

Einfluss des Leptins auf bovine Oozyten und die Entwicklung von Präimplantationsembryonen

Fabiola F Paula-Lopes¹, Marc Boelhaue¹, Tuna Güngör¹ und Eckhard Wolf¹

¹Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der Ludwig-Maximilians Universität, München

Vorraussetzung für die Optimierung von *In-vitro* Kultursystemen für frühe Embryonalstadien des Rindes ist die Identifikation geeigneter Signale zwischen der maternalen und der embryonalen Umwelt. Zu den in dieser Regulation eingebundenen Molekülen wurde das Leptin als Modulator der Ovarfunktion und Embryonalentwicklung identifiziert.

Diese Experimente wurden durchgeführt, um die Rolle des Leptins auf die Entwicklungsfähigkeit von bovinen Oozyten und Präimplantationsembryonen zu untersuchen. In einem ersten Experiment wurden Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK's) mit 0, 1, 10 und 100 ng/ml humanen rekombinaten Leptin in serum-freien Medien gereift. Die Zugabe von Leptin zu der Oozytenmaturation hatte im Vergleich zur Kontrolle keinen Effekt auf die Weiterentwicklungsrate (81,7±2,1; 85,6±2,0; 84,9±2,0 und 81,4±2,0% für 0, 1, 10 oder 100 ng/ml Leptin). Der Anteil der Oozyten, die sich am Tag 8 nach Fertilisation bis zum Stadium der Blastozyste weiterentwickelten, war bei 1 und 10 ng/ml Leptin erhöht (29,0±2,6; 37,3±2,5 und 36,7±2,5% für 0, 1 und 10 ng/ml Leptin; p<0,05), bei 100 ng/ml Leptin hingegen nicht (34,6±2,5%). Färbungen mit Propidium Jodid zeigten, dass die Blastozystenzellzahl ebenso bei Leptin-Konzentrationen von 1 (117,1±4,7%, p<0,05) und 10 ng/ml (113,9±5,4, p=0,07) im Vergleich zur Kontrolle (99,5±6,0 für 0 ng/ml Leptin) erhöht waren. Ausserdem war die Anzahl der TUNEL-positiven Zellen in den Blastozysten aller getesteten Leptinkonzentrationen reduziert (7,3± 0,5; 2,9± 0,5; 2,8± 0,5 und 2,8±0,6% für 0, 1, 10 und 100 ng/ml Leptin; p<0,0001). In einem zweiten Experiment wurden vermutete Zygoten in SOF-BSA (6 mg/ml Bovines Serumalbumin) mit 0-100 ng/ml Leptin kultiviert. Der Anteil der Oozyten, die sich weiterentwickelt haben, war nur bei 1 ng/ml Leptin erhöht (85,9±1,6 und 91,0±1,7% für 0 und 1 ng/ml Leptin; p<0,05), wenn auch kein Effekt des Leptins auf den Anteil der Oozyten, die sich zur Blastozyste weiterentwickelt haben, sichtbar war (24,0±2,2; 28,3±2,3; 28,8±2,7 und

23,8±2,4% für 0, 1, 10 und 100 ng/ml Leptin). Die Leptinkonzentrationen von 1 und 10 ng/ml erhöhten den Anteil der geschlüpften Blastozysten am Tag 8 nach Fertilisation (2,8±1,1; 6,4±1,2 und 7,6±1,4% für 0, 1 und 10 ng/ml Leptin; p<0,05).

Des Weiteren wurde eine quantitative PCR-Analyse (qPCR) der Oozyten/Embryonen aus dem ersten Versuch durchgeführt. Es wurden bei allen neun Stadien (von gereifter Eizelle bis geschlüpfter Blastozyste) der Leptin-Rezeptor (LEPR) und BCL2-assoziiertes X-Protein (BAX) untersucht, die beide auf das Housekeeping-Gen Histone 2A (H2A) normalisiert wurden. Jedes Entwicklungsstadium der serumhaltigen Kontrolle und der serum-freien Leptin-behandelten Gruppen (0, 1, 10 und 100 ng/ml) wurde in drei Pools mit je vier Eizellen/Embryonen in Triplets mit SYBRGreen® quantitativ untersucht (Gerät: ABI Prism 7000 SDS, Applied Biosystems). In allen Gruppen war der LEPR nur sehr gering exprimiert und blieb in allen Leptin-behandelten Versuchsgruppen unbeeinflusst. Die Analyse der BAX-mRNA zeigte eine Abnahme in den Gruppen mit 1 und 10 ng/ml Leptin.

Zusammenfassend beeinflusst das Leptin die Entwicklungsfähigkeit von bovinen Oozyten und Embryonen positiv. Der regulierende Effekt des Leptins während der Maturation verbessert die Blastozystenentwicklung und die Blastozystenqualität durch den verminderten apoptotischen Zellverlust.