

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>	<u>15</u>
2.1.1 Kernreifung.....	16
2.1.2 Zytoplasmareifung.....	17
2.1.3 Biochemische Reifungsvorgänge.....	18
<u>2.2 Befruchtung und frühe Embryonalentwicklung.....</u>	<u>20</u>
<u>2.3 Zellzyklus der Oozyten.....</u>	<u>21</u>
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>	<u>24</u>
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>	<u>31</u>
<u>2.6 Möglichkeiten der Translationsregulation.....</u>	<u>32</u>
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 Sechzehnzellstadium.....</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 Sechzehnzellstadium.....	77
5.3.6.2	Genaue 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