



FERTILINK – Funktionale Genomforschung zur Verbesserung der Fruchtbarkeit von Nutztieren

Eckhard Wolf, Georg J. Arnold, Stefan Bauersachs, Helmut Blum, Thomas Fröhlich, Stefan Hiendleder, Heinrich H.D. Meyer, Horst-Dieter Reichenbach, Fred Sinowatz

Fruchtbarkeit – das zentrale Merkmal für die Tierzucht

Fruchtbarkeit ist über die Zahl der erzeugten Nachkommen ein direkter Produktivitätsfaktor. Zudem limitiert die Zahl der Nachkommen die Selektionsintensität und damit den erreichbaren Selektionserfolg bzw. genetischen Fortschritt. Aktuelle Daten aus der Rinder- und Schweineproduktion zeigen, dass durch Fruchtbarkeitsprobleme zunehmend drastische wirtschaftliche Verluste entstehen. Fruchtbarkeit ist ein komplexes Merkmal, das von einer Vielzahl an Genen beeinflusst wird. Zudem üben Umwelteffekte einen erheblichen Einfluss auf Fruchtbarkeitsparameter aus. Aufgrund dieser Tatsachen ist der Komplex Fruchtbarkeit mit klassischen quantitativ-genetischen und QTL-Kartierungsansätzen nur schwer zu fassen.

Selektionsmechanismen im Reproduktionsgeschehen

Fruchtbarkeit ist durch eine Vielzahl biologischer Selektionsmechanismen determiniert, die auf Wechselwirkungen von Gameten, Embryonen und Feten mit ihrer maternalen Umgebung basieren (**Abb. 1**). Durch Biotechniken der Fortpflanzung, wie die *in vitro* Produktion von Embryonen oder die Kerntransfer-Klonierung, werden diese natürlichen Selektionsmechanismen teilweise umgangen. Inwieweit die bei der Anwendung von Biotechniken der Fortpflanzung mitunter auftretenden Probleme, wie das „*Large Offspring Syndrome (LOS)*“ bei den Wiederkäuern, damit zusammenhängen, ist bislang unklar.

Neue Einblicke durch holistische Analysen

Eine erfolgversprechende Analyse reproduktionsbiologischer Vorgänge und möglicher Störungen bei der Anwendung von Biotechniken erfordert exakt definiertes biologisches Material, systematische vergleichende Transkriptom- und Proteomanalysen sowie funktionelle Studien. Untersuchungen der Wechselwirkung zwischen Gameten bzw. Embryonen und ihrer maternalen Umgebung sind besonders erfolgversprechend, da Ort und Dauer der Wechselwirkungen relativ genau definiert und Veränderungen von Genexpressionsprofilen einfacher als bei anderen Merkmalen interpretiert werden können.

Problem embryonaler Fruchttod

Beim Rind entsteht fast die Hälfte der gesamten Verluste an Trächtigkeiten zwischen dem 8. und 17. Tag nach der Befruchtung, also vor der Implantation (1). Als Ursache für dieses wirtschaftlich wichtige Phänomen des embryonalen Fruchttodes wird u.a. eine gestörte Kommunikation zwischen dem Konzeptus und seiner maternalen Umgebung diskutiert. Limitierende Größen sind das Trächtigkeitserkennungs-Signaling des Embryos einerseits und die uterine Rezeptivität andererseits. Bei den Wiederkäuern ist das Interferon tau (IFNT) als wichtiges embryonales Trächtigkeitserkennungssignal bekannt. IFNT wird von den Trophektodermzellen der Blastozyste produziert und ist das wichtigste antiluteolytische Signal des Embryos. IFNT reduziert auf parakrinem Wege die Expression von Östrogen- und Oxytocinrezeptoren in der Gebärmutterschleimhaut und verhindert so die zyklische Freisetzung von Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) und damit die Luteolyse (1). Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass neben dem IFNT weitere Mechanismen in der embryo-maternalen Kommunikation und Interaktion eine Rolle spielen. Dafür spricht allein die Tatsache, dass die Sekretion von IFNT in einigen Studien mit der Entwicklungskapazität der Embryonen korrelierte, in anderen Studien jedoch nicht. Für ein umfassendes Verständnis des embryo-

maternalen Dialogs sind neben einem Kandidatenansatz systematische vergleichende Transkriptom- und Proteomuntersuchungen zwingende Voraussetzung.

Monozygote Zwillinge als ideales Modell für Studien der embryo-maternalen Kommunikation

Für diese Studien nutzen wir monozygote Zwillinge, die durch „*Embryo-Splitting*“ erstellt wurden. Für das Experiment werden die Zwillingspaare Zyklus-synchronisiert, um dann jeweils einem Zwilling Embryonen zu übertragen, während der andere Zwilling als Kontrolle dient (**Abb. 2**). Dadurch werden störende, bei nicht verwandten Tieren variable genetische Einflüsse auf die Genexpression in Geweben des weiblichen Genitale eliminiert, was einen enormen Vorteil für die Detektion der spezifisch von Embryonen induzierten Veränderungen der Gebaktivitätsprofile darstellt. Signalwirkungen von Embryonen werden identifiziert, indem die mRNA- und Protein-Expressionsmuster in standardisiert gewonnenen Endometriumproben von trächtigen Tieren und ihren nichtträchtigen Zwillingen verglichen werden. Dabei verfolgen wir einerseits einen Kandidatengen-Ansatz, andererseits holistische Ansätze, in denen das Transkriptom bzw. das Proteom der entsprechenden Gewebe auf quantitative Veränderungen des Expressionsprofils untersucht werden. Für die Präimplantationsphase (Tag 18) konnten wir bereits eine Vielzahl von Transkripten im Endometrium identifizieren, deren Abundanz durch die Anwesenheit eines Embryos zunimmt (2). Unter den 87 Genen, die wir als differentiell exprimiert identifiziert haben, befinden sich bereits bekannte Interferon-induzierte Gene, aber auch viele bislang in diesem Kontext unbekannte Gene, die u.a. für die embryo-maternale Immunmodulation oder für strukturelle Umbildungen des Endometriums vor dem Anhaften des Embryos von Bedeutung sein können (**Abb. 3**). Parallel zu diesen Untersuchungen durchgeführte Proteomstudien identifizierten eine Reihe von Proteinen, die im Endometrium trächtiger Tiere (Tag 18) in höherer Abundanz als bei nichtträchtigen Vergleichstieren vorkommen (**Abb. 4**; Ref. 3). Zusätzlich werden optimierte Zellkulturen aus Eileiterepithel bzw. Endometrium in Kokultur mit synchronen Embryonalstadien verwendet, um die Befunde aus dem *in vivo* Modell zu verifizieren und auf ihre funktionelle Relevanz zu prüfen. Darüber hinaus lassen sich mit den *in vitro* Kokultursystemen ergänzend gezielte Versuche in bestimmten, z.B. sehr frühen, Entwicklungsabschnitten von Embryonen durchführen, die mit dem *in vivo* Modell nicht oder nur ungenügend genau realisiert werden können. Für die biotechnologische Anwendung in der Rinderzucht sind dabei besonders Auswirkungen der Kokultur bzw. des Kontakts mit Zellen des weiblichen Genitales auf den Metabolismus und die Entwicklungskompetenz von *in vitro* produzierten Embryonen relevant. Diese Effekte werden durch eine detaillierte morphologische und molekulare Phänotypisierung der produzierten Embryonen sowie der maternalen Zellen, die in Kontakt mit den Embryonen waren, geprüft.

Zyklusabhängige Steuerung zellulärer Funktionen im weiblichen Genitale

Neben den Untersuchungen an trächtigen Tieren beschäftigen wir uns mit molekularen und funktionellen Veränderungen im Eileiter und der Gebärmutter während des Zyklus, der beim Rind durchschnittlich 21 Tage dauert. Das Epithel des Eileiters als Umgebung entscheidender Reproduktionsprozesse unterliegt hinsichtlich seiner Morphologie wie auch hinsichtlich funktionaler Parameter erheblichen zyklusabhängigen Veränderungen. Um die molekularen Grundlagen dieser Veränderungen zu analysieren, haben wir vergleichende Transkriptomuntersuchungen von Eileiterepithelzellen im Östrus (Zyklustag 0) und im Diöstrus (Zyklustag 12) durchgeführt. Unter den insgesamt 77 differentiell exprimierten Genen wiesen im Östrus viele für die Proteinfaltung und -sekretion relevante Gene eine höhere Aktivität auf, während im Diöstrus vor allem Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, ein höheres Expressionsniveau zeigten (4). Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass 3 Tage nach der Ovulation das Genaktivitätsmuster im Epithel des ipsilateralen Eileiters sich von dem des kontralateralen Eileiterepithels unterscheidet. Es wurden über 30 Gene identifiziert, die reproduzierbar im ipsilateralen Eileiter in ihrer Aktivität hoch- oder herunterreguliert waren. Es handelt sich um Gene, die für das Immunsystem relevant sind, Gene, die das Zytoskelett regulieren, wie auch um Gene, die für Zell-Zell-Interaktion von Bedeutung sind (5). Diese Ergebnisse zeigen, dass innerhalb eines Tieres lokale

Unterschiede in der Hormonkonzentration oder der ovulierte Kumulus-Oozyten-Komplex entsprechende Veränderungen der Genaktivität im Eileiter induzieren können. Transkriptomstudien von Endometriumpuben, die im Östrus oder im Diöstrus gewonnen wurden, ergaben eine noch größere Zahl von differentiell abundanten Transkripten, die ebenfalls eine Zyklusstadien-spezifische vermehrte Expression bestimmter Funktionsklassen von Genen erkennen ließen (6).

Dynamische Transkriptom- und Proteomstudien

Die verschiedenen bislang punktuell durchgeführten Untersuchungen haben bereits eine Vielzahl von Genen identifiziert, die in verschiedenen Zyklusstadien bzw. während der Frühgravidität in ihrer Expression verändert sind. Die gewonnenen Transkriptom- und Proteomprofile stellen aber nur eine Momentaufnahme dar und erlauben keine Rückschlüsse hinsichtlich der dynamischen molekularen Veränderungen in Reproduktionsgeweben während des Zyklus bzw. in der Frühgravidität. Daher werden im FUGATO-Verbund *FERTILINK* die Daten durch systematische Untersuchung weiterer Zeitpunkte komplettiert. Dadurch hoffen wir ein detailliertes Bild der molekularen Physiologie von embryo-maternaler Interaktion und Implantation zu bekommen und klären zu können, ob Störungen dieser Mechanismen bei Unfruchtbarkeit eine Rolle spielen.

Nutzen für die Praxis

Die biotechnologische Anwendung der gewonnenen Erkenntnisse kann sich einerseits auf eine Verstärkung der Signale im embryo-maternalen Dialog konzentrieren, um die Trächtigkeitsrate nach Embryotransfer zu erhöhen und dem embryonalen Frühfötus entgegenzuwirken. Ein denkbare Szenario ist beispielsweise die rekombinante Expression neuer embryonaler Trächtigkeitserkennungsproteine, um sie lokal mit dem Embryo zu transferieren oder auch systemisch zu applizieren. Die generelle Machbarkeit dieser Strategie wurde am Beispiel von rekombinanten IFNT bereits demonstriert. Andererseits ist auch die Entwicklung Array-basierter Verfahren für die Differentialdiagnostik von Fruchtbarkeitsstörungen ein Ziel der holistischen Analyse embryo-maternaler Interaktionen und anderer Regulationsmechanismen in der Reproduktionsbiologie. In Finnland werden bereits routinemäßig Endometriumbiopsien für solche Untersuchungen gewonnen.

Als Zukunftsperspektive zeichnen sich systembiologische Ansätze in der Tierzucht ab, die auf der Basis holistischer Analyseverfahren, rasch wachsender biologischer Erkenntnisse und neuer mathematischer Modelle eine Verbesserung funktionaler Merkmale, wie Gesundheit und Fruchtbarkeit, ermöglichen sollten.

Literatur

1. Wolf et al. (2003) Embryo-maternal communication in bovine – strategies for deciphering a complex cross-talk. *Reprod. Domest. Anim.* 38:276-289.
2. Klein et al. (2006) Monozygotic twin model reveals novel embryo-induced transcriptome changes of bovine endometrium in the pre-attachment period. *Biol. Reprod.* 74:253-264.
3. Berendt et al. (2005) Holistic differential analysis of embryo-induced alterations in the proteome of bovine endometrium in the pre-attachment period. *Proteomics* 5:2551-2560.
4. Bauersachs et al. (2004) Monitoring gene expression changes in bovine oviduct epithelial cells during the oestrous cycle. *J. Mol. Endocrinol.* 32:449-466.
5. Bauersachs et al. (2003) Regulation of ipsilateral and contralateral bovine oviduct epithelial cell function in the post-ovulation period - a transcriptomics approach. *Biol. Reprod.* 68:1170-1177.
6. Bauersachs et al. (2005) Gene expression profiling of bovine endometrium during the oestrous cycle: detection of molecular pathways involved in functional changes. *J. Mol. Endocrinol.* 34:889-908.

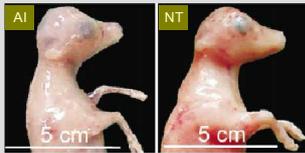
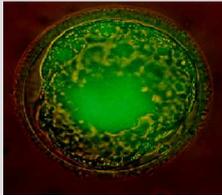
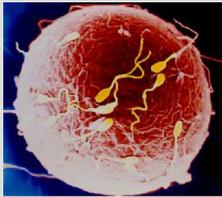
Kontakt

Prof. Dr. Eckhard Wolf

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie
und Laboratorium für funktionale Genomanalyse (LAFUGA)

Genzentrum der Universität München

E-mail: ewolf@lmb.uni-muenchen.de



Eizellreifung und Ovulation

Spermienreifung

Kompetition zwischen Spermien

Syngamie, epigenetische Reprogrammierung

Signaling der Trächtigkeitserkennung

Implantation

Selektive Aborte

Intakte Organogenese

Wachstum und Entwicklung

Geburt

Postnatale Entwicklung

Abb. 1. Selektionsstufen in der Reproduktionsbiologie.

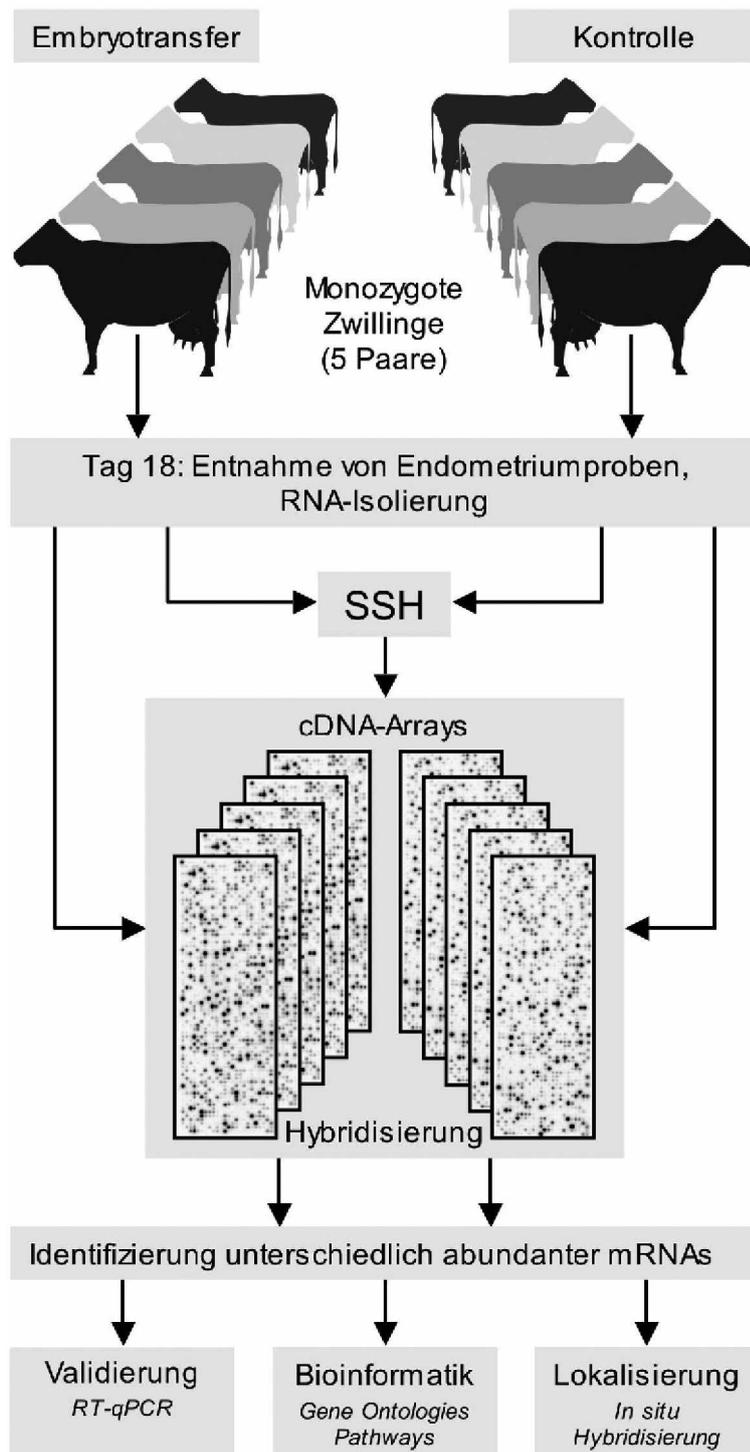


Abb. 2. Strategie zur Identifizierung embryo-induzierter Transkriptomveränderungen im Endometrium (2); SSH = Suppression Subtractive Hybridization.

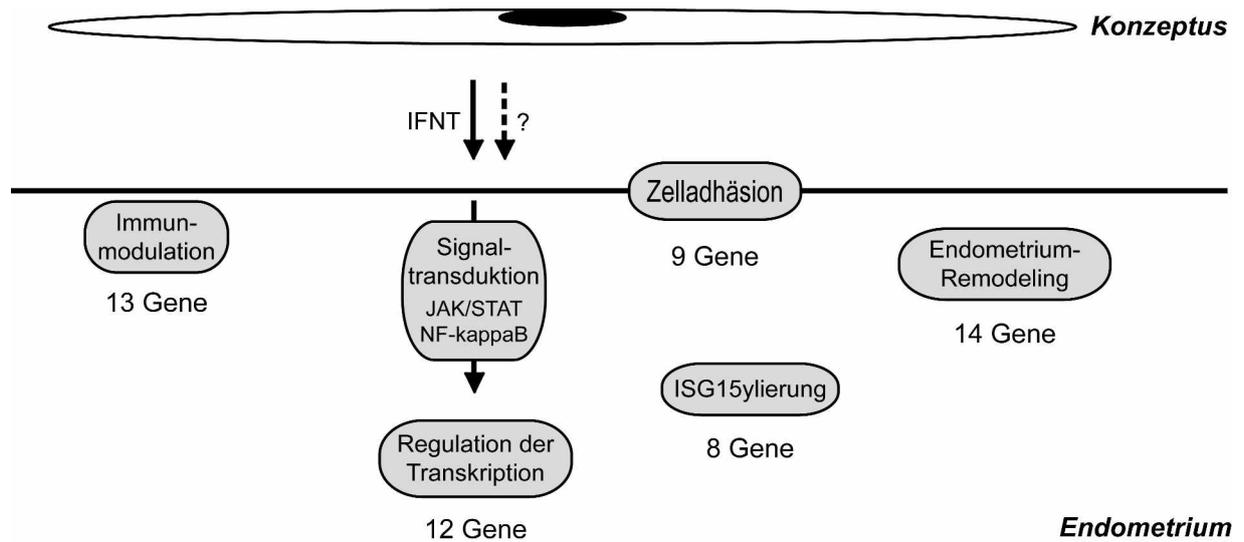


Abb. 3. Embryo-induzierte Transkriptomveränderungen im Rinderendometrium vor der Implantation (Tag 18).

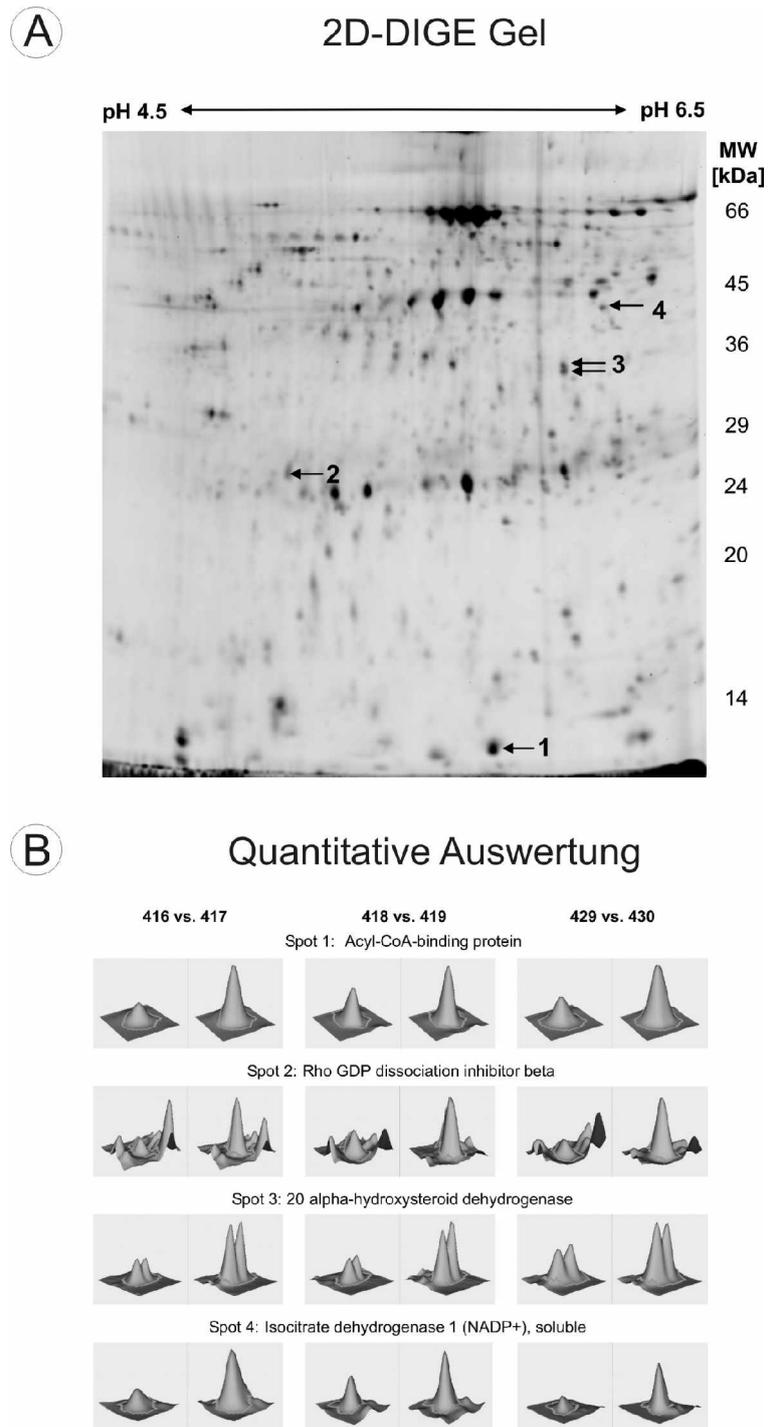


Abb. 4. Quantitative Veränderung des Endometrium-Proteoms während der Frühgravidität (Tag 18). A) 2D-DIGE Analyse der Endometrium-Proteine eines Zwillingspaares (Cy2 Scan) B) 3D-Darstellung abundanzveränderter Proteine bei Anwesenheit eines Embryos (links nicht-trächtig, rechts trächtig, Faktor > 2, $p < 0.01$). Sechs Tiere (drei Zwillingspaare) wurden analysiert (3).