *Xenopus*-Eizellen fanden. Maskin, das eine eIF4E-Bindungsstelle besitzt, zirkularisiert die mRNA durch die Verbindung von CPEB am 3'-Ende und eIF4E am Cap und verhindert damit die Bildung des Initiationskomplexes. Die mRNA wird dabei in einem translatorisch inaktiven Zustand stabilisiert und vor Abbau geschützt.

Nach einem hormonellen Stimulus an der Eizelle wird CPEB unter Einfluss von Aurora A / Eg2 und cdc2 an Ser174 phosphoryliert (Hodgman et al., 2002). Dieses rekrutiert CPSF, wahrscheinlich unterstützt von dem Protein Symplekin, das bisher vor allem im Kern somatischer Zellen beschrieben wurde, aber auch im Zytoplasma von *Xenopus*-Eizellen im Komplex mit „Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor“ (CPSF) nachgewiesen werden konnte (Radford et al., 2008). CPSF positioniert und aktiviert eine Poly(A)-Polymerase, die die Polyadenylierung in Gang setzt. Daran bindet dann, eventuell von Paip1 unterstützt, ein Poly(A)-Bindungsprotein und erhöht durch Interaktion mit eIF4G dessen Affinität zum Cap-Bindungsprotein so stark, dass es Maskin aus der Bindung mit eIF4E verdrängt und so die Translation stimuliert (Cao und Richter, 2002).

Als CPEB-deaktivierende Kinase wird die Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) vermutet. Außerdem wird angenommen, dass die Phosphorylierung verschiedener Stellen auf CPEB (nicht Ser 174) durch MAPK als Grundlage für dessen weitere Aktivierung notwendig ist (Radford et al. 2008).

CPEB findet sich sowohl in der reifenden Eizelle als auch in den frühen Embryonalstadien in der Region des mitotischen Apparates in unterschiedlicher Konzentration.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Expression von CPEB 1 ihr Maximum im GV-Stadium hatte und zur MII-Phase deutlich abfiel (Abb. 31A+E). Es wurde in dieser Phase degradiert. Im Zweizellstadium war es fast nicht mehr nachweisbar. In den folgenden Embryonalstadien stieg es zwar etwas an, kam bis zum Sechzehnzeller aber trotzdem nur in sehr geringen Mengen vor. Seine Rolle in der Translationsregulation am Übergang der Eizelle zum Embryo ist noch nicht völlig geklärt. Geringe CPEB-Konzentrationen, wie sie ab der MII-Phase auftraten, können zu einer ungenügenden Polyadenylierung, mangelnder PABP-Bindung am Poly(A)-Schwanz, folglich fehlendem Ringschluss und damit zur Inhibierung der Translation führen. Diese Degradation scheint also eine entscheidende Ursache für die Translationsrepression im MII-Stadium zu sein.

CPEB bindet auch an die Mikrotubuli. Zudem führt die Aktivierung des MPF zu einer weiteren Phosphorylierung von CPEB, die nicht gebundenes Protein sehr schnell zu 80-90% zerstört. Damit wird die CPE-abhängige Polyadenylierung in diesem Bereich konzentriert (Groisman et al., 2002). Verhindert man diesen Einfluss von CPEB auf Spindelapparat und Centrosomen durch CPEB-Antikörper, verhindert dies Translation und die Zellteilung. Blockiert man die für die Bindung von CPEB an Spindeln und Centrosomen notwendige Domäne, kann es zwar weiter die Translation regulieren, jedoch wird auch hier die Zellteilung inhibiert. Diese Bindung an die Mikrotubuli wird ebenfalls durch Phosphorylierung reguliert. Bisher ist der Mechanismus noch nicht genau geklärt, jedoch werden PKA und Aurora A als verantwortliche Kinasen angesehen (Barnard et al., 2005). Inwieweit dieser Einfluss bei Rindereizellen besteht, bedarf weiterer Klärung. Die Kontrolle der Lokalisation der Translation scheint ebenso wichtig für Zellreifung und Teilung zu sein, wie die Kontrolle der Translation selbst. Jedoch ist nicht jede Translationsaktivierung abhängig von einem CPE und dem daran bindenden Protein (Charlesworth et al., 2004). Die Aktivierung einiger ausgewählter mRNAs, darunter auch des für die Phosphorylierung von CPEB verantwortlichen Eg2 erfolgt schneller und unabhängig von CPEs. Hierauf soll später noch genauer eingegangen werden.

Maskin ist ein bisher nur bei *Xenopus* beschriebener, kompetenter Repressor der Translation. Dieses Protein soll nun genauer betrachtet werden.

Maskin bindet an eIF4E über eine Sequenz, die den eIF4E-Bindungsstellen von eIF4G und 4E-BP1 ähneln (Marcotrigiano et al., 1999; Gingras et al., 1999; Stebbins-Boaz et al., 1999)).

Maskin enthält N-terminal (AS 778-931) eine Doppelwendel, eine „Coiled Coil“-Domäne, gehört also zur TACC (transforming acidic coiled coil)-Familie. Seine eIF4E-Bindungsstelle umfasst die AS 571-586. Ebenfalls ähnlich TACC kann Maskin deutlich konzentriert im Bereich der Zentrosomen nachgewiesen werden (Barnard et al., 2005).

Die Phosphorylierung von Maskin erfolgt ähnlich wie bei 4E-BP1 durch ein komplexes System vor und während der Eizellreifung. In unreifen Eizellen hat vor allem die Proteinkinase A große Bedeutung. Hier bildet die mRNA über CPEB und Maskin einen translatorisch inaktiven Ring. Cdk1 phosphoryliert mindestens eine von verschiedenen weiteren Phosphorylierungsstellen bei reifen Eizellen. Dies lockert die eIF4E-Bindung und bestimmt wahrscheinlich auch die Lokalisierung des Proteins. Zusätzlich zu dem Einfluss von Aurora A auf CPEB führt dies zur Translationsstimulation (Barnard et al., 2005).

Groisman et al. wiesen 2000 auch bei *Xenopus*-Embryos CPEB, Maskin und mRNAs wie Cyclin B, die CPEs enthalten, nach und zeigten, dass sie mit dem Spindelapparat und den Centrosomen assoziiert sind.

6.3.5 Das Maskin-Like-Protein greift in die Translationsregulation bei Rindereizellen ein

Bei der Suche nach einem dem *Xenopus*-Maskin ähnlichen Protein in bovinen Eizellen und Embryonen konnte mittels eines Maskin-Antikörpers ein 55-60kDa großes Protein ermittelt werden. Der in dieser Analyse verwendete Antikörper bindet an die AS 850-900 in der Doppelwendelregion. Diese scheint also auch in dem bovinen Maskin-Like-Protein vorhanden zu sein. Dennoch entsprach es weder dem bei *Xenopus* beschriebenen Maskin, das deutlich größer ist, noch zu den bereits bekannten Proteinen aus der TACC-Familie, die eine ähnliche Doppelspindel aufweisen. Das beim Rind bekannte, mit einer Doppelwendel ausgestattete Protein TACC 3 (95 kDa) wies eine völlig andere Größe und ein anderes Expressionsmuster auf (Abb. 31C). Nach einer geringen Expression im GV-Stadium zeigte es einen konstant hohen Level ohne Band shift. Auch die anderen TACC-Proteine 1 und 2 haben nach der Swiss Prot Datenbank ein Molekulargewicht zwischen 90 und 110 kDa. Bei einer Datenbanksuche nach Regionen mit eIF4E-Bindungsstellen konnte kein bovines Protein gefunden werden.

Die für *Xenopus* aufgestellte Theorie, dass die Bindung von CPEB, Maskin und eIF4E in hypophosphoryliertem Zustand begünstigt wird, kann bei dem bovinen Maskin-Like-Protein aus verschiedenen Gründen nicht angewandt werden:

Die Phosphorylierung von CPEB und Maskin löst zwar deren Bindung zu eIF4E, aber nicht ihre Bindung untereinander (Barnard et al, 2005). Jedoch konnte zwischen dem Maskin-Like-Protein und CPEB bei Immunopräzipitationsanalysen in keinem Stadium eine Bindung nachgewiesen werden.

Außerdem wurde CPEB vor allem im GV-Stadium maximal und am Ende der Endreifung nur noch in sehr geringen Mengen exprimiert.

Damit kann die Bindung von CPEB und Maskin-Like-Protein gerade in der MII-Phase und der frühen Embryonalentwicklung nicht der hauptverantwortliche Regulationsmechanismus sein. Hingegen offenbarte die Far Western Analyse die Bindung von eIF4E im Bereich von 50-60 kDa. Außerdem konnte das Maskin-Like-Protein mit immobilisiertem eIF4E präzipitiert werden. Ein alleiniges Binden von Maskin an eIF4E ist bisher nicht beschrieben. Allerdings ist zu vermuten, dass die Regulation über das Maskin-Like-Protein einen anderen Funktionsmechanismus aufweist, als er von *Xenopus*-Maskin bereits gut bekannt ist.

Dieses Maskin-Like-Protein wurde vom GV-Stadium bis zum Sechzehnzeller exprimiert. Allerdings war es im Zwei- und Vierzellstadium stark reprimiert (Abb. 31 B+F).

Im MII-Stadium und im Acht- und Sechzehnzeller traten multiple Banden auf. Ausgehend von Untersuchungen von Barnard et al. (2005) bei dem bei *Xenopus* gefundenen Maskin ist anzunehmen, dass sie von unterschiedlicher Phosphorylierung herrühren.

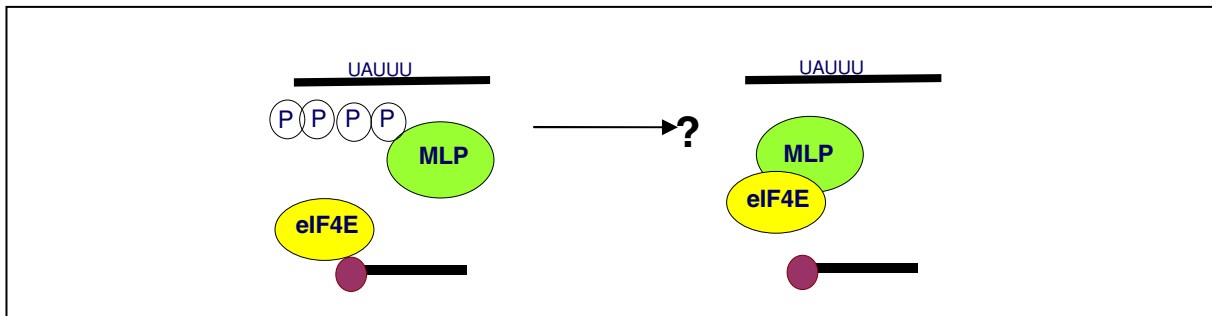
Die Far-Western-Analyse (Abb. 32 B) zur Protein-Protein-Interaktion bestätigte eine starke eIF4E-Bindung im Bereich des Maskin-Like-Proteins bei 55 kDa. Außerdem stellten sich noch einige schwächere Banden dar, die ebenfalls potentielle eIF4E-Bindungsproteine markieren. Zusätzlich wurde eine eIF4E-Immunopräzipitation auf Maskin-Like-Protein (Abb. 32 C, linke Abb.) und eIF4E (Abb. 32 C, rechte Abb.) untersucht. Diese Blots bestätigen ebenfalls die Coimmunopräzipitation des Maskin-Like-Proteins mit eIF4E und damit dessen Bindungsfähigkeit an das Cap-Bindungsprotein.

Im Rahmen der m⁷-GTP-Sepharose-Präzipitation (Abb. 32 D) konnte allerdings in keiner Phase das Maskin-Like-Protein zusammen mit eIF4E in der gebundenen Fraktion nachgewiesen werden. Die Gesamtmenge fand sich im Durchfluss. Das Protein scheint also durch seine Bindung eIF4E vom Cap zu separieren.

Dies kann von entscheidender Bedeutung für die Translationsrepression sein. Vor allem im GV-Stadium unter deutlichem Maskin-Einfluss zeigte sich kaum Bindung von eIF4E an die Cap-Struktur (Abb. 26 A). Stattdessen erschienen die eIF4E – Maskin-Like-Protein- Komplexe im Durchfluss. Damit wird deutlich, dass hier eIF4E durch das Maskin-Like-Protein gebunden und so dessen Bindung an das Cap blockiert wurde.

Im Verlauf der Endreifung verfestigte sich jedoch diese Bindung trotz eines ähnlich hohen Vorkommens des Maskin-Like-Proteins, der Anteil des an das Cap gebundenen eIF4E's stieg (Abb. 26 A). Die eIF4E- Immunopräzipitation von eIF4A (Abb. 32 F) zeigte deutlich eine erhöhte Bildung des eIF4F-Komplexes. Eine mögliche Ursache für die Freigabe von eIF4E ist die deutliche Reduktion von CPEB zur MII-Phase. Geht man aber von einer weiteren, CPEB-unabhängigen Funktionsweise aus, so rückt vor allem der Phosphorylierungsstatus des Maskin-Like-Proteins als Regulationsmöglichkeit in den Vordergrund. Gerade in der MII-Phase und dem Acht- und Sechzehnzeller fand sich hier ein deutlicher Bandshift (Abb. 31 B).

Abb. 37: Maskin like Protein (MLP) als Translationsrepressor:
Hypophosphoryliertes MLP bindet eIF4E und verhindert dessen Interaktion mit dem Cap.



Hierfür wurden gebundenes und ungebundenes Maskin-Like-Protein genau miteinander verglichen (Abb. 32 G). Dabei fiel auf, dass die gebundene Form höhere elektrophoretische Mobilität zeigt. Dies lässt auf eine Hypophosphorylierung dieser Form schließen. Im Gegensatz dazu band die hyperphosphorylierte Form deutlich schlechter an eIF4E, weshalb sie vor allem in der ungebundenen Fraktion zu finden war (Abb. 37). Auch im Embryo finden sich diese Veränderungen.

Weitere Untersuchungen der Struktur und der Bindungseigenschaften des Maskin-Like-Proteins in Bezug auf dessen Funktion für die Translationsregulation sind notwendig.

6.3.6 Weitere mRNA-spezifische Regulationssysteme sind wahrscheinlich

Ein in der Funktion dem Maskin ähnliches Molekül ist Cup, das bisher bei *Drosophila* besonders gut untersucht wurde. Es hat die Möglichkeit, gleichzeitig eIF4E und verschiedene, sequenzspezifische Proteine wie Smaug und Bruno in der 3'-Region zu binden (Barnard et al., 2005; Kim-Ha et al., 1995; Richter und Sonenberg, 2005). Damit kann ebenfalls die mRNA translatorisch inaktiv zirkularisiert und vor dem Abbau geschützt gelagert werden. Bisher kann nur die Funktion von Cup als Repressor der Translation nachgewiesen werden. Noch ist kein Mechanismus bekannt, der durch Modifikation von Cup dessen Loslösung von eIF4E und damit die Wiederaufnahme der Translation kontrolliert. Jedoch wäre es energetisch nicht sinnvoll, mRNAs translatorisch inaktiv zu speichern, ohne sie später reaktivieren zu können. Die Existenz eines solchen Mechanismus ist deshalb sehr wahrscheinlich.

6.4 Kinasen als Regulatoren der Translationsinitiation

Zusammenfassend lässt sich bei allen untersuchten Kinasen beobachten, dass sie alle in ihrer Expression gleich blieben. Im Verlauf der Eizellreifung unterschieden sich aber ihre Phosphorylierungsmaxima deutlich. Dies weist darauf hin, dass sie bei der Regulation der

Endreifung unterschiedliche Rollen spielen. Im GV-Stadium lag Aurora A sehr stark phosphoryliert vor. Dies nahm dann stark ab, bis die Phosphorylierung im Zweizeller nicht mehr nachweisbar war. Dies entspricht auch der Expression ihres Substrates CPEB. Durch das phosphorylierte CPEB wird die Translation stimuliert, bzw. aufrechterhalten, da es über CPSF die Polyadenylierung der mRNA fördert. Ab der MI-Phase wurden gleichzeitig die Phosphorylierung und die Expression von CPEB reduziert. Dies erlaubt die Translationsreprimierung durch Maskin und vermutlich auch noch anderer, eventuell auch CPE-unabhängiger 3'-UTR-kontrollierter Repressionsmechanismen.

In der MI-Phase hatte vor allem Akt ihr Aktivitätsmaximum. Diese ist dafür zuständig, den Translationsrepressor 4E-BP1 zu hyperphosphorylieren und damit zu reprimieren. Diese Tatsache, gemeinsam mit der Erkenntnis, dass das 4E-Bindungsprotein im Zweizeller massiv degradiert vorliegt, lässt den Schluss zu, dass es an der Translationsrepression im MII-Stadium und im frühen Embryo wahrscheinlich nicht beteiligt ist und stattdessen eher Vorkehrungen getroffen werden, dass es auf erste Translationsinitiationen im frühen Embryo keinen Einfluss nehmen kann. Erst ab dem Sechszellstadium, in dem wieder hypophosphorylierte Banden nachweisbar sind, gewinnt es wieder an Bedeutung.

Die Aktivität der MAPK überwog in der MII-Phase. Sie ist zuständig für die Phosphorylierung des Cap-Bindungsproteins eIF4E über Mnk1, das an eIF4G bindet. Dies ist also nur in Verbindung mit dem eIF4F-Komplex möglich. Die Phosphorylierung von eIF4E nahm entsprechend dem Aktivitätsmuster von MAPK bis zur MII-Phase zu. Damit verringert sich seine Affinität zum Cap, was einerseits translationsstimulierend wirken kann, da der Translationsinitiationskomplex das Cap nach Beginn des Scannings wieder für die Bildung neuer Komplexe freigibt. Andererseits sank die Bindung zwischen eIF4E und 4G zunehmend bis zur MII-Phase und auch die Bindung von eIF4E an das Cap wird gelockert. Zwar blieb laut m⁷GTP-Sepharosepräzipitation eIF4E auch in dieser Phase an das Cap gebunden, doch könnte dies Proteinen wie dem Maskin-Like-Protein Ansatzpunkte für die Bindung mit eIF4E liefern.

Auffällig bei allen Kinasen ist, dass sie alle beim Übergang zum Embryo dephosphoryliert wurden (Tab. 6). Dies lässt vermuten, dass in dieser Phase nur wenige, die Translation reaktivierende Mechanismen ablaufen.

Um eine generelle Tendenz und einen Überblick zu gewinnen, wurden die Substrate der für die Translationskontrolle und die Zellentwicklung wichtigen Kinase PKA, PKB, PKC, CDK, ATM/ATR und MAPK/CDK hinsichtlich ihrer Phosphorylierung untersucht. Darin ließen sich deutliche Parallelen zwischen den einzelnen Blots erkennen. Ihnen allen gemeinsam ist, dass im GV-Stadium nirgends eine deutliche Phosphorylierung ihrer Substrate auftrat, hingegen findet sich das Phosphorylierungsmaximum bei allen Blots im MII-Stadium. Gerade in dieser Phase herrscht große regulatorische Aktivität. Bei den Embryonalstadien fanden

sich konstant geringere Kinaseaktivitäten. Nur eine leichte Reduktion in Zweizellstadium und ein geringer Anstieg im Verlauf der Embryonalentwicklung fielen auf.

In der Auftrennung der gesamten Eizellextrakte (Abb. 33 G) wurde deutlich, dass sich die Proteinmuster während der Eizellreifung kaum unterschieden. Dies lässt darauf schließen, dass die Unterschiede in der Eizellreifung und Embryonalentwicklung eher durch die differierenden Kinaseaktivitäten als durch Änderungen des Auftretens ihrer Substrate charakterisiert sind.

6.5 Überblick über Aktivitäten, Modifikationen und Interaktionen regulatorischer Proteine im Verlauf der Eizellreifung und frühen Embryonalentwicklung

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Regulation der Translation maternalen mRNAs während der meiotischen Eizellendreifung und der frühen Embryonalentwicklung durch ein komplexes Zusammenwirken verschiedener nebeneinander und miteinander agierender Regulationsmechanismen gesteuert wird. Kontrolliert wird dies nur zu einem sehr geringen Anteil durch Veränderungen in der Expression spezifischer Proteine, da die Transkription zu diesem Zeitpunkt bereits vollständig abgeschaltet ist. Stattdessen kommen fast alle beteiligten Proteine durchgehend in gleich bleibender Menge vor. Ausnahmen stellen lediglich die Degradation von 4E-BP1, CPEB und Maskin-like-Protein dar. Die größte Bedeutung haben in diesem Zusammenhang posttranslatorische Modifikationen, vor allem die Phosphorylierung und Dephosphorylierung vieler verschiedener, mit dem 5´ und 3´-Ende der mRNAs interagierender Proteine. Dabei sind diese Mechanismen auch noch bei spezifischen Gruppen von maternalen mRNAs verschieden, die zu genau definierten Zeitpunkten an unterschiedlichen Orten in der Zelle translatiert werden müssen.

Besonders bei der spezifischen Regulation bestimmter mRNAs spielen bestimmte regulative Sequenzen in deren 3´-UTR eine große Rolle und kontrollieren die komplexen temporalen Aktivierungsmuster.

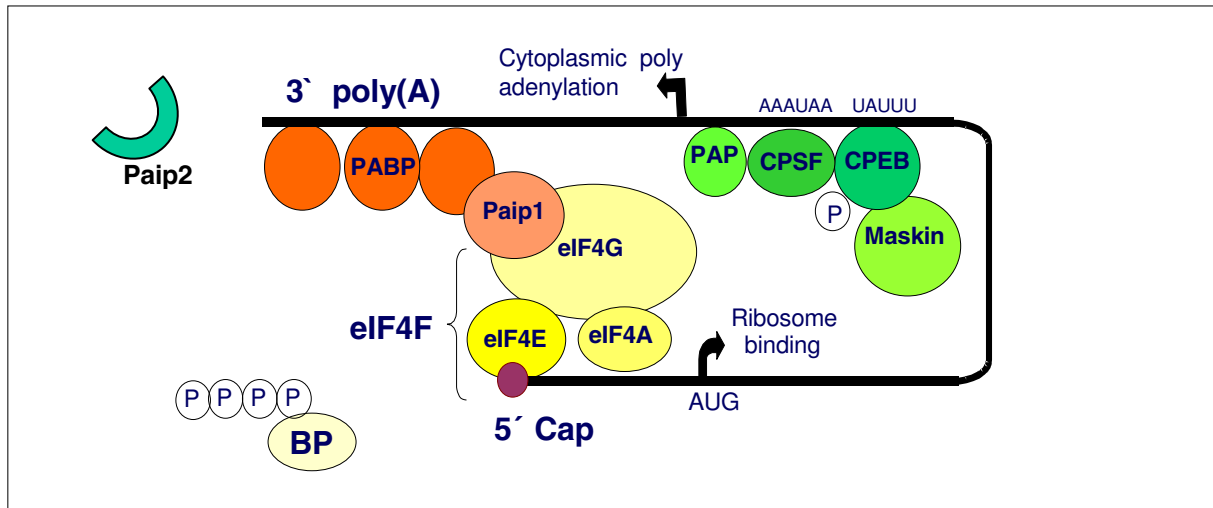
Zentrales Element der Translationsinitiation ist immer noch der Ringschluss der mRNA nach dem erweiterten Schema des Closed-Loop-Modells von Mangus et al. 2003 (Abb. 38). Die Regulation erfolgt hier vor allem an zwei Mechanismen: der zytoplasmatischen Polyadenylierung durch CPEB und der Bildung des eIF4F-Komplexes. Für einen besseren Überblick werden in Tab. 7 die wichtigsten beteiligten Proteine hinsichtlich ihres Auftretens, ihrer Phosphorylierung und ihrer Interaktionen im Verlauf der Eizellreifung und frühen Embryonalentwicklung dargestellt.

Tab. 7: Überblick über Auftreten, Modifikationen und Interaktionen translatorisch wichtiger Proteine in der Eizellendreifung und frühen Embryonalentwicklung

	GV	MI	MII	2C	4C	8C	16C
Transkription	+	-	-				
Translation	++	+++	-	(+)	(+)	(+)	+
5´- interagierende Faktoren							
eIF4E	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
peIF4E	+	++	+++	++	++	++	++
eIF4G	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++
peIF4G	+++	+++	+	+++	++	++	++
eIF4A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4E-BP1	$\alpha \alpha \alpha$	$\alpha \alpha \gamma$	$\alpha \gamma \gamma$	β	$\beta \beta$	$\beta \beta$	$\beta \beta$
eIF4E-Cap-Affinität	+	++	+++	++	++	++	++
eIF4G-Cap	+	++	+	++	++	++	++
eIF4E-peIF4G	+++	++	+	++			
eIF4F-Cap	(+)	++	+	+	+	+	+
4E-BP1 – Cap	-	-	-	-	-	-	-
3´- interagierende Faktoren							
PABP	+++	+++ (bandshift)	++ (bandshift)	+	+	+	+
Paip1	+		+++	+++	+++	+++	+++
Paip2	+++		+++	-	-	-	-
CPEB	+++	++	+	(+)	+	++	++
			(bandshift)			(bandshift)	(bandshift)
Maskin-Like Protein	+++		+++	+	(+)	+++	+++
			(bandshift)			(bandshift)	(bandshift)
TACC3	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Abb. 38: Modifiziertes "Closed Loop"-Modell nach Mangus et al., 2003:

Dieses Modell zeigt den Status aktiver Translation, wie er in somatischen Zellen und vor dem GV-Stadium schematisch bei den mRNAs mit CPEs funktioniert: Durch die Phosphorylierung von CPEB wird einerseits die über Maskin vermittelte Bindung zu eIF4E gelöst, andererseits wird mittels CPSF eine Poly(A)-Polymerase herangezogen und aktiviert, die die mRNA polyadenyliert. Dies bietet PABP viele Bindungsmöglichkeiten. Mittels Paip1 nimmt es Kontakt zum eIF4F-Komplex auf, der sich am Cap bildet. eIF4G vermittelt den 3'-5'Kontakt und zieht den Präinitiationskomplex heran. Dieser kann an die 5'UTR binden, die durch die im eIF4F-Komplex positionierte Helikase eIF4A von Sekundärstrukturen befreit wurde. Die Hyperphosphorylierung von 4E-BP1 verhindert die Blockade von eIF4E durch diesen Repressor.



Im GV-Stadium liegen PABP und CPEB in großen Mengen vor und Aurora A ist stark phosphoryliert. Die Kinase aktiviert CPEB, das über CPSF eine Poly(A)-Polymerase aktiviert, die mit der zytoplasmatischen Polyadenylierung des Poly(A)-Schwanzes beginnt. Daran kann PABP binden, eventuell unterstützt von Paip1. Das Poly(A)-Bindende Protein interagiert mit dem Gerüstprotein eIF4G. Zudem weist eIF4G eine deutliche Phosphorylierung auf. Beides erhöht dessen Affinität zu eIF4E.

Die Bindung beider Proteine erhöht einerseits die Affinität von eIF4E zum Cap, was ohne Berücksichtigung anderer Vorgänge die Bildung des eIF4F-Komplexes fördern würde. Andererseits ermöglicht dies die Phosphorylierung von eIF4E über die an eIF4G gebundene Mnk1. Diese wird durch die ebenfalls ab dem GV-Stadium ansteigende Phosphorylierung der MAPK aktiviert. Dies begünstigt das Ansteigen der Turnover-Rate der eIF4E-Phosphorylierung im MI-Stadium.

Trotzdem ist die Translation hier reprimiert und die Bildung des eIF4F-Komplexes gehemmt. Zu diesem Zeitpunkt sind jedoch auch unspezifische Translationsrepressoren noch aktiv, 4E-BP1 liegt hypophosphoryliert vor und Paip 2 wird in hohen Mengen exprimiert. Während der Endreifung werden sie aber zunehmend inaktiviert und im frühen Embryo sogar degradiert. In der MII-Phase sind beide komplett ausgeschaltet. 4E-BP1 liegt hier vollständig hyperphosphoryliert vor. Dafür hat die Kinase Akt in der MI Phase ihr Maximum, die 4E-BP1 zunehmend phosphoryliert und damit seine reprimierende Wirkung unterbindet.

Beide Repressoren sind damit an der Translationsrepression am Ende der Endreifung nicht beteiligt. Vermutlich sind beide zu unspezifisch, um eine detaillierte stufenweise Reaktivierung der maternalen mRNAs im Embryo zu ermöglichen und sollen deshalb aus diesem Prozess vollständig herausgehalten werden. Dafür sprechen auch ihre massive Degradation im Zweizeller und die erst langsame Reaktivierung mit der Aktivierung des embryonalen Genoms. Aber ein neuer Translationsregulator zeigt hier seine Wirkung. Das im Lauf dieser Arbeiten entdeckte Maskin-Like-Protein bindet an eIF4E und verhindert dessen erneute Bindung ans Cap (Abb. 39).

Im MI-Stadium ist die Translation auf einem Maximum, wahrscheinlich gefördert durch die hohe Dynamik in der eIF4E-Phosphorylierung. Die im GV-Stadium polyadenylierte mRNA wird hier noch stark translatiert. Jedoch beginnen sich bereits Veränderungen abzuzeichnen, die die Translation im weiteren reprimieren werden.

Das Auftreten von CPEB und PABP beginnt ebenso nachzulassen wie die Phosphorylierung von Aurora A. Bei beiden Proteinen erscheint zum MII-Stadium ein Bandshift, der auf posttranslatorische Modifikationen schließen lässt. Inwiefern daran ePABPs beteiligt sind, ist noch unklar. Je weniger CPEB an die CPEs der mRNA bindet, umso geringer ist deren Polyadenylierung durch die Poly(A)-Polymerase und umso weniger PABP kann sich anlagern. Damit steht kaum PABP für die Bindung mit eIF4G und folglich für den Ringschluss zur Verfügung. Außerdem verringert sich zugleich die Phosphorylierung von eIF4G. In der MII-Phase ist eIF4G vollständig dephosphoryliert (Abb. 22) und folglich kann auch kaum noch eine Bindung des Gerüstproteins an eIF4E oder seine Interaktion mit dem Cap nachgewiesen werden. Fehlender Kontakt mit PABP und fehlende Phosphorylierung von eIF4G führen dazu, dass auch die Affinität zu eIF4E schwächer wird und sich weniger eIF4F-Komplexe bilden. Nur ein geringer Teil von eIF4F-Komplexen bleibt latent aktiviert, wahrscheinlich um für die schnelle Aktivierung durch einzelne andere Signale (beginnendes eIF4E-Turnover, CPEB-Neubildung) einer Subklasse spezifischer mRNAs zur Verfügung zu stehen. All diese miteinander verketteten Mechanismen zusammen können die Translation in der MII-Phase vollständig reprimieren (Abb. 40).

Die jetzt wieder fehlende Turnover-Dynamik der eIF4E-Phosphorylierung sorgt ihrerseits für reduzierte Translationsraten.

Ungeklärt ist bisher die Frage, warum trotz geringerem Kontakt mit eIF4G die eIF4E-Phosphorylierung aufrechterhalten werden kann. Möglicherweise spielt auch hier das in diesem Stadium hyperphosphorylierte Maskin-Like-Protein eine Rolle. Doch noch weitere Fragen bleiben offen.

Abb. 39: Mögliche Translationsrepressoren im GV-Stadium

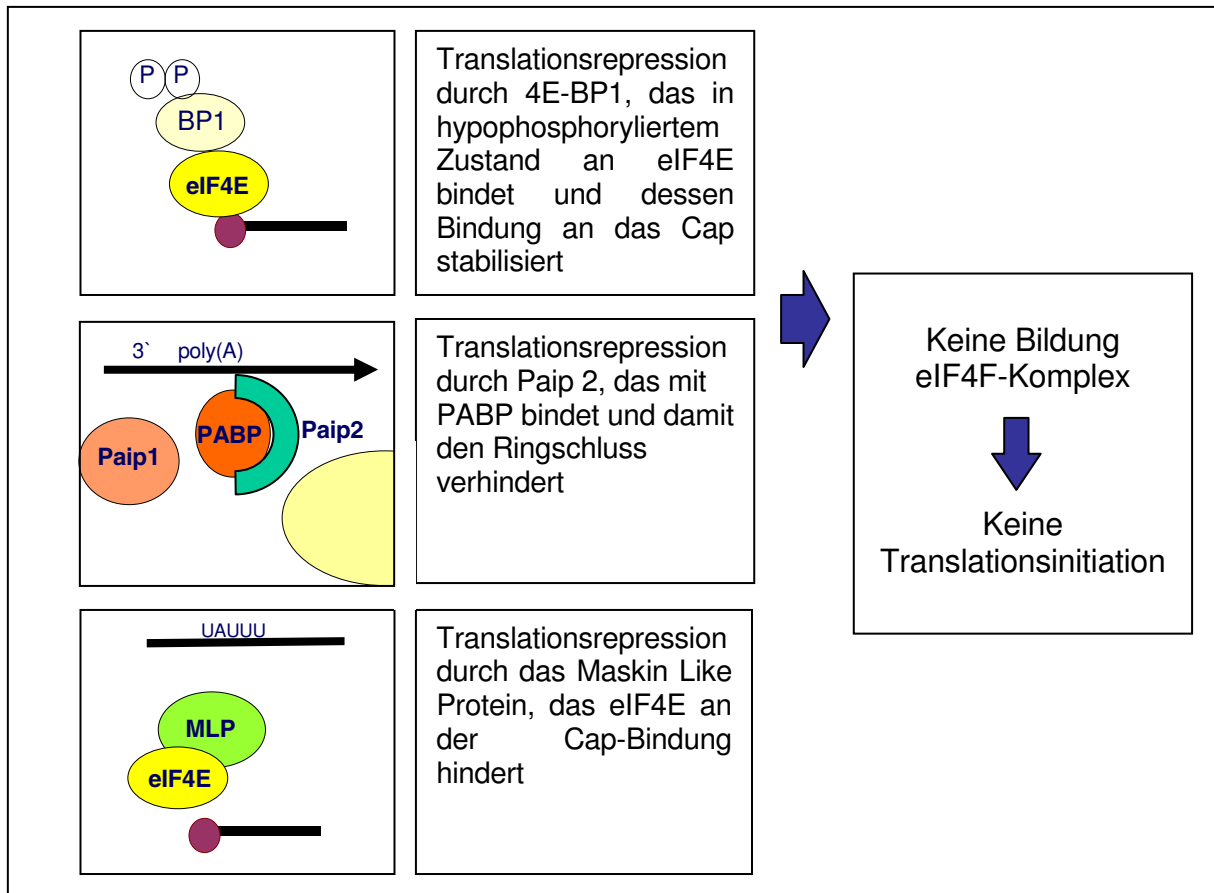
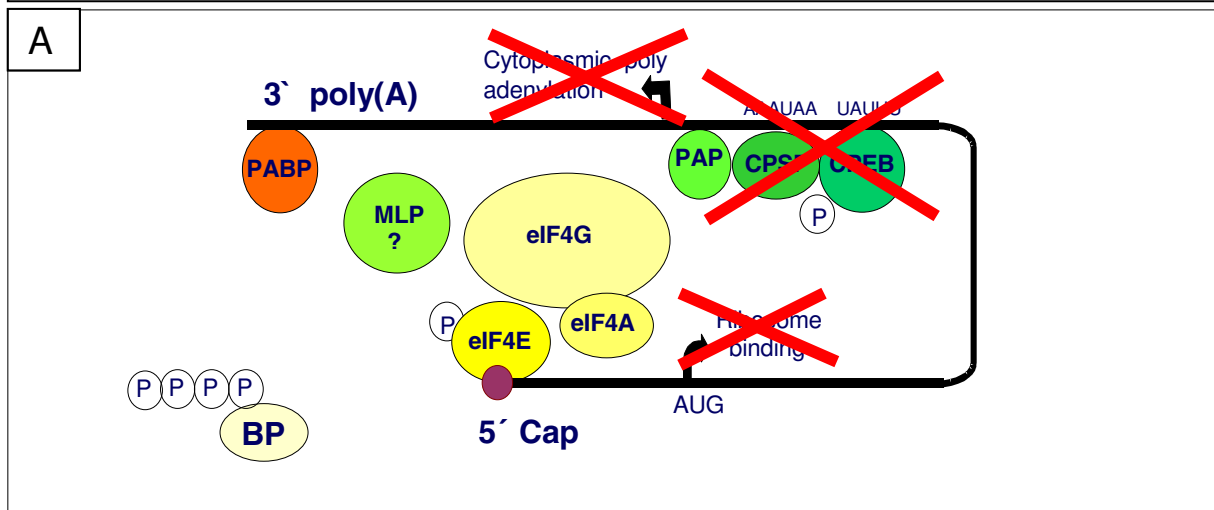
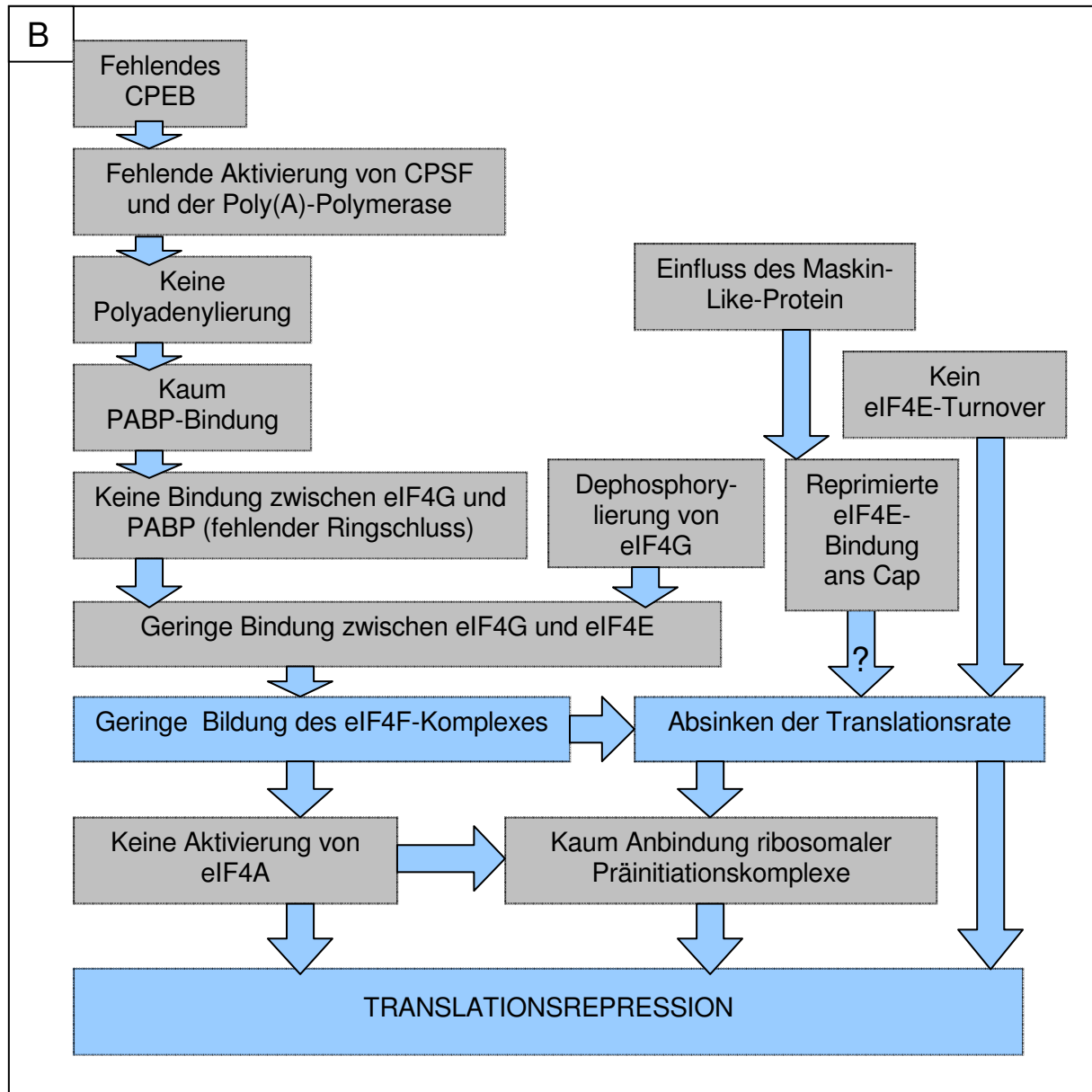


Abb. 40: Translationsrepression im MII-Stadium: Ausgehend von der Degradierung von CPEB tritt eine Kaskade in Kraft, die zur Inhibierung der Translationsinitiation führt.

A: Grafische Darstellung
B: Schematische Darstellung





Das Maskin-Like-Protein hemmt vor allem im GV-Stadium die Interaktion zwischen eIF4E und dem Cap, in der MII-Phase findet sich hingegen eine starke Bindung des Cap-Bindungsproteins zur mRNA. Auch ist das Maskin-Like-Protein in dieser Phase zunehmend phosphoryliert und in großen Teilen im Durchlauf vorhanden. Auch die Helikase eIF4A zeigt im Verlauf der Endreifung eine zunehmend stärkere Bindung zum Cap (Abb. 32F), was nach Barnard et al. (2005) auf eine Bildung des eIF4F-Komplexes hinweist. Demgegenüber stehen aber die Bindungsanalysen von eIF4G, dessen Bindung an eIF4E und das Cap immer mehr geschwächt wird (Abb. 26 C und 27). Inwiefern die Hyperphosphorylierung von Maskin in dieser Phase einen Einfluss auf eIF4G oder die Bildung des eIF4F-Komplexes auswirkt, muss Ziel weiterer Forschungen sein.

Der entscheidende Mechanismus der Translationsregulation ist allerdings ohne Zweifel die Einflussnahme auf die Polyadenylierung der mRNA, die bei den überwiegend CPE-haltigen mRNAs durch die Degradierung von CPEB mit den beschriebenen Kettenreaktionen erfolgt.

Wichtige Erkenntnisse hierzu lieferten Charlesworth et al. 2004 bei *Xenopus*-Eizellen. Sie konnten zeigen, dass es bezüglich auf ihre Reaktivierung nach dem Progesteronstimulus zwei verschiedene Klassen maternaler mRNAs gibt. Bei der sehr schnell aktivierbaren frühen Klasse erfolgt die zytoplasmatische Polyadenylierung bereits zwei bis drei Stunden vor dem GVBD. Zu ihr gehören das Histon-like B4, D7, FGFR1, G10, Mos und auch die für die Phosphorylierung von CPEB notwendige Eg2 (Hodgman et al., 2001). Dabei ist hier die Aktivierung der mRNA nicht abhängig von CPEB und CPEs in der 3'-UTR. Ihre Polyadenylierung wird durch andere Polyadenylation Response Elemente (PREs) in der 3'-UTR aktiviert. Diese spezifischen Sequenzen konnten ausschließlich bei allen früh aktivierten mRNAs in allen untersuchten Spezies nachgewiesen werden. Bisher sind bereits mehrere PREs bekannt: ein embryonales U-reiches und ein C-reiches zytoplasmisches Polyadenylierungselement (Radford et al., 2008). Das RNA-Bindungsprotein Musashi kann nachweislich verschiedene PREs binden und ist notwendig für die frühe zytoplasmatische Polyadenylierung. Es ist möglich, dass die bereits beschriebenen, in geringen Mengen vorhandenen, latent aktivierten eIF4F-Komplexe für eben diese mRNAs zur Verfügung stehen. Die schnelle Aktivierung birgt für die mRNAs den Nachteil eines noch relativ kurzen Poly(A)-Schwanzes. Deshalb enthalten auch sie noch CPEs und können im weiteren Verlauf gemeinsam mit den später aktivierten, CPE-haltigen mRNAs mit dem gleichen Mechanismus weiter translatiert werden. Sie stehen als erste für die Translation der anderen zur Verfügung und werden stufenweise weiter aktiviert. Dies geschieht unter der Kontrolle der MAPK, während die späte Gruppe eher der Regulation des MPF unterliegt.

Zu den spät translatierten mRNAs zählen z. B. Cyclin B1, Cyclin B4, Wee 1 und Cyclin A1 und viele weitere CPE-haltige mRNAs. Diese Gruppe verhält sich im Hinblick auf den Zeitpunkt ihrer Aktivierung heterogener, allen gemeinsam ist der Beginn der zytoplasmatischen Polyadenylierung maximal eine Stunde vor oder während des GVBD. Hierfür ist CPEB unbedingt notwendig. Ob weitere, zeitlich versetzt aktivierbare Untergruppierungen existieren, die ebenfalls über spezifische regulative Sequenzen in der 3'-UTR und dazugehörige Bindungsproteine kontrolliert werden, ist noch nicht untersucht, aber wahrscheinlich. Die genaue Analyse der verschiedenen 3'-UTRs ist hierfür ein interessanter Untersuchungsansatz. Gerade die neuerliche Translation von Cyclin B1 infolge der zytoplasmatischen Polyadenylierung unter Einfluss von Aurora A / Eg2 steuert den Fortschritt des Zellzyklus (Groisman et al., 2002) und den Eintritt in die M-Phase. Desweiteren beschrieben Groisman et al. das oszillierende Auftreten von Maskin und daraus resultierend die Poly- und Deadenylierung der Cyclin B1-mRNA.

Die Translationsraten bleiben auch im Embryo bis zum Acht- und Sechzehnzellstadium niedrig, bis das embryonale Genom vollständig aktiviert ist. Trotzdem werden bereits erste Vorkehrungen getroffen, die die Wiederaufnahme der Translation erleichtern (Abb. 41). Die eIF4G-Phosphorylierung steigt wieder an, was dessen Affinität zum Cap-Bindungsprotein erhöht und die Bildung der eIF4F-Komplexe erleichtert. Die eIF4E-Phosphorylierung sinkt auf ein mittleres Niveau. 4E-BP1 tritt ab dem Vierzellstadium wieder in höheren Konzentrationen auf, ist dabei aber geringgradig dephosphoryliert und erscheint als β -Bande. So ist es noch nicht voll einsatzfähig, kann aber sehr schnell durch Einfluss von Kinasen aktiviert oder deaktiviert werden. Ob dieser Phosphorylierungsgrad selbst zur Repressionsregulation fähig ist, ist noch nicht bekannt.

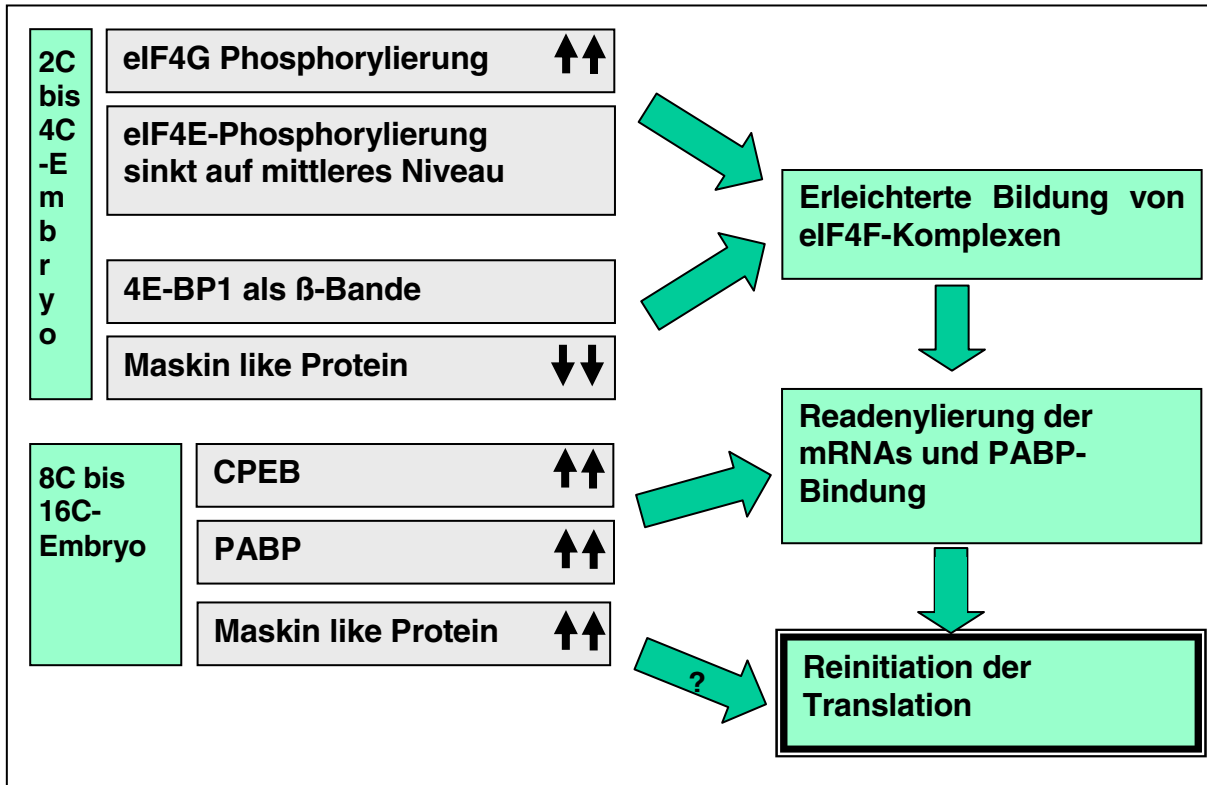
Die Translationsrepression durch geringe Konzentrationen an PABP und CPEB wird derweil vor allem noch im Zwei- und Vierzellstadium aufrechterhalten, bevor sich diese Proteinpopulationen langsam regenerieren und ab dem Sechzehnzeller wieder in normaler Konzentration für die Translation des embryonalen Genoms zur Verfügung stehen. Erst jetzt können wieder relativ unspezifische CPE-haltige mRNAs translatiert werden. Gerade im Acht- und Sechzehnzellstadium zeichnen sich bei beiden Proteinen wieder Bandshifts ab, die für modulatorische Prozesse an diesen Proteinen sprechen. Dazu passend ist auch Aurora A, die durch Phosphorylierung von CPEB die zytoplasmatische Polyadenylierung und damit die Translation stimulieren kann, im Zweizeller noch stark reduziert. Ihre weitere Entwicklung in den späteren Embryonalstadien muss noch untersucht werden. Das Maskin-Like-Protein wird in den Zwei- und Vierzellstadien ebenfalls deutlich reduziert. Es ist möglich, dass dies notwendig ist, um die stufenweise Reaktivierung durch zytoplasmatische Polyadenylierung nicht zu behindern. Ab dem Achtzeller ist es wieder in hoher Konzentration vorhanden.

Ab dem Entwicklungsstadium des Sechzehnzellers ist dann das embryonale Genom erstmals vollständig aktiviert und das Zurückgreifen auf maternale mRNAs nicht mehr nötig. Die ePABPs werden wieder durch das bekannte PABP ersetzt und die unspezifischen Translationsrepressoren 4E-BP1 und Paip2 werden wieder aktiviert, um, wenn nötig, auf extrazelluläre Reize zu reagieren. Für die Expressionsregulation der neu transkribierten embryonalen mRNAs steht nun wieder der volle Translationsapparat zur Verfügung.

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass die Regulation der Translation vor allem über die Kinaseaktivität und die daraus resultierende Phosphorylierung und Dephosphorylierung der beteiligten Proteine kontrolliert wird, die deren Interaktionen untereinander und mit der mRNA steuert. Aus den gewonnenen Erkenntnissen wird aber auch deutlich, dass es kein einzelner Mechanismus ist, der die Abschaltung der Translation in der MII-Eizelle und die stufenweise Reaktivierung spezifischer mRNAs im Embryo steuert. Stattdessen findet sich ein komplexes System, das rund um den Ringschluss der mRNA nach dem Closed-Loop-Modell von

Abb. 41: Reinitiation der Translation im frühen Embryo:

Bereits im Zweizellstadium beginnen Proteinmodifikationen, die die Bildung von eIF4F-Komplexen erleichtern, da diese für alle Translationsvorgänge notwendig sind. Ab dem Achtzellstadium wird die Readenylierung und anschließende Translationsinitiation CPE-haltiger mRNAs eingeleitet.



Mangus et al. (2003) durch Modifikationen der einzelnen Faktoren viele Kontrollmöglichkeiten bietet. Es ist wahrscheinlich, dass weitere Mechanismen ebenfalls an der Translationsregulation beteiligt sind. Zentraler Punkt weiterer Untersuchungen sollten mögliche spezifische Bindungssequenzen in der 3'UTR verschiedenster mRNAs und deren Bindungsproteine sein, die Einfluß nehmen könnten auf die zytoplasmatische Polyadenylierung.

Das Verständnis der genauen Kontrollkaskaden und Modifikationen an diesen für die zytoplasmatische Polyadenylierung besonders essentiellen Faktoren ermöglicht tiefere Einblicke in die Regulation der Translation in dieser Phase.

Bislang ist nur ein kleiner Teil dieses hochkomplexen Systems erforscht. Erschwerend bei der Analyse ist die Tatsache, dass wahrscheinlich in zeitlich nur geringen Abständen verschiedene Gruppen von mRNAs durch unterschiedliche Mechanismen aktiviert werden. Neue und verbesserte Analysemethoden, wie z.B. das High-Throughput-Screening und weitere Immunopräzipitationen mit neuen Antikörpern werden die Suche nach Interaktionspartnern bereits bekannter Proteine wie eIF4E und CPEB in großen Molekülbibliotheken unterstützen und so sind Erkenntnisse über neue Regulatoren zytoplasmatischer Polyadenylierung in Zukunft zu erwarten.

7. Verwendete Medien

7.1 Gewinnung und Vorbereitung von Untersuchungsmaterial

7.1.1 Herkunft der Eizellen und Gewinnung

7.1.1.1 Modifiziertes PBS (PBS +)

PBS+ (Aufbewahrung bei 4 °C max. 2 Wochen nach Herstellung)	
PBS- : PBS-Dulbecco mit Ca ²⁺ / Mg ²⁺ (Biochrom)	500 ml
Glucose (Merck)	500 mg
Sodium-Pyruvat (Serva)	18 mg
Penicillin (Sigma)	10 mg
Streptomycin (Sigma)	20 mg
Heparin (Sigma)	5,6 mg
Bovines Serum Albumin (Sigma)	150 mg

7.1.2 Eizellreifung

7.1.2.1 TCM 199 (sterilfiltriert, verschlossen bei 4 °C, max. 14 Tage)

Maturationsmedium TCM 199, pH 7,4	
Aqua Ampuwa (Fresenius)	100 ml
NaHCO ₃ (Serva)	220 mg
Gentamycinsulfat (Sigma)	5 mg
Sodium-Pyruvat (Serva)	2,2 mg
TCM 199 Hepes Modification (Sigma)	1510 mg

7.1.2.2 Herstellung von ECS

ECS (Estrus Cow Serum)
Herstellung: <ul style="list-style-type: none">- Blutentnahme aus der Schwanzvene von östrischen Kühen- Ruhezeit: 1 Stunde- Lösen des Blutes vom Rand- Zentrifugation 10-20 min- Entnahme des Serums- Zentrifugation 20 min- Überführung des Überstands in ein Becherglas- Erwärmen des Überstands im Wasserbad 65 °C für 30 min zur Inaktivierung- Abfüllen des ECS in den vorgefrorenen Vacutainer

7.1.3 In Vitro-Fertilisation

7.1.3.1 Sperm-TALP (sterilfiltriert, verschlossen bei 4 °C, max. 14 Tage)

7.1.3.2 Fert-TALP (sterilfiltriert, verschlossen bei 4 °C, max. 14 Tage)

	Sperm-TALP	Fert-TALP
Aqua Ampuwa (Fresenius)	125 ml	100 ml
NaHCO ₃ (Serva), extra gelöst	261,25 mg	210 mg
CaCl ₂ (Serva), extra gelöst	36 mg	30 mg
NaCl (Roth)	725 mg	666 mg
KCl (Serva)	28,75 mg	23,5 mg
NaH ₂ PO ₄ (Serva)	4,5 mg	4 mg
MgCl ₂ x 6H ₂ O (Serva)	38,75 mg	10 mg
Medium 199 HEPES Modification (Sigma)	297,5 mg	-
Phenolrot (Sigma)	1,25 mg	1 mg
Na-Lactat-Sirup 60% (Sigma)	460 µl	186 mg
BSA (Sigma)	750 mg	600 mg
Na-Pyruvat	22 mg	22 mg

7.1.3.3 Heparin-Lösung (sterilfiltriert, in Tubes zu je 100 µl bei -20 °C tiefgefroren; entspricht 1 Tube für 10 ml Fert-TALP)

Heparin-Lösung	
Aqua Ampuwa (Fresenius)	5 ml
Heparin (Sigma)	5 mg

7.1.3.4 Hypotaurin-Epinephrin-Lösung (sterilfiltriert, in Tubes zu je 360 µl bei -20 °C tiefgefroren; entspricht 1 Tube für 10 ml Fert-TALP)

Lösung 1:

0,9% NaCl-Lösung	20 ml
Hypotaurin	2,19 mg

Lösung 2:

Aqua Ampuwa (Fresenius)	50 ml
Na-Metabisulfat	50 mg
Na-Lactat-Sirup 60%	113 µl
HCl 37%	30 µl

Lösung 3:

Lösung 2	40 ml
Epinephrin	1,83 mg

Lösung 4:

Lösung 1	10 ml
Lösung 3	4 ml
0,9% NaCl-Lösung	16 ml

7.1.3.5 Gentamicin-Lösung (sterilfiltriert, in Tubes zu je 100 µl bei -20 °C tiefgefroren; entspricht 1 Tube für 10 ml Fert-TALP)

Gentamicin-Lösung	
Aqua Ampuwa (Fresenius)	2,5 ml
Gentamicin-Sulfat (Sigma)	12,5 mg

7.1.4 Kultivierung

s. TCM 199 (Kap. 7.1.2.1)

7.1.5 Vorbehandlung und Einfrieren

7.1.5.1 Hyaluronidase (sterilfiltriert, in Tubes zu je 500 µl bei -20 °C tiefgefroren)

Hyaluronidase (tiefgefroren in Tubes zu je 1 ml)	
Hyaluronidase (Sigma)	100 mg
PBS- : PBS-Dulbecco mit Ca ²⁺ / Mg ²⁺ (Biochrom)	100 ml

7.2 Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen

7.2.1 SDS-PAGE nach Laemmli (1970)

7.2.1.1 Polyacrylamid-Trenngel

Trenngel	7,5 %	8,0 %	10,0 %	12,5 %	13,0 %	15,0 %
Acrylamid / Bisacrylamid (30 : 0.8) (Serva)	7,5 ml	8,0 ml	10,0 ml	12,5 ml	13,0 ml	15,0 ml
Tris 1,5 mol/l (pH 8,8) (Roth)	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
d.d H ₂ O	14,5 ml	14,0 ml	12,0 ml	9,5 ml	9,0 ml	7,0 ml
SDS 10% (GE Healthcare)	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
APS 10% (Roth)	0,2 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
TEMED (GE Healthcare)	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Beispiele (je nach Untersuchungs-Absicht auch anders verwendet)	eIF4G (220 kDa) peIF4G mTOR (289 kDa)	PABP (73 kDa) MAPK(42-44 kDa)			eIF4E, peIF4E (25 kDa) 4E-BP1 (15-20 kDa)	

7.2.1.2 Polyacrylamid-Sammelgel

Sammelgel	5,0 %
Acrylamid / Bis (30 : 0.8) (Serva)	2,5 ml
Tris 0,5 mol/l (pH 6,8) (Roth)	3,8 ml
d.d H ₂ O	8,5 ml
SDS 10%	0,15 ml
APS 10%	0,3 ml
TEMED (GE Healthcare)	20 µl

7.2.1.3 Elektrophoresepuffer (Lagerung bei Raumtemperatur)

Elektrophoresepuffer 10fach konz.	
Tris 0,5 M (Roth)	60,5 g
Glycin (133 mM) (GE Healthcare)	100,0 g
SDS 10 %	10,0 g
d.d H ₂ O	1,0 l
Arbeitsverdünnung: 100 ml auf 900 ml d.d H₂O	

7.2.1.4 SDS-Probenpuffer

SDS-Probenpuffer Blue Loading Buffer	
SDS Probenpuffer 3 x (Cell Signaling)	0,9 ml
Reducing Agent 30 x (Cell Signaling)	100 µl

7.2.2 Western Blot

7.2.2.1 Puffer für den Western Blot

a) Anodenpuffer I (100 ml)		b) Anodenpuffer II (100 ml)		c) Kathodenpuffer (200 ml)	
Tris 1 mol/l (pH10,4)	30,0 ml	Tris 1 mol/l (pH10,4)	2,5 ml	Tris 1 mol/l (pH 9,4)	5,0 ml
d.d H ₂ O	60,0 ml	d.d H ₂ O	87,5 ml	d.d H ₂ O	175,0 ml
Methanol	10,0 ml	Methanol	10,0 ml	Methanol	20,0 ml
				Aminohexansäure	1,048 g

7.2.2.2 Tris Buffer Saline

Tris Buffer Saline 10x (pH7,5) (TBS)	
Tris 1 mol/l (Roth)	24,2 g
NaCl (Roth)	80,0 g
d.d H ₂ O	1,0 l

7.2.2.3 TTBS

Tris Buffer Saline + Tween 20 (TTBS)	
TBS	100,0 ml
d.d H ₂ O	899,0 ml
Tween 20 (Sigma)	1,0 ml

7.2.3 Immunoblotting

s. Tab. 4

7.2.4 ECL-Detektion

Lösung A	
Tris-HCl 0,1M (pH8,6)	200 ml
Luminol	50 mg

Lösung B	
Parahydroxycoumarinsäure (Sigma)	11 mg
DMSO	10 ml

ECL-Lösung	
Lösung A	1 ml
H ₂ O ₂ (30%)	30 µl
Lösung B	100 µl

7.2.5 Immunopräzipitation

Zell-Lysis-Puffer	
Tris (pH 7,5) (Roth)	20 mM
NaCl (Roth)	150 mM
EDTA (Sigma)	1 mM
EGTA (Sigma)	1 mM
Triton X-100 (Sigma)	1 %
Natrium-Pyrophosphat (Sigma)	2,5 mM
β-Glycerolphosphat (Serva)	1 mM
Na ₃ VO ₄ (Sigma)	1 mM
Leupeptin (Sigma)	1 µg/ml

8. Zusammenfassung:

Untersuchungen molekularer Mechanismen des Übergangs von Rindereizellen zu Embryonen: Prozesse der Translationsregulation – Interaktion zwischen dem 5'Initiationskomplex der Translation und 3'-Poly(A)-Bindungsproteinen während der meiotischen Endreifung und der frühen Embryonalentwicklung beim Rind

Die In-Vitro-Produktion (IVP) von Embryonen ist ein Standardverfahren der Tierzucht vor allem beim Rind. Trotzdem liegen die Blastozystenraten bei Oozyten mit morphologisch guter Qualität nur zwischen 30 und 40%. Besonders während der meiotischen Endreifung der Eizellen und der frühen Embryonalentwicklung werden entscheidende Grundlagen für die weitere Entwicklungsfähigkeit des Embryos gelegt.

Am Beginn der Eizellendreifung wird durch die Kondensation des Chromatins die Transkription fast vollständig eingestellt. Trotzdem findet sich vermehrt polyadenylierte mRNA, die jedoch kaum translatiert wird. Stattdessen ist in MII-Eizellen die Translation stark reprimiert. Damit kommt es zur Akkumulation translatorisch inaktiver mRNAs, die dem frühen Embryo vor Einsetzen der eigenen Transkription spezifisch aktivierbar zur Verfügung stehen. An diesem Punkt ist eine Regulation nur noch auf der Ebene der Translation möglich. Limitierend für die Proteinsyntheserate und zentraler Ansatzpunkt der Regulation ist dabei die Translationsinitiation. Von Bedeutung sind hierbei vor allem verschiedene Initiationsfaktoren und andere 5'- und 3'- interagierende Proteine und die diese kontrollierenden Kinasen. Es soll bewiesen werden, dass stadienspezifische Veränderungen im Auftreten und der Phosphorylierung dieser Faktoren für die Repression der Translation in MII-Eizellen und deren Reaktivierung im frühen Embryo verantwortlich sind.

Die wichtigsten Faktoren wurden im Rahmen dieser Arbeit anhand von in vitro gereiften bovinen Oozyten und Embryonen hinsichtlich ihres Vorkommens und ihrer Phosphorylierung im Verlauf der Eizellreifung und frühen Embryonalentwicklung mittels SDS-PAGE, Isoelektrischer Fokussierung, Western Blot und Immunopräzipitation analysiert. Dazu gehörten der eIF4F-Komplex mit dem Cap-Bindungsprotein eIF4E, dem Gerüstprotein eIF4G und der Helikase eIF4A, außerdem der Translationsrepressor 4E-BP1. Zu den 3'-interagierenden Proteinen gehörten PABP1 und 3; Paip1 und 2, CPEB1 und Maskin. Als verantwortliche Kinasen wurden MAPK, Akt und Aurora A und B untersucht.

Auf der Grundlage des „Closed Loop“-Modells von Mangus et al. (2003) ergibt sich daraus folgende stark vereinfachte Darstellung der Translationsinitiation: Das Cap-Bindungsprotein eIF4E bindet an die Cap-Struktur am 5'-Ende der mRNA. Durch Aurora A phosphoryliertes Cytoplasmic Polyadenylation Binding Protein CPEB rekrutiert mittels CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor) die Poly(A)-Polymerase, die den Poly(A)-Schwanz verlängert. Daran kann das Poly(A)-Bindungsprotein binden. Die Bildung des eIF4F-Komplexes durch

Bindung des Gerüstproteins eIF4G an 4E bringt die RNA-Helikase eIF4A in Position, so dass diese Sekundärstrukturen der mRNA auflösen kann und damit die Bindung des 43S-Präinitiationskomplexes ermöglicht. Nur all diese Proteininteraktionen gemeinsam stimulieren die Translation. Dies bietet viele Möglichkeiten der Translationsreprimierung. So kann am 5'-Ende das hypophosphorylierte 4E-BP 1 oder vom 3'-Ende der CPEB-Maskin-Komplex an eIF4E binden und damit über Blockade der Bildung des eIF4F-Komplexes die Helikaseaktivität verhindern. Gerade am Übergang der Eizelle zum Embryo dominieren jedoch spezifische Mechanismen. Es konnte durch unsere Untersuchungen gezeigt werden, dass gerade im Übergang von der MII-Phase zum Zweizellstadium die deutlichsten Veränderungen in Auftreten und Phosphorylierung der beteiligten Faktoren zu finden sind.

Darüber hinaus wurde gerade in der MII-Phase die stärkste Phosphorylierung spezifischer Zielsequenzen der Kinasen PKA, PKB, PKC, CDKs, ATM/ATR und MAPK nachgewiesen.

Bei der Betrachtung der einzelnen Phasen fällt auf, dass im GV-Stadium die von somatischer Translation bekannten Repressoren wie 4E-BP1 und Paip2 deutlich verringert werden und dafür ein neuer hemmender Faktor in Aktion tritt, der im Verlauf dieser Arbeit entdeckt und erstmals beschrieben wurde. Auf der Suche nach einem dem Repressor Maskin ähnlichen Faktor wurde mittels des Maskin-Antikörpers bei bovinen Eizellen ein Protein gefunden, das zwar mit 55kDa deutlich kleiner ist, aber ebenso eIF4E-Bindungsfähigkeit besitzt und eine „Coiled Coil“-Domäne aufweist. Nur die Bindung mit CPEB konnte nicht nachgewiesen werden. Aber es zeigt sich eindeutig, dass das Protein gerade im GV-Stadium die eIF4E-Bindung an das Cap blockiert und damit die Bildung des eIF4F-Komplexes reprimiert.

Während der weiteren Endreifung findet sich jedoch immer mehr hoch phosphoryliertes Maskin-Like-Protein im Durchlauf, so dass dies nicht die Hauptursache für die Translationsrepression im MII-Stadium sein kann.

Eine Verkettung verschiedener Mechanismen verhindert in diesem Stadium die Translationsinitiation. Wichtigstes Element scheint die Degradation von CPEB in diesem Stadium zu sein. Dadurch wird weniger CPSF und folglich auch weniger Poly(A)-Polymerase aktiviert, die mRNAs werden nicht polyadenyliert. PABP, das insgesamt nur in geringerer Menge in diesem Stadium vorkommt, kann dadurch kaum noch an den kurzen Poly(A)-Schwanz der mRNA binden. Damit steht es nicht für den Ringschluss der mRNA vermittelt durch das Gerüstprotein eIF4G zur Verfügung. Zudem wird eIF4G dephosphoryliert. Gemeinsam mit der fehlenden PABP-Bindung führt dies zu verminderter Affinität zum Cap-Bindungsprotein eIF4E, das zunehmend phosphoryliert wird. Der eIF4F-Komplex kommt damit nur schwach und in geringer Menge zustande, die Aktivität der Helikase eIF4A wird nicht ausgelöst. Damit kann der ribosomale Präinitiationskomplex nicht an die mRNA binden, die Translation unterbleibt.

Im frühen Embryo bis zum Vierzeller kehren die Faktoren schrittweise zu einem Status zurück, der den wenigen frühen, nicht CPE-gesteuerten mRNAs die Translation ermöglicht. Die Phosphorylierung von eIF4G steigt wieder an, die des Cap-Bindungsproteins sinkt auf ein mittleres Niveau. Damit wird die Bildung der eIF4F-Komplexe wieder erleichtert. Der Repressor 4E-BP1 weist mittlere Phosphorylierung auf. So ist er noch nicht aktiv, kann aber sehr schnell voll aktiviert werden. Das Maskin-Like-Protein kommt zunächst nur in geringen Mengen vor, steigt dann im Acht- und Sechzehnzeller. In dieser Phase steigt das Vorkommen von CPEB und PABP deutlich an. Dies führt zur Reinitiation auch der Translation der großen Masse CPE-abhängiger mRNAs.

In dieser Arbeit konnten Grundzüge der Translationsregulation am Übergang der Eizelle zum Embryo geklärt werden, es bleiben jedoch noch viele Fragen offen. Vor allem die Rolle des Maskin-Like-Proteins, Regulationsmechanismen der Translation früher mRNAs und die unterschiedlichen Gruppierungen der spät translatierten mRNAs bedürfen noch weiterer Untersuchungen.

9. Summary:

Analysis of molecular mechanisms at the transition of bovine oocytes to embryos:

Processes of translational regulation – Interaction between 5′ translation initiation complex and 3′ poly(A) binding proteins during meiotic maturation and early embryonic development in bovine

The In Vitro Production (IVP) of embryos is a standard method in animal husbandry mainly in cattle. Nevertheless, blastocyst rates do not rise above 40% even in morphologically good quality oocytes. Crucial conditions for embryonal viability are established during meiotic maturation of the oocytes and early embryonic development.

At the beginning of meiotic maturation the chromatin condensation inhibits the transcription almost completely. Nevertheless, we find an increasing amount of polyadenylated but rarely translated mRNA. In MII-oocytes the translation is strongly repressed. This results in accumulation of polyadenylated, but translational inactive mRNAs, which are available for specific activation to the early embryo before his own transcription starts. At this point regulation is only possible at the level of translation. The limiting step for protein synthesis and central regulation mechanism is the initiation of translation. Here, especially the translation initiation factors, other 5′- and 3′-interacting proteins and their controlling kinases are of importance. We want to proof that statespecific changes in abundance and phosphorylation of 5′ and 3′ binding proteins are responsible for the repression of translation in MII-oocytes and the reactivation in early embryos.

In this work the most important factors were analysed with regard to their abundance and phosphorylation state during meiotic maturation and early embryonic development using bovine, in vitro derived oocytes and embryos. Used methods were SDS-PAGE, isoelectric focusing, Western Blot and immunoprecipitation. Analysis included as 5′- interacting factors the eIF4F-complex composed of the cap binding protein eIF4E, the scaffold protein eIF4G and the helicase eIF4A and additionally the translational repressor 4E-BP1. Moreover we analysed PABP1 and 3, Paip1 and 2, CPEB1 and Maskin as 3′-interacting proteins and MAPK, Akt und Aurora A and B as controlling kinases.

Based on the Closed Loop-Model by Mangus et al. (2003) it is possible to create the following, strongly simplified model of translation initiation: The cap binding protein eIF4E binds the cap structure at the 5′ end of the mRNA. Following its phosphorylation by Aurora A, the cytoplasmic polyadenylation binding protein CPEB recruits CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor) that activates the poly(A)-polymerase (PAP), which elongates the poly(A)-tail. This gives the Poly(A)-Binding Protein PABP the possibility to bind. The formation of the eIF4F-complex with binding of eIF4G to eIF4E brings eIF4A into position to resolve secondary structures and allows the binding of the 43S preinitiation complex. Only all

of these protein interactions together stimulate the translation. This offers lots of different possibilities to repress translation. The hypophosphorylated 4E-BP1 at the 5'-end and the CPEB-Maskin-complex from the 3'-end can bind to eIF4E and in this way block the formation of the eIF4F-complex and the helicase activity. But especially at the oocyte to embryo transition very specific mechanisms are dominant. Our findings show that especially at the transition from MII-stage to two-cell-embryo the most striking differences in abundance and phosphorylation of the involved factors are to be found.

Furthermore, major phosphorylation of specific target sequences of PKA, PKB, PKC, CDKs, ATM/ATR and MAPK was observed in MII stage oocytes.

Closer examination of the different stadiums shows that in GV-stage the abundance of translational repressors 4E-BP1 and Paip2 is strongly reduced and a new repressing factor takes their place, which was discovered and described for the first time during this research. Looking for a Maskin related factor using a Maskin antibody we found a 55kDa protein, which is much smaller, but has eIF4E binding ability and possesses a coiled coil domain. Only a binding to CPEB could not be verified. However it was clearly shown that especially in GV-stage the Maskin like protein blocks eIF4E-binding to the Cap and the formation of the eIF4F-complex. But during further meiotic maturation the Maskin like protein is phosphorylated and lots of it can be found in supernatant. So it can't be the most responsible factor for translational repression in MII-oocytes.

Interlinking of different mechanisms seems to be the real cause. The most important part is the degradation of CPEB in this stage. Due to this there is no activation of CPSF and Poly(A)-Polymerase, mRNAs do not become polyadenylated, the additionally reduced PABP is less likely to bind to the shortened Poly(A) tail. As a consequence it is not available for the closure of the mRNA ring. Missing PABP-binding and dephosphorylation of eIF4G strongly reduce its binding affinity to eIF4E, which becomes even more phosphorylated during maturation. Formation of the eIF4F-complex is inhibited, such as the activity of eIF4A. Consequently the ribosomal translation initiation complex can't bind to the mRNA, therefore translation is repressed.

In the early embryo until four cell stage the factors gradually return to a state, which facilitates translation of some early, not CPE-controlled mRNAs. Phosphorylation of eIF4G rises, that of eIF4E decreases to a middle level. Both simplify the formation of eIF4F. The repressor protein 4E-BP1 shows a middle phosphorylation state. So it is not active, but easily and promptly to activate. The maskin like protein can be found in a minor amount in early stages, its abundance rises slowly in eight and sixteen cell stage. At this time the expression of CPEB and PABP increases strongly. This causes reinitiation of translation of the big amount CPE-dependent mRNAs.

In this work basic structures of translation regulation at the oocyte to embryo transition could be explained, but there are lots of questions remaining. Especially the role of Maskin like protein, regulatory mechanisms for the translation of early mRNAs and the different subtypes of late translated mRNAs need to be further investigated.

10. Literaturverzeichnis

Adams, G. P.; Evans, A. C.; Rawlings, N. C. (1994): Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-months-old prepubertal heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 100 : 1, S. 27-33

Agca, Y.; Monson, R. L.; Northey, D. L.; Mazni, O. A.; Schaefer, D. M.; Rutledge, J. J. (1998): Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: normal calving, birth weight and gestation lengths. *Theriogenology* 50 : 1, S.147-162

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (2004): *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley VCH Verlag (4. Auflage). Weinheim

Altman, M.; Schmitz, N.; Berset, C.; Trachsel, H. (1997): A novel inhibitor of cap-dependent translation initiation in yeast: p20 competes with eIF4G for binding to eIF4E. *The EMBO Journal* 16 : 5, S. 1114-1121

Barnard, D. C.; Cao, Q.; Richter, J. D. (2005): Differential phosphorylation controls maskin association with eukaryotic translation initiation factor 4E and localization on the mitotic apparatus. *Molecular and Cellular Biology* 25 : 17, S. 7605-7615

Bavister, B. D.; Yanagimachi, R. (1977): The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro. *Biology of Reproduction* 16 : 2, S. 228-237

Bazer, F. W.; Spencer, T. E. Johnson, G. A.; Burghardt, R. C.; Wu, G. (2009): Comparative aspects of implantation. *Reproduction* 138 : 2, S. 195-209

Behboodi, E.; Anderson, G. B.; BonDurant, R. H.; Cargill, S. L.; Kreuzer, B. R.; Medrano, J. F.; Murray, J. D. (1995): Birth of large calves that developed from in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 44 : 2, S. 227-232

Belsham, G. J.; Sonenberg, N. (1996): RNA-protein interactions in regulation of picornavirus RNA translation. *Microbiological reviews* 60 : 3, S. 499-511

Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L. (2006): *Biochemistry*. International Edition. Palgrave Macmillan (6. Auflage)

Betteridge, K. J.; Eaglesome, M. D.; Randall, G. C.; Mitchell, D. (1980): Collection, description and transfer of embryos from cattle 10-16 days after oestrus. *Journal of reproduction and fertility* 59 : 1, S. 205-216

Bhojwani, M. (2004): Comparison of protein expression and protein phosphorylation during in vitro maturation of bovine oocytes – A proteomic approach –. *Med. Inaugural-Dissertation*. Rostock

Bolanos-Garcia, V. M. (2005): Aurora kinases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37, S. 1572–1577

Brackett, B. G.; Bousquet, D.; Boice, M. L.; Donawick, W. J.; Evans, J. F.; Dressel, M. A. (1982): Normal development following in vitro fertilisation in the cow. *Biology of Reproduction* 27, S.147-158

Brunn, G. J.; Hudson, C. C.; Sekulic, A.; Williams, J. M.; Hosoi, H.; Houghton, P. J.; Lawrence, J. C.; Abraham, R. T. (1997): Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science* 277, S. 99-101

Cao, Q.; Richter J.D. (2002): Dissolution of the maskin-eIF4E complex by cytoplasmic polyadenylation and poly(A)-binding protein controls cyclin B1 mRNA translation and oocyte maturation. *The EMBO Journal* 21 : 14, S. 3852-3862

Caron, S.; Charon, M.; Cramer, E.; Sonenberg, N.; Dusanter-Fourt, I. (2004): Selective modification of eukaryotic initiation factor 4F (eIF4F) at the onset of cell differentiation: recruitment of eIF4GII and long-lasting phosphorylation of eIF4E. *Molecular and Cellular Biology* 24 : 11, S. 4920-4928

Castagnetti, S.; Hentze, M. W.; Ephrussi, A.; Gebauer, F. (2000): Control of Oskar mRNA translation by Bruno in a novel cell-free system from *Drosophila* ovaries. *Development* 127, S. 1063-1068

Castagnetti, S.; Ephrussi, A. (2003): Orb and a long poly(A)-tail are required for efficient oskar translation at the posterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Development* 130, S. 835-843

Charlesworth, A.; Ridge, J. A.; King, L. A.; MacNicol, M. C.; MacNicol, A. M. (2002): A novel regulatory element determines the timing of Mos mRNA translation during *Xenopus* oocyte maturation. *The EMBO Journal* 21, S. 2798-2806

Charlesworth, A.; Cox, L. L.; MacNicol, A. M. (2004): Cytoplasmic polyadenylation element (CPE)- and CPE-binding protein (CPEB)-independent mechanisms regulate early class maternal mRNA translational activation in *Xenopus* oocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 279 : 17, S. 17650-17658

Coller, J.; Parker, R. (2004): Eukaryotic mRNA decapping. *Annual Review of Biochemistry* 73, S. 861-90

Cosson, B.; Braun, F.; Paillard, L.; Blackshear, P.; Beverley Osborne, H. (2004): Identification of a novel *Xenopus laevis* poly(A) binding protein. *Biology of the Cell* 96, S. 519-527

Craig, A. W.; Haghighat, A.; Yu, A. T.; Sonenberg, N. (1998): Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature* 392 : 6675, S. 520-523

Crozet, N. (1989): Nuclear structure and RNA synthesis in mammalian oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement 38, S. 9-16 Review

De Benedetti, A.; Harris, A.L. (1999): eIF4E expression in tumours: its possible role in progression of malignancies. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 31, S. 59-72

De La Fuente, R.; Eppig, J. J. (2001): Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodelling. *Developmental biology* 229 : 1, S. 224-236

De Vantéry, C.; Stutz, A.; Vassalli, J. D.; Schorderet-Slatkine, S. (1997): Acquisition of meiotic competence in growing mouse oocytes is controlled at both translational and posttranslational levels. *Developmental Biology* 187 : 1, S. 43-54

- Dostie, J.; Ferraiuolo, M.; Pause, A.; Adams, S.A.; Sonenberg, N. (2000): A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E. *The EMBO Journal* 19, 3142-3156
- Dreyfuss, G.; Hentze, M.; Lamond, A.I. (1996): From Transcript to Protein. *Cell* 85, S. 963-972
- Driancourt, M. A.; Locatelli, A.; Prunier, A. (1995): Effects of gonadotrophin deprivation on follicular growth in gilts. *Reproduction Nutrition Development* 35 : 6, S. 663-673
- Eckert, J.; Niemann, H. (1995): In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein free media. *Theriogenology* 43 : 7, S. 1211-1225
- Ellederová, Z.; Kovárová, H.; Melo Sterza, F. A.; Livingstone, M.; Tomek, W.; Kubelka, M. (2006): Suppression of translation during in vitro maturation of pig oocytes despite enhanced formation of cap-binding protein complex eIF4F and 4E-BP1 hyperphosphorylation. *Molecular Reproduction and Development* 73 : 1, S. 68-76
- Ellederová, Z.; Cais, O.; Susor, A.; Uhlířová, K.; Kovárová, H.; Jelínková, L.; Tomek, W.; Kubelka, M. (2008): ERK1/2 map kinase metabolic pathway is responsible for phosphorylation of translation initiation factor eIF4E during in vitro maturation of pig oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 75 : 2, S. 309-317
- Eppig, J. J.; O'Brien, M.; Wigglesworth, K. (1996): Mammalian oocyte growth and development in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 44 : 2, S. 260-273
- Eppig, J. J. (1991a): Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays* 13 : 11, S. 569-574
- Eppig, J. J. (1991b): Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte-granulosa cell complexes developed in vitro from preantral follicles. *Biology of Reproduction* 45 : 6, S. 824-30
- Fan, H. Y.; Sun, Q. Y. (2004): Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction* 70, S. 535–547
- Fan, H.-Y.; Tong, C.; Lian, L.; Li, S.-W.; Gao, W.-X.; Cheng, Y.; Cheng, D.-Y.; Schatten, H.; Sun, Q.-Y. (2003): Characterization of ribosomal S6 protein kinase p90rsk during meiotic maturation and fertilization in pig oocytes: mitogen-activated protein kinase-associated activation and localization. *Biology of Reproduction* 68 : 3, S. 968-977
- Farin, C. E.; Hasler, J. F.; Martus, N. S.; Stokes, J. E. (1997): A comparison of Menezes's B2 and tissue culture Medium-199 for in vitro production of bovine blastocysts. *Theriogenology* 48 : 5, S. 699-709
- Fernandez, J.; Yaman, I.; Sarnow, P.; Snider, M.D.; Hatzoglou, M. (2002): Regulation of internal ribosomal entry site-mediated translation by phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha. *The Journal of Biological Chemistry* 277 : 21, S. 19198-19205
- Fraser, C. S.; Pain, V. M.; Morley, S. J. (1999): Cellular stress in *Xenopus* kidney cells enhances the phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor (eIF)4E and the association of eIF4F with poly(A)-binding protein. *The Biochemical journal* 342 : 3, S. 519–526
- Fulka, J.; Kopečný, V.; Trebichavský, I. (1972): Studies on oogenesis in the early postnatal pig ovary. *Biology of Reproduction* 6 : 1, S. 46-50

- Fulka, J. Jr.; Motlík, J.; Fulka, J.; Crozet, N. (1985): Inhibition of nuclear maturation in fully grown porcine and mouse oocytes after their fusion with growing porcine oocytes. *The Journal of Experimental Zoology* 235 : 2, S. 255-259
- Furuichi, Y.; LaFiandra, A.; Shatkin, A. J. (1977): 5'-terminal structure and mRNA stability *Nature* 266 : 5599, S. 235-239
- Gallie, D. R. (1998): A tale of two termini. A functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. *Gene* 216 : 1, S. 1–11
- Gan, W.; La Celle, M.; Rhoads, R.E. (1998): Functional characterisation of the internal ribosome entry site of eIF4G mRNA. In: *The Journal of Biological Chemistry* 273 : 9, S. 5006-5012
- Gavin, A. C.; Ni Ainle, A.; Chierici, E.; Jones, M.; Nebreda, A. R. (1999): A p90(rsk) mutant constitutively interacting with MAP kinase uncouples MAP kinase from p34(cdc2)/cyclin B activation in *Xenopus* oocytes. *Molecular Biology of the Cell* 10 : 9, S. 2971-86
- Gebauer, F.; Xu, W.; Cooper, G. M.; Richter, J. D. (1994): Translational control by cytoplasmic Polyadenylation of c-mos mRNA is necessary for oocyte maturation in the mouse. *The EMBO Journal* 13 : 23, S. 5712-5720
- Gebauer, F.; Hentze, M. W. (2004): Molecular mechanisms of translational control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5 : 10, S. 827-835
- Gilchrist, R. B.; Ritter, L. J.; Armstrong, D. T. (2004): Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal Reproduction Science* 82-83, S. 431-446
- Görlach, M.; Burd, C. G.; Dreyfuss, G. (1994): The mRNA poly(A)-binding protein: localization, abundance, and RNA-binding specificity. *Experimental cell research* 211 : 2, S. 400–407
- Gingras, A. C.; Svitkin, Y.; Belsham, G. J.; Pause, A.; Sonenberg, N. (1996): Activation of the translational suppressor 4E-BP1 following infection with encephalomyocarditis virus and poliovirus. *PNAS* 93 : 11, S. 5578-5583
- Gingras, A. C.; Kennedy, S. G.; O'Leary, M. A.; Sonenberg, N.; Hay, N. (1998): 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signalling pathway. *Genes and Development* 12 : 4, S. 502-513
- Gingras, A. C.; Raught, B.; Sonenberg, N. (1999): eIF4 translation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annual Reviews of Biochemistry*. 68, S. 913-963
- Gingras, A. C.; Raught, B.; Gygi, S. P.; Niedzwiecka, A.; Miron, M.; Burley, S. K.; Polakiewicz, R. D.; Wyslouch-Cieszynska, A.; Aebersold, R.; Sonenberg, N. (2001): Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes and Development* 15 : 21, S. 2852-2864
- Gordon, I.: *Laboratory Production of Cattle Embryos* (2. Edition), *Biotechnology in Agricultural Series*, No. 27; CABI Publishing, Cromwell Press. Trowbridge 2003
- Goossen, B.; Caughman, S.W.; Harford, J.B.; Klausner, J.B.; Hentze, M.W. (1990): Translational repression by a complex between the iron-responsive element of ferritin mRNA and its specific cytoplasmic binding protein is position dependent in vivo. *The EMBO Journal* 9 : 12, S. 4127-4133

- Goto, K.; Kajihara, Y.; Kosaka, S.; Koba, M.; Nakanishi, Y.; Ogawa, K. (1988): Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in vitro fertilization of in vitro matured follicular oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* 83, S. 753
- Gradi, A.; Imataka, H.; Svitkin, Y. V.; Raught, B.; Morino, S.; Sonenberg, N. (1998): A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. *Molecular and Cellular Biology* 18 : 1, S. 334-342
- Groisman, I.; Huang, I. S.; Mendez, R.; Cao, Q.; Theurkauf, W.; Richter, J. D. (2000): CPEB, Maskin, and Cyclin B1 mRNA at the mitotic apparatus: implications for local translational control of cell division. *Cell* 103 : 3, S. 435 - 447
- Groisman, I.; Jung, M. Y.; Sarkissian, M.; Cao, Q.; Richter, J. D. (2002): Translational control of the embryonic cell cycle. *Cell* 109, S. 473
- Gross, J. D.; Moerke, N. J.; V. d. Haar, T.; Lugovskoy, A. A.; Sachs, A. B.; McCarthy, J. E. G.; Wagner, G. (2003): Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell* 115, S. 739-750
- Guzeloglu-Kayisli, O.; Pauli, S.; Demir, H.; Lalioti, M. D.; Sakkas, D.; Seli, E. (2008): Identification and characterization of human embryonic poly(A) binding protein (EPAB). *Molecular Human Reproduction* 14 : 10, S.581-588
- Hagemann, L. J.; Weilert, L. L.; Beaumont, S. E.; Tervit, H. R. (1998): Development of bovine embryos in single in vitro production (sIVP) systems. *Molecular Reproduction and Development* 51 : 2, S.143-147
- Haghighat, A.; Sonenberg, N. (1997): eIF4G dramatically enhances the binding of eIF4E to the mRNA 5' cap structure. *The Journal of Biological Chemistry* 272 : 35, S. 21677-21680
- Hake, L. E.; Richter, J. D. (1994): CPEB is a specificity factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation. *Cell* 79, S. 617-627
- Heikinheimo, O.; Gibbons, W.E. (1998): The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine. *Molecular Human Reproduction* 4 : 8, S. 745-756
- Hentze, M. W.; Muckenthaler, M. U.; Andrews, N. C. (2004): Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117 : 3, S. 285-297
- Hodgman, R.; Tay, J.; Mendez, R.; Richter, J. D. (2001): CPEB phosphorylation and cytoplasmic polyadenylation are catalyzed by the kinase IAK1/Eg2 in maturing mouse oocytes. *Development* 128, S. 2815-2822
- Hundsdoerfer, P.; Thoma, C.; Hentze, M. W. (2005): Eukaryotic translation initiation factor 4G1 and p97 promote cellular internal ribosome entry sequence-driven translation. *PNAS* 102 : 38, S. 13421-13426
- Hyttel, P.; Xu, K. P.; Smith, S.; Greve, T. (1986): Ultrastructure of in vitro maturation in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 78 : 2, S. 615-625
- Imataka, H.; Olsen, H. S.; Sonenberg, N. (1997): A new translational regulator with homology to eukaryotic translation initiation factor 4G. *The EMBO Journal* 16 : 4, S. 817-825

- Imataka, H.; Sonenberg, N. (1997): Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. *Molecular and Cellular Biology* 17 : 12, S. 6940-6947
- Imataka, H.; Gradi, A.; Sonenberg, N. (1998): A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *The EMBO journal* 17 : 24, S. 7480–7489
- Jaffe, L. A.; Gould, M. (1985): Polyspermy-preventing mechanisms. In: Metz, C. B.; Monroy, A. (editors) *Biology of Fertilization*. Academic, New York. S. 223-250
- Jarrell, V.L.; Day, B.N.; Prather, R.S. (1991): The transition from maternal to zygotic control of development occurs during the 4-cell stage in the domestic pig, *Sus scrofa*: quantitative and qualitative aspects of protein synthesis. *Biology of Reproduction* 44, S. 62-68
- Jones, K.T. (2004): Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Molecular Human Reproduction* 10 : 1, S. 1-5
- Joshi, B.; Cai, A. - L.; Keiper, B. D.; Minich, W. B.; Mendez, R.; Beach, C. M.; Stepinski, J.; Stolarski, R.; Darzynkiewicz, E.; Rhoads, R. E. (1995): Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E at Ser 209. *Journal of Biological Chemistry* 270, S. 14597-14603
- Joshi, B.; Cameron, A.; Jagus, R. (2004): Characterisation of mammalian eIF4E-family members. *European Journal of Biochemistry* 271, S. 2189-2203
- Kanitz, W.; K.-P. Brüssow; F. Becker; H. Torner; F. Schneider, M.; Kubelka u. W. Tomek (2001): Comparative aspects of follicular development, follicular and oocyte maturation and ovulation in cattle and pigs. *Achives of Animal Breeding* 44, S. 9-23
- Kahvejian, A.; Svitkin, Y. V.; Sukarieh, R.; M'Boutchou, M. N.; Sonenberg, N. (2005): Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes and development* 19 : 1, S. 104–113
- Kempf, B. J.; Barton, D. J. (2008): Poliovirus 2A(Pro) increases viral mRNA and polysome stability coordinately in time with cleavage of eIF4G. *The Journal of Virology* 82 : 12, S. 5847-5859
- Khaleghpour, K.; Kahvejian, A.; Crescenzo, G. de; Roy, G.; Svitkin, Y. V.; Imataka, H. et al. (2001): Dual interactions of the translational repressor Paip2 with poly(A) binding protein. *Molecular and cellular biology* 21 : 15, S. 5200–5213
- Kim-Ha, J.; Kerr, K.; Macdonald, P. M. (1995): Translational regulation of the oskar mRNA by bruno, an ovarian RNA-binding protein is essential. *Cell* 81 : 3, S. 403-412
- Kleijn, M.; Scheper, G. C.; Voorma, H. O.; Thomas, A. A. M. (1998): Regulation of translation initiation factors by signal transduction. *European Journal of Biochemistry* 253, S. 531-544
- Kobayashi, H.; Minshull, J.; Ford, C.; Golsteyn, R; Poon, R.; Hunt, T. (1991): On the synthesis and destruction of A- and B-type cyclins during oogenesis and meiotic maturation in *Xenopus laevis*. *Journal of Cell Biology* 114 : 4, S. 755-765
- Kotani, T.; Yamashita, M. (2002): Discrimination of the roles of MPF and MAP kinase in morphological changes that occur during oocyte maturation. *Developmental Biology* 252 : 2, S. 271-286

Kozak, M. (1999): Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 234 : 2, S. 187-208

Kubelka, M.; Motlik, J.; Schultz, R. M.; Pavlok, A. (2000): Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes. Without influencing chromosome condensation activity. *Biology of Reproduction* 62 : 2, S. 292-302

Kubiak, J. Z.; Weber, M.; de Pennart, H.; Winston, N. J.; Maro, B. (1993): The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule dependent destruction of cyclin B in presence of CSF. *The EMBO Journal* 12 : 10, S. 3773-3778

Kruip, T. A. M.; Den Daas, J. H. G (1997): In vitro produced and cloned embryos: Effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology*, 47 : 1, S. 43-52

Kyhse-Andersen, J. (1984): Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 10 : 3-4, S.203-209

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Lamphear, B. J.; Kirchweger, R.; Skern, T.; Rhoads, R.E. (1995): Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. *The Journal of Biological Chemistry* 270, S. 21975-21983

Le, H.; Browning, K. S.; Gallie, D. R. (2000): The phosphorylation state of poly(A)-binding protein specifies its binding to poly(A) RNA and its interaction with eukaryotic initiation factor (eIF) 4F, eIFiso4F, and eIF4B. *The Journal of biological chemistry* 275 : 23, S. 17452–17462

Lefebvre, C.; Terret, M. E.; Djiane, A.; Rassnier, P.; Maro, B.; Verlhac, M. H. (2002): Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. *The Journal of Cell Biology* 157 : 4, S. 603-613

Leibfried, L.; First, N. L. (1979): Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *Journal of Animal Science* 48 : 1, S. 76-86

Leibfried-Ruthledge, M. L.; Critser, E. S.; Parrish, J. J.; First, N. L. (1989): In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 31, S. 61-74

Lewis, J.D.; Izaurralde, E. (1997): The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export. *European Journal of Biochemistry* 247, S. 461-469

Li, J.; Meyer, A. N.; Donoghue, D. J. (1997): Nuclear localization of cyclin B mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94 : 2, S. 502-507

Li, Q.; Imataka, I.; Morino, S.; Rogers, G. W.; Richter-Cook, N. J.; Merrick, W. C.; Sonenberg, N. (1999): Eukaryotic translation initiation factor 4AIII (eIF4AIII) is functionally distinct from eIF4AI and eIF4AII. *Molecular Cell Biology* 19, S. 7336-7346

Li, W.; Belsham, G.J.; Proud, C.G. (2001): Eukaryotic initiation factors 4A (eIF4A) and 4G (eIF4G) mutually interact in a 1 : 1 ration in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 276, S. 29111-29115

Liang, C. G.; Su, Y. Q.; Fan, H. Y.; Schatten, H.; Sun, Q. Y (2007): Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen activated protein kinase. *Molecular Endocrinology* 21 : 9, S. 2037-2055

Ling, J.; Morley, S.J.; Traugh, J. (2005): Inhibition of cap dependent translation via phosphorylation of eIF4G by protein kinase Pak2. *The EMBO Journal* 24 : 22, S. 4094-4105

Lomakin, I. B.; Hellen, C. U.; Pestova, T. V.; (2000): Physical association of eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) with eIF4A strongly enhances binding of eIF4G to the internal ribosomal entry site of encephalomyocarditis virus and is required for internal initiation of translation. *Molecular and Cellular Biology* 20, S. 6019-6029

Mader, S.; Lee, H.; Pause, A.; Sonenberg, N. (1995): The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Molecular and Cellular Biology* 15, S. 4990-4997

Mangus, D. A.; Evans, M. C.; Jacobson, A. (2003): Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the posttranscriptional control of gene expression. *Genome Biology* 4 : 7 : 223, S. 1-14

Maquat, L. E. (2005): Nonsense mediated mRNA decay in mammals. *The Journal of Cell Science* 118 : Pt 9, S. 1773-1776

Marcotrigiano, J.; Gingras, A.-C.; Sonenberg, N.; Burley, S.K. (1997): Co-crystal structure of the messenger RNA 5' cap binding protein (eIF4E) bound to methyl-GDP. *Cell* 89, S. 951-961

Martineau, Y.; Derry, M. C.; Wang, X.; Yanagiya, A.; Berlanga, J. J.; Shyu, A. B.; Imataka, H.; Gehring, K.; Sonenberg, N. (2008): Poly(A)-binding protein-interacting protein 1 binds to eukaryotic translation initiation factor 3 to stimulate translation. *Molecular and Cellular Biology* 28, S. 6658-6667

Marx, U. (2002): Experimentelle Untersuchungen zur Effizienzsteigerung der In-vitro-Produktion von Rinderembryonen durch die Fertilisation aktivierter Oozyten sowie durch Vorbehandlung züchterisch wertvoller Schlachtkühe mit eCG. Dissertation Universität Hannover

Masui, Y.; Markert, C. L. (1971): Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *The Journal of Experimental Zoology* 177 : 2, S. 129-145

Mathews, M. B.; Sonenberg, N.; Hershey, J. W. B. (1996): Origins and targets of translational control. Mathews, M. B.; Hershey, J. W. B. (Eds.): *Translational control*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, S. 1-29

Mathews, M. B.; Sonenberg, N.; Hershey, J. W. B. (2000): Origin and principles of translational control. Sonenberg, N.; Hershey, J. W. B.; Mathews, M. B.; (Eds.): *Translational Control of Gene Expression*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, S. 1-31

McKendrick, L.; Pain, V. M.; Morley, S. J.; (1999): Translation initiation factor 4E. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 31, S. 31-35

McKendrick, L.; Thompson, E.; Ferreira, J.; Morley, S.J.; Pain, V.M.; Lewis, J.D. (2001): Interaction of eukaryotic initiation factor 4G with the nuclear cap-binding complex provides a link between nuclear and cytoplasmic functions of the m⁷ guanosine cap. *Molecular and Cellular Biology* 21 : 11, S. 3632-3641

- Meijer, H. A.; Thomas, A. A. (2002): Control of eukaryotic protein synthesis by upstream open reading frames in the 5'-untranslated region of an mRNA. *Biochemical Journal* 367 : Pt 1, S. 1-11
- Melo, E. O.; Dhalia, R.; Martins de Sa, C.; Standart, N.; de Melo Neto, O. P. (2003): Identification of a C-terminal poly(A)-binding protein (PABP)-PABP interaction domain: role in cooperative binding to poly (A) and efficient cap distal translational repression. *Journal of Biological Chemistry* 278 : 47, S. 46357-46368
- Melo Sterza, F. (2003): Untersuchungen zur zytoplasmatischen Reifung von Eizellen des Rindes: Analyse der Regulation der Translation während der meiotischen Endreifung. Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover
- Methot, N.; Pause, A.; Hershey, J. W.; Sonenberg, N. (1997): The translation initiation factor eIF-4B contains an RNA-binding region that is distinct and independent from its ribonucleoprotein consensus sequence. *Molecular and Cellular Biology* 14 : 4, S. 2307-2316
- Meyuhas, O. (2000): Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *European Journal of Biochemistry* 267 : 21, S. 6321-6330
- Michel, Y. M.; Borman, A. M.; Paulous, S.; Kean, K. M. (2001): Eukaryotic initiation factor 4G-poly(A) binding protein interaction is required for poly(A) tail-mediated stimulation of picornavirus internal ribosome entry segment-driven translation but not for X-mediated stimulation of hepatitis C virus translation. *Molecular and cellular biology* 21 : 13, S. 4097-4109
- Minich, W. B.; Balasta, M. L.; Goss, D. J.; Rhoads, R.E. (1994): Chromatographic resolution of in vivo phosphorylated and nonphosphorylated eukaryotic translation initiation factor eIF-4E: increased cap affinity of the phosphorylated form. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, S. 7668-7672
- Mitchell, P.; Tollervey, D. (2000): mRNA stability in eukaryotes. *Current Opinion in Genetics and Development* 10, S. 193-198
- Mitchell, P.; Tollervey, D. (2001): mRNA Turnover. *Current Opinion in Cell Biology* 13, S. 320-324
- Moor, R.; Mattioli, M.; Ding, J.; Nagai, T. (1990): Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* 40, S. 197-210
- Morino, S.; Hazma, H.; Ozaki, M.; Teraoka, Y.; Shibata, S.; Doi, M.; Ueda, H.; Ishida, T.; Uesugi, S. (1996): Analysis of the mRNA cap binding ability of human eukaryotic initiation factor-4E by use of recombinant wild-type and mutant forms. *European Journal of Biochemistry* 239, S. 597-601
- Morino, S.; Imataka, H.; Svitkin, Y.V.; Pestova, T.V.; Sonenberg, N. (2000): Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding site and the middle one-third of eIF4GI constitute the core domain for cap-dependent translation, and the C-terminal one third functions as a modulatory region. *Molecular and Cellular Biology* 20 : 2, S. 468-477
- Motlik, J.; Fulka, J. (1986): Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*, 25, 87-96
- Motlik, J.; Pavlok, A.; Kubelka, M.; Kalous, J.; Kalab, P. (1998): Interplay between Cdc2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology* 49, S. 461-469

- Muckenthaler, M.U.; Preiss, T. (2008): Mechanismen der Translationskontrolle in Eukaryonten. In: Ganten, D.; Ruckpaul, K.: Grundlagen der molekularen Medizin. 3. Auflage Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Nebreda, A. R.; Ferby, I. (2000): Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Current Opinion in Cell Biology* 12 : 6, S. 666-675
- Nebreda, A. R.; Hunt, T. (1993): The c-mos proto-oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell free extracts of *Xenopus* oocytes and eggs. *The EMBO Journal* 12 : 5, S. 1979-1986
- Niedzwiecka, A.; Marcorigiano, J.; Stepinski, J.; Jankowska-Anyszka, M.; Wyslouch-Cieszynska, A.; Dadlez, M.; Gingras, A. C.; Mak, P.; Darzynkiewicz, E.; Sonenberg, N.; Burley, S. K.; Stolarski, R. (2002): Biophysical studies of eIF4E cap binding protein: recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins. *The Journal of Molecular Biology* 319, S. 615-635
- Niemann, H.; Meinecke, B. (1993): In Vitro Produktion von Embryonen. In: Embryotransfer und assoziiert Biotechniken bei landwirtschaftlichen Nutztieren. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, S. 85-104
- Nigg, E. A. (1995): Cyclin dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 17 : 6, S. 471-480
- Padmanabhan, K.; Richter, J.D. (2006): Regulated PUMILIO-2 binding controls RINGO/Spy mRNA translation and CPEB activation. *Genes and Development* 20, S. 199-209
- Pain, V.M. (1996): Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. In: *European Journal of Biochemistry* 236, S. 747-771
- Parrish, J. J.; Susko-Parrish, J. L.; Leibfried-Ruthledge, M. L.; Critser, E. S.; Eyestone, W. H.; First, N.L. (1986): Bovine in vitro fertilisation with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25 : 4, S. 591-600
- Pause, A.; Belsham, G.J.; Gingras, A.-C., Donzé, O.; Lin, T.A.; Lawrence, J. C. Jr.; Sonenberg, N. (1994): Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5' cap function. *Nature* 371, S. 762-767
- Pavlok, A.; Kaláb, P.; Bobák, P. (1997): Fertilisation competence of bovine naturally matured or aged oocytes derived from different antral follicles: morphology, protein synthesis, H1 and MBP kinase activity. *Zygote* 5 : 3, S. 235-246
- Paynton, B. V.; Bachvarova, R. (1994): Polyadenylation and deadenylation of maternal mRNAs during oocyte growth and maturation in the mouse. *Molecular Reproduction and Development* 37 : 2, S. 172-180
- Pestova, T. V.; Borukhov, S. I.; Hellen, C. U. (1998): Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* 394 : 6696, S. 854-859
- Pestova, T. V.; Hellen, C. U. (2001): Functions of eukaryotic factors in initiation of translation. *Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology* 66, S. 389-396
- Pestova, T. V.; de Breyne, S.; Pisarev, A. V.; Abaeva, I. S.; Hellen, C. U. (2008): eIF2-dependent and eIF2-independent modes of initiation on the CSFV IRES: a common role of domain II. *The EMBO Journal* 27 : 7, S. 1060-1072

- Philpott, A.; Yew, P. R. (2008): The *Xenopus* cell cycle: an overview. *Molecular Biotechnology* 39 : 1, S. 9-19
- Piron, M.; Vende, P.; Cohen, J.; Poncet, D. (1998): Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4G1 and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *The EMBO Journal* 17 : 19, S. 5811-5821
- Preiss, T.; Hentze, M.W. (1999): From factors to mechanisms: translation and translational control in eukaryotes. In: *Genetics and Development* 9, S. 515-521
- Proud, C. G. (2005): eIF2 and the control of cell physiology. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 16 : 1, S. 3-12
- Ptushkina, M.; Von der Haar, T.; Karim, M. M.; Hughes, J. M. X.; McCarthy, J. E. G. (1999): Repressor binding to a dorsal regulatory site traps human eIF4E in a high cap-affinity state. *The EMBO Journal* 18 : 14, S. 4068-4075
- Pyronnet, S.; Imataka, H.; Gingras, A.-C.; Fukunaga, R.; Hunter, T.; Sonenberg, N. (1999): Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits Mnk1 to phosphorylate eIF4E. *The EMBO Journal* 18 : 1, S. 270-279
- Racki, W. J.; Richter, J. D. (2006): CPEB controls oocyte growth and follicle development in the mouse. *Development* 133, S.4527-4537
- Radford, H. E.; Meijer, H. A.; de Moor, C. H. (2008): Translational control of cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* oocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1779 : 4, S. 217-229
- Raught, B.; Gingras, A. C. (1999): eIF4E activity is regulated at multiple levels. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 31, S. 43-57
- Raught, B.; Gingras, A. C.; Sonenberg, N. (2000): Regulation of ribosomal recruitment in eukaryotes. Sonenberg, N.; Hershey, J. W. B.; Mathews (eds.): *Translational Control of Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Richter, J.D.; Sonenberg, N. (2005): Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433, S. 477-480
- Rousseau, D.; Kaspar, R.; Rosenwald, I.; Gehrke, L.; Sonenberg, N. (1996): Translation initiation of ornithin decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 messenger RNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E. *Proc. Natl. Sci. USA* 93, S. 1065-1070
- Rozen, F.; Edery, I.; Meerovitch, K.; Dever, T. E.; Merrick, W. C.; Sonenberg, N. (1990): Bidirectional RNA-helicase activity of eukaryotic translation initiation factors 4A und 4F. In: *Molecular Cell Biology* 10, S. 1134-1144
- Rüsse, I.; Sinowatz, F.: *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. Parey Verlag (2. Auflage). Berlin 1998
- Sagata, N.; Watanabe, N.; Vande Woude, G. F.; Ikawa, Y. (1989): The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature* 342, 512-518
- Salamone, D. F.; Damiani, P.; Fissore, R. A.; Robl, J. U.; Duby, R. T. (2001): Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. *Biology of Reproduction* 64, S. 1761-1768

Salaün, P.; Boulben, S.; Mulner-Lorillon, O.; Bellé, R.; Sonenberg, N.; Morales, J.; Cormier, P. (2005): Embryonic-stage-dependent changes in the level of eIF4E-binding proteins during early development of sea urchin embryos. *Journal of Cell Science* 118, S. 1385-1394

Salaün, P.; Pyronnet, S.; Morales, J.; Mulner-Lorillon, O.; Bellé, R.; Sonenberg, N.; Cormier, P. (2003): eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation in the first mitotic division of the sea urchin embryo. *Developmental Biology* 255, S. 428-439

Scheper, G. C.; Proud, C. G. (2002): Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation. *European Journal of Biochemistry* 269, S. 5350-5359

Schinzel, A.: Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS). Universität Zürich, www.medgen.uzh.ch, PDF-Dokument

Seli, E.; Lalioti, M. D.; Flaherty, S. M.; Sakkas, D.; Terzi, N.; Steitz, J. A. (2005): An embryonic poly(A)-binding protein (ePAB) is expressed in mouse oocytes and early preimplantation embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 : 2, S. 367-72

Siemer, C.; Smiljakovic, T.; Bhojwani, M.; Leiding, C.; Kanitz, W.; Kubelka, M.; Tomek, W. (2009): Analysis of mRNA associated factors during bovine oocyte maturation and early embryonic development. *Molecular Reproduction and Development* 76 : 12, S. 1208-1219

Sirard, M. A.; P. Blondin (1996): Oocyte maturation and IVF in cattle. *Animal Reproduction Science* 42, S. 417-426

Sirard, M. A.; Richard, F.; Mayes, M. (1998): Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. *Theriogenology* 49 : 2, S. 483-497. Review

Smiljakovic, T.; Melo Sterza, F.; Kubelka, M.; Vohnikova, Z.; Tomek, W. (2003): Aspects of cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Interplay between MAPK, mRNA-cap binding complex and cytoplasmic mRNA metabolism in regulation of translation. *Biotechnology in Animal Husbandry* 19 : 3-4, S.1-8

Smiljakovic, T.: Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: analysis of signaling cascades and factors which contribute to the meiotic maturation of bovine oocytes. *Rer. Nat. Dissertation*. Rostock 2006

Sommerville, J.; Ladomery, M. (1996): Masking of mRNA by Y-box proteins. *FASEB Journal* 10 : 4, S. 435-443

Sonenberg N. (1988): Cap-binding proteins of eucaryotic mRNA: function in initiation and control of translation. *Microbiology Reviews* 44, S. 173-225

Sonenberg N. (1996): mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of the cell growth. Hershey, J.; Mathews, M.; Sonenberg, N. (cd.): *Translational Control*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., S. 271-294

Sonenberg, N.; Gingras, A. C. (1998): The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and the control of cell growth. *Current Opinion in Cell Biology* 10 : 2, S. 268-275

Stebbins-Boaz, B.; Hake, L.E.; Richter, J.D. (1996): CPEB controls the cytoplasmic polyadenylation of cyclin, Cdk2 and c-mos mRNAs and is necessary for oocyte maturation in *Xenopus*. *The EMBO Journal* 15 : 10, S. 2582-2592

- Stebbins-Boaz, B.; Cao, O.; de Moor, C. H.; Mendez, R.; Richter, J. D. (1999): Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with eIF-4E. *Molecular Cell* 4 : 6, S. 1017-1027
- Sun, Q. Y.; Wu, G. M.; Lai, L.; Bonk, A.; Cabot, R.; Park, K. W.; Day, B. N., Prather, R. S.; Schatten, H. (2002): Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphorylation, microtubule organization, chromatin behavior, and cell cycle progression by protein phosphatases during pig oocyte maturation and fertilization in vitro. *Biology of Reproduction* 66, S. 580-588
- Susor, A.; Jelínková, L.; Karabínová, P.; Torner, H.; Tomek, W.; Kovárová, H.; Kubelka, M. (2008): Regulation of cap-dependent translation initiation in the early stage porcine parthenotes. *Molecular Reproduction and Development* 75 : 12, S. 1716-1725
- Taieb, F.; Thibier, C.; Jessus, C. (1997): On cyclins, oocytes and eggs. *Molecular Reproduction and Development* 48 : 3, S. 397-411
- Tarun, S. Z.; Sachs, A. B. (1995): A common function for mRNA 5' and 3' ends in translation initiation in yeast. *Genes and Development* 9 : 23, S. 2997-3007
- Tarun, S. Z.; Sachs, A. B. (1997): Binding of eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) to eIF4G represses translation of uncapped mRNA. *Molecular and Cellular Biology* 17 : 12, S. 6876-6886
- Thach, R. E. (1992): Cap recap: the involvement of eIF-4F in regulating gene expression. *Cell* 68 : 2, S. 177-180
- Tomek, W.; Melo Sterza, F. A.; Kubelka, M.; Wollenhaupt, K.; Torner, H.; Anger, M.; Kanitz, W. (2002): Regulation of translation during in vitro maturation of bovine oocytes: the role of MAP kinase, eIF4E (cap binding protein) phosphorylation and eIF4E-BP1. *Biology and Reproduction* 66, S. 1274-1282
- Tomek, W.; Torner, H.; Kanitz, W. (2002): Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. *Reproduction in Domestic Animals* 37 : 2, S. 86-91
- Tomek, W.; Smiljakovic, T. (2005): Activation of Akt (protein kinase B) stimulates metaphase I to metaphase II transition in bovine oocytes. *Reproduction* 130, S. 423-430
- Torner, H.; Kubelka, M.; Heleil, B.; Tomek, W.; Aim, H.; Kuzmina, T.; Guiard, V. (2001): Dynamics of meiosis and protein kinase activities in bovine oocytes correlated to prolactin treatment and follicle size. *Theriogenology* 55 : 4, S. 885-899
- Tulsiani, D. R.; Yoshida-Komiya, H.; Araki, Y. (1997): Mammalian fertilisation: a carbohydrate-mediated event. *Biology of Reproduction* 57 : 3, S. 487-494
- Tunquist, B. J.; Maller, J. L. (2003): Under arrest: cytosolic factor (CSF)-mediated metaphase in vertebrate eggs. *Genes and Development* 17 : 6, S. 683-710
- Uchida, N.; Hoshino, S.; Imataka, H.; Sonenberg, N.; Katada, T. (2002): A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in Cap/Poly(A)-dependent translation. *The Journal of biological chemistry* 277 : 52, S. 50286-50292
- Uzbekova, S.; Arlot-Bonnemains, Y.; Dupont, J.; Dalbiès-Tran, R.; Papillier, P.; Penetier, S.; Thélie, A.; Perreau, C.; Mermillod, P.; Prigent, C.; Uzbekov, R. (2008): Spatio-temporal expression patterns of aurora kinases A, B, and C and cytoplasmic polyadenylation-

element-binding protein in bovine oocytes during meiotic maturation. *Biology of Reproduction* 78, S. 218-233

Vagner, S.; Galy, B.; Pyronnet, S. (2001): Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *The EMBO Reports* 2 : 10, S. 893-898

Van der Velden, A.W.; Thomas, A.W. (1999): The role of the 5'-untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 31 : 1, S. 87 - 106

Verlhac, M. H.; Lefebvre, C.; Kubiak, J. Z.; Umbhauer, M.; Rassinier, P.; Colledge, W.; Maro, B. (2000): Mos activates MAP kinase in mouse oocytes through two opposite pathways. *The EMBO Journal* 19 : 22, S. 6065-6074

Vilela, C.; Velasco, C.; Ptushkina, M.; McCarthy, J. E. G. (2000): The eukaryotic mRNA decapping protein Dcp1 interacts physically and functionally with the eIF4F translation initiation complex. *The EMBO Journal* 19 : 16, S. 4372-4382

Von Der Haar, T.; Ball, P. D.; McCarthy, J. E. (2000): Stabilisation of eukaryotic initiation factor 4E binding to the mRNA 5'-Cap by domains of eIF4G. *The Journal of Biological Chemistry* 275 : 39, S. 30551-30555

Wakiyama, M.; Imataka, H.; Sonenberg, N. (2000): Interaction of eIF4G with poly(A)-binding protein stimulates translation and is critical for *Xenopus* oocyte maturation. *Current Biology* 10 : 18, S. 1147-1150

Wang, Z.; Lin, H. (2007): Sex-lethal is a target of Bruno-mediated translational repression in promoting the differentiation of stem cell progeny during *Drosophila* oogenesis. *Developmental Biology* 302 : 1, S. 160-168

Waskiewicz A. J.; Flynn, A.; Proud, C. G.; Cooper, J. A. (1997): Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *The EMBO Journal* 16 : 8, S. 1909-1920

Waskiewicz, A. J.; Johnson, J. C.; Penn, B.; Mahalingham, M.; Kimball, S.R.; Cooper, J. A. (1999): Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. *Molecular and Cellular Biology* 19, S. 1871-1880

Wassarman, P. M.; Letourneau, G. E. (1976): Meiotic maturation of mouse oocytes in vitro: association of newly synthesized proteins with condensing chromosomes. *Journal of Cell Science* 20 : 3, S. 549-568

Wassarman, P. M.; Albertini, D. F. (1994): The mammalian ovum. *The Physiology of Reproduction* (ed. E. Knobil and J. D. Neill), S. 79-122. Raven Press, NY.

Wassarman, P. M.; Litscher, E. S. (2008): Mammalian fertilisation: the egg's multifunctional zona pellucida. *The International Journal of Developmental Biology* 52 : 5-6, S. 665-676

Webster, P.J.; Liang, L.; Berg, C.A.; Lasko, P.; MacDonald, P.M. (1997): Translational repressor bruno plays multiple roles in development and is widely conserved. *Genes and Development* 11, S. 2510-2521

Wehrend, A.; Meinecke, B. (2001): Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during in vitro maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. *Animal Reproduction Science* 66 : 3-4, S. 175-184

Wells, S. E.; Hillner, P. E.; Vale, R. D.; Sachs, A. B. (1998): Circularisation of mRNA by Eukaryotic Translation Initiation Factors. *Molecular Cell* 2, S. 135-140

Wilhelm, J. E.; Hilton, M.; Amos, Q.; Henzel, W. J. (2003): Cup is an eIF4E binding protein required for both the translational repression of oskar and the recruitment of Barentz. *The Journal of Cell Biology* 163 : 6, S. 1197-1204

Wilkie, G.S.; Dickson, K.S.; Gray, K.K.: Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'UTR-binding factors. *Trends in Biochemical Sciences* 28:4 (2003), 182-188

Wilkie, G. S.; Gautier, P.; Lawson, D.; Gray, N. K. (2005): Embryonic Poly(A)-binding protein stimulates translation in germ cells. *Molecular and Cellular Biology* 25 : 5, S. 2060-2071

Wolf, E.; Arnold, G. J.; Bauersachs, S.; Beier, H. M.; Blum, H.; Einspanier, R.; Fröhlich, T.; Herrler, A.; Hiendleder, S.; Kölle, S.; Prella, K.; Reichenbach, H. D.; Stojkovic, M.; Wenigerkind, H.; Sinowatz, F. (2003): Embryo-maternal communication in bovine – strategies for deciphering a complex cross-talk. *Reproduction in Domestic Animals*. 38 : 4, S. 276-289

Yang, D.-Q.; Kastan, M. B. (2000): Participation of ATM in insulin signalling through phosphorylation of eIF-4E-binding protein 1. *Nature Cell Biology* 2, S. 893-898

Zuberek, J.; Wyslouch-Cieszyńska, A.; Niedzwiecka, A.; Dadlez, M.; Stepinski, J.; Augustyniak, W.; Gingras, A. C.; Zang, Z.; Burley, S.; Sonenberg, N.; Stolarski, R.; Darzynkiewicz, E. (2003): Phosphorylation of eIF4E attenuates its interaction with mRNA 5' cap analogs by electrostatic repulsion : Intein mediated protein ligation strategy to obtain phosphorylated protein. *RNA* 9, S. 52-61

Publikation:

Siemer, C.; Smiljakovic, T.; Bhojwani, M.; Leiding, C.; Kanitz, W.; Kubelka, M.; Tomek, W. (2009): Analysis of mRNA associated factors during bovine oocyte maturation and early embryonic development. *Molecular Reproduction and Development* 76 : 12, S. 1208-1219

Danksagung

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. Kanitz für die Überlassung des Themas, die herzliche Aufnahme am Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie des Leibniz-Instituts für Nutztierbiologie sowie für seine Betreuung und Hilfe auch im organisatorischen Bereich danken.

Meinem Betreuer Herrn Dr. Wolfgang Tomek gilt ganz besonderer Dank für die große fachliche Unterstützung und die wertvollen Anregungen im Bereich der molekularbiologischen Arbeiten, bei der Erstellung wissenschaftlicher Vorträge und bei der Abfassung der Dissertation. Vor allem möchte ich ihm danken, dass er selbstlos und geduldig mit seinem großen Wissensschatz und großer Begeisterung für das Thema immer für mich da war und mir über die ganze Zeit meiner Dissertation zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Mein Dank gilt auch den anderen Mitarbeitern im Bereich Fortpflanzungsbiologie der FBN, die jederzeit für alle Fragen offen waren und mich immer freundlich in ihren Kreis aufgenommen haben. Insbesondere danke ich Frau Gesine Krüger, die mir bei der gemeinsamen Arbeit im Labor der FBN geduldig sehr viel erklärt und beigebracht hat und deren Herzlichkeit das Arbeiten einfach schöner gemacht hat.

Herrn Dr. Leiding und Herrn Dr. Nohner vom Besamungsverein Neustadt an der Aisch (BVN) danke ich für die Bereitstellung des betriebseigenen IVP-Labors für meine experimentellen Arbeiten für ihre Unterstützung meiner Arbeit und ihr allzeit offenes Ohr für Fragen und Probleme.

Auch allen Mitarbeitern des BVN, im Besonderen Gerhard Ernst, möchte ich für ihre Freundlichkeit und die herzliche Aufnahme danken und dafür, dass immer jemand da war, wenn man Hilfe brauchte.

Ganz besonders danke ich auch meiner Mit-Doktorandin Christina Schuh für die geduldige Einführung in die Laborpraxis der In-vitro-Produktion.

Der Karl Eibl-Stiftung Neustadt a.d. Aisch möchte ich für die Finanzierung meiner Arbeit durch mein Stipendium und Bereitstellung meiner Forschungsmittel danken.

Meiner Familie, insbesondere meinem Mann Sebastian und meinen Eltern, sowie allen Freunden danke ich aus ganzem Herzen für ihr Verständnis, ihre Unterstützung, ihr offenes Ohr und ihre helfende Hand.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Ansbach, den 10. Oktober 2010

Corinna Siemer