

## 1. Einleitung

In den vergangenen Jahrzehnten stieg die durchschnittliche Laktationsleistung bei Milchkühen stetig an. Wurden zu Beginn der 70er Jahre noch durchschnittliche Laktationsleistungen von 4500kg erreicht, lagen diese im Kontrolljahr 2003/04 bei über 8000kg pro Kuh (Holstein Schwarzbunte, VIT, 2004). Die beobachteten Leistungssteigerungen sind weitestgehend auf verbesserte Fütterungs- und Haltungsbedingungen sowie ein erhöhtes genetisches Potential zurückzuführen und scheinen mit schlechteren Reproduktionsleistungen und verkürzter Nutzungsdauer der Tiere einherzugehen (LUCY, 2001; SHELDON und DOBSON, 2003). Das durchschnittliche Alter einer Milchkuh liegt derzeit bei 4,8 Jahren und die Trächtigkeitschancen einer Erstbesamung betragen etwa 25%. Eine entgegenschläufig verlaufende Entwicklung von Betreuungsaufwand und einer, mit zunehmender Milchleistung beobachteten Verkürzung der Brunstdauer führte zu einer Verlängerung der Zwischenkalbezeit. Diese lag nach dem Jahresbericht der VIT im Jahr 2004 bei 401 Tagen. Jeder Tag einer über 365 Tage verlängerten Zwischenkalbezeit führt zu wirtschaftlichen Verlusten, durch geringere Milchleistungen pro Kuh und Jahr, einen geringeren Zuchtfortschritt, sowie höhere Remontierungsraten (WIECZOREK et al., 1977). Eine Verkürzung der Zwischenkalbezeit kann nur durch intensive Brunstbeobachtung und eine frühzeitige und verlässliche Trächtigkeitsuntersuchung erreicht werden. Eine Realisierung dessen ist aufgrund der ständig wachsenden Bestandsgrößen und dem zunehmenden Arbeitsaufwand nur durch ein optimiertes Herdenmanagement und den Einsatz biotechnologischer Hilfsmittel zu realisieren.

Verlässliche Trächtigkeitsdiagnosen sind neben der Durchführung einer rektalen oder ultrasonographischen Untersuchung auch durch die Konzentrationsbestimmung verschiedener Steroidhormone in einer Blut- oder Milchprobe möglich. Da die einzelnen Verfahren oft mit einem erheblichen Zeit- und/oder Kostenaufwand verbunden sind, stellt die rektale Untersuchung für viele Betriebe nach wie vor die gängigste Methode der Trächtigkeitsuntersuchung dar.

Im Jahre 1986 wurde beim Rind erstmals ein Glykoprotein plazentalem Ursprungs beschrieben, welches während der Trächtigkeit im Blutserum der Mutter nachweisbar ist. Der Nachweis dieses Glykoproteins, dem "pregnancy-associated glycoprotein"

(PAG), mittels Radioimmunoassay (RIA) stellt eine alternative Möglichkeit der Trächtigkeitsdiagnose ab dem 30. Tag nach der Belegung dar (ZOLI et al., 1992b).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst ein alternatives enzymimmunologisches Verfahren (ELISA) für den Nachweis des PAG etabliert werden, welches verlässliche Messungen ohne die Nachteile der für den RIA erforderlichen radioaktiven Markierung gestattet.

Da die Entnahme einer Blutprobe mit einem größeren Aufwand als die Entnahme einer Milchprobe verbunden ist und auch ein gewisses hygienisches Risiko birgt, sollte nach der Etablierung des Assays geprüft werden, ob und ab wann PAG auch in der Milch nachzuweisen ist und in wie weit dieser Nachweis eine Möglichkeit der Trächtigkeitsdiagnose darstellen kann.

Die Verfügbarkeit eines verlässlichen und kostengünstigen Trächtigkeitstest ab dem 30. Tag beim Rind anhand einer Blut- oder Milchprobe wäre sowohl für milch- als auch fleischerzeugende Betriebe von großem Interesse.

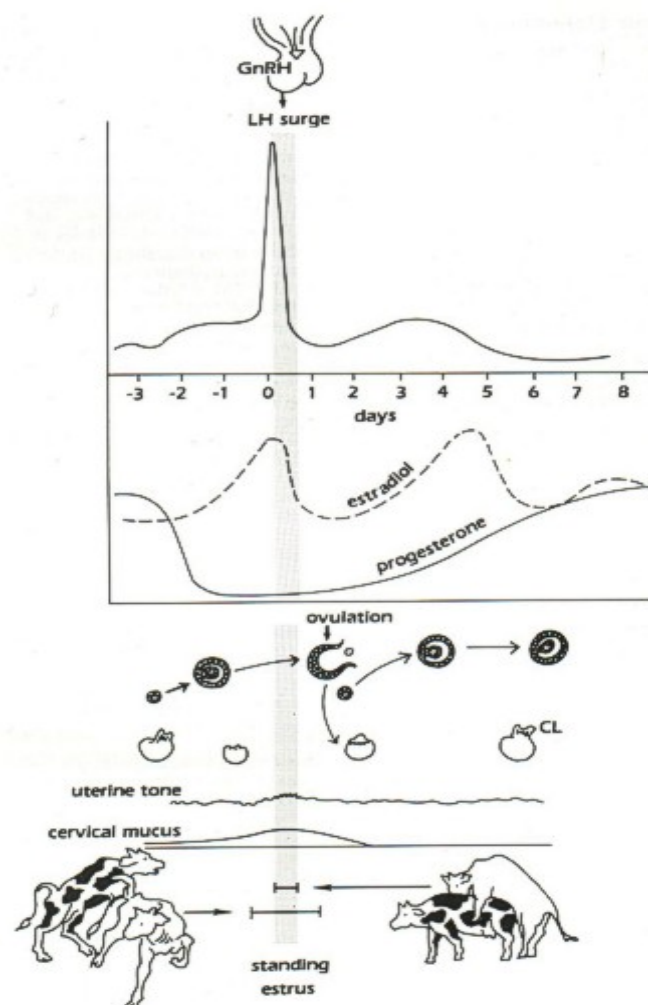
## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Trächtigkeit beim Rind

#### 2.1.1 Brunstzyklus

Unter Einwirkung von FSH und LH setzt beim weiblichen Rind im Alter von 8-11 Monaten die Geschlechtsreife ein. Die am Ovar (ovarieller Zyklus) und am Uterus (uteriner Zyklus) ablaufenden Vorgänge werden als Sexualzyklus oder Brunstzyklus zusammengefasst. Die äußerlich sichtbare Brunst (Östrus), also der wiederkehrende Zustand der Paarungsbereitschaft, ist der erste Tag jedes Brunstzyklus. Die Dauer des Brunstzyklus liegt im Mittel bei 21 (16-30) Tagen, die der Brunst bei 24 (bis 48) Stunden. Der Brunstzyklus wird in 4 Phasen unterteilt: Proöstrus (Vorbrunst), Östrus (Brunst), Metöstrus (Nachbrunst) und Diöstrus oder Interöstrus (Zeit ohne Brunsterscheinungen) und wird maßgeblich von LH und FSH der Adenohypophyse und den Hormonen der Ovarien gesteuert (MICHEL, 1986).

Der Brunstzyklus (Abb. 1) beginnt mit der Ausschüttung des Gonadotropin-Releasing-Hormons (GnRH) vom Hypothalamus. Das GnRH stimuliert die Sekretion des Follikelstimulierenden-Hormons (FSH) und des Luteinisierenden Hormons (LH) der Hypophyse. Auf den



**Abb. 1:** Ablauf des Brunstzyklus mit Follikel- und Gelbkörperentwicklung, sowie Progesteron-, Östradiol- und LH-Verläufen beim Rind (nach HAFEZ und HAFEZ, 2000).

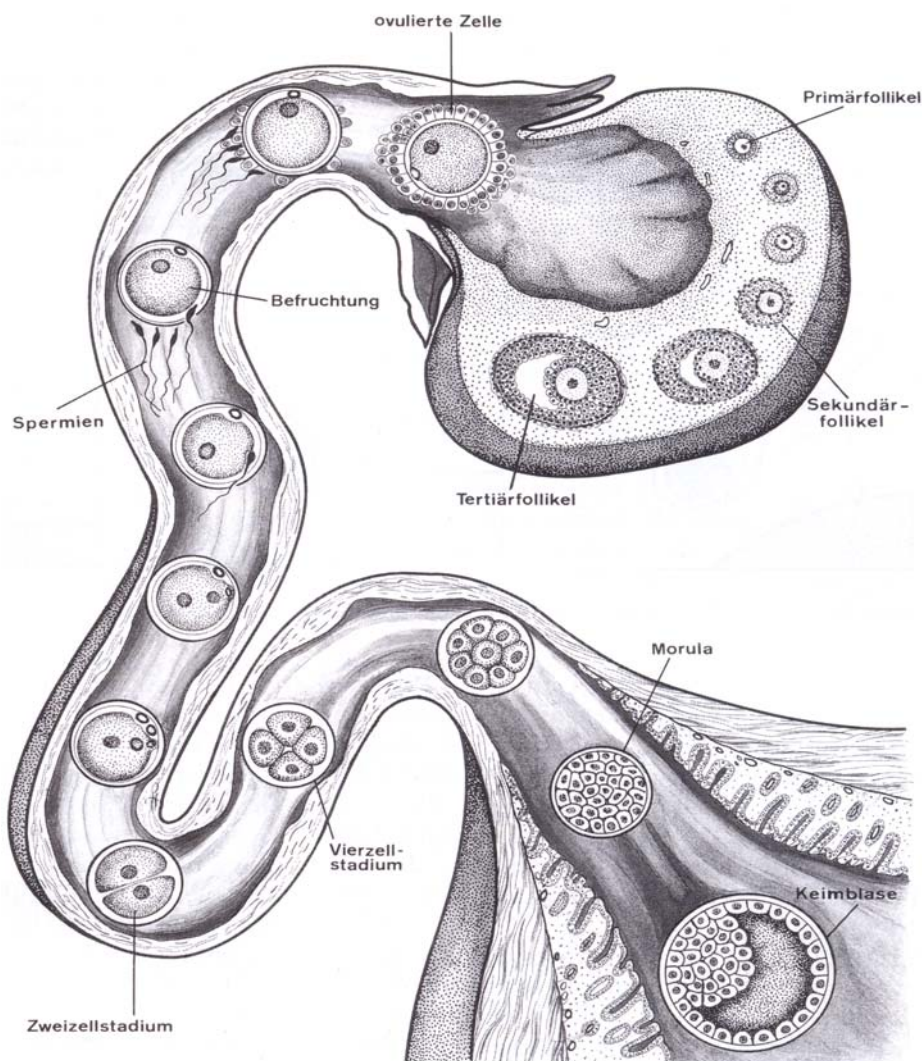
Follikel­epithel­zellen (Granulosazellen) erscheinen FSH- und auf den angrenzenden Zellen des Interstitiums (Theca interna) LH-Rezeptoren. Unter der Wirkung von FSH und LH synthetisieren die Theca interna Östradiol (E<sub>2</sub>) und die Granulosazellen Progesteron und Östradiol.

Während des Proöstrus entwickelt sich unter vermehrtem FSH-Einfluss einer der heranreifenden Follikel auf den Ovarien zum Tertiärfollikel. Die Tertiärfollikel sind Hauptproduktionsort der brunstauslösenden Östrogene. Durch die Ausschüttung des luteinisierenden Hormons (LH) wird schließlich zum Ende der Brunst, bis maximal 14 Stunden nach Brunstende, die Ovulation ausgelöst. Die Granulosazellen des ovulierten Follikels wandeln sich unter LH-Einfluss in Granulosaluteinzellen um. Die Gesamtheit der Granulosaluteinzellen wird als Gelbkörper (Corpus luteum, Cl) bezeichnet. Er ist Hauptproduktionsort des Progesterons. Die Produktion des Progesterons steigt parallel mit der Anbildung des Gelbkörpers an, welcher im Diöstrus seine volle Funktion erreicht. Unter Progesteroneinfluss wird die Uterusschleimhaut auf die Implantation der befruchteten Eizelle vorbereitet und die Ausschüttung von GnRH, LH und FSH unterbunden. Ein neuer Zyklus beginnt mit der erneuten Ausschüttung von GnRH, nachdem das vom Endometrium gebildete Prostaglandin (PGF<sub>2α</sub>) die Rückbildung des Gelbkörpers (Luteolyse) und damit den Abfall der Progesteronkonzentration ausgelöst hat (MICHEL, 1986; BAZER et al., 1993; SCHAMS und BERISHA, 2004).

### 2.1.2 Frühe Embryonalentwicklung und Implantation

Nach der erfolgreichen Verschmelzung von Eizelle und Spermium zur Zygote durchläuft die befruchtete Eizelle mehrere mitotische Teilungen (Furchung), wandert vom Ort der Befruchtung, dem Ovidukt, bis in den Uterus, dem Ort der Implantation (BAZER et al., 1993) und erreicht nach 8-9 Tagen das Stadium der Blastozyste. Der schematische Ablauf der Furchung bis zum Stadium der Blastozyste ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Blastozyste (Keimblase) besteht aus zwei unterschiedlichen Zellgruppen, einer einzelligen äußeren Wand, dem Trophoblast, und einem inneren Zellknoten, dem Embryoblast oder Embryonalknoten. Aus dem Embryoblast entwickelt sich der eigentliche Embryo, aus dem Trophoblast die den Embryo umgebenden Chorionhülle (SCHNORR und KRESSIN, 2001).

Um die Luteolyse des Cl zu verhindern, ohne welches der Erhalt der Trächtigkeit nicht gewährleistet ist, wird zwischen dem 12. und 21. Tag der Trächtigkeit vom Trophoblast ein spezifisches Protein abgegeben, das bovine Interferon- $\tau$  (IFN- $\tau$ ). Interferon- $\tau$  führt unter anderem zu einer Reduzierung der Bildung von Oxytocin- und Östradiolrezeptoren im Uterusepithel und einer vermehrten Bildung eines Prostaglandininhibitors (PGSI). Dadurch wird die pulsatile Ausschüttung von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  aus dem Endometrium, welche zur Luteolyse des Cl und damit zum Abbruch der Trächtigkeit führen würde, unterdrückt (BAZER et al., 1997; DEMMERS et al., 2001).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung von Eizellreifung, Befruchtung und embryonaler Entwicklung bis hin zum Stadium der Blasozyste (nach SCHNORR und KRESSIN, 2001).

Bei Bestehen der Trächtigkeit entwickelt sich das Corpus luteum zum Cl graviditatis und bleibt als Progesteronbildungsort während der gesamten Gravidität bestehen. Das von ihm abgegebene Progesteron bewirkt neben der Transformation

des proliferierten Endometriums und der Reduzierung der Uteruskontraktionen auch das Ausbleiben einer neuen Ovulation durch einen inhibierenden Effekt auf die GnRH bzw. FSH und LH Ausschüttung (THATCHER et al., 1995; HOFFMANN und SCHULER, 2002). Eine detaillierte Beschreibung der Interaktion von Progesteron, Interferon- $\tau$ , plazentalem Laktogen (PL), Wachstumshormonen (GH) und verschiedenen uterinen Rezeptoren für den Erhalt der Trächtigkeit findet sich bei SPENCER und BAZER (2004).

Aus den Zellen des Embryoblast entwickeln sich der Embryo sowie das Amnionepithel, das Entoderm des primären Dottersacks, der Allantois und das Mesoderm für die Eihäute. Aus den kubischen Zellen des Trophoblast entsteht das Chorionepithel (Trophektoderm), das später zusammen mit dem parietalem Blatt des Mesoblasten das den Embryo umhüllende Chorion bildet. Bei beginnender Implantation verbinden sich zweikernige Zellen des Trophoektoderm mit den Epithelzellen des Endometriums zu einem Zellsyncytium (GEISERT und MALAYER, 2000). Dieser Zellverband ist ein wichtiger Produktionsort verschiedenster Substanzen, die in direktem oder indirektem Zusammenhang mit dem Entstehen und dem Erhalt der Trächtigkeit stehen. Zu ihnen gehören unter anderem plazentales Laktogen (DUELLO et al., 1986), Progesteron (WOODING et al., 1996), Prostaglandin (REIMERS et al., 1985), sowie eine Reihe von Wachstumshormonen und -faktoren, zahlreiche Proteine und Glykoproteine, unter ihnen auch das PAG (BECKERS et al., 1998).

Der Vorgang der Implantation beginnt beim Rind nicht vor dem 16. Tag nach der Befruchtung. Er wird in Vorkontakt-, Appositions- und Adhäsionsphase unterteilt. Das durch das Progesteron auf die Nidation vorbereitete Endometrium nimmt zunächst Kontakt mit dem Trophoektoderm des Embryo auf, welches mit kleinen Epithelwucherungen, den primären Zotten bedeckt ist. Später heften sich die zottenartigen Ausstülpungen an die Oberfläche des Endometriums. Aus den sekundären Zotten des Chorionepithels mit bindegewebiger Grundlage und Vaskularisation bilden sich in vereinzelt Bereichen die Kotyledonen, die sich ab der 5. Woche der Trächtigkeit mit den Karunkeln der Uterusschleimhaut zu den Plazentomen (80-120 Stück) verbinden. Die Bildung der Plazentome ist zwischen dem 40. und 50. Trächtigkeitstag abgeschlossen. Über sie erfolgt der Stoffaustausch zwischen Fetus und Mutter (GOODWINE, 2004; LEE und DEMAYO, 2004). Nach der vollständigen

Verankerung der Plazenta wachsen die gebildeten Plazentome von anfänglich 6,5 : 3,5 : 2,0cm auf Größen von bis zu 14,0 : 6,5 : 4,5cm an. Zwischen dem 42. und 50. Tag der Trächtigkeit endet mit der Differenzierung der Organe auch die embryonale Entwicklungsphase. Nach der Anlage der Organe wird im allgemeinen vom Fetus gesprochen (MICHEL, 1986).

Im weiteren Verlauf der Trächtigkeit wird die Entwicklung der Frucht durch das Zusammenspiel von plazentales Wachstumshormon (GH), Prolaktin (PRL) und plazentales Laktogen gesteuert (GOODWINE, 2004). Die Vorbereitung auf die Geburt und das Einsetzen der Wehen wird letztendlich durch das Zusammenspiel von Progesteron, Östrogenen und Oxytocin eingeleitet (KINDAHL et al., 2004).

### 2.1.3 Embryonale Mortalität

Schlechte Trächtigkeitsraten lassen sich entweder auf Befruchtungsstörungen oder Trächtigkeitsabbrüche zurückführen. In früheren Studien wurden beim Rind Befruchtungsraten von bis zu 95% angenommen (AYALON, 1978) und eine hohe embryonale bzw. fetale Sterblichkeit als Hauptursache für schlechte Trächtigkeitsraten angesehen. Neuere Untersuchungen zeigten, dass die tatsächlichen Befruchtungsraten bei Milchkühen zwischen 55 und 88% liegen (HUMBLOT, 2001; SANTOS et al, 2004). Von verschiedensten Faktoren, die Einfluss auf die Fruchtbarkeit nehmen können, spielt bei Hochleistungstieren Hitzestress die wichtigste Rolle (HANSEN, 2002). Während Befruchtungsstörungen in der Regel durch das Auftreten einer neuen Brunst nach 21 Tagen erkannt werden, kommt es bei Trächtigkeitsabbrüchen zu einem verzögerten Auftreten der nächsten Brunst. Die Zeit bis zur nächsten Brunst ist abhängig vom Zeitpunkt des Absterbens des Embryo und der Zeit bis zur Regression des Corpus luteus sowie dem Entwicklungsstand der Follikel (KASTELIC et al., 1991, SANTOS et al., 2004).

In Abhängigkeit vom Auftreten der nächsten Brunst, werden Trächtigkeitsabbrüche in frühen oder späten embryonalen Fruchttod ("early" bzw. "late embryonic mortality") unterschieden. Bei Kühen die bis zum 24. Tag nach der Besamung erneut in Brunst kommen wird von einer Befruchtungsstörung oder einem frühen, bei einer Brunst bis zum 42.-50. Tag von einem späten embryonalen Fruchttod ausgegangen. Trächtigkeitsabbrüche nach dem 50. Tag werden als fetale Verluste bezeichnet. Nach dem Auftreten eines embryonalen Fruchttodes werden Fruchtwasser, Embryo und die Fruchthüllen von der Kuh resorbiert. Dieser Vorgang kann bis zu zwei

Monate dauern (AURICH, 1999). Eine mögliche Mumifizierung der Frucht wird ab der 5. Trächtigkeitswoche beschrieben. Das Einsetzen eines neuen Zyklus bleibt in dieser Zeit aus (KASTELIC und GINTHER, 1989; AURICH 1999).

SANTOS et al. (2004) geben einen Übersicht über verschiedene Studien und zeigten, dass die durchschnittlichen Trächtigkeitsraten am Tag 30 nach der Belegung bei hochleistenden Milchkühen zwischen 35-45% liegen. Der Anteil der tatsächlich abkalbenden Tiere beläuft sich auf etwa 28%. Die geringsten Trächtigkeitsverluste treten in der fetalen, die höchsten, mit bis zu 60%, in der frühen Embryonalphase auf. Die Häufigkeiten des Auftretens embryonaler Sterblichkeit ist abhängig von verschiedensten Faktoren und unterliegt daher starken Variationen (HUMBLOT, 2001, SANTOS et al., 2004).



## 2.2 Struktur und Funktion des "pregnancy-associated glycoprotein" (PAG)

Nach ZOLI et al. (1991; 1992a) bildet die Plazenta des Rindes schon kurz nach Beginn der Trächtigkeit eine Gruppe spezifischer Proteine. Ein solches Protein ist das von BUTLER et al. (1982) beschriebene "pregnancy-specific protein B" (bPSPB) oder das von BECKERS et al. (1988) beschriebene und von XIE et al. (1994) identifizierte "pregnancy-associated glycoprotein-2" (PAG-2). ZOLI et al. isolierten 1991 nach der von BUTLER et al. (1982) beschriebenen Methode mehrere Varianten eines sauren Glykoproteins aus fetalen Kotyledonen, welche sie zur Gruppe der "pregnancy-associated glycoproteins" (PAG) zusammenfassten, die nach BECKERS et al. (1999) zur Familie der Aspartat-Proteasen zählen. Das zuvor beschriebene bPSPB hat nach LYNCH et al. (1992) einen dem bovinen PAG-1<sub>67</sub> (67kDA) fast identischen Aminosäureaufbau, und wird ebenfalls den PAG zugeschrieben. Aspartat-Proteasen gehören zur Gruppe der sauren proteolytischen Enzyme, sind also am Abbau verschiedener Proteine beteiligt. Sie bestehen aus einer einzelnen gefalteten Polypeptidkette mit angehängten N-Glykanen.

**Tab. 1:** Vergleich der Aminosäuresequenzen repräsentativer PAG und Aspartat-Proteinasen (nach GREEN et al., 1998)

|         | pPEP A | rhPEP | boPAG-1 | ovPAG-1 | boPAG-2 | ovPAG-2 | pPAG-1 | pPAG-2 | ePAG | rPEP F | hCath D |
|---------|--------|-------|---------|---------|---------|---------|--------|--------|------|--------|---------|
| pPEP A  | 100    |       |         |         |         |         |        |        |      |        |         |
| rhPEP   | 86     | 100   |         |         |         |         |        |        |      |        |         |
| boPAG-1 | 48     | 49    | 100     |         |         |         |        |        |      |        |         |
| ovPAG-1 | 48     | 50    | 73      | 100     |         |         |        |        |      |        |         |
| boPAG-2 | 50     | 51    | 58      | 59      | 100     |         |        |        |      |        |         |
| ovPAG-2 | 49     | 49    | 59      | 60      | 65      | 100     |        |        |      |        |         |
| pPAG-1  | 49     | 49    | 49      | 48      | 50      | 53      | 100    |        |      |        |         |
| pPAG-2  | 51     | 52    | 54      | 53      | 57      | 57      | 64     | 100    |      |        |         |
| ePAG    | 56     | 56    | 52      | 53      | 54      | 52      | 54     | 57     | 100  |        |         |
| rPEP F  | 56     | 57    | 51      | 50      | 53      | 58      | 56     | 58     | 69   | 100    |         |
| hCath D | 49     | 46    | 40      | 40      | 40      | 45      | 36     | 40     | 42   | 44     | 100     |

pPEP A: porcines Pepsinogen A; rhPEP: Rhesus Affe Pepsinogen A; boPAG-1: bovine PAG-1; ovPAG-1: ovine PAG-1; boPAG-2: bovine PAG-2; ovPAG-2: ovine PAG-2; pPAG-1: porcines PAG-1; pPAG-2: porcines PAG-2; ePAG: equines PAG; rPEP F: Kaninchen Pepsinogen F; hCath D: humanes Cathepsin D; hCath E: humanes Cathepsin E.