Einleitung

#### 1 Einleitung

Die frühembryonale Mortalität ist die wichtigste Ursache der Trächtigkeitsverluste beim Rind. 80 % der Trächtigkeitsverluste ereignen sich im Zeitraum zwischen dem achten und achtzehnten Tag nach der Befruchtung (Diskin & Sreenan 1980, Peters 1996, Mann & Lamming 1999, Dunne et al. 2000), also während der Zeit der maternalen Erkennung der Trächtigkeit. Mitverantwortlich dafür könnte eine unzureichende Interferon-t (bIFN-τ)-Produktion seitens des Embryos sein, dessen Ausschüttung im erwähnten Zeitraum ihr Maximum erreicht. Interferon-τ, früher als bovines Trophoblast-Protein-1 (bTP-1) bezeichnet, ist das hauptsächlich produzierte Produkt des Trophoblasten eines Rinderembryos. Es verhindert die Ausschüttung des luteolytischen Hormons Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  (PGF<sub>2\alpha</sub>) seitens des Gebärmutterendometriums (Fincher et al. 1986, Vallet et al. 1988, Knickerbocker et al., 1986). Dadurch wird die Rückbildung des Gelbkörpers und der Rückgang dessen Bildung von Progesteron verhindert, wie es gegen Ende des Zyklus ohne entsprechend entwickelten Embryo geschehen würde. Somit bildet das bIFN-τ ein zentrales Element in der embryo-maternalen Kommunikation. Ähnliche Trophoblast IFNs wurden nur bei anderen Wiederkäuern der Ordnung Artyodactyla gefunden (Bazer et al. 1994, Roberts et al. 1992, 1996, Spencer et al. 1996, Thatcher et al. 1997, Demmers et al. 2001).

Die Ausscheidung von bIFN-τ des Embryos ist zwischen dem 16. und 19. Tag der Trächtigkeit maximal, kann aber auch schon zwischen Tag 7 bis 9 nach künstlicher Befruchtung bei in vitro produzierten Embryonen festgestellt werden (entspricht Tag 8 bis 10 der Trächtigkeit mit Brunst am Tag 0) (Kubisch et al. 1998). Die Ausscheidung währt mindestens bis zum Tag 38 der Trächtigkeit (Bazer, 1992).

Ziel dieses Forschungsvorhabens ist es zu prüfen, ob es möglich ist, durch Transfer eines bIFN- $\tau$  codierenden Genkonstruktes in das Zytoplasma einer Eizelle eine zeitweilige Überexpression des bIFN- $\tau$ 's zu erzeugen und letztendlich dadurch die Trächtigkeitsrate zu erhöhen. Die Übertragung des Genkonstruktes soll dabei entweder über Mikroinjektion oder spermienvermittelten Gentransfer (SMGT) erfolgen.

Dazu sollen zuerst Genkonstrukte erzeugt werden, die bIFN-τ und ein Markergen (Neomyinresistenz bzw. grün fluoreszierendes Protein (GFP)) exprimieren. Nach dem Test dieser Genkonstrukte in der Zellkultur soll der Einsatz an in-vitro-produzierten Rinderembryonen erfolgen. Dabei werden die Genkonstrukte entweder in das

Einleitung 2

Zytoplasma von Zygoten injiziert oder zusammen mit Spermien inkubiert, die ihrerseits die DNA während der Fertilisation in die Eizelle tragen. Fragestellungen und Aufgaben in dieser Arbeit sind:

- 1.) Die Erzeugung von Genkonstrukten, mit denen es möglich ist, IFN- $\tau$  in Rinderembryonen zu überexprimieren und diese an der Zellkultur zu testen,
- 2.) die Mikroinjektion der Konstrukte in das Zytoplasma in vitro fertilisierter Zygoten zur Untersuchung der DNA-Degradation w\u00e4hrend der embryonalen Entwicklung und der Expression der Konstrukte und schlie\u00e4lich
- 3.) die Inkubation der Konstrukte zusammen mit Spermien um zu pr
  üfen, wie viel DNA an die Spermien bindet, bzw. von den Spermien aufgenommen wird, welche Konstruktmenge bei der Fertilisation mit in die Eizelle getragen wird und schließlich, ob diese Konstrukte von den Embryonen nach SMGT exprimiert werden.

#### 2 Literaturübersicht

## 2.1 Maternale Erkennung der Trächtigkeit

# 2.1.1 Trächtigkeitsverluste

In der Milchviehhaltung stellen Trächtigkeitsverluste einen großen finanziellen Verlust dar. In Großbritannien werden die jährlichen finanziellen Verluste auf 250 Millionen britische Pfund und in den USA auf 1,4 Milliarden US-Dollar geschätzt (Peters 1996). Weltweit wird ein jährlicher Verlust von 1,3 Billionen US-Dollar durch embryonale Sterblichkeit beim Rind (Bos taurus und Bos indicus) angenommen (FAO, 1994). Die Kosten durch embryonale Sterblichkeit setzen sich zusammen aus den Kosten für mehrmalige Besamungen, längere durchschnittliche Güstzeit in der Herde und die höhere Anzahl von Abgängen wegen Unfruchtbarkeit, verbunden mit einer geringeren Anzahl von geborenen Kälbern. Gegenwärtige Schätzungen besagen, dass nach einer einzigen Besamung nur 50 % der besamten Kühe abkalben. Das bedeutet, dass es sich bei den anderen 50 % größtenteils um Trächtigkeitsverluste handelt (Mann & Lamming 1999). Die Fruchtbarkeit bei Milchkühen zeigt jedoch einen stetigen, wenn auch langsamen Abwärtstrend. In den USA wird angenommen, dass die Trächtigkeitsrate bei Milchkühen alle 2,5 Jahre um 1 % abnimmt. Als Gründe dafür werden sowohl die Zunahme der Milchleistung als auch das Wachstum der Herdengrößen, welches eine akkurate Brunsterkennung erschwert, angegeben (Wathes et al. 1998). Die Ausmaße und Zeitspanne dieser Verluste wurden von Diskin & Sreenan (1980), Sreenan & Diskin (1986) und von Peters (1996) beschrieben. Nach diesen Berichten beläuft sich die Befruchtungsrate nach einer Besamung auf ca. 90 %. Also verlaufen 10 % der Besamungen, womöglich sogar mehr, nicht erfolgreich. Die wahrscheinlichste Ursache dafür ist, dass die Besamungen nicht zum zeitgerechten Punkt ausgeführt werden. Dieser Wert wurde in Untersuchungen unter kontrollierten Bedingungen ermittelt, wo eine Brunstbeobachtung gewährleistet und Tiere mit abnormalen Geschlechtsorganen aussortiert werden konnten. Es ist also wahrscheinlich, dass die Befruchtungsrate auf den Produktionsbetrieben geringer ausfällt. Die weitere Entwicklungsrate fällt bis zum Tag 13 durch ausbleibende embryonale Entwicklung auf

ca. 80 % ab. Bis zum Tag 19 beläuft sich dieses Maß nur noch auf 60 % bis 65 %. Man geht davon aus, dass diese Verluste auf das Ausbleiben des embryonalen Signals zurückzuführen sind, das die Rückbildung des Gelbkörpers verhindert. So ergibt sich eine Mortalitätsrate von 25 % bis 30 % innerhalb der ersten drei Wochen der embryonalen Entwicklung. Spätere Trächtigkeitsverluste (< d42) und Aborte (> d42) belaufen sich auf 10 % bis 15 %, sodass daraus eine Kalberate von 50 % resultiert (Mann & Lamming 1999).

#### 2.1.2 Embryonales Signal

## 2.1.2.1 Identifikation des embryonalen Signals

Die Erhaltung der Trächtigkeit hängt davon ab, ob der Embryo in der Lage ist, die Lebensspanne des Gelbkörpers zu verlängern. Beim Schaf wurde von Martal et al. (1979) "Trophoblastin" als ein antiluteolytisches Protein beschrieben, welches aus homogenisierten Schafembryonen gewonnen wurde. Es wurde später unter der Bezeichnung ovines Trophoblast Protein-1 (oTP-1) bekannt. Northey & French (1980) konnten nachweisen, dass sich die Entfernung des Embryos aus der Gebärmutter am Tag 15 nicht verzögernd auf die Zykluslänge auswirkt, während dessen nach der Entfernung am Tag 17 eine signifikante Verzögerung der Luteolyse auftritt. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass sich eine Infusion von Homogenaten aus 17-18 Tage alten Embryonen zum entsprechenden Zeitpunkt ebenfalls verzögernd auf die Luteolyse auswirkt. So konnte nachgewiesen werden, dass der Embryo zwischen Tag 15 und 17 der Trächtigkeit einen antiluteolytisch wirkenden Faktor abgibt. Das analoge bovine Trophoblast Protein-1 (bTP1) wurde als Sekret des bovinen Embryos beschrieben (Thatcher et al. 1989). Es zeigte ebenso antiluteolytische Eigenschaften und besaß die Fähigkeit, die pulsatile Produktion von PGF<sub>2 $\alpha$ </sub> zu blockieren (Knickerbocker et al. 1986, Helmer et al. 1989).

Bei Untersuchungen, in denen rekombinantes bovines Interferon  $\alpha$  injiziert wurde, welches zu 50 % Übereinstimmung in der Aminosäurensequenz zu IFN- $\tau$  besitzt, konnte eine Verlängerung des Zyklus beim Rind nachgewiesen werden. Jedoch traten schädigende Nebenwirkungen wie Fieber, Verringerung der Progesteronkonzentration

und eine geringere Konzeptionsrate auf (Plante et al. 1989, 1991, Barros et al. 1992). Bei Untersuchungen, in denen jedoch aufgereinigtes IFN- $\tau$  aus 17-18 Tage alten Embryonen oder rekombinantes IFN- $\tau$  intrauterin angewendet wurde, konnte man eine geringere Sekretion von PGF<sub>2 $\alpha$ </sub> und eine verlängerte luteale Phase ohne schädigende Nebenwirkungen feststellen (Meyer et al. 1995, 1995a, 1996).

## 2.1.2.2 Wirkungsweise von IFN-τ

## Mechanismen der PGF<sub>2 $\alpha$ </sub>-Synthese

Zum besseren Verständnis des antiluteolytischen Prozesses während der frühen Trächtigkeit werden zunächst die Mechanismen der PGF<sub>2α</sub>-Sekretion während der lutealen und luteolytischen Phase des Brunstzyklus beschrieben. Die limitierenden Faktoren in der PGF<sub>2α</sub>-Synthese sind zum einen die Verfügbarkeit der PGF<sub>2α</sub>-Vorstufe Arachidonsäure (AA) und die Geschwindigkeit der PGF<sub>2α</sub>-Umsetzung durch das Enzym Prostaglandinendoperoxid-H-Synthase (PGS) (Thatcher et al. 1997). Letztere wird auch als Cyclooxygenase (COX) bezeichnet, welche sowohl in einer konstitutiven Form (COX-1) als auch in einer induzierbaren Form (COX-2) vorliegt (McCracken et al. 1999). Nach 12-tägiger Einwirkung von Progesteron auf das Endometrium folgen sowohl bei zyklischen als auch trächtigen Tieren kurze pulsartige Ausschüttungen von PGF<sub>2α</sub> mit geringer Amplitude. Im späteren Verlauf nimmt die Amplitude der PGF<sub>2α</sub>-Schübe bei zyklischen Tieren zu. Dieses geschieht durch die zunächst geringe aber sich im späteren Verlauf steigernde Ausbildung des Oxytocin Rezeptors (Mann et al. 1999). Oxytocin wird während der frühen Trächtigkeit ebenfalls vom Gelbkörper ausgeschüttet (Thatcher et al. 1997, Demmers et al. 2001). Bindet Oxytocin (OT) an den Rezeptor (OTR), dieser Phospholipase C (PLC), aktiviert welche Phosphatidylinositolbisphosphat (PI) aus der Zellmembran zu den Botenstoffen Inositol Triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. IP<sub>3</sub> setzt Calcium Vorräte aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) in der Zelle frei und DAG aktiviert die Protein Kinase C (PKC). PKC aktiviert ihrerseits Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) über den Mitogenaktivierten Protein-Kinase Signalweg (MAPK) welcher die Proteine Raf-1, MEK-1 und ERK-1/2 beinhaltet. Das dabei entstehende Protein ERK-1/2 aktiviert im Zellkern die

Expression der Gene c-jun und c-fos, welche die Transkription des COX-2 Gens fördern (Pru et al. 2001a). PLA<sub>2</sub> wandelt, stimuliert von Calciumionen, Membran-Phospholipide in Arachidonsäure (AA) um. Arachidonsäure wird dann schließlich vom Enzym Cyclooxygenase-2 (COX-2) in PGH<sub>2</sub> umgewandelt. Dieser Schritt wird durch das Vorhandensein von Linoleinsäure (LA) negativ beeinflusst, da LA mit AA um die aktive Bindungsstelle von COX-2 konkurriert (Thatcher et al. 1997, Binelli et al. 2001, Xiao et al. 1999).  $PGF_{2\alpha}$ -Synthase (PGFS) wandelt schließlich  $PGH_2$  in  $PGF_{2\alpha}$  um, welches dann in den Blutkreislauf entlassen wird (Binelli et al. 2000). Das luteolytische Signal ist um so stärker, je geringer die Progesteronkonzentration während der lutealen Phase ist (Mann & Lamming 1995).

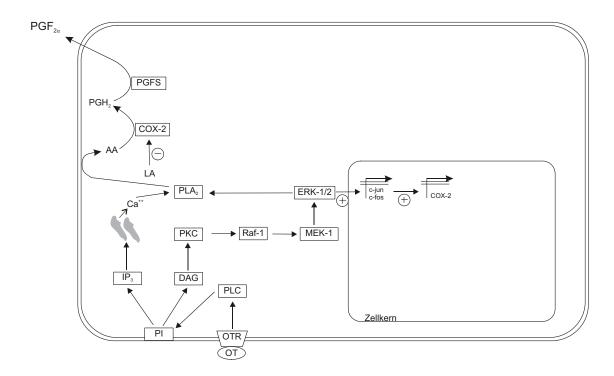


Abb. 1: Schematische Darstellung der  $PGF_{2\alpha}$  Synthese in Zellen des Endometriums. (Erläuterung und Abkürzungen im Text, modifiziert nach Thatcher et al. 1997)