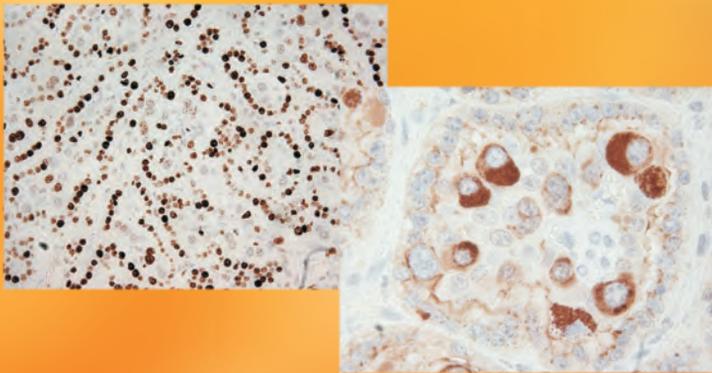


Untersuchungen zu Störungen von Wachstum  
und Differenzierung der Plazentome beim  
Large Offspring Syndrome des Rindes

MAIKE NAUMANN



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin  
Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tier-  
ärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Betreuer: Apl. Prof. Dr. Gerhard Schuler**

# **Untersuchungen zu Störungen von Wachstum und Differenzierung der Plazentome beim Large Offspring Syndrome des Rindes**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Maike Naumann, geb. Gruhn**  
Tierärztin aus Riedstadt-Leeheim

Gießen 2010

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Apl. Prof. Dr. G. Schuler  
Prof. Dr. R. Brehm

Tag der Disputation: 07.07.2010

**Gefördert durch die H. Wilhelm Schaumann Stiftung**

Mama und Papa gewidmet

Träume sind dazu da, verwirklicht zu werden.

In Gedenken an Oma Greta und Opa Willi,  
Kurt Naumann und meinen treuen Gefährten Bob

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Maïke Naumann, geb. Gruhn

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	9
2.	Literaturübersicht	10
2.1	Morphologie der Rinderplazenta	10
2.1.1	Makroskopischer Aufbau der Rinderplazenta	10
2.1.2	Mikroskopischer Aufbau der Rinderplazenta	11
2.2	Zelldynamik	14
2.2.1	Proliferation	14
2.2.1.1	Ki67-Antigen	15
2.2.2	Apoptose	16
2.2.2.1	Caspasen	18
2.2.3	Zelldynamik in der Rinderplazenta	19
2.3	Plazentare Steroide beim Rind	20
2.4	Die Rezeptor-Tyrosinkinase ErbB3	21
2.5	Estrogen-Receptor-Related Receptor 2 (ERR2)	23
2.6	Östrogenrezeptoren	24
2.7	Die Prolaktin-/Wachstumshormon-Familie und ihre Rezeptoren	26
2.8	Large Offspring Syndrome (LOS)	28
2.9	LOS-assoziierte Plazentaveränderungen beim Rind	31
3.	Material und Methoden	33
3.1	Erzeugung der Trächtigkeiten mittels in vitro produzierter Embryonen (IVP) bzw. Embryotransfer nach Superovulation (Multiple Ovulation Embryo Transfer, MOET) und Probengewinnung	33
3.2	Ergänzende Untersuchungen an bereits vorhandenem Probenmaterial aus anderen Versuchen	35
3.3	Hormonanalytische Verfahren	36
3.3.1	Bestimmung von freien und konjugierten Gesamtöstrogenen in Amnion- und Allantoisflüssigkeit	36
3.3.1.1	Extraktion und Aufbereitung der Proben	36
3.3.1.2	Radioimmunologische Messung	36
3.3.1.3	Qualitätskontrollen	37
3.3.2	Bestimmung von Progesteron in Amnion- und Allantoisflüssigkeit	38
3.3.2.1	Extraktion und Aufbereitung der Proben	38
3.3.2.2	Radioimmunologische Messung	38
3.3.2.3	Qualitätskontrollen	38
3.4	RNA-Isolierung aus Plazentomen	39
3.4.1	Vorbereitungen	39
3.4.2	Durchführung	39
3.4.3	Messung der RNA-Konzentration	40
3.5	Konventionelle RT-PCR	40
3.5.1	Anwendungsbereiche	40
3.5.2	Durchführung der RT-PCR	41
3.5.2.1	DNase-Behandlung	41
3.5.2.2	Reverse Transkription (RT)	42
3.5.2.3	Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
3.5.3	Analyse der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese	45

3.6	Messung Zielgen-spezifischer mRNA in den Plazentomen mittels Real-Time RT-PCR (TaqMan-Methode)	47
3.6.1	Grundprinzip der Real-Time RT-PCR (TaqMan-Methode)	47
3.6.2	Durchführung der Real-Time RT-PCR	49
3.6.3	Auswertung der Real-Time RT-PCR	52
3.7	Immunhistologische Untersuchungen	54
3.7.1	Erfassung der Zellproliferation in den Plazentomen durch die immunhistochemische Darstellung des Ki67-Antigens	54
3.7.2	Erfassung der Apoptose in den Plazentomen durch die immunhistochemische Darstellung der aktivierten Caspase 3	56
3.7.3	Immunhistochemischer Nachweis des Wachstumshormon-Rezeptors (GHR)	56
3.8	Quantitative Erfassung verschiedener Trophoblastzelltypen nach Lektin-Histochemie	58
3.8.1	Färbeprotokoll	58
3.8.2	Auswertung der lektingefärbten Gewebeschnitte	59
3.9	Statistische Auswertungen	60
3.10	Alphabetische Liste der verwendeten Puffer, Lösungen, Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	61
3.10.1	Puffer und Lösungen	61
3.10.2	Reagenzien	64
3.10.3	Verbrauchsmaterialien	66
3.10.4	Geräte	66
4.	Ergebnisse	68
4.1	Ergebnisse der Untersuchungen zu Störungen von Wachstum und Differenzierung der Plazentome beim Large Offspring Syndrome des Rindes	68
4.1.1	Angaben zu den IVP- bzw. MOET-Trächtigkeiten sowie den resultierenden Feten	68
4.1.2	Hormonkonzentrationen in den Fruchtwässern	70
4.1.3	Verteilung der Trophoblastzelltypen	71
4.1.4	Zelldynamik in den Plazentomen	73
4.1.5	Expression Wachstums- und Differenzierungs-relevanter Gene in den Plazentomen	76
4.2	Ergebnisse der Untersuchungen zur Expression wachstums- und differenzierungsrelevanter Gene in Rinderplazentomen im Verlauf der normalen Gravidität	78
4.2.1	Expression von ErbB3 in den Rinderplazentomen im Verlauf der normalen Gravidität	78
4.2.2	Expression des Estrogen-related Receptor 2 (ERR2) in den Rinderplazentomen im Verlauf der normalen Gravidität	80
4.2.3	Expression des Wachstumshormonrezeptors (GHR) in den Rinderplazentomen im Verlauf der normalen Gravidität	81
4.2.4	Expression des Prolaktinrezeptors in den Rinderplazentomen im Verlauf der normalen Gravidität	85
4.2.5	Expression von plazentarem Laktogen (bPL) in den Rinderplazentomen im Verlauf der normalen Gravidität	87

5.	Diskussion	89
5.1	Diskussion des Tierexperiments	89
5.2	Diskussion der Ergebnisse zu Wachstum und Differenzierung der Plazentome	91
6.	Zusammenfassung	99
7.	Summary	103
8.	Literaturverzeichnis	106
9.	Abkürzungsverzeichnis	118
10.	Anhang: Dokumentation von Ergebnissen aus der konventionellen RT-PCR	121
11.	Danksagungen	123

## 1. Einleitung

Beim Rind wird als Folge der Anwendung verschiedener biotechnischer Verfahren, wie z. B. der in vitro-Produktion von Embryonen (IVP) oder des somatischen Klonens, bei den resultierenden Graviditäten gehäuft ein Syndrom verschiedener fetaler Anomalien beobachtet. Als besonders auffälliger Bestandteil dieses Syndroms kann ein zum Teil erheblicher fetaler Überwuchs auftreten. Daher wurde es Large Offspring Syndrome (LOS; synonym: Large Calf Syndrome) genannt (Bertolini und Anderson 2002; Drost 2007).

Die genaue Pathogenese des LOS ist noch weitestgehend unklar. Bisherige Untersuchungen lassen jedoch erkennen, dass es offensichtlich auf einer Störung epigenetischer Mechanismen während der Reprogrammierung des Genoms in der frühen embryonalen Phase beruht. Die zum LOS durchgeführten Untersuchungen konzentrierten sich zunächst auf die Blastozyste bzw. auf den Fetus.

Zu den beim LOS ebenfalls beobachteten Alterationen der Plazenta sowie deren mögliche Bedeutung für die Entstehung des fetalen Überwuchses und weiterer fetaler Anomalien liegen bisher vergleichsweise wenige Informationen vor. Aufgrund ihrer Bedeutung in der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Fetus sowie als Quelle zahlreicher Wachstum und Differenzierung regulierender Faktoren, könnte jedoch auch die Plazenta an der Entstehung des Überwuchses und weiterer fetaler LOS-assoziiierter Anomalitäten beteiligt sein (Constant et al. 2006).

Gegenstand dieser Arbeit waren daher vergleichende Untersuchungen an Rinderplazentomen von Graviditäten mit bzw. ohne LOS-assoziiertem fetalem Überwuchs. Die für die Untersuchungen ausgewählten Parameter waren solche, für die eine Bedeutung oder ein Zusammenhang mit Wachstum und Differenzierung der Rinderplazenta bekannt bzw. wahrscheinlich ist.

Weiterhin wurden mit den im Rahmen dieser Arbeit etablierten Methoden für einen Teil der erfassten Parameter Profile im Verlauf der normalen Gravidität erstellt, sofern dazu bisher in der Rinderplazenta keine detaillierten Informationen vorlagen.

## **2. Literaturübersicht**

### **2.1 Morphologie der Rinderplazenta**

#### **2.1.1 Makroskopischer Aufbau der Rinderplazenta**

Bei der Plazenta des Rindes handelt es sich um den Typ einer Plazenta *adeciduata*, da sich Chorion und Uterusepithel beim Abgang der Nachgeburt ohne nennenswerte Verluste an maternalem Gewebe trennen. Gemäß der Verteilung der Zotten auf der Chorionoberfläche spricht man von einer Plazenta *multiplex s. cotyledonaria* (Strahl 1912).

Mit Beginn des embryomaternalen Kontaktes ab dem 16./17. Trächtigkeitstag setzt auch eine rasche Größenzunahme der Frucht ein, die dadurch gekennzeichnet ist, dass die sich ausbildenden Fruchthüllen weit in beide Uterushörner erstrecken (Zietschmann und Krölling 1955). Ab dem 27. Trächtigkeitstag hat nahezu die gesamte Oberfläche der Frucht Kontakt mit dem maternalem Epithel (Leiser 1975).

Die drüsenfreien Bezirke der Uterusschleimhaut werden als Karunkeln bezeichnet (Zietschmann und Krölling 1955). Die Karunkeln werden schon in der Fetalphase angelegt (Atkinson et al. 1984). Anzahl und Anordnung der Karunkelanlagen sind bei den Wiederkäuern speziesspezifisch (Mossmann 1987). Beim Rind sind normalerweise in jedem Uterushorn vier Reihen mit je ca. 10-15 Karunkelanlagen vorhanden. Nach Anlagerung des Chorions an das Endometrium entstehen in den Bereichen des Chorions, welche die Karunkelanlagen überlagern, sogenannte „milky patches“ aus denen letztendlich der fetale Anteil des Plazentoms, die Kotyledone entsteht. Das Plazentom stellt die funktionale Einheit von maternalem (Karunkel) und fetalem (Kotyledone) Teil der Plazenta dar (Übersicht siehe bei Zietschmann und Krölling 1955). Von den „milky patches“ ausgehend wachsen sukzessiv Zotten in das Kryptensystem der sich entwickelnden Karunkelanlage ein (Björkman 1954; Hradecky et al. 1988; Rüsse und Grunert 1993).

Ab dem 100. Graviditätstag haben die Plazentome weitestgehend ihre endgültige Gestalt erreicht; sie sind deutlich konvex, pilz- oder knopfartig (Grosser 1927), wobei im weiteren Verlauf der Gravidität jedoch noch ein Größenwachstum stattfindet, die anfangs flachen Plazentome nehmen bis um das 10fache zu (s. Kap. 2.2.3).

Bei der Größenzunahme der Plazentome kommt es an deren basalen Bereich zu einer Einschnürung, es entsteht der Karunkelstiel, der beim Rind ca. 2-3 cm lang und von drüsenloser Schleimhaut überzogen ist. Dieser enthält größere zu- und abführende Gefäße.

Die Größe eines Plazentoms ist von seiner Lokalisation abhängig. Die größten Plazentome findet man nahe des Fetus. In Richtung Uterushörner und Corpus uteri bleiben sie kleiner (Zietschmann und Krölling 1955; Schnorr und Kressin 2006).

### **2.1.2 Mikroskopischer Aufbau der Rinderplazenta**

Bei voll entwickelten Plazentomen des Rindes überzieht die Chorionplatte die Karunkeloberfläche kappenartig. Von dieser senken sich komplex verzweigte Chorionzotten tief in die Karunkelkrypten ein. Man spricht hier von Primär-, Sekundär- und Tertiärzotten. Zwischen diesen Zotten sind karunkuläre Septen – komplementär zu den Zotten verzweigt – entstanden (Björkmann 1954; Rüsse und Grunert 1993; Leiser und Kaufmann 1994).

Gegen Ende der Gravidität präsentieren sich in den Plazentomen dendritisch verästelte fetale Zottenbüschel, welche das mütterliche Septengewebe bis nahe an seine schalenförmige Basis durchdringen. Die Septen reichen ihrerseits bis an die Zottenbasis. Somit entsteht eine große Oberfläche für den sich hier vollziehenden Stoffaustausch (Hradecky et al. 1988; Rüsse und Grunert 1993; Leiser et al. 1997).

In den Rinderplazentomen lassen sich neben den Zellen der maternalen und fetalen Gefäßsysteme im Wesentlichen vier Zelltypen unterscheiden: die Chorionepithelzellen (Trophoblastzellen), die Stromazellen der Chorionzotten, die Karunkelepithelzellen und die Karunkelstromazellen.

Das Chorionepithel, auch Trophoblast genannt, stellt in der Plazenta die entscheidende Austauschbarriere zwischen Fetus und Mutter dar.

Beim Rind ist das Chorionepithel einschichtig und besteht aus zwei Zelltypen (Wimsatt 1951; Björkmann 1968, 1969; Leiser 1975):

1. den einkernigen Trophoblastzellen (uninucleate trophoblast cells, UTCs) und
2. den Trophoblastriesenzellen (trophoblast giant cells, TGCs; binuclear cells, BNCs) sowie deren Vorstufen.

Die einkernigen Trophoblastzellen haben Kontakt zum maternalen Epithel und sind kubisch bis hochprismatisch. Grenzen sie an TGCs, sind sie vielgestaltig verformt (Björkmann 1954; Leiser 1975). Da sie einen ausgeprägten Mikrovillisaum besitzen,

schreibt man ihnen überwiegend resorptive Fähigkeiten zu. Aber auch endokrine Funktionen wurden nachgewiesen (Gross und Williams 1988; Matamoros et al. 1994; Schuler et al. 2006a, 2006b).

Trophoblastriesenzellen kommen in vielen endothelio- und haemochorialen Plazenten vor (Hoffman und Wooding 1993; Zybina und Zybina 1996). Es handelt sich hierbei um polyploide Zellen, das heisst, deren DNA-Gehalt ist größer als derjenige, welcher dem diploiden Chromosomensatz entspricht.

Beim Rind sind die Kerne unreifer TGC kugelförmig. In reifen TGC sind sie eher ovoid. Sie haben eine deutliche Kernmembran und ein ausgeprägtes Heterochromatin, das in zahlreichen Klümpchen angeordnet ist. Klisch et al. (1999) konnten in der Mehrzahl der TGC-Kerne einen DNA-Gehalt von 8C nachweisen und widerlegten somit die These von Hoffman und Wooding (1993), es handle sich um diploide Kerne. In einigen TGC-Kernen fanden sie sogar DNA-Gehalte von bis zu 32C. Es wird vermutet, dass TGC aus einkernigen Trophoblastzellen durch eine Abfolge von zwei azytokinetischen Mitosen entstehen, denen eine S-Phase ohne anschließende Mitose folgt (Klisch et al. 1999). Nach Ansicht von Wooding und Flint (1994) kann sich jede uninukleäre Trophoblastzelle zu einer Trophoblastriesenzelle entwickeln. Hinsichtlich ihrer Funktionen weisen sie offensichtlich erhebliche speziesspezifische Unterschiede auf. In den Rinderplazentomen sind Trophoblastriesenzellen schon in sehr frühen Stadien der Plazentation nachweisbar (Leiser 1975; King et al. 1980). Sie weisen eine auffällig polare Struktur auf. Die Kerne liegen etwas oberhalb einer gedachten Äquatorialebene. Dadurch wird das Zytoplasma in einen größeren infranukleären und kleineren supranukleären Bereich unterteilt. Diese Bereiche unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Struktur, Anfärbbarkeit und dem Gehalt an Zellorganellen. Für den infranukleären Bereich sind glykoproteinhaltige Granula charakteristisch, während der supranukleäre Bereich einen hohen Gehalt an Mitochondrien und Golgivesikeln aufweist (Wimsatt 1951).

In der Rinderplazenta fusionieren reife TGC mit Karunkelepithelzellen und bilden so trinukleäre fetomaternale Hybridzellen, welche dann ihre Granula in Richtung der maternalen Basalmembran abgeben (Wooding und Wathes 1980; Wooding 1992). Die Bedeutung der Hybridzellen wird in der gerichteten Abgabe von hochmolekularen, endokrin aktiven Substanzen gesehen, die den TGC entstammen und auf diesem Weg ins maternale Kompartiment abgegeben werden (Wooding 1984, Wango et al. 1990, Wooding et al. 1993). Nach Abgabe der spezifischen Granula

kommt es zu einer raschen Degeneration der trinukleären Hybridzellen (Wooding und Beckers 1987; Hoffman und Wooding 1993; Klisch et al. 1999).

Der Anteil der TGC an der Gesamtzahl der Zellen des Chorionepithels ändert sich beim Rind während der Gravidität kaum. Er beträgt ca. 20-25%. Unter der Geburt wurde ein Absterben bzw. Vitalitätsverlust der TGC beobachtet. Dieser Rückgang des TGC-Anteils an den Trophoblastzellen auf ca. 5% soll für den termingerechten Abgang der Nachgeburt von Bedeutung sein. Der Mechanismus, welcher dem präpartalen Verschwinden bzw. dem Vitalitätsverlust zugrunde liegt, ist noch unklar (Williams et al. 1987; Gross und Williams 1988; Gross et al. 1991).

Komplementär zu den fetalen Zotten bilden sich maternale karunkuläre Krypten aus, welche von einem einschichtigen Epithel ausgekleidet werden. Die Karunkelepithelzellen sind, abgesehen von der Spätphase der Gravidität, kubisch. Auch hier findet man gelegentlich mehrkernige Zellen, die sich in ihrer Morphologie aber eindeutig von den eingewanderten Trophoblastriesenzellen unterscheiden und rein maternalen Ursprungs sind (Björkman 1968, 1969). Gegen Ende der Gravidität kommt es zu einer erheblichen Abflachung des Karunkelepithels, zum Zeitpunkt der Geburt ist es in weiten Bereichen der fetomaternalen Kontaktzone nicht mehr nachweisbar (Woicke et al. 1989). Daher wird die "reife" Plazenta des Rindes auch als Plazenta syndesmochorialis bezeichnet.

## 2.2 Zelldynamik

### 2.2.1 Proliferation

Als Proliferation bezeichnet man die Neubildung von Zellen. Dafür verantwortlich ist die Zellteilung, deren zeitlicher Ablauf, der Zellzyklus, sich in 4 Phasen gliedert: (s. Abb. 1):

1. G<sub>1</sub>-Phase (erste Gap-Phase; Gap = Lücke)
2. S-Phase (Synthese-Phase)
3. G<sub>2</sub>-Phase (zweite Gap-Phase)
4. M-Phase (Mitose-Phase)

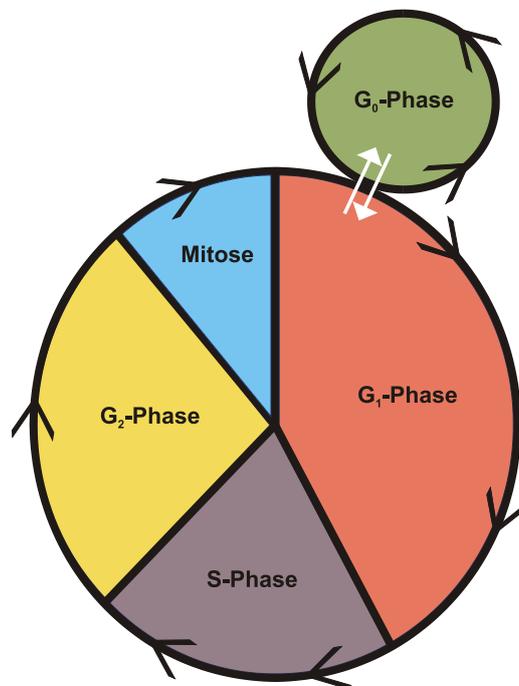


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Zellzyklus  
(modifiziert nach Löffler und Petrides 1998)

Die G<sub>1</sub>-Phase folgt unmittelbar nach einer Mitose (M-Phase). Die diploide Zelle wächst und erbringt Syntheseleistungen, z. B. Membran- und Proteinaufbau. Es folgt die S-Phase, in der die Verdopplung/Replikation der DNA erfolgt. Danach tritt die Zelle in die meist kurze G<sub>2</sub>-Phase ein und bereitet sich auf die nächste M-Phase vor. Die M-Phase ist die kürzeste der 4 Phasen, die letztendlich zur Zellteilung führt. Hierbei werden die Chromosomen in einem komplexen Vorgang auf die Tochterzelle verteilt.

Die Dauer eines Zellzyklus innerhalb einer Zellpopulation ist relativ konstant und beträgt meist 2-4 Tage. G<sub>1</sub>-Phase, S-Phase und G<sub>2</sub>-Phase werden als Interphase, also der Zeitraum zwischen zwei Mitosen, zusammengefasst. Bei den G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Phasen handelt sich um Zwischenphasen, die eine Kontrolle der vorangegangenen Zellzyklusphasen ermöglichen. So wird sichergestellt, dass die einzelnen Phasen korrekt abgelaufen sind und keine Schädigung der genetischen Information vorliegt. In der G<sub>1</sub>-Phase entscheidet die Zelle zudem auch über den Beginn einer weiteren Zellteilung. Der Eintritt in eine erneute Zellteilung ist abhängig von der Anwesenheit mitogener bzw. antiproliferativer Signale. Überwiegen antiproliferative Signale, verlässt die Zelle den Zellzyklus und tritt in einen Ruhezustand ein, die G<sub>0</sub>-Phase. Durch eine mitogene Stimulation ist es einer ruhenden Zelle möglich, erneut in den Zellzyklus einzutreten (Engelhardt und Breves 2000).

Die Übergänge von einer Phase des Zellzyklus in die andere werden durch die Phosphorylierung regulatorischer Faktoren ausgelöst. Die Aktivität der hierzu nötigen Kinasen wird durch Proteine reguliert. Diese werden aufgrund ihres zyklischen Auftretens als Cycline bezeichnet. Da die Kinasen abhängig von den Cyclinen sind, werden sie als Cyclin-abhängige Kinasen (engl. cyclin dependent kinases) bezeichnet (Karlson et al. 1994).

Proliferierende Zellen können anhand ihrer Expression des Ki67-Antigens identifiziert werden.

### **2.2.1.1 Ki67-Antigen**

Ki67-Antigen ist ein Nicht-Histon-Zellkernprotein, welches 1983 entdeckt und genauer charakterisiert wurde (Gerdes et al. 1984). Sein Nachweis ist seit Jahren vor allem in der Humanmedizin in der Tumordiagnostik etabliert (Brown und Gatter 1990; Reszec et al. 2004). Das Protein wurde bei vielen Spezies in gesundem und neoplastischem Gewebe nachgewiesen, unter anderem auch beim Rind (Falini et al. 1989) und wird ausschließlich in den aktiven Phasen des Zellzyklus (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>,

Mitose), nicht jedoch in der Ruhephase ( $G_0$ ) exprimiert (Duchrow et al. 2006). Die Expression beginnt in der Mitte der  $G_1$ -Phase. Der Expressionsspiegel steigt über die S-Phase und  $G_2$ -Phase hin an und erreicht seinen Höhepunkt in der M-Phase (Gerdes et al. 1984; Sasaki et al. 1987). Mit dem Ende der Mitose erfolgt ein rascher Abbau mit einer Halbwertszeit von ca. 60–90 Minuten (Bruno und Darzynkiewicz 1992). Die biologische Funktion des Ki67-Proteins ist noch weitestgehend ungeklärt. In Zellen eingebrachte Antisense-Oligonukleotide (Schlüter et al. 1993) und mikroinjizierte Ki67-Antigen-spezifische Antikörper (Starborg et al. 1996) verlangsamten den Zellzyklus und verringern die Zellproliferation. Dies deutet darauf hin, dass Ki67-Antigen eine wichtige Rolle für die Zellteilung spielt. Neuere Ergebnisse zeigen, dass das Ki67-Protein mit großer Wahrscheinlichkeit in die Transkription und Prozessierung der ribosomalen RNA involviert ist. Auch eine Rolle bei der Steuerung der Aktivität der rRNA-Gene wird nicht ausgeschlossen (Bullwinkel 2006).

### 2.2.2 Apoptose

Man unterscheidet im Wesentlichen zwei Arten des Zelltodes, die Nekrose und die Apoptose.

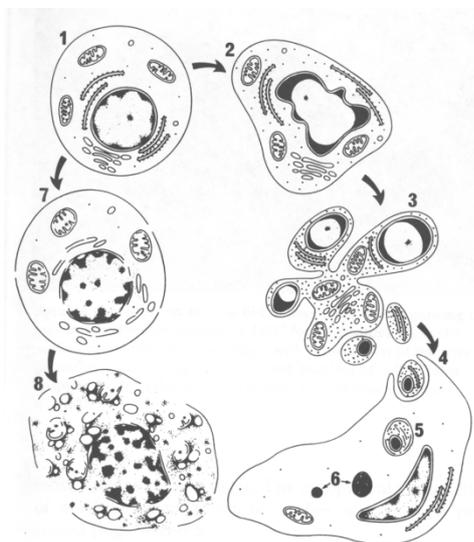
Eine Nekrose wird beispielsweise durch Aktivierung des Komplementsystems, Infarkte oder verschiedene Noxen (z. B. Hypo- oder Hyperthermie, Chemikalien etc.) ausgelöst. Häufig sind ganze Zellverbände betroffen, die nicht mehr in der Lage sind, die Homöostase aufrecht zu erhalten. Es kommt zu unkontrolliertem Eindringen von Wasser und Ionen in die Zelle, welche mitsamt den Zellorganellen anschwillt. Schließlich entleert sich der Zellinhalt in die Umgebung. Dies führt in der Regel zu inflammatorischen Reaktionen und damit häufig zur Schädigung des umgebenden Gewebes (Golstein et al. 1991; Kroemer et al. 1998).

Apoptose und „programmed cell death“ (PCD) werden zwar häufig synonym verwendet, möglicherweise stellt die Apoptose jedoch nur eine von mehreren Formen des PCD dar. Sie ist im Gegensatz zur passiven Nekrose ein aktiver, stringent regulierter Prozess, in dessen Verlauf bestimmte Proteasen, die Caspasen, eine wichtige Rolle spielen. Ihren Namen verdanken die Caspasen ihrer Zugehörigkeit zur Familie der Cysteinproteasen, die die Fähigkeit besitzen, nach der Aminosäure Aspartat eine Schnittstelle zu setzen (cysteinyl aspartate-specific proteinase) (Nicholson 1999; Hu 2003). Aktive Caspasen werden aus inaktiven Vorstufen (Procaspasen) freigesetzt, wobei am Anfang eine sogenannte Initiatorcaspase verschiedene Procaspasen aktiviert, deren aktivierte Formen wiederum weitere

Procaspasen aktivieren (Caspasenkaskade). Am Ende dieser Signalverstärkungskaskade stehen Effektorcaspasen, die verschiedene Substrate spalten und dadurch z. B. Strukturproteine abbauen oder durch Aktivierung von DNAsen den Verdau der DNA bewirken und somit den irreversiblen Zelltod.

Das Programm der Apoptose kann grundsätzlich über zwei verschiedene Wege initiiert werden. Einmal durch extrazelluläre Liganden wie Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und Fas Ligand (FasL oder CD95L), die an sogenannten Todesrezeptoren (TNF-Rezeptor bzw. Fas-Rezeptor) binden, oder aber durch bestimmte intrazelluläre/intrinsische Signale, die spezifische mitochondriale Veränderungen hervorrufen und auf diese Weise zur Aktivierung der Caspasenkaskade führen.

Ist die Apoptose eingeleitet, schrumpft die Zelle durch Zytoplasmaabschnürung („Blebbing“), das Zytoplasma und das Chromatin kondensieren. Im weiteren Verlauf wird der Zellkern fragmentiert (Karyorrhexis) und weitere Vesikel von der Zytoplasmamembran abgeschnürt. Diese so genannten „apoptotischen Körperchen“ werden von Nachbarzellen oder Makrophagen rasch phagozytiert und durch lysosomale Enzyme verdaut (Kerr et al. 1994).



(1) Normale Zelle (2) Die frühe Apoptose ist durch Kondensation des nukleären Chromatins, Kondensation des Zytoplasmas, Ausstülpung der Membranen und Abschnürung von Zytoplasmaanteilen gekennzeichnet. (3) Membranhüllte Cytoplasmanteile und Kernfragmente bilden sog. apoptotische Körper, die (4) von umliegenden Zellen phagozytiert und (5), (6) durch die Lysosomen abgebaut werden. (7) Die Entwicklung der Nekrose geht mit dem Verklumpen des Chromatins einher. Weitere Merkmale sind das Anschwellen der Organellen und Zerreißen der Membranen. (8) Die Membranen lösen sich auf, die Zelle behält aber noch ihre Form, bis sie letztendlich phagozytiert wird.

**Abbildung 2:** Strukturelle Veränderungen während der Apoptose (2-6) und Nekrose (7-8) (nach Kerr et al. 1994).

Die Apoptose stellt unter physiologischen Verhältnissen ein Selbstmordprogramm zur kontrollierten Eliminierung bestimmter Zellen dar, über das alle multizellulären Organismen verfügen. Die Apoptose wird physiologischerweise bei Gewebeumbildungsvorgängen während der fetalen Entwicklung (Haanen und Vermes, 1996), bei der Metamorphose von Insekten und Reptilien, bei altersbedingten Atrophien, in Geweben mit physiologischem Zellumsatz und bei endokrin gesteuerten Atrophien beobachtet. Erhöhte Apoptoseraten treten aber auch bei pathologischen Zuständen wie z. B. Multiple Sklerose, Alzheimersche Demenz, Parkinson-Syndrom, Zelltod nach Infarkten oder HIV-Infektionen (übermäßiges Absterben von T-Helferzellen) auf (Wyllie et al. 1980; Tabibzadeh 1995).

### **2.2.2.1 Caspasen**

Caspasen spielen, wie oben erwähnt, während der Apoptose eine entscheidende Rolle. Der Familie der Caspasen wurden bisher 14 Mitglieder zugeordnet, die je nach Struktur und Funktion in drei Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe besteht aus den Caspasen 1, 4, 5 und 13 und vermittelt Entzündungsreaktionen. Caspasen der Gruppen 2 und 3 spielen eine Rolle bei der Apoptose; zur Gruppe 2 zählen die Caspasen 2, 3 und 7, zur Gruppe 3 die Caspasen 6, 8, 9 und 10.

Caspasen werden als inaktive Procaspasen synthetisiert. Sie bestehen aus einer Prodomäne, einer großen und einer kleinen Untereinheit. Die Procaspasen werden durch andere Caspasen durch Schnitte an spezifischen Aspartatresten aktiviert. Dadurch entstehen aktive Heterotetramere, die aus je zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten bestehen (Wilson et al. 1994; Walker et al. 1994; Rotonda et al. 1996). Aktiviert werden sie durch Abspaltung der Prodomäne an zwei Aspartase-spezifischen Schnittstellen, sodass jeweils zwei große und kleine Untereinheiten die aktive Form bilden. Procaspasen werden von bereits aktiven Caspasen aktiviert (Cohen 1997; Nicholson und Thornberry 1997; Raff 1998). Caspase-3 hat eine Haupt- bzw. Schlüsselrolle und wird schon in frühen Apoptosestadien aktiviert (Faleiro et al. 1997). Daher lassen sich mit dem immunhistologischen Nachweis von aktivierter Caspase-3 in Gewebeschnitten apoptotische Zellen lokalisieren. Sie ist für die teilweise oder vollständige Spaltung vieler Schlüsselenzyme während der Apoptose verantwortlich. Die aktive Caspase-3 ist ein Heterotetramer, bestehend aus zwei 17 kDa und zwei 12 kDa Untereinheiten. Weitere Namen der Caspase-3 sind CPP32, Yama (Todesgott der Hindus) und Apopain (Cohen 1997).

### **2.2.3 Zelldynamik in der Rinderplazenta**

Uterus- und Plazentawachstum sind Voraussetzungen für eine adäquate Bereitstellung von Nährstoffen und Sauerstoff für den Fetus. Beim Rind wachsen die Plazentome während der gesamten Gravidität, wobei ihr Wachstum im Laufe der Graviditätsdauer beträchtlich variiert. Bis zum 200. Trächtigkeitstag steigt das Plazentagewicht annähernd linear, danach erfolgt eine progressive Abnahme des Wachstums (Reynolds et al. 1990). Eine Gewichtszunahme kann prinzipiell durch Zellproliferation oder Hypertrophie der Zellen erreicht werden. Untersuchungen an Plazentomen und interkotyledonärer Plazenta von Wiederkäuern zeigen, dass die Zunahme des Plazentomgewichtes hauptsächlich auf einer Zellproliferation beruht, während die Größenzunahme der interkotyledonären Plazenta weitestgehend durch Hypertrophie erreicht wird. Untersuchungen unter Verwendung von Ki67-Antigen als Proliferationsmarker zeigen, dass in den Plazentomen Proliferation während der gesamten Trächtigkeit in erheblichem Ausmaß nachweisbar ist und sich stärker im maternalen als im fetalen Anteil abspielt. Die höchste Proliferationsrate findet sich im Karunkelepithel. Hier übersteigt die Proliferation die des Trophoblasten deutlich. Im Trophoblasten selbst spiegelt sich neben dem Wachstum die ständige Erneuerung apoptotisch zugrunde gehender TGCs wider (Schuler et al. 2000; Boos et al. 2003). Die überaus hohe, offensichtlich teilweise Wachstums-unabhängige Proliferation im Karunkelepithel deutet, in Verbindung mit der Beobachtung in Richtung des Trophoblasten abschilfernder Karunkelepithelzellen, auf einen hohen Zellumsatz im Karunkelepithel hin. Es wird vermutet, dass dieser hohe Zellumsatz im Karunkelepithel einem permanenten Gewebeumbau dient und zur Ernährung des Fetus durch Bildung einer Histiotrophe beiträgt (Hoffmann und Schuler 2002).

Gegen Ende der Trächtigkeit, um den 260. Tag, verlieren die kubischen Karunkelepithelzellen an Höhe und werden zunehmend flacher. Trotzdem zeigen zahlreiche der abgeflachten Karunkelepithelzellen einen positiven Ki67-Antigennachweis. Daher ist anzunehmen, dass dem Abflachen des Karunkelepipithels eher ein erhöhter Verbrauch an Karunkelepithelzellen als eine verminderte Neubildung zugrunde liegt. Des Weiteren beobachtet man in der unmittelbaren präpartalen Phase eine deutliche Abnahme in der Anzahl und Vitalität der TGCs (Gross et al. 1991).

### 2.3 Plazentare Steroide beim Rind

Wie die Plazenta zahlreicher anderer Spezies produziert auch die Rinderplazenta Progesteron und Östrogene. Die Plazenta des Rindes trägt jedoch nur minimal und temporär zu maternalen Progesteronspiegeln bei. Diese stammen in allen Trächtigkeitsstadien überwiegend aus dem Corpus luteum (Estergreen et al. 1967; Day 1977; Chew et al. 1979; Johnson et al. 1981). Es ist daher unklar, ob beim Rind plazentares Progesteron eine eigenständige Bedeutung besitzt. Immunhistologisch konnten in den Karunkelstromazellen, also in enger Nachbarschaft zu den Progesteron produzierenden Trophoblastzellen, Progesteronrezeptoren nachgewiesen werden (Schuler et al. 1999). Daher ist anzunehmen, dass die Karunkel ein Progesteron-Zielorgan ist und sie eher dem Einfluss des plazentaren als des lutealen Progesterons unterliegt. Möglicherweise dient beim Rind die plazentare Progesteronproduktion der Erzeugung hoher lokaler Konzentrationen, die für den Eintritt bestimmter dosisabhängiger Wirkungen erforderlich sein könnten (Hoffmann und Schuler 2002).

Erhöhte Östrogenspiegel plazentaren Ursprungs sind im peripheren maternalen Blut ca. ab dem 110. Trächtigkeitstag nachweisbar, wobei es sich in erster Linie um Estronsulfat handelt. Estronsulfat steigt bis ca. Tag 150 der Gravidität auf Werte um 5 nmol/l an und danach bis zum etwa 230. Trächtigkeitstag nur noch geringfügig. Danach erfolgt ein weiterer deutlicher Anstieg auf Werte zwischen 15-30 nmol/l in den letzten drei Trächtigkeitswochen. Die Konzentrationen an freiem Estron zeigen zunächst einen ähnlichen Verlauf, jedoch auf erheblich niedrigerem Niveau. Erst in den letzten drei Wochen vor der Geburt zeigt sich ein deutlicher Unterschied im Verlauf zwischen freiem und konjugiertem Estron. Während Estronsulfat bis ca. drei Tage vor der Geburt auf einem gleich bleibend hohen Niveau verläuft, steigt Estron in diesem Zeitraum kontinuierlich an und erreicht einen Peak um 6-12 nmol/l in den letzten drei Tagen vor der Geburt (Hoffmann et al. 1997). Die biologische Bedeutung der plazentaren Östrogene beim Rind ist immer noch weitestgehend unklar. Die hohen präpartalen Konzentrationen freier Östrogene werden mit der Geburtsvorbereitung in Verbindung gebracht. Rexha und Grunert (1993) konnten positive Korrelationen zwischen dem Auftreten von Geburtsanzeichen (Vulvaödem, Erschlaffung der breiten Beckenbänder etc.) und den maternalen Konzentrationen an Gesamtöstrogenen nachweisen. Die plazentaren Östrogene sind jedoch lokal, z. B. in den Fruchtwässern, bereits im zweiten Trächtigkeitsmonat nachweisbar (Eley et al.

1979). Den bereits in frühen und mittleren Trächtigkeitsstadien auftretenden plazentaren Östrogenen konnte immer noch keine eindeutige Funktion zugeordnet werden. Der Nachweis von Östrogenrezeptoren in den Plazentomen deutet aber darauf hin, dass plazentare Östrogene primär möglicherweise als lokale Wachstums- und Differenzierungsfaktoren agieren. Die Aufregulation von Aromatase und Östrogenrezeptor  $\beta$  in den Trophoblastriesenzellen deutet auf eine intrakrine Rolle der plazentaren Östrogene bei der Steuerung der Trophoblastriesenzelldifferenzierung hin. Die deutlichen Beziehungen zwischen lokalen Östrogenkonzentrationen, proliferativer Aktivität und der Expression des Östrogenrezeptors  $\alpha$  in den Karunkeln sprechen dafür, dass dort plazentare Östrogene als parakrine Regelfaktoren von Wachstum, Differenzierung und Funktionen agieren könnten (Schuler et al. 2000, 2002, 2005, 2006a, 2008). Weiterhin ergab sich die Hypothese, dass die plazentaren Östrogene wesentliche Stimulatoren der offensichtlich größtenteils wachstumsunabhängigen, außerordentlich hohen Proliferation im Karunkelepithel sein könnten. Die hierdurch erzeugten "überzähligen" Karunkelepithelzellen könnten nach Apoptose und Abschilfern im Sinne einer holokrinen Sekretion eine erhebliche Nahrungsquelle für den Fetus darstellen (Schuler et al. 2000; Hoffmann und Schuler 2002).

## **2.4 Die Rezeptor-Tyrosinkinase ErbB3**

Die ErbB-Genfamilie zählt zu den Tyrosinkinase-Rezeptoren und besteht aus insgesamt vier Mitgliedern (Citri et al. 2003; Normanno et al. 2005):

- ErbB1 (EGFR, HER-1)
- ErbB2 (Neu, HER-2)
- ErbB3 (HER-3)
- ErbB4 (HER-4)

Zusammen mit ihren Liganden, die der Epidermal Growth Factor (EGF)-Familie angehören, regulieren sie Proliferation und Differenzierung vieler verschiedener Zelltypen (Riese und Stern, 1998). Die EGF-Familie zählt zu den Wachstumsfaktoren und ist u.a. für eine normale Entwicklung in der Embryonalphase essenziell (Hall et al. 2005).

Die EGF-Familie besteht nach Riese und Stern (1998) aus:

Gruppe 1:

- Epidermal Growth Factor (EGF)
- Amphiregulin (AR)
- Transforming Growth Factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ )

Gruppe 2:

- Heparin binding-EGF-like factor (HB-EGF)
- Betacellulin (BTC)
- Epiregulin (EPR)

Gruppe 3:

- Neureguline (NRG-1, NRG-2, NRG-3, NRG-4)

Die Liganden lassen sich in drei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe beinhaltet EGF, Amphiregulin und TGF- $\alpha$ . Diese binden an den ErbB1-Rezeptor. Die zweite Gruppe besteht aus Betacellulin, Heparin binding-EGF und Epiregulin. Diese Liganden binden sowohl an den ErbB1-Rezeptor, als auch an den ErbB4-Rezeptor. Die dritte Gruppe wird durch die Neureguline 1-4 gebildet. Die Neureguline 1 und 2 binden an ErbB3 und ErbB4, während die Neureguline 3 und 4 nur an ErbB4 binden (Casalini et al. 2004).

Die Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären Domäne für die Ligandenbindung, einer einzelnen Transmembran-Domäne und einer zytoplasmatischen Domäne mit enzymatischer Aktivität. Die extrazelluläre Domäne besteht aus vier Subdomänen: die Subdomänen I und III vermitteln die Ligandenbindung, während die cysteinreichen Subdomänen II und IV eine Rolle in der Rezeptordimerisierung spielen (Citri et al. 2003). Die Ausbildung von drei intramolekularen Disulfidbrücken bedingt die typische dreischleifige Sekundärstruktur der Ligandenbindungsdomäne (Salomon et al. 1995). Die zytoplasmatische Domäne besteht aus einer Tyrosinkinasedomäne und verschiedenen Tyrosinresten, die unter Rezeptoraktivierung phosphoryliert werden (Riese und Stern, 1998). Die Bindung eines spezifischen Liganden führt zur Homo- (z. B. ErbB1/ErbB1) oder Heterodimerisierung (z. B. ErbB2/ErbB3) von ErbB-Rezeptoren. In der Folge kommt es zur Tyrosinkinaseaktivierung und zur Phosphorylierung von Tyrosinresten in der zytoplasmatischen Domäne, die als Bindungsstellen von intrazellulären Signalübertragungsmolekülen

dienen. Diese Signalübertragungsmoleküle aktivieren wiederum verschiedene Signalkaskaden. Dazu zählen MAP-Kinase, P13K, Phospholipase-Cy, Proteinkinase C und die Janus-Kinase. Eine Übersicht über die einzelnen Signalkaskaden sowie ein detailliertes Schaubild findet sich bei Citri et al. (2003).

Obwohl alle ErbB-Rezeptoren ähnliche Strukturen aufweisen, unterscheiden sie sich hinsichtlich ihrer Ligandenspezifität und Kinaseaktivität (Klonisch et al. 2001). So besitzt ErbB3 im Vergleich zu den anderen Familienmitgliedern aufgrund einer Punktmutation innerhalb der katalytischen Domäne nur wenig Kinaseaktivität. Daher ist eine Heterodimerisierung Voraussetzung für eine ErbB3-vermittelte Signaltransduktion, da ErbB3 auf Transphosphorylierung durch andere ErbB-Mitglieder angewiesen ist. ErbB2 besitzt die stärkste Kinaseaktivität unter den Mitgliedern und übernimmt bevorzugt die Aufgabe der Heterodimerbildung mit den anderen ErbB-Mitgliedern (Klonisch et al. 2001). Unter allen Heterodimeren unter Beteiligung von ErbB2 ist ErbB2/ErbB3 der potenteste Rezeptor in Bezug auf Proliferation und Transformation (Citri et al. 2003).

Die Liganden für ErbB3 zählen zu den Neuregulinen. Diese spielen z. B. eine elementare Rolle in der Entwicklung des Herzens und des Nervensystems (Carraway 1996). Eine Expression des ErbB3-Rezeptors wurde von Yoshida et al. (1998) sowie von Hall et al. (2005) in der bovinen Blastozyste nachgewiesen. Das weist auf eine Rolle des Rezeptors bei der embryonalen Entwicklung beim Rind hin. Über die Expression von ErbB3 in der Rinderplazenta lagen bisher keine Informationen vor.

## **2.5 Estrogen-Receptor-Related Receptor 2 (ERR2)**

Der Estrogen-Receptor-Related Receptor 2 [Synonyme: Estrogen-related receptor  $\beta$  (ERR $\beta$ ), Estrogen-related receptor 2 (ERR2), nuclear receptor subfamily 3 group B member 2 (NR3B2), Estrogen receptor-like 2 (ESRL2)] gehört zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren (Luo et al. 1997). Nukleäre Rezeptoren sind Transkriptionsfaktoren, die bei der Regulation von Wachstum, Entwicklung und Differenzierung eine wichtige Rolle spielen. Sie fungieren häufig als Ligand-aktivierte Transkriptionsfaktoren (McEwan et al. 1995). Sie lassen sich in drei Hauptgruppen aufteilen. Zu den Typ I-Rezeptoren (Steroidrezeptoren) zählen die klassischen Steroidrezeptoren, z. B. Androgen-, Östrogen- oder Progesteronrezeptoren sowie Glukokortikoid- und Mineralokortikoidrezeptoren. Die Typ II-Rezeptoren beinhalten die nukleären Nicht-Steroidrezeptoren (z. B. Schilddrüsenhormonrezeptor, all-trans-Retinsäure-Rezeptor, 9-cis-Retinsäure-Rezeptor). Die Gruppe der Typ III-Rezeptoren, zu welchen der ERR

zählt, nennt man „Orphan-Receptors“, da für sie kein endogener Ligand existiert oder bisher gefunden wurde (McKenna et al. 1999).

Die ERR-Familie besteht aus drei Mitgliedern, ERR1/ERR $\alpha$ , ERR2/ERR $\beta$ , ERR3/ERR $\gamma$  und ist strukturell eng mit dem Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) verwandt.

ERRs und Östrogenrezeptoren binden an Estrogen-responsive Elements der DNA. ERRs binden jedoch im Gegensatz zu ER keine endogenen Östrogene (Ariazi und Jordan, 2006).

ERR1 wird in Muskel- und Fettgewebe exprimiert, während ERR3 im ZNS zu finden ist. Bei Mäusen wird ERR2 hauptsächlich während der embryonalen Entwicklung in Zellen des extraembryonalen Ektoderms, die das Chorion bilden, exprimiert und spielt in der frühen Plazentation für Proliferation und Differenzierung eine wichtige Rolle. Bei ERR2-Knockout Mäusen trat eine hochgradig gestörte Chorionentwicklung mit einer ausgeprägten Verschiebung des Verhältnisses zwischen diploiden Trophoblastzellen und Trophoblastriesenzellen zugunsten der letzteren auf; Folge war der fetale Fruchttod (Luo et al. 1997). Man hat herausgefunden, dass ERR2 Diethylstilbestrol (DES), ein hochpotentes synthetisches Östrogen, bindet (Tremblay et al. 2001). Natürliche Liganden sind derzeit noch nicht eindeutig identifiziert. Hall et al. (2005) wiesen erstmals ERR2 in der Blastozyste von Rindern nach. Über die Expression von ERR2 in der Rinderplazenta lagen bisher keine Informationen vor.

## 2.6 Östrogenrezeptoren

Die Wirkungen von Östrogenen werden vorwiegend über Rezeptoren vermittelt, die zur großen Superfamilie der nukleären Rezeptoren gehören. Nach Aktivierung durch ihre Liganden binden diese als Hormon-Rezeptor-Dimere an spezifische regulatorische DNA-Abschnitte, die Estrogen-responsive Elements (EREs), und stimulieren oder unterdrücken die Expression abhängiger Zielgene. Beim Menschen, Labornagern und den bisher untersuchten Haussäugetieren wurden zwei Isoformen identifiziert, Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) und Östrogenrezeptor  $\beta$  (ER $\beta$ ). Diese weisen eine große strukturelle Ähnlichkeit auf und der Satz der angesteuerten EREs ist nahezu identisch. Trotzdem sind ihre Gene auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert. Ihre Expressionsmuster sind weitestgehend überlappend, jedoch nicht identisch. Dementsprechend erfüllen sie teilweise redundante, zum erheblichen Teil aber auch eigenständige, teilweise sogar gegensätzliche Funktionen (Hewitt und Korach 2002). Im Hinblick auf die Hypothese, dass die plazentaren Östrogene beim Rind eher als lokale Regulatoren von Wachstum und Differenzierung der Plazentome

denn als Hormone im klassischen Sinn fungieren, wurden von Schuler et al. (2002, 2005) die Expressionsmuster von ER $\alpha$  und ER $\beta$  in den Rinderplazentomen immunhistochemisch charakterisiert. ER $\alpha$  wurde in den Karunkelepithelzellen, Karunkelstromazellen und maternalen Gefäßperizyten lokalisiert. Im fetalen Teil der Plazentome war dagegen keinerlei ER $\alpha$ -Expression nachweisbar. Aufgrund der Korrelation zwischen proliferativer Aktivität (Schuler et al. 2000) und lokalen Östrogenkonzentrationen (Schuler 2000) sowie des ER $\alpha$ -Expressionsmusters in den Plazentomen (Schuler et al. 2002) wurde geschlossen, dass die plazentaren Östrogene an der Stimulation des Karunkelwachstums sowie an der Steuerung von Wachstum, Differenzierung und Funktionen des karunkulären Gefäßsystems beteiligt sein könnten (Hoffmann und Schuler 2002). ER $\beta$  war dagegen in zahlreichen Zelltypen in Karunkeln und Kotyledonen nachweisbar, wobei die Signalintensität insgesamt relativ schwach war. Die deutlichsten Signale fanden sich in den reifen Trophoblastriesenzellen und im maternalen bzw. fetalen Gefäßsystem (Schuler et al. 2005). Die Aufregulation von ER $\beta$  und Aromatase (Schuler et al. 2006a, 2008) im Verlauf der Trophoblastriesenzelldifferenzierung legt die Hypothese nahe, dass die plazentaren Steroide über einen intrakrinen Mechanismus an der Steuerung dieses Prozesses beteiligt sein könnten. Eine ähnliche Funktion plazentarer Östrogene wurde auch in der Humanplazenta postuliert (Bukovsky et al. 2003a, 2003b). Aufgrund seines Expressionsmusters ergibt sich für ER $\beta$  weiterhin die Möglichkeit, an der Steuerung von Wachstum, Differenzierung und Funktionen des plazentaren Gefäßsystems beteiligt zu sein.

## **2.7 Die Prolaktin-/Wachstumshormon-Familie und ihre Rezeptoren**

Prolaktin (PRL) und Wachstumshormon (Growth hormone, GH; Somatotropes Hormon, STH) bilden zusammen mit dem Plazentaren Laktogen (PL) eine Genfamilie, die wahrscheinlich aus Duplikationen gemeinsamer Vorläufergene hervorgegangen ist (Bole-Feysot et al. 1998). Sie zählen zu den Polypeptidhormonen. Des Weiteren werden sie einer noch größeren Übergruppe zugeordnet, der Gruppe der hämatopoetischen Zytokine (Goffin et al. 2002). GH ist beim Rind das Produkt eines einzelnen Gens und wird normalerweise von der Hypophyse pulsatil sezerniert. Dabei ist es für die Stimulation von Zellwachstum und Proliferation verantwortlich. Dies geschieht entweder direkt oder indirekt durch Stimulation des Insulin-like Growth Factor (IGF) Systems (Gootwine 2004). Es spielt eine übertragende Rolle in der Regulation des Längenwachstums. Bei einigen Spezies wird GH auch von der Plazenta gebildet. In der Schafplazenta wird GH vom Trophoblasten und den Syncytialzellen gebildet, in der Rinderplazenta konnte bisher allerdings eine Expression von GH nicht nachgewiesen werden (Gootwine 2004). In den Rinderplazentomen wiesen Kölle et al. (1997) die Expression des GH-Rezeptors im Karunkel epithel nach. Weiterhin wurde der GH-Rezeptor während der gesamten Trächtigkeit in den uninukleären Trophoblastzellen lokalisiert. Hierbei war die Expression in den ersten drei Monaten niedrig, steigerte sich vom dritten bis zum sechsten Trächtigkeitmonat und blieb danach bis zur Geburt nahezu konstant.

PRL stellt ebenfalls ein wichtiges Hormon der Hypophyse dar. Bei einigen Spezies wie z. B. Hund oder Ratte zählt hypophysäres PRL zu den luteotropen Faktoren (Bole-Feysot et al. 1998). Daneben findet man es in vielen verschiedenen Geweben jeglicher Säugetierspezies. PRL hat viele weitere Funktionen, die von der Entwicklung der Milchdrüse, Stimulation des mütterlichen Verhaltens, Immunregulation bis hin zur Regulation von Wasser- und Elektrolythaushalt reichen. Einen Überblick über die zahlreichen biologischen PRL-Funktionen findet man bei Bole-Feysot et al. (1998). Bei einigen Spezies wurde eine PRL-Expression in der Plazenta, v.a. in deren maternalen Anteil nachgewiesen. Die genaue Bedeutung von PRL in der Plazenta ist weitestgehend unklar. Jabbour und Critchley (2001) sprechen ihm jedoch eine wichtige Rolle v.a. während der Phase der Implantation zu. Zur Expression von PRL in der Rinderplazenta liegen bisher praktisch keine Informationen vor.

PL konnte bisher nur in der Plazenta von Wiederkäuern, Primaten und Nagern identifiziert werden (Anthony et al. 1995). In der Wiederkäuerplazenta wird PL von den binukleären Zellen des Trophektoderms produziert und wird sowohl in die maternale als auch in die fetale Zirkulation eingeschleust. Im Trophoblasten ist PL etwa zwischen Tag 16 und 36 erstmals feststellbar und wird danach während der gesamten Trächtigkeit sezerniert (Gootwine 2004). Strukturell gleicht das PL des Rindes (bPL) eher bovinem PRL als GH (Anthony et al. 1995). Die Funktionen von bPL sind im Detail noch weitestgehend unklar; eine Bedeutung wird darin gesehen, dass es im Hinblick auf die Versorgung des heranwachsenden Fetus den maternalen Stoffwechsel beeinflusst, wobei v.a. der maternalen Leber eine zentrale Rolle als Zielorgan zukommt (Schuler LA et al. 1997). Im Gegensatz zu anderen Wiederkäuerspezies und Nagern ist jedoch bPL während der Trächtigkeit im maternalen Serum nur in vergleichsweise niedrigen Konzentrationen nachweisbar.

Deutlich höhere Konzentrationen finden sich jedoch im fetalen Kreislauf mit einem Peak im zweiten Drittel der Gravidität (Scott et al. 1992). Die Bedeutung des im fetalen Kreislauf zirkulierenden bPL ist derzeit noch unklar.

Für bPL wurde bisher kein eigener Rezeptor identifiziert. Seine biologische Aktivität wird über den PRL- bzw. den GH-Rezeptor (PRLR bzw. GHR) vermittelt. Die beiden Rezeptoren gehören zur Superfamilie der Zytokinrezeptoren, sind membran-gebunden und strukturell eng miteinander verwandt. Es handelt sich hierbei um „single-chain“ Proteine. Sie gleichen sich weniger in ihrer Aminosäureabfolge, sondern viel mehr in ihrer Tertiärstruktur (Goffin und Kelly 1997). Beide Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären, einer transmembranösen und einer intrazellulären Domäne. Der genaue Rezeptoraufbau ist bei Bole-Feysot et al. (1998) beschrieben. Typisch für diese Rezeptorfamilie ist das Fehlen einer intrinsischen Kinaseaktivität. Bindet ein Ligand an der Bindungsstelle des Rezeptors, kommt es zuerst zu einem inaktiven Hormon-Rezeptorkomplex. Erst durch die nachfolgende Bindung des Hormon-Rezeptor-Komplexes an einen weiteren Rezeptor wird eine intrazelluläre Signalkaskade induziert. Hierbei kommt es zu einer sofortigen Transphosphorylierung der assoziierten Tyrosinkinase JAK2, gefolgt von der Aktivierung von STAT5 oder des MAP-Kinase-Weges (Goffin und Kelly 1997; Gertler und Djiane 2002). Eine weitergehende Beschreibung der induzierten, sehr komplexen Signalkaskaden finden sich bei Ihle et al. (1994).

Schuler LA et al. (1997) zeigten, dass beim Rind zwei Formen des PRL-Rezeptors existieren, eine lange Standardform (IPRLR) und eine kurze Form (sPRLR). Das Vorkommen einer kurzen Form wurde zuvor bereits bei Nagern und Schafen beschrieben (Schuler LA et al. 2001) und entsteht durch Insertion eines zusätzlichen Exons, welches ein Stopcodon enthält. Die Gestalt beider Rezeptoren unterscheidet sich daher lediglich in der Größe der intrazellulären Domäne, die bei der s-Form kleiner ausfällt. Extrazelluläre und transmembranöse Domäne unterscheiden sich nicht. Die s-Form besitzt die Möglichkeit, die durch die l-Form aktivierte Janus 2 Kinase zu hemmen (Schuler LA et al. 2001).

Über die von bPL an Prolaktin- und GH-Rezeptoren induzierten Wirkungen ist wenig bekannt bzw. es liegen widersprüchliche Informationen vor. An homologen GH-Rezeptoren scheint bPL eher als Antagonist oder Partialagonist zu agieren. Auch die Bindung an PRLR/GHR-Heterodimere wird beschrieben, wobei deren biologische Bedeutung bisher unklar ist (Gertler und Dijane 2002; Gootwine 2004; Patel et al. 2004).

## **2.8 Large Offspring Syndrome (LOS)**

Nach der Anwendung von in vitro-Techniken der Reproduktion wie somatischem Klonen (Somatic Cell Nuclear Transfer, SCNT) und der in vitro-Produktion von Embryonen (IVP) tritt beim Rind gehäuft ein Syndrom fetaler Anomalien auf, welches unter anderem durch einen intrauterinen Überwuchs gekennzeichnet ist: das Large Offspring Syndrome (LOS). Das Geburtsgewicht betroffener Kälber kann bis auf das doppelte des normalen Geburtsgewichtes erhöht sein (Young et al. 1998). Bereits 1991 beschrieben Willadsen et al. das Phänomen der „übergroßen Kälber“ nach Klonen via Transfer von Kernen embryonaler Zellen in entkernte Eizellen. 1992 wurde diese Beobachtung von Sprechern des Symposiums der International Embryo Transfer Society (IETS) bestätigt (Bertolini und Anderson 2002). Das Syndrom umfasst eine große Anzahl weiterer Abnormalitäten. Dazu gehören beispielsweise ein vermehrtes Auftreten von frühembryonalem Tod, eine gesteigerte Abortrate, Skelettdeformationen sowie eine Verschiebung der relativen Organgewichte (Farin et al. 2006). Des Weiteren werden postnatal Lebensschwäche, Saugunlust, Hypothermie, Hypoglykämie, Hypoxie, schwere metabolische Azidose und plötzliche Todesfälle in der Neugeborenenphase beschrieben. Weitere LOS-assoziierte Veränderungen sind eine erhöhte Muskelmasse, veränderte Zusammensetzung der Muskelfasern und

Missbildungen im Kleinhirnbereich (Willadsen et al. 1991; Kruip und den Haas 1997; Young et al. 1998; Farin et al. 2006).

Ebenfalls mit dem LOS in Verbindung gebracht wird das Auftreten von Plazentaaberrationen in Form von Hydrallantois und der Bildung abnorm großer, ungewöhnlich geformter und in der Gesamtzahl reduzierter Plazentome. Weiterhin werden Störungen der placentaren Gefäßbildung beschrieben. Man vermutet, dass für den überaus häufigen frühen fetalen Tod nach somatischem Kerntransfer, der hauptsächlich im ersten Trimester der Trächtigkeit auftritt, die abnormale Plazentaentwicklung eine erhebliche Rolle spielt (Stice et al. 1996; Hill et al. 2000).

Da das Syndrom in seinem Auftreten sehr variabel ist und sich auch ohne fetalen Überwuchs manifestieren kann, schlagen Farin et al. (2006) die Bezeichnung Abnormal Offspring Syndrome (AOS) vor und teilen es in vier verschiedene Kategorien ein:

Typ I AOS: Abnormale Entwicklung und früher embryonaler Tod vor Beendigung der Organogenese (ca. 42. Trächtigkeitstag).

Typ II AOS: Abnormale Entwicklung von Fetus und Plazenta; fetaler Tod zwischen Abschluss der Organogenese und Ende der Trächtigkeit (42.–280. Trächtigkeitstag).

Typ III AOS: Fetus und Plazenta mit schweren Entwicklungsfehlern, die weder vonseiten des Fetus noch der Plazenta zu kompensieren sind; die Geburt verläuft normal oder schwierig; die betroffenen Kälber weisen veränderte klinische, hämatologische und biochemische Parameter auf; Tod während der Geburt oder in der neonatalen Periode (bis 28. Tag p.p.).

Typ IV AOS: Fetus oder Plazenta mit moderaten Abnormalitäten; Fetus und/oder Plazenta können die Alterationen kompensieren; die Geburt verläuft normal oder schwierig; das Kalb ist normal groß oder zu groß; es können veränderte klinische, hämatologische und biochemische Parameter auftreten.

Das LOS/AOS wurde nicht nur bei der Spezies Rind beobachtet, sondern ebenfalls bei Mäusen (Eggan et al. 2001; Fernandez-Gonzalez et al. 2004) und Schafen (Walker et al. 1996).

Die molekularen Mechanismen, die dem LOS/AOS zugrunde liegen, sind noch weitestgehend unklar. Sicher ist jedoch, dass die das LOS/AOS hervorrufenden Ver-

änderungen nicht auf genetischer sondern epigenetischer Ebene ablaufen. Darauf deutet die Tatsache hin, dass LOS/AOS-assoziierte Veränderungen in der Regel nicht vererbt werden. Offensichtlich spielt eine Störung der epigenetischen Re-programmierung des Genoms in der frühembryonalen Phase eine erhebliche Rolle, wobei vermutlich einer Störung des Imprintings von Genen eine besondere Bedeutung zukommt. Unter Imprinting versteht man die Inaktivierung des paternalen oder maternalen Allels eines Gens. Dies wird nur bei einer relativ kleinen Anzahl von Genen beobachtet, während bei den meisten Genen im Falle einer Expression beide Allele aktiv sind. Einem Imprinting unterliegen vor allem Gene, die eine Bedeutung für embryonales und fetales Wachstum bzw. Differenzierung haben. Die DNA-Methylierung stellt hierbei einen bedeutenden Imprinting-Mechanismus dar. Derzeitige Erklärungsmodelle gehen daher von einer Störung der frühembryonalen Demethylierungs- bzw. Methylierungsvorgänge als einer wichtigen Ursache des LOS/AOS aus (Kang et al. 2001; Wilmut et al. 2002; Hiendleder et al. 2006; Farin et al. 2006). Die Einflüsse während der in vitro-Manipulation, welche zu den angesprochenen epigenetischen Störungen führen, sind im Detail immer noch weitestgehend unklar. Dies ist u.a. darauf zurückzuführen, dass das LOS/AOS bisher schlecht reproduzierbar war. Ein kritischer Punkt scheint die Supplementierung der Kulturmedien zu sein. Bovines Serumalbumin und Serum werden am häufigsten als Mediumzusätze verwendet, sind aber umstritten, da sie neben Hormonen und Wachstumsfaktoren eine Reihe weiterer unbekannter Komponenten enthalten können. Dies macht den Vergleich von Experimenten untereinander schwierig. Es ist also von großem Interesse, klar definierte Medien zu entwickeln, die auf synthetischen Makromolekülen basieren (Warzych et al. 2007).

Das LOS/AOS ist bei der Anwendung moderner Techniken der assistierten Reproduktion beim Rind von erheblicher wirtschaftlicher Bedeutung, die sich v.a. beim SCNT aus dem Verlust zahlreicher Graviditäten und der hohen neonatalen Sterblichkeit ergibt. Der fetale Überwuchs führt weiterhin zu Geburtsstörungen und somit zu erhöhten Belastungen des Neonaten und des Muttertieres unter der Geburt, wodurch sich tierschutzrelevante Aspekte ergeben. Finanzielle Verluste ergeben sich auch aus der erhöhten Inzidenz von Kaiserschnitten. Auch wenn mittlerweile Tausende gesunde in vitro-produzierte Kälber geboren wurden, stellt das LOS/AOS immer noch ein Hindernis in der breiten Anwendung moderner biotechnischer Verfahren in der Rinderproduktion dar.

## 2.9 LOS-assoziierte Plazentaveränderungen beim Rind

Neben morphologischen Veränderungen und Funktionsstörungen verschiedener Organe des eigentlichen Fetus, treten als Bestandteil des LOS/AOS gehäuft Plazentaveränderungen auf. Besonders gravierende Plazentaveränderungen werden nach Anwendung des somatischen Klonens beobachtet. Hill et al. (2000) beschrieben bei SCNT-Trächtigkeiten zwischen dem 30. und 90. Graviditätstag einen Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt des fetalen Tods und dem Typ der Plazentaveränderungen:

1. Fetaler Fruchttod vor dem 45. Graviditätstag: Plazenta mit unterentwickeltem Chorion und stark verminderter Vaskularisation; keine fetale Entwicklung möglich.
2. Fetaler Fruchttod 50.- 90. Graviditätstag: ein besser entwickelter Trophoblast, der die Versorgung des Fetus aufrechterhält, bis funktionstüchtige Plazentome für die erhöhte Nährstoffversorgung des wachsenden Fetus benötigt werden. Danach kommt es durch die zunehmende Plazentainsuffizienz zum fetalen Fruchttod.
3. Phänotyp mit ausreichender Anzahl von Plazentomen: Fetus erreicht das 2. Trimester.

Diese Befunde stützen die These, dass es aufgrund der Plazentaveränderungen zu einem verminderten fetomaternalen Stoffaustausch und somit zu einer nicht ausreichenden Nährstoffversorgung des Fetus kommt, dieser dadurch in der Entwicklung stark verzögert ist und quasi „verhungert“. Folge ist der fetale Fruchttod. Aufgrund ihrer Befunde kamen Hill et al. (2000) zu dem Schluss, dass bei SCNT-Graviditäten Plazentaanomalien eine wesentliche Ursache für den fetalen Fruchttod im ersten Trimester darstellen, der zu einem Verlust von 82% der Trächtigkeiten führte. Im Einklang damit stehen Beobachtungen von Stice et al (1996), die fünf Plazenten aus fünf SCNT-Trächtigkeiten zwischen dem 35.–55. Tag der Gravidität untersuchten. Alle Plazenten wiesen eine stark reduzierte Plazentombildung auf, alle Feten starben ab.

Hill et al. (2001) beschrieben eine hochgradig veränderte Plazenta eines lebend geborenen, geklonten Kalbes. Diese Plazenta war abnormal groß, wies jedoch nur 26

Plazentome auf. Hiervon waren 12 vergrößert aber funktionstüchtig, 6 unterentwickelt und 8 degeneriert. Im nichtgraviden Horn fanden sich weiterhin 6 rudimentäre Plazentome und 8 ovale, mineralisierte Plaques. Plazentaveränderungen von Klonkälbern zu späteren Trächtigkeitsstadien sind gekennzeichnet durch Ödeme in Plazenta und Nabelschnur, vergrößerte Plazentome, die in ihrer Anzahl erheblich vermindert sind, und ein reduziertes Gefäßsystem (Constant et al. 2006; Miglino et al. 2007).

Plazentaveränderungen bei Trächtigkeiten aus in vitro-Produktion sind im Vergleich zum SCNT im Allgemeinen deutlich seltener, manifestieren sich erst in späteren Trächtigkeitsstadien und sind von geringerem Schweregrad. Es werden v.a. ein gehäuftes Auftreten von Hydrallantois, eine Erhöhung des Plazentagewichts und eine vergrößerte Karunkeloberfläche beobachtet. Zum Zeitpunkt der Geburt werden das gehäufte Auftreten von Formabweichungen der Plazentome sowie eine Rechtsverschiebung der Plazentomgröße durch das Auftreten von "Giant Placentomes" beschrieben (Hill et al. 2001; Bertolini und Anderson 2002).

Seit den ersten Beschreibungen des LOS/AOS wurden zahlreiche Untersuchungen zu dessen Ätiologie und Pathogenese an Blastozysten, Feten und Kälbern durchgeführt. Die Zahl der Untersuchungen an Plazenten ist dagegen vergleichsweise gering. Die Pathogenese von Plazentaveränderungen und die Rolle der Plazenta im Rahmen des LOS/AOS sind daher insgesamt noch weitestgehend unklar. Insbesondere ist nicht geklärt, ob die Veränderungen an der Plazenta und am eigentlichen Fetus Ausdruck einer in beiden Kompartimenten gleichermaßen angelegten Störung von Wachstum und Differenzierung sind oder ob die Plazentaveränderungen sekundär als Folge von Entwicklungsstörungen des eigentlichen Fetus entstehen oder die Störung von Plazentafunktionen zu Beeinträchtigungen des Fetus führt. Constant et al. (2006) beobachteten bei SCNT-Trächtigkeiten, dass der plazentare Überwuchs dem fetalen Überwuchs vorausgeht und postulierten daher, dass einige der fetalen Veränderungen wie Herzdilatation, Erweiterung des Nabels und Aszites Folgen einer plazentaren Dysfunktion sind.

### **3. Material und Methoden**

Alle Angaben zu den in dieser Arbeit verwendeten Materialien, Reagenzien und Geräte finden sich, falls im Text nicht erwähnt, in Kapitel 3.10.

#### **3.1 Erzeugung der Trächtigkeiten mittels *in vitro* produzierter Embryonen (IVP) bzw. Embryotransfer nach Superovulation (Multiple Ovulation Embryo Transfer, MOET) und Proben-gewinnung**

Die tierexperimentellen Arbeiten wurden am Institut für Tierzucht, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft in Grub unter der Leitung von Herrn Dr. Horst-Dieter Reichenbach durchgeführt. Der Tierversuch war von der zuständigen Behörde, genehmigt worden. Das Tierexperiment wurde von Herrn Prof. Dr. Stefan Hiendleder (vormals Institut für molekulare Tierzucht und Biotechnologie, Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München) geplant und die verwendeten Embryonen in seiner Arbeitsgruppe erzeugt.

Das Probenmaterial der Versuchsgruppen entstammte Trächtigkeiten, welche nach zwei unterschiedlichen Protokollen der *in vitro*-Produktion (IVP-1, n=5 bzw. IVP-2; n=6) erzeugt wurden. Die Eizellen wurden von am Schlachthof gewonnenen Ovarien aspiriert, die einer Brown-Swiss-Kuh entstammten. Für die *in vitro*-Fertilisation nach Maturation der Eizellen wurden Spermien des Braunvieh-Bullen "Simvitel" (ID 276000916363895) verwendet. Detaillierte Angaben zu den beiden Protokollen, die zur Erzeugung der IVP-Trächtigkeiten -1 und -2 zur Anwendung kamen, finden sich bei Hiendleder et al. (2006). Wesentlicher Unterschied zwischen den Protokollen IVP-1 und IVP-2 waren Art und Menge des Gonadotropinzusatzes zum Oozytenmaturationsmedium (IVP-1: 0,01 U/ml bovines FSH + 0,01 U/ml bovines LH; IVP-2: 0,2 U/ml ovines FSH, kein LH). In vorliegender Arbeit wurde abweichend zu dem von Hiendleder et al. (2006) beschriebenen Protokoll, nach dem das Embryokulturmedium in der Gruppe IVP-1 5% Estrus Cow Serum, das der Gruppe IVP-2 10% Estrus Cow Serum enthielt, bei beiden IVP-Gruppen 10% Estrus Cow Serum zum Embryokulturmedium zugesetzt.

Die *in vitro*-maturierten Embryonen beider Versuchsgruppen (IVP-1 und -2) wurden am 7. Tag nach der *in vitro*-Fertilisation (IVF) auf zyklussynchronisierte Empfängertiere der Rasse Deutsches Fleckvieh (DVF) übertragen, wobei zur Erhöhung der Trächtigkeitsraten pro Empfängertier jeweils zwei Embryonen zum Einsatz kamen.

Als Kontrolle dienten Trächtigkeiten aus konventionellem Embryotransfer (Multiple Ovulation Embryo Transfer, MOET; n= 5). Dazu waren Brown Swiss-Färsen nach Superovulation mit Sperma des Braunvieh Bullen "Simvitel" (s.o.) besamt und die Embryonen am 7. Tag nach der Insemination durch Uterusspülung gewonnen worden. Es wurden ebenfalls je zwei Embryonen an zyklussynchronisierte Tiere der Rasse DVF übertragen.

Die Empfängertiere wurden am 73. Tag nach Embryotransfer geschlachtet, das fetale Alter ergab sich demnach mit 80 Tagen.

Unmittelbar nach der Schlachtung wurde der Uterus entfernt und innerhalb von 5 min in das Labor transportiert. Dort wurde er vorsichtig eröffnet und zunächst die Allantois- bzw. Amnionflüssigkeit abgesaugt. Diese Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert. Nach der Entfernung des Fetus bzw. der Feten erfolgte die Entnahme der Plazentome. Bei Einlingsgraviditäten erfolgte die Probenentnahme im mittleren Bereich des fruchttragenden Horns. Bei Zwillingsgraviditäten war aus versuchstechnischen Gründen eine Zuordnung der einzelnen Plazentome zu den einzelnen Feten nicht möglich. Hier wurden die Plazentome aus dem mittleren Bereich beider Hörner entfernt. Weiterhin war es aufgrund der fragilen Gewebekonsistenz nicht möglich, mit zeitlich vertretbarem Aufwand eine saubere manuelle Trennung zwischen Karunkeln und Kotyledonen zu erzielen. Daher wurden pro Tier jeweils drei komplette Plazentome in Form von ca. 0,5x1x1 cm großen Würfeln in gepufferter Formalin-Lösung nach Lillie bzw. in flüssigem Stickstoff konserviert.

Zum Auswaschen des neutral gepufferten Formalins wurden die Gewebeproben am nächsten Tag in 0,1 M Phosphatpuffer (pH-Wert 7,2) überführt und darin für 5-6 Tage aufbewahrt. Der Puffer wurde in dieser Zeit mehrfach erneuert. Danach wurden die Gewebeproben für je 24 Stunden in 30%igem, 50%igem und zum Schluss in 70%igem Ethanol dehydriert. Anschließend wurden sie in Paraffin eingebettet.

Aus diesem Versuch ergaben sich insgesamt drei Gruppen:

1. Gruppe IVP-1
2. Gruppe IVP-2
3. Gruppe MOET (Kontrolle)

### 3.2 Ergänzende Untersuchungen an bereits vorhandenem Probenmaterial aus anderen Versuchen <sup>1)</sup>

Ergänzend zu den Untersuchungen im Zusammenhang mit der LOS-Thematik wurden Untersuchungen an Plazentomen durchgeführt, die von normal graviden Rindern aus drei unterschiedlichen Graviditätsperioden, sowie direkt nach der Geburt stammten:

1. 110 - 150 Tage tragende Tiere
2. 220 - 260 Tage tragende Tiere
3. präpartale Tiere; die Probennahme fand zum Zeitpunkt der präpartalen Luteolyse statt (Progesteron < 1,5 ng)
4. Geburtstiere; die Proben wurden direkt nach der spontan eingetretenen Geburt entnommen

Das gewonnene Probenmaterial war schockgefroren und bei – 80°C aufbewahrt worden, weiterhin standen paraffineingebettete Gewebeproben nach Fixierung in Formalin oder Bouin zur Verfügung, siehe bei Schuler et al. 2007. Diese Tiere bildeten die Gruppe NG (normal gravid).

Bei Untersuchungen zum Wachstumsfaktor und Prolaktinrezeptor wurden des Weiteren noch Plazentome von 60 bis 70 Tage tragenden Tieren verwendet. Diese Proben wurden wie oben erwähnt konserviert und waren von normal graviden Tieren gewonnen worden.

Die Ableitung der Trächtigkeitsdauer erfolgte mit der Formel nach Keller:

$$x = \sqrt{y + 1} - 1$$
$$x = \text{Anzahl der Entwicklungsmonate}$$
$$y = \text{Scheitel} - \text{Steiß} - \text{Länge}$$

Auf Tage umgerechnet ergibt sich die Formel:

$$t = 28 (\sqrt{y + 1} - 1)$$

1) Das Probenmaterial bis zum 260. Graviditätstag war von normal geschlachteten Tieren gewonnen worden. Die Entnahme zum Zeitpunkt der präpartalen Luteolyse sowie direkt nach der Geburt war von der zuständigen Behörde genehmigt worden (AZ Regierungspräsidium Gießen, V54-19c20-15(1)GI18/14-Nr.41/2007).

### **3.3 Hormonanalytische Verfahren**

#### **3.3.1 Bestimmung von freien und konjugierten Gesamtöstrogenen in Amnion- und Allantoisflüssigkeit**

Die Bestimmung von freien und konjugierten Gesamtöstrogenen erfolgte wie bei Hoffmann et al. (1997) angegeben; abweichend davon wurde jedoch ein Antiserum verwendet, das annähernd gleich hohe Kreuzreaktionen mit Estradiol-17 $\beta$  und Estron aufwies.

Das Messverfahren wurde wie folgt durchgeführt:

##### **3.3.1.1 Extraktion und Aufbereitung der Proben**

###### Extraktion der freien Östrogene:

400  $\mu$ l Amnion- oder Allantoisflüssigkeit wurden im Doppelansatz in 15 ml Wheaton-Schraubgläser pipettiert und 3 ml Toluol zugegeben. Die Ansätze wurden 15 min im Rotationsmischer gemischt und anschließend zur besseren Trennung von wässriger und organischer Phase kurz bei 2220 g zentrifugiert. Die untere wässrige Phase wurde im Trockeneis-Alkohol-Bad bei ca.  $-60^{\circ}\text{C}$  gefroren und die organische Phase in ein Glasröhrchen dekantiert. Dieser Zyklus wiederholte sich insgesamt zweimal. Die organische Phase wurde im Vortex-Evaporator bei  $50^{\circ}\text{C}$  niedertrocknet und der Extrakt der radioimmunologischen Hormonbestimmung zugeführt.

##### **3.3.1.2 Radioimmunologische Messung**

Der Radioimmunotest (RIA) war als Competitionstest angesetzt, d. h. radioaktiv markiertes und nicht markiertes Antigen konkurrieren um Bindungsstellen am Antikörper.

Die Trennung von gebundenen und freien Liganden erfolgt durch Adsorption des freien Liganden an Holzkohle, die Messung der gebundenen Aktivität (Isotop  $^3\text{H}$ ) erfolgte am Flüssigkeitsszintillationszähler „LS 5000 TD“ (Beckmann, München).

Das verwendete Antiserum war gegen 1,3,5(10)-Estratrien-3,17 $\beta$ -diol-17-Hemisuccinat-BSA gerichtet.

Es wurde in einer Arbeitsverdünnung von 1:80000 eingesetzt und wies, abgeleitet aus Hoffmann (1977), folgende Kreuzreaktionen auf:

- Estron 100 %
- Estradiol-17 $\alpha$  100 %
- Estradiol-17 $\beta$  100 %
- Progesteron < 0,1 %
- Pregnenolon < 0,1 %
- 17 $\alpha$ -OH-Progesteron < 0,1 %
- Cortisol < 0,1 %
- Corticosteron < 0,1 %
- Dehydroepiandrosteron < 0,1 %
- Androstendion < 0,1 %

Als Tracer wurde 2,4,6,7-<sup>3</sup>H-Estron mit einer spezifischen Aktivität von 95 Ci/mmol ( $\approx$  3,52 TBq/mmol) verwendet.

#### Extraktion der konjugierten Östrogene:

Nach Extraktion der freien Östrogene wurden die in der wässrigen Phase zurückgebliebenen konjugierten Östrogene einer enzymatischen Hydrolyse unterzogen. Dazu wurden jeweils 140  $\mu$ l Hydrolysepuffer und 50  $\mu$ l  $\beta$ -Glukuronidase-Arylsulfatase (Verdünnung der Originalpräparation mit 0,9% NaCl-Lösung im Verhältnis 1:25) hinzugefügt. Die Zugabe des Hydrolysepuffers bewirkte eine Einstellung des pH-Wertes auf ca. 4,8. Das Gemisch wurde über Nacht bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließend wie oben beschrieben extrahiert und niedergetrocknet. Die niedergetrockneten Extrakte wurden ebenfalls nach Rücklösung der radioimmunologischen Hormonbestimmung zugeführt.

#### **3.3.1.3 Qualitätskontrollen**

Zur Kontrolle wurde bei jedem Test eine biologische Probe mit bekanntem niedrigem bzw. bekanntem hohem Östrogengehalt eingesetzt. Die sich daraus ergebende Interassayvariabilität lag bei 13,4 % (niedrige Konzentration) bzw. 11,4 % (hohe Konzentration).

### 3.3.2 Bestimmung von Progesteron in Amnion- und Allantoisflüssigkeit

Die radioimmunologische Bestimmung von Progesteron erfolgte im Prinzip nach dem von Hoffmann et al. (1977) beschriebenen Verfahren.

#### 3.3.2.1 Extraktion und Aufbereitung der Proben

100 µl Amnion- bzw. Allantoisflüssigkeit wurden mit 2 ml Hexan versetzt, wie in Kapitel 3.3.1.1 beschrieben extrahiert und im Vortex-Evaporator bei 50°C niedergetrocknet. Die niedergetrockneten Extrakte wurden in je 0,1 ml BSA-Puffer rückgelöst und dem Radioimmunoassay zugeführt.

#### 3.3.2.2 Radioimmunologische Messung

Testansatz sowie Trennung von freiem und gebundenem Liganden und Messung am Flüssigkeitsscintillationszähler waren wie in 3.3.1.2 angegeben.

Das in dieser Arbeit verwendete Antiserum war gegen 11 $\alpha$ -OH-Progesteron-Hemisuccinat-BSA gerichtet und wies folgende Kreuzreaktionen auf:

- Progesteron 100 %
- Pregnenolon 0,69 %
- 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron 0,49 %
- Testosteron 0,37 %
- Estradiol-17 $\beta$  < 0,01 %
- Cortisol < 0,01 %
- Androstendion < 0,01 %
- Östron < 0,01 %

Als Tracer wurde 1,2,6,7-<sup>3</sup>H-Progesteron mit einer spezifischen Aktivität von 102,1 Ci/mmol ( $\approx$  3,8 TBq/mmol) verwendet.

#### 3.3.2.3 Qualitätskontrollen

Zur Kontrolle wurde bei jedem Test eine biologische Probe mit bekanntem Progesterongehalt mitgeführt.

Die Interassayvariabilität betrug 13,8 % (niedrige Konzentration) bzw. 9,9 % (hohe Konzentration).

## **3.4 RNA-Isolierung aus Plazentomen**

### **3.4.1 Vorbereitungen**

Vor Beginn der Arbeit wurde die Arbeitsfläche mit 70%igem Ethanol und RNase-Away (Molecular Bioproducts, San Diego, USA) gereinigt. Mörser, Pistill, Pinzette, Löffel und 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden auf Eis gestellt und ca. 1 Stunde gekühlt.

Die aufzuarbeitenden Gewebeproben wurden aus dem Gefrierschrank (-80°C) entnommen und bis zur Bearbeitung in flüssigem Stickstoff gelagert. Wurden mehrere Proben hintereinander aufgearbeitet, stand zur Zwischenreinigung des Ultraturrax®-Aufsatzes jeweils pro Probe je ein Reagenzglas mit 4 N NaOH, 70%igem Ethanol und autoklaviertem Wasser bereit. Zur Vorzerkleinerung der tiefgefrorenen Gewebestücke wurden diese mit sauberer Aluminiumfolie umwickelt mit einem Hammer auf einem ebenfalls mit Aluminiumfolie umwickelten Marmorbrettchen zerschlagen.

### **3.4.2 Durchführung**

Das vorzerkleinerte Gewebe wurde in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser gegeben und dort mit dem Pistill zu Pulver verarbeitet, wobei verdampfter Stickstoff ständig nachgefüllt wurde. Das Gewebepulver wurde danach in ein 2-ml-Reaktionsgefäß gefüllt, mit 1 ml Trizol®-Reagenz (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe) überschichtet und mit dem Ultra-Turrax® T8 (IKA-Werke GmbH, Staufen) weiter zerkleinert, bis keine größeren Partikel mehr sichtbar waren. Nach jeder mit dem Ultra-Turrax® bearbeiteten Probe wurde der rotierende Messeraufsatz zuerst in 4 N NaOH, gefolgt von 70%igem Ethanol und zum Schluss in autoklaviertem Wasser gereinigt.

Im Anschluss an die Homogenisierung des Probenmaterials wurde das geschlossene Reaktionsgefäß für 10 min auf Eis gestellt. Nach 10 min wurden zu dem Trizol®-Gewebe Gemisch 200 µl eisgekühltes Chloroform pipettiert, das Reaktionsgefäß geschüttelt, 5 min auf Eis inkubiert und dann bei 4°C und 20200 g 15 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase enthielt die RNA und wurde in ein neues Reaktionsgefäß abpipettiert. Zur weiteren Aufreinigung der RNA wurden erneut 200 µl eisgekühltes Chloroform dazugegeben, die Probe gut geschüttelt, wie oben angegeben abzentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Zur Fällung der darin enthaltenen RNA wurde er zu gleichen Volumenanteilen mit Isopropanol versetzt. Es folgte eine Inkubation der Probe für 30 min bei -20 °C.

Anschließend wurde die Probe nochmals aufgeschüttelt, bei 4°C und 20200 g 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Zum Sediment wurden 500 µl eisgekühltes 70%iges Ethanol zugegeben, die Probe für 10 min auf Eis gestellt und dann bei 4°C und 20200 g 10 min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Danach wurde das Pellet über 10 min bei Raumtemperatur getrocknet, wonach es zur Resuspension mit 50 µl autoklaviertem Wasser versetzt, 10 min in ein 70-°C-Wasserbad gestellt und anschließend gevortext wurde. Um die RNase-spezifische Enzymaktivität zu unterdrücken, wurde die gewonnene RNA mit 1U/µl RNase-Inhibitor (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt.

### **3.4.3 Messung der RNA-Konzentration**

Die Bestimmung der Gesamt-RNA-Konzentration (ng/µl) erfolgte mittels eines UV-Spektrofotometers (BioPhotometer, Eppendorf® AG, Hamburg). Dazu wurden jeweils 5 µl RNA-Präparation und 95 µl autoklaviertes Wasser in Kunststoff-Einmalküvetten (Eppendorf Uvette® 220-1600nm, Westbury, USA) pipettiert und die Extinktion bei 260 nm gemessen. Als Leerwert wurde autoklaviertes Wasser verwendet. Die gewonnene unverdünnte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

## **3.5 Konventionelle RT-PCR**

### **3.5.1 Anwendungsbereiche**

Experimente unter Verwendung der konventionellen RT-PCR wurden zu folgenden Zwecken durchgeführt:

1. Qualitative Bestätigung der Zielgen-Expression vor der Etablierung einer Real-Time RT-PCR-Methode in den Fällen, in denen über die Expression eines Zielgens in den Rinderplazentomen keine bzw. unsichere Informationen vorlagen. Die Primer (siehe Abschnitt 3.5.2, Tabelle 6) wurden mithilfe der Programme Oligo Analyzer 1.0.2 sowie Oligo Explorer 1.1.0. (Teemu Kuulasmaa, University of Kuopio, Finland) erstellt.
2. Überprüfung der für die Real-Time RT-PCR selbst entworfenen Primerpaare auf ihre Funktionstüchtigkeit vor der Bestellung der zugehörigen Taqman-Sonden.

## 3.5.2 Durchführung der RT-PCR

### 3.5.2.1 DNase-Behandlung

Um eine Amplifikation von eventuell noch in der Probe vorhandener genomischer DNA und ein daraus resultierendes falsch positives Ergebnis zu vermeiden, wurde vor jeder RT-PCR die gewonnene RNA einer Behandlung mit DNase unterzogen.

Die Ansätze wurden in 0,25 ml Plastikreaktionsgefäßen (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf) auf Eis angesetzt.

Tabelle 1: Zusammensetzung des DNase-Mix

Komponenten	Einfacher Ansatz (in µl)	Stammlösung
MnCl <sub>2</sub>	1	10 mM
10x PCR-Puffer	1	10 x
DNase I RNase-frei	1	10 U/µl
RNase-Inhibitor	0,25	40 U/µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>3,25</b>	

Das hier verwendete MnCl<sub>2</sub> wurde von Sigma-Aldrich™ Chemie, Deisenhofen bezogen. Der 10 x PCR-Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3) entstammte dem RT-PCR core Kit von Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt. DNase I, RNase-frei wurde von Roche Molecular Biochemicals, Mannheim und der RNase-Inhibitor von MBI Fermentas bezogen.

Dem DNase-Mix wurden 6,65 µl RNA-Lösung (0,2 µg/µl) zugegeben. Das Endvolumen betrug 9,90 µl.

Die DNase-Behandlung wurde in einem T1 Thermocycler 48 (Whatman Biometra, Göttingen) durchgeführt und fand unter folgenden Reaktionsbedingungen statt:

1. 10 min bei 37°C
2. 5 min bei 75°C
3. Abkühlung auf 4 °C
4. bis zur Entnahme aus dem Thermocycler: 4°C

Die Reverse Transkription (RT) folgte direkt im Anschluss, da nach der DNase-Behandlung die Stabilität der RNA nur für sehr kurze Zeit gewährleistet ist.

### 3.5.2.2 Reverse Transkription (RT)

Für die cDNA-Synthese wurde pro Ansatz 1,5 µl DNase behandelte RNA-Lösung und 8,5 µl RT-Mastermix zugegeben. Alle Pipettierschritte erfolgten auf Eis. Als Startprimer dienten unspezifisch bindende Primer (Random Hexamers).

Verwendet wurde ein RT-PCR Core Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an ein vom Hersteller mitgeliefertes Protokoll.

Tabelle 2: Zusammensetzung des RT-Mastermixes für die RT

<b>Komponenten</b>	<b>Einfacher Ansatz (in µl)</b>	<b>Stammlösung</b>
MgCl <sub>2</sub>	2	25 mM
10 x PCR-Puffer	1	10 x
dGTP	1	10 mM
dTTP	1	10 mM
dATP	1	10 mM
dCTP	1	10 mM
Random Hexamers	0,5	50 µM
RNase-Inhibitor	0,5	20 U/µl
ReverseTranskriptase	0,5	50 U/µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>8,5</b>	

Die Reverse Transkription wurde unter folgenden Reaktionsbedingungen in dem T1 Thermocycler 48 durchgeführt:

1. 8 min bei 21°C
2. 15 min bei 42°C
3. 5 min bei 99°C
4. 5 min bei 5 °C
5. bis zur Entnahme aus dem Thermocycler: 4°C

### 3.5.2.3 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zuerst wurden die aus der Anzahl der Ansätze errechneten benötigten Mengen an  $MgCl_2$ -Lösung, 10x PCR-Puffer und autoklaviertem Wasser zu einem Prämix vereinigt (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Zusammensetzung des Prämix

Komponenten	Einfacher Ansatz (in $\mu l$ )	Stammlösung	Gebrauchslösung (bezogen auf ein Endvolumen von 40 $\mu l$ )
$MgCl_2$	2	25 mM	1,25 mM
10 x PCR-Puffer	4	10 x	1 x
Autoklaviertes Wasser	32,75		
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>38,75</b>		

Danach wurde aus dem Prämix, den genspezifischen Primern und der thermo-stabilen DNA-Polymerase ein Primer-Mix hergestellt (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: Zusammensetzung des Primer-Mix

Komponenten	Einfacher Ansatz (in $\mu l$ )	Stammlösung	Gebrauchslösung (bezogen auf ein Endvolumen von 40 $\mu l$ )
PCR-Prämix	38,75	-	-
Primer-Mix*	1	10 pmol/ $\mu l$	0,25 pmol/ $\mu l$
Gold-Amplitaq	0,25	5 U/ $\mu l$	0,125 U/ $\mu l$

\* 1  $\mu l$  Primer-Mix enthält Sense- ( $5'$ - $3'$ ) und Antisense-Primer ( $3'$ - $5'$ ) im Verhältnis 1:1.

Zum Schluss wurden 40 µl Primer-Mix zu 10 µl cDNA-Lösung aus der reversen Transkription (siehe Abschnitt 3.5.2.2) zugegeben. Die Reaktionsbedingungen der konventionellen PCR sind aus der unten stehenden Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Reaktionsbedingungen bei der PCR

<b>Programmschritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	
Aktivierung Gold Amplitaq DNA Polymerase	95°C	10 min	
Initiale Denaturierung	94°C	1 min	
<b>Beginn der Zyklen</b>			
Denaturierung	94°C	1 min	35 Wiederholungen
Anlagerung	Primerspezifisch (siehe Tabelle 6)	2 min	
Verlängerung	72°C	1.30 min	
<b>Ende der Zyklen</b>			
Finale Verlängerung	72°C	10 min	
Bis zur Entnahme	4°C		

### 3.5.3 Analyse der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese unter Verwendung 2%iger Agarosegele analysiert. Hierzu wurden 1,82 g Agarose (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe) in 91 ml TBE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach kurzem Abkühlen bei Raumtemperatur auf ca. 60°C wurden 1,9 µl 1%ige Ethidiumbromidlösung (Roth GmbH & Co, Karlsruhe) zugegeben und die Lösung durch vorsichtiges Schwenken unter Vermeidung von Luftblasenbildung durchmischt. Das flüssige Gel wurde luftblasenfrei in ein Geltablett der horizontalen Gelelektrophoresekammer (Keutz Labortechnik GmbH, Reiskirchen) gegossen und der 20-zählige Kamm zur Bildung der Geltaschen eingesetzt. Nach ca. 30 min bei Raumtemperatur erstarrte das Gel. Nun wurden die Taschenschablone sowie die Gummi-Endblöcke des Geltablets entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingelegt.

Die Proben und Längenmarker (100 bp DNA Ladder) wurden wie folgt angesetzt:

- Proben:
- 15 µl PCR-Produkt
  - 1,5 µl Ladepuffer (6x Loading Dye Solution; MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- 100 bp Ladder:
- 1,0 µl Längenmarker (GeneRuler™, MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
  - 1,5 µl Ladepuffer
  - 7 µl autoklaviertes Wasser

Das Gemisch wurde in die Geltaschen pipettiert, der Sicherheitsdeckel geschlossen und die Anschlüsse mit dem Stromgeber verbunden. Die ca. 30-minütige Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 125 V und einer Stromstärke von 300 mA (Power Supply-Gerät; LKB Bromma, Golden, USA). Die Detektion der elektrophoretisch getrennten Proben erfolgte mittels UV-Licht. Durch die Interkalierung von Ethidiumbromid in die DNA werden die Amplifikate unter UV-Licht als Banden sichtbar. Beispielhafte Fotografien von Gelen aus diesen Untersuchungen werden im Anhang (Abschnitt 10) dokumentiert. Die Spezifität der PCR-Produkte wurde durch eine Sequenzierung (SRD-Scientific Research and Development GmbH, Oberursel) bestätigt.

In der RT-PCR verwendete Primer

**Tabelle 6:** Unter Anwendung der in Kapitel 3.5 beschriebenen Methodik kamen zur Darstellung der Zielparameter mittels RT-PCR die in der Tabelle aufgelisteten Primerpaare zur Anwendung. Die Tabelle gibt auch die Annealing-Temperatur und die Länge des erzeugten PCR-Produkts in Basenpaaren (bp) an. Weiterhin ist die Accession-Nummer der für das Primer-design verwendeten Nukleotidsequenz sowie die Lokalisation der Primer innerhalb dieser Nukleotidsequenzen (nt = Nukleotid) angegeben.

Primer	Basensequenz	Annealing-Temperatur	Accession-Nr.	Lokalisation (nt)	Produktlänge (bp)
ErbB3-for	5`- TTG CCC ATG AAG CTG AGT GTT T- 3`	52°C	EF460505 <sup>1)</sup>	1-22	446bp
ErbB3-rev	5`- CCA CGT CGC CGA TTC ATA TA- 3`			427-446	
ERR2-for	5`- CCA ACG GTC TGG ACT CGC C- 3`	60°C	BC111277	295-313	363bp
ERR2-rev	5`- GCA CAC CTT CCT TCA ACA T- 3`			639-657	
bPL-for	5`- GCA ACA TTG GTG GCT AGC AA- 3`	62°C	J02840	262-281	78bp
bPL-rev	5`- GCC CTC GCC AAA CTG TTT ATT A- 3`			317-339	
PRLRkurz-for	5`- CCA GTT CCA GGG CCA AAA ATA- 3`	67°C	NM_174155	894-914	84bp
PRLRkurz-rev	5`- TTA AAA CAT AGA CAC AAG GCG AGA AG- 3`			952-977	
PRLRgesamt-for	5`- CCC AGT GAA GGA CAC AAG CA- 3`	64°C	NM_001039726	776-795	75bp
PRLRgesamt-rev	5`- GCC CAG ACC ATA ATC AAA CAG AT- 3`			828-850	
GHR-for	5`- AGT CTC CAC AGG GCC TCG TA- 3`	60°C	AY748827	1871-1890	84bp
GHR-rev	5`- TGC TCA CAT AGC CAC ATG ATG A- 3`			1933-1954	

<sup>1)</sup> Um auch hier die geplanten Untersuchungen mit einem rinderspezifischen Primer durchführen zu können, erfolgte eine partielle Klonierung des ErbB3-Gens. Diese Arbeit erfolgte im Wesentlichen durch den mitarbeitenden Co-Doktoranden Mariusz Kowalewski. Die erarbeitete Sequenz wurde in die Genbank mit der Eintragsnummer EF460505, bos taurus receptor tyrosine kinase ErbB3, mRNA (Kowalewski et al., 2007) eingetragen.

### **3.6 Messung Zielgen-spezifischer mRNA in den Plazentomen mittels Real-Time RT-PCR (TaqMan-Methode)**

Die Messung der Genexpression auf mRNA-Ebene in den Plazentomen erfolgte mittels Real-Time RT-PCR unter Verwendung der TaqMan-Methode. Für einen Teil der Zielgene konnte auf rinderspezifische Methoden zurückgegriffen werden, welche in vorausgegangenen Arbeiten von der eigenen Arbeitsgruppe (ER $\alpha$ : Schuler et al. 2002; ER $\beta$ : Schuler et al. 2005) etabliert bzw. von anderen Arbeitsgruppen publiziert worden waren (bPL: Patel et al. 2004). Die übrigen verwendeten Real-Time RT-PCR-Methoden mussten im Rahmen der eigenen Arbeiten selbst etabliert werden, wobei die benötigten rinderspezifischen Sequenzinformationen für PRLR, ERR2 und GHR vorhanden waren, bzw. für ErbB3 parallel zu den laufenden Arbeiten abgeleitet wurden (s. Fußnote Tabelle 6).

#### **3.6.1 Grundprinzip der Real-Time RT-PCR (TaqMan-Methode)**

Mit der Real-Time RT-PCR lässt sich das Expressionsniveau eines Zielgens auf mRNA-Ebene quantitativ bestimmen. Das Prinzip beruht auf dem proportionalen Anstieg der Fluoreszenz zum Anstieg der Konzentration des Amplifikationsproduktes. Die Fluoreszenz entsteht beim angewendeten Verfahren durch eine spezielle TaqMan-Sonde, die neben dem benötigten Primerpaar eingesetzt wird. Es handelt sich hierbei um ein zwischen den Primern bindendes Oligonukleotid, das in der Regel 20 bis 30 Basenpaare lang ist und dessen Sequenz speziell für das zu untersuchende Amplikon ausgewählt wurde. Die verwendeten TaqMan-Sonden waren am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxyfluoreszein (6-FAM) markiert, der als Reporter dient. Am 3'-Ende befand sich der Quencher (to quench = löschen) Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA), eine Fluoreszenz-löschende Verbindung. Bei der PCR verlängert die Taq-Polymerase die komplementäre Sequenz der im PCR-Ansatz vorhandenen Ziel-cDNA. Dabei trifft sie auf die spezifisch gebundene Sonde. Diese wird von der Taq-Polymerase durch ihre 5'-3'-Nuklease-Aktivität abgebaut. Hierbei kommt es zur Trennung von Reporter und Quencher. Da der Quencher in intaktem Sondenzustand ständig die Fluoreszenz des Reporters unterdrückt, kommt es erst nach der Trennung zu einem Fluoreszenzsignal (siehe Abb. 3), welches von der Messeinrichtung des Light Cyclers begleitend zur ablaufenden PCR erfasst wird. Die Auswertung des Fluoreszenzsignals ist in Abschnitt 3.6.3 beschrieben.

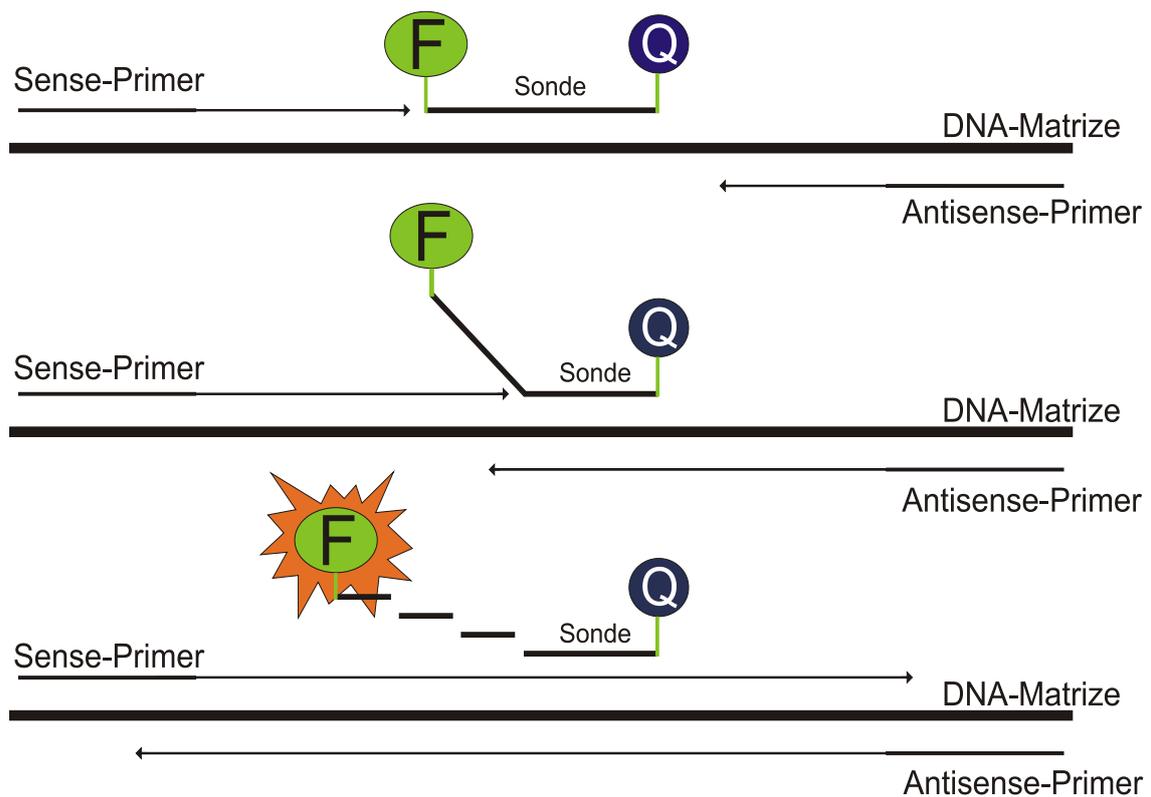


Abbildung 3: Schematische Darstellung des TaqMan-Prinzips:

Durch den Abbau der Sonde durch die Taq-Polymerase kommt es zur Trennung des Quencher-Moleküls (Q) und der Reporter-Fluoreszenz (F). Dies führt zu einem messbaren Fluoreszenzsignal und zeigt die Zielstrangsynthese in der PCR an (modifiziert nach Eurogentec, Seraing/Belgien).

### 3.6.2 Durchführung der Real-Time RT-PCR

Wie in der konventionellen RT-PCR muss zunächst die mRNA in ein geeignetes Template (cDNA) mittels Reverse Transkriptase (RT) umgeschrieben werden. Dies erfolgte wie in Kapitel 3.5.2.1 und 3.5.2.2 beschrieben. Der Reaktionsansatz für die Real-Time RT-PCR, angesetzt in einem 2-ml-Reaktionsgefäß, setzte sich wie in Tabelle 7 beschrieben zusammen.

Tabelle 7: Reaktionsansatz für die Real-Time PCR

Komponenten	Einfacher Ansatz (µl)	Stammlösung
qPCR Master Mix	12,5	2x
Sense-Primer	1,5	5 µM
Antisense-Primer	1,5	5 µM
TaqMan-Sonde	1,0	5 µM
Autoklaviertes Wasser	3,5	
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20</b>	

Zu 20 µl Reaktionsansatz wurden je 5 µl cDNA aus dem RT-Ansatz dazugegeben. Jede Probe wurde im Doppelansatz angesetzt. Als qPCR Master Mix wurde der TaqMan® qPCR Master Mix eingesetzt (Eurogentec, Seraing/Belgien). Die selbst entworfenen Primer und Sonden für ERR2, ErbB3, PRLR (kurze bzw. beide Isoformen) und GHR, welche in Tabelle 8 dargestellt sind, wurden mithilfe der Primer Express Software (Version 2.0, Applied Biosystems, Foster City, CA) ausgewählt. Die verwendeten Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg und die TaqMan-Sonden von der Firma Eurogentec, Seraing/Belgien hergestellt.

**Tabelle 8:** Informationen zu den in der Real-Time RT-PCR verwendeten Primer (for = Vorwärtsprimer; rev = Rückwärtsprimer) und Sonden.

Gen	Quelle*	Basensequenzen	Länge des Amplifikates
GAPDH (Referenzgen)	Schuler et al. (2005)	For: 5'-GCG ATA CTC ACT CTT CTA CCT TCG A - 3' Rev: 5'- TCG TAC CAG GAA ATG AGC TTG AC - 3' Sonde: 5'- CTG GCA TTG CCC TCA ACG ACC ACT T - 3'	82 bp
bPL	Patel et al. (2004)	For: 5'- GCA ACA TTG GTG GCT AGC AA- 3' Rev: 5'- GCC CTC GCC AAA CTG TTT ATT A- 3' Sonde: 5'- CTA TAG GCT CGC CAG GGA AAT GTT CA- 3'	78 bp
ErbB3	EF460505	For: 5'- CAC AGA GTC GCC CGC TCA A- 3' Rev: 5'- CCA CGT CGC CGA TTC ATA TA - 3' Sonde: 5'- AAT GCC AGC ACA ACT CCA GAT GAG GAC T - 3'	91 bp
ERR2	BC111277	For: 5'- CCA TCC AAG GCA ACA TCG A- 3' Rev: 5'- TTG CGC CTC CGT TTC GT- 3' Sonde: 5'- AGC TGC CCG GCC ACC AAT GA- 3'	70 bp
ERα	Schuler et al. (2002)	For: 5'- GCC TCA AAT CCA TCA TCT TGC T - 3' Rev: 5'- CGG TGG ATG TGG TCC TTC TTC TC - 3' Sonde: 5'- CAT CCA TTG CCA GCC GTC AGT TCT G - 3'	101 bp
ERβ	Schuler et al. (2005)	For: 5'- CTC CTG GAC ACC TCT CTC CTT TAG - 3' Rev: 5'- GGT TTC ACG CCA AGG ACT CTT - 3' Sonde: 5'- CAT CCA TTG CCA GCC GTC AGT TCT G - 3'	86 bp

\* Accession-Nr. der verwendeten Nukleotidsequenz bei selbst entwickelten Methoden bzw. Referenz bei der Verwendung publizierter Methoden.

(Fortsetzung s. nächste Seite)

**Tabelle 8:** Informationen zu den in der Real-Time RT-PCR verwendeten Primer (for = Vorwärtsprimer; rev = Rückwärtsprimer) und Sonden (Fortsetzung).

Gen	Quelle*	Basensequenzen	Länge des Amplifikates
GHR	AY748827	For: 5`- AGT CTC CAC AGG GCC TCG TA - 3` Rev: 5`- TGC TCA CAT AGC CAC ATG ATG A - 3` Sonde: 5`- CCT GCC CTT GCC TGA CAA AGA GTT TCT - 3`	84 bp
PRLR (kurze Isoform)	NM_174155	For: 5`-CCA GTT CCA GGG CCA AAA ATA- 3` Rev: 5`- TTA AAA CAT AGA CAC AAG GCG AGA AG- 3` Sonde: 5`- AGG ATT TGA TGT TCA TCT GCT GGA GAT ATC ACA- 3`	84 bp
PRLR (beide Isoformen)	NM_001039726	For: 5`- CCC AGT GAA GGA CAC AAG CA- 3` Rev: 5`- GCC CAG ACC ATA ATC AAA CAG AT- 3` Sonde: 5`- TGG ATC TTT GTG GCC ATC CTT TCT GC- 3`	75 bp

\* Accession-Nr. der verwendeten Nukleotidsequenz bei selbst entwickelten Methoden bzw. Referenz bei der Verwendung publizierter Methoden

Die Durchführung der Real-Time PCR erfolgte mittels des Lightcyclers „ABI PRISM™ 5700 Sequence Detection System“ (Applied Biosystems, Darmstadt) unter Verwendung von 96-well Thermo-Fast® Detection Plates (ABgene, Hamburg).

Die Amplifikation fand unter folgenden Bedingungen statt:

Tabelle 9: Bedingungen der Real-Time PCR

Programmschritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	95°C	10 min	
Denaturierung	95°C	15 sek	40 Wiederholungen
Annealing und Verlängerung	60°C	1 min	

Alle Probenansätze erfolgten im Doppelansatz.

### 3.6.3 Auswertung der Real-Time RT-PCR

Das verwendete  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Verfahren normalisiert zunächst die Zielgen-mRNA-Konzentration relativ zur Expression eines Referenzgens. Das Referenzgen wird auch „Housekeeping Gene“ genannt und sollte ein ubiquitär vorkommendes, in den untersuchten Zellen bzw. im untersuchten Gewebe möglichst konstant exprimiertes Gen sein. In den eigenen Arbeiten wurde Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzgen verwendet. Die Ergebnisse werden dann relativ zur Expression eines Kalibrators dargestellt (relative Genexpression, RGE). Als Kalibrator wird die Probe verwendet, welche die niedrigste Zielgenexpression aufweist.

Die Berechnung der RGE aus den Rohdaten wird wie folgt durchgeführt:

Die Messeinrichtung des für die Real-Time RT-PCR verwendeten Lightcyclers erfasst begleitend zur PCR die Fluoreszenz in den Reaktionsansätzen und bestimmt aus deren Verlauf den Fluoreszenzschwellenwert, den Threshold Cycle oder  $C_T$ -Wert. Da die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe eine gewisse Grundfluoreszenz aufweisen, handelt es sich beim  $C_T$ -Wert um den PCR-Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal die Grundfluoreszenz signifikant überschreitet. Er stellt somit den Zeitpunkt dar, ab dem die Amplifikation und die damit verbundene Bildung von Doppelstrang-cDNA exponentiell sind. Der  $C_T$ -Wert ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der in die Reaktion eingebrachten cDNA-Kopienzahl des entsprechenden Gens, d. h. je mehr cDNA-Template vorhanden ist, desto weniger Zyklen sind erforderlich, um die Grundfluoreszenz zu überschreiten.

Die Bestimmung der relativen Genexpression ergibt sich aus drei aufeinander aufbauenden Berechnungen:

1. Berechnung von  $\Delta C_{T\text{-Zielgen}}$ :

$$\Delta C_{T\text{-Zielgen}} = C_{T\text{-Zielgen}} - C_{T\text{-GAPDH}}$$

Diese Formel berechnet den Unterschied an Thresholdzyklen zwischen dem Zielgen und dem Referenzgen. Dabei wird auf das Housekeeping Gene (GAPDH) normalisiert. Von allen  $C_T$ -Wert-Doppelbestimmungen wird vorher der Mittelwert berechnet.

2. Berechnung von  $\Delta\Delta C_T$ :

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\text{-Zielgen}} - \Delta C_{T\text{-Kalibrator}}$$

Die Darstellung der relativen Genexpression erfolgt in Beziehung zu einem Kalibrator. Als Kalibrator dient die Probe mit der niedrigsten Expression des Zielgens, das bedeutet die Probe mit dem höchsten  $\Delta C_T$ -Wert. Dieser Wert ( $\Delta C_{T\text{-Kalibrator}}$ ) wird nun von den  $\Delta C_T$ -Werten sämtlicher Proben subtrahiert.

3. Berechnung RGE:

Durch den nun ermittelten  $\Delta\Delta C_T$  kann schließlich die relative Genexpression (RGE) berechnet werden:

$$\text{RGE} = 2^{(-\Delta\Delta C_T)}$$

Mit der RGE wird die n-fache Überexpression eines Genes im Vergleich zu der Probe mit der geringsten Expression angegeben (Kalibrator). Da der  $\Delta C_T$  des Kalibrators 0 ist, ergibt sich für ihn ein RGE-Wert von 1.

## **3.7 Immunhistologische Untersuchungen**

Vorbemerkung:

Die Erfassung der Zellproliferation und der Apoptose beschränkte sich auf Proben aus dem Versuch zur Erzeugung von Feten mit Large Offspring Syndrome (siehe Kapitel 3.1), während für den Nachweis des Wachstumshormonrezeptors auch auf das in Kapitel 3.2 beschriebene Probenmaterial zurückgegriffen wurde.

### **3.7.1 Erfassung der Zellproliferation in den Plazentomen durch die immunhistochemische Darstellung des Ki67-Antigens**

Die immunhistochemische Darstellung des Proliferationsmarkers Ki67 erfolgte an ca. 4 µm dicken Schnitten [Mikrotom Leica RM 2125 RT; Leica DB 80L Einmalmesser (Leica Instruments GmbH, Nussloch)], welche auf Adhäsionsobjektträger SuperFrost®Plus (Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig) gezogen wurden. Die Schnitte wurden 2 x 4 min in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe für je 2 x 2 min in absolutem, 95%igem und 70%igem Ethanol rehydriert. Danach wurden die Präparate zunächst 5 min unter fließendem Leitungswasser gespült und im Anschluss daran 5 min in 10 mM Citratpuffer pH 6,0 gewaschen. Zur Epitop-Demaskierung wurden die Schnitte 3 x 5 min in einer Mikrowelle bei 560 Watt in vorgeheiztem Citratpuffer inkubiert und danach 20 min bei Raumtemperatur gekühlt. Anschließend wurden die Schnitte 5 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase wurden sie 30 min in 0,3%igem Wasserstoffperoxid in Methanol inkubiert und danach in einer 5-minütigen Inkubation in ICC-Puffer gewaschen. Die Objektträger wurden danach aus der Küvette entnommen, auf einem Papierhandtuch abgeklopft, mittels fusselreier Papiertücher (Kimwipes, Ladd Industries, Williston) getrocknet und die Gewebeschnitte mit einem PAP-Pen (G. Kisker-Biotech, Schweinfurt) umfahren. Zum Blocken unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden die Schnitte mit 10%igem inaktivierten Pferdeserum (57°C/20 min) überschichtet. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer für 20 min bei Raumtemperatur. Danach wurde die Blockierungslösung abgesaugt und der spezifische Primärantikörper (MIB-1, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), 1:200 verdünnt in ICC-Puffer, auf die Gewebeschnitte pipettiert. In den Negativkontrollen wurde der Primärantikörper durch einen gleichermaßen verdünnten unspezifischen Maus-Isotypen-Kontrollantikörper IgG1 ersetzt. Als Positivkontrolle

diente Darmgewebe. Die Inkubation erfolgte über Nacht (ca. 20 Stunden) bei 4°C in einer feuchten Kammer. Danach wurden die Schnitte 5 min in ICC-Puffer gewaschen, die Objektträger aus dem Puffer entnommen, abgeklopft und abgetrocknet. Es folgte das Auftragen des Sekundärantikörpers (biotinyliertes Pferd-anti-Maus IgG, BA-2000; Vector Laboratories, Burlingame, USA) in einer Verdünnung von 1:200 in ICC-Puffer. Nach Ablauf der 30-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer wurden die Objektträger 5 min in ICC-Puffer gewaschen, abgeklopft, die Schnitte getrocknet und mit Avidin-Biotin-Komplex (aus VECTASTAIN® PK-6101 Rabbit IgG Elite ABC Kit) inkubiert. Der Avidin-Biotin-Komplex war zuvor nach Herstellerangaben in ICC-Puffer angesetzt und bei Raumtemperatur mindestens 30 min vorinkubiert worden. Die Inkubationsdauer bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer betrug 30 min. Anschließend wurden die Schnitte für 5 min in ICC-Puffer gewaschen, abgeklopft, mit der Substratlösung (Nova-RED, Vector Laboratories, Burlingame, USA) überschichtet und dann für 3 min zur Entwicklung des Signals in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abschluss der Substratinkubation wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser gewaschen, zur Gegenfärbung für 2 sec in Hämatoxilin-Lösung getaucht und nochmals für 5 min unter fließendem Wasser gespült. Zum Schluss wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe bestehend aus 95%igem und absolutem Ethanol für je 2 x 2 min sowie in Xylol für 2 x 3 min dehydriert und mittels Histokit (Assistent, Osterode) eingedeckelt.

Aus jeder Trächtigkeit wurden zwei Schnitte eines Plazentoms in die Auswertung einbezogen. Für jeden der folgenden vier Zelltypen wurden pro Schnitt 1000 Zellen beurteilt und als positiv oder negativ klassifiziert:

- Trophoblast
- Stroma der Chorionzotten
- Karunkelepithel
- Karunkelstroma

Berechnet wurde der prozentuale Anteil Ki67-Antigen-positiver Zellen und der sich aus der Bewertung der beiden Schnitten eines Plazentoms ergebende Mittelwert.

### **3.7.2 Erfassung der Apoptose in den Plazentomen durch die immunhistochemische Darstellung der aktivierten Caspase 3**

Die immunhistochemische Darstellung der aktivierten Caspase 3 erfolgte nach dem in Abschnitt 3.7.1 beschriebenen Verfahren. Als Primärantikörper wurde ein monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen die menschliche aktivierte Caspase 3 (C92-605, BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg) in einer Verdünnung von 1:50 in ICC-Puffer verwendet. Blockierungsserum, biotinylierter Sekundärantikörper und Avidin-Biotin-System entstammten dem VECTASTAIN® PK-6101 Rabbit IgG Elite ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA). In den Negativkontrollen wurde der spezifische Primärantikörper durch verdünntes inaktiviertes Serum (57°C/20 min) eines nicht immunisierten Kaninchens ersetzt. Als Positivkontrolle wurde Lymphgewebe verwendet.

Die Auswertung der Färbereaktion erfolgte lichtmikroskopisch bei 200-facher Vergrößerung. Von jedem Tier kamen je zwei Schnitte zur Auswertung. Pro Schnitt wurden zehn Gesichtsfelder durchmustert und die positiven Farbreaktionen gezählt. Anhäufungen kleinerer positiver Zelltrümmer, die offensichtlich dem apoptotischen Zerfall einer Zelle entsprangen, wurden als ein apoptotisches Ereignis gewertet. Abschließend wurde aus den jeweils in den beiden Schnitten eines Plazentoms ermittelten apoptotischen Ereignissen der Mittelwert gebildet.

### **3.7.3 Immunhistochemischer Nachweis des Wachstumshormon-Rezeptors (GHR)**

Der immunhistochemische Nachweis des GHR erfolgte in Anlehnung an die von Kölle et al. (1997) publizierte Methode. Die Untersuchungen zur GHR-Expression im Zusammenhang mit dem Large-Offspring-Syndrom wurden an formalinfixiertem Gewebe und zur Charakterisierung der GHR-Expression in Rinderplazentomen im Verlauf der normalen Gravidität an Bouin-fixiertem Gewebe durchgeführt. Zum Entparaffinieren wurden die ca. 4 µm dicken Schnitte 3 x 10 min in Xylol inkubiert. Es folgte die Rehydrierung der Gewebeschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe. Die Inkubation dauerte in absolutem Ethanol 2 x 5 min, in 90%-, 80%- und 70%igem jeweils 5 min. Danach wurden die Schnitte 5 min in destilliertem Wasser gewaschen. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte 30 min in 0,3%igem Wasserstoffperoxid in eiskaltem Methanol inkubiert und anschließend

3 x 5 min in PBS-Puffer gewaschen. Eine Permeabilisierung der Präparate erfolgte für 5 min in 70 ml PBS-Puffer, der mit 1 g BSA und 21 µl Triton versetzt war. Die Objektträger wurden danach aus der Küvette entnommen, wie in Kapitel 3.7.1 beschrieben abgeklopft, getrocknet und mit dem PAP-Pen (G. Kisker-Biotech, Schweinfurt) umfahren. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte mit 10%igem Ziegen Serum (aus VECTASTAIN® PK-6101 Rabbit IgG Elite ABC Kit) in einer Verdünnung von 1:20 überschichtet und dann 20 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Blockierungslösung abgesaugt. Der Primärantikörper mAB 263, welcher gegen ein Spezies übergreifend konserviertes Epitop des GHR gerichtet war (Barnard et al. 1985), wurde in einer Verdünnung von 1:400 in PBS-Puffer aufgetragen. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer bei 4°C für mindestens 20 h. Es folgte eine Waschung der Schnitte für 3 x 5 min in PBS-Puffer. Die Schnitte wurden danach abgeklopft, getrocknet und mit einem polyklonalen biotinylierten Ziege-anti-Maus-Ig Sekundärantikörper (E0433, DakoCytomation, Glostrup/Dänemark) in einer Verdünnung 1:250 in PBS überschichtet und für 45 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Schnitte wurden danach erneut 3 x 5 min in PBS-Puffer gewaschen, abgeklopft, abgetrocknet und mit einem Avidin-Biotin-Komplex (aus VECTASTAIN® PK-6101 Rabbit IgG Elite ABC Kit) inkubiert. Der Avidin-Biotin-Komplex war zuvor nach Herstellerangaben in PBS-Puffer angesetzt und bei Raumtemperatur mindestens 30 min vorinkubiert worden. Die Inkubationsdauer bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer betrug 45 min. Die Präparate wurden anschließend 3 x 5 min in PBS-Puffer gewaschen. Die Signalentwicklung erfolgte mittels eines Peroxidase-Substrats (AEC-Kit, BIOLOGO, Dr. H. Schultheiß e.K., Kronshagen). Die Entwicklungsdauer betrug 5 min. Danach wurden die Schnitte 5 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen, kurz mit Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt, erneut 5 min unter fließendem Wasser gewaschen und zum Schluss mit Kaisers Glycerin-Gelatine (Merck KGaA, Darmstadt) eingedeckelt. Die Auswertung der Gewebeschnitte erfolgte deskriptiv.

## **3.8 Quantitative Erfassung verschiedener Trophoblastzelltypen nach Lektin-Histochemie**

### **3.8.1 Färbeprotokoll**

Der lektinhistochemische Nachweis glykoprotein-haltiger Granula in den sich differenzierenden und reifen Trophoblastriesenzellen wurde in Anlehnung an das von Klisch und Leiser (2003) beschriebene Verfahren an formalinfixierten Gewebeproben durchgeführt. Die Schnittdicke betrug 4 µm. Zum Entparaffinieren wurden die Schnitte 2 x 4 min in Xylol inkubiert. Anschließend folgte die Rehydrierung der Schnitte in absolutem, 95%igem und 70%igem Ethanol für je 2 x 2 min. Danach wurden die Präparate 5 min unter fließendem Wasser gespült und in ICC-Puffer für 5 min gewaschen. Die Objektträger wurden dann auf einem Papierhandtuch abgeklopft, mittels fusselreier Papiertücher (Kimwipes, Ladd Industries, Williston) getrocknet und die Gewebeschnitte mit einem PAP-Pen (G. Kisker-Biotech, Schweinfurt) umfahren. Anschließend wurde biotinyliertes Lektin aus Dolichos Biflorus (Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf) in einer Verdünnung von 1:200 in ICC-Puffer aufgetragen und die Schnitte bei Raumtemperatur für 45 min inkubiert. Danach wurden sie erneut für 5 min in ICC-Puffer gewaschen, abgeklopft, getrocknet und mit dem Avidin-Biotin-Komplex Komplex (aus VECTASTAIN® PK-6101 Rabbit IgG Elite ABC Kit) überschichtet. Das Ansetzen des Avidin-Biotin-Komplexes erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Inkubationszeit in einer feuchten Kammer betrug 30 min. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Schnitte erneut in ICC-Puffer gewaschen, abgeklopft, getrocknet und mit der nach Herstellerangaben vorbereiteten Substratlösung (Nova-RED®, Vector Laboratories, Burlingame, USA) überschichtet. Die 3-minütige Entwicklung der Signale fand in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur statt. Die Schnitte wurden danach unter fließendem Wasser gewaschen, zur Gegenfärbung für 2 sec in Hämatoxilin-Lösung getaucht und nochmals für 5 min unter fließendem Wasser gespült. Zum Schluss wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe bestehend aus 95%igem und absolutem Ethanol für je 2 x 2 min, sowie in Xylol für 2 x 3 min dehydriert und mittels Histokit (Assistent, Osterode) eingedeckelt.

### 3.8.2 Auswertung der lektinegefärbten Gewebeschnitte

Die Auswertung der Färbereaktion erfolgte lichtmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung. Von jedem Tier kamen jeweils zwei Schnitte, die von einem Paraffinblock stammten, zur Auswertung. Anhand ihrer Morphologie sowie der Menge und Färbintensität zytoplasmatischer Granula wurden pro Schnitt 1000 Trophoblastzellen folgenden Kategorien zugeordnet (s. Abb. 5 in Abschnitt 4.1.3):

1. reife (mature) Trophoblastriesenzellen (mTGC): große Trophoblastzellen mit einem oder zwei großen Kernen in der Schnittebene; Zytoplasma (fast) vollständig mit intensiv gefärbten, sich überlagernden Granula gefüllt
2. unreife (immature) TGC (iTGC): Trophoblastzellen variabler Zell- bzw. Kerngröße mit einem oder zwei Kernen in der Schnittebene; einzeln liegende, schwach bis mäßig gefärbte Granula füllen meist nur einen Teil des Zytoplasmas aus
3. einkernige Trophoblastzellen (Uninucleated Trophoblast Cells, UTC): = kleinere, variabel geformte einkernige Trophoblastzellen mit „normal“ großem Zellkern ohne angefärbte Granula

Abschließend wurde aus den beiden untersuchten Schnitten eines Plazentoms für die o.g. Trophoblastzell-Kategorien die Mittelwerte gebildet und die prozentualen Anteile bezogen auf die Gesamtzahl der Trophoblastzellen errechnet.

### 3.9 Statistische Auswertungen

Die statistischen Berechnungen wurden von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung, Fachbereich Veterinärmedizin Justus-Liebig-Universität Gießen, unter Beratung von Herrn Dr. K. Failing durchgeführt.

Die am Institut für Tierzucht, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft in Grub erhobenen Daten bezüglich der erzeugten Feten wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Hiendler für statistische Berechnungen im Zusammenhang mit den hier erhobenen Daten zur Verfügung gestellt.

Zur Prüfung auf einen Einfluss der Versuchsgruppe, des fetalen Geschlechts und der Fetenzahl (Einlings- bzw. Zwillingsgravidität) auf die fetale Scheitel-Steiß-Länge (SSL), auf den maximalen Brustumfang ( $BU_{max}$ ), das fetale Gewicht sowie auf den Quotienten  $BU_{max}/SSL$  wurde eine dreifaktorielle Varianzanalyse ohne Wechselwirkungen durchgeführt (Software BMDP2V).

Die Daten aus der Real-Time RT-PCR (mRNA-Konzentrationen in den Plazentomen), der Hormonkonzentrationen und der Immunhistochemie wurden zur Prüfung auf einen Einfluss der Versuchsgruppe einfaktoriellen Varianzanalysen unterzogen (BMDP2V).

Beim Auftreten von Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) wurden paarweise Gruppenvergleiche mittels des Tukey-Tests durchgeführt (BMDP7D). Ohne Berücksichtigung der Versuchsgruppe wurden weiterhin Korrelationsanalysen auf einen Zusammenhang zwischen den Hormonkonzentrationen in den Fruchtwässern, der Verteilung der Trophoblastzelltypen, der Zelldynamik und der Genexpression mit den Parametern zu Größe (SSL,  $BU_{max}$ ), Gestalt ( $BU_{max}/SSL$ ) und Gewicht der Feten durchgeführt. Beim Auftreten signifikanter Korrelationen wurden Regressionskoeffizient und –gerade berechnet (BMDP6D).

Bei einem Teil der Parameter wiesen die entsprechenden Daten eine rechtsschiefe Verteilung auf. In diesen Fällen wurden die Daten vor der statistischen Bearbeitung logarithmiert und die Ergebnisdarstellung erfolgte als geometrischer Mittelwert ( $\bar{X}_g$ ) x Streufaktor (SF)<sup>±1</sup>. Bei normal verteilten Daten wurden die statistischen Bearbeitungen ohne vorherige Transformation durchgeführt und die Ergebnisse als arithmetischer Mittelwert ± Standardabweichung ( $\bar{X} \pm SD$ ) dargestellt.

### 3.10 Alphabetische Liste der verwendeten Puffer, Lösungen, Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

#### 3.10.1 Puffer und Lösungen

##### Bouinsche Lösung

gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung	750 ml
Formol (ca. 35 %-ig)	250 ml
Eisessig	50 ml
unmittelbar vor Gebrauch ansetzen	

##### 10 mM Citratpuffer für die Mikrowellenbehandlung der Gewebeschnitte (pH 6,0)

###### Stammlösung A: 0,1 M Zitronensäure:

$C_6H_8O_7 \times H_2O$	21 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

###### Stammlösung B: 0,1 M Tri-Natriumcitrat:

$C_6H_5O_7Na_3 \times 2H_2O$	29,41 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

###### Gebrauchslösung:

Stammlösung A	9 ml
Stammlösung B	41 ml
Aqua bidest.	450 ml

##### Ethanol (Alkohol)-Reihe für die Entparaffinierung von Gewebeschnitten

% Ethanol	95	90	80	70
Ethanol reinst (100%)	95 ml	90 ml	80 ml	70 ml
Aqua dest.	5 ml	10 ml	20 ml	30 ml

**Formaldehyd 4%ig, gepuffert, pH 7,0 für die Gewebefixierung (Formol nach Lillie)**

Formol (ca. 40%ige wässrige Formaldehyd-Lösung)	500 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	32,5 g
Aqua bidest.	ad 5000 ml

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung 0,3 %ig zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase**

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%ig	2 ml
Aqua bidest.	ad 200 ml

**ICC-Puffer (pH 7,45) für die Immunhistologie**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
KCl	0,2 g
NaCl	8,0 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Nach der pH-Kontrolle Zugabe von 3 ml Triton X-100.

**Kohlesuspension für die Trennung von freien und antikörpergebundenen Steroiden im Radioimmunoassay**

Holzkohle (Norit A)	2,5 g
Dextran 60	0,25 g
Aqua dest.	ad 500 ml

**PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7,2 für die Immunhistochemie**

10 x Stammlösung:

NaCl	82 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	22 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,5 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

### **PBS-Gebrauchslösung (1x PBS)**

10 x PBS	100 ml
Aqua bidest.	ad 1000 ml

### **0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2 für die Aufbewahrung von Gewebeproben nach Formalin-Fixierung**

#### Lösung 1:

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,8 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

#### Lösung 2:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	17,8 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

#### Gebrauchslösung:

Lösung 1	28,3 ml
Lösung 2	71,7 ml

### **10x Tris-Borsäure-EDTA-Puffer pH 8,8 (10x TBE-Puffer) für die Agarose-Gelelektrophorese**

Tris-Base	108 g
Borsäure	55 g
0,5 M EDTA pH 8,8	40 ml
Aqua bidest	ad 1000 ml

#### Gebrauchslösung: 1 x TBE-Puffer

10 x TBE-Puffer	100 ml
Aqua bidest.	ad 1000 ml

### 3.10.2 Reagenzien

- ABC-Komplex: VECTASTAIN<sup>®</sup> Elite ABC-Kit, PK-6101, Rabbit IgG, (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- Agarose Multi-Purpose (Roche Applied Science, Mannheim)
- Arylsulfatase aus *Helix pomatia* 5 U/mg (Boehringer Mannheim GmbH)
- BA2000; Horse anti mouse IgG biotinylated antibody (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- Borsäure, Pufferan<sup>®</sup> (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe)
- Bovines Serum Albumin (Sigma, Deisenhofen)
- Chloroform (Roth GmbH & Co., Karlsruhe)
- Dextran 60 (Serva, Heidelberg)
- Di-Natriumhydrogenphosphat reinst (Merck KGaA, Darmstadt)
- Di-Natriumhydrogenphosphat (Merck KGaA, Darmstadt)
- 100bp DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- DNase 1, RNase-free, 10 U/μl (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)
- Eisessig 100% wasserfrei (Merck KGaA, Darmstadt)
- Essigsäure 1 N (Merck KGaA, Darmstadt)
- 2,4,6,7-<sup>3</sup>H-Estron, spezifische Aktivität: 3,52 TBq/mmol (Amersham Biosciences, UK)
- Ethanol 99,6%, DAB 10 (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe)
- Ethidiumbromidlösung 1% (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe)
- Ethylendiamin-Tetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe)
- Formaldehyd (Merck KGaA, Darmstadt)
- Gene Amp Gold RNA PCR Core Kit<sup>®</sup> (Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt)
- β-Glucuronidase 5,3 U/ml (Serva, Heidelberg)
- Hämatoxilin (Merck KGaA, Darmstadt)
- Hexan (Merck KGaA, Darmstadt)
- Histokit (Assistent, Osterode)
- Holzkohle Norit A, Partikelgröße 4-7 μm (Serva, Heidelberg)
- Isopropanol (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe)
- Kaisers Glycerin-Gelatine (Merck KGaA, Darmstadt)

- Kaliumchlorid (Merck KGaA, Darmstadt)
- Kaliumphosphat monobasisch (Fluka, Neu-Ulm)
- Kaliumhydrogenphosphat (Fluka Chemie GmbH, Buchs)
- 6x Loading Dye (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- Magnesiumchlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Methanol (Merck KGaA, Darmstadt)
- Natriumazid (Merck KGaA, Darmstadt)
- Natriumchlorid (Fluka, Neu-Ulm)
- Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat (Merck KGaA, Darmstadt)
- Natriumhydroxid (Merck KGaA, Darmstadt)
- Peroxidase Kit: Vector<sup>®</sup> Nova-Red (Linearis Biologische Produkte GmbH, Wertheim)
- Peroxidase-Substrat AEC-Kit (BIOLOGO, Dr. Hartmut Schultheiß e.K., Kronshagen)
- 1,2,6,7-<sup>3</sup>H-Progesteron, spezifische Aktivität: 3,8 TBq/mmol (Perkin Elmer Life and Analytical Science, Boston/USA)
- RNase-Away (Molecular Bioproducts, San Diego, USA)
- RNase-Inhibitor, 40 U/µl (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- Szintillationsflüssigkeit Aquasafe 300 Plus (Zinnser Analytik GmbH, Frankfurt/Main)
- Toluol (Merck KGaA, Darmstadt)
- Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck KGaA, Darmstadt)
- TRIS: Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Fluka, Neu-Ulm)
- Triton 100 (Serva, Heidelberg)
- Trizol<sup>®</sup> (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe)
- Wasserstoffperoxid, 30 %-ig (Merck KGaA, Darmstadt)
- Zitronensäure-Monohydrat (Merck KGaA, Darmstadt)

### **3.10.3 Verbrauchsmaterialien**

- Einweg-Reaktionsgläser 75x11,5 mm (Sarstedt AG + Co, Nümbrecht)
- Handschuhe UniGloves® (MAGV Laborbedarf + Laborgeräte, Rabenau-Londorf)
- Papiertücher Kimwipes (Ladd Industries, Williston)
- PAP-Pen (G. Kisker–Biotech, Steinfurt)
- PCR-Tubes 0,5 ml, ultradünn, RNase-/DNase-Pyrogenfrei (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf)
- Reaktionsgefäße 2 ml (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf)
- Schraubverschlüsse für Wheaton-Extraktionsgläser (Zinsser Analytik, GmbH, Frankfurt)
- Thermo-Fast® Detection Plate (ABgene, Hamburg)
- Uvette® (Eppendorf AG, Hamburg)
- Wheaton–Extraktionsgläser 15 ml (Wheaton Scientific, New Jersey/USA), bezogen über Zinsser Analytik GmbH, Frankfurt)
- Zählfläschchen 6 ml für die Flüssig-Szintillation aus Polyäthylen „Minis 2000“ (Fa. Zinsser Analytik GmbH, Frankfurt)

### **3.10.4 Geräte**

- Diluter-Dispenser „Multilutor DIG“ (Fa. Rudolf Brand GmbH + Co KG, Wertheim)
- Einbettungsautomat (Microm Laborgeräte GmbH, Heidelberg)
- Eppendorf Biophotometer (Eppendorf AG, Hamburg)
- Flachgel-Elektrophoresekammer Midi 100 x 150 mm, Gießkammer und Kamm (Keutz Labortechnik GmbH, Reiskirchen)
- Laborwasseraufbereitungsanlagen: Aqua demineralisata Seral-Anlage mit angeschlossener Millipore-Reinigungsanlage „Milli Q“, Water Purification System, Typ MQ 4-fach UF (Millipore GmbH, Eschborn)
- Magnetrührer MR 2002 (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Kelheim)
- Paraffinausgießstation „Histoembedder EG 1160“ (Leica Instruments GmbH, Nussloch)
- pH-Meter (MAGV Laborbedarf + Laborgeräte, Rabenau-Londorf)
- Schüttler Heidolph Polymax 1040 (MAGV Laborbedarf + Laborgeräte, Rabenau-Londorf)

- Schüttelautomat-Rotationsmischer (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Kelheim)
- Ultra-Turrax<sup>®</sup> T-8 mit Dispergierwerkzeug S8 N-5g (IKA-Werke GmbH, Staufen)
- UV-Lampe UVGL-25 (UVP, San Gabriel, USA)
- UV-Transluminator mit Bildbearbeitungssoftware Phoretix Grabber 3.01 (Biostep GmbH, Jahnsdorf)
- Vakuumpumpe KNF Neuber, Typ 035.1.2 AN. 18 (KNF Neuberger, Freiburg)
- Vortexer Heidolph REAX control (MAGV Laborbedarf + Laborgeräte, Rabenau-Londorf)
- Vortex-Evaporator (Fa. Haake Buchler GmbH, Karlsruhe)
- Waagen „Mettler AE160“ und „Mettler PJ 300“ F.Nr.33650 (Mettler Toledo, Gießen)
- Wasserbad Typ WB-24 (Medax Nagel, KG Kiel)
- Wasserbad GFL 1083 (Bezug: MAGV Laborbedarf + Laborgeräte, Rabenau-Londorf)
- Wärmeschrank Memmert Typ 3 26, F. Nr. 340 073, 220 V, 380 W, 50/60 Hz, Din 12880-Kl. 0, Nenntemp.: 70°C, Schutzart Din 40050-IP20 (Schwabach)
- Zentrifuge Mikro 22R (Hettich, Tuttlingen)
- Zentrifuge Varifuge 0-6000 U/min (Fa. Heraeus Christ GmbH, Hanau)

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Ergebnisse der Untersuchungen zu Störungen von Wachstum und Differenzierung der Plazentome beim Large Offspring Syndrome des Rindes**

#### **4.1.1 Angaben zu den IVP- bzw. MOET-Trächtigkeiten sowie den resultierenden Feten**

Die am Institut für Tierzucht, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft in Grub erhobenen Daten zu den IVP- bzw. MOET-Trächtigkeiten sowie den resultierenden Feten wurden von Herrn Prof. Dr. Hiendler für Auswertungen im Rahmen der eigenen Arbeiten zur Verfügung gestellt (s. Tabelle 10).

Zum Zeitpunkt der Schlachtung am 80. Trächtigkeitstag standen für die IVP1- und die MOET-Gruppe jeweils fünf und für die IVP2-Gruppe sechs intakte Trächtigkeiten zur Verfügung. Durch die gehäuften Zwillingsgraviditäten resultierten daraus in allen Versuchsgruppen jeweils acht Feten. In den beiden IVP-Gruppen waren die Feten überwiegend männlichen Geschlechts, während in der MOET-Gruppe das Geschlechterverhältnis annähernd ausgeglichen war.

Der Einfluss der Versuchsgruppe (IVP1, IVP2, MOET) war in der dreifaktoriellen Varianzanalyse für alle erfassten Parameter signifikant (s. Tabelle 10).

In paarweisen Gruppenvergleichen mittels Tukey-Test waren die Feten der beiden IVP-Gruppen deutlich länger ( $p$  jeweils  $< 0,001$ ) und schwerer ( $p$  jeweils  $< 0,01$ ) als die Feten der MOET-Gruppe, sie wiesen einen größeren maximalen Brustumfang auf ( $p$  jeweils  $< 0,01$ ) und der Quotient aus maximalem Brustumfang und Scheitel-Steiß-Länge ( $BU_{max}/SSL$ ) war in den IVP-Gruppen signifikant kleiner ( $p$  jeweils  $< 0,001$ ), d. h., die IVP-Feten wiesen eine schlankere Gestalt auf als die Kontrollfeten. Zwischen den beiden IVP-Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Die Zahl der Feten (Einlings- gegenüber Zwillingsgravidität) zeigte einen Einfluss auf die Parameter SSL ( $p < 0,05$ ),  $BU_{max}$  ( $p < 0,05$ ) und Gewicht ( $p < 0,01$ ), nicht hingegen auf  $BU_{max}/SSL$  (s. Tabelle 10). Feten aus Zwillingsgraviditäten waren kürzer, leichter und hatten einen geringeren maximalen Brustumfang. Ein Einfluss des fetalen Geschlechts ergab sich nur für den Parameter  $BU_{max}/SSL$  ( $p < 0,05$ ).

**Tabelle 10:** Angaben zu den Feten aus Trächtigkeiten nach konventionellem Embryotransfer (MOET) sowie nach Transfer in vitro produzierter Embryonen bei Anwendung der Protokolle IVP1 und IVP2; Alter der Feten: 80 Tage.

SSL = Scheitel-Steiß-Länge, BU<sub>max</sub> = maximaler Brustumfang, p = Irrtumswahrscheinlichkeiten aus einer dreifaktoriellen Varianzanalyse zum Einfluss der Versuchsgruppe (Gruppe), dem fetalen Geschlecht (Sex) und der Fetenzahl (E/Z, Einlings- vs. Zwillingsgravidität).

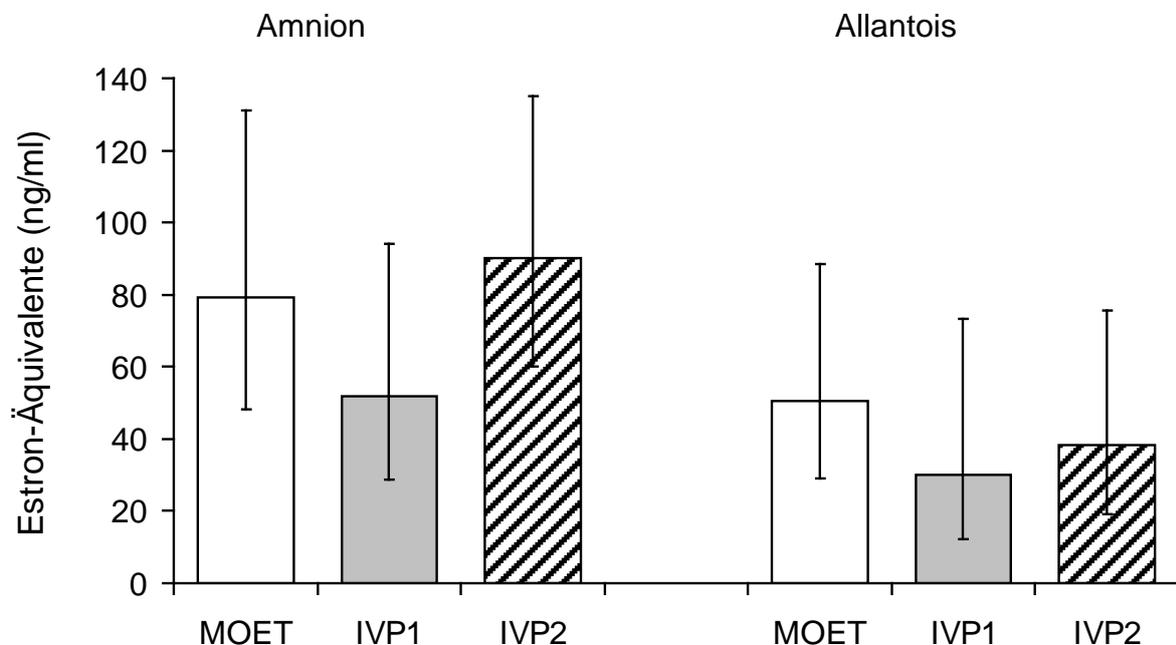
Gruppe	Nr. Träger tier	Zahl der Feten	fetales Geschlecht	SSL (cm)	BU <sub>max</sub> (cm)	BU <sub>max</sub> SSL	Gewicht (g)	
IVP1	1.1	1	m	14,4	10,2	0,711	103,3	
	1.2	2	m	14,6	10,4	0,712	105,2	
			w	14,8	9,7	0,658	92,0	
	1.3	2	m	14,5	10,0	0,690	97,7	
			m	14,1	9,5	0,673	85,6	
	1.4	1	m	15,3	10,6	0,693	121,0	
	1.5	2	m	13,5	9,4	0,696	85,8	
			m	12,6	8,4	0,663	71,5	
				$\bar{X}$	14,2	9,8	0,687	95,3
				<b>SD</b>	0,8	0,7	0,019	14,1
IVP2	2.1	1	m	14,1	10,1	0,715	93,3	
	2.2	1	m	15,6	10,5	0,675	115,4	
	2.3	2	m	13,1	9,0	0,687	77,3	
			w	12,7	8,6	0,676	63,4	
	2.4	1	m	15,1	10,3	0,682	117,7	
	2.5	2	m	14,0	9,8	0,700	94,8	
			w	14,1	10,0	0,709	97,7	
	2.6	1	m	15,1	10,3	0,681	105,0	
				$\bar{X}$	14,2	9,8	0,691	95,6
				<b>SD</b>	0,9	0,6	0,014	17,1
MOET	3.1	2	w	10,6	8,3	0,783	58,9	
			m	11,0	9,2	0,840	72,9	
	3.2	1	m	11,0	9,3	0,841	78,2	
			w	10,7	8,6	0,808	65,2	
	3.3	2	w	11,0	8,2	0,741	58,8	
			w	10,9	8,3	0,761	61,7	
	3.4	1	w	10,9	8,3	0,761	61,7	
			m	11,0	9,0	0,814	64,9	
	3.5	2	m	11,0	9,0	0,814	64,9	
			w	11,3	9,1	0,804	62,3	
			$\bar{X}$	10,9	8,7	0,799	65,4	
			<b>SD</b>	0,2	0,4	0,033	6,4	
			<b>p Gruppe</b>	0,000	0,017	0,000	0,001	
			<b>p Sex</b>	0,985	0,209	0,017	0,257	
			<b>p E/Z</b>	0,015	0,048	0,706	0,006	

#### 4.1.2 Hormonkonzentrationen in den Fruchtwässern

Die Konzentrationen der konjugierten Gesamtöstrogene in den Fruchtwässern wiesen innerhalb einer Gruppe erhebliche Unterschiede auf (s. Abb. 4). Im Mittel waren sie sowohl in der Amnion- als auch in der Allantoisflüssigkeit in der IVP1-Gruppe niedriger als in der MOET- und der IVP2-Gruppe. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant.

Zwischen den Konzentrationen der konjugierten Gesamtöstrogene und den fetalen Größenparametern ergaben sich keine statistisch signifikanten Korrelationen.

Die Konzentrationen der freien Gesamtöstrogene sowie von Progesteron lagen in allen untersuchten Proben unterhalb der Nachweisgrenze von 0,1 ng/ml.



**Abbildung 4:** Konzentrationen konjugierter Gesamtöstrogene in der Amnion- bzw. Allantoisflüssigkeit von Rinderfeten der MOET-, IVP1- und IVP2-Gruppe. Die Messergebnisse (in Estron-Äquivalenten) sind als geometrischer Mittelwert x Streufaktor<sup>±1</sup> dargestellt.

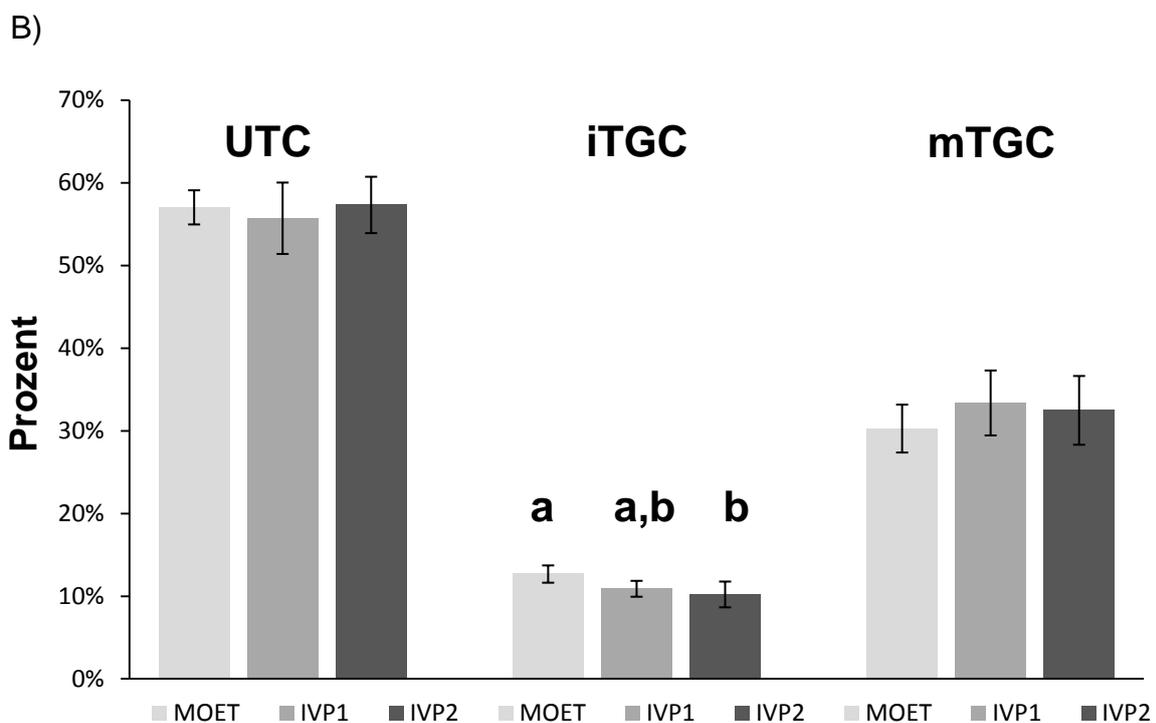
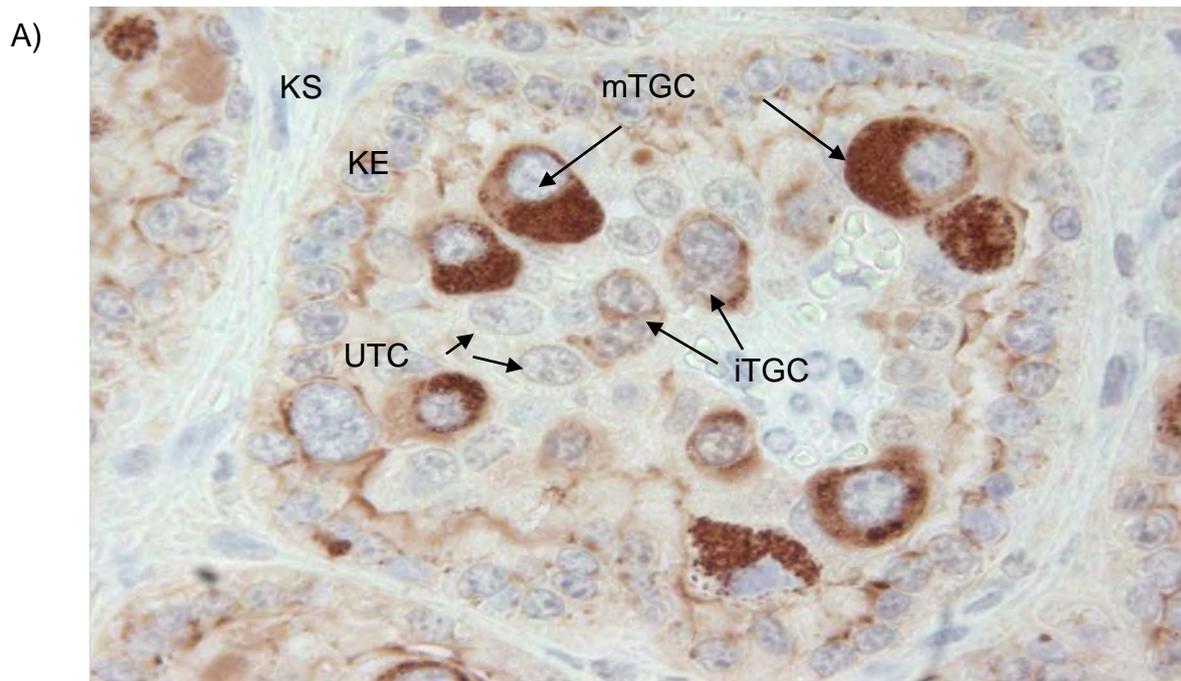
### 4.1.3 Verteilung der Trophoblastzelltypen

Während sich für die prozentualen Anteile der einkernigen Trophoblastzellen (UTC) und der reifen Trophoblastriesenzellen (mTGC) keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede ergaben, war für die Anteile der unreifen Trophoblastriesenzellen (iTGC) der Einfluss der Versuchsgruppe statistisch signifikant ( $p=0,032$ ). Der prozentuale Anteil der iTGC an der Gesamtzahl der Trophoblastzellen war in der MOET-Gruppe mit ca. 13 % signifikant höher ( $p < 0,05$ ) als in der IVP2-Gruppe, mit ca. 11 % war die IVP1-Gruppe nicht unterschiedlich von der MOET- bzw. IVP2-Gruppe (s. Abb. 5).

Bei der Korrelationsanalyse ergab sich eine signifikante negative Korrelation zwischen dem Anteil der iTGC und der fetalen Scheitel-Steiß-Länge (SSL) sowie dem maximalen fetalen Brustumfang ( $BU_{max}$ ). Zwischen iTGC und dem Quotienten  $BU_{max}/SSL$  (s. Tabelle 11) zeigte sich eine signifikante positive Korrelation.

**Tabelle 11:** Ergebnisse der Korrelationsanalyse auf einen Zusammenhang zwischen dem prozentualen Anteil unreifer Trophoblastriesenzellen an den Trophoblastzellen insgesamt und der fetalen Scheitel-Steiß-Länge (SSL), dem maximalen Brustumfang ( $BU_{max}$ ), dem Quotienten  $BU_{max}/SSL$  und dem fetalen Gewicht.  $p$  = Irrtumswahrscheinlichkeit,  $R$  = Korrelationskoeffizient, n.s. = nicht signifikant.

Parameter	p	R	Regressionsgerade
SSL	0,024	-0,56	$y = -0,61x + 20,1$
$BU_{max}$	0,044	-0,51	$y = -0,237x + 12,2$
$BU_{max}/SSL$	0,046	0,51	$y = 0,017x + 0,53$
Gewicht	n.s.	---	---



**Abbildung 5:** A) Definition verschiedener Trophoblastzelltypen nach ihrer Morphologie und Anfärbarkeit mittels Lektin-Histochemie (Dolichos Biflorus). UTC = einkernige Trophoblastzellen, iTGC = unreife Trophoblastriesenzellen, mTGC = reife Trophoblastriesenzellen; KS = Karunkelstroma, KE = Karunkelepithel.  
B) Prozentuale Anteile ( $\bar{X} \pm SD$ ) der UTC, iTGC und mTGC in Placentomen der Gruppen MOET, IVP1 und IVP2. Werte mit unterschiedlicher Beschriftung unterscheiden sich mit  $p < 0,05$ .

#### 4.1.4 Zelldynamik in den Plazentomen

Die Häufigkeit apoptotischer Zellen (Anzahl/mm<sup>2</sup>) war im Mittel in der MOET-Gruppe (181,1±62,5) deutlich niedriger als in den beiden IVP-Gruppen (IVP1: 314,0±96,7; IVP2: 290,0±127,2), aufgrund der großen Streuung der Messwerte innerhalb der Versuchsgruppen in Relation zu den Gruppengrößen war dieser Unterschied jedoch nicht statistisch signifikant (s. Tabelle 12 und Abb. 6). Wurden in einer explorativen Datenanalyse die Messwerte der beiden IVP-Gruppen gepoolt und mittels T-Test mit der MOET-Gruppe verglichen, ergab sich ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,040$ ). Bei der Analyse auf einen Zusammenhang zwischen der Apoptose-Häufigkeit in den Plazentomen und fetalen Größenparametern unter Einbeziehung aller Trächtigkeiten ergab sich für den Quotienten  $BU_{\max}/SSL$  eine signifikante negative Korrelation ( $p = 0,020$ ,  $R = -0,58$ ; Regressionsgerade:  $y = -0,0004x + 0,80$ ).

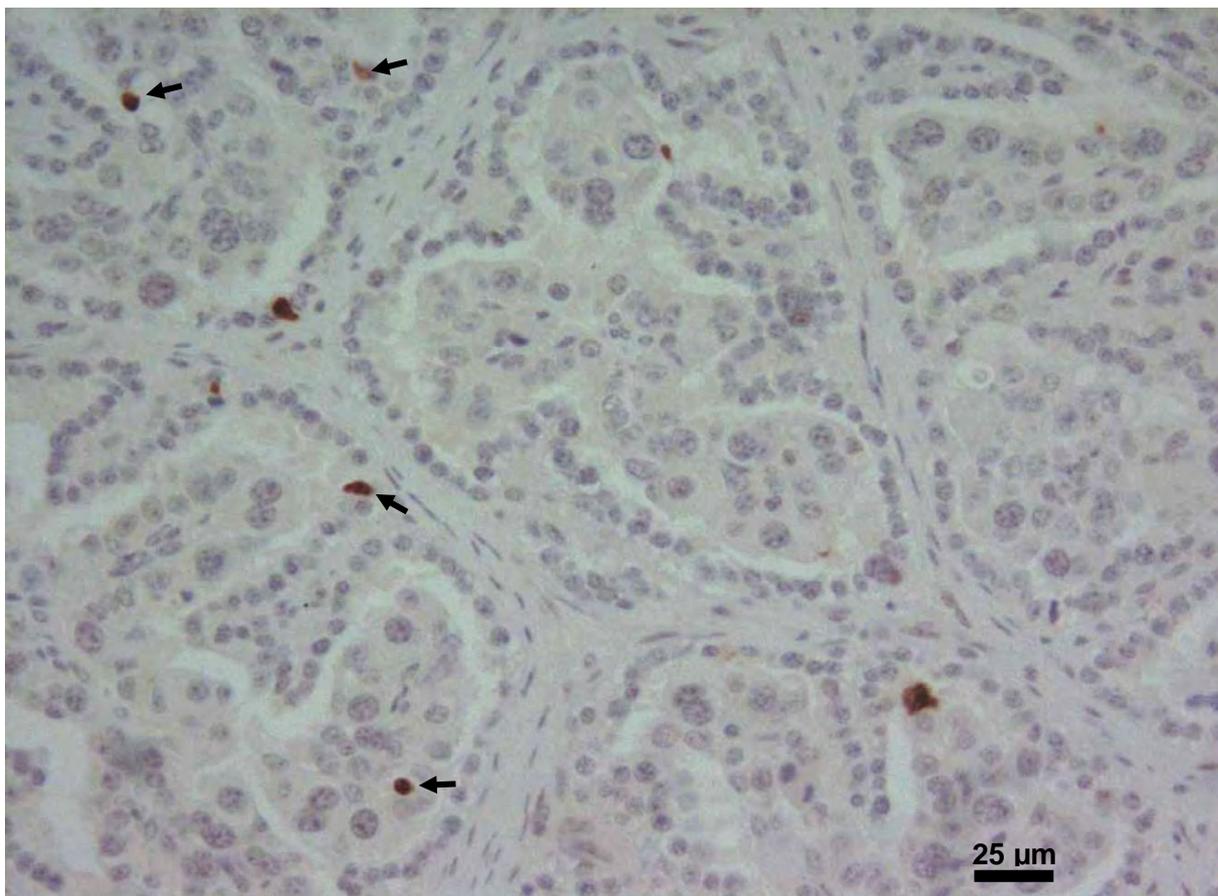


Abbildung 6: Darstellung der Apoptose in einem Plazentom eines Rindes der IVP1-Gruppe mittels Immunfärbung für die aktivierte Caspase 3. Größere positive Reaktionen treten häufig im Karunkelepithel auf, wo invasive Trophoblastriesenzellen in die Degeneration eintreten. Meist kleinere positive Anfärbungen finden sich im Trophoblasten (Pfeile), wobei es

sich offensichtlich überwiegend um phagozytierte Reste aus dem Karunkelepithel abgeschilfter Zellen (invasive Trophoblastriesenzellen und Karunkelepithelzellen) handelt.

Tabelle 12: Zelldynamik in Rinderplazentomen der Gruppen MOET, IVP1 und IVP2. Zur Identifikation apoptotischer Zellen wurde der immunhistologische Nachweis der aktivierten Caspase 3 angewendet. Die Identifikation proliferierender Zellen erfolgte durch den immunhistologischen Nachweis des Proliferationsmarkers Ki67-Antigen.

Parameter	MOET	IVP1	IVP2	p <sup>1)</sup>
Apoptotische Zellen/mm <sup>2</sup>	181,1 ± 62,5	314,0 ± 96,7	290,0 ± 127,2	0,123
% proliferierende Zellen im:				
Trophoblast	25,7 ± 5,1	21,5 ± 3,5	26,4 ± 3,5	0,152
Chorionzottenstroma	16,9 ± 4,8	13,6 ± 3,2	18,3 ± 5,5	0,272
Karunkelepithel	70,0 ± 14,0	65,8 ± 9,8	76,7 ± 8,7	0,278
Karunkelstroma	20,2 ± 5,3	11,9 ± 1,6	20,0 ± 7,2	0,063

<sup>1)</sup> Irrtumswahrscheinlichkeit für einen Einfluss der Versuchsgruppe

Bei der Erfassung der Proliferation im Plazentom waren für alle untersuchten Gewebeanteile die gemessenen Werte in der IVP1-Gruppe niedriger als in der IVP2- bzw. MOET-Gruppe (s. Tabelle 12 und Abb. 7), ein statistisch gesicherter Einfluss der Versuchsgruppe ergab sich jedoch nicht; lediglich für das Karunkelstroma wurde die Signifikanz knapp verfehlt (p=0,063). In den Analysen auf einen Zusammenhang zwischen der proliferativen Aktivität der erfassten Zelltypen in den Plazentomen und fetalen Größenparametern unter Einbeziehung aller Trächtigkeiten ergaben sich ebenfalls keine statistisch signifikanten Korrelationen.

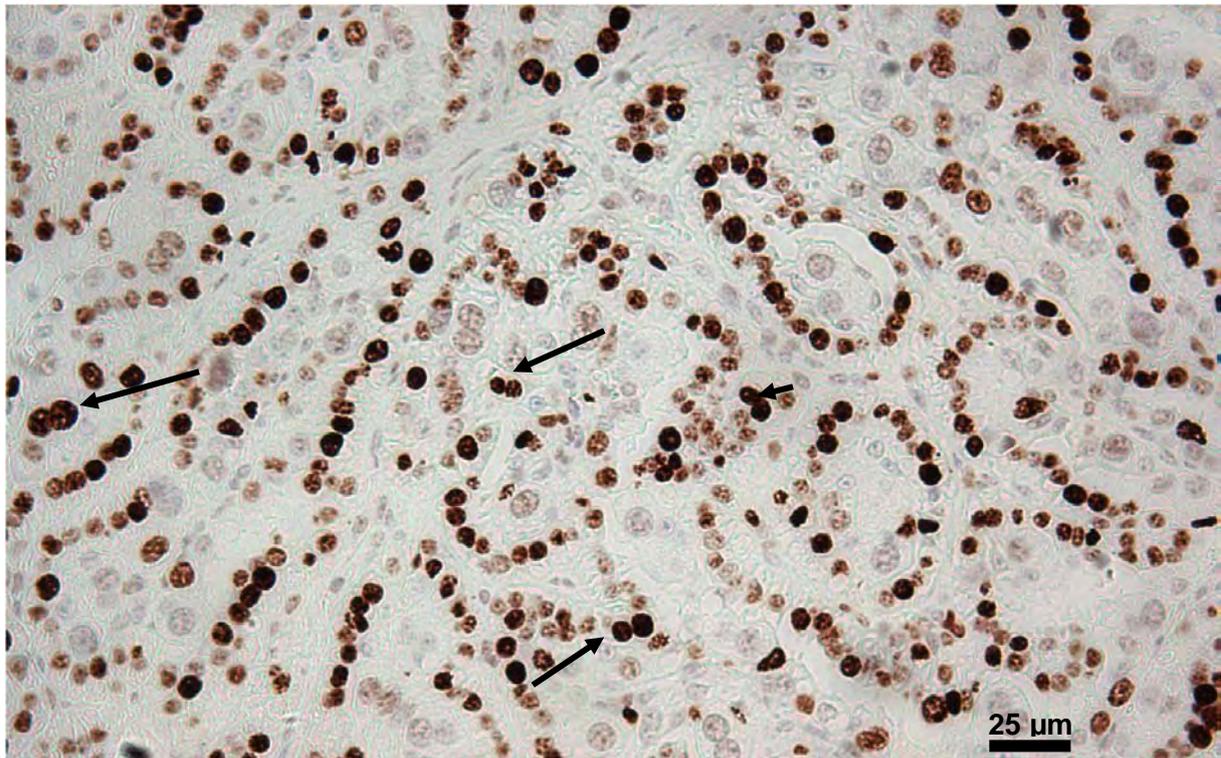


Abbildung 7: Immunhistologische Darstellung des Ki67-Antigens zur Erfassung der Zellproliferation in einem Plazentom eines Rindes aus der IVP2-Gruppe. Die weitaus höchste Häufigkeit positiver Reaktionen ist im Karunkelepithel zu beobachten. Zahlreiche positive Zellkerne finden sich auch im Trophoblasten offensichtlich im Zusammenhang mit der Trophoblastriesenzell-Differenzierung (Pfeile).

#### **4.1.5 Expression Wachstums- und Differenzierungs-relevanter Gene in den Plazentomen**

Die mittels Real-Time RT-PCR in den Plazentomen gemessenen relativen Genexpressionen sowie die Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalysen bezüglich eines Einflusses der Versuchsgruppe sind in Tabelle 13 aufgeführt. Von den untersuchten Genen ergab sich nur für den Estrogen-related Receptor 2 (ERR2) annähernd eine Signifikanz hinsichtlich der Versuchsgruppe ( $p = 0,054$ ). Für die restlichen untersuchten Gene war der p-Wert jeweils deutlich größer als 0,05. Im paarweisen Vergleich der Versuchsgruppen mittels Tukey-Test unterschied sich hinsichtlich der ERR2-Expression die MOET-Gruppe ( $3,92 \times 2,53^{\pm 1}$ ) signifikant von der IVP1-Gruppe ( $14,22 \times 1,56^{\pm 1}$ ), während die IVP2-Gruppe ( $9,27 \times 2,28^{\pm 1}$ ) nicht signifikant von der IVP1- bzw. MOET-Gruppe unterschiedlich war. Wurden in einer explorativen Datenanalyse die relativen ERR2-Genexpressionen der beiden IVP-Gruppen zusammengefasst und mittels T-Test mit der MOET-Gruppe verglichen, ergab sich ein p-Wert von 0,022.

In der Korrelationsanalyse unter Einbeziehung aller Trächtigkeiten ergab sich eine signifikante positive Korrelation zwischen der ERR2-Expression in den Plazentomen und der fetalen Scheitel-Steiß-Länge sowie dem fetalen Gewicht sowie eine signifikant negative Korrelation zum Quotienten  $BU_{\max}/SSL$  (s. Tabelle 14).

**Tabelle 13:** Relative Expression wachstums- und differenzierungsrelevanter Gene in Rinderplazentomen der Gruppen MOET, IVP1 und IVP2. Angegeben sind die mittels der Real-Time RT-PCR ermittelten relativen Genexpressionen. Die Darstellung erfolgt als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $\bar{X} \pm SD$ ) für normal verteilte Daten und als geometrischer Mittelwert und Streufaktor [ $\bar{X}$  g (SF)] für rechtsschief verteilte Daten. Werte mit unterschiedlicher Beschriftung unterscheiden sich mit  $p < 0,05$ .

<b>Gen</b>	<b>MOET</b>	<b>IVP1</b>	<b>IVP2</b>	<b>p</b>
ErbB3	1,50 (1,18)	1,75 (1,32)	2,66 (2,14)	0,185
Östrogenrezeptor $\alpha$	2,27 (1,98)	2,36 (1,51)	3,01 (1,52)	0,618
Östrogenrezeptor $\beta$	2,76 $\pm$ 0,79	2,68 $\pm$ 0,76	2,28 $\pm$ 1,21	0,431
Estrogen-related receptor 2	3,92 (2,53) <sup>(a)</sup>	14,22 (1,56) <sup>(b)</sup>	9,27 (2,28) <sup>(a,b)</sup>	0,054
Wachstumshormonrezeptor	14,89 (1,33)	7,46 (4,48)	13,74 (1,49)	0,419
Plazentares Laktogen	7,78 (1,22)	10,67 (3,05)	3,67 (2,57)	0,142
Prolaktinrezeptor (kurze Isoform)	7,75 (5,33)	14,79 (2,29)	5,61 (3,52)	0,481
Prolaktinrezeptor (beide Isoformen)	20,46 (5,51)	22,23 (3,19)	6,76 (4,79)	0,362

**Tabelle 14:** Ergebnisse der Korrelationsanalyse auf einen Zusammenhang zwischen der für den Estrogen-related Receptor 2 (ERR2) ermittelten relativen Gen-Expression und der fetalen Scheitel-Steiß-Länge (SSL), dem maximalen Brustumfang ( $BU_{max}$ ), dem Quotienten  $BU_{max}/SSL$  und dem fetalen Gewicht.  $p$  = Irrtumswahrscheinlichkeit,  $R$  = Korrelationskoeffizient, n.s. = nicht signifikant.

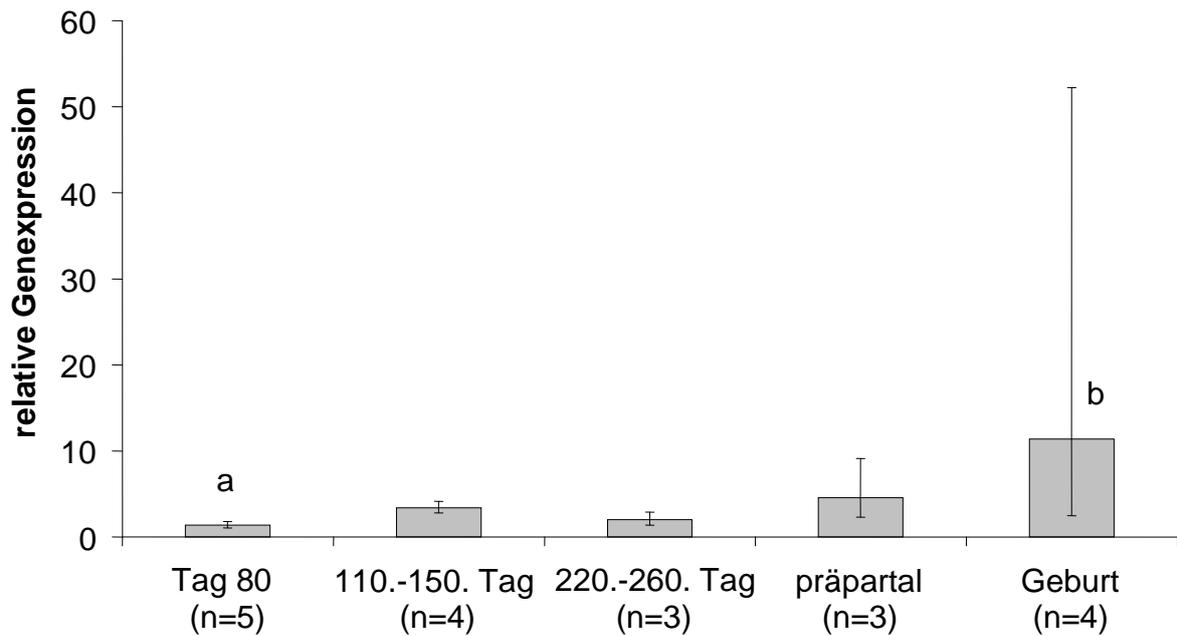
Parameter	p	R	Regressionsgerade
SSL	0,019	0,58	$y = 2,69x + 10,9$
$BU_{max}$	n.s.	---	---
$BU_{max}/SSL$	0,020	-0,60	$y = -0,086x + 0,80$
Gewicht	0,043	0,51	$y = 27,2x + 64,2$

## 4.2 Ergebnisse der Untersuchungen zur Expression wachstums- und differenzierungsrelevanter Gene in Rinderplazentomen im Verlauf der normalen Gravidität

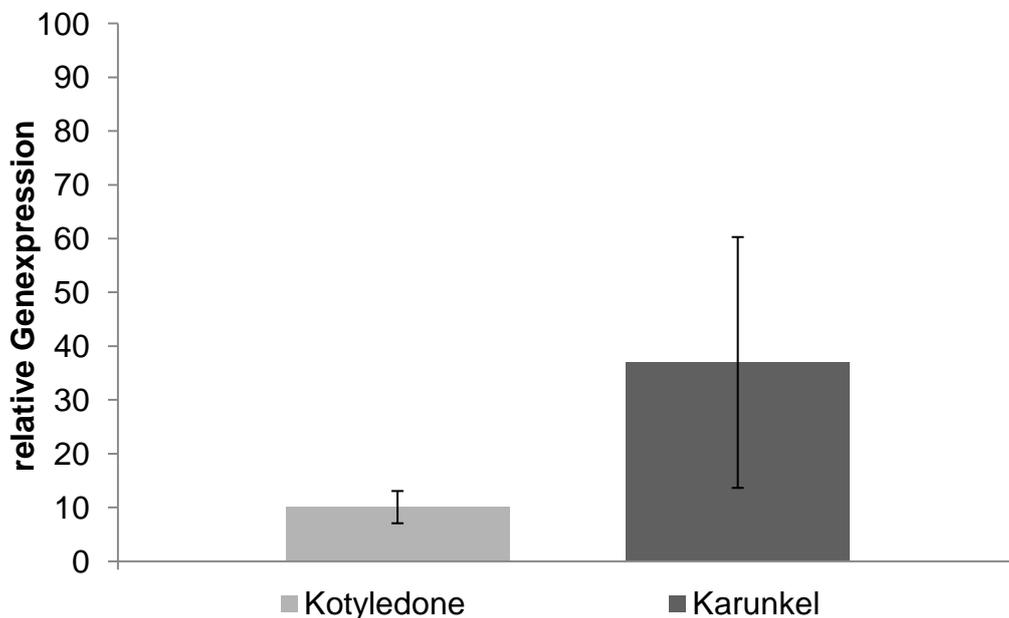
Nachdem die Untersuchungen auf die Expression des Östrogenrezeptors  $ER\alpha$  und  $ER\beta$  in den Rinderplazentomen im Verlauf der Gravidität bereits durchgeführt worden waren (Schuler et al. 2002/2005), beschränkte sich vorliegende Arbeit auf die Erfassung der Expression von ErbB3, Estrogen-related Receptor 2, Wachstumshormonrezeptor (GHR), Plazentares Laktogen und Prolaktinrezeptor kurze Isoform/beide Isoformen.

### 4.2.1 Expression von ErbB3 in den Rinderplazentomen im Verlauf der normalen Gravidität

Der Verlauf der mittels Real-Time RT-PCR ermittelten relativen Genexpression für ErbB3 ist in Abbildung 8 dargestellt. Zwischen dem Tag 80 und dem Zeitraum der präpartalen Gruppe (Luteolyse) schwankten die Messwerte im Mittel zwischen 1,4 und 4,6. Unter der Geburt stieg der Mittelwert auf 11,4 an. Die Messwerte weisen zwischen den Tieren der Geburtsgruppe jedoch eine erhebliche Streuung auf. Bei der ein-faktoriellen Varianzanalyse ergab sich ein signifikanter Einfluss der Beobachtungsgruppe ( $p=0,041$ ). Der paarweise Vergleich der Beobachtungsgruppen mittels Tukey-Test zeigte, dass sich die Messwerte der Tiere vom 80. Graviditätstag signifikant von denen der Geburtsgruppe unterschieden ( $p < 0,05$ ). Bei der separaten Messung der relativen Genexpression in Karunkel- bzw. Kotyledonengewebe von drei Tieren zwischen dem 120. und 240. Trächtigkeitstag zeigte sich, dass die ErbB3-Expression im maternalen Teil der Plazentome stets höher waren als im fetalen Anteil (Abb. 9). Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant.



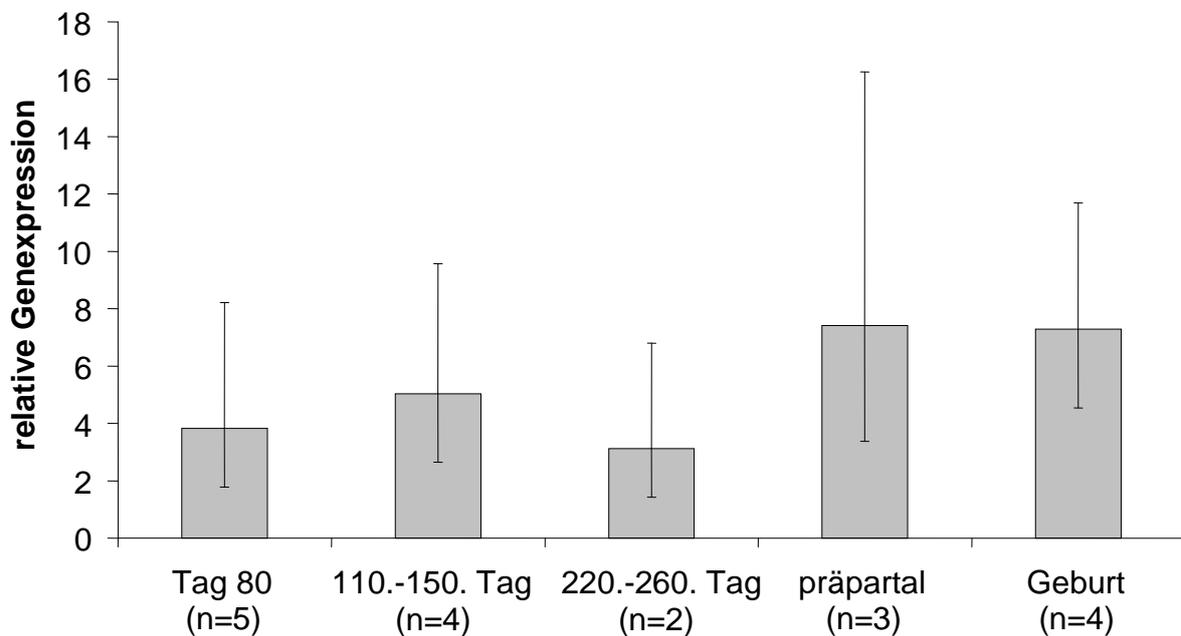
**Abbildung 8:** ErbB3-Expression in Rinderplazentomen im Verlauf der Gravidität. Dargestellt ist die mittels Real-Time RT-PCR ermittelte relative Genexpression als geometrischer Mittelwert x Streufaktor<sup>±1</sup>. Säulen mit unterschiedlicher Beschriftung unterscheiden sich mit  $p < 0,05$ .



**Abbildung 9:** ErbB3-Expression in Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe von drei Rindern zwischen dem 120. und 240. Trächtigkeitstag. Dargestellt ist die mittels Real-Time RT-PCR gemessene relative Genexpression ( $\bar{X} \pm SD$ ).

#### 4.2.2 Expression des Estrogen-related Receptor 2 (ERR2) in den Rinderplazentomen im Verlauf der normalen Gravidität

Die mittels Real-Time RT-PCR im Verlauf der Gravidität gemessene relative Genexpression für ERR2 ist in Abbildung 10 dargestellt. Die zwischen dem 80. Trächtigkeitstag und der Geburt gemessenen Werte lassen keine Abhängigkeit vom Trächtigkeitsstadium erkennen. Bei der einfaktoriellen Varianzanalyse ergab sich kein signifikanter Einfluss der Beobachtungsgruppe. Bei der separaten Messung der relativen Genexpression in Karunkel- bzw. Kotyledonengewebe von drei Tieren zwischen dem 120. und 240. Trächtigkeitstag (Abb. 11) ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen fetalem und maternalem Anteil der Plazentome.



**Abbildung 10:** ERR2-Expression in Rinderplazentomen im Verlauf der Gravidität. Dargestellt ist die mittels Real-Time RT-PCR gemessene relative Genexpression als geometrischer Mittelwert x Streufaktor<sup>±1</sup>.

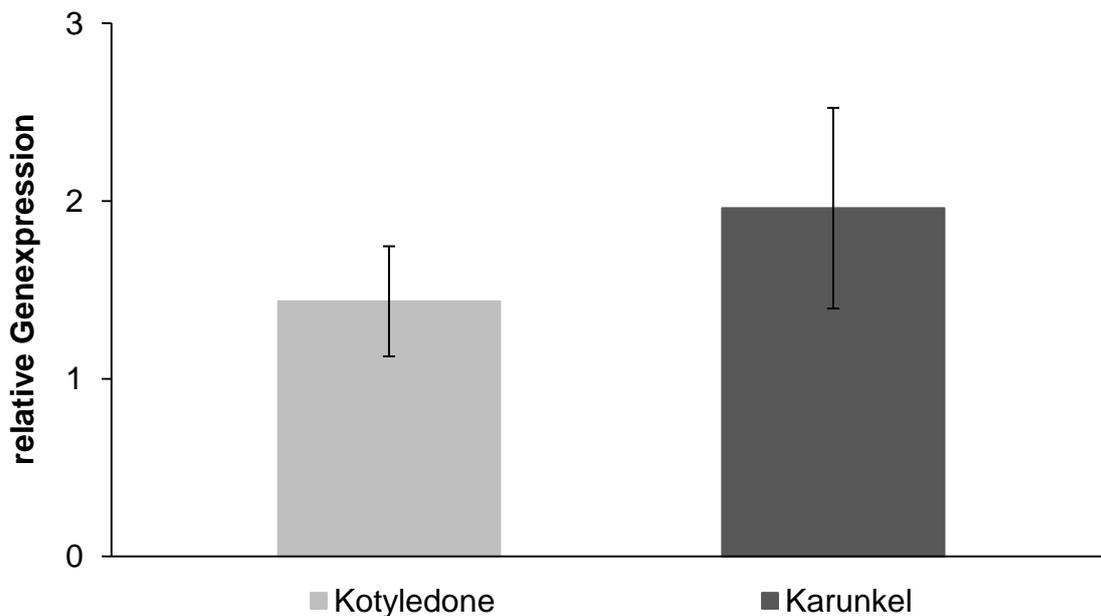
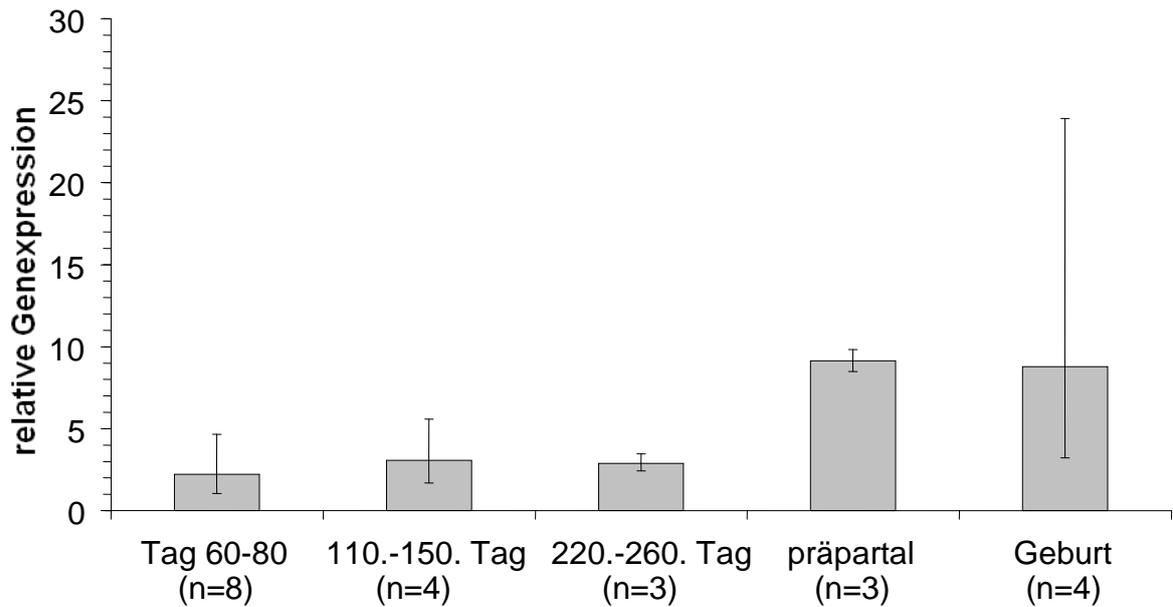


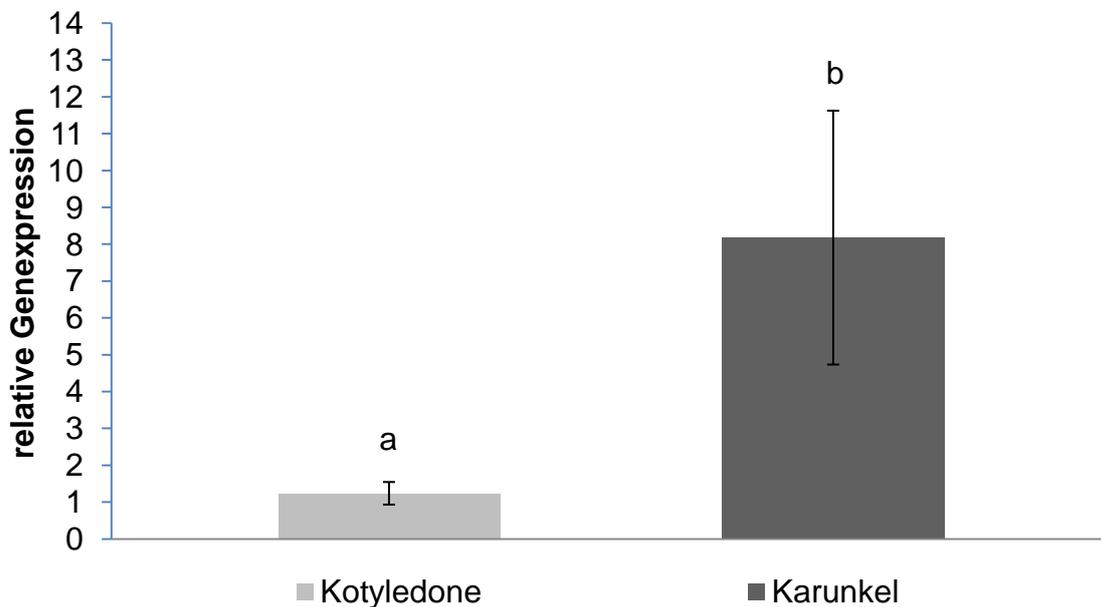
Abbildung 11: ERR2-Expression in Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe von drei Rindern zwischen dem 120. und 240. Trächtigkeitstag. Dargestellt ist die mittels Real-Time RT-PCR gemessene relative Genexpression ( $\bar{X} \pm SD$ ).

#### 4.2.3 Expression des Wachstumshormonrezeptors (GHR) in den Rinderplazentomen im Verlauf der normalen Gravidität

Die in den Gesamtplazentomen gemessene relative GHR-mRNA-Genexpression verläuft zwischen dem 60. Trächtigkeitstag und der Spätgravidität auf nahezu konstantem Niveau (s. Abb. 12). Zum Zeitpunkt der präpartalen Luteolyse steigt sie dann im Mittel ungefähr auf das Dreifache an. Auch unter der Geburt werden im Mittel erhöhte Werte gemessen, wobei zwischen den Tieren dieser Gruppe eine erhebliche Streuung beobachtet wurde. In der einfaktoriellen Varianzanalyse ergab sich ein signifikanter Einfluss der Beobachtungsgruppe ( $p=0,034$ ). Mittels Tukey-Test waren auf dem 5%-Signifikanzniveau keine Gruppenunterschiede festzustellen. Auf dem 10%-Signifikanzniveau unterschieden sich die präpartale sowie die Geburtsgruppe vom 60.–80. Tag. Bei der separaten Messung der relativen Genexpression in Karunkel- bzw. Kotyledonengewebe von drei Tieren zwischen dem 120. und 240. Trächtigkeitstag zeigte sich, dass die GHR-Expression im maternalen Teil der Plazentome stets höher waren als im fetalen Anteil (Abb. 13). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ( $p=0,034$ ).

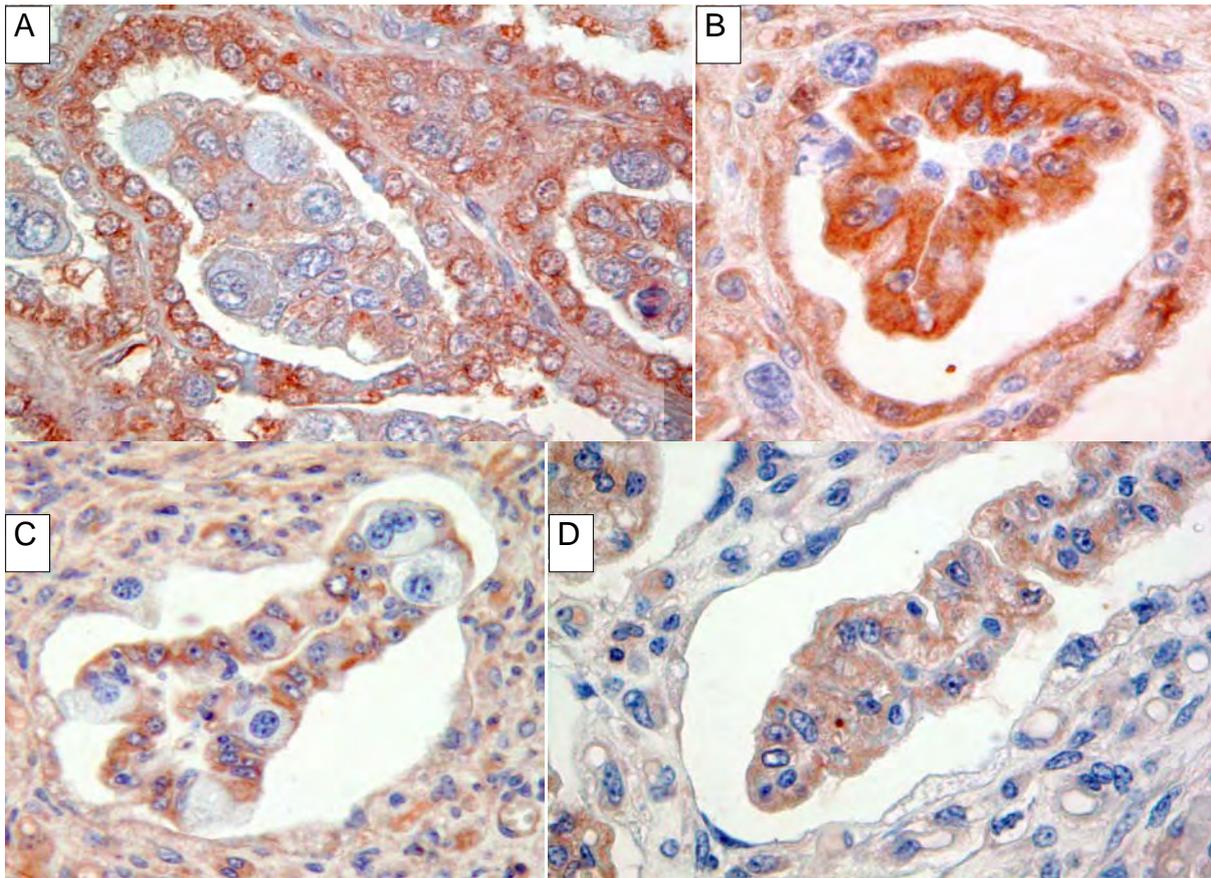


**Abbildung 12:** Wachstumshormonrezeptor-Expression in Rinderplazentomen im Verlauf der Gravidität. Dargestellt ist die mittels Real-Time RT-PCR gemessene relative Genexpression als geometrischer Mittelwert x Streufaktor<sup>±1</sup>.



**Abbildung 13:** Wachstumshormonrezeptor-Expression in Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe von drei Rindern zwischen dem 120. und 240. Trächtigkeitstag. Dargestellt ist die mittels Real-Time RT-PCR gemessene relative Genexpression ( $\bar{X} \pm SD$ ). Die Messwerte in Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe unterscheiden sich mit  $p < 0,05$ .

Das GHR-Protein ist immunhistologisch in den Plazentomen zwischen dem 60. Trächtigkeitstag und dem 8. Trächtigkeitsmonat sowohl im Zytoplasma der Karunkel-epithelzellen als auch in geringerer Intensität im Zytoplasma der einkernigen Trophoblastzellen (UTC) nachweisbar (Abb. 14). Die reifen Trophoblastriesenzellen sowie deren Vorläufer in fortgeschrittenen Differenzierungsstadien sind stets GHR-negativ. Um den Zeitpunkt der Luteolyse und unter der Geburt wurde ein Anstieg der Farbeintensität in den UTC beobachtet, wobei häufig auch nukleäre Signale auftraten. Das zuvor vorherrschende zytoplasmatische Signal in den Karunkel-epithelzellen wurde in der Spätphase der Gravidität deutlich schwächer und trat gegenüber dem Signal in den UTC durch die präpartale Reduktion des Karunkel-epithels weiter in den Hintergrund.



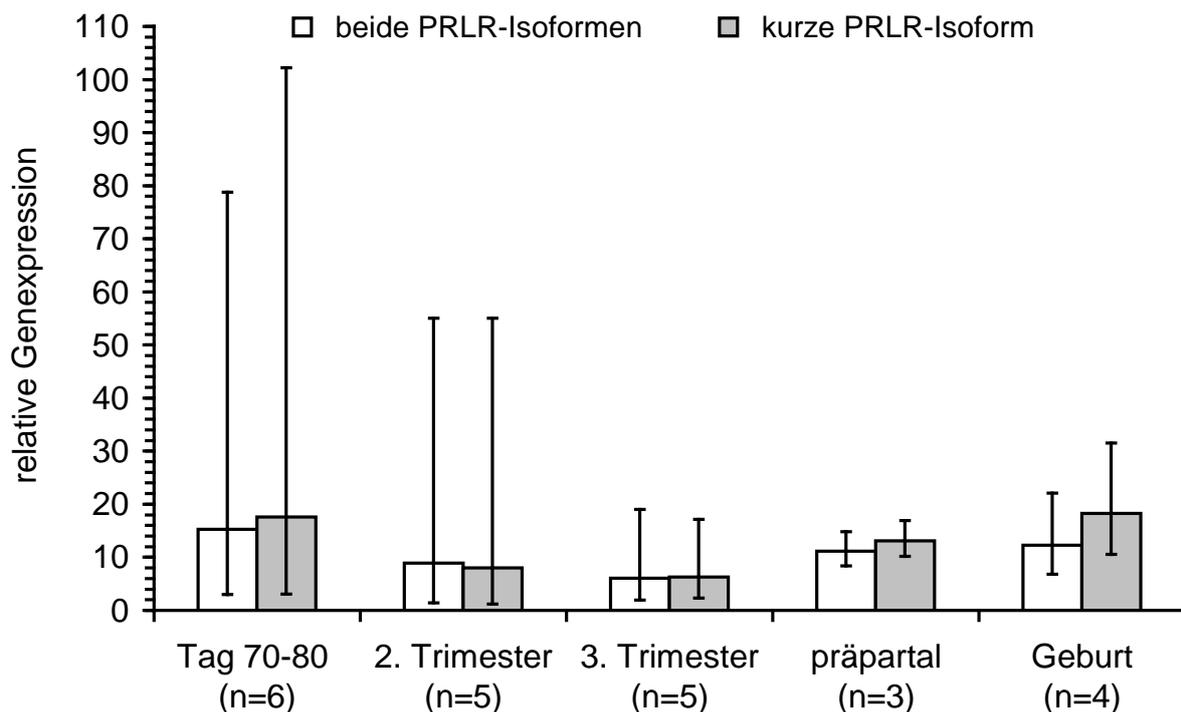
**Abbildung 14:** Immunhistologische Darstellung des Wachstumshormon-Rezeptors in Rinderplazentomen zu verschiedenen Stadien der Gravidität (A-C) sowie unter der Geburt (D).

- A) Tag 110: typisches Färbemuster während der frühen und mittleren Gravidität. Die stärksten Signale befinden sich im Zytoplasma der Karunkelepithelzellen. Daneben finden sich schwächere zytoplasmatische Signale in den einkernigen Trophoblastzellen. Die Trophoblastriesenzellen sowie deren Vorläufer sind negativ.
- B) Tag 278: unmittelbar vor dem Eintritt der präpartalen Luteolyse. Hier dominiert das Signal in den einkernigen Trophoblastzellen. Ein schwächeres Signal ist weiterhin in den deutlich abgeflachten Karunkelepithelzellen zu erkennen.
- C) Tag 282: während der präpartalen Luteolyse. Deutliches Signal in den einkernigen Trophoblastzellen. In dem erheblich reduzierten Karunkelepithel sind nur noch vereinzelt schwache positive Reaktionen vorhanden.
- D) Zeitpunkt der termingerechten Geburt: deutliche Signale im Trophoblasten. Die verbliebenen Anteile des Karunkelepithels sind weitestgehend negativ.

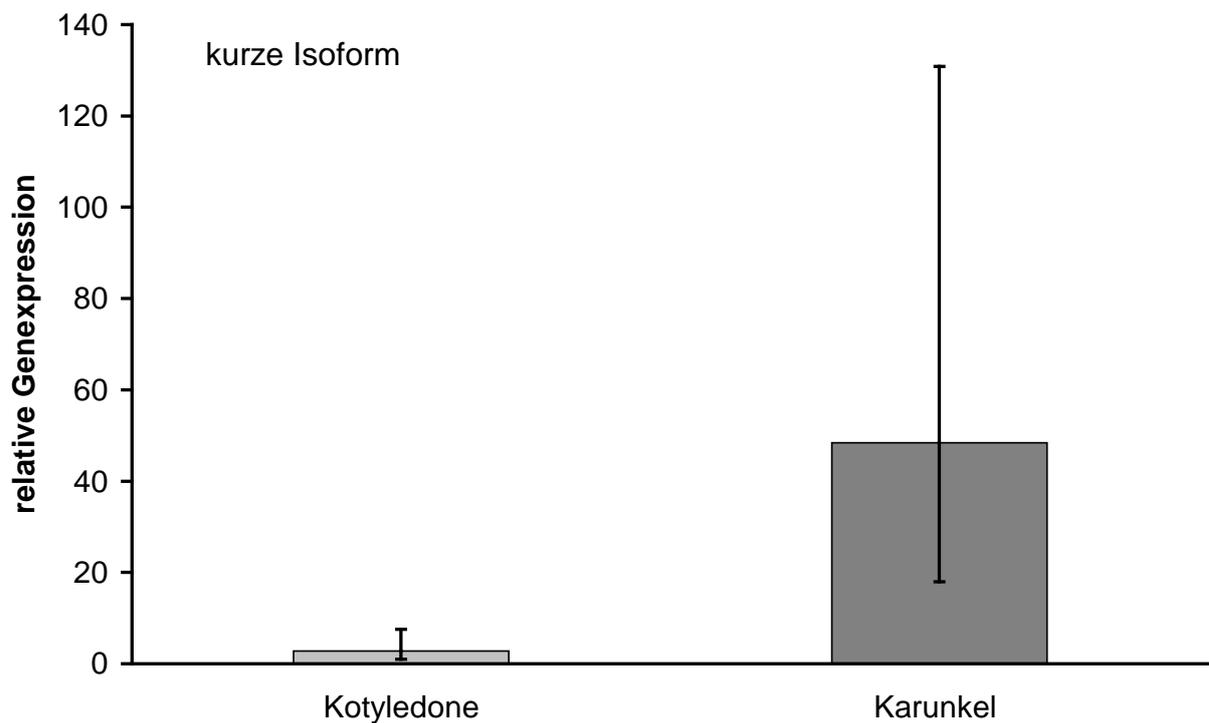
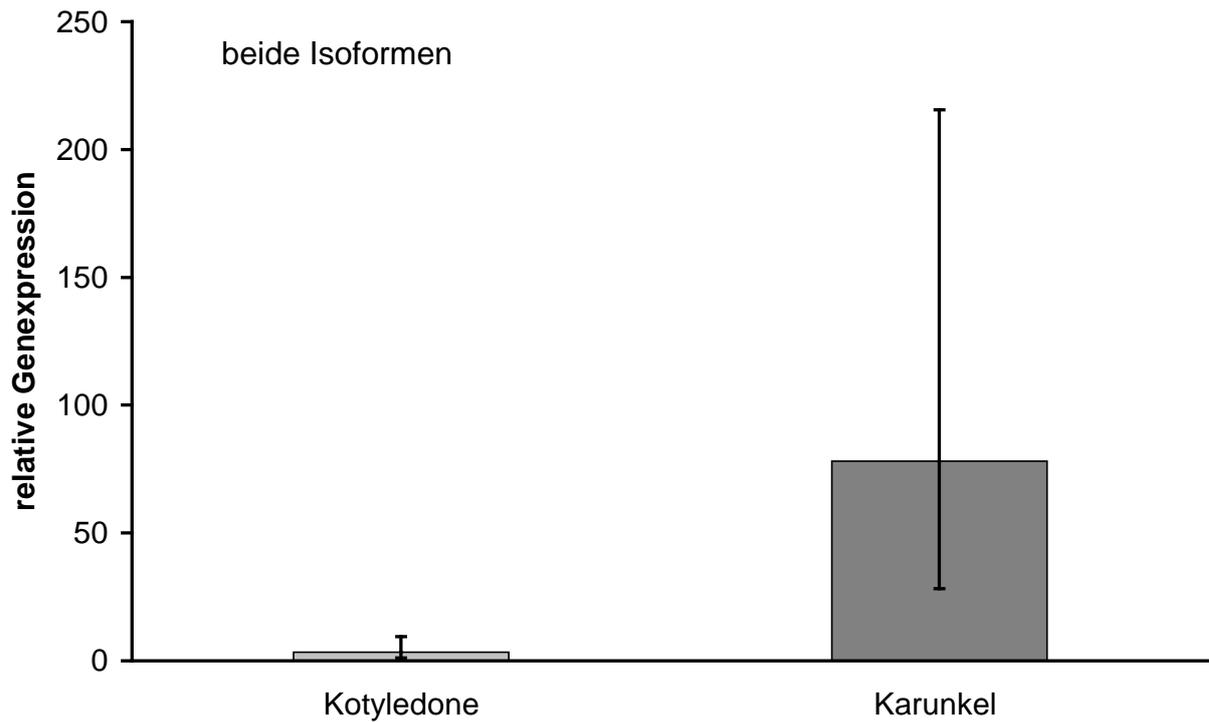
#### 4.2.4 Expression des Prolaktinrezeptors in den Rinderplazentomen im Verlauf der normalen Gravidität

Die relative Genexpression zeigt im Mittel sowohl für die kurze Isoform als auch bei der Erfassung beider Isoformen zwischen dem 70. Trächtigkeitstag und der Spätgravidität einen kontinuierlichen Abfall der Messwerte, gefolgt von einem Anstieg zum Zeitpunkt der Luteolyse und unter der Geburt (s. Abb. 15). Aufgrund der erheblichen Streuung der Messwerte in der frühen und mittleren Gravidität ergab sich bei der statistischen Auswertung kein signifikanter Einfluss der Beobachtungsgruppe.

Bei der separaten Messung der relativen Genexpression in Karunkel- bzw. Kotyledonengewebe von vier Tieren zwischen dem 70. Trächtigkeitstag bis zur Geburt zeigte sich, dass sowohl bei der Messung der kurzen Isoform als auch bei der gemeinsamen Erfassung beider Isoformen die Messwerte im maternalen Teil der Plazentome stets höher waren als im fetalen Anteil (Abb. 16). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ( $p=0.0067$  bzw.  $p=0.0049$ ).



**Abbildung 15:** Verlauf der Prolaktinrezeptor-Expression in Rinderplazentomen. Dargestellt ist die mittels Real-Time RT-PCR gemessene relative Genexpression als geometrischer Mittelwert x Streufaktor<sup>±1</sup>.



**Abbildung 16:** Prolaktinrezeptor-Expression in Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe von vier Rindern zwischen dem 70. Trächtigkeitstag und der Geburt. Dargestellt ist die mittels Real-Time RT-PCR gemessene relative Genexpression (geometrischer Mittelwert x Streufaktor<sup>+1</sup>). Die Messwerte in Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe unterscheiden sich mit  $p < 0,01$ .

#### 4.2.5 Expression von plazentarem Laktogen (bPL) in den Rinderplazentomen im Verlauf der normalen Gravidität

Die in den Gesamtplazentomen auf mRNA-Ebene gemessene relative bPL-Expression steigt im Mittel in der Spätgravidität bis zur Geburt geringfügig an (s. Abb. 17). In der einfaktoriellen Varianzanalyse ergab sich jedoch kein signifikanter Einfluss der Beobachtungsgruppe. Bei der separaten Messung der relativen Genexpression in Karunkel- bzw. Kotyledonengewebe von fünf Tieren zwischen dem 70. Trächtigkeitstag bis zur Geburt wurden in vier von fünf Fällen in den Kotyledonen geringfügig höhere Werte im Vergleich zur zugehörigen Karunkel gemessen (s. Abb. 18). In einem Fall war der Messwert in der Karunkel geringfügig höher als in der Kotyledone. Statistisch unterschieden sich die Messwerte in Karunkeln bzw. Kotyledonen nicht.

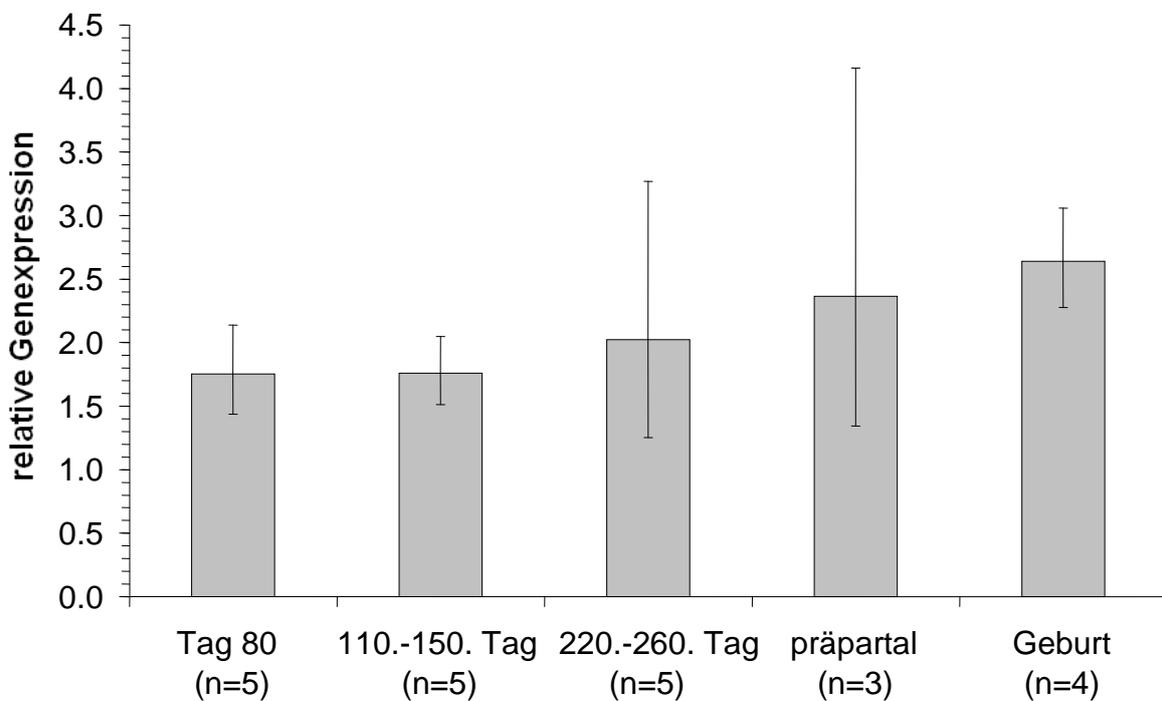


Abbildung 17: Verlauf der Expression von plazentarem Laktogen in Rinderplazentomen. Dargestellt ist die mittels Real-Time RT-PCR gemessene relative Genexpression als geometrischer Mittelwert x Streufaktor<sup>±1</sup>.

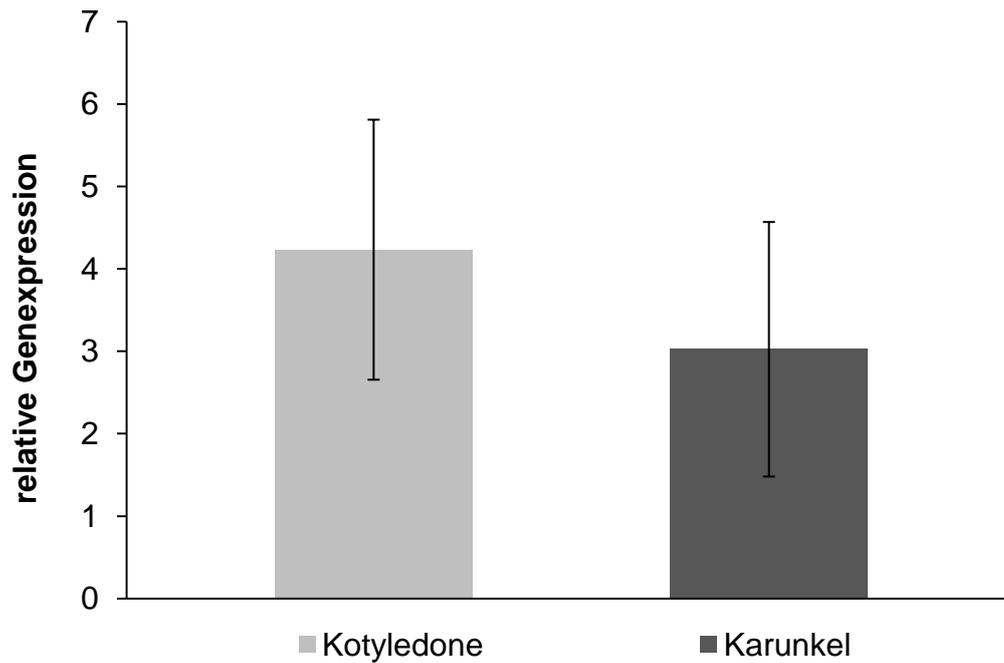


Abbildung 18: Expression von placentarem Laktogen in Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe von fünf Rindern zwischen dem 70. Trächtigkeitstag bis zur Geburt. Dargestellt ist die mittels Real-Time RT-PCR gemessene relative Genexpression ( $\bar{X} \pm SD$ ).

## **5. Diskussion**

### **5.1 Diskussion des Tierexperiments**

In vorangegangenen Untersuchungen zur in vitro-Produktion von Rinderembryonen an der Bayerischen Landesanstalt für Tierzucht in Grub war aufgefallen, dass nach der Anwendung eines bestimmten Protokolls (Protokoll IVP2) gehäuft ein ausgeprägter fetaler Überwuchs (LOS) auftrat, während Feten, die nach einem anderen aber sehr ähnlichen Protokoll erzeugt worden waren (IVP1-Originalmethode), davon weitaus seltener betroffen waren (Hiendleder et al. 2006). Als die diesem Phänomen zugrunde liegende Ursache wurde die unterschiedliche Supplementierung des zur in vitro Maturation (IVM) der Oozyten verwendeten Mediums mit Gonadotropinen vermutet (IVP1: 0,01 U/ml bovines FSH plus 0,01 U/ml bovines LH; IVP2: 0,2 U/ml ovines FSH). Ziel der von Prof. Hiendleder geplanten Untersuchungen war es daher, dieser Beobachtung in einem weiteren Tierversuch nachzugehen. Bei ansonst identischen Versuchsbedingungen unterschieden sich die beiden zur in vitro-Produktion von Embryonen verwendeten Methoden daher nur im Gonadotropinzusatz (s.o.) zum IVM-Medium.

Anders als erwartet trat bei beiden IVP-Gruppen fetaler Überwuchs in gleich hohem Ausmaß auf, sodass nicht auf Gruppenunterschiede geschlossen werden konnte. Zur Identifizierung möglicher LOS-assoziiertes Phänomene wurde daher eine LOS-negative Kontrollgruppe mittels MOET erzeugt. Hierbei wurde darauf geachtet, die Versuchsbedingungen zwischen der MOET- und den beiden IVP-Gruppen soweit wie möglich identisch zu gestalten, um die nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit der eigenen Fragestellung stehende Variabilität der Ergebnisse zu minimieren. Dies betraf insbesondere den genetischen Hintergrund der Keimzellspender und der Empfängertiere. Um die Wahrscheinlichkeit des Angehens einer Trächtigkeit nach der Übertragung von in vitro-produzierten Embryonen zu erhöhen, wurden pro Empfängertier stets zwei Embryonen übertragen. Da in vielen Fällen hieraus Zwillingsgraviditäten resultierten, wurde als Zeitpunkt der Schlachtung der 80. Graviditätstag gewählt, da in vorangegangenen Untersuchungen zu diesem Zeitpunkt der Trächtigkeit noch kein offensichtlicher Einfluss einer Einlings- bzw. Zwillingsgravidität auf Größe und Gewicht der Feten festgestellt werden konnte, das Auftreten eines fetalen Überwuchses jedoch bereits deutlich zu erkennen war (Hiendleder, persönliche Mitteilung). Anders als in den vorausgegangenen Untersuchungen (Hiendleder, persönliche Mitteilung), traten in der

vorliegenden Studie jedoch signifikante Unterschiede zwischen Feten aus Einlings- bzw. Zwillingsgraviditäten hinsichtlich der Parameter Scheitel-Steiß-Länge, maximaler Brustumfang und Gewicht auf, wobei diese Unterschiede v.a. in den IVP-Gruppen deutlich ausgeprägt waren. Da jedoch Zwillingsgraviditäten in allen Versuchsgruppen in vergleichbarer Häufigkeit vorkamen, ist eine Beeinträchtigung der Aussagefähigkeit des Experiments hinsichtlich des fetalen und plazentaren Wachstums nicht anzunehmen.

Auffällig war, dass in den beiden IVP-Gruppen die Feten überwiegend männlichen Geschlechts waren (IVP1: männl./weibl.=7/1; IVP2: männl./weibl.=6/2), während das Geschlechterverhältnis in der MOET-Gruppe nahezu ausgeglichen war (männl./weibl.=3/5). Es wird vermutet, dass das Geschlechterverhältnis bei den IVP-Feten darauf zurückzuführen ist, dass zum Zeitpunkt der Auswahl übertragungsfähiger Embryonen nach den üblichen morphologischen Kriterien weibliche Embryonen in ihrer Entwicklung gegenüber männlichen etwas retardiert erschienen.

Da in der statistischen Prüfung hinsichtlich eines Einflusses des fetalen Geschlechts auf Scheitel-Steiß-Länge, maximaler Brustumfang und Gewicht keine annähernd signifikanten p-Werte auftraten, kann mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden, dass durch die zwischen den Gruppen unterschiedliche Verteilung des fetalen Geschlechts die Aussagefähigkeit des Experiments in Bezug auf das fetale Größenwachstum beeinträchtigt wurde.

Bezüglich der eigenen Ergebnisse wäre es wünschenswert gewesen, die erhaltenen Messergebnisse auf Beziehungen zu morphologischen Daten der Plazenten zu untersuchen. Da jedoch parallel zu den eigenen Probenentnahmen Corrosion Cast-Präparate von Plazentomen zur Untersuchung der Gefäßarchitektur hergestellt wurden, konnte aus versuchstechnischen Gründen das Gesamtgewicht bzw. eine Gewichtsverteilung der Plazentome nicht mit der notwendigen Genauigkeit bestimmt werden. Weiterhin war bei Zwillingsgraviditäten aus organisatorischen und Zeitgründen eine Zuordnung der entnommenen Plazentome zu den Feten nicht möglich.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse zu Wachstum und Differenzierung der Plazentome

Die Bedeutung der plazentaren Östrogenproduktion ist beim Rind noch weitestgehend unklar. Umfangreiche vorangegangene Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe haben zur Hypothese geführt, dass die in der Plazenta des Rindes in großen Mengen gebildeten Östrogene weniger Hormone im klassischen Sinne darstellen, sondern primär als lokale Regulatoren von Wachstum und Differenzierung der Plazentome fungieren (Hoffmann und Schuler, 2002; Schuler et al. 1999, 2002, 2005, 2008). Daher wurden Messungen der Östrogenkonzentrationen in den Fruchtwässern durchgeführt und die Expression der Östrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  auf mRNA-Ebene quantitativ erfasst. Hierbei ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und keine signifikanten Korrelationen zu fetalen Größenparametern.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit war die Charakterisierung der Zelldynamik in den Plazentomen. Dazu wurden Apoptose, Proliferation und die Art der Trophoblastzellen (einkernige Trophoblastzellen, reife und unreife Trophoblastriesenzellen) in den Plazentomen quantitativ erfasst. Der Quantifizierung der Proliferation lagen zunächst die Überlegungen zugrunde, dass ein übermäßig wachsender Fetus das plazentare Wachstum stimulieren könnte oder umgekehrt, dass eine größere Plazenta die Grundlage für ein verstärktes fetales Wachstum sein könnte. In diesem Zusammenhang erscheinen frühere Befunde von Schuler et al. (2000), Hoffmann und Schuler (2002), Boos et al. (2003) von Bedeutung, die im Karunkel epithel eine überaus hohe Proliferation erkennen ließen, wobei dem durch die Trophoblastzellen resorbierten Zelldetritus die Funktion einer erheblichen Nährstoffquelle für den Fetus zugeschrieben wurde (siehe auch Abbildungen 6 und 7). Nach diesem Konzept ist die Karunkel eine vom Trophoblasten besiedelte modifizierte holokrine Drüse, deren Aktivität mit dem fetalen Überwuchs in Beziehung stehen könnte. Auch die Trophoblastzellen der Chorionzotten weisen beim Rind eine erhebliche proliferative Aktivität auf (Schuler et al. 2000; Boos et al. 2003), die als Grundlage des kotyledonären Wachstums als auch der permanenten Neubildung der apoptotisch zugrunde gehenden schwach invasiven Trophoblastriesenzellen dient.

Der Prozess der Migration und Apoptose der Trophoblastriesenzellen des Rindes ist derzeit immer noch weitestgehend unklar. Er wird unter anderem mit dem Transport hochmolekularer Hormone, vor allem von plazentarem Laktogen, durch die Plazentabarriere hindurch ins mütterliche Kompartiment in Zusammenhang gebracht (Wooding

und Wathes 1980). Somit könnte auch eine Steigerung der proliferativen Aktivität des Trophoblasten indirekt über eine vermehrte Abgabe von Botenstoffen ins maternale Kompartiment mit dem fetalen Überwuchs in Verbindung stehen, z. B. über eine Stimulation des Karunkelwachstums oder die vermehrte Bereitstellung von Nährstoffen durch den mütterlichen Organismus.

Bei der Quantifizierung der Proliferation mittels der immunhistologischen Darstellung des Proliferationsmarkers Ki67-Antigen bestätigten sich die in früheren Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse (Schuler et al. 2000), Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ergaben sich jedoch nicht. Zusammenhänge zwischen der proliferativen Aktivität in den untersuchten Zelltypen der Plazentome mit dem fetalen Größenwachstum waren ebenfalls nicht zu erkennen.

Für die quantitative Erfassung der einzelnen Trophoblastzelltypen wurde die Lektin-Histochemie eingesetzt, da deren rein lichtmikroskopische Identifizierung je nach Lage der Zelle zur Schnittebene häufig schwierig ist. Das verwendete Lektin DBA bindet an Zucker-Seitenketten von Glykoproteinen und ist relativ spezifisch für Pregnancy-associated Glycoproteins, deren Expression im Verlauf der Trophoblastriesenzelldifferenzierung aufreguliert wird (Klisch et al. 2006). Für den Anteil unreifer Trophoblastriesenzellen (iTGC) ergab sich in der einfaktoriellen Varianzanalyse ein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe ( $p = 0,032$ ); der Anteil war in den IVP-Gruppen geringfügig niedriger (IVP1 = 11%; IVP2 = 10%) als in der MOET-Gruppe (13%), wobei der Unterschied zwischen IVP2 und MOET statistisch signifikant war ( $p = 0,0322$ ). Wurden in einer explorativen Analyse die Daten der IVP-Gruppen gepoolt und mit der MOET-Gruppe verglichen, ergab sich ein deutlich signifikanter Unterschied ( $p = 0,011$ ). Die Zusammenfassung der beiden IVP-Gruppen erscheint hier legitim, da sich hinsichtlich der erfassten Parameter zu Dimensionen und Gewicht der Feten keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ergaben (s. Tabelle 10). Für einen Zusammenhang zwischen der Trophoblastriesenzelldifferenzierung und dem fetalen Wachstum sprechen weiterhin die signifikant negative Korrelation zwischen dem iTGC-Anteil im Trophoblasten und der fetalen SSL bzw. dem maximalen Brustumfang ( $BU_{max}$ ) sowie die signifikant positive Korrelation zwischen dem iTGC-Anteil und dem Verhältnis  $BU_{max}/SSL$ .

Der verminderte Anteil an iTGC in den IVP-Gruppen könnte über einen verzögerten Eintritt einkerniger Trophoblastzellen in die Trophoblastriesenzelldifferenzierung oder eine beschleunigte Umwandlung der iTGC in reife TGC erklärt werden. In letzterem Fall

könnte je nach Geschwindigkeit der nachfolgenden apoptotischen Degeneration der reifen TGC, deren Anteil erniedrigt, unverändert oder erhöht sein. In den IVP-Gruppen wurde gegenüber der MOET-Gruppe ein tendenziell erhöhter Anteil reifer TGC festgestellt. Es ergab sich jedoch weder in der einfaktoriellen Varianzanalyse ein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe ( $p = 0,49$ ) noch war bei einem explorativen Vergleich der gepoolten Daten beider IVP-Gruppen mit der MOET-Gruppe ein statistisch signifikanter Unterschied feststellbar ( $p = 0,25$ ). Interessanterweise war aber in den IVP-Gruppen eine erhöhte Apoptosehäufigkeit festzustellen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit in der einfaktoriellen Varianzanalyse für einen Einfluss der Versuchsgruppe war zwar mit  $p = 0,12$  nicht signifikant, wurden in einer explorativen Analyse die Daten aus den IVP-Gruppen gepoolt und mit der MOET-Gruppe verglichen, ergab sich jedoch ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,040$ ). Wesentliche Quellen für die nahezu ausschließlich im Trophoblasten beobachteten apoptotischen Ereignisse sind degenerierende invasive TGC und abschilfernde Karunkel epithelzellen (Hoffmann und Schuler, 2000; Boos et al. 2003). Bei den Korrelationsanalysen zwischen der Apoptosehäufigkeit und der fetalen Scheitel-Steiß-Länge bzw. dem fetalen Gewicht wurde eine Signifikanz nur knapp verfehlt ( $p=0,064$  bzw.  $0,069$ ), wobei tendenziell eine positive Korrelation vorhanden war. Die Befunde zur Zusammensetzung des Trophoblasten und zur Apoptosehäufigkeit deuten insgesamt darauf hin, dass der fetale Überwuchs mit einer beschleunigten Trophoblastriesenzelldifferenzierung assoziiert sein könnte. Allerdings wäre in diesem Fall eine Zunahme der Proliferation im Trophoblasten zu erwarten, die sich mit der angewandten Methode jedoch nicht feststellen ließ. Eine weitere Erklärung für die Abnahme des Anteils feststellbarer iTGCs könnte eine veränderte Expression der Zielmoleküle des zur Identifikation der TGC eingesetzten Lektins sein.

Neben den beiden Östrogenrezeptor-Isoformen wurde die Expression einiger weiterer wachstums- und differenzierungsrelevanter Gene untersucht. Die Familie der ErbB-Rezeptoren spielt eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Zelllinien vieler verschiedener Gewebearten. Das ErbB3/ErbB2-Heterodimer ist an der Steuerung der Embryonalentwicklung beteiligt (Citri et al. 2003). Klonisch et al. (2001) wiesen ErbB3 während der Implantation im Uterus und der Blastozyste von Kaninchen nach. Hall et al. (2005) beschrieben seine Expression in der Rinderblastozyste. In den eigenen Untersuchungen konnte erstmals seine Expression in den Rinderplazentomen gezeigt werden. Eine zwischen den Versuchsgruppen unterschiedliche Expression war nicht nachweisbar. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass im Verlauf der normalen Trächtig-

keit ErbB3 in den Plazentomen ab dem 80. Graviditätstag bis zur Geburt exprimiert wird. Der signifikante prä- und intrapartale Anstieg der relativen ErbB3-Expression deutet darauf hin, dass dieser Rezeptor in die zur Geburt führenden Regulationsvorgänge involviert ist. Bei der stichprobenartigen Messung in separiertem Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe war in allen drei untersuchten Fällen die Expression in den Karunkeln höher. Dieser Unterschied war jedoch insgesamt nur gering ausgeprägt und nicht statistisch signifikant.

Der Estrogen-related Receptor 2 (ERR2) wurde in die Untersuchungen einbezogen, da für diesen bei der Maus eine wichtige Rolle in der Steuerung der Trophoblastriesenzelldifferenzierung gezeigt werden konnte (Luo et al. 1997; Tremblay et al. 2001) und seine Expression in der Blastozyste des Rindes nachgewiesen worden war (Hall et al. 2005). Über die Expression in den Rinderplazentomen lagen bisher keinerlei Informationen vor. In den eigenen Untersuchungen konnte auf mRNA-Ebene die Expression vom 80. Trächtigkeitstag bis zur Geburt nachgewiesen werden, wobei sich keine Abhängigkeit im Verlauf der Gravidität ergab.

In den Untersuchungen zur ERR2-Expression in Rinderplazentomen aus IVP1-, IVP2- bzw. MOET-Trächtigkeiten zeigte sich in einer einfaktoriellen Varianzanalyse ein annähernd signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe ( $p = 0,053$ ), wobei die relative ERR2-Expression in den beiden IVP-Gruppen im Mittel höher war als in der MOET-Gruppe. Wurden in einer explorativen Datenanalyse die ERR2-Expressionsdaten der beiden IVP-Gruppen gepoolt und mit denen der MOET-Gruppe verglichen, ergab sich ein deutlich signifikanter Unterschied ( $p = 0,022$ ; T-Test). Weiterhin zeigte sich, dass die plazentare ERR2-Expression positiv mit dem fetalen Wachstum korreliert war.

In der ERR2-Knockout-Maus wurde eine übersteigerte Differenzierung der diploiden Trophoblastzellen in Trophoblastriesenzellen beobachtet. Interessanterweise deuten die eigenen Befunde zur Zusammensetzung des Trophoblasten in den Rinderplazentomen bei den IVP-Gruppen ebenfalls auf eine veränderte Dynamik in der Trophoblastriesenzelldifferenzierung hin (s.o.). Anders als bei der Maus deuten die eigenen Befunde beim Rind jedoch eher in Richtung einer Beschleunigung der TGC-Bildung bei erhöhter ERR2-Expression. Bezüglich dieses Widerspruches muss allerdings beachtet werden, dass es zwischen der Plazentation bei Maus und Rind erhebliche morphologische und funktionelle Unterschiede gibt. So können nach morphologischen und funktionellen Gesichtspunkten in der Mausplazenta deutlich mehr Trophoblastzelltypen unterschieden werden als beim Rind (Cross 2005) und auch die

Trophoblastriesenzellen weisen zwischen einzelnen Spezies erhebliche Unterschiede in ihrer Entstehungsweise und Funktionen auf (Hoffman und Wooding 1993). Somit könnte sich die Bedeutung von ERR2 in der Rinderplazenta erheblich von der in der Mausplazenta unterscheiden.

Nachdem eine Expression von ERR2 zunächst in der Blastozyste des Rindes nachgewiesen wurde (Hall et al. 2005), war gegebenenfalls zu erwarten, dass deren Lokalisation in den Plazentomen vor allem in den Kotyledonen nachgewiesen werden kann. Eine stichprobenartige vergleichende Messung in Kotyledonen bzw. Karunkeln von drei Plazentomen zwischen dem 120. und 240. Trächtigkeitstag ließ jedoch keine bevorzugte Expression in einem der beiden Gewebeanteile erkennen. Eine vorwiegende Expression in den TGC kann aber dennoch nicht ausgeschlossen werden, da die reifen TGC bei der manuellen Trennung der beiden Gewebeanteile nach eigenen Beobachtungen zu einem erheblichen Teil im Karunkelepithel zu finden sind (siehe auch Befunde zur bPL-Expression).

Insgesamt ergeben sich demnach aus den eigenen Untersuchungen deutliche Hinweise, dass die im Rahmen der In vitro-Produktion durchgeführten Manipulationen an Eizellen und/oder Embryonen zu einer veränderten ERR2-Expression in den Plazentomen führt, aus der eine veränderte Zelldynamik im Trophoblasten resultieren könnte.

Plazentares Laktogen (bPL) wurde in die Untersuchungen einbezogen, da diesem Faktor eine Bedeutung bei der Beeinflussung des mütterlichen Stoffwechsel im Interesse des fetalen Wachstums zugesprochen wird (Anthony et al. 1995) und beim Rind im fetalen Kreislauf deutlich höhere Konzentrationen als im maternalen gemessen wurden (Holland et al. 1997).

Hierbei sind beim Rind die Hauptangriffspunkte und Wirkmechanismen dieses "Hormons" noch weitestgehend unklar. Für bPL konnte bisher kein eigener Rezeptor eindeutig identifiziert werden. Es bindet aber sowohl an den Prolaktinrezeptor (PRLR) als auch an den Wachstumshormonrezeptor (GHR). Aufgrund seiner Eigenschaft, in homologen in vitro-Systemen mit Prolaktinrezeptor-Homodimeren zu interagieren bzw. die Bildung von GHR/PRLR-Heterodimeren zu induzieren wird angenommen, dass PRLR-Homodimere bzw. GHR/PRLR-Heterodimere auch in vivo die Wirkung von bPL vermitteln. Eine somatogene Wirkung von bPL konnte zwar in heterologen Systemen gezeigt werden, da bPL aber in homologen Systemen keine Bildung von GHR-Homodimeren induzieren konnte, was als Voraussetzung für die Aktivierung einer ent-

sprechenden intrazellulären Signalkaskade gilt, agiert bPL am GHR vermutlich als Antagonist oder Partialagonist (Gertler und Djiane 2002; Gootwine 2004). Da beim Rind im Vergleich zum Schaf die im mütterlichen Organismus gemessenen Konzentrationen von plazentarem Laktogen sehr viel niedriger sind (Handwerger et al. 1977; Hossner et al. 1997), stellt sich bezüglich des bPL die Frage, ob dieses "Hormon" beim Rind nicht eher vorwiegend eine Rolle als lokaler Regulator des plazentaren Wachstums und der plazentaren Differenzierung spielt. Daher wurden GHR und PRLR ebenfalls in die Untersuchungen einbezogen. Über die Expression von GHR und PRLR in den Rinderplazentomen lagen bisher nur wenige bzw. kaum Informationen vor (Scott et al. 1992; Kölle et al. 1997).

Für keinen dieser Parameter (bPL, GHR, PRLR) konnte in den eigenen Untersuchungen auf mRNA-Ebene ein signifikanter Gruppenunterschied bezüglich der Expression in den Plazentomen gezeigt werden. Es ergaben sich auch keinerlei Beziehungen zwischen der Expression dieser Faktoren und den an den Feten erhobenen Daten. Die Ergebnisse zur bPL-Expression am 80. Graviditätstag stehen weiterhin im Widerspruch zu denen von Bertolini et al. (2006), die in Plazentomen aus IVP-Trächtigkeiten im Vergleich zu Plazentomen aus MOET-Trächtigkeiten mittels Real-Time RT-PCR am 90. sowie am 180. Trächtigkeitstag signifikant höhere bPL-Expressionen fanden; allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Zeitunterschied von 10 Tagen (80. vs. 90. Graviditätstag) eine Einflussgröße darstellt.

Im Verlauf der normalen Trächtigkeit wurde zwischen dem 80. Graviditätstag und der Geburt ein kontinuierlicher Anstieg der bPL-Expression in den Plazentomen gemessen, der jedoch statistisch nicht signifikant war. Diese Ergebnisse bestätigen grundsätzlich die Resultate früherer Messungen der bPL-mRNA-Konzentrationen in Rinderplazentomen von Patel et al. (2004), in denen sich der gemessene Anstieg jedoch als signifikant erwies. Die bPL-Expression in den Rinderplazentomen ist auf zellulärer Ebene durch Untersuchungen mittels Immunhistologie (Duello et al. 1986) und in situ-Hybridisierung (Patel et al. 2004) gut charakterisiert. Eine nennenswerte Expression ist nur in den reifenden und ausgereiften TGC nachweisbar. Die eigenen Ergebnisse aus bPL-Expressionsmessungen in Karunkel und Kotyledonen zeigen jedoch deutlich, dass solche häufig durchgeführten fetomaternal vergleichenden Untersuchungen (v.a. mRNA-Konzentrationen, Enzymaktivitäten) trotz sorgfältiger Präparation des Probenmaterials kaum aussagefähig sind, wenn eine Expression in den TGC nicht ausgeschlossen werden kann. Dies bestätigt eigene lichtmikroskopische

Beobachtungen, nach denen in den Plazentomen bei artefizieller Trennung "entlang der fetomaternalen Kontaktzone" ein Großteil der reifen TGC im oder am Karunkelepithel haften bleibt.

Bezüglich des Prolaktinrezeptors ergab sich keine Abhängigkeit der Expression vom Trächtigkeitsstadium (Realtime RT-PCR-Verfahren für die Erfassung der kurzen PRLR-Isoform bzw. zur gemeinsamen Erfassung beider PRLR-Isoformen). In den frühen und mittleren Trächtigkeitsstadien traten überaus hohe Streuungen der Messwerte auf. Da diese starken "Ausreißer" mit zwei unterschiedlichen Messsystemen reproduzierbar waren und derart starke Streuungen der Messwerte nur bei der Messung der PRLR-Expression auftraten, kann ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um methodenbedingte Artefakte handelt. Offensichtlich treten also erhebliche Schwankungen der PRLR-Expression zwischen verschiedenen Tieren auf. Denkbar wäre auch, dass die PRLR-Expression innerhalb der Plazentome sehr inhomogen verteilt ist. Gegen einen Lokalisations-Effekt bei der Probenentnahme spricht jedoch, dass bei den 80 Tage-Tieren aufgrund der geringen Größe der Plazentome die für die RNA-Gewinnung verwendeten Gewebestück stets alle Bereiche der Plazentome umfassten. Über die Expression von PRLR in Rinderplazentomen liegen auf zellulärer Ebene bisher keinerlei Informationen vor. Bei der stichprobenartigen separaten Messung in Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe konnte die PRLR-Expression vorwiegend der Karunkel zugeordnet werden.

Zur GHR-Expression in den Plazentomen lag bisher nur eine Veröffentlichung vor die zeigte, dass in den Rinderplazentomen GHR hauptsächlich in den einkernigen Trophoblastzellen (UTC) und den Karunkelepithelzellen, nicht jedoch in den TGC exprimiert wird (Kölle et al. 1997). Diese Befunde konnten in den eigenen Untersuchungen bestätigt werden. Separate Messungen in Karunkel- und Kotyledonengewebe zeigten, dass zwischen dem 120. und 240. Trächtigkeitstag die Expression im maternalen Teil der Plazentome höher ist, was mit einem intensiveren immunhistologischen Signal in den Karunkelepithelzellen im Vergleich zu den UTC korrelierte. Bei den erstmalig zum Zeitpunkt der präpartalen Luteolyse und unter der Geburt durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, dass in dieser Phase das Signal in den UTC deutlich überwog, wobei zusätzlich zu den zytoplasmatischen auch deutliche nukleäre Signale beobachtet wurden. Eine nukleäre Lokalisation passt nach traditionellem Verständnis nicht zu einem membranständigen Proteohormon-Rezeptor. Neuere Befunde deuten jedoch darauf hin, dass der GHR nach Ligandbindung internalisiert werden kann und eine

nukleäre Lokalisation des GHR mit einer starken Proliferation assoziiert ist (Conway-Campbell et al. 2007; Swanson und Kopchick, 2007). Der signifikante präpartale Anstieg der GHR-Expression deutet darauf hin, dass dieser Rezeptor in die zur Geburt führende Signalkaskade involviert sein könnte. Insgesamt sprechen die zur Expression von PRLR und GHR erhaltenen Befunde dafür, dass beim Rind die Plazentome selbst wichtige Zielorgane des plazentaren Laktogens sind.

## 6. Zusammenfassung

Beim Rind wird nach der Anwendung verschiedener biotechnischer Verfahren wie beispielsweise der in vitro-Produktion von Embryonen (IVP) und des somatischen Klonens vermehrt ein Syndrom fetaler Anomalien beobachtet, das häufig mit einem fetalen Überwuchs einhergeht. Daher wurde es als Large Offspring Syndrome (LOS) bezeichnet. Die genaue Pathogenese dieses Syndroms ist noch weitestgehend unklar. Offensichtlich spielen in dessen Ätiologie Störungen der epigenetischen Reprogrammierung des Genoms während der frühembryonalen Phase eine erhebliche Rolle. Bisherige Untersuchungen zum LOS konzentrierten sich hauptsächlich auf den Fetus sowie auf die Genexpression in der frühembryonalen Phase, die in dem Syndrom ebenfalls auftretenden plazentaren Veränderungen sind vergleichsweise noch wenig erforscht. Auch eine mögliche Bedeutung der Plazenta in der Stimulation des LOS-assoziierten Überwuchses hat bisher noch relativ wenig Interesse gefunden. Daher wurden in dieser Arbeit vergleichende Untersuchungen an Rinderplazentomen aus Graviditäten mit bzw. ohne LOS-assoziierten Überwuchs durchgeführt, wobei die erfassten Parameter einen offensichtlichen oder vermuteten Bezug zu Wachstum und Differenzierung der Plazenta hatten. Hierdurch sollten LOS-assoziierte Plazentaveränderungen näher charakterisiert und Hinweise auf deren Pathogenese erhalten werden. Weiteres Ziel war es, eventuelle Beziehungen zwischen Plazentaveränderungen und fetalem Überwuchs zu identifizieren.

Das zur Charakterisierung LOS-assoziiierter Plazentaveränderungen untersuchte Probenmaterial entstammte Trächtigkeiten, die nach zwei unterschiedlichen Protokollen der in vitro-Produktion (IVP1, n=5; IVP2, n=6) erzeugt wurden. Der Unterschied zwischen den beiden Protokollen bestand in einer unterschiedlichen Supplementierung des Oozytenmaturationsmediums mit Gonadotropinen (IVP1: 0,01 U/ml bovines FSH + 0,01 U/ml bovines LH; IVP2: 0,2 ml ovines FSH). Als Kontrollen dienten Plazentome aus Trächtigkeiten, die mittels konventionellen Embryotransfers nach Superovulation (MOET) erzeugt worden waren. Das Spermium für die Besamung stammte vom selben Bullen ("Simvitel"; Brown Swiss). Die Eizell-Spendertiere gehörten ebenfalls der Rasse Brown Swiss an. Die als Empfängertiere verwendeten Fleckvieh-Färsen wurden am 80. Trächtigkeitstag geschlachtet und als Probenmaterial Plazentome (Fixierung in phosphatgepuffertem 10%igem Formalin; schockgefrorene Gewebeproben) sowie Amnion- bzw. Allantoisflüssigkeit gewonnen. Weiterhin wurden Scheitel-Steiß-Länge (SSL), Gewicht und maximaler Brustumfang

(BU<sub>max</sub>) der Feten registriert. Aus den Trächtigkeiten resultierten in den drei Versuchsgruppen jeweils 8 Feten. Die Feten der IVP-Gruppen waren deutlich länger ( $p < 0,001$ ) und schwerer ( $p < 0,001$ ) als die Feten der MOET-Gruppe, während sich zwischen IVP1 und IVP2 diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede ergaben. Dieses Probenmaterial und Daten zu Größe und Gewicht der Feten wurden von Prof. Dr. S. Hiendleder, vormals Institut für molekulare Tierzucht und Biotechnologie, Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung gestellt. Die tierexperimentellen Arbeiten erfolgten an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft in Grub unter der Leitung von Herrn Dr. H.-D. Reichenbach.

In Amnion- und Allantoisflüssigkeit wurden die Konzentrationen freier und konjugierter Östrogene sowie von Progesteron radioimmunologisch bestimmt. Bezüglich der konjugierten Östrogene gab es zwischen den Versuchsgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede. Signifikante Korrelationen zum fetalen Wachstum waren ebenfalls nicht nachweisbar. Die Konzentrationen der freien Gesamtöstrogene sowie von Progesteron lagen in allen untersuchten Proben unterhalb der Nachweisgrenze von 0,1 ng/ml.

Zur Erfassung der Dynamik der Trophoblastriesenzelldifferenzierung wurden einkernige Trophoblastzellen (UTC), unreife und reife Trophoblastriesenzellen (iTGC bzw. mTGC) nach ihrer Morphologie und Anfärbbarkeit durch Lektin aus Dolichos Biflorus identifiziert und ausgezählt. Diese Untersuchung ergab einen signifikant höheren Anteil an iTGC in der MOET-Gruppe ( $12,7 \pm 1,2$ ) als in der IVP2-Gruppe ( $10,2 \pm 1,7$ ;  $p < 0,05$ ), während sich die IVP1-Gruppe ( $10,9 \pm 1,1$ ) nicht signifikant von den anderen beiden Versuchsgruppen unterschied. Wurden die Daten der IVP-Gruppen gepoolt und mit der MOET-Gruppe verglichen, war der Unterschied deutlich signifikant ( $p=0,011$ ). Bei der Korrelationsanalyse unter Einbeziehung aller Trächtigkeiten ergab sich eine signifikante negative Korrelation zwischen dem Anteil der iTGC und der fetalen SSL ( $p=0,024$ ) sowie BU<sub>max</sub> ( $p=0,044$ ).

Basierend auf dem immunhistochemischen Nachweis der aktivierten Caspase 3 wurde die Häufigkeit apoptotischer Zellen pro mm<sup>2</sup> Gewebeschnitt erfasst. Hierbei zeigte sich, dass in den IVP-Plazentomen apoptotische Zellen häufiger waren als in den MOET-Plazentomen (IVP1:  $314,0 \pm 96,7$ ; IVP2:  $290,0 \pm 127,2$ ; MOET:  $181,1 \pm 62,5$ ); es ergab sich jedoch kein statistischer Einfluss der Versuchsgruppen. Wurden die Daten der IVP-Gruppen gepoolt und mit der MOET-Gruppe verglichen, war der Unterschied jedoch statistisch signifikant ( $p=0,040$ ). Die Quantifizierung der Zell-

proliferation unter Verwendung des immunhistologischen Nachweises des Proliferationsmarkers Ki67-Antigen ergab für keinen der untersuchten Zelltypen (Trophoblast, Chorionzottenstroma, Karunkelepithel, Karunkelstroma) einen signifikanten Einfluss der Versuchsgruppe. Es ergaben sich auch keine signifikanten Korrelationen zwischen der Proliferation in den untersuchten Zelltypen und fetalen Größenparametern.

Bei der Messung der relativen Expression wachstums- und differenzierungsrelevanter Gene mittels Real-Time RT-PCR (TaqMan-Methode) wurde hinsichtlich des Estrogen-related receptor 2 (ERR2) annähernd ein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe erreicht ( $p=0,054$ ), wobei die Expression in den IVP-Gruppen höher war als in der MOET-Gruppe [ $\bar{X}$  g (SF): IVP1: 14,2 (1,6); IVP2: 9,3 (2,3); MOET: 3,9 (2,5)]. Wurden die Daten aus den IVP-Gruppen gepoolt und mit der MOET-Gruppe verglichen, ergab sich ein signifikanter Unterschied ( $p=0,022$ ). Weiterhin ergaben sich signifikant positive Korrelationen zwischen der ERR2-Expression und SSL ( $p=0,019$ ) sowie dem Fetengewicht ( $p=0,043$ ). Bezüglich der Expression der übrigen untersuchten Gene (ErbB3, Östrogenrezeptoren und  $\beta$ , Wachstumshormonrezeptor, Plazentares Laktogen, Prolaktinrezeptor) ergaben sich keine signifikanten Gruppenunterschiede und Korrelationen zu fetalen Größenparametern.

Diese Ergebnisse deuten insgesamt darauf hin, dass zumindest im eigenen LOS-Modell der fetale Überwuchs mit einer veränderten ERR2-Expression in den Plazentomen assoziiert ist. Aufgrund der nachgewiesenen erheblichen Bedeutung von ERR2 in der Differenzierung muriner Trophoblastzellen und der eigenen Befunde bezüglich der Apoptose-Häufigkeit und des Anteils unreifer Trophoblastriesenzellen kann weiterhin vermutet werden, dass es bei LOS-Trächtigkeiten in den Plazentomen im Zusammenhang mit einer gesteigerten ERR2-Expression zu einer Alteration in der Dynamik der Trophoblastriesenzelldifferenzierung kommt.

In ergänzenden Untersuchungen wurden für einige der untersuchten Gene auf mRNA-Ebene Expressionsprofile in den Plazentomen über den Verlauf der normalen Trächtigkeit erstellt, sofern dazu für das Rind noch keine Informationen vorlagen. Das hierzu verwendete tiefgefrorene Probenmaterial stammte aus früheren Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe und deckte den Zeitraum zwischen dem 60. Trächtigkeitstag und der termingerechten Geburt ab. Für ErbB3 ( $p=0,041$ ) und Wachstumshormonrezeptor ( $p=0,034$ ) wurde ein signifikanter Einfluss des Trächtigkeitsstadiums festgestellt, wobei in beiden Fällen ein Anstieg der Messwerte unmittelbar präpartal

und unter der Geburt zu beobachten war. Dies deutet darauf hin, dass die Expression beider Gene mit der zur Geburt führenden Signalkaskade in Verbindung stehen könnte. Für ERR2 und den Prolaktinrezeptor ergab sich dagegen kein Einfluss des Trächtigkeitsstadiums. Die Expression von Wachstumshormon- und Prolaktinrezeptoren in den Plazentomen sprechen dafür, dass diese beim Rind wichtige Zielorgane für das Plazentare Laktogen sind.

## 7. Summary

In cattle in a considerable proportion of cases, the use of assisted reproductive techniques such as in vitro production (IVP) or somatic cell nuclear transfer is associated with a variable syndrome of fetal abnormalities, of which fetal overgrowth is a striking feature. Thus, this syndrome was named large offspring syndrome (LOS). The pathogenesis of LOS is still widely unclear. However, the disturbance of epigenetic reprogramming of the genome during the preimplantation period has been identified as an important underlying factor. So far, the vast majority of studies on the etiology of LOS focused on the fetus or on gene expression during the early embryonic phase, whereas only limited information is available on the origin of LOS-associated placental aberrations and their potential role in the emergence of fetal overgrowth. Thus, in this comparative study including placentomes from LOS pregnancies and from normal control pregnancies, parameters with obvious or suggested relevance for placental growth and differentiation were assessed to characterize LOS-associated placental lesions and to provide information on the underlying pathogenetic mechanisms. An additional aim of this study was to test for a possible relationship between placental abnormalities and fetal overgrowth.

Placentomes were obtained from LOS pregnancies produced by two different IVP protocols (IVP1, n=5; IVP2, n=6), which only differed in the supplementation of the oocyte maturation medium with gonadotropins (IVP1: 0.01 U/ml bovine FSH + 0.01 U/ml bovine LH; IVP2: 0.2 ml ovine FSH). Placentomes from pregnancies produced by multiple ovulation embryo transfer (MOET; n=5) were used as controls. Semen used for in vitro-fertilization (IVP groups) and artificial insemination (MOET group) was from the same bull ("Simvitel"; Brown Swiss). The oocyte donors also belonged to the Brown Swiss breed. The recipients (Fleckvieh) were slaughtered at day 80 of gestation and placentomes were snap-frozen or conserved in phosphate buffered 10% formalin, respectively. In addition, amniotic and allantoic fluids were collected and fetal crown-rump-length (CRL), weight and maximal thoracic circumference ( $TC_{max}$ ) were registered. Each of the three experimental groups provided 8 fetuses. Fetuses of the IVP-groups were significantly longer ( $p < 0.001$ ) and heavier ( $p < 0.001$ ) compared to MOET fetuses. However, no significant differences were found in this regard between IVP1 and IVP2 fetuses. Tissue samples and data on fetal size and weight were provided by Prof. Dr. S. Hiendleder, formerly Institute of Molecular Animal Breeding, Gene Center, Ludwig-Maximilians-University Munich. The animal

experiments were carried out at the Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft in Grub under supervision of Dr. H.-D. Reichenbach.

The concentrations of free and conjugated total estrogens and of progesterone in amniotic and allantoic fluids were measured by radioimmunoassay. No statistically significant differences were found between the experimental groups for conjugated total estrogens, and no significant correlations between conjugated total estrogen concentrations and fetal size or weight were obtained. The concentration of free total estrogens and progesterone were below the sensitivity of the assay, respectively ( $<0.1$  ng/ml). To characterize the dynamics of trophoblast giant cell differentiation, based on histochemistry using dolichos biflorus lectin trophoblast cells were assigned to one of the following categories: uninucleate trophoblast cells (UTC), immature or mature trophoblast giant cells (iTGC, mTGC). Quantitative evaluation showed that the percentage of iTGC was significantly higher in the MOET group ( $12.7 \pm 1.2$ ) compared to the IVP2 group ( $10.2 \pm 1.7$ ;  $p < 0.05$ ), whereas the IVP1 group ( $10.9 \pm 1.1$ ) was not different from the IVP2 and the MOET group, respectively. When the data of both IVP groups were pooled and compared to the MOET group, the difference was clearly statistically significant ( $p=0.011$ ). In correlation analyses including the data from all pregnancies, significant negative correlations were found between the percentage of iTGC and the fetal CRL ( $p=0.024$ ) and  $TC_{max}$  ( $p=0.044$ ), respectively.

The frequency of apoptotic cells per  $mm^2$  tissue section was assessed based on immunostaining for activated caspase 3. It was higher in IVP placentomes than in MOET placentomes (IVP1:  $314.0 \pm 96.7$ , IVP2:  $290.0 \pm 127.2$ ; MOET:  $181.1 \pm 62.5$ ). However, no statistically significant effect was obtained for the experimental group. When comparing the pooled data from the IVP groups to the MOET group, a statistically significant difference was found ( $p=0.040$ ). Immunohistochemical detection of Ki67 antigen was applied to quantify cell proliferation in various cell types of the placenta (trophoblast cells, stromal cells of chorionic villi, caruncular epithelial cells, caruncular stromal cells). No statistically significant effect of the experimental group was found concerning the percentage of Ki67 antigen positive cells for any of the cell types investigated, and no significant correlations were detected between placental cell proliferation and parameters of fetal size and weight. The relative expression of genes relevant for growth and differentiation was measured by Real-Time RT-PCR (Taqman method). Concerning the expression of estrogen-related receptor 2 (ERR2) there was a borderline error probability for an effect of the experimental group

( $p=0.054$ ). Mean relative gene expression (RGE) was higher in the MOET group compared to the IVP groups [ $\bar{X}$  g (SF): IVP1: 14,2 (1.6); IVP2: 9,3 (2,3); MOET: 3,9 (2,5)]. When pooling the data from the IVP groups and comparing them to the MOET group, the difference was clearly significant ( $p=0.022$ ). Moreover, in correlation analyses including data from all pregnancies, significant positive correlations between the expression of ERR2 and CRL ( $p=0.019$ ) and fetal weight ( $p=0.043$ ) were found, respectively. No significant effect of the experimental group and no correlations to parameters of fetal size and weight were found for the expression of the remaining genes investigated (ErbB3, estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , growth hormone receptor, placental lactogen, prolactin receptor).

These results suggest that - at least in our LOS model - fetal overgrowth is associated with an altered ERR2 expression in the placentomes. Considering the essential role of ERR2 in the control of murine trophoblast cell differentiation, the own results on the occurrence of apoptosis and the proportion of immature trophoblast giant cells suggest that the increase of ERR2 expression in placentomes from LOS pregnancies is associated with an altered dynamics of trophoblast giant cell differentiation.

In addition to the measurement of gene expression in placentomes from IVP and MOET pregnancies on day 80 of gestation, gestational profiles were established for the target genes mentioned above for normal pregnancies in case no respective information was available from literature. Snap-frozen placentomal samples covering the period between day 80 of gestation and parturition were available from previous studies. A significant effect of gestational age was found for ErbB3 ( $p=0.041$ ) and growth hormone receptor ( $p=0.034$ ). For both factors, a distinct increase of relative gene expression was observed in the immediate prepartal phase and during parturition suggesting that they are involved in the signal cascade leading to parturition. No time effect was detectable for ERR2 and prolactin receptors. Comparative measurements of mRNA specific to growth hormone receptor and prolactin receptors in caruncles and cotyledons localized their expression predominantly in the maternal part of the placentomes. This suggests that the caruncle may be an important target organ of placental lactogen, which may act as a ligand of these two receptors.

## 8. Literaturverzeichnis

- Anthony RV, Pratt SL, Liang R, Holland MD. 1995. Placental-fetal hormonal interactions: impact on fetal growth. *Journal of Animal Science* 73:1861-1871.
- Ariazi EA, Jordan VC. 2006. Estrogen-related receptors as emerging targets in cancer and metabolic disorders. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 6:203-215.
- Atkinson BA, King GJ, Amoroso EC. 1984. Development of the caruncular and intercaruncular regions in the bovine endometrium. *Biology of Reproduction* 30:763-774.
- Barnard R, Bundesen PG, Rylatt DB, Waters MJ. 1985. Evidence from the use of monoclonal antibody probes for structural heterogeneity of the growth hormone receptor. *The Biochemical Journal* 231:459-468.
- Bertolini M, Anderson GB. 2002. The placenta as a contributor to production of large calves. *Theriogenology* 57:181-187.
- Bertolini M, Wallace CR, Anderson GB. 2006. Expression profile and protein levels of placental products as indirect measures of placental function in in vitro-derived bovine pregnancies. *Reproduction* 131:163-173.
- Björkmann NH. 1954. Morphological and histochemical studies on the bovine placenta. *Acta Anatomica Basel* 22:1-91.
- Björkmann NH. 1968. Fine structure of cryptal and trophoblastic giant cells in the bovine placentome. *Journal of Ultrastructure Research* 24:249-258.
- Björkmann NH. 1969. Light and electron microscopic studies on cellular alterations in the normal bovine placentome. *Anatomical Record* 163:17-30.
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews* 19:225-268.
- Boos A, Janssen V, Mülling C. 2003. Proliferation and apoptosis in bovine placentomes during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as well as in cows retaining the fetal membranes. *Reproduction* 126:469-480.
- Brown DC, Gatter KC. 1990. Monoclonal Antibody Ki67: its use in histopathology. *Histopathology* 17:489-503.

- Bruno S, Darzynkiewicz Z. 1992. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Proliferation* 25:31-40.
- Bukovsky A, Cekanova M, Caudle MR, Wimalasena J, Foster JS, Henley DC, Elder RF. 2003a. Expression and localisation of estrogen receptor –alpha protein in normal and abnormal term placentae and stimulation of trophoblast differentiation by estradiol. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1:13.
- Bukovsky A, Caudle MR, Cekanova M, Fernando RI, Wimalasena J, Foster JS, Henley DC, Elder RF. 2003b. Placental expression of estrogen receptor beta and its hormone binding variant – comparison with estrogen receptor alpha and a role for estrogen receptors in assymetric division and differentiation of estrogen-dependent cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1: 36.
- Bullwinkel J, Baron-Lühr B, Lüdemann A, Wohlenberg C, Gerdes J, Scholzen T. 2006. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *Journal of Cellular Physiology* 206:624-635.
- Carraway KL 3rd. 1996. Involvement of the neuregulines and their receptors in cardiac and neural development. *Bioassays* 18:263-266.
- Casalini P, Iorio MV, Galmozzi E, Menard S. 2004. Role of HER receptors family in development and differentiation. *Journal of Cellular Physiology* 200:343-350.
- Chew B, Erb RE, Fessler JF, Callahan CJ, Malven PV. 1979. Effects of ovariectomy during pregnancy and of prematurely induced parturition on progesterone estrogens, and calving traits. *Journal of Dairy Science* 62:557-566.
- Citri A, Skaria KB, Yarden Y. 2003. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB3. *Experimental Cell Research* 284:54-65.
- Cohen GM. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal* 326:1-16.
- Constant F, Guillomot M, Heyman Y, Vignon X, Laigre P, Servely JL, Renard JP, Chavette-Palmer P. 2006. Large Offspring or Large Placenta Syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. *Biology of Reproduction* 75:122-130.
- Conway-Campbell BL, Wooh JW, Brooks AJ, Gordon D, Brown RJ, Lichanska AM, Chin HS, Barton CL, Boyle GM, Parsons PG, Jans DA, Waters MJ. 2007. Nuclear targeting of the growth hormone receptor results in dysregulation of cell

proliferation and tumorigenesis. The Proceedings of the National Academy of Science USA 104:13331-13336.

- Cross JC. 2005. How to make a placenta: mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice - a review. *Placenta* 26 Suppl A:3-9.
- Day AM. 1977. Cloprostenol for termination of pregnancy in cattle. *New Zealand Veterinary Journal* 25:139-144.
- Drost M. 2007. Complications during gestation in cow. *Theriogenology* 68:487-491.
- Duchrow M, Ziems C, Habermann J, Bruch HP. 2006. Ki-67 Autoantikörper beim kolorektalen Karzinom. *Zentralblatt für Chirurgie* 131, Doi: 10.1055/s-2006-944396, Thieme-connect/abstract.
- Duello TM, Bryatt JC, Bremel RD. 1986. Immunohistochemical localization of placental lactogen in binucleate cells of bovine placentomes. *Endocrinology* 119:1351-1355.
- Eggan K, Akutsu H, Loring J, Jackson-Grusby L, Klemm M, Rideout WM 3rd, Yanagimachi R, Jaenisch R. 2001. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:6209-6214.
- Eley RM, Thatcher WW, Bazer FW. 1979. Hormonal and physical changes associated with bovine conceptus development. *Journal of Reproduction and Fertility* 55:181-190.
- Engelhardt v. W, Breves G. 2000. *Physiologie der Haustiere*. Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart.
- Estergreen VL, Frost OL, Gomes WR, Erb RE, Bullard JF. 1967. Effect of ovariectomy on pregnancy maintenance and parturition in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 50:1293-1295.
- Failero L, Kobayashi R, Fernhead H, Lazebnik Y. 1997. Multiple species of CPP32 and Mch2 are the major active caspases present in apoptotic cells. *The EMBO Journal* 16:2271-2281.
- Falini B, Flenghi L, Fagioli M, Stein H, Schwarting R, Riccardi C, Manocchio I, Pileri PG, Lanfrancone L. 1989. Evolutionary conservation in various mammalian species of the human proliferation-associated epitope recognized by the Ki-67

- monoclonal antibody. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 37:1471-1478.
- Farin PW, Piedrahita JA, Farin CE. 2006. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 65:178-191.
  - Fernandez-Gonzalez R, Moreira P, Bilbao A, Jimenez A, Perez-Crespo M, Ramirez MA, Rodriguez De Fonseca F, Pintado B, Gutiérrez-Adán A. 2004. Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101:5880-5885.
  - Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *The Journal of Immunology* 133:1710-1715.
  - Gertler A, Djiane J. 2002. Mechanism of ruminant placental lactogen action: molecular and in vivo studies. *Molecular Genetics and Metabolism* 75:189-201.
  - Goffin V, Kelly PA. 1997. The prolactin/growth hormone receptor family: structure/function relationships. *Journal of Mammary Gland and Neoplasia* 2:7-17.
  - Goffin V, Binart N, Touraine P, Kelly PA. 2002. Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annual Review of Physiology* 64:47-67.
  - Golstein P, Ojcius DM, Young JD. 1991. Cell death mechanisms and the immune system. *Immunological Reviews* 121:29-65.
  - Gootwine E. 2004. Placental hormones and fetal-placental development. *Animal Reproduction Science* 82-83:551-566.
  - Greven H, Kowalewski MP, Hoffmann B, Geyer J, Rex-Haffner M, Ugele B, Schuler G. 2007. Bovine placental steroid sulphatase: molecular cloning and expression pattern in placentomes during gestation and parturition. *Placenta* 28:889-897.
  - Gross TS, Williams WF. 1988. Bovine placental prostaglandin synthesis: principle cell synthesis as modulated by the binucleate cell. *Biology of Reproduction* 38:1027-1034.
  - Gross TS, Williams WF, Russek-Cohen E. 1991. Cellular changes in the peripartum bovine fetal placenta related to placental separation. *Placenta* 12:27-35.
  - Grosser O. 1927. *Frühentwicklung, Eihautbildung und Plazentation des Menschen und der Säugetiere*. Bergmann, München.

- Haanen C, Vermes I. 1996. Apoptosis: programmed cell death in fetal development. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 64:129-133.
- Hall VJ, Ruddock NT, French AJ. 2005. Expression profiling of genes crucial for placental and preimplantation development in bovine in vivo, in vitro, and nuclear transfer blastocysts. *Molecular Reproduction and Development* 72:16-24.
- Handwerger S, Crenshaw C Jr, Maurer WF, Barrett J, Hurley TW, Golander A, Fellows RE. 1977. Studies on ovine placental lactogen secretion by homologous radioimmunoassay. *Journal of Endocrinology* 72:27-34.
- Hewitt SC, Korach KS. 2002. Estrogen receptors: structure, mechanisms and function. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 3:193-200.
- Hiendleder S, Wirtz M, Mund C, Klempt M, Reichenbach HD, Stojkovic M, Weppert M, Wenigerkind H, Elmlinger M, Lyko F, Schmitz OJ, Wolf E. 2006. Tissue-specific effects of in vitro fertilization procedures on genomic cytosine methylation levels in overgrown and normal sized bovine fetuses. *Biology of Reproduction* 75:17-23.
- Hill JR, Burghardt RC, Jones K, Long CR, Looney CR, Shin T, Spencer TE, Thompson JA, Winger QA, Westhusin ME. 2000. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biology of Reproduction* 63:1787-1794.
- Hill JR, Edwards JF, Sawyer N, Blackwell C, Cibelli JB. 2001. Placental anomalies in a viable cloned calf. *Cloning* 3:83-88.
- Hoffmann B. 1977. Bestimmung von Steroidhormonen beim weiblichen Rind. Entwicklung von Messverfahren und physiologischen Daten. *Fortschritte der Veterinärmedizin* 26. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.
- Hoffmann B, Goes de Pinho T, Schuler G. 1997. Determination of free and conjugated oestrogens in peripheral blood plasma, feces and urine of cattle throughout pregnancy. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 105:296-303.
- Hoffmann B, Schuler G. 2002. The bovine placenta; a source and target of steroid hormones: observations during the second half of gestation. *Domestic Animal Endocrinology* 23:309-320.
- Hoffman LH, Wooding FB. 1993. Giant and binucleate trophoblast cells of mammals. *Journal of Experimental Zoology* 266:559-577.

- Holland MD, Hossner KL, Williams SE, Wallace CR, Niswender GD, Odde KG. 1997. Serum concentrations of insulin-like growth factors and placental lactogen during gestation in cattle. I. Fetal profiles. *Domestic Animal Endocrinology* 14:231-239.
- Hossner KL, Holland MD, Williams SE, Wallace CR, Niswender GD, Odde KG. 1997. Serum concentrations of insulin-like growth factors and placental lactogen during gestation in cattle. II. Maternal profiles. *Domestic Animal Endocrinology* 14:316-324.
- Hradecky P, Mossman HW, Stott GG. 1988. Comparative development of ruminant placentomes. *Theriogenology* 29:715-729.
- Hu X. 2003. Proteolytic signaling by TNF $\alpha$ : caspase activation and I $\kappa$ B degradation. *Cytokine* 21:286-294.
- Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Thierfelder WE, Kreider B, Silvennoinen O. 1994. Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends in Biochemical Sciences* 19:222-227.
- Jabbour HN, Critchley HO. 2001. Potential roles of decidual prolactin in early pregnancy. *Reproduction* 121:197-205.
- Johnson WH, Manns JG, Adams WM, Mapletoft RJ. 1981. Termination of pregnancy with cloprostenol and dexamethasone in intact or ovariectomized cows. *Canadian Veterinary Journal* 22:288-290.
- Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Chung AS, Lee KK, Han YM. 2001. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nature Genetics* 28:173-177.
- Karlson P, Doenecke D, Koolman J. 1994. *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Wissenschaftler*. 14. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. New York.
- Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. 1994. Apoptosis - its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73:2013-2026.
- King GJ, Atkinson BA, Robertson HA. 1980. Development of the placentome from days 20 to 29 of gestation. *Journal of Reproduction and Fertility* 59:95-100.
- Klisch K, Hecht W, Pfarrer C, Schuler G, Hoffmann B, Leiser R. 1999. DNA content and ploidy level of bovine placentomal trophoblast giant cells. *Placenta* 20:451-458.

- Klisch K, Leiser R. 2003. In bovine binucleate trophoblast giant cells, pregnancy-associated glycoproteins and placental prolactin-related protein-I are conjugated to asparagin-linked N-acetylgalactosaminyl glycans. *Histochemistry and Cell Biology* 119:211-217.
- Klisch K, Boos A, Friedrich M, Herzog K, Feldmann M, Sousa N, Beckers J, Leiser R, Schuler G. 2006. The glycosylation of pregnancy-associated glycoproteins and prolactin-related protein-I in bovine binucleate trophoblast giant cells changes before parturition. *Reproduction* 132:791-798.
- Klonisch T, Wolf P, Hombach-Klonisch S, Vogt S, Kuechenhoff A, Tetens F, Fischer B. 2001. Epidermal growth factor-like ligands and ErbB genes in the peri-implantation rabbit uterus and blastocyst. *Biology of Reproduction* 64:1835-1844.
- Kölle S, Sinowatz F, Boie G, Lincoln D, Waters MJ. 1997. Differential expression of the growth hormone receptor and its transcripts in bovine uterus and placenta. *Molecular and Cellular Endocrinology* 131:127-136.
- Kowalewski MP, Gruhn M, Schuler G, Hoffmann B. 2007. *Bos taurus* receptor tyrosine kinase ErbB-3 (ErbB3) mRNA, partial cds. GenBank: EF460505.1.
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rignon M. 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual Reviews of Physiology* 60:619-642.
- Kruip TAM, den Haas JHG. 1997. In vitro produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology* 47:43-52.
- Leiser R. 1975. Kontaktaufnahme zwischen Trophoblast und Uterusepithel während der frühen Implantation beim Rind. *Anatomia Histologia Embryologia* 4:63-86.
- Leiser R, Kaufmann P. 1994. Placental Structure: in a comparative aspect. *Experimental and Clinical Endocrinology* 102:122-134.
- Leiser R, Krebs C, Klisch K, Ebert B, Danzer V, Schuler G, Hoffmann B. 1997. Fetal villosity and microvasculature of the bovine placentome in the second half of gestation. *Journal of Anatomy* 191:517-527.
- Löffler G, Petrides PE. 1998. *Biochemie und Pathobiochemie*. 6. Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Luo J, Sladek R, Bader JA, Matthyssen A, Rossant J, Giguère V. 1997. Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor ERR-beta. *Nature* 388:778-782.

- Matamoros RA, Caamano L, Lamb SV, Reimers TJ. 1994. Estrogen production by bovine binucleate and mononucleate trophoblastic cells in vitro. *Biology of Reproduction* 51:486-492.
- McEwan IJ, Dahlman-Wright K, Amlöf T, Ford J, Wright APH, Gustafsson JA. 1995. Mechanisms of transcription activation by nuclear receptors: studies on the human glucocorticoid receptor  $\tau$  1 transactivation domain. *Mutation Research* 333:15-22.
- McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine Reviews* 20:321-344.
- Miglino MA, Pereira FT, Visintin JA, Garcia JM, Meirelles FV, Rumpf R, Ambrósio CE, Papa PC, Santos TC, Carvalho AF, Leiser R, Carter AM. 2007. Placentation in cloned cattle: structure and microvascular architecture. *Theriogenology* 68:604-617.
- Mossman HW. 1987. *Vertebrate fetal membranes*. Rutgers University Press, New Brunswick, New Jersey.
- Nicholson DW. 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation* 6:1028-1042.
- Nicholson DW, Thornberry NA. 1997. Caspases: killer proteases. *Trends in Biochemical Sciences* 22:299-306.
- Normanno N, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, De Luca A, Caponigro F, Salomon DS. 2005. The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. *Current Drug Targets* 6:243-257.
- Patel OV, Yamada O, Kizaki K, Todoroki J, Takahashi T, Imai K, Schuler LA, Hashizume K. 2004. Temporospatial expression of placental lactogen and prolactin-related protein-1 genes in the bovine placenta and uterus during pregnancy. *Molecular Reproduction and Development* 69:146-152.
- Raff M. 1998. Cell suicide for beginners. *Nature* 396:119-122.
- Reszec J, Kanczuga-Koda L, Sulkowska M, Koda M, Cylwik J, Barwijek-Machala M, Sulkowski S. 2004. An evaluation of Ki-67 and PCNA expression in conjunctival and eyelid tumors. *Folia Morphologica (Warszawa.)* 63:95-105.
- Rexha S, Grunert E. 1993. The forecasting of the time of calving using a rapid progesterone test. *Tierärztliche Praxis* 21:197-200.

- Reynolds LP, Millaway DS, Kirsch JD, Infeld JE, Redmer DA. 1990. Growth and in-vitro metabolism of placental tissues of cows from day 100 to day 250 of gestation. *Journal of Reproduction and Fertility* 89:213-222.
- Riese DJ, Stern DF. 1998. Specificity within the the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *BioEssays* 20:41-48.
- Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labelle M, Peterson EP, Rasper DM, Ruel R, Vaillancourt JP, Thornberry NA, Becker JW. 1996. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nature Structural and Molecular Biology* 3:619-625.
- Rüsse I, Grunert E. 1993. Die wachsende Frucht: Altersbestimmung. In: Grunert E, Arbeiter K Richter J, Götze R. (Hrsg): Tiergeburtshilfe. Paul Parey-Verlag, Berlin S. 52-55.
- Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. 1995. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 19:183-232.
- Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, Takahashi M. 1987. The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *Journal of Cell Physiology* 133:579-584.
- Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J. 1993. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *Journal of Cell Biology* 123:513-522.
- Schuler G. 2000. Plazentare Steroide beim Rind. Biosynthese und Beziehungen zu Wachstum und Differenzierung der Plazentome. Habilitationsschrift am Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Giessen. Internetadresse: <http://bibd.uni-giessen.de/ghm/2002/uni/h020001.htm>.
- Schuler G, Wirth C, Klisch K, Pfarrer C, Leiser R, Hoffmann B. 1999. Immunolocalization of progesterone receptors in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition. *Biology of Reproduction* 61:797-801.
- Schuler G, Wirth C, Klisch K, Failing K, Hoffmann B. 2000. Characterization of proliferative activity in bovine placentomes between day 150 and parturition by quantitative immunohistochemical detection of Ki-67 Antigen. *Reproduction in Domestic Animals* 35:157-162.

- Schuler G, Wirth C, Teichmann U, Failing K, Leiser R, Thole H, Hoffmann B. 2002. Occurrence of estrogen receptor  $\alpha$  in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition. *Biology of Reproduction* 66:976-982.
- Schuler G, Teichmann U, Taubert A, Failing K, Hoffmann B. 2005. Estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) is expressed differently from ER $\alpha$  in bovine placentomes. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 113:1-8.
- Schuler G, Özalp GR, Hoffmann B, Harada N, Browne P, Conley AJ. 2006a. Reciprocal expression of 17 $\alpha$ -hydroxylase-C17,20-lyase and aromatase cytochrome P450 during bovine trophoblast differentiation: a two-cell system drives placental oestrogen synthesis. *Reproduction* 131:669-679.
- Schuler G, Teichmann U, Kowalewski MP, Hoffmann B, Madore E, Fortier MA, Klisch K. 2006b. Expression of cyclooxygenase-II (COXII) and 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase (20 $\alpha$ -HSD)/ prostaglandin F-synthase (PGFS) in bovine placentomes: implications for the initiation of parturition in cattle. *Placenta* 27:1022-1029.
- Schuler G, Greven H, Kowalewski MP, Döring B, Özalp GR, Hoffmann B. 2008. Placental steroids in cattle: hormones, placental growth factors or by-products of trophoblast giant cell differentiation? *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 25:429-436.
- Schuler LA, Nagel RJ, Gao J, Horseman ND, Kessler MA. 1997. Prolactin receptor heterogeneity in bovine fetal and maternal tissues. *Endocrinology* 138:3187-3194.
- Schuler LA, Lu JC, Brockman JL. 2001. Prolactin receptor heterogeneity: processing and signaling of the long and short isoforms during development. *Biochemical Society Transactions* 29:52-56.
- Scott P, Kessler MA, Schuler LA. 1992. Molecular cloning of the bovine prolactin receptor and distribution of prolactin and growth hormone receptor transcripts in fetal and utero-placental tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology* 89:47-58.
- Starborg M, Gell K, Brundell E, Höög C. 1996. The murine Ki-67 Cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *Journal of Cell Science* 109:143-153.

- Stice SL, Strelchenko NS, Keefer CL, Matthews L. 1996. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biology of Reproduction* 54:100-110.
- Strahl H. 1912. Zur Kenntnis der Wiederkäuerplazentome. *Anatomischer Anzeiger* 40:257-264.
- Swanson SM, Kopchick JJ. 2007. Nuclear localization of growth hormone receptor: another age of discovery for cytokine action? *Science signal transduction knowledge environment* 415:69.
- Tabibzadeh S. 1995. Signals and molecular pathways involved in apoptosis, with special emphasis on human endometrium. *Human Reproduction Update* 1:303-323.
- Tremblay GB, Kunath T, Bergeron D, Lapointe L, Champigny C, Bader JA, Rossant J, Giguere V. 2001. Diethylstilbestrol regulates trophoblast stem cell differentiation as a ligand of orphan nuclear receptor ERR- $\beta$ . *Genes and Development* 15:833-838.
- Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferez CR, et al. 1994. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10) homodimer. *Cell* 78:343-352.
- Walker Sk, Hartwich KM, Seamark RF. 1996. The production of unusually large offspring following embryo manipulation. *Theriogenology* 45:111-120.
- Wango EO, Wooding FBP, Heap RB. 1990. The role of trophoblast binucleate cells in implantation in the goat: a quantitative study. *Placenta* 11:381-394.
- Warzych E, Wrenzycki C, Peippo J, Lechniak D. 2007. Maturation medium supplements affect transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produced in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 74:280-289.
- Willadsen SM, Janzen RE, McAlister RJ, Shea BF, Hamilton G, McDermand D. 1991. The viability of late morula and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology* 35:161-170.
- Williams WF, Margolis MJ, Manspeaker J, Douglass LW, Davidson JP. 1987. Peripartum changes in the bovine placenta related to fetal membrane retention. *Theriogenology* 28:213-223.
- Wilmut I, Beaujean N, de Sousa PA, Dinnyes A, King TJ, Paterson LA, Wells DN, Young LE. 2002. Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 419:583-586.

- Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, et al. 1994. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* 370:270-275.
- Wimsatt WA. 1951. Observations on the morphogenesis, cytochemistry and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. *American Journal of Anatomy* 89:233-281.
- Woicke J, Schoon HA, Heuwieser W, Schulz L-CL, Grunert E. 1986. Morphologische und funktionelle Aspekte plazentarer Reifungsmechanismen beim Rind. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 33:660-667.
- Wooding FB. 1984. Role of binucleate cells in fetomaternal fusion at implantation in sheep. *American Journal of Anatomy* 170:233-250.
- Wooding FB. 1992. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta* 13:101-113.
- Wooding FB, Wathes DC. 1980. Binucleate cell migration in the bovine placentome. *Journal of Reproduction and Fertility* 59:425-430.
- Wooding FB, Beckers JF. 1987. Trinucleate cells and the ultrastructural localisation of bovine placental lactogen. *Cell and Tissue Research* 247:667-673.
- Wooding FB, Hobbs T, Morgan G, Heap Rb, Flint AP. 1993. Cellular dynamics of growth of sheep and goat synepitheliochorial placentomes: an autoradiographic study. *Journal of Reproduction and Fertility* 98:275-283.
- Wooding FB, Flint APF. 1994. Placentation. In *Marshall's Physiology of Reproduction*, 4th edn (Ed.) Lamming GE, Vol. III, Part I, pp. 233-460. London: Chapman and Hall.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology* 68:251-306.
- Yoshida Y, Miyamura M, Hamano S, Yoshida M. 1998. Expression of growth factor ligand and their receptor mRNAs in bovine ovar during in vitro maturation and after fertilization in vitro. *Journal of Veterinary Medicine Sciences* 60:549-554.
- Young LE, Sinclair KD, Wilmut I. 1998. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Reviews of Reproduction* 3:155-163.
- Zietschmann O, Krölling O. 1955. *Lehrbuch der Entwicklungsgeschichte der Haustiere*. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.
- Zybina EV, Zybina TG. 1996. Polytene chromosomes in mammalian cells. *International Review of Cytology* 165:53-119.

## 9. Abkürzungsverzeichnis

µl:	Mikroliter
µm:	Mikrometer
Abb.:	Abbildung
AOS:	Abnormal Offspring Syndrome
Aqua dest:	aqua destillata
B <sub>0</sub> :	Bindungsnullwert
BNC:	Binuclear cell (zweikernige Trophoblastriesenzelle)
bp:	Basenpaare
BSA:	bovines Serumalbumin
CDK:	Cyclin-dependent Kinase
cDNA:	complementary (komplementäre) DNA
cpm:	counts per minute
dATP:	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP:	Desoxycytosintriphosphat
dGTP:	Desoxyguanosintriphosphat
DNA:	Desoxyribonukleinsäure (A = Acid)
dTTP:	Desoxythymidintriphosphat
ECS:	Estrus Cow Serum
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
ERR2:	Estrogen Related Receptor 2
FSH:	follikelstimulierendes Hormon
g:	Erdbeschleunigung
GAPDH:	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GHR:	Growth Hormone Receptor
ICC:	Immunocytochemistry
IETS:	International Embryo Transfer Society
IgG:	Immunglobulin G
iTGC:	immature Trophoblast Giant Cell (unreife TGC)
IVP:	In vitro Produktion
JAK2:	Janus Kinase 2
kDa:	Kilo-Dalton
LH:	luteinisierendes Hormon
LOS:	Large Offspring Syndrome

M:	molar, Molarität
mA:	MilliAmpère
MAP-Kinase:	Mitogen Activated Protein Kinase
min:	Minuten
mM:	millimolar
MOET:	Multiple Ovulation Embryo Transfer
mRNA:	messenger RNA
mTGC:	mature (reife) TGC
n:	normal
ng:	Nanogramm
nm:	Nanometer
nmol/l:	Nanomol pro Liter
NSB:	nicht spezifische Bindung
O <sub>2</sub> :	molekularer Sauerstoff
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PCD:	Programmed Cell Death (programmierter Zelltod)
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PRLR:	Prolaktin-Rezeptor (sPRLR = kurze Form)
rev:	reverse
RGE:	relative Genexpression
RNA:	Ribonukleinsäure
rRNA:	ribosomale RNA
RT:	Reverse Transkriptase
RT-PCR:	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
s.:	sive bzw. seu (lateinisch: oder)
SCNT:	Somatic Cell Nuclear Transfer
SSL:	Scheitel-Steißlänge
STAT5:	Signal Transducers and Activators of Transkription 5
TA:	Totalaktivität
TBE:	Tris-Borsäure-EDTA
TGC:	Trophoblast giant cell (Trophoblastriesenzelle)
TNF:	Tumor-Nekrose-Faktor
TRIS:	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U/ml:	Unit per Milliliter

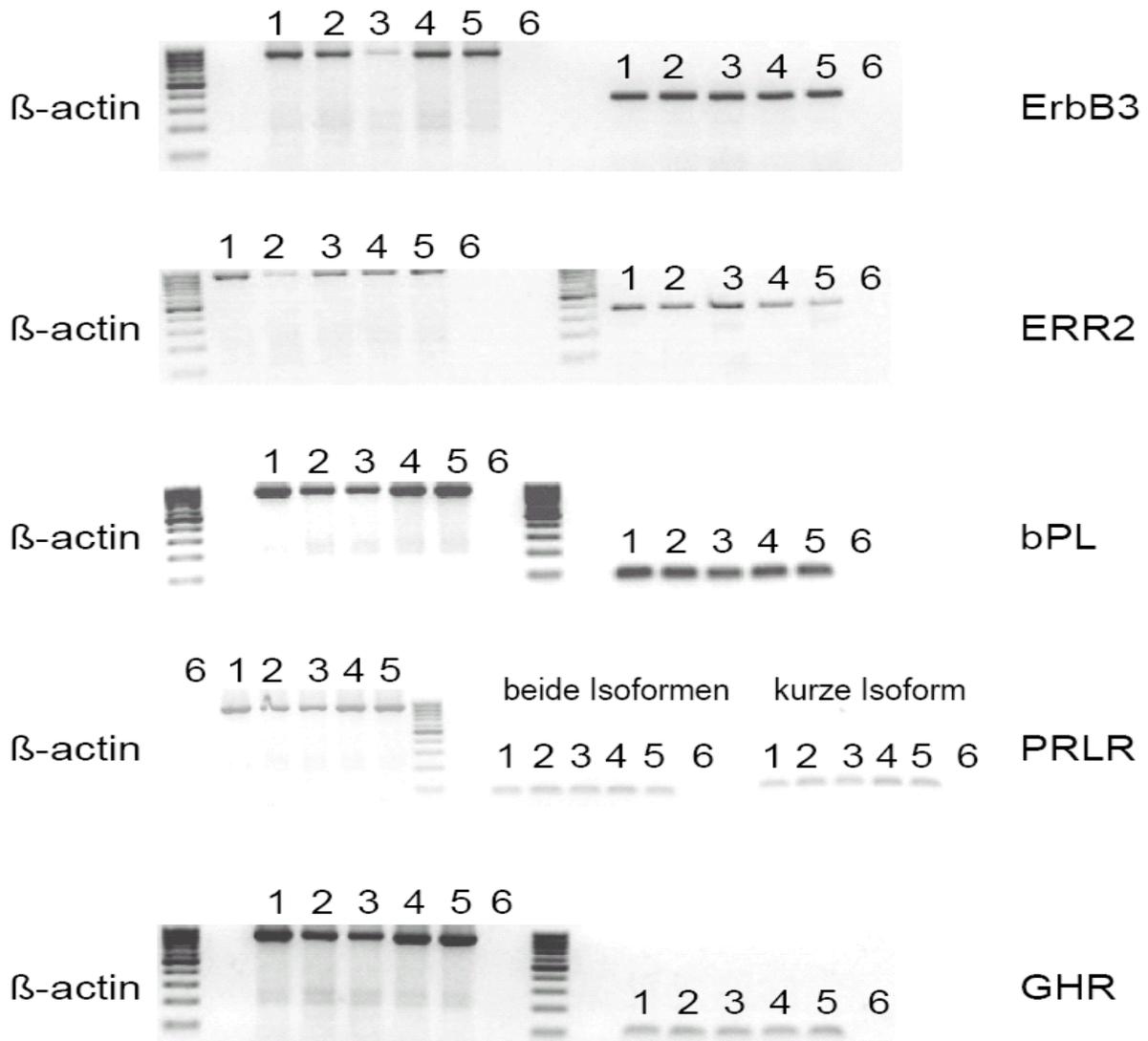
UTC: Uninucleate Trophoblast Cell (einkernige Trophoblast zelle)  
UV: ultraviolett

## **10. Anhang: Dokumentation von Ergebnissen aus der konventionellen RT-PCR**

Untersuchungen unter Verwendung der konventionellen RT-PCR wurden zu folgenden Zwecken durchgeführt:

- zur qualitativen Bestätigung der Zielgen-Expression vor der Etablierung einer Real-Time RT-PCR-Methode in den Fällen, in denen über die Expression eines Zielgens in den Rinderplazentomen keine bzw. unsichere Informationen vorlagen
- zur Überprüfung der für die Real-Time RT-PCR selbst entworfenen Primerpaare auf ihre Funktionstüchtigkeit

Beispielhaft werden in Abbildung 19 aus diesen Experimenten resultierende Ergebnisse dokumentiert.



**Abbildung 19:** Analyse von Amplifikaten aus der konventionellen RT-PCR. Belegung der Spuren:

- 1 = Placentom Tag 80
- 2 = Placentom Tag 110
- 3 = Placentom Tag 220
- 4 = Placentom zum Zeitpunkt der präpartalen Luteolyse
- 5 = Placentom zum Zeitpunkt der Geburt
- 6 = Negativkontrolle (cDNA-Präparation durch H<sub>2</sub>O ersetzt)

Als Positivkontrollen wurden zu den verschiedenen Zielgenen parallel Experimente unter Verwendung eines  $\beta$ -Aktin-spezifischen Primerpaars durchgeführt. Die erwarteten Bandengrößen betragen: ErbB3: 446 bp, ERR2: 363 bp, bPL 78 bp, PRLR (kurze Isoform): 84 bp, PRLR (beide Isoformen): 75 bp, GHR: 84 bp,  $\beta$ -Aktin: 890 bp.

Die Spezifität der Amplikons wurde durch Sequenzierung bestätigt.

## 11. Danksagungen

Bei meinem Doktorvater Apl. Prof. Dr. Gerhard Schuler bedanke ich mich für die Überlassung des hochinteressanten und brisanten Themas, sein Engagement, die fachliche Beratung und Hilfestellung, auch nach meinem Eintritt in die Berufswelt. Ohne Ihre Hilfe und die ständigen Ermahnungen, meine Arbeit nicht zu vergessen, wäre es um einiges schwerer geworden.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann, der es mir mit der Aufnahme ins Team ermöglichte meinen Traum zu erfüllen. Ich danke ihm für die immer freundliche Unterstützung, Beratung und Hilfestellung. Ich kenne keinen Professor, der sich so sehr für uns Doktoranden einsetzt und noch so gewaltige Wogen glättet. Vielen Dank für alles.

Ein besonderers Dankeschön richte ich an die H. Wilhelm Schaumann-Stiftung. Ohne die finanzielle Unterstützung wäre diese Arbeit für mich nicht möglich gewesen.

Bei Herrn Prof. Dr. Stefan Hiendleder bedanke ich mich recht herzlich für die freundliche Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Proben.

Dieser Dank gilt ebenso Dr. Horst-Dieter Reichenbach und Miriam Reichenbach sowie dem gesamten Team, für die freundliche und kollegiale Zusammenarbeit während der Probenentnahme.

Einen besonderen Dank entrichte ich an alle Mitarbeiter der ehemaligen Professur für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung II.

Mariusz Kowalewski: Ich danke Dir für Deine unermüdliche Hilfe in technischen und molekularbiologischen Fragen. Nichts war Dir zu viel und man konnte immer auf Dich bauen. Vielen Dank!

Helga Greven und Dr. Sandra Göricke-Pesch danke ich für die freundliche und unkomplizierte Zusammenarbeit in der Forschung und im OP, sowie für viele wunderschöne Hunde-Spaziergänge, Hochzeiten und traute Abende am Grill.

Meiner lieben Freundin Astrid Spang danke ich ganz herzlich für ihr immer offenes Ohr, egal in welcher emotionalen Lage ich bin. Es hat viel Spass gemacht mit Dir zu arbeiten und ich bin froh, dass wir uns kennen gelernt haben! Hoffentlich verlieren wir uns nie aus den Augen! Irgendwann ist jede Untiefe des Lebens vorbei, manchmal dauert es eben länger...Und jammern nützt nichts.

Meinen Kollegen Dr. Henry Mikiugu Mutembei und Peter Richterich danke ich für die freundliche Aufnahme ins Team und die kollegiale Zusammenarbeit.

Liebe Sima, vielen, vielen Dank, dass Du Dir die Zeit genommen hast, um mir das „Blasten“ nach langer Auszeit nochmal genaustens zu erläutern.

Ein besonderer Dank gilt dem RIA-Labor-Team für ihre Hilfsbereitschaft und das schöne Arbeitsklima. Lieber Willi, liebe Sabine, liebe Carmen, Euch war keine Hilfe zu viel und über manchen meiner „Super-Gaus“ wurde nur milde gelächelt. Vielen Dank!

Ohne Willi hätte ich meinen PC des Öfteren aus dem Fenster befördert. Danke!

Ich komme Euch immer noch gerne besuchen!

Meine Gedanken sind auch bei Margret Bach, die mir stets eine große Stütze und Hilfe in Laborangelegenheiten war. Die netten Plaudereien in wohl verdienten kurzen Kaffeepausen werden mir stets in Erinnerung bleiben.

Bei Prof. Dr. Sabine Kölle bedanke ich mich für die freundliche und fachlich kompetente Unterstützung. Danke auch Frau Susanne Schubert-Pohl und Frau Jutta Dern-Wieloch für die tatkräftige Unterstützung im Labor.

Herrn Prof. Dr. Bülte und den Mitarbeitern des Instituts für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, sowie Herrn Prof. Dr. Petzinger und Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie danke ich für deren Hilfe und Zusammenarbeit bei Durchführung der quantitativen Real Time PCR.

Herrn Dr. rer. Nat. Klaus Failing und Frau Marion Spangenberg danke ich für die Hilfe in der statistischen Datenverarbeitung.

Danke meinem Chef Jens Boßler, der mir für die Fertigstellung meiner Arbeit immer wieder bereitwillig Freizeit einräumte. Und für die gute Zusammenarbeit!

Meinen größten Dank entrichte ich meiner Familie, die mir in allen Lebenslagen zur Seite steht. Meinen geliebten Eltern, die mir meinen größten Wunsch erfüllt haben, Tierärztin zu werden. Ihr habt mir mein Studium ermöglicht und mich hindurch begleitet, alle meine Entscheidungen akzeptiert und das Wichtigste – Ihr habt mich nie im Stich gelassen. Meine Geschwister Wiebke und Alexander, schön, dass es Euch gibt.

Wiebke, learning by doing! Danke für Dein stets offenes Ohr und unsere Meinungsverschiedenheiten, die mir immer wieder zeigen, was eine intakte Schwesterbeziehung ist!

Kleiner Bruder, auch Du gehst Deinen Weg!

Oma Ruth und Opa, vielen Dank für Eure Unterstützung, moralisch und finanziell.

In Gedenken an Opa Willi und Oma Greta, die ich nie vergessen werde.

Meinem geliebtem Mann Stefan danke ich für all sein Verständnis und seine Offenheit, die er meinem freizeitraubendem Beruf und meiner Liebe zu Tieren entgegenbringt. Wir kriegen die Arche schon voll!

Ein Dankeschön geht auch an meine lieben Schwiegereltern, die mich so liebevoll und selbstverständlich aufgenommen haben.

„Dass mir der Hund das liebste sei, sagst Du o Mensch, sei Sünde. Ein Hund bleibt Dir im Sturme treu, der Mensch nicht mal im Winde.“ (Franz von Assisi)

Danke meinen beiden geliebten Hunden Bob und Bino, die mich während meines Studiums und dieser Arbeit begleitet haben.

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5633-9



9 78 3 835 9 5633 9