

Untersuchungen der zyklusabhängigen Genexpression in Rindereileiter-Epithelzellen

Stefan Bauersachs, Katja Prella, Stephanie Rief, Hendrik Wenigerkind, Sylvia Mallok, Helmut Blum und Eckhard Wolf

Biologischer Hintergrund:

Während des Sexualzyklus finden beim Rind im Eileiter Veränderungen in der Zusammensetzung und der Beschaffenheit der Epithelzellen statt. Diese Veränderungen sind sogar makroskopisch sichtbar. Wahrscheinlich sind sie wichtig für die erfolgreiche Fortentwicklung und spätere Einnistung eines entstehenden Embryos. Möglicherweise existiert bereits im Eileiter eine Art Kommunikation zwischen dem Embryo und dem Muttertier. Vermutlich „sendet“ das Epithel dabei Signale an den Embryo und empfängt wiederum Signale vom Embryo. Es ist naheliegend, dass diese Signale zyklusabhängig reguliert sind. Zumindest die Veränderungen in der Beschaffenheit des Epithels sollten auch auf der Ebene der Genexpression nachzuweisen sein, darunter möglicherweise auch die Signale, welche die Entwicklung des Embryos beeinflussen.

Material und Methoden

Unsere Vorgehensweise besteht in der Analyse der Genexpression auf der Ebene der mRNA. Die Vorteile solcher Verfahren sind die sehr hohe Nachweisempfindlichkeit und die hohe Leistungsfähigkeit in Bezug auf den Probendurchsatz. Als Ausgangsmaterial für die Isolierung der RNA dienen Eileiter-Epithelproben von zyklussynchronisierten Tieren, die am Tag 0, Tag 3,5 bzw. am Tag 12 geschlachtet werden. Das Epithel wird jeweils vom ipsilateralen und vom contralateralen (Kontrolle) Eileiter entnommen. Dadurch sind wir in der Lage, auch unabhängig von Tier-zu-Tier-Schwankungen die Änderungen der Genexpression zwischen ipsi- und contralateralem Eileiter zu erfassen.

Im Gegensatz zum menschlichen und Maus-Untersuchungssystem gibt es beim Rind noch keine käuflichen cDNA-Sets oder sogar fertige cDNA-Arrays für Expressionsanalysen, so dass wir für unser Vorgehen die Methode der subtraktiven Genbanken gewählt haben. Der Vorteil dieses Ansatzes ist, dass er keine Kenntnis der beteiligten Gene voraussetzt. Bei der subtraktiven Hybridisierung werden die cDNAs differenziell exprimierter Gene angereichert und als cDNA-Bibliothek kloniert. Die cDNAs dieser Bibliotheken werden anschließend mit Hilfe von Microarray-Analysen untersucht. Die hierbei als differenziell exprimiert erscheinenden cDNAs werden ausgewählt und durch Sequenzierung identifiziert. Die erhaltenen Sequenzen werden mit den öffentlich zugänglichen Datenbanken verglichen und bioinformatisch ausgewertet.

Bisherige Ergebnisse

Bisher wurden von zyklussynchronisierten Rindern vier verschiedene subtraktive cDNA-Bibliotheken hergestellt zur Anreicherung von 1) ipsi-spezifischen cDNAs am Tag 3,5; 2) contra-spezifischen cDNAs am Tag 3,5; 3) Tag 3,5-spezifischen cDNAs und 4) Diöstrus-spezifischen cDNAs. Für ein Vorscreening der Bibliotheken wurden von den beiden ersten cDNA-Bibliotheken jeweils 768 cDNA-Klone und von den anderen cDNA-Bibliotheken je 384 cDNA-Klone durch Array-Hybridisierungen untersucht. Zur Hybridisierung wurde eine Reihe von Eileiterproben von unterschiedlichen Zeitpunkten des Zyklus verwendet. Beispielsweise wurden für den Vergleich ipsilateraler – contralateraler Eileiter Proben von fünf verschiedenen Tieren (Zyklustag 3,5) analysiert. Mehrere Hundert auffällige cDNAs wurden bereits sequenziert und bioinformatisch ausgewertet. Die Daten wurden vorläufig in einer Excel-Datenbank zusammengefasst. Die vollständige Auswertung ist zur Zeit noch nicht abgeschlossen.

Nach dem derzeitigen Stand zeichnet sich aber schon ab, dass mit dem verwendeten Verfahren Gene identifiziert werden können, die im Laufe des Sexualzyklus differenziell exprimiert werden. Inwieweit sich die Ergebnisse eines einzelnen Vergleichs auf weitere Tiere übertragen lassen, wird die weitere Datenauswertung zeigen. Wahrscheinlich werden die ipsi-contra-Vergleiche konsistenter sein als die Östrus-Diöstrus-Vergleiche zwischen verschiedenen Tieren. Auf jeden Fall ergeben die bisherigen Daten ein sehr interessantes Set an Rinder-cDNAs, deren Gene im Eileiterepithel exprimiert werden und bilden die Grundlage für weitergehende Untersuchungen.

Weiteres Vorgehen

Nach Abschluss der Auswertung der bisherigen Ergebnisse kann die Qualität der vorhandenen subtraktiven Banken genauer beurteilt werden. Danach wird entschieden, ob aus diesen Banken weitere cDNA-Klone (3.000-5.000) untersucht oder noch weitere subtraktive cDNA-Banken aus „optimiertem Probenmaterial“ hergestellt werden.

Primäres Ziel ist es, Gene zu identifizieren, die während des Sexualzyklus reguliert werden und eine potentielle Bedeutung für die Entwicklung des Embryos haben. Längerfristig könnte daraus beispielsweise ein „Bovine Oviduct Microarray“ für Fruchtbarkeitsdiagnostische Zwecke entwickelt oder eine Erhöhung der Trächtigkeitsrate bei Embryonentransfer durch Gabe bestimmter Faktoren erreicht werden.