

**Untersuchungen zu altersabhängigen
Segregationsfehlern in den Oozyten von
CBA/Ca Mäusen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (rer. nat.)
Fakultät für Biologie

vorgelegt von Geert Michel

September 2002

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	4
2.1	Entwicklung weiblicher Keimzellen in Mammaliern	4
2.2	Der Zellzyklus	7
2.2.1	Meiose I und II	8
2.2.2	Besonderheiten des Zellzyklus in der Entwicklung und Reifung der Oozyten von Mäusen	32
2.3	Chromosomale Aberrationen in den Oozyten von Mammaliern	37
2.3.1	Numerische Aberrationen in der Meiose	38
2.3.2	Ursachen numerischer Aberrationen	42
2.4	Die Maus als Modellorganismus für numerische Aberrationen während der Meiose	44
2.5	Fragestellung und Ziele der Arbeit	45
3	Material und Methoden	46
3.1	Verwendete Tiere und Bestimmung des Ovulationszyklusses .	46
3.1.1	Tiere	46
3.1.2	Injektion der Tiere mit Gonadotrophinen	46
3.1.3	Bestimmung des Ovulationszyklusses	46
3.2	<i>In vitro</i> Reifung der Oozyten	47
3.2.1	Wasser für die Kultur	47
3.2.2	Herstellung der Kapillaren für die Manipulation der Oozyten	47
3.2.3	Medien und andere Lösungen	47
3.2.4	Isolation und Kultur der Oozyten	50
3.2.5	Drogen	50
3.3	Bestimmung der Reifungskinetik und der Reifungsrate	50
3.4	Zytogenetische Analyse	51
3.4.1	Spreitung und chromosomale Analyse der Oozyten . .	51
3.4.2	C-Bandierung gespreiteter Chromosomen	52
3.5	Immunfluoreszenz	53
3.5.1	Verwendete Materialien und Aufbereitung	54

3.5.2	Indirekte Immunfluoreszenz	55
3.6	Analyse der Histon-H1- und MBP Kinase Aktivität	57
3.6.1	Verwendete Materialien und Aufbereitung	57
3.6.2	Trennung der Proteine in der SDS-Polyacrylamid Gel elektrophorese und Bestimmung der spezifischen Ak- tivität der Substrate	59
3.7	Statistische Auswertung	61
3.7.1	Fisher-Test	61
3.7.2	χ^2 -Test	62
4	Ergebnisse	64
4.1	<i>In vitro</i> Reifung unbehandelter Oozyten von CBA/Ca Mäusen	64
4.2	Reifungsraten und -kinetiken von <i>in vitro</i> gereiften Oozyten unstimulierter junger- und alter Mäuse	66
4.2.1	Vergleich der Reifungskinetiken von <i>in vitro</i> gereiften Oozyten unstimulierter junger und alter Mäuse	66
4.3	Chromosomale Anomalien in Oozyten von jungen- und alten unstimulierten CBA/Ca Mäusen	70
4.3.1	Spreitungen von Ooyten junger und alter Mäuse nach 16 Stunden <i>in vitro</i> Reifung	70
4.3.2	Frühe Spreitung <i>in vitro</i> -gereifter Metaphase I Oozy- ten junger- und alter Mäuse	71
4.4	Einfluß von Gonadotrophinen auf die Rate chromosomaler Aberrationen und die Reifungskinetik	77
4.4.1	Reifungsrate	77
4.4.2	Chromosomale Aberrationen	79
4.5	Aktivität der Histon HI- und MBP-Kinasen in Oozyten	81
4.5.1	Ergebnisse der Etablierung der Kinaseassays und Stan- dardisierung der Messungen	82
4.5.2	Vergleich der Kinase Aktivitäten junger und alter Mäuse	84
4.6	Reifungsrate und Kinetik Nocodazol-inkubierter Oozyten	88
4.6.1	Bestimmung einer Nocodazolkonzentration die nicht zu einem vollständigen Block führt	89
4.6.2	Reifungskinetik der Oozyten bei einer Nocodazolkon- zentration von 12 ng/ml Medium	90
4.7	Nocodazol-induzierte morphologische Veränderungen der Spin- del <i>in vitro</i> gereifter Oozyten	93
5	Diskussion	97
5.1	Welche Rolle spielen die Unterschiede in der Reifungskinetik und Reifungsrate für die Aneuploidie?	98
5.1.1	Vergleich der GVBD-Rate von Oozyten junger und alter CBA/Ca Mäuse	98

5.1.2	Vergleich der Pb-Rate von Oozyten junger und alter CBA/Ca Mäuse	98
5.1.3	Der Einfluss der Superovulation auf die Reifungsrate und Reifungskinetik	100
5.2	Wie kommt es zu den altersabhängigen chromosomalen Aberrationen?	101
5.2.1	Wann sind die ersten chromosomalen Aberrationen zu beobachten?	103
5.3	Gibt es weitere Faktoren die zur chromosomalen Instabilität beitragen?	105
5.3.1	Welche Faktoren beeinflussen die Reifungsgeschwindigkeit; können sie die Chronologie der Reifung stören?	106
5.4	Nocodazol aktiviert einen Kontrollpunkt und verzögert die Reifung der Oozyten	109
6	Anhang	113

Kapitel 1

Zusammenfassung

Die altersabhängige Aneuploidie ist im Menschen schon seit langem bekannt und schon früh beschrieben worden. Obwohl dieses Phänomen schon gut charakterisiert worden ist, sind die Ursachen und Mechanismen, die zur Entstehung chromosomaler Aberrationen beitragen, noch relativ unbekannt. Die außergewöhnliche Entwicklungsgeschichte der weiblichen Keimzellen macht diese Zellen über einen langen Zeitraum anfällig für Schädigungen:

- im Verlauf der Prophase I während der Paarung der Chromosomen und der Rekombination,
- in der langen Ruhephase in der die Zellen im Dictyotän arretiert sind,
- gegen Ende der Ruhephase, wenn sich das Follikel vom Primordialfollikel zum antralen Follikel entwickelt,
- und während der Vollendung der Meiose, wenn sich die Spindel bildet, die Chromosomen segregieren und die Zelle in der Metaphase II erneut arretiert.

In dieser Zeit können exogene und endogene Faktoren zu einer Verminderung der Oozytenqualität führen. In dieser Untersuchung wurde der Zeitraum von der Wiederaufnahme der Reifung bis zum Arrest in der Metaphase II (MII) untersucht. Durch frühe Spreitungen konnte rückwirkend das Rekombinationsmuster während der Prophase I analysiert und potentiell anfällige Muster identifiziert werden. Außerdem sollte die Bedeutung des physiologischen Alters der Spender und die Rolle hormoneller Schwankungen bestimmt werden. Dies wurde in Bezug gesetzt zu den Daten über die Regulation der Reifung während und nach der Wiederaufnahme der Reifung.

In dieser Untersuchung wurde geklärt:

- zu welchem Zeitpunkt der Oogenese bzw. Reifung die chromosomalen Anomalien angelegt werden,

- welchen Einfluss hormonelle Schwankungen auf die Qualität der Oozyten haben,
- ob die chromosomale Reifung mit der zytoplasmatischen Reifung koordiniert ist und
- welchen Einfluss das physiologische Alter der Mäuse hat.

Aus den gewonnenen Daten sollte weiterhin abgeleitet werden, in welchem Umfang sich die CBA/Ca als ein Modellorganismus für die altersbedingte Aneuploidie des Menschen verwenden läßt.

Die CBA/CA Maus zeigt, wie der Mensch, eine altersabhängige Erhöhung der chromosomalen Aneuploidien [53]. In den Oozyten der alten Spender konnte eine signifikant erhöhte Rate hyperploider Zellen beobachtet werden. Eine genaue Untersuchung der Aberrationen zeigte außerdem eine signifikant erhöhte Rate einer ungeraden Anzahl einzelner Chromatiden. Dies ist auch beim Menschen die häufigste Ursache für numerische Chromosomenanomalien und wird hier auf eine fehlerhafte Trennung der homologen Chromosomen während der ersten maternalen Meiose zurückgeführt (reviewed in [48, 49, 74]). Es konnte so erstmals gezeigt werden, daß altersbedingte Fehlverteilungen in der Maus wie auch beim Menschen im Verlauf der M I stattfinden können. Um die Ursache(n) für diese Fehlverteilungen zu klären, wurden die Oozyten einer detaillierten, biochemischen und zytogenetischen Analyse unterzogen. Bei der genauen Charakterisierung der gespreiteten Chromosomen von Oozyten junger und alter CBA/Ca Mäuse konnte eine deutlich erhöhte Rate an Chromatiden beobachtet werden, die nur über terminale Chiasmata miteinander verbunden waren. Diese chromosomalen Konfigurationen sind im humanen System eng mit maternal bedingten Trisomien der Chromosomen 16 und 21 korreliert [88]. Dies war ein weiterer Hinweis, daß es zwischen den altersbedingten, chromosomalen Aberrationen des Menschen und der CBA/Ca Maus deutliche Analogien gibt.

Da der Ablauf des Zellzyklus zeitlich streng reguliert ist und Auskunft über das Vorhandensein von Kontrollpunkten gibt, wurden die Reifungskinetiken der Oozyten junger und alter Mäuse untersucht und mit der Aktivität der beiden reifungsrelevanten Kinasen (Histon HI- und MAP-Kinase) verglichen. In dieser Untersuchung konnte in den Oozyten der älteren CBA/Ca Mäuse erstmals eine Entkopplung der zytoplasmatischen von der chromosomalen Reifung beobachtet werden. Es konnten somit zwei voneinander unabhängige Risikofaktoren identifiziert werden, deren Zusammenwirken für eine altersabhängige Erhöhung der Aneuploidierate verantwortlich sein können.

Um die Rolle hormoneller Schwankungen bei der Entstehung von chromosomalen Fehlverteilungen zu untersuchen, wurden die Mäuse im Diöstrus mit einer geringen Dosis an PMS gespritzt. Es zeigte sich, daß die Rate an euploiden und hyperploiden Oozyten in den superovulierten, jungen Mäusen zunimmt, wohingegen sie sich in den Oozyten der alten, superovulierten

Mäuse nicht signifikant ändert. Es konnte somit gezeigt werden, daß eine vergleichsweise geringe Hormongabe, die nicht zu einer signifikanten Änderung der Zahl gebildeter Follikel führt, nur in jungen CBA/Ca Mäusen zu einer Zunahme an Oozyten mit chromosomalen Aberrationen führt.

Kapitel 2

Einleitung

2.1 Entwicklung weiblicher Keimzellen in Mammaliern

Primordiale Keimzellen sind der Ursprung aller Mammalier, sie sind die Vorläufer der Gameten. Primordiale Keimzellen (engl.: primordial germ cell, PGC) werden sehr früh im Verlauf der Embryogenese determiniert. Sie sind totipotente Zellen die, in Abhängigkeit von ihrer Umgebung, zu Gameten beiderlei Geschlechts differenzieren können. Im Verlauf der frühen Embryogenese (Tag 9,5 bis 11,5) wandern die PGCs zu den Gonadenanlagen. Von dort wandern die Vorläufer der weiblichen Gameten mit dem Keimepithel in die oberflächlichen Rindenschichten des Ovars ein. Ein Teil der sog. Keimballen atrophiert und bildet die Markstränge. Ein anderer Teil bleibt im Cortex erhalten und zerfällt hier in Zellkomplexe, die in der Regel eine Oozyte enthalten (siehe Abbildung 2.1 auf der nächsten Seite). Die weiblichen PGCs treten bei der Maus etwa nach Tag 13,5 in die Meiose ein [25, 163] vorher vergrößert sich ihre Zahl von 100 (Tag 8,5) auf 3000 (Tag 11,5) [241]. Die Oozyte ist von einem einschichtigen, prismatischen Epithel umschlossen und bildet mit diesem das Primärfollikel. Die oben beschriebenen Vorgänge sind für Mensch und Maus gleich und im folgenden werde ich genauer auf die Keimzellentwicklung der weiblichen Maus eingehen.

Die Keimzellendifferenzierung der weiblichen Maus verläuft in zwei klar zu trennenden Phasen. 13,5 Tage nach der Befruchtung haben die primären Keimzellen die letzte, mitotische Teilung durchlaufen, sie werden nun als Oogonien bezeichnet. Die Anzahl gebildeter Oogonien beträgt $2 \cdot 10^5$ bis $4 \cdot 10^5$ und stellt die absolute Menge an Keimzellen dar, die eine weibliche Maus in ihrem Leben bilden wird [240]. Etwa $3/4$ dieser Keimzellen gehen bis zur Geburt wieder durch Apoptose und Atresia von Oogonien und Oozyten verloren [10, 17]. Die übrigen Oogonien treten in die Meiose I (MI) ein und erreichen das Diplotänstadium (Diktyat) bis etwa Tag 5 nach der Geburt. In diesem Stadium arretieren die Zellen. Mit dem Erreichen der Pubertät

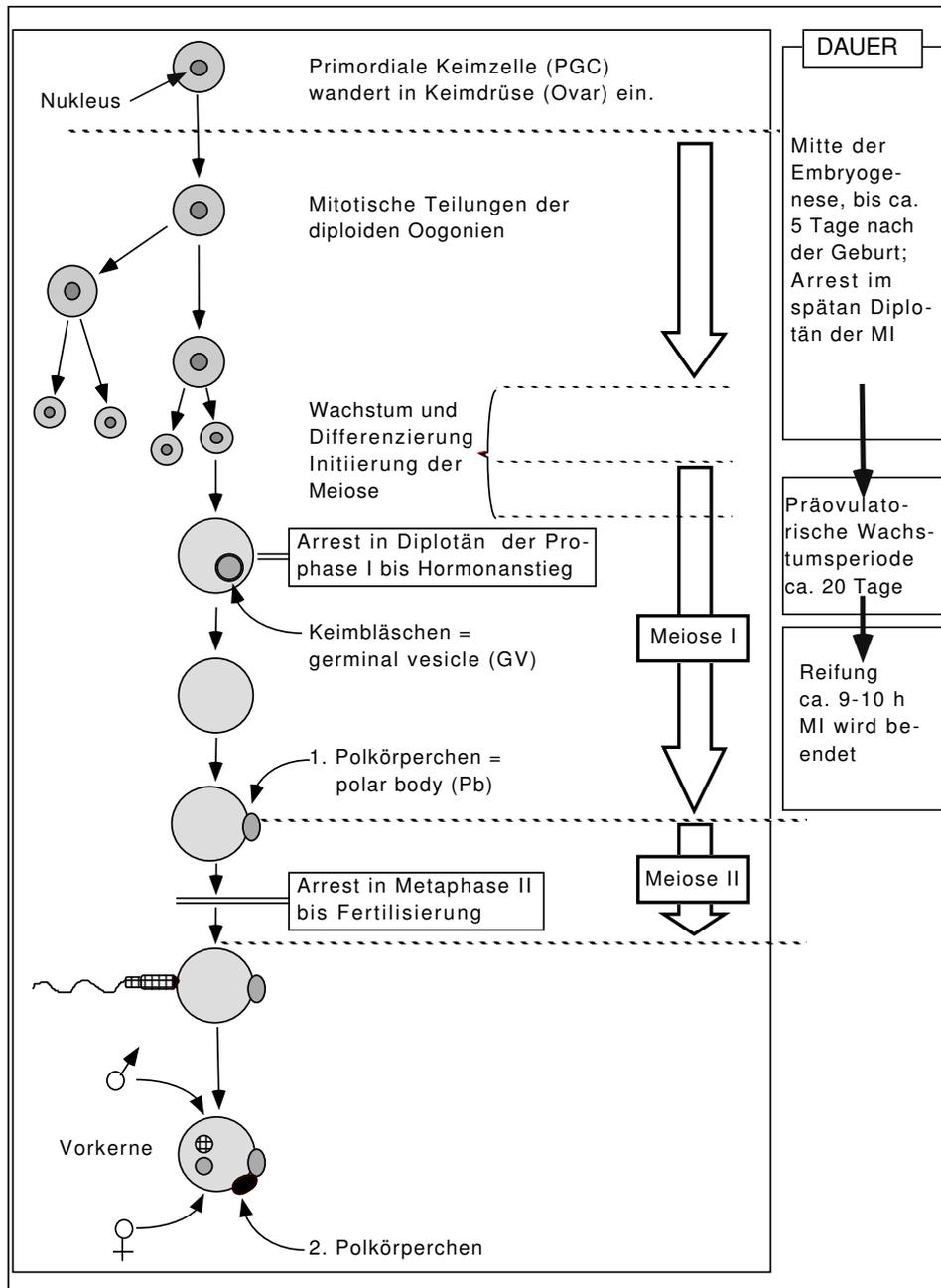


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Ereignisse, die während der Entwicklung der Oozyten in der Maus stattfinden (siehe auch Tabelle 2.1 auf Seite 9)

werden die Ovarien hormonell stimuliert, und einige Oogonien treten in die zweite Phase ihrer Entwicklung, in die Reifung ein. Dies geschieht alle 4 bis 5 Tage bis zu einem Alter von etwa 12 bis 14 Monaten. Die heranreifenden Oozyten bleiben bis kurz vor der Ovulation im Diktyotän. In dieser Zeit verfünffacht sich ihr Durchmesser von etwa $15\mu\text{m}$ auf ungefähr $80\mu\text{m}$. Gleichzeitig proliferieren die Follikelzellen und ihre Zahl erreicht mit ca. $5 \cdot 10^2$ Zellen pro Follikel ihr Maximum.

Die Follikelzellen bilden eine flüssigkeitsgefüllte Hohlkugel, in dessen Innenraum, dem Antrum, die Oozyte heranreift. Die Granulosazellen innerhalb des Follikels erfüllen verschiedene Aufgaben. Sie produzieren und transportieren etwa 85 % der von der Oozyte benötigten Metabolite. Außerdem induzieren sie den meiotischen Arrest (siehe unten) der Oozyte [56]. So wie die Granulosazellen Metabolismus, Wachstum, meiotischen Arrest und die Reifung beeinflussen, werden diese auch durch die Oozyte reguliert. Die Oozyte greift in die Differenzierung und Proliferation der Granulosazellen ein und beeinflusst so die Expansion der Kumuluszellen und somit die Organisation des Follikels.

In Mammaliern ist das Wachstum der präantralen Follikel zumindest in der Anfangsphase unabhängig von extraovariellen, hormonellen Stimuli. Erst später wird das Follikelwachstum durch Hypophysenhormone gesteuert. Daher wird vermutet, daß es in der frühen Phase des Follikelwachstums eine gegenseitige Steuerung des Wachstums der somatischen Zellen und des Gameten geben muß. Diese Interaktion kann direkt über intrazelluläre Brücken (intracellular junctions) oder durch lösliche Faktoren, die auto- oder parakrin wirken, stattfinden [21, 72, 208]. In der Literatur werden drei zellspezifische, lokal produzierte Faktoren beschrieben, die das Wachstum der präantralen Follikel direkt beeinflussen und steuern. Zwei dieser Faktoren sind ein Rezeptor und sein Ligand. Es handelt sich hier um den Rezeptor *c-kit*, eine Tyrosinkinase und den Liganden *steel*. Der Rezeptor wird von Oozyten und der Ligand von den Granulosazellen exprimiert [96]. Unterschiedliche Ansätze, den Rezeptor oder den Liganden zu depletieren (knock out, Injektion von antisense RNA und Antikörpern) zeigten, daß *c-kit* und sein Ligand für alle Stadien des Follikelauswahl (recruitment), des Follikelwachstums und der Differenzierung unerlässlich sind [169, 183, 279]. Der positiven Wirkung auf die Follikelauswahl und das Follikelwachstum dieser beiden Faktoren wird die Wirkung eines weiteren Genproduktes, GDF-9 gegenübergestellt [28, 43]. GDF-9 gehört zu der Superfamilie der TGF- β -Proteine. Der komplette Verlust von GDF-9 (knock out) führt ausschließlich im weiblichen Geschlecht zu Infertilität. Dies ist auf einen Arrest der primären Follikel zurückzuführen. *In vitro*-Kulturen von Follikeln zeigen, daß dieser Arrest sich vor allem auf den somatischen Anteil der Follikel beschränkt und daß das Verhältnis der Oozytengröße zu der Follikelgröße im Vergleich zu den Kontrollen deutlich vergrößert ist. Dieses Missverhältnis beruht einerseits darauf, daß GDF-9 im späteren Verlauf der Reifung für

die Proliferation der Granulosazellen essentiell ist und zum anderen, daß die Oozyten zwar normal reifen und kompetent werden, aber etwas größer sind als die Kontrolloozyten. Neben dieser morphologischen Veränderung wurde beobachtet, daß diese Zellen mit einer deutlich höheren Rate aus dem M II Arrest entkamen und spontan aktiviert wurden. Hervorzuheben ist, daß die drei Faktoren vom Follikel selber produziert werden und das eigene Wachstum und die Reifung koordinieren.

20 Tage nach Beginn der Reifung werden, verursacht durch eine Veränderung des Hormonspiegels, 6 bis 16 Oozyten ovuliert. Die hormonellen Veränderungen, die zur Ovulation führen, lösen gleichzeitig den MI-Arrest der Oozyten. Diese vollenden die erste Reifeteilung, und der erste Polkörper wird gebildet. Die Oozyten reifen bis zur Metaphase der zweiten Reifeteilung (MII), in der sie bis zum Eindringen des Spermiums arretiert sind.

Die in diesem Kapitel beschriebenen Vorgänge der Proliferation, des Arrests, der Apoptose und der Atresie unterliegen externen und internen Kontrollen, die den Zellzyklus der Zellen steuern. Im folgenden Abschnitt werde ich daher auf den Zellzyklus und seine Regulation näher eingehen. Da die meisten Untersuchungen zu diesem Thema an mitotischen Zellen gemacht worden sind, werde ich auf dieses System besonders eingehen und auf die Ähnlichkeiten und Unterschiede zu meiotischen Zellen hinweisen.

2.2 Der Zellzyklus

Jede mitotische Zelle durchläuft bei ihrer Teilung charakteristische Phasen. In der Synthese-Phase (S-Phase) wird die DNA verdoppelt, und in der Mitose (M-Phase) werden die duplizierten Chromosomen getrennt und zu gleichen Teilen auf zwei Tochterzellen verteilt. Diese beiden Phasen werden durch Gap-Phasen (G_1 und G_2) zeitlich voneinander getrennt. Diese Vorgänge sind räumlich und zeitlich genau aufeinander abgestimmt und werden durch Kontrollpunkte (engl. checkpoint) sichergestellt. Die Aufgabe dieser Kontrollpunkte ist es, sicherzustellen, daß aufeinanderfolgende Ereignisse fehlerfrei ausgeführt werden und sich somit bedingen. Diese Kontrollpunkte bestehen aus drei verschiedenen funktionellen Elementen. Die Kaskade beginnt mit der Datenerfassung, hier werden verschiedene Parameter der Zelle gesammelt und ausgewertet. Im nächsten Schritt wird diese Information verstärkt und weitergeleitet. Das letzte Glied in der Kette sind Effektoren, die bei Bedarf in den weiteren Verlauf des Zellzyklus eingreifen können. Dieser Eingriff kann sich unterschiedlich manifestieren. Der Zellzyklus kann vorübergehend unterbrochen werden. Er wird nach einer Erholungsphase, in der die Zelle die Ursache für die Verzögerung beseitigt, wieder aufgenommen. Ist die Ursache für den Arrest nicht zu beheben, kann die Zelle auch durch Apoptose aus dem Zellverband entfernt werden. Auch die Kontrol-

le der Wiederaufnahme des Zellzyklus erfolgt über die oben beschriebenen Elemente (siehe auch 2.2.1.3 auf Seite 21).

Die übliche Abfolge der Zellzyklusphasen wird nur in sehr wenigen Fällen nicht eingehalten. Einer davon ist die Meiose, in deren Verlauf aus diploiden Zellen haploide Gameten entstehen. Hier folgen auf eine Replikation zwei Chromosomensegregationen. In der ersten Reifeteilung, auch Reduktionsteilung genannt (Meiose I), trennen sich die homologen Chromosomen, in der darauf folgenden zweiten Reifeteilung (Meiose II) trennen sich die Schwesterchromatiden. Die entstehenden Zellen werden Gameten genannt

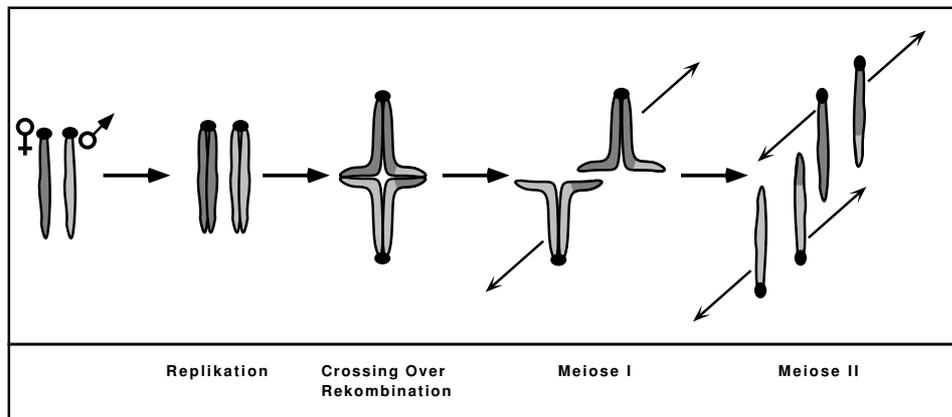


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der chromosomalen Ereignisse während der ersten und zweiten meiotischen Reifeteilung

(siehe Abbildung 2.2). In der ersten meiotischen Reifeteilung kommt es, vermittelt durch Crossing over, zu einer Neukombination der Allele einzelner Chromosomen. Die zweite Reifeteilung entspricht im Gegensatz zur Reduktionsteilung wieder einer normalen, mitotischen Teilung. In den folgenden Abschnitten werden die oben geschilderten Vorgänge genauer beschrieben.

2.2.1 Meiose I und II

2.2.1.1 Charakteristische Veränderungen struktureller Elemente im Verlauf des Zellzyklus

Die Vorgänge während der ersten, meiotischen Reifeteilung werden folgendermaßen untergliedert: Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase. Die Prophase ist dadurch charakterisiert, daß in ihrem Verlauf die Chromosomen kondensieren (Leptotän, Griechisch: leptos = dünn) und sich die homologen, maternalen und paternalen Chromosomen entlang ihrer Längsachse zueinander ausrichten. Die Ausrichtung der Chromosomen wird durch die Bildung des synaptonemalen Komplexes gefestigt (Zygotän, Griechisch: zy-

gos = Paar) und abgeschlossen. Der synaptonemale Komplex wird aus Proteinen gebildet, welche die maternalen und die paternalen Chromatidensätze eines Bivalents miteinander verbinden. Wenn dieser Vorgang abgeschlossen ist, beginnt das Pachytän (Griechisch: pakhus = dick), in dessen Verlauf sich die Chromosomen weiter verkürzen und die Chromosomentetraden bilden, in der eindeutig sichtbar wird, daß jedes Chromosom aus zwei Chromatiden besteht. Im anschließenden Diplotän (Griechisch: diploos = doppelt) geht die enge Konjugation der Chromosomen verloren; sie bleiben aber noch gepaart, und die Stellen, an denen sie über Chiasmata (Griechisch: chiasma = Dachbalken die überkreuz liegen) verknüpft sind, zeigen sich deutlich. Mit dem Auseinanderweichen der homologen Chromosomen (Diakinese, Griechisch: kinesis = Bewegung) ist die Prophase I beendet (siehe auch Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Zusammenfassung der chromosomalen Ereignisse während der Meiose (siehe auch Abbildung 2.1 auf Seite 5)

Stadium	Ereignis*
Reduktionsteilung	
Prophase I	
Leptotän	Die DNA wird repliziert, eine tetraploide Zelle wird gebildet.
Zygotän	Die Paarung homologer Schwesterchromatiden beginnt, und sie formieren sich zu Bivalenten.
Frühes Pachytän	Die Bivalente verkürzen und verdicken sich.
Spätes Pachytän	Die Chromatiden entwinden sich und dekondensieren, die Rekombination ist abgeschlossen.
Diplotän (ArrestI)	Die homologen Chromatidenpaare beginnen sich zu trennen, bleiben aber über die Chiasmata miteinander verbunden.
Prometaphase I	Die Spindel bildet sich, und die Chromosomen werden zwischen den Polen hin- und hergezogen (congression).
Metaphase I	Die Kernmembran (Keimbläschen) löst sich auf, die Transkription wird eingestellt und die Bivalenten sind in der meiotischen Spindel eingeordnet.
Anaphase I	Die Homologen trennen sich.
Telophase I	Der erste Polkörper ist vollständig abgeschnürt, und jedes Kompartiment enthält einen haploiden Chromosomensatz.
2. Reifeteilung	
Prophase II	
Metaphase II	Die Spindel wird gebildet, und die Zelle arretiert

Fortsetzung auf folgender Seite

Fortsetzung von vorheriger Seite

Stadium	Ereignis*
Anaphase II	erneut bis zur Fertilisierung. Die Oozyte wird ovuliert. Die Oozyte wird befruchtet, die identischen Chromatiden werden getrennt und der zweite Polkörper wird abgeschnürt.

*Eine genaue Aufschlüsselung der Ereignisse erfolgt im Text

Eine besondere Bedeutung haben in der Meiose die Chiasmata, sie spielen eine entscheidende Rolle bei der gleichmäßigen Segregation der Homologen auf die Tochterzellen bzw. den Polkörper und die Oozyte. In Spermatozyten von Mäusen konnten Strukturen nachgewiesen werden die den elektronenmikroskopisch sichtbaren Strukturen entlang der homologen Chromosomen von Hefe entsprechen [200]. Von Plug *et al.* konnte gezeigt werden, daß diese Strukturen von Proteinen gebildet werden, die eine entscheidende Rolle bei der Detektion und Reparatur von DNA Strangbrüchen spielen (siehe auch Abschnitt 2.2.1.3.2 auf Seite 29). Es handelt sich bei diesen Strukturen um die Rekombinationsknotenpunkte (recombination nodules). Es werden frühe und späte Rekombinationsknotenpunkte unterschieden. Die Unterscheidung bezieht sich auf ihr Erscheinen im Verlauf der MI. Die Frühen werden im Leptotän und Zygotän sichtbar, die Späten erst im Pachytän [30]. Die Verteilung der späten Rekombinationsknotenpunkte stimmt sehr genau mit der Zahl und der Verteilung der Crossover überein. In der Hefe *S. cerevisiae* beginnt die Bildung von Crossover mit Doppelstrangbrüchen während des Leptotäns. Diese Doppelstrangbrüche werden so modifiziert, daß freie 3'-Enden entstehen. Die Doppelstrangbrüche zweier homologer Chromosomen werden dann stabilisiert, indem die beiden Chromosomen miteinander über die sogenannten doppelten Holliday Strukturen verbunden werden [224, 225, 3].

Nach der Aneinanderlagerung einzelner Abschnitte der homologen Chromosomen, wird der synaptonemale Komplex, eine bandförmige, aus Proteinen bestehende Struktur entlang der Längsachse der homologen Chromosomen, ausgebildet. Der synaptonemale Komplex besteht aus einem zentralen und zwei lateralen Elementen, die direkt mit jeweils einem der Homologen verbunden und über das zentrale Element miteinander verknüpft sind. Diese Verbindung zwischen den Homologen wird im Diplotän und der Diakinese wieder aufgelöst, so daß die Homologen nur noch durch die Chiasmata miteinander verbunden bleiben. Die Crossover und die dazu distal liegenden Komplexe, welche durch reziproken Doppelstrangbruch und anschließende Verknüpfung der homologen Chromosomen erzeugt werden, spielen eine entscheidende Rolle bei der gleichmäßigen Segregation der Homologen auf die Tochterzellen bzw. den Polkörper und die Oozyte. Voraussetzung für eine korrekte Segregation ist, daß die Chiasmata bzw. Crossover nicht vom Ort

der Rekombination distal zum Telomer wandert. Es werden verschiedene Modelle aufgestellt, die erklären sollen, wie dies verhindert wird.

Eine Hypothese besagt, daß Cross over und distal zum Bruchpunkt in direkter Nachbarschaft zum Rekombinationspunkt liegende Komplexe verhindern, daß die Spannung, welche durch den Spindelapparat auf das Crossover ausgeübt wird, zu einer telomergerichteten Verlagerung des Crossovers und somit zu einer vorzeitigen Trennung der Homologen führt.

Eine andere Theorie besagt, daß diese Funktion durch das Axialelement des synaptonemalen Komplexes erfüllt wird. Bisher ist es noch nicht gelungen eine dieser beiden Theorien schlüssig zu belegen. So hat *Aspergillus nidulans* keinen synaptonemalen Komplex und zeigt trotzdem Crossover während der Meiose I [47, 181].

Ein dritte Hypothese postuliert, daß die distal wandernden Chiasmata von Strukturen aufgehalten werden, die in der Telomerregion liegen [46]. Es konnte aber unter anderem von Kanda *et al.* [109] gezeigt werden, daß es in Spermatozyten von Mäusen nicht zu einer distalen Verlagerung von Chiasmata kommt.

Die Anaphase I wird durch die Auflösung der Chiasmata und die Trennung der maternalen und paternalen Homologen eingeleitet, welche dann in die Tochterzellen segregieren. Die Tatsache, daß sich die Homologen und nicht die Schwesterchromatiden voneinander trennen, wurde von Nicklas [173] untersucht. Er konnte in Fusionsexperimenten zwischen MI und MII Spermatozyten von Heuschrecken zeigen, daß sich die meiotischen Chromosomen entsprechend ihres jeweiligen Entwicklungsstandes voneinander trennten. Diese Experimente zeigten, daß die Entscheidung, ob sich die Homologen oder die Schwesterchromatiden voneinander zu trennen haben, ausschließlich mit den jeweiligen Chromosomen assoziiert ist [186]. In *D. melanogaster* konnte von Miyazaki und Orr-Weaver [165] gezeigt werden, daß die Verbindung der Schwesterchromatiden in zwei Schritten gelöst wird. Die Koppelung entlang der Chromosomen wird in der Anaphase I gelöst, wohingegen die Verknüpfung in der Zentromerregion bis zur Anaphase II erhalten bleibt. In *Drosophila* Mutanten konnten zwei Proteine identifiziert werden, die von der späten Prophase (Mei-S332), [114] bzw. der Anaphase I (Cor1) bis zur Anaphase II mit den Zentromeren assoziiert sind. Mutationen in diesen Genen führen häufig zu einer vorzeitigen Trennung der Schwesterchromatiden während der Anaphase I, dies hat chromosomale Fehlverteilungen und genetische Instabilität zur Folge [166]. In *S. cerevisiae* sind die Vorgänge besser geklärt als in den anderen Systemen. Die Schwesterchromatiden sind über sogenannte Kohäsine über ihre ganze Länge miteinander verbunden. Erst wenn diese Verbindung in der Anaphase I aufgelöst wird, weichen die Schwesterchromatiden auseinander [168, 249]. Die Kohäsine sind Proteinkomplexe bestehend aus mindestens vier Proteinen (Smc1, Smc3, Scc1 und Scc3 (sister chromatid cohesion)). In der Meiose I werden die Kinetochorenpaare von Schwesterchromatiden über die Spindel mit demselben Spindelpol

verbunden, wohingegen in der MII die Kinetochore der Chromatiden zu den gegenüberliegenden Polen gezogen bzw. ausgerichtet werden.

Zwei Proteine sind für die geordnete Trennung der Schwesterchromatiden (MI) und der Homologen (MII) notwendig (Smc3 und Rec8). Beide Proteine sind im Verlauf des Pachytäns entlang der gesamten Länge der meiotischen Chromosomen verteilt. Während der ersten meiotischen Teilung konzentriert sich ihre Verteilung auf das Zentromer, um dann während der Metaphase II komplett zu verschwinden. Die Auflösung der Verbindung mit dem Kinetochor korreliert mit der Anaphase II, also mit der Trennung der Schwesterchromatiden. Deletion des *rec8* Gens hat zwei unterschiedliche Effekte: einerseits führt es dazu, daß sich die Verbindung der Schwesterchromatiden am Zentromer schon während der ersten, meiotischen Reifeteilung auflöst. Andererseits verändern sich die Kinetochore so, daß beide Schwesterchromatiden eines homologen Chromosomes durch Spindeln gebunden und in entgegengesetzte Richtung auseinandergezogen werden. [116, 265]. Mutiert man das *Rec8*-Gen so, daß es nicht mehr durch das Separin gespalten werden kann, trennen sich weder die homologen Chromosomen in der MI noch die Schwesterchromatiden in der MII [24]. Die unzeitgemäße Proteolyse der Kohäsine kann also eine Ursache für genetische Instabilität sein. Der Verbleib von Kohäsinen an den Zentromeren wirft die Frage auf, wie die dort lokalisierten Kohäsine vor der Inaktivierung durch Esp1 geschützt werden (siehe auch 2.6 auf Seite 22). Klein *et al.* [116] postulieren, daß Proteine wie das *Drosophila* Mei-S233 Protein diese Aufgabe haben und somit die verfrühte Trennung der Schwesterchromatiden verhindern. In diesem Abschnitt wurde die Bedeutung der Chiasmata und ihre Bildung für eine korrekte Segregation der Chromosomen und damit für die genetische Stabilität eines Organismus erläutert. Bei diesen Vorgängen spielt die gezielte Proteolyse von Proteinen eine entscheidende Rolle bei der Steuerung des Zellzyklus. Ehe ich in Abschnitt 2.2.1.2.3 auf Seite 19 auf die Proteine eingehe, die die Verfügbarkeit wichtiger, struktureller und regulatoriver Elemente des Zellzyklus steuern, möchte ich die eigentlichen Regulatoren bzw. Taktgeber des Zellzyklus vorstellen. Es handelt sich dabei um Proteine die sowohl in der Mitose als auch in der Meiose für das Durchlaufen des Zellzyklus unerlässlich sind.

2.2.1.2 Die Rolle der Proteinkinasen im Verlauf der Meiose

Die Charakterisierung von Faktoren, die den Zellzyklus regulieren, gehen auf Untersuchungen zurück, in denen Zellen fusioniert wurden, die sich in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befanden [106, 161, 207]. In diesen Untersuchungen wurde gezeigt, daß es in späten G₂- bzw. M-Zellen Faktoren gibt, die in der Lage sind, frühe G₂-Zellen in die Mitose zu treiben. Dieses Prinzip wurde **M**aturation **P**romoting **F**actor (MPF) genannt. Nachdem man auch in *Xenopus*oozyten eine solche Wirkung beschrieben hatte, war es

möglich in diesem System nach Faktoren zu suchen, welche die Auflösung des Keimbläschens und die Kondensation der Chromosomen induzieren konnten [161]. Diese Untersuchungen führten schließlich zu der Entdeckung eines MPF [145]. Genprodukte mit dieser Wirkung wurden auch in der Hefe gefunden und als eine besondere Klasse von Kinasen charakterisiert [83, 179]. Die Verknüpfung der Daten aus Hefegenetik, Froschbiochemie und Zellkultur von Säugerzellen konnte zeigen, daß DNA-Replikation und Mitose durch S- und M-Phase spezifische, zyklinabhängige Faktoren induziert werden. Untersuchungen an einer großen Zahl verschiedener Spezies zeigen, daß die Aktivität einer hochkonservierten Serin-Threonin-Kinase den Eintritt sowohl in der Mitose als auch in der Meiose in die M-Phase des Zellzyklus einleitet. Bei dieser Kinase handelt es sich um $p34^{cdc2}$, die Aktivität dieser Kinase wird von einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren reguliert, auf die ich im folgenden näher eingehen werde. $p34^{cdc2}$ und die Homologen verschiedener Spezies sind Phosphoproteine mit einem Molekulargewicht von ca. 34 kDa. Die Kinase-Aktivität wird durch den eigenen Phosphorylierungsstatus (siehe Abbildung 2.3) und die Bindung an Zykline und / oder Inhibitoren reguliert.

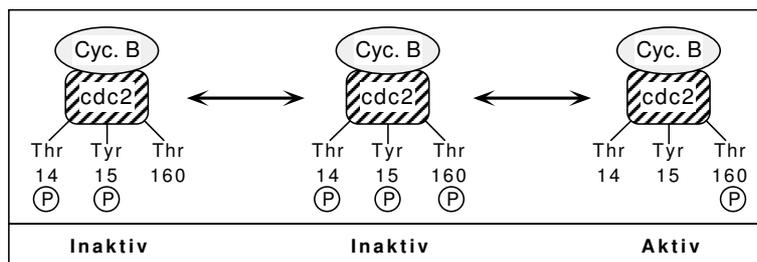


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Kinase-Aktivität von $p34^{cdc2}$ in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsgrad

In Abbildung 2.3 ist die Regulation durch Phosphorylierung schematisch dargestellt. $p34^{cdc2}$ hat drei Phosphorylierungsstellen, deren sequentielle Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung bestimmt, ob der Komplex aus Zyklin und $p34^{cdc2}$ Kinaseaktivität hat. Auf die Komponenten, die diese Modifikationen durchführen, werde ich im weiteren Verlauf genauer eingehen (siehe 2.2.1.2.1 auf der nächsten Seite). Neben der Phosphorylierung des $p34^{cdc2}$ spielt die Kopplung an Zyklin B eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des $p34^{cdc2}$. Zykline wurden ursprünglich darüber definiert, daß sie während jeder Mitose degradiert werden [57]. Mittlerweile ist die Zahl der Familienmitglieder immer größer geworden, und die Definition eines Zyklin wurde insofern präzisiert, als daß die Gemeinsamkeit dieser Proteine eine Zyklin-Box ist [99]. Dieses Motiv ist Voraussetzung für die Bindung an die verschiedenen Zyklin-abhängigen Kinasen (CDK engl.: **C**yclin **D**ependent **K**inase) [99]. Im Gegenzug wurden die CDK's dadurch charakterisiert, daß

es Kinasen sind, welche eine Bindung an ein Zyklin benötigen, um andere Proteine phosphorylieren zu können. Der Komplex aus p34^{cdc2} und Zyklin B heißt MPF, und es handelt sich hierbei um den von Masui schon 1971 [161] identifizierten Faktor. Zyklin B hat in Zellen verschiedene Aufgaben. Einerseits ist seine Bindung an p34^{cdc2} unerlässlich für deren Aktivierung durch Dephosphorylierung (siehe Abbildung 2.3 auf der vorherigen Seite), andererseits bestimmt es die Substrate des MPF [191, 222].

Die Regulation der Verfügbarkeit von Zyklin B wird auf zwei verschiedenen Wegen kontrolliert: die Synthese wird auf transkriptioneller Ebene reguliert [118]. Der Abbau und somit die Inaktivierung des MPF wird durch die APC-vermittelte Ubiquitinierung eingeleitet und die anschließende Proteolyse durch das 26S-Proteasom durchgeführt [68, 91].

2.2.1.2.1 Regulation der MPF Kinaseaktivität durch Phosphorylierungs- Dephosphorylierungsreaktionen an p34^{cdc2}. Neben der Dimerisierung mit Zyklin B spielt der Phosphorylierungszustand des p34^{cdc2} eine entscheidende Rolle für die Kinaseaktivität der katalytischen Untereinheit. In Abbildung 2.4 auf der nächsten Seite ist die Regulation der MPF Aktivität durch die Kinasen Myt1, Wee1 und CAK (Cyclin activating kinase) und die Phosphatase Cdc25-C schematisch dargestellt.

Drei verschiedene Phosphorylierungsstellen werden für die Zyklin-abhängigen Kinasen beschrieben, zwei inhibitorische und eine aktivierende. Die inhibitorischen an Threonin-14 und Tyrosin-15 (humanes cdc2) sind dominant und halten die katalytische Domäne inaktiv (Prä-MPF), bis sie durch die spezifische Phosphatase Cdc25-C dephosphoryliert werden. An diesen Aminosäuren wird cdc2 durch die beiden Kinase Wee1 und Myt1 phosphoryliert. Die Verteilung der beiden Kinasen ist unterschiedlich. Wee1 ist im Nukleus zu finden und phosphoryliert ausschließlich Thr-15. Myt1 phosphoryliert sowohl Thr-14 als auch Tyr-15 und befindet sich am endoplasmatischen Retikulum [89, 122, 189]. Diese beiden Kinasen scheinen redundant zu arbeiten; das Fehlen je einer der beiden Kinasen hat keine Auswirkungen auf den Zellzyklus. Fehlen jedoch beide, gehen die Zellen ungeachtet aller Kontrollpunkte in die Mitose [151].

Die dritte Phosphorylierungsstelle (Thr-167 in *S. pombe*, Thr-161 in *Xenopus* und Thr-169 in *S. cerevisiae*) ist unerlässlich für die Aktivität der Kinase [73] und das Überleben der Zellen. Phosphoryliert wird diese Aminosäure durch eine CDK Aktivierende Kinase (CAK). In *S. pombe* handelt es sich um ein Protein (Cak1p), wohingegen sich CAK in *Xenopus* und dem Menschen aus drei verschiedenen Untereinheiten zusammensetzt [41, 61, 134, 162, 245, 273]: cdk7 (p40^{MO15}) kodiert die katalytische Untereinheit, Zyklin H ist die regulatorische Untereinheit und Mat1 (Ménage à trois) verbindet die beiden Proteine miteinander und aktiviert p40^{MO15} [42, 60, 244]. Für cdk2 konnte gezeigt werden, daß eine Voraussetzung für

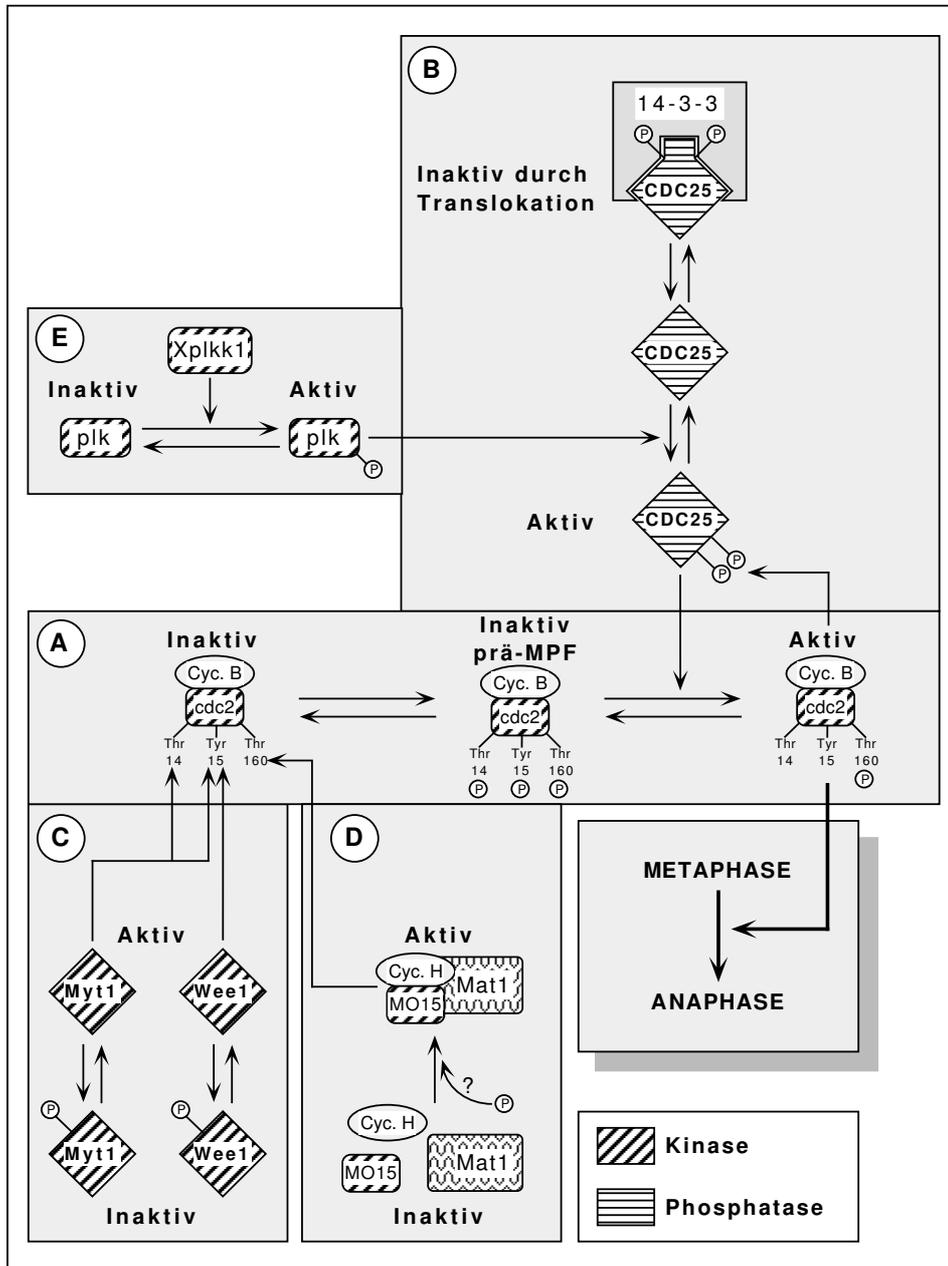


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Regulation des MPF durch die Kinasen Wee1 und Myt1 und die Phosphatase Cdc25-C.

- A. Aktivität des MPF in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand
- B. Dephosphorylierung und damit Aktivierung durch Cdc25-C
- C. + D. Phosphorylierung des $p34^{cdc2}$ durch Wee1, Myt1 und CAK
- E. Phosphorylierung und Aktivierung des CDC25-C durch Plk

die Phosphorylierung von Thr-160 durch CAK die Bindung an Zyklin A ist [216]. Bisher konnte noch nicht eindeutig geklärt werden, ob diese Phosphorylierung einen Einfluß auf die Stabilität der katalytischen Domäne (T-Loop) des Cdk's hat oder, ob sie die Erkennung und Bindung des Substrates regulieren [216, 222]. In Abbildung 2.4 auf der vorherigen Seite ist unter B die Wirkung der Phosphatase Cdc25-C skizziert. Die Aktivität dieser Phosphatase wird ebenfalls durch den eigenen Phosphorylierungszustand reguliert. Phosphorylierung an Ser-216 inaktiviert das Protein und markiert es für die Bindung an ein Mitglied der 14-3-3 Proteinfamilie, welches in der Hefe und *Xenopus* als nukleäres Exportsignal fungiert [125, 147, 192]. Eine andere Kombination von Phosphorylierungen aktiviert die Phosphatase, und diese dephosphoryliert cdc2 an Tyr-15 und Thr-14 und aktiviert so den MPF [132].

Die Aktivierung des MPF hängt direkt von der Dephosphorylierung der Aminosäuren Tyr-15 und Thr-14 durch cdc25-C ab. Es gibt drei verschiedene cdc25-Gene: cdc25-A, cdc25-B und cdc25-C, sie sind untereinander auf Aminosäureebene zu etwa 50 % homolog.

cdc25-A ist für die G₁/S Transition wichtig und wird cdk2/Zyklin E abhängig aktiviert [105]. Diese Aktivierung ist Teil einer positiven Rückkopplungsschleife, in der sich cdk2/Zyklin E und cdc25-A gegenseitig aktivieren [94].

CDC-25-C ist für den G₂/M-Übergang notwendig, es dephosphoryliert cdc2/Zyklin B, und auch hier kommt es zu einer positiven Rückkopplung zwischen der Aktivierung des MPF (durch Dephosphorylierung von cdc2 an Tyr-15 und Thr-14) und der Aktivierung des cdc25-C [93]. Aktiviert wird cdc25-C unter anderem von der Kinase plk1 (**p**olo like **k**inase) und bildet mit ihr eine positive Rückkopplungsschleife [1], in die auch der MPF einbezogen wird [185]. Cdc25-B und Cdc-25C wird noch durch verschiedene andere Kinasen im Zusammenhang mit Zellzyklus-Kontrollpunkten reguliert (p38 und Chk1) [23]. Cdc-25-C wird im Verlauf der Spermatogenese in späten Pachytän-Diplotän Spermatozyten und in runden Spermatischen exprimiert. Das dritte Mitglied der cdc25 Genfamilie, **cdc25-B** kann in drei verschiedenen Splice-Varianten auftreten [11]. Im Verlauf der S-Phase wird cdc25-B aktiv und dephosphoryliert cdc2, welches an Zyklin A gebunden ist. In der G₂-Phase verschiebt sich die Substratspezifität zu cdc2/Zyklin B noch bevor cdc25-C aktiv wird, und es wird von Lammer *et al.* postuliert, daß die initiale cdc25-B Aktivität für den Eintritt in die Mitose und die Aktivierung des cdc25-C durch cdc2/Zyklin B notwendig sei [129].

Im Verlauf der Oogenese und Reifung wird cdc-25-B in wachsenden Oozyten und in Granulosazellen exprimiert. In Granulosazellen wird außerdem noch cdc-25-C exprimiert [274]. Beide Substrate des cdc-25-B sind zu diesem Zeitpunkt vorhanden; cdc2/Zyklin A wird kurz vor cdc2/Zyklin B aktiviert und es konnte gezeigt werden, daß der Komplex aus cdc2/Zyklin A vor cdc2/Zyklin B dephosphoryliert und somit aktiviert wird [184].

2.2.1.2.2 Regulation der MPF Kinaseaktivität durch die Bindung an Cdk-Inhibitoren Im letzten Abschnitt wurde beschrieben wie die Kinaseaktivität der verschiedenen Cdk/Zyklus-Komplexe durch Phosphorylierungs-Dephosphorylierungsreaktionen reguliert wird. In diesem Abschnitt geht es um die Wirkungsweise von Faktoren, die an die Cdk's bzw. den Komplex aus Cdk und Zyklus binden und so die Kinaseaktivität des Cdk's inhibieren. Zwei Proteinfamilien sind bekannt, deren Mitglieder sowohl die aktive Kinase als auch deren Aktivierungsprozess inhibieren können. In Tabelle 2.2 sind die beiden Gruppen von Zellzyklusinhibitoren aufgelistet.

Tabelle 2.2: Zyklus-abhängige Kinasen, Zyklone und Zyklus abhängige Inhibitoren der Kinasen (CKI's) zu verschiedenen Zeiten im Zellzyklus

Zell-Zyklus-phase	Cdk	Zyklus	CKI ^a	
			CIP/KIP ^b	INK ^c
G ₁	Cdk4,6	Zyklus D	p21 ^{Cip1} , p27 ^{Kip1} p57 ^{Kip2}	p15 ^{Ink4B} , p16 ^{Ink4A} p18 ^{Ink4C} , p19 ^{Ink4D^d}
G ₁ /S	Cdk2	Zyklus E	p21 ^{Cip1} , p27 ^{Kip1}	
S	Cdk2	Zyklus A	p21 ^{Cip1}	
G ₂ /M	Cdc2	Zyklus B	p21 ^{Cip1}	
M	Cdc2	Zyklus A, B		

^a Cyclin Dependent Kinase Inhibitor

^b Cdk Inhibitory Protein / Kinase Inhibitory Protein

^c Inhibitor of CDK4

^d p19^{Ink4D} = ARF (alternate reading frame)

Mitglieder der KIP-Familie binden und inhibieren den aktiven Komplex aus Cdk und Zyklus. Ihnen gemeinsam ist eine N-terminale Domäne, mit der sie an cdk-Zyklus Komplexe binden und diese inhibieren. Für p21^{Cip1} und p57^{Kip2} konnte darüberhinaus C-terminal eine Domäne identifiziert werden, die eine für die G₁/S Zellzyklusinhibition notwendige Bindungsstelle für PCNA (**P**roliferating **C**ell **N**uclear **A**ntigen) bildet. Diese Klasse von Inhibitoren bindet an den präformierten Komplex aus Cdk und Zyklus und verhindert eine effiziente Bindung des ATP Substrates [190]. Funktionell bildet p27^{Kip1} eine Ausnahme, da es die Proteolyse von Zyklus A durch eine Protease (Tsap, engl.: **p**Twenty-seven **a**ctivated **p**rotease) induziert [14]. Die Mitglieder der KIP-Familie können, neben ihrer Funktion als Inhibitoren aber auch eine aktivierende Funktion ausüben. Sie sind in der Lage, Zyklus D-abhängige Cdk's in ihrem Komplex mit Zyklus D zu stabilisieren und deren Transport in den Kern zu vermitteln. Unter bestimmten Umständen führt dies zur Phosphorylierung des Retinoblastom- Proteins (**Rb**). Das Rb-Protein wird als transkriptioneller Repressor inaktiviert, und G₁/S relevante

Proteine werden transkribiert. Somit fungieren zumindest die Mitglieder der KIP-Familie nicht in jedem Fall als Zellzyklusinhibitoren [33, 127].

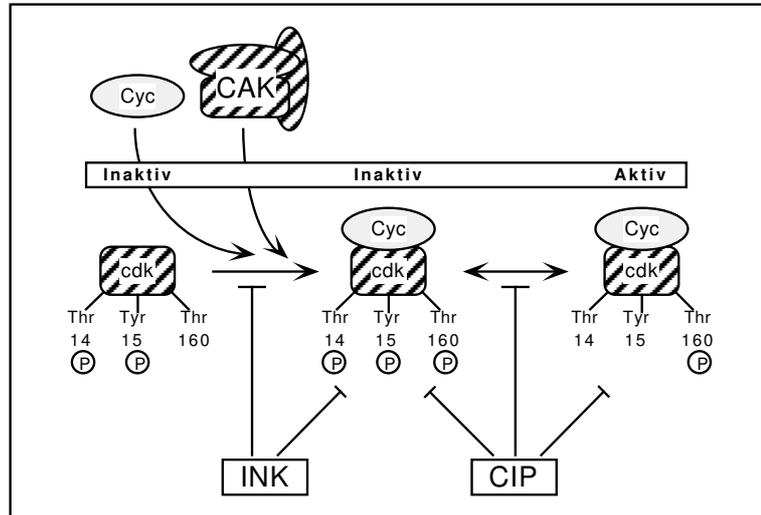


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Regulation der Kinaseaktivität der CDKs. Die Aktivitätsbezeichnungen des Cdk-Zykluskomplexes beziehen sich auf die Aktivität in Abwesenheit der Inhibitoren.

Die Affinität der unterschiedlichen Zyclin/Cdk Komplexe ist nicht für alle KIP's gleich; so bindet ein Komplex von Cdk4/Zyclin D p27^{Kip1} deutlich effizienter als Cdk2/ Zyclin E oder A. Dies kann zu einer Regulierung der Verfügbarkeit des Inhibitors beitragen, ohne die Kinase-Aktivität des Cdk4/Zyclin D Komplexes zu beeinflussen, da dieser Komplex auch in der Bindung mit p27^{Kip1} noch aktiv sein kann [33]. Die Halbwertszeit der KIP-Familienmitglieder beträgt 30 bis 60 Minuten. Ihre Stabilität wird durch Phosphorylierung reguliert, und sie werden Ubiquitin-vermittelt degradiert [264].

Die **INK**-Familie besteht aus vier Mitgliedern; diese können sowohl freies Cdk binden und die Assoziation mit Zyclinen verhindern als auch an fertige Cdk-Zykluskomplexe binden und deren Kinaseaktivität unterbinden. Die Mitglieder der INK-Familie inhibieren spezifisch G₁-Phase CDKs.

Die verschiedenen Möglichkeiten, wie die Inhibitoren mit den CDK's und den dazugehörigen Komplexen aus CDK und Zyclin interagieren, sind in Abbildung 2.5 gezeigt. Die inhibierende Wirkung der Mitglieder der INK-Familie (p16^{INK4a}) ergibt sich aus der Fähigkeit cdk4 und cdk6 zu inhibieren, dies führt zu einer Hypophosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (**Rb**). Die Bindung des RB-Proteins an E2F wird durch den Phosphorylierungszustand des RB gesteuert. Hypophosphoryliertes RB bindet an E2F, und inhibiert so dessen transkriptionelle Aktivität. Wird das Retinoblastom

Protein phosphoryliert entläßt es den Transkriptionsfaktor E2F und dieser wird aktiv. Somit führt eine Inhibition der RB phosphorylierenden Kinasen (cdk4 und cdk6) zu einer Verringerung der RB Phosphorylierung und zur Repression der E2F gesteuerten Gene, die für den G₁/S Übergang notwendig sind [45].

Über die Rolle von Cdk-bindenden Zellzyklusinhibitoren in der Meiose ist wenig bekannt. In Untersuchungen der Spermiogenese von Ratten konnte gezeigt werden, daß p21^{Cip1} in primären Spermatozyten während des Pachytäns und in runden Spermatiden exprimiert wird. Diese Expression wird hochreguliert, wenn die Ratten bestrahlt werden [268]. Für die Maus konnte in Untersuchungen von atm-knock-out Tieren gezeigt werden, daß p21^{Cip1} in Spermatozyten hochreguliert wird und diese nur bis zum Pachytän reifen [13]. Zumindest in der Spermatogenese scheinen also Mitglieder der KIP Familie als Reaktion auf Bestrahlung hochreguliert zu werden und sind am Arrest dieser Zellen beteiligt.

In diesem und dem vorangegangenen Abschnitt wurde erläutert, wie Aktivität der Kinasen im Verlauf des Zellzyklus durch die Bindung an Inhibitoren bzw. durch den Phosphorylierungsgrad einzelner Proteine reguliert wird. Eine weitere Möglichkeit, wie der Zellzyklus reguliert werden kann, besteht darin, bestimmte Protein gezielt für die Proteolyse zu markieren, diese dann aus dem funktionellen Verband zu entfernen und somit ihre Verfügbarkeit zu kontrollieren. Im folgenden Abschnitt werden die Proteine, die an der Regulation der Proteolyse beteiligt sind, vorgestellt. Sie regulieren sowohl in der Mitose als auch in der Meiose die Verfügbarkeit wichtiger, struktureller und regulativer Elemente des Zellzyklus.

2.2.1.2.3 Ubiquitinierende Systeme: Der Anaphase Promoting Complex (APC) und der SCF Voraussetzung für die Metaphase-Anaphase-Transition ist die Proteolyse bestimmter Proteine und die Aktivierung dieser Prozesse durch die ubiquitinierenden Systeme. Die Enzymkomplexe, die für diese Depletion verantwortlich sind, können durch ein Überangebot an Zyklin B blockiert werden [237]. Jedoch ist Zyklin B nicht das ausschließliche Ziel dieser Maschinerie, da die Überexpression eines undegradierbaren Zyklin B nicht zu einem Arrest führt [95]. Die Proteolyse von Proteinen über den Ubiquitinweg ist ein Zweischritt-Mechanismus. Im ersten Schritt muß das Protein ubiquitiniert und im zweiten Schritt durch das 26S-Proteasom degradiert werden [68, 91]. Der erste Schritt dieser Kette, die Markierung mit mehreren Ubiquitin-Molekülen, läßt sich in drei weitere Schritte unterteilen: Zu Beginn dieser Reaktion wird das Ubiquitin durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 aktiviert. Das aktivierte Ubiquitin wird anschließend auf ein Trägerprotein übertragen (E2 oder UBC, engl.: **Ubiquitin Conjugating Complex**). Das eigentliche Endsubstrat der Ubiquitinierung ist an eine Ligase (E3) gekoppelt, welche das aktivierte Ubiquitin

auf das Zielprotein überträgt und es so für das 26S-Proteasom kenntlich macht [35]. E3 ist eine Gruppe verschiedener Proteine, die aneinander gebunden sind und bei der Substraterkennung von entscheidender Bedeutung sind. E3 bestimmt, wann welche Proteine ubiquitiniert werden und hat dadurch eine Schlüsselfunktion bei der Erkennung der Substrate für die Ubiquitinierung. Bisher sind zwei verschiedene E3-Komplexe beschrieben worden: Der **Anaphase Promoting Complex (APC)** und der **SCF**.

Der **SCF** ist nach den verschiedenen Proteinen bzw. Proteinkomplexen benannt, aus denen er sich zusammensetzt: **Skp1**, **Cdc53/Cullin** und **Skp1/F-box-Motiv Protein-Komplex**. In diesem Komplex bindet Skp1 über das F-Box Motiv an ein F-Box Protein, diese beiden werden durch Cdc53/Cullin mit E2 (**cell division control**) verknüpft. Eine große Zahl verschiedener F-Box-Proteine ist beschrieben, diese fungieren als Rezeptoren für die verschiedenen Substrate, welche ubiquitiniert und dadurch für das Proteasom kenntlich gemacht werden sollen [196].

Ein weiterer Proteinkomplex, der sich vom SCF unterscheidet, reguliert die Ubiquitinierung verschiedener Proteine, deren anschließende Proteolyse für den weiteren Verlauf des Zellzyklus wichtig sind: der **APC**. Der APC oder auch Cyclosom ist ein Komplex, der beim Menschen aus mindestens zehn verschiedenen Proteinen besteht [197] und die drei oben beschriebene Schritte der Ubiquitinierung in sich vereint [280, 282]. Das 26S-Proteasom besteht aus drei Untereinheiten, deren Komplexierung ATP-abhängig ist. In diesem Komplex verbinden sich die katalytische Domäne (20S) mit zwei regulatorischen Komplexen (19S). Dieses Heterotrimer erkennt, von einer Ausnahme abgesehen, spezifisch Ubiquitin-markierte Proteine und degradiert diese. Die oben beschriebene, APC-bestimmte Markierungs- und Proteolysemaschinerie ist während der S-, G₂- und frühen M-Phase inaktiv. In dieser Zeit können die mitotischen Zykline akkumulieren und die Schwesterchromatiden sich aneinander heften.

Die Auswahl, wann welche Proteine durch das APC markiert werden sollen, erfolgt durch Phosphorylierung von APC-Bestandteilen durch Cdk1/Zyclin B und Plk1 (**polo like kinase**) und Aktivatoren, die an den APC binden und ihn lenken [123, 198, 235]. Zwei verschiedene Proteine sind in *S. pombe* und *S. cerevisiae* identifiziert worden, die als Lotsen für den APC fungieren. **I. Cdc20** (Säuger-Homolog ist p55Cdc, *Xenopus*-Homolog ist Fizzy (Fzy)) vermittelt die Proteolyse des Anaphase-Inhibitors Pds1 (**precocious division of sister chromatids**) [37]. **II. Hct1** (Cdh1, fizzy-related) vermittelt die Proteolyse der Zykline vom B-Typ während der G₁ Phase [104, 223, 258]. Pds1 ist notwendig, um die Verbindung der Schwesterchromatiden aufrecht zu erhalten, da es einen Anaphase-initiiierenden Faktor bindet (Esp1), der die Schwesterchromatiden voneinander trennt [66, 80, 276]. Durch die Lotsenfunktion von Cdc20 wird die Proteolyse eines essentiellen Faktors (Pds1) eingeleitet, dessen Verschwinden, unter bestimmten Umständen, kausal mit der Metaphase-Anaphase-Transition verbunden ist [249]. In Abbildung 2.6

auf der nächsten Seite ist die Funktion von Pds1 als Inhibitor des Separins Esp1 in *S. cerevisiae* schematisch dargestellt. Pds1 reguliert in *S. cerevisiae* sowohl den Eintritt in die Anaphase, indem es das Separin Esp1 bindet und inaktiviert (siehe 2.6 auf der nächsten Seite), als auch den Austritt aus der Mitose, indem es die Dephosphorylierung und somit Aktivierung des APC-Lotsen Cdh1 (Hct1) reguliert [38]. Aus Untersuchungen in Säugerzellen ist bekannt, daß Hct1 durch Cdk1/Zyklin B phosphoryliert und dadurch inaktiviert werden kann [142, 281]. Es ist nicht bekannt ob Hct1 auch in Oozyten durch den aktivierten MPF reguliert wird.

Welche Rolle spielen die Mitglieder der Mad- und Bub- Familie in diesem Netzwerk? Im Folgenden wird kurz erläutert, daß die Bindung von Mad2 oder Bub2 an den jeweiligen Lotsen des APC die Aktivierung und das Targeting des Komplexes aus Lotse und APC verhindert und dadurch die Degradation des Substrates unterbindet. In *S. cerevisiae* und Säugerzellen konnte gezeigt werden, daß die Bindung von Mad2 oder Bub2 an die jeweiligen Lotsen entweder die Proteolyse von Pds1 (Mad2 bindet Cdc20 [152]) oder die Proteolyse von Zyklin B (Bub2 bindet Hct1 (Cdh1)) verhindern kann [2]. An den beiden ubiquitinierenden Systemen greifen die Regulationsmechanismen, die den Austritt aus der Mitose regulieren an. Dies geschieht über die Steuerung der Verfügbarkeit der Lotsen (Cdc20, Cdh1) und / oder die Bindung inhibierender Faktoren (Mad1, 2, 3 und Bub2) an Cdc20 gebundenes APC (APC^{Cdc20}) oder an Cdh1 gebundenes APC (APC^{Cdh1}) [2] (siehe auch ‘Spindelkontrollpunkte’ 2.2.1.3.1 auf Seite 23). Der in diesem Abschnitt besprochene Mechanismus der Zellzyklusregulation durch die Proteolyse von Schlüsselproteinen gewährleistet, daß der Zellzyklus immer nur in einer Richtung durchlaufen wird.

2.2.1.3 Zellzykluskontrollpunkte

Die bisher beschriebene Abfolge der einzelnen Zellzyklusphasen läuft, sofern sie nicht durch äußere Einflüsse gestört wird, kontinuierlich ab. Die einzelnen Phasen bedingen sich gegenseitig, indem entweder der Eintritt in die nächste Phase aktiv inhibiert wird und/oder Aktivatoren für den Eintritt in die nächste erst verfügbar sind, wenn die vorherige Phase abgeschlossen ist. So ist die geordnete Abfolge der einzelnen Phasen gewährleistet. Erst wenn das System oder einzelne Bestandteile des Systems gestört werden, wird eine übergeordnete Instanz aktiviert, die in der Lage ist, den Zellzyklus anzuhalten. Diese Zellzykluskontrollpunkte (engl.: checkpoint) bestehen aus drei Elementen, die in Abbildung 2.7 auf Seite 23 schematisch dargestellt sind. Das erste Element hat sensorische Aufgaben, es muß die Ursache bzw. die Folge für eine Störung des Zellzyklus wahrnehmen. Das zweite Element leitet diese Information weiter und verstärkt sie, das Dritte muß in der Lage sein, den Zellzyklus reversibel anzuhalten. In der darauffolgenden Pause wird geklärt, ob die Zelle den entstandenen Schaden kompensieren oder reparieren

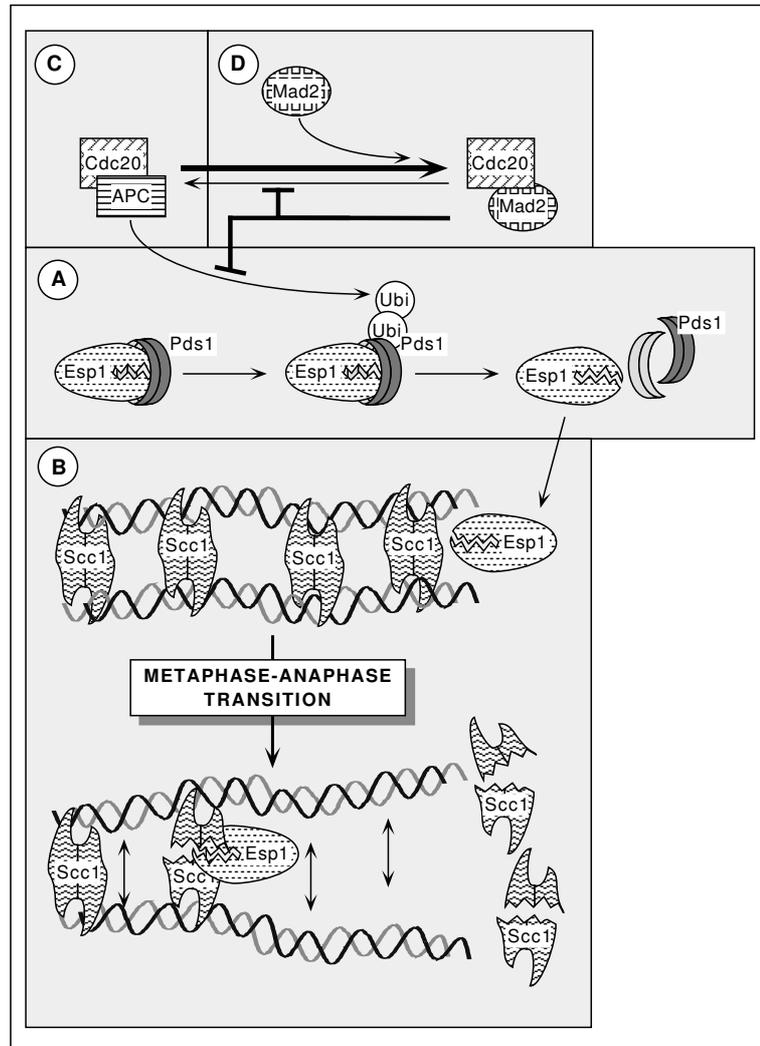


Abb. 2.6: Die Funktion von Pds1 als Inhibitor des Separins Esp1 in *S. cerevisiae* und dessen Bedeutung für die Metaphase-Anaphase Transition
 A. + C. Inhibition des Separins Esp1 durch Pds1 und dessen Inaktivierung durch APC vermittelte und Cdc20 gesteuerte Ubiquitinierung
 B. Trennung der Schwesterchromatiden nach Proteolyse des Cohesins Scc1 durch Esp1
 D. Mad2 reguliert die Verfügbarkeit des APC-Lotsen Cdc20

kann. Sind beide Bedingungen erfüllt, kann die Zelle den Zellzyklus wieder aufnehmen, ist der Schaden irreparabel, wird die Zelle über Apoptose aus dem Zellverband entfernt. Dieser Regelmechanismus besteht also aus einem sensorischen Element, einem Verstärker und einem Effektor, der sowohl in den Zellzyklus eingreifen als auch die Reperaturmaschinerie induzieren bzw. den obligaten Apoptoseweg inhibieren kann [136]. Im folgenden werde ich auf zwei Kontrollpunkte näher eingehen: den Spindelkontrollpunkt und den DNA- oder Chromosomenkontrollpunkt.

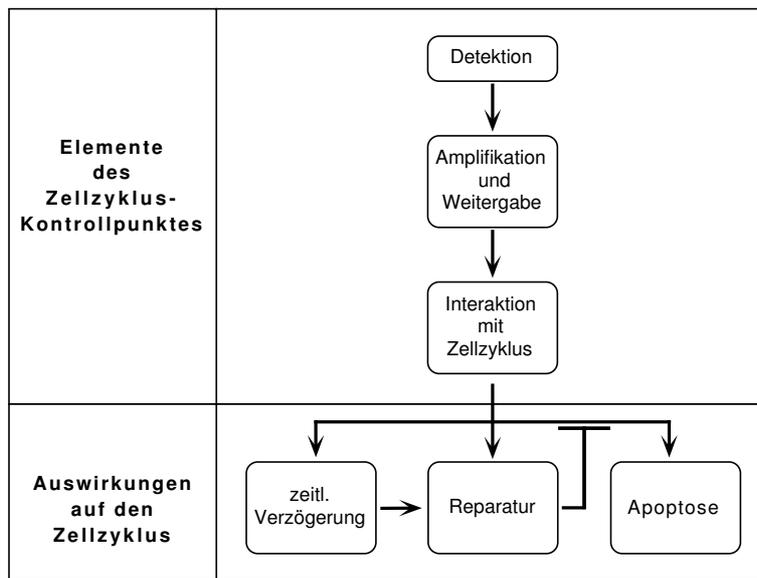


Abb. 2.7: Darstellung der drei Grundelemente eines Zellzykluskontrollpunktes

2.2.1.3.1 Der Spindelkontrollpunkt Die unbalancierte Segregation von Chromosomen während der Meiose ist eine Ursache für chromosomale Fehlverteilungen in Oozyten. Eine Ursache für dieses Phänomen kann eine fehlerhafte Verbindung zwischen den Kinetochoren und der Spindel sein. Die fehlerfreie Anheftung der Spindel an die Kinetochore wird sowohl in der Meiose wie auch in der Mitose durch den Spindelkontrollpunkt sichergestellt [5]. Der Spindelkontrollpunkt stellt eine funktionelle Verbindung zwischen der Anheftung der Mikrotubuli und dem Kinetochor her. Er erzeugt ein Signal, welches den Zellzyklus arretiert, bis alle Chromosomen korrekt mit den Mikrotubuli verbunden sind. Auf die Proteine, die an diesen Prozessen beteiligt sind, wird in dem folgenden Abschnitt eingegangen werden. Die hier beschriebenen Mechanismen werden sowohl in der Mitose als auch in der Meiose genutzt um eine fehlerfreie Segregation der Chromosomen sicherzu-

stellen.

Eine Besonderheit der meiotischen Spindel ist das Fehlen von Zentriolen [238]. Gruppen von MTOCs (**m**icro**t**ubule **o**rganizing **c**enters) bilden hier die Spindelpole [157]. Nach der Wiederaufnahme der Meiose (MI) vergehen etwa 2 Stunden bis eine bipolare Struktur erkennbar ist. Hierfür ist eine Aktivierung der MAPK und **P**rotein **P**hosphatase 2A (PP2A) unerlässlich [149]. Innerhalb der nächsten 2 Stunden werden die Chromosomen in der Äquatorialebene hin- und hergezogen (congression). Die Chromosomen sind über ihre Arme mit den Spindeln verbunden, und es sind noch keine Kinetochorfasern ausgebildet. Nach Ablauf weiterer 3 bis 4 Stunden sammeln sich die Chromosomen in der Äquatorialebene, stabile Verbindungen der Kinetochore mit den Spindeln bilden sich jedoch erst kurz vor der Abschnürung der Polkörperchen aus. Das Timing dieses Vorganges wird durch die Reifung der Kinetochore bestimmt und wird vermutlich durch posttranslationale Veränderungen von Kinetochorkomponenten gesteuert [204]. Im Verlauf weniger Minuten werden die Schwesterchromatiden getrennt und der erste Polkörper abgeschnürt [20].

Neben der Bedeutung von Crossovers und Chiasmata für eine fehlerfreie Segregation (siehe Kapitel 2.3 auf Seite 37) der Chromosomen spielt die bipolare Ausrichtung der Chromosomen zwischen den Spindelpolen eine wichtige Rolle. Diese wird durch die Anheftung der beiden Kinetochore während der Prometaphase an die gegenüberliegenden Pole des Spindelapparates erreicht. Für die Bildung der Spindel ist, zumindest in der Mitose, die lokal begrenzte Aktivität einer GTPase (Ran) notwendig. Sie wird erreicht durch die Aktivierung des chromatinassoziierten GDP/GTP Austausch-Faktors RCC1 [29]. Wenn die Kinetochore mit dem Spindelapparat verbunden sind, werden die Bivalente in der Meiose zwischen den beiden Spindelpolen hin und herbewegt (congression), ehe sie sich endgültig in der Metaphaseplatte ausrichten. Für die Congression und die Ausrichtung in der Metaphaseplatte ist das Kinesin CENP-E unerlässlich. CENP-E erhält die Verbindung zwischen dem Kinetochor und dem sich dynamisch auf- und abbauenden Plus-Ende der Mikrotubulie aufrecht. Die zum Plus-Ende gerichtete Bewegung des CENP-E gewährleistet eine Bewegung, die weg von den Polen hin zur Metaphaseplatte gerichtet ist [156, 220]. Die Verknüpfung des Kinetochors mit der Spindel erreicht erst ihre endgültige Festigkeit, wenn das System unter mechanische Spannung gebracht wird. Dies gewährleistet, daß die Kinetochore eines Bivalents (in der MI) oder eines Univalents (in der MII) sich an entgegengesetzte Spindelpole anheften [175]. In der Mitose wird in dieser Phase sowohl die Verbindung der Spindel mit dem Kinetochor [266] als auch die Funktionalität dieser Verbindung geprüft, indem ein weiterer Kontrollpunkt die Beständigkeit gegen mechanische Spannung sicherstellt [138, 174]. Sind alle Kinetochore fest mit Mikrotubuli verknüpft, wird das Signal, welches den Zellzyklus angehalten hat, abgeschaltet, und die Zellen gehen nach einem sehr genau geregelten Zeitintervall in die Anaphase.

Ein einzelnes, freies Zentromer verzögert in der Hefe nicht nur die Auflösung des synaptonemalen Komplexes der in der Metaphase Platte ausgerichteten Homologen, sondern es verhindert auch die Proteolyse von Zyklin B und die Zytokinese. Der Kontrollpunkt ist an den Kinetochoren lokalisiert. Dies konnte von Rieder *et al.* [209] gezeigt werden, indem er das freie Zentromer eines einseitig angehefteten Chromosoms mit einem Laserstrahl zerstörte. Diese Manipulation hob den Block auf, und die Schwesterchromatiden trennten sich, und die Zellen (PtK) beendeten die Mitose. Im Verlauf der Mitose ist die Zelle zu jedem Zeitpunkt empfindlich gegen Störungen der Spindel-funktionen. Die Meiose unterscheidet sich hier von der Mitose, Brunet *et al.* konnten zeigen, daß Störungen der Spindelintegrität erst in der späten Prometaphase der Meiose I zu einer Verzögerung der Reifung führen [20]. In der Mitose wird eine funktionelle Verbindung zwischen der Spindel und dem Kinetochor ausgebildet, sobald die Kernhülle aufgelöst wurde. Anschließend werden die Chromosomen in der Metaphaseplatte angeordnet, um dann in der Anaphase getrennt zu werden. Die Dauer der M-Phase wird durch diesen Vorgang bestimmt [211]. In der Meiose verweilt die Oozyte noch einige Stunden, ehe sie eine Spindel ausbildet, und es vergehen weitere Stunden ehe in diese Spindel Chromsomen einsortiert werden.

Der Spindel-Kontrollpunkt versagt, wenn unter anderem die Genprodukte der Mad (**mitotic arrest defective**) und Bub (**budding uninhibited by benomyl**) Familie fehlen. Mitglieder dieser beiden Genfamilien, die in verschiedenen Spezies beschrieben worden sind, [32, 59, 80, 182] sind ein Teil des Spindelkontrollpunktes. Bub1 und Bub3 (Maus, Mensch) und Mad2 (Mensch, *Xenopus*) sind in der Pro- und Prometaphase an den Kinetochoren lokalisiert und bleiben dort, bis alle Chromsomen in der Metaphaseplatte ausgerichtet sind [246, 247]. Wird die Anheftung der Spindel oder die Ausrichtung der Chromosomen in der Metaphaseplatte gestört (lagging chromosomes), verbleiben Bub1, Bub3 und Mad2 am Kinetochor bis die Kinetochore fest mit der Spindel verbunden- bzw. die Chromosomen in der Metaphaseplatte eingeordnet sind [32, 107, 140, 160]. Bub1 und BubR1 sind Proteinkinasen, die Bub3 binden und phosphorylieren können [213] und die Bindung am Kinetochor direkt vermitteln [246]. Mad1 kann Mad2 binden und wird von Mps1 (**monopolar spindle**) phosphoryliert, wenn die Spindel gestört ist [80, 81, 267]. Überexpression von Mps1 führt in Anwesenheit von morphologisch intakten Spindeln zum Arrest der Zellen [81]. Wie oben schon erwähnt, sind in der Hefe sowohl Mad1, 2 und 3 als auch Bub1, 2 und 3 nötig, um die Zelle in der Präanaphase zu arretieren, wenn die Spindel gestört ist. Eine Verbindung zwischen den Mechanismen, die die Metaphase-Anaphase-Transition einleiten und dem Spindelkontrollpunkt (siehe 2.2.1.3.1 auf Seite 23) besteht darin, daß die Cdc20 Homologen (in *S. pombe* und *S. cerevisiae*, *Xenopus*, *Drosophila* und im Menschen) mit Mitgliedern der Mad Familie interagieren und zusammen an den APC binden, diesen inaktivieren und dadurch die Zellen in der Mitose arretieren [101, 108, 148, 263] (siehe

auch 2.2.1.2.3 auf Seite 20). So konnten Alexandru *et al.* in *S. cerevisiae* zeigen, daß *mad2* Mutante Zellen trotz Nokodazolbehandlung ohne Verzögerung durch die Metaphase-Anaphase Transition gehen. *Sec1* dissoziiert von den Schwesterchromatiden, und diese trennen sich mit normaler Kinetik [2]. Über die Natur des Signals, welches die Anaphase verzögert, bis alle Kinetochore fest mit der Spindel verbunden sind und unter Zug stehen, ist nicht viel bekannt. Einen Hinweis geben Untersuchungen von Nicklas *et al.* [174]. Für diese Untersuchungen setzten Nicklas *et al.* einen Antikörper ein (3F3/2), der bestimmte Epitope in abhängigkeits ihres Phosphorylierungszustandes erkennt. In diesen Untersuchungen an Spermatozyten von Insekten konnte gezeigt werden, daß Kinetochore ein 3F3/2 Phosphoepitop exprimieren, wenn diese nicht durch eine Spindel unter mechanische Spannung gebracht werden [70, 138, 139, 176]. Dieses Phosphoepitop verschwindet, wenn die Kinetochor-Spindel-Verbindung mechanisch beansprucht wird. Die Anaphase wird in diesen Zellen so lange verzögert, bis das 3F3/2 Signal verschwunden ist; wird dies durch Mikroinjektion dieses Antikörpers verhindert, bleiben die Zellen arretiert [26]. Interessante Ergebnisse von Skoufias *et al.* deuten darauf hin, daß BubR1 und Mad 2 den Spindelkontrollpunkt funktionell teilen. In diesem Konzept sichert Mad2 die funktionelle Verknüpfung der Mikrotubuli mit dem Kinetochor, und BubR1 gibt den Kontrollpunkt frei, wenn die Spindel unter mechanische Spannung gesetzt wird [230]. Zusammenfassend kann man sagen, daß es ein diffusibles Signal gibt, das den Anaphaseblock aufrechterhält, bis alle Chromosomen in der Metaphaseplatte eingeordnet sind [69]. Dieses Signal ist aber nur über kurze Distanzen wirksam, wie Rieder in seinen Arbeiten mit fusionierten PtK Zellen zeigen konnte, in denen der Präanaphaseblock einer Spindel die benachbarte Spindel nicht blockieren konnte [210]. Im Xenopussystem konnte in Oozytenextrakten und in XTC Zellen (Zelllinie gewonnen aus der Kaulquappe) gezeigt werden, daß Mitglieder der Map-Kinase Superfamilie (siehe Kapitel 3.6.1.2 auf Seite 58) eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Spindelkontrollpunktes spielen [164, 239, 261].

Der Spindelkontrollpunkt kann also mindestens in drei verschiedene Bestandteile untergliedert werden. Im ersten Schritt wird die funktionelle Anheftung der Spindel an die Kinetochore sichergestellt, hier spielen Mitglieder der Mad und Bub Familie eine entscheidende Rolle. Im zweiten Schritt wird diese Information an die dritte Instanz weitergeleitet, die mit dem APC interagiert. Die Weiterleitung hängt unter anderem von Mitgliedern der MAP-Kinase-Superfamilie (p41, p42 und p38) ab. Der letzte Schritt, die Aktivierung des APC, und damit die Trennung der Schwesterchromatiden, wird unter anderem von der Aktivierung der APC-Lotsen (Cdc20 und Hct1) gesteuert. Molekulares Ziel des Spindelkontrollpunktes ist APC^{Cdc20}. Die Inhibition dieses Enzymkomplexes verhindert die Trennung der Schwesterchromatiden, arretiert die Zelle und verhindert den Austritt aus der Mitose. Notwendig für die Inhibition ist Mad2 und die Interaktion von Mad2 oder

Bub2 mit dem APC-Lotsen oder mit dem Komplex aus Lotse und APC. Diese Bindung verhindert die Aktivierung des APC [2, 58]. Im Falle von Mad2 muß dieses erst noch tetramerisieren, ehe die Bindung an den APC zu einer Hemmung der APC Aktivität führt [58]. Diese Hemmung bleibt bestehen, bis alle Chromosomen in die Metaphaseplatte eingeordnet sind, dann erst geht die Zelle in die Anaphase [69]. In Abbildung 2.8 ist der Zusammenhang zwischen der Detektion eines Spindelfehlers und den folgenden Ereignissen schematisch dargestellt.

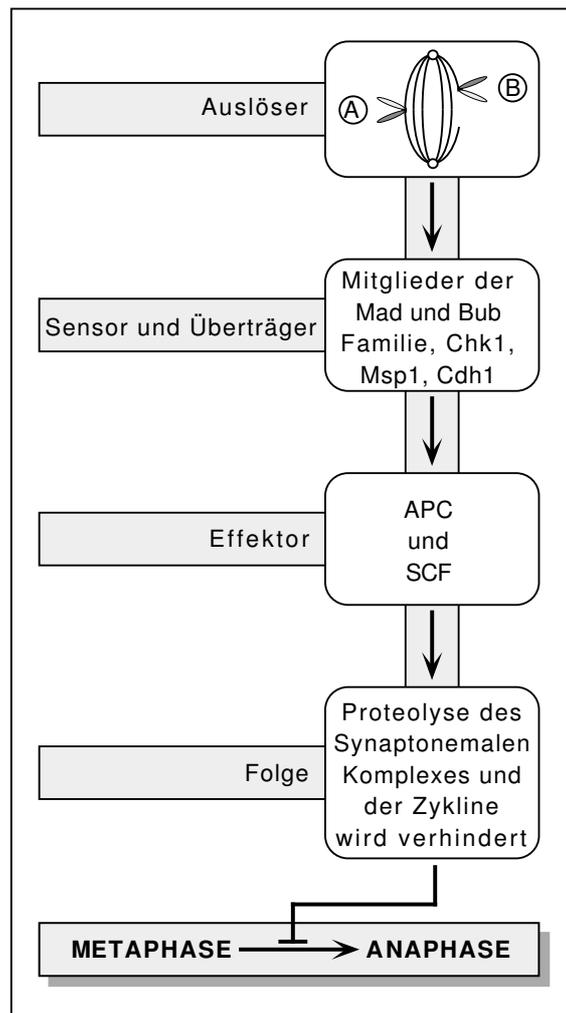


Abb. 2.8: Schematische Darstellung des Spindelkontrollpunktes und seiner Auswirkungen

- A. Korrekt in Spindel eingeordnetes Bivalent
- B. Einseitig angeheftetes Bivalent

Der Spindelkontrollpunkt wird sowohl in der Mitose als auch in der

Meiose aktiv, wenn die Integrität bzw. die Anheftung der Spindel an das Kinetochor gestört ist. Mutationen an Proteinen, die eine wichtige Rolle bei der DNA Reparatur spielen, führen sowohl in Spermatozyten als auch in Oozyten zu einem Arrest der Zellen in der Prometaphase I. Mlh1 (**MutL Homolog**) gehört zu der Familie der Gene, die für die DNA Fehlpaarungs-Reparatur (Mismatch repair) während der Rekombination und Reparatur wichtig sind. Sie sind homologe des aus *E. coli* gut charakterisierten MutS und MutL Systems. In *E. coli* ist MutS der Faktor der eine Fehlpaarung eines Nukleotids detektiert, und MutL stellt die Verbindung zwischen der Detektion (MutS) und den Reperatursystemen her (reviewed in [180]). Mlh1 markiert sowohl in *S. cerevisiae* als auch in der Maus die Stellen auf Chromosomen, an denen Crossover stattfinden, und es konnte in der Hefe gezeigt werden, daß nur Mlh1 in der Lage ist, Crossover zu induzieren [100, 271]. In Mlh1 knock out Mäusen sinkt die Crossover Rate in Oozyten fast auf Null. Dies führt dazu, daß die homologen Chromosomen nicht mehr über Chiasmata stabilisiert werden, so daß sie in der Prometaphase als ungepaarte Univalente vorliegen, obwohl zwischendurch der synaptonemale Komplex ausgebildet wurde. Die fehlende Rekombination destabilisiert die homologen Chromosomen und verhindert die Reifung der Kinetochore, so daß die Spindeln keine festen Verbindungen mehr mit diesen eingehen können. Die Spindelpole wandern immer weiter auseinander und die Form der Spindel entspricht nicht dem Wildtyp. Dies aktiviert den Spindelkontrollpunkt, der die Zellen in der Prometaphase I blockiert. Die so arretierten Oozyten werden durch Apoptose aus dem Zellverband entfernt [9, 271]. Diese langegezogenen Spindeln wurden auch in den Oozyten von Mäusen beobachtet, denen das *c-mos* Gen ausgenockt wurde (*mos* -/-). In diesen Oozyten streckt sich die Spindel während der Metaphase-Anaphase Transition, wenn die MPF-Aktivität vorübergehend sinkt [229, 254]. Einige Autoren bezweifeln zwar die Existenz eines Spindelkontrollpunktes [133], aber es spricht einieges für die Existenz dieses Kontrollpunktes. Steuerwald *et al.* verglichen die Menge an Mad2 und Bub1 mRNA in humanen Oozyten. Sie verglichen Oozyten von Spendern, die jünger bzw. älter als 36 Jahre waren, und konnten zeigen, daß die Menge an Bub1 mRNA in den Oozyten (GV, MI und MII) der älteren Spender deutlich geringer ist als in den Oozyten der jüngeren Spender. Die Menge an Mad2 mRNA veränderte sich nicht signifikant. Somit konnte gezeigt werden, daß zumindest die zentralen Transkripte der Proteine, die am Spindelkontrollpunkt beteiligt sind, in Oozyten vorhanden sind. Diese nehmen mit zunehmendem Alter der Mutter ab, dies korreliert mit der Zunahme chromosomaler Aberrationen in Oozyten älterer Frauen [233]. Neue Erkenntnisse über den Spindelkontrollpunkt in *Xenopus* lassen sogar vermuten, daß die Elemente des Spindelkontrollpunktes in den Dienst des MII Arrests gestellt werden. So konnte in *Xenopus* gezeigt werden, daß Bub1, ein zentrales Element des Spindelkontrollpunktes von PSK p90 phosphoryliert wird. Dadurch wird der APC-Aktivator/Lotse Cdc20 an das phosphorylierte

Bub1 gebunden und die Aktivierung des APC verhindert [155, 76].

2.2.1.3.2 Der Chromosomenkontrollpunkt Im vorhergenden Abschnitt habe ich die Elemente des Kontrollpunktes vorgestellt, welche die funktionelle Integrität der Spindel sicherstellen. In diesem Abschnitt werde ich auf die Elemente eingehen, die gewährleisten, daß beschädigte Chromosomen repariert werden, bevor sie repliziert werden (S-Phase) oder segregieren (M-Phase). Auch für diesen Kontrollpunkt gilt das in Abbildung 2.7 auf Seite 23 aufgestellte Grundprinzip. D. h. der Fehler oder der Verursacher muß detektiert, die Information muß weitergeleitet und verstärkt und der Zellzyklus unterbrochen werden, um der Zelle die Möglichkeit zu geben, die Auswirkungen der Störung zu analysieren und den Fehler zu beheben oder aber die Zelle apoptotisch aus dem Zellverband zu entfernen.

Ein Protein, das in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle spielt, ist p53. Es vermittelt sowohl einen G₁/S- als auch einen prämitotischen Kontrollpunkt. Dieser Kontrollpunkt wird aktiviert, wenn die Integrität der DNA gestört ist [64, 111, 150]. Die Aktivierung führt in jedem Fall zu einer Verzögerung des Eintritts in die nächste Phase des Zellzyklus [144].

Außerdem spielt p53 auch noch eine Rolle als Spindelkontrollpunkt, auch hier wird der Zellzyklus in der G₂-Phase so lange verzögert, bis der Fehler beseitigt ist oder die Zelle über Apoptose entfernt wird [39].

Ein zentrale Rolle im **G₁/S Kontrollpunkt** spielt das p53 Protein. Es wurde als Tumorsuppressorgen charakterisiert und ist in mehr als 50 % aller menschlichen Tumoren mutiert [135]. Unter normalen Umständen ist es ein sehr kurzlebiges, DNA-bindendes Protein, welches Mdm2-vermittelt [242] degradiert wird. DNA-klastogene oder mutagene Substanzen aktivieren ATM (**A**taxia **t**hela**n**giectasia **m**utated), eine Kinase mit einer PI-3-ähnlichen (**p**hosphatidyl-**i**nositol **3**-kinase) Domäne. ATM bindet an p53 und phosphoryliert es an Ser 15 [12, 27, 115], dies inaktiviert die Mdm2 Bindungsstelle und erhöht so die Halbwertszeit des p53 Proteins drastisch [124]. Das phosphorylierte Protein tetramerisiert, bindet an die DNA und kann dort sowohl als Transkriptionsrepressor (bcl2 (**b** cell lymphoma) und Zyklin B) als auch als Aktivator (Cip1, Gadd45, Mdm2) fungieren [54, 79, 112, 284]. Unter den in ihrer Expression veränderten Proteinen ist Cip1, im Hinblick auf den Arrest des Zellzyklus, von entscheidender Bedeutung. Es bindet an Cdk2/Zyklin E, inaktiviert diesen Komplex und verhindert so die G₁/S Transition [44, 54, 82, 275]. Für die G₁/S Transition ist die Phosphorylierung des Rb Proteins (**R**etinoblastom) notwendig, da durch dessen Phosphorylierung der Transkriptionsfaktor E2F aus seinem Komplex mit Rb freigegeben wird und die Transkription transitionsrelevanter Gene initiiert [4, 19]. In Abbildung 2.9 auf Seite 31 sind die oben beschriebenen Vorgänge dargestellt. p53 greift noch auf eine andere Art in die G₁/S-Transition ein. Das durch p53 induzierte Cip1 bindet an PCNA (**P**roliferating **C**ell **N**uclear **A**ntigen)

und blockiert die Elongation der DNA während der Replikation, wobei es die Rolle, die PCNA in der Reparatur spielt, nicht beeinflusst [137, 260]. Neben dem p53 abhängigen G₁/S Kontrollpunkt gibt es eine Kontrolle, die p53 unabhängig ist. Hier wird als Antwort auf UV-Licht Chk1 von ATR (siehe auch 2.2.1.3.2 auf der vorherigen Seite) phosphoryliert und somit aktiviert [143]. Dieses wiederum phosphoryliert Cdc25A und markiert es dadurch für die Ubiquitinierung. Dadurch kann der Komplex aus Cdk2/Zyklusin E nicht aktiviert werden, der für den G₁/S Übergang notwendig ist [154]. Es ist bemerkenswert, daß diese Kontrollmechanismen beide den G₁/S Übergang sichern: der p53-unabhängige Kontrollpunkt blockiert den Zellzyklus sofort nach der Schädigung wohingegen der Kontrollpunkt, der über die p53-p21^{Cip1} Achse den G₁/S Übergang reguliert, erst einige Stunden nach der DNA Schädigung durch UV Strahlung, in den den Zellzyklus eingreift.

Auch am **G₂/M Übergang** wird durch einen Bruch in der DNA p53 stabilisiert und dessen Transkriptionsaktivität erhöht. Cip1 wird exprimiert und reguliert die Aktivität des cdc2/Zyklusin B Komplexes. Ausserdem reguliert p53 den Eintritt in die Mitose, indem es die Expression von Zyklusin B₁ herunterreguliert und somit die Komplexierung mit und die Aktivierung von Cdc2 verhindert [102]. Dies scheint jedoch erst in zweiter Instanz für die Modulation des Zellzyklus, in diesem Zusammenhang, wichtig zu sein [234]. Die eigentliche Verzögerung des Zellzyklus erfolgt hier über die Regulation der Cdc25 Aktivität. Der Fehler in der DNA wird durch die Kinase ATM (**A**taxia **t**elangiectasia **m**utated) an drei Proteine weitergeleitet, welche die Aktivität der Phosphatase Cdc25 regulieren; Chk1, Chk2 (**c**heckpoint **k**inase1) und Cds1 [16]. Durch die beiden Kinasen wird Cdc25 so phosphoryliert, daß es von einem Protein (14-3-3 σ) gebunden und aus dem Kern transportiert wird [126, 192]. Somit ist es für eine Dephosphorylierung des MPF (Cdc2/Zyklusin B) nicht mehr verfügbar, und die Zelle verharrt in der G₂-Phase. Diese Zusammenhänge sind in Abbildung 2.10 auf Seite 33 schematisch dargestellt. Ein weiterer Mediator des DNA-Kontrollpunktes ist die Kinase Plk1. Die Kinaseaktivität von Plk1 wird nach einer DNA-Schädigung herunterreguliert. Dies blockiert sowohl den Eintritt als auch den Austritt aus der Mitose. Zu Beginn der Mitose verhindert die Inaktivierung der Plk1 die Aktivierung von Cdc25-C. Am Ende der Mitose verhindert die verringerte Plk1 Kinase-Aktivität die Aktivierung des (APC^{Cdc20}) und somit die APC vermittelte Proteolyse von Zyklusin B [231]. In *S. pombe* ist noch ein weiterer Weg aufgeklärt worden, der den für den G₂/M Übergang notwendigen Anstieg in der Cdc2/Zyklusin B Kinaseaktivität verhindert: neben der Phosphatase Cdc25-C wird hier noch die Kinase Wee1 phosphoryliert und somit aktiviert. Dies führt dazu, daß die inhibitorische Phosphorylierungsstelle Tyr₁₅ am Cdc2 phosphoryliert wird und der MPF inaktiv bleibt (siehe auch 2.4 auf Seite 15) [206]. Neben ATM spielt hier noch ein weiteres Protein eine Rolle bei der Phosphorylierung von p53. Hierbei handelt es sich um ATR (**A**T related). ATM und ATR regulieren den Phosphorylierungsgrad von

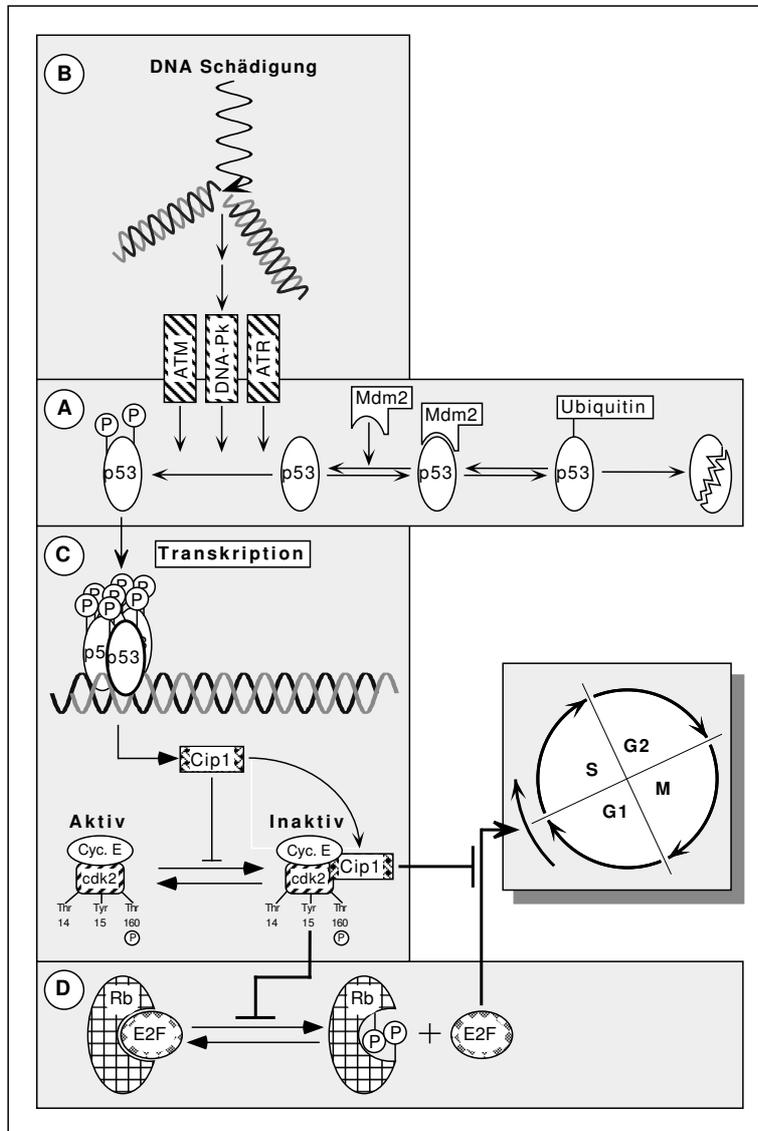


Abb. 2.9: Schematische Darstellung des G_1/S DNA-Kontrollpunktes
 A. Regulation der p53-Stabilität durch Mdm2 und den Phosphorylierungs-
 zustand des p53
 B. Aktivierung von Kontrollgenen durch DNA-Schädigende Agenzien und
 deren Wirkung auf p53
 C. p53 initiierte die Transkription Genen, die für den G_1/S -Übergang not-
 wendig sind
 D. Regulation des Komplexes aus E2F und Rb durch cdk1/ZyklusinE

p53 zeitversetzt. Schon wenige Minuten nach einer DNA Schädigung wird p53 durch ATM phosphoryliert und somit aktiviert. Nach etwa 2 Stunden wird diese Funktion von ATR übernommen und führt zu einer Verlängerung des Arrests [248]. Chk1 spielt jedoch nicht nur bei dem ATR vermittelten Block des Zellzyklus eine Rolle. Kaneko *et al.* konnten zeigen, daß die Kinase auch unter ungestörten Bedingungen Cdc25C phosphoryliert und so für den Export des MPF Aktivators aus dem Zellkern sorgt. Erst wenn die S-Phase abgeschlossen ist, wird der Chk1 vermittelte Export des Cdc25C unterbunden, wodurch es zu einer Akkumulation der Phosphatase und somit zu einer Aktivierung des MPF kommt [110].

Wie die Fehler in der DNA von der Zelle tatsächlich detektiert werden ist nicht ganz klar. Sowohl die Mitglieder der PKI Familie (ATM, ATR, DNA-PK) als auch p53 können an einzelsträngige DNA und DNA Doppelstrangbrüche binden. Wer aber letztendlich den Fehler detektiert und weitergibt, ist nicht vollständig geklärt. Zusammenfassend zeigt es sich, daß die für die jeweilige Zellzyklusphase wichtigen Cdk/Zyklin Komplexe das Ziel der Kontrollpunkte sind. Ihre Aktivität wird durch die an dem Kontrollpunkt beteiligten Proteine herunterreguliert und die Zellen so vorübergehend arretiert.

In der weiblichen Meiose scheint es keinen Kontrollpunkt zu geben, der die Integrität der DNA bzw. der Chromosomen sicherstellt, solange der Fehler nicht zu einer Aktivierung des Spindelkontrollpunktes führt. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß weder Chromosomen, die nicht in die Metaphaseplatte eingeordnet sind [97, 133, 278], noch freie Doppelstrangbrüche zu einer Aktivierung eines Metaphase/Anaphase Arrests führen.

2.2.2 Besonderheiten des Zellzyklus in der Entwicklung und Reifung der Oozyten von Mäusen

Die Entwicklung weiblicher Keimzellen unterscheidet sich, wie schon Eingangs erklärt (siehe 2.1 auf Seite 6), deutlich von der somatischer Zellen. Mitotische Zellen verlassen den Zellzyklus, indem sie aus der G₁-Phase in die G₀-Phase wechseln, Oozyten hingegen arretieren in der G₂-Phase des Zellzyklus. Nachdem die Zellen bis zum Erreichen der Pubertät im Diplotän der Prophase I arretiert waren, nehmen einige von ihnen nach einem hormonellen Stimulus die Reifung wieder auf, um anschließend in der Metaphase II erneut zu verweilen. In diesem Stadium werden sie in der Maus ovuliert, um anschließend fertilisiert zu werden. Die Wiederaufnahme der Reifung manifestiert sich in der Auflösung des Keimbläschens (GVBD engl.: **G**erminal **V**esicle **b**reakdown), dies repräsentiert die Transition von der G₂- in die M-Phase. Anschließend kondensieren die Chromosomen, und die Spindel wird gebildet. Diese Vorgänge sind fünf bis acht Stunden nach GVBD abgeschlossen, und die Länge des Zeitintervalls ist genetisch determiniert [203, 204]. Diese die äußerlich sichtbaren Aktivitäten der Reifung betreffenden Merk-

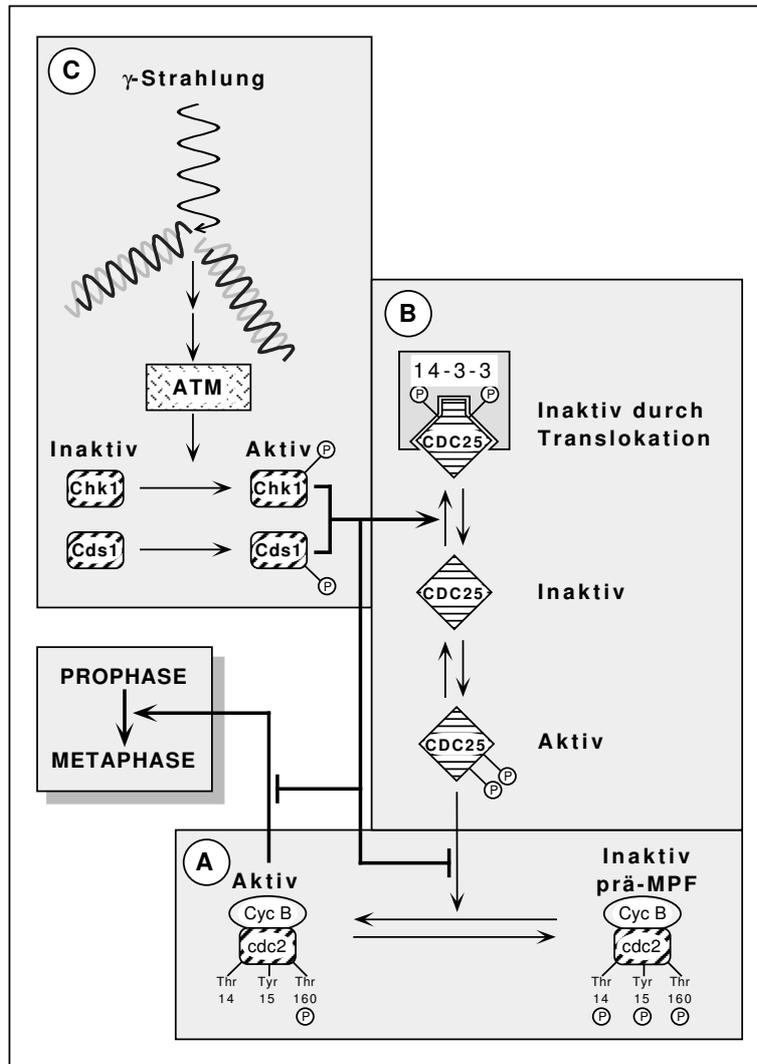


Abb. 2.10: Schematische Darstellung des G₂/M DNA-Kontrollpunktes
 A. Aktivität des MPF in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand
 B. Die Rolle von Cdc25-C im DNA-Kontrollpunkt
 C. Durch γ -Strahlung induzierter DNA-Kontrollpunkt und die nachgeschalteten Elemente

male werden von charakteristischen Veränderungen in der Aktivität des MPF (siehe 2.2.1.2 auf Seite 12) und der MAP Kinase (MAPK: **M**itogen **A**ctivated **P**rotein **K**inase oder auch ERK (**E**xtracellular regulated kinase)) begleitet. Mit dem Ende der Auflösung der Kernmembran (GVBD) steigt die MPF Kinase Aktivität. Dieser Anstieg erfolgt biphasisch, und die erste Phase wird durch Proteinsyntheseinhibitoren nicht beeinflusst, da im Verlauf der initialen Aktivierung nur präformierter, inaktiver MPF (Prä-MPF) dephosphoryliert und somit aktiviert wird. Nach dieser initialen Phase wird die Reifungskinetik zumindest im Verlauf der ersten vier Stunden durch die Zyklin B1-Syntheserate bestimmt. In dieser Phase der Reifung steigt parallel zur Zyklin B1-Syntheserate die MPF Aktivität bis beide ein Plateau erreichen [34, 253, 204, 254, 270]. Der Anstieg der MPF Kinase Aktivität fördert direkt oder indirekt die Bildung der Spindel. Die kondensierten Chromosomen haben bis kurz vor dem Ende der Metaphase I über die gesamte Länge der Chromosomenarme Kontakt mit der Spindel. Dieser Kontakt reicht aus, um sie in der Äquatorialebene anzuordnen. Erst gegen Ende der Metaphase I werden Kinetochorspindeln ausgebildet und die Chromosomen endgültig in der Metaphaseplatte ausgerichtet. In diesem Zustand verweilen die Zellen für wenige Minuten, ehe sie in die Anaphase I eintreten und den ersten Polkörper abschnüren [20]. Die Kompetenz des Kinetochors, mit der Spindel in Kontakt zu treten, und stabile Kinetochorspindeln auszubilden erhält das Kinetochor erst kurz vor dem Ende der Metaphase I. Dieser Vorgang ist unabhängig von Proteinsynthese, und Brunet *et al.* [20] diskutieren, daß eine posttranslationale Modifikation des Kinetochors durch den MPF diese Kompetenz induziert. In diese Phase fällt auch die Zeit, in der die homologen Chromosomen maximal kondensieren, um dann getrennt zu werden [204].

Alle im folgenden gemachten Zeitangaben sind genetisch determiniert und hängen somit stark von dem untersuchten Mausstamm ab [202, 203]. Mit der Abschnürung des Polkörperchens sinkt die MPF Kinaseaktivität drastisch (innerhalb von 5 bis 10 Minuten) bis fast auf den Ausgangswert vor dem GVBD, um danach innerhalb weniger Minuten (10 bis 20 Minuten) wieder ein Plateau zu erreichen, das in etwa dem vor der Abschnürung des Polkörperchens entspricht. In *Xenopus* konnte gezeigt werden, daß die Restaktivität, die der MPF während der MI / MII Transition hat, notwendig ist, um eine MI / S Transition zu verhindern. Für diese niedrige MPF Aktivität sorgt das Gleichgewicht zwischen der Degradierung von Zyklin B durch den APC (siehe Abschnitt 2.2.1.2.3 auf Seite 19) und der Inaktivierung von Wee I durch MPF. Ist die MPF Aktivität zu niedrig, wird cdc2 durch Wee I phosphoryliert und dadurch inaktiviert, wodurch die MI / S Transition initialisiert wird [103]. Nachdem der MPF seine maximale Aktivität wieder erreicht hat, verbleibt die Kinaseaktivität des MPF bis zur Fertilisierung auf diesem hohen Niveau [204]. Etwa 2 Stunden nach der Fertilisierung wird der MPF vollständig inaktiviert. Die Aktivität der MAP Kinase steigt

während der Prometaphase etwas verzögert gegen die des MPF an und erreicht ihr Maximum nach etwa 4 Stunden. Diese Aktivität bleibt über die erste Anaphase hinaus gleichbleibend hoch, bis sie nach der Fertilisierung etwa 1,5 bis 2 Stunden nach der Inaktivierung des MPF auch absinkt. Die beschriebenen Vorgänge sind in Abbildung 2.11 auf der nächsten Seite schematisch dargestellt. Die Inaktivierung der MAP Kinase ist unerlässlich für die nachfolgende, erste mitotische Teilung. Während der Phase, in der die MPF Kinaseaktivität abfällt, bleiben die Chromosomen kondensiert und die Replikation wird verhindert.

Der Arrest in der MII wird durch den zytostatischen Faktor (CSF, engl.: **Cytostatic Factor**) vermittelt, indem er den MPF stabilisiert und so die Kinaseaktivität hoch hält. Der Begriff CSF ist weniger die Bezeichnung für ein fest definiertes Protein oder einen Komplex aus Proteinen als vielmehr die Beschreibung der Wirkung. Wird dieser Wirkkomplex, dessen genaue Zusammensetzung und Funktionsweise noch nicht geklärt ist, in Zweizell-Embryonen injiziert, führt dies zum Arrest der Zellen [161]. Ein Bestandteil dieser Wirkung ist das Proto-Onkogen c-Mos, eine Serin-Threonin Kinase mit einem Molekulargewicht von 39 kDa [217]. Es stellte sich heraus, daß Mos eine MAP Kinase Kinase Kinase ist, d.h. es phosphoryliert und reguliert somit einen Aktivator der MAP Kinase (MAPK) [78], gleichzeitig inhibiert es eine Phosphatase und aktiviert Mek1 so auf zwei verschiedenen Wegen [77]. Die Aktivierung der MAPK ist notwendig, aber nicht ausreichend für die Blockierung der Zellen in der M II [36]. Wird das vorgeschaltete Element der MAPK durch homologe Rekombination ausgeschaltet, wird die MAPK im Verlauf der Reifung nicht aktiviert. Etwa zwei Drittel der Oozyten aus mos -/- Mäusen gehen aus der M II Phase direkt in eine Metaphase III (M III). Es konnte gezeigt werden, daß die Oozyten während der Transitionen (M I zu M II und M II zu M III) in einen Interphase-ähnlichen Zustand kommen, der sich in den langen, dünnen und monopolen Spindeln und dem partiell dekondensierten Chromatin manifestiert [255]. Die Untersuchungen an c-Mos -/- Mäusen zeigten, daß c-Mos in der Maus für den Arrest in der MII notwendig ist. Außerdem reguliert die MAP-Kinase die Aktivität des Aktin-Mikrofilament Netzwerkes und beeinflusst so die Wanderung der Spindel zur Peripherie der Zelle und deren Ausrichtung senkrecht zum Cortex [229]. Daneben verhindert die MAP-Aktivität eine unzeitgemäße Elongation der Spindel, wenn die MPF Aktivität während der Metaphase-Anaphase Transition vorübergehend abfällt [256]. In Oozyten von *Xenopus* hingegen wird auch die Progesteron-induzierte Wiederaufnahme der Reifung durch c-Mos vermittelt. In diesem System konnten die funktionellen Zusammenhänge zwischen der hormoninduzierten Reifung und der Aktivierung der MAPK und des MPF genauer aufgeschlüsselt werden. In Tabelle 2.3 auf Seite 37 sind die unterschiedlichen Funktionen von c-Mos in Maus und *Xenopus* gegenübergestellt.

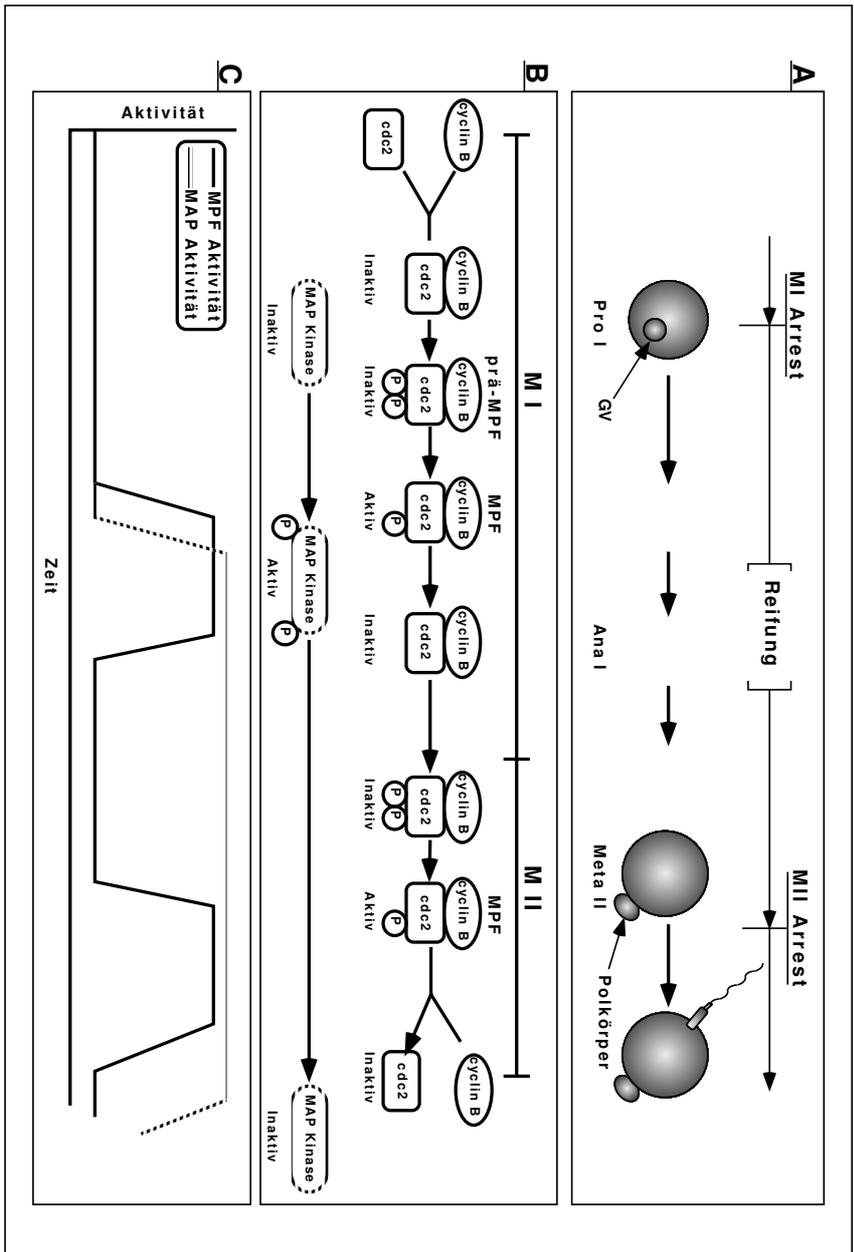


Abb. 2.11: Schematische Darstellung der Vorgänge im Verlauf der Reifung.
 A. Sichtbare Veränderungen der Oozyte im Verlauf der Reifung.
 B. Aktivierung und Inaktivierung des MPF- und der MAP-Kinase.
 C. Aktivität des MPF- und der MAP-Kinase im Verlauf der Reifung.

Tabelle 2.3: Funktion von c-Mos und der nachgeschalteten MAPK in der Reifung von Oozyten von *Xenopus* und Maus

MAP Kinaseaktivität benötigt für	Maus	Xenopus
Wiederaufnahme der Reifung	Nein	Ja
Verhindert Bildung der Kernhülle	Nein	Ja
Arretierung in Meiose II	Ja	Ja
Verhindert Mitose in unbefruchteten Oozyten	Nein	Nein
Wichtig für komplette Kondensation der Chromosomen	Ja	Ja
Verhindert Dekondensation der Chromosomen zwischen MI und MII	Ja	Ja

Wie in der Tabelle 2.3 beschrieben ist in *Xenopus* die Aktivität der MAPK für die Aufnahme der Reifung notwendig. In *Xenopus* ist die Aktivierung des MPF der Aktivierung der MAPK nachgeschaltet und wird durch diese reguliert. Der MPF liegt in den ruhenden Zellen als Prä-MPF vor, das heißt $p34^{cdc2}$ liegt hyperphosphoryliert vor. Myt1, die Kinase die den Prä-MPF hyperphosphoryliert wird, durch die Kinase $p90^{rsk}$ phosphoryliert und dadurch inaktiviert. Die Aktivität von $p90^{rsk}$ wiederum wird durch die MAPK reguliert. Für *Xenopus* konnten Gross *et al.* zeigen, daß es neben der Aktivierung des MPF durch die MAPK noch einen zweiten, Progesteron-induzierbaren Reaktionsweg gibt, durch den Cdc2/Zyklin B aktiviert werden kann. Mediator ist hier das Plk homologe Plx1, diese Kinase initiiert die Metaphase I auch wenn die MAPK vollständig inhibiert ist. Im weiteren Verlauf der Reifung gehen diese Oozyten jedoch nicht in die MII sondern in S-Phase. Die MAPK Aktivität ist also für die MI / MII Transition unerlässlich, die Aktivierung der MAPK hat eine Inaktivierung des APC zur Folge, somit steigt die Zyklin B Konzentration am MI / MII Übergang wieder an, und es kommt zur Ausbildung einer funktionellen Spindel [75]. Diese Kette aus aktivierenden und inaktivierenden Kinasen erklärt, warum in *Xenopus* die Aktivierung des MPF und somit die Wiederaufnahme der Reifung von der Aktivierung der MAPK abhängt [75, 187]. In Abbildung 2.4 auf Seite 15 sind die phosphorylierenden bzw. dephosphorylierenden Proteine gezeigt, welche die Aktivität des MPF beeinflussen.

2.3 Chromosomale Aberrationen in den Oozyten von Mammaliern

Der Begriff der chromsomalen Aberrationen umfaßt verschiedene Klassen von Fehlern, welche die Integrität des Genoms beeinflussen. Grundsätzlich unterscheidet man numerische Aberrationen, die die Zahl der Chromoso-

men verändern, von strukturellen Aberrationen, welche die Linearität einzelner Chromosomen unterbrechen. Die erste Klasse schließt die Aneuploidien ein, die entweder zu einer Vervielfachung des gesamten Chromosomensatzes führen (Polyploidie) oder aber nur einzelne Chromosomen betrifft, die entweder in der Überzahl auftreten (Hyperploidie) oder deren Zahl verringert ist (Hypoploidie). Auch der Begriff der strukturellen Aberration vereint verschiedene Typen von Defekten in sich. Man unterscheidet Punktmutationen, die nur zum Austausch oder Verlust einzelner Basen des genetischen Codes führen, vom Verlust, dem Austausch, der Duplikation oder der Inversion längerer Abschnitte ganzer Chromosomen.

Die Ursachen für solche Defekte können im System selber, also im Organismus bzw. der Zelle, begründet sein oder aber durch äußere Faktoren (Chemikalien, Strahlung) erzeugt werden. Besonders in letzter Zeit gewinnt der Zusammenhang zwischen erblicher Prädisposition und der sich daraus ergebenden Empfindlichkeit gegenüber extrinsischen Faktoren immer mehr an Bedeutung. Während der Oogenese in Mammaliern und besonders beim Menschen scheinen die extrinsischen Faktoren die Qualität der Oozyten besonders zu beeinflussen. Dies ist um so mehr von Bedeutung, als daß humane Oozyten bis zu 40 Jahre lang im Diplotän arretiert sein können, ehe sie die Reifung wieder aufnehmen. Über diese Zeit hinweg ist jede dieser spezialisierten Zellen potentiell anfällig für extrinsische und intrinsische Faktoren.

2.3.1 Numerische Aberrationen in der Meiose

Das Auftreten zweier Kopien eines Chromosoms in einem Gamet wird von Genetikern als Nichttrennung (Nondisjunction) definiert. Dieser Begriff beschreibt jedoch nicht den Mechanismus, durch den es zu diesem Ereignis kommt. Vielmehr kann es sowohl durch eine Nichttrennung im klassischen Sinne zu einer Hyperploidie kommen, als auch durch eine verfrühte Trennung von Chromosomen (Chromatiden), in deren Folge diese zufallsgemäß zu den Spindelpolen wandern. Das Ergebnis sind Gameten, die sich in ihrer Chromosomenzahl unterscheiden. Diese Fehlverteilungen können in beiden meiotischen Teilungen auftreten. Numerische Aberrationen in der Meiose I resultieren in zwei disomen Gameten und zwei Gameten, denen das betroffene Chromosom fehlt. Die Disome enthalten je ein paternales oder maternales Chromosom in der Überzahl. Fehler in der Meiose II manifestieren sich in zwei Gameten mit einem normalen haploiden Chromosomensatz, einem Gameten der zwei Schwesterchromatiden enthält und einem Gameten, dem ein Chromatid fehlt. Dieses Muster kann auch auftreten, wenn sich die Bivalente in der MI vorzeitig trennen. Der Chromosomensatz dieser Zellen unterscheidet sich jedoch darin, daß der disome Gamet zwei Homologe enthält und nicht, wie im Fall der MII Non-disjunction, zwei Schwesterchromatiden. Bei der Verschmelzung eines normalen Gameten mit einem Gameten,

der ein zusätzliches Chromosom hat, entsteht ein trisome Zygote. Im Menschen sind für jedes Chromosom Trisomie beschrieben worden, jedoch ist die Überlebensrate für die trisomen Zygoten sehr gering [120, 212]. Die oben beschriebenen Möglichkeiten der Fehlverteilungen, verursacht durch Fehler in der Meiose I oder II, sind in Abbildung 2.12 auf der nächsten Seite schematisch dargestellt.

2.3.1.1 Geschlechts- und altersspezifische Unterschiede in der Häufigkeit chromosomaler Aberrationen

2.3.1.1.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede Die Mehrzahl der beim Menschen festgestellten numerischen Chromosomenanomalien sind auf fehlerhafte Trennungen der homologen Chromosomen während der ersten, maternalen Meiose zurückzuführen [84, 177] reviewed in [48, 49, 74]. So wurden bei verschiedenen Untersuchungen der akrozentrischen Chromosomen (13, 14, 15, 21, 22) und des Chromosoms 16 festgestellt, daß die meisten Trisomien für diese Chromosomen maternalen Ursprungs waren und auf einer fehlerhaften Segregation während der MI beruhten. Eine Ausnahme bildet das Chromosom 18, welches hauptsächlich durch Fehler in der MII fehlverteilt wird [22]. Die Trisomien paternalen Ursprungs (Chromosomen 18 und 21) treten mit deutlich niedrigerer Frequenz auf und beruhen fast ausschließlich auf Fehlern während der MII [283].

Trisomien werden als die Ursache uniparentaler Disomien diskutiert [55]. **Uniparentale Disomie (UPD)** beschreibt den Zustand, bei dem ein Paar homologer Chromosomen von nur einem Elternteil stammt. Es wird vermutet, daß die UPD aus einem trisomen Gameten hervorgeht, der ein überzähliges Chromosom verliert ('trisomic rescue') und die beiden verbleibenden Chromosomen von einem Elternteil stammen. Da die Rate an Aneuploidien in Oozyten um ein vielfaches höher ist als in Spermatozoen, ist es sehr wahrscheinlich, daß die UPD mehrheitlich maternalen Ursprungs ist [159, 272]. Obwohl die Zahl der Chromosomen in diesen Individuen richtig ist kann es zu schweren Missbildungen kommen. Dies kann verschiedene Ursachen haben: Sind auf den betroffenen homologen Chromosomen funktionelle Bereiche, die durch Imprinting reguliert werden, dann sind beide Kopien davon betroffen (Prader-Willi Syndrom, Angelman Syndrom, transiente neonatale Diabetes [131]). Im Falle einer Isodisomie werden rezessive, genetische Defekte nicht mehr durch ein dominantes Wildtyp-Allel gerettet. Uniparentale Disomien werden sowohl im Menschen als auch bei Mäusen nachgewiesen und untersucht [31, 113].

2.3.1.1.2 Altersbedingte Unterschiede Eine enge Korrelation besteht zwischen dem Alter der Mutter und dem Auftreten von Trisomien. Bei Frauen über 35, also gegen Ende der Reproduktionsphase, steigt die Rate an Aneuploidien sehr stark an [86, 120, 212, 214]. Generell sind Unterschiede

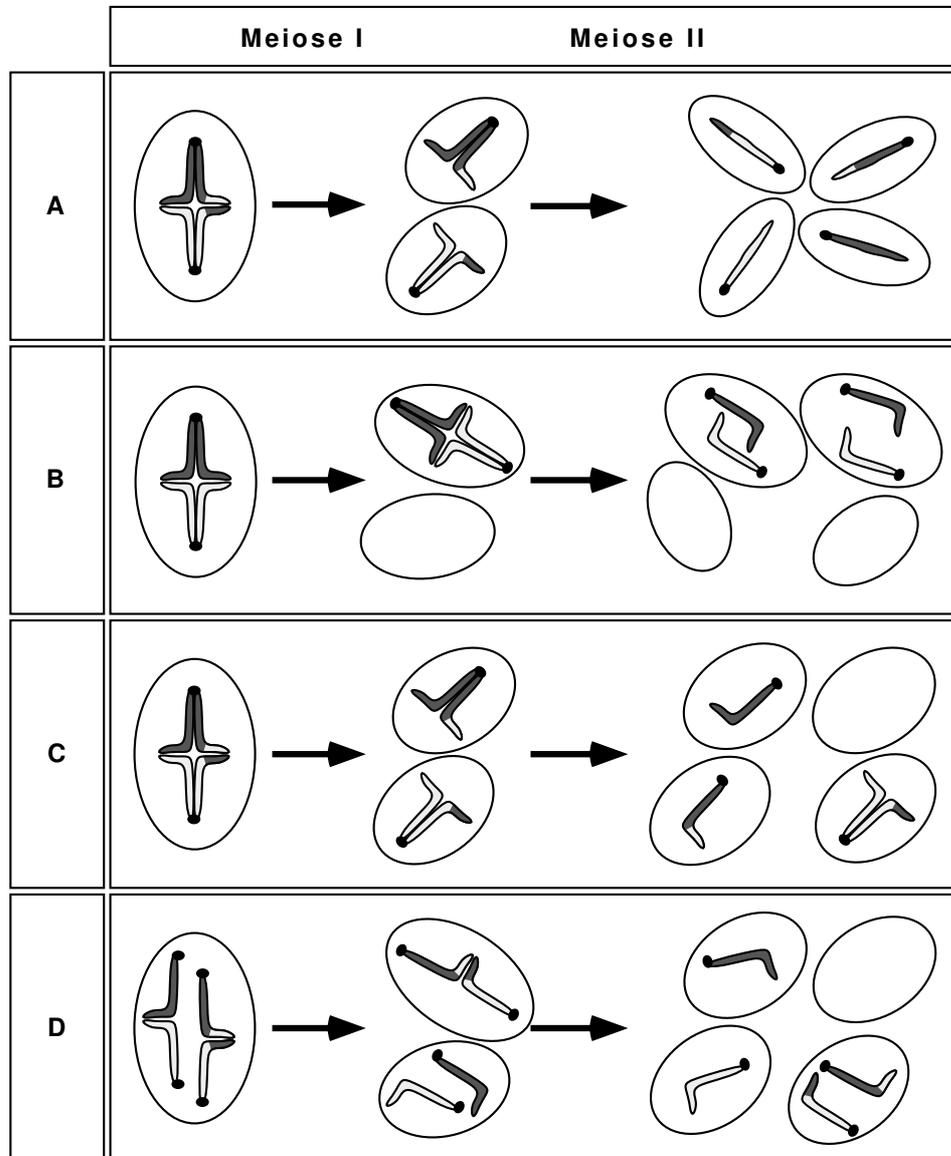


Abb. 2.12: Schematische Darstellung der Folgen chromosomaler Fehlverteilungen in der MI oder MII

A. Normale Segregation in M I und M II

B. Keine Trennung der Bivalenten in der MI

C. Fehlerhafte Trennung der Schwesterchromatiden in der M II

D. Vorzeitige Trennung der Schwesterchromatiden und keine Trennung der Bivalenten in der MI

in der Aneuploidierate zwischen den Keimzellen beider Geschlechter zu finden. Vergleicht man die Rate aneuploider Oozyten mit der von Spermien, so stellt man fest, daß 8,6% der untersuchten, humanen Oozyten hyperploid sind. Geht man davon aus, daß die Zahl der aneuploiden Oozyten doppelt so hoch ist wie die Zahl der hyperploiden Oozyten, ist die Zahl der Oozyten mit numerischen Aberrationen größer als 18 % (reviewed in [49, 98]). Die Rate an aneuploiden Spermatozyten wird mit 1-7% angegeben [252, 269, 98]. Einzige Ausnahme ist das Chromosom 16, welches einen mit zunehmendem Alter linearen Anstieg in seiner Fehlverteilungsrate zeigt. Die Ursache und der Mechanismus für den altersbedingten Anstieg in der Aneuploidierate ist noch nicht geklärt. Es ist nicht auszuschließen, daß die altersabhängige Zunahme der chromosomalen Fehlverteilungen verschiedene Ursachen haben kann. In Untersuchungen von Müttern mit trisomen Aborten wurde gezeigt, daß diese etwa ein Jahr eher in die Menopause eintraten als die Vergleichsgruppe [117]. Diese Befunde ergänzten die Untersuchungen von Freeman *et al.* [62], dieser korrelierte das vermehrte Auftreten von Kindern mit Down Syndrom mit einem reduzierten Oozyten-Pool in den Müttern. Beide Befunde deuten darauf hin, daß bei einem limitierten Vorrat an Oozyten, jene mit schlechterer Qualität erst am Ende der Reproduktionsphase ovuliert werden. Dies entspricht der Hypothese vom limitierten Oozyten-Pool, die von Warburton als eine Ursache für altersbedingte Aneuploidien angesehen wird [262]. Zusätzlich werden Störungen der Oozyte während des langen Arrests im Diptyotän sowie Veränderungen im Hormonhaushalt [167, 259] als mögliche Ursachen für die Altersaneuploidie diskutiert. Ausserdem scheint die Vaskularisierung und somit die Durchblutung des Ovars einen Einfluß auf die Qualität der Oozyten zu haben. Eine weitere Hypothese postuliert eine gestörte Besetzung der Spindel mit Mitochondrien mit den sich daraus ergebenden Veränderungen im Metabolismus der einzelnen Kompartimente der Oozyte [236]. Weitere Erklärungsversuche fordern mehr als eine Ursache für altersbedingte, chromosomale Fehlverteilungen. Lamb *et al.* vermuten zwei Ursachen für die altersbedingte Nicht-Trennung (non-disjunction): Das erste Ereignis ist die Bildung eines anfälligen Bivalentes im fötalen Ovar, wie z. B. ein Bivalent mit terminalem Chiasma. Das zweite Ereignis ist dann die fehlerhafte Prozessierung dieses Bivalentes im adulten Ovar während der MI [128]. In dieser Theorie besteht der altersbedingte Effekt in einer geringeren Effizienz bei der Segregation der Bivalenten. Beide Voraussetzungen wurden untersucht, und es konnte zumindest für Trisomien der Chromosomen 16 und 21 gezeigt werden, daß diese in allen, untersuchten Altersgruppen ähnlich anfällige, chromosomale Konfigurationen aufwiesen [88]. Es muss jedoch einschränkend gesagt werden, daß dies nicht für alle Chromosomen gilt. So ergaben sich bei der Untersuchung von Chromosom 15- und maternal bedingten X-chromosomalen Trisomien gegenteilige Ergebnisse [88]. Aber zumindest für einen Teil der Chromosomen scheint das Auftreten von Fehlverteilungen nicht ausschließlich mit der chromosomalen Konstitution

zu korrelieren. Die zweite Forderung nach einer verminderten Effektivität bei der Trennung anfälliger Bivalente wurden von verschiedenen Gruppen gezeigt. Volarcik *et al.* konnten zeigen, daß eine fehlerhafte Ausrichtung der Chromosomen in der Metaphaseplatte I eng mit einem erhöhten Alter der Spender korrelierten [259]. Es spricht einiges dafür, daß es verschiedene Ursachen für die Trisomien einzelner Chromosomen gibt, somit müssen die Ursachen für altersbedingte Aneuploidien möglicherweise für jedes Chromosom gezeigt werden. Eine klare Korrelation von Fehlverteilungen und der Lokalisation von Chiasmata entlang der Bivalente konnte jedoch für bestimmte Chromosomen gezeigt werden.

2.3.2 Ursachen numerischer Aberrationen

Es ist bekannt, daß Trisomien beim Menschen mit steigendem Alter der Frau zunehmen, und daß sie mit einem veränderten Rekombinationsmuster der Chromosomen korreliert sind. Dies ist in sofern erstaunlich, als daß die Rekombinationsereignisse schon im Embryo stattfinden und somit 15 bis 45 Jahre vor der fehlerhaften Trennung der Chromosomen erfolgt sind (siehe auch 2.2.1.1 auf Seite 10 und Abbildung 2.1 auf Seite 5). Für eine korrekte Segregation der Chromosomen in der Meiose I sind verschiedene Faktoren ausschlaggebend, die direkt mit der Anzahl und der Position der Crossover und der Chiasmata verknüpft sind. Die Verteilung von Crossover über ein Chromosom unterliegt bestimmten Charakteristika [6]:

1. Jedes homologe Chromosom eines Bivalents ist mindestens über ein Crossover verbunden,
2. die Anzahl weiterer Crossover ist eine Funktion der Länge des Chromosoms,
3. ein Crossover in einer bestimmten Region verhindert weitere Crossover in diesem Bereich, die Wahrscheinlichkeit für weitere Crossover nimmt mit der Entfernung zu,
4. Crossover-Ereignisse finden im Euchromatin nicht im Heterochromatin statt,
5. Die Frequenz und Verteilung der Crossover sind für die Geschlechter unterschiedlich.

In verschiedenen Publikationen wurde die Anzahl an Crossover- Ereignissen auf trisomen Chromosomen des Menschen untersucht. Es konnte für Chromosom 16 [87], 21 [226] und das X Chromosom [153] gezeigt werden, daß diese keine oder nur ein Crossover-Ereignis aufwiesen. Doch nicht nur die Anzahl an Crossover-Ereignissen, sondern auch ihre Lage relativ zum Zentromer, sind für eine korrekte Segregation der homologen Chromosomen von Bedeutung (siehe Abbildung 2.13 auf der nächsten Seite). Bei der Untersuchung

von Trisomien konnte sowohl für den Menschen (Chromosom 16 und 21) als auch für *Drosophila* (X Chromosom) gezeigt werden, daß eine distale Lage der Chiasmata mit einer höheren Fehlerrate in der MI korrelieren und proximal gelegene Chiasmata eine erhöhte Fehlerrate in der MII zur Folge haben [119, 128, 226]. Interessant sind in diesem Zusammenhang verschiedene Publikationen, in denen die Rolle des Rec8 Proteins in *S. pombe* untersucht wird (siehe auch 2.2.1.1 auf Seite 10). In $rec8^-$ *S. pombe* konnte gezeigt werden, daß die Rekombinationshäufigkeit um das Zentromer herum stark verringert ist, es jedoch keinen Einfluss auf die Rekombinationsfrequenz am Telomer hat. Rec8 wird in *S. pombe* unter Anderem für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen benötigt [188].

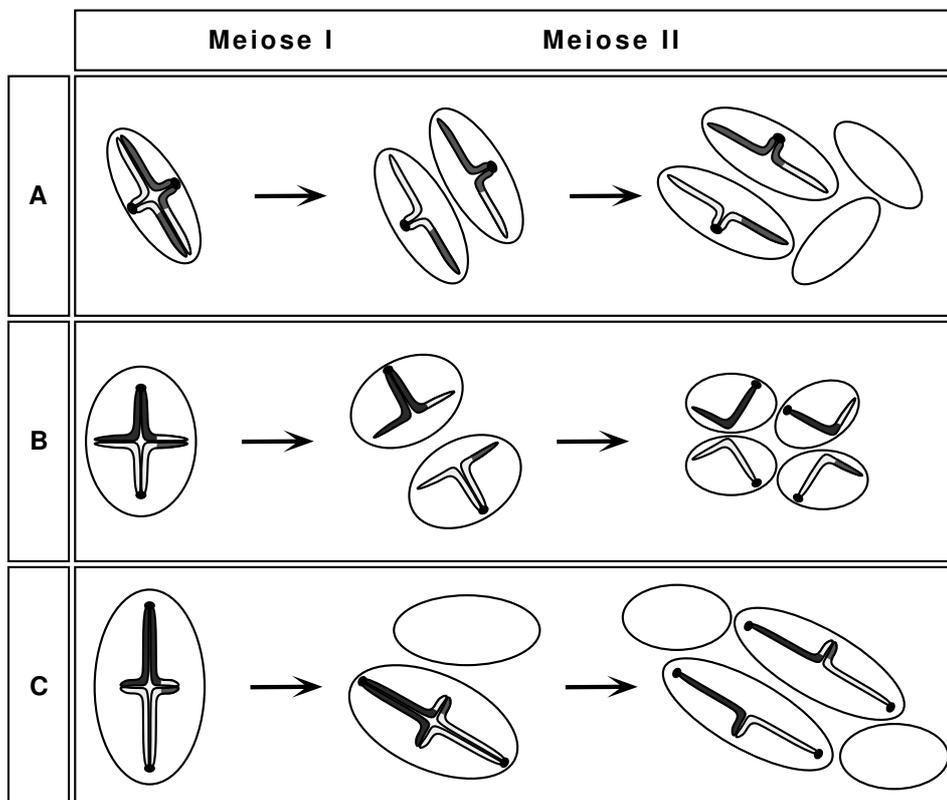


Abb. 2.13: Schematische Darstellung der Korrelation zwischen der Lage der Chiasmata und des Auftretens von Fehlverteilungen in der MI oder MII
 A. Keine Trennung der Schwesterchromatiden in der MII bei proximaler Lage der Chiasmata
 B. Normale Segregation in M I und M II bei medialer Lage der Chiasmata
 C. Keine Trennung der Bivalenten in der MI bei distaler Lage der Chiasmata

Die Ursache für die altersbedingte Zunahme an Trisomen kann an verschiedenen Faktoren liegen: In der Oozyte selber, im Uterus also dem Gewebe, welches den Fötus aufnehmen und möglicherweise auch selektionieren soll, und dem neuroendokrinen System, welches die Signale für die Reifung und Ovulation der Oozyte in der richtigen spatiotemporalen Abstimmung geben muß. Transfers von Oozyten junger Frauen auf ältere Empfänger zeigen keine reduzierte Selektion auf fehlerhafte Zygoten. Somit ist verminderte Selektion im älteren Organismus mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen [121, 277]. Der hormonelle Status scheint beim Menschen Ausschlaggebend zu sein. Oozyten-Spender werden einem Superovulationsprotokoll unterzogen werden, welches drastisch in den normalen Hormonhaushalt eingreift. Es wurde von verschiedenen Autoren gezeigt, daß die Superovulation zu einer Erhöhung der Rate aberranter Oozyten führt [199, 251]. Versuche, in denen älteren Frauen sowohl ihre eigenen als auch Oozyten jüngerer Spender transferiert wurden (sie also dem gleichen Superovulationsprotokoll unterzogen wurden), zeigen eine höhere Schwangerschaftsrate für die fremden als für die eigenen Oozyten [141, 171, 172]. Somit scheint die Ursache für eine erhöhte Aberrationsrate der Oozyten ältere, Frauen zumindest teilweise in den Oozyten selber zu liegen.

Neben der oben diskutierten Rolle der Chiasmata zeigt auch die Spindel Veränderungen, die mit dem Alter der Oozytenspender korrelieren. Volarcik *et al.* konnten für eine kleine Anzahl von untersuchten Oozyten zeigen, daß in der Gruppe der Metaphase I-Oozyten älterer Spender einige der Zellen eine veränderte Spindelmorphologie aufwiesen. Ausserdem zeigten diese Oozyten eine unvollständige Einordnung der Chromosomen in den Spindeläquator, mit einzelnen Chromosomen, die zwischen dem Äquator und dem Spindelpol lagen [259].

2.4 Die Maus als Modellorganismus für numerische Aberrationen während der Meiose

Die CBA/Ca Maus ist ein geeignetes Modell, an dem man das Phänomen der Altersaneuploidie untersuchen kann, da sie verschiedenen Voraussetzungen erfüllt:

- A. eine erhöhte Aneuploidierate in Embryonen, die gegen Ende der natürlichen Reproduktionsphase gezeugt werden [18, 71],
- B. eine altersabhängige Zunahme an Aneuploidien in den Oozyten, die mit der Leerung der Ovarien korreliert [18] und nicht mit dem physiologischen Alter des Spenders,
- C. einen limitierten Vorrat an Oozyten, der gegen Ende der Reproduktionsphase erschöpft ist,

- D.** verglichen mit anderen Mausstämmen eine insgesamt geringe Anzahl an Oozyten im adulten, reproduktionsfähigen Tier.

Die unter A bis D genannten Punkte zeigen große Ähnlichkeit zu den Beobachtungen im Menschen. Damit lassen sich viele der im Menschen gemachten Beobachtungen in diesem Tiermodell systematisch analysieren.

2.5 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Die Mechanismen und Ursachen, die zu dem Phänomen der altersabhängige Aneuploidie im Menschen führen können, sind nicht hinreichend geklärt. Daher ist es ein Ziel dieser Arbeit, die Bedingungen die in den weiblichen Keimzellen zu den chromosomalen Aberrationen führen können genauer zu verifizieren. Dazu sollte geklärt werden,

- A.** wann die Aneuploidien angelegt werden,
- B.** welchen Einfluss der hormonelle Status auf die Qualität der Oozyten hat,
- C.** welche Rolle das physiologische Alter der Spenderin bei der Produktion aneuploider Oozyten hat und
- D.** in welchem Umfang sich die CBA/Ca als Modellorganismus für die Untersuchung dieser Fragestellung eignet.

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Verwendete Tiere und Bestimmung des Ovulationszyklusses

3.1.1 Tiere

Für die hier vorgestellten Arbeiten wurden Mäuse des Inzuchtstammes CBA/Ca verwendet, diese stammten sowohl aus unserer eigenen als auch aus der Zucht des Lieferanten (Harlan Winkelmann GmbH). Für diese Untersuchung wurden ausschließlich geschlechtsreife 6- 48 Wochen alte Weibchen verwendet. Wenn nicht ausdrücklich anders vermerkt, wurden die Tiere nicht hormonell stimuliert (superovuliert). Die Tiere wurden in zwei Gruppen unterteilt: die jungen und die alten Tiere. Die jungen Tiere waren zwei bis vier Monate alt, und die alten Tiere mußten mindestens neun Monate alt sein und aus der laufenden Zucht kommen. Die Tiere wurden in einem zwölfstündigen Hell/Dunkelrhythmus gehalten und erhielten Futter und Wasser *ad libitum*.

3.1.2 Injektion der Tiere mit Gonadotrophinen

Zur Stimulation des Follikelwachstums wurde den Tieren 44 Stunden vor der Präparation 5 Internationale Einheiten (international units, IU) Pregnant mares serum gonadotropin (PMSG) intraperitoneal (i.p.) gespritzt. Es wurden nur Tiere verwendet, die sich im Diöstrus befanden. Die Injektion wurden abends durchgeführt.

3.1.3 Bestimmung des Ovulationszyklusses

Mäuse haben einen regelmässigen Zyklus, der sich über einen Zeitraum von von 4-5 Tagen erstreckt. Der Zyklus wird in vier verschiedene Stadien, Diöstrus, Proöstrus, Östrus und Metöstrus unterteilt, die sich in der zellulären Zusammensetzung des Vaginalabstriches unterscheiden. Die zelluläre

Zusammenstzung der verschiedenen Stadien ist in Tabelle 3.1 beschrieben.

Tabelle 3.1: Zelluläre Zusammensetzung des Vaginalabstriches

Phase	Zelluläre Zusammensetzung
Diöstrus	Viele Leukozyten, kaum andere Zellen
Proöstrus	Viele runde, epitheliale Zellen, wenige abgeflachte, verhornte epitheliale Zellen, wenige runde Leukozyten.
Östrus	Viele verhornte, abgeflachte, tote Zellen
Metöstrus	Weniger epitheliale Zellen- und mehr Leukozyten als im Östrus

Für einen Abstrich wird die Vagina der Maus mit Wasser gespült, und die Zellen werden im Phasenkontrast bei 100 x Vergrößerung ausgewertet.

3.2 *In vitro* Reifung der Oozyten

3.2.1 Wasser für die Kultur

In früheren Arbeiten (Diplomarbeit D. Soewarto (1994)) konnte gezeigt werden, daß die Qualität des für die Herstellung des Kulturmediums verwendeten Wassers von entscheidender Bedeutung für die Effizienz der Zellkultur ist. Deionisiertes Milliporewasser wurde für zwölf Stunden mit Aktivkohle inkubiert und anschließend drei Mal filtriert (Faltenfilter von Schleicher und Schüll). Dieses Wasser wurde maximal eine Woche für die Herstellung von Kulturmedien verwendet.

3.2.2 Herstellung der Kapillaren für die Manipulation der Oozyten

Für die Isolation und das Arbeiten mit den Oozyten wurden Glaskapillaren (Clerk Electromedical Instruments, GL 150T-10) verwendet. Die Kapillaren wurden mit einem Detergenz (Wasser mit einem Tropfen Pril) und Aceton gespült, anschließend getrocknet und über einem Bunsenbrenner ausgezogen. Die so präparierten Kapillaren wurden vor der Verwendung so gekürzt, daß eine Kapillare mit einem adäquaten Durchmesser entstand.

3.2.3 Medien und andere Lösungen

Die verwendeten Medien wurden sterilfiltriert (Renner, 0,2 μm) verwendet und aus Stammlösungen hergestellt, die in Tabelle 3.8 auf Seite 49 aufgeführt

sind. In Tabelle 3.2 ist die Zusammensetzung des modifizierten M2 Kulturmediums [52], modifiziert nach Fulton [65], beschrieben.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung des modifizierten M2 Mediums

Substanz	Endkonzentration [mM]	Molekulargewicht	g/Liter
NaCl	99,23	58,450	5,800
KCl	2,58	74,557	0,192
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,80	147,20	0,265
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,36	v	0,050
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,49	v	0,100
NaHCO ₃	4,15	84,020	0,336
HEPES	20,00	238,300	4,696
Natrium-Lactat	22,00	112,100	2,466
Ca-Lactat	2,0	v	0,218
Na-Pyruvat	0,25	110,000	0,028
Glukose			1,000
BSA			4,000
Penicillin G Na-Salz			0,060
Streptomycin Sulfat			0,050
Phenolrot			0,010
H ₂ O			auf 1 Liter

Tabelle 3.3: Zusammensetzung von Stammlösung A

Stock A	Substanz	g/100ml
10 x konzentriert	NaCl	5,800
	KCl	0,192
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,050
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,100
	Natrium-Lactat	2,466
	Glukose	1,000
	Penicillin G Na-Salz	0,060
	Streptomycin Sulfat	0,050
	Ca-Lactat	0,218

Tabelle 3.4: Zusammensetzung von Stammlösung B

Stock B	Substanz	g/100ml
10 x konzentriert	NaHCO ₃	2,101
	Phenolrot	0,010

Tabelle 3.5: Zusammensetzung von Stammlösung C

Stock C	Substanz	g/10ml
100 x konzentriert	Na-Pyruvat	0,028

Tabelle 3.6: Zusammensetzung von Stammlösung D

Stock D	Substanz	g/10ml
100 x konzentriert	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,265

Tabelle 3.7: Zusammensetzung von Stammlösung E

Stock E	Substanz	g/100ml
10 x konzentriert	HEPES	4,696
	Phenolrot	0,010

Der pH der Stammlösung E wurde mit 5N NaOH auf 7,4 eingestellt. Das Medium wurde aus den Stammlösungen hergestellt mit 4mg/ml BSA supplementiert und sterilfiltriert (Renner 0,2µm).

Tabelle 3.8: Herstellung des Mediums aus den Stammlösungen

Stock	Menge für 50 ml
A (10 fach)	5,0 ml
B (10 fach)	0,8 ml
C (100 fach)	0,5 ml
D (100 fach)	0,5 ml
E (10 fach)	4,2 ml
H ₂ O	39,0 ml
BSA	200,0 mg

Das Kulturmedium wurde aus Stammlösungen hergestellt und anschließend bis zu 48 Stunden in Kultur verwendet. Die Stammlösungen wurden mit dem oben beschriebenen Wasser angesetzt, sterilfiltriert (Renner 0,2µm) und bis zu 4 Wochen zur Herstellung von Kulturmedium verwendet. Die

Stammloösungen A und E wurden bei 4°C - und die Stammlösungen B, C und D gebrauchsfertig aliquotiert, bei -20°C gelagert.

Für das Anstechen der Follikel wurde ein Medium (M2+) mit einer BSA-Konzentration von 14 mg/ml verwendet. Alle verwendeten Medien wurden vor dem Einsetzen der Zellen oder Organe auf 37°C vorgewärmt.

3.2.4 Isolation und Kultur der Oozyten

Für die Präparation wurden alle Medien und das Präparierbesteck vorgewärmt. Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet, die Bauchdecke geöffnet und die Ovarien herauspräpariert und in M2 Medium überführt. Alle weiteren Schritte fanden in mediumgefüllten Petrischalen (Falcon, 35mm bzw. 60mm Durchmesser) statt. Im nächsten Schritt wurden die Ovarien von dem sie umgebenden Fettgewebe befreit und das Ovar in M+ Medium überführt. Im folgenden Schritt wurden die Follikel mit einer Kanüle punktiert und die Oozyten durch vorsichtiges auf- und abpipettieren von den sie umgebenden Follikelzellen befreit. Es wurden ausschließlich Zellen mit einem intakten Kern (Keimbläschen, germinal vesicle, GV) und einem Durchmesser von etwa 70 bis 90µm verwendet. Diese wurden aus dem M2+ Medium einmal in M2 Medium gewaschen und anschließend in M2 Medium kultiviert. Die Präparationszeit betrug maximal 20 Minuten, um eine gute Synchronität der Zellkulturen zu gewährleisten. Die Reifung der Zellen erfolgte bei 37°C in Vierlochschalen (Fa. Nunc) in einem unbegasteten Inkubator bei 100 % Luftfeuchtigkeit. In Versuchsansätzen, in denen die Zellen in Drogen inkubiert werden sollten, wurden diese so in DMSO vorverdünnt, daß immer gleiche Volumina der gelösten Droge bzw. des Lösungsmittels zugesetzt wurden.

3.2.5 Drogen

3.2.5.1 Nocodazol

Eine Stammlösung von 3mg/ml Nocodazol wurde in DMSO angesetzt und bei 4°C für 12 bis 15 Monate verwendet. Für die Inkubationen mit Nocodazol wurden Inkubationen mit verschiedenen Konzentrationen der Droge durchgeführt [158, 221], die eingesetzten Konzentrationen werden in der Auswertung beschrieben (88). Als Kontrolle wurden parallel Inkubationen mit gleichen Volumina DMSO ohne die Droge durchgeführt.

3.3 Bestimmung der Reifungskinetik und der Reifungsrate

Für die Bestimmung der Reifungskinetik wurden die Zellen in stündlichen Intervallen bei sechzigfacher Vergrößerung unter dem Binokular beobach-

tet. Die Rate an Zellen mit und ohne Keimbläschen, Zellen mit Polkörper und atretische Zellen wurden gezählt. Die Signifikanz von Unterschieden zwischen den untersuchten Gruppen wurde mit Hilfe des Fisher-Tests überprüft [228]. Zu diesem Zweck wurden die gezählten Häufigkeiten in einer Vierfeldertafel (siehe Tabelle 3.9) eingetragen. In die Spalten der Vierfeldertafel wurden die durch das Versuchskonzept bedingten Gruppen eingetragen. Der Eintrag in die Reihen ergab sich aus dem Bezug der Einzeldaten zum gemeinsamen Median der Meßdaten beider Gruppen.

Tabelle 3.9: Vierfeldertafel 1

Gruppenzugehörigkeit	Jung	Alt	Spaltensummen
> Median	A	B	A+B
≤ Median	C	D	C+D
Reihensumme	A+C	B+D	N

Die exakte Wahrscheinlichkeit, daß die N Fälle sich wie beobachtet auf die Vierfeldertafel verteilen, erhält man durch Einsetzen in Formel 3.1.

$$p = \frac{(A+B)!(C+D)!(A+C)!(B+D)!}{N!A!B!C!D!} \quad (3.1)$$

Die Reifunrate wurde nach 14 bis 16 Stunden bestimmt, indem die Anzahl von Zellen mit Polkörper gezählt wurde.

3.4 Zytogenetische Analyse

3.4.1 Spreitung und chromosomale Analyse der Oozyten

3.4.1.1 Verwendete Materialien

Tabelle 3.10: Für die Spreitung benötigte Chemikalien

Lösung	Zusammensetzung
Hypotone Lösung	1% Tri-Na-Citrat-Dihydratlösung
Fixierlösung	Methanol / Eisessig (3/1), 0°C

3.4.1.1.1 Verwendete Lösungen Die hypotone Lösung wurde sterilfiltriert (Renner, 2µm) und 5-7 Tage verwendet. Das Fixativ wurde für jeden Versuch frisch angesetzt und auf Eis gelagert.

3.4.1.1.2 Vorbehandlung der Objektträger Auf die verwendeten Objektträger wurde ein Kreis von etwa 10mm Durchmesser gekratzt und die Objektträger danach für mindestens 24 Stunden in Methanol / HCl (1ml

HCl (rauchend) auf 300 ml Methanol) eingelegt. Kurz vor Gebrauch wurden die Objektträger mit einem Papiertuch (Kimberley-Clark) gereinigt.

3.4.1.2 Spreitung der Oozyten

Für die Untersuchung der chromosomalen Konstitution der M II Oozyten wurden diese nach 16 bis 18 Stunden gespreitet [243].

Für die Untersuchungen der frühen M I Stadien wurden die Zellen aussortiert, deren Keimbläschen sich aufgelöst hatten. Die aussortierten Zellen wurden nach 30 Minuten nach der Auflösung des Keimbläschens gespreitet. Für die Spreitungen wurde die modifizierte Methode von Tarkowski [243] eingesetzt. Die Zellen wurden für 15-20 Minuten bei Raumtemperatur in der hypotonen Lösung (siehe 3.10 auf der vorherigen Seite) inkubiert und anschließend je 3-6 Zellen mit einer Kapillare mit großem Spitzendurchmesser ($\approx 100 \mu\text{m}$) in die Fixierlösung überführt. Unter dem Mikroskop wurde das Platzen der Zellen und das Austreten des Zytoplasmas beobachtet und die Zellen dann in einem Tropfen Fixierlösung auf einen der vorbereiteten Objektträger aufgebracht. Mit einem weiteren Tropfen Fixierlösung wurden die Zellen nachfixiert und die Objektträger anschließend luftgetrocknet.

3.4.2 C-Bandierung gespreiteter Chromosomen

3.4.2.1 Verwendete Materialien

Tabelle 3.11: Für das C-Banding benötigte Substanzen

Lösung	Zusammensetzung
Bariumhydroxyd ($\text{Ba}(\text{OH})_2$)	3,6 g in 86,4ml H_2O (4% (w/v)) bei 37°C
HCl	0,2M
2 x SSC	aus 20 x SSC mit 2M HCl auf pH 7,0 eingestellt und auf 65°C vorgewärmt
Gurr-Phosphatpuffer	1 Gurr Tablette (BDH England) in 100 ml 2x desilliertes H_2O , autoklaviert
Giensa-Färbelsg.	4% Giensa (BDH England) Gurr Puffer, durch Faltenfilter filtriert
Xylol(Fluka Deutschland)	
Eukitt (O. Kindler, Deutschland)	

3.4.2.2 Durchführung der Färbung

Die Chromosomenpräparate müssen für das C-Banding gealtert werden. Die Alterung erfolgt entweder für 6 Tage bei Raumtemperatur oder 16-18 Stunden bei 60°C . Die gealterten Präparate werden 60 Minuten in 0,2 M HCl denaturiert und anschließend 2 x mit destilliertem H_2O gespült. Im nächsten Schritt werden die Präparate 3-4 Minuten in $(\text{Ba}(\text{OH})_2)$ inkubiert (siehe 3.11

auf der vorherigen Seite) und anschließend sehr gründlich in H₂O gespült. In der folgenden 60 minütigen Inkubation in 2 x SSC bei 65°C renaturieren die Chromosomen wieder. Nach zweimaligem Waschen in H₂O werden die Präparate für 15-20 Minuten in Giemsalösung gefärbt und erneut gründlich mit H₂O abgespült und bei Raumtemperatur getrocknet. Die trockenen Präparate werden bei 100 facher Vergrößerung unter Immersionsöl ausgewertet. Nach der Auswertung wurde das Immersionsöl durch waschen in Xylol (2 x 10 Minuten) wieder entfernt und die Präparate mit Eukitt eingedeckelt.

3.4.2.3 Auswertung der gefärbten Chromosomenpräparate

Der haploide Chromosomensatz der Maus besteht aus 20 akrozentrischen Chromosomen. In der Metaphase I (MI) liegen diese als Bivalente vor, die aus gepaarten Homologen bestehen. In der Metaphase II (MII), also nach Abschnürung des Polkörpers findet man, im Normalfall 20 Univalente, die aus Chromatiden bestehen, welche noch über die Zentromere assoziiert sind. Die Auswertung erfolgte bei 1000 facher Vergrößerung am Axioplan-Mikroskop von Zeiss (Oberkochen, Deutschland). In das Axiophot-Photomikroskop war eine Kamera für die Photodokumentation integriert. Die Spreitpräparate wurden mit einem T_{max} 100 Film von Kodak aufgenommen. Ein Chromosomensatz mit 20 Bivalenten (MI) bzw. 20 Univalenten (MII), wurde als euploid bewertet. Die Zellen wurden gemäß den Angaben in 3.4.1.2 gespreitet. Für die Messungen der Abstände zwischen einzelnen Chromatiden der früh gespreiteten MI Oozyten (siehe 4.3.2 und 4.7 und 4.6) wurden nur euploide Chromosomensätze ausgewertet. Für die Vermessung der früh gespreiteten MI Chromosomen wurden die Spreitungen mit einer Videokamera (Olympus VC150) aufgenommen und über einen Computer auf einem Monitor abgebildet. Die zu messenden Parameter (siehe 71) wurden mit einem Lineal direkt am Monitor vermessen und die Werte entsprechend der Vergrößerung in μM umgerechnet.

3.4.2.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde der χ^2 Test verwendet, da die Gruppen unabhängig sind und die zu untersuchenden Daten in diskreten Kategorien vorliegen. Da die Häufigkeiten der untersuchten Faktoren sehr gering war, wurde die Korrektur von Yates angewandt [228].

3.5 Immunfluoreszenz

Neben der chromosomalen Konstitution der Zellen sollte die Form der Spindel untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

Grundsätzlich unterteilt sich diese Methode in zwei Schritte: Zuerst werden

die Zellen extrahiert, um sie für den Anti-Tubulin-Antikörper zugänglich zu machen [50, 52]. Anschließend werden die Zellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen α -Tubulin (1:400 in PBS) aus der Maus inkubiert. Dieser wird mit einem FITC (**F**luoro-**I**sothio-**C**yanat) gekoppeltes Anti-Maus IgG (1:40 bis 1:60 in PBS) nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte am Axiophot-Photomikroskop und die Dokumentation auf einem T_{max} 400 Film von Kodak.

3.5.1 Verwendete Materialien und Aufbereitung

3.5.1.1 Extraktionspuffer

Die Zellen wurden mit dem Extraktionspuffer A (siehe Tabelle 3.12) behandelt, um Proteine aus dem Zytoplasma zu lösen, die Zugänglichkeit der Spindel für den Antikörper zu verbessern und den unspezifischen Hintergrund so gering wie möglich zu halten [40]. Extraktionspuffer B wurde verwendet, um die vorbehandelten Objektträger zu benetzen, er unterscheidet sich von Extraktionspuffer A nur darin, daß er kein KCl enthält.

Tabelle 3.12: Extraktionspuffer A

Substanz	Konzentration
HEPES	20,0 mM
MgCl ₂	0,5 mM
EGTA pH 7,5	5,0 mM
TritonX-100	2,0 %
PMSF	20,0 μ M
Glycerin	25,0 %
KCl	50,0 mM

Der Puffer wurde mit 2M NaOH bei 30°C auf pH 6,75 eingestellt und bei 4°C gelagert. Er konnte bis zu einem Monat verwendet werden.

3.5.1.2 Weitere Lösungen und Antikörper für die Immunfluoreszenz

Tabelle 3.13: Lösungen für Immunfluoreszenz

Substanz	Konzentration, Lagerung, Gebrauchskonzentration
Pronase (Boehringer)	7 mg/ml in M2 Medium , Aliquots bei -20°C bis 6 Monate haltbar, 7mg/ml in M2
Poly-L-Lysin (Sigma)	10 mg/ml in 2x destilliertem H ₂ O, Aliquots

Fortsetzung auf folgender Seite

Fortsetzung von vorheriger Seite

Substanz	Konzentration, Lagerung, Gebrauchskonzentration
	bei -20°C bis 6 Monate haltbar, 1mg/ml in H ₂ O
PBS pH 7,3 (Oxoid)	1 Tablette/100ml H ₂ O autoklaviert
1,4-Diazobizyclo-octan (DABCO, Sigma)	2mg DABCO/1ml PBS/20% Glycerol, bei 4°C bis zu 3 Monaten haltbar
4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, Sigma)	0,2 mg/ml in 2x destilliertem H ₂ O, bei -20°C bis 6 Monate haltbar, vor Gebrauch: 10µg/ml in PBS
Methanol	-20°C

Tabelle 3.14: Antikörper für Immunfluoreszenz

Antikörper	Konzentration, Lagerung, Gebrauchskonzentration
Monoklonaler Anti- α -Tubulin Antikörper (IgG)	bei -70°C, vor Gebrauch 1:400 in PBS mit 0,01% NaN ₃
Polyklonaler Anti-Maus Antikörper (IgG)	bei -20°C, vor Gebrauch 1:60 in PBS verdünnen

3.5.1.3 Vorbereitung der Objektträger

Mit einem Diamantstift wurde ein Ring von etwa 10mm Durchmesser auf den Objektträger gekratzt. Die so markierten Objektträger wurden in Methanol gelegt und nach einigen Minuten gründlich mit einem Tuch (Kimberley-Clark) geputzt. Der Ring wurde anschließend mit einem Ring aus Vulkanisierlösung ("Fahradkleber", TipTop, Stahlgruber, München) überdeckt. Die so präparierten Objektträger mußten mindestens 24 Stunden ausdünsten. Direkt vor dem Aufbringen der extrahierten Zellen wird die Oberfläche im Ring nacheinander mit Poly-L-Lysin beschichtet, mit H₂O gespült und mit Extraktionspuffer B (siehe 3.5.1.1 auf der vorherigen Seite) benetzt.

3.5.2 Indirekte Immunfluoreszenz

3.5.2.1 Extraktion

Zu Beginn der indirekten Immunfluoreszenz mußte die Zona Pelluzida der Oozyten durch vorsichtiges Andauen in Pronase (siehe 3.13) entfernt werden. Die Pronase wurde 30 Minuten vor Gebrauch auf 37°C erwärmt und abzentrifugiert. Anschließend wurden je ein Tropfen Pronase und drei Tropfen M2 Medium (siehe 3.2 auf Seite 48) einzeln in eine Kulturschale gesetzt. Die Zellen wurden unter Beobachtung etwa vier Minuten in der Pronase

belassen und dann im ersten Waschtropfen M2 Medium durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren von der Zona befreit. Zur bestmöglichen Entfernung der Pronase wurden die Zellen insgesamt drei Mal in M2 Medium gespült. Anschließend erfolgte die Extraktion. Dazu wurde der Extraktionspuffer A (3.12 auf Seite 54) in einem Uhrglasschälchen auf 37°C vorgewärmt und die Oozyten vorsichtig in den Puffer überführt. Die Zellen wurden für 45- bis 60 Minuten bei 37°C extrahiert.

3.5.2.2 Fixierung

Nach der Extraktion wurden die Zellen mit einer Kapillare (siehe 3.2.2 auf Seite 47) auf die vorbereiteten Objektträger (siehe 3.5.1.3 auf der vorherigen Seite) aufgebracht und der überschüssige Extraktionspuffer abgesogen. Der Objektträger wurde anschließend für 7 Minuten im Fixativ (Methanol, -20°C) inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen zwei Mal je 10 Minuten in PBS rehydriert.

3.5.2.3 Anti-Tubulin Immunfluoreszenz und DAPI-Färbung der Chromsomen

Nach der Rehydrierung in PBS werden etwa 20µl Anti-α-Tubulin (1:400 in PBS) (siehe 3.14 auf der vorherigen Seite) in den Ring aus Fahrradkleber pipettiert. Die Inkubationszeit mit dem Erstantikörper hängt von der Temperatur ab, bei der die Objektträger inkubiert werden. Bei 37°C reicht eine Inkubationsdauer von 45- 60 Minuten; 12 bis 14 Stunden dauert es bei 4°C und es schließt sich noch eine einstündige Inkubation bei 37°C an. Gewaschen werden die Objektträger zwei Mal je 20 Minuten in PBS bei 37°C. Für den Nachweis werden 20µl eines FITC gekoppeltes Anti-Maus IgG, (1:40 bis 1:60 in PBS) in den Ring pipettiert und die Objektträger für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Alle Inkubationen mit den Antikörpern werden in einer feuchten Kammer durchgeführt, um das Austrocknen der Präparate zu vermeiden. Anschließend wurden die Präparate 20 Minuten bei Raumtemperatur in PBS gewaschen. Um die Chromosomen zu färben wurden die Objektträger anschließend abgetrocknet, mit 15 bis 20 µl DAPI (siehe 3.13 auf Seite 54) überschichtet und 20 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der DAPI Färbung wurden die Objektträger in PBS gestellt und sofort mit einem Deckglas verschlossen. Dazu wurde der Ring aus Fahrradkleber entfernt. Aus Fahrradkleber wurden kleine Abstandhalter für die Deckgläser aufgesetzt. Um ein Ausbleichen der Präparate zu vermeiden, wurden diese mit 20µl DABCO eingedeckelt und anschließend mit Fahrradkleber versiegelt.

3.6 Analyse der Histon-H1- und MBP Kinase Aktivität

Im Verlauf der Meiose verändern sich sowohl die MPF- als auch die MAP-Kinase-Aktivität. Diese Aktivitätsänderungen werden streng kontrolliert und sie regeln u. a. die Auflösung der Kernmembran und die Kondensation der Chromosomen (siehe 3.6.1.2 auf der nächsten Seite). Aus der Mitose ist bekannt, daß die Zyklin-assoziierten Kinasen ein wichtiges Ziel für die Zellzykluskontrollpunkte sind. Die Aktivität der Kinasen wurde bestimmt, um mögliche Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen zu charakterisieren und diese mit den anderen spezifischen Merkmalen der Gruppen zu korrelieren.

3.6.1 Verwendete Materialien und Aufbereitung

3.6.1.1 Lösungen für Kinase-Assey

Tabelle 3.15: Reaktionspuffer für das Kinase-Assey

Substanz	Stamm- lösung	2 x Stock Konzentration
β -Glyzerinphosphat	1,0M	300,0 mM
EGTA pH 7,3	0,5 M	180,0 mM
MgCl ₂	1,0M	40,0 mM
DTT	0,1 M	4,0 mM
Leupeptin (Boehringer)	25,0 mg/ml	1,0 mg/ml
Aprotinin (Boehringer)	25,0 mg/ml	1,0 mg/ml
Pepstatin (Boehringer)	25,0 mg/ml	1,0 mg/ml
Pefablock (Boehringer)	25,0 mg/ml	0,4 mg/ml
Adenosin Triphosphat (ATP)	0,1 M	4,0 mM
Na-Orthovanadate (Sigma)	10,0 mM	0,4 mM
Inhibitor der cAMP-abhängigen PKA (Sigma)	50,0 μ M	1 μ M
Rinderserum Albumin	25,0 mg/ml	10,0 mg/ml

Tabelle 3.16: Markierungspuffer für das Kinase-Assey

Substanz	Stamm- lösung	Endkon- zentration
Histon HI (Typ III, Sigma)	100,0 μ g/ml	11,25 μ g/ml
Myelin Basic Protein (MBP, Sigma)	20,0 μ g/ml	3,75 μ g/ml

Fortsetzung auf folgender Seite

Fortsetzung von vorheriger Seite

Substanz	Stamm- lösung	Endkon- zentration
$\gamma\text{P}^{32}\text{dATP}$ (Hartmann)		185,0tBq/mMol
Ausschließlich unstabilisiertes $\gamma\text{P}^{32}\text{dATP}$ (FP 401) verwenden!		

Tabelle 3.17: Probenpuffer (2x Lämmli)

Substanz	Konzentration
Phosphatpuffer pH 6,8 (NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4)	10,0 mM
Sodium-dodecyl Sulfat (SDS)	5%
β -Merkaptoethanol	10,0 %
Glyzerin	10,0 %

3.6.1.2 Aufbereitung der Zellen für das Kinase-Assey

Für das Kinase-Assey wurden Proben, die aus jeweils drei Zellen bestanden, verarbeitet. Für alle Versuche wurden die Kulturen synchronisiert, indem nach 90 Minuten die Zellen aussortiert wurden die das Keimbläschen noch nicht aufgelöst hatten. Zu den ausgewählten Zeiten wurden die drei Zellen den Kulturen entnommen, in $2\mu\text{l}$ M2 Medium in Reaktionsgefäße (Eppendorf, 1,5 ml mit Schraubdeckel) pipettiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen konnten bei -70°C bis zu 14 Tagen aufbewahrt werden. Für das-Assey wurden die Proben auf Trockeneis gelagert und $2\mu\text{l}$ Reaktionspuffer (siehe 3.15 auf der vorherigen Seite) an den Rand des Caps pipettiert. Die Caps wurden dann bei 4°C 20 Sekunden bei 12 kUpm zentrifugiert und sofort wieder auf Trockeneis gelagert. Die Lyse erfolgte durch eine Inkubation im Wasserbad bei 30°C für 60 Sekunden und erneutem Einfrieren. Als nächstes wurde $1\mu\text{l}$ Markierungspuffer (siehe 3.16 auf der vorherigen Seite) an den Rand des Caps pipettiert und die Proben erneut zentrifugiert (Raumtemperatur, 60 Sekunden, 12 kUpm). Anschließend wurden die Proben 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von $5\mu\text{l}$ Probenpuffer (siehe 3.17) beendet ([254]).

Um die unspezifische Assoziation von $\gamma\text{P}^{32}\text{dATP}$ an das Substrat zu bestimmen, wurden als Kontrolle Proben mitgeführt, die keine Zellen enthielten. Diese Kontrollen wurden genau wie die Proben behandelt und am Ende auch auf das Gel aufgetragen. Die in den Kontrollen gemessenen Aktivitäten wurden von den jeweiligen Meßwerten subtrahiert und diese dann weiterverarbeitet. Für die Gelelektrophorese (siehe 3.6.2.2 auf Seite 60) wurden die Proben 2 Minuten gekocht, auf Eis abgekühlt und auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen (siehe 3.6.2.2 auf Seite 60) [257, 254].

3.6.2 Trennung der Proteine in der SDS-Polyacrylamid Gel elektrophorese und Bestimmung der spezifischen Aktivität der Substrate

3.6.2.1 Herstellung des Polyacrylamid-Gels

Die Proben der Kinase-Asseys wurden in einem 15%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.

Tabelle 3.18: Polyacrylamid Gel

Substanz	Menge	
	Trenngel	Sammelgel
30% Acrylamidmix (Acrylamid: Bisacrylamid 30:1)	25,0 ml	1,7 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	12,5ml	—
1M Tris-HCl, pH 6,8	—	1,25 ml
H ₂ O	11,5 ml	6,8 ml
10% SDS	0,5 ml	0,1 ml
10% Ammoniumpersulfat	0,5 ml	0,1 ml
TEMED	20,0 μ l	10,0 μ l

Tabelle 3.19: Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese Puffer

Substanz	Konzentration
Tris-Base	25,0 mM
Glycin	250 mM
SDS	0,1%

Tabelle 3.20: Färbelösung

Substanz	Menge
Coomassie Brilliant Blue R250	0,25 G
Methanol: H ₂ O (1:1)	90,0 ml
Eisessig	10 ml
Filtrieren durch Whatman No. 1	

Die Entfärbelösung enthält kein Coomassie. Zur Auftrennung der Substrate für die Kinasen wurde das Zweiphasen-Trennsystem nach Lämmli verwendet. Zur Herstellung der analytischen Gele wurden zwei gereinigte, entfettete Glasplatten zusammen mit Abstandhaltern geklammert und mit Agarose abgedichtet. Die Gellösung wurde wie in Tabelle 3.18 hergestellt. TEMED und APS wurden erst unmittelbar vor dem Gießen zuge-

setzt. Die Trenngellösung wurde bis zu einer Höhe von $2/3$ der gewünschten Trennstrecke zwischen die Glasplatten gegossen, sofort mit Isobutanol überschichtet und bis zur vollständigen Polymerisation (≈ 30 Minuten) bei Raumtemperatur belassen. Das Isobutanol wurde abgeschüttet, der Gel-Zwischenraum mit H_2O gespült und die Glasplatten getrocknet. Nun wurde mit Sammelgel-Lösung überschichtet und ein Kamm eingepaßt, der nach vollständiger Polymerisation entfernt werden konnte. Die Gele wurden dann in eine Elektrophoresekammer eingespannt, die Pufferkammern mit dem Elektrophoresepuffer (siehe 3.19 auf der vorherigen Seite) gefüllt und die überschichteten Auftragstaschen gründlich gespült [218].

3.6.2.2 Trennung der Proteine im Gel

Die Proteinproben wurden mit dem gleichen Volumen ($5\mu l$) Lämmli (siehe 3.17 auf Seite 58) 1 Minute bei $100^\circ C$ denaturiert, auf Eis abgekühlt, kurz abzentrifugiert und auf die Probestaschen aufgetragen. Im Trenngel wurden die Proben bei maximal 90 Volt aufgetrennt. Die Laufzeit richtete sich nach der Größe des Gels, in jedem Fall wurde die Gelektrophorese beendet, wenn die Bromphenolblaubande aus dem Gel gelaufen war. Die Gele wurden anschließend für 1 Stunde gefärbt (siehe 3.20 auf der vorherigen Seite) und 2 Mal für je eine Stunde entfärbt.

3.6.2.3 Bestimmung der Aktivität der Substrate

Der Markierungsgrad der beiden Substrate wurde mit zwei verschiedenen Methoden bestimmt.

Tabelle 3.21: Röntgenfilmentwicklung

Bezeichnung	Zusammensetzung
Röntgenfilm	Hyperfilm- β -Max, Amersham
Entwicklerlösung	Kodak D-19
Stopbad	2% Essigsäure
Fixierlösung	25% (w/v) $Na_2S_2O_3$ 5% (w/v) $K_2S_2O_5$
Szintillationsflüssigkeit	Beckmann Ready Save

3.6.2.3.1 Bestimmung der radioaktiven Markierung durch Szintillationsmessung Das entfärbte Gel wurde in eine Plastikfolie eingeschweißt, ein Röntgenfilm aufgelegt und für 12-18 Stunden bei Raumtemperatur exponiert. Zur Entwicklung der Röntgenfilme (siehe 3.21) wurden diese unter Rotlichtbeleuchtung 5 Minuten in Entwickler geschwenkt, kurz im Stopbad gespült, 10 Minuten in Fixierlösung belassen, 10 Minuten in Wasser gespült und bei Raumtemperatur getrocknet.

Für die Bestimmung der radioaktiven Markierung der Substrate wurde das Gel aus der Folie entnommen, die Substratbanden ausgeschnitten und mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit im Szintillationszähler gezählt. Um den Hintergrund messen zu können, wurden zwei Ansätze ohne Zellen inkubiert und wie die anderen Proben weiterverarbeitet. Die Substrataktivität dieser Proben wurde von der Aktivität der Ansätze mit Zellen abgezogen.

3.6.2.3.2 Bestimmung der radioaktiven Markierung mit einem Phospho-Imager Zur Auswertung mit dem Phospho-Imager (Raytest, PI-715) wurden die Gele in eine Frischhaltefolie eingewickelt, in die Expositions-kassette gelegt und mit einer Aluminiumfolie (Raytest) bedeckt. Der Screen wurde 1,5 bis 3 Stunden exponiert und anschließend im Phospho-Imager gescannt und ausgewertet.

3.7 Statistische Auswertung

Die Versuche waren so angelegt, daß immer zwei Gruppen miteinander verglichen wurden, um zu bestimmen, ob sie einer gemeinsamen Grundgesamtheit angehören oder ob sie sich voneinander unterscheiden. Für diese Art von Daten und Fragestellung können zwei verschiedene Tests verwendet werden. Dies sind der Fisher Test und der χ^2 Test. Welcher der beiden Test verwendet wird hängt davon ab, ob die Stichprobengröße N (siehe 3.2 auf der nächsten Seite) < 20 oder > 40 ist. Ist $N < 20$, wird der Fisher Test verwendet, ist $N > 40$, wird der χ^2 Test angewandt.

Zu diesem Zweck wurde wahlweise der Median oder der Mittelwert bestimmt und die Verteilung der Daten um diesen herum ausgewertet. Die so gewonnenen Verteilungen wurden in eine Vierfeldertafel eingesetzt und die Signifikanzen folgendermaßen bestimmt. Die folgenden Methoden werden beispielhaft an den Reifungsdaten aus Abschnitt 4.2.1.1.1 auf Seite 66 erläutert.

3.7.1 Fisher-Test

Tabelle 3.22: Vierfeldertafel

Gruppenzugehörigkeit	Jung	Alt	Spaltensummen
$>$ Median	A	B	A+B
\leq Median	C	D	C+D
Reihensumme	A+C	B+D	N

Tabelle 3.23: Vierfeldertafel für $t_{1,5}$

Gruppenzugehörigkeit	Jung	Alt	Spaltensummen
> Median	2	5	7
≤ Median	8	0	8
Reihensumme	10	5	15

Der gemeinsame Median beträgt 66,67 (siehe Tabelle 6.1 auf Seite 113). Die exakte Wahrscheinlichkeit, daß die N Fälle sich wie beobachtet auf die Vierfeldertafel verteilen, erhält man durch Einsetzen in Formel 3.2 (Fisher Test Ref.).

$$p = \frac{(A+B)!(C+D)!(A+C)!(B+D)!}{N!A!B!C!D!} \quad (3.2)$$

$$p_{t_{1,5}} = \frac{(7)!(9)!(10)!(6)!}{15!2!5!8!0!}$$

$$p_{t_{1,5}} = 0,007$$

3.7.2 χ^2 -Test

An diesem Beispiel wird die Vorgehensweise erläutert, wenn der Probenumfang größer als 40 ist ($N > 40$): Für $t_{2,5}$ werden die Werte (siehe Tabelle 6.3 auf Seite 114) auch in einer Vierfeldertafel aufgelistet. Da für diesen Messpunkt $N > 40$ ist, muß hier die Wahrscheinlichkeit p mit dem χ^2 -Test bestimmt werden. Dazu werden die Daten aus der Vierfeldertafel (siehe Tabelle 3.24) in die Formel 3.3 eingesetzt.

Tabelle 3.24: Vierfeldertafel für $t_{2,5}$

Gruppenzugehörigkeit	Jung	Alt	Spaltensummen
> Median	13	25	38
≤ Median	29	10	39
Reihensumme	42	35	77

$$\chi^2 = \frac{N(|AD - BC| - \frac{N}{2})^2}{(A+B)(C+D)(A+C)(B+D)} \quad (3.3)$$

$$\begin{aligned}\chi^2 &= \frac{77(|29 \cdot 25 - 10 \cdot 13| - \frac{77}{2})^2}{(29 + 10)(13 + 25)(29 + 13)(10 + 25)} \\ \chi^2 &= 10,95 \\ p_{t_{2,5}} &\leq 0,001\end{aligned}$$

Kapitel 4

Ergebnisse

In der folgenden Abbildung (Abbildung 4.1 auf der nächsten Seite) ist das experimentelle Design und ein Schema der verschiedenen Versuche, in denen die Oozyten der CBA/Ca und MF1 Mäuse verwendet wurden, dargestellt.

4.1 *In vitro* Reifung unbehandelter Oozyten von CBA/Ca Mäusen

Die Kinetik mit der Oozyten reifen, unterliegt einer strengen Kontrolle, und es konnte schon in früheren Untersuchungen gezeigt werden, daß es Unterschiede in der Reifungskintik der Oozyten junger und alter CBA/Ca gibt. Diese Untersuchungen hatten ergeben, daß die Oozyten der alten CBA/Ca schneller in die Metaphase II eintreten als die Oozyten der jungen Mäuse. Diese Untersuchungen wurden um weitere, charakteristische Reifungszeitpunkte erweitert und präzisiert. Im Verlauf der Reifung werden verschiedene Entwicklungsstadien durchlaufen, in denen bestimmte Vorgänge in der Zelle, aufeinander abgestimmt, durchgeführt werden. Die zeitliche Koordination dieser Vorgänge wird durch verschiedene Zellzykluskontrollpunkte überwacht, und Unterschiede in der Kinetik können ein Hinweis auf Unterschiede in der Präzision dieser Kontrollpunkte sein.

Für diese Untersuchungen wurden Oozyten, die *in vitro* reifen sollen, aus antralen Follikeln freigesetzt und unter geeigneten Bedingungen bis zum Arrest in der Metaphase II kultiviert. Eine gleichbleibend gute Reifungsqualität wird erreicht, wenn ausschließlich antrale Follikel angestochen werden und von den austretenden Oozyten nur die gewählt werden, in denen ein klar abgegrenztes Keimbläschen (germinal vesicle, GV) zu erkennen ist. Unter diesen Umständen sollte die Reifungsrate nicht unter 60% liegen. War dies in den Kontrollen doch der Fall wurde das Experiment nicht gewertet.

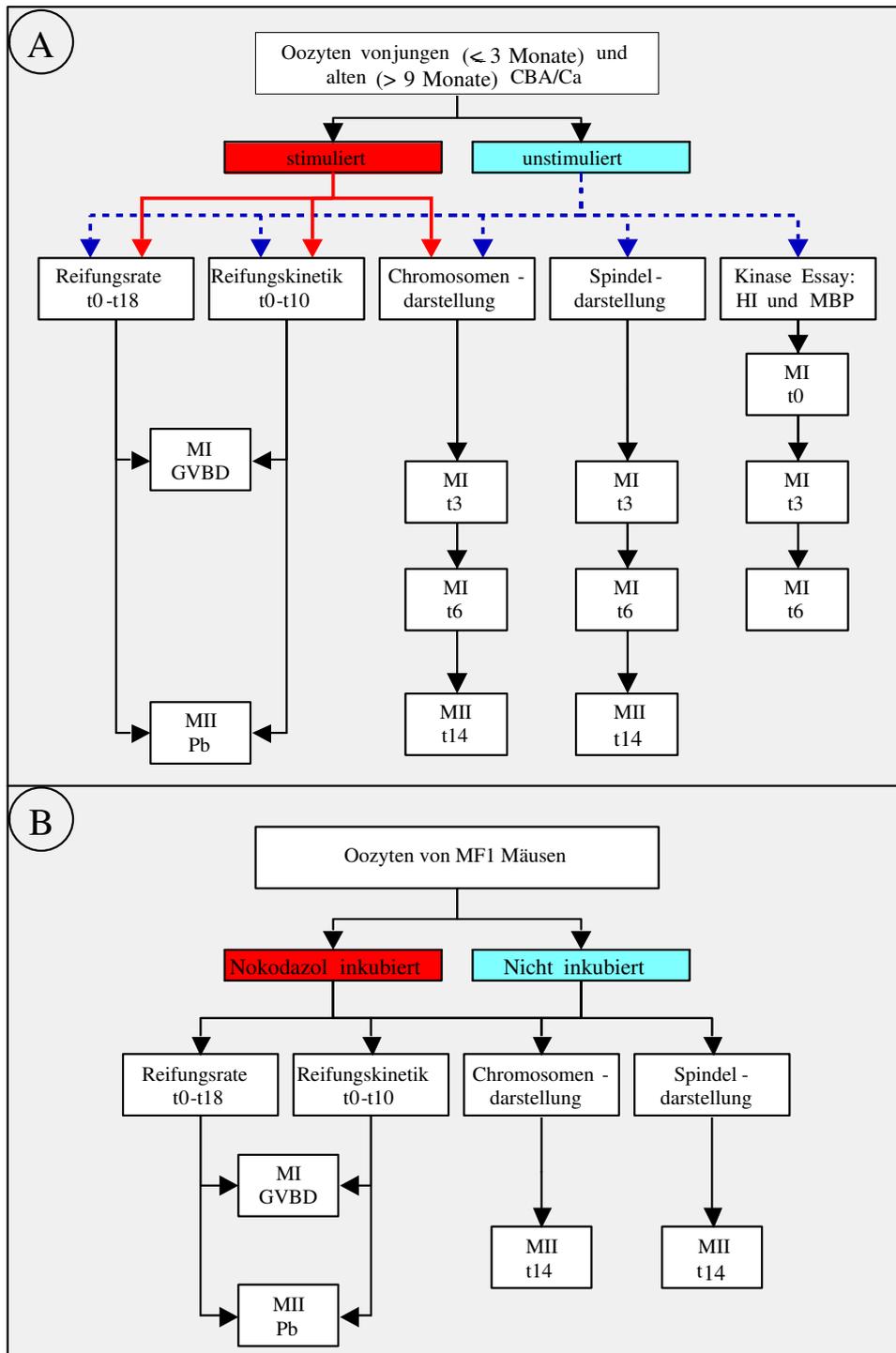


Abb. 4.1: Experimentelles Design und Verwendungsschema der eingesetzten Oozyten von jungen und alten CBA/Ca (A) und MF1 Mäusen (B).

4.2 Reifungsraten und -kinetiken von *in vitro* gereiften Oozyten unstimulierter junger- und alter Mäuse

In den im Folgenden beschriebenen Untersuchungen, werden zwei Gruppen gegenübergestellt, die sich im Alter der Tiere unterscheiden. Die erste Gruppe besteht aus Tieren, die zwischen 10 und 20 Wochen alt sind, die zweite Gruppe umfasst Exbreeder, die älter als 40 Wochen sind. Zu Beginn dieser Arbeit musste zuerst geklärt werden, welche Charakteristika die Reifungskinetik (siehe Abschnitt 4.2.1) und Reifungsrate (siehe Abschnitt 4.2.1.3 auf Seite 70) in den verglichenen Gruppen aufweisen.

4.2.1 Vergleich der Reifungskinetiken von *in vitro* gereiften Oozyten unstimulierter junger und alter Mäuse

Aus früheren Untersuchungen war bekannt, daß die Oozyten der alten CBA/Ca schneller reifen als die der Vergleichsgruppe [53]. Diese Befunde sollten nun verifiziert werden, und es sollte untersucht werden, ob die absoluten Reifungsraten dieses Ergebnis beeinflussen. Nach der Isolation aus den Follikeln und der Entfernung der Follikelzellen nehmen kompetente Oozyten die Reifung auf und reifen bis zur Metaphase II, dabei durchlaufen sie charakteristische, gut sichtbare Stadien. Für die Untersuchung der Reifungskinetik wurde die Auflösung des Keimbläschens (germinal vesicle, GV) als die prominenteste Manifestation der Wiederaufnahme der Reifung und die Abschnürung des Polkörpers als gut sichtbare und eindeutig zu identifizierende Merkmale gewählt. Für die folgenden Untersuchungen wurden die Reifungskinetiken innerhalb der ersten 2,5 Stunden der Reifung bestimmt.

4.2.1.1 Vergleich der Reifungskinetik innerhalb der ersten 2,5 Stunden

4.2.1.1.1 Darstellung der Reifungsdaten innerhalb der ersten 2,5 Stunden Die Rate an Zellen, die ihr Keimbläschen aufgelöst haben (GVBD), wurde nach 1,5 - ($t_{1,5}$), 2,0 Stunden ($t_{2,0}$) und 2,5 Stunden ($t_{2,5}$) festgestellt. Es zeigte sich, daß sich die GVBD-Rate der Zellen in Abhängigkeit vom Alter der Mäuse unterschied. Die Daten aus den Tabellen 6.1 auf Seite 113, 6.2 auf Seite 113 und 6.3 auf Seite 114 sind in Tabelle 4.1 zusammengefaßt. Die Berechnung der Signifikanzen ist in Abschnitt 3.7 auf Seite 61 beschrieben.

Tabelle 4.1: Vergleich der mittleren GVBD-Rate *in vitro* gereifter Oozyten von jungen und alten Mäusen

	Jung			Alt		
	t _{1,5}	t _{2,0}	t _{2,5}	t _{1,5}	t _{2,0}	t _{2,5}
n _{t₀} [*]	449	449	1681	215	215	1190
GVBD	244	338	1339	164	205	1062
\bar{X}_{GVBD}^{**}	55,08	75,94	79,97	78,55 ^a	91,99 ^b	89,86 ^c
σ_{GVBD}^*	10,59	8,98	10,14	4,88	6,53	6,63

n_{t₀}^{*} ist die Anzahl isolierter Zellen zu t₀

\bar{X}_{GVBD}^{**} : Mittelwert der prozentualen GVBD-Raten

σ_{GVBD}^* : Standardabweichung der prozentualen GVBD-Raten

^aSignifikanter Unterschied zu Jung $p_{t_{1,5}} = 0,007$

^bSignifikanter Unterschied zu Jung $p_{t_{2,0}} = 0,019$

^cSignifikanter Unterschied zu Jung $p_{t_{2,5}} \leq 0,001$

Die mittleren GVBD-Raten für die drei untersuchten Zeitpunkte sind in Tabelle 4.2 aufgelistet und in Abbildung 4.2 auf der nächsten Seite dargestellt.

Tabelle 4.2: Vergleich der mittleren GVBD-Rate *in vitro* gereifter Oozyten von jungen und alten Mäusen

	Jung			Alt		
	t _{1,5}	t _{2,0}	t _{2,5}	t _{1,5}	t _{2,0}	t _{2,5}
Mittelwert	55,08	75,94	79,97	78,55 ^a	91,99 ^b	89,86 ^c
Stabwn.*	10,59	8,98	10,14	4,88	6,53	6,63

Stabwn.*: Standardabweichung

^aSignifikanter Unterschied zu Jung $p_{t_{1,5}} \leq 0,01$

^bSignifikanter Unterschied zu Jung $p_{t_{2,0}} \leq 0,02$

^cSignifikanter Unterschied zu Jung $p_{t_{2,5}} \leq 0,001$

Vergleicht man die Raten, mit denen die Zellen junger und alter Mäuse das Keimbläschen auflösen (siehe Tabelle 4.2 und Abbildung 4.2 auf der nächsten Seite) sieht man, daß die Oozyten der alten Mäuse vom ersten Messpunkt an mit einer signifikant höheren Rate in das GVBD gegangen sind.

4.2.1.2 Vergleich der Reifungskinetik bis zur MetaphaseII

Die Abschnürung des Polkörpers wurde als Charakteristikum für den Eintritt in die Metaphase II gewertet. Zu diesem Zweck wurden die Zellen stündlich unter dem Binokular betrachtet, die Rate an Zellen mit und ohne Keimbläschen und die Anzahl an Zellen mit Abschnürungen (Ein Polkörper bzw. in einigen Fällen größere Abschnürungen) ausgezählt. Der Zeitpunkt,

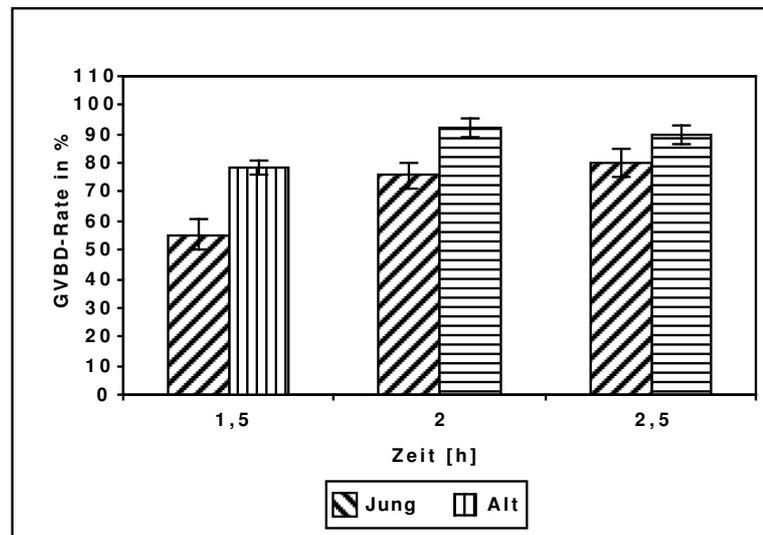


Abb. 4.2: GVBD-Rate *in vitro* gereifter Oozyten junger und alter Mäuse (Signifikanzen: siehe Fußnoten in Tabelle 4.2 auf der vorherigen Seite)

zu dem 50 % der Oozyten einen Polkörper abgeschnürt haben, läßt sich aus den Beobachtungen extrapolieren. In Tabelle 4.3 ist die Rate an gebildeten Polkörpern über 3 Stunden (von t_8 - t_{10}) angegeben. In Tabelle 4.3 sind die Daten für drei unabhängige Versuche (A, B, C) aufgeführt und in Abbildung 4.3 auf der nächsten Seite sind die Daten grafisch dargestellt.

Tabelle 4.3: Vergleich der Reifungskinetik für t_8 , t_9 und t_{10} zwischen *in vitro* gereiften Oozyten junger und alter unstimulierter Mäuse

Messung	Alter	$n_{t_0}^*$	Anzahl an M II Zellen (in%)		
			t_8	t_9	t_{10}
A	Jung	41	14 (34,50)	23 (56,10)	25 (60,98)
	Alt	24	7 (29,17)	12 (50,00)	17 (70,83)
B	Jung	34	10 (29,41)	15 (44,12)	22 (64,71)
	Alt	16	7 (43,75)	11 (68,75)	11 (68,75)
C	Jung	35	9 (25,70)	20 (57,10)	22 (63,00)
	Alt	28	12 (42,90)	24 (85,70)	24 (85,70)
Mittelw. Jung (in %)		110	29,75	52,44	62,89
Stabwn. Jung			4,23	7,22	1,87
Mittelw. Alt (in %)		68	38,61	68,15	75,09
Stabwn. Alt			8,19	17,86	9,24

$n_{t_0}^*$ ist die Anzahl isolierter Zellen zu t_0

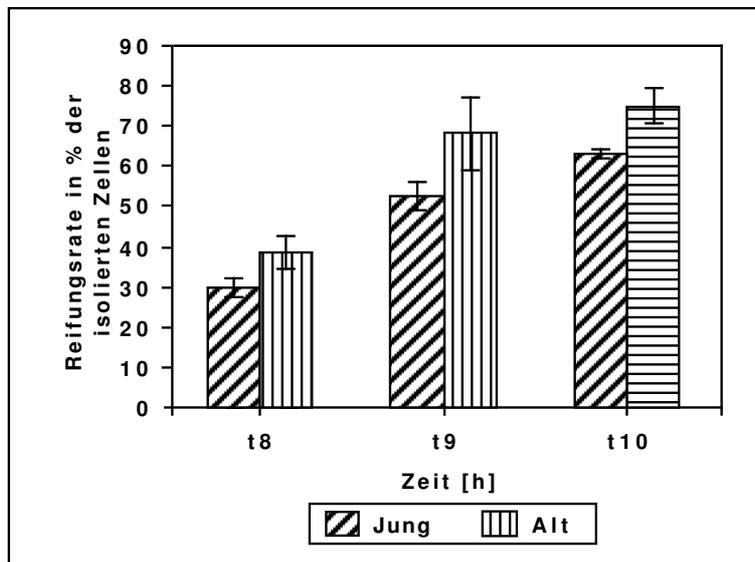


Abb. 4.3: Pb-Rate *in vitro* gereifter Oozyten junger und alter Mäuse (siehe Tabelle 4.3 auf der vorherigen Seite)

Extrapoliert man die Reifungsraten gegen die Zeit so sieht man, daß 50% der Oozyten junger Mäuse die MII-Phase nach 8 Stunden und 54 Minuten erreichen. Von den Oozyten alter Mäuse haben nach 8 Stunden 23 Minuten die Hälfte aller Zellen einen Polkörper abgeschnürt. Somit erreichen die Oozyten alter Mäuse die Metaphase II 31 Minuten eher als die Oozyten der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 4.4). In Abschnitt 4.2.1.3 auf der nächsten Seite sind die absoluten Reifungsraten der untersuchten Gruppen aufgelistet. Es zeigt sich, daß die Rate an Zellen, die in der Metaphase I verweilen in beiden Gruppen gleich groß ist.

Tabelle 4.4: Vergleich der extrapolierten Reifungsraten der Oozyten junger und alter CBA/Ca Mäuse

	50% Rate	
	GVBD	Pb
	t[min]*	
Jung	104	534
Alt	87	503
Differenz	17	31

*Gemessen ab t_0

Es zeigte sich, daß die Oozyten der alten CBA/Ca insgesamt schneller reiften als die der jungen CBA/Ca. Diese Beschleunigung der Reifung nimmt mit der Zeit zu und betrifft auch den Zeitpunkt kurz vor der Anaphase I. In

diesem Intervall wird der Spindelkontrollpunkt aktiviert [20], und es kann sein, daß das beschleunigte Durchlaufen des Kontrollpunktes diesen negativ beeinflusst.

4.2.1.3 Vergleich der Reifungsraten von *in vitro* gereiften Oozyten junger und alter unstimulierter Mäuse

Im Zusammenhang mit der Reifungskinetik sind die absoluten Reifungsraten der Zellen von Bedeutung, da Unterschiede in der Kinetik auch auf Unterschieden in den absoluten Reifungsraten beruhen können. Die Rate an MI- und MII-Oozyten wurde nach 18 Stunden Kultur bestimmt und sind in Tabelle 4.5 aufgelistet.

Tabelle 4.5: Reifungsraten *in vitro*-gereifter Oozyten junger und alter unstimulierter Mäuse

Alter	$n_{t_0}^*$	Reifungsrate (in %)		
		GV	Meiose I	Meiose II
Jung	629	27 (4,3)	171 (27,2)	431 (68,5)
Alt	679	6 ^a (0,9)	179 (26,4)	494 (72,8)

$n_{t_0}^*$ ist die Anzahl isolierter Zellen zu t_0

a: Signifikante Unterschiede zu Jung, $p < 0,001$

Die beiden untersuchten Gruppen unterscheiden sich nur in der Anzahl der inkompetenten Zellen, die im Diktyotän (Keimbläschenstadium) arretiert sind, signifikant voneinander. In der Rate, mit der die Zellen in der Metaphase I arretieren, unterscheiden sich die beiden untersuchten Gruppen nicht signifikant voneinander. Das bedeutet, daß die unterschiedlichen Reifungskinetiken nicht auf unterschiedlichen, absoluten Reifungsraten beruhen.

4.3 Chromosomale Anomalien in Oozyten von jungen- und alten unstimulierten CBA/Ca Mäusen

4.3.1 Spreitungen von Oozyten junger und alter Mäuse nach 16 Stunden *in vitro* Reifung

Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, daß es in der CBA/Ca eine altersabhängige Zunahme an chromosomalen Aberrationen gibt [232, 53]. In dieser Untersuchung sollte dieses Phänomen zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht werden, um zu klären, wann das erste Mal chromosomale Anomalien auftreten. Betrachtet man die chromosomale Konstitution der Oozyten junger und alter Mäuse, ergibt sich folgendes Bild (siehe auch die Tabellen 4.6 auf der nächsten Seite und 4.11 auf Seite 80). In der Untersuchung

wurden aneuploide, diploide und Chromosomensätze mit vorzeitig getrennten Chromosomen ausgewertet.

Tabelle 4.6: Chromosomale Konstitution *in vitro*-gereifter Oozyten junger und alter Mäuse

Alter	Analysierbare MII Oozyten	Chromosomale Konstitution (in %)			
		$n_{Chr}^* =$			
		20	>20	<20	40
Jung	162	132	3	20	7
		(81,5)	(1,9)	(12,4)	(4,3)
Alt	192	134 ^a	13 ^b	29	16
		(69,8)	(6,8)	(15,1)	(8,3)

n_{Chr}^* = ist die Zahl an Chromosomen pro Spreitung

a Signifikanter Unterschied zu Kontr. $n_{Chr} = 20$ Jung: $p \leq 0,02$

b Signifikanter Unterschied zu Kontr. $n_{Chr} > 20$ Jung: $p \leq 0,05$

Es zeigte sich, daß sich die beiden untersuchten Gruppen in dem Auftreten diploider und hyperploider Zellen (siehe Tabelle 4.6) und Zellen mit vorzeitig getrennten Chromosomen (siehe Tabelle 4.11 auf Seite 80) signifikant unterscheiden (siehe Abbildung 4.4 auf der nächsten Seite). Das Auftreten hyperploider Zellen ist in den *in vitro*-gereiften Oozyten alter Mäuse signifikant höher als in der Vergleichsgruppe.

Die vorzeitig getrennten Chromatiden wurden außerdem daraufhin untersucht, ob es sich um balancierte oder unbalancierte, vorzeitige Trennungen handelte (siehe Tabelle 4.12 auf Seite 80). Balancierte und unbalancierte vorzeitige Trennungen unterscheiden sich dadurch, daß in ersteren noch beide der vorzeitig getrennten Chromatiden zu finden sind, wohingegen bei einer unbalancierten vorzeitigen Trennung einer der beiden Chromatiden fehlt. Durch die Unterscheidung der balancierten und der unbalancierten Chromatidentrennungen kann man eine Aussage darüber machen, ob der Fehler, der zu dieser Auffälligkeit geführt hat, vor oder nach der Abschnürung des Polkörpers stattgefunden hat. Den Verlust eines Chromatids kann man so erklären, daß die vorzeitige Trennung der Chromatiden noch vor dem Eintritt in die Metaphase II stattgefunden hat und das fehlende Chromatid vom Spindelapparat in den Polkörper gezogen wurde (siehe auch Abbildung 2.12 auf Seite 40).

4.3.2 Frühe Spreitung *in vitro*-gereifter Metaphase I Oozyten junger- und alter Mäuse

Es ist aus Untersuchungen in *Drosophila* und dem Menschen bekannt, daß die Lage und die Häufigkeit von Cross-over einen Einfluß auf die Wahr-

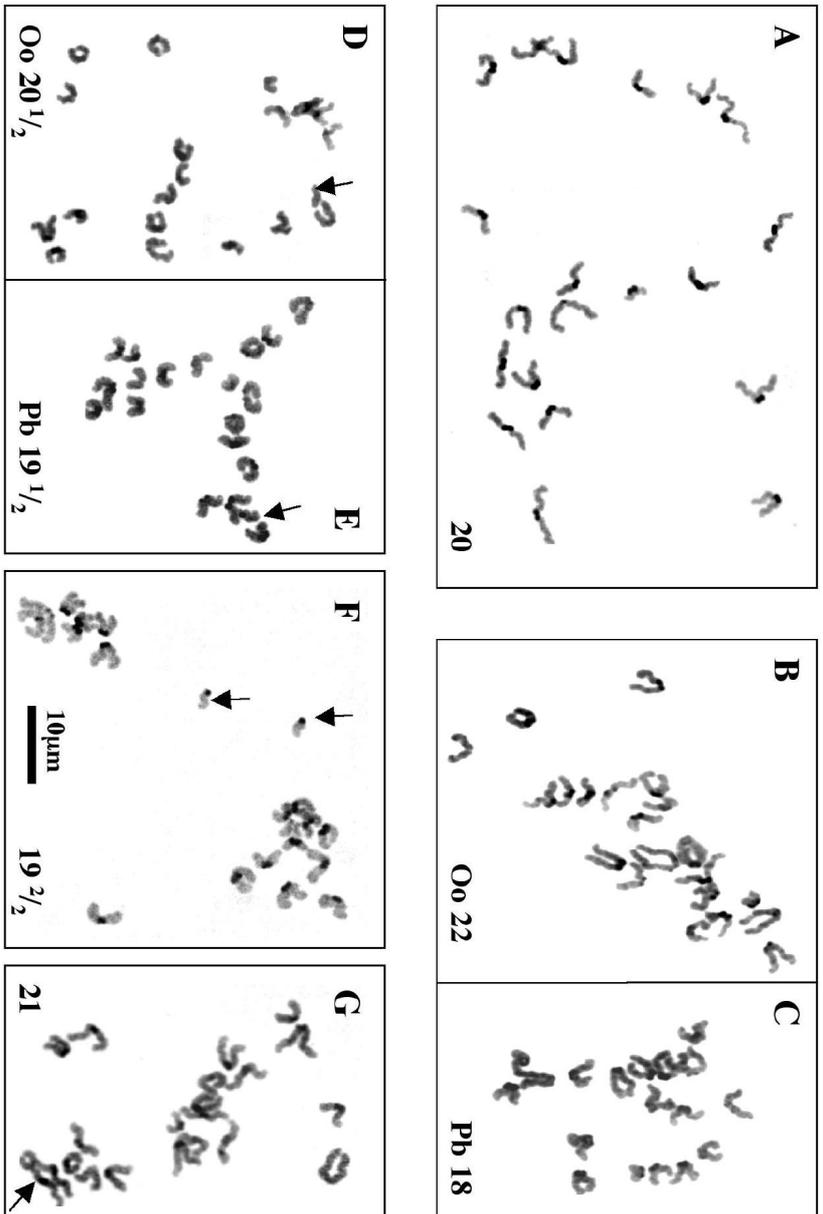


Abb. 4.4: Chromosomale Konstitution gespreiteter, C-bandlerter Oozyten von alten CBA/Ca nach 16 Stunden *in vitro* Reifung. **A.** Euploider Chromosomensatz, **B.** Hyperploider Chromosomensatz mit 22 Chromosomen, **C.** Hypoploider Chromosomensatz mit 18 Chromosomen, **D.** Hyperploider Chromosomensatz mit einem überzähligen Chromatid (siehe Pfeil), **E.** Hypoploider Chromosomensatz mit einem fehlenden Chromatid (siehe Pfeil), **F.** Euploider Chromosomensatz mit vorzeitig getrennten Chromatiden (siehe Pfeile), **G.** Hyperploider Chromosomensatz mit einem überzähligen Chromosom (siehe Pfeil).

scheinlichkeit haben, daß Chromosomen in der MI oder MII falsch verteilt werden [119, 128, 226]. Die frühe Spreitung von MI Oozyten sollte zeigen, ob es in diesen Zellen auch auffällige Chromosomenkonfigurationen zu beobachten sind. Außerdem konnte die Frage beantwortet werden, wann die Chromatidentrennungen stattfinden, die zu balancierten und unbalancierten vorzeitigen Chromatidentrennungen führen.

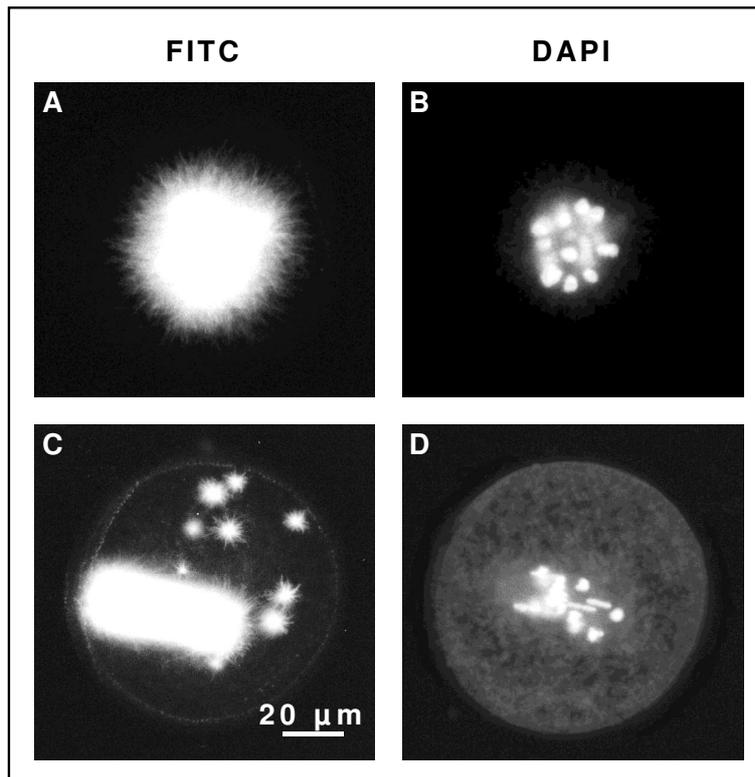


Abb. 4.5: Spindelcharakteristika zu t_3 und t_6 von Oozyten junger CBA/Ca. Die Morphologie der Spindel und die Verteilung der Bivalenten in der Spindel ist in den Oozyten der jungen und alten CBA/Ca identisch, daher sind nur die Oozyten junger CBA/Ca abgebildet. Spindel (A) und Chromosomen (B) nach 3h *in vitro* Reifung, Spindel (C) und Chromosomen (D) nach 6h *in vitro* Reifung.

Zu diesem Zweck wurden Oozyten nach 3 (siehe Tabelle 4.7 auf Seite 76) und nach 6 Stunden gespreitet und die chromosomale Konstitution untersucht. Bei t_3 haben die Zellen das Keimbläschen aufgelöst, aber die Metaphaseplatte noch nicht erreicht und noch keine funktionelle bipolare Spindel gebildet (siehe Abbildung 4.5 A + B). Bei t_6 haben die Oozyten eine funktionelle Spindeln ausgebildet, und die Bivalente sollten in diese eingeordnet sein (siehe Abbildung 4.5 C + D). Jetzt wirken auch schon Zugkräfte auf

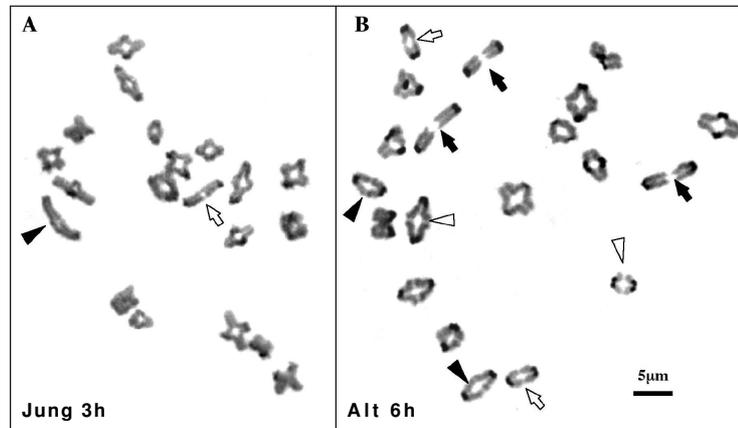


Abb. 4.6: Chromosomale Konstitution gespreiteter, C-bandierter Oozyten von jungen (A) bzw. alten (B) CBA/Ca nach 3 und 6 Stunden *in vitro* Reifung.

Schwarzes Dreieck: Telomerassoziierte Bivalente ohne Spalt,

Weisses Dreieck: Telomerassoziiertes Bivalent ohne Spalt mit klar erkennbarer subtelo-merer Verbindung zwischen den Bivalenten

Schwarzer Pfeil: Telomerassoziierte Bivalente mit Spalt

Weisser Pfeil: Telomerassoziierte Bivalente mit Spalt

Für eine Erklärung der Pfeile und Dreiecke siehe auch Abbildung 4.7.

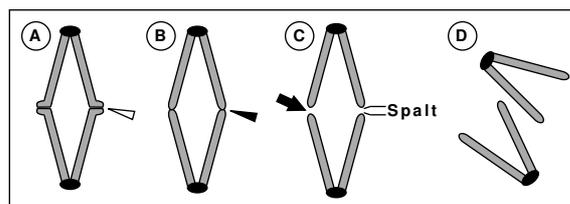


Abb. 4.7: Schematische Darstellung der beobachteten, auffälligen chromosomalen Konfigurationen früh gespreiteter *in vitro* gereifter MI Oozyten.

A. Telomer-assoziertes Bivalent ohne Spalt mit klar erkennbarer subtelo-

merer Verbindung zwischen den Bivalenten, **B.** Telomer-

assoziertes Bivalent ohne Spalt, **C.** Telomer-assoziertes Bivalent mit Spalt,

D. Univalent (Die Pfeile entsprechen den Markierungen aus Abbildung 4.6).

die Bivalente, so daß instabil verknüpfte Schwesterchromatiden möglicherweise schon voneinander getrennt werden. Sollte die Ursache für die hohe Rate unbalancierter Trennungen tatsächlich in einem Fehler in der MI liegen, sollten einzelne Univalente zu t_3 und/oder t_6 zu finden sein. Auffällig waren einzelne Bivalente, bei denen die homologen Chromosomen mit den Telomeren zueinander ausgerichtet waren, aber ein meßbarer Spalt zwischen diesen zu sehen war (siehe Schema 4.7 auf der vorherigen Seite und Abbildung 4.6 auf der vorherigen Seite). Dieser Spalt wurde vermessen. In Tabelle 4.7 auf der nächsten Seite sind die Chromosomen mit Telomerspalten über $0,4 \mu\text{m}$ aufgelistet. Unterschieden wurden zwei Gruppen von Bivalenten mit auffälligen, chromosomalen Konfigurationen: Solche mit endständig assoziierten Bivalenten, bei denen kein deutlicher Spalt zwischen den Telomeren zu sehen war (TaB ohne Spalt) und solche, bei denen keine deutlich sichtbare Verbindung in der Giemsa Färbung beobachtet werden konnte (TaB mit Spalt). Die Bivalente mit Spalt wurden nicht als Univalente ausgewiesen, da sie mit den Telomeren noch eindeutig gegeneinander ausgerichtet waren. Vergleicht man die Werte für t_3 und t_6 (siehe Tabelle 4.7 auf der nächsten Seite) miteinander, so sieht man, daß die hohe Rate an Telomeren mit Spalt zum frühen Zeitpunkt (nach etwa 3 Stunden *in vitro*-Reifung) nach weiteren 3 Stunden *in vitro*-Reifung nicht zu einer Erhöhung der Rate an Metaphase I Zellen mit vorzeitig getrennten Bivalenten führt.

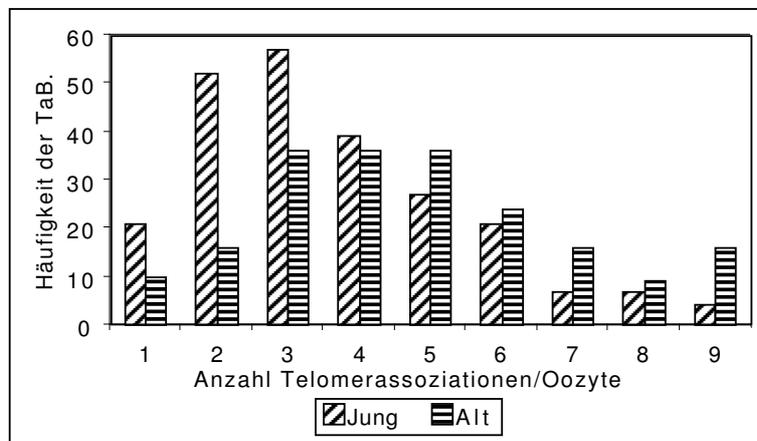


Abb. 4.8: Summe der TaB. pro Oozyte für t_3 und t_6

Tabelle 4.7: Anzahl an Chromosomen bzw. Zellen mit distalen Chiasmata bzw. separierten Telomeren (Spalt) der Bivalenten nach 3 und 6 Stunden *in vitro* Reifung

	Reifungsdauer [h]			
	3		6	
	Jung	Alt	Jung	Alt
Zellen gesamt*	134	88	101	113
Chromosomen gesamt	2680	1760	2020	2260
Zellen mit TaB** ohne Spalt	45	19	43	23 ^c
in %	(33,6)	(21,6)	(42,6)	(20,4)
Bivalente mit TaB ohne Spalt	234	169	174	243 ^d
in %	(8,7)	(9,4)	(8,6)	(10,8)
Zellen mit Spalt	79	66 ^a	47	83 ^e
in %	(59,0)	(75,0)	(46,5)	(73,5)
Bivalente mit Spalt	134	147 ^b	77	202 ^f
in %	(5,0)	(8,4)	(3,8)	(8,9)

*Es wurden nur euploide Zellen gewertet

**TaB: Telomerassoziierte Bivalente

^a Signifikanter Unterschied zu Jung t_3 : $p < 0,05$

^b Signifikanter Unterschied zu Jung t_3 : $p < 0,001$

^c Signifikanter Unterschied zu Jung t_6 : $p < 0,001$

^d Signifikanter Unterschied zu Jung t_6 : $p < 0,05$

^e Signifikanter Unterschied zu Jung t_6 : $p < 0,001$

^f Signifikanter Unterschied zu Jung t_6 : $p < 0,001$

Die Rate an Bivalenten mit Spalt und Oozyten mit Bivalenten mit Spalt unterscheidet sich zu beiden untersuchten Zeitpunkten (t_3 und t_6) signifikant zwischen den beiden Altersgruppen. In dem Intervall von t_3 bis t_6 steigt sowohl die Rate an Zellen mit Tab. ohne Spalt als auch die Rate an Bivalenten mit Tab. ohne Spalt im Vergleich zu den Oozyten der jungen CBA/Ca an und unterscheidet sich signifikant zwischen den Oozyten der beiden Altersgruppen (siehe Tabelle 4.7). Auch die Rate an Zellen mit Spalt bzw. Bivalenten mit Spalt zeigt mit zunehmender Reifungszeit signifikantere Unterschiede zwischen den Oozyten der beiden Altersgruppen als zu t_3 . Wenn man sich die Verteilung der Anzahl der Telomerassoziierten Bivalente (TaB.) pro Oozyte ansieht (siehe Tabelle 6.7 auf Seite 121 und Abbildung 4.8 auf der vorherigen Seite), fällt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Altersgruppen auf ($p < 0,001$). Das bedeutet, daß die beiden Gruppen keiner gemeinsamen Grundgesamtheit angehören und sich die Oozyten der beiden Altersgruppen bezüglich der Anzahl von Telomer-assoziierten Bivalente pro Oozyte signifikant voneinander unterscheiden. In Abbildung 4.8 auf der vorherigen Seite ist die Summe der Telomerassoziierten Bivalente pro Oozyte für t_3 und t_6 dargestellt.

4.4 Einfluß von Gonadotrophinen auf die Rate chromosomaler Aberrationen und die Reifungskinetik

4.4.1 Reifungsrate

Es ist mehrfach beschrieben worden, daß Superovulation im humanen System zu Anomalien der Spindel und der Chromosomenverteilung führen kann [199, 251]. Es sollte geklärt werden, ob eine solche Irritation der Oozyten auch in der Maus beobachtet werden kann. Dazu war es nötig eine Hormondosis zu spritzen, die die Anzahl gebildeter Follikel nicht verändert (siehe Tabelle 4.8). Die Dosis an PMS betrug 5 I.U. pro Tier und wurde 48 Stunden vor der Isolation der Zellen intraperitoneal gespritzt. In Tabelle 4.8 sind isolierten Oozyten pro Tier in Abhängigkeit vom Alter und der Stimulation gezeigt. Die Unterschiede zwischen den PMS-behandelten Tieren und den unbehandelten Tieren sind nicht signifikant. Angaben zu den Signifikanzen sind nur sehr bedingt möglich, da in einigen Präparationen die Ovarien mehrerer Mäuse angestochen wurden und es somit keine exakten Angaben zu den Oozyten pro Maus möglich sind. Wenn man in den Isolationen, in denen mehr als eine Maus pro Isolation eingesetzt wurden, den Mittelwert der Oozyten pro Maus errechnet, kann man die Unterschiede in der Ausbeute bestimmen. Es zeigt sich, daß sich die Zahl der isolierten Oozyten durch die PMS-Behandlung nicht signifikant verändert. Vergleicht man die Ausbeuten innerhalb der Gruppen (jung gegen alt), so zeigt sich, daß die Unterschiede zwischen den Altersgruppen durch die PMS-Behandlung signifikanter werden ($p = 0,01$ für die unbehandelten und $p = 0,001$ für die PMS injizierten Tiere). Diese Tendenz müsste jedoch dringend mit Isolationen einzelner Tiere wiederholt werden, da die Mittelwertbildung die Berechnung der Signifikanzen erheblich beeinflusst.

Tabelle 4.8: Zahl isolierter Oozyten stimulierter und unstimulierter junger und alter Mäuse

Behandlung/ Alter	Anzahl an Oozyten pro Tier
Kontr. Jung	22,4 ± 7,42
Kontr. Alt	10,6 ± 3,37
PMS Jung	25,3 ± 3,90
PMS Alt	7,3 ± 2,07

Es konnte gezeigt werden, daß die Hormongabe einen Einfluß auf die Reifungsrate der Oozyten hat. Es soll nun untersucht werden, ob es auch altersabhängige Unterschiede im Reifungsverhalten gibt, die durch die Hormongabe induziert werden. In Tabelle 4.9 auf der nächsten Seite sind die Rei-

fungsdaten für die Oozyten junger und alter Mäuse, nach 14 bis 16 Stunden Reifung zusammengefasst worden, und es wird ausschließlich die Reifungsrate in Abhängigkeit von der Stimulation bewertet. Es arretieren signifikant mehr Oozyten stimulierter Mäuse in der Metaphase I ($p < 0,01$) als von unstimulierten Mäusen. Umgekehrt verhält es sich bei der Anzahl der Zellen, die in die Metaphase II gehen. Hier ist die Rate an Zellen stimulierter Mäuse geringer ($p < 0,01$) als die unstimulierter.

Tabelle 4.9: Vergleich der Reifungsraten *in vitro*- gereifter Oozyten stimulierter und unstimulierter Mäuse beider Altersklassen

Behandlung	$n_{t_0}^*$	Reifungsrate (in %)		
		GV	Meiose I	Meiose II
Kontrolle	661	7 (1,1)	158 (23,9)	489 (74,0)
PMS	656	6 (0,9)	207 ^a (31,6)	432 ^b (65,6)

$n_{t_0}^*$ ist die Anzahl isolierter Zellen zu t_0

a: Signifikante Unterschiede zu Kontrolle: $p < 0,01$

b: Signifikante Unterschiede zu Kontrolle: $p < 0,01$

In Tabelle 4.10 und Abbildung 4.9 auf der nächsten Seite sind die Daten in Abhängigkeit vom Alter der Tiere dargestellt, und es zeigt sich, daß es Unterschiede in der Reifungsrate gibt, die mit dem Alter der Tiere korrelieren. Die Oozyten stimulierter Mäuse unterscheiden sich hinsichtlich ihres Arrests in der Metaphase I voneinander. Die Oozyten junger, stimulierter Mäuse arretieren mit einer signifikant höheren Rate in der Metaphase I als die Oozyten unstimulierter Mäuse ($p < 0,05$).

Tabelle 4.10: Reifungsraten *in vitro*-gereifter Oozyten junger und alter stimulierter und unstimulierter Mäuse nach 16 Stunden *in vitro* Reifung

Behandlung	Alter	$n_{t_0}^*$	Reifungsrate (in %)		
			GV	Meiose I	Meiose II
Kontrolle	Jung	302	6 (2,0)	76 (25,2)	216 (71,5)
	Alt	359	1 (0,3)	82 (22,8)	273 (76,0)
PMS	Jung	360	2 (0,6)	120 ^a (33,3)	232 (64,4)
	Alt	296	4 (1,4)	87 (29,4)	200 ^b (67,6)

$n_{t_0}^*$ ist die Anzahl isolierter Zellen zu t_0

a: Signifikante Unterschiede zu Kontr. Jung: $p < 0,05$

b: Signifikante Unterschiede zu Kontr. Alt: $p < 0,05$

Diese Unterschiede sind bei den Oozyten alter Mäuse nicht zu beobachten. Hinsichtlich der Rate, mit der die Zellen in die Metaphase II eintreten,

ist zu beobachten, daß die Oozyten alter, stimulierter Mäuse mit einer signifikant geringeren Rate in die Metaphase II eintreten ($p < 0,05$). Vergleicht man dies mit den Oozyten junger Mäuse ist ein solcher Unterschied nicht signifikant.

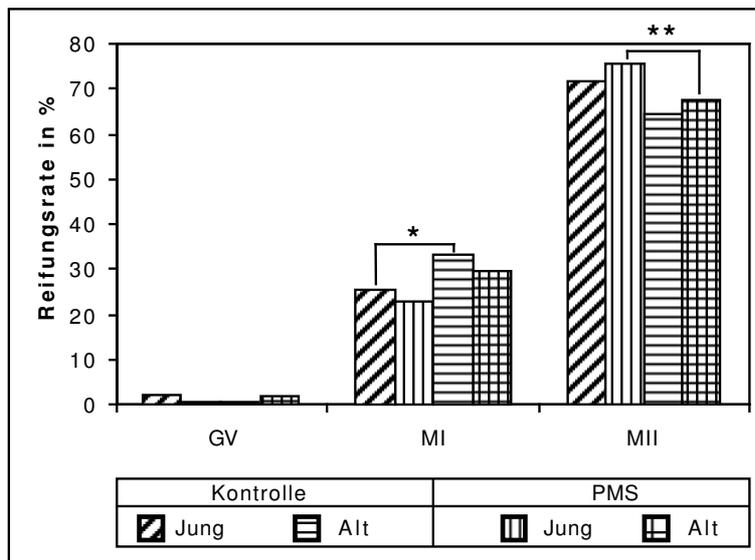


Abb. 4.9: Reifungsrate *in vitro*- gereifter Oozyten stimulierter und unstimulierter junger und alter Mäuse (siehe Tabelle 4.10 auf der vorherigen Seite)

* Signifikante Unterschiede zu Kontr. Jung: $p < 0,05$

** Signifikante Unterschiede zu Kontr. Alt: $p < 0,05$

4.4.2 Chromosomale Aberrationen

Vergleicht man die chromosomalen Aberrationen junger und alter *in vitro*-gereifter Oozyten von stimulierten und unstimulierten Mäusen fällt auf, daß die signifikanten Unterschiede in der Rate an euploiden und hyperploiden Zellen von unstimulierten Mäusen (siehe 4.3.1 auf Seite 71) in den Oozyten stimulierter Mäuse nicht zu beobachten sind. Vergleicht man die Ergebnisse der unstimulierten Tiere mit denen der stimulierten fällt auf, daß sich die Anzahl euploider und hyperploider Zellen bei den jungen Tieren erhöht, wohingegen sich diese Werte für die Oozyten alter, stimulierter Tiere kaum verändern. Dies führt dazu, daß die signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen verschwinden (siehe Tabelle 4.11 auf der nächsten Seite).

Tabelle 4.11: Chromosomale Konstitution *in vitro* gereifter Oozyten junger und alter stimulierter und unstimulierter Mäuse

Behandlung	Alter	Analysierbare MII Oozyten	Chromosomale Konstitution (in %)			
			$n_{Chr}^* =$			
			20	>20	<20	40
Kontrolle	Jung	162	132 (81,5)	3 (1,9)	20 (12,4)	7 (4,3)
	Alt	192	134 ^a (69,8)	13 ^b (6,8)	29 (15,1)	16 (8,3)
PMS	Jung	166	124 (74,7)	7 (4,2)	29 (17,5)	6 (3,61)
	Alt	125	89 (71,2)	8 (6,4)	20 (16,0)	8 (6,4)

n_{Chr}^* ist die Zahl an Chromosomen pro Spreitung

^a Signifikanter Unterschied zu Kontr. $n_{Chr} = 20$ Jung: $p < 0,02$

^b Signifikanter Unterschied zu Kontr. $n_{Chr} > 20$ Jung: $p < 0,05$

In Tabelle 4.12 ist die Rate an vorzeitigen Trennungen der Bivalenten aufgeführt. Die Rate an vorzeitigen Trennungen hat sowohl in den Oozyten junger als auch in den Oozyten alter stimulierter Mäuse prozentual zugenommen. Dabei ist die Rate unbalancierter Trennungen in den Oozyten junger, stimulierter Mäuse stärker angestiegen als die balancierter Trennungen in der gleichen Altersgruppe. Dies führt dazu, daß die Summe der vorzeitigen Trennungen in den Oozyten alter, stimulierter Mäuse sich noch signifikant von der junger, stimulierter Mäuse unterscheidet, sich jedoch die Raten unbalancierter Trennungen zwischen den Altersgruppen stimulierter Tiere nicht mehr signifikant voneinander unterscheiden.

Tabelle 4.12: Anteil der balancierten und unbalancierten vorzeitig getrennten Chromatiden in *in vitro*-gereiften Oozyten junger und alter stimulierter und unstimulierter Mäuse

Behandlung	Alter	n_{An}^*	Vorzeitige Trennung (in %)		
			Balanciert	Unbalanciert	Gesamt
Kontrolle	Jung	162	1 (0,4)	0 (0,0)	1 (0,4)
	Alt	192	4 (2,1)	10 ^a (5,2)	14 ^b (7,3)
PMS	Jung	166	1 (0,6)	4 (2,4)	5 (3,0)

Fortsetzung auf folgender Seite

Fortsetzung von vorheriger Seite

Behandlung	Alter	n _{An} *	Vorzeitige Trennung (in%)		
			Balanciert	Unbalanciert	Gesamt
	Alt	125	5 (4,0)	9 (7,2)	14 ^c (11,2)

n_{An}*: Analysierbare M II Oozyten

^a Signifikanter Unterschied zu Kontr. Jung. unbalanciert: $p < 0,01$

^b Signifikanter Unterschied zu Kontr. Jung gesamt: $p < 0,01$

^c Signifikanter Unterschied zu PMS Jung gesamt: $p < 0,02$

4.5 Aktivität der Histon HI- und MBP-Kinasen in Oozyten

Kompetente Prophase I-arretierte Oozyten von Vertebraten werden *in vivo* durch Veränderungen des Hormonspiegels aktiviert und durchlaufen die Meiose bis zur Metaphase II. Dieser Vorgang wird als Reifung bezeichnet. *In vitro* wird die Reifung durch die Freisetzung aus dem Follikel und die Befreiung von den Granulosazellen induziert. Die Aktivierung des MPF ist ein notwendiges Element in der Kette der Ereignisse, die zu einer Wiederaufnahme der meiotischen Reifung führt.

Eine weitere Kinase, die im Verlauf der Reifung aktiviert wird, ist die MAP-Kinase. In Oozyten von Mäusen wird sie etwa 30 Minuten nach der Aktivierung des MPF induziert. Die Aktivität dieser Kinase bleibt über die Reifung hinweg hoch. Sie fällt erst nach der MPF-Inaktivierung im Anschluß an die Befruchtung der Eizelle ab.

Polanski *et al.* [201, 204] konnten zeigen, daß die Länge des Intervalls zwischen GVBD und der Abschnürung des ersten Polkörpers unter anderem durch die Syntheserate an Zyklin B bestimmt wird.

Eine Möglichkeit, die Aktivität des MPF und der MAP-Kinase zu untersuchen, ist die Inkubation eines Substrates mit aufgeschlossenen Oozyten und $\gamma\text{P}^{32}\text{dATP}$. In diesem Ansatz wird das Substrat durch die Kinase mit radioaktivem ATP markiert. Das Substrat kann anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt werden und die spezifische Aktivität des markierten Substrates und somit der Kinase gemessen werden [257, 254].

Es sollte untersucht werden, ob sich Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen bezüglich der Kinaseaktivität zeigen lassen und ob diese möglicherweise die Unterschiede in Reifungskinetik widerspiegeln.

4.5.1 Ergebnisse der Etablierung der Kinaseassays und Standardisierung der Messungen

4.5.1.1 Histon HI-Kinaseaktivität

Die MPF- oder auch Histon HI-Kinaseaktivität wurde im Verlauf der ersten sechs Stunden an Oozyten von MF-1 Mäusen untersucht. Dazu wurden zu t_0 , t_3 und t_6 je drei Oozyten schockgefroren und die Histon HI-Kinaseaktivität bestimmt (siehe 3.6.1.2 auf Seite 58).

Tabelle 4.13: Histon HI-Kinaseaktivität (in cpm) von jeweils drei Oozyten zu den Zeitpunkten t_0 , t_3 und t_6

Zeitpunkt der Probenentnahme	Probe*	Einzelwerte	
		m. H. **	o. H. **
t_0 3 GV	A	443	37
	B	433	27
Mittelwert			32
Stabwn			–
t_3 3 GVBD	A	1667	1261
	B	1741	1335
	C	1198	792
Mittelwert			1129.3
Stabwn			240.4
t_6 3 GVBD	A	2383	1977
	B	2567	2161
	C	2599	2193
	D	2022	1616
Mittelwert			1986.8
Stabwn			229.4
t_6 6 GVBD	E	4491	4085
Hintergrund		406	–

Probe*: Es wurden verschiedene, unabhängige Wiederholungen (A-E) der Messung durchgeführt

** Mit und ohne Hintergrund

Die Daten aus der Tabelle 4.13 zeigen, daß die Histon HI-Kinaseaktivität im Verlauf der ersten 6 Stunden ansteigt. Die Aktivität ist in Oozyten, die direkt nach der Isolation eingefroren wurden, sehr niedrig. Sie beträgt nur 2,8 % der Aktivität der Zellen die zu t_3 entnommen wurden. Außerdem zeigt der Vergleich der beiden Werte für t_6 , daß das Assay über den gemessenen Aktivitätsbereich linear mißt und nicht in eine Sättigung kommt (siehe Abbildung 4.10 auf der nächsten Seite).

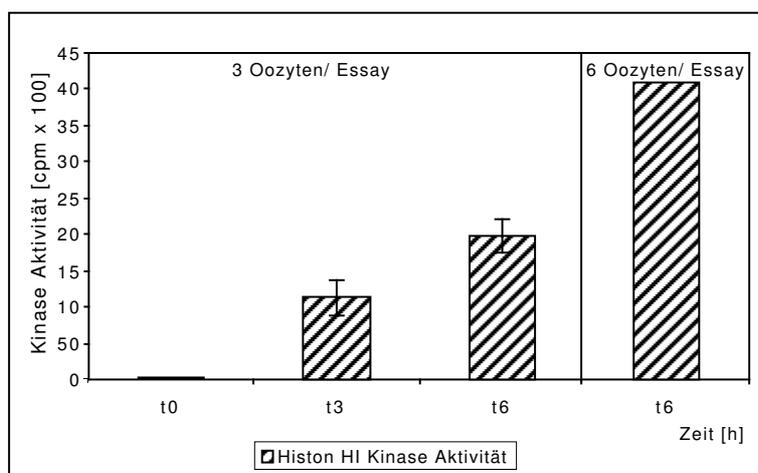


Abb. 4.10: Histon HI-Kinaseaktivität für die Zeitpunkte t_0 , t_3 und t_6 (siehe Tabelle 4.13 auf der vorherigen Seite)

4.5.1.2 MBP-Kinaseaktivität

Die MBP-Aktivität wurde gleichzeitig mit der Histon HI-Kinaseaktivität in einem Assay bestimmt (siehe 3.6.1.2 auf Seite 58). Die untersuchten Zeitpunkte sind dieselben.

Tabelle 4.14: MBP-Kinaseaktivität (in cpm) von jeweils drei Oozyten zu den Zeitpunkten t_0 , t_3 und t_6

Zeitpunkt der Probenentnahme	Probe*	Einzelwerte	
		m. H. **	o. H. **
t_0 3 GV	A	137	56
	B	241	160
	Mittelwert		108
Stabwn			–
t_3 3 GVBD	A	1418	1337
	B	1471	1390
	C	1036	955
	Mittelwert		1227.3
Stabwn		193.8	
t_6 3 GVBD	A	1160	1079
	B	1423	1342
	C	1470	1389
	D	1190	1109
	Mittelwert		1229.8
Stabwn		137.2	

Fortsetzung auf folgender Seite

Fortsetzung von vorheriger Seite

Zeitpunkt der Probenentnahme	Probe*	Einzelwerte	
		m. H. **	o. H. **
t ₆ 6 GVBD	E	2191	2110
Hintergrund		81	—

Probe*: Es wurden verschiedene, unabhängige Wiederholungen (A-E) der Messung durchgeführt

** Mit und ohne Hintergrund

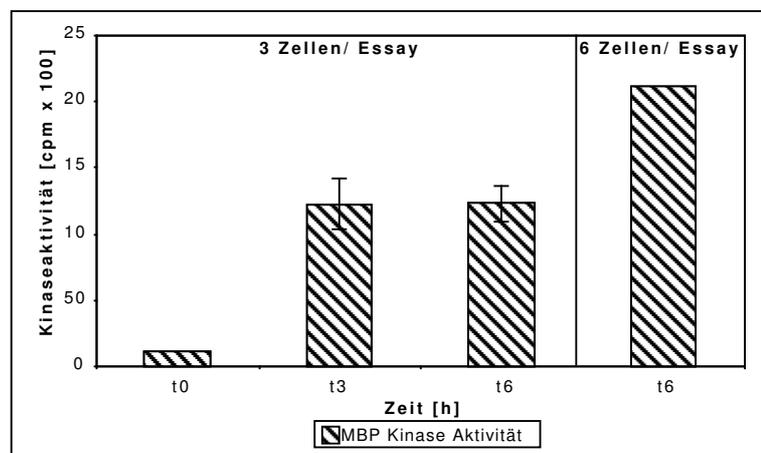


Abb. 4.11: MBP-Kinaseaktivität für die Zeitpunkte t₀, t₃ und t₆ (siehe Tabelle 4.14 auf der vorherigen Seite)

Aus den Daten in Tabelle 4.14 auf der vorherigen Seite geht eindeutig hervor, daß die Aktivität der MBP-Kinase bis t₃ ihr Maximum erreicht hat. Die Aktivität beträgt zum Zeitpunkt t₀ 8,8 % der Aktivität die in t₃-Zellen gemessen wird. Auch hier wurde als Kontrolle die doppelte Zellzahl eingesetzt (6 Zellen/Assey siehe Abbildung 4.11), um zu zeigen, daß das System linear mißt und genügend Substrat eingesetzt wurde. Nur so konnten für diesen Zeitraum und diese Anzahl von Zellen zuverlässige Meßwerte ermittelt werden.

4.5.2 Vergleich der Kinase Aktivitäten junger und alter Mäuse

Aus dem Vergleich der Reifungskinetik junger und alter Mäuse ging hervor, daß 50 % der Oozyten alter Mäuse etwa 30 Minuten eher in die Metaphase II eintreten als die Oozyten junger Mäuse (siehe 4.2.1.2 auf Seite 67). Diese Unterschiede in der Reifungskinetik wurden auch auf der Ebene der Kinaseaktivitäten untersucht.

4.5.2.1 Vergleich der Histon HI-Kinaseaktivitäten von Oozyten junger und alter CBA/Ca

Die Histon HI-Kinaseaktivität der Oozyten junger und alter Mäuse (siehe Tabelle 4.15) wurde auf den mittleren t_3 Wert der Oozyten junger Mäuse bezogen (siehe Tabelle 4.16 auf der nächsten Seite) und in Abbildung 4.12 dargestellt. Es wurden zwei unabhängige Messungen A und B durchgeführt, die mindestens drei Wiederholungen beinhalten.

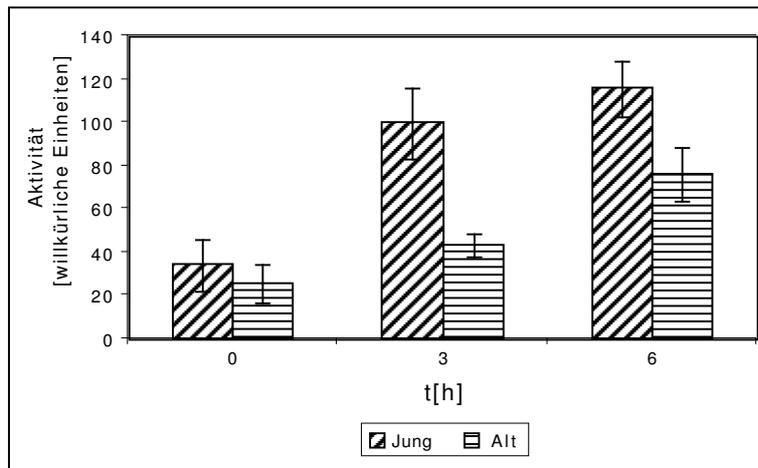


Abb. 4.12: Vergleich der Histon HI-Kinaseaktivität *in vitro* gereifter Oozyten junger und alter Mäuse entnommen zu den Zeitpunkten t_0 , t_3 und t_6 .

In Tabelle 4.15 sind die Histon HI-Kinaseaktivitäten für die Zeitpunkte t_0 , t_3 und t_6 aufgelistet. Die Daten stammen aus zwei verschiedenen Messungen A und B, in denen jeweils mindestens drei Wiederholungen eingesetzt wurden. Von den Einzelwerten wurde der Hintergrund abgezogen (Für Messung A betrug der Hintergrund 321 cpm und für Messung B: 547,5 cpm).

Tabelle 4.15: Vergleich der Histon HI-Kinaseaktivität *in vitro*- gereifter Oozyten junger und alter Mäuse entnommen zu den Zeitpunkten t_0 , t_3 und t_6 (in cpm).

Messung	t_0		t_3		t_6	
	Jung	Alt	Jung	Alt	Jung	Alt
A	216	213	2016	1211	2862	1853
	358	624	2475	760	2096	1721
	794	991	2245	711	2095	1782
	568				2060	2106

Fortsetzung auf folgender Seite

Fortsetzung von vorheriger Seite

Messung	t_0		t_3		t_6	
	Jung	Alt	Jung	Alt	Jung	Alt
B	397	78	703	513	1816	1159
	427	562	982	649	1496	685
	980	200	1845	497	1703	1760

Die Daten der Versuchsreihe A (Tabelle 4.15 auf der vorherigen Seite) wurden mit dem Mittelwert der t_3 Messungen verrechnet (Mittelwert t_3 entspricht 100 %, die jeweiligen Messwerte entsprechen x %) und in Tabelle 4.16 eingesetzt. Analog wurden die Messwerte aus der Versuchsreihe B berechnet.

Tabelle 4.16: Die Daten aus Tabelle 4.15 auf der vorherigen Seite bezogen auf die jeweiligen Mittelwerte der Messungen A bzw. B zu t_3

Messung	t_0		t_3		t_6	
	Jung	Alt	Jung	Alt	Jung	Alt
A	9.62	9.49	89.80	53.94	127.48	42.25
	15.95	27.80	110.24	33.85	93.36	71.32
	35.37	44.14	100.00	31.67	93.32	61.31
	25.30				91.76	
B	33.73	6.63	59.73	43.59	154.29	75.65
	36.28	47.75	83.43	55.14	127.10	94.99
	83.26	16.99	156.75	42.23	144.69	112.28
					93.81	
Gem. Med.*	27.8		57.43		93.59	

*Gemeinsamer Median der Kinase Daten von Oozyten junger und alter Mäuse für einen Meßzeitpunkt. Siehe Abbildung 4.12 auf der vorherigen Seite.

Für die Histon HI-Kinaseaktivitäten jeder der Zeiten wurde der jeweils gemeinsame Median der jungen und alten Mäuse bestimmt (siehe Tabelle 4.16). Anschließend wurde ausgezählt, wieviele der Einzeldaten ober- bzw. unterhalb des gemeinsamen Medians lagen und diese Werte in eine Vierfeldertafel (siehe 3.22 auf Seite 61) eingesetzt. Um herauszufinden, ob es sich bei den untersuchten Gruppen (junge und alte Mäuse) bezüglich der Histon HI-Kinaseaktivitäten um zwei verschiedene Gruppen handelte, wurden die Daten im Fisher-Test (siehe 3.7 auf Seite 61) verrechnet. Es zeigte sich, daß sich die Histon HI Kinase Aktivitäten nur zu t_3 ($p_{t_3} \leq 0,001$) signifikant voneinander unterscheiden.

4.5.2.2 Vergleich der MBP-Kinaseaktivitäten von Oozyten junger und alter CBA/Ca

Analog zu den Daten der Histon HI-Kinase wurden die Daten der MBP Kinase aufgearbeitet. Die MBP-Kinaseaktivität der Oozyten junger und alter Mäuse (siehe Tabelle 4.17) wurde auf den mittleren t_3 Wert der Oozyten junger Mäuse bezogen (siehe Tabelle 4.18 auf der nächsten Seite) und in Abbildung 4.13 dargestellt.

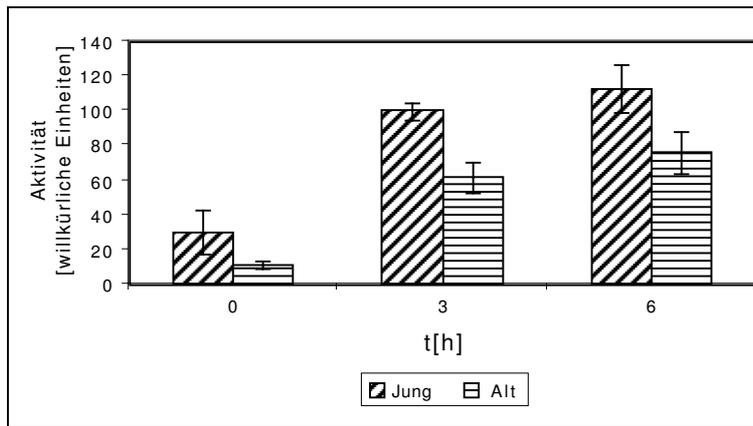


Abb. 4.13: Vergleich der MBP-Kinaseaktivität *in vitro* gereifter Oozyten junger und alter Mäuse entnommen zu den Zeitpunkten t_0 , t_3 und t_6 .

In Tabelle 4.17 sind die MBP-Kinaseaktivitäten für die Zeitpunkte t_0 , t_3 und t_6 aufgelistet. Die Daten stammen aus zwei verschiedenen Messungen A und B, in denen jeweils mindestens drei Wiederholungen eingesetzt wurden. Von den Einzelwerten wurde der Hintergrund abgezogen (Für Messung A betrug der Hintergrund 60 cpm und für Messung B: 84,5 cpm).

Tabelle 4.17: Vergleich der MBP-Kinaseaktivität *in vitro* gereifter Oozyten junger und alter Mäuse entnommen zu den Zeitpunkten t_0 , t_3 und t_6 .

Messung	t_0		t_3		t_6	
	Jung	Alt	Jung	Alt	Jung	Alt
A	149	131	1063	916	1267	439
	110	115	984	696	876	741
	167	133	1069	396	910	637
	169				1024	
B	146	39	629	504	812	552
	67	120	711	311	586	693
	105	59	849	480	515	819
					872	

Die Daten der Versuchsreihe A (Tabelle 4.17 auf der vorherigen Seite) wurden mit dem Mittelwert der t_3 Messungen verrechnet (Mittelwert t_3 entspricht 100 %, die jeweiligen Messwerte entsprechen x %) und in Tabelle 4.18 eingesetzt. Analog wurden die Messwerte aus der Versuchsreihe B berechnet.

Tabelle 4.18: Die Daten aus Tabelle 4.17 auf der vorherigen Seite bezogen auf die jeweiligen Mittelwerte der Messungen A und B zu t_3

Messung	t_0		t_3		t_6	
	Jung	Alt	Jung	Alt	Jung	Alt
A	14.34	12.61	102.31	88.16	121.94	42.25
	10.59	11.07	94.71	66.99	84.31	71.32
	16.07	12.80	102.89	38.11	87.58	61.31
	16.27				98.56	
					83.93	
B	33.73	5.28	86.21	69.07	154.29	75.65
	36.28	16.39	97.46	42.59	127.10	94.99
	83.26	8.02	116.39	65.78	144.69	112.28
Gem. Med.*	14,34		87,19		91,29	

*Gemeinsamer Median der Kinase Daten von Oozyten junger und alter Mäuse für einen Meßzeitpunkt. Siehe Abbildung 4.13 auf der vorherigen Seite.

Diese Daten wurden mit dem Fisher-Test statistisch ausgewertet (siehe 3.7.1 auf Seite 61). Für t_3 findet man schwach signifikante Unterschiede ($p= 0,04$) in der Aktivität der MBP-Kinase. Die MBP-Kinaseaktivitäten der Oozyten junger und alter Mäuse zu t_0 und t_6 unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

4.6 Reifungsrate und Kinetik Nocodazol-inkubierter Oozyten

Aus Untersuchungen an Oozyten älterer Frauen ist bekannt, daß sich die Morphologie der Spindel von der von Oozyten junger Frauen unterscheidet [259]. In mitotischen Zellen und während der Spermatogenese wird die Funktionalität der Spindel durch den Spindelkontrollpunkt sichergestellt [5]. Die Spindel läßt sich durch den Einsatz von Nocodazol in ihrer Struktur und Funktion beeinflussen. Somit ist man in der Lage den Spindelkontrollpunkt definiert zu testen und die beteiligten Elemente zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde eine Konzentration der Droge gesucht, welche die Spindel nicht vollständig depolymerisiert, sondern nur in ihrer Funktion beeinträchtigt.

4.6.1 Bestimmung einer Nocodazolkonzentration die nicht zu einem vollständigen Block führt

Für die folgenden Untersuchungen wurde eine Nocodazolkonzentration bestimmt, bei der eine bivalente Spindel gebildet werden kann und welche nicht zu einem dauerhaften Block in der Reifung führt. Oozyten von MF1 Mäusen wurden wie beschrieben (siehe 3.2.4 auf Seite 50) isoliert und in M2-Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen der Droge unter Standardbedingungen kultiviert. Die Zellen wurden stündlich unter dem Binokular begutachtet, und die Zahl an Oozyten ohne Keimbläschen bzw. mit Polkörper protokolliert.

Tabelle 4.19: Inkubation von Oozyten in Medium mit verschiedenen Konzentrationen an Nocodazol. Gemessen wurde die Rate an Polkörpern, die abgeschnürt wurden

Zeit [h]	Oozyten mit Polkörper (in %)			
	Kontrolle	Nocodazol [ng/ml]		
		30	12	6
8	1 (4,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
9	10 (45,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
10	13 (59,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (12,5)
11	14 (63,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	8 (50,0)
12	15 (68,2)	7 (21,9)	3 (10,7)	8 (50,0)
14	16 (72,7)	8 (25,0)	12 (42,9)	12 (75,0)
15	16 (72,7)	9 (28,1)	12 (42,9)	12 (75,0)
$n_{t_0}^* =$	22	32	28	16

* eingesetzte Zahl von Oozyten zu t_0

Für die folgenden Untersuchungen wurde eine Konzentration des Spindelgiftes gesucht, bei der die Spindel nicht vollständig depolymerisiert wird. Dadurch sollte es möglich sein, die Aktivierung eines Kontrollpunktes von der Unterbrechung des Zellzyklus durch die Zerstörung der Spindel unterscheiden zu können. Die Daten aus Tabelle 4.19 sind in Abbildung 4.14 auf der nächsten Seite grafisch dargestellt. Bei den beiden, niedrigeren Konzentrationen (6 und 12 ng/ml Nocodazol) kam es zu einer Verzögerung der Reifung. Bei einer Konzentration von 30 ng/ml hatten nach 15 Stunden nur 28,1 % der Oozyten einen Polkörper abgeschnürt. Diese Konzentration war für Untersuchungen, bei denen die Mehrzahl der Zellen nur vorübergehend arretiert werden sollten, ungeeignet.

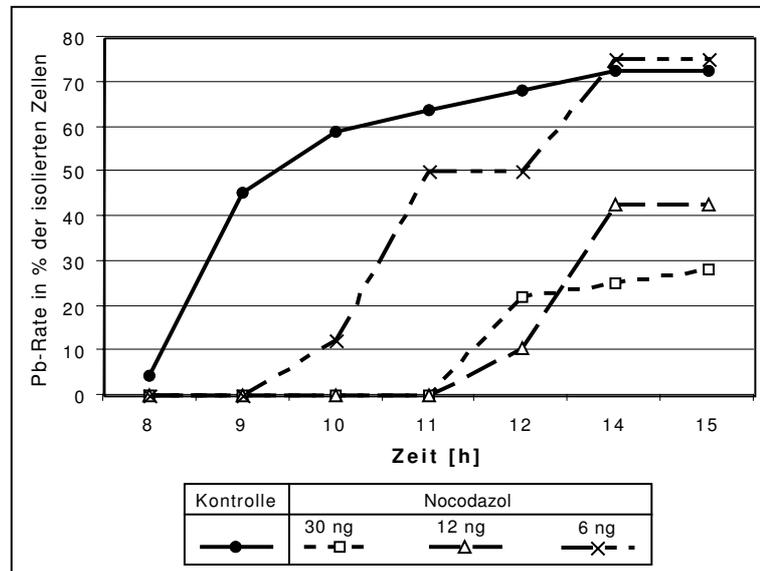


Abb. 4.14: Vergleich der Reifungsraten bei drei verschiedenen Nocodazolkonzentrationen (Siehe Tabelle 4.19 auf der vorherigen Seite auf der vorherigen Seite).

4.6.2 Reifungskinetik der Oozyten bei einer Nocodazolkonzentration von 12 ng/ml Medium

Für die folgenden Untersuchungen wurden die Oozyten in M2-Medium inkubiert, welches 12 ng/ml Nocodazol enthält. Es zeigte sich, daß die Zellen vorübergehend arretieren. Dieser Arrest war durch eine veränderte Morphologie gekennzeichnet. Die Zellen zeigten an ihrer Peripherie eine ringförmige Einschnürung, ähnlich den Merkmalen einer beginnenden Polkörperabschnürung. Im Phasenkontrast war deutlich zu sehen, daß die Spindel zur Peripherie unterhalb der beginnenden Abschnürung gewandert war. In diesem Stadium arretierten die Zellen für etwa 2 bis 3 Stunden, ehe sie einen Polkörper abschnürten. Diese Zellen werden im weiteren als 'Unvollendete' (u.v.) bezeichnet. In Tabelle 6.4 auf Seite 117 sind die absoluten und die prozentualen Reifungsdaten der Kontrollzellen aufgelistet. In Tabelle 4.20 auf der nächsten Seite sind die Reifungsdaten der Oozyten aufgelistet.

Tabelle 4.20: Reifungsdaten Nocodazol-inkubierter (12 ng/ml) *in vitro* gereifter Oozyten (MF1) von t_7 bis t_{13}

		Beobachteter Zeitraum						
		t_7	t_8	t_9	t_{10}	t_{11}	t_{12}	t_{13}
Kontrolle ($n = 216$)								
GVBD	Mw.*	91.3	87.9	81.5	58.6	40.7	23.7	17.5
	Stwn.*	3.8	7.9	9.1	15.1	12.8	10.3	9.6
Pb	Mw.		8.4	12.2	31.0	48.9	65.4	71.0
	Stwn.		5.9	5.8	10.8	8.8	6.7	9.1
Nocodazol ($n = 357$)								
GVBD	Mw.	81.9	70.6	64.4	53.1	44.9	40.6	35.5
	Stwn.	5.6	8.3	5.6	5.3	6.1	6.7	7.9
U.v.	Mw.	8.0	21.1	28.2	36.5	40.7	36.9	37.4
	Stwn.	2.5	6.1	5.7	5.0	6.7	7.5	5.8
Pb	Mw.			2.2	6.7	8.1	14.9	18.4
	Stwn.			-	3.2	4.6	7.6	6.5
Pb+u.v.†	Mw.	8.04	20.84	28.11	38.92	46.72	51.50	56.21
	Stwn.	2.49	6.64	6.21	4.44	5.64	6.86	5.22

* Mittelwert der Prozentwerte

* Standardabweichung

† Summe der Werte für die Rate gebildeter Pb und u.v. Diese Werte wurden aus den Daten der Einzelexperimente bestimmt und deren zeitlichen Mittelwerte errechnet, daher sind die Mittelwerte nicht gleich der Summe der beiden Mittelwerte aus der Tabelle

Die mittleren GVBD-Raten der Kontrolle und der inkubierten Zellen sind in Abbildung 4.15 auf der nächsten Seite gezeigt. Um herauszufinden, ob es sich bei den untersuchten Gruppen (Nocodazol-inkubierte Oozyten und die Kontrolle) bezüglich der GVBD-Rate um zwei verschiedene Gruppen handelte, wurden die prozentualen Reifungsdaten (siehe die Tabellen 6.4 auf Seite 117) eines Zeitpunktes nach dem gemeinsamen Median (siehe 3.7 auf Seite 61) sortiert, die Daten in eine Vierfeldertafel (siehe 3.22 auf Seite 61) eingetragen und dem Fisher-Test unterzogen (siehe 3.7.1 auf Seite 61). Signifikante Unterschiede in der GVBD-Rate der Kontrollen und der inkubierten Oozyten sind in Tabelle 4.22 auf Seite 93 aufgelistet. Signifikante Unterschiede sind nur für die Zeitpunkte t_7 , t_8 und t_9 zu errechnen. Die GVBD-Raten der beiden untersuchten Gruppen unterscheiden sich nur zu t_9 deutlich voneinander, bei t_7 und t_8 sind die Unterschiede bezüglich der GVBD-Rate sehr gering. Insgesamt scheinen die Nocodazol inkubierten Zellen entweder langsamer oder mit einer geringeren Rate in die Metaphase II einzutreten.

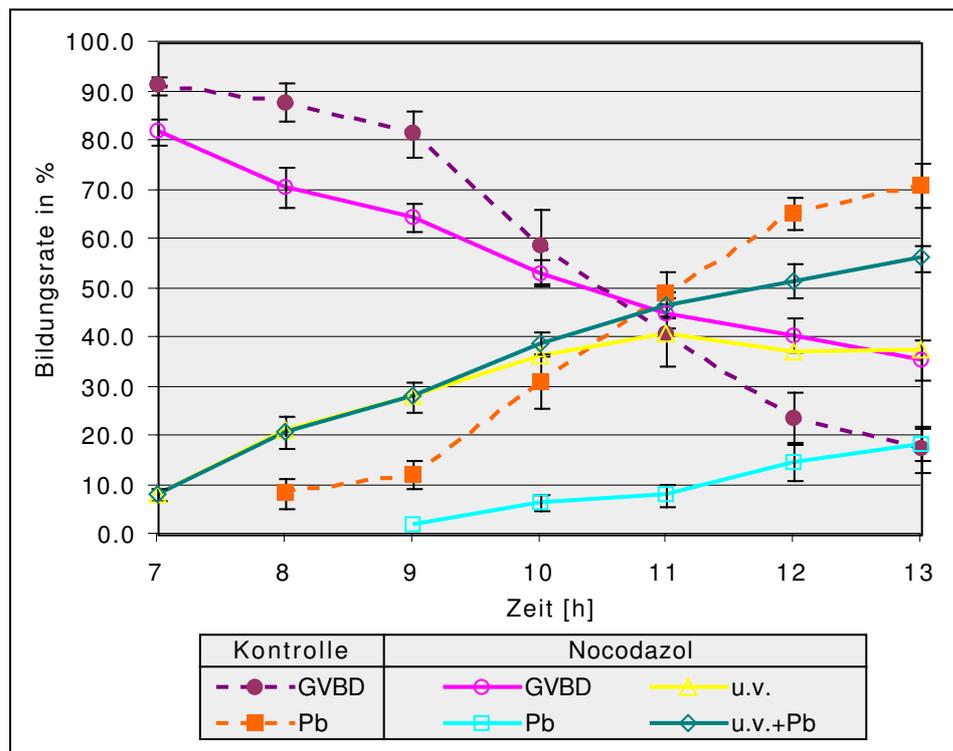


Abb. 4.15: Mittlere GVBD-Rate Nocodazol inkubierter (12 ng/ml) *in vitro*-gereifter Oozyten von MF1 Mäusen

Tabelle 4.21: Signifikante Unterschiede in der GVBD-Rate Nocodazol-behandelter und unbehandelter *in vitro*-gereifter Oozyten

Zeitpunkt	p*
t ₇	0,067
t ₈	0,067
t ₉	0,002

*Wahrscheinlichkeit p

Die gleichen Berechnungen wurden durchgeführt um die Unterschiede zwischen den Oozyten mit Polkörper zwischen den untersuchten Gruppen zu bestimmen. Es zeigt sich, daß sich die inkubierten Oozyten und die Kontrollen bezüglich ihrer Rate an gebildeten Polkörpern über den ganzen Untersuchungszeitraum signifikant ($p = 0,002$) voneinander unterscheiden.

In Tabelle 4.23 auf Seite 96 werden Daten vorgestellt, in denen die Zellen nach 13 Stunden Reifung so aufbereitet wurden, daß die Chromosomen (DA-PI) und die Spindel (indirekte Immunfluoreszenz (siehe 3.5 auf Seite 53)) ausgewertet werden können. In dieser Untersuchung zeigt sich, daß die Unvollendeten zumindest nach 13 Stunden als MII Oozyten vorliegen. Es wurde keine ähnliche Untersuchung zu einem früheren Zeitpunkt durchgeführt, daher ist es nicht möglich zu zeigen, ab wann diese Zellen als MII Zellen vorliegen. Auffällig ist, daß die Unvollendeten früher und in größerer Zahl zu beobachten sind als Polkörper in der Kontrolle.

Tabelle 4.22: Signifikante Unterschiede in der Pb-Rate Nocodazol-behandelter und unbehandelter *in vitro*-gereifter Oozyten

Zeitpunkt	p*
t ₇	0,002
t ₈	0,013
t ₉	0,013
t ₁₂	0,002
t ₁₃	0,002

*Wahrscheinlichkeit p

4.7 Nocodazol-induzierte morphologische Veränderungen der Spindel *in vitro* gereifter Oozyten

Die Wirkung der niedrigen Konzentration an Nocodazol wurde quantifiziert, indem die Spindeln vermessen wurden. Die Oozyten wurden in Anwesenheit von 12 ng/ml Nocodazol 13 Stunden in M2-Medium inkubiert. Anschlie-

ßend wurden die Spindel und die Chromosomen in der Immunfluoreszenz dargestellt (siehe 3.5 auf Seite 53) und die Spindeln vermessen (siehe Abbildung 4.16). In Tabelle 6.6 auf Seite 120 sind die Spindelabmessungen der untersuchten MII Oozyten (Oozyten mit Polkörper) aufgelistet.

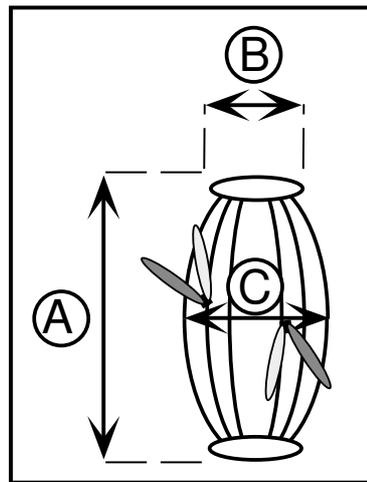


Abb. 4.16: Darstellung der Spindelmeßpunkte

Die Auswertung der Daten zeigt, daß sich die beiden Populationen der inkubierten Zellen und der Kontrolle nur in der Länge der Spindel A (siehe Abbildung 4.16) unterscheiden ($p \leq 0,002$). Die Spindeln der Nocodazol-behandelten Oozyten sind signifikant kürzer als die der Vergleichsgruppe (Siehe Abbildung 4.17 auf der nächsten Seite).

In einer weiteren Auswertung sollte untersucht werden, ob sich diese Zellen noch in ihrer chromosomalen Konfiguration unterscheiden d. h., ob sie auch auf chromosomaler Ebene den gleichen Reifungsstatus hatten wie auf zellulärer Ebene. In Tabelle 4.23 auf Seite 96 ist die chromosomale Konfiguration der Zellen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstatus aufgelistet. Dazu wurden die Zellen mit DAPI gefärbt, und es wurde untersucht, ob die chromosomale Konfiguration dem Reifungsstadium der Zelle entspricht bzw. ob die Chromosomen richtig in die Metaphaseplatte eingeordnet sind.

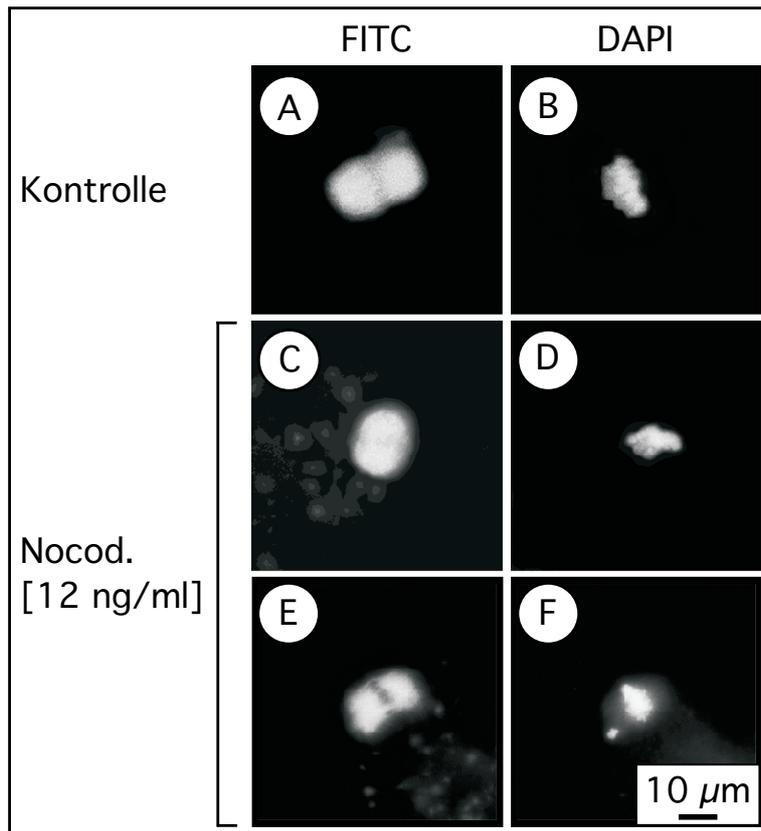


Abb. 4.17: Spindelcharakteristika zu t_{13} von *in vitro* gereiften Oozyten, die für 13 Stunden in M2 mit 12 ng/ml Nocodazol inkubiert wurden. Spindel (A) und Chromosomen (B) nach 13h *in vitro* Reifung, Spindel (C, E) und Chromosomen (D, F) nach 13h *in vitro* Reifung in M2 mit 12 ng/ml Nocodazol. In F ein Chromosom, das nicht in der Metaphaseplatte eingeordnet ist.

Tabelle 4.23: Chromosomale Konfiguration der Nocodazol-inkubierten Zellen

	n*	Chromosomen korrekt in Spindel eingeordnet					
		GVBD		u.v.		Pb	
		Ja	Nein	Ja	Nein	Ja	Nein
Kontr.	22						
MI		2	-	-	-	-	-
MII		-	-	-	-	20	-
Noc.	60						
MI		5	-	9	1	-	-
MII		-	-	-	-	34	11

*n ist Anzahl eingesetzter Oozyten

Es zeigt sich, daß die Zellen, die keinen Polkörper abgeschnürt haben, auch auf chromosomaler Ebene nicht weiter gereift sind. Der Block der verhindert, daß die Zellen einen Polkörper abschnüren verhindert also auch, daß die Chromosomen getrennt werden und die Zellen in die Anaphase I eintreten.

Kapitel 5

Diskussion

Der Begriff der altersabhängigen Aneuploidie beschreibt die Zunahme chromosomaler Aneuploidien mit steigendem Alter der Eltern. Es ist schon seit geraumer Zeit bekannt, daß das Risiko, ein trisomes Kind zu gebären, gegen Ende der reproduktiven Phase der Mutter signifikant ansteigt [193]. Obwohl dieses Phänomen schon früh beschrieben wurde, ist bis heute noch wenig über die Ursache und die Entstehung bekannt. Die CBA/Ca Maus erfüllt verschiedene Bedingungen, die sie als Modellorganismus für die Untersuchung altersabhängiger, chromosomaler Aberrationen des Menschen prädestinieren (siehe auch 2.4 auf Seite 44). So konnten in früheren Untersuchungen an CBA/Ca Mäusen numerische, chromosomale Aberrationen beobachtet werden, deren Zahl mit dem Alter der Mäuse zunahm [49, 51, 53]. In dieser Arbeit werden weitere, reifungsrelevante Parameter verglichen.

In verschiedenen Publikationen wurde die Anzahl und die Lage der Cross over-Ereignissen auf trisomen Chromosomen des Menschen untersucht. Es konnte für Chromosom 16 [87], 21 [226] und das X Chromosom [153] gezeigt werden, daß diese keine oder nur ein einzelnes Crossover-Ereignis aufwiesen. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß sowohl für den Menschen (Chromosom 16 und 21) als auch für *Drosophila* (X Chromosom) eine distale Lage der Chiasmata mit einer höheren Fehlerrate in der MI und proximal gelegene Chiasmata mit einer erhöhten Fehlerrate in der MII korrelieren [119, 128, 226]. In der hier vorgestellten Arbeit sollte untersucht werden, ob dieses Phänomen auch in der CBA/Ca Maus nachgewiesen werden kann und ob es möglicherweise eine Korrelation mit dem Alter der Mäuse gibt. Zu diesen zytogenetischen Daten sollte die Aktivität der beiden Zellzyklusregulierenden Kinasen MPF und MAP Kinase untersucht werden, um altersbedingte Unterschiede in deren Aktivität zu finden. Neben diesen primär unmanipulierten Systemen sollten Untersuchungen an Zellen, deren Spindel durch Nocodazol verändert wurde, zeigen, wie die Zellen auf diese Störung reagieren.

5.1 Welche Rolle spielen die Unterschiede in der Reifungskinetik und Reifungsrate für die An-euploidie?

In diesem Abschnitt werden die Reifungskinetik und die Reifungsrate (siehe 4.2.1 auf Seite 66) untersucht. Der erste Untersuchungszeitraum umfaßt das Zeitintervall, in dem die Oozyten das Keimbläschen auflösen. Auf zellulärer Ebene werden die Zellen durch die Befreiung von den Follikelzellen aus dem Block im Diktyotän entlassen, in dem sie seit der Geburt (siehe 2.1 auf Seite 5) arretiert sind. Auf Chromosomenebene bedeutet das, daß sich der synaptonemale Komplex zwischen den homologen Chromosomen auflöst und sich die Chromosomen trennen, um sich gemäß ihrer Ausrichtung in der Metaphaseplatte auf die Oozyte und das erste Polkörperchen zu verteilen.

5.1.1 Vergleich der GVBD-Rate von Oozyten junger und alter CBA/Ca Mäuse

Der Vergleich der Reifungsraten zeigt, daß die Oozyten der alten Mäuse zu allen drei Messzeiten eine signifikant höhere Rate an Zellen mit aufgelöstem Keimbläschen aufwiesen ($p_{t_{1,5}} = 0,007$, $p_{t_{2,0}} = 0,019$, $p_{t_{2,5}} \leq 0,001$). Es ist nicht bekannt, ob die Anzahl an gereiften Zellen pro Zeiteinheit zwischen den beiden Gruppen unterschiedlich ist oder ob die Oozyte alter Mäuse die Reifung früher aufnehmen. In beiden Gruppen wurden nur in Ausnahmefällen zu $t_{1,0}$ schon einzelne GVBD's gesehen. Extrapoliert man die Rate, zu der 50% der Oozyten das Keimbläschen aufgelöst haben, sieht man, daß die Oozyten alter Mäuse nach etwa 85 Minuten ins GVBD gegangen sind, wohingegen die Oozyten der jungen CBA/Ca erst nach etwa 100 Minuten soweit sind. Die Unterschiede in der Kinetik beruhen nicht auf Unterschieden in der absoluten Reifungsrate (siehe Tabelle 4.5 auf Seite 70). Die Rate der inkompetenten Oozyten alter Mäuse ist signifikant niedriger als die der Vergleichsgruppe, jedoch sind die Differenzen nicht so groß, daß sie die Unterschiede in der Reifungskinetik erklären würden. Es gibt somit prinzipielle Unterschiede in der Kinetik der Auflösung des Keimbläschens zwischen den Altersgruppen.

5.1.2 Vergleich der Pb-Rate von Oozyten junger und alter CBA/Ca Mäuse

Die Oozyten von CBA/Ca Mäusen schnüren etwa nach acht bis zehn Stunden ihren Polkörper ab. Es zeigte sich, daß der Trend, der bei der Auflösung des Keimbläschens zu beobachten war, sich auch zu diesem Entwicklungszeitpunkt nachweisen läßt. Extrapoliert man den Zeitpunkt, zu dem 50% der Oozyten ihren Polkörper abgeschnürt haben, so zeigt es sich, daß 50 % der Oozyten von alten Mäuse etwa 30 Minuten vor der Vergleichsgruppe

ihre Polkörper abgeschnürt haben (siehe Tabelle 4.4 auf Seite 69). Diese Berechnungen der Zeiten, zu denen 50% der Zellen ihre Polkörper abgeschnürt haben, können höchstens Anhaltspunkte sein, da die Verteilung der reifenden Zellen einer Glockenkurve entspricht und man somit nur bedingt die 50% Werte extrapolieren kann. Es zeigt sich jedoch ganz deutlich, daß die Oozyten alter Mäuse insgesamt schneller als die der Jungen durch die Reifung laufen und daß sie mit fortschreitender Reifung zunehmend schneller werden. In der Mitose werden die Integrität der Spindel und die Einordnung der Chromosomen in die Metaphaseplatte vor dem Eintritt in die Anaphase sichergestellt (reviewed in [5, 49]). LeMair-Adkins *et al.* [133] postulieren, daß in der weiblichen Meiose zumindestens der Kontrollpunkt fehlt, der sicherstellt, daß alle Chromosomen in die Metaphaseplatte eingeordnet sind, ehe die Zelle in die Anaphase geht. In Untersuchungen mit X0 weiblichen Mäusen konnte LeMair-Adkins *et al.* zeigen, daß die X0 Oozyten schneller in die Anaphase gehen als die Oozyten der Kontrollgruppe.

Eine Betrachtung der absoluten Reifungsdaten (siehe Tabelle 4.5 auf Seite 70) zeigt, daß sich die Oozyten der beiden Altersgruppen nur in der Rate, mit der sie im GV-Stadium arretieren, signifikant voneinander unterscheiden. Eine der möglichen Ursachen für die schnellere Reifung kann ein verringerter Kontakt zu den Granulosazellen sein. Diese die Oozyte umgebenden Zellen übernehmen verschiedene Aufgaben, die für die Ernährung der Zellen unerlässlich sind (siehe 2.1 auf Seite 6). Sie scheinen aber nicht nur für das Überleben der Oozyte wichtig zu sein, sondern üben auch eine wichtige Funktion bei der Selektion von Oozyten mit fragmentierten Chromosomen aus [195]. Fujino *et al.* [63] untersuchen die Ursachen altersbedingter Qualitätsverluste an Oozyten von ICR Mäusen. Sie konnten zeigen, daß in diesem Stamm mit zunehmendem Alter der Mäuse, die Rate an Zellen mit fragmentierten Chromosomen ansteigt. Perez und Tilly erweiterten diese Untersuchung, indem sie die Rolle der Kumuluszellen für eine mögliche Selektion der chromosomal geschädigten Oozyten durch Apoptose untersuchten [194, 195]. Sie kultivierten die Oozyten für 24 Stunden und verglichen die Apoptoserate von Oozyten, die von Kumuluszellen umschlossen waren, mit der von ‘nackten’ Oozyten beider Altersgruppen. Die beiden Altersgruppen unterschieden sich in der Apoptoserate der von Kumuluszellen umhüllten Oozyten nicht signifikant voneinander. Bei den Oozyten junger ICR Mäuse gab es in Abhängigkeit von der Umhüllung mit Kumuluszellen oder der Kultivierung der ‘nackten’ Oozyten keine signifikanten Unterschiede in der Apoptoserate. Die Kumulus-umhüllten Oozyten alter Mäuse hatten eine deutlich höhere Apoptoserate als die ‘nackten’ Oozyten der gleichen Altersgruppe und der Oozyten junger Mäuse. Sie konnten zeigen, daß das apoptotische Potential der Oozyten in den alten Mäusen davon abhängt, daß diese von Kumuluszellen umgeben sind. In den ICR Mäusen besteht der altersbedingte Fehler in einer Zunahme an Chromosomenbrüchen. Diese führen dann in Abhängigkeit von der Umhüllung mit Kumuluszellen zur Apoptose. Van Blerkom *et al.*

untersuchten die chromosomale Integrität im Zusammenhang mit mehrfach wiederholten Superovulationen. Sie konnten in dem gleichen Mausstamm (ICR) keine Brüche der Chromosomen feststellen [250]. Es ist somit noch nicht völlig sicher, worin die Ursache der Auslese einiger Oozyten besteht. In der CBA/Ca Maus konnte eine altersbedingte Zunahme an Chromosomenbrüchen nicht nachgewiesen werden. Jedoch sind andere chromosomale Aberrationen wie die erhöhte Aneuploidierate zu beobachten. Die Rate an Zellen mit einzelnen Chromatiden ist in den Oozyten der alten Mäuse signifikant erhöht (siehe Tabelle 4.12 auf Seite 80), es handelt sich hier um chromosomale Konfigurationen, die denen in X0 Mäusen ähneln. Auch die Oozyten von X0 Mäusen gehen schneller in die Anaphase als die Vergleichsgruppe [133].

In den Untersuchungen von Perez *et al.* konnte die Bedeutung der Kumuluszellen für die Selektion durch Apoptose gezeigt werden [194, 195]. Bei den Präparationen der Oozyten von alten CBA/Ca fiel auf, daß sich diese Oozyten wesentlich leichter von den Kumuluszellen befreien liessen als die Oozyten der jungen Mäuse. Da der Kontakt der Oozyte mit den Kumuluszellen für eine effiziente Selektion der Oozyten im Zusammenhang mit Chromosomenschädigungen und Apoptose wichtig ist, könnte dies auch eine Rolle bei der Selektion der Oozyten alter CBA/Ca spielen.

5.1.3 Der Einfluss der Superovulation auf die Reifungsrate und Reifungskinetik

Die Fähigkeit der Oozyte, die Chromosomen korrekt zu verteilen, nimmt mit dem zunehmenden Alter der Mutter ab. Es wird diskutiert, daß die Störungen, die zu den Fehlverteilungen der Chromosomen führen, zu jedem Zeitpunkt der Oogenese und der Reifung bis hin zur Einnistung stattfinden können [18, 51, 67, 85, 90, 285]. Einige dieser Vorgänge sind direkt abhängig vom hormonellen Status der Mutter vor, während und nach der Follikulogenese bzw. der Wiederaufnahme der Reifung. Es ist mehrfach beschrieben worden, daß Superovulation beim Menschen zu Anomalien der Spindel und der Chromosomen führen kann [199, 205, 251]. Es sollte in dieser Arbeit geklärt werden, ob eine solche Beeinflussung der Qualität der Oozyten auch in der Maus festzustellen ist. Zu diesem Zweck wurden die Mäuse mit PMSG (siehe 3.1.2 auf Seite 46) gespritzt. Bei der Verabreichung der Hormone wurde darauf geachtet, daß die Tiere nur im Diöstrus gespritzt wurden und daß eine Hormondosis (5 I.U.) verwendet wurde, die nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Ausbeute an Oozyten führt (siehe Tabelle 4.8 auf Seite 77). Betrachtet man die Daten unabhängig vom Alter der Tiere, zeigt sich ganz deutlich ($p < 0,01$), daß nach 14 bis 16 Stunden Reifung signifikant mehr Oozyten stimulierter CBA/Ca in der Metaphase I arretieren (siehe Tabelle 4.9 auf Seite 78). Es handelt sich hier nicht um inkompetente Zellen, da sich die Rate an GV Oozyten nach 14 bis 16 Stunden Reifung nicht signi-

fikant unterscheiden. Dies deckt sich mit Untersuchungen, die Van Blerkom und Davis [250] in einer Untersuchung mit ICR Mäusen gemacht haben. Das die verringerte Zahl an isolierten Oozyten nicht auf einer Störung der chromosomalen Integrität beruht, wurde von den Autoren gezeigt. Vielmehr wird hier vermutet, daß es follikelspezifische, intrinsische Faktoren sind, die einen Einfluss auf die Überlebensrate der Oozyte haben, da natürlich ovulierte Oozyten im Gegensatz zu *in vitro* gereiften Oozyten über 50% Abnormalitäten aufwiesen.

Betrachtet man die Daten in Abhängigkeit vom Alter und der Hormonbehandlung, fallen zwei signifikante Unterschiede auf:

1. Verglichen mit den Oozyten unstimulierter, junger CBA/Ca, arretieren die Oozyten junger, stimulierter Mäuse mit einer signifikant höheren Rate in der Metaphase I ($p < 0,05$).
2. Die Oozyten alter, stimulierter Mäuse treten mit einer signifikant geringeren Rate in die Metaphase II ein ($p < 0,05$ siehe Tabelle 4.10 auf Seite 78 und Abbildung 4.9 auf Seite 79).

Es zeigt sich also, daß durch die Hormonbehandlung signifikant weniger Oozyten in die M II eintreten. In dieser Population von Oozyten zeigen diese eine erhöhte Rate an chromosomalen Fehlverteilungen. Dieses Ergebnis läßt sich auf unterschiedliche Arten interpretieren. Durch die Hormonstimulierung kann eine andere Population an Oozyten zur Reifung gebracht worden sein, deren Fehlerrate pro Isolation per se höher (production line) und deren Verluste durch selektionierende Kontrollpunkte anteilmäßig höher ist. Oder die Population an ovulierten Oozyten ist in der Qualität gleich der der unstimulierten Mäuse, aber die Selektion durch die Kontrollpunkte arbeitet effektiver. Die bisher vorliegenden Ergebnisse ermöglichen keine Differenzierung zwischen diesen beiden Hypothesen. Von den Superovulationsprotokollen im Menschen unterscheidet sich unser Protokoll dadurch, daß die Hormondosis vergleichsweise gering ist, und es wurde nur die Follikelreifung beeinflusst (PMSG) nicht aber das Timing der Ovulation (hCG). Somit ist es schwierig, die Interpretation der humanen Daten auf diese Reihe an Experimenten zu übertragen.

5.2 Wie kommt es zu den altersabhängigen chromosomalen Aberrationen?

Die Unterschiede in der Reifungsrate, dem Timing und der Veränderung der gemessenen Parameter durch das Superovulationsprotokoll werden im folgenden Abschnitt den zytogenetischen Daten gegenübergestellt. Zu diesem Zweck wurden Oozyten der verschiedenen Versuchsgruppen gespreitet und daraufhin untersucht, ob sie sich in der Rate chromosomaler Anomalien unterscheiden (siehe Tabelle 4.6 auf Seite 71). Der Vergleich der Oozyten junger

und alter Mäuse (unstimuliert) zeigt, daß sich die beiden untersuchten Gruppen in dem Auftreten diploider und hyperploider Zellen (siehe Tabelle 4.6 auf Seite 71) und Zellen mit vorzeitig getrennten Chromosomen (siehe Tabelle 4.11 auf Seite 80) signifikant unterscheiden. In der Gruppe der Oozyten alter Mäuse ist die Rate an hyperploiden Zellen signifikant höher ($p < 0,02$) als in der Vergleichsgruppe, die Rate an diploiden Oozyten ist signifikant geringer ($p < 0,05$) als in Oozyten junger Mäuse. Ausserdem wurden noch vorzeitig getrennte Chromatiden beobachtet, diese wurden unterschieden in balancierte und unbalancierte, vorzeitigen Trennungen. Zu unbalancierten, vorzeitigen Trennungen kann es kommen, wenn die verfrühte Trennung vor der Abschnürung des Polkörpers beendet war und das fehlende Chromatid in den Polkörper segregiert ist. Die Oozyten der alten CBA/Ca haben eine signifikant höhere Rate vorzeitig getrennter Chromatiden ($p < 0,01$) mit einer zusätzlichen signifikanten Präferenz für unbalancierte, vorzeitige Trennungen ($p < 0,01$). Die Rate an unbalancierten, vorzeitigen Trennungen ist 2,5 mal so hoch wie die balancierter, vorzeitiger Trennungen. Die Mehrzahl der beobachteten Fehler, die zu einer verfrühten Trennung führen, finden also in der Metaphase I statt. Dies kann nur durch eine unzeitgemäße Auflösung der Verbindung zwischen den beiden Schwesterchromatiden entlang ihrer Zentromere erklärt werden. Dies ist auch beim Menschen die häufigste Ursache für numerische Chromosomenanomalien und wird hier auf eine fehlerhafte Trennung der homologen Chromosomen während der ersten, maternalen Meiose zurückgeführt [84, 177] reviewed in [48, 49, 74].

Vergleicht man diese Daten mit denen superovulierter Mäuse (siehe Tabelle 4.11 auf Seite 80), so ist zu erkennen, daß sich die Anzahl hyperploider Zellen junger, stimulierter Tiere leicht erhöht und die Rate diploider Zellen in jungen, unbehandelten Tieren leicht sinkt. Die Oozyten superovulierter, alter Mäuse zeigen keine Veränderungen in der Anzahl diploider bzw. hyperploider Zellen. Untereinander unterscheiden sich die Oozyten junger und alter superovulierter Mäuse somit hinsichtlich der zytogenetischen Daten nicht mehr signifikant. Dieser Befund ließe sich mit der Theorie der Production Line erklären [90]. Diese Theorie beruht auf verschiedenen Beobachtungen:

- In Säugern (z.B. Mensch und CBA/Ca-Maus) steigt die Rate an Aneuploidien mit zunehmenden Alter des Individuums [8, 53].
- Je später die embryonal angelegten Oozyten gebildet werden, um so niedriger ist ihre Rate an Chiasmata.

Die daraus resultierende Theorie besagt, daß die embryonal zuerst angelegten, also qualitativ hochwertigeren Oozyten, auch zuerst ovuliert werden. Mit zunehmendem Alter steigt der Anteil ovulierter Oozyten mit einer geringeren Rate an Chiasmata, also mit einem höheren Risiko für unbalancierte, vorzeitige Trennungen der Chromatiden. Verschiebt die Hormongabe den Anteil der qualitativ guten Oozyten zu den minderwertigeren, später gebil-

deten Oozyten, dann führt dies in den jungen CBA/Ca zu einer stärkeren Veränderung der Population reifender Oozyten als in den Ovarien der alten CBA/Ca. Da die Ovarien der alten CBA/Ca schon fast entleert sind, ist der Anteil an Oozyten mit einer niedrigen Chiasmarate schon vergleichsweise hoch und hat daher altersabhängig schon ein Maximum erreicht. Dadurch ließe sich erklären, daß die Rate chromosomaler Aberrationen in den stimulierten, alten CBA/Ca nicht steigt. Auch der Vergleich der superovulierten mit den unbehandelten Tieren beider Altersklassen weist keine signifikanten Unterschiede auf. Auch hier ist der Vergleich mit den Daten aus der Humanmedizin schwierig, da ein Ziel der Superovulation eine erhöhte Anzahl ovulierter Oozyten ist. Diese Oozyten zeigen eine erhöhte Rate aneuploider Zellen [7].

Der Vergleich der balancierten und unbalancierten, vorzeitigen Trennungen zeigt keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den Daten der unbehandelten Tiere. In beiden Altersgruppen der hormonbehandelten Tiere hat die Rate an unbalancierten Trennungen zugenommen, bei den jungen hormonbehandelten Tieren prozentual stärker als bei den alten. Die Signifikanz des Unterschiedes der gesamten Zahl an vorzeitigen Trennungen zwischen den superovulierten jungen und alten CBA/Ca ist etwas vermindert. Diese Veränderungen sind jedoch nicht signifikant.

Durch die Hormonbehandlung kommt es in den jungen Tieren zu einer leichten, nicht signifikanten Erhöhung der Rate hyperploider Zellen. Insgesamt zeigt sich, daß sich die Rate chromosomaler Aberrationen in den Oozyten der alten CBA/Ca nicht signifikant verändert. Die absolute Reifungsrate ist in den Oozyten alter, superovulierter Mäuse um 8,4% niedriger als in den Oozyten ungeprimter, alter Mäuse ($p < 0,05$) (siehe Tabelle 4.10 auf Seite 78).

5.2.1 Wann sind die ersten chromosomalen Aberrationen zu beobachten?

Aus der hohen Rate unbalancierter Trennungen ergab sich Frage, wann die ersten Anzeichen für diese vorzeitige Trennung der Bivalenten zu beobachten ist. Um diese Frage zu klären, wurden Oozyten junger und alter CBA/Ca zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (t_3 und t_6) gespreitet (siehe Tabelle 4.7 auf Seite 76). Bei t_3 haben die Zellen das Keimbläschen aufgelöst, aber die Metaphase noch nicht erreicht und noch keine funktionelle, bipolare Spindel gebildet. Bei t_6 haben die Oozyten eine funktionale, fäßchenförmige, bipolare Spindel ausgebildet, und die Bivalente sollten in diese eingeordnet sein. Jetzt wirken auch schon Zugkräfte auf die Bivalente, so daß instabil verknüpfte Schwesterchromatiden möglicherweise schon voneinander getrennt werden. Sollte die Ursache für die hohe Rate unbalancierter Trennungen tatsächlich in einem Fehler in der MI liegen, sollten einzelne Univalente zu t_3 und/oder

t_6 zu finden sein. Überraschenderweise konnte nur eine Oozyte mit einem Univalenten in der Gruppe der Oozyten junger CBA/Ca gefunden werden. Weitere Univalente konnten nicht gefunden werden, jedoch eine hohe Rate an Bivalenten mit Spalt. Bei diesen sog. Bivalenten mit Spalt handelte es sich um bivalente Chromosomen, deren Telomere eindeutig zueinander ausgerichtet sind, obwohl sie eine sichtbare Unterbrechung in der dichten, chromosomalen Struktur aufweisen (siehe Schema 4.7 auf Seite 74 und Abbildung 4.4 auf Seite 72). In gefärbten Präparaten (Giemsa) konnte zwischen den zueinander ausgerichteten Bivalenten an den Telomeren eine ganz schwache Brücke aus giemsaefärbtem Material gesehen werden. Es scheint sich hier um Bivalente mit extrem terminalen Chiasmata zu handeln. In die Auswertung wurden solche Konfigurationen aufgenommen, deren Spalt größer als $0,4 \mu\text{m}$ war. Diese Konfigurationen wurden nicht als Univalente ausgewiesen, da die Telomere noch eindeutig gegeneinander ausgerichtet waren. Es zeigte sich, daß nach drei Stunden Reifung signifikante Unterschiede in der Anzahl an Zellen bzw. Bivalenten mit Spalt zwischen den beiden Altersgruppen zu finden waren. In den Oozyten alter Mäuse war die Zahl an Bivalenten mit Spalt signifikant höher als in den Oozyten junger Mäuse ($p < 0,001$) (siehe Tabelle 6.7 auf Seite 121). Die Unterschiede zwischen den Oozyten der beiden Altersgruppen nahmen im Verlauf weiterer drei Stunden *in vitro* Reifung noch zu. Die Oozyten der alten CBA/Ca unterschieden sich nach drei Stunden in allen gemessenen Parametern signifikant von den Oozyten der jungen CBA/Ca (siehe Tabelle 4.7 auf Seite 76). Die postulierten, vorzeitig getrennten Chromatiden konnten in den früh gespreiteten Oozyten nicht gefunden werden, jedoch steigt die Rate an Oozyten mit auffälligen, chromosomalen Konfigurationen im Verlauf der ersten sechs Stunden der *in vitro* Reifung dramatisch an. Die beobachteten Konfigurationen könnten die Vorstufe späterer (MII), chromosomaler Fehlverteilungen sein. Bei Untersuchungen an trisomen Chromosomen des Menschen konnten für die Chromosomen 16 und 21 gezeigt werden, daß bei maternal bedingten Fehlern in der MI die trisomen Chromosomen eine geringere Anzahl an Rekombinationen aufwiesen und daß die wenigen Rekombinationsereignisse ausschließlich distal zu finden waren [120] (siehe auch Abschnitt 2.3.2 auf Seite 42). Wenn die terminal assoziierten Bivalente terminale Crossover Ereignisse darstellen, dann würden sich die Befunde aus dem Mausmodell mit denen decken, die für den Menschen für die Chromosomen 16 und 21 beobachtet wurden. Chiasmata halten während der Congression die homologen Chromosomen zusammen und sorgen so für die bipolare Ausrichtung der Kinetochore zu den beiden Spindelpolen. Eine Destabilisierung der Verbindung der homologen Chromosomen führt auch zu Fehlern bzw. Verzögerungen in der Anordnung der Chromosomen in der Metaphaseplatte und kann somit eine Ursache für chromosomale Fehlverteilungen sein. Von verschiedenen Autoren konnte eine klare Korrelation zwischen dem altersabhängigen Auftreten unvollständiger Metaphaseplatten und chromosomalen Fehlverteilungen ge-

zeigt werden [15, 259, 92, 219]. Es konnte jedoch bisher nicht kausal gezeigt werden, daß die nicht eingeordneten Chromosomen die Ursache für die altersbedingte, erhöhte Aneuploidierate bei Frauen sind.

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Daten zeigen deutlich, daß es in den Oozyten der alten CBA/Ca schon im Verlauf der MI zu auffälligen, chromosomalen Konfigurationen kommt. Handelt es sich bei diesen Konfigurationen um Chiasmata oder um Telomere, die über Proteinbrücken miteinander verknüpft sind? Eine mögliche Antwort auf diese Frage geben Untersuchungen an Mäusen, denen das *Mhl1* Gen deletiert wurde, welche zeigen, daß diese Mäuse keine Chiasmata mehr ausbilden. Die Folge ist, dass die Chromosomen dieser Mäuse in der Prometaphase ausschließlich als Univalent vorliegen [271]. Da in beiden untersuchten Gruppen zusammen nur ein Univalent beobachtet wurde, handelt es sich bei den terminalen Assoziationen wahrscheinlich um echte Chiasmata. Diese Klasse von terminalen Chiasmata sind im humanen System eng mit einer erhöhten Rate an chromosomalen Fehlverteilungen korreliert. Ein weiterer Beweis für die Theorie, daß die in der MII beobachteten Fehler in der MI angelegt werden, ist das Auftreten univalenter Chromatiden in Spreitungen von Polkörpern. Diese können nur dadurch erklärt werden, daß die in der MII beobachtete Aberration schon in der MI entstanden ist, und daß das fehlende Chromatid in den zugehörigen Polkörper segregiert. Das Wissen um den Zeitpunkt, zu dem sich die chromosomale Aberration frühestens nachweisen lässt, ist besonders wichtig bei der Aufklärung der Mechanismen, die zu maternalen, altersabhängiger Aneuploidie führen. Untersuchungen am Spindelkontrollpunkt [20] haben gezeigt, daß vorübergehende Störungen der Spindelintegrität erst dann zu einer Verzögerung der Reifung führen, wenn sie 6 bis 8 Stunden nach dem GVBD stattfinden. Der Spindelkontrollpunkt wird also erst kurz vor der Metaphase aktiviert. Betrachtet man diese Ergebnisse vor dem Hintergrund der deutlichen Verkürzung der Reifungsdauer der Oozyten alter CBA/Ca, so kann diese Veränderung der Reifungskinetik ein Hinweis darauf sein, daß Kontrollpunkte in ihrer Funktion beeinträchtigt sind. Zusammenfassend kann man sagen, daß das vermehrte Auftreten von einzelnen Chromatiden in den Spreitungen von Oozyten alter CBA/Ca nicht ausschließlich auf dem Vorkommen extrem distaler Chiasmata beruhen kann, da diese auffälligen Konfigurationen in beiden untersuchten Gruppen in großer Zahl zu beobachten waren. Weitere Parameter und deren Bedeutung für die Entstehung der chromosomalen Aneuploidien, werden im folgenden Kapitel analysiert.

5.3 Gibt es weitere Faktoren die zur chromosomalen Instabilität beitragen?

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die chromosomale Konfiguration und die Reifungskinetik der Oozyten junger und alter CBA/Ca verglichen.

Es zeigten sich jedoch keine Merkmale, die ausschließlich in einer der beiden untersuchten Gruppen zu finden waren. Die Rate an Chromosomen mit Spalt und Telomerassoziationen war in den Oozyten alter Mäuse signifikant höher, jedoch konnten sie in hoher Zahl auch in den Oozyten der jungen Mäuse nachgewiesen werden. Dies kann bedeuten, daß sich die Oozyten in weiteren, bisher noch nicht untersuchten Parametern unterscheiden, die die weitere Reifung und Qualitätskontrolle der Oozyten beeinflussen. Es ist möglich, daß die chromosomalen Konfigurationen, die in beiden Gruppen beobachtet werden, nur in den Oozyten der jungen CBA/Ca in ausreichendem Maße erkannt und korrigiert werden können. Neben diesen graduellen Unterschieden auf chromosomaler Ebene konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die Oozyten der alten CBA/Ca schneller reifen als die der Vergleichsgruppe. Dieser Befund gibt einen Hinweis auf weitere Unterschiede zwischen den Oozyten der beiden Altersgruppen.

Unter *in vitro* Bedingungen nehmen von Granulosazellen befreite Oozyten von Menschen und Mäusen die Reifung spontan auf. Dieser Vorgang wird durch interne und externe Stimuli beeinflusst. Eines der wichtigsten, internen Stimuli ist die Aktivierung des MPF ($cdc2^{p34}$ + Zyklin B1) und der MAP Kinase (MAPK). In Oozyten markiert die Aktivierung des Cdk1-Zykin-Komplexes den Eintritt in die Meiose [178]. Der Zusammenhang zwischen der Aktivität des MPF und der Reifungsgeschwindigkeit wurde in den Arbeiten von Polanski *et al.* gezeigt: Mausstämme (CBA/Kw and KE), die sich in der Syntheserate von Zyklin B unterscheiden, brauchen unterschiedlich lang, bis sie ihre maximale MPF-Aktivität erreichen, in die Anaphase gehen und den ersten Polkörper abschnüren [201, 204, 130]. Somit war es naheliegend, die Aktivität des MPF und der MAP Kinase in den Oozyten der jungen und der alten CBA/Ca zu untersuchen und zu vergleichen.

5.3.1 Welche Faktoren beeinflussen die Reifungsgeschwindigkeit; können sie die Chronologie der Reifung stören?

Um die Aktivität des MPF bzw der MAP-Kinase zu messen, wurde unter geeigneten Bedingungen die jeweiligen Substrate (Histon HI bzw. MBP) zu dem Lysat von drei bzw. sechs Zellen zugegeben, und das Substrat wurde mit $\gamma P^{32}dATP$ markiert. Die Daten aus Tabelle 4.13 auf Seite 82 und Abbildung 4.10 auf Seite 83 zeigen, daß die Kinase-Aktivität über den beobachteten Zeitraum deutlich ansteigt und die doppelte Anzahl an eingesetzten Oozyten auch zu einer Verdopplung der Messwerte führt. Somit konnte gezeigt werden, daß das Assay über den untersuchten Aktivitätsbereich linear misst und nicht in eine Sättigung kommt.

Polanski *et al.* konnten zeigen, daß die Länge des Intervalles zwischen GVBD und der Abschnürung des ersten Polkörpers unter anderem durch die Syntheserate an Zyklin B bestimmt wird [201, 204]. Diese begrenzt auch den zeitlichen Verlauf der Histon HI Kinase-Aktivierung. Oozyten des Maus-

stammes CBA/Kw brauchen vom GVBD bis zur Abschnürung des ersten Polkörpers etwa 7 Stunden, wohingegen Oozyten des Mausstammes KE 10 bis 11 Stunden benötigen.

Der Vergleich der Histon HI- und der MBP Kinasedaten sollte klären, ob sich Unterschiede in der Aktivität der Kinasen und in der Kinetik, mit der sie aktiviert werden, nachweisen lassen. In den Abbildungen 4.12 auf Seite 85 und 4.13 auf Seite 87 sind die Histon HI und MBP Kinaseraten von Oozyten der beiden Altersgruppen für t_0 , t_3 und t_6 gezeigt.

Histon HI: Insgesamt ist die Histon HI Kinase-Aktivität in den Oozyten alter CBA/Ca geringer als in der Vergleichsgruppe. Ein signifikanter Unterschied läßt sich für t_3 zeigen ($p_{t_3} < 0,001$), die Kinaseaktivität ist zu diesem Zeitpunkt in den Oozyten der alten Mäuse deutlich geringer als in den Oozyten der jungen CBA/Ca.

MBP: Auch die MBP-Kinase Aktivität ist in den Oozyten der alten Mäuse insgesamt geringer als in den Oozyten der jungen CBA/Ca. Es gibt nur zu t_3 schwach signifikante Unterschiede in der Aktivität der MAP-Kinase ($p_{t_3} < 0,04$).

Obwohl die Oozyten der alten Mäuse sowohl schneller das Keimbläschen auflösen als auch früher einen Polkörper abschnüren, ist ihre Kinase-Aktivität zu t_3 um 57 % niedriger als die der Vergleichsgruppe. Dies kann in dieser Phase auf eine geringere Verfügbarkeit von Zyklin B zurückzuführen sein, da Polani *et al.* zeigen können, daß die Kinetik, mit der die Histon HI Kinase ansteigt, von der Verfügbarkeit des Zyklins abhängt. Direkt damit verknüpft ist die Länge der ersten, meiotischen M-Phase, da gezeigt wurde, daß dieses Zeitintervall durch die Injektion von Zyklin B-mRNA verkürzt werden kann. Die hier vorgestellten Daten zeigen, daß in den Oozyten der alten CBA/Ca die Reifungsdauer nicht mehr mit der Kinase-Aktivität koordiniert ist. Somit ist die zytoplasmatische Reifung der Oozyten alter CBA/Ca von der chromosomalen Reifung und der Spindelreifung entkoppelt. Es ist vorstellbar, daß diese Entkopplung den Fortschritt des Zellzyklus und seine Regulation auf verschiedene Weisen beeinflusst. Der verzögerte Anstieg der Kinase-Aktivität kann die Synchronisierung der strukturellen Veränderungen (Spindelbildung und Kondensation der Chromosomen) mit der Phosphorylierung zellzyklussteuernder Proteine stören. So wurde von verschiedenen Autoren gezeigt, daß die Aktivität der Kinasen die Spindelbildung beeinflussen [254, 204]. In dieser Arbeit konnten keine morphologischen Veränderungen der Spindel in den Oozyten der älteren Mäuse gezeigt werden, dies schließt jedoch nicht aus, daß es in diesen Zellen zu einer Beeinträchtigung der Funktionalität der Spindeln kommt, die auf die veränderte Kinaseaktivität zurückzuführen ist (siehe auch den Abschnitt 5.4 auf Seite 109). Eine weitere Hypothese postuliert eine geringere Dekorierung der Spindel mit Mitochondrien mit den sich daraus ergebenden Veränderungen im Metabolismus der einzelnen Kompartimente der Oozyte, wie z.B. einer Unterversorgung Spindel-assoziiierter Funktionen mit ATP [236]. Daneben kann die

relative Verkürzung des Intervalls zwischen GVBD und Anaphase I dazu beitragen, daß besonders anfällige Strukturen, wie die distalen Chiasmata, unzeitgemäß aufgelöst werden. Die Unterschiede in der Aktivität der Kinasen sind ein weiterer Faktor neben den terminalen Chiasmata, der die Oozyten der alten Mäuse von denen der jungen unterscheidet. Möglicherweise führt das Zusammenwirken beider Fehlerquellen zu den beschriebenen chromosomalen Anomalien. Lamb *et al.* postulierten, daß es mehrere Faktoren gibt, die im Verlauf der Meiose zu einem Ausbleiben der Trennung (non-Disjunction) führen. Das erste Ereignis ist die Bildung eines anfälligen Bivalentes im fötalen Ovar, wie z. B. ein Bivalent mit terminalen Chiasmata. Das zweite Ereignis ist dann die fehlerhafte Prozessierung dieses Bivalentes im adulten Ovar während der MI [128]. In dieser Theorie besteht der altersbedingte Effekt in einer geringeren Effizienz der Segregation der Bivalenten. In den Oozyten beider Altersgruppen der CBA/Ca konnten eine große Anzahl von Bivalenten mit terminalen Chiasmata nachgewiesen werden, mit einer signifikant höheren Rate dieser auffälligen, chromosomalen Konfigurationen in den Oozyten der alten Mäuse. Die in den Oozyten der alten CBA/Ca zu beobachtende Entkopplung der zytoplasmatischen Reifung von der chromosomalen Reifung ist ein vielversprechender Befund, und es ist möglich, daß es sich hierbei um das zweite Ereignis handelt, welches in Kombination mit den terminalen Chiasmata zu einer Fehlverteilung führen kann.

Werden alle Chromosomen nach dem gleichen Mechanismus fehlverteilt? Um diese Frage zu klären wurden die Chromosomensätze trisomer Kinder mit denen ihrer Eltern verglichen [88]. Dabei stellte sich als einzige Gemeinsamkeit für alle fehlverteilten Chromosomen heraus, daß die Zahl der Rekombinationen der homologen Chromosomen verändert ist. Eine Reduktion der Chiasmata betroffener Chromosomen konnte in maternal bedingten Trisomien, die im Verlauf der MI entstehen, für die Chromosomen 15, 16, 18 und das X-Chromosom gezeigt werden. Für die Chromosomen 16 und 21 wurde die Anzahl und Lage der Chiasmata in Abhängigkeit vom Alter der Mutter untersucht, und es zeigte sich, daß es keine Unterschiede gab, die mit dem Alter der Mutter korrelierten [88]. Folglich muß es weitere Faktoren geben, die für die altersabhängige Zunahme von Trisomien verantwortlich sind. Dies deckt sich mit der Forderung nach einem zweiten Ereignis ("Two Hit" Hypothese), welches in Abhängigkeit vom Alter der Mutter, zu einer Fehlverteilung führen kann. Ein weiterer Faktor, der zu einer Fehlverteilung führen kann, ist eine verminderte Effizienz bei der Segregation anfälliger Bivalente. Volarcik *et al.* konnten zeigen, daß eine fehlerhafte Ausrichtung der Chromosomen in der Metaphaseplatte I eng mit einem erhöhten Alter der Spender korrelierten [259]. Es spricht einiges dafür, daß es verschiedene Ursachen für die Trisomien einzelner Chromosomen gibt. Eine klare Korrelation von Fehlverteilungen und der Lokalisation von Chiasmata entlang der Bivalente konnte für bestimmte Chromosomen gezeigt werden. Diese Konfigurationen sind dann anfällig für altersbedingte Fehler in der Segregation.

Ein möglicher Mechanismus, wie dieser zweite, altersabhängige Fehler aussehen kann, wurde von Shonn *et al.* in *S. cerevisiae* gezeigt [227]. Während Bub1 das Timing der Meiose beeinflusst, spielt Mad2 in *S. cerevisiae* eine wichtige Rolle bei der Anheftung der Kinetochore an die Spindel [227]. Shonn *et al.* konnten zeigen, daß Mad2 defiziente Mutanten der Hefe fast ausschließlich Fehler in der ersten, meiotischen Reifeteilung machen. Als Ursache wird diskutiert, daß die Chromosomen mit endständigen Chiasmata in der ersten meiotischen Reifeteilung flexibler sind als Chromosomen mit kinetochornahen Chiasmata. Diese erhöhte Flexibilität erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß beide Homologen am selben Spindelpol verankert und zu diesem hingezogen werden.

Wir konnten in dem System der CBA/Ca zeigen, dass zwei verschiedene Klassen von Fehlern vorkommen können: erstens auffällige Chromosomale Konfigurationen und zweitens, eine signifikante Entkopplung der chromosomalen Reifung von der zytoplasmatischen Reifung. Bei den hier beschriebenen Abweichungen von der Norm bzw. den auffälligen Strukturen kann es sich um die Kombination der in der "Two Hit" Hypothese geforderten Störungen handeln, deren Zusammenwirken das Risiko für chromosomale Aberrationen erhöht. In der Hefe konnte die Funktion zellzyklusrelevanter Gene (Mad2, Bub1) gezeigt werden, die eine Rolle im Timing, der Anheftung und Segregation der Chromosomen haben. Es wäre jetzt interessant die Verteilung von Mad2 im Verlauf der Reifung zu untersuchen und das Verteilungsmuster in Oozyten der jungen und alten CBA/Ca zu bestimmen.

5.4 Nocodazol aktiviert einen Kontrollpunkt und verzögert die Reifung der Oozyten

Die bisher vorgestellten Daten beantworten die Frage nach der Existenz von Kontrollpunkten in der Reifung der Oozyten nicht. Zu diesem Zweck wurden die Oozyten einer definierten Störung ausgesetzt, um zu klären, ob sie gemäß dem Funktionsprinzip eines Kontrollpunktes reagieren (siehe Abbildung 2.7 auf Seite 23). Der Kontrollpunkt, der für diese Untersuchungen beansprucht werden sollte, ist der Spindelkontrollpunkt (engl.: Spindel Assembly Checkpoint). In dieser Kontrollinstanz wird sichergestellt, daß die Chromosomen bipolar in die Spindel einsortiert und in der Metaphaseplatte ausgerichtet werden. Es ist schon lange bekannt, daß eukaryontische Zellen arretieren, wenn Spindel-depolimerisierende Drogen eingesetzt werden [215]. Von Zellen höherer Eukaryonten weiss man, daß sie arretieren, wenn auch nur ein Chromosom in einer ansonsten intakten Spindel nicht mit dieser verbunden ist [211]. Man weiss außerdem, daß das Signal, welches den Zellzyklus verzögert, von dem freien Kinetochor ausgeht [209] (siehe auch 2.2.1.3.1 auf Seite 23).

Um diesen Kontrollpunkt genauer zu charakterisieren, wurde eine Droge

eingesetzt, die die Mikrotubuli depolymerisiert und in der Mitose zu einem Block im Zellzyklus führt. Analog dazu arretieren Nocodazol inkubierte Oozyten mit kondensierten Bivalenten [51]. In diesen Untersuchungen wurden hohe Konzentrationen der Droge eingesetzt. In den hier beschriebenen Experimenten sollte untersucht werden, ob es eine Nocodazol-Konzentration gibt, bei der die Zellen transient arretieren und wie sich dieser Arrest auf die weitere Reifung der Oozyten auswirkt.

Es konnte in dieser Untersuchung gezeigt werden, daß sowohl die Morphologie der Spindel als auch die Reifungskinetik deutlich verändert wurden. Die Spindeln der inkubierten Zellen sind signifikant kürzer (siehe 4.7 auf Seite 94). Ausserdem konnte gezeigt werden, daß in der Gruppe der inkubierten Zellen eine deutlich höhere Zahl an Oozyten zu finden war, deren Chromosomen nicht richtig in die Metaphaseplatte eingeordnet waren (siehe Abbildung 4.17 auf Seite 95). Ähnliche Spindel deformationen, wie sie in den inkubierten Zellen beobachtet wurden, wurden von Volarcik *et al.* gezeigt die die Spindeln von Oozyten älterer Frauen untersucht haben [259]. Auch in diesen Spindeln war die Zahl an fehlerhaft einsortierten Chromosomen, wie in den Nocodazol inkubierten CBA/Ca-Oozyten, erhöht. Die Ausbildung von stabilen Kinetochor-Spindelfasern wird durch posttranslationale Veränderungen von Kinetochorkomponenten gesteuert [204]. Nach der Anheftung der Kinetochorfasern werden innerhalb weniger Minuten die Schwesterchromatiden getrennt und der erste Polkörper abgeschnürt [20]. Der Spindelkontrollpunkt soll sicherstellen, daß am Metaphase-Anaphase-Übergang alle Chromosomen funktionell richtig an die Spindel angeheftet sind und sie somit in die Anaphase gehen können. Die Verzögerung des Eintritts in die Anaphase bedeutet, daß der Kontrollpunkt noch nicht freigegeben wurde und die Zellen deshalb in der MI arretiert sind. Dieser Kontrollpunkt, der den Eintritt in die Anaphase durch die Ausbildung der stabilen Kinetochorfasern steuert, ist an den Kinetochoren lokalisiert. Dies ist in Übereinstimmung mit dem Kontrollpunkt der von Rieder *et al.* [211] beschrieben wurde und sicherstellt, daß die Metaphase-Anaphase Transition so lange blockiert wird, bis keine freien Kinetochore mehr vorhanden sind. Neben dieser Verzögerung wurde auch beobachtet, daß in den inkubierten Zellen die ersten Anzeichen für die Abschnürung eines Polkörperchens schon nach 7 Stunden zu beobachten waren. Von den inkubierten Oozyten zeigten 8,0 % der Zellen $\pm 2,5\%$ eine beginnende Abschnürung, in den Kontrollen wurde dies erst nach 8 Stunden Reifung beobachtet (8,4 % \pm 5,9 %), zu t_7 wurden in der Kontrolle noch keine Polkörper beobachtet. Ein Grund für diese frühe Bildung des Polkörpers könnte eine fehlerhafte Ausrichtung der Spindel zur Peripherie der Oozyte sein. Es ist aus der Literatur bekannt, daß die Wanderung der Chromosomen an die Peripherie der Zelle nicht durch Mikrotubuli, sondern durch Mikrofilamente vermittelt wird [146, 158]. Mikrofilamente werden durch die Nocodazolbehandlung nicht direkt beeinflusst. So werden die nur leicht deformierten Spindeln (siehe 4.7 auf Seite 94) zur

Peripherie gezogen, und die fehlerhafte Ausrichtung der Spindel bringt die Chromosomen in dichten Kontakt zur Peripherie und induziert dort die ersten Anzeichen der Abschnürung eines Polkörpers. Die weitere Entwicklung wird dann möglicherweise durch einen Spindelkontrollpunkt verzögert. Die ersten Polkörper werden in diesen Zellen zu t_9 , also eine Stunde später als in den Kontrollen, beobachtet (siehe Tabelle 4.20 auf Seite 91). Oozyten von MFI Mäusen reifen deutlich verzögert, wenn sie in einer niedrigen Dosis von Nocodazol inkubiert werden.

Steuerwald *et al.* konnten an humanen Oozyten junger (≤ 36 Jahre) und älterer Frauen (> 36 Jahre) zeigen, daß die Menge an Bub1 mRNA in den Oozyten (GV, MI und MII) der älteren Spender deutlich geringer ist als in den Oozyten der jüngeren Spender. Die Menge an Mad2 mRNA veränderte sich nicht signifikant (zur Rolle der Bub- und Mad-Familienmitglieder siehe Schema 2.8 auf Seite 27). Fehlt Bub1 in *Drosophila* oder der Maus, führt dies in diesen Spezies zu Chromosomenfehlverteilungen [247]. In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß die Oozyten der alten CBA/Ca schneller in die Metaphase II gehen als die Oozyten der Vergleichsgruppe (siehe Tabelle 4.3 auf Seite 68), da Bub1 für das Timing in der Mitose wichtig ist. Während Bub1 das Timing der Meiose beeinflusst, spielt Mad2 in *S. cerevisiae* eine wichtige Rolle bei der Anheftung der Kinetochore an die Spindel [227]. Shonn *et al.* konnten zeigen, daß Mad2-defiziente Mutanten der Hefe fast ausschließlich Fehler in der ersten, meiotischen Reifeteilung machen. Als Ursache wird diskutiert, daß die Chromosomen mit endständigen Chiasmata in der ersten meiotischen Reifeteilung flexibler sind als Chromosomen mit kinetochornahen Chiasmata. Diese erhöhte Flexibilität erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß beide Homologen am selben Spindelpol verankert und zu diesem hingezogen werden. Im Wildtyp reguliert Mad2 die korrekte Anheftung der Kinetochore an die entgegengesetzten Spindelpole [227]. In den Mutanten fehlt diese Kontrolle, und es kommt zu Fehlverteilungen in der Metaphase I. In Oozyten der Maus verbleibt Mad2 bis zur Befruchtung an den Kinetochoren und verhält sich damit grundsätzlich anders als in somatischen Zellen oder Spermien. In der Mitose bindet Mad2 so lange Cdc20 bis alle Kinetochoren funktionell richtig mit der Spindel verbunden sind und verhindert so die Freisetzung des Cdc20 und somit die Aktivierung des APC (siehe Abbildung 2.8 auf Seite 27). In der männlichen Meiose verschwindet das Mad2-Signal in der Metaphase II [107]. Somit unterscheiden sich die männliche und die weibliche Meiose im Hinblick auf die Lokalisation eines der Proteine des Spindelkontrollpunktes. Kallio *et al.* diskutieren, daß Mad2 in der weiblichen Meiose nicht nur für den Spindelkontrollpunkt notwendig ist, sondern auch den Arrest der Oozyten in der Metaphase II bis zur Befruchtung steuert. Es wäre nun interessant die Verbindung zwischen *c-mos* und Mad2 zu finden, da die Oozyten von *c-mos* $-/-$ Mäusen zu einem grossen Prozentsatz nicht in der Metaphase II arretieren, sondern in die sog. Metaphase III eintreten. Neben diesem Verlust des M II Arrests beobachtete

man in diesen Oozyten Spindelformen, wie ich sie auch in den Nokodazolinkubierten Oozyten fand [229, 254].

Es wäre nun interessant, die Verteilung und Konzentration von Mad2 und Bub1 in den Oozyten junger und alter CBA/Ca zu untersuchen. Sollten sich altersspezifische Unterschiede ergeben, die denen entsprechen, die in humanen Oozyten gezeigt wurden, könnte man die Spindeln dieser Zellen gezielt mit Nokodazol behandeln. Mit diesem Ansatz wäre es möglich, beide Funktionen von Mad2 in der Meiose (a. Arrest in der Metaphase II und b. Teil des Spindelkontrollpunktes) zu untersuchen und die Rolle dieser Proteine in der altersbedingten Zunahme der Aneuploidie zu klären.

Aus *Xenopus* und der Hefe sind immer mehr Daten verfügbar, die sich mit der Frage beschäftigen, wie der Arrest in MI und MII herbeigeführt wird und welche Gemeinsamkeiten der oder die Mechanismen mit den Spindel oder DNA Kontrollpunkten haben [170]. Es wäre nun interessant die Experimente mit den Nokodazol-inkubierten Oozyten fortzuführen und die jeweiligen Regulationswege mit spezifischen Substanzen (z. B. Kinaseinhibitoren, Phosphataseinhibitoren) zu blockieren, um die dabei gewonnenen Erkenntnisse auf den MI bzw. MII Arrest zu übertragen.

Kapitel 6

Anhang

Tabelle 6.1: GVBD-Rate *in vitro* gereifter Zellen während der ersten 1,5 Stunden

Altersgruppe	Anzahl (in %)		
	GV t ₀	GVBD t _{1,5}	
Jung	42	19	(45,24)
	59	27	(45,76)
	44	25	(56,82)
	32	13	(40,63)
	52	36	(69,23)
	51	25	(49,02)
	48	31	(64,58)
	60	27	(45,00)
	28	19	(67,86)
	33	22	(66,67)
Alt	24	19	(79,17)
	29	22	(75,86)
	58	50	(86,21)
	37	29	(78,38)
	67	49	(73,13)
Gemeinsamer Median = 66,67			

Tabelle 6.2: GVBD-Rate *in vitro* gereifter Oozyten während der ersten 2,0 Stunden

Altersgruppe	Anzahl (in %)		
	GV t ₀	GVBD t _{2,0}	
	42	33	(78,57)

Fortsetzung auf folgender Seite

Fortsetzung von vorheriger Seite

Altersgruppe	Anzahl (in %)		
	GV t_0	GVBD $t_{2,0}$	
Jung	59	34	(57,63)
	44	29	(65,91)
	32	23	(71,88)
	52	43	(82,69)
	51	41	(80,39)
	48	41	(85,42)
	60	42	(70,00)
	28	22	(78,57)
Alt	33	30	(90,91)
	24	21	(87,50)
	29	28	(96,55)
	58	57	(98,28)
	37	35	(94,59)
	67	64	(95,52)
Gemeinsamer Median = 81,54			

Tabelle 6.3: GVBD-Rate *in vitro* gereifter Oozyten während der ersten 2,5 Stunden

Anzahl (in %)					
Jung			Alt		
GV t_0	GVBD $t_{2,5}$		GV t_0	GVBD $t_{2,5}$	
37	32	(86,49)	44	41	(93,18)
41	35	(85,37)	24	23	(95,83)
39	29	(74,36)	36	29	(80,56)
52	47	(90,38)	19	18	(94,74)
55	35	(96,36)	25	21	(84,00)
72	60	(83,33)	18	18	(100,00)
50	46	(92,00)	62	58	(93,55)
33	21	(63,64)	67	49	(73,13)
56	47	(83,93)	52	48	(92,31)
25	16	(64,00)	44	36	(81,82)
33	25	(75,76)	18	17	(94,44)
42	41	(97,62)	55	51	(92,73)
43	37	(86,05)	23	23	(100,00)
43	32	(74,42)	51	45	(88,24)
48	39	(81,25)	34	31	(91,18)
33	25	(75,76)	18	17	(94,44)

Fortsetzung auf folgender Seite

Fortsetzung von vorheriger Seite
Anzahl (in %)

Jung			Alt		
GV	GVBD		GV	GVBD	
t₀	t_{2,5}		t₀	t_{2,5}	
36	27	(75,00)	60	50	(83,33)
59	45	(76,27)	64	61	(95,31)
47	40	(85,11)	22	22	(100,00)
44	40	(90,91)	39	34	(87,18)
32	27	(84,38)	37	34	(91,89)
67	51	(76,12)	19	18	(94,74)
50	39	(78,00)	12	10	(83,33)
45	39	(86,67)	15	14	(93,33)
33	19	(57,58)	45	40	(88,89)
38	21	(55,26)	23	19	(82,61)
31	29	(93,55)	28	23	(82,14)
42	38	(90,48)	28	27	(96,43)
39	34	(87,18)	33	30	(90,91)
31	24	(77,42)	35	32	(91,43)
38	21	(55,26)	61	54	(88,52)
35	27	(77,14)	31	26	(83,87)
43	29	(67,44)	10	9	(90,00)
28	21	(75,00)	26	25	(96,15)
32	27	(84,38)	12	9	(75,00)
37	33	(89,19)			
40	32	(80,00)			
27	21	(77,78)			
20	16	(80,00)			
20	16	(80,00)			
46	41	(89,13)			
19	15	(78,95)			

Gemeinsamer Median = 85,37

$$E_H = \frac{\text{Reihensumme} \times \text{Spaltensumme}}{n} \quad (6.1)$$

wobei E_H die erwartete Häufigkeit ist und n die Gesamtzahl der untersuchten Oozyten. Die Summe der Einzelwahrscheinlichkeiten errechnet sich aus der Formel:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^k \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}} \quad (6.2)$$

wobei

O_{ij} die beobachtete Anzahl von Fällen in der i -ten Zeile und der j -ten Spalte und

E_{ij} erwartete Anzahl von Fällen unter H_0 in der i -ten Zeile und der j -ten Spalte bedeutet.

$\sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^k$ bedeutet die Anweisung, über alle r Zeilen und k Spalten, d. h. über alle Zellen aufzusummieren. Die Werte, die sich nach Formel 6.2 für χ^2 ergeben, sind annähernd verteilt wie Chi-Quadrat mit den Freiheitsgraden $= (r - 1)(k - 1)$, worin $r =$ Anzahl der Zeilen und $k =$ Anzahl der Spalten ist. In der Tabelle ergibt sich die χ^2 aus der Aufsummierung der Einzelwahrscheinlichkeiten.

Tabelle 6.4: Reifungsrate *in vitro*-gereifter Oozyten (MF1)
von t_7 bis t_{13}

	n*	Beobachteter Zeitraum						
		t_7	t_8	t_9	t_{10}	t_{11}	t_{12}	t_{13}
GV	40	3	3	3	3	3	3	3
		(7,5)	(7,5)	(7,5)	(7,5)	(7,5)	(7,5)	(7,5)
GVBD		34	33	31	16	10	6	5
		(85,0)	(82,5)	(77,5)	(40,0)	(25,0)	(15,0)	(12,5)
Pb			1	3	18	24	27	28
			(2,5)	(7,5)	(45,0)	(60,0)	(67,5)	(70,0)
Sonst.		3	3	3	3	3	4	4
		(7,5)	(7,5)	(7,5)	(7,5)	(7,5)	(10,0)	(10,0)
GV	61	3	0	0	0	0	0	0
		(4,9)						
GVBD		58	58	58	46	29	16	7
		(95,1)	(95,1)	(95,1)	(75,4)	(47,5)	(26,2)	(11,5)
Pb				12	29	42	51	
				(19,7)	(47,5)	(68,9)	(83,6)	
Sonst.		3	3	3	3	3	3	
		(4,9)	(4,9)	(4,9)	(4,9)	(4,9)	(4,9)	
GV	63	3	3	3	3	3	3	
		(4,8)	(4,8)	(4,8)	(4,8)	(4,8)	(4,8)	
GVBD		60	60	56	49	39	27	23
		(95,2)	(95,2)	(88,9)	(77,8)	(61,9)	(42,9)	(36,5)
Pb			4	11	21	33	35	
			(6,3)	(17,5)	(33,3)	(52,4)	(55,6)	
Sonst.							2	
							(3,2)	
GV	24	2	2	2	2	2	2	
		(8,3)	(8,3)	(8,3)	(8,3)	(8,3)	(8,3)	
GVBD		22	22	17	12	8	4	3
		(91,7)	(91,7)	(70,8)	(50,0)	(33,3)	(16,7)	(12,5)
Pb			5	8	12	16	17	
			(20,8)	(33,3)	(50,0)	(66,7)	(70,8)	
Sonst.				2	2	2	2	
				(8,3)	(8,3)	(8,3)	(8,3)	
GV	28	3	3	3	3	3	3	
		(10,7)	(10,7)	(10,7)	(10,7)	(10,7)	(10,7)	
GVBD		25	21	21	14	10	5	4
		(89,3)	(75,0)	(75,0)	(50,0)	(35,7)	(17,9)	(14,3)
Pb		4	4	11	15	20	21	
		(14,3)	(14,3)	(39,3)	(53,6)	(71,4)	(75,0)	

Fortsetzung auf folgender Seite

Fortsetzung von vorheriger Seite

	n*	Beobachteter Zeitraum						
		t₇	t₈	t₉	t₁₀	t₁₁	t₁₂	t₁₃
Sonst.								0 (0,0)

*n ist die Anzahl isolierter Oozyten

Tabelle 6.5: Histon HI Aktivität *in vitro* gereifter Oozyten
junger ud alter CBA/Ca

Reifungsdauer	Jung	Alt
t₀	1.0	
t₃	4.84	
t₆	7.83	9.55
Telophase	2.15	1.37
Pb + 1h		0.65
Pb + 1,5h	1.81	
Pb + 19h	5.28	5.63

Tabelle 6.6: Einfluß von Nocodazol [1,2ng/ml] auf die Spindel *in vitro* gereifter MII Oozyten (MF1)

Behandlung	Spindelmaße in μM				
	A*	B*	C*	A/C	B/C
Kontrolle	27	6	12	2.25	4.50
	20.4	4.8	9	2.27	4.25
	15	4.2	7.8	1.92	3.57
	20.4	5.4	10.8	1.89	3.78
	19.2	7.2	9.6	2.00	2.67
	19.8	7.2	12	1.65	2.75
	22.8	8.4	8.4	2.71	2.71
	18	6	9.6	1.88	3.00
	18	6	8.4	2.14	3.00
	17.4	6	7.8	2.23	2.90
	19.2	4.2	8.4	2.29	4.57
	21	5.4	13.2	1.59	3.89
	21.6	5.4	4.8	4.50	4.00
	21.6	6	12	1.80	3.60
	22.8	7.2	14.4	1.58	3.17
	26.4	3.6	9.6	2.75	7.33
	26.4	4.8	13.2	2.00	5.50
	25.2	6	12	2.10	4.20
	26.4	6	13.2	2.00	4.40
	25.2	9.6	14.4	1.75	2.63
Mittelw.**	21.69	5.97	10.53	2.17	3.82
Stabw.***	3.49	1.44	2.58	0.64	1.14
	19.2	6	13.2	1.45	3.20
	15.6	10.8	10.8	1.44	1.44
	18.6	9.6	18	1.03	1.94
	14.4	4.8	9.6	1.50	3.00
	20.4	8.4	15.6	1.31	2.43
	14.4	9.6	12	1.20	1.50
	16.8	8.4	10.8	1.56	2.00
	16.8	6	8.4	2.00	2.80
	16.8	6	10.8	1.56	2.80
	13.2	3.6	9.6	1.38	3.67
	16.2	4.8	8.4	1.93	3.38
	14.4	10.8	10.8	1.33	1.33
	14.4	4.8	7.2	2.00	3.00
	19.2	14.4	12	1.60	1.33
	18	8.4	10.8	1.67	2.14
	18	4.8	12	1.50	3.75

Fortsetzung auf folgender Seite

Fortsetzung von vorheriger Seite

Behandlung	Spindelmaße in μM				
	A*	B*	C*	A/C	B/C
Nocodazol	20.4	4.8	10.8	1.89	4.25
	16.8	4.2	10.8	1.56	4.00
	14.4	4.8	10.8	1.33	3.00
	18	5.4	9.6	1.88	3.33
	19.2	6	10.8	1.78	3.20
	15.6	6	12	1.30	2.60
	21.6	6	12	1.80	3.60
	16.8	6	10.8	1.56	2.80
	21.6	4.8	6	3.60	4.50
	21.6	6	18	1.20	3.60
	20.4	3.6	11.4	1.79	5.67
	19.2	4.8	3.6	5.33	4.00
	21.6	4.8	10.8	2.00	4.50
	20.4	3.6	12	1.70	5.67
	Mittelw.**	17.8	6.4	10.98	1.77
Stabw.***	2.56	2.55	2.9	0.81	1.14
Gemeins. Median****	19.20	6.00	10.80	1.79	3.27

*siehe Abbildung 4.16 auf Seite 94

**Standardabweichung

***Mittelwert

****Gemeinsamer Median

Tabelle 6.7: Anzahl terminaler Chiasmata pro Oozyte in *in vitro* gereiften Oozyten beider Altersgruppen

Anzahl an TaB.* pro Oozyte			Reihen- summe	Erwartete Häufigk. (E_H)**		Einzelwahr- scheinlichk.***	
	Jung	Alt		Jung	Alt	Jung	Alt
0	21	10	31	16.79	14.25	1.06	1.27
1	52	16	68	36.82	31.25	6.26	7.44
2	57	36	93	50.36	42.74	0.88	1.06
3	39	36	75	40.61	34.47	0.06	0.07
4	27	36	63	34.11	28.95	1.48	1.71
5	21	24	45	24.37	20.68	0.47	0.53
6	7	16	23	12.45	10.57	2.39	2.79
7	7	9	16	8.66	7.35	0.32	0.37
8-11 [†]	4	16	20	10.83	9.19	4.31	5.04
Spaltens.	235	199	n=434				

Fortsetzung auf folgender Seite

Fortsetzung auf folgender Seite

Summe der Einzelwahrscheinlichkeiten:	17.22	20.29
Summe der Einzelwahrscheinlichkeiten Jung + Alt = χ^2	: 37.51[‡]	

*TaB.: Telomerassoziierte Bivalente

siehe Formel 6.1 auf Seite 116 ; *siehe Formel 6.2 auf Seite 116
6.2 auf Seite 116 |

[†]maximal 11 TaB. pro Oozyte beobachtet. Die beobachteten Oozyten mit mehr als 7 TaB. (8-11) wurden addiert, um die Formel 6.2 auf Seite 116 anwenden zu können.

[‡]Signifikanter Unterschied zu Jung: $p < 0,001$

Die zugrundeliegenden Berechnungen sind im Anhang in den Formeln 6.1 auf Seite 116 und 6.2 auf Seite 116 erläutert.

Literaturverzeichnis

- [1] ABRIEU, A. ; BRASSAC, T. ; GALAS, S. ; FISHER, D. ; LABBE, J. C. ; DOREE, M.: The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in *Xenopus* eggs. In: *J Cell Sci* 111 (1998), Nr. 12, S. 1751–7
- [2] ALEXANDRU, G. ; ZACHARIAE, W. ; SCHLEIFFER, A. ; NASMYTH, K.: Sister chromatid separation and chromosome re-duplication are regulated by different mechanisms in response to spindle damage. In: *EMBO J* 18 (1999), S. 2707–2721
- [3] ALLERS, T. ; LICHTEN, M.: Differential timing and control of non-crossover and crossover recombination during meiosis. In: *Cell* 106 (2001), S. 47–57
- [4] ALMASAN, A. ; LINKE, S. P. ; PAULSON, T. G. ; HUANG, L. C. ; WAHL, G. M.: Genetic instability as a consequence of inappropriate entry into and progression through S-phase. In: *Cancer Metastasis Rev* 14 (1995), Nr. 1, S. 59–73
- [5] AMON, A.: The spindle checkpoint. In: *Curr Opin Genet Dev* 9 (1999), Nr. 1, S. 69–75
- [6] ANDERSON, L. K. ; REEVES, A. ; WEBB, L. M. ; ASHLEY, T.: Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localisation of MLH1 protein. In: *Genetics* 151 (1999), S. 1569–1579
- [7] ANGELL, R. R. ; HILLIER, S. G. ; WEST, J. D. ; GLASIER, A. F. ; RODGER, M. W. ; BAIRD, D. T.: Chromosome anomalies in early human embryos. In: *J Reprod Fertil Suppl* 36 (1988), S. 73–81
- [8] ANGELL, R. R. ; XIAN, J. ; KEITH, J.: Chromosome anomalies in human oocytes in relation to age. In: *Hum Reprod* 8 (1993), Nr. 7, S. 1047–54
- [9] BAKER, S. M. ; PLUG, A. W. ; PROLLA, T. A. ; BRONNER, C. E. ; HARRIS, A. C. ; YAO, X. ; CHRISTIE, D. M. ; MONELL, C. ; ARNHEIM,

- N. ; BRADLEY, A. ; ASHLEY, T. ; LISKAY, R. M.: Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. In: *Nat Genet* 13 (1996), Nr. 3, S. 336–42
- [10] BAKKEN, A. H. ; MCCLANAHAN, M.: Patterns of RNA synthesis in early meiotic prophase oocytes from fetal mouse ovaries. In: *Chromosoma* 67 (1978), S. 21–40
- [11] BALDIN, V. ; CANS, C. ; SUPERTI-FURGA, G. ; DUCOMMUN, B.: Alternativ splicing of human CDC25B tyrosine phosphatase. Possible implications for growth control? In: *Oncogen* 14 (1997), S. 2485–2495
- [12] BANIN, S. ; MOYAL, L. ; SHIEH, S. ; TAYA, Y. ; ANDERSON, C. W. ; CHESSA, L. ; SMORODINSKY, N. I. ; PRIVES, C. ; REISS, Y. ; SHILOH, Y. ; ZIV, Y.: Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. In: *Science* 281 (1998), Nr. 5383, S. 1674–7
- [13] BARLOW, C. ; LIYANAGE, M. ; MOENS, P. B. ; DENG, C. X. ; RIED, T. ; WYNshaw BORIS, A.: Partial rescue of the prophase I defects of Atm-deficient mice by p53 and p21 null alleles. In: *Nat Genet* 17 (1997), Nr. 4, S. 462–6
- [14] BASTIANS, H. ; TOWNSLEY, F. M. ; RUDERMAN, J. V.: The cyclin dependent kinase inhibitor p27 KIP1 induces N-terminal proteolytic cleavage of cyclin A. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), S. 15374–15381
- [15] BATTAGLIA, D. E. ; GOODWIN, P. ; KLEIN, N. A. ; SOULES, M. R.: Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. In: *Hum Reprod* 11 (1996), Nr. 10, S. 2217–22
- [16] BLASINA, A. ; DE WEYER, I. V. ; LAUS, M. C. ; LUYTEN, W. H. ; PARKER, A. E. ; MCGOWAN, C. H.: A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase. In: *Curr Biol* 9 (1999), Nr. 1, S. 1–10
- [17] BORUM, K.: Oogenesis in the mouse: A study of meiotic prophase. In: *Exp. Cell. Res.* 24 (1961), S. 2495–2507
- [18] BROOK, J. D. ; GOSDEN, R. G. ; CHANDLEY, A. C.: Maternal age and aneuploid embryos: evidence from the mouse that biological and not chronological age is the important influence. In: *Hum Genet* 6 (1984), S. 41–46
- [19] BRUGAROLAS, J. ; MOBERG, K. ; BOYD, S. D. ; TAYA, Y. ; JACKS, T. ; LEES, J. A.: Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is

- necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after gamma-irradiation. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), Nr. 3, S. 1002–7
- [20] BRUNET, S. ; SANTA MARIA, A. ; GUILLAUD, P. ; DUJARDIN, D. ; KUBIAK, J. Z. ; MARO, B.: Kinetochore fibers are not involved in the formation of the first meiotic spindle in mouse oocytes, but control the exit from the first meiotic M phase. In: *The Journal of Cell Biology* 146 (1999), S. 1–11
- [21] BUCCIONE, R. ; SCHROEDER, A. C. ; EPPIG, J. J.: Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. In: *Biol. Reprod.* 43 (1990), S. 543–547
- [22] BUGGE, M. ; COLLINS, A. ; PETERSEN, M. B. ; FISHER, J. ; BRANDT, C. ; HERTZ, J. M. ; TRANEBJAERG, L. ; DE LOZIER BLANCHET, C. ; NICOLAIDES, P. ; BRONDUM NIELSEN, K. ; MORTON, N. ; MIKKELSEN, M.: Non-disjunction of chromosome 18. In: *Hum Mol Genet* 7 (1998), Nr. 4, S. 661–9
- [23] BULAVIN, D. V. ; AMUNDSON, S. A. ; J., F. A.: p38 and Chk1 kinases: different conductors for the G(2)/M checkpoint symphony. In: *Curr Opin Genet Dev* 12 (2002), S. 92–7
- [24] BUONOMO, S. B. C. ; CLYNE, R. K. ; FUCHS, J. ; LOIDL, J. ; UHLMANN, F. ; NASMYTH, K.: Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. In: *Cell* 103 (2000), S. 387–398
- [25] BYSKOV, A. G.: Differentiation of the mammalian embryonic gonad. In: *Physiol Rev* 66 (1986), S. 71–117
- [26] CAMPBELL, M. S. ; GORBSKY, G. J.: Microinjection of mitotic cells with the 3F3/2 anti-phosphoepitope antibody delays the onset of anaphase. In: *J Cell Biol* 129 (1995), Nr. 5, S. 1195–204
- [27] CANMAN, C. E. ; LIM, D. S. ; CIMPRICH, K. A. ; TAYA, Y. ; TAMAI, K. ; SAKAGUCHI, K. ; APPELLA, E. ; KASTAN, M. B. ; SILICIANO, J. D.: Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. In: *Science* 281 (1998), Nr. 5383, S. 1677–9
- [28] CARABATSOS, M. J. ; ELVIN, J. ; MATZUK, M. M. ; ALBERTINI, D. F.: CHaracterisation of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. In: *Developmental Biology* 204 (1998), S. 373–384
- [29] CARAZO-SALAS, R. E. ; GUARGUAGLINI, G. ; GRUSS, O. J. ; SEGREF, A. ; KARSENTI, E. ; MATTAJ, I. W.: Generation of GTP-bound Ran

- by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation. In: *Nature* 400 (1999), S. 178–181
- [30] CARPENTER, A. T. ; KUCHERLAPATI, R. (Hrsg.) ; SMITH, G. R. (Hrsg.): *Thoughts on recombination nodules, meiotic recombination, and chiasmata..* Washington, DC. : American Society for Microbiology, 1988. – 529–548 S
- [31] CATTANACH, B. M. ; BEECHEY, C. V.: Autosomal and X-chromosome imprinting. In: *Development* 103 (1990), S. 36–72
- [32] CHEN, R. H. ; WATERS, J. C. ; SALMON, E. D. ; MURRAY, A. W.: Association of spindle assembly checkpoint component XMAD2 with unattached kinetochores. In: *Science* 274 (1996), Nr. 5285, S. 242–6
- [33] CHENG, M. ; OLIVIER, P. ; DIEHL, J. A. ; FERRO, M. ; ROUSSEL, M. F. ; ROBERTS, J. M. ; SHERR, C. J.: The p21 CIP1 and p27 KIP1 CDK inhibitors are essential activators of cyclin-D-dependent kinases in murine fibroblasts. In: *EMBO J* 18 (1999), Nr. 6, S. 1571–1583
- [34] CHOI, T. ; AOKI, F. ; MORI, M. ; YAMASHITA, M. ; NAGAHAMA, Y. ; KOHMOTO, K.: Activation of p34cdc2 protein kinase activity in meiotic and mitotic cell cycles in mouse oocytes and embryos. In: *Development* 113 (1991), Nr. 3, S. 789–95
- [35] CIECHANOVER, A.: The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell live. In: *EMBO J.* 17 (1998), S. 7151–7160
- [36] CIEMERYCH, M. A. ; KUBIAK, J. Z.: Cytostatic activity develops during meiosis I in oocytes of LT/Sv mice. In: *Dev Biol* 200 (1998), Nr. 2, S. 198–211
- [37] CIOSK, R. ; ZACHARIAE, W. ; MICHAELIS, C. ; SHEVCHENKO, A. ; MANN, M. ; NASMYTH, K.: An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. In: *Cell* 93 (1998), Nr. 6, S. 1067–76
- [38] COHEN FIX, O. ; KOSHLAND, D.: Pds1p of budding yeast has dual roles: inhibition of anaphase initiation and regulation of mitotic exit. In: *Genes and Development* 13 (1999), S. 1950–1959
- [39] CROSS, S. M. ; SANCHEZ, C. A. ; MORGAN, C. A. ; SCHIMKE, M. K. ; RAMEL, S. ; IDZERDA, R. L. ; RASKIND, W. H. ; REID, B. J.: A p53-dependent mouse spindle checkpoint. In: *Science* 267 (1995), Nr. 5202, S. 1353–6
- [40] CUKURCAM, S.: *Der Einfluss des Pestizids Trichlorfon auf die Oozytenreifung*, Universität Bielefeld, Diplomarbeit, 1999

- [41] DARBON, J. M. ; DEVAULT, A. ; TAVIAUX, S. ; FESQUET, D. ; MARTINEZ, A. M. ; GALAS, S. ; CAVADORE, J. C. ; DOREE, M. ; BLANCHARD, J. M.: Cloning, expression and subcellular localization of the human homolog of p40MO15 catalytic subunit of cdk-activating kinase. In: *Oncogene* 9 (1994), Nr. 11, S. 3127–38
- [42] DEVAULT, A. ; MARTINEZ, A. M. ; FESQUET, D. ; LABBE, J. C. ; MORIN, N. ; TASSAN, J. P. ; NIGG, E. A. ; CAVADORE, J. C. ; DOREE, M.: MAT1 ('menage a trois') a new RING finger protein subunit stabilizing cyclin H-cdk7 complexes in starfish and *Xenopus* CAK. In: *Embo J* 14 (1995), Nr. 20, S. 5027–36
- [43] DONG, J. ; ALBERTINI, D. F. ; NISHIMORI, K. ; KUMAR, T. R. ; LU, N. ; MATZUK, M. M.: Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. In: *Nature* 383 (1996), Nr. 6600, S. 531–5
- [44] DULIC, V. ; KAUFMANN, W. K. ; WILSON, S. J. ; TISTY, T. D. ; LEES, E. ; HARPER, J. W.: p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation induced G1 arrest. In: *Cell* 76 (1994), S. 1013–1023
- [45] DYSON, N.: The regulation of E2F by RB-family proteins. In: *Genes Dev* 12 (1998), S. 2245–2262
- [46] EGEL, R.: TEloimers and chiasma terminalization. In: *Hereditas* 94 (1979), S. 138–140
- [47] EGEL-MITANI, M. ; OLSON, L. W. ; EGEL, R.: Meiosis in *Aspergillus nidulans*: Another example for lacking synaptonemal complexes in the absence of cross over interference. In: *Hereditas* 97 (1982), S. 179–187
- [48] EICHENLAUB RITTER, U.: Parental age-related aneuploidy in human germ cells and offspring: a story of past and present. In: *Environ Mol Mutagen* 28 (1996), Nr. 3, S. 211–36
- [49] EICHENLAUB RITTER, U.: Genetics of oocyte ageing. In: *Maturitas* 30 (1998), Nr. 2, S. 143–69
- [50] EICHENLAUB RITTER, U. ; BETZENDAHL, I.: Chloral hydrate induced spindle aberrations, metaphase I arrest and aneuploidy in mouse oocytes. In: *Mutagenesis* 10 (1995), Nr. 6, S. 477–86
- [51] EICHENLAUB RITTER, U. ; BOLL, I.: Nocodazole sensitivity, age-related aneuploidy, and alterations in the cell cycle during maturation of mouse oocytes. In: *Cytogenet Cell Genet* 52 (1989), Nr. 3-4, S. 170–6

- [52] EICHENLAUB RITTER, U. ; CHANDLEY, A. C. ; GOSDEN, R. G.: Alterations to the microtubular cytoskeleton and increased disorder of chromosome alignment in spontaneously ovulated mouse oocytes aged in vivo: an immunofluorescence study. In: *Chromosoma* 94 (1986), Nr. 5, S. 337–45
- [53] EICHENLAUB RITTER, U. ; CHANDLEY, A. C. ; GOSDEN, R. G.: The CBA mouse as a model for age-related aneuploidy in man: studies of oocyte maturation, spindle formation and chromosome alignment during meiosis. In: *Chromosoma* 96 (1988), Nr. 3, S. 220–6
- [54] EL-DEIRY, W. S. ; TOKINO, T. ; VALCULESCU, V. E. ; LEVY, D. B. ; PARSONS, R. ; TRENT, J. M.: Waf1, a potential mediator of p53 tumor suppression. In: *Cell* 75 (1993), S. 817–825
- [55] ENGEL, E. ; DE LOZIER-BLANCHET, C. D.: Uniparental disomy, isodisomy, and imprinting: probable effects in man and strategies for their detection. In: *Am. J. Med. Genet.* 40 (1991), S. 432–439
- [56] EPPIG, J. J.: Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. In: *Bioessays* 13 (1991), Nr. 11, S. 569–74
- [57] EVANS, T. ; ROSENTHAL, E. T. ; YOUNGBLOM, J. ; DISTEL, D. ; HUNT, T.: Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. In: *Cell* 33 (1983), Nr. 2, S. 389–96
- [58] FANG, G. ; YU, H. ; KIRSCHNER, M. W.: The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. In: *Genes Dev* 12 (1998), Nr. 12, S. 1871–83
- [59] FARR, K. A. ; HOYT, M. A.: Bub1p kinase activates the *Saccharomyces cerevisiae* spindle assembly checkpoint. In: *Mol Cell Biol* 18 (1998), Nr. 5, S. 2738–47
- [60] FISHER, R. P. ; JIN, P. ; CHAMBERLIN, H. M. ; MORGAN, D. O.: Alternative mechanisms of CAK assembly require an assembly factor or an activating kinase. In: *Cell* 83 (1995), Nr. 1, S. 47–57
- [61] FISHER, R. P. ; MORGAN, D. O.: A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. In: *Cell* 78 (1994), Nr. 4, S. 713–24
- [62] FREEMAN, S. B. ; YOUNG, Q. ; ALLRAN, K. ; TAFT, L. F. ; SHERMAN, S. L.: Women with a reduced ovarian complement may have an increased risk for a child with down syndrome. In: *Am. J. Hum. Genet.* 66 (2000), S. 1680–3

- [63] FUJINO, Y. ; OZAKI, K. ; YAMAMASU, S. ; ITO, F. ; MATSUOKA, I. ; HAYASHI, E. ; NAKAMURA, H. ; OGITA, S. ; SATO, E. ; INOUE, M.: DNA fragmentation of oocytes in aged mice. In: *Hum Reprod* 11 (1996), Nr. 7, S. 1480–3
- [64] FUKASAWA, K. ; WIENER, F. ; VANDE WOUDE, G. F. ; MAI, S.: Genomic instability and apoptosis are frequent in p53 deficient young mice. In: *Oncogene* 15 (1997), S. 1295–1302
- [65] FULTON, B. P. ; WHITTINGHAM, D. G.: Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. In: *Nature* 273 (1978), Nr. 5658, S. 149–51
- [66] FUNABIKI, H. ; YAMANO, H. ; KUMADA, K. ; NAGAO, K. ; HUNT, T. ; YANAGIDA, M.: Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. In: *Nature* 381 (1996), Nr. 6581, S. 438–41
- [67] GERMAN, J.: Mongolism, delayed fertilisation and human sexual behaviour. In: *Nature* 217 (1968), S. 516–8
- [68] GLOTZER, M. ; MURRAY, A. W. ; KIRSCHNER, M. W.: Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway [see comments]. In: *Nature* 349 (1991), Nr. 6305, S. 132–8
- [69] GORBSKY, G. J. ; KALLIO, M. ; DAUM, J. R. ; TOPPER, L. M.: Protein dynamics at the kinetochore: cell cycle regulation of the metaphase to anaphase transition. In: *Faseb J* 13 Suppl 2 (1999), S. S231–4
- [70] GORBSKY, G. J. ; RICKETTS, W. A.: Differential expression of a phosphoepitope at the kinetochores of moving chromosomes. In: *J Cell Biol* 122 (1993), Nr. 6, S. 1311–21
- [71] GOSDEN, R. G.: Chromosome anomalies of preimplantation mouse embryos in relation to maternal age. In: *J Reprod Fertil* 35 (1973), S. 351–54
- [72] GOUGEON, A.: Regulation of ovarian follicular development in primates: Facts and hypothesis. In: *Endocr. Rev.* 17 (1996), S. 121–155
- [73] GOULD, K. L. ; MORENO, S. ; OWEN, D. ; SAZER, S. ; NURSE, P.: Phosphorylation at Thr167 is required for *S. pombe* p34 cdc2 function. In: *EMBO J* 10 (1991), S. 3297–3309
- [74] GRIFFIN, D. K.: The incidence, origin, and etiology of aneuploidy. In: *Int Rev Cytol* 167 (1996), S. 263–96
- [75] GROSS, S. D. ; SCHWAB, M. S. ; TAIEB, F. E. ; LEWELLYN, A. L. ; QIAN, Y.-W. ; MALLER, J. L.: The critical role of the MAP kinase

- pathway in meiosis II in *Xenopus* oocytes is mediated by p90 Rsk. In: *Current Biology* 10 (1999), Nr. 8, S. 430–438
- [76] GROSS, S. ; SCHWAB, M. S. ; LEWELLYN, A. L. ; L., M. J.: Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by the protein kinase p90Rsk. In: *Science* 286 (1999), S. 1365–7
- [77] H., V. M. ; C., L. ; Z., K. J. ; UMBHAUER M, R. P. ; W., C. ; B., M.: Mos activates MAP kinase in mouse oocytes through two opposite pathways. In: *EMBO J.* 22 (2000), S. 6065–74
- [78] HACCARD, O. ; SARCEVIC, B. ; LEWELLYN, A. ; HARTLEY, R. ; ROY, L. ; IZUMI, T. ; ERIKSON, E. ; MALLER, J. L.: Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by MAP kinase. In: *Science* 262 (1993), Nr. 5137, S. 1262–5
- [79] HALDAR, S. ; NEGRINI, M. ; MONNE, w. ; SABBIONI, S. ; CROCE, C. M.: Downregulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. In: *Cancer Research* 54 (1994), S. 2095–2097
- [80] HARDWICK, K. G. ; MURRAY, A. W.: Mad1p, a phosphoprotein component of the spindle assembly checkpoint in budding yeast. In: *J Cell Biol* 131 (1995), Nr. 3, S. 709–20
- [81] HARDWICK, K. G. ; WEISS, E. ; LUCA, F. C. ; WINEY, M. ; MURRAY, A. W.: Activation of the budding yeast spindle assembly checkpoint without mitotic spindle disruption. In: *Science* 273 (1996), Nr. 5277, S. 953–6
- [82] HARPER, J. W. ; ADAMI, G. R. ; WEI, M. ; KEYOMARSI, K. ; ELLEDGE, S. J.: The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. In: *Cell* 75 (1993), S. 805–816
- [83] HARTWELL, L. H. ; CULOTTI, J. ; PRINGLE, J. R. ; REID, B. J.: Genetic control of the cell division cycle in yeast. In: *Science* 183 (1974), Nr. 120, S. 46–51
- [84] HASSOLD, T.: Trisomy in man. In: *Annu. Rev. in Genet.* 18 (1984), S. 69–97
- [85] HASSOLD, T. ; ABRUZZO, M. ; ADKINS, K. ; GRIFFIN, D. ; MERRILL, M. ; MILLIE, E. ; SAKER, D. ; SHEN, J. ; ZARAGOZA, M.: Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology. In: *Environ Mol Mutagen* 28 (1996), Nr. 3, S. 167–75
- [86] HASSOLD, T. ; HUNT, P. A. ; SHERMAN, S.: Trisomy in humans: incidence, origin and etiology. In: *Curr Opin Genet Dev* 3 (1993), Nr. 3, S. 398–403

- [87] HASSOLD, T. ; MERRILL, M. ; ADKINS, K. ; FREEMAN, S. ; SHERMAN, S.: Recombination and maternal age-dependent nondisjunction: molecular studies of trisomy 16. In: *Am J Hum Genet* 57 (1995), Nr. 4, S. 867–74
- [88] HASSOLD, T. ; SHERMAN, S. ; HUNT, P.: Counting crossovers: characterizing meiotic recombination in mammals. In: *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000), S. 2409–19
- [89] HEALD, R. ; MCLOUGHLIN, M. ; MCKEON, F.: Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase. In: *Cell* 74 (1993), Nr. 3, S. 463–74
- [90] HENDERSON, S. A. ; EDWARDS, R. G.: Chiasma frequency and maternal age in mammals. In: *Nature* 218 (1968), S. 22–28
- [91] HERSHKO, A. ; GANOTH, D. ; PEHRSON, D. ; PALAZZO, R. ; COHEN, L. H.: Methylated ubiquitin inhibits cyclin degradation in clam embryo extracts. In: *J Biol Chem* 266 (1991), S. 16376–16379
- [92] HODGES, C. A. ; ILAGAN, A. ; JENNINGS, D. ; KERI, R. ; NILSON, J. ; HUNT, P. A.: Experimental evidence that changes in oocyte growth influence meiotic chromosome segregation. In: *Hum Reprod* 17 (2002), S. 1171–80
- [93] HOFFMANN, I. ; CLARKE, P. R. ; MARCOTE, M. J. ; KARSENTI, E. ; DRAETTA, G.: Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2-cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. In: *EMBO J* 12 (1993), S. 53–63
- [94] HOFFMANN, I. ; DRAETTA, G. ; KARSENTI, E.: Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. In: *Embo J* 13 (1994), Nr. 18, S. 4302–10
- [95] HOLLOWAY, S. L. ; GLOTZER, M. ; KING, R. W. ; MURRAY, A. W.: Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. In: *Cell* 73 (1993), Nr. 7, S. 1393–402
- [96] HORIE, K. ; TAKAKURA, K. ; TAI, S. ; NARIMOTO, K. ; NODA, Y. ; NISHIKAWA, S. ; NAKAYAMA, H. ; FUJITA, J. ; MORI, T.: The expression of c-kit protein during oogenesis and early embryonic development. In: *Biol. Reprod.* 45 (1991), Nr. 4, S. 547–552
- [97] HUNT, P. ; LEMAIRE, R. ; EMBURY, P. ; SHEEAN, L. ; MROZ, K.: Analysis of chromosome behavior in intact mammalian oocytes: monitoring the segregation of a univalent chromosome during female meiosis. In: *Hum Mol Genet* 4 (1995), Nr. 11, S. 2007–12

- [98] HUNT, P. A. ; HASSOLD, T. J.: Sex matters in meiosis. In: *Science* 296 (2002), S. 2181–3
- [99] HUNT, T.: Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. In: *Semin Cell Biol* 2 (1991), Nr. 4, S. 213–22
- [100] HUNTER, N. ; BORTS, R. H.: Mlh1 is unique among mismatch repair proteins in its ability to promote crossing-over during meiosis. In: *Genes Dev* 11 (1997), Nr. 12, S. 1573–82
- [101] HWANG, L. H. ; LAU, L. F. ; SMITH, D. L. ; MISTROT, C. A. ; HARDWICK, K. G. ; HWANG, E. S. ; AMON, A. ; MURRAY, A. W.: Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint [published erratum appears in *Science* 1998 May 29;280(5368):1331]. In: *Science* 279 (1998), Nr. 5353, S. 1041–4
- [102] INNOCENTE, S. A. ; ABRAHAMSON, J. L. ; COGSWELL, J. P. ; LEE, J. M.: p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), Nr. 5, S. 2147–52
- [103] IWABUCHI, M. ; OHSUMI, K. ; YAMAMOTO, T. M. ; SAWADA, W. ; KISHIMOTO, T.: Residual Cdc2 activity remaining at meiosis I exit is essential for meiotic M-M transition in *Xenopus* oocyte extracts. In: *EMBO Journal* 19 (2000), Nr. 17, S. 4513–4523
- [104] JASPERSEN, S. L. ; CHARLES, J. F. ; MORGAN, D. O.: Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. In: *Curr Biol* 9 (1999), Nr. 5, S. 227–36
- [105] JINNO, S. ; SUTO, K. ; NAGATA, A. ; IGARASHI, M. ; KANAOKA, Y. ; NOJIMA, H. ; OKAYAMA, H.: Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. In: *Embo J* 13 (1994), Nr. 7, S. 1549–56
- [106] JOHNSON, R. T. ; RAO, P. N.: Nucleo-cytoplasmic interactions in the achievement of nuclear synchrony in DNA synthesis and mitosis in multinucleate cells. In: *Biol Rev Camb Philos Soc* 46 (1971), Nr. 1, S. 97–155
- [107] KALLIO, M. ; ERIKSSON, J. E. ; GORBSKY, G. J.: Differences in spindle association of the mitotic checkpoint protein Mad2 in mammalian spermatogenesis and oogenesis. In: *Dev Biol* 225 (2000), Nr. 1, S. 112–23
- [108] KALLIO, M. ; WEINSTEIN, J. ; DAUM, J. R. ; BURKE, D. J. ; GORBSKY, G. J.: Mammalian p55CDC mediates association of the spindle checkpoint protein Mad2 with the cyclosome/anaphase-promoting complex,

- and is involved in regulating anaphase onset and late mitotic events. In: *J Cell Biol* 141 (1998), Nr. 6, S. 1393–406
- [109] KANDA, N. ; KATO, H.: Analysis of crossing over in mouse meiotic cells by BrdU labelling technique. In: *Chromosoma* 78 (1980), Nr. 1, S. 113–21
- [110] KANEKO, Y. ; WATANABE, H. ; MORISAKI, H. ; AKITA, A. ; FUJIMOTO, K. ; TOMINAGA, M. ; TERASAWA, A. ; TACHIBANA, K. ; NAKANISHI, M.: Cell-cycle-dependent and ATM independent expression of human Chk1 kinase. In: *Oncogene* 18 (1999), S. 3673–3681
- [111] KASTAN, M. B. ; ONYEKERE, O. ; SIDRANSKY, D. ; VOGELSTEIN, B. ; CRAIG, R. W.: Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. In: *Cancer Research* 51 (1991), S. 6304–6311
- [112] KASTAN, M. B. ; ZHAN, Q. ; EL DEIRY, W. S. ; CARRIER, F. ; JACKS, T. ; WALSH, W. V. ; PLUNKETT, B. S. ; VOGELSTEIN, B. ; FORNACE, J.: A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. In: *Cell* 71 (1992), Nr. 4, S. 587–97
- [113] KENNERKNECHT, I.: A genetic model for the Prader-Willi syndrome and its implication for Angelman syndrome. In: *Hum Genet* 90 (1992), Nr. 1-2, S. 91–8
- [114] KERREBROCK, A. W. ; MOORE, D. P. ; WU, J. S. ; ORR WEAVER, T. L.: Mei-S332, a Drosophila protein required for sister-chromatid cohesion, can localize to meiotic centromere regions. In: *Cell* 83 (1995), Nr. 2, S. 247–56
- [115] KHANNA, K. K. ; KEATING, K. E. ; KOZLOV, S. ; SCOTT, S. ; GATEI, M. ; HOBSON, K. ; TAYA, Y. ; GABRIELLI, B. ; CHAN, D. ; LEES MILLER, S. P. ; LAVIN, M. F.: ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. In: *Nat Genet* 20 (1998), Nr. 4, S. 398–400
- [116] KLEIN, F. ; MAHR, P. ; GALOVA, M. ; BUONOMO, S. B. C. ; MICHAELIS, C. ; NAIRZ, K. ; NASMYTH, K.: A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. In: *Cell* 98 (1999), S. 91–103
- [117] KLINE, J. ; KINNEY, A. ; LEVIN, B. ; WARBURTON, B.: Trisomic pregnancy and earlier age at menopause. In: *Am. J. Hum. Genet.* 67 (2000), S. 395–404
- [118] KOCH, C. ; NASMYTH, K.: Cell cycle regulated transcription in yeast. In: *Curr Opin in Cell Biol* 6 (1994), S. 451–459

- [119] KOEHLER, K. E. ; BOULTON, C. L. ; COLLINS, H. E. ; FRENCH, R. L. ; HERMAN, K. C. ; LACEFIELD, S. M. ; MADDEN, L. D. ; SCHUETZ, C. D. ; HAWLEY, R. S.: Spontaneous X chromosome MI and MII non-disjunction events in *Drosophila melanogaster* oocytes have different recombinational histories. In: *Nat Genet* 14 (1996), Nr. 4, S. 406–14
- [120] KOEHLER, K. E. ; HAWLEY, R. S. ; SHERMAN, S. ; HASSOLD, T.: Recombination and nondisjunction in humans and flies. In: *Hum Mol Genet* 5 Spec No (1996), S. 1495–504
- [121] KORNAFEL, K. L. ; SAUER, M. V.: Increased rates of aneuploidy in older women. Increased rates of aneuploidy do not occur in gestations of older embryo recipients. In: *Hum Reprod* 9 (1994), Nr. 11, S. 1981–2
- [122] KORNBLUTH, S. ; SEBASTIAN, B. ; HUNTER, T. ; NEWPORT, J.: Membrane localization of the kinase which phosphorylates p34cdc2 on threonine 14. In: *Mol Biol Cell* 5 (1994), Nr. 3, S. 273–82
- [123] KOTANI, S. ; TUGENDREICH, S. ; FUJII, M. ; JORGENSEN, P. M. ; WATANABE, N. ; HOOG, C. ; HIETER, P. ; TODOKORO, K.: PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. In: *Mol Cell* 1 (1998), Nr. 3, S. 371–80
- [124] KUBBUTAT, M. ; JONES, S. ; KAZAZ, A. ; OREN, M.: Regulation of p53 stability by Mdm2. In: *Nature* 387 (1997), S. 296–299
- [125] KUMAGAI, A. ; DUNPHY, W. G.: Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25. In: *Genes and Development* 13 (1999), S. 1067
- [126] KUMAGAI, A. ; GUO, Z. ; EMAMI, K. H. ; WANG, S. X. ; DUNPHY, W. G.: The *Xenopus* Chk1 protein kinase mediates a caffeine-sensitive pathway of checkpoint control in cell-free extracts. In: *J Cell Biol* 142 (1998), Nr. 6, S. 1559–69
- [127] LABAER, J. ; GARRETT, M. D. ; STEVENSON, L. F. ; SLINGERLAND, J. M. ; SANDHU, C. ; CHOU, H. S. ; FATTAEY, A. ; HARLOW, E.: New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. In: *Genes Dev* 11 (1997), Nr. 7, S. 847–62
- [128] LAMB, N. E. ; FREEMAN, S. B. ; SAVAGE AUSTIN, A. ; PETTAY, D. ; TAFT, L. ; HERSEY, J. ; GU, Y. ; SHEN, J. ; SAKER, D. ; MAY, K. M. ; AVRAMOPOULOS, D. ; PETERSEN, M. B. ; HALLBERG, A. ; MIKKELSEN, M. ; HASSOLD, T. J. ; SHERMAN, S. L.: Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. In: *Nat Genet* 14 (1996), Nr. 4, S. 400–5

- [129] LAMMER, C. ; WAGERER, S. ; SAFFRICH, R. ; MERTENS, D. ; ANSORGE, W. ; HOFFMANN, I.: The *cdc25B* phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells. In: *J Cell Science* 111 (1998), S. 2445–2453
- [130] LEDAN, E. ; POLANSKI, Z. ; TERRET, M. E. ; MARO, B.: Meiotic maturation of the mouse oocyte requires an equilibrium between cyclin B synthesis and degradation. In: *Dev Biol* 232 (2001), S. 400–413
- [131] LEDBETTER, D. H. ; ENGEL, E.: Uniparental disomy in humans: development of an imprinting map and its implications for prenatal diagnosis. In: *Hum Mol Genet* 4 (1995), Nr. Spec No, S. 1757–64
- [132] LEE, M. S. ; OGG, S. ; XU, M. ; PARKER, L. L. ; DONOGHUE, D. J. ; MALLER, J. L. ; PIWNICA WORMS, H.: *cdc25+* encodes a protein phosphatase that dephosphorylates *p34cdc2*. In: *Mol Biol Cell* 3 (1992), Nr. 1, S. 73–84
- [133] LEMAIRE ADKINS, R. ; RADKE, K. ; HUNT, P. A.: Lack of checkpoint control at the metaphase/anaphase transition: a mechanism of meiotic nondisjunction in mammalian females. In: *J Cell Biol* 139 (1997), Nr. 7, S. 1611–9
- [134] LEVEDAKOU, E. N. ; HE, M. ; BAPTIST, E. W. ; CRAVEN, R. J. ; CANCE, W. G. ; WELCSH, P. L. ; SIMMONS, A. ; NAYLOR, S. L. ; LEACH, R. J. ; LEWIS, T. B. ; ET AL.: Two novel human serine/threonine kinases with homologies to the cell cycle regulating *Xenopus* MO15, and NIMA kinases: cloning and characterization of their expression pattern. In: *Oncogene* 9 (1994), Nr. 7, S. 1977–88
- [135] LEVINE, A. J. ; MOMAND, J. ; A., F. C.: The p53 tumor suppressor gene. In: *Nature* 351 (1991), S. 453–456
- [136] LI, F. ; AMBROSINI, G. ; CHU, E. Y. ; PLESCIA, J. ; TOGNIN, S. ; MARCHISIO, P. C. ; ALTIERI, D. C.: Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. In: *Nature* 396 (1998), Nr. 6711, S. 580–4
- [137] LI, R. ; WAGA, S. ; HANNON, G. J. ; BEACH, D. ; STILLMAN, B.: Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. In: *Nature* 371 (1994), Nr. 6497, S. 534–7
- [138] LI, X. ; NICKLAS, R. B.: Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. In: *Nature* 373 (1995), Nr. 6515, S. 630–2

- [139] LI, X. ; NICKLAS, R. B.: Tension-sensitive kinetochore phosphorylation and the chromosome distribution checkpoint in praying mantid spermatocytes. In: *J Cell Sci* 110 (1997), Nr. Pt 5, S. 537–45
- [140] LI, Y. ; BENEZRA, R.: Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. In: *Science* 274 (1996), Nr. 5285, S. 246–8
- [141] LIM, A. S. ; TSAKOK, M. F.: Age-related decline in fertility: a link to degenerative oocytes? In: *Fertil Steril* 68 (1997), Nr. 2, S. 265–71
- [142] LISTOVSKY, T. ; ZOR, A. ; LARONNE, A. ; BRANDEIS, M.: Cdk1 is essential for mammalian cyclosome/APC regulation. In: *Exp Cell Res* 255 (2000), Nr. 2, S. 184–91
- [143] LIU, Q. ; GUNTUKU, S. ; CUI, X. S. ; MATSUOKA, S. ; CORTEZ, D. ; TAMAI, K. ; LUO, G. ; CARATTINI-RIVERA, S. ; DEMAYO, F. ; BRADLEY, A. ; DONEHOWER, L. A. ; ELLEDGE, S. J.: Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. In: *Genes Dev* 14 (2000), Nr. 12, S. 1448–59
- [144] LIVINGSTONE, L. R. ; WHITE, A. ; SPROUSE, I. ; LIVANOS, E. ; JACKS, T. ; TISTY, T. D.: Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild type p53. In: *Cell* 70 (1992), Nr. 923-935
- [145] LOHKA, M. J. ; HAYES, M. K. ; MALLER, J. L.: Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (1988), Nr. 9, S. 3009–13
- [146] LONGO, F. J. ; CHEN, D. Y.: Development of cortical polarity in mouse eggs: involvement of the meiotic apparatus. In: *Dev Biol* 107 (1985), Nr. 2, S. 382–94
- [147] LOPEZ GIRONA, A. ; FURNARI, B. ; MONDESERT, O. ; RUSSELL, P.: Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. In: *Nature* 397 (1999), Nr. 6715, S. 172–5
- [148] LORCA, T. ; CASTRO, A. ; MARTINEZ, A. M. ; VIGNERON, S. ; MORIN, N. ; SIGRIST, S. ; LEHNER, C. ; DOREE, M. ; LABBE, J. C.: Fizzy is required for activation of the APC/cyclosome in *Xenopus* egg extracts. In: *Embo J* 17 (1998), Nr. 13, S. 3565–75
- [149] LU, Q. ; DUNN, R. L. ; ANGELES, R. ; SMITH, G. D.: Regulation of spindle formation by active mitogen-activated protein kinase and protein phosphatase 2A during mouse oocyte meiosis. In: *Biol Reprod* 66 (2002), S. 29–37

- [150] LU, X. ; LANE, D. P.: Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: Defects in chromosome instability syndromes? In: *Cell* 75 (1993), S. 765–778
- [151] LUNDGREN, K. ; WALWORTH, N. ; BOOHER, R. ; DEMBSKI, M. ; KIRSCHNER, M. ; BEACH, D.: mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. In: *Cell* 64 (1991), Nr. 6, S. 1111–22
- [152] LUO, X. ; FANG, G. ; COLDIRON, M. ; LIN, Y. ; YU, H. ; KIRSCHNER, M. W. ; WAGNER, G.: Structure of the Mad2 spindle assembly checkpoint protein and its interaction with Cdc20. In: *Nat Struct Biol* 7 (2000), Nr. 3, S. 224–9
- [153] MACDONALD, M. ; HASSOLD, T. ; HARVEY, J. ; WANG, L. H. ; MORTON, N. E. ; JACOBS, P.: The origin of 47,XXY and 47,XXX aneuploidy: heterogeneous mechanisms and role of aberrant recombination. In: *Hum Mol Genet* 3 (1994), Nr. 8, S. 1365–71
- [154] MAILAND, N. ; FALCK, J. ; LUKAS, C. ; SYLJUASEN, R. G. ; WELCKER, M. ; BARTEK, J. ; LUKAS, J.: Rapid destruction Cdc25A in response to DNA damage. In: *Science* 288 (2000), S. 1425–1429
- [155] MALLER, J. L. ; SCHWAB, M. ; GROSS, S. D. ; TAIEB, F. E. ; ROBERTS, B. T. ; TUNQUIST, B. J.: The mechanism of CSF arrest in vertebrate oocytes. In: *Mol Cell Endocrinol* 187 (2002), S. 173–8
- [156] MANEY, T. ; HUNTER, A. W. ; WORDEMAN, M. ; WORDEMAN, L.: Mitotic centromere-associated kinesin is important for anaphase chromosome segregation. In: *J. Cell Biol.* 142 (1998), S. 787–801
- [157] MARO, B. ; HOWLETT, S. K. ; WEBB, M.: Non-spindle microtubule organizing centers in metaphase II-arrested mouse oocytes. In: *J Cell Biol* 101 (1985), Nr. 5 Pt 1, S. 1665–72
- [158] MARO, B. ; JOHNSON, M. H. ; WEBB, M. ; FLACH, G.: Mechanism of polar body formation in the mouse oocyte: an interaction between the chromosomes, the cytoskeleton and the plasma membrane. In: *J Embryol Exp Morphol* 92 (1986), S. 11–32
- [159] MARTIN, R. H.: Variation in the frequency and type of sperm chromosomal abnormalities among normal men. In: *Hum. Genet.* 77 (1987), S. 108–144
- [160] MARTINEZ-EXPOSITO, M. J. ; KAPLAN, K. B. ; COPELAND, J. ; SORGER, P. K.: Retention of the Bub3 checkpoint protein on lagging chromosomes. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), S. 8493–8498

- [161] MASUI, Y. ; MARKERT, C. L.: Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. In: *J Exp Zool* 177 (1971), Nr. 2, S. 129–45
- [162] MATSUOKA, M. ; KATO, J. Y. ; FISHER, R. P. ; MORGAN, D. O. ; SHERR, C. J.: Activation of cyclin-dependent kinase 4 (cdk4) by mouse MO15-associated kinase. In: *Mol Cell Biol* 14 (1994), Nr. 11, S. 7265–75
- [163] McLAREN, A.: *Germ cells and soma. A new look at an old problem..* New Haven : Yale University Press, 1981
- [164] MINSHULL, J. ; SUN, H. ; TONKS, N. K. ; MURRAY, A. W.: A MAP kinase-dependent spindle assembly checkpoint in *Xenopus* egg extracts. In: *Cell* 79 (1994), Nr. 3, S. 475–86
- [165] MIYAZAKI, W. Y. ; ORR WEAVER, T. L.: Sister-chromatid misbehavior in *Drosophila* ord mutants. In: *Genetics* 132 (1992), Nr. 4, S. 1047–61
- [166] MOENS, P. B. ; SPYROPOULOS, B.: Immunocytology of chiasmata and chromosomal disjunction at mouse meiosis. In: *Chromosoma* 104 (1995), Nr. 3, S. 175–82
- [167] VAN MONTFRANS, J. M. ; DORLAND, M. ; OOSTERHUIS, G. J. E. ; VAN VUGT, J. M. G. ; REKERS-MOMBARG, L. T. M. ; LAMBALK, C. B.: Increased concentrations of follicle-stimulating hormone in mothers of children with Downs syndrome. In: *Lancet* 353 (1999), S. 1853–1854
- [168] MOORE, D. P. ; ORR-WEAVER, T. L.: Chromosome segregation during meiosis: building an unambivalent bivalent. In: *Curr Top Dev Biol* 37 (1998), S. 263–99
- [169] MORITA, T. ; MANGANARO, T. M. ; TAO, X. J. ; MARTIMBEAU, S. ; DONAHOE, P. K. ; TILLY, J. L.: Requirement for phosphatidylinositol-3-kinase in cytokine-mediated germ cell survival during fetal oogenesis in the mouse. In: *Endocrinology* 140 (1999), S. 941–949
- [170] NASMYTH, K.: Segregating sister Genomes: The molecular biology of chromosome separation. In: *Science* 297 (2002), S. 559–65
- [171] NAVOT, D. ; BERGH, P. A. ; WILLIAMS, M. A. ; GARRISI, G. J. ; GUZMAN, I. ; SANDLER, B. ; GRUNFELD, L.: Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. In: *Lancet* 337 (1991), Nr. 8754, S. 1375–7
- [172] NAVOT, D. ; DREWS, M. R. ; BERGH, P. A. ; GUZMAN, I. ; KARSTADT, A. ; SCOTT, J. ; GARRISI, G. J. ; HOFMANN, G. E.: Age-related

- decline in female fertility is not due to diminished capacity of the uterus to sustain embryo implantation [see comments]. In: *Fertil Steril* 61 (1994), Nr. 1, S. 97–101
- [173] NICKLAS, R. B.: Chromosome distribution: experiments on cell hybrids and in vitro. In: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 277 (1977), Nr. 955, S. 267–76
- [174] NICKLAS, R. B.: How cells get the right chromosomes. In: *Science* 275 (1997), Nr. 5300, S. 632–7
- [175] NICKLAS, R. B. ; KOCH, C. C.: Chromosome micromanipulation. III. Spindle fibre tension and the reorientation of mal-oriented chromosomes. In: *J Cell Biol* 43 (1969), S. 40–50
- [176] NICKLAS, R. B. ; WARD, S. C. ; GORBSKY, G. J.: Kinetochore chemistry is sensitive to tension and may link mitotic forces to a cell cycle checkpoint. In: *J Cell Biol* 130 (1995), Nr. 4, S. 929–39
- [177] NICOLAIDIS, P. ; PETERSEN, M. B.: Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. In: *Hum Reprod* 13 (1998), Nr. 2, S. 313–9
- [178] NIGG, E. A.: Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. In: *Nature Reviews* 2 (2001), S. 21–32
- [179] NURSE, P. ; THURIAUX, P.: Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. In: *Genetics* 96 (1980), Nr. 3, S. 627–37
- [180] ODRISCOLL, M. ; HUMBERT, O. ; KARRAN, P.: DNA mismatch repair. In: *Nucleic Acids Mol. Biol.* 12 (1998), S. 173–197
- [181] OLSON, L. W. ; EDEN, U. ; EGEL-MITANI, M. ; EGEL, R.: Asynaptic meiosis in fission yeast? In: *Hereditas* 83 (1978), S. 265–268
- [182] OUYANG, B. ; LAN, Z. ; MEADOWS, J. ; PAN, H. ; FUKASAWA, K. ; LI, W. ; DAI, W.: Human Bub1: a putative spindle checkpoint kinase closely linked to cell proliferation. In: *Cell Growth Differ* 9 (1998), Nr. 10, S. 877–85
- [183] PACKER, A. I. ; HSU, Y. C. ; BESMER, P. ; BACHVAROVA, R. F.: The ligand of the c-kit receptor promotes oocyte growth. In: *Dev Biol* 161 (1994), Nr. 1, S. 194–205
- [184] PAGANO, M. ; PEPPERKOK, R. ; VERDE, F. ; ANSORGE, W. ; DRAETTA, G.: Cyclin A is required at two points in the mammalian cell cycle. In: *EMBO J* 11 (1992), S. 961–971

- [185] PAHLAVAN, G. ; POLANSKI, Z. ; KALAB, P. ; GOLSTEYN, R. ; NIGG, E. A. ; MARO, B.: Characterization of polo-like kinase 1 during meiotic maturation of the mouse oocyte. In: *Dev Biol* 220 (2000), Nr. 2, S. 392–400
- [186] PALIULIS, L. V. ; NICKLAS, B. R.: The reduction of chromosome number in Meiosis is determined by properties built into the chromosomes. In: *The Journal of Cell Biology* 150 (2000), Nr. 6, S. 1223–1231
- [187] PALMER, A. ; GAVIN, A. C. ; NEBREDA, A. R.: A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. In: *Embo J* 17 (1998), Nr. 17, S. 5037–47
- [188] PARISI, S. ; MCKAY, M. J. ; MOLNAR, M. ; THOMPSON, M. A. ; VANDERSPEK, P. J. ; VAN DRUNEN-SCHOENMAKER, E. ; KANAAR, R. ; LEHMANN, E. ; HOEIJMAKERS, J. H. ; KOHLI, J.: Rec8p, a meiotic recombination and sister chromatid cohesion phosphoprotein of the Rad21p family conserved from fission yeast to humans. In: *Mol Cell Biol* 19 (1999), S. 3515–28
- [189] PARKER, L. L. ; ATHERTON FESSLER, S. ; PIWNICA WORMS, H.: p107wee1 is a dual-specificity kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992), Nr. 7, S. 2917–21
- [190] PAVLETICH, N. P.: Mechanism of cyclin dependent Kinase regulation: Structures of Cdks, their cyclin activators, and CIP and INK4 inhibitors. In: *J Mol Biol* 287 (1999), S. 821–828
- [191] PEEPER, D. S. ; PARKER, L. L. ; EWEN, M. E. ; TOEBES, M. ; HALL, F. L. ; XU, M.: A- and B-type cyclins differentially modulate substrate specificity of cyclin-cdk complexes. In: *EMBO J* 12 (1993), S. 1947–1954
- [192] PENG, C. Y. ; GRAVES, P. R. ; THOMA, R. S. ; WU, Z. ; SHAW, A. S. ; PIWNICA WORMS, H.: Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216 [see comments]. In: *Science* 277 (1997), Nr. 5331, S. 1501–5
- [193] PENROSE, L. S.: The relative effects of paternal and maternal age in mongolism. In: *J. Gent.* 27 (1933), S. 219–24
- [194] PEREZ, G. I. ; TAO, X. J. ; TILLY, J. L.: Fragmentation and death (a. k. a. apoptosis) of ovulated oocytes. In: *Mol Hum Reprod* 5 (1999), S. 414–420

- [195] PEREZ, G. I. ; TILLY, J. L.: Cumulus cells are required for the increased apoptotic potential in oocytes of aged mice. In: *Hum Reprod* 12 (1997), S. 2781–2783
- [196] PETERS, J. M.: SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. In: *Curr Opin Cell Biol* 10 (1998), Nr. 6, S. 759–68
- [197] PETERS, J. M.: Subunits and substrates of the anaphase-promoting complex [In Process Citation]. In: *Exp Cell Res* 248 (1999), Nr. 2, S. 339–49
- [198] PETERS, J. M. ; KING, R. W. ; HOOG, C. ; KIRSCHNER, M. W.: Identification of BIME as a subunit of the anaphase-promoting complex. In: *Science* 274 (1996), Nr. 5290, S. 1199–201
- [199] PLACHOT, M. ; VEIGA, A. ; MONTAGUT, J. ; DE GROUCHY, J. ; CALDERON, G. ; LEPRETRE, S. ; JUNCA, A. M. ; SANTALO, J. ; CARLES, E. ; MANDELBAUM, J. ; ET AL.: Are clinical and biological IVF parameters correlated with chromosomal disorders in early life: a multicentric study. In: *Hum Reprod* 3 (1988), Nr. 5, S. 627–35
- [200] PLUG, A. W. ; PETERS, A. H. ; KEEGAN, K. S. ; HOEKSTRA, M. F. ; DE BOER, P. ; ASHLEY, T.: Changes in protein composition of meiotic nodules during mammalian meiosis. In: *J Cell Sci* 111 (1998), Nr. Pt 4, S. 413–23
- [201] POLANSKI, Z.: Activation of in vitro matured mouse oocytes arrested at first or second meiotic metaphase. In: *Int J Dev Biol* 39 (1995), Nr. 6, S. 1015–20
- [202] POLANSKI, Z.: Genetic background of the differences in timing of meiotic maturation in mouse oocytes: a study using recombinant inbred strains. In: *J Reprod Fertil* 109 (1997), Nr. 1, S. 109–14
- [203] POLANSKI, Z.: Strain difference in the timing of meiosis resumption in mouse oocytes: involvement of a cytoplasmic factor(s) acting presumably upstream of the dephosphorylation of p34cdc2 kinase. In: *Zygote* 5 (1997), Nr. 2, S. 105–9
- [204] POLANSKI, Z. ; LEDAN, E. ; BRUNET, S. ; LOUVET, S. ; VERLHAC, M. H. ; KUBIAK, J. Z. ; MARO, B.: Cyclin synthesis controls the progression of meiotic maturation in mouse oocytes. In: *Development* 125 (1998), Nr. 24, S. 4989–97
- [205] RACOWSKY, C. ; PRATHER, A. L. ; JOHNSON, M. K. ; OLVERA, S. P. ; GELETY, T. J.: Prematurely condensed chromosomes and meiotic abnormalities in unfertilized human oocytes after ovarian stimulation

- with and without gonadotropin-releasing hormone agonist. In: *Fertil Steril* 67 (1997), Nr. 5, S. 932–8
- [206] RALEIGH, J. M. ; OCONNELL, M. J.: The G₂ damage checkpoint targets both Wee1 and Cdc25. In: *Journal of Cell Science* 113 (2000), S. 1727–1736
- [207] RAO, P. N. ; JOHNSON, R. T.: Mammalian cell fusion. IV. Regulation of chromosome formation from interphase nuclei by various chemical compounds. In: *J Cell Physiol* 78 (1971), Nr. 2, S. 217–23
- [208] RICHARDS, J. S.: Hormonal control of gene expression in the ovary. In: *Endocr. Rev.* 15 (1994), S. 725–751
- [209] RIEDER, C. L. ; COLE, R. W. ; KHODJAKOV, A. ; SLUDER, G.: The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. In: *J Cell Biol* 130 (1995), Nr. 4, S. 941–8
- [210] RIEDER, C. L. ; KHODJAKOV, A. ; PALIULIS, L. V. ; FORTIER, T. M. ; COLE, R. W. ; SLUDER, G.: Mitosis in vertebrate somatic cells with two spindles: implications for the metaphase/anaphase transition checkpoint and cleavage. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), Nr. 10, S. 5107–12
- [211] RIEDER, C. L. ; SCHULTZ, A. ; COLE, R. ; SLUDER, G.: Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. In: *J Cell Biol* 127 (1994), Nr. 5, S. 1301–10
- [212] RISCH, N. ; STEIN, Z. ; KLINE, J. ; WARBURTON, D.: The relationship between maternal age and chromosome size in autosomal trisomy. In: *Am J Hum Genet* 39 (1986), Nr. 1, S. 68–78
- [213] ROBERTS, B. T. ; FARR, K. A. ; HOYT, M. A.: The *Sacharomyces cerevisiae* checkpoint gene *Bub1* encodes a novel protein kinase. In: *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994), S. 8282–8291
- [214] ROBINSON, W. P. ; MCFADDEN, D. E. ; STEPHENSON, M. D.: The origin of abnormalities in recurrent Aneuploidy or Polyploidy. In: *Am. J. Hum. Genet.* 69 (2001)
- [215] RUDNER, A. D. ; MURRAY, A. W.: The spindle assembly checkpoint. In: *Curr Opin Cell Biol* 8 (1996), Nr. 6, S. 773–80
- [216] RUSSO, A. A. ; JEFFREY, P. D. ; PAVLETICH, N. P.: Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. In: *Nature Struct Biol* 3 (1996), S. 696–700

- [217] SAGATA, N. ; WATANABE, N. ; VANDE WOUDE, G. F. ; IKAWA, Y.: The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. In: *Nature* 342 (1989), Nr. 6249, S. 512–8
- [218] SAMBROOK, J. ; FRITSCH, E. F. ; MANIATIS, T.: *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York, 1989 (Cold Spring Harbour Laboratory Press)
- [219] SANDALINAS, M. ; MARQUEZ, C. ; MUNNE, S.: Spectral karyotyping of fresh, non-inseminated oocytes. In: *Mol Hum Reprod* 8 (2002), S. 580–5
- [220] SCHAAR, B. T. ; CHAN, G. K. ; MADDOX, P. ; SALMON, E. D. ; YEN, T. J.: CENP-E function at kinetochores is essential for chromosome alignment. In: *J. of Cell Biology* 139 (1997), S. 1373–1389
- [221] SCHATTEN, G. ; SIMERLY, C. ; SCHATTEN, H.: Microtubule configurations during fertilization, mitosis, and early development in the mouse and the requirement for egg microtubule-mediated motility during mammalian fertilization. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (1985), Nr. 12, S. 4152–6
- [222] SCHULMAN, B. A. ; LINDSTROM, D. L. ; HARLOW, E.: Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), Nr. 18, S. 10453–8
- [223] SCHWAB, M. ; LUTUM, A. S. ; SEUFERT, W.: Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis. In: *Cell* 90 (1997), Nr. 4, S. 683–93
- [224] SCHWACHA, A. ; KLECKNER, N.: Identification of joint molecules that form frequently between homologs but rarely between sister chromatids during yeast meiosis. In: *Cell* 76 (1994), Nr. 1, S. 51–63
- [225] SCHWACHA, A. ; KLECKNER, N.: Identification of double Holliday junctions as intermediates in meiotic recombination. In: *Cell* 83 (1995), Nr. 5, S. 783–91
- [226] SHERMAN, S. L. ; PETERSEN, M. B. ; FREEMAN, S. B. ; HERSEY, J. ; PETTAY, D. ; TAFT, L. ; FRANTZEN, M. ; MIKKELSEN, M. ; HASSOLD, T. J.: Non-disjunction of chromosome 21 in maternal meiosis I: evidence for a maternal age-dependent mechanism involving reduced recombination. In: *Hum Mol Genet* 3 (1994), Nr. 9, S. 1529–35
- [227] SHONN, M. A. ; MCCARROLL, R. ; MURRAY, A. W.: Requirement of the spindle checkpoint for proper chromosome segregation in budding yeast in meiosis. In: *Science* 289 (2000), S. 300–3

- [228] SIEGEL, S.: *Methoden in der Psychologie Band 4*. Bd. 3 : Nichtparametrische statistische Methoden. Frankfurt, 1987
- [229] SIMERLY, C. ; NOWACK, G. ; DE LANEROLL, P. ; SCHATTEN, G.: Differential expression and functions of cortical myosin IIA and IIB isotypes during meiotic maturation, fertilization and mitosis in mouse oocytes and embryos. In: *Mol Biol Cell* 9 (1998), S. 2509–2525
- [230] SKOUFIAS, D. A. ; ANDREASSEN, P. R. ; LACROIX, F. B. ; WILSON, L. ; MARGOLIS, R. L.: Mammalian mad2 and bub1/bubR1 recognize distinct spindle-attachment and kinetochore-tension checkpoints. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (2001), S. 4492–7
- [231] SMITS, V. A. ; KLOMPMAKER, R. ; ARNAUD, L. ; RIJKSEN, G. ; NIGG, E. A. ; MEDEMA, R. H.: Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. In: *Nat Cell Biol* 2 (2000), Nr. 9, S. 672–676
- [232] SPEED, R. M.: The effects of ageing on the meiotic chromosomes of male and female mice. In: *Chromosoma* 64 (1977), S. 241–54
- [233] STEUERWALD, N. ; COHEN, J. ; HERRERA, R. J. ; SANDALINAS, M. ; BRENNER, C. A.: Association between spindle assembly checkpoint expression and maternal age in human oocytes. In: *Molecular Human reproduction* 7 (2001), Nr. 1, S. 49–55
- [234] STEWART, N. ; HICKS, G. G. ; PARASKEVAS, F. ; MOWAT, M.: Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. In: *Oncogene* 10 (1994), S. 109–115
- [235] SUDAKIN, V. ; GANOTH, D. ; DAHAN, A. ; JELLER, H. ; HERSHKO, J. ; LUCA, F. C. ; RUDERMAN, J. V. ; HERSHKO, A.: The cyclosome, a large complex containing ubiquitin ligase activity, targets cyclin for destruction at the end of mitosis. In: *Mol Biol Cell* 6 (1995), S. 185–198
- [236] SUN, F. ; YIN, H. ; EICHENLAUB-RITTER, U.: Differential chromosome behaviour in mammalian oocytes exposed to the tranquilizer diazepam *in vitro*. In: *Mutagenesis* 16 (2001), S. 407–417
- [237] SURANA, U. ; AMON, A. ; DOWZER, C. ; MCGREW, J. ; BYERS, B. ; NASMYTH, K.: Destruction of the CDC28/CLB mitotic kinase is not required for the metaphase to anaphase transition in budding yeast. In: *Embo J* 12 (1993), Nr. 5, S. 1969–78
- [238] SZOLLOSI, D. ; CALARCO, P. ; DONAHUE, R. P.: Absence of centrioles in the first and second meiotic spindles of mouse oocytes. In: *Journal of Cell Science* 11 (1972), S. 521–541

- [239] TAKENAKA, K. ; GOTOH, Y. ; NISHIDA, E.: MAP kinase is required for the spindle assembly checkpoint but is dispensable for the normal M phase entry and exit in *Xenopus* egg cell cycle extracts. In: *J Cell Biol* 136 (1997), Nr. 5, S. 1091–7
- [240] TAM, P. P. ; SNOW, M. H.: Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. In: *J. Embryol. Exp. Morphol.* 64 (1981), S. 133–147
- [241] TAM, P. P. L. ; SNOW, M. H. L.: Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. In: *J. Embryol Exp Morphol* 64 (1981), S. 133–147
- [242] TAO, W. ; LEVINE, A. J.: Nucleoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), S. 3077–3080
- [243] TARKOWSKI, A. K.: An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs. In: *Cytogenetics* 5 (1966), S. 394–400
- [244] TASSAN, J. P. ; JAQUENOUD, M. ; FRY, A. M. ; FRUTIGER, S. ; HUGHES, G. J. ; NIGG, E. A.: In vitro assembly of a functional human CDK7-cyclin H complex requires MAT1, a novel 36 kDa RING finger protein. In: *Embo J* 14 (1995), Nr. 22, S. 5608–17
- [245] TASSAN, J. P. ; SCHULTZ, S. J. ; BARTEK, J. ; NIGG, E. A.: Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase). In: *J Cell Biol* 127 (1994), Nr. 2, S. 467–78
- [246] TAYLOR, S. S. ; HA, E. ; MCKEON, F.: The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. In: *J Cell Biol* 142 (1998), Nr. 1, S. 1–11
- [247] TAYLOR, S. S. ; MCKEON, F.: Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. In: *Cell* 89 (1997), Nr. 5, S. 727–35
- [248] TIBBETTS, R. S. ; BRUMBAUGH, K. M. ; WILLIAMS, J. M. ; SARKARIA, J. N. ; CLIBY, W. A. ; SHIEH, S. Y. ; TAYA, Y. ; PRIVES, C. ; ABRAHAM, R. T.: A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. In: *Genes Dev* 13 (1999), Nr. 2, S. 152–7
- [249] UHLMANN, F. ; LOTTSPEICH, F. ; NASMYTH, K.: Sister-chromatid separation and anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. In: *Nature* 400 (1999), S. 37–42

- [250] VAN BLERKOM, J. ; DAVIS, P.: Differential effects of repeated ovarian stimulation on cytoplasmic and spindle organization in metaphase II mouse oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. In: *Human Reproduction* 16 (2001), S. 757–764
- [251] VAN BLERKOM, J. ; HENRY, G.: Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. In: *Hum Reprod* 7 (1992), Nr. 3, S. 379–90
- [252] VAN HUMMELEN, P. ; LOWE, X. ; WYROBEK, A. J.: Simultaneous detection of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of healthy men by multicolour fluorescence in situ hybridisation. In: *Hum Genet* 98 (1996), S. 608–615
- [253] DE VANTERY, C. ; STUTZ, A. ; VASSALLI, J. D. ; SCHORDERET SLATKINE, S.: Acquisition of meiotic competence in growing mouse oocytes is controlled at both translational and posttranslational levels. In: *Dev Biol* 187 (1997), Nr. 1, S. 43–54
- [254] VERLHAC, M. H. ; KUBIAK, J. Z. ; CLARKE, H. J. ; MARO, B.: Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. In: *Development* 120 (1994), Nr. 4, S. 1017–25
- [255] VERLHAC, M. H. ; KUBIAK, J. Z. ; WEBER, M. ; GERAUD, G. ; COLLEDGE, W. H. ; EVANS, M. J. ; MARO, B.: Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. In: *Development* 122 (1996), Nr. 3, S. 815–22
- [256] VERLHAC, M. H. ; LEFEBRVE, C. ; GUILLAUD, P. ; RASSINIER, P. ; MARO, B.: Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos. In: *Curr Biol* 10 (2000), S. 1303–1306
- [257] VERLHAC, M. H. ; DE PENNART, H. ; MARO, B. ; COBB, M. H. ; CLARKE, H. J.: MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. In: *Dev-Biol* 158 (1993), Nr. 2, S. 330–40
- [258] VISINTIN, R. ; PRINZ, S. ; AMON, A.: CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC- dependent proteolysis. In: *Science* 278 (1997), Nr. 5337, S. 460–3
- [259] VOLARCIK, K. ; SHEEAN, L. ; GOLDFARB, J. ; WOODS, L. ; ABDULKARIM, F. W. ; HUNT, P.: The meiotic competence of in-vitro matured human oocytes is influenced by donor age: evidence that folliculogenesis is compromised in the reproductively aged ovary. In: *Hum Reprod* 13 (1998), Nr. 1, S. 154–60

- [260] WAGA, S. ; HANNON, G. J. ; BEACH, D. ; STILLMAN, B.: The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. In: *Nature* 369 (1994), Nr. 6481, S. 574–8
- [261] WANG, X. M. ; ZHAI, Y. ; FERRELL, J.: A role for mitogen-activated protein kinase in the spindle assembly checkpoint in XTC cells. In: *J Cell Biol* 137 (1997), Nr. 2, S. 433–43
- [262] WARBURTON, D.: The effect of maternal age on the frequency of trisomy: change in meiosis or *in utero* selection? In: *Prog. Clin. Biol. Res.* 311 (1989), S. 165–81
- [263] WASSERMANN, K. ; BENEZRA, R.: Mad2 transiently associates with an APC/p55Cdc complex during mitosis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), Nr. 19, S. 11193–8
- [264] WATANABE, H. ; PAN, Z.-Q. ; SCHREIBER-AGUS, N. ; DEPINHO, R. A. ; HURWITZ, J. ; XIONG, Y.: Suppression of cell transformation by the cyclin-dependent kinase inhibitor p57-KIP2 requires binding to proliferating cell nuclear antigen. In: *Proc Natl Acad Sci* 95 (1998), S. 1392–1397
- [265] WATANABE, Y. ; NURSE, P.: Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. In: *Nature* 400 (1999), S. 461–464
- [266] WATERS, J. C. ; CHEN, R. H. ; MURRAY, A. W. ; SALMON, E. D.: Localization of MAD2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension. In: *The Journal of Cell Biology* 141 (1998), Nr. 5, S. 1181–1191
- [267] WEISS, E. ; WINEY, M.: The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body duplication gene MPS1 is part of a mitotic checkpoint. In: *J Cell Biol* 132 (1996), Nr. 1-2, S. 111–23
- [268] WEST, A. ; LAHDETIE, J.: p21WAF1 expression during spermatogenesis of the normal and X-irradiated rat. In: *Int J Radiat Biol* 71 (1997), Nr. 3, S. 283–91
- [269] WILLIAMS, B. J. ; BALLENGER, C. A. ; MALTER, H. E. ; BISHOP, F. ; TUCKER, M. ; ZWINGMAN, T. A. ; HASSOLD, T. J.: Non-disjunction in human sperm: results of fluorescence in situ hybridization studies using two and three probes. In: *Hum Mol Genet* 2 (1993), Nr. 11, S. 1929–36
- [270] WINSTON, N. J.: Stability of cyclin B protein during meiotic maturation and the first mitotic cell division in mouse oocytes. In: *Biol Cell* 89 (1997), Nr. 3, S. 211–9

- [271] WOODS, L. M. ; HODGES, C. A. ; BAART, E. ; BAKER, S. M. ; LISKAY, M. ; HUNT, P. A.: Chromosomal influence on meiotic spindle assembly: abnormal meiosis I in female Mlh1 mutant mice. In: *J Cell Biol* 145 (1999), Nr. 7, S. 1395–406
- [272] WRAMSBY, H.: Chromosomal analysis of human oocytes recovered from preovulatory follicles in stimulated cycles. In: *New Engl. J. Med.* 316 (1987), S. 121–124
- [273] WU, L. ; YEE, A. ; LIU, L. ; CARBONARO HALL, D. ; VENKATESAN, N. ; TOLO, V. T. ; HALL, F. L.: Molecular cloning of the human CAK1 gene encoding a cyclin-dependent kinase-activating kinase. In: *Oncogene* 9 (1994), Nr. 7, S. 2089–96
- [274] WU, S. ; WOLGEMUTH, D. J.: The distinct and developmentally regulated patterns of expression of members of the mouse Cdc25 gene family suggest differential functions during gametogenesis. In: *Dev Biol* 170 (1995), Nr. 1, S. 195–206
- [275] XIONG, Y. ; HANNON, G. J. ; ZHANG, H. ; CASSO, D. ; KOBAYASHI, R. ; BEACH, D.: p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. In: *Nature* 366 (1993), S. 701–704
- [276] YAMAMOTO, A. ; GUACCI, V. ; KOSHLAND, D.: Pds1p, an inhibitor of anaphase in budding yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s). In: *J Cell Biol* 133 (1996), Nr. 1, S. 99–110
- [277] YARON, Y. ; PEYSER, M. R. ; AMIT, A. ; DAVID, M. P. ; BRENNER, S. ; LESSING, J. B.: In vitro fertilisation and oocyte donation in woman 45 years of age and older. In: *Fertil Steril* 63 (1995), S. 71–76
- [278] YIN, H. ; CUKURCAM, S. ; BETZENDAHL, I. ; ADLER, I. ; EICHENLAUB-RITTER, U.: Trichlorfon exposure, spindle aberrations and nondisjunction in mammalian oocytes. In: *Chromosoma* 107 (1998), Nr. 6-7, S. 514–22
- [279] YOSHIDA, H. ; TAKAKURA, N. ; KATAOKA, H. ; KUNISADA, T. ; OKAMURA, H. ; NISHIKAWA, S. I.: Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. In: *Dev Biol* 184 (1997), Nr. 1, S. 122–37
- [280] YU, H. ; PETERS, J. M. ; KING, R. W. ; PAGE, A. M. ; HIETER, P. ; KIRSCHNER, M. W.: Identification of a cullin homology region in a subunit of the anaphase-promoting complex. In: *Science* 279 (1998), Nr. 5354, S. 1219–22

- [281] YUDKOVSKY, Y. ; SHTEINBERG, M. ; LISTOVSKY, T. ; BRANDEIS, M. ; HERSHKO, A.: Phosphorylation of Cdc20/fizzy negatively regulates the mammalian cyclosome/APC in the mitotic checkpoint. In: *Biochem Biophys Res Commun* 271 (2000), Nr. 2, S. 299–304
- [282] ZACHARIAE, W. ; SHEVCHENKO, A. ; ANDREWS, P. D. ; CIOSK, R. ; GALOVA, M. ; STARK, M. J. ; MANN, M. ; NASMYTH, K.: Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins. In: *Science* 279 (1998), Nr. 5354, S. 1216–9
- [283] ZARAGOZA, M. V. ; JACOBS, P. A. ; JAMES, R. S. ; ROGAN, P. ; SHERMAN, S. ; HASSOLD, T.: Nondisjunction of human acrocentric chromosomes: studies of 432 trisomic fetuses and liveborns. In: *Hum Genet* 94 (1994), Nr. 4, S. 411–7
- [284] ZHAN, Q. ; BAE, I. ; KASTAN, M. B. ; FORNACE, J.: The p53-dependent gamma-ray response of GADD45. In: *Cancer Res* 54 (1994), Nr. 10, S. 2755–60
- [285] ZHENG, C. J. ; BYERS, B.: Oocyte selection: a new model for the maternal-age dependence of Down syndrome. In: *Hum Genet* 90 (1992), Nr. 1-2, S. 1–6