

## Zytoplasmatische Veränderungen bei Stutenoozyten während der Eizellreifung in vitro

H. Torner, H. Alm, W. Tomek, R. Pöhland, W. Kanitz

Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie, Forschungsinstitut für die Biologie  
landwirtschaftlicher Nutztiere, Dummerstorf

Auf Grund der begrenzten Verfügbarkeit von equinen Oozyten haben Techniken der Embryonenproduktion in vitro beim Pferd nur einen vergleichsweise geringen Entwicklungsstand. Die Entwicklungskompetenz von in vitro gereiften Oozyten nach ICSI und IVF ist stark von der Cumulummorphologie der Cumulus-Oozyten-Komplexe (COK) vor der Reifung abhängig. Stutenoozyten mit expandiertem Cumulus bei Reifungsbeginn weisen nach ICSI (Hinrichs et al., 2005) oder nach IVF (Alm et al., 2001) die höhere embryonale Entwicklungsfähigkeit auf. Die Ursache für diese unterschiedliche Entwicklungskompetenz der verschiedenen COK-Gruppen ist wahrscheinlich in einer differentiellen zytoplasmatischen Ausreifung der Oozyten begründet.

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen bestand daher in der vergleichenden Charakterisierung zytoplasmatischer Reifungsvorgänge bei equinen Oozyten mit kompaktem und expandiertem Cumulus bei Reifungsbeginn.

Bei gleichzeitiger Vitalfärbung mit dem Fluoreszenzmarker MitoTracker CMTM Ros für die Atmungsaktivität in den Mitochondrien und mit Hoechst 33342 für das Chromatin im Nukleus konnte eine genaue Zuordnung von mitochondrialer Aggregation und Aktivität im Ooplasma zum meiotischen Kernzustand während der IVM getroffen werden (n=144 Oozyten).

Auf Grund der regulatorischen Bedeutung von Proteinkinasen für die meiotische Endreifung von Oozyten wurden zusätzlich die Aktivität der MAP-Kinase und der Proteinkinase Akt im Reifungsverlauf bei Oozyten beider COK-Gruppen untersucht (288 Oozyten).

Equine Oozyten mit expandiertem Cumulus bei Reifungsbeginn weisen im Vergleich zu Oozyten mit kompaktem Cumulus in der ersten Phase der IVM (0 -18 h) fortgeschrittene Stadien der Meiose ( $P < 0.05$ ) und Mitochondrien in zunehmender Aggregation ( $P < 0.05$ ) auf. Während Oozyten aus dieser Gruppe eine kontinuierliche Zunahme ihrer mitochondrialen Aktivität im Reifungsverlauf (0 - 32 h) erfahren, fällt die mitochondriale Aktivität bei Oozyten aus der kompakten COK-Gruppe zwischen 24 und 32 h IVM ab. Während es in der Phase der Ausschleusung des Polkörpers (Telophase I bis Metaphase II) zu einer signifikanten Zunahme der mitochondrialen Aktivität bei Oozyten aus der expandierten COK-Gruppe kommt, verringert sich diese bei Oozyten aus kompakten COK ( $P < 0.05$ ).

Auch die Analyse der Aktivität der Proteinkinasen Akt und MAP im Reifungsverlauf erbrachte gruppenspezifische Unterschiede bei den equinen Oozyten. So befindet sich die Proteinkinase Akt bei Oozyten der expandierten COK-Gruppe bereits bei Reifungsbeginn in einer phosphorylierten Form. Dieser Zustand wird bei Oozyten der kompakten COK-Gruppe erst nach 12 h IVM erreicht. Die beiden Isoformen der MAP-Kinase ERK1 und ERK2 konnten in Oozyten aus beiden COK-Gruppen nachgewiesen werden, jedoch war deren Phosphorylierungsgrad bei Oozyten der expandierten COK-Gruppe nach IVM deutlich höher.

Unsere Untersuchungen belegen den unterschiedlichen zytoplasmatischen Ausreifungsprozess von expandierten und kompakten Stutenoozyten während der IVM. Die höhere Entwicklungskompetenz von schon vor Reifungsbeginn expandierten equinen COK könnte auf deren erhöhter mitochondrialer Aktivität und dem stärkeren Phosphorylierungsgrad der MAP-Kinase unmittelbar nach Reifungsende beruhen.

## Referenzen

Alm H, Torner H, Blottner S, Nürnberg G, Kanitz W, 2001: Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on in vitro fertilization of horse oocytes. *Theriogenology* 56;817-829.

Hinrichs K, Choi YH, Love LB, Varner DD, Love CC, Walckeneer BE, 2005: Chromatin configuration within germinal vesicle of horse oocytes: changes post mortem and relationship to meiotic and developmental competence. *Biol Reprod* 72;1142-1150.