

**Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer)**

Die Aktivierung des Arylhydrocarbonrezeptors während der *In-vitro*-Reifung von Säugetieroozyten

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)**

**vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**von Daniela Olatunji, geb. Nestler
geboren am 30.05.1982 in Merseburg**

**Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer
2. Prof. Dr. med. vet. Christine Wrenzycki (Hannover)
3. Prof. Dr. med. Hermann M. Behre (Halle/Saale)**

Eröffnungsdatum des Promotionsverfahrens: 02.02.2010

Datum der Verteidigung: 03.09.2010

Referat und bibliografische Beschreibung

Der Arylhydrocarbonrezeptor (AhR), ein durch Liganden aktivierter Transkriptionsfaktor, wurde bezüglich seiner Rolle als Vermittler toxischer Effekte von Umweltgiften, wie zum Beispiel 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin (TCDD), untersucht. Neuere Studien berichten über eine potentielle Rolle des AhR in der Physiologie des Ovars, insbesondere bei der Reifung der Oozyten. Das Ziel der hier vorliegenden Studie ist die Analyse der AhR-Aktivierung und seiner Rolle während der *In-vitro*-Maturation (IVM) von Säugetieroozyten aus physiologischer und toxikologischer Sicht. Dafür wurden Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOKs) vom Rind während der *In-vitro*-Reifung mit dem Serin/Threoninkinaseinhibitor 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP), mit einem Inhibitor der Proteinbiosynthese, Cycloheximide, und einem spezifischen Inhibitor der MAPK-Kinase, PD98059, behandelt und die Wirkung auf IVM und die Expression der AhR-Zielgene mit Hilfe molekularbiologischer Techniken auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Unter der Behandlung mit 6-DMAP konnte eine signifikante Reduktion der Kernreifungsrate sowie der Transkription von CYP1A1 und der MAP-Kinase (MAPK) beobachtet werden. Cycloheximide inhibierte die Reifung der KOKs, zeigte jedoch keinen signifikanten Einfluß auf die Expression von CYP1A1. PD98059 führte zu einer 3-stündigen Verzögerung der Aktivierung von CYP1A1 und MAPK während der IVM. Diese Ergebnisse legen eine Beteiligung von Serin/Threoninkinasen an der Regulation des AhR während der Maturation von Rinderoozyten nahe. Des Weiteren wurde untersucht, ob und unter welchen Umständen der AhR in Kumulus-Oozyten-Komplexen vom Schwein aktiviert wird und wie sich in der Entwicklung befindliche Oozyten durch exogene AhR-Liganden in ihrer Reifung beeinflussen lassen. Die Ergebnisse zeigen, dass es während der *In-vitro*-Reifung von KOKs vom Schwein zu einer konstitutiven Induktion von CYP1A1 kommt und lassen somit auf eine Aktivierung des AhR durch die Anwesenheit noch unbekannter endogener Liganden schließen. Die Anwesenheit von exogenen Liganden des AhR, in diesem Fall β -Naphthoflavone, führte über eine Induktion von Apoptose in den Kumuluszellen zur Ovotoxizität. Die Tatsache, dass dieser Effekt bei Anwesenheit von Follikelflüssigkeit im Maturationsmedium nicht auftrat, deutet auf noch nicht identifizierte Komponenten in der Follikelflüssigkeit mit einer protektiven Rolle gegenüber schädlichen exogenen Liganden für die Eizellreifung hin.

Olatunji, Daniela: Die Aktivierung des Arylhydrocarbonrezeptors während der *In-vitro*-Reifung von Säugetieroozyten.

Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Arylhydrocarbonrezeptor	1
1.1.1	Eigenschaften und Funktion	1
1.1.2	Ah-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion	3
1.1.3	Ah-Rezeptor-Zielgene	4
1.1.4	Die toxikologische Rolle des AhR im Ovar	4
1.1.5	Die physiologische Rolle des AhR im Ovar	6
1.2	Die Interaktion zwischen dem AhR und der <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> (MAP-Kinase)	7
1.2.1	Die Funktion von Phosphorylierungen/Dephosphorylierungen bei der Regulation der Reifung	7
1.2.2	Maturation Promoting Factor (MPF)	8
1.2.3	<i>Mitogen activated Protein Kinase (MAP-Kinase)</i>	8
1.2.4	MAPK und AhR	11
1.3	Ziel der Arbeit	12
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	Chemikalien	14
2.1.2	Geräte und Gebrauchswaren	16
2.1.3	Primer und Antikörper	18
2.1.4	Gebrauchslösungen	19
2.2	Präparation der Medien	20
2.3	Gewinnung und Selektion der Kumulus-Oozyten-Komplexe	21
2.4	Kultivierung der Kumulus-Oozyten-Komplexe	22
2.5	Zytogenetische Beurteilung der Oozyten	22
2.5.1	Fixation und Färbung der Oozyten	22
2.5.2	Beurteilung der Kernreifungsstadien der Oozyten	23
2.6	Quantitative Analyse der apoptotischen Zellen	23
2.7	Extraktion der mRNA	23
2.8	Synthese der cDNA	24
2.9	Semiquantitative PCR-Reaktion	24
2.10	SDS-Elektrophorese	25
2.11	Westernblot	26
3	Ergebnisse	28
3.1	Induktion eines meiotischen Arrest und der Einfluß auf die Expression des AhR-Zielgenes CYP1A1 und die Reifung der Rindereizellen (IVM-Rate)	28

Inhaltsverzeichnis	II
3.1.1 6-DMAP und Cycloheximide	28
3.1.2 Der Einsatz des spezifischen MEK-Inhibitor PD98059	34
3.2 Die Regulation der Aktivität des AhR in Schweine-Kumulus-Oozyten-Komplexen unter physiologischen und toxikologischen Bedingungen: Die Bedeutung von Follikelflüssigkeit	38
3.2.1 Die konstitutive und ligandeninduzierte Expression der Gene des AhR-Signalweges während IVM	38
3.2.2 Die Bedeutung von Follikelflüssigkeit	42
3.2.3 Der Einfluß von β -Naphthoflavone auf die Apoptose der Kumuluszellen	44
4 Diskussion	46
4.1 Die Interaktionen zwischen dem AhR und der <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> (MAP-Kinase) während der <i>In-vitro</i> -Reifung von Rinderoozyten	46
4.2 Die Aktivierung des AhR während der <i>In-vitro</i> -Reifung von Schweineeizellen	55
5 Zusammenfassung	60
6 Literaturverzeichnis	62
7 Thesen	80

Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro (10 ⁻⁶)
μl	Mikroliter (10 ⁻⁶ Liter)
μg	Mikrogramm (10 ⁻⁶ Gramm)
μM	Mikromol (10 ⁻⁶ Mol)
Abb.	Abbildung
AhR	Arylhydrocarbonrezeptor
AhRKO-Mäuse	<i>AhR-Knockoutmäuse</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	<i>Aqua bidestillata</i>
ARNT	Arylhydrocarbon nuclear translocator
BSA	bovines Serumalbumin
bHLH	<i>Basic helix-loop-helix</i> (basische Helix-Loop-Helix-Domäne)
BMM	Basismaturationsmedium
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	Kohlendioxid
DMBA	Dibenzo[a]anthrazene
DEPC	Diethylpyrocarbonat
6-DMAP	6-Dimethylaminopurine
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DRE	<i>dioxin-responsive element</i>
EDTA	Ethylendiamintetraazetat-Dinatriumsalz
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (Epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	EGF-Rezeptor
ERK	<i>Extracellular signal-regulated protein kinase</i>
FF	Follikelflüssigkeit
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GSH	Glutathion

GV	<i>germinal vesicle</i> (Germinalvesikel)
GVBD	<i>germinal vesicle breakdown</i>
h	Stunde
hCG	humanes Choriongonadotropin
hsp90	Hitzeschockprotein 90
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IL-1 β	Interleukin 1 β
IVM	<i>In-vitro</i> -Maturation
JNK	Jun-N-Terminal-Kinasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kiloDalton
KOK(s)	Kumulus-Oozyten-Komplex(e)
l	Liter
LH	Luteinisierendes Hormon
NaCl	Natriumchlorid
m	milli (10 ⁻³)
M	Mol
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> (MAP-Kinase)
mg	Milligramm (10 ⁻³ Gramm)
ml	Milliliter (10 ⁻³ Liter)
mM	Millimol (10 ⁻³ Mol)
MEK 1	MAPK-Kinase (MAPKK) [<i>Mitogen Activated Protein Kinase Kinase</i> , MAPK-ERK-Kinase 1]
min	Minute
MPC [®]	Magnetic Particle Concentrator [®]
MPF	<i>Maturation Promoting Factor</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
Neg.	Negativkontrolle
β -NF	β -Naphthoflavone
NP40	Nonidet P-40
Oligo-dT	Oligo-desoxy-Thymidin
PAHs	diaromatische polyhalogenierte Arylhydrocarbone
PAI-2	Plasminogen Aktivator-Inhibitor

PAS	Per-ARNT-Sim
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCBs	polychlorierte Biphenyle
PCDF	polychlorierte Dibenzofurane
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD98059	2-(2'-amino-3'-methoxyphenyl)- oxanaphthalen-4-one
PFA	Paraformaldehyd
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
PTK	Proteintyrosinkinase
PVA	Polyvinylalkohol
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
sec	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
Tab.	Tabelle
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
XRE	<i>xenobiotic-responsive element</i>

1 Einleitung

1.1 Der Arylhydrocarbonrezeptor

1.1.1 Eigenschaften und Funktion

Der Arylhydrocarbonrezeptor (AhR), ein durch Liganden aktivierter Transkriptionsfaktor, wurde 1976 von Poland und Mitarbeitern entdeckt (Poland et al., 1976). Er ist ein Mitglied der *basic helix-loop-helix (bHLH)-Per-ARNT-Sim (PAS)*-Familie. Diese besteht aus regulatorischen Transkriptionsfaktoren, die schon früh während der Embryogenese exprimiert werden und eine wichtige Rolle während der Entwicklung spielen. Diese beinhaltet im Detail Funktionen im Rahmen der Neurogenese, der Morphogenese des Atemtraktes, des Metabolismus toxischer Substanzen, des zirkadianen Rhythmus, von Reaktionen auf Hypoxie, von Hormonrezeptorfunktionen und der Reproduktion (Chang und Puga, 1998).

Das gemeinsame Merkmal aller bHLH-PAS Proteine stellt die PAS-Domäne dar, die nach den ersten drei Proteinen benannt wurde, in denen diese Domäne entdeckt wurde: das Drosophila-Protein Per, das menschliche Protein Arylhydrocarbon nuclear translocator (ARNT) und das Drosophila-Protein Sim (Nambu et al., 1991).

Der Rezeptor wird nahezu ubiquitär exprimiert (Okey et al., 1994). Zwischen den Spezies gibt es Unterschiede in der Bindungsaffinität und dem Molekulargewicht. Es wurden Molekulargewichte von 95 kDa (C57BL/6-Mauslinien), 104 kDa (Kaninchen), 124 kDa (Hamster) bis 130 kDa (Wildmaus) nachgewiesen (Poland und Glover, 1987).

Eine der Hauptfunktionen des AhR besteht in der Vermittlung toxischer Effekte von Umweltgiften, wie zum Beispiel den polychlorierten Dibenzodioxinen und Dibenzofuranen, sowie den koplanaren polychlorierten Biphenylen (PCBs), die den Dioxinen in ihrer Struktur sehr ähnlich sind. Diese chemischen Verbindungen werden zu der Gruppe der diaromatischen polyhalogenierten Arylhydrocarbone (PAHs) gezählt. Weitere solche Xenobiotika sind Dibenzo[a]anthrazene (DMBA) und Flavone (Nebert et al., 2004). Der stärkste Ligand des AhR ist das 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) (Safe, 1984). Das gemeinsame Merkmal dieser chemischen Verbindungen besteht in einer schädlichen Wirkung auf die Gesundheit von Mensch und Tier. Veränderungen im Zellwachstum und der Zelldifferenzierung, von Homöostase und Hormonbalance (DeVito und Birnbaum, 1995) und eine Reproduktionstoxizität sind beschrieben (Fischer, 2000; Stapleton und Baker, 2003).

In den letzten Jahren wird dem AhR aufgrund von neuen Erkenntnissen auf diesem Gebiet zusätzlich zu seiner Rolle als Mediator der toxischen Effekte von Xenobiotika eine physiologische Rolle zugeschrieben. Der Rezeptor existiert seit über 450 Millionen Jahren

(Hahn, 2002). Sein Ursprung liegt in einer Zeit, in der Art und Ausmaß der Umweltverschmutzung, wie sie heute besteht, nicht existierte. Der Ah-Rezeptor wird zu verschiedenen Zeitpunkten während der Entwicklung in einer Vielzahl von Geweben verschiedener Spezies, zum Beispiel in Lunge, Niere, Leber, Milz, Herz- und Skelettmuskel, sowie in Thymus und Plazenta exprimiert (Ema et al., 1992; Carver et al., 1994; Hayashi et al., 1994; Pohjanvirta und Tuomisto, 1994). Damit lässt sich eine alleinige Funktion im Rahmen des Metabolismus toxischer Substanzen ausschließen (Abbott et al., 1998; Jain et al., 1998; Tschoudschilsuren et al., 1999).

Um die Rolle des AhR ohne eine Aktivierung durch einen exogenen Liganden zu untersuchen, wurden Experimente mit Mäusen durchgeführt, in denen der Rezeptor nicht exprimiert wird (Fernandez-Salguero et al., 1995; Schmidt et al., 1996; Mimura et al., 1997). Diese werden als *AhR-Nullmäuse* beziehungsweise *AhR-Knockoutmäuse* (AhRKO-Mäuse) bezeichnet. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass der Rezeptor eine Rolle bei der Reproduktion, dem Überleben von Neugeborenen und dem Wachstum spielt (Fernandez-Salguero et al., 1995; Schmidt et al., 1996; Mimura et al., 1997; Gonzalez und Fernandez-Salguero, 1998).

Es gibt vielfältige Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des Rezeptors an ovariellen Mechanismen (Barnett et al., 2007a,b). Bei fehlender Expression des Rezeptors in weiblichen *Knockoutmäusen* konnten eine Reihe komplexer Defizite während der Reproduktion ermittelt werden. Diese beinhalteten eine erhöhte Mortalitätsrate dieser Mäuse während der Schwangerschaft und Stillzeit, eine kleine Wurfstärke zur Geburt, eine geringere Überlebensrate von Neugeborenen in den ersten zwei Wochen nach der Geburt und das Sterben von Neugeborenen nach dem Abstillen

Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse für die Existenz von natürlichen, endogenen Liganden des AhR. Bis heute ist die Identifikation eines physiologischen Liganden des AhR, der AhR-abhängige Signale unter physiologischen Bedingungen vermittelt, nicht gelungen. Als potentielle physiologische Liganden gelten Tryptophanderivate und Indol(3,2-b)carbachol (Kleman et al., 1992; Rannug et al., 1995), Bilirubin (Sinal und Bend, 1997) und Flavone (Reiners et al., 1999), die mit hoher Aktivität an den AhR binden.

Adachi et al. (2001) gelang es, in menschlichem Urin die Tryptophan-Analoga Indirubin und Idigo nachzuweisen, die beide im direkten Vergleich zu TCDD eine höhere Affinität zum Ah-Rezeptor aufwiesen.

1.1.2 Ah-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion

Die Ergebnisse von Studien bezüglich der Aktivierung des Rezeptors lassen vermuten, dass der AhR das einzige Mitglied dieser Familie von Transkriptionsfaktoren zu sein scheint, bei dem eine Bindung durch einen Liganden die Voraussetzung für eine Aktivierung darstellt (Chang und Puga, 1998). Vor einer Bindung durch einen potentiellen Liganden befindet sich der Rezeptor in Assoziation mit dem Hitzeschockprotein 90 (hsp90) (Denis et al., 1988; Perdew, 1988) und einem *Immunophilin-Related-Protein* von einer Proteingröße von 38 kDa (XAP2) (Ma und Whitlock, 1996; Carver und Bradfield, 1997; Meyer et al., 1998). Dieser Assoziationskomplex ist im Zytoplasma lokalisiert. Die Bindung eines Liganden an den AhR führt zu Veränderungen seiner Konformation und resultiert in der Aussendung eines Signals und einer sich anschließenden Translokation des gesamten Komplexes in den Zellkern (Pollenz et al., 1994).

Im Zellkern erfolgt eine Ablösung von hsp90 und XAP2 und eine Dimerisierung mit ARNT. Dieser Schritt dient der Bildung eines aktiven Transkriptionsfaktors, der mit hoher Affinität an spezifische DNA-Sequenzen bindet (Reyes et al., 1992). Die spezifischen Sequenzen werden als *xenobiotic-responsive elements (XREs)*, auch als *dioxin-responsive elements (DREs)*, bezeichnet und befinden sich in der Promoterregion der durch den AhR regulierten Genen. Als Resultat der Interaktion zwischen dem Transkriptionsfaktor und den DNA-Sequenzen kommt es zur Transkription der entsprechenden Zielgene (Denis et al., 1988) (Abb. 1).

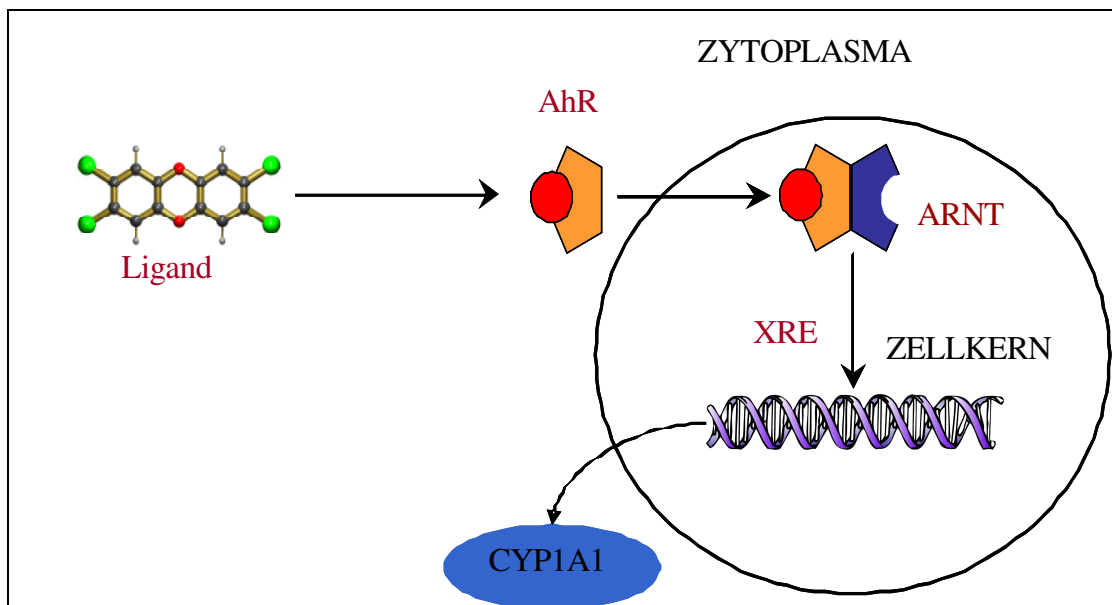


Abb. 1 Der AhR-Signalweg mit einem der bekanntesten Zielgene, dem CYP1A1.

1.1.3 Ah-Rezeptor-Zielgene

Zu den Mitgliedern der sogenannten Ah-Rezeptor-Genbatterie zählen Gene, deren Expression durch dioxinartige Verbindungen beeinflusst wird (Abbott, 1995).

Eine Gruppe umfasst die Cytochrom P 450 Monooxygenasen 1A1, 1A2 und 1B1; die Gluthatione S-Transferase $\pi 1$; die Aldehyd-3-Dehydrogenase; die NAD(P)H-Quinon-Oxidoreduktase und die UDP-Glukuronosyltransferase (Poland und Knutson, 1982; Nebert und Gonzalez, 1987; Dunn et al., 1988; Jaiswal et al., 1988; Bock et al., 1990). Die Induktion dieser Enzyme stellt eine adaptive Antwort der Zelle auf die Wirkung chemisch toxischer Verbindungen dar und führt über eine Oxygenierung zu der Entgiftung diverser Xenobiotika (Conney, 1982).

Zusätzlich wurden Gene identifiziert, die in die Proliferation und Differenzierung von Zellen involviert sind, wie zum Beispiel Plasminogen Aktivator-Inhibitor 2 (PAI-2), Interleukin 1 β (IL-1 β) (Sutter et al., 1991) und die Protoonkogene c-fos und c-jun (Puga et al., 1992).

Des Weiteren gehören dazu auch Gene, die in direkter Verbindung mit Wachstumsfaktoren und den Signalwegen von Hormonrezeptoren, wie dem Rezeptor des Epidermalen Wachstumsfaktor EGF (*epidermal growth factor*) und dem Östrogenrezeptor, stehen (Poland und Knutson, 1982; Safe, 1986; Peterson et al., 1993; Huff et al., 1994).

1.1.4 Die toxikologische Rolle des AhR im Ovar

Der AhR und ARNT konnten im Ovar von Mäusen, Ratten, Kaninchen, Rindern und Menschen nachgewiesen werden [Ratte: (Chaffin et al., 2000), Kaninchen: (Hasan und Fischer, 2003), Mensch: (Khorram et al., 2002), Rind: (Pocar et al., 2004) und Maus: (Robles et al., 2000)] und hat für die Physiologie des Ovars eine wichtige Bedeutung (Benedict et al., 2000,2003; Barnett et al., 2007a,b). Liganden des AhR sind in der Lage die Funktion des Ovars zu verändern.

Die Exposition von Ratten gegenüber TCDD resultierte in einem signifikant geringerem Gewicht des Ovars (Gao et al., 1999; Son et al., 1999). Li et al. (1995) und Cummings et al. (1996) konnten bei Einsatz von TCDD einen Verlust des physiologischen ovariellen Zyklus von ausgewachsenen Ratten beobachten, während Chaffin et al. (1996) und Giavini et al. (1983) über eine reduzierte Ovulationsrate berichteten.

In Experimenten mit Rhesusaffen konnte unter Einfluß von TCDD eine Störung des Östrogenzyklus beobachtet werden (Allen et al., 1977; Barsotti et al., 1979). Eine Exposition von Nagetieren gegenüber polychlorierten Biphenylen resultierte in Störungen der Funktionen des Ovars, wie zum Beispiel einer Reduktion der Anzahl der Keimzellen (Ronnback und de Rooij, 1994) und der Anzahl der Follikel (Jonsson et al., 1975).

In weiteren Studien bezüglich der Wirkung von Umweltgiften wurde über Veränderungen im Menstruationszyklus, Amenorrhoe und eine Hemmung der Ovulation in nicht-menschlichen Primaten berichtet (Muller et al., 1978; Barsotti et al., 1979).

Es existieren nur sehr wenige Untersuchungen über die Effekte der PAHs auf den menschlichen Organismus. In Follow-up-Studien mit Frauen, die akzidentell hohen Konzentrationen von PCBs, polychlorierten Dibenzofuranen (PCDF) und TCDD ausgesetzt waren, wurde eine Irregularität im Menstruationszyklus nachgewiesen. Interessanterweise wurden diese Störungen vor allem bei den Frauen entdeckt, die sich während der Exposition noch in der prämenarchalen Phase befanden. Diese Erkenntnis führt zu der Annahme, dass Unterschiede in der Sensitivität gegenüber Xenobiotika bestehen, die vom reproduktiven Entwicklungsstadium der Frau zum Zeitpunkt der Exposition abhängig sind (Mendola et al., 1997; Yu et al., 2000; Eskenazi et al., 2002). Somit wird das Ausmaß einer Schädigung durch reproduktiv toxische Verbindungen durch die Phase im reproduktiven Leben eines Organismus determiniert, in der es zu der Exposition gekommen ist. Zusätzlich gibt es nur sehr wenige Studien, die sich mit den Effekten einer pränatalen Einwirkung von PAHs auf die Entwicklung des Ovars beschäftigt haben.

Eine Behandlung von Nagetieren während der Gestation mit TCDD während kritischer Phasen der Organogenese wirkte sich schädlich auf die Entwicklung des reproduktiven Systems aus. Eine Exposition von Nagetieren mit TCDD *in utero* beeinflusste die Anatomie und Funktion der Geschlechtsorgane bei weiblichen Nachkommen, beispielsweise traten ein reduziertes Gewicht des Ovars, eine Reduktion der Anzahl der Corpora lutea, ein zu früh einsetzender Alterungsprozess des Ovars und ein früh auftretender Rückgang der Fruchtbarkeit auf (Silbergeld und Mattison, 1987; Gray et al., 1997; Wolf et al., 1999).

Im Rahmen einer pränatalen Exposition mit PCBs, wurde eine um 40-50 % reduzierte Anzahl der Follikel in allen Stadien der Entwicklung, verglichen mit der Kontrollgruppe, beobachtet. Diese Veränderung führte zu einer frühzeitigen Alterung des Reproduktionssystems in den exponierten Nachkommen (Ronnbeck, 1991). Die Ähnlichkeiten der Effekte von Dioxin-ähnlichen PCBs und TCDD (Gray und Kelce, 1996; Smits-van Prooije et al., 1996) legen den Schluß nahe, dass der AhR an diesen Vorgängen beteiligt ist.

1.1.5 Die physiologische Rolle des AhR im Ovar

Es gibt vielfältige Hinweise für eine Funktion des AhR-Signalweges im Rahmen der Regulation der Physiologie des Ovars. Es wird vermutet, dass er das Wachstum der Oozyten und der Follikel während der prä- und postnatalen Phase beeinflussen könnte (Benedict et al., 2000). Einige Studienergebnisse sprechen für eine Rolle des AhR bei der Regulation der Apoptose während der weiblichen Gametogenese und Follikulogenese.

Weibliche Mäuse, in einem Alter von 53 Tagen, die den AhR nicht exprimierten, zeigten eine reduzierte Rate antraler Follikel (Benedict et al., 2000) und eine Unfähigkeit der Keimzellen, in die Apoptose einzutreten (Robles et al., 2000). Eine reduzierte Zahl von Antrafollikeln könnte die in Schwangerschaft und Stillzeit erforderliche Hormonsynthese eventuell nicht leisten und so die beobachteten Effekte in *AhR-Knockoutmäusen* erklären helfen. Zusätzlich wurde herausgefunden, dass bei Abwesenheit des AhR das Follikelwachstum gehemmt und die Zahl der ovulierenden Follikel, die sich zu Corpora lutea entwickeln, reduziert wird (Benedict et al., 2003).

Barnett et al. (2007b) berichten über ein gestörtes Follikelwachstum in AhRKO-Mäusen. Ursachen für die beobachteten Effekte sind eine Reduktion der Proliferation von Granulosazellen, Störungen des Zellzyklus und der Bildung sowie des Ansprechens auf Östradiol. Ein reduziertes Ansprechen auf Gonadotropine ist durch verminderte Level von Gonadotropinrezeptoren im Ovar verursacht und hemmt die für die Ovulation notwendige Synthese von Östradiol (Barnett et al., 2007a).

Die Erkenntnisse aus den Studien mit den AhRKO-Mäusen und der Nachweis einer konstitutiven Expression des AhR in der humanen Granulosazelllinie KGN (Horling, 2009) und des Hauptzielgenes CYP11A1 im Ovar und den Oozyten der Maus, sowie die Notwendigkeit einer konstitutiven Stimulation der Aktivität des AhR für die physiologische Eizellreifung beim Rind (Pocar et al. 2004) unterstützen die Hypothese einer möglichen Funktion des AhR bei der Regulation der Oozytenreifung.

1.2 Die Interaktion zwischen dem AhR und der *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAP-Kinase)

1.2.1 Die Funktion von Phosphorylierungen/Dephosphorylierungen bei der Regulation der Reifung

Studien zu molekularen Mechanismen, die in die zellulären Vorgänge während der Fortsetzung der Meiose involviert sind, beschreiben eine Beteiligung von Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozessen, die durch Proteinkinasen und Proteinphosphatasen induziert werden, an der Regulation dieser Vorgänge (Dekel, 1996; Whitaker, 1996; Ferrell, 1999).

Säugetieroozyten werden im Verlauf der 1. Reifeteilung der Meiose in der Prophase arretiert, bis es *in vivo* durch den Anstieg der Konzentration von Luteinisierendem Hormon (LH) beziehungsweise *in vitro* durch adäquate Kulturbedingungen zu der Fortsetzung der Meiose kommt (Pincus und Enzmann, 1935; Edwards, 1965). Die Wiederaufnahme der Meiose ist durch zahlreiche morphologische Veränderungen im Zellkern und Zytoplasma gekennzeichnet. Die nukleären Vorgänge umfassen das Wachstum des Zellkernes zum Keimbläschen, auch als Germinalvesikel (GV) bezeichnet, den Abbau der Kernmembran [*Germinal Vesicle breakdown* (GVBD)], die Kondensation des Chromatin, die Formation des Spindelapparates und eine Weiterentwicklung bis zu Stadium Metaphase II. Diese wird im Falle einer Fertilization aufgehoben (Wassarman und Albertini, 1994).

1.2.2 Maturation Promoting Factor (MPF)

Dem *Maturation Promoting Factor* (MPF) wurde eine bedeutende Rolle im Rahmen des physiologischen Ablaufes der Meiose zugeschrieben, da eine Aktivierung des Faktors vor dem Beginn des GVBD oder zum Einsetzen des GVBD erfolgt (Hashimoto und Kishimoto, 1988; Choi et al., 1991; Kalous et al., 1993; Gavin et al., 1994).

Der MPF-Komplex wird aus der katalytischen Untereinheit p34 und dem Cyclin B, der regulatorischen Untereinheit, gebildet (Draetta und Beach, 1988; Brizuela et al., 1989) und ist in seiner aktiven Form dazu fähig, Proteine an Serin/Threoninresten zu phosphorylieren. Dazu gehören insbesondere Proteine, die an der Bildung der Zellkernhülle und an der Kondensation des Chromatin und der Organisation des Zytoskeletts beteiligt sind (Gurley et al., 1978; Peter et al., 1992; Verde et al., 1992).

In Studien wurde die Kaskade der *Mitogen Activated Protein Kinasen* (MAPK) als ein weiteres regulatorisches System bei der Progression der Meiose von Oozyten identifiziert (Ruderman, 1993).

1.2.3 Mitogen activated Protein Kinase (MAP-Kinase)

Die 44/42 MAP-Kinasen, die auch als *Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases* (ERK 1 oder p44^{mpk} und ERK 2 oder p42^{mpk}) bezeichnet werden, gehören zu der Familie der Serin/Threoninkinasen, zu deren Aktivierung eine Phosphorylierung an Threonin- und Tyrosinresten erforderlich ist (Posada und Cooper, 1992). In Eizellen von Mäusen, Ratten, Ziegen, Schweinen und Rindern konnten beide Isoformen [Maus: (Sobajima et al., 1993; Verlhac et al., 1993), Ratte: (Goren et al., 1994), Ziege: (Dedieu et al., 1996), Schwein: (Inoue et al., 1995), Rind: (Fissore et al., 1996)] nachgewiesen werden.

44/42 MAPK wird direkt über eine Phosphorylierung von Threonin-183 und Tyrosin-185 durch eine spezifische Proteinkinase, die MAPK-Kinase (MAPKK auch MAPK-ERK-Kinase 1, MEK1 genannt), aktiviert (Crews und Erikson, 1992). In somatischen Zellen wird MEK1 über die Phosphorylierung durch die Serin/Threoninkinase raf 1 (MAPKKK) aktiviert (Seger und Krebs, 1995). In den Oozyten von Wirbeltieren wird MEK1 über eine Phosphorylierung durch MOS aktiviert. MOS ist eine keimzellspezifische Serin/Threoninkinase (Papkoff et al., 1982) und ein Produkt des Proto-Onkogens c-mos, dessen RNA als maternale Information in der wachsenden Oozyte gespeichert wird (Gebauer und Richter, 1997) (Abb. 2).

Die inaktive Form der MAP-Kinase und MAPKK befinden sich in kultivierten somatischen Zellen im Zytoplasma der entsprechenden Zelle. Nach der Aktivierung wandert ein Teil von ihr in den Zellkern, um die extrazellulären Signale in den Zellkern zu übertragen (Chen et al., 1992; Seth et al., 1992; Gonzalez et al., 1993; Lenormand et al., 1993).

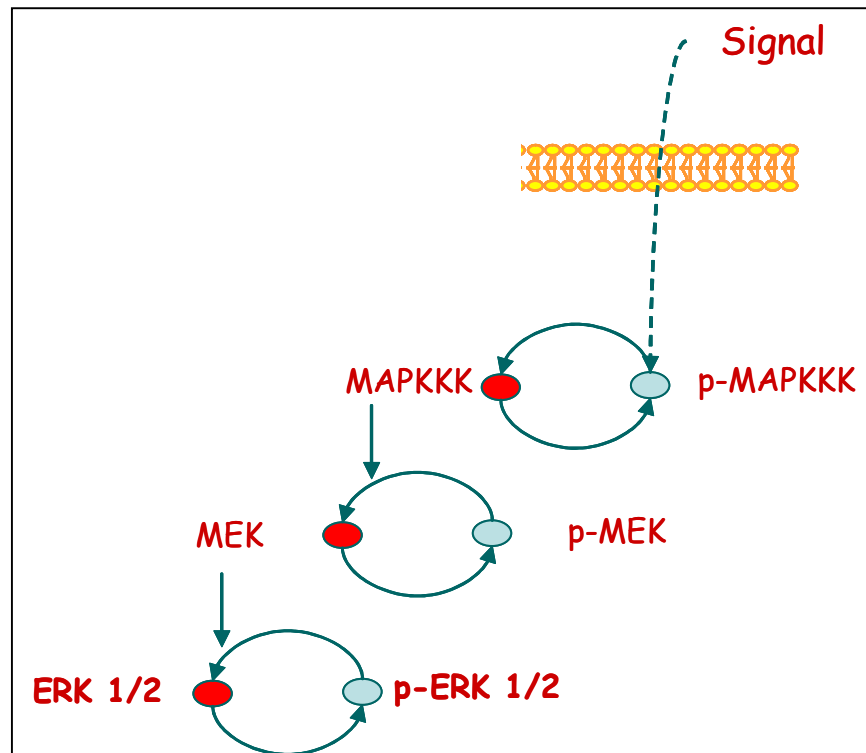


Abb. 2 Signalweg der MAP-Kinasen.

Eine Aktivierung von MAPKK und MAPK findet während der Oozytenreifung verschiedener Spezies, wie z.B. Meereswirbeltieren (Sanghera et al., 1991; Shibuya et al., 1992), dem Krallenfrosch (Gotoh et al., 1991a; Posada und Cooper, 1992) und Säugetieren [Maus: (Sobajima et al., 1993; Verlhac et al., 1993; Verlhac et al., 1994), Rind: (Fissore et al., 1996)], statt. Zusätzlich konnten Inoue et al. (1998) durch Mikroinjektion der aktiven Form in den Zellkern unreifer porziner Eizellen den GVBD auszulösen. Das deutet auf eine Beteiligung der MAP-Kinase in der Vermittlung reifungsinduzierender Signale vom Zytoplasma in den Zellkern hin.

In Kulturen mit unterschiedlichen Zelllinien und während der Oozytenreifung von Krallenfrosch- und Mausoozyten konnte nachgewiesen werden, dass die MAP-Kinasen als Antwort der Zelle auf die Einwirkung von Wachstumsfaktoren aktiviert werden (Cobb et al., 1991; Ferrell et al., 1991; Gotoh et al., 1991a,b; Shibuya et al., 1992; Verlhac et al., 1993). Es existieren zahlreiche molekulare, sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Substrate, die die MAP-Kinase phosphoryliert (Seger und Krebs, 1995).

Zu den zytoplasmatischen Zielproteinen gehören Proteine des Zytoskeletts (Verlhac et al., 1993; Minshull et al., 1994) und Lamine (Peter et al., 1992), die beide eine Rolle während der Reifung der Eizellen spielen.

Davis (1993,1995) berichtet über weitere Ziele von MAPK, zu denen die Phospholipase A2, die Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-myc, sowie der membranständige EGF-Rezeptor gezählt werden. Das erste identifizierte und am intensivsten charakterisierte physiologische Substrat der MAP-Kinase ist die Proteinkinase p90^{rsk}, die dazu fähig ist, das S6-Protein, das einen Teil der 40 S-Ribosomenuntereinheit bildet, in Oozyten von Krallenfröschen zu phosphorylieren (Jones et al., 1988).

ERK 1/2 ist in der Lage, p90^{rsk} *in vivo* und *in vitro* zu phosphorylieren (Dalby et al., 1998). Studien mit Oozyten vom Krallenfrosch demonstrieren, dass p90^{rsk} den überwiegenden Teil der Funktionen der MAPK bei der Regulation der Fortsetzung der Prozesse im Rahmen der Meiose vermittelt (Bhatt und Ferrell, 1999; Gross et al., 1999; Gross et al., 2000).

Der Signalweg der MAP-Kinase scheint zusätzlich an der Organisation der Mikrotubuli während der Oozytenreifung beteiligt zu sein. Zhao et al. (1991) zeigten, dass der Einsatz eines Antikörpers gegen MOS in den Mausoozyten zu einer Hemmung der Bildung eines meiotischen Spindelapparates führt.

Die MAP-Kinase und MPF werden in Rindereizellen ca. 6 Stunden nach Beginn der Kultur, vor dem Auftreten des GVBD (ca. 8 Stunden nach Beginn der Kultur), aktiviert und die Aktivität von MAPK steigt bis zur Metaphase I an. Dieses Niveau wird bis zum Stadium der Metaphase II auf einem gleichbleibenden Niveau gehalten (Fissore et al., 1996).

Dedieu et al. (1996) konnten in Oozyten der Ziege eine Aktivierung der MAP-Kinase nach dem Auftreten des GVBD nachweisen. In porzinen Oozyten befand sich die MAP-Kinase-Aktivität während der Germinalvesikel-Phase auf einem niedrigen Level, der im weiteren Verlauf zum Zeitpunkt der Metaphase I abrupt anstieg (Inoue et al., 1995). Ähnliche Verläufe der Aktivierung sind auch in Oozyten beim Menschen, beim Esel und Kaninchen beschrieben worden (Goudet et al., 1998; Sun et al., 1999; Yu et al., 2002). In Mausoozyten findet die Aktivierung von MAPK nach dem GVBD statt (Gavin et al., 1994; Verlhac et al., 1994).

Es ist weitgehend bekannt, dass in Säugetieroozyten (vor allem von Nagetieren) zwei verschiedene Wege zur physiologischen Fortsetzung der Reifung nach der Arretierung im G2/M –Stadium der Meiose I existieren. Im Fall einer Trennung der Oozyten von den inhibitorisch wirkenden anderen Follikelkomponenten kommt es zu einer spontanen Fortsetzung der Reifungsprozesse. Diese passiert unabhängig von der MAP-Kinase. In dem anderen Fall ist es möglich, die inhibitorischen Effekte der Follikel durch den Einfluß der Gonadotropine zu überwinden. Für diesen Vorgang bedarf es der Aktivierung der MAP-Kinase (Su et al., 2001; Su et al., 2002; Fan et al., 2003).

1.2.4 MAPK und AhR

Eine Vielzahl von Ergebnissen, die bei *In-vitro*- oder *In-vivo*-Studien gewonnen werden konnten, lassen auf eine Funktion der MAPK-Kaskade bei der AhR-Aktivität schließen (Puga et al., 2002). In Tierexperimenten ließ sich nachweisen, dass TCDD, der Hauptagonist von AhR, dazu fähig ist, die Aktivität von ERK zu stimulieren (el-Sabeawy et al., 1998). Weiterhin ließ sich eine Funktion der durch TCDD stimulierten MAPK-Kaskade bei der Induktion der Transkription AhR-abhängiger Gene und vor allem bei der Expression von CYP1A1 beobachten (Tan et al., 2002). Die Aktivierung von Jun-N-Terminal-Kinasen (JNK) oder ERK führt über die Potenzierung der transkriptionalen Aktivität von ARNT zu einer Steigerung der von AhR und ARNT abhängigen Transkription (Tan et al., 2004).

Die MAP-Kinase könnte somit ein weiteres Ziel für TCDD in der Zelle darstellen, über das die Aktivität des AhR-Komplex moduliert wird.

Diese Studien zeigen, dass die Regulation der MAPK-Kaskade eine essentielle regulatorische Komponente des AhR in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor darstellt. Soweit aus der Literatur bekannt ist, wurde die Bedeutung der MAPK-Kaskade für die Regulation des AhR-Signalweges in Abwesenheit exogener Liganden bisher nicht untersucht.

1.3 Ziel der Arbeit

In früheren Studien wurde beschrieben, dass die Aktivität des AhR während der *In-vitro*-Reifung von Rinder-KOKs in Abwesenheit exogener Liganden stimuliert wird. Die Exposition gegenüber spezifischen AhR-Antagonisten führte neben einer Reduktion der Expression von CYP1A1 zu einer Beeinträchtigung der Fähigkeit der Oozyten, die *In-vitro*-Reifung zu durchlaufen (Pocar et al., 2004). Diese Ergebnisse sprechen für eine Rolle der Aktivierung des AhR und der Induktion von CYP1A1 während der Reifung von Rindereizellen. Bisher ist nicht geklärt, ob diese Aktivierung direkt oder indirekt in den korrekten Ablauf der *In-vitro*-Reifung involviert ist.

Zudem sind die genauen molekularen Mechanismen, die an der Aktivierung des AhR im Follikel beteiligt sind, nicht bekannt. Über eine kritische Rolle von Phosphorylierungen im Rahmen der Regulation der Aktivität des AhR ist berichtet worden (Chen und Tukey, 1996; Long et al., 1998). Zusätzlich wurde früh erkannt, dass Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozesse von Proteinen, die durch Proteinkinasen und Proteinphosphatasen reguliert werden, eine Funktion während der Meiose von Oozyten besitzen (Dekel, 1996; Whitaker, 1996; Ferrell, 1999).

Die Kaskade der MAP-Kinase stellt dabei einen wichtigen regulatorischen Faktor im physiologischen Ablauf der Meiose von Oozyten (Fan und Sun, 2004) dar.

Das Ziel der hier vorliegenden Studie ist die Analyse der Bedeutung der Aktivierung des AhR während der *In-vitro*-Reifung. Um die Funktion der Phosphorylierungsprozesse im Rahmen der Aktivierung des AhR und der Eizellreifung zu definieren, wurden der Serin/Threoninkinaseinhibitor 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP) und Cycloheximide, ein Hemmstoff der Proteinsynthese, eingesetzt und deren Wirkung auf IVM und die Expression der AhR-Zielgene auf mRNA- und Proteinebene analysiert.

Um die Interaktionen zwischen dem AhR-Signalweg und der Kaskade der MAP-Kinase zu untersuchen, wurde der spezifische MEK-Inhibitor 2-(2'-amino-3'-methoxyphenyl)-oxanaphthalen-4-one (PD98059) verwendet und seine Effekte auf die Expression von CYP1A1 und den physiologischen Ablauf der Reifung der KOKs untersucht.

Der AhR ist ein bekannter Mediator der Toxizität von Xenobiotika, wie den Dioxinen und Dioxin-ähnlichen Verbindungen. Die Reifung der Eizelle ist eine vulnerable Phase während der Follikulogenese bis zur optimalen Befruchtung und weiteren Embryonalentwicklung.

Um neue Erkenntnisse bezüglich der toxikologischen und potentiellen physiologischen Rolle des AhR während der Reifung von Oozyten zu gewinnen, wurde der Einfluß des AhR-Liganden β -Naphthoflavone (β -NF) auf die Eizellreifung und die Effekte verschiedener Kulturbedingungen auf den AhR-Signalweg in porzinen Kumulus-Oozyten-Komplexen in Anwesenheit beziehungsweise Abwesenheit von β -Naphthoflavone untersucht.

Das Schwein wurde für diesen Studienteil ausgewählt, weil bezüglich der ovariellen endokrinen Funktionen Ähnlichkeiten zwischen dem Menschen und dem Schwein bestehen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tab. 1

Acrylamid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Agarose	Biozym, Hamburg, Deutschland
Amphotericin B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Annexin V-CY3 Apoptosis-Detection-Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Cycloheximide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<i>Coomassie Brillante Blue</i> - Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Pure Extreme™ dNTPs	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
6-Dimethylaminopurine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dulbecco's Phosphate buffered Saline (PBS) 10× Fertiglösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dynabeads mRNA DIRECT kit	Deutsche Dynal, Hamburg, Deutschland
Chemilumineszenzlösung für Westernblot (ECL-Lösung)	Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, Rockford, IL, USA
EDTA	Carl Roth GmbH & Co.; Karlsruhe, Deutschland
Westernblot Entwickler- 6 Fixiererlösung (GBX Developer & Fixer Twin Pack)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol (absolut)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Fluoro Gard	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Gene Amp PCR Core kit	PerkinElmer, Wellesley, MA, USA
Gentamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Heparin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Hepes 25 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Hoechst 33258 Färbelösung	MoBiTec, Göttingen, Deutschland

Humanes Choriongonadotropin	Suigonan, Intervet, Wiesbaden, Deutschland
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Kulturmedium M199 (Katalognr. 5017)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Magermilchpulver Glücksklee	Nestlé, Frankfurt, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
β -Naphthoflavone	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdesoxycholate	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Nonidet P-40 (NP40)	Minerva biolabs, Berlin, Deutschland
17 β -Östradiol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
PCR-Nukleotid-Mix (dNTP's)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
PD98059	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
PFA (Paraformaldehyd)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG)	Intervet, Wiesbaden, Deutschland
Phosphataseinhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Polyvinylalkohol (PVA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ponceau-S-Lösung	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Pyruvat Na-salt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA) (bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure (HCl) 37%ig	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
SDS (<i>sodium dodecyl sulfat</i>)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Taq DNA Polymerase (incl. 10 \times PCR-Puffer + 50 mM MgCl ₂)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TEMED (N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Tris [Tris(hydroxymethyl)-aminomethan]	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Tween20	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland

Zellkulturwasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
------------------	---

2.1.2 Geräte und Gebrauchswaren

Tab. 2

Analysenwaage	Typ BP 3100 S, Typ BP 210 S, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Autoclav	Technoclav Integra Biosciences, Tecnomora Deutschland GmbH, Fernwald, Deutschland
BioProfil LTF software	LTF Labortechnik, Wasserburg/B, Deutschland
Blot-Apparatur für Westernblot	X Cell II TM Blot Module, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Chemilumineszenzfilm	Hyperfilm TM ECL, Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK
Deckgläser	VEB Ilmenau, Deutschland
Durchlicht- und Auflichtmikroskop	Axioplan, Zeiss AG, Oberhochen, Deutschland
Elektrophoresekammer (incl. Gelschlitten) [horizontal] für Argarose-Gele	Agagel Mini, Biometra blomed Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland
Elektrophorese-Apparatur [vertikal] für Westernblot	X Cell Sure Lock TM Mini Cell Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,6 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	Carl Roth GmbH & Co.; Karlsruhe, Deutschland
Falcon-Tubes	Becton Dickinson, San Jose, USA, über Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Gelblotting-Filterpapier (0,37 mm)	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland
Halb-Laminarbox	Lamin Air®, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Heißluftsterilisator	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Laborspülautomat	Typ Desinfector Automatic G 7735, Miele & Co KG, Gütersloh, Deutschland
Magnetrührer	MLW Rührerätewerk Medingen, Sitz Freital, Deutschland Typ R3T Variomag [®] Elektronorührer Poly 15, Laborbedarf K.J. Werner GmbH, Leipzig, Deutschland
Magnetic Particle Concentrator (MPC)	Dynal MPC [®] -E, Dynal, Oslo, Norwegen
Stereomikroskop	Stereomikroskop Olympus SZH 10 Optical Co.GmbH, Hamburg, Deutschland
Microwell-Platte Nucleon	Nunc, Roskilde, Dänemark
Mikrowelle	Panasonic
Nitrocellulose Blotting Membran	Hybond TM - ECL TM Nitrocellulose Membran, Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK
Osmometer	GONOTEC GmbH, Berlin, Deutschland
Petrischalen (30 mm)	Falcon, BD GmbH, Heidelberg, Deutschland
pH-Meter	Digital pH-Meter pH 525, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland

Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Präzisionswaage	Sartorius Basic Sartorius AG Göttingen, Deutschland
Reinstwasseranlage	Milli-Q UF Plus, Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland
Schüttelgeräte	Thys 2, MLW Labortechnik Ilmenau, Deutschland Heidolph unimax 2010, Deutschland
Spritzen (steril, 10 ml)	Becton Dickinson, San Jose, USA, über Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Sterilfilter (Porengröße 0,22 µm)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Thermoblock	Trio-Thermoblock, Biometra blomed Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland
UV-Tisch für Argarose-Gele	LTF Labortechnik, Wasserburg/B, Deutschland
Vortexer	MS 2 Minishaker, Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	Thermostad B3-DC 1, Haake, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturschalen	Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf 5415C Biofuge <i>fresco</i> Heraeus (Kühlzentrifuge), Heraeus, Hanau, Deutschland
Marker PCR und WB	MassRuler™ DNA Ladder, Low Range, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

2.1.3 Primer und Antikörper

Die verwendeten oligonucleotiden Primer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) sind zusammen mit den entsprechenden RT-PCR Bedingungen in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tab. 3 Primersequenzen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide und RT-PCR-Bedingungen für Rinder-KOKs.

Gen	Primersequenz 5' → 3'	T [°C]	Z	D [μ]	G [bp]
β-Aktin	S CCAAGGCCAACCGTGAGAAG As CCATCTCCTGCTTCGAAGTCC	57	30	2	268
AhR	S AGAGAGTCGCATGATAGTGTTTC As GCCTAGGTGTTTCATAATGTTG	57	40	2	603
ARNT	S TTACCTGCAGTCTGCCAATGG As AGACAGGCCGGGTGGTATATG	57	40	2	492
CYP1A1	S TCGGGCACATGCTGATGTTG As GCACAGATGACATTGGCCACTG	57	40	2	454
CYP1B1	S TCAACCGCAACTTCAGCAAC As GTCATGATTCACAGACCACT	57	40	2	500

S = Sense, As = Antisense, T = Annealing-Temperatur, Z = Anzahl der PCR-Zyklen, D = eingesetzte Menge c-DNA, G = Größe des Amplifikates.

Tab. 4 Primersequenzen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide und RT-PCR-Bedingungen für porcine KOKs.

Gen	Primersequenz 5' → 3'	T [°C]	Z	D [μ]	G [bp]
β-Aktin	S GTGCGGGACATCAAGGAGAAG As CGATCCACACGGAGTACTTGCG	57	30	2	400
AhR	S AGAGAGTGGCATGATAGTGTTTC As GCCTAGGTGTTTCATAATGTTG	57	40	2	603
ARNT	S CAGCAAACGGAATTGGATGTG As GCTGGACAATGGTTACAGGAGG	57	40	2	325
CYP1A1	S TTGCCTCAGACCCAGCTTCC As TGTGTCAAACCCAGCTCCAAAG	57	40	2	524

S = Sense, As = Antisense, T = Annealing-Temperatur, Z = Anzahl der PCR-Zyklen, D = eingesetzte Menge c-DNA, G = Größe des Amplifikates.

Antikörper

Tab. 5

Anti-Rabbit-CYP1A1, polyklonal	Dianova, Hamburg, Deutschland
Anti-Mouse-pERK 1/2 (p44/42)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Donkey-Anti-Rabbit	Dianova, Hamburg, Deutschland
Goat-Anti-Mouse HRP	Dianova, Hamburg, Deutschland

2.1.4 Gebrauchslösungen

Lösungen für IVM

Tab. 6

M199 C	1,96 g Kulturmedium M199 (Katalognr. 5017) + 15 mg Kanamycin + 0,42 g NaHCO ₃ ad 200 ml Zellkulturwasser (pH 7,38-7,41; 280-305 mosmol/kg)
M199 D	9,8 g Kulturmedium M199 (Katalognr. 5017) + 1,0 g PVA + 4,0 g BSA + 55 mg Penicillin + 70 mg Streptomycin + 10 mg Heparin + 6,5 g 25mM Hepes ad. 1000 ml A.bidest (pH 7,38-7,41; 280-305 mosmol/kg)

Lösungen für die Molekularbiologie

Tab. 7

<i>Blocking</i> -Lösung	50 ml TBST (1×) + 2,5 g Magermilchpulver
Entfärbelösung (für SDS-Elektrophorese)	300 ml Ethanol + 100 ml Essigsäure (10%) ad 1000 ml A. bidest.
Laemmli-Puffer (10×) (Laufpuffer für SDS- Elektrophorese)	30,0 g Tris Base + 144 g Glycin + 10 g SDS ad. 1000 ml A. bidest.
Trenngelpuffer	36,3 g Tris-Base + 8 ml SDS (10%) ad. 200 ml A. bidest., pH 8,8 (bei 4 °C lagern)
Sammelgelpuffer	6,0 g Tris-Base + 4 ml SDS (10%) ad. 100 ml A. bidest., pH 6,8 (bei 4 °C lagern)
<i>Reducing sample</i> -Puffer	2 ml Glycin + 40 ml SDS (10%) + 2,5 ml Sammelgelpuffer + 1 ml Mercaptoethanol 1 Spatelspitze Bromphenolblau ad. 1000 ml A. bidest.
Ripa-Puffer	790 mg Tris-Base + 900 mg NaCl + 10 ml NP 40 (10%) + 2,5 ml Na-Desoxycholate (10%) + 1 ml EDTA 100 mM ad. 100 ml A. bidest.
<i>Stripping</i> -Puffer	20 ml SDS (10%) + 12,5 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8) + 700 µl Mercaptoethanol ad. 1000 ml A. bidest.
TBS-Puffer/TBST-Puffer	8 g NaCl + 0,2 g KCl + 3 g Tris ad. 1000 ml A. bidest.; für TBST 1 ml Tween hinzufügen; pH 7,4
TAE-Puffer (10×)	48,4 g Tris + 20,0 ml EDTA 0,5 M + 2 ml Essigsäure
Transferpuffer (12,5×)(Stammlösung)	18,2 g Tris-Base (pH 6,0) + 90 g Glycin ad. 1000 ml A. bidest., pH 8,3
Transferpuffer (1×)	80 ml 12,5× Transferpuffer + 200 ml Methanol ad. 1000 ml A. bidest., 2 ml SDS (10%) hinzufügen

Die Lösungen für IVM wurden über einen Sterilfilter mit 0,22 µm Porengröße sterilfiltriert.

2.2 Präparation der Medien

Die Präparation der Medien erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer Halb-Laminarbox. Vor dem Gebrauch wurden alle verwendeten Glas- und Metallwaren nach der Reinigung in einem Laborspülautomat für 4 Stunden bei 160 °C in einem Heißluftsterilisator sterilisiert. Plastikwaren, sowie das Dulbeccos PBS wurden für 30 Minuten bei 121°C und 105 Pascal autoklaviert. Die Lagerung der Chemikalien erfolgte entsprechend der Herstelleranweisung. Das verwendete Wasser stammte aus einer Reinstwasseranlage. Es wurde darauf geachtet, dass nur Wasser mit einem höheren elektrischen Widerstand als 15,0 MΩm, aus der Anlage entnommen wurde.

Die Bestandteile des Transportmediums vom Schlachthof bis zur weiteren Verarbeitung im Labor und die Medien, die bei der Gewinnung der KOKs verwendet wurden, sind unter 2.3 beschrieben. Als Stammmedium zur Kultivierung der KOKs vom Rind wurde M199 C eingesetzt, das mit 0,68 mM L-Glutamin, 25 mM NaHCO₃, 0,23 mM Natrium-Pyruvat, 10 % FKS, 10 IU/ml Pregnant Mare Serum Gonadotropin, 5 IU/ml humanes Choriongonadotropin (hCG) und 1 µg/ml 17β-Östradiol ergänzt wurde und damit das Basis-Maturationsmedium (BMM) darstellte. Dieses Stammmedium wurde zur Kultivierung der KOKs vom Schwein in der Zusammensetzung dahingehend variiert, dass der Anteil an fetalem Kälberserum von 10% auf 20% verdoppelt worden ist.

Mindestens 2 h vor der Verarbeitung der Ovarien wurden die Medien je nach Versuchsansatz vorbereitet, um eine Äquilibration im Brutschrank bei 39 °C in einer 5%igen CO₂ Atmosphäre und gesättigter Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten. Das FKS wurde nach der Lieferung für 30 Minuten bei 56 °C im Wasserbad erwärmt, um Komplementfaktoren und Immunglobuline zu inaktivieren. Bis zum Gebrauch wurde das FKS dann bei -20 °C gelagert.

Das PMSG und das hCG wurden in einer Konzentration von 100 IE/µl bzw. 50 IE/µl in Wasser gelöst. 17β-Östradiol wurde in 99%igem Ethanol in einer Konzentration von 1 µg/µl gelöst. Diese Hormonlösungen wurden bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert. Die Inhibitoren 6-DMAP und Cycloheximide wurden in einer Konzentration von 16,32 mg/ml (4mM) beziehungsweise 10 mg/ml (10µM) in M199 C gelöst. Diese Konzentrationen wurden basierend auf Literatur von Lonergan et al. (1997) ausgewählt. 2-(2'-amino-3'-methoxyphenyl-oxanaphthalen-4-one (PD98059) wurde in einer Konzentration von 2,673 mg/ml in Dimethylsulfoxid (DMSO) [10µM] gelöst. Die Konzentration wurde basierend auf Literatur über Experimente mit Konzentrationen von 5 bis 50 µM PD98059 in Kumulus-Oozyten-Komplexen anderer Spezies ausgewählt (Meinecke und Krischek, 2003; Gall et al., 2005; LaRosa und Downs, 2005; Zhang et al., 2006). Es wurden vor Beginn dieser Studie Experimente mit PD98059 durchgeführt um die geeignete Konzentration für Rinderoozyten

zu finden (Daten hier nicht gezeigt). Die Konzentration von β -Naphthoflavone ($50 \mu\text{M}$) wurde basierend auf *In-vitro*-Experimenten mit kultivierten Zelllinien, in denen mit dieser Konzentration der AhR-Signalweg aktiviert wurde, ausgewählt (Elbekai et al., 2004; Mills et al., 2004).

2.3 Gewinnung und Selektion der Kumulus-Oozyten-Komplexe

Die Ovarien von Rindern beziehungsweise von Schweinen wurden im Schlachthof Altenburg/Leipzig gewonnen und innerhalb von 2 Stunden in einem Behältnis, das mit Dulbeccos PBS, versetzt mit 100,000 IU Penicillin, 100 mg Streptomycin und $250 \mu\text{g}$ Amphotericin B/Liter gefüllt war, bei einer Temperatur von $32\text{-}34 \text{ }^\circ\text{C}$ in das Labor transportiert. Alle im Labor darauf folgenden Vorgänge wurden bei einer konstanten Temperatur von $36 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. In oben genanntem Medium wurden die Ovarien gespült, um eventuelle Blutrückstände vollständig zu entfernen. Bei den Rinderovarien erfolgte die Isolierung der KOKs aus den Follikeln durch das Aufschneiden der Follikel mit einem Skalpell. Dieser Vorgang wurde in einer Petrischale, gefüllt mit der IVM-Lösung M199 durchgeführt. Die Gewinnung der KOKs von porcinen Ovarien gelang durch Aspiration der durchschnittlich $3\text{-}5 \text{ mm}$ großen Follikel mit einer 10 ml Spritze, die mit der IVM-Lösung M199 Sigma gefüllt war. Unter dem Mikroskop wurden bei beiden Spezies intakte Kumulus-Oozyten-Komplexe ausgewählt und im Anschluss daran dreimal in M199 Sigma gewaschen. Es wurden nur KOKs als geeignet für die *In-vitro*-Maturation und die darauf folgenden Experimente eingestuft, bei denen das Ooplasma homogen erschien und die über einen mindestens 3-lagigen, gleichmäßigen, kompakten Kumuluszellverband verfügten (Abb. 3).

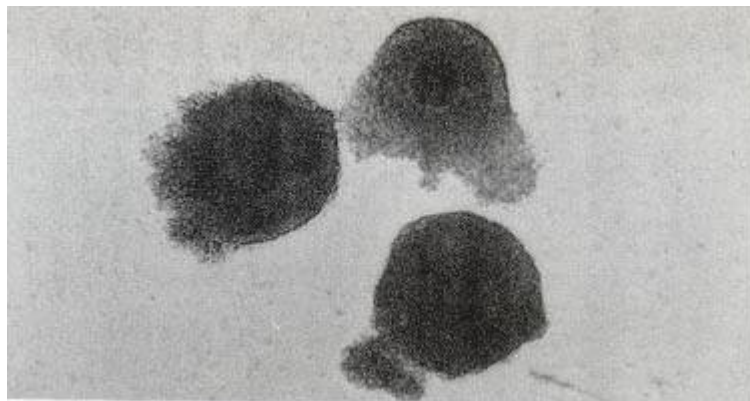


Abb. 3 Beispiel für einen verwendeten Kumulus-Oozyten-Komplex (Vergrößerung: $10\times$).

2.4 Kultivierung der Kumulus-Oozyten-Komplexe

Für die Kultivierung wurden 25-35 KOKs ausgewählt und in einer Vertiefung einer Microwell-Platte (Platten zur Kultivierung mit vier Vertiefungen), gefüllt mit 500 µl frischem und äquilibrierten Stammmedium und je nach Versuchansatz hinzugefügtem Inhibitor, gewaschen. Im darauf folgenden Schritt wurden sie in eine andere Vertiefung transferiert und für die nächsten 24 h beim Rind bzw. 44 h beim Schwein bei einer Temperatur von 39 °C in einer 5%igen CO₂ Atmosphäre unter maximaler Luftfeuchtigkeit bebrütet.

Die Experimente jeder Versuchsreihe wurden mindestens dreimal wiederholt.

2.5 Zytogenetische Beurteilung der Oozyten

2.5.1 Fixation und Färbung der Oozyten

Die Darstellung der Kernreifungsstadien der Eizellen erfolgte nach Luciano et al. (1999).

Nach der oben beschriebenen Inkubationszeit wurden die Kumuluszellen in eine frisch vorbereitete Microwell-Platte mit 500 µl PBS + 0,1% Polyvinylalkohol (PVA) überführt.

Unter einem Stereomikroskop wurden die KOKs durch wiederholtes Aufziehen in einer dem Oozytendurchmesser entsprechenden Pipettenspitze auf mechanische Weise von ihrem Kumulusverband gelöst (Denudierung). Anschließend erfolgte bei Raumtemperatur eine 15-minütige Inkubation in 4%igem Paraformaldehyd (PFA). Im letzten Schritt der Fixation wurden die denudierten Eizellen in 500 µl PBS + 0,1% PVA überführt und in dieser Lösung belassen. In diesem Zustand konnten die Oozyten für einige Tage bei einer Temperatur von 4 °C gelagert werden.

Im Anschluss erfolgte die Färbung der Oozyten. Hierfür wurden die Eizellen für 5 Minuten abgedeckt, um den Farbstoff vor Licht zu schützen, in PBS + 0,1% PVA und zusätzlich 10 µl/ml Hoechst 33258 Färbelösung belassen. Daraufhin erfolgte ein weiterer Waschschrift in PBS + 0,1% PVA.

Die Oozyten wurden in Gruppen von 5-10 Stück in einen Tropfen Fluoro Gard auf einen entfetteten Objektträger gebracht und mit einem Deckglas abgedeckt. Als Abstandhalter zwischen Objektträger und Deckglas diente Silikon. Bis zur Beurteilung des Kernreifungsstadium unter dem Mikroskop konnten diese Objektträger bei -20 °C nur für einen kurzen Zeitraum aufbewahrt werden. Eine längere Aufbewahrungszeit führte zu einer Reduktion der Fluoreszenzkraft des Farbstoffes

2.5.2 Beurteilung der Kernreifungsstadien der Oozyten

Der Vorgang der Kernreifung beinhaltet den Wechsel der Chromatininformation und die Auflösung des Nukleolus und der Kernmembran während der meiotischen Reifung.

Die Beurteilung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop bei 20x-40x Vergrößerung.

Die Oozyten wurden entsprechend dem Stadium der Kernreifung der Kategorie 'unreifes Stadium' (Zellkern im GV beziehungsweise GVBD), 'Zwischenstadium' (Zellkern in Metaphase I), 'reifes Stadium' (Zellkern in Metaphase II) oder 'degeneriertes Stadium' zugeordnet (Abb. 4).

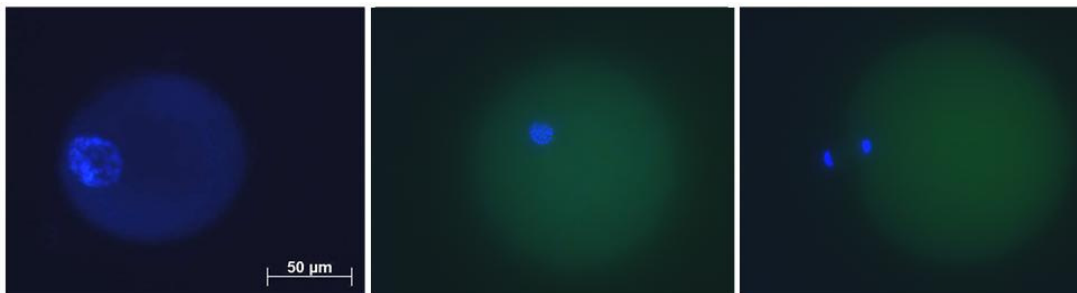


Abb. 4 Die Kernreifungsstadien GV/GVBD, M I und M II (von links nach rechts) (Vergrößerung: 20x).

2.6 Quantitative Analyse der apoptotischen Zellen

Ein frühes Anzeichen der beginnenden Apoptose ist die Translokation von Phosphatidylserin von der inneren zu der äußeren Schicht der Plasmamembran. Unter Verwendung des Annexin V-CY3 Apoptosis-Detection-Kit wurde das Phosphatidylserin an der Zelloberfläche durch das Phosphatidylserin-Bindungsprotein Annexin V, das mit CY3 konjugiert ist, detektiert.

Die gereiften KOKs wurden mit Bindungspuffer gewaschen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur unter Ausschluß von Licht in 50 µl der Färbelösung, die 1 µg/ml Annexin V-CY3 und 100 µM 6-Carboxyfluorescein-Diacetat enthielt, inkubiert. Die Zellen wurden dann noch einmal mit Bindungspuffer gewaschen und nach Aufbringen auf einen Objektträger sofort unter einem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Die Kombination beider Farbstoffe erlaubte eine Differenzierung zwischen lebensfähigen Zellen (grün), nekrotischen Zellen (rot) und apoptotischen Zellen (rot und grün).

2.7 Extraktion der mRNA

Die Isolierung der polyadenylierten [poly(A)+] RNA der KOKs erfolgte als eine mRNA-Direktisolierung mit magnetisierbaren an Oligo-dT gekoppelte Beads (Dynabeads®) durch Verwendung eines Dynabeads mRNA DIRECT kit .

Dabei wurden 30-40 KOKs in 200 µl Lysepuffer [100 mmol Tris-HCL (pH 8.0), 500 mmol LiCl, 10 mmol EDTA, 1% (wt/vol) SDS und 5 mmol Dithiothreitol] für 10 min bei

Raumtemperatur lysiert. Im Anschluss wurden 10 µl vorgewaschene Dynabeads® zu der Probe gegeben und diese für eine Zeitspanne von 5 min bei Raumtemperatur und 200 U/min hybridisiert, um eine Bindung der poly(A)+RNAs an die Dynabeads® zu ermöglichen. Das Lysat wurde für 2 min in den Dynal MPC® gegeben, der als Magnet die Dynabeads® mit der gebundenen mRNA an der hinteren Tubewand fixiert.

Der Überstand wurde abpipettiert und es erfolgte ein zweimaliges Waschen in 50 µl Waschpuffer A [10 mmol Tris-HCL (pH 8,0), 0,15mmol LiCl, 1 mmol EDTA und 1% (wt/vol) SDS] und darauf folgend ein dreimaliges Waschen in 50 µl Waschpuffer B [10 mmol Tris-HCL (pH 8,0), 0,15mmol LiCl, 1 mmol EDTA]. Nach dem letzten Waschschrift erfolgte die Eluierung bei 65°C für 2,5 min nach Resuspendierung in 11 µl DEPC-Wasser.

Nach erneuter Platzierung im Dynal MPC® konnte die sich im Überstand befindende freie mRNA in ein frisches 0,6 ml Reaktionsgefäß zur Synthese des ersten Stranges überführt werden.

2.8 Synthese der cDNA

Zur Synthese der c-DNA, d.h. zur reversen Transkription der mRNA, wurden die Proben nach Extraktion der mRNA mit dem „GeneAmp® RNA PCR Core Kit“ von Perkin Elmer weiterverarbeitet. Nach Zugabe von 2 µl PCR- Puffer, 2 µl 50 mM MgCl₂, 2 µl 10 mM dNTP, 1 µl Random Hexamer Primer, 1 µl Reverse Transkriptase und 1µl RNase-Inhibitor entstand ein finales Volumen des Reaktionsgemisches von 20 µl, das mit Silikonöl abgedeckt wurde.

Für die cDNA-Synthese wurden die Proben für 10 Minuten bei 25 °C, für 1 Stunde bei 42 °C und für 5 Minuten bei 99 °C in einem programmierbaren Heizblock inkubiert.

Nach Beendigung dieser Schritte erfolgt die sofortige Lagerung auf Eis. Die cDNA –Proben konnten dann über einen längeren Zeitraum bei –20 °C aufbewahrt werden.

2.9 Semiquantitative PCR-Reaktion

Für die Vervielfältigung bestimmter DNA-Bereiche wurden 2 µl Einzelstrang-c-DNA benutzt. Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug 30 µl und enthielt 0,6 µl der oben aufgeführten Oligonucleotidprimerkombinationen, 0,18 µl 1 U hitzestabile *Taq* Polymerase, 0,6 µl 10mM dNTPs, 0,9 µl 50 mM MgCL₂ und 3 µl 10xPCR Puffer und Wasser ad 30 µl. Zur Kontrolle der Reinheit aller Reagenzien im Reaktionsgemisch enthielt jede PCR eine Wasserprobe ohne cDNA. Der Enzymmix wurde in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben und zur Vermeidung von Evaporationen mit Mineralöl abgedeckt. Die Schritte der Amplifizierung fanden in einem programmierten Heizblock statt und umfassten die Erhitzung auf 94 °C für eine Dauer von 30 sec. Bei dieser Temperatur trennten sich die DNA-Stränge vollständig voneinander und bildeten Einzelstränge. Der nächste Schritt lief

bei einer Temperatur von 57 °C ab. Er dauerte 30 sec und erlaubte in dieser Zeit das Anbinden (englisch *anneal*) der Primer an die komplementären Sequenzen der DNA-Moleküle. Die Elongation der neu synthetisierten DNA-Stränge durch die *Taq* Polymerase erfolgte in einem Zeitraum von 45 sec und einer Temperatur von 72 °C. Um die Signale unterschiedlicher RNA-Proben anzugleichen wurden β -Aktin-Transkripte als international vergleichbarer Standard vervielfältigt. Der gesamte Zyklus wurde bei der Amplifikation von β -Aktin 30mal und bei der Vervielfältigung der Sequenzen unserer Zielgene 40mal wiederholt. Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden 20 μ l jeder Probe mit 3 μ l Ladepuffer versetzt und auf ein Gel, bestehend aus 4,5 g Agarose, gelöst in 300 ml TAE-Puffer und mit 0,2 μ g/ml Ethidiumbromid versetzt, aufgetragen, um eine Elektrophorese durchzuführen. Die Auftrennung der PCR-Amplifikate erfolgte bei 90 mV. Das Gel wurde unter Benutzung eines UV-Tisches visualisiert, durch eine CCD Kamera digitalisiert und die Intensität jeder Bande durch eine densitometrische Analyse quantifiziert. Hierfür stand ein Computer assistiertes Bild-Analyse System (BioProfil LTF software, LTF Labortechnik, Wasserburg/B, Deutschland) zur Verfügung.

Zur Ermittlung des relativen Anteils der mRNA wurden die densitometrisch gemessenen Werte der β -Aktin-Bande und der Bande der entsprechend korrespondierenden Probe zueinander in ein prozentuales Verhältnis gesetzt.

Für jede mRNA wurden die Experimente mindestens dreimal repliziert.

2.10 SDS-Elektrophorese

Die Proben enthielten jeweils 25 Kumulus-Oozyten-Komplexe und wurden in Vorbereitung auf die Durchführung der Western-Blot-Analyse zur Isolierung der Proteine mit 30 μ l Ripa-Puffer versetzt. Im nächsten Schritt wurde dieses Gemisch im Reaktionsgefäß mit einer sterilen 1 ml Einmalspritze aspiriert, resuspendiert und anschließend gevortext, um eine Abtrennung der Oozyten von ihrem Kumuluszellverband zu erreichen. Für die Isolierung von Proteinen, die in ihrem ursprünglichen Phosphorylierungsstatus nachgewiesen werden sollen, ist es notwendig vor der Weiterverarbeitung der Proben je 2 μ l Phosphataseinhibitor-Cocktail zu dem Reaktionsgemisch hinzuzufügen, um eine Phosphorylierung zu verhindern. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis folgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C für weitere 30 min. Der Überstand wurde abpipettiert, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Im Anschluß wurden diese Proben mit je 15 μ l *Reducing Sample*-Puffer versetzt für 5 min bei 90 °C in einem Wärmeblock inkubiert. Hierbei kommt es zu einer Zerstörung der Zellmembran und zur Freisetzung von Proteinen. Als letzter Schritt der Vorbereitung wurden die Proben in der Zentrifuge für wenige Sekunden anzentrifugiert. Das Ziel der Elektrophorese war es die Proteine CYP1A1 (55-60 kDa), ERK 1 (44 kDa) und ERK 2 (42 kDa) von den übrigen

Proteinen im Eizellextrakt zu separieren, um die Transkriptionsrate unter Behandlung mit den verschiedenen Inhibitoren zu vergleichen.

Diese Separation erfolgte unterer Einsatz der diskontinuierlichen SDS-Page nach Laemmli (1970). Das Prinzip dieses Verfahrens ist es Proteine in einer Matrix (Polyacrylamid) anhand ihrer molekularen Massen in einem elektrischen Feld aufzutrennen. Durch die Applikation von SDS erhalten alle Proteine pro gebundenem SDS-Molekül zwei negative Ladungen. Dies erlaubt die Auftrennung im elektrischen Feld unter Vernachlässigung der molekülspezifischen Ladung. Die Gele bestehen aus einem Trenngel, das von einem Sammelgel überschichtet wird, um eine Konzentrierung der Proteine vor der Auftrennung im Trenngel zu erreichen.

Im Trenngel werden die Proteine in scharfen Banden fokussiert. Für die Auftrennung der Proteine wurde ein 10%iges Polyacrylamidgel vorbereitet. Hierfür wurde zuerst ein Trenngel (3,32 ml Acrylamid + 2,5 ml Trenngelpuffer + 4,18 ml A. bidest. + 20 µl TEMED + 100 µl APS 10%) in eine Gelkassette gegeben und nach einer ca. 20 minütigen Polymerisierung das Sammelgel (1 ml Acrylamid + 2,5 ml Sammelgelpuffer + 6,5 ml A. bidest. + 20 µl TEMED + 100 µl APS 10%) darüber gegossen. Um die Taschen zum Einfüllen der Proben zu erhalten, wurde in das Sammelgel ein Profilformer mit entsprechenden Aussparungen gesetzt, der nach Auspolymerisierung des Sammelgels entfernt werden konnte. Die Kassette mit dem Gel wurde in eine Elektrophoresekammer eingespannt, um im Anschluß daran die Proben in die Taschen zu überführen und das gesamte System mit Laufpuffer (1×) aufzufüllen. Zur Bestimmung der Bandengröße wurde bei jedem Gellauf ein MassRuler™ DNA Ladder, low range (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) geladen. Die Kammern wurden an das Spannungsgerät angeschlossen und der Gellauf erfolgte für 1 ½ h bei 125 V bis die Bromphenolblaubanden der Proben bis 0.5 bis 1 cm vom Ende des Trenngels entfernt angelangt waren.

2.11 Westernblot

Im Anschluß an die SDS-Elektrophorese erfolgte das eigentliche 'Blotting'. Es ist eine Methode, bei der die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Trenngel auf einen geeigneten Träger, z.B. Nitrocellulose oder Nylon übertragen werden. Hierbei wird eine Kopie des Gels produziert, wobei die Proteine auf dem Filter immobilisiert werden. Die Bindung der Makromoleküle an Nitrocellulose erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoff-Brücken.

Nach dem Transfer sind die Proteine für die Behandlung mit verschiedenen Liganden, Antikörpern, Lecithinen oder Enzymbstraten zugänglich, sodass der Western Blot nicht nur für die qualitative und quantitative Bestimmung einzelner Proteine im Gemisch, sondern auch für deren Identifikation geeignet ist.

Nach der Trennung der Proteine durch die SDS-Elektrophorese erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrcellulose-Membran. Hierfür wurde das Gel vorsichtig aus der Gelkassette gelöst, um anschließend die Membran auf das Gel zu legen. Danach wurde jeweils von oben und von unten Filterpapier angelegt, und dieser Komplex zwischen mit Transferpuffer getränkten Schwämmen als eine Art 'Sandwich' in die Western-Blot-Kammer gelegt und verschlossen. Nach 1 ½ stündiger Laufzeit bei 23 V wurde das Gel zur Anfärbung in *Coomassie Brillante Blue*-Lösung auf einem Rüttler für eine Dauer von 20 Minuten geschwenkt. Das Gel wurde danach über Nacht in Entfärberlösung inkubiert und später bei Raumtemperatur getrocknet. Die Membran wurde für den Färbevorgang 5 bis 10 Minuten in Ponceau-Lösung auf dem Rüttler geschwenkt und danach mit Reinstwasser wieder entfärbt. Die mit Hilfe der Blotting-Technik hergestellten Membranfilter müssen vor der weiteren Verwendung mit Blockierungsreagenzien behandelt werden, um alle unbesetzten Bindungsstellen auf der Membran zu maskieren. Hierfür wurde eine *Blocking*-Lösung verwendet, in der die Membran für 1 Stunde bei leichtem Schütteln inkubiert wurde. Die Identität von Proteinen kann nur mit Hilfe einer Immunodetektion bestimmt werden, die den Einsatz von spezifischen Antikörpern beinhaltet. Das Prinzip besteht darin, dass der Primärantikörper das gesuchte Protein spezifisch bindet und der Sekundärantikörper spezifisch gegen Bereiche, in der Regel die Fc-Bereiche, des ersten Antikörpers gerichtet ist und an diese bindet. In den hier beschriebenen Experimenten wurde ein polyklonaler Antikörper vom Kaninchen gegen CYP1A1 in der Verdünnung 1:100 in 5%iger Magermilchpulver-Lösung in TBS-T und ein monoklonaler Antikörper von der Maus gegen phosphorylierte ERK 1/ERK 2 (p42/p44) in der Verdünnung 1:500 eingesetzt. Nach der Inkubation mit der *Blocking*-Lösung wurde diese entfernt und die Membran mit der primären Antikörperlösung für 1,5 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Im Anschluß erfolgte ein mehrmaliges Waschen mit TBS-T (1×) und danach die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1 h. Um den störenden Hintergrund zu entfernen wurden nochmals mehrere Waschschrte mit TBS (1×) angeschlossen. Die Visualisierung erfolgte über eine Chemilumineszenzreaktion unter Benutzung einer Chemilumineszenzlösung (je 2 ml ECL-1 und ECL-2 für insgesamt 5 min) und dem Nachweis auf einem photographischen Film. Anschließend konnte der entwickelte Film densitometrisch ausgewertet werden.

3 Ergebnisse

Die Experimente dieser Arbeit lassen sich in zwei Hauptabschnitte untergliedern.

Zum einen wurden die funktionelle Rolle des AhR-Signalweges und die potentiellen Interaktionen mit den Mitogen aktivierten Proteinkinasen p44/42 (MAPK, ERK 1/2) während der *In-vitro*-Reifung von Rinderoozyten untersucht.

Im zweiten Abschnitt wird mit dem AhR-Liganden β -Naphthoflavone die toxikologische und potentiell physiologische Rolle des AhR während der Reifung von Oozyten beschrieben. Zusätzlich wurden die Effekte verschiedener Kulturbedingungen auf den AhR-Signalweg in porzinen Kumulus-Oozyten-Komplexen in An- beziehungsweise Abwesenheit von β -Naphthoflavone untersucht.

3.1 Induktion eines meiotischen Arrest und der Einfluß auf die Expression des AhR-Zielgenes CYP1A1 und die Reifung der Rindereizellen (IVM-Rate)

3.1.1 6-DMAP und Cycloheximide

Beobachtungen an Rindereizellen haben gezeigt, dass der AhR während der *In-vitro*-Reifung von Rindereizellen aktiviert wird und eine potentielle Funktion in der Regulation des korrekten Ablaufes der Reifung besitzt (Pocar et al., 2004).

Um den Einfluß der AhR-Aktivierung auf die *In-vitro*-Reifung und insbesondere die molekularen Mechanismen, die dieser Aktivierung unterliegen, zu erforschen, wurde in dieser Arbeit die Aktivität des AhR unter den Bedingungen eines meiotischen Arrestes untersucht. Die Reifung wurde durch 6-DMAP inhibiert. Die KOKs wurden für 24 Stunden in Basis-Maturationsmedium (BMM) kultiviert, dem 4mM 6-DMAP (6-DMAP 24h) hinzugefügt wurde. Als Kontrollgruppe dienten KOKs, die in BMM ohne Zusatz eines Inhibitors für 24 h (Kontrolle) reiften. Nach der Kultivierung wurde ein Teil der KOKs bei -20°C eingefroren, um im Anschluß daran die Expression der Gene des AhR-Signalweges auf mRNA- und Proteinebene zu analysieren. Der andere Teil wurde hinsichtlich der Kumulusexpansion und der Kernreifungsstadien, wie unter 2.5.2 beschrieben, beurteilt.

Wie erwartet führte die Behandlung mit 6-DMAP für die restliche Dauer der Kultur zu einer Arretierung der Eizellen im GV/GVBD-Stadium. Bei der Beurteilung der Kernreifungsstadien stellte sich heraus, dass sich 92,5% der mit 6-DMAP-behandelten Kumulus-Oozyten-Komplexe im GV-Stadium befanden. Der Vergleich zu der Kontrollgruppe (2,1% im GV-Stadium) war statistisch signifikant. Zusätzlich zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der gereiften KOKs. In der Kontrollgruppe konnten 73,6% der KOKs gegenüber 0% bei der Behandlung mit 6-DMAP der Metaphase II zugeordnet werden (Tab.8).

Des Weiteren konnte in diesem Experiment eine statistisch signifikant niedrigere Rate der phosphorylierten MAP-Kinasen ERK 1 (p-ERK 1, p44) und ERK 2 (p-ERK 2, p42) beobachtet werden. Die Expression auf Proteinebene wurde hierfür nach 24-stündiger Inkubation mit 4mM 6-DMAP durch Western Blot-Analyse analysiert (Abb. 5).

Der Einsatz dieses Inhibitors führte außerdem zu einer signifikanten Senkung der Rate von CYP1A1 und CYP1B1 mRNA (15,74% und 26,84% der Kontrolle) (Abb. 6).

Die Analyse der Expression von CYP1A1 auf Proteinebene bestätigte die bereits erhaltenen mRNA-Daten (Abb. 5).

Bei der Untersuchung der Transkriptrate von AhR und ARNT auf mRNA-Ebene zeigten sich keine statistisch signifikanten Veränderungen (Abb. 7).

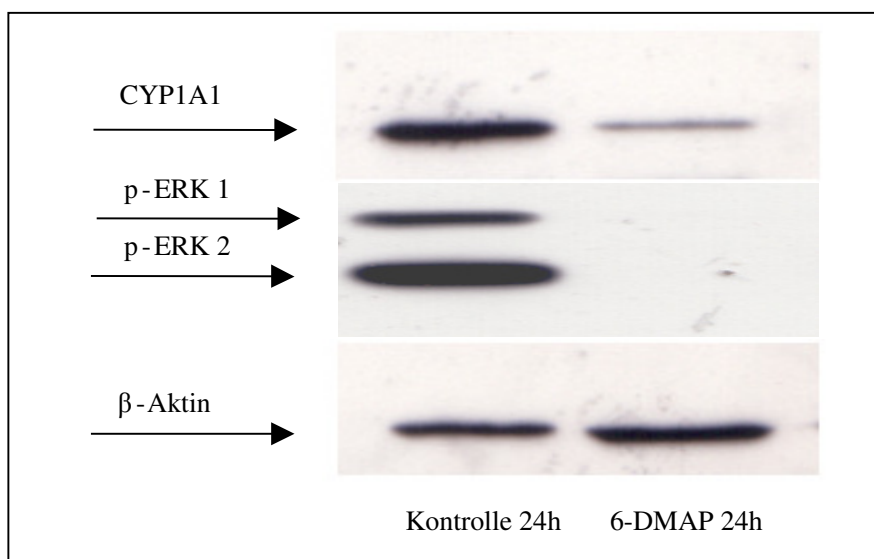
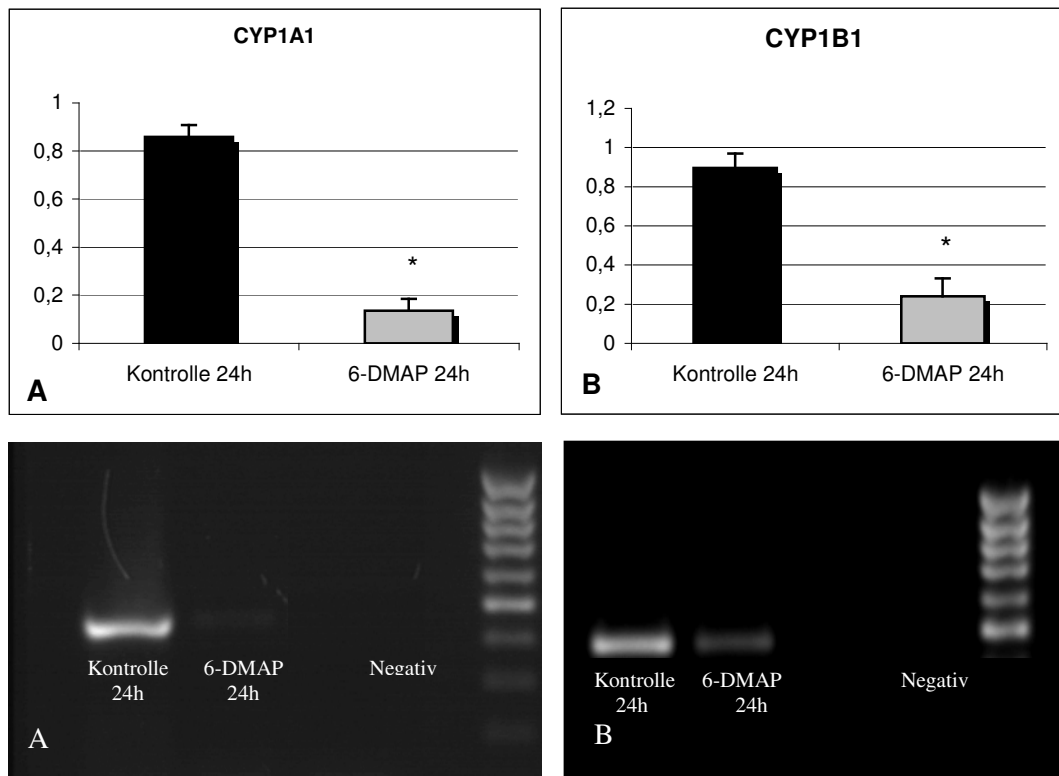
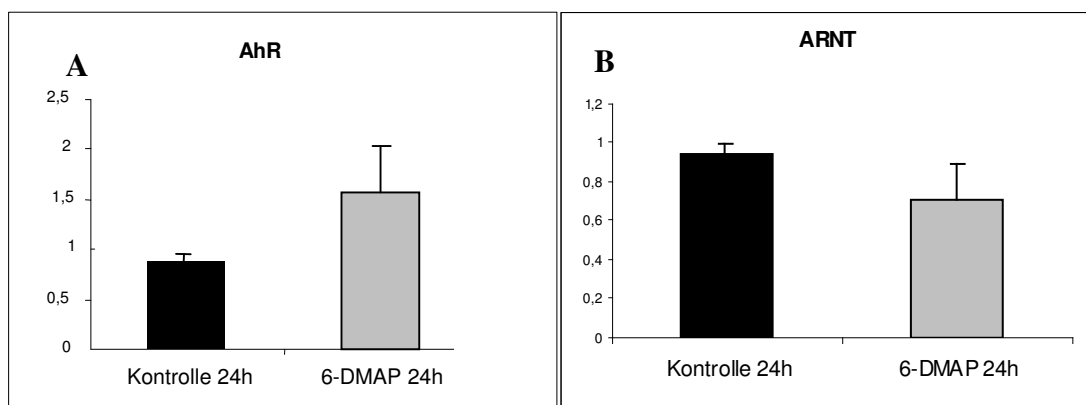


Abb. 5

Westernblotanalyse der Expression von CYP1A1, p-ERK 1 und p-ERK 2 in Rinderoozyten nach Exposition mit 4 mM 6-DMAP. Die Exposition mit 6-DMAP führte in den KOKs im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer signifikanten Reduktion der Transkripte von CYP1A und der Expression von p-ERK 1 und p-ERK 2.

**Abb. 6**

Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für CYP 1A1 (A) und CYP 1B1 (B) nach Exposition mit 4mM 6-DMAP. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. Die Exposition mit 6-DMAP führte in den KOKs im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer signifikanten Reduktion der Transkripte von CYP1A1 und CYP1B1 (* $p < 0,05$). Zusätzlich Darstellung der Ergebnisse der Gelelektrophorese.

**Abb. 7**

Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für AhR (A) und ARNT (B) nach Exposition mit 4mM 6-DMAP. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. Die Exposition mit 6-DMAP führte in den KOKs im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht zu einer signifikanten Veränderung der Transkripte von AhR und ARNT (* $p < 0,05$).

Diese Daten zeigen, dass 6-DMAP eine Reduktion der Aktivität des AhR vermittelt. Um die Mechanismen, die zu dieser Reduktion führen, weiter definieren zu können, wurde untersucht, ob die beobachteten Effekte reversibel sind. Hierfür wurden die KOKs nach einer 24-stündigen Inkubation in 4mM 6-DMAP (6-DMAP 24h) für weitere 24h in frisches Maturationsmedium ohne Inhibitorzusatz überführt (6-DMAP 24h + BMM 24 h). Es zeigte sich dabei neben einer erwarteten wiederhergestellten Fähigkeit der Oozyten, die *In-vitro*-Reifung zu durchlaufen (Tab. 8), auch eine signifikante Steigerung der Rate der phosphorylierten MAP-Kinasen verglichen mit der Behandlung mit dem Inhibitor (6-DMAP 24h) (Abb. 8). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass es zu einer Erholung der Expression von CYP1A1 kommt. Dies wurde aus der Transkriptmenge von CYP1A1 auf mRNA-Ebene ersichtlich, die verglichen mit alleiniger Kultivierung mit 6-DMAP (6-DMAP 24h) im Mittel um 4,3 anstieg und im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied aufzeigte (Abb. 9). Die Analyse der Expression von CYP1A1 auf Proteinebene bestätigte die bereits erhaltenen mRNA-Daten (Abb. 8).

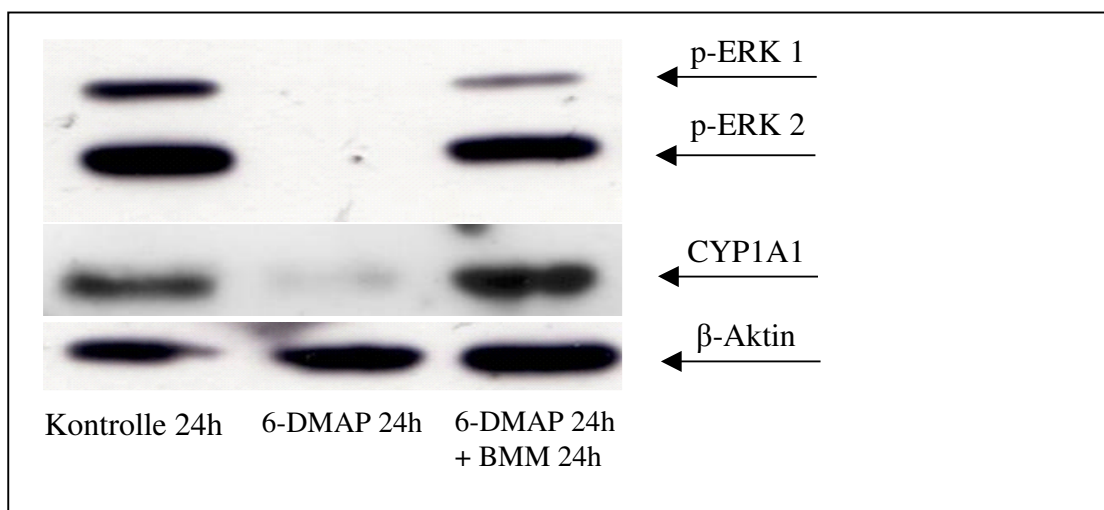
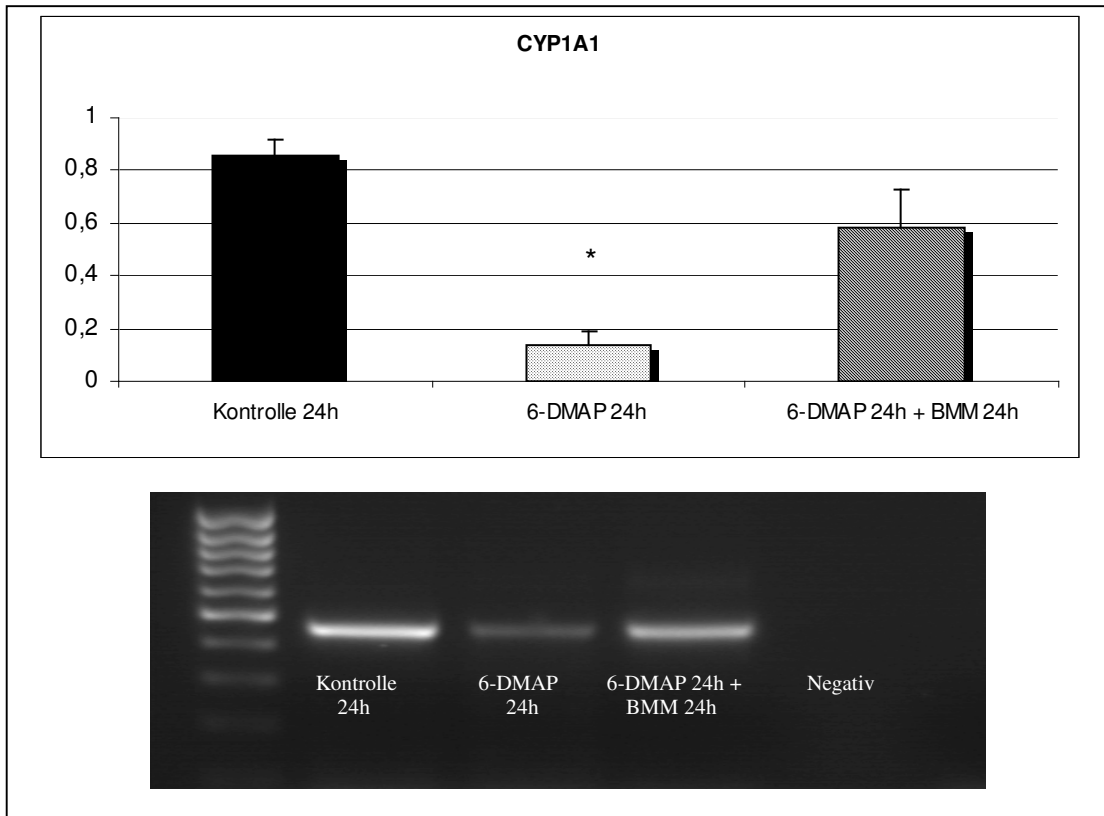


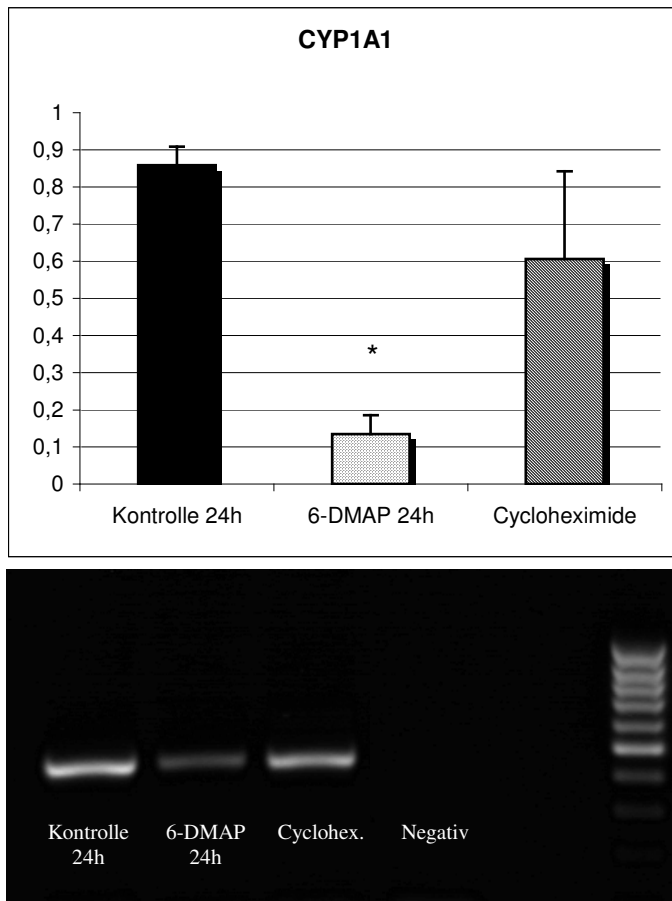
Abb. 8

Westernblotanalyse der Expression von CYP1A1, p-ERK 1 und p-ERK 2 in Rinderoozyten nach Exposition mit 4 mM 6-DMAP für 24h und weiterer Kultivierung in BMM für 24h (6-DMAP 24h + BMM 24h). Die Exposition mit 6-DMAP führte in den KOKs im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer signifikanten Reduktion der Transkripte von CYP1A1 und der Expression von p-ERK 1 und p-ERK 2. In der Kultur mit 6-DMAP 24h + BMM 24h zeigte sich im Vergleich zur Inhibitorbehandlung eine signifikante Steigerung der Rate von p-ERK 1, p-ERK 2 und CYP1A1 (* $p < 0,05$).

**Abb. 9**

Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für CYP 1A1 nach Exposition mit 4mM 6-DMAP für 24h und anschließender Inkubation in BMM für 24h (6-DMAP 24h + BMM 24h). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. Diese Behandlung führte in den KOKs im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht zu signifikanten Veränderungen im Expressionsniveau. Im Vergleich zu der Exposition gegenüber 6-DMAP für 24h (6-DMAP 24h) zeigte sich ein signifikanter Unterschied (* $p < 0,05$).

Zusammenfassend konnte in diesem ersten Teil der Experimente gezeigt werden, dass es unter Einfluß von 6-DMAP zu einem Arrest im physiologischen Ablauf der Meiose und einer Senkung der Transkriptionsrate von CYP1A1 sowie der Rate an phosphorylierter ERK 1 und ERK 2 kommt. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob diese Veränderungen einer geringeren Aktivität der MAP-Kinasen zuzuschreiben sind, wurden Kumulus-Oozyten-Komplexe für 24 Stunden in Anwesenheit von 10 μ M Cycloheximide kultiviert. Die 24-stündige Exposition mit Cycloheximide führte zu einer Hemmung der Eizellen in dem physiologischen Ablauf der Meiose, wobei sich nach der Behandlung der größte Teil der Oozyten im GV/GVBD-Stadium befand (Tab. 8). Die Analyse der Expression von AhR, ARNT, CYP1A1 (Abb. 10) und CYP1B1 auf mRNA-Ebene zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe (Daten grafisch nicht dargestellt). Diese Ergebnisse bestätigen die Rolle von Phosphorylierungsprozessen im Rahmen der Regulation der AhR-Aktivität in KOKs beim Rind.

**Abb. 10**

Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für CYP1A1 nach Exposition mit 4mM 6-DMAP bzw. 10µM Cycloheximide. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. Nach Exposition mit 6-DMAP konnte für CYP 1A1 in den KOKs eine signifikant niedrigere Transkriptmenge im Vergleich zur Kontrollgruppe und Cycloheximide ermittelt werden (* $p < 0,05$). Zusätzlich Darstellung der Ergebnisse der Gelelektrophorese.

Tab. 8 Effekte von 6-DMAP und Cycloheximide auf die *In-vitro*-Maturation von Rinderoozyten. Repräsentative Darstellung der prozentualen Mittelwerte der Anzahl der Oozyten in den verschiedenen Kernreifungsstadien.

Behandlung	GV/GVBD (%)	M I (%)	M II (%)	Degneriertes Stadium (%)
Kontrolle	2,1 ^a	18,8 ^a	73,6 ^a	5,5
6-DMAP 24h	92,5 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	7,5
Cycloheximide	97,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	3,0
6-DMAP 24h +BBM 24h	6,0 ^a	19,8 ^a	71,7 ^a	4,8

^{abcd} Unterschiedliche Fußnoten in einer Spalte bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$).

3.1.2 Der Einsatz des spezifischen MEK-Inhibitor PD98059

Um die Interaktionen zwischen der MAPK-Kaskade und dem AhR-Signalweg genauer untersuchen zu können, wurde der spezifische MEK-Inhibitor PD98059 [2-(2'-amino-3'-methoxyphenyl)-oxanaphthalen-4-one] ausgewählt. PD98059, ein Flavonoid mit inhibitorischer Wirkung auf die *Mitogen Activated Protein Kinase-Kinase* (MEK) (Alessi et al., 1995; Dudley et al., 1995; Guyton et al., 1996; Cook et al., 1997) verhindert die durch MEK-Kinase und raf 1 induzierte Phosphorylierung von MEK (Alessi et al., 1995; Dudley et al., 1995).

Die Inkubation der KOKs erfolgte für 3 (T=0-3h), 15 (T=0-15h) und 24 (T=0-24h) Stunden in BMM unter Zusatz von 10µM PD98059 gelöst in DMSO (0,001%).

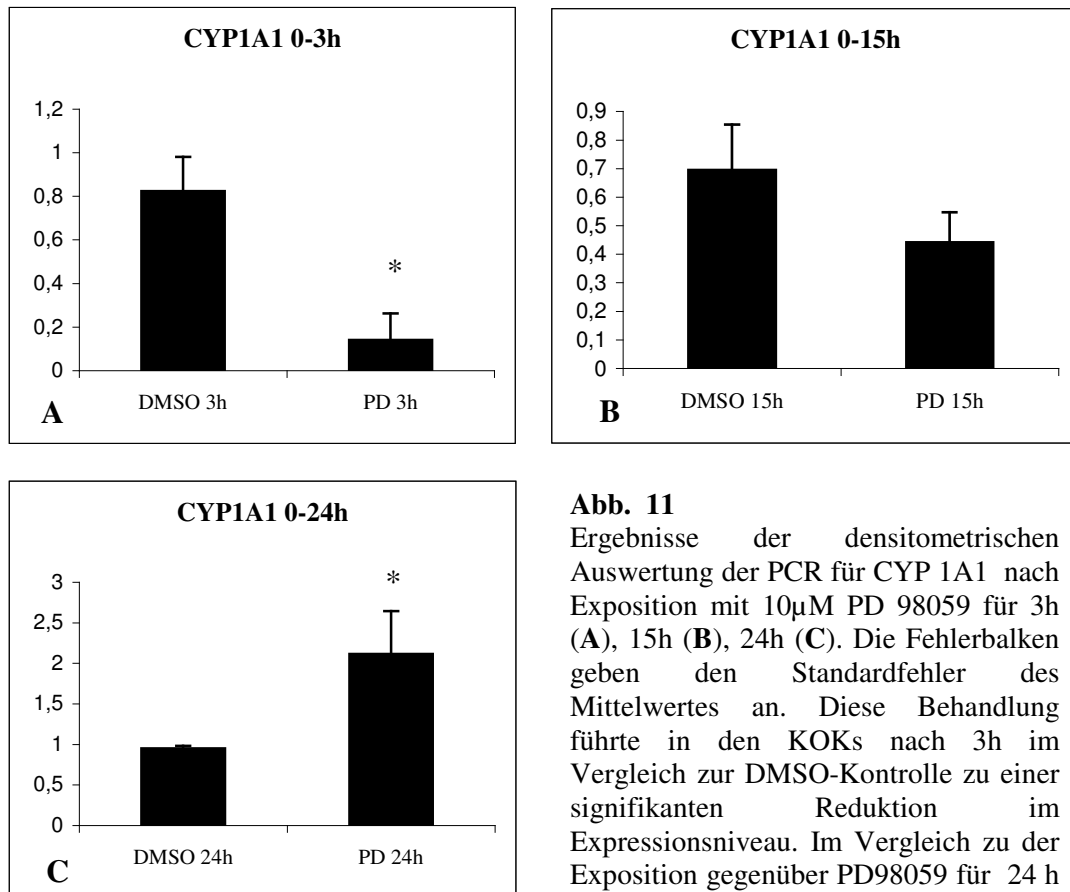
Die Kontrollgruppe, wurde in BMM+0,001% DMSO inkubiert, da DMSO als Lösungsmittel für PD 98059 fungierte.

Nach einer dreistündigen Exposition gegenüber PD98059 (T=3h) konnte eine im Mittel um 5,9-fach signifikant niedrigere mRNA-Menge von CYP1A1 im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle ermittelt werden (Abb. 11 A).

Die Inkubation mit dem Inhibitor für 15 h (T=15h) führte in den Rinder-KOKs zu keinen nennenswerten Unterschieden in der Transkriptionsrate der mRNA (Abb. 11 B).

In dem Expositionsversuch über einem Zeitraum von 24 h (T=24h) wurde im Vergleich zu der Behandlung mit DMSO im Durchschnitt ein Anstieg der Transkriptmenge um 2,2 ermittelt, der mit einem $p < 0,05$ eine statistische Signifikanz aufwies (Abb. 11 C).

Bei der Beurteilung der Kernreifungsstadien stellte sich heraus, dass sich nach 15 h Kultur 62,5% der in DMSO beziehungsweise 82,8% der mit PD98059 behandelten Kumulus-Oozyten-Komplexe in der Metaphase I befanden. Nach 24 h konnten 84,7% in der DMSO-Gruppe und 68,0% in der PD98059-Gruppe der Metaphase II zugeordnet werden (Tab. 9). Zusätzlich konnten Veränderungen in der Phosphorylierung von p-ERK 1 und p-ERK 2 auf Proteinebene beobachtet werden. Der Einsatz des Inhibitors führte hier nach einer dreistündigen Exposition zu einem signifikanten Abfall der Rate der phosphorylierten MAP-Kinasen, die nach 15h wieder leicht angestiegen war. Im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle konnte bei der Inkubation mit PD98059 für 24h ein signifikanter Anstieg der Proteinmenge von p-ERK 1 und p-ERK 2 beobachtet werden (Abb. 12).

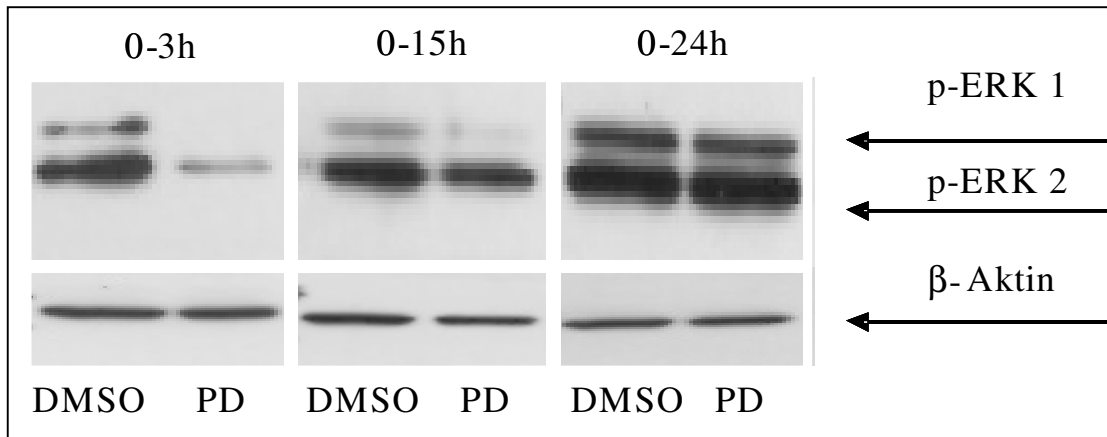
**Abb. 11**

Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für CYP 1A1 nach Exposition mit 10 μ M PD 98059 für 3h (A), 15h (B), 24h (C). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. Diese Behandlung führte in den KOKs nach 3h im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu einer signifikanten Reduktion im Expressionsniveau. Im Vergleich zu der Exposition gegenüber PD98059 für 24 h zeigte sich ein signifikanter Anstieg (* $p < 0,05$).

Tab. 9 Effekte von PD98059 auf die *In-vitro*-Maturation von Rinderoozyten. Repräsentative Darstellung der prozentualen Mittelwerte der Anzahl der Oozyten in den verschiedenen Kernreifungsstadien.

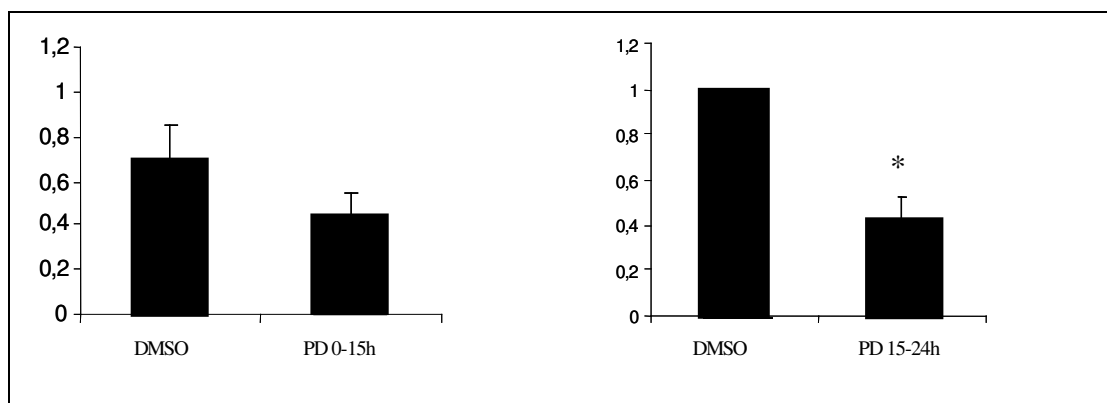
Behandlung	GV/GVBD (%)	MI (%)	M II (%)
DMSO 15h	0,0	62,5 ^b	34,9 ^b
PD98059 15h	0,0	82,8 ^a	10,7 ^a
DMSO 24h	0,0	11,3 ^d	84,7 ^d
PD98059 24h	0,0	28,0 ^c	68,0 ^c

^{abcd} Unterschiedliche Fußnoten in einer Spalte bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$).

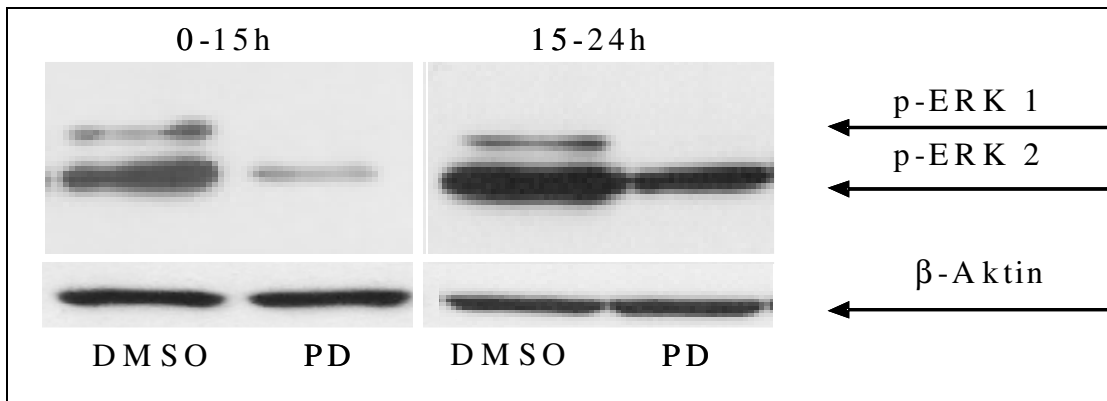
**Abb. 12**

Westernblotanalyse der Expression von p-ERK 1 und p-ERK 2 in Rinderoozyten nach Exposition mit 10 μM PD98059. Die Exposition mit PD98059 führte in den KOKs nach 3h zu einem signifikanten Abfall der Rate der phosphorylierten MAP-Kinasen, die nach 15h wieder leicht angestiegen war. Im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle konnte bei der Inkubation mit PD98059 für 24h ein signifikanter Anstieg der Proteinmenge von p-ERK 1 und p-ERK 2 beobachtet werden .

Des Weiteren wurde untersucht, ob der Wiederanstieg von phosphorylierter ERK 1 und 2 sowie parallel dazu der Anstieg der Transkriptmenge von CYP1A1 durch einen Aktivitätsverlust des Inhibitors verursacht wird oder ob die Phosphorylierung von ERK 1 und 2 nach 15 Stunden der *In-vitro*-Reifung nicht mehr der Kontrolle von MEK unterliegt. Für diese Untersuchung wurden die KOKs in BMM+DMSO kultiviert (PD 0-15h), dem erst 15 h nach Beginn der Kultivierung PD98059 hinzugefügt wurde und die dann für weitere 9 Stunden inkubiert wurden (PD 15-24h). Es konnte beobachtet werden, dass es unter diesen Bedingungen zu einer signifikanten Reduktion der Expression von CYP1A1 (Abb. 13) und der Rate der phosphorylierten MAP-Kinasen, vor allem von ERK 1 kommt (Abb. 14).

**Abb. 13**

Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für CYP 1A1 nach Exposition mit 10 μM PD98059 ab der 15. Stunde der Kultur (PD 15-24h). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. Der späte Zusatz des Inhibitors führte in den KOKs im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu einer signifikanten Reduktion im Expressionslevel (* $p < 0,05$).

**Abb. 14**

Westernblotanalyse der Expression von p-ERK 1 und p-ERK 2 in Rinderootzyten nach Exposition mit 10 μ M PD98059 ab der 15. Stunde der Kultur (PD 15-24h). Der späte Zusatz des Inhibitors führte in den KOKs Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu einer signifikanten Reduktion der Rate der phosphorylierten MAP-Kinasen.

3.2 Die Regulation der Aktivität des AhR in Schweine-Kumulus-Oozyten-Komplexen unter physiologischen und toxikologischen Bedingungen: Die Bedeutung von Follikelflüssigkeit

3.2.1 Die konstitutive und ligandeninduzierte Expression der Gene des AhR-Signalweges während IVM

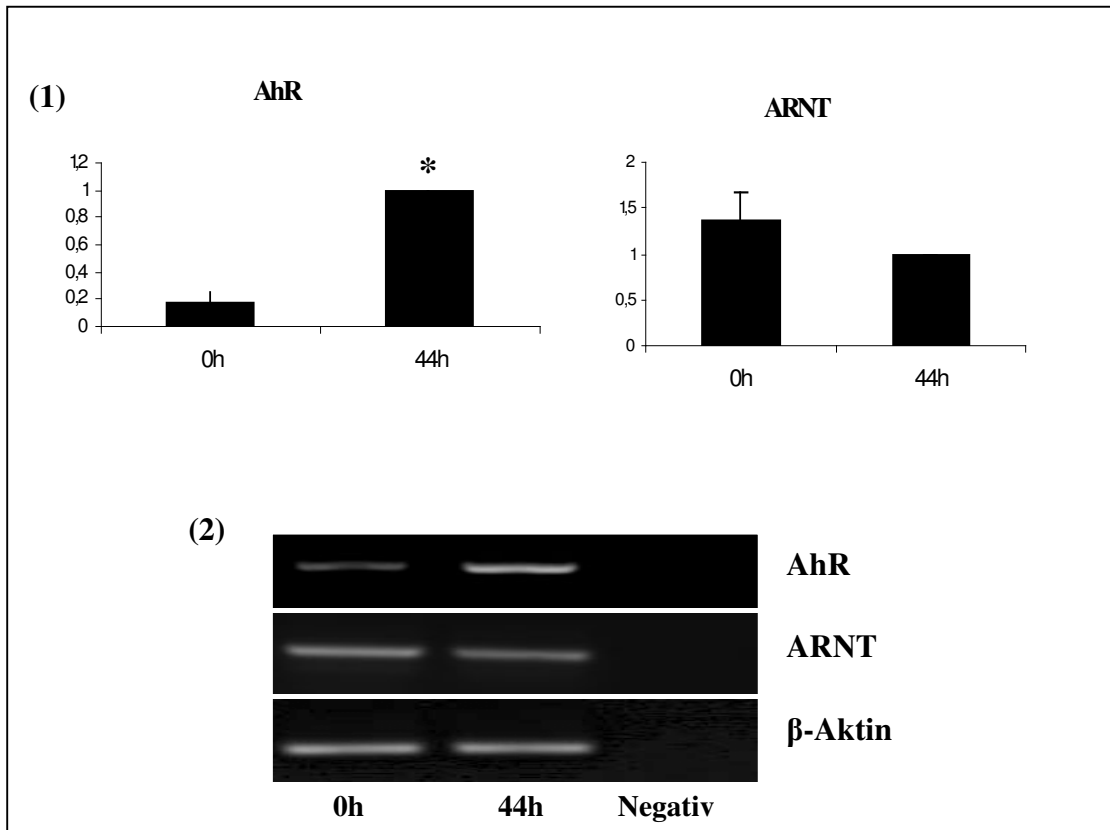
Um neue Erkenntnisse bezüglich der toxikologischen und potentiellen physiologischen Rolle des AhR während der Reifung von Oozyten zu gewinnen, wurde der Einfluß des AhR-Liganden β -Naphthoflavone (β -NF) auf die Eizellreifung und die Effekte verschiedener Kulturbedingungen auf den AhR-Signalweg in porzinen Kumulus-Oozyten-Komplexen in Anwesenheit beziehungsweise Abwesenheit von β -Naphthoflavone untersucht.

In diesem Versuchsabschnitt wurde die unreifen Oozyten, nachdem die KOKs gemäß der Methode, wie in 2.3 beschrieben, vorbereitet worden waren, bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren ($T=0$).

Die restlichen KOKs wurden für 44 Stunden in BMM versetzt mit 10 % Follikelflüssigkeit inkubiert. Die Expression von AhR und seinem Partner ARNT wurde durch semiquantitative RT-PCR untersucht. Zu Beginn der Kultur ($T=0\text{h}$) wurde in den unreifen Eizellen eine konstitutive Expression der AhR mRNA und ARNT mRNA beobachtet. Die Expressionsrate des AhR stieg während der nächsten 44 Stunden des IVM signifikant an ($p<0.05$) (Abb. 15). Die Transkriptmenge von ARNT zeigte während der gesamten Reifungsdauer keine signifikanten Variationen im Expressionsniveau (Abb. 15).

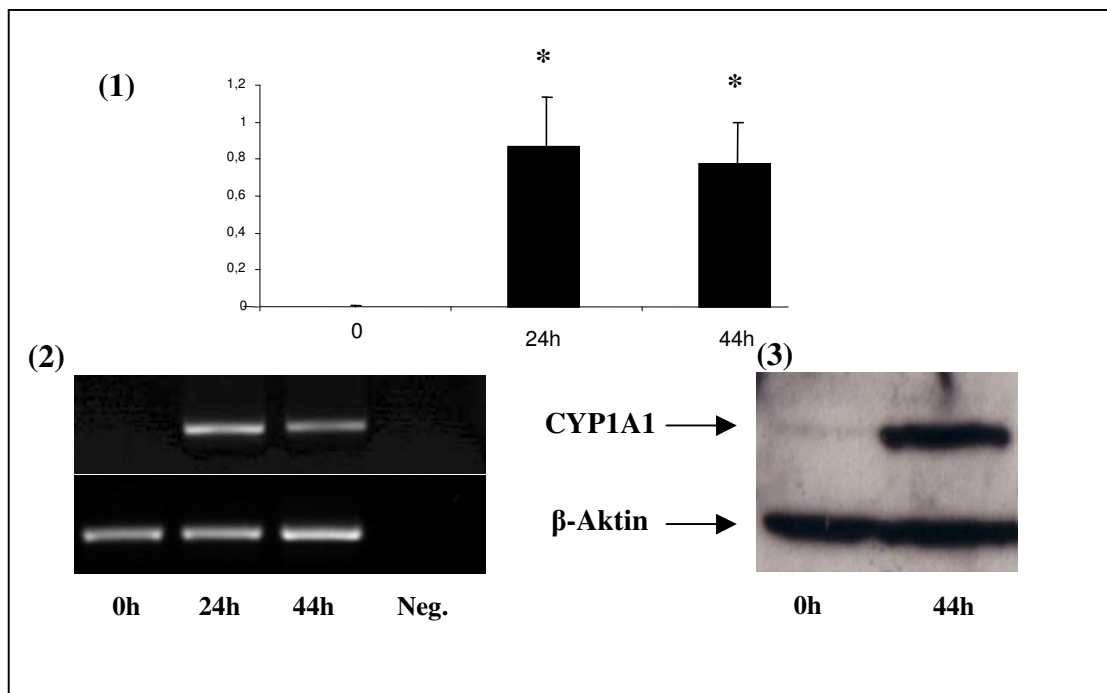
Um die Funktionalität des Ah-Rezeptors zu testen, wurde die Expression von CYP1A1, dem Hauptzielgen des AhR, während der *In-vitro*-Reifung analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass CYP1A1 mRNA in unreifen KOKS zum Zeitpunkt $T=0$ konstitutiv exprimiert wird und die Transkriptmenge sich in der darauf folgenden 24 beziehungsweise 44-stündigen Inkubation signifikant erhöht ($p<0.05$)

[Abb. 16 (1) und (2)]. Die Analyse der Expression von CYP1A1 auf Proteinebene bestätigte die bereits erhaltenen mRNA-Daten [Abb. 16 (3)]. Daraus lässt sich auf eine konstitutive Aktivierung des AhR-Signalweges schließen. Dieses Ergebnis führt zu der Frage, ob der AhR-Signalweg in porzinen KOKs die Toxizität von exogenen Liganden vermitteln kann. Hierfür wurde die Expression von CYP1A1 unter dem Einfluß von $50\text{ }\mu\text{M}$ β -Naphthoflavone (β -NF) während der *In-vitro*-Reifung analysiert. β -NF ist ein bekannter prototypischer AhR-Ligand.

**Abb. 15**

(1) Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für AHR und ARNT nach 0 beziehungsweise 44h IVM. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. Es konnte nach 44h IVM in den KOKs eine signifikant erhöhte Transkriptmenge für AHR ermittelt werden (* $p < 0,05$). Die Expression von ARNT zeigte keine Veränderungen im Vergleich zum Zeitpunkt T=0.

(2) Darstellung der Ergebnisse der Gelelektrophorese.

**Abb. 16** (1) Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für CYP1A1 in porzinen KOKs vor und nach 24 beziehungsweise 44h IVM. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. Es konnte nach 24 und 44h IVM in den KOKs eine signifikant erhöhte Transkriptmenge für CYP1A1 ermittelt werden (* $p < 0,05$).

(2) Darstellung der Ergebnisse der Gelelektrophorese.

(3) Repräsentative Darstellung der Western Blot-Analyse.

Unter dem Einfluß von β -NF konnte im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Steigerung der CYP1A1-mRNA-Transkriptmenge zum Zeitpunkt T=24h und T=44h beobachtet werden (Abb. 17). Das zeigt, dass der AhR trotz seinem hohen Niveau an konstitutiver Aktivität auf exogene Liganden reagiert. Die Analyse der Expression von CYP1A1 auf Proteinebene bestätigte die bereits erhaltenen mRNA-Daten (Abb. 17).

Da eine Steigerung der AhR-Aktivität während der *In-vitro*-Reifung, sowie eine Interaktion des AhR mit exogenen Liganden, die Expression von CYP1A1 induzieren, wurde postuliert, dass die Interaktion mit exogenen Liganden einen Einblick in die Funktion des konstitutiv aktivierten Ah-Rezeptors liefern würde. Hierfür wurde die Kernreifung nach der Behandlung mit β -NF beurteilt. Interessanterweise zeigte sich beim Einsatz des AhR-Liganden keine signifikante Beeinträchtigung der *In-vitro*-Maturation (Metaphase II-Rate: Kontrolle: 76,2%; Kontrolle- β -NF: 74,7 %; Tab. 10).

Tab.10 Effekte von β -Naphthoflavone auf die *In-vitro*-Maturation von porzinen Oozyten. Repräsentative Darstellung der prozentualen Mittelwerte der Anzahl der Oozyten in den verschiedenen Kernreifungsstadien.

Behandlung	GV/GVBD (%)	M I (%)	M II (%)	Degneriertes Stadium (%)
Kontrolle	1,5	15,4 ^a	76,2 ^a	6,9 ^a
Kontrolle- β -NF	1,4	15,1 ^a	74,7 ^a	8,8 ^a
FKS	0,0	19,2 ^a	75,0 ^a	5,8 ^a
FKS- β -NF	0,0	42,0 ^b	44,4 ^b	20,2 ^b

^{ab} Unterschiedliche Fußnoten in einer Spalte bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0.05$).

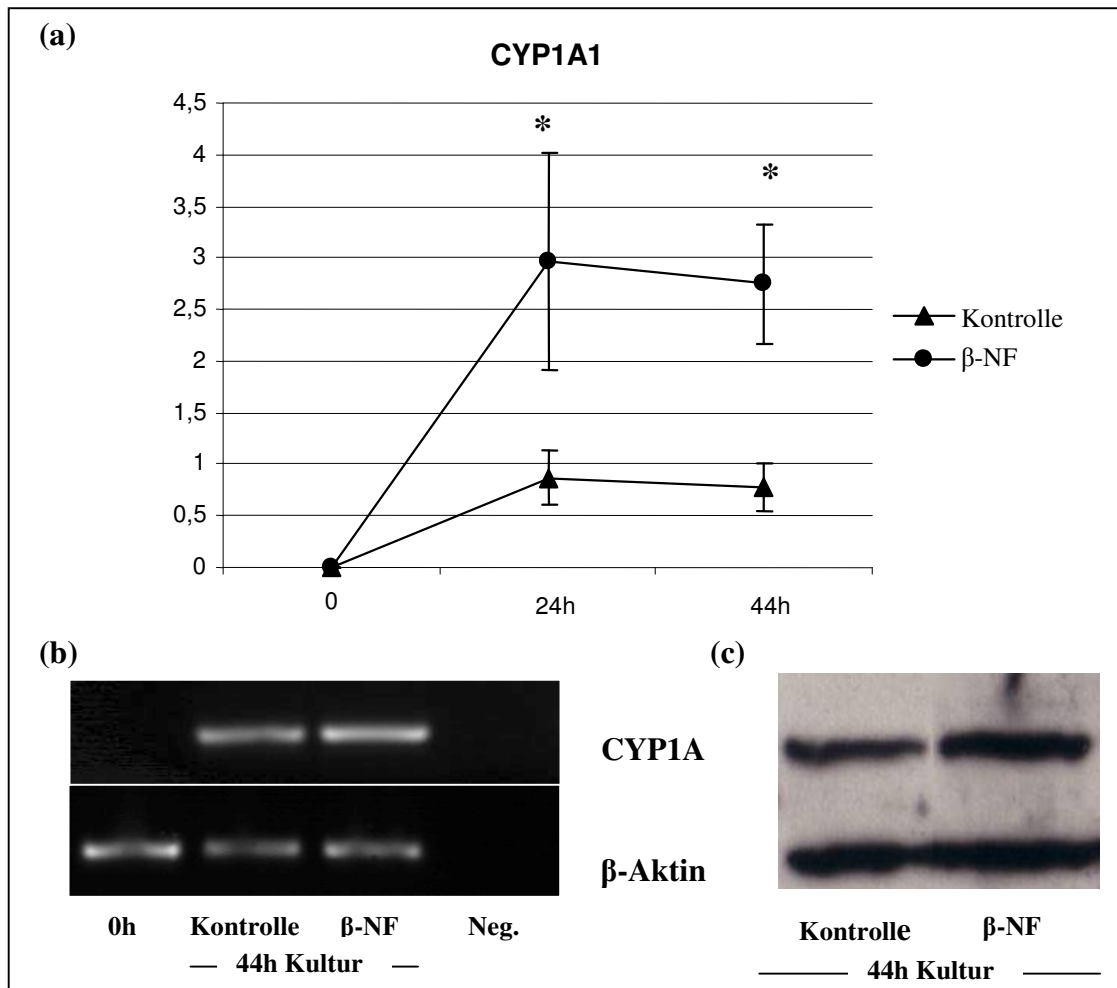


Abb. 17 (a) Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für CYP1A1 vor und nach 24 beziehungsweise 44h IVM in porzinen KOKs zur Untersuchung der Effekte von β-Naphthoflavone. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. Die KOKs wurden in Kulturmedium ohne (-▲-) beziehungsweise unter Zusatz von 50 μM β-NF (-●-) inkubiert. Unter der Behandlung mit dem AhR-Liganden β-NF konnte eine signifikante Steigerung der Transkriptmenge von CYP1A1 nach 24h und 44h IVM beobachtet werden (* $p < 0,05$).

(b) Darstellung der Ergebnisse der Gelelektrophorese.

(3) Repräsentative Darstellung der Western Blot-Analyse.

3.2.2 Die Bedeutung von Follikelflüssigkeit

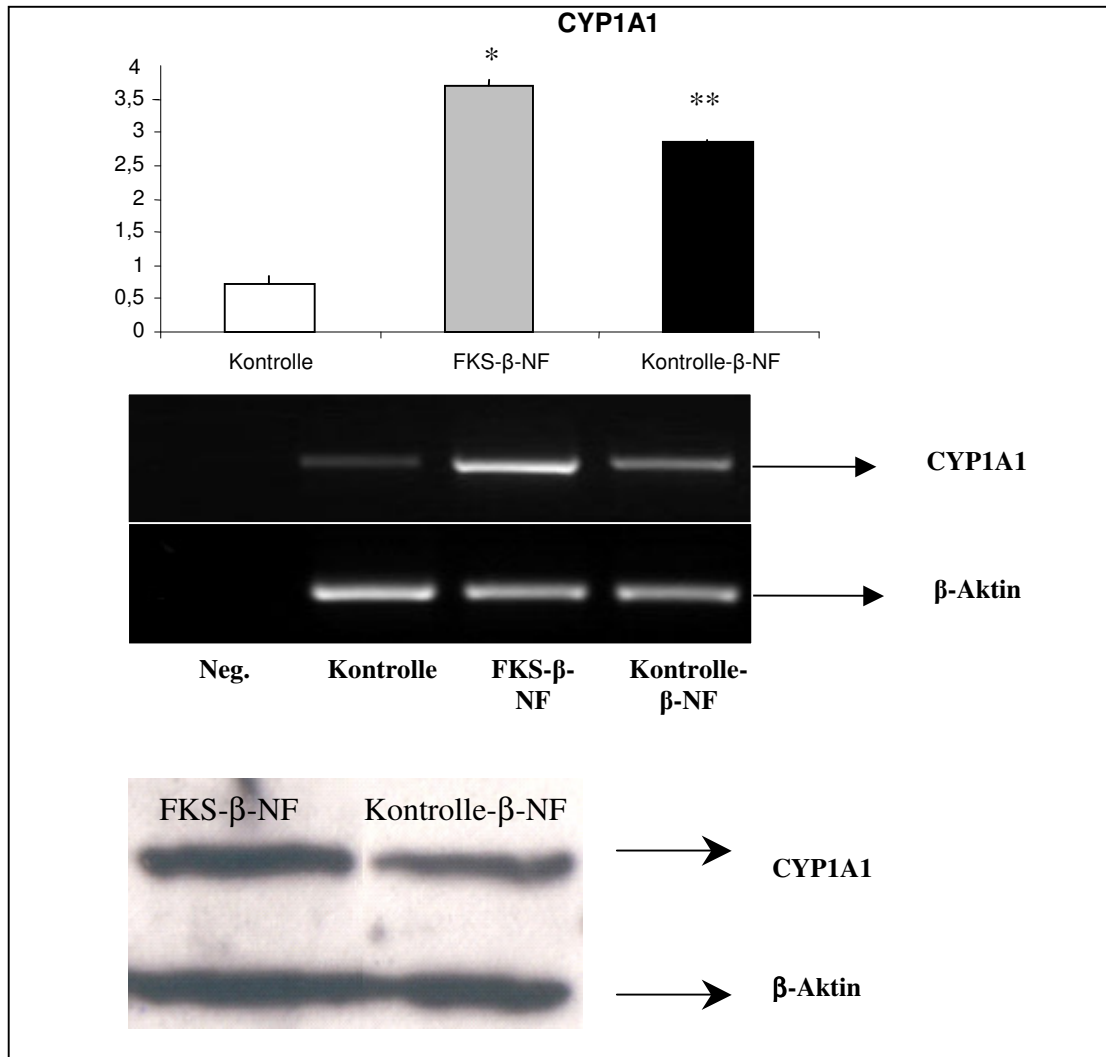
In der Follikulogenese bildet sich die Follikelhöhle aus. Die Follikelflüssigkeit, die den Kumulus-Oozyten-Komplex umgibt, enthält die Faktoren, die für die *In-vitro*-Entwicklung eines Embryos von Bedeutung sind (Edwards, 1974). Dazu gehören Proteine, Zytokine und Wachstumsfaktoren, sowie andere Peptidhormone, Steroide, Stoffwechselprodukte des Energiestoffwechsels und noch nicht identifizierte Faktoren.

Um die Effekte von Follikelflüssigkeit auf die Regulation der konstitutiven und durch β -NF-induzierten Expression von CYP1A1 in porzinen KOKs zu untersuchen, wurde dem IVM-Medium keine Follikelflüssigkeit hinzugefügt, sondern 20% FKS (Fetales Kälberserum) als einzige Proteinquelle verwendet. Unabhängig von den Kulturbedingungen zeigten sich bezüglich der konstitutiven Expression von CYP1A1 in Abwesenheit eines AhR-Liganden keine signifikanten Unterschiede (Daten grafisch nicht dargestellt). Weiterhin konnten nach der 44-stündigen Reifungsperiode keine Unterschiede in der Reifungskompetenz zwischen den KOKs, denen allein FKS als Proteinquelle diente (FKS), und den KOKs in Anwesenheit von Follikelflüssigkeit (KOKs in der Metaphase II: Kontrolle 76,2%, FKS 75,0%) beobachtet werden (Tab. 10). Interessanterweise kam es unter Zusatz von β -NF zu einer signifikanten Steigerung der Transkriptmenge von CYP1A1 in der Kultur mit FKS (FKS- β -NF) als einziger Proteinquelle verglichen mit der Kontrollgruppe, die in Medium mit Follikelflüssigkeit reifte (Kontrolle- β -NF) (Abb. 18). Die Analyse der Expression von CYP1A1 auf Proteinebene bestätigte die mRNA-Daten (Abb. 18).

Parallel dazu beeinflusste die Inkubation der porzinen KOKs mit β -NF während der *In-vitro*-Reifung in Abwesenheit von Follikelflüssigkeit (FKS- β -NF) signifikant die Eizellreifung.

Es konnten nur 44,4% der Kumulus-Oozyten-Komplexe, die in Anwesenheit von β -NF kultiviert wurden, im Vergleich zu 75,0% KOKs, die dem Agonisten nicht ausgesetzt waren, der Metaphase II zugeordnet werden. Zusätzlich ließ sich feststellen, dass die Rate der degenerierten KOKs in Anwesenheit von β -NF im Vergleich zu den nicht exponierten KOKs erhöht war (FKS- β -NF: 20,36% vs. FKS: 5,83%; s. Tab. 10).

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse vermuten, dass eine gesteigerte Aktivität des AhR zu Ovotoxizität führen könnte und dass noch unbekannte Komponenten in der Follikelflüssigkeit eine protektive Rolle gegenüber AhR-Liganden besitzen.

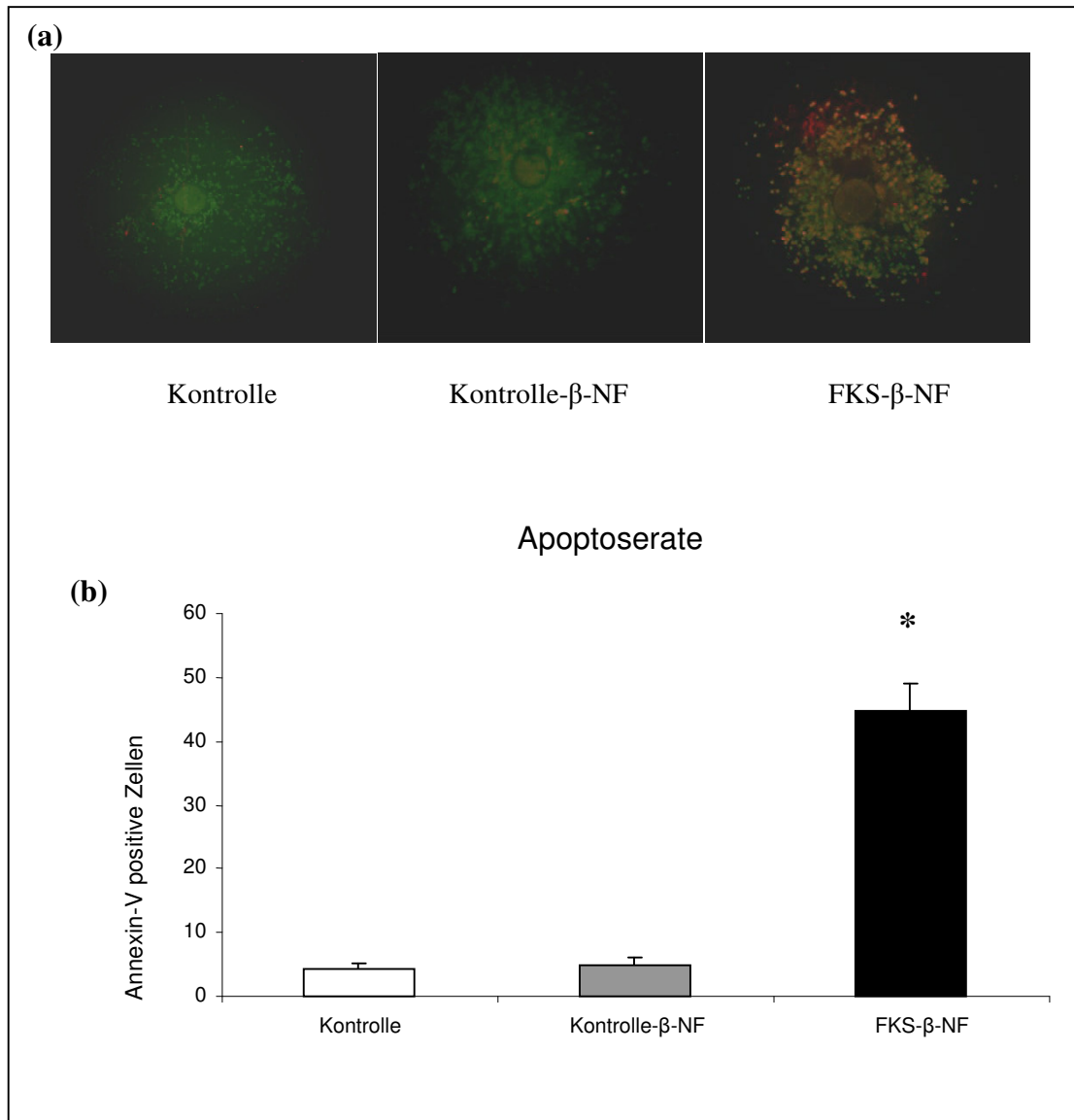
**Abb. 18**

Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für CYP1A1 zur Untersuchung der Effekte von β -Naphthoflavone. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. Die KOKs wurden in Follikelflüssigkeit in Abwesenheit von β -NF (Kontrolle) bzw. in Follikelflüssigkeit (Kontrolle- β -NF) und FKS (FKS- β -NF) unter Zusatz von β -NF kultiviert. Unter der Behandlung mit dem AhR-Liganden β -NF konnte eine signifikante Steigerung der Transkriptmenge von CYP1A1 in der Kultur mit FKS (FKS- β -NF) verglichen mit der Behandlung mit Follikelflüssigkeit (Kontrolle- β -NF) beobachtet werden (* $p < 0,05$). Zusätzlich Darstellung der Ergebnisse der Gelelektrophorese und repräsentative Darstellung der Western Blot-Analyse.

3.2.3 Der Einfluß von β -Naphthoflavone auf die Apoptose der Kumuluszellen

In diesem Experiment wurden reife KOKs der Kontrollgruppe und der Behandlung mit FKS in An- beziehungsweise Abwesenheit von β -Naphthoflavone zur Kennzeichnung von lebenden Zellen mit 6-Carboxyfluorescein-Diacetat und zur Kennzeichnung von Zellkernen in der frühen Apoptose mit Annexin V-CY3 gefärbt. Bezüglich der Rate der lebensfähigen Zellen wurden unabhängig von der Inkubation mit β -NF zwischen den unterschiedlichen Behandlungen keine Unterschiede beobachtet. Bei Abwesenheit des Liganden hatten die Kulturbedingungen keinen Effekt auf die Inzidenz der frühen Apoptose (Daten grafisch nicht dargestellt). Zusätzlich führte β -NF in Anwesenheit von Follikelflüssigkeit verglichen mit der Kontrollgruppe nicht zu einer gesteigerten Apoptoserate in porzinen KOKs. Interessanterweise zeigte sich jedoch unter Einsatz von β -NF bei den KOKs, die in der Kultur mit FKS als alleiniger Proteinquelle reiften (FKS- β -NF), eine gesteigerte Rate der Apoptose in KOKs (Abb. 19).

Diese Ergebnisse lassen eine mögliche Involvierung von noch nicht identifizierten Komponenten in der Follikelflüssigkeit bei der Protektion von porzinen Oozyten gegenüber einer durch den AhR induzierten Toxizität vermuten.

**Abb. 19**

Messung der frühen Apoptose in ausgewählten KOKs durch Färbung mit Annexin V.

(a) Die ausgewählten KOKs wurden in Kontrollmedium ohne Ligandenzusatz beziehungsweise in Kontrollmedium und Medium, das nur FKS als Proteinquelle enthielt, in Anwesenheit von β -NF kultiviert und mit CY3-gekennzeichnetem Annexin V (rot) und 6-Carboxyfluorescein-Diacetat (grün) gefärbt, um die apoptotischen und lebensfähigen Zellen erkennen zu können. Die Färbung mit 6-Carboxyfluorescein-Diacetat zeigt, dass sich die Mehrzahl der Kumuluszellen unabhängig von den Reifungsbedingungen als lebensfähig einstufen ließen. Die KOKs wiesen bei Kultivierung in Kontrollmedium, unabhängig von der Anwesenheit von β -NF, kaum Annexin V-Färbung auf. In der Gruppe der KOKs, die in FKS unter Zusatz von β -NF reiften, kam es jedoch zu einer vermehrten Bindung von Annexin V an die Kumuluszellen. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis dafür, dass diese Zellen absterben. Das überlappende Auftreten von roter und grüner Farbe ergibt eine gelbe Fluoreszenz in der Mehrheit der Kumuluszellen und zeigt apoptotische Zellen an.

(b) Darstellung der quantitativen Analyse der Ergebnisse der Färbung mit Annexin V. Es zeigt sich, dass ca. 4% der lebensfähigen Kumuluszellen im Vergleich zu ca. 44% in der FKS- β -NF-Gruppe apoptotisch wurden. Nekrotische Zellen wurden nicht beachtet. Die Werte werden als Mittelwerte mit Standardabweichung resultierend aus drei Wiederholungen pro Experiment dargestellt. Für jedes Experiment wurden ca. 150 Zellen verwendet.

4 Diskussion

4.1 Die Interaktionen zwischen dem AhR und der *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAP-Kinase) während der *In-vitro*-Reifung von Rinderoozyten

Zahlreiche Studien haben demonstriert, dass der AhR einen wichtigen regulatorischen Faktor im Rahmen der zellulären Reaktion auf die Einwirkung von Umweltgiften darstellt. Der am intensivsten untersuchte Ligand ist das TCDD (Pohjanvirta und Tuomisto, 1994). Experimente mit *AhR-Knockoutmäusen* zeigten, dass der AhR *in vivo* eine essentielle Bedeutung für die durch Xenobiotika induzierte Toxizität und Karzinogenität besitzt (Fernandez-Salguero et al., 1996; Shimizu et al., 2000). Da der AhR in zahlreichen Geweben von Säugetieren nachweisbar ist, wird vermutet, dass er zusätzlich zu seiner toxikologischen Funktion eine endogene Rolle spielt. Diese Hypothese wird durch Ergebnisse der Studien an den AhRKO-Mäusen unterstützt. Sie zeigten Veränderungen in Bezug auf die Entwicklung der Leber, das Immunsystem (Fernandez-Salguero et al., 1995; Schmidt et al., 1996; Mimura et al., 1997) und die Reproduktion (Abbott et al., 1999; Benedict et al., 2000).

Für die vorliegende Arbeit ist wichtig, dass der AhR auch eine funktionelle Rolle in der Regulation von ovariellen Prozessen spielt. Der Rezeptor und sein nukleärer Partner ARNT werden im Ovar von Säugetieren exprimiert. In *AhR-Knockoutmäusen* überleben weniger fetale ovarielle Zellen (Robles 2000; Benedict 2000). In Abwesenheit des AhR ist das Follikelwachstum gehemmt und die Zahl der ovulierenden Follikel, die sich zu Corpora lutea entwickeln, reduziert (Benedict et al., 2003). In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass der AhR-Signalweg während der *In-vitro*-Reifung von Rindereizellen in Abwesenheit exogener Liganden aktiviert wird. Der Einsatz von AhR-Antagonisten verursachte eine Reduktion des Hauptzielgenes CYP1A1 auf mRNA- und Proteinebene und hatte einen negativen Effekt auf die Fähigkeit der Oozyten, den Reifungsprozess zu durchlaufen (Pocar et al., 2004). Die physiologische Signifikanz des AhR/ARNT-Komplexes und die molekularen Mechanismen in den Endstadien der Eizellreifung sind jedoch noch nicht bekannt. Ziel der hier vorliegenden Studie war es deshalb, die molekularen Mechanismen, die an der Aktivierung des AhR und den Interaktionen zwischen der Eizellreifung und dem AhR beteiligt sind, weiter aufzuklären.

6-DMAP ist dafür bekannt, in Rinderoozyten kurz vor dem GVBD-Stadium über eine Blockierung der frühen Phosphorylierungsreaktionen die Fortsetzung der Meiose zu hemmen (Fulka et al., 1991; Levesque und Sirard, 1995; Lonergan et al., 1997; Avery et al., 1998; Dode und Adona, 2001; Faerge et al., 2001). Die Fähigkeit des Inhibitors, die Oozyten im Stadium des GV zu blockieren, konnte in der hier vorliegenden Studie bestätigt werden. Zusätzlich kam es unter der Behandlung mit 6-DMAP zu einer Senkung der

Transkriptionsrate von CYP1A1 auf mRNA- und Proteinebene, sowie phosphorylierter ERK 1 und 2 auf Proteinebene.

Die beobachteten Effekte bei der IVM und dem veränderten Expressionsniveau des Hauptzielgenes CYP1A1 und der untersuchten MAP-Kinasen erwiesen sich als reversibel.

Diese Ergebnisse sind mit den Beobachtungen von Fulka et al. (1991) und Avery et al. (1998) vereinbar, die in ihren Studien ebenfalls über eine Reversibilität der Effekte von 6-DMAP während der *In-vitro*-Reifung berichten. In diesen Experimenten war der durch den Inhibitor induzierte Arrest der Meiose reversibel. Weitere Analysen ergaben aber, dass zwischen 60% und 80% der behandelten Oozyten im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine abnormale Metaphasenformation aufwiesen.

Unter der Behandlung mit Cycloheximide zeigte sich in der hier vorgestellten Studie die Mehrzahl der Kumulus-Oozyten-Komplexe in dem Stadium des GV. Interessanterweise führte die Hemmung der Meiose durch Cycloheximide dabei nicht zu einem signifikanten Unterschied in der Expression von CYP1A1. Die Gemeinsamkeit zwischen Cycloheximide und 6-DMAP besteht in der Fähigkeit, die Wiederaufnahme der Meiose in Säugetieroozyten zu hemmen. Der Wirkmechanismus des 6-DMAP beinhaltet die Hemmung der Serin/Threoninkinasen. Cycloheximide hingegen wirkt über eine Blockade der Synthese von Proteinen, die mit der Kernmembran assoziiert sind (Hunter und Moor, 1987; Simon et al., 1989; Sirard et al., 1989; Tatemoto et al., 1994; Levesque und Sirard, 1996). Die Ergebnisse in der hier vorliegenden Arbeit bestätigen somit die Vermutung der spezifischen Rolle von Phosphorylierungen bei der Regulation des AhR während der *In-vitro*-Reifung.

6-DMAP ist ein Serin/Threoninkinasehemmstoff mit einem sehr breiten Wirkspektrum (Fulka et al., 1991; Levesque und Sirard, 1995; Lonergan et al., 1997; Avery et al., 1998; Dode und Adona, 2001; Faerge et al., 2001). Die Sensibilität der MAP-Kinasen gegenüber 6-DMAP sprechen dafür, dass eine potentielle Verbindung zwischen der Kaskade der MAP-Kinasen und dem AhR-Signalweg existiert.

In Experimenten an Tieren, in denen TCDD, der Hauptagonist des Ah-Rezeptors, eingesetzt wurde, konnte eine Stimulation der Aktivität der MAP-Kinasen beobachtet werden. Es wurde postuliert, dass die Stimulation dieser Phosphorylierungskaskade für die Induktion von AhR-abhängiger Transkription von Genen von entscheidender Bedeutung ist. el-Sabeawy et al. (1998) untersuchten in einer Studie die Effekte von TCDD auf verschiedene Signaltransduktionswege während der pubertären Entwicklung von Ratten. Dabei zeigte sich, dass nach Bindung von TCDD an den Ah-Rezeptor die c-Src-Kinase aktiviert wird. Diese führt über den EGF-Rezeptor (EGFR) und über Proteintyrosinkinase (PTK) zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen. Dieser Signalweg erfordert somit keine direkte TCDD-AhR-ARNT-Interaktion mit der DNA im Zellkern, um die MAP-Kinasen zu aktivieren und Veränderungen der Genexpression zu bewirken. In Experimenten mit MCF10A, einer

Zelllinie mit immortalisierten humanen Mammaepithelzellen, zeigte sich, dass TCDD über die Aktivierung der c-Src-Kinase und eine Aktivitätssteigerung von ERK die proliferationsstimulierenden Effekte von Insulin antagonisiert (Park et al., 2004b). Die Analyse der Daten in der hier vorliegenden Studie bezüglich der Expression von CYP1A1 in den Rinderoozyten unter Behandlung mit PD98059 zeigen Parallelen zu der Transkription von phosphorylierter ERK1/2 auf. Nach einer 3-stündigen Inkubation der Eizellen mit PD98059 konnte eine signifikante Reduktion der Aktivität von CYP1A1 auf mRNA- und Proteinebene verzeichnet werden. Interessanterweise war dieser signifikante Unterschied nach 15 Stunden der Kulturzeit nicht mehr nachweisbar. Ein Teil der Rinder-KOKs wurde für die Zeitspanne der physiologischen Reifung von 24 Stunden inkubiert. Die Analyse der Transkriptionsrate der CYP1A1 mRNA und des CYP1A1 Proteins nach 24 Stunden ergaben eine signifikante Steigerung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Um die Verbindung zwischen dem Signalweg des AhR und der Kaskade von MAPK intensiver zu beleuchten, wurde zusätzlich die Expression von phosphoryliertem ERK 1- und ERK 2- Protein unter Behandlung mit PD98059 analysiert.

Nach 3 h der Behandlung mit dem Inhibitor war eine niedrigere Transkriptionsrate von phosphorylierter ERK 1 und ERK 2 zu verzeichnen, die nach weiteren 12 Stunden (T=15h) wieder angestiegen und bei der Analyse nach der kompletten Dauer des IVM (T=24h) signifikant erhöht war. Bei der Beurteilung der Kernreifungsstadien stellte sich heraus, dass es zu einer Verzögerung der Kernreifung kam. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Behandlung mit PD98059 die Aktivierung von CYP1A1 und MAP-Kinase nicht komplett inhibiert, sondern die Aktivierung einer Verzögerung unterliegt.

Die Ursache hierfür könnte eine auf einen Zeitraum von 15 h limitierte Wirkdauer des PD98059 sein. Als ein weiterer Grund wäre auch ein Verlust der Abhängigkeit von ERK 1 und 2 gegenüber seinem Aktivator MEK zu diesem Zeitpunkt denkbar. Die Inkubation der KOKs vom Zeitpunkt T=15h bis T=24h ergab eine signifikant erniedrigte Transkriptionsrate der CYP1A1 mRNA und des CYP1A1 Proteins, sowie der Rate der phosphorylierten ERK 1/2. Es besteht somit weiterhin eine Abhängigkeit zwischen der MAP-Kinase und MEK. Ferner entfaltet PD98059 seine Wirkung als Inhibitor von MEK an einem noch nicht identifizierten Zeitpunkt in dem Zeitraum T=3h bis T=15h während der IVM.

Die wahrscheinlichste Erklärung des Phänomens einer inkompletten Inhibierung der MAP-Kinase durch PD98059 ist, dass bereits im GV-Stadium, zu Beginn der Kultur, ein Teil des MEK-Proteins im phosphorylierten Zustand vorliegt.

In Experimenten von Tomek et al. (2002), die die Regulation der Translation während der *In-vitro*-Reifung von Rinderoozyten und hierbei insbesondere die Rolle der MAP-Kinase und eines Initiators der Translation eIF4E (das *cap binding protein*) untersuchten, konnten ähnliche Ergebnisse beobachtet werden. Die Behandlung von Kumulus-Oozyten-Komplexen

von Rindern mit 20 μ M PD98059 führte dort zu einer ca. 4-stündigen Verzögerung der Aktivierung der MAP-Kinase. Wurde die Konzentration des Inhibitors auf 50 μ M und 100 μ M erhöht, zeigten sich ähnliche Resultate. In den Kumulus-Oozyten-Komplexen der Kontrollgruppe erreichten die Oozyten nach 10 Stunden in der Kultur das GVBD-Stadium. Im Kontrast dazu befand sich der größere Anteil der KOKs, die mit dem MEK-Inhibitor behandelt wurden, nach 10 Stunden der Reifungszeit im Stadium des GV. Interessanterweise waren diese Kumulus-Oozyten-Komplexe trotz der Anwesenheit von PD98059 dazu fähig, nach 24 Stunden Inkubation die Metaphase II zu erreichen.

Der MEK-Inhibitor PD98059 wirkt nach der Bindung an die inaktiven Formen von MEK über eine Inhibierung der Phosphorylierung und Aktivierung von MEK durch seine Aktivatoren MEK-Kinase und Raf 1 (Alessi et al., 1995; Dudley et al., 1995). PD98059 ist nicht dazu fähig phosphoryliertes und damit bereits aktiviertes MEK zu beeinflussen (Alessi et al., 1995). Aufgrund dieser Erkenntnisse lässt sich bezogen auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vermuten, dass bereits in Oozyten im Stadium des GV ein kleiner Anteil von aktiviertem MEK vorliegt, das über eine Phosphorylierung zu einer Aktivierung der MAP-Kinase führt und die Behandlung mit PD98059 somit nur eine Verzögerung dieser Aktivierung induziert.

Die Tatsache, dass dieser Inhibitor der MEK-Aktivität die Aktivierung von CYP1A1 beeinflusst, unterstützt die Hypothese einer Verbindung zwischen der Kaskade der MAP-Kinase und dem Signalweg des AhR.

Yim et al. (2004) untersuchten die Bedeutung von Signalwegen der Proteinkinasen während der Aktivierung des AhR und behandelten hierfür Hepa1c1c7-Zellen mit PD98059, um diese anschließend gegenüber TCDD zu exponieren. Die Vorbehandlung mit dem spezifischen MEK-1-Inhibitor reduzierte die durch TCDD induzierte Expression von CYP1A1. Im weiteren Verlauf dieser Studie wurde ein *Co-Immunoprecipitation Assay* durchgeführt, dessen Ergebnisse vermuten ließen, dass TCDD eine vermehrte Bindung zwischen dem AhR und Phosphoproteinen induziert, TCDD selbst die Serin/Threoninreste des AhR aber nicht phosphoryliert. In Zusammenschau der gesamten Ergebnisse dieser Studie ergibt sich die Hypothese, dass der AhR mit einem Protein interagiert, das ein Substrat einer Serin/Threoninkinase, wie zum Beispiel der p44/42 MAP-Kinase, darstellt. Die MAP-Kinase wird durch TCDD aktiviert, um dann ein noch nicht identifiziertes Zielprotein zu phosphorylieren, welches mit dem AhR interagiert und die Aktivität der Bindung des AhR an die *xenobiotic-responsive elements* der entsprechenden Zielgene moduliert. Die MAP-Kinase könnte damit ein weiteres Ziel für TCDD in der Zelle darstellen, über das die Aktivität des AhR-Komplexes moduliert wird. In Anbetracht dieser Ergebnisse wäre die Aktivierung von p44/p42 MAPK ein wichtiger regulatorischer Faktor bezüglich der Funktion des AhR als ein Transkriptionsfaktor. Die Ergebnisse der Studie von Yim et al.

(2004) unterstützen die Resultate der hier vorgestellten Arbeit, in der unter Behandlung mit PD98059 eine Reduktion der Transkription von dem Hauptzielgen des AhR, dem CYP1A1, nachgewiesen werden konnte.

Im Kontrast dazu war die Expression von CYP1A1 in der hier vorgestellten Studie nicht durch TCDD induziert. Dies stellt einen indirekten Beweis für das Vorhandensein von endogenen Liganden dar, die die durch Yim et al. (2004) vermutete Funktion des TCDD bei der Aktivierung der MAP-Kinase übernehmen.

Im Rahmen der Interpretation der Ergebnisse ist es sehr wichtig zu beachten, dass PD98059 neben der Funktion des spezifischen MEK-1-Inhibitors zusätzlich weitere Funktionen besitzt. Einige chemische Verbindungen mit der Struktur der Flavonoide sind durch gesteigerte Induktion von Phase-II-Enzymen im Rahmen der Metabolisierung toxischer Substanzen und Reduktion der Aktivität von CYP1A1 in der Lage einen präventiven Effekt gegenüber chemisch schädliche Verbindungen auszuüben (Uda et al., 1997; Kang et al., 2003).

Reiners et al. (1998) vermuten aufgrund ihrer Studien an humanen immortalisierten Epithelzellen der Mamma (MCF10A), dass PD98059 die durch TCDD induzierte Expression von CYP1A1 durch einen anderen Mechanismus unterdrückt. In diesem Fall scheint es wahrscheinlich, dass TCDD und der MEK-1-Inhibitor kompetitiv um die Bindung am AhR konkurrieren, und PD98059 so die Bindung des Xenobiotikums an die *DREs* verhindert. Damit erfüllt PD98059 eine Funktion als ein Antagonist oder partieller Agonist am Ah-Rezeptor. Dieser antagonistische Effekt scheint jedoch nicht die Ursache für die Reduktion der AhR-abhängigen Genexpression zu sein. Yim et al. (2004) konnten in ihren Experimenten einen Einfluß von PD98059 auf den MEK-1/p44/p42 MAPK Signalweg und seine Interaktion mit der durch TCDD induzierten Expression von *DRE-driven reporter* Genen nachweisen. Sie demonstrierten, dass die Expression eines dominant negativen Mutanten der p42 MAP-Kinase die durch TCDD induzierte Expression von *DRE-driven reporter* Genen blockiert.

Tan et al. (2004) berichten in ihrer Arbeit über eine Aktivierung von p44/42 MAPK und Jun N-terminalen Kinasen durch TCDD. Diese sind in der Lage die Aktivität von ARNT und die von AhR/ARNT-abhängige Genexpression zu modulieren und die Toxizität von Umweltgiften zu vermitteln. Eine durch TCDD induzierte Genexpression kann auch durch den MEK-1-Inhibitor U0126 [1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(o-aminophenylmercapto)-butandiene], der im Gegensatz zu PD98059 in seiner chemischen Struktur nicht mit den Flavonoiden vergleichbar ist, supprimiert werden (Tan et al., 2002).

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese einer Verbindung zwischen der MAPK- und AhR-Signalweg und zeigen, dass sich der AhR auf dem gemeinsamen Signalweg in Bezug auf die MAP-Kinase *downstream* einordnen lässt.

Wachstumsfaktoren können p44/p42 MAPK aktivieren (Cobb et al., 1991). Dabei existiert eine Verbindung zwischen der MAP-Kaskade und dem *epidermal growth factor* (EGF). Die Bindung des EGF an seinen Rezeptor stimuliert die Aktivierung von Komponenten einer Kaskade, die *p21-ras*, raf-1 Kinase, MEK und ERK beinhaltet (Satoh et al., 1992; Cano und Mahadevan, 1995) (Abb. 20.2).

Sakaguchi et al. (2000) berichten über eine Beschleunigung der Meiose in Kumulus-Oozyten-Komplexen von Rindern, wenn diese in serumfreien Medium mit EGF und *insulin-like growth factor* (IGF-I) behandelt wurden. Fissore et al. (1996) demonstrierten in ihrer Arbeit, dass die Injektion von MOS RNA in Rinderoozyten zu einer schnellen und maximalen Aktivierung von MAPK führte, die in einer Beschleunigung der Wiederaufnahme der Meiose und des GVBD resultierte. Die Ergebnisse einer weiteren Studie von Sakaguchi et al. (2002) zeigten, dass die Aktivität der MAP-Kinase in Oozyten, die mit EGF behandelt wurden, in dem Zeitraum von 6 bis 8 h nach Beginn der Kultur signifikant anstieg. Der Wirkung des EGF bezüglich der Aktivität der MAP-Kinase könnte eine Erklärung für die zuerst beobachtete Beschleunigung des Ablaufes der Meiose bei der Einwirkung von EGF sein. Die Ergebnisse der hier vorgestellten Arbeit sprechen für eine mögliche Rolle der MAP-Kinase bei der Regulation des AhR während der *In-vitro*-Maturation. Der Signalweg des Epidermalen Wachstumsfaktors könnte dabei als ein *upstream*-Aktivator von ERK1/2 fungieren. Um die biologische Signifikanz dieses Phänomens weiter aufzuklären, sind Folgestudien notwendig.

Es stellt sich weiterhin die Frage, durch welche Mechanismen der AhR dazu fähig ist, die Rate der Kumulus-Oozyten-Komplexe, die die *In-vitro*-Reifung durchlaufen, zu regulieren. Ein wesentlicher Faktor für die Homoöstate von Zellteilung und Zelltod ist die Apoptose, der programmierte Untergang von Zellen. Die Apoptose ist maßgeblich an reproduktiven Prozessen, wie zum Beispiel der Depletion von Oozyten unter physiologischen und pathologischen Bedingungen im Ovar, beteiligt (Perez und Tilly, 1997; Morita und Tilly, 1999; Pru und Tilly, 2001). Die Atresie von Follikeln stellt einen natürlichen Vorgang für die Degeneration der Follikel im Ovar dar und scheint abhängig vom Entwicklungsstadium des Follikels auf einer vermehrten Apoptose in den Granulosazellen beziehungsweise den Oozyten zu beruhen (Hughes und Gorospe, 1991). In der reproduktiven Phase existieren zwei Zeitpunkte, an denen eine gesteigerte Apoptoserate im Ovar stattfindet. Der erste Zeitpunkt befindet sich im fötalen Ovar und beinhaltet die Induktion der Atresie einer großen Anzahl der Keimzellen (Ratts et al., 1995; Reynaud und Driancourt, 2000). Die zweite Periode der ovariellen Apoptose ist das Ergebnis der folliculären Atresie und beginnt mit dem Einsetzen der Pubertät, also in der Zeit, in der Kohorten von Primordialfollikeln in den Pool der sich entwickelnden Follikel eintreten. Im Ovar ist die Apoptose der prinzipielle Mechanismus, über den die Reduktion der Oozyten unter physiologischen und

pathologischen Bedingungen vermittelt wird (Perez und Tilly, 1997; Morita und Tilly, 1999; Pru und Tilly, 2001).

Während der Reifung besteht eine Korrelation zwischen einer erhöhten Rate an Apoptose in Kumuluszellen und einer geringeren Reifungskompetenz der Oozyten (Ikeda et al., 2003). Wachstumsfaktoren beeinflussen das Follikelwachstum zum Teil durch Modulation der Balance zwischen dem Überleben und dem Zelltod von Granulosazellen. Es wurde gezeigt, dass Wachstumsfaktoren der EGF-Familie über die Aktivierung des EGF-Rezeptors (EGFR) als parakrine Mediatoren des LH-Signals während der Ovulation fungieren (Park et al., 2004a). Die Reduktion der Aktivität des EGF-Rezeptors führt in einer Vielzahl von Zelllinien zu einer Induktion des programmierten Zelltodes (Moyer et al., 1997). Des Weiteren konnte in kultivierten Granulosazellen von Ratten ein inhibitorischer Effekt von EGFR-Liganden auf die Apoptose beobachtet werden (Chun et al., 1996; Tilly, 1996). Der Signalweg von Ras/Raf/MEK/ERK 1/2 ist ein wichtiger Signalweg, der über den EGF-Rezeptor aktiviert wird (Yarden, 2001). Die Exposition gegenüber PD98059 resultiert in menschlichen Granulosazellen in einer Induktion der Apoptose (Oliver et al., 1999).

Experimentelle Studien an Tieren haben gezeigt, dass TCDD die Aktivität von ERK stimuliert (el-Sabeawy et al., 1998). TCDD aktiviert mit dem EGF-Rezeptor assoziierte Tyrosinkinase und induziert die molekularen Interaktionen von EGFR-assozierten Adaptorproteinen (Madhukar et al., 1988; Park et al., 1998). Der Mechanismus, über den TCDD den Signalweg des EGF-Rezeptors aktiviert, scheint kompliziert zu sein. In einer Studie von Davis et al. (2000) wurde die Induktion von TGF- α , einem Liganden des EGFR, durch TCDD als ein potenzieller Mechanismus identifiziert. Zudem wurde berichtet, dass TCDD in verschiedenen Zelllinien die durch das Fehlen von EGF induzierte Apoptose über einen EGFR-vermittelten Signalweg reduziert (Davis et al., 2000; Davis et al., 2001). In der hier vorliegenden Studie zeigte sich, dass die durch PD98059 vermittelte Hemmung der MAPK-Kaskade die Aktivierung des AhR-Signalweges während der *In-vitro*-Reifung in Kumulus-Oozyten-Komplexen von Rindern modulieren kann und dieses Phänomen mit einer Reduktion der Reifungskompetenz korreliert. Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass die Signalwege von AhR und EGFR miteinander verbunden sind. Diese Interaktion könnte eine kritische Funktion im Rahmen der Protektion der Follikelzellen vor Apoptose während der Reifung besitzen.

In Experimenten an *AhR-Knockoutmäusen* wurde beobachtet, dass TCDD in den Mäusen der Kontrollgruppe zu der Induktion von Apoptose führte, während sich das in den Knockoutmäusen nicht nachweisen ließ (Fernandez-Salguero et al., 1996; Kamath et al., 1997; Zaher et al., 1998). Zudem wurde berichtet, dass AhR-Liganden *in vivo* in menschlichen ovariellen Follikeln die Expression des pro-apoptischen Genes Bax und die Apoptose induzieren (Matikainen et al., 2001). Ergebnisse von Studien unserer

Arbeitsgruppe zeigen, dass PCB 126, ein AhR-Ligand, in den Kumuluszellen von Rinder-KOKs zur Induktion von Apoptose führt (Pocar et al., 2005). In Zusammenschau lassen diese Ergebnisse vermuten, dass durch den EGFR aktivierte MAPKs zusätzliche Ziele in der Zelle darstellen, über die AhR-Liganden die Funktion des AhR-Komplexes modulieren. Des Weiteren lässt sich daraus auf eine mögliche rückkoppelnde Rolle von ERK 1/2 in der Modulation der AhR-Aktivität in Follikelzellen schließen.

In den Abbildungen 20.1 – 20.3 sind mögliche Interaktionen zwischen den Signalwegen von AhR, MAPK und EGF dargestellt.

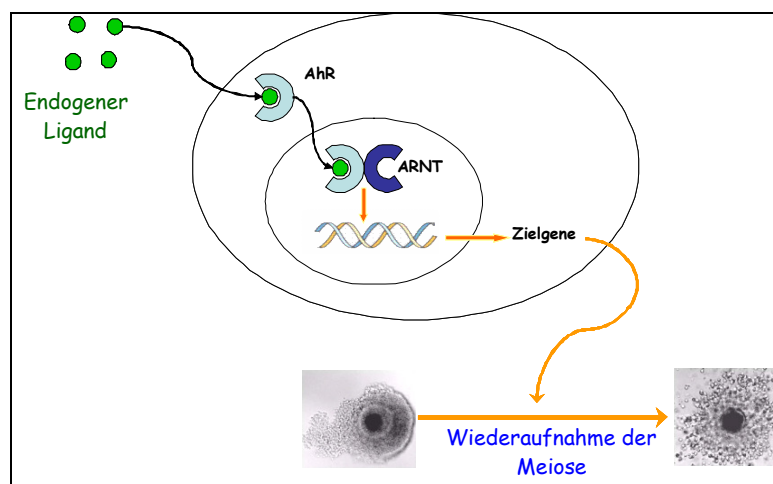


Abb. 20.1

Die Ergebnisse der vorliegenden und anderer Studien legen den Schluß nahe, dass ein endogener Ligand über die Aktivierung des AhR/ARNT-Signalweges die Expression spezifischer Zielmoleküle induziert. Diese unterstützen in Säugetieroozyten die Wiederaufnahme der Meiose.

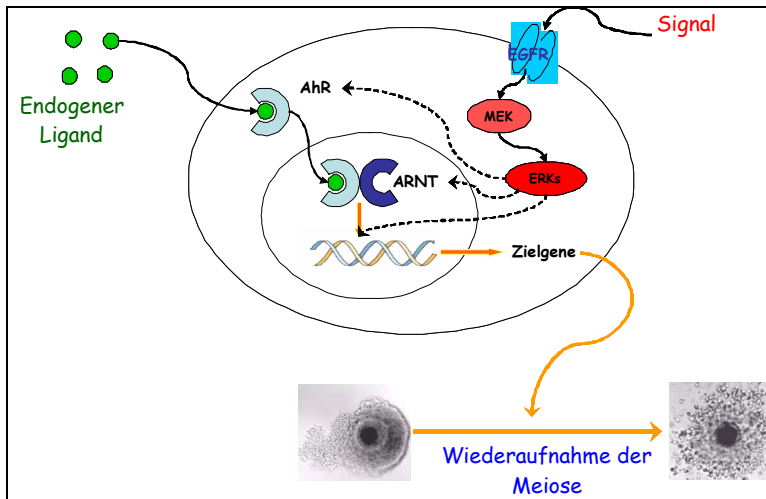


Abb. 20.2

Die Wiederaufnahme der Meiose scheint auch durch andere extrazelluläre Signale möglich, am wahrscheinlichsten durch eine Aktivierung des EGFR-Signalweges.

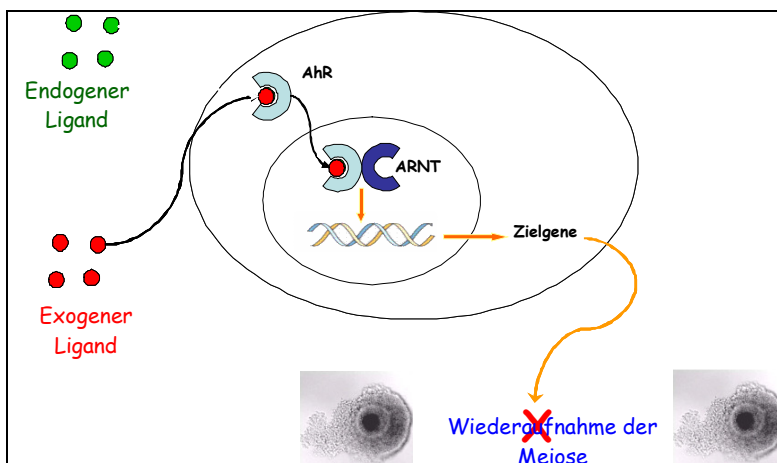


Abb. 20.3

Die Anwesenheit eines exogenen Liganden beeinflusst über eine Veränderung des Expressionsniveaus und/oder -zeitpunktes die Expression der Zielgene und hemmt damit die Meiose. Die Rolle der EGFR-Kaskade unter diesen Bedingungen muss noch geklärt werden.

4.2 Die Aktivierung des AhR während der *In-vitro*-Reifung von Schweineeizellen

In der vorliegenden Studie sollte in diesem Studienteil zunächst untersucht werden, ob und unter welchen Umständen der AhR in porzinen Kumulus-Oozyten-Komplexen aktiviert wird. Des Weiteren waren eine mögliche Beeinflussung sich entwickelnder Oozyten durch exogene AhR-Liganden Bestandteil dieser Studie.

AhR mRNA und ARNT mRNA werden in unreifen Kumulus-Oozyten-Komplexen exprimiert. Diese Ergebnisse werden durch eine Vielzahl von Studien unterstützt, die die Expression der Komponenten des AhR-Signalweges bei Nagetieren (Benedict et al., 2000; Chaffin et al., 2000; Robles et al., 2000), beim Menschen (Khorram et al., 2002; Horling, 2009), Kaninchen (Hasan und Fischer, 2003) und Rind (Pocar et al., 2004) beschreiben.

In der hier vorgestellten Studie konnte ein signifikanter Anstieg im Expressionsniveau der AhR mRNA während der 44-stündigen Inkubation beobachtet werden. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, bei denen in Rinderoozyten und Kumuluszellen während der *In-vitro*-Reifung eine vermehrte Expression des AhR beobachtet werden konnte, überein (Pocar et al., 2004). Des Weiteren lassen die Studien von Chaffin et al. (1999) und Horling (2009), in denen sich in Granulosazellen von Affen nach Behandlung mit Gonadotropinen und in einer humanen Granulosazelllinie eine Induktion der AhR-Expression zeigte, auf eine funktionelle Rolle des AhR in den Granulosazellen schließen. In der Literatur wird auch über eine vermehrte Transkription von AhR mRNA in anderen Zelltypen in Abwesenheit von exogenen Liganden berichtet (Sadek und Allen-Hoffmann, 1994; Hayashi et al., 1995; Mufti et al., 1995; Singh et al., 1996; Crawford et al., 1997; Elizondo et al., 2000; Monk et al., 2001). Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass der AhR-Signalweg einen Teil der Zellzyklusregulation und/oder Zelldifferenzierung darstellt und unterstützen die Hypothese einer potentiellen physiologischen Rolle des Rezeptors. Die in der hier vorliegenden Studie beobachtete Induktion von CYP1A1 in *in vitro* gereiften KOKs unterstützt diese Hypothese.

In Bezug auf CYP1A1 wurde gefunden, dass seine Expression während der Reifung porziner Granulosazellen (Leighton et al., 1995) und befruchteter Eizellen von Mäusen (Dey und Nebert, 1998) entwicklungsabhängig reguliert wird. Zusätzlich wurde in Kumulus-Oozyten-Komplexen von Rindern eine konstitutive Expression dieses Enzyms und seine Induktion während der Eizellreifung beobachtet (Pocar et al., 2004). Auch in Studien mit einer immortalisierten humanen Granulosazelllinie (KGN) zeigte sich, dass der AhR-Signalweg konstitutiv aktiviert und durch den Einsatz von TCDD induziert wird (Horling, 2009).

Wenn man davon ausgeht, dass die Aktivierung des AhR die Bindung eines Liganden erfordert, ist die hohe konstitutive CYP1A1-Expression ein indirekter Beweis für die Existenz von endogenen Liganden, die dazu fähig sind, den AhR während der Eizellreifung

zu aktivieren. Bis heute ist die Identifikation eines potenten endogenen Liganden des AhR nicht gelungen.

Neben der physiologischen Signifikanz könnte es auch möglich sein, dass eine ausreichende Konzentration des AhR in heranreifenden Oozyten diese Zellen gegenüber Umweltgiften angreifbar machen. Der AhR ist ein bekannter Mediator der Toxizität von Xenobiotika, wie TCDD, koplaren PCBs und Flavonoiden. Die Reifung der Eizelle ist ein kritischer Schritt für eine optimale Befruchtung und weitere Embryonalentwicklung und es konnte gezeigt werden, dass eine Störung im Ablauf der Reifung zu einer negativen Beeinflussung der weiblichen Reproduktion führt.

Deshalb wurde in der hier vorliegenden Studie die Frage aufgeworfen, ob eine Exposition gegenüber exogenen AhR-Liganden während der Eizellreifung die Reifung von Schweineoozyten negativ beeinträchtigt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden KOKs vom Schwein in einer Kultur mit β -Naphthoflavone inkubiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Exposition gegenüber β -NF während IVM einen Anstieg der CYP1A1-Expression verursacht und deuten damit neben der konstitutiven auf eine induzierbare AhR-Aktivität während der Eizellreifung hin. Bis zum jetzigen Zeitpunkt existieren keine Studien bezüglich der Effekte von β -NF in Säugetieroozyten. In Studien mit dem *Chinook*-Lachs konnte gezeigt werden, dass β -NF eine Transkription von CYP1A1 in Follikeln des Ovars induziert (Campbell und Devlin, 1996). Weber (2002) berichtet in seiner Arbeit über eine signifikant erhöhte Expression von CYP1A1-Protein nach der Behandlung mit β -NF in Ovarien von jungen Regenbogenforellen.

In der hier vorliegenden Studie wurden unter normalen Kulturbedingungen keine negativen Effekte des β -NF bezüglich der Oozytenreifung beobachtet.

Experimente mit jungen Katzenfischen, in denen eine ovotoxische Wirkung der Flavone beobachtet werden konnte, stehen in Kontrast dazu. In dieser Studie wurde berichtet, dass β -NF in jungen Welsen die Apoptoserate ovarieller Zellen steigert. Diese gesteigerte Induktion der Apoptose ist vermutlich durch eine Reduktion der Expressionsrate von Hitzeschockprotein 70 in den ovariellen Follikeln bedingt (Weber und Janz, 2001).

Zusätzlich existieren neben β -NF weitere AhR-Liganden, die in der Lage sind, im Ovar von *In-vivo*- und *In-vitro*-Modellen eine ovotoxische Wirkung auszuüben. So wurde beobachtet, dass die Exposition von Oozyten während der Reifung gegenüber PCB die Befruchtungsfähigkeit von Mausoozyten (Kholkute et al., 1994; Kholkute und Dukelow, 1997), sowie die Eizellreifung und die anschließende Entwicklungskompetenz von Rindereizellen beeinflusst (Krogenaes et al., 1998; Pocar et al., 2001a; Pocar et al., 2001b).

Eine mögliche Erklärung für die fehlenden negativen Effekte von β -NF auf die Schweineoozyten könnte in den während der *In-vitro*-Reifung verwendeten

Kulturbedingungen zu finden sein. Im Kontrast zu anderen Säugetierarten werden porcine Oozyten typischerweise in Anwesenheit von Follikelflüssigkeit kultiviert.

Die Eizellreifung ist ein komplexer Vorgang. Vatzias und Hagen (1999) berichteten über die Existenz von bisher noch nicht identifizierten Faktoren in der Follikelflüssigkeit, die eine positive Wirkung auf die Eizellreifung besitzen und gleichzeitig eine protektive Rolle gegenüber dem Einfluß schädlicher exogener Substanzen haben. Es ist deshalb denkbar, dass der Zusatz von Follikelflüssigkeit während IVM die Ursache für die beobachteten Diskrepanzen darstellt. Um diese Frage zu beantworten, wurden in der hier vorliegenden Studie porcine KOKs in Abwesenheit von Follikelflüssigkeit mit β -NF exponiert.

Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Rate der Oozyten, die *in vitro* reifen konnten sowie eine gleichzeitig erhöhte Rate degenerierter Oozyten. Diese negative Beeinflussung des physiologischen Ablaufes der Eizellreifung lässt vermuten, dass lokale Faktoren aus dem Ovar, insbesondere die Follikelflüssigkeit, dazu fähig sind, die Aktivität des AhR in Anwesenheit oder Abwesenheit exogener Liganden zu modulieren. Die Follikelflüssigkeit spielt vermutlich eine kritische Rolle bei der Protektion der Oozyten gegenüber verschiedener Arten von Stress.

In der hier vorliegenden Studie wurde beobachtet, dass es in Anwesenheit von β -NF nur in der Kultur ohne Zusatz von Follikelflüssigkeit zu einer signifikant gesteigerten Rate der Apoptose von Kumuluszellen kommt. In der Kontrollgruppe konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, woraus sich schließen lässt, dass Apoptose die Ursache für die beeinträchtigte Eizellreifung sein könnte. Diese Daten werden durch Ergebnisse einer Studie mit Kumulus-Oozyten-Komplexen von Rindern gestützt, die gezeigt haben, dass PCB 126, ein anderer AhR-Ligand, in den Kumuluszellen Apoptose induziert (Pocar et al., 2005). Einige Studien berichten über eine Funktion des AhR in der Regulation oder Vermittlung apoptotischer Prozesse. TCDD führt in Mäusen zu einer Induktion der Apoptose. Dieser Effekt wurde in AhRKO-Mäusen nicht beobachtet (Fernandez-Salguero et al., 1996; Kamath et al., 1997; Zaher et al., 1998). Zusätzlich wurde berichtet, dass AhR-Liganden die Expression des pro-apoptotischen Gens Bax und *in vivo* die Apoptose in menschlichen Follikelzellen des Ovars induzieren (Matikainen et al., 2001).

Ikeda et al. (2003) berichteten darüber, dass der Grad der Apoptose, spontan oder induziert, in Kumuluszellen mit der Entwicklungskompetenz der Oozyten korrelieren könnte. Tatemoto et al. (2004) haben in ihren Experimenten gezeigt, dass die Follikelflüssigkeit die Oozyten durch einen vermehrten Abbau von Radikalen durch Superoxiddismutase-Isoenzymen vor oxidativem Stress schützt. In einer Studie, die sich mit den Effekten von β -NF auf die Biotransformation der Leber und der Biosynthese von Glutathion (GSH) im Forellenbarsch (*Micropterus salmoides*) beschäftigte, wurde ein vorübergehender Anstieg der Expression von Glutathion-S-Transferase A mRNA beobachtet. Weiterhin erhöhte sich

die Expression der katalytischen Untereinheit der Glutamat-Cystein-Ligase unter Behandlung mit β -NF um den Faktor 1,7. Parallel hierzu erfolgte ein Anstieg des intrazellulären GSH (Hughes und Gallagher, 2004). Glutathion, ein Tripeptid der Säugetierzellen, schützt Zellen vor der Oxidation und spielt damit eine entscheidende Rolle in der Protektion vor oxidativem Stress (Meister, 1983).

Interessanterweise wird die Toxizität des TCDD teilweise durch eine Antwort der Zelle auf oxidativen Stress vermittelt, die aus einer transkriptionalen Aktivierung und einem Anstieg der Produktion von reaktivem Sauerstoff resultiert (Dalton et al., 2002). In weiblichen C57BL/6J Mäusen wurde gezeigt, dass TCDD über einen durch den AhR-vermittelten Mechanismus innerhalb von 1 Woche einen Anstieg des hepatischen oxidierten Glutathion um den Faktor 2 verursacht (Shertzer et al., 1998). Hieraus folgern wir, dass die Menge des intrazellulären Glutathion in Oozyten vom Schwein, eine Veränderung der Menge und/oder des Redox-Status von GSH, die zu oxidativem Stress führen, ursächlich für die beobachteten Effekte des β -NF in der Kultur mit Serum im Vergleich zu der Kultur mit Follikelflüssigkeit verantwortlich sein könnten. Zur weiteren Klärung der Effekte von AhR-Liganden im Zusammenhang mit oxidativem Stress im Ovar, insbesondere über die Bedeutung von Glutathion in porzinen KOKs und die Behandlung mit β -NF, bedarf es weiterer Studien.

An der protektive Rolle der Follikelflüssigkeit, die in dieser Studie beobachtet wurde, sind vermutlich auch Wachstumsfaktoren beteiligt. Sakaguchi et al. (2002) zeigten in einer Studie an Rinderoozyten, dass die Wachstumsfaktoren EGF und IGF-1 (*insulin-like growth factor*) in Kumulus-Oozyten-Komplexen von kleinen Follikeln (≤ 3 mm im Durchmesser) den Ablauf des meiotischen Zellzyklus der Oozyten beschleunigen können. Dieser Effekt könnte mit durch die erhöhten Aktivitäten der in den Zellzyklus involvierten Kinasen H1-Kinase und MAP-Kinase während der frühen Stadien der Reifung verursacht sein.

In Zusammenschau der Ergebnisse der Studien bezüglich des AhR und seiner toxischen Liganden kann eine mögliche Verbindung zwischen dem Einfluß umwelttoxischer Substanzen und einer steigenden Infertilitätsrate von Frauen im reproduktiven Alter vermutet werden. Bei ca. einem Drittel der idiopathisch infertilen Frauen könnte diese Infertilität durch die Effekte von Umweltgiften verursacht sein (Stephen und Chandra, 1998; Lasley, 2001). Eine Exposition gegenüber Dioxinen und die folgende Aktivierung des AhR-Signalweges und seine Interaktionen könnten an der Pathogenese von Störungen des weiblichen Reproduktionstraktes beim Menschen, insbesondere der Endometriose, aber auch der Infertilität und dem verfrühtem Eintritt in die Menopause, beteiligt sein (Sharara et al., 1998; Petroff et al., 2003).

Aus diesem Grund haben Studien bezüglich des Signalweges des AhR als Vermittler umwelttoxischer Effekte eine große Bedeutung. Die Eizellreifung ist ontogenetisch eine

vulnerable Stufe auf dem Weg der weiteren Entwicklung. Es ist von entscheidender Bedeutung, dass die zytoplasmatische und die nukleäre Reifung der Oozyte bis zur Ovulation abgeschlossen ist.

Da der AhR bei physiologischen Abläufen im Fortpflanzungsprozess eine Funktion besitzt, werden Erkenntnisse über seinen Signalweg und seine interzellulären Interaktionen über die Verbesserung der zytoplasmatischen Reifung während der IVM möglicherweise auch zu einer gesteigerten Rate von erfolgreichen *In-vitro*-Fertilisationen beitragen.

5 Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des Arylhydrocarbonrezeptors für die Reifung von Säugetieroozyten aus physiologischer und toxikologischer Sicht untersucht.

Der AhR-Aktivität ist in Abwesenheit eines exogenen Liganden während der *In-vitro*-Maturation von Rinderoozyten konstitutiv aktiviert.

Der Serin/Threoninkinaseinhibitor 6-DMAP reduziert die Transkription des AhR-Zielgenes Cytochrom-P450-Monooxygenase 1A1 (CYP1A1) und phosphorylierten *extracellular signal-regulated protein kinases* ERK 1 und 2 (p44/p42 MAP-Kinase). Zusätzlich konnte eine Blockierung der physiologischen Reifung beobachtet werden. Die durch 6-DMAP verursachten Veränderungen in der Eizelle sind reversibel.

Um eine potentielle Rolle der Serin/Threoninkinasen im Rahmen der Aktivierung des AhR während der *In-vitro*-Reifung zu bestätigen, wurden im Folgenden die Kumulus-Oozyten-Komplexe mit Cycloheximide behandelt. Der Inhibitor führte zu einem Arrest in der Meiose, war jedoch nicht in der Lage, die Transkription von CYP1A1 signifikant zu beeinflussen.

Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung von Serin/Threoninkinasen an der Regulation des AhR während der *In-vitro*-Reifung von Rindereizellen hin.

Eine Behandlung mit dem spezifischen MEK (MAPK-Kinase)-Inhibitor PD98059 führte zu einer 3-stündigen Verzögerung der Aktivierung von MAPK. Parallel dazu zeigte sich nach 3 h Kultur eine signifikante Reduktion der Transkription des CYP1A1, ein Befund, der zuvor schon von anderen Arbeitsgruppen beobachtet worden war. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich im Wirkmechanismus des Inhibitors zu suchen. Bereits phosphorylierte, und somit aktivierte, MEK im Stadium des GV entzieht sich dem Einfluß des Inhibitors und kann die Kaskade der MAP-Kinase fortsetzen.

Die Aktivierung von MAP-Kinasen durch TCDD und eine sich daraus ergebende AhR/ARNT-abhängige Genexpression zeigen, dass der AhR an der Toxizität von Umweltgiften beteiligt ist. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit weisen insbesondere auf eine Beteiligung der MAP-Kinasen an toxischen AhR-Wirkungen während IVM von Rinderoozyten hin.

Im zweiten Teil der Studie konnte eine konstitutive Induktion von CYP1A1 während der *In-vitro*-Reifung von Kumulus-Oozyten-Komplexen vom Schwein gezeigt werden. Diese Ergebnisse lassen eine Aktivierung des AhR durch die Anwesenheit noch unbekannter endogener Liganden in der Follikelflüssigkeit vermuten. AhR-Liganden führten über die Induktion von Apoptose in den Kumuluszellen zu einer Beeinträchtigung der Eizellreifung. Dieser Effekt wurde bei Anwesenheit von Follikelflüssigkeit im Maturationsmedium nicht beobachtet. Daraus lässt sich auf die Existenz von noch nicht identifizierten Komponenten in

der Follikelflüssigkeit schließen, die eine protektive Funktion gegenüber exogenen Störfaktoren besitzen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Aktivierung der AhR-Kaskade eine wichtige Rolle für den korrekten Ablauf der *In-vitro*-Reifung von Säugetieroozyten spielt.

Die Analyse der Mechanismen, die der Aktivierung des AhR während der Oozytenreifung unterliegen und die Identifikation der Faktoren in der Follikelflüssigkeit, die mit der AhR-Aktivität verbunden sind, sollte ein Schwerpunkt zukünftiger Studien sein, in denen die physiologische und toxikologische Signifikanz dieses Transkriptionsfaktors *in vivo* aufgeklärt wird.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Abbott BD (1995) Review of the interaction between TCDD and glucocorticoids in embryonic palate. *Toxicology* 105:365-73.
- 2 Abbott BD, Probst MR, Perdew GH, Buckalew AR (1998) AH receptor, ARNT, glucocorticoid receptor, EGF receptor, EGF, TGF alpha, TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 expression in human embryonic palate, and effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Teratology* 58:30-43.
- 3 Abbott BD, Schmid JE, Pitt JA, Buckalew AR, Wood CR, Held GA, Diliberto JJ (1999) Adverse reproductive outcomes in the transgenic Ah receptor-deficient mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 155:62-70.
- 4 Adachi J, Mori Y, Matsui S, Takigami H, Fujino J, Kitagawa H, Miller CA, 3rd, Kato T, Saeki K, Matsuda T (2001) Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J Biol Chem* 276:31475-8.
- 5 Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270:27489-94.
- 6 Allen JR, Barsotti DA, Van Miller JP, Abrahamson LJ, Lalich JJ (1977) Morphological changes in monkeys consuming a diet containing low levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Food Cosmet Toxicol* 15:401-10.
- 7 Avery B, Hay-Schmidt A, Hyttel P, Greve T (1998) Embryo development, oocyte morphology, and kinetics of meiotic maturation in bovine oocytes exposed to 6-dimethylaminopurine prior to in vitro maturation. *Mol Reprod Dev* 50:334-44.
- 8 Barnett KR, Tomic D, Gupta RK, Babus JK, Roby KF, Terranova PF, Flaws JA (2007a) The Aryl Hydrocarbon Receptor Is Required for Normal Gonadotropin Responsiveness in the Mouse Ovary. *Toxicol Appl Pharmacol* 66-72.
- 9 Barnett KR, Tomic D, Gupta RK, Miller KP, Meachum S, Paulose T, Flaws JA (2007b) The Aryl Hydrocarbon Receptor Affects Mouse Ovarian Follicle Growth Via Mechanisms Involving Estradiol Regulation and Responsiveness. *Biol Reprod* 76:1062-70.
- 10 Barsotti DA, Abrahamson LJ, Allen JR (1979) Hormonal alterations in female rhesus monkeys fed a diet containing 2, 3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Bull Environ Contam Toxicol* 21:463-9.
- 11 Benedict JC, Lin TM, Loeffler IK, Peterson RE, Flaws JA (2000) Physiological role of the aryl hydrocarbon receptor in mouse ovary development. *Toxicol Sci* 56:382-8.

- 12 Benedict JC, Miller KP, Lin TM, Greenfeld C, Babus JK, Peterson RE, Flaws JA (2003) Aryl hydrocarbon receptor regulates growth, but not atresia, of mouse preantral and antral follicles. *Biol Reprod* 68:1511-7.
- 13 Bhatt RR, Ferrell JE, Jr. (1999) The protein kinase p90 rsk as an essential mediator of cytosstatic factor activity. *Science* 286:1362-5.
- 14 Bock KW, Lipp HP, Bock-Hennig BS (1990) Induction of drug-metabolizing enzymes by xenobiotics. *Xenobiotica* 20:1101-11.
- 15 Brizuela L, Draetta G, Beach D (1989) Activation of human CDC2 protein as a histone H1 kinase is associated with complex formation with the p62 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:4362-6.
- 16 Campbell PM, Devlin RH (1996) Expression of CYP1A1 in livers and gonads of Pacific salmon: Quantitation of mRNA levels by RT-cPCR. *Aquat Toxicol* 34:47-69.
- 17 Cano E, Mahadevan LC (1995) Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci* 20:117-22.
- 18 Carver LA, Bradfield CA (1997) Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *J Biol Chem* 272:11452-6.
- 19 Carver LA, Hogenesch JB, Bradfield CA (1994) Tissue specific expression of the rat Ah-receptor and ARNT mRNAs. *Nucleic Acids Res* 22:3038-44.
- 20 Chaffin CL, Peterson RE, Hutz RJ (1996) In utero and lactational exposure of female Holtzman rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: modulation of the estrogen signal. *Biol Reprod* 55:62-7.
- 21 Chaffin CL, Stouffer RL, Duffy DM (1999) Gonadotropin and steroid regulation of steroid receptor and aryl hydrocarbon receptor messenger ribonucleic acid in macaque granulosa cells during the periovulatory interval. *Endocrinology* 140:4753-60.
- 22 Chaffin CL, Trewin AL, Hutz RJ (2000) Estrous cycle-dependent changes in the expression of aromatic hydrocarbon receptor (AHR) and AHR-nuclear translocator (ARNT) mRNAs in the rat ovary and liver. *Chem Biol Interact* 124:205-16.
- 23 Chang CY, Puga A (1998) Constitutive activation of the aromatic hydrocarbon receptor. *Mol Cell Biol* 18:525-35.
- 24 Chen RH, Sarnecki C, Blenis J (1992) Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* 12:915-27.
- 25 Chen YH, Tukey RH (1996) Protein kinase C modulates regulation of the CYP1A1 gene by the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 271:26261-6.

- 26 Choi T, Aoki F, Mori M, Yamashita M, Nagahama Y, Kohmoto K (1991) Activation of p34cdc2 protein kinase activity in meiotic and mitotic cell cycles in mouse oocytes and embryos. *Development* 113:789-95.
- 27 Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E, Hsueh AJ (1996) Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology* 137:1447-56.
- 28 Cobb MH, Boulton TG, Robbins DJ (1991) Extracellular signal-regulated kinases: ERKs in progress. *Cell Regul* 2:965-78.
- 29 Conney AH (1982) Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons:G.H.A. Clowes Memorial lecture. *Cancer research* 42:
- 30 Cook SJ, Beltman J, Cadwallader KA, McMahon M, McCormick F (1997) Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 expression by extracellular signal-related kinase-dependent and Ca²⁺-dependent signal pathways in Rat-1 cells. *J Biol Chem* 272:13309-19.
- 31 Crawford RB, Holsapple MP, Kaminski NE (1997) Leukocyte activation induces aryl hydrocarbon receptor up-regulation, DNA binding, and increased Cyp1a1 expression in the absence of exogenous ligand. *Mol Pharmacol* 52:921-7.
- 32 Crews CM, Erikson RL (1992) Purification of a murine protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: relationship to the fission yeast byr1 gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8205-9.
- 33 Cummings AM, Metcalf JL, Birnbaum L (1996) Promotion of endometriosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats and mice: time-dose dependence and species comparison. *Toxicol Appl Pharmacol* 138:131-9.
- 34 Dalby KN, Morrice N, Caudwell FB, Avruch J, Cohen P (1998) Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/p90rsk that are inducible by MAPK. *J Biol Chem* 273:1496-505.
- 35 Dalton TP, Puga A, Shertzer HG (2002) Induction of cellular oxidative stress by aryl hydrocarbon receptor activation. *Chem Biol Interact* 141:77-95.
- 36 Davis JW, 2nd, Lauer FT, Burdick AD, Hudson LG, Burchiel SW (2001) Prevention of apoptosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the MCF-10A cell line: correlation with increased transforming growth factor alpha production. *Cancer Res* 61:3314-20.
- 37 Davis JW, 2nd, Melendez K, Salas VM, Lauer FT, Burchiel SW (2000) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) inhibits growth factor withdrawal-induced

- apoptosis in the human mammary epithelial cell line, MCF-10A. *Carcinogenesis* 21:881-6.
- 38 Davis RJ (1993) The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 268:14553-6.
- 39 Davis RJ (1995) Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol Reprod Dev* 42:459-67.
- 40 Dedieu T, Gall L, Crozet N, Sevellec C, Ruffini S (1996) Mitogen-activated protein kinase activity during goat oocyte maturation and the acquisition of meiotic competence. *Mol Reprod Dev* 45:351-8.
- 41 Dekel N (1996) Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. *Rev Reprod* 1:82-8.
- 42 Denis M, Cuthill S, Wikstrom AC, Poellinger L, Gustafsson JA (1988) Association of the dioxin receptor with the Mr 90,000 heat shock protein: a structural kinship with the glucocorticoid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 155:801-7.
- 43 DeVito MJ, Birnbaum LS (1995) Dioxins: model chemicals for assessing receptor-mediated toxicity. *Toxicology* 102:115-23.
- 44 Dey A, Nebert DW (1998) Markedly increased constitutive CYP1A1 mRNA levels in the fertilized ovum of the mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 251:657-61.
- 45 Dode MA, Adona PR (2001) Developmental capacity of *Bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-dimethylaminopurine. *Anim Reprod Sci* 65:171-80.
- 46 Draetta G, Beach D (1988) Activation of cdc2 protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement. *Cell* 54:17-26.
- 47 Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR (1995) A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7686-9.
- 48 Dunn TJ, Lindahl R, Pitot HC (1988) Differential gene expression in response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Noncoordinate regulation of a TCDD-induced aldehyde dehydrogenase and cytochrome P-450c in the rat. *J Biol Chem* 263:10878-86.
- 49 Edwards RG (1965) Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 208:349-51.
- 50 Edwards RG (1974) Follicular fluid. *J Reprod Fertil* 37:189-219.
- 51 Elbekai RH, Korashy HM, Wills K, Gharavi N, El-Kadi AO (2004) Benzo[a]pyrene, 3-methylcholanthrene and beta-naphthoflavone induce oxidative stress in hepatoma hepa 1c1c7 Cells by an AHR-dependent pathway. *Free Radic Res* 38:1191-200.

- 52 Elizondo G, Fernandez-Salguero P, Sheikh MS, Kim GY, Fornace AJ, Lee KS, Gonzalez FJ (2000) Altered cell cycle control at the G(2)/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast. *Mol Pharmacol* 57:1056-63.
- 53 el-Sabeawy F, Wang S, Overstreet J, Miller M, Lasley B, Enan E (1998) Treatment of rats during pubertal development with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters both signaling kinase activities and epidermal growth factor receptor binding in the testis and the motility and acrosomal reaction of sperm. *Toxicol Appl Pharmacol* 150:427-42.
- 54 Ema M, Sogawa K, Watanabe N, Chujoh Y, Matsushita N, Gotoh O, Funae Y, Fujii-Kuriyama Y (1992) cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 184:246-53.
- 55 Eskenazi B, Mocarelli P, Warner M, Samuels S, Vercellini P, Olive D, Needham LL, Patterson DG, Jr., Brambilla P, Gavoni N, Casalini S, Panazza S, Turner W, Gerthoux PM (2002) Serum dioxin concentrations and endometriosis: a cohort study in Seveso, Italy. *Environ Health Perspect* 110:629-34.
- 56 Faerge I, Mayes M, Hyttel P, Sirard MA (2001) Nuclear ultrastructure in bovine oocytes after inhibition of meiosis by chemical and biological inhibitors. *Mol Reprod Dev* 59:459-67.
- 57 Fan HY, Sun QY (2004) Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol Reprod* 70:535-47.
- 58 Fan HY, Tong C, Lian L, Li SW, Gao WX, Cheng Y, Chen DY, Schatten H, Sun QY (2003) Characterization of ribosomal S6 protein kinase p90rsk during meiotic maturation and fertilization in pig oocytes: mitogen-activated protein kinase-associated activation and localization. *Biol Reprod* 68:968-77.
- 59 Fernandez-Salguero P, Pineau T, Hilbert DM, McPhail T, Lee SS, Kimura S, Nebert DW, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ (1995) Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 268:722-6.
- 60 Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ (1996) Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 140:173-9.
- 61 Ferrell JE, Jr. (1999) *Xenopus* oocyte maturation: new lessons from a good egg. *Bioessays* 21:833-42.
- 62 Ferrell JE, Jr., Wu M, Gerhart JC, Martin GS (1991) Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and a microtubule-associated protein kinase homolog in *Xenopus* oocytes and eggs. *Mol Cell Biol* 11:1965-71.
- 63 Fischer B (2000) Receptor-mediated effects of chlorinated hydrocarbons. *Andrologia* 32:279-83.

- 64 Fissore RA, He CL, Vande Woude GF (1996) Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biol Reprod* 55:1261-70.
- 65 Fulka J, Jr., Leibfried-Rutledge ML, First NL (1991) Effect of 6-dimethylaminopurine on germinal vesicle breakdown of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 29:379-84.
- 66 Gall L, Boulesteix C, Ruffini S, Germain G (2005) EGF-induced EGF-receptor and MAP kinase phosphorylation in goat cumulus cells during in vitro maturation. *Mol Reprod Dev* 71:489-94.
- 67 Gao X, Son DS, Terranova PF, Rozman KK (1999) Toxic equivalency factors of polychlorinated dibenzo-p-dioxins in an ovulation model: validation of the toxic equivalency concept for one aspect of endocrine disruption. *Toxicol Appl Pharmacol* 157:107-16.
- 68 Gavin AC, Cavadore JC, Schorderet-Slatkine S (1994) Histone H1 kinase activity, germinal vesicle breakdown and M phase entry in mouse oocytes. *J Cell Sci* 107 (Pt 1):275-83.
- 69 Gebauer F, Richter JD (1997) Synthesis and function of Mos: the control switch of vertebrate oocyte meiosis. *Bioessays* 19:23-8.
- 70 Giavini E, Prati M, Vismara C (1983) Embryotoxic effects of 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin administered to female rats before mating. *Environ Res* 31:105-10.
- 71 Gonzalez FA, Seth A, Raden DL, Bowman DS, Fay FS, Davis RJ (1993) Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus. *J Cell Biol* 122:1089-101.
- 72 Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P (1998) The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug Metab Dispos* 26:1194-8.
- 73 Goren S, Piontkewitz Y, Dekel N (1994) Meiotic arrest in incompetent rat oocytes is not regulated by cAMP. *Dev Biol* 166:11-7.
- 74 Gotoh Y, Moriyama K, Matsuda S, Okumura E, Kishimoto T, Kawasaki H, Suzuki K, Yahara I, Sakai H, Nishida E (1991a) Xenopus M phase MAP kinase: isolation of its cDNA and activation by MPF. *Embo J* 10:2661-8.
- 75 Gotoh Y, Nishida E, Matsuda S, Shiina N, Kosako H, Shiokawa K, Akiyama T, Ohta K, Sakai H (1991b) In vitro effects on microtubule dynamics of purified Xenopus M phase-activated MAP kinase. *Nature* 349:251-4.
- 76 Goudet G, Belin F, Bezar J, Gerard N (1998) Maturation-promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) expression in relation to oocyte competence for in-vitro maturation in the mare. *Mol Hum Reprod* 4:563-70.

- 77 Gray LE, Jr., Kelce WR (1996) Latent effects of pesticides and toxic substances on sexual differentiation of rodents. *Toxicol Ind Health* 12:515-31.
- 78 Gray LE, Wolf C, Mann P, Ostby JS (1997) In utero exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters reproductive development of female Long Evans hooded rat offspring. *Toxicol Appl Pharmacol* 146:237-44.
- 79 Gross SD, Schwab MS, Lewellyn AL, Maller JL (1999) Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by the protein kinase p90Rsk. *Science* 286:1365-7.
- 80 Gross SD, Schwab MS, Taieb FE, Lewellyn AL, Qian YW, Maller JL (2000) The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in *Xenopus* oocytes is mediated by p90(Rsk). *Curr Biol* 10:430-8.
- 81 Gurley LR, D'Anna JA, Barham SS, Deaven LL, Tobey RA (1978) Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells. *Eur J Biochem* 84:1-15.
- 82 Guyton KZ, Gorospe M, Kensler TW, Holbrook NJ (1996) Mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation by butylated hydroxytoluene hydroperoxide: implications for cellular survival and tumor promotion. *Cancer Res* 56:3480-5.
- 83 Hahn ME (2002) Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact* 141:131-60.
- 84 Hasan A, Fischer B (2003) Epithelial cells in the oviduct and vagina and steroid-synthesizing cells in the rabbit ovary express AhR and ARNT. *Anat Embryol (Berl)* 207:9-18.
- 85 Hashimoto N, Kishimoto T (1988) Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Dev Biol* 126:242-52.
- 86 Hayashi S, Okabe-Kado J, Honma Y, Kawajiri K (1995) Expression of Ah receptor (TCDD receptor) during human monocytic differentiation. *Carcinogenesis* 16:1403-9.
- 87 Hayashi S, Watanabe J, Nakachi K, Eguchi H, Gotoh O, Kawajiri K (1994) Interindividual difference in expression of human Ah receptor and related P450 genes. *Carcinogenesis* 15:801-6.
- 88 Horling K (2009) Die KGN-Zelllinie als Modell zur Untersuchung der Rolle des Arylhydrocarbon-Rezeptors für die Physiologie und Funktion von Granulosazellen.
- 89 Huff J, Lucier G, Tritscher A (1994) Carcinogenicity of TCDD: experimental, mechanistic, and epidemiologic evidence. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 34:343-72.

- 90 Hughes EM, Gallagher EP (2004) Effects of beta-naphthoflavone on hepatic biotransformation and glutathione biosynthesis in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Mar Environ Res* 58:675-9.
- 91 Hughes FM, Jr., Gorospe WC (1991) Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology* 129:2415-22.
- 92 Hunter AG, Moor RM (1987) Stage-dependent effects of inhibiting ribonucleic acids and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes in vitro. *J Dairy Sci* 70:1646-51.
- 93 Ikeda S, Imai H, Yamada M (2003) Apoptosis in cumulus cells during in vitro maturation of bovine cumulus-enclosed oocytes. *Reproduction* 125:369-76.
- 94 Inoue M, Naito K, Aoki F, Toyoda Y, Sato E (1995) Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote* 3:265-71.
- 95 Inoue M, Naito K, Nakayama T, Sato E (1998) Mitogen-activated protein kinase translocates into the germinal vesicle and induces germinal vesicle breakdown in porcine oocytes. *Biol Reprod* 58:130-6.
- 96 Jain S, Maltepe E, Lu MM, Simon C, Bradfield CA (1998) Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 alpha, HIF2 alpha and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. *Mech Dev* 73:117-23.
- 97 Jaiswal AK, McBride OW, Adesnik M, Nebert DW (1988) Human dioxin-inducible cytosolic NAD(P)H:menadione oxidoreductase. cDNA sequence and localization of gene to chromosome 16. *J Biol Chem* 263:13572-8.
- 98 Jones SW, Erikson E, Blenis J, Maller JL, Erikson RL (1988) A *Xenopus* ribosomal protein S6 kinase has two apparent kinase domains that are each similar to distinct protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:3377-81.
- 99 Jonsson HT, Jr., Keil JE, Gaddy RG, Loadholt CB, Hennigar GR, Walker EM, Jr. (1975) Prolonged ingestion of commercial DDT and PCB; effects on progesterone levels and reproduction in the mature female rat. *Arch Environ Contam Toxicol* 3:479-90.
- 100 Kalous J, Kubelka M, Rimkevicova Z, Guerrier P, Motlik J (1993) Okadaic acid accelerates germinal vesicle breakdown and overcomes cycloheximide- and 6-dimethylaminopurine block in cattle and pig oocytes. *Dev Biol* 157:448-54.
- 101 Kamath AB, Xu H, Nagarkatti PS, Nagarkatti M (1997) Evidence for the induction of apoptosis in thymocytes by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol* 142:367-77.

- 102 Kang KW, Park EY, Kim SG (2003) Activation of CCAAT/enhancer-binding protein beta by 2'-amino-3'-methoxyflavone (PD98059) leads to the induction of glutathione S-transferase A2. *Carcinogenesis* 24:475-82.
- 103 Kholkute SD, Dukelow WR (1997) Effects of polychlorinated biphenyl (PCB) mixtures on in vitro fertilization in the mouse. *Bull Environ Contam Toxicol* 59:531-6.
- 104 Kholkute SD, Rodriguez J, Dukelow WR (1994) Reproductive toxicity of Aroclor-1254: effects on oocyte, spermatozoa, in vitro fertilization, and embryo development in the mouse. *Reprod Toxicol* 8:487-93.
- 105 Khorram O, Garthwaite M, Golos T (2002) Uterine and ovarian aryl hydrocarbon receptor (AHR) and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) mRNA expression in benign and malignant gynaecological conditions. *Mol Hum Reprod* 8:75-80.
- 106 Kleman MI, Overvik E, Mason GG, Gustafsson JA (1992) In vitro activation of the dioxin receptor to a DNA-binding form by food-borne heterocyclic amines. *Carcinogenesis* 13:1619-24.
- 107 Krogenaes AK, Nafstad I, Skare JU, Farstad W, Hafne AL (1998) In vitro reproductive toxicity of polychlorinated biphenyl congeners 153 and 126. *Reprod Toxicol* 12:575-80.
- 108 Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- 109 LaRosa C, Downs SM (2005) MEK inhibitors block AICAR-induced maturation in mouse oocytes by a MAPK-independent mechanism. *Mol Reprod Dev* 70:235-45.
- 110 Lasley B (2001) Specific challenges of investigating ovarian toxicity in humans and the nonhuman primate model. *Toxicological Sciences (Supplement 1)* &=:1571.
- 111 Leighton JK, Canning S, Guthrie HD, Hammond JM (1995) Expression of cytochrome P450 1A1, an estrogen hydroxylase, in ovarian granulosa cells is developmentally regulated. *J Steroid Biochem Mol Biol* 52:351-6.
- 112 Lenormand P, Sardet C, Pages G, L'Allemain G, Brunet A, Pouyssegur J (1993) Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J Cell Biol* 122:1079-88.
- 113 Levesque JT, Sirard MA (1995) Effects of different kinases and phosphatases on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 42:114-21.
- 114 Levesque JT, Sirard MA (1996) Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B in bovine oocytes. *Biol Reprod* 55:1427-36.

- 115 Li X, Johnson DC, Rozman KK (1995) Reproductive effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in female rats: ovulation, hormonal regulation, and possible mechanism(s). *Toxicol Appl Pharmacol* 133:321-7.
- 116 Lonergan P, Khatir H, Carolan C, Mermillod P (1997) Bovine blastocyst production in vitro after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. *J Reprod Fertil* 109:355-65.
- 117 Long WP, Pray-Grant M, Tsai JC, Perdew GH (1998) Protein kinase C activity is required for aryl hydrocarbon receptor pathway-mediated signal transduction. *Mol Pharmacol* 53:691-700.
- 118 Luciano AM, Pocar P, Milanesi E, Modena S, Rieger D, Lauria A, Gandolfi F (1999) Effect of different levels of intracellular cAMP on the in vitro maturation of cattle oocytes and their subsequent development following in vitro fertilization. *Mol Reprod Dev* 54:86-91.
- 119 Ma Q, Whitlock JP, Jr. (1996) The aromatic hydrocarbon receptor modulates the Hepa 1c1c7 cell cycle and differentiated state independently of dioxin. *Mol Cell Biol* 16:2144-50.
- 120 Madhukar BV, Ebner K, Matsumura F, Bombick DW, Brewster DW, Kawamoto T (1988) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes an increase in protein kinases associated with epidermal growth factor receptor in the hepatic plasma membrane. *J Biochem Toxicol* 3:261-77.
- 121 Matikainen T, Perez GI, Jurisicova A, Pru JK, Schlezinger JJ, Ryu HY, Laine J, Sakai T, Korsmeyer SJ, Casper RF, Sherr DH, Tilly JL (2001) Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nat Genet* 28:355-60.
- 122 Meinecke B, Krschek C (2003) MAPK/ERK kinase (MEK) signalling is required for resumption of meiosis in cultured cumulus-enclosed pig oocytes. *Zygote* 11:7-16.
- 123 Meister A (1983) Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 220:472-7.
- 124 Mendola P, Buck GM, Sever LE, Zielesny M, Vena JE (1997) Consumption of PCB-contaminated freshwater fish and shortened menstrual cycle length. *Am J Epidemiol* 146:955-60.
- 125 Meyer BK, Pray-Grant MG, Vanden Heuvel JP, Perdew GH (1998) Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Molecular and Cellular Biology* 18:978-988.

- 126 Mills JB, Rose KA, Sadagopan N, Sahi J, de Morais SM (2004) Induction of drug metabolism enzymes and MDR1 using a novel human hepatocyte cell line. *J Pharmacol Exp Ther* 309:303-9.
- 127 Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M, Fujii-Kuriyama Y (1997) Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* 2:645-54.
- 128 Minshull J, Sun H, Tonks NK, Murray AW (1994) A MAP kinase-dependent spindle assembly checkpoint in *Xenopus* egg extracts. *Cell* 79:475-86.
- 129 Monk SA, Denison MS, Rice RH (2001) Transient expression of CYP1A1 in rat epithelial cells cultured in suspension. *Arch Biochem Biophys* 393:154-62.
- 130 Morita Y, Tilly JL (1999) Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev Biol* 213:1-17.
- 131 Moyer JD, Barbacci EG, Iwata KK, Arnold L, Boman B, Cunningham A, DiOrio C, Doty J, Morin MJ, Moyer MP, Neveu M, Pollack VA, Pustilnik LR, Reynolds MM, Sloan D, Theleman A, Miller P (1997) Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358,774, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res* 57:4838-48.
- 132 Mufti NA, Bleckwenn NA, Babish JG, Shuler ML (1995) Possible involvement of the Ah receptor in the induction of cytochrome P-450IA1 under conditions of hydrodynamic shear in microcarrier-attached hepatoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 208:144-52.
- 133 Muller WF, Hobson W, Fuller GB, Knauf W, Coulston F, Korte F (1978) Endocrine effects of chlorinated hydrocarbons in rhesus monkeys. *Ecotoxicol Environ Saf* 2:161-72.
- 134 Nambu JR, Lewis JO, Wharton KA, Jr., Crews ST (1991) The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* 67:1157-67.
- 135 Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ (2004) Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J Biol Chem* 279:23847-50.
- 136 Nebert DW, Gonzalez FJ (1987) P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem* 56:945-93.
- 137 Okey AB, Riddick DS, Harper PA (1994) Molecular biology of the aromatic hydrocarbon (dioxin) receptor. *Trends Pharmacol Sci* 15:226-32.

- 138 Oliver RH, Khan SM, Leung BS, Yeh J (1999) Induction of apoptosis in luteinized granulosa cells by the MAP kinase kinase (MEK) inhibitor PD98059. *Biochem Biophys Res Commun* 263:143-8.
- 139 Papkoff J, Verma IM, Hunter T (1982) Detection of a transforming gene product in cells transformed by Moloney murine sarcoma virus. *Cell* 29:417-26.
- 140 Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M (2004a) EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 303:682-4.
- 141 Park R, Kim DH, Kim MS, So HS, Chung HT, Kwon KB, Ryu DG, Kim BR (1998) Association of Shc, Cbl, Grb2, and Sos following treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in primary rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 253:577-81.
- 142 Park S, Mazina O, Kitagawa A, Wong P, Matsumura F (2004b) TCDD causes suppression of growth and differentiation of MCF10A, human mammary epithelial cells by interfering with their insulin receptor signaling through c-Src kinase and ERK activation. *J Biochem Mol Toxicol* 18:322-31.
- 143 Perdew GH (1988) Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J Biol Chem* 263:13802-5.
- 144 Perez GI, Tilly JL (1997) Cumulus cells are required for the increased apoptotic potential in oocytes of aged mice. *Hum Reprod* 12:2781-3.
- 145 Peter M, Sanghera JS, Pelech SL, Nigg EA (1992) Mitogen-activated protein kinases phosphorylate nuclear lamins and display sequence specificity overlapping that of mitotic protein kinase p34cdc2. *Eur J Biochem* 205:287-94.
- 146 Peterson RE, Theobald HM, Kimmel GL (1993) Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds: cross-species comparisons. *Crit Rev Toxicol* 23:283-335.
- 147 Petroff BK, Crutch CR, Hunter DM, Wierman ME, Gao X (2003) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) stimulates gonadotropin secretion in the immature female Sprague-Dawley rat through a pentobarbital- and estradiol-sensitive mechanism but does not alter gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion by immortalized GnRH neurons in vitro. *Biol Reprod* 68:2100-6.
- 148 Pincus G, Enzmann EV (1935) The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. I. The activation of ovarian eggs. *J Exp. Med.* 62:655-675.
- 149 Pocar P, Augustin R, Fischer B (2004) Constitutive expression of CYP1A1 in bovine cumulus oocyte-complexes in vitro: mechanisms and biological implications. *Endocrinology* 145:1594-601.

- 150 Pocar P, Brevini TA, Perazzoli F, Cillo F, Modena S, Gandolfi F (2001a) Cellular and molecular mechanisms mediating the effects of polychlorinated biphenyls on oocyte developmental competence in cattle. *Mol Reprod Dev* 60:535-41.
- 151 Pocar P, Nestler D, Risch M, Fischer B (2005) Apoptosis in bovine cumulus-oocyte complexes after exposure to polychlorinated biphenyl mixtures during in vitro maturation. *Reproduction* 130:857-68.
- 152 Pocar P, Perazzoli F, Luciano AM, Gandolfi F (2001b) In vitro reproductive toxicity of polychlorinated biphenyls: effects on oocyte maturation and developmental competence in cattle. *Mol Reprod Dev* 58:411-6.
- 153 Pohjanvirta R, Tuomisto J (1994) Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms, and animal models. *Pharmacol Rev* 46:483-549.
- 154 Poland A, Glover E (1987) Variation in the molecular mass of the Ah receptor among vertebrate species and strains of rats. *Biochem Biophys Res Commun* 146:1439-1449.
- 155 Poland A, Glover E, Kende AS (1976) Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J Biol Chem* 251:4936-46.
- 156 Poland A, Knutson JC (1982) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22:517-54.
- 157 Pollenz RS, Sattler CA, Poland A (1994) The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence microscopy. *Mol Pharmacol* 45:428-38.
- 158 Posada J, Cooper JA (1992) Requirements for phosphorylation of MAP kinase during meiosis in *Xenopus* oocytes. *Science* 255:212-5.
- 159 Pru JK, Tilly JL (2001) Programmed cell death in the ovary: insights and future prospects using genetic technologies. *Mol Endocrinol* 15:845-53.
- 160 Puga A, Nebert DW, Carrier F (1992) Dioxin induces expression of c-fos and c-jun proto-oncogenes and a large increase in transcription factor AP-1. *DNA Cell Biol* 11:269-81.
- 161 Puga A, Xia Y, Elferink C (2002) Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Chem Biol Interact* 141:117-30.

- 162 Rannug U, Rannug A, Sjoberg U, Li H, Westerholm R, Bergman J (1995) Structure elucidation of two tryptophan-derived, high affinity Ah receptor ligands. *Chem Biol* 2:841-5.
- 163 Ratts VS, Flaws JA, Kolp R, Sorenson CM, Tilly JL (1995) Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinology* 136:3665-8.
- 164 Reiners JJ, Jr., Clift R, Mathieu P (1999) Suppression of cell cycle progression by flavonoids: dependence on the aryl hydrocarbon receptor. *Carcinogenesis* 20:1561-6.
- 165 Reiners JJ, Jr., Lee JY, Clift RE, Dudley DT, Myrand SP (1998) PD98059 is an equipotent antagonist of the aryl hydrocarbon receptor and inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol Pharmacol* 53:438-45.
- 166 Reyes H, Reisz-Porszasz S, Hankinson O (1992) Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science* 256:1193-5.
- 167 Reynaud K, Driancourt MA (2000) Oocyte attrition. *Mol Cell Endocrinol* 163:101-8.
- 168 Robles R, Morita Y, Mann KK, Perez GI, Yang S, Matikainen T, Sherr DH, Tilly JL (2000) The aryl hydrocarbon receptor, a basic helix-loop-helix transcription factor of the PAS gene family, is required for normal ovarian germ cell dynamics in the mouse. *Endocrinology* 141:450-3.
- 169 Ronnback C, de Rooij DG (1994) Effects of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl on foetal germ cells in two mouse strains after repeated treatment of the dams during and after pregnancy. *Pharmacol Toxicol* 74:287-93.
- 170 Ronnbeck C (1991) Effects of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (TCB) on ovaries of foetal mice. *Pharmacol Toxicol* 68:340-5.
- 171 Ruderman JV (1993) MAP kinase and the activation of quiescent cells. *Curr Opin Cell Biol* 5:207-13.
- 172 Sadek CM, Allen-Hoffmann BL (1994) Cytochrome P450IA1 is rapidly induced in normal human keratinocytes in the absence of xenobiotics. *J Biol Chem* 269:16067-74.
- 173 Safe S (1984) Polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls (PBBs): biochemistry, toxicology, and mechanism of action. *Crit Rev Toxicol* 13:319-95.
- 174 Safe SH (1986) Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 26:371-99.
- 175 Sakaguchi M, Dominko T, Leibfried-Rutledge ML, Nagai T, First NL (2000) A combination of EGF and IGF-I accelerates the progression of meiosis in bovine

- follicular oocytes in vitro and fetal calf serum neutralizes the acceleration effect. *Theriogenology* 54:1327-42.
- 176 Sakaguchi M, Dominko T, Yamauchi N, Leibfried-Rutledge ML, Nagai T, First NL (2002) Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors in vitro. *Reproduction* 123:135-42.
- 177 Sanghera JS, McNabb CK, Tonks N, Pelech SL (1991) Tyrosyl phosphorylation and activation of the myelin basic protein kinase p44mpk during sea star oocyte maturation. *Biochim Biophys Acta* 1095:153-60.
- 178 Satoh T, Nakafuku M, Kaziro Y (1992) Function of Ras as a molecular switch in signal transduction. *J Biol Chem* 267:24149-52.
- 179 Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC, Bradfield CA (1996) Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6731-6.
- 180 Seger R, Krebs EG (1995) The MAPK signaling cascade. *Faseb J* 9:726-35.
- 181 Seth A, Gonzalez FA, Gupta S, Raden DL, Davis RJ (1992) Signal transduction within the nucleus by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 267:24796-804.
- 182 Sharara FI, Seifer DB, Flaws JA (1998) Environmental toxicants and female reproduction. *Fertil Steril* 70:613-22.
- 183 Shertzer HG, Nebert DW, Puga A, Ary M, Sonntag D, Dixon K, Robinson LJ, Cianciolo E, Dalton TP (1998) Dioxin causes a sustained oxidative stress response in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 253:44-8.
- 184 Shibuya EK, Boulton TG, Cobb MH, Ruderman JV (1992) Activation of p42 MAP kinase and the release of oocytes from cell cycle arrest. *Embo J* 11:3963-75.
- 185 Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Ishikawa T (2000) Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:779-82.
- 186 Silbergeld EK, Mattison DR (1987) Experimental and clinical studies on the reproductive toxicology of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Am J Ind Med* 11:131-44.
- 187 Simon M, Jilek F, Fulka J, Jr. (1989) Effect of cycloheximide upon maturation of bovine oocytes. *Reprod Nutr Dev* 29:533-40.
- 188 Sinal CJ, Bend JR (1997) Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of cyp1a1 by bilirubin in mouse hepatoma hepa 1c1c7 cells. *Mol Pharmacol* 52:590-9.
- 189 Singh SS, Hord NG, Perdew GH (1996) Characterization of the activated form of the aryl hydrocarbon receptor in the nucleus of HeLa cells in the absence of exogenous ligand. *Arch Biochem Biophys* 329:47-55.

- 190 Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML, First NL (1989) Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 40:1257-63.
- 191 Smits-van Prooije AE, Waalkens-Berendsen DH, Morse DC, Koopman-Esseboom C, Huisman M, Sauer PJ, Boersma ER, Lammers JH, van den Berg KJ, van der Paauw GC, Kulig BM, Snoeij NJ (1996) The effects on mammals of pre- and postnatal environmental exposure to PCBS. The Dutch Collaborative PCB/Dioxin Study. *Arch Toxicol Suppl* 18:97-102.
- 192 Sobajima T, Aoki F, Kohmoto K (1993) Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 97:389-94.
- 193 Son DS, Ushinohama K, Gao X, Taylor CC, Roby KF, Rozman KK, Terranova PF (1999) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) blocks ovulation by a direct action on the ovary without alteration of ovarian steroidogenesis: lack of a direct effect on ovarian granulosa and thecal-interstitial cell steroidogenesis in vitro. *Reprod Toxicol* 13:521-30.
- 194 Stapleton HM, Baker JE (2003) Comparing polybrominated diphenyl ether and polychlorinated biphenyl bioaccumulation in a food web in Grand Traverse Bay, Lake Michigan. *Arch Environ Contam Toxicol* 45:227-34.
- 195 Stephen EH, Chandra A (1998) Updated projections of infertility in the United States: 1995-2025. *Fertil Steril* 70:30-4.
- 196 Su YQ, Rubinstein S, Luria A, Lax Y, Breitbart H (2001) Involvement of MEK-mitogen-activated protein kinase pathway in follicle-stimulating hormone-induced but not spontaneous meiotic resumption of mouse oocytes. *Biol Reprod* 65:358-65.
- 197 Su YQ, Wigglesworth K, Pendola FL, O'Brien MJ, Eppig JJ (2002) Mitogen-activated protein kinase activity in cumulus cells is essential for gonadotropin-induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse. *Endocrinology* 143:2221-32.
- 198 Sun QY, Blumenfeld Z, Rubinstein S, Goldman S, Gonen Y, Breitbart H (1999) Mitogen-activated protein kinase in human eggs. *Zygote* 7:181-5.
- 199 Sutter TR, Guzman K, Dold KM, Greenlee WF (1991) Targets for dioxin: genes for plasminogen activator inhibitor-2 and interleukin-1 beta. *Science* 254:415-418.
- 200 Tan Z, Chang X, Puga A, Xia Y (2002) Activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by aromatic hydrocarbons: role in the regulation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) function. *Biochem Pharmacol* 64:771-80.
- 201 Tan Z, Huang M, Puga A, Xia Y (2004) A critical role for MAP kinases in the control of Ah receptor complex activity. *Toxicol Sci* 82:80-7.

- 202 Tatemoto H, Horiuchi T, Terada T (1994) Effects of cycloheximide on chromatin condensations and germinal vesicle breakdown (GVBD) of cumulus-enclosed and denuded oocytes in cattle. *Theriogenology* 42:1141-1148.
- 203 Tatemoto H, Muto N, Sunagawa I, Shinjo A, Nakada T (2004) Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. *Biol Reprod* 71:1150-7.
- 204 Tilly JL (1996) Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod* 1:162-72.
- 205 Tomek W, Melo Sterza FA, 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. *Biol Reprod* 66:1274-82.
- 206 Tscheudschilsuren G, Kuchenhoff A, Klonisch T, Tetens F, Fischer B (1999) Induction of arylhydrocarbon receptor expression in embryoblast cells of rabbit preimplantation blastocysts upon degeneration of Rauber's polar trophoblast. *Toxicol Appl Pharmacol* 157:125-33.
- 207 Uda Y, Price KR, Williamson G, Rhodes MJ (1997) Induction of the anticarcinogenic marker enzyme, quinone reductase, in murine hepatoma cells in vitro by flavonoids. *Cancer Lett* 120:213-6.
- 208 Vatzias G, Hagen DR (1999) Effects of porcine follicular fluid and oviduct-conditioned media on maturation and fertilization of porcine oocytes in vitro. *Biol Reprod* 60:42-8.
- 209 Verde F, Dogterom M, Stelzer E, Karsenti E, Leibler S (1992) Control of microtubule dynamics and length by cyclin A- and cyclin B-dependent kinases in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol* 118:1097-108.
- 210 Verlhac MH, de Pennart H, Maro B, Cobb MH, Clarke HJ (1993) MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 158:330-40.
- 211 Verlhac MH, Kubiak JZ, Clarke HJ, Maro B (1994) Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development* 120:1017-25.
- 212 Wassarman P, Albertini D: The mammalian ovum. In: K. E and N. J (Hrsg.): *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York, 1994, pp. 79-122
- 213 Weber LP, Diamond, S. L., Bandiera, S. M., and Janz, D. M. (2002) Expression of HSP70 and CYP1A protein in ovary and liver of juvenile rainbow trout exposed to beta-naphthoflavone. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 131:387-394.

- 214 Weber LP, Janz DM (2001) Effect of beta-naphthoflavone and dimethylbenz[a]anthracene on apoptosis and HSP70 expression in juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ovary. *Aquat Toxicol* 54:39-50.
- 215 Whitaker M (1996) Control of meiotic arrest. *Rev Reprod* 1:127-35.
- 216 Wolf CJ, Ostby JS, Gray LE, Jr. (1999) Gestational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) severely alters reproductive function of female hamster offspring. *Toxicol Sci* 51:259-64.
- 217 Yarden Y (2001) The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 37 Suppl 4:S3-8.
- 218 Yim S, Oh M, Choi SM, Park H (2004) Inhibition of the MEK-1/p42 MAP kinase reduces aryl hydrocarbon receptor-DNA interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 322:9-16.
- 219 Yu HQ, Bou S, Chen DY, Sun QY (2002) Phosphorylation of MAP kinase and p90^{rsk} and its regulation during in vitro maturation of cumulus-enclosed rabbit oocytes. *Zygote* 10:311-6.
- 220 Yu ML, Guo YL, Hsu CC, Rogan WJ (2000) Menstruation and reproduction in women with polychlorinated biphenyl (PCB) poisoning: long-term follow-up interviews of the women from the Taiwan Yucheng cohort. *Int J Epidemiol* 29:672-7.
- 221 Zaher H, Fernandez-Salguero PM, Letterio J, Sheikh MS, Fornace AJ, Jr., Roberts AB, Gonzalez FJ (1998) The involvement of aryl hydrocarbon receptor in the activation of transforming growth factor-beta and apoptosis. *Mol Pharmacol* 54:313-21.
- 222 Zhang WL, Huitorel P, Genevriere AM, Chiri S, Ciapa B (2006) Inactivation of MAPK in mature oocytes triggers progression into mitosis via a Ca²⁺ -dependent pathway but without completion of S phase. *J Cell Sci* 119:3491-501.
- 223 Zhao X, Singh B, Batten BE (1991) The role of c-mos proto-oncoprotein in mammalian meiotic maturation. *Oncogene* 6:43-9.

7 Thesen

1. Der Arylhydrocarbonrezeptor (AhR) ist ein durch Liganden aktivierter Transkriptionsfaktor, der neben der Vermittlung toxischer Effekte von Umweltgiften, wie zum Beispiel von 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), auch eine Funktion in der ovariellen Follikulogenese bei Säugetieren besitzt.
2. Der AhR ist während der *In-vitro*-Maturation konstitutiv aktiv. Exogene Liganden erhöhen die Expression von Zielgenen wie CYP1A1 in Rindereizellen.
3. Serin/Threoninkinasen spielen eine Rolle in der Regulation des AhR während der *In-vitro*-Maturation von Rinderoozyten.
4. Die Behandlung von Rinderoozyten mit dem spezifischen MAPK-Kinase (MEK)-Inhibitor PD98059 bewirkt eine Verzögerung der Aktivität von CYP1A1 und der p44/p42 MAP-Kinase. Das lässt eine Interaktion zwischen den Kaskaden der MAP-Kinase und dem AhR vermuten.
5. Der AhR wird auch während der *In-vitro*-Reifung von Kumulus-Oozyten-Komplexen vom Schwein aktiviert. Dies deutet bei einer weiteren Spezies auf eine wichtige Funktion des Rezeptors für den korrekten Ablauf der *In-vitro*-Reifung bei Säugetieroozyten hin.
6. Die Aktivität des Rezeptors in porzinen Kumulus-Oozyten-Komplexen kann durch exogene Liganden, wie β -Naphthoflavone, über die Induktion der Apoptose in den Kumuluszellen ovotoxisch wirken.
7. Die Anwesenheit von Follikelflüssigkeit im Kulturmedium verhindert die toxischen Effekte des β -Naphthoflavone während der *In-vitro*-Reifung von porzinen Oozyten.
8. Zusammenfassend ist festzustellen, dass der AhR in zwei Säugetierspezies, dem Rind und Schwein, physiologisch an der Eizellreifung beteiligt ist, aber durch diese Funktion gleichzeitig ein Angriffsziel für toxische Dysregulation bietet. In den porzinen Kumulus-Oozyten-Komplexen schützen Inhaltsstoffe in der Follikelflüssigkeit vor toxischen Interventionen durch Xenobiotika.

Curriculum vitae

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Daniela Olatunji
Geburtsname: Nestler
Geburtsdatum: 30.05.1982
Geburtsort: Merseburg
Familienstand: Verheiratet, 1 Tochter
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Konfession: Katholisch

SCHULBILDUNG

07/2000 Abitur am Domgymnasium Merseburg

STUDIUM

10/2000 – 11/2006 Studium der Humanmedizin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

BERUFSTÄTIGKEIT

10/2007 - 10/2008 Tätigkeit als Assistenzärztin in der Abteilung für Kinder- und Jugendmedizin, Krankenhaus Ludmilenstift Meppen, Dr. med. Blanke und Dr. med. Matthaei
11/2008 - 04/2009 Tätigkeit als Assistenzärztin in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Diakoniekrankenhaus Rotenburg (Wümme) gGmbH, Dr. med. Scharnetzky
05/2009 - 08/2009 Tätigkeit als Assistenzärztin in der Abteilung für Kinder- und Jugendmedizin, Krankenhaus Ludmilenstift Meppen, Dr. med. Blanke und Dr. med. Matthaei

STUDIENBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN

09/2003 – 06/2005 Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale): Durchführung molekularbiologischer Techniken

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Promotion ist an keiner weiteren Fakultät eingereicht bzw. abgelehnt worden. Ein früherer Promotionsversuch ist nicht erfolgt.

Bremen, den 18.01.2010

Publikationen

Pocar P, Nestler D, Risch M, Fischer B

„Apoptosis in bovine cumulus-oocyte complexes after exposure to polychlorinated biphenyl mixtures during in vitro maturation.“

Reproduction 130(6) [2005] 857-868

Nestler D, Risch M, Fischer B, Pocar P

„Regulation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) activity in porcine cumulus-oocyte complexes in physiological and toxicological conditions: the role of follicular fluid“

Reproduction 133(5) [2007] 887-897

Nestler D, Risch M, Fischer B, Pocar P

„Die Aktivierung des Arylhydrocarbon-rezeptors während der In-vitro-Reifung von Oozyten des Schweines unter verschiedenen Kulturbedingungen“

Vortrag bei der 21. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg
09/2004

Nestler D, Risch M, Fischer B, Pocar P

„Modulation of arylhydrocarbon receptor (AhR) activity during in vitro maturation (IVM) of bovine oocyte“

Poster bei der Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (IETS), Kopenhagen, Dänemark 01/2005