

## 4 Methodik

### 4.1 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA-Expression verschiedener Faktoren (Enzyme, Zytokine) im bovinen Endometrium bestimmt. Das zu untersuchende Zellmaterial stammte entweder von bovinen Uteri aus dem Schlachthof, von Milchkühen eines kommerziellen Milcherzeugerbetriebes in Brandenburg oder von fünf Erstkalbinnen der Tierklinik für Fortpflanzung, Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin. Eine Übersicht über den Versuchsaufbau liefert Abbildung 2.

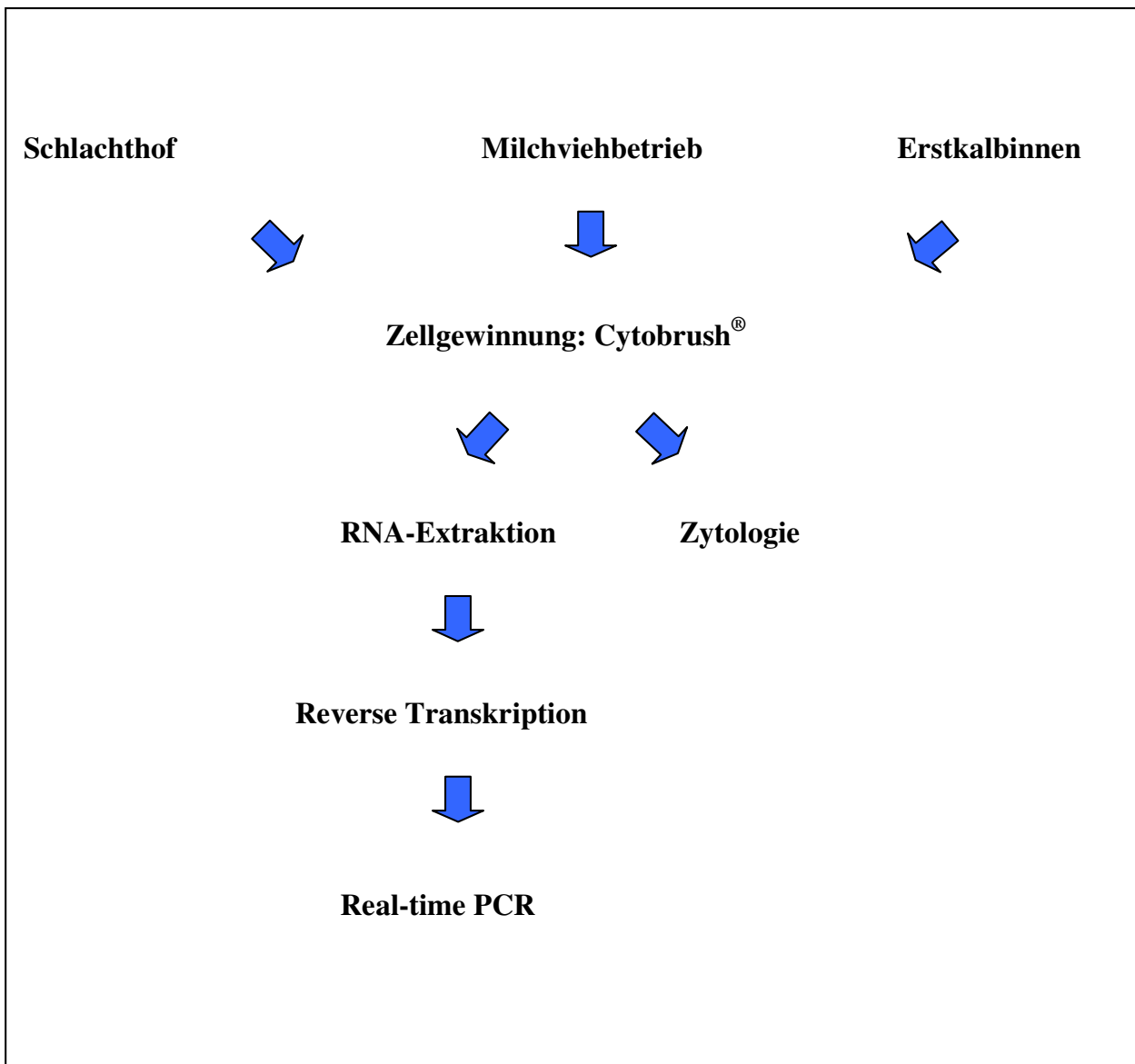


Abbildung 2: Übersicht über den Versuchsaufbau

## 4.2 Gewinnung der Endometriumszellen

### 4.2.1 Schlachthof

Die zu untersuchenden Endometriumszellen wurden im Schlachthof von geschlechtsreifen, weiblichen Rindern ca. 20 min post mortem gewonnen. Um krankhaft veränderte Uteri möglichst von der Studie auszuschließen, fand zunächst eine makroskopische Beurteilung hinsichtlich der Symmetrie der Uterushörner, ovarieller Dysfunktionen (Zysten), pathologischer Flüssigkeitsansammlungen im Uterus sowie der Farbe der Schleimhaut statt. Konnten keine Hinweise auf pathologische Veränderungen entdeckt werden, so erfolgte anhand der von Ireland (1980) bzw. Arosh (2002) beschriebenen Methode eine Einordnung der Uteri in eine von vier Zyklusphasen: prä- (Tag 19-21) und postovulatorische Phase (Tag 1-5) sowie frühe (Tag 6-12) und späte Lutealphase (Tag 13-18). Dabei wurden als Kriterien das Vorhandensein ovarieller Funktionskörper (Follikel, Gelbkörper), der Öffnungsgrad der Zervix, das Vorhandensein von Brunstschleim in Zervix oder Uterus sowie die Farbe des Endometriums berücksichtigt. Die Kriterien zur Bestimmung der Zyklusphasen sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Kriterien zur Bestimmung der Zyklusphasen nach Ireland et al., 1980 und Arosh et al., 2002

		<b>Tag 1-5</b>	<b>Tag 6-12</b>	<b>Tag 13-18</b>	<b>Tag 19-21</b>
Ovar	Follikel	< 0,5 cm	0,5-1 cm	1-1,5 cm	1,5-2,5 cm prall fluktuierend
	Gelbkörper	0,5-1,5 cm rot-blutig	1,5-2,5 cm rot-braun	1,8-3 cm orange-rot	1,7-2,3 cm zitronengelb
Uterus	Zervix	geöffnet	geschlossen	geschlossen	bleistiftstark geöffnet, klarer Schleim
	Schleimhaut	rosa-rot	rosa-braun	blassrosa	blassrosa

Im Anschluss an die Bestimmung des Sexualzyklus wurden die Uteri aufgeschnitten. Mit jeweils einem Cytobrush<sup>®</sup> wurden Endometriumszellen an drei verschiedenen Stellen des Uterus (ipsilaterales und contralaterales Horn, Corpus) entnommen (Abbildung 3). Als ipsilateral wurde die Seite des Uterus mit einem aktiven Funktionskörper (Follikel oder Gelbkörper) auf dem Ovar definiert. Bei dem contralateralen Horn handelte es sich entsprechend um die gegenüberliegende Seite ohne aktiven Funktionskörper. Das Bürstchen wurde mehrmals am Endometrium entlanggerollt, so dass die Zellen der Schleimhaut an den Borsten haften blieben. Das auf diese Weise gewonnene Zellmaterial wurde anschließend in ein mit 0,5 ml RNAlater<sup>®</sup> gefülltes Reaktionsgefäß (1,5 ml) eingerieben. Insgesamt wurden 32 Tiere in die Studie aufgenommen (acht pro Zyklusphase). Von den ersten 16 Tieren wurden jeweils zwei Proben vom ipsilateralen, vom contralateralen Horn und vom Corpus uteri entnommen, bei den folgenden 16 Tieren nur noch eine Probe pro Entnahmestelle. Zusätzlich wurde pro Tier ein zytologisches Präparat des Endometriums angefertigt und der prozentuale Anteil an PMN bestimmt (siehe Kapitel 4.12). Der Transport der so konservierten Endometriumszellen ins Labor erfolgte auf Eis. Das Zellmaterial wurde bei + 4°C bis zur RNA-Extraktion aufbewahrt.

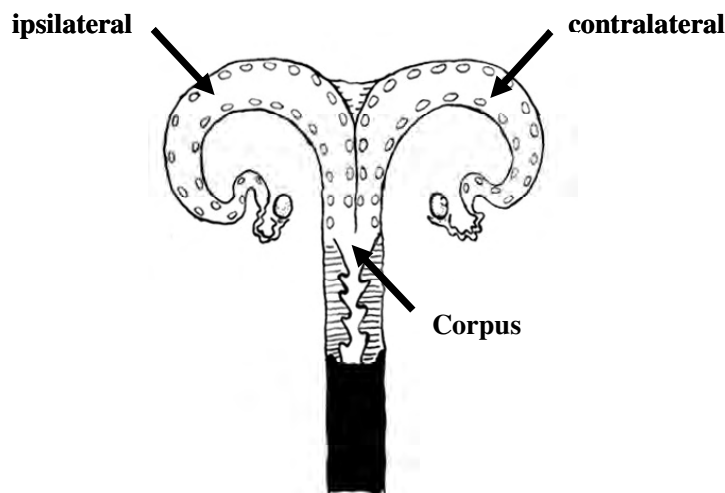


Abbildung 3: schematischer Uterus mit Kennzeichnung der Entnahmeorte

## **4.2.2 Kommerzieller Milcherzeugerbetrieb**

### **4.2.2.1 Übersicht betriebsrelevanter Daten**

Der Milchviehbetrieb, auf dem die Studie durchgeführt wurde, lag nordöstlich von Berlin im Landkreis Barnim, Brandenburg. Die Milchviehherde umfasste ca. 750 Tiere. Dabei waren sowohl die Rassen Schwarzbuntes Milchrind und Holstein Frisian, als auch Kreuzungstiere aus beiden Rassen vertreten. Bezüglich der Haltungsform handelte es sich um einen Boxen-Laufstall mit Spaltenboden, wobei die Tiere der Leistung bzw. des Laktationsstadiums entsprechend unterschiedlichen Gruppen zugeordnet wurden. Die Fütterung setzte sich aus einer Grundfuttermischung bestehend aus Maissilage, Grassilage, Pressschnitzel und Soja sowie einer leistungsbezogenen Kraftfuttergabe (Transponderfütterung) zusammen. Die Tiere erreichten eine durchschnittliche Milchleistung von ca. 8000 kg pro Kuh und Jahr.

### **4.2.2.2 Untersuchung und Einteilung der Studientiere**

Alle in diese Studie aufgenommenen Tiere befanden sich zwischen dem 21. und 27. Tag post partum. Um zunächst die Zyklusphase der Tiere zu bestimmen, wurden die Milchkühe adspektorisch sowie mittels rektaler Palpation eingehend untersucht. Zur Beurteilung der Zyklusphase fanden dabei folgende Kriterien besondere Beachtung: Anzeichen von Brunstschleim, ödematisierte Vulva, gerötete Vaginalschleimhaut, Größe, Symmetrie und Kontraktilität des Uterus sowie Funktionskörper der Ovarien (Follikel, Gelbkörper).

Anschließend sollte eine Einteilung der Tiere in drei Gruppen erfolgen:

Gruppe 1: klinisch gesunde Tiere

Gruppe 2: Tiere mit subklinischer Endometritis

Gruppe 3: Tiere mit klinischer chronischer Endometritis

Um die Kühe den einzelnen Gruppen aufgrund des Gesundheitsstatus zuordnen zu können, erfolgte eine Untersuchung anhand von Adspektion, rektaler Palpation, Vaginoskopie und Zytologie. Tiere, die bereits adspektorisch eitrigen, vaginalen Ausfluss aufwiesen, wurden der Gruppe 3 zugeteilt. Bei Tieren, die weder adspektorisch noch palpatorisch Symptome für eine klinische Endometritis zeigten, erfolgte eine vaginoskopische Untersuchung mit einem

Röhrenspekulum nach Götze. Hierbei wurde auf die Form und den Öffnungsgrad der Portio vaginalis cervicis sowie die Farbe und die Feuchtigkeit der Schleimhaut geachtet. Konnte Ausfluss bzw. eine Flüssigkeitsansammlung in der Vagina festgestellt werden, so wurde die Qualität beurteilt: eitrige Beimengungen dienten auch hier als Kriterium, die Tiere der Gruppe 3 zuzuteilen. Zur Unterscheidung klinisch gesunder und subklinisch erkrankter Kühe, wurde eine zytologische Untersuchung des Endometriums mittels der Cytobrush<sup>®</sup>-Methode zugrunde gelegt (siehe Kapitel 4.12). Wenn von 300 ausgezählten Zellen der Anteil an neutrophilen Granulozyten (PMN) über 5% lag, so wurde eine subklinische Endometritis diagnostiziert. Die Tiere wurden retrospektiv in Gruppe 2 eingestuft. Lag der Anteil an PMN unter 5%, so wurden die Kühe als klinisch gesund beurteilt und in Gruppe 1 eingeteilt (Raab, 2004). Eine Übersicht bezüglich der Einteilungskriterien liefert nachfolgende Tabelle 10.

Tabelle 10: Übersicht der Einteilungskriterien nach Raab, 2004

	<b>Gruppe 1 Klinisch gesund</b>	<b>Gruppe 2 Subklinische Endometritis</b>	<b>Gruppe 3 Klinische Endometritis</b>
Adspektion	o.b.B.	o.b.B.	vaginaler eitriger Ausfluss
Rektale Palpation	o.b.B.	o.b.B.	Flüssigkeit im Uterus
Vaginoskopie	o.b.B.	o.b.B.	eitrige Flüssigkeitsansammlung
Zytologie (PMN)	< 5 %	> 5 %	nicht bestimmt

Zusätzlich wurde von jedem Tier eine Blutprobe zur Bestimmung des Progesteron- und Östrogengehaltes aus der V. coccygea entnommen (siehe Kapitel 4.14).

Insgesamt wurden 27 Tiere in die Studie aufgenommen, jeweils neun pro Gruppe.

#### **4.2.2.3 Technik der Zellgewinnung**

Bei Tieren aller Gruppen wurden Endometriumszellen mittels der Cytobrush<sup>®</sup>-Methode entnommen. Zunächst wurde ein 49,5 cm langes Metallrohr mit einem Durchmesser von 5 mm vaginal eingeführt und unter rektaler Kontrolle durch die Zervix bis in den Uterus vorgeschoben. Eine zweite Person konnte nun das 20 mm lange und im Durchmesser 2,8 mm breite Cytobrush<sup>®</sup>, welches auf einen 52,5 cm langen und im Durchmesser 2 mm breiten Metallstab aufgeschraubt war, in ein Metallrohr von 60 cm Länge und einem Durchmesser

von 4 mm Breite schieben. Dieses Metallrohr mit innenliegendem Metallstab samt aufgeschraubtem Bürstchen wurde nun in das bereits in der Zervix befindliche Metallrohr eingeführt. Anschließend wurde der Metallstab ca. 3 cm nach kranial vorgeschoben, so dass das Cytobrush<sup>®</sup> frei im Uterus lag. Durch Drehen des Metallstabs rollte das Bürstchen am Endometrium entlang, wobei die Zellen der Schleimhaut an den Borsten haften blieben. Das Cytobrush<sup>®</sup> wurde in das innere Metallrohr zurückgezogen und aus dem Uterus entfernt. Auf diese Weise wurden von jedem Tier drei Proben aus der Uterusschleimhaut entnommen. Das äußere Metallrohr verblieb während der Probenentnahme im Uterus und diente für die inneren Metallrohre samt Cytobrush<sup>®</sup> als Führungsschiene. Abbildung 4 zeigt das System zur Gewinnung der Endometriumszellen. Das Zellmaterial zweier Bürstchen wurde jeweils in zwei separate mit 0,5 ml RNAlater<sup>®</sup> gefüllte Reaktionsgefäße eingerieben. Von einem dritten Cytobrush<sup>®</sup> wurde auf einem Objektträger ein Ausstrich für die zytologische Untersuchung angefertigt (siehe Kapitel 4.12). Die Endometriumszellen wurden bei Raumtemperatur ins Labor transportiert und bis zur RNA-Extraktion bei + 4°C aufbewahrt.



Abbildung 4: Cytobrush<sup>®</sup>-System

### 4.2.3 Erstkalbinnen der Tierklinik für Fortpflanzung

Bei den zu untersuchenden Tieren handelte es sich um fünf tragende Färsen der Tierklinik für Fortpflanzung im Alter von ca. 27 Monaten. Sie wurden in einem Anbindestall auf Stroh gehalten. Die Fütterung setzte sich aus Heu, einer Kraftfuttermenge sowie Zuckerrübenschnitzeln zusammen.

Ziel war es, die Erstkalbinnen über das gesamte Puerperium hinweg zu untersuchen. Die Zellentnahme begann zehn Tage nach der Abkalbung und wurde anschließend in wöchentlichem Abstand durchgeführt. Die folgende Abbildung 5 gibt einen Überblick über den Versuchsaufbau.

Zu jedem Untersuchungszeitpunkt wurden die Befunde der rektalen Untersuchung dokumentiert: ovarielle Funktionskörper, Größe, Symmetrie und Kontraktilität des Uterus. Zusätzlich wurde auf vaginalen Ausfluss geachtet und gegebenenfalls seine Qualität beurteilt. Die Gewinnung der Endometriumszellen mittels Cytobrush<sup>®</sup>-Methode erfolgte wie bereits in Kapitel 4.2.2.3 beschrieben.

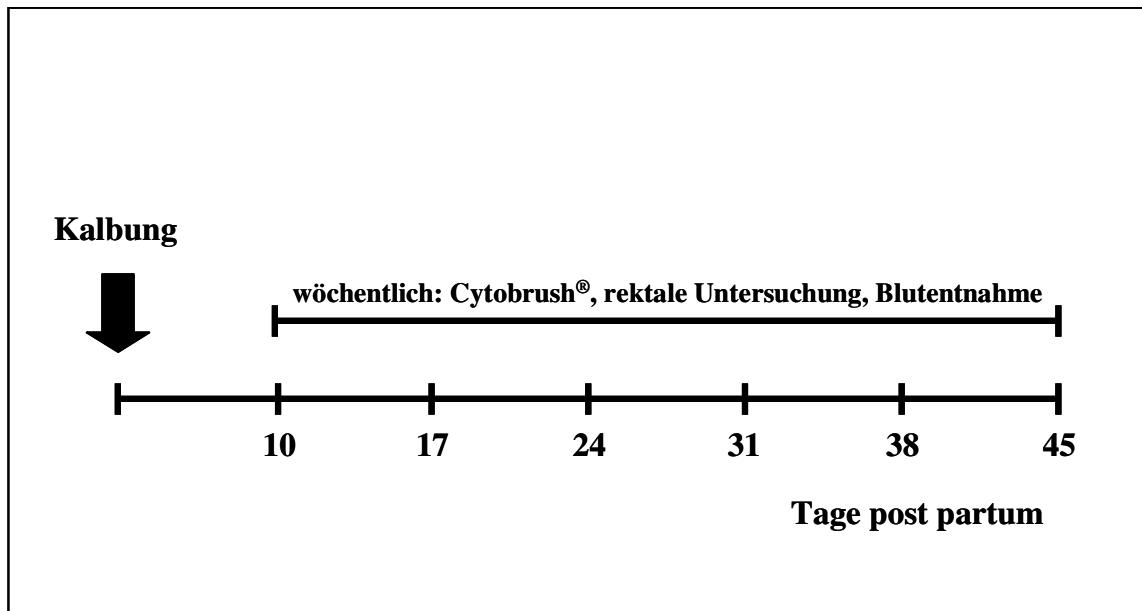


Abbildung 5: Versuchsaufbau der Probengewinnung

Im Anschluss an die Zellgewinnung wurde von jedem Tier eine Blutprobe zur Bestimmung des Progesteron- und Östrogengehaltes aus der V. jugularis entnommen (siehe Kapitel 4.14).

### 4.3 RNA-Extraktion

Um eine Kontamination der RNA mit RNasen zu vermeiden, wurden für die einzelnen Arbeitsschritte Vorsichtsmaßnahmen getroffen. Grundsätzlich erfolgte der Umgang mit RNA nur unter Verwendung von Einmalhandschuhen sowie speziellen RNase-freien Materialien. Pinzetten wurden vor Gebrauch mit 99%igem Ethanol gereinigt, alle Lösungen, Glas- und Reaktionsgefäße für 20 min bei 121 °C und 1,5 bar autoklaviert und verwendete Gelkammern mit 0,1 M NaOH für 30 min inkubiert. Zusätzlich erfolgte die RNA-Extraktion mit einem eigens dafür vorgesehenen Satz Pipetten.

Vor Beginn der Isolierung der Gesamt-RNA wurden zu jeder Probe, bestehend aus 500 µl RNAlater<sup>®</sup> und Zellmaterial, 500 µl gekühltes (4°C) PBS hinzugegeben und sorgfältig durchmischt. Anschließend wurde die Probe bei 8000 Upm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, ohne das Pellet zu zerstören. Die Gesamt-RNA der gewonnenen Endometriumszellen wurde anschließend mit Hilfe des Invisorb<sup>®</sup> Spin Cell RNA Mini Kits isoliert. Die im Handbuch beschriebene Anleitung diente als Grundlage für die einzelnen Arbeitsschritte. Um die Zellen zu lysieren, wurden 700 µl Lyse-Puffer zu den Zellen hinzugegeben und bis zu deren vollständiger Auflösung sorgfältig durchmischt. Im nächsten Schritt erfolgte die Entfernung der genomischen DNA mit Hilfe eines DNA-Binding Filters. Hierzu wurden 700 µl der lysierten Zellen auf den Filter gegeben, 1 min inkubiert, bei 12000 Upm für 2 min zentrifugiert, der Filter verworfen und der Durchfluss aufbewahrt. Um nun die Voraussetzung für die Bindung der RNA zu schaffen, wurden 700 µl Ethanol (70%ig) zu dem Durchfluss in das Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend konnte die RNA durch Einsatz eines RNA-Binding Filters gebunden werden. In zwei Schritten wurden jeweils 700 µl auf den Filter gegeben, für 1 min inkubiert, bei 10000 Upm für 30 sec zentrifugiert und der Durchfluss entfernt. Die nun im Filter gebundene RNA wurde zweimal mit Hilfe eines Waschpuffers gereinigt. Im Anschluss an die Entfernung des Waschpuffers wurde der Filter bei 13000 Upm für 3 min getrocknet und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nun wurden 40 µl Elutionspuffer direkt auf die Membran des Filters gegeben, für 2 min inkubiert, bei 10000 Upm für 1 min zentrifugiert und das Eluat gesichert. Die darin gelöste RNA wurde gründlich durchmischt, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und sofort auf Eis verbracht.

Zur Bestimmung der Konzentration bzw. der Ausbeute wurde die RNA 1:25 mit RNA-H<sub>2</sub>O verdünnt und die Absorption im Photometer bei  $\lambda = 260$  nm bestimmt. Als Referenzwert



diente eine Küvette mit RNA-H<sub>2</sub>O. Um Verunreinigungen durch Proteine zu ermitteln, wurde ebenfalls die Wellenlänge bei  $\lambda = 280$  nm gemessen, so dass die Reinheit anhand einer Ratio (Verhältnis OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>) geprüft werden konnte. Die Ratio sollte in einem Bereich zwischen 1,6 und 1,8 liegen. Zusätzlich wurde die Absorption bei  $\lambda = 320$  nm bestimmt, da ein hoher Wert auf weitere Kontaminationen hinweist. Die Aufbewahrung der RNA bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.4 RNA-Agarose-Gel

Zur visuellen Darstellung sowie zur Überprüfung der Qualität und Quantität der RNA-Moleküle wurde eine Elektrophorese unter Verwendung eines 1% (w/v) denaturierenden RNA-Agarose-Gels durchgeführt.

Die Herstellung des Gels erfolgte wie in Kapitel 3.8 beschrieben. Im Anschluss an die Herstellung des Gels wurden in heißem Zustand 9,6 ml 37%iges Formaldehyd hinzugefügt und das Gel in die Kammer gegossen. Innerhalb einer Stunde polymerisierte das Gel. Das feste Gel wurde in 1x MOPS-Puffer getaucht. Zwei  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA in 10  $\mu\text{l}$  RNA-H<sub>2</sub>O wurden mit jeweils 10  $\mu\text{l}$  Probenpuffer (Kapitel 3.8) verdünnt.

Alle Proben wurden bei  $70^{\circ}\text{C}$  für 10 min denaturiert, sofort auf Eis gestellt und anschließend in die Geltaschen einpipettiert (17  $\mu\text{l}$  je Probe). Die Elektrophorese erfolgte konstant bei 70 V für ca. eine Stunde. Anschließend konnte aufgrund der Ethidiumbromideinlagerungen die Auftrennung der RNA in 18 S und 28 S rRNA Untereinheiten (dominante Banden) unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht werden. Ebenso ließen sich eventuelle Verunreinigungen durch DNA darstellen. Zur Dokumentation diente jeweils ein Foto (Abbildung 6).

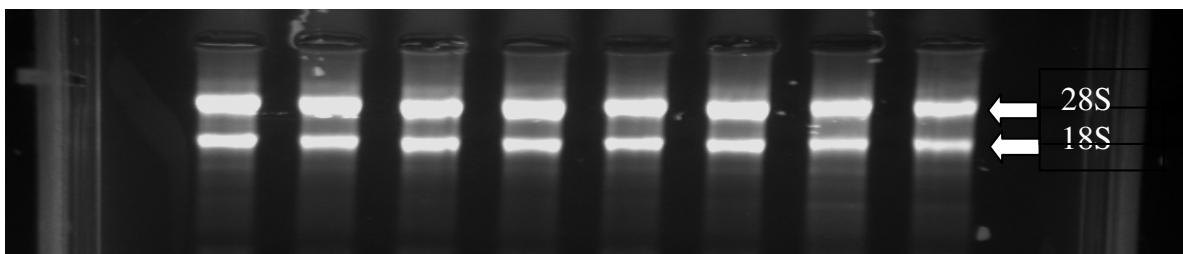


Abbildung 6: Auftrennung der Gesamt-RNA

#### 4.5 Untersuchung der RNA-Qualität mittels Bioanalyzer

Die Qualität der RNA, die aus den Endometriumszellen der Tiere vom Milcherzeugerbetrieb sowie den Erstkalbinnen isoliert wurde, wurde mittels Bioanalyzer 2100 untersucht. Prinzipiell wird dabei eine Kapillarelektrophorese in einem kompakten Chip-System durchgeführt. Durch Färbung der RNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff und Vergleich mit einem externen Standard können die Größe der in der Probe vorhandenen RNA (18S und 28S) und ihre Konzentration bestimmt werden. Auf dem Chip sind Vertiefungen für die Proben, das Gel sowie den Größenmarker angeordnet. Ein Mikro-Kanalsystem aus Glas, welches mit einem Gel-Farbstoff-Gemisch gefüllt wird, stellt die Verbindung zwischen den einzelnen Vertiefungen her. Der Chip wurde zunächst in die dafür vorgesehene Chip-Priming-Station eingesetzt. In die mit einem schwarzen „G“ gekennzeichnete Vertiefung wurden 9 µl der vorbereiteten Gel-Farbstoff-Matrix (65 µl gefilterte Gel-Matrix mit 1 µl Farbstoff-Konzentrat) gegeben. Mittels Druckluft aus einer integrierten Spritze wurde die Gel-Matrix in das Mikrokanalsystem gepresst. Nach 30 sec konnte die Priming-Station wieder geöffnet werden. In die übrigen beiden mit „G“ gekennzeichneten Vertiefungen wurden 9 µl Gel-Farbstoff-Matrix als Reserve hineinpipettiert. In die verbleibenden Vertiefungen wurden jeweils 5 µl RNA-Nano-Marker gegeben. Die Denaturierung des RNA 6000 Größenstandards und der zu untersuchenden Proben erfolgte in einem Wärmeblock bei 70°C für 2 min. Jeweils 1 µl des Größenstandards sowie 1 µl der Proben wurden auf den Chip geladen. Anschließend wurde der Chip bei 2400 Upm für 1 min auf einem speziellen Schüttler gründlich durchmischt. Der Chip wurde in den Bioanalyzer 2100 eingesetzt und das Programm gestartet. Die Komplexe aus RNA mit eingelagertem Farbstoff werden durch eine laserinduzierte Fluoreszenz detektiert und die Daten als gelähnliche Bilder (Banden) und Elektropherogramme (Peaks) angezeigt. Zusätzlich wurde eine RNA Integrity Number (RIN) angegeben. Es handelte sich hierbei um ein von der Software generiertes Hilfsmittel, um die Integrität bzw. Qualität der Gesamt-RNA zu beurteilen.

## 4.6 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription dient die einzelsträngige RNA als Matrize für die Synthese eines komplementären DNA-Stranges (cDNA), da für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) DNA benötigt wird. Um genomische DNA zu eliminieren, wurde zusätzlich vor der reversen Transkription ein DNase-Verdau durchgeführt.

Es wurde 1 µg RNA pro Probe in 15 µl PCR-H<sub>2</sub>O eingesetzt und zunächst jeweils das gleiche Volumen an DNase-Reaktionsansatz hinzugefügt (Gabler et al., 1997). Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: DNase-Reaktionsansatz

<b>Ansatz pro Probe</b>	
M-MLV RT 5x Puffer	6 µl
PCR-H <sub>2</sub> O	8 µl
DNase (1 U/µl)	1 µl

Die Proben wurden im Cyclyer zunächst für 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend wurde die DNase bei 75°C (5 min) inaktiviert. Im Anschluss wurden die Proben sofort für 5 min auf Eis gestellt, um die Denaturierung der RNA aufrecht zu erhalten. Schließlich wurden jeweils 30 µl RT-Reaktionsansatz hinzugefügt. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: RT-Reaktionsansatz

<b>Ansatz pro Probe</b>	
M-MLV RT 5x Puffer	6 µl
dNTPs (je 10 mM)	4 µl
Hexamere (50 µM)	3 µl
PCR-H <sub>2</sub> O	16 µl
M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl

Im Cyclyer wurden die Proben zunächst für 10 min bei 25°C, für 50 min bei 37°C, für 2 min bei 90°C inkubiert und schließlich auf 4°C gekühlt. Im Anschluss an eine Zentrifugation der Proben bei 13000 Upm für 1 min wurden diese gründlich durchmischt und ein weiteres Mal

zentrifugiert (13000 Upm, 1 min). Die cDNA wurde aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Der beschriebene Ansatz bezieht sich auf die vom Schlachthof gewonnenen Proben. Für die reverse Transkription der Proben vom Milcherzeugerbetrieb sowie den Erstkalbinnen wurde aufgrund der geringeren RNA-Konzentration nur  $0,5\ \mu\text{g}$  RNA in einem  $40\ \mu\text{l}$  Reaktionsvolumen eingesetzt.

#### 4.7 Auswahl der primerspezifischen Temperaturoptima mittels PCR

Bei der PCR erfolgt zunächst die Denaturierung der Doppelstränge, so dass sich nun die Primer an die Einzelstränge anlagern können (Annealing). Der dritte Schritt besteht in der Zweistrangsynthese (Elongation der Primer) mit Hilfe der hitzestabilen DNA-Polymerase (iTaq). Um die optimale Annealingtemperatur für die einzelnen Primerpaare zu ermitteln, wurde eine konventionelle Gradienten-PCR durchgeführt. Zusätzlich wurde die Produktgröße sowie die Sequenz überprüft. Der Heizblock des Cyclers umfasste eine Temperaturdifferenz von  $60 \pm 8^{\circ}\text{C}$ , so dass die PCR für einen Primer bei 12 verschiedenen Annealingtemperaturen durchgeführt werden konnte. In den 12 nebeneinander liegenden Vertiefungen des Heizblocks wurden jeweils folgende Temperaturen erreicht:  $52^{\circ}\text{C}$ ,  $52,2^{\circ}\text{C}$ ,  $53,1^{\circ}\text{C}$ ,  $54,6^{\circ}\text{C}$ ,  $56,4^{\circ}\text{C}$ ,  $58,5^{\circ}\text{C}$ ,  $60,7^{\circ}\text{C}$ ,  $62,9^{\circ}\text{C}$ ,  $64,9^{\circ}\text{C}$ ,  $66,6^{\circ}\text{C}$ ,  $67,8^{\circ}\text{C}$ ,  $68,5^{\circ}\text{C}$ . Der Reaktionsansatz für die PCR ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: PCR-Reaktionsansatz

<b>Ansatz pro Probe</b>	
10x iTaq Puffer	2,5 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,75 $\mu\text{l}$
dNTPs (je 10 mM)	0,5 $\mu\text{l}$
Primer forward (20 $\mu\text{M}$ )	0,5 $\mu\text{l}$
Primer revers (20 $\mu\text{M}$ )	0,5 $\mu\text{l}$
PCR-H <sub>2</sub> O	17,25 $\mu\text{l}$
cDNA	5 $\mu\text{l}$
iTaq Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0,1 $\mu\text{l}$

Da es sich um eine Hotstart-Polymerase handelte, wurden die Proben im Cycler zunächst für 10 min bei 94°C inkubiert. Daran schlossen sich 40 Zyklen bestehend aus jeweils 30 sec bei 94°C und der jeweiligen Annealingtemperatur (52 bis 68,5°C) für 1 min an. Anschließend wurden die Proben für 2 min bei 72°C inkubiert und schließlich für 10 min auf 4°C heruntergekühlt.

Im Anschluss an die Gradienten-PCR wurden jeweils 20 µl des PCR-Produkts mit 5 µl Auftragspuffer vermischt. Das 1% (w/v) DNA-Agarose-Gel (siehe Kapitel 3.8) wurde mit 200 ml 1x TAE-Puffer überschichtet, jeweils 25 µl der Proben sowie 10 µl des Größenmarkers (Gene Ruler 100 bp) wurden auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese konstant bei 70 V für ca. 60 min durchgeführt.

Nach Sichtbarmachung der einzelnen mit Ethidiumbromid gefärbten Banden unter UV-Licht, wurde das Temperaturoptimum anhand des intensivsten Signals ermittelt. Zur Dokumentation wurde jeweils ein Foto erstellt.

#### **4.8 Aufreinigung der PCR-Produkte**

Um das PCR-Produkt aufzureinigen und anschließend quantifizieren zu können, wurde zunächst eine konventionelle PCR durchgeführt (siehe Kapitel 4.7).

Die PCR-Produkte bzw. Amplifikate wurden in einem 1% (w/v) DNA-Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, die Banden im UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit Hilfe des Invisorb® Spin DNA Extraktion Kits, wobei die einzelnen Arbeitsschritte dem Protokoll des Herstellers entsprachen. Insgesamt verlief die Aufreinigung in fünf Schritten. Zunächst wurden die ausgeschnittenen Gel-Banden in ein Reaktionsgefäß (2,0 ml) verbracht und 500 µl Gel Solubilizer S hinzugefügt. Das Gel wurde für 10 min bei 50°C in einem Wärmeblock unter kontinuierlichem Schütteln bis zu dessen vollständiger Auflösung inkubiert. Nun wurden 250 µl Binding Enhancer hinzugegeben und die Suspension gründlich durchmischt. Um das DNA-Fragment zu binden, wurden 800 µl der Probe auf den Spin-Filter pipettiert und für 1 min bei 12000 Upm zentrifugiert. Nach Entfernung des Filtrats, wurden zweimalig jeweils 500 µl Wasch-Puffer auf den Filter gegeben und für 30 sec bei 12000 Upm zentrifugiert. Im Anschluss an die Trocknung des Filters bei 10000 Upm für 4 min wurde dieser in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Schließlich wurden 20 µl Elutionspuffer direkt auf die Membran

des Filters gegeben, dieser nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur für 1 min bei 12000 Upm zentrifugiert, das im Eluat gelöste DNA-Fragment in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C aufbewahrt.

#### 4.9 Quantifizierung der PCR-Produkte

Um das aufgereinigte PCR-Produkt als Standard für die Real-time PCR verwenden zu können, musste es zunächst mit Hilfe des PicoGreen® dsDNA Quantitation Kits quantifiziert werden. Das Prinzip beruht auf der Eigenschaft des PicoGreens®, hochselektiv an doppelsträngige DNA, jedoch nicht an RNA oder einzelsträngige DNA zu binden. Die Durchführung erfolgte laut Beschreibung des Herstellers. Für die Erstellung einer Standardkurve wurde zunächst von der mitgelieferten  $\lambda$ -DNA mit TAE-Puffer eine Stammlösung angefertigt. Von dieser Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe (2, 5, 10, 25 und 50 ng/ml) hergestellt und alle zu messenden DNA-Proben mit TAE-Puffer verdünnt. Sowohl die DNA-Standards als auch die Proben wurden in eine 96-Loch-Fluorometerplatte ( $\mu$  Clear Platte) vorgelegt, mit der PicoGreen®-Lösung überschichtet und 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung mit Hilfe eines Fluorometers (Fluostar Optima). Die Proben wurden bei 480 nm angeregt und die Emission bei 520 nm ermittelt. Anhand der Regressionskurve der DNA-Standards konnte die Konzentration der einzelnen Proben bestimmt werden. Der Korrelationskoeffizient (R-Wert) betrug 0,9998. Für alle Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Abweichung beider Proben betrug nicht mehr als 10%.

#### 4.10 Sequenzierung der PCR-Produkte

Um die Nukleotid-Sequenz der PCR-Produkte zu bestimmen wurde die Didesoxy- bzw. Kettenabbruch-Methode nach Sanger (1977) angewendet, wobei nur die Sequenzierreaktion mit Hilfe des ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits im eigenen Labor stattfand. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Ansatz der Sequenzierreaktion

<b>Ansatz pro Probe</b>	
Big Dye	3 $\mu$ l
cDNA (100 ng)	5 $\mu$ l
Primer for oder rev (3,2 pmol)	2 $\mu$ l
Mineralöl	20 $\mu$ l

Im Cycler wurden die Proben über 25 Zyklen inkubiert. Ein Zyklus bestand aus 96°C für 10 sec, 50°C für 5 sec und 60°C für 4 min. Anschließend wurden die Proben im Cycler auf 4°C heruntergekühlt.

Die Aufreinigung sowie die Analyse der Sequenzierreaktion wurden von GATC-Biotech (Konstanz) kommerziell durchgeführt.

#### 4.11 Real-time PCR

Die Quantifizierung der cDNA erfolgte mittels Real-time PCR im Rotor Gene 3000. Diese Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren ermöglicht es, die Amplifizierung der Templates über den gesamten Reaktionsverlauf hinweg zu verfolgen. Die exakte DNA-Menge innerhalb des linearen Anstiegsbereichs ließ sich anhand der Standardkurve eines definierten PCR-Produkts (externe Standard-Methode) ermitteln.

Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe ( $1:10^3$  bis  $1:10^9$ ) in 10er Verdünnungsschritten des jeweiligen Standards (definiertes PCR-Produkt) hergestellt (2  $\mu$ l Standard, 18  $\mu$ l PCR- $H_2O$ ), gründlich durchmischt und auf Eis gestellt. Nun konnte der Reaktionsansatz vorbereitet werden (Tabelle 15).

Tabelle 15: Reaktionsansatz für die Real-time PCR

<b>Ansatz pro Probe</b>	
Primer forward (20 $\mu$ M)	0,2 $\mu$ l
Primer revers (20 $\mu$ M)	0,2 $\mu$ l
PCR- $H_2O$	3,4 $\mu$ l
dt Sensi-Mix (2x), Quantace	5 $\mu$ l
SYBR-Green (50x), Quantace	0,2 $\mu$ l

Der Reaktionsansatz wurde durchmischt, für 1 min bei 13.000 Upm zentrifugiert und je 9  $\mu$ l pro Reaktionsgefäß vorgelegt. Von der zu untersuchenden cDNA bzw. der Standards wurde jeweils 1  $\mu$ l hinzugefügt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße in den Rotor eingesetzt und die Reaktion gestartet. Die Proben wurden zunächst für 10 min bei 95°C inkubiert, um die Taq-Polymerase zu aktivieren. Daran schlossen sich 45 Zyklen bestehend aus 95°C für 15 sec, die jeweilige Annealingtemperatur für 20 sec und 72°C für 30 sec an. Anschließend wurde die Schmelzpunktkurve erstellt (50-95°C, 6 sec/1°C), um die Spezifität des Produkts zu überprüfen. Die Auswertung erfolgte nach Ablauf des Programms mit Hilfe der entsprechenden Software. Zunächst wurde für alle Proben ein  $C_T$  (cycle threshold)-Wert ermittelt. Dieser entspricht der Zykluszahl zum Zeitpunkt exponentieller Vermehrung. Anhand der  $C_T$ -Werte der Standards (PCR-Produkte mit bekannter Konzentration) ließ sich eine Standardkurve erstellen, wobei der Korrelationskoeffizient bzw. R-Wert bei 0,99 lag. Mit Hilfe der Standardkurve konnte nun aus den  $C_T$ -Werten aller Proben die jeweils ursprünglich vorhandene cDNA-Konzentration ermittelt werden. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf das jeweilige PCR-Produkt. Zusätzlich wurde die Effizienz der Reaktion bestimmt. Sie lag durchschnittlich in einem Bereich von etwa 90%. Als Negativkontrolle dienten für jeden Ansatz 1  $\mu$ l PCR-H<sub>2</sub>O sowie vier Proben, denen bei der reversen Transkription kein Enzym (reverse Transkriptase) zugesetzt wurde. Bei jeder durchgeführten Real-time PCR ergaben die Kontrollen ein negatives Ergebnis. Eine Auswertung erfolgte erst nach Überprüfung der Schmelzpunktkurve bzw. der Spezifität des Produkts. Um die Qualität bzw. Effizienz der Reversen Transkription zu überprüfen, wurde von jeder Probe neben dem zu untersuchenden Primer auch eine PCR mit einem so genannten Haushalts-Gen durchgeführt. Dabei handelte es sich in dieser Arbeit um die ribosomale 18S rRNA.

## 4.12 Zytologie

### 4.12.1 Anfertigen der Zellpräparate

Von jedem in die Studie aufgenommenen Tier wurden Ausstriche des Endometriums angefertigt. Die Gewinnung des Zellmaterials erfolgte wie bereits beschrieben mittels der Cytobrush<sup>®</sup>-Methode, wobei das Bürstchen anschließend von links nach rechts auf einem Glasobjektträger abgerollt wurde. Die Fixierung und Färbung des zytologischen Präparates



fanden im Labor nach Anleitung des Herstellers statt. Die Zellkerne färbten sich violett, das Plasma hellgrau und die Granula der neutrophilen Granulozyten hellviolett an.

#### 4.12.2 Mikroskopische Beurteilung der Zellpräparate

Die Ausstriche wurden bei 400facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop betrachtet. Die Durchsicht begann nach allgemeinen labordiagnostischen Methoden in der linken oberen Ecke des Objektträgers und setzte sich mäanderförmig fort. Insgesamt wurden pro Zellpräparat 300 Zellen ausgezählt und differenziert. Besondere Beachtung fanden polymorphkernige Granulozyten (PMN), Lymphozyten und Endometriumszellen. Ziel der mikroskopischen Beurteilung der Ausstriche war die Bestimmung des prozentualen Anteils der neutrophilen Granulozyten am Gesamtzellbild. Anhand dieser Beurteilung erfolgte die Zuordnung der Tiere zu folgenden Gruppen:

Gruppe 1: Anteil der PMN > 5% (Tiere mit subklinischer Endometritis)

Gruppe 2: Anteil der PMN < 5% (klinisch gesunde Tiere)

Ein Beispiel für ein typisches zytologisches Präparat ist in Abbildung 7 dargestellt.

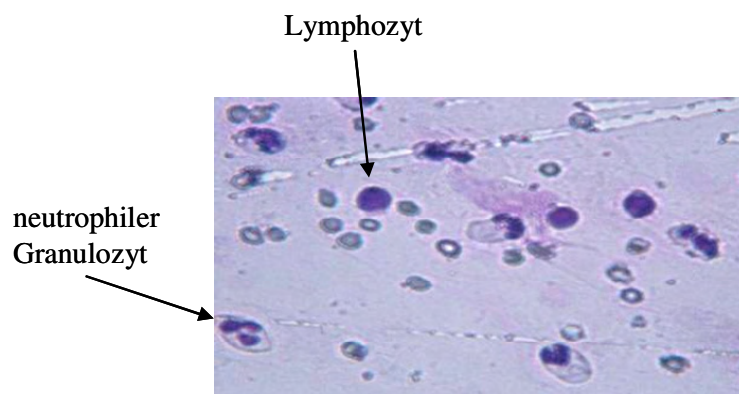


Abbildung 7: Zytologisches Präparat mit Lymphozyt und neutrophilem Granulozyt

### 4.13 Sonographie

Da es mittels der rektalen Palpation nicht immer möglich war, den Zyklusstand der Tiere eindeutig zu bestimmen, wurde bei der Untersuchung der Erstkalbinnen die Sonographie als weiteres diagnostisches Hilfsmittel herangezogen. Die Ovarien wurden mit einem 5-MHz-Linear-Endorektalschallkopf (Fa. Pie Medical, Maastricht, NL) untersucht. In Abbildung 8 sind die jeweiligen Funktionskörper eines Ovars im Ultraschallbild dargestellt. Flüssigkeitsgefüllte Follikel stellen sich dabei echoarm (schwarz), Gelbkörper hingegen echogen (grau) dar.

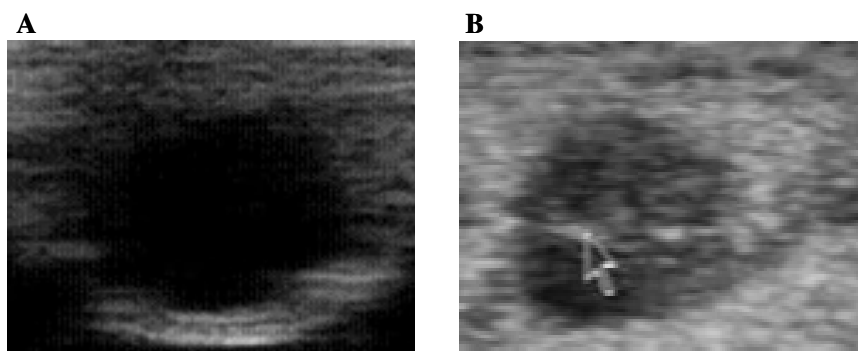


Abbildung 8: Ultraschallbild eines Follikels (A) und eines Gelbkörpers (B) mit umgebendem Ovargewebe

### 4.14 Hormonbestimmung

Um die Bestimmung der Zyklusphase mittels rektaler Palpation und Sonographie zu unterstützen, wurde von jedem untersuchten Tier des Milchviehbetriebes sowie von den Erstkalbinnen der Tierklinik für Fortpflanzung ein Hormonprofil erstellt (Progesteron/Östradiol). Die Blutentnahme aus der V. coccygea (Milchviehbetrieb) bzw. der V. jugularis (Tierklinik) erfolgte jeweils im Anschluss an die Gewinnung der Endometriumszellen. Nach Zentrifugierung der Blutproben (4000 Upm für 10 min) wurde das Serum abgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die Bestimmung der Progesteron- und Östradiolwerte mittels Enzymimmunoassay (EIA) wurde als Dienstleistung im Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW), Berlin, durchgeführt.

#### 4.15 Statistische Auswertung

Alle zur Auswertung relevanten Daten wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel<sup>®</sup> (Version 2000, Microsoft) und dem Statistikprogramm SPSS<sup>®</sup> bearbeitet.

Die mRNA-Expression der Entzündungsmediatoren bGCP-2, COX-1, COX-2, Haptoglobin, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 sowie TNF $\alpha$  wurde im Endometrium anhand von Schlachthofmaterialien in Abhängigkeit vom Entnahmeort (ipsilaterales und contralaterales Horn, Corpus) und der Zyklusphase (n=8 pro Zyklusphase) untersucht. Von den ersten 16 Tieren wurden zwei RNA-Proben pro Entnahmeort gewonnen. Von den folgenden 16 Tieren wurde nur noch jeweils eine Probe pro Region entnommen. Die Daten wurden zunächst logarithmiert. Es wurde eine univariate Varianzanalyse mit Messwiederholung mit den Faktoren Entnahmeort, Zyklustag und Messung (ipsilateral 1 und 2, contralateral 1 und 2, Corpus 1 und 2) durchgeführt. Da zwischen den beiden Proben eines Entnahmeortes keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten, erfolgte anschließend eine zweifaktorielle Varianzanalyse anhand der ersten Messwerte (ipsilateral 1, contralateral 1, Corpus 1) mit Messwiederholungsfaktor Entnahmeort und Zwischensubjektfaktor Zyklustag. Ergab sich für den Faktor Zyklustag ein signifikanter Unterschied, so wurde ein Post-hoc-Test angeschlossen (Dunnett-T3). Für jeden untersuchten Entzündungsmediator wurden Q-Q-Plots erstellt.

Bei den Kühen des Milcherzeugerbetriebes erfolgte die Untersuchung der mRNA-Expression im Endometrium von gesunden Tieren sowie Kühen mit subklinischer und klinischer Endometritis (jeweils n=9). Pro Tier wurden zwei RNA-Proben gewonnen und aus den Ergebnissen der Mittelwert berechnet. Hinsichtlich der statistischen Auswertung wurde zunächst der Kruskal-Wallis-H-Test durchgeführt. Ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied, so wurde eine paarweise Untersuchung mittels Mann-Whitney-U-Test angeschlossen.

Im dritten Teil der Studie wurde die mRNA-Expression im Endometrium von Erstkalbinnen (n=5) in Abhängigkeit von sechs Untersuchungszeitpunkten post partum (Tag 10, 17, 24, 31, 38, 45) untersucht. Pro Tier wurden zwei RNA-Proben gewonnen und daraus der Mittelwert berechnet. Die Auswertung der Daten erfolgte ebenfalls mit dem Kruskal-Wallis-H-Test. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests wurde die mRNA-Expression am 17. und 31. Tag post partum miteinander verglichen.

Zur Berechnung der Korrelationen zwischen einzelnen Entzündungsmediatoren wurde der

Pearson-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  festgelegt.

Zur grafischen Darstellung wurden Streudiagramme, Liniendiagramme und Boxplots verwendet. Beim Boxplot werden der größte und der kleinste Messwert, der Median sowie das erste (25%) und dritte Quartil (75%) entlang der Skala abgetragen. Der Bereich zwischen dem ersten und dritten Quartil wird durch eine Box hervorgehoben. Innerhalb dieses Bereichs liegen die mittleren 50% der Beobachtungswerte. Die Höhe der Box entspricht der Interquartilbreite. Werte, die mehr als die 3fache Interquartilbreite von der Box entfernt liegen, werden als Extremwert bezeichnet und sind durch einen Stern gekennzeichnet. Als Ausreißer sind Werte definiert, die mehr als die 1,5fache Interquartilbreite, aber weniger als die 3fache Interquartilbreite von der Box entfernt liegen. Diese Werte sind kreisförmig dargestellt.