

## **Untersuchungen zur Regulation der cap-abhängigen Translation während der meiotischen Endreifung von Eizellen des Rindes.**

F. Melo Sterza<sup>1</sup>, W. Kanitz<sup>2</sup>, C. Leidig<sup>1</sup>, H.P. Nohner<sup>1</sup> und W. Tomek<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>BVN Neustadt/ Aisch, <sup>2</sup>FBN Dummerstorf, Abt. Reproduktionsbiologie

Beim Einsatz von in vitro Reifungstechniken können weltweit in Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial 20-35% transfertaugliche Blastozysten erzeugt werden. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die verwendeten Reifungssysteme suboptimal sind. Während die Kernreifung anhand morphologischer Veränderungen relativ gut beurteilt werden kann, sind die biochemischen Prozesse der zytoplasmatischen Reifung nur bruchstückhaft bekannt.

Um einen Beitrag zur Aufklärung zytoplasmatischer Regulationsprozesse zu leisten, wurde die Aktivierung spezifischer Proteinkinasen (cdc2-, MAP Kinase) und potentielle Zielmoleküle (Regulator der Translation eIF4E) im Verlauf der In vitro Reifung untersucht.

Frühere Analysen zeigten, dass die Genexpression während der meiotischen Endreifung hauptsächlich auf Translationsebene reguliert wird. Der Initiationsfaktor eIF4E spielt dabei eine bedeutende Rolle, da seine Aktivität in somatischen Zellen als begrenzend für die Translationsrate angesehen wird. Die Wirkung dieses Initiationsfaktors wird durch Phosphorylierung reguliert. Über die Interdependenzen in Eizellen ist nichts bekannt.

Wir untersuchten mittels isoelektrischer Fokussierung und Western Blotting, den Phosphorylierungsgrad von eIF4E während der IVM von Eizellen des Rindes. Die Ergebnisse zeigten, dass eIF4E im GV-Stadium vollständig in nicht phosphorylierter Form vorliegt. Die Phosphorylierung des Faktors beginnt im Zeitraum des GVBD und setzt sich bis zur Metaphase II fort. Zu diesem Zeitpunkt ist eIF4E vollständig phosphoryliert. Diese Phosphorylierung korreliert zeitlich mit der Aktivierung von MAP- und cdc2-Kinase.

Die Inhibition der cdc2 Kinase und indirekt der MAP Kinase durch Butyrolakton I führte zu einer Arretierung der Eizellen im GV-Stadium und zu einer vollständigen und reversiblen Inhibition der eIF4E Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu führte eine Inhibition des MAP Kinase Weges durch den spezifischen MEK Inhibitor PD098059 nur zu einer Verzögerung des GVBD und der Phosphorylierung von eIF4E. Diese Ergebnisse zeigen, dass eIF4E über den MAP-Kinase Weg phosphoryliert wird und dass die Aktivierung von MAP Kinase in Eizellen des Rindes, im Gegensatz zu somatischen Zellen, nur partiell MEK abhängig ist.

Die Analyse der Translationsaktivität während der IVM zeigte ein Maximum im Zeitraum des GVBD. Metaphase II Oozyten zeigten nur basale Werte wie im GV Stadium. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der Tatsache, dass eIF4E in der Metaphase II vollständig phosphoryliert ist. Daraus leiten wir die Hypothese ab, dass ein spezifischer Repressor die Wirkung von eIF4E in MII Oozyten verhindert. Ein potentieller Kandidat ist ein 4E-Bindungsprotein, das kürzlich in somatischen Zellen nachgewiesen wurde. Die Untersuchungen dazu in Eizellen werden fortgesetzt.

Die vertieften Kenntnisse der Regulationsprozesse während der meiotischen Endreifung können zur Etablierung mehrstufiger Reifungssysteme beitragen, die eine synchrone Kern- und Zytoplasmareifung gewährleisten und die Ausbeute an transfertauglichen Embryonen erhöhen.