

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. vet. med. Holm Zerbe

Einfluss von Apoptose und Degradation der extrazellulären Matrix auf  
die Pathogenese der *Retentio secundinarum* beim Rind

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Helena Sophia Dorothee Lange

aus Bad Langensalza

München 2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Korreferenten: Priv.-Doz. Dr. Stefan Bauersachs  
Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke  
Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf  
Univ.-Prof. Dr. Walter Herrmanns

Tag der Promotion: 09. Februar 2013

Gefördert aus Mitteln der Firma Zoetis Animal Health Europe Paris durch Personal- und  
Sachmittel

Meiner Mum  
In Andenken an meinen lieben Opa

Wenn es etwas gibt,  
gewaltiger als das Schicksal,  
so ist es der Mut,  
der's unerschüttert trägt.

J. W. v. Goethe

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>A.</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>B.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VI</b>
<b>C.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>VII</b>
<b>D.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Die bovine Plazenta .....</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>Die <i>Retentio secundinarum</i> des Rindes .....</b>	<b>4</b>
2.1.	Definition und Inzidenz.....	4
2.2.	Bedeutung.....	5
2.2.1.	Folgen für das Puerperium .....	5
2.2.2.	Ökonomische Folgen.....	7
<b>3.</b>	<b>Mechanismen der physiologischen Nachgeburtsablösung .....</b>	<b>8</b>
3.1.	Plazentale Reifung.....	8
3.2.	Mechanische Lockerung während der Geburt .....	10
3.3.	Endokrinologische Abläufe im peripartalen Zeitraum.....	11
<b>4.</b>	<b>Ätiologie der Nachgeburtsverhaltung .....</b>	<b>13</b>
4.1.	Pathogenese der <i>Retentio secundinarum</i> .....	13
4.1.1.	Trächtigkeitsdauer .....	15
4.1.2.	Fütterung .....	15
4.1.3.	Hypokalzämie.....	16
4.1.4.	Ketose.....	17
4.1.5.	Immunsuppression .....	18
4.2.	Die Extrazellulärmatrix (EZM).....	20
4.2.1.	Proteasen und deren Regulatoren.....	21
4.2.2.	Kollagen .....	24
4.3.	Apoptose.....	25

<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>27</b>
<b>1.</b>	<b>Geräte.....</b>	<b>27</b>
<b>2.</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>28</b>
2.1.	Medikamente.....	28
2.2.	Reagenzien .....	29
2.3.	Puffer und Lösungen .....	30
2.3.1.	Tris Buffer Saline (TBS) .....	30
2.3.2.	Wasserstoffperoxidlösung (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	30
2.3.3.	Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) .....	30
2.3.4.	Harnstoff Saccharose EDTA-Puffer (HSE) .....	31
2.3.5.	Tris Borsäure EDTA (TBE) .....	31
2.3.6.	Herstellung von Agarosegelen .....	31
2.4.	Verbrauchsmaterialien .....	31
<b>3.</b>	<b>Tiere.....</b>	<b>33</b>
3.1.	Versuchsbetrieb.....	33
3.2.	Versuchstiere.....	34
3.3.	Zusammenstellung der Tiere in Gruppen.....	34
3.4.	Tierschutzantrag .....	36
<b>4.</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>36</b>
4.1.	Probengewinnung und Aufbereitung .....	36
4.1.1.	Gewinnung der Plazentomproben .....	36
4.1.2.	Gewinnung der Blutproben .....	37
4.1.3.	Gewinnung von Serum.....	37
4.1.4.	Gewinnung von Plasma.....	38
4.2.	Klinische Untersuchungen der Versuchstiere .....	38
4.2.1.	Geburtsüberwachungen .....	38
4.2.2.	Postpartale gynäkologische Untersuchungen.....	39
4.2.3.	Therapiemaßnahmen .....	40
4.3.	Bestimmung klinisch-chemischer Parameter .....	41
4.4.	Bestimmung des Progesterongehaltes mittels eines Enzymimmunoassay (EIA).....	41
4.5.	Stereologie.....	42
4.5.1.	Probenaufarbeitung .....	42

4.5.2.	Immunhistochemische Färbungen.....	43
4.5.3.	Quantitativ stereologische Untersuchungen.....	44
4.6.	Vergleichende Messung der mRNA-Expression mittels Microarrays ...	45
<b>5.</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>49</b>
5.1.	Affymetrix Power Tools.....	49
5.2.	R Statistikumgebung und BioConductor.....	49
5.3.	Ermittlung differentiell exprimierter Gene (DEGs) .....	49
5.4.	DAVID Functional Annotation Clustering .....	50
5.5.	MultiExperiment Viewer MeV .....	50
5.6.	Gene Set Enrichment Analysis (GSEA).....	51
5.7.	CoPub .....	51
5.8.	Datenanalyse der quantitativ stereologischen Untersuchungen .....	52
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>53</b>
<b>1.</b>	<b>Auswahl der Tiere für Prädispositionsgruppen .....</b>	<b>53</b>
<b>2.</b>	<b>Qualitativ histologische und quantitativ stereologische Untersuchungen .....</b>	<b>55</b>
2.1.	Qualitativ histologische Befunde .....	55
2.2.	Vergleichbare Gesamtvolumina der Epithelzellen in allen Plazentomproben.....	55
<b>3.</b>	<b>Genexpressionsanalyse von Proben aus bovinen peripartalen Plazentomen.....</b>	<b>56</b>
3.1.	Prozessierung der Microarray-Daten .....	56
3.2.	Identifizierung von differentiell exprimierten Genen in bovinen peripartalen Plazentomen mit und ohne <i>Ret. sec</i> .....	58
3.3.	Untersuchung der Expressionsdaten mittels Korrelations-Heatmaps ....	58
3.3.1.	Korrelationsanalysen in Abhängigkeit von den definierten Prädispositionsgruppen .....	61
3.4.	Vergleichende Analyse physiologischer und pathologischer Plazentomproben (Vergleich zweier experimenteller Ansätze).....	63
3.5.	Auswahl von Tiere anhand von Korrelationsanalysen auf der Basis der DEG aus der Bezugsstudie (STREYL et al., 2012) .....	65
3.6.	Direkter Vergleich der zwei identifizierten Gruppen à neun Kühen	

	anhand einer Korrelationsanalyse .....	69
3.7.	Keine weitere Clusterung in „norm“ und „ret“ anhand einer Korrelationsanalyse der restlichen nicht gruppierbaren 22 Kühe .....	71
3.8.	Funktionelle Annotation durch DAVID Functional Annotation Clustering .....	73
3.9.	Ergebnisse der CoPub-Analyse .....	75
3.9.1.	Die extrazelluläre Matrix (EZM) .....	76
3.9.2.	Apoptose.....	78
3.9.3.	Differentielle Expression von Genen für Pregnancy Associated Glycoproteins .....	80
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>81</b>
<b>1.</b>	<b>Konzeptionelle Überlegungen zum Versuchsaufbau .....</b>	<b>81</b>
1.1.	Warum eine Analyse des Transkriptoms?.....	82
1.2.	Analysen des Transkriptoms mit DNA-Microarrays .....	83
<b>2.</b>	<b>Funktion und Regulation der extrazellulären Matrix (EZM) im bovinen peripartalen Plazentom bei Tieren mit <i>Ret. sec.</i> ....</b>	<b>86</b>
2.1.	Proteasen und Protease-Inhibitoren.....	87
2.1.1.	Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) .....	87
2.1.2.	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases (TIMPs) .....	89
2.1.3.	A Disintegrin and Metalloproteinase domain (ADAMs) .....	91
2.1.4.	A Disintegrin and Metalloproteinase domain with Thrombospondin Motif (ADAMTS) .....	92
2.1.5.	Plasminogen-Activator, Urokinase (PLAU), Plasminogen-Activator, Urokinase Rezeptor (PLAUR) .....	93
2.2.	Strukturelle und regulatorische Bestandteile der EZM .....	94
2.2.1.	Matrixproteine.....	96
2.2.2.	Glykoproteine.....	97
2.2.2.1.	Fibulin 5 (FBN5).....	97
2.2.2.2.	Integrine .....	98
<b>3.</b>	<b>Bedeutung der Apoptose im bovinen Plazentom für Nachgeburtsablösung und -verhalten .....</b>	<b>99</b>
3.1.	Apoptose.....	99
3.1.1.	Störungen der Mitoseregulation und des Übergangs in den Prozess der	

---

	Apoptose bei Tieren mit <i>Ret. sec.</i> ....	99
3.1.2.	Beginn der Apoptose .....	103
3.1.3.	Essentielle Regulation der Apoptose durch Caspasen .....	103
3.2.	Pregnancy Associated Glycoproteins (PAGs).....	105
<b>4.</b>	<b>Transkriptomanalyse zur Bedeutung subklinischer Hypokalzämie und subklinischer Ketose auf Transkriptomebene für die <i>Ret. sec.</i> .....</b>	<b>105</b>
<b>5.</b>	<b>Schlussbetrachtung und Ausblick.....</b>	<b>107</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>109</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>113</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>116</b>
<b>IX.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>135</b>
<b>X.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>136</b>



## A. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: <b>Parturition Score (STREYL et al., 2011)</b> .....	39
Abbildung 2: <b>Schematische Darstellung der Arbeitsschritte für die Aufbereitung der mRNA zur Analyse mit einem GeneChip® Microarray von Affymetrix</b> .....	48
Abbildung 3: <b>Gesamtvolumenanteil der Epithelzellen in den Plazentomproben (<math>V_V(\text{Epithelzellen/Plazentom})</math>).</b> ....	56
Abbildung 4: <b>Boxplots der normalisierten Microarraydaten der 40 ausgewählten Plazentomproben.</b> .....	57
Abbildung 5: <b>Paarweise Korrelations-Heatmap aller 40 ausgewählten Plazentomproben.</b> .....	60
Abbildung 6: <b>Korrelations-Heatmap der Plazentomproben von den Tieren mit subklinischer Hypokalzämie.</b> .....	62
Abbildung 7: <b>Korrelations-Heatmap der Plazentomproben von den Tieren mit subklinischer Ketose.</b> .....	63
Abbildung 8: <b>Gene Set Enrichment Analyse basierend auf dem Vergleich des Datensatzes der vorliegenden Studie mit den AP bzw. IP höher exprimierten Genen des Datensatzes von STREYL et al. (2012).</b> .....	65
Abbildung 9: <b>Korrelations-Heatmap für den limitierten Datensatz von 1.226 DEGs aus STREYL et al. (2012).</b> .....	67
Abbildung 10: <b>Hierarchische Cluster-Analyse aller 40 Proben für die DEGs aus STREYL et al. (2012).</b> .....	69
Abbildung 11: <b>Korrelations-Heatmap der ausgewählten 18 Plazentomproben für alle detektierbaren Transkripte.</b> .....	71
Abbildung 12: <b>Korrelations-Heatmap der nicht gruppierten Plazentomproben („norm“: n = 11 versus „ret“: n = 11).</b> .....	72

## **B. TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: <b>Einteilung der humanen Matrix Metalloproteinasen (MMPs)</b> .....	22
Tabelle 2: <b>Versuchsgruppen (je n = 5)</b> .....	35
Tabelle 3: <b>Übersicht über Zeitpunkte der Untersuchungen und Probenentnahmen</b> .....	40
Tabelle 4: <b>Medikamentenanwendung</b> .....	41
Tabelle 5: <b>Programmablauf der Paraffininfiltration mit dem Vakuum-Gewebeinfiltrationsprozessor ASP300</b> .....	42
Tabelle 6: <b>Versuchstiergruppierung</b> .....	54
Tabelle 7: <b>DAVID-Analyse der in den „ret“-Proben höher exprimierten Gene</b> .....	74
Tabelle 8: <b>DAVID-Analyse der in den „ret“-Proben niedriger exprimierten Gene</b> .....	75
Tabelle 9: <b>Mittels CoPub-Analyse ermittelte Gene, die im Zusammenhang mit dem Umbau der extrazellulären Matrix stehen</b> .....	77
Tabelle 10: <b>Mittels CoPub-Analyse ermittelte Gene, die im Zusammenhang mit dem Apoptosegeschehe stehen</b> .....	79
Tabelle 11: <b>Bovine Pregnancy Associated Glycoproteins, die differentiell exprimiert werden</b> .....	80

## C. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SI-Einheiten, Abkürzungen und Zeichen chemischer Elemente sowie ihre Formeln sind in diesem Verzeichnis nicht aufgeführt.

$\beta$ -HBA	$\beta$ -Hydroxybutyrat
<i>Aa.</i>	<i>Arteriae</i> (dt: Arterien)
<i>ad us. vet.</i>	<i>ad usum veterinare</i> (lateinisch: für tierärztlichen Gebrauch)
<i>a.p.</i>	<i>ante partum</i>
Abb.	Abbildung
ADAM	A Disintegrine and Metallopeptidase
ADAMTS	A Disintegrine and Metallopeptidase with Thrombospondine motif
ACTH	Adrenocorticotropin (Adrenocorticotropes Hormon, offizieller Name: POMC-proopiomelanocortin)
AP	Antepartal (Kurzbezeichnung für eine Tiergruppe)
APE 1	Apurinic/Apyrimidinic Endonuklease 1
AST	Aspartat-Aminotransferase (offizieller Name: GOT1-glutamic oxaloacetic transaminase 1)
Aurora A	Aurora Kinase-A
Aurora B	Aurora Kinase-B
B0	Nullwert
BCS	Body Condition Score
bPAG	bovine Pregnancy Associated Glycoprotein
ca.	circa
Ca	Kalzium
CAT	Clot Activator Tube
CCL2, 3, 8	C-C motif ligand 2, 3, 8
CCM	Corn-Cob-Mix
CDKN	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor
cDNA	copy Desoxyribonucleic Acid
CK	Creatin-Kinase
<i>C.l.</i>	<i>Corpus luteum</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Coef=	Correlation Coefficient
COX-2	Cyclooxygenase 2
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
CXCL5, 10	C-X-C motif ligand 5, 10

DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DEG	Differentiell exprimiertes Gen
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EIA	Enzym-Immuno-Assay
ERK	Extracellular signal-Related Kinase
ES	Enrichment Score
et al.	et alii (dt: und andere)
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBN	Fibulin
FC	Fold Change
FDR	False Discovery Rate
FFS	Freie Fettsäuren
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
<i>g</i>	Gaugewert
GAS	Growth arrest-specific
ggf.	gegebenfalls
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
<i>h</i>	<i>hora</i> (lateinisch: Stunde)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBA	β-HBA, β-Hydroxybutyrat
HCl	Salzsäure
HLA G	Humanes Leukozyten-Antigen G
HSE	Harnstoff Saccharose EDTA-Puffer
<i>i.p.</i>	<i>intra partal</i>
<i>i.u.</i>	<i>intra uterin</i>
<i>i.v.</i>	<i>intra venös</i>
IFN-γ	Interferon-gamma
IL-1,-8	Interleukin-1,-8
IL-1 <sub>β</sub>	Interleukin-1, beta
IP	Intrapartal (Kurzbezeichnung für eine Tiergruppe)

ITG	Integrin
Kb	Kilo Basenpaar
K <sub>2</sub> EDTA	Kalium 2 Ethylendiamintetraessigsäure
LAFUGA	Laboratory for Functional Genome Analysis
LDL	Low Density Lipoprotein
LH	Luteinisierendes Hormon
LKV	Landeskontrollverband
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LMW	Low Molecular Weight
M	molar
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MAQC	MicroArray Quality Control
MeV	Multi Experiment Viewer
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex / major Histocompatibility Complex
MHC-I , II	Haupthistokompatibilitätskomplex I / major histocompatibility complex I, II
min	Minuten
MLCK	Myosin Light Chain Kinase
MLP	Milchleistungsprüfung
mmol/l	Millimol pro Liter
MMP-1 bis -28	Matrix Metalloproteinasen-1 bis -28
MMPs	Matrix Metalloproteinasen
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
MT-MMP	Membrane type-Matrix Metalloproteinase
n =	Anzahl
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
ncRNA	non coding Ribonucleic Acid
NEB	Netto-Energie-Bilanz
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
norm	Tiere, die in den Abbildungen und Tabellen als Tiere ohne <i>Ret. sec.</i> bezeichnet werden
OP	Operation
P <sub>4</sub>	Progesteron
<i>p.i.</i>	<i>post inseminationem</i>
<i>p.p.</i>	<i>post partum</i>
PA	Pansenauskultation

PAG	Pregnancy Associated Glycoprotein
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandin F <sub>2α</sub>
pH	Potentia hydrogenii
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PP-Plots	Probability-Probability-Plots
Prog	Progesteronwert
ret	Tiere, die in den Abbildungen und Tabellen als Tiere mit <i>Ret. sec.</i> bezeichnet werden
<i>Ret. sec.</i>	<i>Retentio secundinarum</i> (Nachgeburtsverhaltung)
RFM	Retained fetal membranes
RNA	Ribonucleic Acid
RMA	Robust Multiarray Average
RT	Raumtemperatur
RU	rektale Untersuchung
<i>s.c.</i>	<i>sub cutan</i>
SA	Schwingauskultation
SD	Standardabweichung
SMOC	SPARC related modular calcium binding
sog.	sogenannt
SOTA	Self-organizing tree algorithm
SPARC	Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine
TBE	Tris Borsäure
TBS	Tris Buffer Saline
TGC	Trophoblast Giant cells
TdT	Terminale-Desoxynucleotidyl-Transferase
TGFβ	Transforming Growth factor beta
TH-Zelle	T-Helfer-Zelle
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TIMP1, 2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1, 2
TMR	Total Mixed Ratio (Totale Mischration des Futters, beinhaltet alle nötigen Komponenten)
TNFα	Tumor necrosis factor alpha
TSP	Thrombospondin
TSP1, 2	Thrombospondin 1, 2
u.a.	unter anderem
UDG	Uracil-DNA-Glykosylase
uPA	Urokinase-type-Plasminogen-Activator

uPA-R	Urokinase-type-Plasminogen-Activator-Receptor
v.a.	vor allem
vs	versus
VU	vaginale Untersuchung
Vv.	<i>Venae</i> (dt: Venen)
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## I. EINLEITUNG

Der physiologische Zeitraum *post partum* (*p.p.*), in dem sich die Fruchthüllen (sog. Nachgeburt) ablösen, ist spezifisch für jede Säugetier-Spezies. Wenn dies z.B. beim Menschen nicht innerhalb einer halben Stunde *p.p.* passiert, spricht man von einer *Retentio placentae* (COMBS & LAROS, 1991; WEEKS, 2008). Beim Rind ist für die physiologische Ablösung der fetalen Eihäute eine Zeitspanne von sechs bis 12 Stunden *p.p.* definiert (VAN WERVEN, 1992).

Die *Retentio secundinarum* (*Ret. sec.*) des Rindes ist beim Einzeltier und auf Bestandsebene von großer tiergesundheitlicher sowie wirtschaftlicher Relevanz. Direkte und indirekte Effekte können zu erheblichen Verlusten in der Tierproduktion führen (GRUNERT, 1983; BORSBERRY & DOBSON, 1989; ESSLEMONT & KOSSAIBATI, 1996; KOSSAIBATI & ESSLEMONT, 1997; GUARD, 1999; AHLERS, 2000a, 2000b). Diese Schäden betreffen überwiegend die Produktionsstufen Milchvieh-, aber auch die Mutterkuhhaltung einschließlich der zur Bestandsremontierung erforderlichen weiblichen Jungrinder. Folglich wird auf diesem Gebiet bereits langjährige Ursachenforschung betrieben. Trotz dieser intensiven weltweiten Beforschung der Problematik gibt es bis heute viele offene Fragen bezüglich der Ursachen und Pathogenesemechanismen für dieses offenbar polyfaktorielle Krankheitsgeschehen. Prädispositionsfaktoren sind insbesondere Dystokien, Früh- oder Spätgeburten, Zwillingsträchtigkeiten, Geburtseinleitungen, endokrinen Dysregulationen der Sexualsteroiden oder stoffwechselbedingten Erkrankungen, wie z.B. die Hypokalzämie oder die Ketose (HANSEN, 1976; GRUNERT, 1983; PAISLEY et al., 1986; FÜRL, 2002a; FÜRL, 2003). Eine besondere Bedeutung kommt offenbar der Reifung des Plazentagewebes durch Umbauvorgänge der Extrazellulärmatrix und durch Apoptoseprozesse zu (WILLMS, 1986; SCHOON, 1989; BOOS et al., 2003; STREYL et al., 2012). Ebenso scheinen entzündungsähnliche Prozesse bei der Vorbereitung der Nachgeburtsablösung mitzuwirken (BRAUNERT, 2012; STREYL et al., 2012).

Die Hauptzielsetzung dieser Arbeit ist die Identifizierung von für die Ätiologie und Pathogenese der *Ret. sec.* relevanten Faktoren und Mechanismen in einem holistischen Ansatz. Mittels Transkriptomanalyse an bovinen Plazentomgewebeproben sollen Unterschiede zwischen Tieren mit physiologischem Nachgeburtsabgang und solchen mit *Ret. sec.* zum Zeitpunkt der Geburt dargestellt werden. Außerdem soll geprüft werden, ob anerkannte



Prädispositionsfaktoren der *Ret. sec.* - die subklinischen Formen der Hypokalzämie und der subklinischen Ketose - relevante Effekte auf die plazentare Genexpression haben, die mit der *Ret. sec.* in Verbindung gebracht werden können. Das Projekt läuft in enger Kooperation mit einer weiteren Dissertation (BRAUNERT, 2012). Dort werden (a) die Dysregulation peripartaler Sexualsteroidhormonprofile und (b) inflammatorische Mechanismen im peripartalen Plazentom erforscht, jeweils mit Blick auf deren Bedeutung für die Ätiopathogenese der *Ret. sec.* Um homogenes und somit für die Transkriptomanalyse vergleichbares Plazentomgewebe sicherstellen zu können, werden strenge Kriterien bei der Tierausswahl und die quantitativ stereologische Analyse des Epithelzellanteils in den Plazentomproben angewendet.

Die Resultate dieser Studien sollen das Verständnis für die Pathomechanismen dieser komplexen und wichtigen Erkrankung verbessern. Auf dieser Grundlage sollen zukünftig neue Prophylaxe- und Therapiekonzepte entwickelt werden.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Die bovine Plazenta

Das Rind ist ein Paarhufer und wird somit dem zentralen Implantationstyp zugeordnet. Die Formation der Plazentome beginnt beim Rind zwischen dem 22. und 27. Trächtigkeitstag (KING et al., 1980). Um den 40. Graviditätstag ist die Plazentation nahezu abgeschlossen und führt somit zu einer festen Verbindung zwischen den Fruchthüllen des Embryos und dem maternalen Endometrium (SENGER, 2005; NOAKES, 2009). Das maternale Gewebe wird nicht zerstört und der Trophoblast legt sich dem Uterusepithel an. Beide Epithelien bilden zur Oberflächenvergrößerung Falten und Mikrovilli aus, die sich miteinander verzahnen (RÜSSE, 1998). Die Aufgaben der Plazenta sind vielfältig. Sie schützt v.a. den Embryo gegen äußere Schadeinwirkungen und sorgt für den Stoffaustausch zwischen mütterlichem und fetalem Organismus. Im Verlaufe der Gravidität beim Rind synthetisiert sie u.a. Progesteron und vor allem Östrogene.

Das Endometrium (*Pars uterina*) bildet den mütterlichen Anteil (*Placenta materna*) und tritt an den präformierten Stellen (Karunkeln) mit dem Chorion in Verbindung (SCHNORR & KRESSIN, 2006). Im Endometrium befinden sich vier unregelmäßige Reihen zu je 10 bis 14 erhabener, drüsenloser Schleimhautbezirke mit einer zellreichen Propria, die in der Tiefe stark vaskularisiert ist. Sie stellen die 80 bis 120 vorgebildeten Karunkeln dar, an denen sich die *Placenta fetal*is während der Trächtigkeit mit Hilfe der Kotyledonen fest anheftet (KÖNIG, 2002). Bereits im fetalen Uterus sind die Karunkelanlagen makroskopisch sichtbar (ATKINSON et al., 1984). Die Karunkelanlagen bestehen vorwiegend aus Kollagen Typ-III. Kollagen Typ-I liegt nur in Form eines Maschenwerks im subepithelialen Endometrium vor. Die Karunkeln trächtiger Rinder weisen eine vergleichbare Kollagenfaserverteilung auf (BOOS, 2000).

Das Myometrium besteht aus einer inneren zirkulären Muskelfaserschicht (*Stratum submucosum tunicae muscularis*), einer mittleren bindegewebig durchsetzten Gefäßschicht (*Stratum vasculare tunicae muscularis*) und einer äußeren longitudinal angeordneten Muskelfaserschicht (*Stratum supravasculorum tunicae muscularis*). Das Myometrium ist verantwortlich für die Kontraktionen des Organs (KÖNIG, 2002). Das Perimetrium setzt sich aus der *Tunica serosa*, die den Uterus von außen in Form eines einschichtigen Peritonealepithels

(*Mesothel*) überzieht, und der bindegewebigen *Tela subserosa* zusammen (LIEBICH, 2004).

Das Chorion (*Placenta fetalis*) mit seinen Zottenfeldern (*Kotyledonen*) bildet den fetalen Teil der Plazenta (*Pars fetalis*). Die Zotten, die in den unregelmäßig geformten maternalen Karunkelkrypten liegen, bestehen aus einem bindegewebigen Gerüst, das von trophoblastischem Epithel bedeckt wird (DAVIES & WIMSATT, 1966). Definition und Kategorisierung der Plazenta des Rindes kann auf Basis zweier unterschiedlicher Ansätze erfolgen. STRAHL (1906) definiert die Plazenta des Rindes in Abhängigkeit von der Art der fetomaternalen Verbindung, als *Semiplacenta multiplex* oder *cotyledonaria*. GROSSER (1909) führte eine Einteilung der Plazentaformen nach histologischen Gesichtspunkten ein. Beim Rind spricht er dementsprechend von einer *Placenta epitheliochorialis*, weil hier das maternale Kryptenepithel an das fetale Chorionepithel grenzt. SCHNORR (2006) kategorisiert die Plazenta des Rindes als eine *Placenta synepitheliochorialis*, welche eine Sonderform der *Placenta epitheliochorialis* darstellt. Seine Einordnung folgt der Tatsache, dass schwach invasive Trophoblastriesenzellen eine Verbindung mit einzelnen Karunkel-epithelzellen zu fetomaternalen Hybridzellen eingehen und es somit zur Überschreitung der Basalmembran des maternalen Epithels durch den Trophoblasten kommt (WOODING, 1992; HARTMANN, 2011).

## 2. Die *Retentio secundinarum* des Rindes

### 2.1. Definition und Inzidenz

Physiologischerweise wird die Nachgeburt innerhalb von sechs bis maximal 24 Stunden nach Abkalbung ausgestoßen (ARTHUR, 1979; VAN WERVEN, 1992; SHELDON et al., 2008). Aus klinischer Sicht wird die *Retentio secundinarum* (*Ret. sec.*) als vollständige oder unvollständige Ablösung der Nachgeburt nach mehr als zwölf Stunden *post partum* (*p.p.*) definiert (GRUNERT, 1983). Der Zeitraum sechs bis zwölf Stunden *p.p.* stellt einen sogenannten verzögerten Nachgeburtsabgang dar. Für die Inzidenz der *Ret. sec.* wird im Durchschnitt 5% angegeben (SHELDON et al., 2008). Andere Autoren geben eine Inzidenz von 3 bis 12% an (ARTHUR, 1979; ROMANIUK, 1985; ESSLEMONT & KOSSAIBATI, 1996; SCOTT, 2005; DRILLICH et al., 2006c). Sowohl in Problembetrieben (ESSLEMONT & KOSSAIBATI, 1996; DRILLICH et al.,

2006c; DRILLICH et al., 2006a) als auch bei Kühen mit Dystokie, bei Zwillingsgeburten mit circa (ca.) 40 %, kann die Inzidenz der *Ret. sec.* deutlich höher ausfallen (EILER et al., 1997; SHELDON, 2004). Die *Ret. sec.* wird auch als klinisches Symptom verschiedener Grunderkrankungen, wie z.B. Hypokalzämie und/oder Ketose, Schwer- oder Mehrlingsgeburten angesehen, die sich zudem untereinander negativ beeinflussen können (SCHULZ & MERKT, 1956; GRUNERT, 1983, 1985; SCHOON, 1989; GRUNERT, 1993c; SCHLAFFER et al., 2000). Hochleistungstiere sind im Allgemeinen anfälliger und schwieriger zu therapieren als extensiv genutzte Rassen (GRUNERT & GRUNERT, 1990).

## 2.2. Bedeutung

Die *Ret. sec.* hat grundsätzlich negative Auswirkungen auf den Verlauf des Puerperiums (ARTHUR, 1979; ROMANIUK, 1985; ESSLEMONT & KOSSAIBATI, 1996). Der nicht zeitgerechte Abgang der Nachgeburt gilt als prädisponierender Faktor für Erkrankungen der Gebärmutter und anderer Organe sowie für schlechtere Fruchtbarkeitsaussichten der betroffenen Tiere (BORSBERRY & DOBSON, 1989; LAVEN & PETERS, 1996; FOURICHON et al., 2000; GROHN & RAJALA-SCHULTZ, 2000; SCOTT, 2005; DRILLICH et al., 2006b; DRILLICH et al., 2006c; DRILLICH et al., 2006a; FISCHER et al., 2006). Puerperalerkrankungen werden als einen Komplex aus Gebärpause, Schweregeburt, Abort und *Ret. sec.*, mit nachfolgender *puerperaler Metritis* und Gefahr der Entstehung einer klinischen *Mastitis* aufgrund eines geschwächten Immunsystems (CURTIS et al., 1985) angesehen. In den Untersuchungen von Lopez-Gautius (1996) waren die Abgangsraten von Kühen mit vorangegangener *Ret. sec.* oder *Pyometra*, die zwischen Tag 30-70 *post inseminationem (p.i.)* als tragend untersucht wurden, bei der zweiten Trächtigkeitsuntersuchung (Tag 120-150 *p.i.*) bis zu 2,8-fach höher. Eine an einer Puerperalerkrankung leidende Kuh ist außerdem einem höheren Risiko ausgesetzt, an einer weiteren Störung, zum Beispiel einer Ketose oder einer Labmagenverlagerung, zu erkranken.

### 2.2.1. Folgen für das Puerperium

Schon während der Geburt gelangen Keime aus der Umwelt in den Uterus. Bei Vorliegen von retinierten Eihäuten, die eine Verbindung zwischen der Umgebung der Tiere und dem Uteruslumen darstellen, kann es zu einer massiv erhöhten

bakteriellen Besiedlung im Uterus *p.p.* kommen (OLSON, 1986; BOSTEDT, 1993). Man geht davon aus, dass durch eine *Ret. sec.* in großer Menge nekrotisches Gewebe im Uterus vorhanden ist, welches beste Wachstums-voraussetzungen für Bakterien bietet (SHELDON, 2004). Dabei kann es infolge der starken bakteriellen Besiedlung der Gebärmutter auch zu einer Allgemeininfektion kommen (HERSCHLER & LAWRENCE, 1984; AHLERS, 2000a). In den ersten Tagen *p.p.* dominieren in den Lochialproben von Tieren mit *Ret. sec.* in der Regel koliforme Keime und Streptokokken (BRETZLAFF et al., 1982; SOBIRAJ & DRAEGER, 1988; AHLERS & GRUNERT, 1993; BOSTEDT, 1993). Im weiteren Verlauf des Puerperiums sind bei Tieren mit Nachgeburtsverhaltung und höhergradigen Endometritiden im Uterus vorwiegend *Trueperella pyogenes*, *Proteus vulgaris* sowie die anaeroben Keime, wie *Fusobacterium necrophorum* und verschiedene *Bacteroides*-Spezies anzutreffen (FREDRIKSSON et al., 1985; AHLERS & GRUNERT, 1993; BEKANA et al., 1996b; HUSZENICZA et al., 1999; AHLERS, 2000b; DRILLICH et al., 2001). Phagozyten von Kühen mit *Ret. sec.* scheinen eine reduzierte Phagozytoseaktivität aufzuweisen (LEWIS, 1997).

Bereits GRUNERT und ZAREMBA (1979) wiesen darauf hin, dass eine allgemeine Resistenzminderung den Puerperalverlauf von Tieren mit Nachgeburtsverhaltung negativ beeinflussen können. Auch GILBERT et al. (1993) vermuteten einen Zusammenhang zwischen der Beeinträchtigung der leukozytären Abwehr bei Tieren mit *Ret. sec.* und der Tatsache, dass diese Tiere prädisponiert sind, im Puerperium häufiger und schwerer an Infektionen zu erkranken als Tiere ohne Eihautretention. Verschiedene Autoren konnten einen Zusammenhang zwischen Nachgeburtsverhaltungen und klinisch manifesten Mastitiden durch die geschwächte Abwehrlage nachweisen (GRUNERT & ZAREMBA, 1979; GRUNERT, 1983; SCHUKKEN et al., 1988; HEINONEN & HEINONEN, 1989; SCHUKKEN, 1989; ZDUNCZYK, 1992). Es wurden eine hämatogene Streuung von Endotoxinen und Bakterien ausgehend vom Genitaltrakt und/oder eine galaktogene Infektion über die massiv infizierten Lochien diskutiert (ZDUNCZYK, 1992). In erster Linie prädisponiert eine *Ret. sec.* die betroffenen Tiere, an einer *puerperalen Metritis* zu erkranken (SANDALS et al., 1979; BRETZLAFF et al., 1982; PAISLEY et al., 1986; MURRAY et al., 1990; DE KRUIF, 1994; LAVEN & PETERS, 1996; LEWIS, 1997). Klinische Anzeichen für eine akute Entzündung der Gebärmutter sind

Fieber, übelriechender, wässriger Ausfluss sowie ein gestörtes Allgemeinbefinden mit Anorexie und Leistungseinbußen, was zu einer puerperalen Intoxikation oder Sepsis und auch Ketose führen kann (GRUNERT, 1983; DE KRUIF, 1994; SMITH et al., 1998; AHLERS, 2000a). Es wurde eine Endometritisprävalenz von 64% beschrieben (BORSBERRY & DOBSON, 1989). Tiere mit *Ret. sec.* weisen in Abhängigkeit vom Puerperalverlauf eine mehr oder minder stark verzögerte Uterusinvolution auf, welche zu einer verringerten Fruchtbarkeitsleistung führen kann (BOSTEDT, 1979; FONSECA et al., 1983; FREDRIKSSON et al., 1985; BEKANA et al., 1996b; NAKAO et al., 1997).

Nach der Kalbung hält die uterine Sekretion von Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) physiologischerweise bis zum 10. bis 20. Tag *p.p.* an (EDQVIST et al., 1978; LINDELL et al., 1982; MADEJ et al., 1984; TIAN & NOAKES, 1991; RISCO et al., 1994b; 1994a). Laut BEKANA et al. (1996a) beginnt die ovarielle Aktivität erst, wenn die endogene Prostaglandinsekretion auf ein Basisniveau zurückgefallen ist. Die Synthese findet hauptsächlich in den Karunkeln statt (GUILBAULT et al., 1984) und kehrt mit deren Abbau auf basale Werte zurück (RISCO et al., 1994a). Hohe *post partale* Plasmakonzentrationen an  $PGF_{2\alpha}$  sollen die Uterusinvolution beschleunigen (LINDELL et al., 1982; LINDELL & KINDAHL, 1983; MADEJ et al., 1984). Daher können eine *puerperale Metritis* und eine verzögerte Uterusinvolution mit einer verspäteten Rückkehr zur zyklischen Ovaraktivität *p.p.* einhergehen (FONSECA et al., 1983). Demnach ist es möglich, dass eine *Ret. sec.* mit resultierender *Metritis puerperalis* über eine Toxinresorption und erhöhte  $PGF_{2\alpha}$ -Sekretion zu einer Verzögerung der ersten Ovulation *p.p.* führen (PETER & BOSU, 1988).

### 2.2.2. Ökonomische Folgen

Die direkten (unmittelbaren) Kosten, die v.a. durch tierärztliche Behandlungen, Wartezeit auf die Milch sowie verringerte Milchleistung im Krankheitsfall entstehen, fallen drastisch geringer aus als die indirekten (langfristigen) Kosten. Langfristige Kosten stellen die erhöhte Anfälligkeit für weitere Erkrankungen, verringerte Fruchtbarkeit, verlängerte Zwischenkalbezeiten und ein erhöhtes Abgangsrisiko dar (JOOSTEN et al., 1988; LAVEN & PETERS, 1996; KOSSAIBATI & ESSLEMONT, 1997).

Die Kosten entstehen durch einen erhöhten Besamungsaufwand und eine Verlängerung der Günstzeiten und damit der Zwischenkalbezeiten. Es wird sowohl

ein direkter Mechanismus vermutet, der bei Tieren mit *Ret. sec.* die Fruchtbarkeit beeinflusst, als auch ein indirekter Effekt, der den Weg für eine Prädisposition zu einer *Metritis puerperalis* ebnet (MELLADO & REYES, 1994). Für verlängerte Gützeiten oder einen vorzeitigen Abgang aufgrund von einer puerperalen *Metritis* wird eine Kostenspanne von 291,19 bis 362,09 € angegeben (DRILLICH et al., 2001). Bei der Einteilung in direkte Kosten fällt ein finanzieller Aufwand bei einer *Ret. sec.* von 83 £ durch reduzierte Milchleistung an. Die indirekten Kosten setzen sich durch wirtschaftliche Verluste infolge eines erhöhten Metritis-Risikos mit weiteren 215 £ zusammen (KOSSAIBATI & ESSLEMONT, 1997). In einem Betrieb in Großbritannien fällt bei einer Bestandsgröße von 100 laktierenden Kühen und einer Inzidenz der *Ret. sec.* von 6,6% ein finanzieller Verlust von 471 £ pro Tier und Jahr an (JOOSTEN et al., 1988). GUARD (1999) beziffert für US-Verhältnisse einen erhöhten Kostenaufwand von 285 \$ für eine Kuh mit einer Nachgeburtsverhaltung.

Tiere mit *Ret. sec.* zeigen gegenüber nicht erkrankten ein erhöhtes Risiko, vorzeitig aus der Herde auszuscheiden. Dies hat erhebliche Kosten durch notwendige Remontierungen zur Folge. Als dominierender Grund für diese erhöhten Abgangsraten wurde v.a. mangelnde Fruchtbarkeit angegeben (ROMANIUK, 1985; JOOSTEN et al., 1988; HEINONEN & HEINONEN, 1989; VAN WERVEN, 1992).

### **3. Mechanismen der physiologischen Nachgeburtsablösung**

#### **3.1. Plazentale Reifung**

Der physiologische Abgang der Nachgeburt beim Rind in den ersten 12 Stunden *p.p.* erfordert die Trennung von Kotyledone und Karunkel innerhalb eines Plazentoms. Die Prämisse für den ungestörten Abgang ist die morphologische Reife der plazentaren Strukturen, die ab dem 240. Trächtigkeitstag einsetzt und bis zum Zeitpunkt des Partus andauert (SCHOON, 1989). Ein weiterer Faktor ist die mechanische Lockerung der fetomaternalen Verbindung durch ständige Druckschwankungen im Uterus infolge der Uteruskontraktionen während der Nachgeburtswehen innerhalb der ersten zwölf Stunden nach Austreibung des Kalbes (SCHULZ & MERKT, 1956; LAVEN & PETERS, 1996). Als Voraussetzung für die plazentale Reifung muss eine Reduktion der maternalen epithelialen Kryptenzellen durch Apoptose stattfinden (BOOS et al., 2003).

Umbauprozesse an den fetomaternalen Grenzflächen bewirken eine Abflachung des maternalen Kryptenepithels und eine numerische Reduktion der maternalen Epithelzellen (BJORKMAN, 1954; SCHULZ & MERKT, 1956; WILLMS, 1986). Die plazentale Ausreifung erleichtert durch Distanzverkürzung den fetomaternalen Blutaustausch und stellt damit einen Hauptmechanismus zur adäquaten Versorgung des wachsenden Fetus in den letzten Monaten der Trächtigkeit dar. In den letzten zwei Trächtigkeitsmonaten scheinen koagulierende und fibrinolytische Prozesse von Bedeutung für die beginnende Plazentaablösung beim Rind zu sein (SCHULZ & MERKT, 1956; GRUNERT, 1980; SHARPE et al., 1989). Es kommt in den Randbereichen der Karunkeln aufgrund physiologischer Fibrosierung bereits *ante partum (a.p.)* zur Lösung der fetalen Zotten aus den Krypten. In unreifen Plazentomen ist das Kryptenepithel größtenteils kubisch und nur in kleinen Bereichen abgeflacht (ZIEGLER, 1978; GRUNERT, 1980; WOICKE et al., 1986; SARGES et al., 1998). Zwischen dem 260. und dem 285. Trächtigkeitstag nimmt die fibrinolytische Aktivität im Karunkelstroma ab (SCHOON, 1989) und ist bei reifen Plazentomen nur noch geringgradig vorhanden (SCHOON et al., 1992). Nach Beobachtungen von SCHULZ und MERKT (1956) steigt während der Hochträchtigkeit im Chorionepithel der Gehalt an Diplokaryozyten. In der jüngeren Literatur wird jedoch von einer physiologischen Abnahme der Gesamtzahl der Trophoblast Giant Cells (TGC) im peripartalen Zeitraum berichtet (MARGOLIS, 1983; SCHOON, 1989; TOLHUYSEN, 1990). BOOS et al. (2003) vermuten, dass die Phagozytose der apoptotischen maternalen Kryptenepithelzellen dem Feten zur histiotrophen Ernährung dient. Sie beschreiben weiter, dass die bis zu 80% binukleären Trophoblastriesenzellen im Laufe der Trächtigkeit kontinuierlich vom Chorionepithel in das maternale Epithel wandern und dort mit den uterinen Epithelzellen verschmelzen, wodurch fetomaternale trinukleäre Hybridzellen entstehen. Die Verschmelzung wird auch eingeschränkte Trophoblastinvasion bezeichnet (PFARRER et al., 2003). Sie enthalten diverse Zellorganellen und Granula mit plazentärem Laktogen sowie trächtigkeitsspezifischen Glykoproteinen (PAG) (WOODING et al., 1996). Nachdem sie ihre Granula freigesetzt haben, werden sie allmählich vom Trophoblasten resorbiert (WOODING & WATHES, 1980; HOFFMAN & WOODING, 1993; KLISCH et al., 1999; SCHULER et al., 1999). Mit fortschreitender Trächtigkeit nimmt die Zahl der fetalen TGC deutlich ab (MARGOLIS, 1983; WILLMS, 1986; WOICKE et al.,



1986; WILLIAMS et al., 1987; SCHOON, 1989; TOLHUYSEN, 1990; GROSS et al., 1991). Diese Abnahme stellt die Reifungsvorgänge der Eihäute dar. Bei Nachgeburtsverhaltungen scheinen diese Mechanismen nicht vollständig abzulaufen. Genauso wenig findet der oben erwähnte Abfall der Anzahl der Trophoblastriesenzellen in vollem Ausmaß statt. Daraus wird gefolgert, dass die Plazentareifung nicht unmittelbar mit der Reifung des Fetus bzw. mit den Mechanismen, die den Partus einleiten, verbunden ist (WOICKE et al., 1986; SCHOON, 1989). Während der Geburt verlieren die TGC an Vitalität oder sterben ab, was den zeitnahen Abgang der *Secundinae* repräsentieren soll. Der Mechanismus, welcher für den Vitalitätsverlust bzw. das Absterben der TGC verantwortlich ist, wurde noch nicht aufgeklärt (GROSS, 1985; WILLIAMS et al., 1987; GROSS et al., 1991).

### 3.2. Mechanische Lockerung während der Geburt

Während des *Partus* kommt es durch die Wehen zu ständig wechselnden Druckverhältnissen in den Gefäßen der Plazentome mit abwechselnder Anämie und Hyperämie der Kapillaren. Damit verbunden ist eine Verkleinerung und Vergrößerung der Oberfläche der Kotyledonenzotten, die deren Lockerung in den Plazentomen bewirkt. In der Austreibungsphase werden infolge der Uteruskontraktionen die Plazentome gegen den Fetus gepresst, wobei es zu einer Abflachung und seitlichen Ausdehnung kommt (SCHULZ & MERKT, 1956; BOOS et al., 2003). Wichtig ist in diesem Zusammenhang die östrogenbedingte Erschlaffung des maternalen Bindegewebes (GRUNERT, 1983). Die Lösung der Kotyledonenzotten aus den Karunkelkrypten beginnt im Bereich der stärksten mechanischen Beanspruchung in der Umgebung des Karunkelstiels (SCHULZ & MERKT, 1956). Nach dem Austreiben der Frucht und dem Reißen der Nabelschnur wird der fetale Teil des Plazentakreislaufs unterbrochen. In den Kapillaren der Kotyledonen entsteht durch Ausblutung der *Placenta fetalis* eine Blutleere. Schrumpfungsvorgänge, Kollabieren der Choriongefäße und Ischämie der Zotten führen zu einer Verringerung der Zottenoberfläche und erleichtern somit die Ablösung und das Ausgleiten der Chorionzotten aus den Karunkelkrypten (GÖTZE, 1941; GLOOR, 1965; GRUNERT, 1985; LAVEN & PETERS, 1996).

Die Hyalinisierung der Karunkeln vollzieht sich nach dem Abgang der Eihäute. Innerhalb einer halben Stunde nach Ablösung der *Secundinae* sind die

Karunkelkrypten auf einen schmalen Spalt eingengt. Lokale Bindegewebszellen proliferieren und formieren sich zu phagozytierenden Makrophagen. Es erfolgt eine Abstoßung inklusive der eingelagerten Fetttropfchen in das Uteruslumen, wo sie neben Fruchtwasserresten und Erythrozyten einen Bestandteil der Lochien ausmachen. Nach acht bis neun Tagen *p.p.* beginnt nun auch der Abbau der Karunkelstiele. Die Karunkeln werden reepithelialisiert (SCHULZ & GRUNERT, 1959; GLOOR, 1965).

Die plazentären Blutgefäße hyalinisieren, während zeitgleich das subintimale und adventitielle Bindegewebe proliferiert. Demnach lässt sich eine Obliteration der Gefäßlumina erkennen (SCHULZ & GRUNERT, 1959). Der Prozess der Plazentaablösung findet vorwiegend zwischen den fetalen Villi und den maternalen Krypten statt. Oben erwähnte histologische Veränderungen der Oberflächenstrukturen werden vermutlich überwiegend durch Konzentrationsänderungen relevanter Hormone (z.B. Prostaglandine E und F, Östrogene), diverser Zytokine, wie das IL-8, und verschiedener Enzyme (wie z.B. die Kollagenasen aus der Familie der Proteasen) im letzten Gestationsstadium und während der Geburt reguliert (ARTHUR & BEE, 1996; SHELDON, 2004; PARKINSON, 2009).

### 3.3. Endokrinologische Abläufe im peripartalen Zeitraum

Die fetale Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse führt zu Beginn der Geburt zu einer Veränderung der Kortikosteroidverhältnisse. Die Produktion der Kortikosteroidhormone wird durch das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) veranlasst. CRH wird geburtsnah vom Hypothalamus des Fetus und vom Chorion synthetisiert. Es führt zu einer Ausschüttung von Adrenocorticotropin (ACTH) und somit zu einer vermehrten Bildung von Kortikosteroiden in der fetalen Nebennierenrinde (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004). Eine erhöhte Sekretion von PGE<sub>2</sub> und das fetale Kortisol induzieren in der Plazenta die Aktivierung der 17 $\alpha$ -Hydroxylase-C 17/20-Lyase, das aus einem Progesteron-metaboliten Östrogen synthetisiert und dessen Produktion und Konzentration ansteigen lässt (HARTMANN, 2011). Dadurch wird der Progesteronblock des Myometriums aufgehoben; das Myometrium wird sensibel für Oxytocin. Östrogen erhöht die intrauterine Prostaglandinproduktion und -freisetzung, insbesondere von PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2a</sub>. PGF<sub>2a</sub> stimuliert die Expression von Oxytocinrezeptoren im Myometrium (WHITTLE et al., 2000). Somit kann

vermehrt Oxytocin gebunden werden, wodurch auch indirekt die Kontraktilität des Myometriums gesteigert wird (TAVERNE & NOAKES, 2009). Gleichzeitig führt das freigesetzte PGF<sub>2α</sub> zu einer Auflösung des *Corpus luteums* (C.L.) und damit zur Einleitung der Geburt (LINDELL et al., 1977; KINDAHL et al., 2004). Die Bedeutung der Kortikosteroide liegt somit in der Induktion einer Vielzahl von Enzymen in der Späträchtigkeit, wodurch es zu der typischen antepartalen Dynamik der Steroidhormone kommt (KRAWCZYNSKI, 1999). Die Untersuchungen von GRUNERT et al. (1989b) zeigen, dass nicht nur die Höhe des antepartalen Gesamtöstrogenanstieges, sondern auch die Dauer dieses Anstieges für die Reifung und somit für die physiologische Ablösung der Nachgeburt eine große Rolle spielt. Als besonders wichtig für eine komplikationslose Nachgeburtsablösung beschreiben GRUNERT (1983), SCHOON (1989) sowie SCHULZ und MERCKT (1956) eine Ödematisierung und hyaline Verquellung sowie eine Auflockerung des Stromas, wobei die Gefäßdurchlässigkeit als Folge der hormonellen Umstellungen im geburtsnahen Zeitraum erhöht ist.

Bei Tieren mit physiologischem Abgang der *Secundinae* stieg die durchschnittliche Gesamtöstrogenkonzentration im Blut signifikant von Tag 6 bis Tag 1 *a.p.* (von  $1329,2 \pm 317,9$  auf  $3719,8 \pm 951,2$  pg/ml). Am Tag 1 *p.p.* wurde ein deutliches Sinken des Gesamtöstrogens beobachtet (von  $459,4$  auf  $344,2$  pg/ml). Tiere mit verzögertem oder nur teilweisem Abgang der Nachgeburt zeigten konstant eine niedrigere Gesamtöstrogenkonzentration von Tag 6 bis Tag 1 vor Geburt ( $595,4 \pm 174,8$  bis  $1884,3 \pm 565,1$  pg/ml). Die Werte von Kühen mit *Ret. sec.* waren signifikant niedriger als die Werte der Kühe mit verzögertem Abgang (Anstieg von Tag 6 bis Tag 1:  $329,3 \pm 115,3$  bis  $735,2 \pm 517,9$  pg/ml). Am Tag 1 nach Geburt unterschieden sich die Gesamtöstrogenwerte aller drei Gruppen nicht signifikant (GRUNERT et al., 1989b). Hauptverantwortlich für die Ödematisierung der Plazenta ist die Wirkung des Östrogenanstieges bei gleichzeitig sinkender Progesteronkonzentration innerhalb von 48-12 h *a.p.* (ZEROBIN, 1987; REXHA & GRUNERT, 1993). Die Ödematisierung und die Durchtränkung der Plazentome werden als typische Östrogenwirkungen interpretiert, was als Folge die Lockerung des plazentaren Gewebes, einschließlich der Fibroblastenproliferation und der Kontraktion kleiner Arterien bewirkt (GRUNERT et al., 1989a). Die Ödematisierung ist ein Kennzeichen der Reife der Plazenta (GRUNERT et al., 1989a; AURICH &

AURICH, 1994). Im bindegewebigen Teil der Plazentome wird die Kollagenstruktur umgebaut (SHARPE et al., 1990). Die abnehmende fibrinolytische Gewebeaktivität des Karunkelstromas wird von SCHOON et al. (1989) in Beziehung zum ansteigenden Serumöstrogenspiegel und zum Östrogenrezeptorstatus gesetzt. Aufgrund der nahezu gleichbleibenden hohen Anzahl an Progesteronrezeptoren im Myometrium beim Rind ist ein präpartaler Progesteronabfall absolute Grundvoraussetzung für das Eintreten der Geburt, da Progesteron die Uteruskontraktion in Form von Wehen und die Aktivität der Kollagenasen unterdrückt (KLAUKE & HOFFMANN, 1992). Somit ermöglicht der Abfall des Progesterons während der präpartalen Periode die enzymatische Aktivität, die für die Lösung der Plazenta notwendig ist (NAGASE & WOESSNER, 1999). Bei Kühen mit *Ret. sec.* wurden von AGTHE & KOLM (1975) einen Tag *a.p.* hohe Östrogenwerte beobachtet; diese waren aber gleichzeitig mit relativ hohen Progesteronwerten im Plasma verbunden. In der Studie von GRUNERT et al. (1989b) unterschieden sich die Progesteronwerte Tag 6 bis 1 *a.p.* signifikant von den Werten am Tag der Geburt. Am Tag der Kalbung war die mittlere Progesteronkonzentration für alle Tiere ohne *Ret. sec.* die niedrigste ( $0,75 \pm 0,20$  ng/ml). Bei den Kühen mit verzögertem oder unvollständigem Abgang der Nachgeburt waren die Werte diesbezüglich unverkennbar höher ( $1,3 \pm 0,28$  und  $1,9 \pm 1,3$  ng/ml). Am ersten Tag nach Geburt zeigte die mittlere Progesteronkonzentration keinen signifikanten Unterschied in allen drei Gruppen. Zusätzlich führen erhöhte Östrogenwerte zu einer Hochregulation von Oxytozinrezeptoren im Myometrium und zu einer PGF<sub>2α</sub>-Synthese (FUCHS et al., 1999). Neben der Luteolyse stimuliert PGF<sub>2α</sub> die glatte Muskulatur des Myometriums, was als eine der wichtigsten Voraussetzungen für die mechanische Einleitung der Geburt gilt (ARTHUR, 1979; SHEMESH et al., 1984; HOFFMANN, 1993; JANSZEN et al., 1993). Die geburtsnahe Luteolyse des *C.I.* führt zu einem weiteren Progesteronabfall (MUSAH et al., 1987).

#### **4. Ätiologie der Nachgeburtsverhaltung**

##### **4.1. Pathogenese der *Retentio secundinarum***

Die jahrzehntelange Forschung zur Ätiologie und Pathogenese der *Ret. sec.* offenbarte eine ganze Reihe von Kausalfaktoren, von denen viele untereinander in Zusammenhang stehen oder sich gegenseitig bedingen. Daraus kann man

schließen, dass es sich bei der Störung der Nachgeburtsablösung um ein polyfaktorielles Geschehen handelt.

Die Nachgeburt wird erst eine gewisse Zeit nach der Geburt des Kalbes, nach Definition in der Nachgeburtsphase der Geburt, ausgestoßen. Somit kann man allgemein behaupten, dass zunächst einmal jede Kuh *postpartal* eine Retention der Eihäute aufweist (VAN WERVEN, 1992; LAVEN & PETERS, 1996). Die Diagnose „Nachgeburtsverhaltung“ ist demnach eine Definitions- und dabei v.a. eine Zeitfrage. In der Regel wird daher ein Zurückbleiben der gesamten Nachgeburt oder von Teilen der *Secundinae* über mehr als 12 Stunden *p.p.* als pathologisch angesehen (GÖTZE, 1941; SCHULZ & MERKT, 1956; GRUNERT, 1983; KINSEL, 1996).

GÖTZE (1941) führt für die Pathogenese der *Ret. sec.* drei Möglichkeiten auf: Entweder eine mechanische Behinderung des Abganges der Eihäute wie z.B. Zervixenge, Zervixspangen, große Kotyledonen, Festhaken der Eihäute an Karunkeln und ähnliches oder Mängel an austreibenden Kräften (*Atonia uteri*) oder eine Störung des Lockerungsvorganges in den Plazentomen (infektiöse oder nichtinfektiöse Ursachen). Von der Häufigkeit des Vorkommens soll die letztgenannte Entstehungsweise mit einem Anteil von rund 98%, teilweise in Kombination mit einer *Atonia uteri*, überwiegen. Seit der Tilgung der Brucellose des Rindes ist diese Art der infektiösen Ursachen in Deutschland äußerst gering geworden. In Schweden galt schon in den 1990er Jahren dem weltweit verbreiteten Bovinen Virus Diarrhoe-Virus und der damit zusammenhängenden Infektion einschließlich der Folge einer *Ret. sec.* größere Bedeutung (NISKANEN et al., 1995). Zudem kommt es bereits *sub partu*, auch bei ungestörtem Geburtsverlauf, zu einer Besiedelung des Uterus mit Keimen aus der Umwelt des Muttertieres, forciert durch aufsteigende Kontaminationen entlang der heraushängenden Eihautteile (GÖTZE, 1941; BOSTEDT, 1979; SOBIRAJ & DRAEGER, 1988; GRUNERT, 1990; DE KRUIF, 1994; LEWIS, 1997). Metastatische Keimbesiedlungen der Plazenta sind ebenfalls nicht auszuschließen (GÖTZE, 1941; GRUNERT, 1983). Die resultierenden entzündlichen Reaktionen können zu einer mechanischen Behinderung des Nachgeburtsabganges sowie zu einer Uterusatonie führen (ARTHUR, 1979; GRUNERT & ZAREMBA, 1979).

Nach GRUNERT (1983), LAVEN und PETERS (1996) und PAISLEY et al. (1986) können folgende Faktoren eine Störung des Lösungsprozesses in den Plazentomen bewirken:

- Unreife Plazentome bei verkürzter Gestationsdauer (Abort, Frühgeburt, Geburtseinleitung, Zwillingsgeburt) mit unzureichender hormoneller und struktureller Vorbereitung
- Überreife Plazentome bei verlängerter Gestationsdauer mit proliferativen Veränderungen im Karunkelepithel, das durch Verdickung der Septen die Kotyledonenzotten fixiert
- Nichtentzündliches Ödem der Chorionzotten nach Trauma durch z.B. *Dystokie*, *Sectio caesarea*, *Fetotomie*, *Torsio uteri* oder Allergie mit mechanischer Behinderung der Lockerung
- Hyperämie der Plazentome, bedingt durch kurzfristige mechanische Abflussbehinderung oder vorzeitigen Verschluss der Nabelgefäße mit folgender Inkarzeration der Zotten in den Krypten
- Ernährungsbedingte Mängel, wie z.B. Vitamin E-, Selen- und Carotinoid-Mangel
- Immunsuppression

#### 4.1.1. Trächtigkeitsdauer

Eine zu kurze oder zu lange Trächtigkeitsdauer in Bezug auf den rasseabhängigen, errechneten Kalbetermin kann für das Entstehen einer *Ret. sec.* ausschlaggebend sein und wird vom Genotyp des Kalbes (KOLB, 1984), der Anzahl der Feten und dem Geburtsgewicht (HANSEN, 1976) mitbestimmt. GRUNERT (1983) erläutert, dass bei einer Trächtigkeitsdauer von weniger als 271 Tagen oder mehr als 291 Tagen (rassebedingt) ein deutlich höherer prozentualer Anteil an Nachgeburtsverhaltungen auftritt. Ein Abort vor dem 120. Trächtigkeitstag dagegen verläuft in der Regel ohne Störungen des Nachgeburtsabgangs.

#### 4.1.2. Fütterung

Es sind eine ganze Reihe von Fütterungsmängeln als potentielle Ursachen für die Entstehung der *Ret. sec.* identifiziert worden. Beispielsweise wurde gezeigt, dass ein erhöhter Rohproteingehalt durch stickstoffhaltige Düngung zu einer erhöhten Inzidenz von Nachgeburtsverhaltungen führen kann. GARIBAY VILA (1978) stellte fest, dass ein unausgeglichenes Eiweiß-Energieverhältnis eine Ursache für die Entstehung einer *Ret. sec.* sein kann. Ebenfalls ist Vitamin-A-Mangel prädisponierend (KOLB, 1984). Ein vermehrtes Auftreten von *Ret. sec.* ist im Rahmen von Fütterungsversuchen bei hochträchtigen Rindern mit Fütterungen ohne  $\beta$ -Carotin-Supplementierung festgestellt worden (MICHAL et al.,

1994). Die Autoren sehen in der erhöhten alimentären Bereitstellung von  $\beta$ -Carotin eine Stimulation der zellvermittelten Abwehr, welche die Häufigkeit von Erkrankungen des Reproduktionstrakts reduziert. LEBLANC et al. (2004) konnten durch parenterale Retinolapplikation ein verringertes Auftreten von Mastitiden, nicht aber von Nachgeburtsverhaltungen zeigen.

Vermehrtes Auftreten von *Ret. sec.* kommt in Selenmangelgebieten vor. Die Folge von Selenmangel ist eine verminderte Glutathionperoxidaseaktivität in den Erythrozyten. Glutathionperoxidase inaktiviert Peroxide, die im Zellstoffwechsel entstehen und zytotoxisch sind (BOSTEDT & SCHRAMEL, 1983). Allgemein stabilisieren Vitamin E und Selen Membranen und Phospholipide (KOLB, 1984). LEBLANC et al. (2002) belegten in zwei Studien einen durchaus positiven Einfluss einer erhöhten Tokopherolkonzentration im Blut auf die Inzidenz von Nachgeburtsverhaltungen, vor allem wenn die Tiere vor der Gabe einen marginalen Vitamin-E-Spiegel im Serum aufweisen. Im Zusammenhang mit *Ret. sec.* wurde auch von Stoffwechselstörungen wie Hypokalzämischer Gebärpause und Ketose berichtet (GRUNERT, 1983). Diese kommen vor allem als ätiologisch bedeutsame Faktoren in Betracht und sind Ausdruck *antepartaler* Mängel in der Kalzium- und Energieversorgung. Die Störungen treten häufig in engem zeitlichen Zusammenhang mit der Nachgeburtsverhaltung auf und ihr Verlauf kann durch die häufig mit der *Ret. sec.* einhergehende Depression der Futteraufnahme negativ beeinflusst werden.

#### 4.1.3. Hypokalzämie

Zum Zeitpunkt der Abkalbung oder in den ersten Tagen nach der Geburt kommt es bei Milchkühen häufig zum Abfall der Kalziumserumkonzentration. Dies ist im Rahmen des Laktationsbeginns durch den hohen Kalziumspiegel im Kolostrum und in der Milch bedingt. Zudem weisen ältere Kühe einen geringen Kalziumlevel im Serum auf. Hierfür wird die verringerte Absorption der Mineralien aufgrund abnehmender Rezeptordichte der 1,25-Dihydroxyvitamin-D-Rezeptoren im Intestinum verantwortlich gemacht (QUIROZ-ROCHA et al., 2009). Die Autoren definieren einen Kalzium-Normalwert von 2,10 bis 2,80 mmol/l Serum. ROSENBERGER (1990) erläutert, dass zum Zeitpunkt des Kalbens der Gehalt an Kalzium im Serum physiologischerweise bis auf 2 mmol/l abfällt, um sich innerhalb der ersten 2 bis 4 Wochen *p.p.* wieder zu normalisieren. Ein Absinken unter 2,0 mmol/l geht mit einer Lähmung der quergestreiften und glatten

Muskulatur einher, was zum Festliegen (Milchfieberhaltung mit autauskultatorischer Haltung des Kopfes) und zur komatösen Trübung des Bewusstseins führen kann. Es werden mehrere Zusammenhänge zwischen *Ret. sec.* und Hypokalzämie vermutet: So wiesen bei anionenreicher Fütterung die Kühe mit *Ret. sec.* signifikant niedrigere Kalziumplasmakonzentrationen auf als jene ohne Nachgeburtsverhaltung (CURTIS et al., 1983; MELENDEZ et al., 2004). Die Gesamtkonzentration des Kalziums ist durch andere Faktoren wie z.B. durch Hypalbuminämie beeinflussbar. Allerdings verminderten sich durch die orale Supplementation von Kalzium und Energie in keiner Weise peripartale Erkrankungen - inklusive *Ret. sec.* - trotz physiologischer ionisierter Kalziumwerte im Blut (MELENDEZ et al., 2003).

#### 4.1.4. Ketose

Die Ketose bezeichnet eine Stoffwechselstörung, die vermehrt bei Hochleistungskühen im Rahmen der negativen Energiebilanz (NEB) oder bei überkonditionierten Tieren auftritt. Die Stoffwechselerkrankung kann in eine alimentäre, primäre oder in eine sekundäre Ketose differenziert werden. Die primäre Ketose hat seinen Ursprung im peripartalen Energiedefizit. Die sekundäre Ketose ist die Folge anderer Erkrankungen, durch die bezüglich einer Inappetenz und unzureichender Versorgung von Nährstoffen eine krankmachende Energielücke hervorgerufen wird und aufrechterhalten bleibt (STÖBER, 2002). Die Ketose wird durch vermehrter Fettmobilisation und erhöhter Konzentrationen von freien Fettsäuren (FFS) im Blut verursacht. Die reduzierte Glukoneogenese im *peripartalen* Zeitraum beeinträchtigt den Kohlenhydratstoffwechsel immens (CADORNIGA-VALINO et al., 1997). Folglich kommt es zu *Oxalacetat*-Mangel, welches bei der  $\beta$ -Oxidation der FFS im Überschuss anfallende *Acetyl-CoA* nicht mehr in den Citratzyklus einbeziehen kann (RUKKWAMSUK et al., 1998). Die vermehrt gebildeten *Acetyl-CoA*-Moleküle werden in *Acetoacetat* umgewandelt, die Ausgangssubstanz der weiteren zwei Ketonkörper,  $\beta$ -Hydroxybutyrat ( $\beta$ -HBA) und *Aceton* (GOFF & HORST, 1997). Gebildet werden die Ketonkörper, die wasserlösliche, leicht transportierbare und oxidierbare Formen minderwertigere Energieträger darstellen, v.a. in der Leber (RUKKWAMSUK et al., 1998; SALLMANN & FUHRMANN, 2000). Es kommt zum signifikanten Anstieg von Ketonkörper im Blut (*Acetonämie*), die mit der Milch, dem Harn (*Acetonurie*), dem Schweiß und der Atemluft ausgeschieden werden. Die Anhäufung der



Ketonkörper führt zur Hypoglykämie, Hyperlipidämie und Blutzuckererhöhung (STÖBER, 2002). Die Ketose verursacht eine Anorexie mit Inappetenz, welche diese Stoffwechsellaage verschlimmern und einen Teufelskreis hervorrufen (GRUMMER, 1993). Die vermehrt anfallenden Ketonkörper schränken die Kontraktionsfähigkeit der Muskulatur ein, was wiederum Wehenschwächen im Nachgeburtsstadium und verzögerte Uterusinvolutionen bedingt (FÜRL, 2002b; 2003) und die Kuh für eine *Ret. sec.* prädisponieren können (DYK, 1995). Zudem führt eine ausgeprägte negative Energiebilanz zur Immunsuppression (GOFF und HORST, 1997) und ggf. zur Suppression der lokalen Abwehr des Uterus. Erhöhte Ketonkörperkonzentrationen verringern sowohl die Lymphozytenfunktion *in vitro* (TARGOWSKI & KLUCINSKI, 1983) als auch die Phagozytoseaktivität (KLUCINSKI et al., 1988). Die chemotaktischen Fähigkeiten neutrophiler Granulozyten werden beeinträchtigt, was eine verminderte bakterizide Wirkung und eine niedrigere Zytokinproduktion (Interferon, Interleukine, Tumornekrose-Faktor) nach sich zieht (EULER, 2009).

Der Referenzbereich von  $\beta$ -HBA im Serum erstreckt sich von 0,34 - 0,62 mmol/l (FÜRL, 2005). Eine Erhöhung ab 0,8 mmol/l *a. p.* und 1,18 mmol/l *i. p.* und *p. p.* von  $\beta$ -HBA weist deutlich auf einen längerfristigen Energiemangel hin und ist ein guter Indikator zur Feststellung einer vorliegenden Ketose (QUIROZ-ROCHA et al., 2009). Zudem konnte ein Zusammenhang zwischen *Ret. sec.* und Ketose sowie Labmagenverlagerung gezeigt werden (CURTIS et al., 1985).

#### 4.1.5. Immunsuppression

Eine Trächtigkeit an sich verlangt zumindest eine gewisse lokale Suppression des Immunsystems, um eine Immunantwort gegen die feto-maternale Verbindung zu unterdrücken. Diese Immuntoleranz ist essentiell um die Gravidität aufrecht erhalten zu können. Sie wird bei den meisten Spezies durch Expression diverser MHC-Klasse-I-Proteinen in den trophoblastischen Zellen gesichert (SHU et al., 2012). Im Gegensatz zu anderen Säugetieren exprimieren die reifen bovinen Trophoblastzellen nur während des letzten Trimesters der Gravidität in spezifischen Regionen der uterin-plazentaren Zwischenräume MHC-Klasse-I-Antigene. Diese Erkenntnis erscheint sehr bedeutend, da die MHC-Klasse-I-Kompatibilität zwischen Mutterkuh und Fetus mit zunehmender Inzidenz der *Ret. sec.* assoziiert wird (DAVIES et al., 2004). Die Arbeitsgruppe hat signifikante Unterschiede sowohl zwischen der Lymphozytenzahl und

Zytokinproduktion als auch in dem Apoptoseverhalten der Trophoblastzellen im Plazentomgewebe von *MHC*-kompatiblen und *MHC*-nichtkompatiblen Trächtigkeiten zum Zeitpunkt der Geburt gefunden. Sie folgern daraus, dass der Auslöser für plazentale Separation *i.p.* eine maternale immunologische Wiedererkennung nach vorausgegangener Immunreaktion von fetalen *MHC*-Klasse-I-Proteinen sein muss. Die klassische *MHC*-I-Expression ist polymorph und könnte die bovine postpartale plazentäre Ablösung effizient verbessern (SHU et al., 2012). Somit wird während der Trächtigkeit die Funktion von TH1 unterdrückt, sodass die Funktionen von TH2-Zellen dominieren (SAITO et al., 1999a; 1999b). Diese relative Immunsuppression wird peripartal aufgehoben. Das Immunsystem befindet sich während der Geburtsphase beim Rind wieder in einem aktiven Zustand (ISHIKAWA et al., 2004). Die erhöhte Leukozytenzahl im Blut, vor allem neutrophile Granulozyten, in Verbindung mit einem hohem Serum-Östrogenspiegel zum Zeitpunkt des Partus, lassen auf eine hormonelle Stimulation des Immunsystems beim Rind *sub partu* schließen, die bei der Manifestation einer Nachgeburtsverhaltung, repräsentiert durch die fehlende Infiltration neutrophiler Granulozyten, ausgeblieben ist (WESSENDORF et al., 1998). So liegt die Vermutung nahe, dass eine *Ret. sec.* entstehen kann, wenn im mütterlichen Organismus in oder kurz nach der Geburt dieses „Umschalten“ von „immunsupprimiert“ auf „immunaktiv“ nicht stattfindet. Mehrere Autoren nennen im Zusammenhang mit verminderter immunologischer Abwehrleistung und Nachgeburtsverhaltung vor allem eine anhaltend reduzierte chemotaktische Aktivität polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN) ab einer Woche vor bis zu einer Woche nach Geburt (GUNNINK, 1984b, 1984a; HEUWIESER et al., 1986; GILBERT et al., 1993; CAI et al., 1994; DOSOGNE et al., 1999). KIMURA et al. (2002) haben geringere IL-8-Konzentrationen, ein für PMN chemoattraktives Zytokin, in fetalem Plazentagewebe nachgewiesen und sehen damit eine mögliche Ursache für die verminderte Neutrophilie bei bestehender *Ret. sec.* Gleichmaßen wird der reduzierten Leukozytenchemotaxis und Phagozytoseaktivität von Makrophagen schon vor Geburt in Plazentomen von Kühen mit verzögertem Plazentaabgang im Sinne einer Abwehrschwäche eine Beteiligung an dieser Erkrankung zugesprochen (GUNNINK, 1984a; HEUWIESER et al., 1986; MIYOSHI et al., 2002).

#### 4.2. Die Extrazellulärmatrix (EZM)

Die EZM (Interzellulärsubstanz) stellt ein Netzwerk aus Makromolekülen dar, welches die Zellen umgibt. Durch Sekretion spezifischer Zellen wird die Ausrichtung des Netzwerkes bestimmt. Die EZM beeinflusst Überleben, Form, Entwicklung, Polarität und Verhalten der Zellen. Sie befindet sich in allen Gewebearten, wobei der größte Anteil im Bindegewebe vorherrscht. Die EZM ist an der Bildung von Knochen, Zähnen, Sehnen und Kornea beteiligt. Die Basallamina am Übergang zu Epithelien wird von der EZM organisiert. Es findet eine Einteilung der Makromoleküle in zwei Hauptklassen statt: Die Polysaccharide vom Glykosaminoglykan-Typ (GAGs) und die Faserproteine. Die Faserproteine lassen sich in die sogenannten Anheftungsproteine Fibronectin und Laminin und die funktionellen Strukturproteine Kollagen und Elastin klassifizieren. Kollagene, die 25% der Säugetierproteine ausmachen, sind die Hauptkomponente der EZM (HAUPT, 2007). Die EZM bildet ein agiles Gerüst, das sich konstant im Umbauprozess befindet und eine entscheidende Rolle in diversen physiologischen Abläufen wie z. B. der Migration, Proliferation, Differenzierung und dem Metabolismus der eingebetteten Zellen, einschließlich der Embryogenese, spielt. Sie steht ständig in Kontakt mit den intrazellulären Signalkaskaden und kann über Wachstumsfaktoren und anderen Hormonen in den Prozess der Degradation eingreifen.

Eine große Anzahl an Molekülen ist in proteolytischen Prozessen der EZM, wie z.B. Ab- und Umbau von neuen EZM-Proteinen, beteiligt. Diese können anhand ihrer ausgeprägten Strukturdomänen in verschiedene Proteinfamilien eingeteilt werden (BOSMAN & STAMENKOVIC, 2003). Die erste Gruppe besteht aus Serinproteasen wie z.B. Thrombin, Tissue Plasminogen Activator, Urokinase and Plasmin. Die zweite Gruppe stellen die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) dar, eine große Familie mit hoch konservierten zinkabhängigen Endopeptidasen. Diese beiden Gruppen agieren generell als ein breites Proteasenspektrum und sind hauptsächlich am Abbau der EZM beteiligt. Die dritte Gruppe, die bone morphogenetic protein 1/tolloid family of metalloproteinases wirken an der zellulären Differenzierung und Zusammensetzung mit und aktivieren dadurch die latenten Wachstumsfaktoren der TGF- $\beta$  Superfamilie.

#### 4.2.1. **Proteasen und deren Regulatoren**

Die MMPs sind zinkhaltige Endopeptidasen, die Schlüsselkomponenten in physiologischen Prozessen im Bindegewebe während der Embryonalentwicklung, Organmorphogenese, Angiogenese, Ovulation, Zervixdilatation, postpartalen Uterusinvolution, Wundheilung und Apoptose darstellen (NAGASE & WOESSNER, 1999; BREW et al., 2000; GOLDMAN & SHALEV, 2003). Sie können einerseits die Aminosäurekettensequenzen von Proteinen der EZM, wie z. B. Kollagen, Laminin, Elastin und/oder Fibronectin spalten. Andererseits besteht auch eine Beteiligung an pathologischen Prozessen wie Tumorwachstum, Metastasierung, Entzündungen oder auch Zahn- und Herzerkrankungen (SANG, 1998). Bisher wurden 66 MMPs nachgewiesen, von denen 25 MMPs in Vertebraten und 22 Homologe in Homo sapiens vorkommen, die in Tabelle 1 in ihren Gruppen aufgelistet sind (MASSOVA et al., 1998; GOLDMAN & SHALEV, 2003). Eine Form der Regulation der MMPs erfolgt über die Kontrolle der Transkription durch Hormone, Wachstumsfaktoren oder Zytokine. Der zweite Weg der Aktivierung erfolgt durch Ausschleusung des inaktiven Proenzym aus der Zelle durch substratspezifische Interaktionen des Prosegments (MATRISIAN, 1990). Nur die Membrane type-MMPs (MT-MMPs) erfahren auf diese Weise keine Stimulation. Eine stabile Funktion der MMPs ist nur mit ausreichend vorhandenem Kalzium gewährleistet.

Tabelle 1: **Einteilung der humanen Matrix Metalloproteinasen (MMPs)**

(MASSOVA et al., 1998; GOLDMAN &amp; SHALEV, 2003; RADICHEV et al., 2010)

Subfamilien	Vertreter
<b>1: Kollagenasen</b>	Interstitielle Kollagenase (MMP-1) Neutrophile Kollagenase (MMP-8) Kollagenase 3 (MMP-13)
<b>2: Gelatinasen</b>	Gelatinase A (MMP-2) Gelatinase B (MMP-9)
<b>3: Stromelysine</b>	Stromelysin-1 (MMP-3) Stromelysin-2 (MMP-10) Stromelysin-3 (MMP-11)
<b>4: Membrane type (MT)-MMPs</b>	MT1-MMP (MMP -14) MT2-MMP (MMP -15) MT3-MMP (MMP -16) MT4-MMP (MMP-17) MT5-MMP (MMP-24) MT6-MMP (MMP25, Leukolysin)
<b>5: Sonstige</b>	Matrilysin 1 (MMP-7) Matrilysin 2 (MMP-26) Metalloelastase (MMP-12) RASI-1 (MMP-19) Enamelysin (MMP-20) MMP-23 MMP-27 Epilysin (MMP-28)

Zur Familie der Gelatinasen gehören MMP-2 und MMP-9. Die Struktur des katalytischen Zentrums der Gelatinasen kann eine Bindung oder Spaltung von Gelatine (Hauptbestandteile Kollagene I und II) bewirken. Daneben ermöglichen sie einen Abbau der Hauptbestandteile der Basalmembran wie z.B. Kollagen Typ-IV, Laminin und Fibronektin (CURRY & OSTEEN, 2001).

Die Enzyme agieren vor allem auf der Zelloberfläche, aber auch im Extrazellular-Raum. Die Aktivitäten werden durch Kombinationen aus Zymogenaktivierung und -hemmung von endogenen Inhibitoren wie  $\alpha_2$ -Macroglobulin und die Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) kontrolliert (BREW et al., 2000). Alle TIMPs (1-4) besitzen das Vermögen, die proteolytische Wirkung der MMPs in unterschiedlicher Art und Weise zu beeinflussen und so die MMP-Aktivität durch Bindung in Form eines nichtkovalenten Komplexes zu regulieren. TIMP-1 und -2 sind wichtige regulatorische Proteasen des Umbaus der EZM und besitzen Wachstumsfaktor-Aktivitäten (SMITH et al., 1996). Sie hemmen die aktivierte Form der MMPs. TIMP-2 hemmt überwiegend pro-MMP-2. TIMP-1 und -3 sind überwiegend anti-angiogenetisch. Die Regulation der MMPs durch

ihre Gewebeinhibitoren, die TIMPs, ist von Bedeutung für den Stoffwechsel der EZM. Desweiteren beteiligen sie sich, ohne direkten Einfluss auf die MMPs, sowohl an Wachstums- und Resorptionsvorgängen als auch an Tumorentstehung und -suppression. Hemmenden Einfluss haben auch Serumproteine wie Thrombospondin-1 und -2 und  $\alpha_2$ -Makroglobulin, deren Wirkmechanismus einem anderen Prozess als dem der TIMPs unterliegt (BAKER et al., 2002). Im Gegensatz zur reversiblen Wirkung der TIMPs ist  $\alpha_2$ -Makroglobulin ein freies Plasmaprotein und stellt somit in flüssigen Geweben die vorwiegende Hemmung der MMPs sicher.  $\alpha_2$ -Makroglobulin übt eine irreversible Hemmung auf die MMPs aus (STERNLICHT & WERB, 2001).

Die MMPs, ihre Aktivatoren und ihre Inhibitoren üben einen unmittelbaren Einfluss auf die Plazentaentwicklung und -reifung aus. Auch während des Partus sind sie verantwortlich für den Umbau der EZM-Komponenten. MMP2 und -9 sind in der Lage, sowohl denaturierte, fibrilläre Kollagene als auch native Kollagene IV und V zu spalten (WALTER & BOOS, 2001). MMP2 hat zudem eine hohe Substratspezifität zu Gelatinase und vermag im Gegensatz zu MMP9 auch fibrilläres Kollagen, welches eine Triple Helix-Kollagenfaser ist, zu spalten (AIMES & QUIGLEY, 1995). Kühe mit *Ret. sec.* weisen einen Abfall der MMP9-Aktivität und einen MMP2-Mangel auf (NAGASE & WOESSNER, 1999). Diese Enzyme scheinen sehr wichtig für die Lösung der Kotyledonen-Karunkel-Verbindung und somit der Lösung der *Secundinae* zu sein. TGC, die bei Tieren mit *Ret. sec.* einen höheren Anteil in den Gewebeproben ausmachen, sollen für eine verstärkte Sekretion von TIMP-2, welches v.a. die proteolytische Aktivität von MMP-2 hemmt, verantwortlich sein. Somit erfolgt eine Unterdrückung des präpartalen extrazellulären Umbauprozess und der Reifung der Eihäute (WALTER & BOOS, 2001).

Störungen der regulären Hormonabläufe im peripartalen Uterus hemmen die Abgabe der Proteasen (WALTER & BOOS, 2001). MMP9 wird konstant ohne proinflammatorische Stimuli ausgeschüttet. Eine intensivere Produktion findet nach Stimulation durch z.B. IL-8 in den tertiären Granula der PMNs statt (CHAKRABARTI & PATEL, 2005). Es wird auch in die fetale Plazenta ausgeschüttet (OSMERS et al., 1995). Daher besteht ein Zusammenhang zwischen der peripartalen Plazentareifung sowie letztendlich der Ablösung und der Ausschüttung von MMPs (TSATAS et al., 1999). Kommt es zu einer

unvollständigen Ausreifung kann allein die verringerte Proteasenaktivität der Grund für eine Nachgeburtsverhaltung sein.

ADAMs (A Disintegrin and Metalloproteinase) werden auch Adamalysine bezeichnet. Sie stellen eine große Familie von transmembranen Glykoproteinen dar (SEALS & COURTNEIDGE, 2003). Die Strukturdomänen deuten an, dass die ADAMs an der Proteolyse, der Zell-Zell-Adhäsion und Fusion, an der intrazellulären Signalkaskade, der Trophoblastinvasion und dem EZM-Umbau während der Trächtigkeit beteiligt sind. ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs) sind Adamalysine mit Thrombospondin-Motiven und können wie die ADAMs die EZM binden. Beide Familien sind den MMPs funktionell sehr ähnlich. ADAM19 enthält eine MMP-Domäne mit einer typischen zinkbindenden Sequenz, welche eine wichtige Funktion im Abbau und Umbau der EZM hat (ZHAO et al., 2001). Die Aktivitäten der ADAMs können auch durch TIMPs gehemmt werden, welche ursprünglich als endogene Inhibitoren der MMPs geklont wurden. Aufgrund der hohen Verteilung von TIMPs im Gewebe können diese nur einen begrenzten hemmenden Effekt auf die ADAMs ausüben. Daher erscheint es plausibel, dass neben den TIMPs auch noch andere inhibitorische Moleküle für ADAMs existieren müssen (PORTER et al., 2005). Sie haben eine charakteristische ADAM-like Proteasen-Domäne, eine Disintegrin-like und eine cysteinreiche Domäne. Bis heute wurden 19 verschiedene Mitglieder der ADAMTS-Familie identifiziert, aber ihre Funktion und die Substrate der meisten Mitglieder sind noch nicht vollständig erforscht (JONSSON-RYLANDER et al., 2005). Einige Mitglieder der ADAMTS Familie sind an der Entstehung von vaskulären Läsionen beteiligt und können verschiedene Proteoglykane in den bestehenden Blutgefäßen umbauen (WAGSÄTER et al., 2008). Von den konventionellen ADAMs unterscheiden sie sich in einem bestimmten Merkmal, nämlich dem Thrombospondin type 1 (TSP-1) -repeat, zwischen der Disintegrin-like und der cysteinreichen Domäne. ADAMTS sind aktive sezernierende Metalloproteinasen, die an die EZM binden (TANG, 2001).

#### 4.2.2. Kollagen

SHARPE et al. (1990) haben festgestellt, dass Kühe mit *Ret. sec.* im Vergleich zu abgelösten Kotyledonen, einen erhöhten Anteil von Typ-III-Kollagenen in den zurückgehaltenen fetalen Kotyledonen aufweisen. Dieser erhöhte Anteil in den

bovinen nicht abgestoßenen Eihäuten fördert die Festigkeit der *Secundinae* und erschwert somit den Nachgeburtsabgang. Der erhöhte Proteingehalt weist auf eine geringe proteolytische Aktivität bei Kühen mit *Ret. sec.* hin. Der gesteigerte Typ-III-Kollagengehalt bei Nachgeburtsverhaltung entsteht möglicherweise durch eine veränderte Aktivität proteolytischer Enzyme (MMP-1 und 13), die Typ-III-Kollagen abbauen (YU et al., 2012). Bei der Ermittlung des Fibrinogengehaltes im peripheren Blut in den letzten 15 Tagen *a.p.* wurde dessen Anstieg beobachtet, wobei Kühe mit *Ret. sec.* signifikant höhere Fibrinogenspiegel aufwiesen als Kühe mit normalem Nachgeburtsabgang (PETAC, 1985). Die Autoren vermuten, dass die peripartale Fibrinogensynthese bei Kühen mit *Ret. sec.* im Vergleich zu Kühen mit physiologischem Nachgeburtsabgang erhöht ist und damit das Gleichgewicht von Fibrinogensynthese und -lyse bei Kühen mit Nachgeburtsverhaltung verschoben ist.

#### 4.3. Apoptose

Der Prozess des programmierten Zelltodes wird als Apoptose bezeichnet und ist ein kritischer Faktor für zahlreiche physiologische und pathologische Prozesse. Nach dem Absterben der einzelnen Zellen werden diese, ohne eine inflammatorische Reaktion hervorzurufen, phagozytiert. Der Vorgang ist relativ leicht anhand des Erscheinens von dichten „apoptotic bodies“ mit Licht- oder Elektronenmikroskopie im betroffenen Gewebe erkennbar (MCLAREN et al., 1999). Die Reduktion der maternalen epithelialen Zellen erfolgt überwiegend durch den Apoptoseprozess (BOOS et al., 2003). Während der ganzen Trächtigkeit konnte eine Degeneration von maternalen Kryptepithelzellen, und zu einem kleineren Anteil auch Trophoblast-Epithelzellen festgestellt werden, welche physiologische Gewebeumbauprozesse reflektieren. Man unterscheidet zwei Mechanismen der Apoptose-Induktion: den extrinsischen Weg über membranständige Signale und den intrinsischen Prozess in Mitochondrien. Beide Reaktionen sind durch schrittweise Aktivierung einer Reihe von Cysteinproteasen, den Caspasen, involviert (WANG et al., 2006). Der extrinsische Weg involviert die Aktivierung von Rezeptoren in der Plasmamembran durch Bindung von Liganden wie z.B. Fas/CD95, TNF $\alpha$ , und TRAIL. Intrazellulärer Stress, wie z.B. DNA-Schädigung aktiviert den intrinsischen Weg. Die Caspase-Kaskade wird durch erhöhte Permeabilität der Mitochondrienmembran und der Cytochrom c-Ausschüttung ausgelöst (DU et al., 2006). Es gibt einige Hinweise,



dass apoptotische Prozesse an der Reifung der fetalen Membranen mitwirken, damit diese reißen und sich speziell an der dem Chorion zugewandten Seite, lösen können (KEELAN et al., 2003). Das Signal zur Apoptose scheint entweder eine Reaktion auf den Abbau der EZM in den *Secundinae* zu sein oder stellt einen signifikanten und separaten Part einer Signalkaskade dar, um die fetalen Membranen letztendlich abreißen zu lassen (KEELAN et al., 2003). Beim Vergleich gesunder und an *Ret. sec.* erkrankter Kühe konnte bei den Tieren mit Nachgeburtsverhaltung in den Epithelzellen des fetalen Chorions eine höhere Anzahl von „apoptotic bodies“ gefunden werden. Gleichzeitig wurde eine Abnahme dieser apoptotischen Zellkompartimente im maternalen Kryptenepithel beobachtet. Diese Feststellung kann, zusammen mit der im gesamten Gewebe vorkommenden höheren Anzahl an Epithelzellen, als ein Hinweis herangezogen werden, dass der Prozess der Epithelzellreduktion nach dem Ausstoßen der Frucht bei Tieren mit *Ret. sec.* noch nicht abgeschlossen ist (BOOS et al., 2003). Weiterhin stellen die Autoren fest, dass Apoptoseprozesse essentiell für die Plazentareifung und den korrekten und vollständigen Abgang der fetalen Membranen sind. Daraus kann geschlossen werden, dass die plazentare Reifung eine Voraussetzung für eine vollständige und zeitgerechte Ablösung der Eihäute ist (BJÖRKMANN, 1954, 1969; KING et al., 1979, 1981; HOFFMANN & SCHULER, 2002).

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Geräte

Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Brutschrank ThermoScientific (37°C, 5% CO <sub>2</sub> )	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Dispenser	Eppendorf, Wessling
GeneChip™ Fluidics Station 450	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip™ Hybridization Oven 640	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip™ Scanner 3000 7G	Affymetrix, Santa Clara, USA
Handy-Step®	Brand, Wertheim
Homogenisator Silent Crusher M	Heidolph, Schwabach
Horizontale Gelelektrophorese-Apparatur	Werkstatt, Genzentrum der LMU München
Kryofix K	Gesellschaft für elektrophysikalischen Gerätebau Brandau / Odenwald
Kühlschrank	Liebherr, Biberach
Kühlzentrifuge Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Wessling
Laborfeinwaage, SCALTEC SBC 32	Scaltec Instruments GmbH, Göttingen
Magnetrührer Ikamag™ RTC	Ika Labortechnik, Staufen
Metri Check	Hauptner, Solingen
Mikrowelle 8521	Privileg, Stuttgart
Micro Centrifuge II (GMC-060)	Neolab, Heidelberg
Minishaker MS 1 / Minute (Vortexer)	Ika®, Staufen
Nanodrop Spectrophotometer ND-1000	Nanodrop Technologies, Wilmington, USA
Paraffinausgießstation EC 350	Microm, Walldorf
Pipette, elektronisch einstellbar (1-5 ml)	Brand, Wertheim
Pipette Proline, elektronisch einstellbar (50-1.200 µl)	Biohit, Rosbach
Pipette Proline, einstellbar (0,5-10 µl)	Biohit, Rosbach
Pipette Proline, einstellbar (10-100 µl)	Biohit, Rosbach
Pipette Proline, einstellbar (20-200 µl)	Biohit, Rosbach

Pipette Proline, einstellbar (100-1.000 µl)	Biohit, Rosbach
Pipette Proline, einstellbar, Transferpette®-8 (5-10 µl)	Biohit, Rosbach
Reinstwassersystem (GenPure)	TKA, Niederelbert
Reinstwassersystem (Millipore Super Q)	Millipore, Schwalbach
Roche/Hitachi Analysegerät 902	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Rotationsmikrotom HM 315	Thermo Fisher Scientific, MICROM International GmbH, Walldorf
Schüttler IKA VIBRAX VXR	IKA Labortechnik, Staufen
T3-Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermomixer 5437	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank (-30°C), Profiline 7080 299-00	Liebherr, Biberach
Tischzentrifuge Heraeus, Digifuge GL	Heraeus, Heppenheim
Vakuum-Gewebeinfiltrationsprozessor ASP300 S	Leica Microsystems, Nussloch
Vortex Genie 2 G 560E	Scientific Industries, INC, NY, USA
Wärmeschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Wasserbad Typ SP-EL	DAGLEF PLATZ Chemisch- Technische Spezialgeräte, Wankendorf

## 2. Materialien

### 2.1. Medikamente

Amoxicillin-Uterusstäbe (800 mg Amoxicillin)	WDT, Garbsen
Degrseptin®	Albrecht, Aulendorf
Depotocin®	Veyx, Schwarzenborn
Excenel® RTU (50 mg Ceftiofur/1ml)	Pfizer, Berlin
Gleitgel mit Schutzfilm, 1000 ml Flasche	Selectavet, Weyarn- Holzolling
Romefen®PR 10% (100 mg Ketoprofen/1ml)	Merial, Hallbergmoos
Vetisept® Lösung 10% <i>ad us. vet.</i>	Albrecht, Aulendorf

**2.2. Reagenzien**

AccuGene (RNase freies Wasser)	Cambrex Bioscience Rockland, Maine, USA
Agarose Ultra Pure 500 g	Invitrogen™, Karlsruhe
Ambion W expression Kit	Ambion, Austin, Texas, USA
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Riedel-de Hâen, Deisenhofen
3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)	Kem-En-Tec Diagnostics A/S, Kopenhagen, Dänemark
Ethanol (100%; 96%; 80%, 70%)	BfB (Bundesmonopolverwaltung für Branntwein) München
Ethanol (100%, vergällt)	BfB, Lutherstadt Wittenberg
Ethanol (Rotipuran > 99,8%)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Formalin, neutral gepuffert, 4%	SAV Liquid Productions, Flinsbach am Inn
GeneChip Hybridization Wash and Stain Kit PartNr. 900720	Affymetrix, Santa Clara, USA
Hämalaun	Roth, Karlsruhe
HS-Instrumentenbad SAFE SEPT	Henry Schein Inc., München
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kalium-Ethylendiamintetraacetat (EDTA) K <sub>2</sub> EDTA 0,6 M	Klinik für Wiederkäuer, Oberschleißheim, LMU München
Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin Clones AE1/AE3	Dako, Denmark A / S, Glostrup, Dänemark
Natriumacetat (NaAc)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)-Plätzchen	Merck, Darmstadt
Rabbit Serum (Normalserum)	MP Biomedicals, Eschwege
Paraformaldehyd, neutral gepuffert, 4%	SAV Liquid Productions, Flinsbach am Inn
Proteinase K, Ready-to-use	Dako, Denmark A / S, Glostrup, Dänemark
Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins / HRP	Dako, Denmark A / S, Glostrup, Dänemark

---

RNAlater®	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Tris-Hydrxylmethylaminomethan	NeoLab, Heidelberg
Trizol Reagent®	Invitrogen, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), 30%	NeoLab, Heidelberg
Xylol	SAV Liquid Productions, Flinsbach am Inn

### 2.3. Puffer und Lösungen

#### 2.3.1. Tris Buffer Saline (TBS)

0,5 mol/l Stock-Solution (für 1.000 ml Lösung)

60,5 g Tris-Hydroxymethylaminomethan in 700 ml *Aqua destillata* (*Aqua dest.*) lösen

Mit 25%iger HCl auf pH 7,6 einstellen

pH-Wert überprüfen

90 g NaCl darin lösen

auf 1.000 ml mit *Aqua dest.* auffüllen

pH-Wert prüfen und ggf. einstellen

Aus der 0,5 mol/l Stock-Solution (III2.2) erfolgte eine 1:10-Verdünnung mit *Aqua dest.* auf eine 0,05 mol/l TBS-Puffer-Gebrauchslösung. Der Puffer hatte einen von pH 7,6 und die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

#### 2.3.2. Wasserstoffperoxidlösung (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

30%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung                      6 ml

*Aqua dest.*                                      180 ml

#### 2.3.3. Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)

In 10 ml *Aqua dest.* erfolgte die Lösung einer 10mg DAB Tablette im Dunkeln mit anschließender Filtration. Für 1 ml DAB-Lösung musste direkt vor dem Auftragen auf die Schnitte 1 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welches als Substrat diente, versetzt werden.

**2.3.4. Harnstoff Saccharose EDTA-Puffer (HSE)**

Der 2,5-fach konzentrierte HSE-Puffer setzt sich aus den genannten Bestandteilen (III.2.2) in den folgenden Konzentrationen zusammen:

Harnstoff	1,2 g des 60,06 g/mol in 4 mol/l Endkonzentration
Saccharose	2,5 g als 50% Endkonzentration
0,5 mol/l EDTA	500 µl als 50 mmol/l als Endkonzentration
Ad 5 ml H <sub>2</sub> O	

**2.3.5. Tris Borsäure EDTA (TBE)**

Der 10-fach konzentrierte TBE-Puffer setzt sich aus folgenden Bestandteilen in den folgenden Konzentrationen zusammen:

Tris Base	108 g
Borsäure	55 g
EDTA, 0,5 mol/l, pH = 8	40 ml
Ultrafiltriertes Reinstwasser	ad 1000 ml

**2.3.6. Herstellung von Agarosegelen**

Für 50 ml Agarosegel werden

0,5 g Agarose verwendet und  
mit 45 ml ionenfreiem Millipore-Wasser angerührt.

Die Lösung wird unter gelegentlichem Schwenken in der Mikrowelle aufgekocht und anschließend wird nach Abkühlung auf ca. 50 °C wird 5 ml der 10 x TBE-Puffer-Lösung, die 25 ng Ethidiumbromid pro ml enthält, hinzugefügt.

**2.4. Verbrauchsmaterialien**

96 Well Nunc-Immuno Platten, transparent, Maxi Sorp	Nunc, Langenselbold
Abdecktuch, Buster OP-Cover 60 x 90 cm	Kruuse, Langeskov, Dänemark
Cap, Breakoff Capband	Micronic B. V., Lelystad, Niederlande
Deckgläschen	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Effeminator, verlängert nach Reisinger, modifiziert nach Richter	Hauptner, Solingen
Einmal-Spritzen (2 ml), steril	Becton Dickinson S. A., Fraga, Spanien

Einmal-Spritzen (5 ml), steril	Becton Dickinson S. A., Fraga, Spanien
Einmal-Spritzen (20 ml), steril	Becton Dickinson S. A., Fraga, Spanien
Einmal-Untersuchungs-Handschuhe, „Gentle Skin® sensitive“	Meditrade, Kiefersfelden
GeneChip® Bovine Gene 1.0 ST Array	Affymetrix, Santa Clara, USA
Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Deckel, 1,5 ml	Zefa Laborservice GmbH, Harthausen
Cryo-Tags®, Laser Cryo-Babies, 1,28 x 0,50", 1.700/pk	Diversified Biotech 1208 V. F. W. Boston, USA
Fleischermesser	Giesser Messer, Winnenden
Gewebe Einbettkassetten Microstar III, hellblau	Labor für Histologie und Zytologie, Cottbus
GeneChip Bovine Genome Array	Affymetrix, Santa Clara, USA
Histokitt	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim, Rhon
Kanülen, steril, 16 G	Becton Dickinson S. A., Fraga, Spanien
Kanülen, steril, 18 G	Becton Dickinson S. A., Fraga, Spanien
Kanülen, steril blau 23 G	Becton Dickinson S. A., Fraga, Spanien
KryoBoxen 81-W Raster & Deckel aus Karton	SLG®, Gauting
Kryoröhrchen 1,2 ml, graduiert mit Außengewinde mit Standring	Zefa Laborservice GmbH, Harthausen
Kryovails (RNase frei)	Brand, GMBH & CO KG, Wertheim
Nitrilhandschuhe	Kimberly-Clark, Roswell
Objektträger, „Star Frost®“, ready to use	Engelbrecht, München
Pasteurpipetten, 150 mm aus Glas	Roth, Karlsruhe
Pipettensauger	Roth, Karlsruhe
Pinzette, anatomisch	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Plastikgefäß mit Schraubverschluss, 35 ml	Labor für Histologie und Zytologie, Cottbus
Rasterfolien für systematic random sampling	Klinik für Wiederkäuer, Oberschleißheim, LMU München
KRUTEX Rektalhandschuhe (Soft Untersuchungshandschuhe, Extra-	Henry Schein Vet GmbH, Hamburg

Sensitive)

Skalpell BAYHA®	Bayha GmbH, Tuttlingen
Skalpellklingen, BAYHA®, Typ 21, steril	Bayha GmbH, Tuttlingen
Stanze, 0,75 x 0,5 cm inkl. Stempel Sonderanfertigung	Hauswerkstatt Oberschleißheim, LMU München
Sterile Einmalhandschuhe, sempermed® supreme	Semperit Technische Produkte GmbH, Wien
Vacutainer® Brand Luer Adapter	Becton Dickinson, Heidelberg
Vacutainer® Systems, Halter	Becton Dickinson, Heidelberg
Vacutainer®-Röhrchen (10 ml) mit Clot Activator Tube (CAT)	Becton Dickinson, Heidelberg
Vacutainer®-Röhrchen (10 ml), K <sub>2</sub> E 18,0 mg	Becton Dickinson, Heidelberg
Vacutainer® Precision Glide™ Multiple Sample Needle 20 G x 1,5	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellstoff 20 x 20 cm, hochgebleicht	Equimoll, Starnberg

### 3. Tiere

#### 3.1. Versuchsbetrieb

Die Probenentnahmen und Untersuchungen wurden Mitte August bis Ende Oktober 2009 und Anfang Februar bis Anfang Mai 2010 in einem Milchvieh-Betrieb in Brandenburg durchgeführt. Der Betrieb hat 1.099 Kühe und weitere Rinder als weibliche Nachzucht (insgesamt etwa 2.000 Tiere). Die durchschnittliche Jahresmilchleistung des Betriebes betrug im Jahr 2010 10.489 kg mit einem Fettgehalt von 4.08% und einem Eiweißgehalt von 3,37% (01.10.2009 bis 30.09.2010, Ergebnis des Jahresabschlusses der Milchleistungsprüfung, LKV Brandenburg, Waldsiedersdorf).

Die Tiere sind in Abhängigkeit von Reproduktionsstatus und Milchleistung in Gruppen aufgestellt. Alle Rinder, ab dem Färsenalter (ca. 14 Monate), sind in einer Laufstallhaltung mit Betonspaltenboden untergebracht. Die Liegeboxen werden täglich neu mit klein gehäckselt Stroh bedeckt.

Die Fütterung der Kühe findet einmal täglich zwischen 2:00 und 7:00 Uhr statt. Tagsüber sorgen die Melker dafür, dass das Futter bis zu siebenmal nachgeschoben wird. Das Futter stellt eine TMR aus Gras-, Mais-, Rübenschnittsilage und entweder Lieschkolben- oder Corn-Cob-Mix-Silage dar.



Des Weiteren erhalten die Tiere Soja- und Rapsextraktionsschrot sowie Mineralfutter und Biertreber. Im Winter werden zusätzlich Karotten- und Rote Beete-Trester zugefüttert.

Die Tiere werden dreimal am Tag – alle acht Stunden – gemolken. Von August 2009 bis Mai 2010 wurde mit 1.160 Kühen pro Melkzeit etwa 10.000 Liter ermolken, am Tag somit ca. 30.000 Liter. Die so gewonnene Milch wird zweimal täglich abgeholt.

Abkalbungen kommen das ganze Jahr ohne saisonale Häufung vor. Die weiblichen Kälber werden direkt nach der Geburt in Iglus gebracht und verbleiben darin bis zum Absetzen. Die Tränke der Kuhkälber erfolgt bis zum 5. Lebenstag mit Kolostrum, danach erhalten sie 7-8 Wochen Milchaustauscher, TMR der Hochleistungskühe sowie Kälberstarter. Die Bullenkälber werden entweder in Iglus oder in einzelnen Holzboxen aufgestellt und bis zum 3. Lebenstag mit Kolostrum und danach bis zum Verkauf nach 14 - 21 Lebenstagen mit Vollmilch getränkt.

### 3.2. Versuchstiere

Alle beprobten Tiere ( $n = 180$ ) waren Rinder der Rasse Deutsche Holstein-Friesian vom Typ Schwarzbunt und zwischen 2,13 und 10,3 Jahre alt (nach der Kalbung erste bis achte Laktation). Sie waren alle klinisch allgemeingesund. Bei Kühen, die kachektisch waren, über einen längeren Zeitraum eine Lahmheit aufwiesen, eine Mastitis oder Fieber vor der Kalbung entwickelten, wurde von einer Probenentnahme abgesehen.

### 3.3. Zusammenstellung der Tiere in Gruppen

Von den 180 beprobten Tieren wurden in dem vorliegenden Projekt 40 Kühe für die Transkriptomanalysen ausgewählt. Die Einteilung der Tiere in bestimmte Gruppen erfolgte anhand ausgewählter Blutparameter. Bei der Gestaltung der Gruppen wurden prädisponierende Faktoren, wie subklinische Hypokalzämie oder subklinische Ketose, als auch unphysiologische peripartale Sexualsteroidkonzentrationen (II3.1.4), die als Hinweis zur Entstehung einer *Ret. sec.* dienen, ausgewählt. Somit wurden antepartal (14 Tage bis 6 Stunden *a.p.*), intrapartal und postpartal bis Ende des Frühpuerperiums (ca. 10-14 Tage *p.p.*) die Blutparameter Kalzium,  $\beta$ -Hydroxybuttersäure ( $\beta$ -HBA) und Progesteron ermittelt und darauf basierend die Tiere den folgenden acht Gruppen ( $n = je\ 5$ ) zugeordnet:

Tabelle 2: **Versuchsgruppen (je n = 5)**

Gruppe 1a	Tiere mit physiologischen Parametern im Hinblick auf Kalzium-, $\beta$ -HBA <sup>1</sup> und P <sub>4</sub> <sup>2</sup> -Werten; ohne <i>Ret. sec.</i>
Gruppe 1b	Tiere mit physiologischen Parametern im Hinblick auf Kalzium-, $\beta$ -HBA <sup>1</sup> und P <sub>4</sub> <sup>2</sup> -Werten; mit <i>Ret. sec.</i>
Gruppe 2a	Tiere mit unphysiologischen P <sub>4</sub> <sup>2</sup> -Werten zur Geburt; ohne <i>Ret. sec.</i>
Gruppe 2b	Tiere mit unphysiologischen P <sub>4</sub> <sup>2</sup> -Werten zur Geburt; mit <i>Ret. sec.</i>
Gruppe 3a	Tiere mit subklinischer Hypokalzämie; ohne <i>Ret. sec.</i>
Gruppe 3b	Tiere mit subklinischer Hypokalzämie; mit <i>Ret. sec.</i>
Gruppe 4a	Tiere mit subklinischer Ketose; ohne <i>Ret. sec.</i>
Gruppe 4b	Tiere mit subklinischer Ketose; mit <i>Ret. sec.</i>

<sup>1</sup> $\beta$ -HBA:  $\beta$  – Hydroxybuttersäure,<sup>2</sup>P<sub>4</sub>: Progesteron

Tiere der Gruppe 1a und 1b sind Tiere mit und ohne *Ret. sec.*, die physiologische Werte der Blutparameter Kalzium,  $\beta$ -HBA und Progesteron aufweisen. Die Tiere der Gruppen 2a und 2b zeigen Störungen in der peripartalen Progesterondynamik. Als physiologischen Progesteronwert für Tiere in Geburt oder am ersten Tag *p.p.* geben sowohl HOFFMANN (1993) als auch VON ENGELHARDT & BREVES (2004) einen Abfall des während der Gravidität relativ konstant hohen Progesteronwertes auf ein Basalniveau von < 1 ng/ml Plasma an. Die Einteilung der Tiere in die Gruppen 2a oder 2b erfolgte anhand dieses Grenzwertes. Zudem wurden Tiere, die einen *postpartalen* Wiederanstieg von P<sub>4</sub> innerhalb von 12 Stunden *a.p.* aufzeigten oder 12 Stunden *p.p.* einen Wert von > 0,6 ng/ml P<sub>4</sub> aufwiesen, ebenso der letztgenannten Gruppen (2a und 2b) zugeordnet. Die genannten beiden Zustände sind nicht in der Literatur beschrieben und werden deshalb als nicht physiologisch eingestuft. Bei diesen Tieren der Gruppen 2a und 2b lagen keine Hinweise auf eine subklinische Ketose oder subklinische Hypokalzämie vor.

Tiere mit subklinischer Hypokalzämie wurden als Kühe definiert, die mindestens zu einem Probennahmezeitpunkt einen Kalzium-Wert von  $\leq 2$  mmol/l im Serum aufwiesen, hingegen keinerlei klinische Anzeichen einer Hypokalzämie aufwiesen. In Abhängigkeit von einer *Ret. sec.* wurden sie den Gruppen 3a und 3b zugeordnet (QUIROZ-ROCHA et al., 2009). Bei diesen Kühen konnten immer physiologische Blut- $\beta$ -HBA- und Progesteronwerte nachgewiesen werden.

Für die Einteilung von Tieren in die Kategorie subklinische Ketose (Gruppe 4a und 4b), wurden nach QUIROZ-ROCHA et al. (2009) zwei Grenzwerte für  $\beta$ -HBA herangezogen. Bis zur Geburt galt ein Wert von 0,8 mmol  $\beta$ -HBA/l Serum und ab dem Zeitpunkt der Geburt wurde der Grenzwert von 1,18 mmol HBA/l Serum für das Auftreten einer subklinischen Ketose geltend gemacht. Bei den Tieren waren keine Symptome einer klinischen Ketose erkennbar. Zudem wiesen sie physiologische Kalzium- und Progesteronwerte auf.

Das Probenmaterial aller 180 einbezogenen Tiere wird im Rahmen weiterer Teilprojekte verwendet.

#### 3.4. **Tierschutzantrag**

Das Projekt wurde in Form eines Tierschutzantrages bei der zuständigen Behörde, dem Landesamt für Verbraucherschutz, Landwirtschaft und Flurneuordnung, Frankfurt (Oder) unter dem Geschäftszeichen 23-2347-A-25-1-2009 angezeigt.

### 4. **Methoden**

#### 4.1. **Probengewinnung und Aufbereitung**

##### 4.1.1. **Gewinnung der Plazentomproben**

Unmittelbar nach der Entwicklung der Frucht wurden drei Plazentomproben transvaginal unter manueller Kontrolle gewonnen. Dazu wurde der Damm- und Schambereich der Tiere vor Probennahme gründlich mit Degraseptin (III2.1) und Wasser gewaschen. Im Anschluss wurden Vestibulum und Scham mit Zellstoff (III2.4), getränkt mit 70% Ethanol (III2.4), mehrmals gereinigt. Zur Probenentnahme wurden Rektalhandschuhe (III2.4) verwendet, die mit der Innenseite nach außen getragen wurden, um möglichst saubere Bedingungen zu schaffen. Die Probennahme erfolgte mittels verlängertem Effeminator, modifiziert nach Reisinger (III1). Der Effeminator wurde vor Verwendung in ein Bad mit Desinfektionsmittel für Endoskopiezubehör gelegt, kurz vor Anwendung mit 70%-igem Ethanol besprüht und zum Schutz während des Transportes in einen langen Plastikhandschuh verpackt. Der Effeminator wurde transzervikal bis in den Uterus eingeführt und so um einen Karunkelstiel gelegt, dass die quetschende Seite zur Uteruswand und die schneidende Seite zum Plazentom bzw. zum Uteruslumen zeigten. Nach Schließen des Effeminators wurde die Quetschung des Karunkelstiels für 2,5 min aufrechterhalten und der Effeminator erst dann gelöst.

So wurden die drei Plazentome entnommen und auf einem Tablett mit sterilem Abdecktuch, OP-Cover zwischengelagert. Innerhalb von 45 min nach der Entnahme wurden die Plazentome mittels Systematic Random Sampling bearbeitet und je eine Probe in RNAlater®, Formalin 4% und Paraformaldehyd 4% überführt. Pro Plazentom wurden drei Proben à 0,75 x 0,25 x 0,25 cm ausgestanzt und dabei nur Stellen mit fetomaternalen Kontaktstellen berücksichtigt. Die Einzelprobe wurde in etwa drei gleich große Teile, d.h. Stücke mit 0,25 cm<sup>3</sup> geteilt. Das mittlere Stück wurde in 1 ml RNAlater®, die beiden äußeren jeweils in 4%igem, neutral gepuffertem Formalin und Paraformaldehyd fixiert. Nun erfolgte die Aufbewahrung der Proben für 24 Stunden (h) bei 4°C im Kühlschrank. Im Anschluss wurden die in RNAlater®-asservierten Proben aus ihrem Medium herausgenommen und in Eppendorfgefäße überführt. Sie wurden bis zur Analyse bei -18°C gelagert. Die Formalin- und Paraformaldehydproben wurden nach mindestens 24 h und maximal 48 h zur weiteren Bearbeitung in 70%-igem Ethanol gelegt.

#### 4.1.2. Gewinnung der Blutproben

Die Blutentnahme *a.p.* erfolgte einmal pro Woche bei der sogenannten Trockensteherkontrolle. Bei dieser Kontrolle wurden bei allen trockenstehenden Tieren die Euter auf Verhärtungen oder sonstige Veränderungen untersucht. Anschließend wurden die Tiere, von denen Blutproben gewonnen werden sollten, durch ein automatisches Selektionstor sortiert und zur sicheren Blutentnahme in ein kleines Stallabteil geführt. Die Gewinnung des Blutes verlief unter antiseptischen Bedingungen mit Hilfe des Vacutainer®-Systems (III2.4) aus den *Venae (Vv).* und *Arteriae (Aa.) coccygeales*. Die erste Blutprobe wurde jeweils 17 bis 11 Tage, die zweite 10 bis 4 Tage, die dritte spätestens 3 Tage vor dem errechneten Kalbetermin gewonnen. Danach wurden alle 24 h bis zum Eintreten der Geburt Blutproben genommen. Bei klinischen Hinweisen auf eine früher anstehende Kalbung wurden die Entnahmen individuell für die jeweilige Kuh gestaltet und auch vorgezogen. Direkt nach Entwicklung der Frucht wurde eine weitere Blutprobe entnommen. Weitere postpartalen Blutentnahmen wurden 12, 24 und 48 h sowie am Tag 5, 10 bis 12 und Tag 19 bis 21 durchgeführt.

#### 4.1.3. Gewinnung von Serum

Zur Gewinnung des Serums wurden die Vacutainer®-Röhrchen mit CAT (III2.4) mit der Blutprobe bis zu 2 h bei Raumtemperatur (RT) stehend gelagert und

anschließend zentrifugiert (4.472 g, 5 min bei RT). Der Überstand wurde mittels Glaspipetten in 1,5 ml Eppendorfgefäße (III2.4) in zweifacher Ausführung aliquotiert und bei -18°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

#### 4.1.4. Gewinnung von Plasma

Zur Gewinnung des Plasmas wurden die Vacutainer®-Röhrchen mit K<sub>2</sub>EDTA (III2.4) sofort nach der Probenentnahme auf Eis gekühlt. Zur vollständigen Entfibrinisierung wurde jedem EDTA-Röhrchen zusätzlich 5 µl/ml 0,6 molares K<sub>2</sub>EDTA zugefügt. Die Blutproben wurden spätestens 30 min nach Entnahme zentrifugiert (4.472 g, 5 min, bei RT). Jeweils 1 ml des Überstandes wurde mittels Pipette in Micronic Röhrchen (III2.4) überführt und bei -18°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

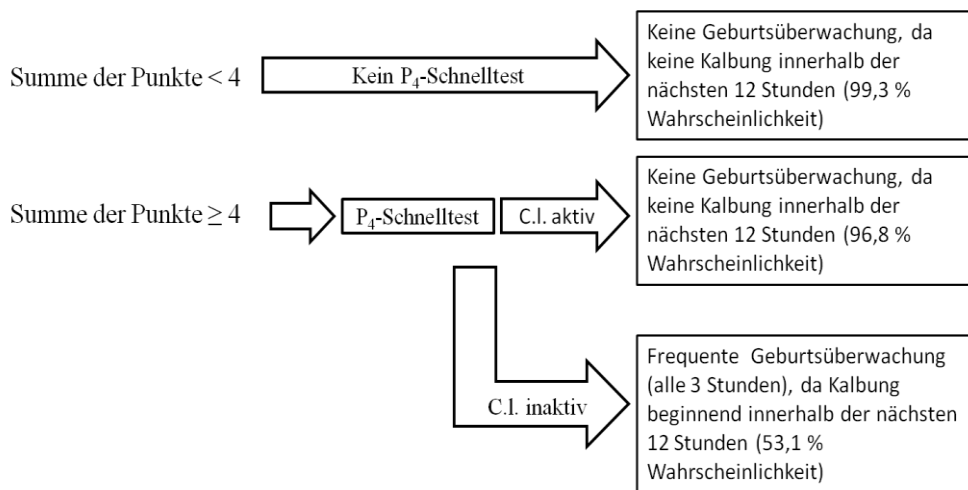
#### 4.2. Klinische Untersuchungen der Versuchstiere

##### 4.2.1. Geburtsüberwachungen

Aus der Gruppe der trockenstehenden Tiere wurden täglich Tiere, die sieben bis fünf Tage vor errechnetem Kalbedatum waren, in den Abkalbebereich geführt und dort auf Anzeichen einer bevorstehenden Geburt untersucht. Der Untersuchungsgang folgte dabei dem von Streyl et al. (2011) entwickelten Parturition Score (Abbildung 1). Besonderes Augenmerk galt der Beurteilung des Relaxationsgrades der breiten Beckenbänder und dem Füllungsstatus der Zitzen. Die beurteilten Parameter erhielten die entsprechenden Punkte. Ein Anstieg der Gesamtpunktzahl deutet auf eine bevorstehende Geburt hin. Ziel war eine Geburt frühzeitig zu erkennen und dadurch die antepartalen Blutproben in kurzen Intervallen zu gewinnen.

Klinische Anzeichen	Parturition Score-Punkte für jedes klinische Stadium			
<b>breite Beckenbänder</b>	fest, keine Relaxation <b>0</b>	geringgradig weicher <b>2</b>	komplett weich, aber palpierbar <b>4</b>	nicht palpierbar, komplett weich <b>6</b>
<b>Zitzenfüllung</b>	keine Füllung <b>0</b>	geringgradig gefüllt <b>1</b>	mittelgradig gefüllt <b>2</b>	vollständig gefüllt <b>3</b>

Summe der Punkte

Abbildung 1: **Parturition Score (STREYL et al., 2011)**

Abgewandelter Parturition Score nach STREYL et al. (2011), da P4-Schnelltest nur in Ausnahmefällen durchgeführt wurde; C.I. = *Corpus luteum*.

#### 4.2.2. Postpartale gynäkologische Untersuchungen

Alle Tiere wurden 12 h nach Abkalbung einer manuellen vaginalen und einer rektalen Untersuchung unterzogen. Die Scham und deren Umgebung wurden gereinigt und desinfiziert (III4.1.1). Es wurden der Öffnungsgrad des *Ostium uteri externum*, die Konsistenz, die Farbe und der Geruch des Lochialsekrets, die Schleimhautfarbe und eventuelle Verletzungen des weichen Geburtsweges beurteilt und dokumentiert.

Bei der rektalen Untersuchung wurden Größe, Kontraktilität und Fluktuation des Uterus sowie die Symmetrie der Uterushörner beurteilt. Bei Tieren mit *Ret. sec.* wurde ein Nachgeburtsabnahmeversuch vorgenommen. Zusätzlich wurden diese Tiere 48 und 96 h *p.p.* erneut gynäkologisch untersucht. Bei allen Tieren wurde bis einschließlich Tag 5 *p.p.* die Körpertemperatur gemessen. Eine Kontrolle der Milchleistung erfolgte in Absprache mit dem Melkpersonal. Bei Hinweisen auf einen Rückgang der Leistung oder auf Mastitis wurden nach klinischen

Untersuchungen entsprechende Maßnahmen ergriffen. Bei Tieren mit Nachgeburtsverhaltung wurden das Allgemeinbefinden, die Aktivität des Pansens inklusive Perkussions- und Schwingauskultation zur Erkennung einer Labmagenverlagerung untersucht (Tabelle 2).

Zwischen Tag 10 bis 12 sowie Tag 19 bis 21 *p.p.* erfolgten jeweils gynäkologische Untersuchungen (Puerperalkontrollen) mittels Metri-Checks® (III1). Es wurde die Beschaffenheit des Lochialsekrets in Hinsicht auf Farbe, Viskosität und Geruch beurteilt. Außerdem erfolgte eine manuelle rektale Untersuchung. Hier wurden Größe, Tonisierung, Fluktuation des Uterus und die Symmetrie der Uterushörner bestimmt.

**Tabelle 3: Übersicht über Zeitpunkte der Untersuchungen und Probenentnahmen**

Zeitpunkt	Blut	Plazentom- probe	Gynäkologische Untersuchungen	Temp- eratur	Pansen- aktivität	PA/SA
Partus	x	x		x		
12 Stunden <i>p.p.</i>	x		x	x		
1. Tag <i>p.p.</i>	x		x	x	x (Tiere mit <i>Ret. sec.</i> )	x (Tiere mit <i>Ret. sec.</i> )
2. Tag <i>p.p.</i>	x		x (Tiere mit <i>Ret. sec.</i> )	x	x (Tiere mit <i>Ret. sec.</i> )	x (Tiere mit <i>Ret. sec.</i> )
3. Tag <i>p.p.</i>				x	x (Tiere mit <i>Ret. sec.</i> )	x (Tiere mit <i>Ret. sec.</i> )
4. Tag <i>p.p.</i>			x (Tiere mit <i>Ret. sec.</i> )	x	x (Tiere mit <i>Ret. sec.</i> )	x (Tiere mit <i>Ret. sec.</i> )
5. Tag <i>p.p.</i>	x			x	x (Tiere mit <i>Ret. sec.</i> )	x (Tiere mit <i>Ret. sec.</i> )
10.-12. Tag <i>p.p.</i>	x		Metri Check®	x		
19.-21. Tag <i>p.p.</i>	x		Metri Check®	x		

Pansenaktivität: Auskultation und Beurteilung der Pansenmotorik,

PA/SA: Perkussions- und Schwingauskultation rechts und links an der Flanke des Tieres

#### 4.2.3. Therapiemaßnahmen

Alle Tiere wurden zum Zeitpunkt der Gewebeprobenentnahme mit 30 mg Ceftiofurhydrochlorid (Excenel RTU) subkutan (*s.c.*), 15 mg Ketoprofen (Romefen) *s.c.* und zwei Amoxicilin-Uterusstäben (1.600 mg Amoxicillin) intrauterin (*i.u.*) behandelt (III2.1). Bei der Untersuchung 12 Stunden *p.p.* erhielten alle Tiere zwei Amoxicilin-Uterusstäbe *i.u.* Zum Zeitpunkt der gynäkologischen Kontrolluntersuchungen 48 und 96 Stunden *p.p.* erfolgte, soweit möglich, eine weitere *i.u.* Einlage von zwei Amoxicillin-Uterusstäben. Die

parenterale, antimikrobielle Behandlung (15 ml Excenel RTU *s.c.*) wurde mindestens über 3 Tage durchgeführt. Bei Tieren, die Fieber aufwiesen (Körperinnentemperatur  $> 39,5^{\circ}\text{C}$ ), wurde die Applikation auf 5 Tage erweitert. Tiere, die eine verminderte Kontraktilität des Uterus zeigten, erhielten ab der ersten Puerperalkontrolle 12 Stunden *p.p.* 5 ml Depotocin (III2.1) intravenös (*i.v.*), wenn notwendig alle 12 Stunden bis Tag 2 *p.p.*

Tabelle 4: **Medikamentenanwendung**

Behandlungszeitpunkte	Amoxicillin <i>i.u.</i>	Ceftiofur-hydrochlorid <i>s.c.</i>	Ketoprofen <i>s.c.</i>
Partus	X	x	x
12 Stunden <i>p.p.</i>	x		
Tag 1 <i>p.p.</i>		x	
Tag 2 <i>p.p.</i>	x (Tiere mit <i>Ret. sec.</i> )	x	
Tag 3 <i>p.p.</i>			
Tag 4 <i>p.p.</i>	x (Tiere mit <i>Ret. sec.</i> )		
Tag 5 <i>p.p.</i>			
Tag 10-12 <i>p.p.</i>			
Tag 19-21 <i>p.p.</i>			

#### 4.3. Bestimmung klinisch-chemischer Parameter

Entsprechende Blutproben wurden im Labor der Klinik für Wiederkäuer der LMU München untersucht. Besondere Aufmerksamkeit erhielten die Bestimmungen und Auswertungen der Parameter  $\beta$ -HBA, Kalzium, Gesamt-Bilirubin, Aspartat-Aminotransferase (AST), Glutamatdehydrogenase (GLDH), Creatin-Kinase (CK), Phosphor, Magnesium, Natrium und Kalium. Die Bestimmung erfolgte photometrisch mit dem Analysegerät Hitachi 912 E Automatic Analyzer der Firma Boehringer Mannheim (III1) bei  $37^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.4. Bestimmung des Progesterongehaltes mittels eines Enzymimmunoassay (EIA)

Der Progesterongehalt im Plasma wurde mittels eines hauseigenen Enzym-Immuno-Assays (EIA) unter Verwendung der Doppelantikörpertechnik erfasst (MEYER, 1989). Der Nachweis wurde direkt aus dem Plasma (5  $\mu\text{l}$ ) mittels eines monoklonalen Antikörpers (Klon 2H4; Sigma P1922; Antigen Progesteron- $7\alpha$ -BSA; Marker: Progesteron-3-HRP) erbracht. Die Intra-Assay-Variation belief sich auf  $< 10\%$ . Die Nachweisgrenze (niedrigste ermittelbare Hormonkonzentration)



errechnet aus  $B0 - 3 SD$  ( $B0$ : Nullwert;  $SD$ : Standardabweichung der  $B0$  – Bestimmung) lag bei  $\leq 0,6$  pmol/ml (0,19 ng/ml).

#### 4.5. Stereologie

##### 4.5.1. Probenaufarbeitung

Die Aufarbeitung der Plazentomproben erfolgte im Labor für Histologie und Zytologie, Dr. med. E. Albert, Dr. med. habil. O. Kaufmann in Cottbus.

Die in neutral gepuffertem Formalin (4%; III2.2) bzw. in neutral gepuffertem Paraformaldehyd (4%; III2.2) fixierten und in den Einbettkassetten Microstar III (III2.4) aufbewahrten Gewebeproben unterliefen im Vakuum-Gewebeinfiltrationsprozessor ASP300 S (III1) dem folgenden Programmablauf (Tabelle 5): Zuerst erfolgte eine Nachfixierung in 4%-igem gepuffertem Formalin, dann die Entwässerung über die aufsteigende Alkoholreihe. Danach wurden die Proben in Xylol (Intermedium) verbracht und durchliefen anschließend einer Paraffininfiltration.

**Tabelle 5: Programmablauf der Paraffininfiltration mit dem Vakuum-Gewebeinfiltrationsprozessor ASP300**

<b>Programmablauf</b>	<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>
1. Formalin 4%-ig gepuffert	1 h	45°C
2. Ethanol 50%-ig gepuffert	30 min	45°C
3. Ethanol 70%-ig gepuffert	30 min	45°C
4. Ethanol 80%-ig gepuffert	1 h	45°C
5. Ethanol 96%-ig gepuffert	1 h	45°C
6. Ethanol 96%-ig gepuffert	1,5 h	45°C
7. Ethanol absolut	1 h	45°C
8. Ethanol absolut	1 h	45°C
9. Xylol	1 h	45°C
10. Xylol	2 h	45°C
11. Paraffin I	1 h	60°C
12. Paraffin II	1 h	60°C
13. Paraffin III	1 h	60°C

Nach Ablauf des Programms erfolgte die Entnahme der paraffindurchtränkten Gewebeproben. Mit Hilfe der Paraffinausgießstation EC 350 (III1) wurden sie abschließend in Paraffinblöcke gegossen.

#### 4.5.2. Immunhistochemische Färbungen

Zur Bestimmung des Volumenanteils des Epithelgewebes in den Gewebeproben der Plazentome wurde das Epithel durch den immunhistochemischen Nachweis von Zytokeratin, mittels indirekter Immunperoxidase-methode (BURNETT et al., 1997) an Paraffinschnitten dargestellt.

An einem Rotationsmikrotom wurden von jeder eingebetteten Gewebeprobe ca. 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden nach Streckung in einem 40°C warmen Wasserbad auf geschliffene Objektträger (III2.4) gezogen und danach für mindestens 24 h bei 37°C in einem Wärmeschrank getrocknet. Da 9 Gewebeproben pro Tier zur Verfügung standen und die Auswertung mit maximal 4 Objektträgern (III2.4) pro Tier am Stereologiesystem Visiopharm-Visiomorph V/S© (III1) durchgeführt werden sollte, wurden mehrere Schnitte auf einen Objektträger (III2.4) aufgezogen. Anschließend wurden die Schnitte in Xylol (Isomerengemisch) entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (III2.2). Die endogene Peroxidase wurde durch Behandlung der Schnitte für 15 min in 1%-iger Wasserstoffperoxidlösung (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (III2.2) blockiert. Danach wurden die Schnitte in TBS (pH 7,6, III2.3) für 10 min gespült. Die Demaskierung des Antigens erfolgte mit Proteinase K (III2.2), die maximal für 10 min auf den Schnitten verweilte. Anschließend wurden die Schnitte wiederum in TBS (pH 7,6, III2.3) für 10 min gespült.

Das Kaninchen-Normalserum (III2.2) für die Blockierung unspezifischer Bindungen wurde 1:10 in TBS (III2.3) verdünnt und in einer Feuchtkammer für 30 min auf den Schnitten belassen. Daraufhin wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper „monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin“ (III2.2) mit einer Verdünnung von 1:50 in TBS (III2.3) für 1 h bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach Spülen der Schnitte (dreimal 5 min) in TBS (pH 7,6; III2.3), wurden die Schnitte mit dem sekundären Antikörper „polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP“ (III2.2), in einer Verdünnung von 1:100 in TBS (III2.3) für 1 h in einer Feuchtkammer inkubiert. Es schlossen sich drei weitere Spülungen in TBS (pH 7,6, III2.3) für dreimal 5 min an. Anschließend folgte das Auftragen des Chromogens DAB (3,3-Diaminobenzidin-

tetrahydrochloriddihydrat; III2.2) mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (III2.2) als Substrat für 5 min auf die Objektträger (III2.4). Bei dieser Reaktion wird  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Substrat umgesetzt und dabei eine braune Färbung des Diaminobenzidin (DAB) erzeugt. Das Stoppen der Reaktion erfolgte durch 5minütiges Wässern unter fließendem Leitungswasser. Die Gegenfärbung zur besseren Sichtbarmachung der Kompartimente erfolgte für wenige Sekunden in Hämalun (III2.2). Darauf folgte das Bläuen in Leitungswasser über 5 min und die Entwässerung der Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (einmal 70%, zweimal 96%, zweimal 100% Ethanol; III2.2). Zum Abschluss wurden die Schnitte für ca. 1 min in Xylol (III2.2) belassen und anschließend mit Deckgläschen (III2.4) und Histokitt (III2.4) zur Konservierung eingedeckt.

#### 4.5.3. Quantitativ stereologische Untersuchungen

Die Bestimmung der Volumenanteile der Epithelzellen in den Plazentomproben ( $V_V(\text{Epithelzellen/Plazentom})$ ) erfolgte nach dem Prinzip von Delesse (ROYET, 1991), wobei die Punktedichte einer Struktur der Volumendichte der Struktur in der untersuchten Probe entspricht. Folglich kann  $V_V(\text{Epithelzellen/Plazentom})$  am Schnitt durch Ermittlung der Punktedichte der Epithelzellschnittprofile in der Plazentomprobe bestimmt werden (WEIBEL, 1979).

$$V_V(\text{Epithelzellen/Plazentom}) = \Sigma P(\text{Epithelzellen}) / \Sigma P(\text{Plazentomprobe})$$

$V_V(\text{Epithelzellen/Plazentom})$ : Volumendichte der Epithelzellen in der Plazentomprobe

$\Sigma P(\text{Epithelzellen})$ : Summe der auf Epithelzellen fallenden Trefferpunkte

$\Sigma P(\text{Plazentomprobe})$ : Summe der auf die Gewebeprobe fallenden Trefferpunkte

Die Bestimmung der Volumendichte der Epithelzellen in den Plazentomproben erfolgte durch Punktezählung an immunhistochemisch gefärbten Präparaten (III4.5.2) am Visiopharm-Visiomorph V/S© Stereologiesystem (III1). Hierzu wurden in 1,25-facher Vergrößerung komplette Übersichtsaufnahmen sämtlicher Schnitte ausgewertet. Die Auswahl systematisch zufälliger Testfelder innerhalb der auszuwertenden Gewebeanschnittprofile erfolgte automatisch durch Anwendung der Newcast®-Software des Stereologiesystems. Pro Tier wurden durchschnittlich  $130 \pm 10$  systematisch zufällige Testfelder ausgewertet.

Mikroskopische Aufnahmen der Testfelder der Gewebeproben auf den vier Objekträgern wurden in 20facher Vergrößerung auf einem Monitor abgebildet und mit einem 9-Punkteraster überlagert. Dabei wurden zwei Kompartimente betrachtet. Die Summe der Trefferpunkte, die auf Plazentomgewebe ( $\Sigma P_{(\text{Plazentomprobe})}$ ) bzw. die auf die Anschnittprofile der Epithelzellen ( $\Sigma P_{(\text{Epithelzellen})}$ ) fallen, wurde gezählt. Pro Tier wurden durchschnittlich  $850 \pm 50$  Trefferpunkte ausgewertet. Die Volumendichte von Epithelzellen in der Plazentomprobe ( $V_{V(\text{Epithelzelle/Plazentomprobe})}$ ) wurde nach der in Kapitel III4.5.3 beschriebenen Gleichung mit einem computergestützten Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel™) errechnet.

#### 4.6. Vergleichende Messung der mRNA-Expression mittels Microarrays

Die Aufarbeitung, d.h. RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und Microarray-Daten, der in *RNAlater*® (III2.2) zur Konservierung überführten Plazentomproben und die Durchführung der Transkriptomanalyse erfolgten - freundlicherweise, und mit besonderem Dank verbunden - vollständig nach den Affymetrix Protokollen im Laboratorium für Funktionale Genomanalyse (LAFUGA) des Genzentrums der LMU München, Großhadern unter der Leitung von Dr. rer. nat. Helmut Blum. Bei sämtlichen Arbeiten mit RNA muss unbedingt beachtet werden, dass unspezifischer Abbau durch Kontamination mit RNasen auftreten kann. Dies gilt es zu vermeiden. Aus diesem Grunde und zur eigenen Sicherheit wurden bei allen Arbeitsschritten Handschuhe (Nitrilhandschuhe; III2.4) getragen. Ebenso wurden für die Isolierung und Bearbeitung der RNA nur RNase-freie Plastikwaren verwendet. Die Arbeitsflächen mussten vor Beginn der Arbeiten mit 80%igem Ethanol gereinigt und alle Arbeitsgänge unter einem Abzug durchgeführt werden. Für die Analysen des Transkriptoms wurde die isolierte RNA benötigt. Alle Gewebeproben müssen unter identischen Bedingungen aufgearbeitet werden, um eine aussagekräftige Auswertung dieser Profile zu erhalten. Wie oben beschrieben (III.4.1.1), gab es pro Plazentom drei Gewebeproben, welche vor der RNA-Isolierung gepoolt wurden. Für die Microarray-Analysen wurden jeweils gleiche Mengen an RNA aus allen drei Plazentomen pro Tier zusammengeführt und aufbereitet.

Aus den Gewebeproben wurde mittels TRIzol™-Reagenz (III2.2) Gesamt-RNA entsprechend den Herstellervorgaben isoliert und gereinigt. Anschließend wurde die Qualität der RNA durch elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel mit

anschließender Anfärbung mit Ethidiumbromid und dem Bioanalyzer beurteilt. Der GeneChip® Bovine Gene 1.0 ST Array von Affymetrix (III.2.4) wurde für die Expressionsanalyse angewendet. Er enthält 190.851 *Probe sets*, die insgesamt 26.303 bovine Transkripte repräsentieren. Im Gegensatz zum bovinen Vorläuferchip, GeneChip® Bovine Genome Array, dessen *Probe sets* vor allem im 3'-Bereich der Transkripte liegen, sind die *Probe sets* beim neuen GeneChip® Bovine Gene 1.0 ST Array über das gesamte Transkript verteilt, d.h. es gibt je ein *Probe set* pro Exon. Dieses neuartige Design wurde von einem internationalen Konsortium hervorgebracht, welches für die ersten beiden Jahre exklusiven Vorrang für die Verwendung dieses GeneChips® hatte. Zum Nachweis der mRNAs bedarf es eines mehrstufigen Prozesses, wobei als erstes aus der Gesamt-RNA eine doppelsträngige copy-DNA (cDNA) synthetisiert werden muss. Dies erfolgt durch Einsatz von random-Primern, die eine T7-Promoter-Sequenz enthalten, wobei mehrere cDNA-Fragmente über eine mRNA verteilt produziert werden. Aus den Fragmenten der cDNA müssen zur ursprünglichen mRNA komplementäre RNA-Fragmente (cRNA), die unmarkiert sind, mittels einer T7-RNA-Polymerase hergestellt werden. Diese cRNA-Fragmente werden unter Verwendung von (anderen/neuen) Random-Primer mit Einbau von dUTP (Desoxyuridintriphosphat) an die Stelle von T in einzelsträngige cDNA revers transkribiert und der RNA-Strang wird abgebaut. Anschließend folgt eine Behandlung der cDNA-Moleküle mit einer Kombination aus Uracil-DNA-Glykosylase (UDG) und Apurinic/Apyrimidinic Endonuklease 1 (APE 1), um eine spezifische Erkennung der Uracil-Reste hervorzurufen und damit eine Spaltung der cDNA an den Stellen mit U zu erreichen. Im nächsten Schritt werden die 3'-Enden der cDNA-Fragmente mittels Terminaler-Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) und einem proprietären DNA-Labeling-Reagenz, welches Biotin enthält, markiert. Die auf diese Weise entstandenen, mit Biotin markierten cDNA-Moleküle werden mit dem bovinen ST Array hybridisiert (Abbildung 2). Für die Bindung der cDNA an die Oligonukleotide werden die intermolekularen Wechselwirkungen in Form von Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den Nukleinsäuresträngen ausgenutzt. Diese Kräfte stellen Bindungen elektrostatischer Natur dar und sind für die Bildung der physiologischen Tertiärstruktur der DNA, Doppelhelix-DNA verantwortlich. Wasserstoffbrücken-Bindungen entstehen im Falle der zwei Nukleinsäurestränge durch die komplementäre Anordnung der heterozyklischen Purin- und Pyrimidinbasen. Nur

diese beiden Basen bilden jeweils ein Basenpaar deren Verbindung durch oben genannte Wasserstoffbrücken-Bindungen zu der doppelsträngigen DNA führt. Entsprechend dem Watson-Crick-Modell kommt es nur bei einer antiparallelen Anordnung der Nukleinsäure-Einzelstränge zu einer stabilen Bindung. Das bedeutet, dass die Primärsequenz des einen Stranges die Basensequenz des anderen Stranges der Doppelhelix festlegt. Adenin kann entweder mit Thymin oder Uracil zwei Wasserstoffbrücken-Bindungen bilden, ebenso kann Guanin nur mit Cytosin drei Wasserstoffbrücken-Bindungen aufbauen. Überschüssige, nicht gebundene cDNA-Moleküle müssen durch Spülen entfernt werden und die hybridisierten biotinmarkierten cDNA-Fragmente können mit Hilfe eines Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugates detektiert werden. Streptavidin bindet an die biotinmarkierten cDNA-Moleküle und Phycoerythrin, ein Fluoreszenzfarbstoff macht die Bindung identifizierbar. Das Verhältnis der Intensität des gemessenen Fluoreszenzsignals der nun komplementär gebundenen cDNA zwischen den einzelnen Proben wird zur vergleichenden Genexpressionsanalyse verwendet.

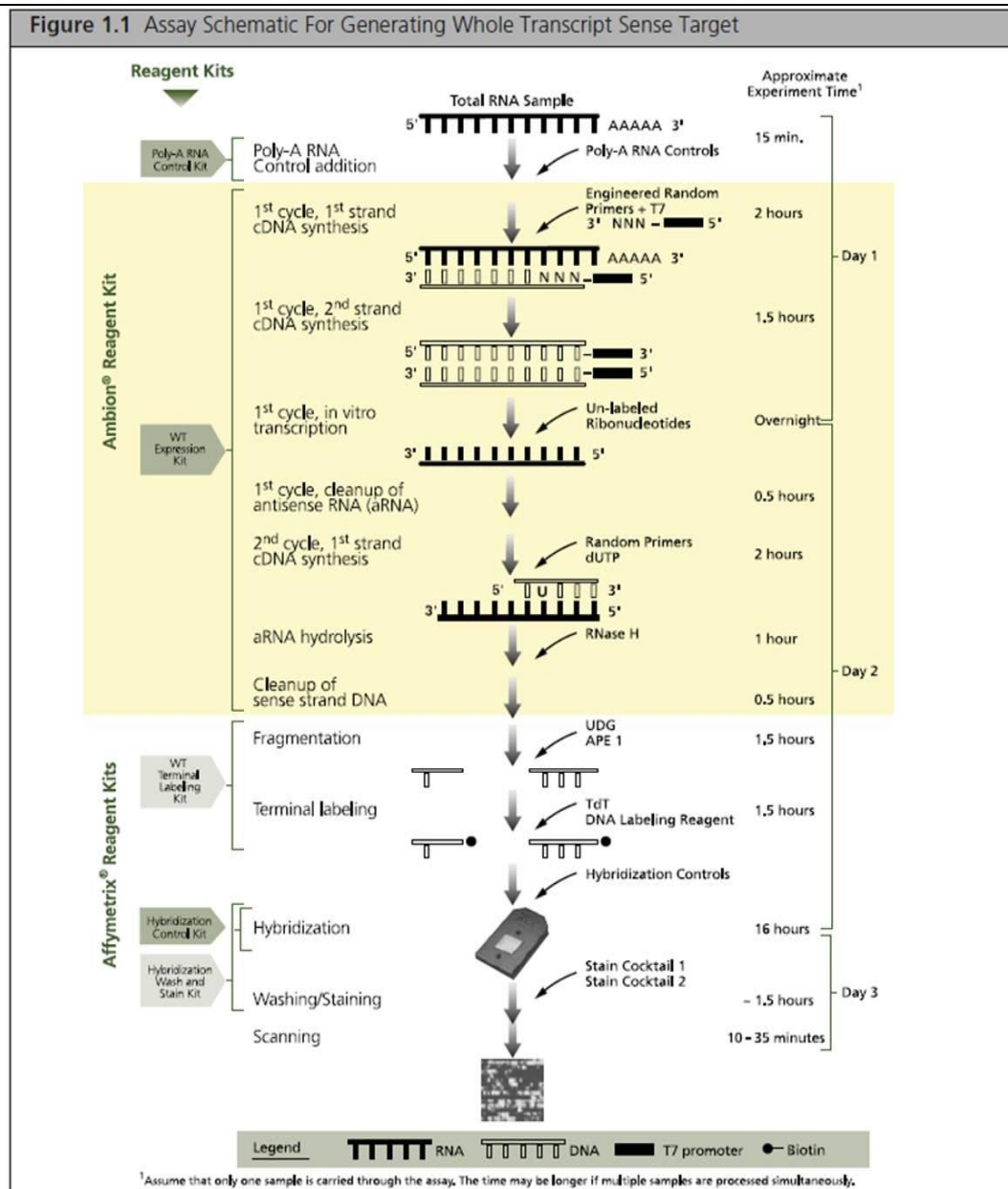


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte für die Aufbereitung der mRNA zur Analyse mit einem GeneChip® Microarray von Affymetrix (aus dem GeneChip® WT Terminal Labeling and Hybridization User Manual). Links werden die Kits, die für die jeweiligen Arbeitsschritte notwendig sind aufgeführt und rechts kann man den zeitlichen Ablauf erkennen. Die vollständige RNA-Probe wird mit einem Poly-A RNA Control-Kit versehen. Als nächstes erfolgt die cDNA-Synthese, die Herbeiführung der einzelsträngigen cDNA, nachdem cRNA-Fragmente hergestellt wurden. Nach Abbau des RNA-Stranges werden die cDNA-Fragmente an den U-Stellen gespalten und an den 3'-Enden erfolgt das Labeling mit Biotin. Die letzten Schritte beinhalten die Hybridisierung, das Waschen, Färben und Scannen, um im Endergebnis ein Fluoreszenzsignal zu erhalten, dessen Intensität mess- und auswertbar ist.

## 5. Statistische Auswertung

### 5.1. Affymetrix Power Tools

(<http://www.affymetrix.com>; Partners & Programs; Developers' Network; Affymetrix Power Tools)

Die Affymetrix Power Tools stellen eine Reihe von Programmen aus cross-plattform-Kommandozeilen dar. Sie erstellen Algorithmen, welche für die Analyse der Affymetrix GeneChip® Arrays notwendig sind. In der vorliegenden Arbeit wurde vor allem der Algorithmus RMA zur Prozessierung und Normalisierung der CEL-Files der einzelnen Microarrays herangezogen. Die CEL-Files stellen Signalintensitäten der einzelnen *Probe sets* dar. Sowohl normalisierte Expressionswerte, als auch Angaben zur Detektierbarkeit der *Probe sets* wurden erhalten und *Probe sets*, die nicht in einer bestimmten Anzahl der Proben detektierbar waren, gefiltert. Auf diese Weise wird das „Hintergrund-Rauschen“ im Datensatz reduziert und das Auffinden differentiell exprimierter *Probe sets* erleichtert.

### 5.2. R Statistikumgebung und BioConductor

(<http://cran.r-project.org>, [www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org))

Bei der Auswertung der Affymetrix-Experimente wurden unter anderem frei verfügbare Tools für die Statistik-Softwareumgebung R verwendet. R stellt eine Software-Umgebung für statistische Berechnungen und Visualisierungen dar. Für Microarray-Analysen gibt es bei BioConductor (LEE et al., 2004) eine Ressource für verschiedenste R-Pakete, die über zeilenweise Befehlseingaben im R-Terminalfenster gesteuert werden. In der vorliegenden Arbeit lag die Aufmerksamkeit auf die Ermittlung differentiell exprimierter Gene, wofür das „limma“-Paket in R angewendet wurde. Weiterhin wurden mit Hilfe von R paarweise Korrelations-Matrices und -Heatmaps erstellt, wofür das Programmpaket *geneplotter* verwendet wurde.

### 5.3. Ermittlung differentiell exprimierter Gene (DEGs)

Zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene, wurde das BioConductor-Paket „limma“ (Linear Models for MicroArray data von Grogan Smyth (2004; SMYTH et al., 2005)) angewendet. Diese Art von Analyse besteht aus einer Implementierung des Empirischen Bayes-Ansatzes, welches auch als modifizierter t-Test definiert werden kann. So können die Informationen von



mehreren Probe sets eines Experimentes aufgegriffen werden, um ihre Varianz zu ermitteln. In der Auswertung dieses Projekts wurde eine statistische Signifikanzgrenze bei einer False Discovery Rate (FDR) von 5% (auf multiples Testen korrigierte p-Werte  $<0,05$ ) festgelegt sowie ein Schwellenwert für den Expressionsunterschied (Fold Change) von 1,5. Die FDR ist eine Art von Korrektur auf multiple Tests, die speziell für Microarray-Daten entwickelt wurde. Wie bei konventionellen Verfahren (z. B. Benjamini-Hochberg) werden die p-Werte korrigiert, d.h. sind in der Regel höher – also „schlechter“ – als nominelle p-Werte. Der Grad der Korrektur richtet sich nach der Anzahl an Genen, die sich gleich verhalten, also einen Expressionsunterschied aufweisen.

#### 5.4. **DAVID Functional Annotation Clustering**

(<http://david.abcc.ncifcrf.gov>)

DAVID bedeutet Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery. Es stellt ein Webtool zur bioinformatischen Auswertung von Genexpressionsdaten dar und wird für die funktionelle Interpretation langer Genlisten insbesondere aus Transkriptom-Studien eingesetzt. Die Software-Funktion DAVID Functional Annotation Clustering ordnet die eingegebenen Gene zuerst funktionellen Kategorien, Keywords, Pathways u.a. aus verschiedenen Datenbanken, wie z. B. Gene Ontology oder KEGG Pathways zu und prüft dann, ob eine Kategorie überrepräsentiert ist, d.h. signifikant mehr Gene für eine funktionelle Kategorie erhalten wurden als man rein zufällig erwarten würde. Zur Zusammenfassung redundanter Kategorien werden anschließend sog. Annotationscluster gebildet, d.h. funktionelle Kategorien mit einer bestimmten Überlappung der jeweils zugeordneten Gene. Aus den p-Werten der funktionellen Kategorien eines Annotationsclusters wird ein Score (negativer dekadischer Logarithmus des geometrischen Mittels der p-Werte der einzelnen Kategorien eines Annotationsclusters) berechnet, wobei ein Score von 1,3 etwa einem p-Wert von 0,05 entspricht.

#### 5.5. **MultiExperiment Viewer (MeV)**

(<http://www.tm4.org/mev>)

Das Software-Programm MeV berechnet, untersucht und veranschaulicht die in großem Umfang anfallenden Daten aus Genexpressionsstudien, wie beispielsweise Microarray-Experimenten und ermöglicht u.a. unterschiedliche Cluster-Analysen in variierenden Visualisierungen, Klassifikationen und statistische

Analysen. Dadurch können Zusammenhänge der Expressionsdaten multipler Experimente charakterisiert werden. Für die Durchführung wurden die Expressionswerte transformiert, indem Mittelwert-zentrierte Werte berechnet wurden. Das bedeutet, dass sich die Expressionswerte der einzelnen Proben auf den Mittelwert aller Proben beziehen. Da die Expressionswerte log2-transformierte Werte darstellen, wurde bei jeder Probe die Differenz aus dem Wert jener Probe und dem Mittelwert aller Proben gebildet. Somit entstehen Werte, die unter oder über dem Wert 0 liegen. Positive Werte werden in der Clusteranalyse rot und negative Werte blau dargestellt. Diese Art der Visualisierung der Expressionswerte macht komplexe Ergebnisse von Microarray-Analysen leichter interpretierbar.

#### 5.6. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

(<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>)

Die GSEA verwendet eine Statistik im Stil von Kolmogorov Smirnov und macht zeitgleich auch grafisch erkennbar, ob zuvor definierte Gengruppen (Gensets) eine Überlappung mit dem untersuchten Datensatz aufweisen. Es werden alle exprimierten Gene eines Datensatzes anhand ihrer differentiellen Expression in einer Rangliste angeordnet, d.h. die am stärksten hochregulierten Gene an einem Ende, die am stärksten herunterregulierten Gene am anderen Ende und nicht differentiell exprimierte Gene im mittleren Bereich der Rangliste. Zudem wird ein Enrichment Score berechnet, der den Grad der Anreicherung eines Gensets in Form einer Kurve zu einem Ende der Rangliste hin grafisch darstellt. GSEA stellt eine Datenbank mit sog. Gensets (z.B. Gengruppen, die in verschiedensten Studien als differentiell exprimiert gefunden wurden oder Gene aus definierten funktionellen Gruppen) für einen Vergleich mit dem zu analysierenden Datensatz zur Verfügung (Quelle: <http://www.broadinstitute.org>, (SUBRAMANIAN et al., 2005)). Es können aber auch eigene vorhandene Gensets verwendet werden.

#### 5.7. CoPub

(<http://service.ncbi.nlm.nih.gov/copub/portal/>)

CoPub ist ein Text-Mining-Tool, welches biologische Begriffe und deren Vorkommen zusammen mit Genen in Abstracts einer biomedizinischen Meta-Datenbank (PubMed) sucht und aufführt. Dieses Webtool kann eingesetzt werden, um die Bedeutung und ein besseres Verständnis von Genlisten aus einer Microarray-Analyse zu erhalten. Hier gibt es die Möglichkeit, bestimmte funktionelle

Begriffe (biological keywords) für biologische Prozesse, molekulare Funktionen und zelluläre Komponenten aus der Gene Ontology Datenbank und Begriffe aus der allgemeinen Pathologie, Leberpathologie, von Erkrankungen, Zelllinien- und Gewebetypen, Drogen- und Stoffwechselwegen zu vereinen und zu verknüpfen. Es werden in den PubMed-Abstracts folglich Co-Zitierungen der Gensymbole mit den entsprechenden funktionellen Begriffen erfasst und in Form statistisch überrepräsentierter funktioneller Begriffe zitiert und hervorgehoben.

#### 5.8. **Datenanalyse der quantitativ stereologischen Untersuchungen**

Die Daten der quantitativ stereologischen Untersuchungen wurden mittels Microsoft Excel™ (Microsoft Inc., USA) und SPSS™ für Windows (Version 18.0, IBM Statistics, USA) durchgeführt.

Die Berechnungen der Mittelwerte, Standardabweichungen, Mediane und Quartile, die Erstellungen von Grafiken sowie die Volumendichte erfolgten in Microsoft Excel. Die Daten wurden visuell mittels Box- und Whisker-Plots und PP-Plots auf Normalverteilung untersucht. Bei nicht-normalverteilten Daten wurden nicht-parametrische Auswertungsverfahren angewandt. Gruppenvergleiche wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (BORTZ, 2005). p-Werte < 0,05 wurden als signifikant angesehen.

---

## IV. ERGEBNISSE

### 1. Auswahl der Tiere für Prädispositionsgruppen

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels der Transkriptomanalyse Untersuchungen zur Pathogenese der Nachgeburtsverhaltung (*Ret. sec.*) beim Rind durchgeführt. Anhand der in der Literaturübersicht (II4) beschriebenen Prädispositionen, wie Hypokalzämie, Ketose und peripartale Dysregulation der Sexualsteroiden, wurden 40 Tiere von den 180 Probanden (20 Kühe ohne *Ret. sec.* und 20 Kühe mit *Ret. sec.*; III3.3) für die Transkriptomanalyse ausgewählt. Die Plazentomproben dieser 40 Kühe sind auf Genexpressionsebene analysiert worden, v.a. im Hinblick auf Prozesse der Immunmodulation (paralleles Dissertationsprojekt; BRAUNERT, 2012), Umbau der extrazellulären Matrix (EZM) und Apoptose. Im vorliegenden Dissertationsprojekt wurde zudem der Frage nachgegangen, ob Zusammenhänge zwischen subklinischer Hypokalzämie oder subklinischer Ketose im peripartalen Zeitraum mit den plazentären Mechanismen des Umbaus der EZM und der Apoptose und damit mit der Nachgeburtsverhaltung des Rindes bestehen. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Gruppeneinteilung der Kühe, inklusive ihren Kuhnummern und Bezeichnungen in der Ergebnisdarstellung. Die Tiere, die eine *Ret. sec.* aufwiesen, werden in nachfolgenden Tabellen und Abbildungen als „ret“ und die Tiere ohne *Ret. sec.* werden als „norm“ bezeichnet.

Tabelle 6: Versuchstiergruppierung

Nachgeburtsverhalten				physiologischer Nachgeburtsabgang			
	Tier-nummer	Bezeichnung	Auswahl-kriterien		Tier-nummer	Bezeichnung	Auswahl-kriterien
Gruppe 1a	3771	ret1	physiologische Blutparameter im Hinblick auf Kalzium <sup>1</sup> , $\beta$ -HBA <sup>2</sup> und Progesteron <sup>3</sup>	Gruppe 1b	4699	norm2	physiologische Blutparameter im Hinblick auf Kalzium <sup>1</sup> , $\beta$ -HBA <sup>2</sup> und Progesteron <sup>3</sup>
	3513	ret2			4547	norm3	
	3874	ret5			4964	norm4	
	3647	ret6			5015	norm5	
	4318	ret7			5000	norm6	
Gruppe 2a	3732	ret_Prog1	unphysiologische peripartale Progesteron-Werte <sup>3</sup>	Gruppe 2b	4797	norm_Prog1	unphysiologische peripartale Progesteron-Werte <sup>3</sup>
	3499	ret_Prog2			4658	norm_Prog2	
	4193	ret_Prog3			4008	norm_Prog3	
	3717	ret_Prog4			4961	norm_Prog4	
	3996	ret_Prog5			3985	norm_Prog5	
Gruppe 3a	3439	ret_Ca2	subklinische Hypokalzämie <sup>1</sup>	Gruppe 3b	4839	norm_Ca1	subklinische Hypokalzämie <sup>1</sup>
	3407	ret_Ca3			3007	norm_Ca2	
	4464	ret_Ca4			3076	norm_Ca3	
	2439	ret_Ca5			3759	norm_Ca4	
	3338	ret_Ca6			3238	norm_Ca5	
Gruppe 4a	2581	ret_HBA1	subklinische Ketose <sup>2</sup>	Gruppe 4b	4846	norm_HBA1	subklinische Ketose <sup>2</sup>
	4336	ret_HBA2			4482	norm_HBA2	
	3948	ret_HBA3			4531	norm_HBA3	
	4694	ret_HBA4			4473	norm_HBA4	
	3453	ret_HBA6			4165	norm_HBA5	

<sup>1</sup> Ein physiologischer Kalziumwert im Serum der Kühe ist in vorliegender Arbeit definiert als  $\geq 2$  mmol/l. Kühe mit subklinischer Hypokalzämie wiesen bei mindestens einem Probennahmezeitpunkt einen Wert von  $\leq 2$  mmol/l auf. Diese Kühe zeigten keinerlei klinische Anzeichen einer Hypokalzämie und das sowohl bei Erkrankung an einer *Ret. sec.* als auch ohne Auftreten einer *Ret. sec.* (QUIROZ-ROCHA et al., 2009).

<sup>2</sup> Für die subklinische Ketose wurden zwei Grenzwerte des Ketonkörpers  $\beta$ -HBA ( $\beta$ -Hydroxybutyrat) herangezogen. Bis zur Geburt wurde ein Wert von  $\geq 0,8$  mmol  $\beta$ -HBA/l Serum und ab dem Zeitpunkt der Geburt der Grenzwert von  $\geq 1,18$  mmol  $\beta$ -HBA/l Serum für das Auftreten einer subklinischen Ketose geltend gemacht (QUIROZ-ROCHA et al., 2009). Tiere mit physiologischen  $\beta$ -HBA-Werten zeigten keine erhöhten Messwerte.

<sup>3</sup> Tiere mit physiologischen Progesteron ( $P_4$ )-Werten sind solche, die *i.p.* oder am ersten Tag *p.p.* ein Wert von  $< 1$  ng  $P_4$ /ml Plasma aufwiesen (HOFFMANN, 1993; VON ENGELHARDT & BREVES, 2004). Darüber hinaus wiesen sie weder einen Wiederanstieg des  $P_4$  nach dem physiologischen Abfall *a.p.* auf, noch zeigten sie einen erhöhten Wert von  $\geq 0,6$  ng  $P_4$ /ml *p.p.*

**Abkürzungen:** ret: Kühe mit *Ret. sec.*; norm: Kühe ohne *Ret. sec.*; ret\_Prog1- ret\_Prog5: Kühe mit *Ret. sec.* und gemessenen Progesteronwerten im Plasma; ret\_Ca2-ret\_Ca6: Kühe mit *Ret. sec.* und gemessenen Kalziumwerten im Serum; ret\_HBA1-ret\_HBA6: Kühe mit *Ret. sec.* und gemessenen  $\beta$ -HBA-Werten im Serum; norm\_Prog: Kühe ohne *Ret. sec.* und gemessenen Progesteronwerten im Plasma; norm\_Ca1-norm\_Ca5: Kühe ohne *Ret. sec.* und gemessenen Kalziumwerten im Serum; norm\_HBA1-norm\_HBA5: Kühe ohne *Ret. sec.* und gemessenen  $\beta$ -HBA-Werten im Serum

## **2. Qualitativ histologische und quantitativ stereologische Untersuchungen**

Unterschiede im Volumenanteil der Epithelzellen in den untersuchten Plazentomproben können grundsätzlich die Ergebnisse der Genexpressionsstudien (Transkriptomanalysen) beeinflussen. Einzelne Gene im fetalen und maternalen Gewebe und in den verschiedenen Zelltypen weisen unterschiedliche Expressionsmuster und Transkriptabundanzen auf. Aus diesem Grund war zu klären, ob die zelluläre Zusammensetzung des in Genexpressionsstudien zu untersuchenden Probenmaterials weitgehend homogen und damit die Expressionsresultate vergleichbar und interpretierbar waren (SHEN-ORR et al., 2010). Auch für zellfunktionelle Analysen in Hinsicht auf Immunantwort, Apoptose und Umbau der EZM ist die Kenntnis der Gewebezusammensetzung von Bedeutung. Daher wurden zur Abschätzung der Variabilität der Gewebezusammensetzung in den Plazentomproben zum Zeitpunkt der Geburt die Anteile der funktionell bedeutsamen Epithelzellen im Probenmaterial mittels quantitativ stereologischer Methoden bestimmt.

### **2.1. Qualitativ histologische Befunde**

Lichtmikroskopische Analysen der Plazentomproben ergaben keine Hinweise auf organpathologische Alterationen, insbesondere bestanden weder im maternalen noch im fetalen Bereich der Plazentome entzündliche Veränderungen (Befunde vom Institut für Tierpathologie, Ludwig-Maximilians-Universität München). Die Auswertung der Gewebeproben ergab eine unauffällige Histomorphologie mit beidseitig intaktem, z.T. gefältelem Epithel (Plazenta epitheliochorialis) von Chorion- und Uterusepithel und dem zur Oberflächenvergrößerung entwickelten dichten Mikrozottenbesatz im Bereich der fetomaternalen Kontaktflächen. Die im Chorionepithel auftretenden zwei- und mehrkernigen Riesenzellen (TGC) waren unverkennbar. Die Proben bestanden zum größten Teil aus mehrstufigem Schleimhautepithel (Epithelium mucosae) des Uterus mit hochprismatischen Zellen und Bindegewebszellen.

### **2.2. Vergleichbare Gesamtvolumina der Epithelzellen in allen Plazentomproben**

Die in Abschnitt (III4.6.2) erläuterte immunhistochemische Darstellung von Zytokeratin ermöglichte die eindeutige Identifizierung der Epithelzellen. Die

durchschnittlichen Volumenanteile des Epithels in den Plazentomproben wurden deshalb an immunhistochemisch gefärbten Schnitten durchgeführt.

Für einen allgemeinen Überblick wurden zunächst alle Tiere mit *Ret. sec.* ( $n = 20$ ) und ohne *Ret. sec.* ( $n = 20$ ) verglichen. Der Volumenanteil des Epithels in den Plazentomproben war bei den beiden Gruppen (norm,  $MW \pm SD$ :  $0,16 \pm 0,05$  Vv vs ret,  $MW \pm SD$ :  $0,15 \pm 0,04$  Vv;) nahezu identisch ( $p = 0,705$ ). Des Weiteren lagen keine Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung der Proben zwischen den Gruppen mit subklinischer Hypokalzämie bzw. Ketose mit und ohne *Ret. sec.* vor (Abbildung 3: Hypokalzämie:  $p = 0,754$ ; Ketose:  $p = 0,754$ ).

Somit können Unterschiede in den Transkriptabundanzdaten der Genexpressionsdaten aufgrund eines signifikant unterschiedlichen Epithelzellanteils der Plazentomproben ausgeschlossen werden.

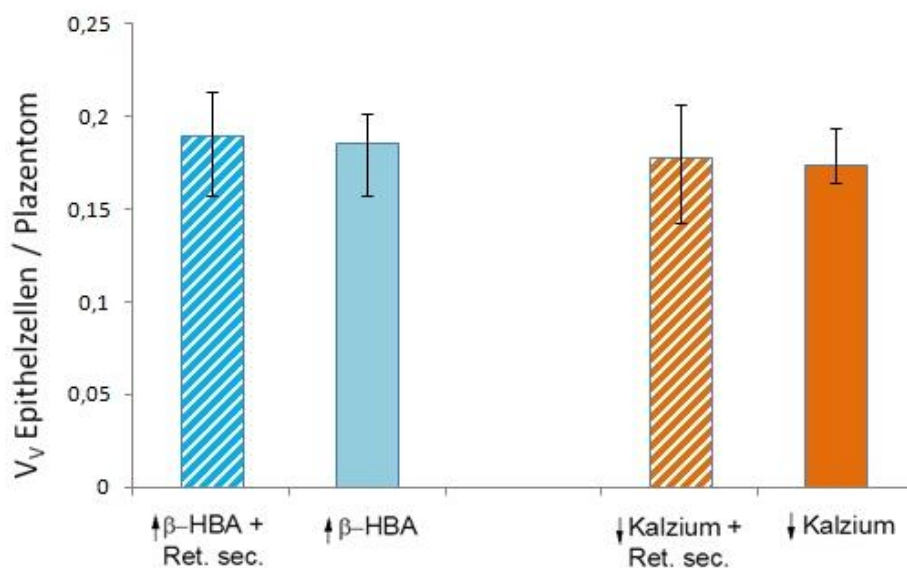


Abbildung 3: **Gesamtvolumenanteil der Epithelzellen in den Plazentomproben ( $V_v(\text{Epithelzellen/Plazentom})$ )**. Dargestellt sind die Mediane (1. und 3. Quartil als Fehlerbalken) der Kühe mit subklinischer Ketose ( $\beta$ -HBA mit und ohne *Ret. sec.* – blau/hellblau schraffiert bzw. hellblau) und mit subklinischer Hypokalzämie (Kalzium mit und ohne *Ret. sec.* – rot/orange schraffiert bzw. rot). Es gab keine signifikanten Unterschiede in den plazentomalen Volumenanteilen der Epithelzellen zwischen den Gruppen.

### 3. Genexpressionsanalyse von Proben aus bovinen peripartalen Plazentomen

#### 3.1. Prozessierung der Microarray-Daten

Die Fluoreszenzsignale wurden nach der Hybridisierung der 40 Proben mit dem GeneChip® Bovine Gene 1.0 ST Array von Affymetrix™ (III2.4) mit dem Affymetrix-Scanner (III1) detektiert. Mit Hilfe des Robust Multiarray Average

(RMA)-Algorithmus aus den Affymetrix Powertools wurden die Rohdaten einer Prozessierung einschließlich Normalisierung und Filterung der Daten auf solche mit nachweisbarem Signal (*present Probe sets*) unterzogen (<http://www.affymetrix.com>). Dabei wurden die Signale der einzelnen *Probes* auf Transkriptebene zusammengefasst. Die ermittelten prozessierten Expressionsdaten (log2-transformiert) sind in Form von Boxplots in Abbildung 4 dargestellt. Anhand der Boxplots lässt sich schlussfolgern, dass die Verteilung der Signalintensitäten für die einzelnen Proben nach der Normalisierung mit RMA weitgehend angeglichen werden konnte.

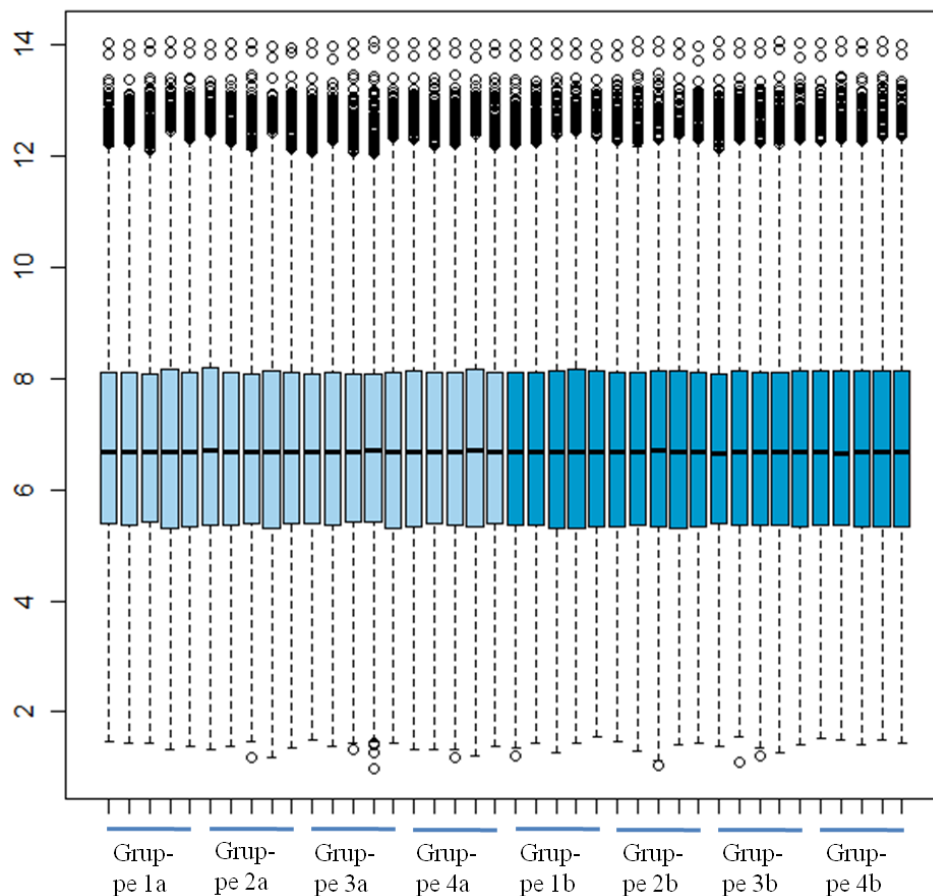


Abbildung 4: **Boxplots der normalisierten Microarraydaten der 40 ausgewählten Plazentomproben.** Die Boxplots in hellblau stellen die Tiere mit *Ret. sec.* und die dunkelblauen die Tiere ohne *Ret. sec.* dar. Die blaue Box beinhaltet 50% der Daten („mittlere Hälfte“, 25. bis 75. Perzentil). Die fettgedruckten Linien in der Mitte der Boxen geben den Median an. Die gestrichelten Linien ober- und unterhalb der Box verdeutlichen jeweils das Ausmaß der gemessenen Signalintensitäten und stellen das obere und untere Quartil der Expressionsdaten dar. Die Werte, die als Kreise über den jeweiligen gestrichelten Linien aufgeführt werden, sind als Ausreißer deklarierbar.



### 3.2. Identifizierung von differentiell exprimierten Genen in bovinen peripartalen Plazentomen mit und ohne *Ret. sec.*

Um typische Genexpressionsmuster infolge einer *Ret. sec.* identifizieren zu können, wurde eine statistische Auswertung der Expressionsprofile der jeweils 20 „ret“- und „norm“-Tiere mit „limma“ (Linear Models for MicroArray data (SMYTH, 2004)) und BioConductor-Software-Paket (GENTLEMAN et al., 2004)) durchgeführt. Dabei wurden 22.166 von den 26.303 auf dem GeneChip® Bovine Gene 1.0 ST Array von Affymetrix™ (III2.4) vorhandenen bovinen Transkripten analysiert (detektierbare Transkripte). Bei einer False Discovery Rate (FDR) von 5% wurden von den 22.166 exprimierten Transkripten 2.500 als differentiell exprimiert (ohne Fold change Cut-off) identifiziert. Davon sind bei einem Schwellenwert von *Fold Change* (FC) = 2 ( $\log_2 \text{FC} = 1$ ) in den „ret“-Proben drei Gene signifikant höher (= hochreguliert) bzw. drei Gene signifikant niedriger (= herunterreguliert) exprimiert. Der FC drückt den Faktor des Expressionsunterschieds aus. Mathematisch ausgedrückt ist er in diesem Projekt ein Quotient aus jeweils den Expressionsmittelwerten der Tiere mit Nachgeburtsverhaltung und den Tieren ohne Nachgeburtsverhaltung. Bei einer FDR von 1% und einem FC von 2 sind bei den „ret“-Proben zwei Gene hoch- und drei Gene herunterreguliert. Bei einer Lockerung des FC auf einen „Cut off“ von 1,5 und bei einer festgesetzten FDR von 5% ergeben sich 137 differentiell exprimierte Gene (DEGs) im Vergleich der 20 „ret“-Proben mit den 20 „norm“-Proben.

### 3.3. Untersuchung der Expressionsdaten mittels Korrelations-Heatmaps

Im nächsten Schritt wurden alle Expressionsdaten mit Hilfe von paarweisen Korrelations-Heatmaps verglichen und nach Ähnlichkeit untereinander in Cluster geordnet, um einen Überblick der Ähnlichkeiten der Datensätze der 40 Proben zu erhalten. Die Heatmap in Abbildung 5 zeigt keine deutliche Clusterung, die der Gruppeneinteilung „norm“/„ret“ bzw. den Untergruppen (Tabelle 6) entspricht. Die Betrachtung des paarweisen Korrelationskoeffizienten der Analyse aller Transkripte zeigte, dass ein relativ hohes Maß an Ähnlichkeit zwischen den Proben vorhanden war, was für eine vergleichbare Gewebezusammensetzung der Proben spricht und darauf hinweist, dass zwischen den verglichenen Gruppen keine sehr großen Expressionsunterschiede vorhanden sind. Die 20 Tiere ohne *Ret. sec.* sind mit „norm“ deklariert und das nachfolgende Kürzel beschreibt ihre

Untergruppenzugehörigkeit (Tabelle 6). Dementsprechend sind die Tiere mit *Ret. sec.* als „ret“ benannt. Auch hier wird nachstehend ihre Gruppenzugehörigkeit definiert. Die Korrelations-Heatmap lässt deutlich einen Ausreißer erkennen („ret\_HBA4“) und veranschaulicht, dass die meisten „ret“- und „norm“-Proben durch Betrachtung der Unteräste untereinander gemischt sind. Eine untergeordnete Gruppenzugehörigkeit ist anhand der Baumstruktur links oder oberhalb der Grafik von bestimmten Untergruppen von „norm\_HBA3“ bis „norm\_Ca1“ und „ret\_Prog2“-„ret\_Prog1“, „ret\_Ca3-ret\_Prog4“ und „norm3-norm\_HBA2“ erkennbar.

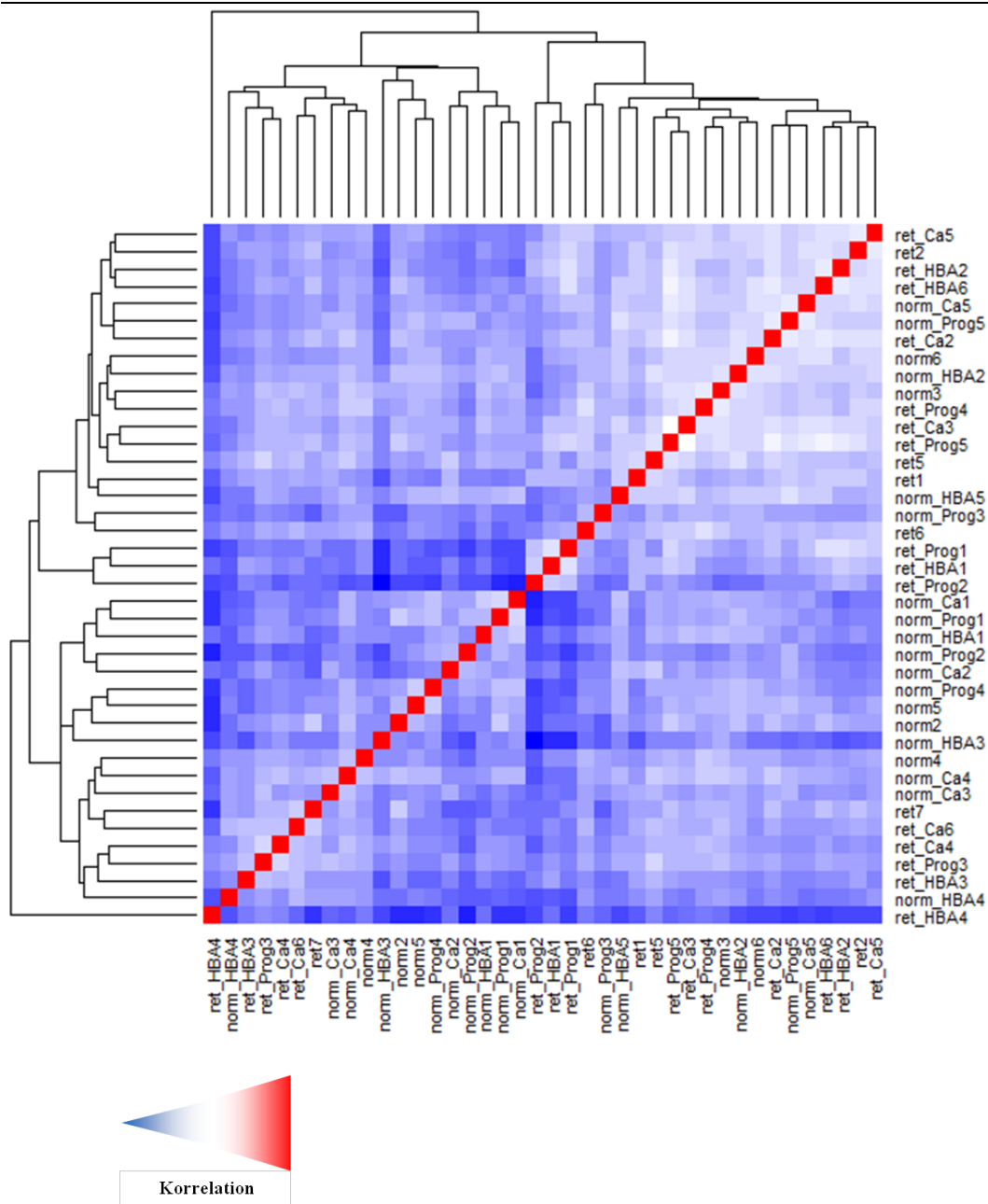


Abbildung 5: **Paarweise Korrelations-Heatmap aller 40 ausgewählten Plazentomproben.** Ausgehend von normalisierten Expressionsdaten wurden zunächst durch eine paarweise Korrelationsanalyse (R, BioConductor, Geneplotter) alle 40 Expressionsprofile der „norm“-Tiere mit denen der „ret“-Tiere verglichen. Die Farben der Quadrate geben den Grad der Ähnlichkeit der verglichenen Expressionsmuster an. Diese können dunkelrot (entspricht der vollkommenen Übereinstimmung der Expressionsmuster, Coef=1) bis dunkelblau (entspricht der niedrigsten erhaltenen Korrelation in diesem Vergleich) sein. Die Baumstruktur oben und an der linken Seite gibt die Beziehung zwischen den Expressionsprofilen an. Die Länge der Äste zwischen Verzweigungen zeigt an, wie stark sich die Genexpression zwischen den gebildeten Gruppen unterscheidet.

Die der Heatmap in Abbildung 5 zugrunde liegende paarweise Korrelationsanalyse zeigte eine relative einheitliche Varianz der untersuchten Proben. Die Betrachtung der korrigierten p-Werte aus der statistischen Analyse zeigt statistisch annehmbare Werte. Die Anzahl der DEGs wird hauptsächlich

durch die Festlegung des Schwellenwerts für den FC aufgrund der überwiegend relativ niedrigen Expressionsunterschiede beeinflusst. Höhere FCs für einzelne „ret“-Proben werden somit bei Gegenüberstellung der jeweils 20 Tiere in Bezug auf ihre Einteilung mit und ohne *Ret. sec.* „rausgemittelt“, was darauf zurückzuführen ist, dass die Kontrollen keine sehr einheitliche Gruppe bilden und einige „ret“-Proben den Kontrollen sehr ähnlich erscheinen. Somit ergeben sich viele signifikante Unterschiede in der Genexpression der Tiere, aber die Höhe der durchschnittlichen Unterschiede ist sehr gering. Beispielhaft sind entsprechende Gene in Tabelle 9 und 10 aufgeführt.

### **3.4. Korrelationsanalysen in Abhängigkeit von den definierten Prädispositionsgruppen**

Anhand der Einteilung der Probanden in bestimmte Prädispositionsgruppen wurde eine Analyse der Expressionsdaten auf Effekte der Gruppen der subklinischen Ketose und subklinischen Hypokalzämie auf die plazentare Genexpression durchgeführt (Abbildung 6 und Abbildung 7). In einer parallel laufenden Dissertationsarbeit (BRAUNERT, 2012) wurde besonderes Augenmerk auf die Transkriptomanalyse von Kühen mit Dysregulationen des peripartalen Progesterons gelegt (Tabelle 6). In vorliegender Arbeit waren anhand der statistischen Überprüfung mittels „limma“ keine signifikanten Unterschiede in den Datensätzen auf Transkriptomebene zwischen den Plazentomproben von Tieren mit bzw. ohne *Ret. sec.* entweder mit subklinischer Hypokalzämie oder subklinischer Ketose erkennbar. Die vorwiegend dunkelblaue Färbung der Quadrate in den beiden folgenden Heatmaps (Abbildung 6 und Abbildung 7) visualisiert wiederum die einheitliche Varianz der Genexpressionsdaten der „norm“ und „ret“ Kühe in den Prädispositionsgruppen 3 und 4.

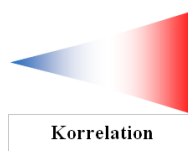
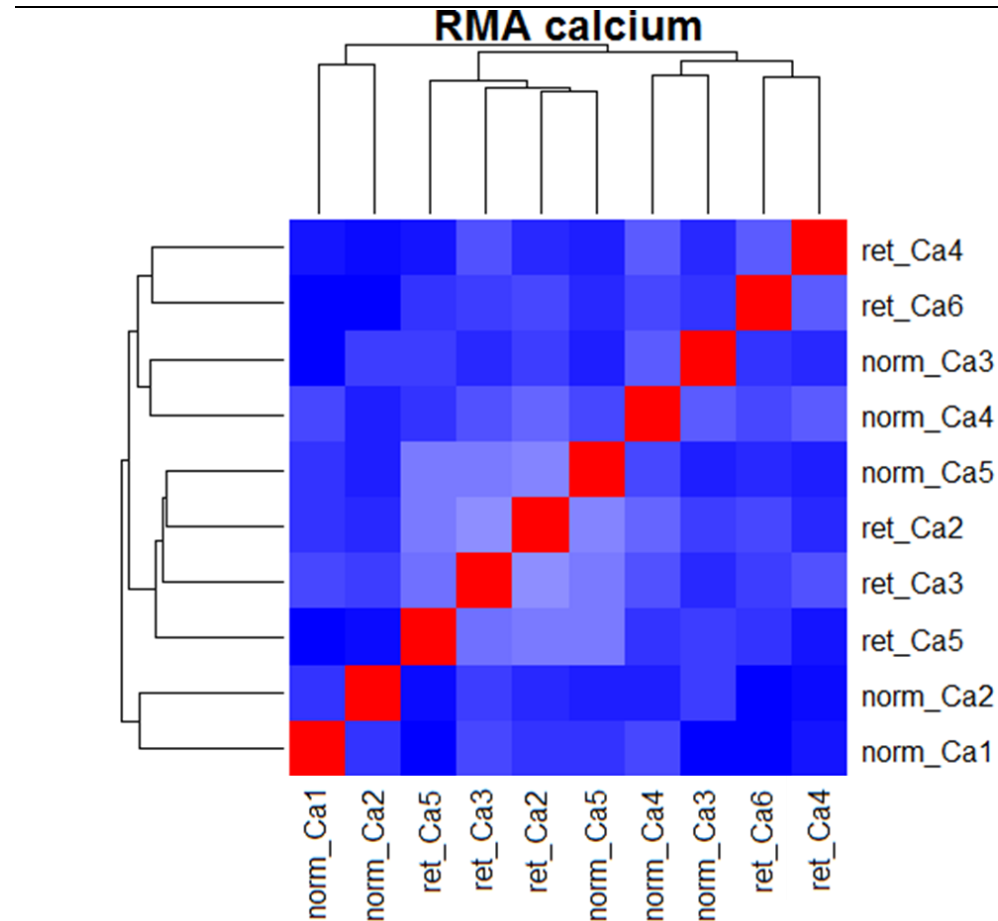


Abbildung 6: **Korrelations-Heatmap der Plazentomproben von den Tieren mit subklinischer Hypokalzämie.** Die normalisierten Expressionsdaten wurden durch eine paarweise Korrelationsanalyse (R, BioConductor, Geneplotter) von je fünf Expressionsprofilen der „norm“- und „ret“-Tiere mit subklinischer Hypokalzämie verglichen. Die Farben der Quadrate geben den Grad der Ähnlichkeit der verglichenen Expressionsmuster an. Diese können dunkelrot (entspricht der vollkommenen Übereinstimmung der Expressionsmuster, Coef=1) bis dunkelblau (entspricht der niedrigsten erhaltenen Korrelation in diesem Vergleich) sein. Die Baumstruktur oben und an der linken Seite gibt die Beziehung zwischen den Expressionsprofilen an. Die Länge der Äste führt die Beziehung zwischen den Expressionsprofilen auf. Der Vergleich der Tiere in Bezug auf subklinische Hypokalzämie weist keine Clusterung der Plazentomproben in „ret“ und „norm“ auf Transkriptomebene auf.

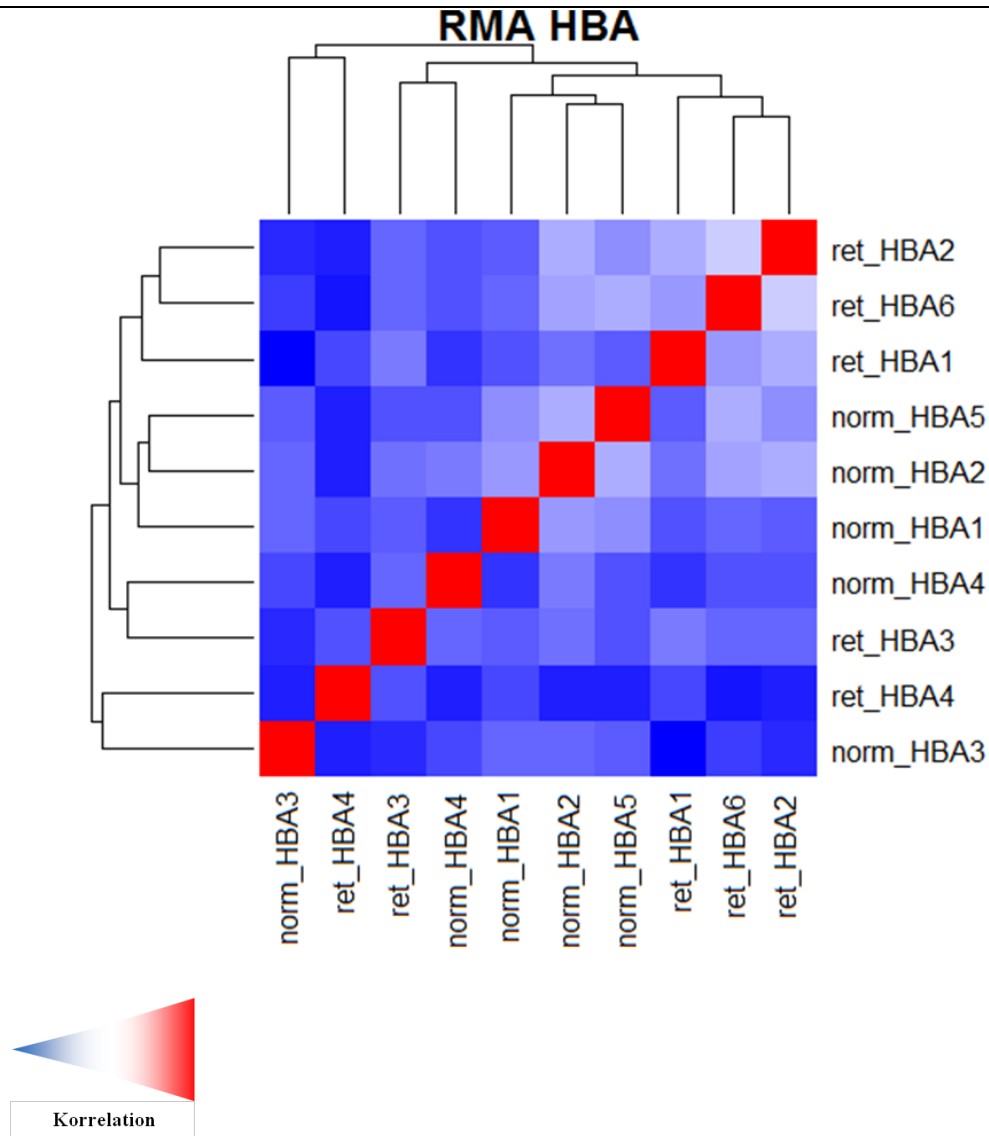


Abbildung 7: **Korrelations-Heatmap der Plazentomproben von den Tieren mit subklinischer Ketose.** Es wurde ein Vergleich der normalisierten Expressionsdaten anhand einer paarweisen Korrelationsanalyse (R, BioConductor, Geneplotter) von je fünf Expressionsprofilen der „norm“- und „ret“-Tiere mit subklinischer Ketose verglichen. Die Farben der Quadrate zeigen den Grad der Ähnlichkeit der verglichenen Expressionsmuster an. Diese können dunkelrot (entspricht der vollkommenen Übereinstimmung der Expressionsmuster, Coef=1) bis dunkelblau (entspricht der niedrigsten erhaltenen Korrelation in diesem Vergleich) sein. Die Baumstruktur oben und an der linken Seite und die Länge der Äste stellt die Beziehung zwischen den Expressionsprofilen zueinander dar. Der Vergleich der Tiere mit subklinischer Ketose lässt keine Clusterung der Plazentomproben in „ret“ und „norm“ auf der Ebene des Transkriptoms erkennen.

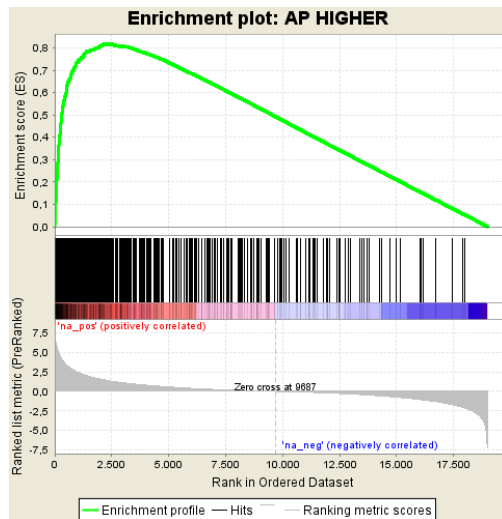
### 3.5. Vergleichende Analyse physiologischer und pathologischer Plazentomproben (Vergleich zweier experimenteller Ansätze)

Da kein erkennbarer Zusammenhang zwischen Prädispositionsfaktoren und Genexpression in den peripartalen Plazentomproben feststellbar war, wurde unter Nichtbeachtung der Prädispositionsfaktoren weiter nach signifikanten

Unterschieden zwischen Tieren mit und ohne *Ret. sec.* auf Transkriptomebene gesucht. Zur näheren Charakterisierung der im vorliegenden Projekt generierten Genexpressionsprofile wurde ein Vergleich mit einer vorangegangenen Studie von STREYL et al. (2012) durchgeführt. In dieser Studie waren nach gleichem Protokoll Plazentomproben von je vier Fleckvieh-Kühen 10 bis 14 Tage vor errechnetem Kalbetermin (anteartal; „AP“-Datensatz) *via Sectio caesarea* und direkt in der Geburtsphase nach Entwicklung der Frucht (intrapartal; „IP“-Datensatz) transvaginal entnommen und auf Transkriptomebene analysiert worden. In der Studie von STREYL et al. (2012) wurden 1.273 DEGs erfasst. Dabei entspricht der Zeitpunkt „IP“ den Kontrollproben („norm“) in der vorliegenden Studie. Zum Vergleich mittels Gene Set Enrichment Analyse (GSEA) wurde aus allen exprimierten (detektierbaren) Genen der vorliegenden Microarray-Studie (19.403 Gene mit Gensymbol) eine Rangliste angefertigt. Hierzu wurden anhand des FC „ret“ vs. „norm“ und dem korrigierten p-Wert ein Score berechnet und die Gene mit dem höchsten positiven Score (am stärksten in „ret“ hochreguliert) an oberster Stelle und die mit dem niedrigsten negativen Score (am stärksten herunterreguliert) an unterster Stelle der Liste platziert. Der erstellten Rangliste konnten 1.226 DEGs der Studie von STREYL et al. (2012) zugeordnet werden. Die Ergebnisse (Abbildung 8) zeigten eine hohe Anreicherung der AP stärker exprimierten Gene der Vorläuferstudie in Richtung der in den *Ret. sec.*-Proben höher exprimierten Genen in der Rangliste (Abbildung 8 links). Umgekehrt zeigte sich eine sehr gute Anreicherung der IP stärker exprimierten Gene der Vorläuferstudie in Richtung der in den „norm“-Proben höher exprimierten Gene (Abbildung 8 rechts). Die Rangliste wird in der Grafik horizontal und mit dem höchsten positiven Score links dargestellt. Beim Vergleich der Datensätze wird für jedes übereinstimmende Gen mit der Referenzgenliste ein positiver Treffer als schmaler schwarzer Strich gekennzeichnet und als Enrichment Score (ES) bezeichnet. Der ES (grüne Kurve) steigt umso steiler an, je mehr Gene der Referenzliste der Vorläuferstudie mit den am höchsten differentiell exprimierten Genen (DEGs) der Microarray-Daten aus vorliegender Studie übereinstimmen. Der steile Anstieg ist in dem Verlauf der grünen Trendlinie und in der Häufung der schwarzen Striche (Trefferpunkte) unterhalb der grünen Linie erfassbar. Die rote Farbe in dem Balken unter den Trefferpunkten stellt den Grad der positiven Korrelation und die blaue Farbe den der negativen Korrelation dar. Die graue Kurve unterhalb des blauroten Balkens

entspricht diesem Balken und stellt den Score der Rangliste in Form einer Kurve dar.

A



B

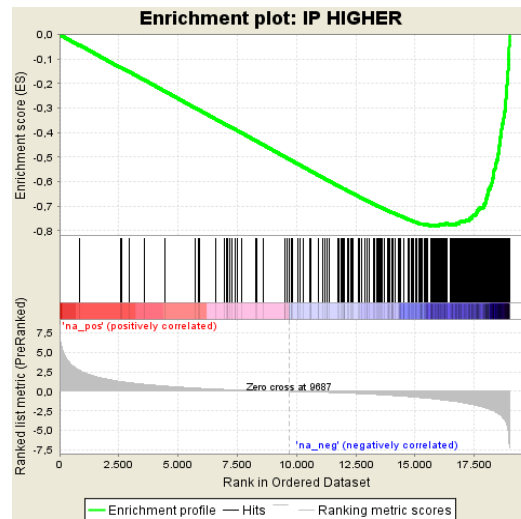


Abbildung 8: **Gene Set Enrichment Analyse basierend auf dem Vergleich des Datensatzes der vorliegenden Studie mit den AP bzw. IP höher exprimierten Genen des Datensatzes von STREYL et al. (2012).** Alle exprimierten (detektierbaren) Gene des Microarray-Datensatzes sind basierend auf ihrer differentiellen Expression zwischen „ret“ und „norm“ in einer Rangliste (ranked list) aufgeführt. Anhand dieser geordneten Liste gibt die GSEA eine positive Auswertung (Y-Achse) für jedes übereinstimmende Gen, welches in beiden Datensätzen vorkommt (grüne Kurve, Enrichment Score). Die Gene, die „ret“ vs. „norm“ am stärksten höher exprimiert sind, befinden sich links (rot) und die am stärksten niedriger exprimierten Gene sind rechts (blau) aufgeführt. Jeder Trefferpunkt beim Vergleich der Genlisten wird durch einen vertikalen Strich auf der X-Achse repräsentiert. Je stärker die Anreicherung der Ähnlichkeit der Gene unter den Datensätzen ist, desto höher ist die Dichte der Striche auf der X-Achse zu einem Ende hin. **A:** Enrichment-Plot des Vergleichs mit den in den *a.p.*-Plazentomen höher exprimierten Genen (AP HIGHER) **B:** Enrichment Plot des Vergleichs mit den in den *i.p.*-Plazentomen höher exprimierten Genen (IP HIGHER).

### 3.6. Auswahl von Tiere anhand von Korrelationsanalysen auf der Basis der DEG aus der Bezugsstudie (STREYL et al., 2012)

Der Befund der GSEA (IV3.4) legte nahe, die DEGs aus der Vorläuferstudie zur spezifischeren Charakterisierung der Proben zu verwenden, weil AP höher exprimierte Gene mit unreifen Plazentomen assoziiert sind und IP höher exprimierte Gene mit reifen Plazentomen. Dies wurde mit dem Ziel durchgeführt, „ret“-Proben auszuwählen, in denen AP hochregulierte Gene eine stärkere Expression im Vergleich zu „norm“-Proben zeigen. Umgekehrt sollten „norm“-Proben ausgewählt werden, in denen die IP hochregulierten Gene stärker exprimiert waren im Vergleich zu den „ret“-Proben. Weiterhin hat eine Korrelationsanalyse mit vollständigen Datensätzen (= alle detektierbaren Gene) immer den Nachteil, dass spezifische Effekte durch die hohe Anzahl an



untersuchten Genen überdeckt werden bzw. andere Effekte, wie z.B. allgemeine Variation durch Schwankungen in der Probenzusammensetzung etc., die gesuchten überlagern. Deshalb wurde die paarweise Korrelationsanalyse mit einem auf die DEGs aus der vorangegangenen Studie limitierten Datensatz wiederholt (Abbildung 9). Dies ergab eine eindeutig erkennbare Gruppierung der Proben. Diese Gruppierungen sind zur Verdeutlichung durch jeweils gelbe und grüne Rahmen in Abbildung 9 gekennzeichnet. Die Proben im gelben Rahmen ergeben eine Gruppe von Tieren ohne *Ret. sec.* mit einer weitgehend übereinstimmenden Genexpression. Auch alle Proben in den beiden grünen Rahmen zeigen zueinander eine ähnliche Genexpression (rötliche Färbung) und deutliche Unterschiede zur „norm“-Gruppe (blaue Färbung). Somit kristallisieren sich neun Tiere mit *Ret. sec.* und neun Tiere ohne *Ret. sec.* heraus, die jeweils unter sich eine hohe Korrelation der Genexpression zeigen, mit gleichzeitig niedriger Korrelation zur jeweils anderen Gruppe.

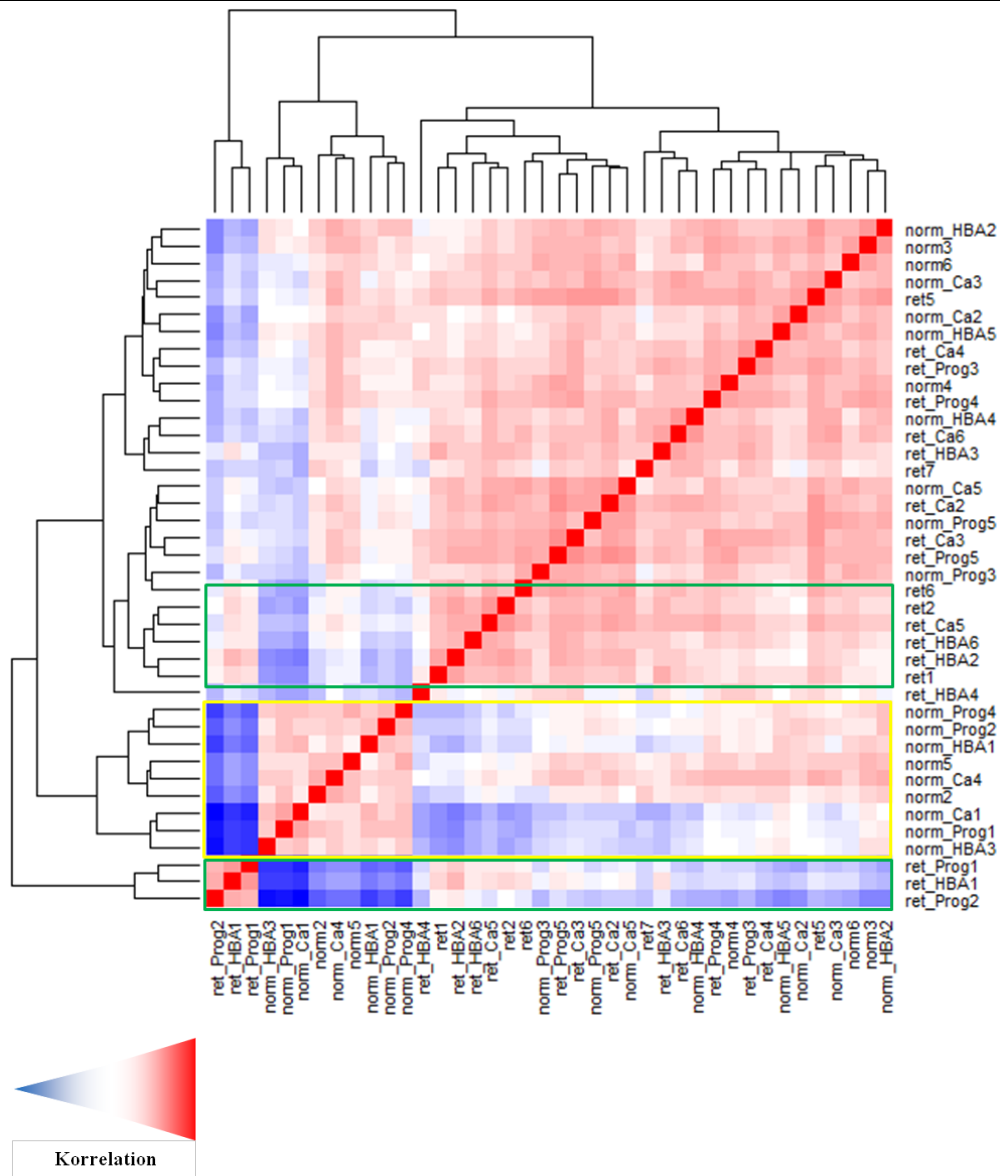


Abbildung 9: **Korrelations-Heatmap** für den limitierten Datensatz von 1.226 DEGs aus STREYL et al. (2012). Ausgangspunkt waren wiederum die normalisierten Expressionsdaten, von denen ein Vergleich anhand einer Korrelationsanalyse (R, BioConductor, Geneplotter) aller 40 Expressionsprofile der „norm“-Tiere mit denen der „ret“-Tiere aufgestellt wurde. Die Farben der Quadrate geben den Grad der Ähnlichkeit der verglichenen Expressionsmuster an. Diese können dunkelrot (entspricht der vollkommenen Übereinstimmung der Expressionsmuster, Coef=1) bis dunkelblau (entspricht der niedrigsten erhaltenen Korrelation in diesem Vergleich) sein. Die Baumstruktur oben und an der linken Seite stellt die Beziehung zwischen den Expressionsprofilen dar. Die Länge der Äste zwischen den Verzweigungen lässt erkennen, wie hoch die Differenz der Genexpression zwischen den neu gebildeten Gruppen ist. Die vorwiegende Färbung im rötlichen Bereich der Quadrate deutet auf die Ähnlichkeit der Datensätze hin. In dem gelben (Tiere der „norm“-Gruppe) und den grünen Rahmen (Tiere der „ret“-Gruppe) werden die 18 Tiere im Vergleich zu den restlichen 22 Tieren mit höher übereinstimmenden Expressionsdaten in zwei neue Gruppen eingeordnet.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde weiterhin eine hierarchische Cluster-Analyse (für Gene und Proben) für die Expressionswerte der DEGs aus STREYL et al. (2012) mit einem speziell für Microarray-Daten entwickelten

---

Softwareprogramm	durchgeführt	(Hierarchical	Clustering,
------------------	--------------	---------------	-------------

MultiExperimentViewer, Microarray Software, III5.5). Auch hier ist erkennbar, dass sich dieselben 18 Proben separieren, die sich auch in der Korrelations-Heatmap gruppiert haben (Abbildung 10). Auf der rechten Seite in Abbildung 10 gruppieren sich dieselben neun „norm“-Proben, deren Expressionsmuster eine hohe Übereinstimmung aufweist (siehe Box mit gelbem Rahmen). Genauso ordnen sich die Gene der drei „ret“-Proben mit annähernd gleichem Expressionsmuster wieder nebeneinander, die sich eindeutig von allen „norm“-Proben differenzieren (Abbildung 10, grüner Rahmen links). Dazu finden sich die anderen sechs „ret“-Proben von Abbildung 10 mit vergleichsweise hoher Übereinstimmung ihrer Expressionsmuster zueinander und eindeutiger Abgrenzung der Genexpression zu den hier analysierten neun „norm“-Tieren (Abbildung 10, Mitte bis rechts, weitere Boxen mit grünem Rahmen).

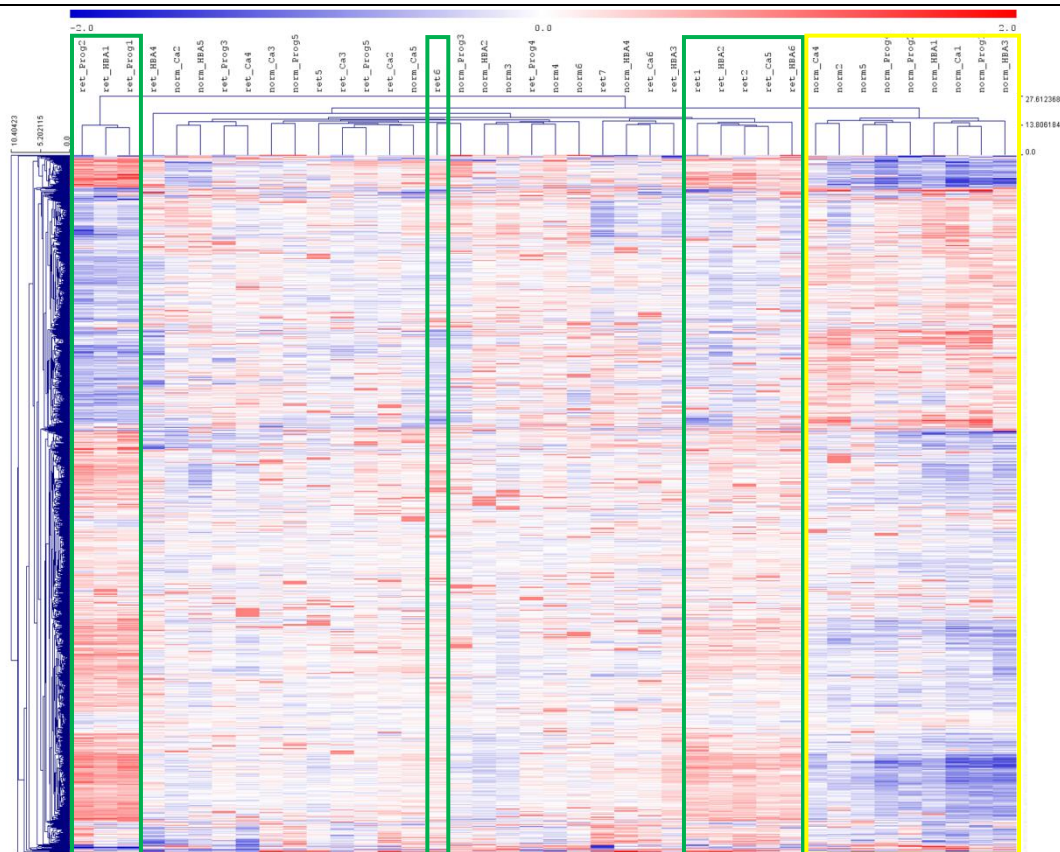


Abbildung 10: **Hierarchische Cluster-Analyse aller 40 Proben für die DEGs aus STREYL et al. (2012).** Für diese Analyse wurden relative logarithmische ( $\log_2$ ) Expressionswerte verwendet (normalisierte Expressionswerte der einzelnen Proben minus Mittelwert der Werte aller Proben). Die Reihen entsprechen den einzelnen Genen, die Spalten den 40 Proben. Eine Abweichung der Expressionswerte vom Mittelwert aller Proben ist farblich erkennbar (blau: unterhalb des Mittelwertes, rot: oberhalb des Mittelwertes). Das Dendrogramm links der Grafik stellt das hierarchische Clustern der Gene dar. Die Baumstruktur oberhalb zeigt das Clustern der Proben. Es lassen sich dieselben Proben wie anhand der Korrelations-Heatmap mit und ohne *Ret. sec.* den jeweiligen neu gefundenen Gruppen zuordnen, was die gelbe und die grünen Einrahmungen demonstrieren sollen.

### 3.7. Direkter Vergleich der zwei identifizierten Gruppen à neun Kühen anhand einer Korrelationsanalyse

In der Korrelations-Heatmap (Abbildung 11) weist die divergierende Blaufärbung der Quadrate auf eine höhere Heterogenität zwischen den zwei neu gefundenen Gruppen à neun Kühen hin. Bei Gegenüberstellung sowohl der Tiere mit *Ret. sec.*, als auch die Tiere ohne *Ret. sec.*, zeigt sich eine größere Ähnlichkeit innerhalb der Gruppe und eine divergierende Clusterung zwischen den Plazentomproben der Tiere aus den zwei unterschiedlichen Gruppen.

Die statistische Analyse zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene wurde erneut für die anhand der Ergebnisse der Vorläuferstudie (STREYL et al., 2012) ausgewählten Proben durchgeführt. Bei einer FDR von 5% und einem FC von

$\geq 1,5$  wurden 801 DEGs bei den Plazentomproben der Tiere mit *Ret. sec.* gefunden, wobei 568 DEGs hoch- und 233 DEGs runterreguliert werden. Bei Betrachtung der Gene mit einem korrigierten p-Wert von 0,01, was einer FDR von 1% entspricht, waren in den „ret“-Proben im Vergleich zu den „norm“-Proben 25 Gene niedriger und 144 Gene höher exprimiert. In der Korrelations-Heatmap (Abbildung 11) weist die divergierende Blaufärbung der Quadrate auf eine höhere Heterogenität zwischen den zwei neu gefundenen Gruppen à neun Kühen hin. Bei Gegenüberstellung sowohl der Tiere mit *Ret. sec.*, als auch der Tiere ohne *Ret. sec.*, sieht man eine größere Ähnlichkeit innerhalb der Gruppe und eine divergierende Clusterung zwischen den Plazentomproben der Tiere aus den zwei unterschiedlichen Gruppen.

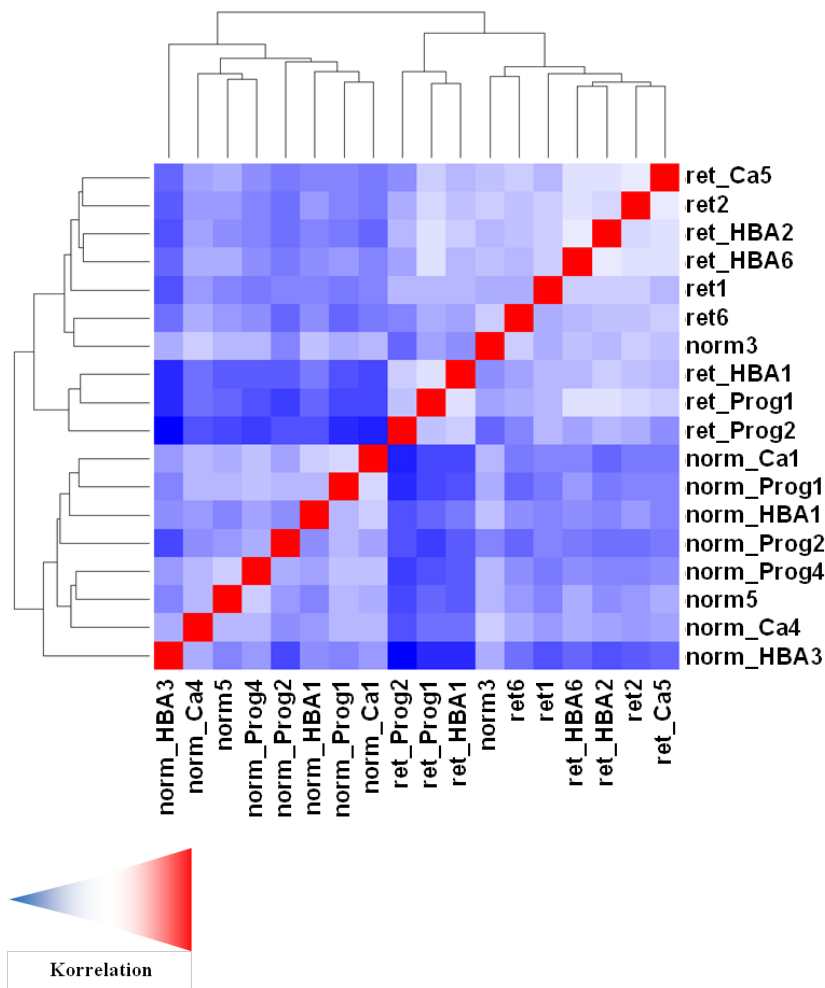


Abbildung 11: **Korrelations-Heatmap der ausgewählten 18 Plazentomproben für alle detektierbaren Transkripte.** Ausgehend von normalisierten Expressionsdaten wurden nun durch eine paarweise Korrelationsanalyse (R, BioConductor, Geneplotter) die 18 Expressionsprofile der jeweiligen neun „norm“-Tiere mit denen der neun „ret“-Tieren („norm“: Tiere ohne Nachgeburtsverhaltung; „ret“: Tiere mit Nachgeburtsverhaltung) verglichen. Die Farben der Quadrate geben den Ähnlichkeitsgrad der verglichenen Expressionsmuster an. Diese können dunkelrot (entspricht der vollkommenen Übereinstimmung der Expressionsmuster, Coef=1) bis dunkelblau (entspricht der niedrigsten erhaltenen Korrelation in diesem Vergleich) sein. Die Baumstruktur oben und an der linken Seite gibt die Beziehung zwischen den Expressionsprofilen an. Die Länge der Äste zwischen Verzweigungen zeigt an, wie hoch die abweichende Genexpression zwischen den zwei gebildeten Gruppen ist. Die Farbnuancen der Quadrate zeigen hier einen deutlicheren Ähnlichkeitsgrad der verglichenen Expressionsmuster. Auch die Länge und Verzweigung der Äste des Dendogramms oben und an der linken Seite stellt eine deutliche Teilung der Genexpressionsprofile zwischen den Gruppen dar.

### 3.8. Keine weitere Clusterung in „norm“ und „ret“ anhand einer Korrelationsanalyse der restlichen nicht gruppierbaren 22 Kühe

Zur Plausibilitätskontrolle wurden die restlichen 22 Plazentomproben, der Tiere, die in der Korrelations-Heatmap der „norm“- oder der „ret“-Gruppe (je n= 9) nicht zuzuordnen waren (Abbildung 9 und Abbildung 10) ebenfalls einer Korrelationsanalyse unterzogen. Abbildung 12 veranschaulicht, dass die Genexpressionsmuster der restlichen 22 Plazentomproben keine eindeutige

Gruppenbildung aufweisen, d.h. sich in ihrer Genexpression kaum unterscheiden. Dennoch zeigen sie in sich eine hohe Ähnlichkeit mit einem paarweisen Korrelationskoeffizienten von 0,9. Dies scheint ein Hinweis darauf zu sein, dass die Genexpression im bovinen peripartalen Plazentom und vermutlich auch sein Reifegrad bei einem Teil der Tiere zum Zeitpunkt der Probenentnahme direkt *p.p.* unabhängig vom klinischen Status („norm“ oder „ret“) sehr ähnlich ist.

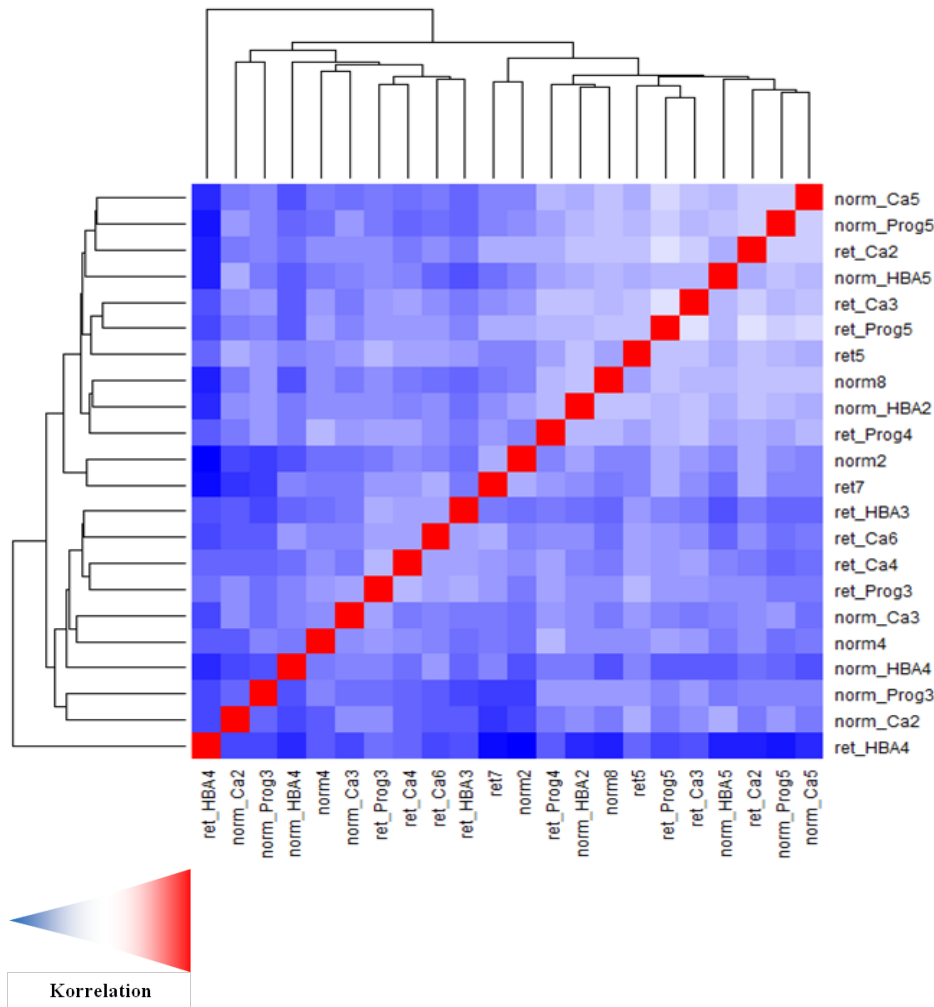


Abbildung 12: **Korrelations-Heatmap der nicht gruppierten Plazentomproben („norm“: n = 11 versus „ret“: n = 11).** Ausgehend von normalisierten Expressionsdaten wurden durch eine paarweise Korrelationsanalyse (R, BioConductor, Geneplotter) die restlichen 22 Expressionsprofile der elf „norm“-Tiere mit denen der elf „ret“-Tiere verglichen. Die Farben der Quadrate geben den Grad der Ähnlichkeit der verglichenen Expressionsmuster an. Diese können dunkelrot (entspricht der vollkommenen Übereinstimmung der Expressionsmuster, Coef=1) bis dunkelblau (entspricht der niedrigsten erhaltenen Korrelation in diesem Vergleich) sein. Die Baumstruktur oben und an der linken Seite der Heatmap stellt die Beziehung zwischen den Expressionsprofilen dar. Die Länge der Äste zwischen Verzweigungen gibt an, wie hoch die Unterscheidung der Genexpression in den gebildeten Untergruppen ist.

### 3.9. Funktionelle Annotation durch DAVID Functional Annotation Clustering

Für die identifizierten DEGs aus dem Vergleich der selektierten 18 Plazentomproben (FDR 5%, FC 1,5) wurde mit Hilfe des DAVID Functional Annotation Clustering Tools (III5.4) nach überrepräsentierten funktionellen Kategorien gesucht. Die erhaltenen Annotations-Cluster enthalten biologische Prozesse und funktionelle Kategorien, denen überdurchschnittlich häufig Gene zugeordnet wurden. Die Grenze des Enrichment Scores (negativer dekadischer Logarithmus des geometrischen Mittels der p-Werte der Kategorien eines Annotations-Clusters, steht für die Signifikanz der Überrepräsentation) wurde bei 1,35 festgelegt (1,3 entspricht einem p-Wert von ca. 0,05). Wie oben (III5.4) erläutert, zeigen die Cluster gewisse Überlappungen für manche den Gruppen zugeordneten Gene, so dass teilweise auch dieselben Gene wiederholt vorkommen. Diese Gruppen wurden für die biologisch funktionellen Komplexe „Apoptose“ oder immer noch im Prozess der „Mitose“ befindlich und „Umbau der Extrazellulären Matrix“ genauer ausgewertet. Viele dieser Prozesse stehen im engen Zusammenhang mit dem Komplex von Immunantwort und proinflammatorischer Entzündungsreaktion und können nicht vollständig getrennt voneinander betrachtet werden. Daher weisen einige Kategorien auch hier überlappende Zusammenhänge auf. Sie sind in den folgenden Tabellen 7 und 8 für höher und niedriger exprimierte Gene aufgelistet.



Tabelle 7: **DAVID-Analyse der in den „ret“-Proben höher exprimierten Gene**

Functional Annotation Cluster Description <sup>1</sup>	Enrichment Score <sup>2</sup>	Genes <sup>3</sup>
Peptidase activity (23; 1.9); aspartic-type peptidase activity (12; 8.9); Protease (19; 2.9); proteolysis (23; 1.3); hydrolase (30; 1.4)	6.37	30
Mitosis (11; 5.,0); cell cycle process (19; 3.7); cell cycle phase (15; 3.8); cell division (11; 3.4)	4.14	26
Ras guanyl-nucleotide exchange factor activity (9; 5.6); regulation of small GTPase mediated signal transduction (14; 3.1); GTPase regulator activity (15; 2.5); regulation of Rho protein signal transduction (8; 4.9); small GTPase regulator activity (12; 2.9)	2.70	15
cell division (11; 3,6); cyclin (4; 6,8); Cyclin-related (4; 7,1)	2.12	11
chromosome (20; 2,9); chromosomal part (19; 3,17); non-membrane-bounded organelle (43; 1.3); intracellular non-membrane-bounded organelle (43; 1.3 ); cytoskeleton (8; 1.3)	1.97	43
hormone activity (6; 2.5); Somatotropin hormone (4; 8.9)	1.60	6
meiotic cell cycle (4; 5.5); M phase of meiotic cell cycle (4; 5.5)	1.45	4
symporter activity (6; 3.2); neurotransmitter transporter activity (4; 6.2); integral to plasma membrane (10; 1.8); intrinsic to plasma membrane (10; 1.8)	1.41	10

<sup>1</sup>Functional Annotation Cluster Description: Beschreibung der funktionellen Annotations-Cluster; Die Grenze aller Annotations-Cluster ist bis zu einem Enrichment Score von 1,35 festgelegt; in Klammern wird die Anzahl der Gene und Fold Enrichment jeder Gengruppe beschrieben

<sup>2</sup>p-Wert der jeweiligen Annotationsgruppierung

<sup>3</sup>Anzahl der Gene in einer funktionellen Annotationsgruppierung

Tabelle 8: **DAVID-Analyse der in den „ret“-Proben niedriger expimierten Gene**

Functional Annotation Cluster Description <sup>1</sup>	Enrichment Score <sup>2</sup>	Genes <sup>3</sup>
signal peptide (37; 2.7); disulfide bond (37; 2.9); extracellular region (36; 2.8); Glycoprotein (39; 2.3);	7.34	56
immune response (22; 5.0); extracellular region (36; 2.8), chemokine activity (8; 16.6); extracellular space (15; 4.0); Chemokine signaling pathway (10; 3.7); chemotaxis (9; 11.3); cytokine activity (11; 8.4)	4.85	51
cell adhesion (18; 3.9); biological adhesion (18, 3.9)	4.41	18
cell migration (10; 5.8); cell motion (10; 4.5); localization of cell (10; 5.4); wound healing (5; 4.6); cell chemotaxis (4; 17.8)	3.31	11
Carbohydrate binding (8; 3.8); glycosaminoglycan binding (7; 8.8); pattern binding (7; 7.3)	3.18	8
egf-like domain (8; 6.0); Thrombospondin, type 1 repeat (5; 12.4)	2.75	10
protein complex binding (7; 9.0); cell surface (7; 4.0); external side of plasma membrane (5; 4.9)	2.65	10
protein complex binding (7; 9.0); cell junction assembly (3; 18.2); cell junction organization (3; 11.7)	2.43	7
Dilated cardiomyopathy (8; 6.5), Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) (7; 6.1); Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) (4; 3.9)	2.27	9
Immunoglobulin (5; 4.4), Immunoglobulin-like fold (11; 3.0); Immunoglobulin-like (9; 2.8); Immunoglobulin subtype (9; 4.7)	2.24	11
inflammatory response (11; 7.0); response to wounding (15, 5.7), defense response (13; 3.9); acute inflammatory response (4; 6.2)	1.88	21
calcium ion binding (11; 1.5), egf-like domain (8; 6.0); EGF-like (5; 3.6); EGF-like calcium-binding (4; 6.9)	1.86	16
response to bacterium (6; 4.5); response to organic substance (8; 2.8); response to lipopolysaccharide (3; 7.4)	1.68	10
regulation of locomotion (6; 5.4); regulation of cell migration (5; 5.3); growth factor binding (5; 6.9); regulation of cell adhesion (3; 3.2 )	1.43	9

<sup>1</sup>Functional Annotation Cluster Description: Beschreibung der funktionellen Annotations-Cluster; Die Grenze aller Annotations-Cluster ist bis zu einem Enrichment Score von 1,35 festgelegt; in Klammern wird die Anzahl der Gene und Fold Enrichment jeder Gengruppe beschrieben

<sup>2</sup>p-Wert der jeweiligen Annotationsgruppierung

<sup>3</sup>Anzahl der Gene in einer funktionellen Annotationsgruppierung

### 3.10. Ergebnisse der CoPub-Analyse

Um die Menge der funktionell bedeutsamen ermittelten biologischen und medizinischen Komplexe in ihren Zusammenhängen begreifen und interpretieren zu können, erfolgte mittels CoPub (III4.8.7) eine zielgerichtete Literaturrecherche in Bezug auf die aus der DAVID-Analyse identifizierten DEGs (IV3.8). So wurden im Hinblick auf die Prozesse des EZM-Umbaus und der Apoptose assoziierte DEGs in den Tabellen 9 und 10 zusammengetragen. Es wurde ein R scale score threshold von 35 und ein p-Wert von 0,05 festgesetzt. Diese Tabellen stellen die Grundlage der Diskussion der Ergebnisse der Genexpressionsanalysen dar und wurden für die weitere Auswertung angewendet. Die Gene, die aufgrund ihrer funktionellen Zuordnung am Umbau der EZM und

am Apoptose-Geschehen beteiligt sein könnten, wurden jeweils in Tabelle 9 und Tabelle 10 entsprechend ihrer differentiellen Expression aufgelistet. Dabei ergaben sich 72 DEGs. Desweiteren erfolgte eine differenzierte Betrachtung der DEGs einerseits in Bezug auf den Umbau der EZM und andererseits mit Hinsicht auf die Apoptose, wobei man die Gene der proinflammatorischen Entzündungsreaktion nicht ausgrenzen kann.

### 3.10.1. Die extrazelluläre Matrix (EZM)

Tabelle 9 zeigt die DEGs, welche mit Hilfe der CoPub-Analyse dem biologischen Komplex „Umbau der extrazellulären Matrix“ zugeordnet werden konnten. In diesem Zusammenhang wurden beispielsweise die folgenden „Keywords“ als überrepräsentiert gefunden: In den biologischen Prozessen fanden sich v.a. die Regulation der Proteasen, die sich vorwiegend durch Proteolyse am EZM-Umbau beteiligen. Ebenso häufen sich Prozesse, die Proteinbindungen in der extrazellulären Matrix beeinflussen, v.a. diejenigen, die für die Bindung an der Zelloberfläche verantwortlich sind. Bei den zellulären Komponenten, molekularen Funktionen und Stoffwechselwegen fielen gehäuft die proinflammatorischen Reaktionen inklusive der Wundheilung und der akuten inflammatorischen Antwort an. Eine Antwort auf bakterielle Reize wird ebenso reguliert. Proteasen, die beim Umbau der EZM und bei der proinflammatorischen Immunantwort benötigt werden, sind ebenfalls erkennbar. Auch hier wird wiederum deutlich, dass man die genannten physiologischen Prozesse nicht vollständig voneinander separieren kann. Somit finden sich wieder einige Gene, die genau genommen der Immunantwort zugeteilt werden müssten, wie z.B. CCL2 und -8, CXCL3 und -5, CD14 und -163, CSF1R und -2, aber auch im Zusammenhang mit dem Umbau der EZM aktiviert werden. Anhand der Auflistung der Gene in Tabelle 9 ist eindeutig zu vernehmen, dass die Gene, die im Zusammenhang mit dem EZM-Umbau stehen, bei den Tieren mit *Ret. sec.* eine niedrigere Expression aufweisen.

**Tabelle 9: Mittels CoPub-Analyse ermittelte Gene, die im Zusammenhang mit dem Umbau der extrazellulären Matrix stehen**

Bovine Entrez Gene ID	Bovine Entrez Gene symbol <sup>1</sup>	Bovine Entrez Gene description	Human Entrez Gene ID	Human Entrez Gene symbol <sup>1</sup>	FC ret/ norm <sup>2</sup>	p.value adjusted <sup>3</sup>
513856	A2M	alpha-2-macroglobulin	2	A2M	-1.51	0.002
280985	ACAN	aggrecan 1	176	AGC1	-2.19	0.015
510907	ADAM19	ADAM metalloproteinase domain 19	8728	ADAM19	-1.62	0.000
286806	ADAMTS4	a disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 4	9507	ADAMTS4	-1.65	0.001
317693	AEBP1	AE binding protein 1	165	AEBP1	-1.50	0.002
281043	CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	6347	CCL2	-1.74	0.004
281044	CCL8	chemokine (C-C motif) ligand 8	6355	CCL8	-1.90	0.020
281048	CD14	CD14 antigen	929	CD14	-1.66	0.000
533844	CD163	CD163 molecule	9332	CD163	-2.21	0.000
281095	CSF2	colony stimulating factor 2	1437	CSF2	-1.52	0.004
613667	CXCL3	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	2920	CXCL2	-2.05	0.000
281735	CXCL5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	6374	CXCL5	-2.07	0.000
535185	FBLN5	fibulin 5	10516	FBLN5	-1.59	0.018
511711	FGL2	fibrinogen-like 2	10875	FGL2	-1.52	0.008
515367	FSTL3	folliculin-like 3	10272	FSTL3	-1.52	0.000
538565	GLIPR2	GLI pathogenesis-related 2	152007	GLIPR2	-1.74	0.008
282879	HGF	hepatocyte growth factor	3082	HGF	-1.56	0.012
281814	HIF1A	hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	3091	HIF1A	-1.51	0.000
281233	IBSP	integrin-binding sialoprotein (bone sialoprotein, bone sialoprotein II)	3381	IBSP	-2.67	0.015
281839	ICAM1	intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor	3383	ICAM1	-1.96	0.001
404185	IGFBP5	insulin-like growth factor-binding protein 5	3488	IGFBP5	-1.85	0.002
281251	IL1B	interleukin 1, beta	3553	IL1B	-1.64	0.026
539334	IL1RAP	interleukin 1 receptor accessory protein	3556	IL1RAP	-1.51	0.007
280828	IL8	interleukin 8	3576	IL8	-1.97	0.003
281873	ITGA5	integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	3678	ITGA5	-1.51	0.000
282642	ITGB3	integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	3690	ITGB3	-1.86	0.000
536286	ITGB8	integrin, beta 8	3696	ITGB8	-1.69	0.030
281905	LTBP2	latent transforming growth factor beta binding protein 2	4053	LTBP2	-1.65	0.001
404179	LYVE1	extracellular link domain containing 1	10894	XLKD1	-1.66	0.004
281909	MANBA	mannosidase, beta A, lysosomal	4126	MANBA	-2.02	0.001
338037	MYLK	myosin, light polypeptide kinase	4638	MYLK	-1.59	0.000
521854	NID2	nidogen 2	22795	NID2	-1.56	0.000
507790	PF4	platelet factor 4	5196	PF4	-1.88	0.000
281408	PLAU	plasminogen activator, urokinase	5328	PLAU	-1.51	0.002
281983	PLAUR	plasminogen activator, urokinase receptor	5329	PLAUR	-1.90	0.000
615490	SMOC2	SPARC related modular calcium binding 2	64094	SMOC2	-1.55	0.005
504625	SORBS1	sorbin and SH3 domain containing 1	10580	SORBS1	-1.63	0.000
538957	TGFB3	transforming growth factor, beta 3	7043	TGFB3	-1.66	0.000

Bovine Entrez Gene ID	Bovine Entrez Gene symbol <sup>1</sup>	Bovine Entrez Gene description	Human Entrez Gene ID	Human Entrez Gene symbol <sup>1</sup>	FC ret/norm <sup>2</sup>	p.value adjusted <sup>3</sup>
281530	THBS1	thrombospondin 1	7057	THBS1	-1.78	0.000
338092	THBS2	thrombospondin 2	7058	THBS2	-1.57	0.002
282092	TIMP1	tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (erythroid potentiating activity, collagenase inhibitor)	7076	TIMP1	-1.51	0.002
404547	TREM1	triggering receptor expressed on myeloid cells 1	54210	TREM1	-1.83	0.006
282118	VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1	7412	VCAM1	-1.93	0.003
505366	WFDC1	WAP four-disulfide core domain 1	58189	WFDC1	-1.51	0.000
280713	ADM	adrenomedullin	133	ADM	1.56	0.000
280994	ALPL	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	249	ALPL	1.52	0.039
281667	CCNA2	cyclin A2	890	CCNA2	1.53	0.011
327679	CCNB1	cyclin B1	891	CCNB1	1.89	0.000
538436	CCNE2	cyclin E2	9134	CCNE2	1.56	0.000
509418	CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor	1436	CSF1R	1.52	0.000
504242	HDAC5	histone deacetylase 5	10014	HDAC5	1.71	0.000
281230	HPSE	heparanase	10855	HPSE	2.01	0.001
515823	LOC515823	keratin, type II cytoskeletal 8-like	3856	KRT8	1.50	0.002
505595	MCF2L	MCF.2 cell line derived transforming sequence-like	23263	MCF2L	1.52	0.001
404150	METAP2	similar to methionyl aminopeptidase 2	10988	METAP2	1.64	0.000
531092	MMP25	matrix metalloproteinase 25	64386	MMP25	1.68	0.000
281450	RELN	reelin	5649	RELN	2.43	0.008
540090	RNF2	ring finger protein 2	6045	RNF2	1.78	0.000
282356	SLC2A1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	6513	SLC2A1	1.51	0.000

<sup>1</sup> Offizielles Gensymbol nach NCBI (The National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>).

<sup>2</sup> Der FC ret/norm erläutert, um wievielfach sich die Zahl vom Anfangswert der „ret“-Tiere zum Endwert der „norm“-Tiere ändert. Er wird aus einem Verhältnis von Anfangswert und Endwert berechnet.

<sup>3</sup> korrigierter p-Wert aus der Limma-Analyse

### 3.10.2. Apoptose

Ein großer Anteil der DEGs wirken an dem Zusammenspiel von Mitose und/oder Apoptose oder gestörter Mitose mit, weshalb dem Ablauf des geregelten Zellzyklusses und dem Übergang in den programmierten Zelltod eine Schlüsselrolle bei der Nachgeburtsablösung einerseits und der Entstehung der *Ret. sec.* andererseits zukommt. Im funktionellen Netzwerk der Apoptose finden sich wiederum bestimmte „Keywords“ wie biologische Prozesse, zelluläre Komponenten und molekulare Funktionen mit Bezug zu Mitose, Apoptose- und Nekrosegesehen wieder. In Tabelle 10 werden die spezifischen DEGs mit Assoziation zur Apoptose aufgeführt. Anhand der Genexpression ist erkennbar, dass die Mitose-assoziierten Gene bei den Tieren mit *Ret. sec.* meist hochreguliert sind.

**Tabelle 10: Mittels CoPub-Analyse ermittelte Gene, die im Zusammenhang mit dem Apoptosegeschehen stehen**

Bovine Entrez Gene ID	Bovine Entrez Gene symbol <sup>1</sup>	Bovine Entrez Gene description	Human Entrez Gene ID	Human Entrez Gene symbol <sup>1</sup>	FC ret/norm <sup>2</sup>	p.value adj <sup>3</sup>
280985	ACAN	aggrecan 1 (chondroitin sulfate proteoglycan 1, large aggregating proteoglycan, antigen identified by monoclonal antibody A0122)	176	AGC1	-2.19	0.015
286806	ADAMTS4	a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 4	9507	ADAMTS4	-1.65	0.001
535185	FBLN5	fibulin 5	10516	FBLN5	-1.59	0.018
338037	MYLK	myosin, light polypeptide kinase	4638	MYLK	-1.59	0.000
281408	PLAU	plasminogen activator, urokinase	5328	PLAU	-1.51	0.002
281530	THBS1	thrombospondin	7057	THBS1	-1.78	0.000
338092	THBS2	thrombospondin 2	7058	THBS2	-1.57	0.002
535750	ALS2	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile)	57679	ALS2	2.48	0.000
504437	AURKA	aurora kinase A	6790	AURKA	1.57	0.002
360192	AURKB	aurora kinase B	9212	AURKB	2.09	0.000
538409	CASP6	caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase	839	CASP6	1.70	0.000
281667	CCNA2	cyclin A2	890	CCNA2	1.53	0.011
327679	CCNB1	cyclin B1	891	CCNB1	1.89	0.000
538436	CCNE2	cyclin E2	9134	CCNE2	1.53	0.011
615282	CDKN3	cyclin-dependent kinase inhibitor 3	1033	CDKN3	1.54	0.022
513678	CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	1111	CHEK1	1.52	0.002
615827	CKS1B	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B	1163	CKS1B	1.54	0.000
504746	ECT2	epithelial cell transforming sequence 2 oncogene	1894	ECT2	1.68	0.001
504350	ENPEP	glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A)	2028	ENPEP	2.33	0.000
614840	GAS2	growth arrest-specific 2	2620	GAS2	1.66	0.001
504242	HDAC5	histone deacetylase 5	10014	HDAC5	1.71	0.000
281230	HPSE	Heparanase	10855	HPSE	2.01	0.001
337870	MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	4085	MAD2L1	1.62	0.000
404150	METAP2	similar to methionyl aminopeptidase 2	10988	METAP2	1.64	0.000
523998	NEK2	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2	4751	NEK2	1.50	0.010
617707	PPAP2B	phosphatidic acid phosphatase type 2B	8613	PPAP2B	1.65	0.004
511264	SKP1	S-phase kinase-associated protein 1 pseudogene	6500	SKP1	1.91	0.000

<sup>1</sup> Offizielles Gensymbol nach NCBI (The National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>).

<sup>2</sup> Der FC ret/norm erläutert um wievielfach sich die Zahl vom Anfangswert der „ret“-Tiere zum Endwert der „norm“-Tiere ändert. Er wird aus einem Verhältnis von Anfangswert und Endwert berechnet.

<sup>3</sup> korrigierter p-Wert aus der Limma-Analyse

### 3.10.3. Differentielle Expression von Genen für Pregnancy Associated Glycoproteins

Der GeneChip<sup>®</sup> Bovine Gene 1.0 ST Array von Affymetrix (III2.4) ist speziell für die Microarray-Analyse für das bovine Genom hergestellt und somit werden auch Transkripte ermittelt, die nicht in den Software-Programmen der humanen Datenbanken aufgeführt sind. Um möglichst viel Information aus der DAVID-Analyse und aus CoPub zu erhalten, wurden dafür die zugewiesenen humanen Gen-Identifizierer (auch als Gen-IDs bezeichnet) verwendet. Für viele Datenbanken sind auch die bovinen Identifizierer nicht anwendbar bzw. liefern wesentlich weniger Informationen. Spezies-spezifische Gene für *Bos taurus* werden mit dieser Auswertungsstrategie jedoch nicht erfasst. Bei der Microarray-Analyse fielen beispielsweise viele der bovinen Gene für Pregnancy associated Glycoproteins (bPAGs) als differentiell exprimiert auf. Der Großteil der bPAGs wird in den TGCs exprimiert und produziert. Im vorliegenden Projekt wurden sie in den peripartalen „ret“-Plazentomproben als höher exprimiert identifiziert und sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: **Bovine Pregnancy Associated Glycoproteins, die differentiell exprimiert werden**

Bovine Entrez Gene ID	Bovine Entrez Gene symbol <sup>1</sup>	Bovine Entrez Gene description	FC ret/norm <sup>2</sup>	p.value.adj <sup>3</sup>
281964	PAG1	pregnancy-associated glycoprotein 1	1,9	0,0001
337898	PAG4	pregnancy-associated glycoprotein 4	1,8	0,0002
337899	PAG5	pregnancy-associated glycoprotein 5	2,5	0,0000
337900	PAG6	pregnancy-associated glycoprotein 6	2,3	0,0013
337901	PAG7	pregnancy-associated glycoprotein 7	2,7	0,0228
337903	PAG9	pregnancy-associated glycoprotein 9	1,8	0,0249
337909	PAG15	pregnancy-associated glycoprotein 15	2,4	0,0011
337910	PAG16	pregnancy-associated glycoprotein 16	1,9	0,0000
337911	PAG18	pregnancy-associated glycoprotein 18	2,6	0,0000
337912	PAG17	pregnancy-associated glycoprotein 17	2,6	0,0005
337914	PAG20	pregnancy-associated glycoprotein 20	2,0	0,0049
337915	PAG21	pregnancy-associated glycoprotein 21	2,4	0,0078
518205	MGC157405	pregnancy-associated glycoprotein	2,8	0,0398
784756	LOC784756	PAG17 protein-like	2,2	0,0017

<sup>1</sup> Offizielles Gensymbol nach NCBI (The National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>).

<sup>2</sup> Der FC ret/norm erläutert um wievielfach sich die Zahl vom Anfangswert der „ret“-Tiere zum Endwert der „norm“-Tiere ändert. Er wird aus einem Verhältnis von Anfangswert und Endwert berechnet.

<sup>3</sup> korrigierter p-Wert aus der Limma-Analyse

## V. DISKUSSION

### 1. Konzeptionelle Überlegungen zum Versuchsaufbau

Beim Rind wird seit Jahrzehnten zur Ätiologie der Nachgeburtsverhaltung geforscht. Bisher konnte keine alles dominierende Krankheitsursache identifiziert werden. Stattdessen vermutet man, dass multiple, oft auch zusammenhängende Faktoren, den nicht zeitgemäßen Abgang der fetalen Membranen bedingen. Den Anstoß, in diesem Zusammenhang eine holistische Studie mittels eines Whole-Transcript-Arrays durchzuführen, gaben die Resultate der ersten Transkriptomanalyse zur Physiologie der bovinen Nachgeburtsablösung beim Rind von STREYL et al. (2012). In dieser Studie wurde Plazentomgewebe von vier gesunden Kühen etwa eine Woche *a.p.* im Rahmen eines vorzeitigen Kaiserschnitts und von vier gesunden Kühen unmittelbar nach der Austreibung der Frucht (*i.p.*) transvaginal gewonnen und einer vergleichenden Analyse auf Ebene der mRNA-Expression unterzogen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass insbesondere Mechanismen des Umbaus der Extrazellulärmatrix, der Apoptose und der proinflammatorischen Immunantwort einen relevanten Einfluss auf die peripartale Genexpression im Plazentomgewebe haben. Daher lag die Vermutung nahe, dass auf Genexpressionsebene auch Hinweise auf Ursachen der *Ret. sec.* gefunden werden können. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie untermauern die Beobachtungen und Hypothesen, dass die vollständige Lösung der fetalen Eihäute zumindest hauptsächlich auf einer plazentalen Reifung mit vorausgegangenem Umbau der EZM inklusive des Untergangs der plazentären Epithelzellen durch Apoptose und auf proinflammatorischen Prozessen beruht (BOOS et al., 2003).

Im vorgestellten Projekt galt es auch, Kühe mit allgemein anerkannten Prädispositionen für die Entwicklung einer Nachgeburtsverhaltung, wie Hypokalzämie, Ketose (beide jeweils im subklinischen Bereich) und unphysiologische intrapartale P<sub>4</sub>-Werte bezüglich ihrer plazentären mRNA-Expression zu analysieren. Dabei wurde ein Vergleich von Tieren, die die oben genannten prädisponierenden Faktoren aufwiesen, jeweils mit und ohne *Ret. sec.* auf der Ebene der exprimierten mRNA aufgestellt. Tiere ohne Prädispositionen (auch mit und ohne *Ret. sec.*) wurden als Kontrollen herangezogen.



### 1.1. **Warum eine Analyse des Transkriptoms?**

Viele physiologische Prozesse gehen mit umfangreichen Veränderungen des Transkriptoms und/oder des Proteoms einher. Transkriptom- und Proteomanalysen stehen für eine holistische Erfassung komplexer Sachverhalte. Natürlich wäre ein denkbarer Weg auch die Erfassung und Quantifizierung aller Proteine des betroffenen Gewebes, also die Produktebene, gewesen. Die Proteomic stellt eine systematische Untersuchung von Proteomen dar, mit der die aktuell erfassbare Gesamtheit an in den zu untersuchenden Zelltypen, Geweben oder Flüssigkeiten exprimierten Proteinen analysiert werden kann (KIMURA et al., 2012). Aus verschiedenen Gründen ist die Proteomanalyse wesentlich schwieriger umzusetzen als eine Transkriptomanalyse. Auch ist momentan ein Verfahren zur Erfassung des vollständigen Proteoms nicht vorhanden. Daher werden in der Regel nur bestimmte Anteile des Proteoms untersucht, wie z.B. die jeweils in höchster Kopienzahl vorkommenden Proteinspezies. Für unsere Fragestellung wäre das kritisch gewesen, da die reine Kopienzahl nicht gleichsetzbar ist mit biologischer Wirksamkeit und Bedeutung.

Alternativ zur Proteomanalyse steht die Analyse des Transkriptoms. Grundsätzlich beschreibt das Transkriptom das komplette Set von Transkripten und deren Quantität in einer Zelle, abhängig von ihrem spezifischen Entwicklungsstadium oder physiologischen Zustand (WANG et al., 2009). Nukleinsäuren weisen als Vorteil definierte chemische Eigenschaften auf. Sie können in hoher Qualität aus Geweben isoliert und durch einfachere Verfahren mit hoher Empfindlichkeit reproduzierbar nachgewiesen werden. Die Nachweisverfahren nehmen einen geringen analytischen Platz ein und sind daher parallel durchführbar. Somit können in relativ geringen Zeitabständen komplette Transkriptomanalysen erfasst werden (MITTERHUEMER, 2009). Dabei können physiologische Prozesse untersucht werden, die mit einer erhöhten oder erniedrigten Transkript-Abundanz von Genen einhergehen. Prozesse, die dagegen nur auf der Proteinebene reguliert werden, wie z.B. über Phosphorylierungen von Proteinen oder deren Abbau, werden nicht erfasst (MITTERHUEMER, 2009). Genauso muss eingeräumt werden, dass durch physiologisch ablaufende post-transkriptionelle Regulationsmechanismen die detektierbare mRNA nicht immer mit der Menge tatsächlich gebildeter Proteine korreliert (MACDONALD, 2001).

### 1.2. Analysen des Transkriptoms mit DNA-Microarrays

Das Genom eines Säugetieres weist mehr als 20.000 proteinkodierende Gene auf, von denen jeweils mehrere mRNA-Isoformen transkribiert werden können. Deshalb werden zur Erfassung aller mRNA-Spezies einer Zelle sehr leistungsfähige Verfahren benötigt. Durch die Entwicklung von Microarrays (SCHENA et al., 1995; FREEMAN et al., 2000; SCHULZE & DOWNWARD, 2001) wurde es möglich, in einem einzigen Experiment die Transkriptionsraten aller bekannten mRNA-Spezies einer Zelle zu erfassen und genomweite Expressionsprofile zu erstellen. Als Vorbild dient der klassische Northernblot, der die Expression eines Gens durch Hybridisierung gegen in einem Gel separierte mRNA nachweist. Dieses Verfahren wird bei Analysen mit Microarrays umgekehrt und die komplette mRNA gegen definierte Sonden hybridisiert, die auf einem festen Träger aufgebracht sind (MITTERHUEMER, 2009). Das „Reverse Northernblotting“ weist zugleich den bedeutenden Vorteil auf, dass die Fläche für eine Sonde bis in den Bereich von einigen wenigen Quadratmikrometern ( $\mu\text{m}^2$ ) verkleinert werden kann.

Zurzeit stehen verschiedene Microarray-Technologien zur Verfügung, welche mit unterschiedlichen Ansätzen die Genexpression untersuchen und sich jeweils für spezielle Fragestellungen besonders gut eignen (AHMED, 2006; MANDRUZZATO, 2007). Da die meisten Systeme nur wenige  $\mu\text{m}^2$  pro Gensonde benötigen, können auf einem Quadratzentimeter mehrere Millionen verschiedener Sonden untergebracht werden. Auf diese Weise kann eine hohe Anzahl der Sonden gleichzeitig in einem Experiment unter identischen Bedingungen gegen eine komplexe Probe aus markierten Nukleinsäuren hybridisiert werden. Die Menge, die an der markierten Sonde gebundenen cDNA korreliert mit der Häufigkeit der zugehörigen mRNA im untersuchten Gewebe. Mit empfindlichen Nachweisverfahren können Gene erfasst werden, deren Transkripte in einfacher Kopie pro Zelle vorkommen (MITTERHUEMER, 2009). Der Schritt der Normalisierung der Daten ist ausschlaggebend für die Ergebnisse der jeweils exprimierten Gene (HOFFMANN et al., 2002). Im Rahmen des MicroArray Quality Control (MAQC) Project wurde die Leistungsfähigkeit verschiedener Microarray-Plattformen und alternativer Technologien untersucht (SHI et al., 2006). Mit der Einführung der sog. MIAME Guidelines wurde versucht, die Durchführung und Auswertung von Genexpressionsanalysen einheitlich nachvollziehbar zu machen, um in verschiedenen Laboren mit

verschiedenen Technologien produzierte Daten vergleichen zu können. Untersucht wurden die Ergebnisse von Analysen, die mit verschiedenen Microarray-Verfahren zur quantitativen Erfassung der Genexpression durchgeführt worden waren. Es konnte somit nachgewiesen werden, dass die Ergebnisse verschiedener Verfahren (z.B. TaqMan Gene Expression Arrays, StaRT-PCR, QuantiGene Reagent System) weitgehend übereinstimmen (CANALES et al., 2006). Jedoch wurden bei niedrig exprimierten Genen durch schwache Hybridisierungssignale nahe am „Hintergrundrauschen des Detektionsverfahrens“ weniger aussagekräftige Ergebnisse erhalten. Dennoch wurde aufgeführt, dass die Qualität der Ergebnisse von Microarray-Analysen durch Optimierung und Standardisierung der verwendeten Methoden verbessert werden konnte und dass die Methode bei verschiedenen Plattformen reproduzierbare Ergebnisse lieferte (YAUK & BERNDT, 2007). Ausführliche Untersuchungen in Bezug auf die Leistungsfähigkeit der Verfahren haben gezeigt, dass das Transkriptom von Säugetieren eine beträchtlich große Anzahl von Transkripten enthält, die nicht für Proteine kodieren und deshalb als noncoding RNA (ncRNA) bezeichnet werden (CARNINCI et al., 2005; KATAYAMA et al., 2005). Diese sind nicht mit den üblichen Hochleistungsarrays erfassbar, sofern sie noch unbekannt sind. Da bisher vermutlich noch eine hohe Anzahl an unbekannten Transkripten vorhanden ist, kann das bovine Transkriptom noch nicht vollständig interpretiert werden.

Im vorliegenden Projekt wurde für den experimentell-analytischen Ansatz die für das bovine Genom zurzeit modernste Version von Microarrays, der GeneChip® Bovine Gene 1.0 ST Array von Affymetrix (III2.4) verwendet. Es ist der erste ST Array für das Rind. Bei Anwendung dieser Methodik werden auch ohne Beschränkung auf bestimmte Kandidatengene umfangreiche und detaillierte Geninformationen ermittelt.

Bei der Analyse der großen Datenmenge der Plazentomproben, die alle in einem vergleichbaren Zeitraum der plazentären Reifung genommen wurden, besteht das analytische Problem des physiologischen „Hintergrundrauschens“: Bei allen Tieren hat die Regulation für die Plazentaablösung eingesetzt; Ausmaß und Stadium des Prozesses ist aber unterschiedlich. Durch die hohe Anzahl der untersuchten Gene (22.166 Transkripte) entsteht dabei ein verstärktes „Hintergrundrauschen“. Die differentielle Expression einzelner relevanter Gene, die für die Ablösung der *Secundinae* verantwortlich sein könnten, kann dadurch

übersehen werden. Entgegen unseren Erwartungen zeigten die Tiere bzw. deren Plazentomproben auf Transkriptomebene weder eine Clusterung anhand ihrer Prädispositionsgruppen noch anhand des Erkrankens an einer *Ret. sec.* Den methodisch-analytischen Durchbruch brachte eine Fokussierung auf die differentiell exprimierten Gene (DEGs) der Vorläuferstudie von STREYL et al. (2012; 1.273 DEGs im Plazentom gesunder peripartaler Tiere) beim Vergleich der Expressionsprofile der 40 untersuchten Proben. Die Analyse dieser „Markergene“ ergab für 18 Proben eine deutliche Clusterung in jeweils neun Tiere mit („ret“) und neun ohne („norm“) Nachgeburtsverhaltung.

Aufgrund der signifikanten Unterschiede bezüglich der DEGs der Plazentomproben bei 18 von 40 Kühen kann auch auf Ebene der Genexpression ein Zusammenhang vom biomechanischen Komplex der Reifung der Plazenta mit dem Pathomechanismus der Nachgeburtsverhaltung geschlossen werden.

In der folgenden Diskussion werden ganz überwiegend die Resultate der Genexpressionsanalyse dieser 18 Tiere (IV3.6) berücksichtigt. Hier wird ein klarer Kontrast des biologischen (Reifungs-) Zustands deutlich. Im Vergleich der Genexpressionsdaten der übrigen 22 Plazentomproben (elf „norm“- und elf „ret“-Tiere) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die paarweisen Korrelationskoeffizienten lagen bei fast allen paarweisen Vergleichen bei ca. 0,9. Das offenbart, dass sich die Datensätze der einzelnen Proben relativ ähnlich sind und keine deutlichen Unterschiede zwischen den "ret"-Proben und den "norm"-Proben bestehen. Ursachen sind z.B. in dem oben genannten sog. „Hintergrundrauschen“ in den Datensätzen zu suchen. Die Ablösung der fetalen Membranen stellt zudem einen relativ lang andauernden Reifemechanismus dar, der schon einige Wochen vor der Abkalbung beginnt und mit der Austreibung der Frucht immer noch nicht vollständig abgeschlossen ist. Der Vorgang ist durch diverse physiologische Prozesse im Gewebe gekennzeichnet, die bei allen Bovidae gleichermaßen eine geraume Zeitdauer benötigen und in dreidimensionaler Ebene ablaufen. Somit kann angenommen werden, dass alle Tiere grundsätzlich zwar die gleichen biologischen Prozesse durchlaufen, aber (in unserer Studie) bedingt durch das eng gefasste Zeitfenster der Probenentnahme, aufgrund der biologischen Variabilität die entscheidenden Regulationsmechanismen in einigen Fällen schon abgelaufen waren oder noch bevorstanden. Hintergrund: Die Definition der Nachgeburtsverhaltung als „Zurückbleiben der Eihäute über einen Zeitraum von 12 h *p.p.* hinaus“ beruht v.a. auf klinischen

Parametern und Beobachtungen. Tatsächlich lösen sich die Eihäute bei einem Großteil der Tiere schon innerhalb der ersten 4 h *p.p.* Somit ergibt sich eine Zeitspanne von etwa 3 bis 12 h nach der Kalbung, in der viele biologische Prozesse nicht ganz zeitsynchron ablaufen. Bei einer Beprobung direkt nach dem Partus (wie hier erfolgt) kann diese Individualität nicht gut erfasst werden.

Nach Bestätigung der Clusterung der neun „ret“- und neun „norm“-Tiere aus der paarweisen Korrelationsanalyse mittels einer hierarchischen Cluster-Analyse (IV3.5) aus dem limitierten Datensatz von 1.226 beim Vergleich der in beiden Studien übereinstimmenden Genen, erfolgte eine eingehende Betrachtung der 801 DEGs. Anhand der funktionellen Analyse mit Hilfe von DAVID (IV3.8) konnte eine Gliederung der Gene in ihrer Bedeutung für die diversen Stoffwechselprozesse vorgenommen werden. Der Einfachheit halber und zum besseren Verständnis wird im Folgenden die Änderung von „mRNA-Konzentrationen“ als „hochreguliert“ oder „herunterreguliert“ bezeichnet.

## **2. Funktion und Regulation der extrazellulären Matrix (EZM) im bovinen peripartalen Plazentom bei Tieren mit *Ret. sec.***

Zell-EZM-Interaktionen, Zellmigration und -invasion spielen eine entscheidende Rolle im Umbau der EZM. Nur so können diverse physiologisch relevante Prozesse der Embryogenese, Differenzierung, Zellmigration, Wundheilung und der programmierte Zelltod nach geordneten Signalkaskaden ablaufen (DILLY et al., 2010). Der überwiegende Anteil des EZM-Umbaus geschieht während der Wachstums- und Entwicklungsphasen, aber auch in pathologischen Stadien wie z.B. beim Krebs. Die Modifizierung der EZM ist ein wesentlicher Teil der Entwicklung, der Morphogenese und des Gewebeumbaus. In diesen Prozessen spielen die Zelloberfläche und die EZM-Proteasen eine entscheidende Rolle. Eine große Anzahl an Molekülen mit Proteasenaktivität ist in proteolytischen Prozessen der EZM beteiligt. Auch darf man hier wiederum nicht das Zusammenwirken mit immunologischen Prozessen vergessen, die häufig zeitgleich oder als Folge stimuliert sind. Die Proteasen können anhand ihrer ausgeprägten Strukturdomänen in verschiedene Proteinfamilien eingeteilt werden. Die Interpretation der Ergebnisse der Studie bezüglich der Beteiligung von MMPs

an der Nachgeburtsablösung bzw. der *Ret. sec.* erfolgt im Folgenden auf Basis dieser Einteilung.

Zur besseren Verständlichkeit sind im Folgenden die mRNA-Ergebnisse kursiv aufgeführt, während die mRNA-Produkte in nicht kursiver Schreibweise beibehalten werden.

## 2.1. Proteasen und Protease-Inhibitoren

### 2.1.1. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

Es gibt verschiedene Typen von Proteasen, die am Matrix-Umbau beteiligt sind. Die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind Proteinasen, die überwiegend beim Abbau der Proteine der extrazellulären Matrix, wie z.B. Kollagene, Laminine, Aggrecane von Bedeutung sind (BREW et al., 2000). Die Expression der meisten MMPs wird transkriptionell über Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine, Zell-Matrix-, Zell-Zell-Interaktionen und zelluläre Transformationen reguliert. Die Enzyme agieren vor allem auf der Zelloberfläche oder aber auch im Extrazellular-Raum. Die MMPs werden als inaktive Proenzyme sezerniert; ihre Aktivierung geschieht durch Spaltung des N-haltigen Terminus der Propeptide (DILLY et al., 2010). Eine erhöhte MMP-Expression und Aktivität führt zu Gewebsinvolution durch den stimulierten EZM-Umbau; sie fördert die Zelldifferenzierung und wirkt bei der Apoptose mit (RICKE et al., 2002). Eine unkontrollierte Stimulation führt zu einer großen Vielfalt von Erkrankungen, wie z.B. Arthritis, Tumorzellmetastasierung und Atherosklerose. Reguliert werden die MMPs hauptsächlich durch Kombinationen aus Zymogenaktivierung und –hemmung, durch endogene Inhibitoren wie  $\alpha_2$ -Macroglobulin und den Tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs) (BREW et al., 2000). Die TIMPs werden als die Hauptregulatoren der MMPs im Gewebe betrachtet. Änderungen in der EZM kann biologische Prozesse in jeglicher Hinsicht beeinflussen (NAGASE & WOESSNER, 1999). Diese Änderungen wirken sich auf Formationen der Zelloberfläche, -form und die Motilität der Zellen aus (BREW et al., 2000).

Während eines Entzündungsprozesses sezernieren polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNs) Proteasen, inklusive MMP25, welches eine Neutrophilen-spezifische Membrantyp-MMP ist, MMP8 und antimikrobielle Peptide, um den Umbau des vorliegenden Gewebes oder dessen Abbau zu stimulieren (NIE & PEI, 2004). In vorliegender Expressionsstudie wurde *MMP25* mit einem Fold Change (FC) von 1,7 bei den Tieren mit *Ret. sec.* stärker exprimiert. Die PMNs

phagozytieren Pathogene und senden lösliche Mediatoren, einschließlich proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, aus, um eine Entzündungsreaktion hervorzurufen. Die dabei absterbenden PMNs werden nach Erkennen eines „Ess mich“-Signals auf ihrer Oberfläche durch Makrophagen verdaut. Dieses Schlüsselereignis aktiviert die Kaskade der Phagozytose und ist das wichtigste Element des EZM-Umbaus und der Auslösung eines proinflammatorischen Prozesses im Gewebe. Bei der Leukozyten-vermittelten MMP-Regulierung durch PMNs und Makrophagen ist die Rolle von *MMP25* immer noch ungenügend erforscht. Das membrangebundene Leukolysin, welches den Chemokin-Prozess anregt, kommt gehäuft in Gelatinase-Granula der PMNs vor, findet sich aber auch in der spezifischen Granula mit sekretorischen Vesikeln. Stimulation durch Chemokin-Ligand IL8 und Interferon- $\gamma$  induziert ein erhöhtes Ausschütten von *MMP25*. *MMP*-gespaltenes Vimentin potenziert die Phagozytose. Dies führt zu einer Makrophagen-assoziierten Phagozytose durch apoptotisch-markierte PMNs (STARR et al., 2012). Im Gegensatz zu allen anderen MMPs bewirkt *MMP25* eine Neutrophilen-Migration. PMNs sind kurzlebige Zellen und unterlaufen konsequent einem programmierten Zelltod. Dabei werden die alten und unbrauchbaren PMNs entfernt, damit die Antwort auf infektiöse Entzündungen zum Abschluss kommen kann. Die Apoptose charakterisiert einen präzisen Ablauf spezifischer morphologischer und molekularer Veränderungen, an dem die differentielle Expression membrangebundener Moleküle gebunden ist. Auf der Zelloberfläche junger, noch nicht verbrauchter PMNs findet man keine gebundenen *MMP25*-Proteasen. Im Gegensatz dazu weisen PMNs, die das Programm des definierten Zelltodes durchlaufen, ein hohes Aufkommen an *MMP25* auf ihrer Oberfläche vor. Eine Induktion der Apoptose führt somit zu einer Relokalisation des *MMP25* an die Zelloberfläche der PMNs (FORTIN et al., 2010). Diese variierende enzymatische Funktion multipler Stadien des Entzündungsprozesses lässt vermuten, dass *MMP25* v.a. an der bioaktiven Molekülspaltung der Zelloberfläche teilnimmt, was ein chemoattraktives Signal für Monozyten darstellt (STARR et al., 2012).

Es wurde beobachtet, dass *MMP25* in bestimmten Medien *in vitro* nicht in der Lage war, *MMP2*-Proenzym zu stimulieren. Andere Studien haben aber in zellfreien, flüssigen Medien gezeigt, dass die katalytische Domäne von *MMP25* die Prodomänen-Sequenz von pro-*MMP-2* ähnlich der Abspaltung durch MT1-MMP zu lösen vermag, nur deutlich ineffizienter. Reifes *MMP25*-Enzym befindet

sich auf der Zelloberfläche im Extrazellulärraum, in dem nur eine geringe Anzahl von Proenzymen im Gegensatz zum Zellinneren präsent ist. Pro-MMP2 vermag als Gelatinase Kollagen I und II, aber auch Kollagen IV und V, also die Hauptbestandteile der Basalmembran, zu spalten. Im Uterus kommt MMP2 durch Aktivierung der PGF-Synthese bei der Ablösung der fetalen Membranen eine wichtige Rolle zu (WEINREB et al., 1997; YOSHIDA et al., 2002). Im maternalen Anteil der Plazenta bei Kühen ohne *Ret. sec* wurde dagegen eine höhere Aktivität von Pro-MMP2 nachgewiesen (MAJ & KANKOFER, 1997).

Die Hochregulierung von *MMP25* in den Proben der Tiere mit *Ret. sec*. kann ein Hinweis sein, dass der Mechanismus des Umbaus der EZM noch nicht vollständig stimuliert ist, also noch im Anfangsstadium der plazentalen Reifung und den Prozess somit verzögert. Bei den Proben der Tiere ohne *Ret. sec*. kann die niedrigere Expression von *MMP25* daher so interpretiert werden, dass hier der Prozess der EZM-Auflösung schon nahezu abgeschlossen ist. Es wird aufgeführt, dass die gefundenen Inhibitoren von *MMP25* als wertvolle molekulare Handwerkzeuge fungieren und ein Anfang zur Entwicklung von pharmakologischen Inhibitoren sein könnten (RADICHEV et al., 2010). Vielleicht können bei der weiteren Beforschung von Inhibitoren auch Aktivatoren ermittelt werden.

Einige Substrate von *MMP25* sind bisher erforscht worden. Darunter findet man z.B. Fibrillin-1, Syndecan-4, Kollagene Typ I, II, IV und VI, Galectin-1 und Osteonektin oder Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) (STARR et al., 2012). SPARC stellt einen Prototyp der extrazellulären Proteasen dar. Es ist am Umbau der EZM und der Wundheilung beteiligt und reguliert als Prototyp auch die MMP-Synthese (MCPARLAND et al., 2001). SPARC related modular calcium binding 2 (*SMOC<sub>2</sub>*; FC = -1,51) gehört auch zu der BM-40/SPARC-Familie und zeigt ebenso während der Embryogenese, Angiogenese und der Wundheilung eine hohe Genexpression. Es wird vermutet, dass *SMOC<sub>2</sub>* sowohl Interaktionen zwischen den Integrinen und der EZM als auch mitogene Eigenschaften besitzt und so Kommunikation zwischen den Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren vermittelt (PAZIN & ALBRECHT, 2009).

### 2.1.2. Tissue Inhibitor of Matrix Metallopeptidasen (TIMPs)

TIMPs sind Proteine mit variierenden Funktionen und scheinen somit in der Trophoblastinvasion sowie Differenzierung und Reifung der bovinen Plazenta



involviert zu sein (DILLY et al., 2010). *TIMP1* wurde in vorliegender Studie bei den Tieren mit *Ret. sec.* als 1,5fach herunterreguliert gefunden, was sowohl eine Reduktion der MMP-Regulierung als auch der EZM-Prozesse zur Folge haben kann und auch hier für eine Verzögerung des auflösenden EZM-Prozesses in den Proben der Tiere mit *Ret. sec.* spricht. Beispielsweise ist MMP9 für physiologische und pathologische Prozesse, wie z.B. die Wundheilung, Implantation, Angiogenese und Tumormetastasierung verantwortlich und wird vorwiegend von *TIMP1* reguliert. Daher kann eine MMP9/TIMP1-Imbalance zu einer Reduzierung der Trophoblastzellinvasion führen (LUO et al., 2011). Die Aktivität von pro-MMP9 konnte zuerst nur in den maternalen Anteilen der bovinen Plazenta festgestellt werden (MAJ & KANKOFER, 1997). Wenig später konnte MMP9 während der ganzen Trächtigkeit in den Trophoblastzellen lokalisiert werden (WALTER & BOOS, 2001). In der Plazenta der Frau wurde eine hohe MMP9-Aktivität in diversen Regionen der feto-maternalen Kontaktzonen, einschließlich der Anheftungsvilli, der Basallamina und der *Decidua* lokalisiert. Somit wird MMP9 in der Humanmedizin als entscheidender Faktor zur Lösung der Nachgeburt angesehen. Die aktive MMP9-Umbaukapazität gilt als Voraussetzung für die Gewebemodifizierung, die Zellmigration der TGCs während der ganzen Gestation und für die Lösung der *Secundinae* nach der Geburt. Genauso wird TIMP1 eine wichtige Rolle im Umbauprozess und somit auch dem Reifeprozess der Plazenta zugeschrieben (DILLY et al., 2010). Das Zusammenspiel von MMP9 und TIMP1 wird sowohl in der humanen als auch in der bovinen Plazenta durch Epidermal Growth factor (*EGF*) reguliert. Durch erhöhtes Aufkommen von *EGF* wird pro-MMP9 und TIMP1 aktiviert, was zur Migration und Invasion der Trophoblastzellen führt. Die gleichzeitig erhöhte Stimulation von MMP9 und TIMP1 muss nicht immer eine Hemmung von MMP9 bewirken, da es einerseits einen Regulator der MMPs darstellt und andererseits unabhängig von der hemmenden Kapazität auch Zellproliferation fördert (DILLY et al., 2010).

*Transforming-Growth-Factor  $\beta$*  (*TGFB3*; FC = -1,7) steigert die mRNA-Expression von *TIMP*, währenddessen Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ; FC = -1,6) spezifisch die Expression von *TIMP1* und 3 in humanen Stromazellen des Endometriums hemmt (HUANG et al., 1998). Da stellt sich die Frage, ob die Herunterregulierung beider Faktoren eine verringerte *TIMP1*-Expression bewirkt. Die Gruppe um HIRATA et al. (2003) vermutet, dass verschiedene und

einzigartige Regulationsmechanismen für die *TIMP1*-Expression in der bovinen maternal-fetalen Kontaktzone verantwortlich sind. Stimulierend auf die Expression wirken z.B. TGF $\beta$ , IGF-I, IL-1 $\alpha$  und TNF $\alpha$ ; inhibitorischen Einfluss übt IL-1 $\beta$  aus. Darüber hinaus haben sie herausgefunden, dass der Wirkmechanismus von TIMP1 auf Translationsebene moduliert werden kann. Sie gehen davon aus, dass diese Regulationsform auch im bovinen Endometrium und in den TGCs auf gleiche Weise stattfindet. *TIMP2*-Aktivität kommt zuerst eine wichtige Rolle in der Trächtigkeitserhaltung zu, indem es die Lösung der fetalen Membranen von den maternalen Karunkeln verhindert, um dann *p.p.* die Kontrolle über den physiologischen Abgang der Nachgeburt zu erhalten. Die Proteasen stehen unter dem Einfluss der steroidabhängigen Enzyme und es wird vermutet, dass sich durch die synergistische Wirkung der Proteasen und Enzyme die physiologische Ablösung der *Secundinae* vollziehen kann (TAKAGI et al., 2007). Bei den verschiedenen Funktionen von TIMP2 stellt sich die Frage, ob auch TIMP1 in der Lage ist, diese Prozesse zu vermitteln.

#### 2.1.3. A Disintegrin and Metalloproteinase domain (ADAM)

ADAMs, auch Adamalysine genannt, stellen eine große Familie von transmembranen Glykoproteinen dar (SEALS & COURTNEIDGE, 2003). Sie haben unmittelbaren Einfluss auf die Proteolyse der EZM und wirken an der Zell-Zell-Adhäsion, Fusion und der intrazellulären Signalkaskade mit.

*ADAM19* (FC = -1,6), auch Meltrin  $\beta$  genannt, enthält eine Metalloproteinase-Domäne mit einer typischen zinkbindenden Sequenz, welche eine wichtige Funktion im Abbau und Umbau der EZM hat (ZHAO et al., 2001). Es besitzt, durch die Aktivierung einer Furin-ähnlichen Proprotein-Konvertase proteolytische Aktivität (ZHAO et al., 2001; KANG et al., 2002). *ADAM19-RNA* wird in Plazenta, Herz, Hirn, Lunge, Blase, Milz, Appendix, Kolon, Lymphknoten und Skelettmuskel exprimiert (WEI et al., 2001). *ADAM19* wird in der menschlichen Plazenta hoch exprimiert, bei der Maus kommt ihm eine entscheidende Aufgabe während der Embryonalentwicklung zu (KURISAKI et al., 1998). Aufgrund der Feststellung hoher Expressionslevel von *ADAM19* in den plazentaren Villi, den trophoblastischen Reihen und den Stromazellen, ist es vorstellbar, dass *ADAM19* an der Trophoblastinvasion, welche als Voraussetzung für die Implantation stattfinden muss, und am EZM-Abbau in den mittleren und späten Stadien der Implantation beteiligt ist (WANG et al., 2005). In der Studie von STREYL et al.

(2012) wurde *ADAM19* *i.p.* hochreguliert. Durch Herunterregulierung in vorliegender Studie bei den Tieren mit *Ret. sec.* kann sich die proteolytische Aktivität während des EZM-Umbaus vermutlich nicht vollständig entfalten und es liegt nicht fern zu vermuten, dass deren Einfluss auf den EZM-Umbau eine ungemein wichtige Voraussetzung für die Reifung der Plazenta und den Abgang der fetalen Membranen ist. Es bedarf weiter zu klären, in welchen weiteren Stadien der Gestation *ADAM19* und der Rest der *ADAM*-Familie in physiologischen Prozessen ihre volle Wirkung entfalten. Die Entwicklung einiger synthetischer Inhibitoren v.a. zur Hemmung der MMPs, um unkontrollierte Aktivität in Form von Tumormetastasierung zu bewirken, ist vorangeschritten. Die katalytische Aktivität von *ADAM8* und *ADAM19* ist z.B. sensibel gegenüber dem Hydroxamsäure-ähnlichen Inhibitor BB94 (Batimastat) (ELSO et al., 2004). Vielleicht kann daran angeknüpft werden.

#### 2.1.4. **A Disintegrin and Metallopeptidase domain with Thrombospondin Motif (ADAMTS)**

Bis heute sind 19 verschiedene ADAMTS-Proteasen identifiziert worden, wobei ihre Funktion noch nicht vollständig geklärt ist (JONES & RILEY, 2005). ADAMTS haben charakteristische ADAM-like Proteasen-Domänen, eine Disintegrin-like und eine Cysteinreiche Domäne. Der Unterschied zu den ADAMS liegt in ihrer Thrombospondin type 1 (THBS1)-repeat-Region. Sie sind aktiv sezernierte Metalloproteinasen, die an die EZM binden (TANG, 2001). *ADAMTS4* (FC = -1,6) und 5, auch Aggrecanasen genannt, sind überwiegend am Umbau der Knorpelzellen bei arthritischen Erkrankungen beteiligt (TANG, 2001). Zusätzlich spaltet *ADAMTS4*  $\alpha_2$ -Makroglobulin (TORTORELLA et al., 2004a) und Versikan, ein wichtiger Gefäßwandbestandteil (SANDY et al., 2001; WAGSÄTER et al., 2008). Für *ADAMTS5* konnte zudem die Expression in der Plazenta gezeigt werden (TANG, 2001). Die herunterregulierte Expression und Produktion von *ADAMTS4* im Plazentomgewebe von „ret“-Tieren in vorliegender Arbeit ist ein Indiz für herabgesetzte Aktivität beim Umbau der EZM. Es konnte demonstriert werden, dass *ADAMTS4* durch die Interaktion mit Fibronektin gehemmt wird (ELSO et al., 2004). Aber es sind noch weitere Studien über die Art und Weise der Hemmungsmechanismen notwendig. Genauso sollte der Fragestellung weiter nachgegangen werden, in welchem Zeitraum der Trächtigkeit *ADAMTS4* differentiell exprimiert wird. *ADAMTS4* als auch

ADAMTS5 werden durch Proteolyse von  $\alpha_2$ -Makroglobulin (FC = -1,5) gehemmt, was zu einer ausschlaggebenden Konformationsänderung der Proteasen führt. Gleichzeitig fungiert  $\alpha_2$ -Makroglobulin als Substrat für die Aggrecanasen (TORTORELLA et al., 2004b).

Die Hypothese, dass die MMP-Aktivität bei Kühen mit und ohne Nachgeburtsverhaltung differiert, kann durch diese Arbeit bestätigt werden. Schon bei der Vorläuferstudie konnten Unterschiede der MMP-Expression im bovinen Plazentomgewebe gesunder Kühe *a.p.* und *i.p.* festgestellt werden (STREYL et al., 2012). Hier zeigt sich nun, dass bei Tieren mit *Ret. sec.* die Genexpression der meisten Proteasen und ihrer Regulatoren verringert ist und dem Genexpressionsprofil der unreifen *a.p.* gewonnenen Plazentomproben ähnelt. In einer Studie über die Erkrankung der Arthritis konnte demonstriert werden, dass eine kombinierte Therapie mit Oncostatin M (OSM) und Interleukin-1 (IL-1) einen synergistischen Effekt auf die Zerstörung von Knorpel zeigt. Aufgrund erhöhter proinflammatorischer Signale erfolgt eine Protein-Kinase (PKR) - Expression und -Stimulation in den frühen Stadien einer Osteoarthritis, die die Expression von *MMP9* stimuliert und somit *ADAMTS4*, *5* und *TNF $\alpha$* -mRNA-Expression erhöht. Ebenso sollen OSM und IL-1 über eine Signalkaskade die Aktivierung von *MMP13* bewirken, welches Kollagen II spalten kann (GILBERT et al., 2012). Die synergistische Therapie mit OSM und IL-1 könnte evtl. auch eine erhöhte *ADAMTS4*-Expression im Plazentagewebe bewirken und so die Ablösung der fetalen Membranen pharmazeutisch unterstützen, weil es auch die Expression anderer Matrixgene, wie Kollagen 2A, 9A1, 11A1 und ACAN herabsetzt. Im Moment stehen dem die immens hohen Kosten im Wege.

#### 2.1.5. Plasminogen-Activator, Urokinase (PLAU), Plasminogen-Activator, Urokinase Rezeptor (PLAUR)

Der Urokinase-type-plasminogen-activator (*PLAU*; FC = 1,5) wandelt Plasminogen in Plasmin um, eine Serinprotease, die eine Kaskade von proteolytischen Abläufen aktiviert und zu einem Umbau verschiedener Komponenten der EZM führen kann. *PLAU* kann an einen spezifischen Urokinase-type-plasminogen-activator-Rezeptor (*PLAUR*; FC = -1,9) binden, der an der Zelloberfläche durch einen Glykophosphoinositol-Schwanz verankert ist. Desweiteren geht *PLAUR* Bindungen mit einigen Integrinen (z.B.  $\alpha_v$  und  $\beta_3$ ) ein und modifiziert so deren Funktionen. *PLAUR* soll eine proteolytische Aktivität

von PLAU an der Zelloberfläche fokussieren, um so eine amplifizierende Plasminogenaktivierung zu erhalten. Es wurde gezeigt, dass PLAUR direkt an der Chemotaxis, Zelladhäsion und Migration beteiligt ist (RAGNO et al., 1999). Weiterhin wurde festgestellt, dass PLAU Einfluss auf die Zellmigration in humanen Epithelzellen und bovinen Endothelzellen hat und dadurch das Zellwachstum beeinflusst (TARUI et al., 2003). Die Zellmigration ist ein integrierter, mehrstufiger Prozess, der von Wachstumsfaktoren und EZM-Proteinen reguliert wird und dabei an Integrine bindet, welche somit indirekt auch vom *PLAU/PLAUR*-System reguliert wird. Diese Aktivität spiegelt möglicherweise einige Fähigkeiten von PLAUR wieder, z.B. direkt an Vitronektin zu binden oder mit Integrinen Bindungen einzugehen und somit deren Funktionen modulieren zu können. Es kann Zellsignalreaktionen, die die Zellmigration sowohl stabilisieren und als auch in die regelrechte Richtung weisen (CHAPMAN, 1997). Die verminderte Expression von beiden Molekülen in den Plazentomproben von Tieren mit *Ret. sec.* scheint die Funktion der einzelnen Proteasen als auch das Zusammenwirken der beiden zu einer herabgesetzten Signalkaskade, Integrinbindung, Zellmigration und Proteasenfunktion zu führen. Auch hier lassen sich die nicht abgeschlossene Ausreifung und die nicht ausreichend wirkende Apoptose im Fall einer Nachgeburtsverhaltung erklären. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass die Aktivierung der MMPs durch das Plasminogensystem, welches durch die Balance von den Stimulatoren PLAU und PLAUR und deren Plasminogenaktivator-Inhibitoren (PAIs) kontrolliert ist, reguliert wird. Es wurden einige molekulare Interaktionen zwischen dem fibrinolytischen und MMP-System beobachtet. Bei Hemmung dieser Abläufe kommt es zu einer Verzögerung oder zu einer kompletten Störung der Wundheilung (GOLDMAN & SHALEV, 2003).

## 2.2. Strukturelle und regulatorische Bestandteile der EZM

Die Thrombospondine (THBS) sind eine kleine Familie von derzeit 5 bekannten sezernierenden, modularen Glykoproteinen (THBS1 bis THBS5) mit verschiedenen Funktionen (ADAMS, 2001; BORNSTEIN, 2001). Sie stellen große extrazelluläre Makromoleküle dar, die an der Zell-Zell- und an der Zell-Matrix-Kommunikation teilnehmen und mit verschiedenen EZM-Proteinen einschließlich Kollagen, Fibrinogen und Fibronektin interagieren (KRADY et al., 2008). THBS1 und THBS2 weisen hohe Ähnlichkeit auf und bilden eine

Subfamilie (Subgroup A) innerhalb der Thrombospondine. Bei Tieren mit Nachgeburtsverhalten war *THBS1* 1,8-fach herunterreguliert. Sowohl in der Vorläuferstudie von STREYL et al. (2012) als auch bei der Frau (LIM et al., 2012) konnte gezeigt werden, dass *THBS1* in der Geburtsphase hochreguliert ist. Desweiteren interagiert THBS1 mit zahlreichen Rezeptoren, wie z.B. CD36, CD47, Kollagen Typ 5, Gerinnungsfaktoren und verschiedenen Integrinen (MUMBY et al., 1984). Es bindet an TGF $\beta$  und den Platelet transforming growth factor (PDGF). Durch die Bindung von TGF $\beta$  erfolgt seine Aktivierung, was die Synthese von Kollagenen und anderen Matrix-Molekülen induziert (WYNN, 2008). THBS1 aktiviert TGF $\beta$  im Epithelgewebe (MURPHY-ULLRICH et al., 1992). Es zeigt eine beträchtlich höhere Bindung an Kollagen Typ V in Abwesenheit von Kalziumionen (GALVIN et al., 1987). Zudem kann THBS1 durch Bindung an Fibronectin in die EZM eingebaut werden (LAHAV et al., 1982). Fibronectin ist die bedeutendste EZM-Komponente im Granulationsgewebe. Fibroblasten binden primär an Fibronectin, welches aus Plasma und Zellen stammt, über den heterodimeren Zelloberflächen-Rezeptor  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin und baut Fibronectin zu unlöslichen Fibrillen zusammen. Die Regulation der extrazellulären Proteasen ist ein kritischer Punkt des EZM-Umbaus. Zusätzlich hemmt es die Aktivierung von Plasmin, dem Urokinase-Plasminogen-Aktivator, der Neutrophil-Elastase und den MMPs (ANONICK et al., 1993). Die Fähigkeit von THBS1, ein breites Spektrum an Proteasen hemmen zu können, scheint die neu geformte EZM während des Umbaus zu schützen und zu stabilisieren (TAN & LAWLER, 2009). Es hemmt die Proliferation vaskulärer Endothelzellen und die Morphogenese. Zusätzlich hat THBS1 anti-inflammatorische Eigenschaften, die durch die Multi-Organ-Entzündung in THBS1-Nullmäusen und bei Suppression von Zytokinausschüttung nachgewiesen werden konnten (NARIZHNEVA et al., 2005). Einige Wirkmechanismen von THBS1 sind immer noch nicht vollständig geklärt, wie z.B. die Bindung an CD36 bei einer Verletzung der Gefäße, welche folglich zur Apoptose der Endothelzellen führt. Dies kann schlussfolgernd auch auf die Reifung der Plazenta und Ablösung der Secundinae mit folgendem Apoptose-Programm im bovinen Uterus bezogen werden, da die mRNA-Konzentrationen von *THBS1* in vorliegender Studie herabgesetzt sind.

*THBS2* (FC = -1,6) ist noch nicht so umfassend studiert. Durch seine hohe Ähnlichkeit zu THBS1 wird angenommen, dass es an dieselben Rezeptoren

binden kann. Tatsächlich wurde aufgeführt, dass CD36, Heparansulfat-Proteoglykan,  $\alpha_5\beta_3$ -Integrin, LRP auch als Rezeptoren für THBS1 fungieren können. Wie auch THBS1 kann THBS2 durch Hemmung der vom basischen Fibroblasten-growth-factor induzierten Migration, der induzierten sauren lysophosphatischen Mitogenese und der Formierung der fokalen Bindung direkten Einfluss auf die Endothelzellen nehmen (KRADY et al., 2008). In nachgeschalteten Abläufen wurde festgestellt, dass es zu einer Aktivierung von p59fyn kommt, welche p38 mitogen-activated protein kinases (MAPK) und Caspase 3-like Proteasen aktiviert und somit eine Apoptose der Endothelzellen bewirkt (KRADY et al., 2008). Es ist jedoch unklar, ob dieselben Mechanismen in die Regulierung der physiologischen Angiogenese involviert sind. Ebenso ungeklärt ist, ob THBS2 eine Aktivierung dieser Kaskade herbeiführen kann, trotz nachgewiesener Bindung an CD36 von Endothelzellen (KRADY et al., 2008). Es wurde beobachtet, dass THBS Zell-Matrix-Kontakte ins Schwanken bringen kann. Die Interaktion von THBS mit Zellen ist kurzlebig, da es rasch wieder von den Zellen abgebaut wird. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass THBS in Prozessen wie der beginnenden Wundheilung, der Angiogenese und Zellentwicklung, infolge von Synthese von Granulationsgewebe durch „priming“ von Zellen für die Mitose oder Migration durch die Destabilisierung der Zell-Matrix-Kontakte infolge von Verlust von fokalen Bindungsplaques fungiert (MURPHY-ULLRICH & HOOK, 1989) und somit sicherlich bei der Ablösung der *Secundinae* eine Rolle spielt. Vielleicht könnte die gezielte Stimulation von Wachstumsfaktoren eine Lösung sein, um eine THBS-Expression zu steigern, damit es vermehrte Interaktionen mit der EZM aufbaut und die gleiche Aktivität, wie in der frühen Wundheilungsphase erreicht und sich somit auch die Nachgeburt rechtzeitig lösen kann.

### 2.2.1. Matrixproteine

Matrixproteine wie Nidogene (*Nidogen 2*; F/C = -1, 6) sind wichtig für die Zelladhäsion, da sie Kontakte zwischen den verschiedenen zellulären Integrinen aufbauen. Ein Verlust von Nidogen beeinträchtigt durch Lösung der Zellinteraktionen die Integrität der Basalmembran, was möglicherweise die Metastasierung durch Angiogenese begünstigt (ULAZZI et al., 2007). Beide Nidogene interagieren auch mit Zellrezeptormolekülen und kontrollieren Polarisierung, Migration und Invasion der Zellen. Die Wechselwirkungen

zwischen den Zellen und der Basalmembran regulieren diverse zelluläre Prozesse, einschließlich der Differenzierung, Proliferation und Apoptose. Beide Nidogene kommunizieren mit Kollagen I, IV und sind zellbindend. Es wurde auch berichtet, dass die Nidogene Laminin 1 vor Proteolyse schützen können, was vermuten lässt, dass die Abwesenheit von Nidogenen zusätzlichen Abbau und Umbau der Proteine der Basalmembran zur Folge hat. Der Verlust von Nidogenen beeinträchtigt vor allem die Integrität der Basalmembran, was möglicherweise den Mechanismus der Invasion für genetisch veränderte Epithelzellen vereinfacht und Metastasierung durch Angiogenese begünstigt (ULAZZI et al., 2007). Ob dies bei einer Herunterregulierung bei einem FC von 1,6 auch schon eine Beeinflussung der Integrität bewirken kann, bleibt bisher eine Vermutung, aber die Basalmembran stellt in vorliegender Studie die Grenze zwischen den maternalen und fetalen Kompartimenten dar, die voneinander gelöst werden sollen. Trophoblastzellen sind polarisiert. Doch wenn sie die Trophoblastinvasion herbeiführen und mit den maternalen Epithelzellen fusionieren und zu TGCs werden, sind sie unpolarisiert. Auch dies lässt vermuten, dass verminderte Nidogenexpression die Polarisierung nicht ausreichend regulieren kann und somit die Zellinvasion und Integrität der TGCs vermindert ist. Hierbei muss aber noch geklärt werden, in welchem Zeitraum der Trächtigkeit die Polarisierung der TGCs von großer Bedeutung ist und ob dies Einfluss auf das Zurückbleiben der Eihäute haben kann.

### 2.2.2. Glykoproteine

#### 2.2.2.1. Fibulin 5 (FBN5)

*FBN5* (FC = -1,6) gehört der Fibulin-Familie an. Sie ist eine Gruppe sezernierter Glykoproteine, die aus 5 bekannten Mitgliedern besteht (FBLN1–5) und stellt eine Leitkomponente der EZM dar (MADDALI et al., 2004). FBN 5 ist ein integrinbindendes EZM-Protein, welches Endothelzell-Bindung herbeiführt. Weiter reguliert es Zellwachstum, -motilität sowie -adhäsion und agiert als Ligand für Apolipoprotein sowie Integrine. Die Expression wird in den Endothel- und glatten Muskelzellen durch Verletzung induziert - in den Fibroblasten und Endothelzellen geschieht es durch TGF $\beta$  (SCHIEMANN et al., 2002). Gleichzeitig ist es ein Promoter der Wundheilung (LEE et al., 2004). FBN5 wird stark im embryonalem Gefäßnetz und der Neuralleiste exprimiert, zeigte aber herabgesetzte Expression in allen adulten Geweben, außer im zyklischen Uterus,



wo fortwährend aktiv Umbau und Angiogenese abläuft. Genauso konnte erhöhte Expression von FBN5 in der Vorläuferstudie bei den *i.p.*-gewonnenen Proben ermittelt werden (STREYL et al., 2012). Zusätzlich bewirkt seine strukturelle Funktion eine Formation und gleichzeitig eine Stabilisierung der Basalmembran, der elastischen Fasern und des lockeren Bindegewebes (YANAGISAWA et al., 2002; NONAKA et al., 2009). Somit hat es generell einen großen Einfluss auf das Zellverhalten (BALASUBRAMANIAN et al., 2004). Darüber hinaus vermittelt FBN5 Zell-Matrix-Kommunikation und reguliert die Organogenese, Fibrinogenese, Gefäßmodulierung und Tumormetastasierung (KOWAL et al., 1999; GALLAGHER et al., 2005; KATSUTA et al., 2008). Die niedrigere Expression von *FBN5* in Plazentomgewebe von Tieren mit *Ret. sec.* gegenüber den Tieren ohne Nachgeburtsverhaltung ist ein weiteres Indiz dafür, dass im Falle einer *Ret. sec.* verringerte Zell-Matrix-Kommunikation, Fibrinogenese, Gefäßmodulierung mit Angiogenese und somit die Umbauprozesse in der Plazenta verzögert stattfinden.

#### 2.2.2.2. Integrine

Integrine (ITG $\alpha_5$ : FC = -1,5; ITG $\beta_3$ : FC = -1,9; ITG $\beta_8$ : FC = -1,7) sind zelladhäsionsgebundene Rezeptoren und gehören zur Überfamilie der transmembranen Glykoproteine. Ihre heterodimere Struktur ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit) macht ihre Funktionsweise aus (PFARRER et al., 2003; ZEILER, 2006). Sie vermitteln über ihre Rezeptorfunktion durch Interaktion mit Liganden der EZM-Glykoproteine und den Zelloberflächenmolekülen Kontakt zwischen den Zellen und das sowohl von außen nach innen als auch umgekehrt. Die Integrine zählen zu den wichtigsten Rezeptoren für die Herstellung einer Verbindung von Zelle, dem Zytoskelett und der EZM (HAUPT, 2007). Ihr Vorkommen ist immens hoch, dafür ist ihre Bindungskapazität sehr gering. Auf diese Weise können aber schnell viele Interaktionen stattfinden und ihre Wirkung, durch Konformationsänderung und somit Aktivierung weiterer, spezieller Integrine, entfalten. Integrine haben eine relevante Bedeutung bei der embryonalen Organmorphogenese. Bei adulten Organismen verwalten sie die Kontrolle biologischer Funktionen, wie Adhäsion, Polarität, Wachstum, Differenzierung und Motilität. Somit sind sie an der Regulierung vieler Prozesse, wie z.B. dem Entzündungsgeschehen, der Proliferation, Angiogenese, Zellpolarität, -migration, -invasion und dem programmierten Zelltod beteiligt

(ZEILER, 2006). Sie wirken an der Expression und der daraus resultierenden Zusammensetzung der EZM. Dieser Prozess führt wiederum zu einer weiteren Aktivierung anderer Integrine und Rezeptoren von Wachstumsfaktoren (ZEILER, 2006). Bei niedriger Expression der Integrine kann es sein, dass auch hier der Prozess der Plazentaablösung durch verringerte physiologische Zellkommunikation für eine verzögerte Reifung der Eihäute verantwortlich gemacht werden kann.

### **3. Bedeutung der Apoptose im bovinen Plazentom für Nachgeburtsablösung und -verhaltung**

#### **3.1. Apoptose**

Der programmierte Zelltod ist ein fundamentaler Prozess, der die normale Entwicklung und Homeostase von Vielzellern kontrolliert. Herabgesetzte Apoptose steuert dazu bei, die Empfangsbereitschaft des Organismus für einige Krankheiten, inklusive Krebs zu steigern (BENETTI et al., 2001). Zelltod durch Apoptose ist durch zelluläres und nukleäres Schrumpfen, Membranschwellung, Kondensation des nukleären Chromatins und DNA-Fragmentation gekennzeichnet (SGORBISSA et al., 1999a). Der Prozess der Apoptose soll eng mit den Ereignissen des Zellzyklus verbunden sein und ist überwiegend in proliferierendem Gewebe vorzufinden. Genauso ist die Induktion des programmierten Zelltodes mit Proliferations-assoziierten Genen gekoppelt (MEIKRANTZ & SCHLEGEL, 1996). Somit ist es leicht verständlich, dass während der gesamten Trächtigkeit sowohl ein Umbau von maternalen Kryptepithelzellen als auch von Trophoblast-Epithelzellen festgestellt wurde. Zur Geburt hin sollte physiologischerweise eine Reduktion der maternalen epithelialen Zellen überwiegend durch apoptotische Prozesse erfolgen (BOOS et al., 2003). Apoptoseprozesse stellen einen entscheidenden Mechanismus der Plazentareifung und den zeitlich korrekten sowie vollständigen Abgang der fetalen Membranen dar.

##### **3.1.1. Störungen der Mitoseregulation und des Übergangs in den Prozess der Apoptose bei Tieren mit *Ret. sec.***

Im Vergleich von *a.p.* zu *i.p.* wurde eine stärkere Expression von Genen, die mit Zellteilung zusammenhängen, in den Plazentomproben der Tiere mit *Ret. sec.*

gefunden (STREYL et al., 2012). Diese Gene, wie z.B. Cyclin B1 und A2, cyclinabhängige Kinasen (CDKs), und Aurora A- und B-Kinasen, sind an der Zellproliferation, also am Zellzyklus und an der Zellteilung beteiligt. Während der Trächtigkeit finden genau diese Mitoseprozesse in der Plazenta statt. In der Vorläuferstudie von STREYL et al. (2012) konnte genau das bestätigt werden: Bei den AP-Proben sind die Gene des Mitose-Komplex hochreguliert und bei den Proben von den Tieren, die *i.p.* gewonnen wurden, werden diese Gene herunterreguliert und die Gene, die für die Apoptose notwendig sind, wie z.B. Caspasen, hochreguliert.

**Cyclin B1:** Die Zellproliferation wird durch den Zellzyklus kontrolliert. *Cyclin B1* (FC = 1,9) stellt die Schlüsselkomponente des Zellzyklusablaufs dar. Es bindet in der Zellteilungsphase an seine Substrate und kontrolliert somit den Ablauf der Mitose. Eine unausgewogene Regulation von Cyclin B1 während der aktivierten Mitose führt zu unkontrolliertem Zellwachstum und unphysiologischer Zellfunktion. Cycline sind an der rhythmisch wiederkehrenden Proliferationsphase im humanen Endometriumsgewebe beteiligt und scheinen die regulierenden Hauptkomponenten des Zellzyklus in der Phase der Zellproliferation und -differenzierung im Endometrium zu sein. Eine Progesteronbehandlung der Endometriumzellen *in vitro* senkt die Expression von *Cyclin B1*, wodurch der Zellzyklus verlangsamt wird, was ein erhöhtes Aufkommen von apoptotischen Zellen zur Folge hat. Es wird daraus geschlossen, dass Progesteron die Zellproliferation hemmt, den Zellzyklus stoppt und Apoptose durch eine Herunterregulierung von Cyclin B1 induziert (TANG et al., 2009). Cyclin B1 hat unmittelbaren Einfluss auf die Aktivierung und den Übergang in die Mitose. Eine Überexpression von *Cyclin B1* kann aber auch zu unkontrollierter Zellproliferation führen. Die Ursache ist in erster Linie durch Inaktivierung von p53 begründet (XIE et al., 2005). Somit kann dies ein weiteres Indiz sein, dass in Plazentomproben von *Ret. sec.*-Tieren noch kein oder ein verzögerter Eintritt in das Apoptosegeschehen stattgefunden hat. Es konnte gezeigt werden, dass Cyclin1/cdc2-Inhibitoren, wie Camptothecin und Paclitaxel die Aktivität von Cyclin B1 herabsetzen und einen Abbruch des Zellzyklus bewirken. Alsterpaullone (ALP) inaktiviert den Cyclin1/cdc2-Komplex indem es kompetitiv mit ATP dem Substrat des katalytischen Zentrums von cdc2 konkurriert, was das Zellwachstum stoppt. Darüber hinaus intensiviert die

Anwesenheit von ALP die herunterregulierenden Effekte von Cyclin B1 durch Progesteron signifikant, was den Abbruch des Zellzyklus und die Apoptose einleitet (TANG et al., 2009).

**Cyclin A2:** Cyclin A (FC von *Cyclin A2* = 1,5) wird als S-Phase und mitotisches Cyclin, klassifiziert (BORTNER & ROSENBERG, 1995). Die Zellen, die den Apoptoseprozess durchlaufen, sind hauptsächlich in der frühen S- oder späten G1-Phase der Mitose. Dies erfordert, dass Moleküle in dieser Phase vorliegen müssen, die die Ausführung des programmierten Zelltodes in einer frühen Phase vorantreiben. Die Zellproliferation wird durch die Synthese zellspezifischer Cycline und die Aktivierung Cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs) reguliert. Der Übergang in die S-Phase des Zellzyklus wird durch Proteinkinase-assoziiertes Cyclin E und A reguliert. Apoptoseinduktion wurde ohne jegliche Ausnahme durch Cyclin-A-abhängige Kinasen gezeigt, aber nicht durch assoziierte Aktivierung von Cyclin E und B (MEIKRANTZ & SCHLEGEL, 1996). Daher vermuten die Autoren, dass Cyclin A als ein zellabhängiger Vermittler der Apoptose agiert. Eine erhöhte Expression von *Cyclin A* oder seiner *CDKs* kann den anti-apoptotischen Aktivator BCL-2 umgehen. Somit scheinen die Apoptoseprozesse im Plazentomgewebe der Tiere mit *Ret. sec.* noch in den Anfangsstadien zu sein.

**Cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDKN3):** *CDKN3* (FC = 1,5) ist ein wichtiges Element in der Regulation des Zellzyklus und der Entwicklung der Zellen, inklusive Zellteilung (FINKIELSTEIN et al., 2002a). Der geregelte Ablauf der Mitose ist von der Bindung bestimmter Cycline an ihre Cyclin-abhängigen Kinasen, mit folgender Aktivierung, abhängig. Das Protein des *CDKN3*-Gens ist eine kinase-associated phosphatase (KAP), welches CDK-2 als Substrat bindet (NICULESCU et al., 2004). KAP kann an CDK-2 in Gegenwart oder in Abwesenheit von Cyclinen binden und deren Interaktionen schwächen. Es kann CDK-2 aber nur inaktivieren, wenn Cyclin A von diesem abgebaut wird oder getrennt ist. Somit ist bewiesen, dass KAP ein biologischer Inhibitor von CDK-2 ist (CHINAMI et al., 2005). Damit die Zellen die Mitose beenden können, müssen alle CDKs vollständig inaktiviert werden (JOHNSON et al., 2002). Eine unkontrollierte CDK-Aktivität während der Mitosephasen korreliert oft mit dem programmierten Zelltod. Eine erzwungene Expression der Inhibitoren von CDKs

verhindert Apoptose in verschiedenen Zelltypen. Der Cyclin A2-CDK2-Komplex vermittelt entweder einen Stillstand des Zellzyklus, wenn die Apoptose geblockt ist, oder fördert sogar DNA-Fragmentation durch Stimulation des Apoptoseprozesses (FINKIELSTEIN et al., 2002b). Somit ist es verständlich, dass *CDKN-3* bei komplettem Ablauf von Mitose hochreguliert und Apoptose herunterreguliert oder gehemmt sein sollte. Dies ist ein weiteres Indiz für den nicht zeitgerechten Ablauf des programmierten Zelltodes in den Plazentomproben von Kühen mit *Ret. sec.*

**Aurora Kinase A (Aurora-A):** *Aurora-A* (FC = 1,6) ist eine Serin/Threonin-Protein-Kinase und scheint bei einer Hochregulierung die Zellen durch Amplifikation des Zentrosoms zu transformieren. Damit induziert *Aurora-A* die Zellproliferation, besitzt anti-apoptotische Funktion, indem es p53 hemmt (YANG et al., 2006) und die Expression von *Bcl-2* hochreguliert, einem ebenfalls anti-apoptotischen Signal (WANG et al., 2006; YANG et al., 2006). Desweiteren wurde demonstriert, dass *Aurora-A* eine aktive Bedeutung in der Stimulation der Mitose innehat, indem es die lokale Translation der zentrosomalen mRNA, z.B. *Cyclin B1* reguliert. Somit reguliert es nicht nur den Zellzyklus, sondern bestimmt auch das Überleben der Zellen (YANG et al., 2006). *Aurora-A* siedelt sich an die Polspindeln während der Mitose an und reguliert so die Zusammensetzung, Stabilität und Funktion der Spindelfasern. Das Aufkommen des *Aurora-A*-Proteins wird zellzyklusabhängig geregelt. Anfangs ist sein Produkt niedrig, in der G2/M-Phase erhöht und nach Beenden der Mitose wird es sofort abgebaut. Inhibitoren der *Aurora-A* stimulieren Apoptose *in vitro* und *in vivo*. ZM447439 (ZM) ist ein potenter und selektiver Inhibitor von *Aurora-A* und -B und induziert eine Hochregulierung von p53 und die Aktivierung der Caspase-3 (LI et al., 2010). Auch hier lässt sich wieder spekulieren, dass die Apoptose-Prozesse noch nicht richtig begonnen haben und immer noch Zellzyklus, anstatt Umbau der EZM durch die Stimulation des programmierten Zelltodes vorherrscht.

**Aurora-Kinase B (Aurora-B):** *Aurora-B*-Kinasen (FC = 2,1) gehören zu der Familie der chromosomalen Passagier-Proteine, die ihre Lokalisation während der Mitose verändern. Die Mitglieder der *Aurora-B*-Familie werden mit der Regulierung des Anheftens an die Spindelfaseransatzstelle und den Spindelkontrollpunkt, der Chromosomentrennung und der Zytokinese in

Verbindung gebracht (COWLEY et al., 2009). Aurora-B ist entscheidend für den Ablauf der Mitose und Zytokinese und spielt eine Rolle, wenn sich die Chromosomen in der Metaphase verbinden und in der Anaphase separieren. Eine Hemmung von Aurora-B führt zu einer unvollständigen Trennung der Chromosome, zu abnormaler Zytokinese, und eine Dysregulation in beiden Richtungen kann Polyploidie nach sich ziehen (LORDIER et al., 2010). Eine erhöhte ektopische Expression soll zur Stimulation von p53 führen und das Zellwachstum unterdrücken (JUNG et al., 2005). Die Hochregulierung von *Aurora-B* bei den Tieren mit *Ret. sec.* kann eine Unterdrückung des Apoptoseprozesses bedeuten, was im Zusammenhang mit der unvollständigen Ablösung der fetalen Membranen stehen kann.

### 3.1.2. Beginn der Apoptose

*Growth arrest-specific 2* (GAS2; FC = 1,7) wirkt *in vitro* als ein Apoptose-Signal, nachdem es von Caspase-3 als direktes Substrat gespalten wurde (BENETTI et al., 2001). Caspase-6 ist nicht in der Lage GAS2 zu spalten. Die Proteolyse durch GAS2 wurde in den frühen Stadien der Apoptose, wenn die Zellen noch an der EZM haften, entdeckt. Nach Spaltung ist GAS2 vollkommen aktiviert und führt zu spezifischen Strukturveränderungen des Mikrofilamentsystems, welche den Prozess des Zelltods und das charakteristische Bild der Apoptose ausmachen. Das Zytoskelett unterliegt daher den spezifischen Veränderungen des programmierten Zelltodes (SGORBISSA et al., 1999a). Somit führt eine erhöhte Expression von GAS2 zur Reorganisation des Mikrofilaments und zur Zellkondensation (SGORBISSA et al., 1999b). Die Hochregulierung stellt ein weiteres Indiz dafür, dass die Tiere mit *Ret. sec.* sich im Anfangsstadium der Apoptose befinden und die vollständige Ausreifung der fetalen Eihäute noch nicht komplett abgeschlossen ist.

### 3.1.3. Essentielle Regulation der Apoptose durch Caspasen

Caspasen sind eine Familie von Cystein-Proteasen, denen eine relevante Bedeutung bei der Auslösung des Apoptoseprozesses zukommt (SGORBISSA et al., 1999a). Sie werden in Initiator-Caspasen (Caspase 2, -8, -9 und -10) und ausführende Caspasen (Caspase 3, -6, und -7) eingeteilt (VELAZQUEZ-DELGADO & HARDY, 2012). Bei Säugetieren resultiert eine ektopische Expression von Mitgliedern der Caspase-Familie in Apoptose (KIM et al., 1999). Wie auch viele andere zelluläre Proteasen werden Caspasen als inaktive

Proenzyme synthetisiert (SGORBISSA et al., 1999a). Ihre Aktivierung, generell hervorgerufen durch ein apoptotisches Signal, erfolgt durch Spaltung einer spezifischen Aminosäurekettensequenz eines oder mehrerer Initiator-Caspasen. Die Initiator-Caspasen stimulieren die ausführenden Caspasen durch Spaltung ihres Proenzym (MONROE et al., 2002). Die morphologischen Veränderungen, die das Aussehen von Zellen während des programmierten Zelltodes charakterisieren, entstehen durch die Effektor-Caspasen (SGORBISSA et al., 1999b). Sexualsteroiden sollen einen protektiven Schutz gegenüber dem Prozess der Apoptose herbeiführen; v.a. Östrogen spielt dabei eine bedeutende Rolle. Niedrige Östrogenlevel während des physiologisch ablaufenden Sexualzyklus stimulieren in der Uterusschleimhaut einen Übergang in das Apoptosegeschehen. Wenn man in Betracht zieht, dass direkt *p.p.* nach dem zur Geburt hin erfolgten Östrogenpeak, ein physiologischer Abfall des Östrogenspiegels vorherrscht, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass hierdurch eine Stimulation der Apoptose erfolgt. Im Gegensatz dazu wurde beobachtet, dass in neuronalen Zellen z.B. das antiapoptotische Gen *Bcl-X<sub>L</sub>* durch Östrogen stimuliert wird, was ein Überleben der Zellen bewirkt. Desweiteren wurde gezeigt, dass Östrogen die Aktivität der Caspasen sowohl transkriptionell als auch post-transkriptionell regulieren kann (MONROE et al., 2002). *Caspase 6* (FC = 1,7) unterscheidet sich in einigen Aspekten von den anderen Caspasen seiner Gruppe. Erstens übt es außer bei einer Überexpression, eine geringere apoptotische Wirkung, aus. Zweitens spaltet es auch andere zelluläre Substrate und zeigt eine divergierende Substratspezifität gegenüber Peptidsubstraten (VELAZQUEZ-DELGADO & HARDY, 2012). Man vermutet eine im Gegensatz zu den Initiator-Caspasen unterschiedliche Regulierung der Effektor-Caspasen (MONROE et al., 2002). Das zeigt, dass die Plazentomproben von den Tieren mit *Ret. sec.* immer noch im vollen Prozess der Apoptose stehen. Aber was hat es mit der geringeren apoptotischen Wirkung von Caspase 6 auf sich? Oder hat der Apoptose-Prozess bei den Tieren mit *Ret. sec.* noch gar nicht richtig begonnen? Bisher wurde die Beziehung zwischen dem Zinklevel und dem apoptotischen Potenzial eingehend untersucht. Der Effekt von Zink auf Caspase 6 besteht darin, dass extrem hohe Zinkkonzentrationen (>500 µM) Apoptose auslösen, während physiologisch relevante Konzentrationen die Apoptoseprozesse supprimieren. Ein erschöpfter Zinkhaushalt führt wiederum zu Apoptose. Dies könnte ein Ansatz zur weiteren Forschung zur gezielten Stimulierung der Apoptose bei Tieren mit *Ret. sec.* sein.

### 3.2. **Pregnancy Associated Glycoproteins (PAGs)**

Die PAGs sind überwiegend sekretorische Proteine der Trophoblastzellen. Die Proteine gehören zu der Familie der Aspartat-Proteinasen. Bei den Wiederkäuern stellen sie eine große Familie mit ca. 100 Protein-kodierenden Genen dar. Bisher sind 21 bovine (*b*)PAGs (FC liegt in einer Spanne von 1,7-2,8) identifiziert worden. Im Laufe der Trächtigkeit weisen sie eine variierende zeitliche und räumliche Genexpression auf. Der vornehmliche Anteil der *b*PAGs wird in den Trophoblast Giant cells (TGCs) exprimiert, während einige wenige in allen Trophoblastzellen detektierbar sind. Die TGCs sezernieren die Produkte ihrer Granula in die maternalen Epithelzellen, wobei die *b*PAGs in den maternalen Blutkreislauf gelangen. Daher sind die *b*PAGs in maternalen Serumproben wegen ihrer langen Halbwertszeit *p.p.* noch ca. zwei bis drei Monate nachweisbar (KLISCH et al., 2005; WHITLOCK & MAXWELL, 2008). Bei Kühen mit physiologischer Ablösung der fetalen Eihäute ist eine sinkende Anzahl der TGCs zum Ende der Trächtigkeit durch apoptotische Phagozytose ermittelt worden (WILLIAMS et al., 1987). Daraus lässt sich eine verringerte Genexpression der *b*PAGs bei Tieren mit physiologischem Abgang der Nachgeburt wegen der verringerten Zahl an TGCs vermuten. In vorliegender Arbeit wurde eine erhöhte Expression aller *b*PAGs in den Plazentomproben von Tieren mit *Ret. sec.* ermittelt, was als Hinweis für die unvollständige Reifung und damit verzögerte Ablösung der fetalen Membranen gelten kann.

## 4. **Transkriptomanalyse zur Bedeutung subklinischer Hypokalzämie und subklinischer Ketose auf Transkriptomebene für die *Ret. sec.***

Im vorliegenden Dissertationsprojekt wurde auch der Frage nachgegangen, ob Zusammenhänge zwischen subklinischer Hypokalzämie oder subklinischer Ketose im peripartalen Zeitraum mit den plazentären Mechanismen des Umbaus der EZM und der Apoptose und damit mit der Nachgeburtsverhaltung des Rindes bestehen. Beim Vergleich der jeweiligen Prädispositionsgruppen, also der Tiere mit subklinischer Hypokalzämie bzw. subklinischer Ketose, mit und ohne *Ret. sec.* konnten nicht ausreichend detektierbare differentiell exprimierte Gene



mittels dem „limma“-Paket des Softwareprogramms R-BioConductor ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)) nachgewiesen werden.

Die beiden Stoffwechselerkrankungen Hypokalzämie und Ketose sind in erster Linie fütterungsbedingt. Es bedarf v.a. eines ausgeklügelten Managements, um diesen Erkrankungen gut vorbeugen zu können. Das Angebot des zusammengesetzten Futters muss stimmen, die Zeiten der täglichen Futtervorlage sollten in entsprechenden Intervallen ablaufen und ein ausreichender Zugang zum Futter für alle Tiere muss gewährleistet sein. Darüber hinaus besteht die Gefahr der klinischen Erkrankungen v.a. in den ersten Tagen und Wochen nach der Kalbung. Das Erscheinungsbild der Ketose manifestiert sich überwiegend im Zeitraum von 7-10 Tagen *p.p.* (WALSH et al., 2007). Daher erscheint es nachvollziehbar, dass bei der unmittelbar *postpartal* erfolgten Probenentnahme auf Transkriptomebene noch keine Veränderungen der mRNA-Konzentrationen vorhanden waren.

Zudem sollte bedacht werden, dass die Plazentomproben von Tieren gewählt wurden, die subklinisch auffällige Parameter im Hinblick auf Hypokalzämie und Ketose aufwiesen, die Kühe aber zu keiner Zeit (*a.p.*, *i.p.* und *p.p.*) das klinische Stadium der jeweiligen Stoffwechselerkrankung erreichten. Als Grundlage der vorliegenden Studie galt es, herauszufinden, ob die bereits bekannten und oben erwähnten Prädispositionen auch schon auf subklinischer Ebene einen Einfluss auf Transkriptomebene im Zusammenhang mit der *Ret. sec.* haben. So scheint es, dass es auf Ebene des Transkriptoms mit dem vorhandenen Probenprotokoll keine Zusammenhänge dieser beiden Stoffwechselerkrankungen mit dem Abgang der Nachgeburt nachweisbar sind - aber nur im Bezug auf die subklinische Ausprägung und nicht auf die klinische Erkrankung. Zur vollständigen Klärung dieser Fragestellung, bedarf es wohl weiterer Untersuchungen und frequenterer Probennahmen, insbesondere auch bei klinisch erkrankten Tieren und im postpartalen Zeitraum, wo die Unterschiede deutlich sein könnten. Dabei stellt sich weiter die Frage, ob die Effekte der Erkrankung an Hypokalzämie oder Ketose im Plazentom auf Transkriptomebene überhaupt detektierbar sind oder ob die Stoffwechselerkrankungen möglicherweise gar keinen Einfluss auf die mRNA im peripartalen Plazentomgewebe, sondern über andere Mechanismen (z.B. mechanisch muskuläre Effekte) auf die bovine *Ret. sec.* haben.

## 5. Schlussbetrachtung und Ausblick

Zusammenfassend betrachtet, bestätigt die Transkriptomanalyse des peripartalen Plazentoms in vorliegender Studie Vorbeobachtungen und folgernde Hypothesen, dass die physiologischen Regulationsmechanismen für den Umbau der EZM im bovinen peripartalen Plazentomgewebe zum Zeitpunkt der Probennahme bei den Tieren mit einer *Ret. sec.* nicht vollständig stattgefunden haben. Genauso wenig sind die komplexen Apoptoseprozesse, die sowohl für die Ablösung der Nachgeburt als auch die Uterusinvolution *p.p.* unabdingbar sind, in dem Maße angelaufen, wie es bei gesunden Tieren der Fall ist. Dieser am besten als Unreifezustand zu bezeichnende Status der Plazenta ist zusammen mit anderen Faktoren, wie z.B. Störungen der komplexen plazentären proinflammatorischen Prozesse, für das Zurückbleiben der fetalen Eihäute stark mitverantwortlich. Diese Unreife der Plazenta wird insbesondere durch den Vergleich der in diesem Projekt gewonnenen Plazentomproben mit denen unserer Vorläuferstudie zu physiologischen peripartalen Genexpressionsveränderungen bei der Nachgeburtsablösung sichtbar: Die Plazentomproben der Tiere mit *Ret. sec.* zeigten insgesamt ein Genexpressionsprofil, welches dem Genexpressionsprofil von den 10-14 Tage *a.p.* gewonnenen Proben ähnlicher war als dem der „norm“-Proben. Prinzipiell sollten die „ret“-Proben in ihrer Expression durch eine möglicherweise vorliegende verzögerte Reifung zwischen den AP und den IP-Proben liegen.

Es muss in die Überlegungen aber auch mit einbezogen werden, dass in dieser Studie eine einmalige Probennahme die Genexpression der Transkripte zu diesem Zeitraum charakterisieren soll. Die individuelle Ablösung der Nachgeburt jeder einzelnen Kuh kann unter physiologischen Bedingungen im Zeitraum von weniger als einer Stunde bis zu sechs Stunden *p.p.* passieren. Selbst Fälle, bei denen die Eihäute nach etwa 12 Stunden *p.p.* abgehen, gelten als nahezu physiologische Verläufe. In dieser Zeitspanne sind natürlich weitere Veränderungen auf Transkriptomebene zu erwarten, die in vorliegender Arbeit nicht untersucht werden konnten.

Das Ziel dieser Arbeit war es, pathomechanische Charakteristika der *Ret. sec.* auf Genexpressionsebene zu finden. Damit sollten eventuelle Kandidatengene detektiert werden, die zukünftig für die Entwicklung innovativer Prophylaxe- und Therapiekonzepte der *Ret. sec.* beim Rind genutzt werden können. Das Ziel

konnte erreicht werden: So wurden eine ganze Reihe erfolgversprechender Kandidaten identifiziert, deren medikamenteller Einsatz die untersuchten Schlüsselmechanismen der Nachgeburtsablösung positiv manipulieren könnten. Für die Beeinflussung der Apoptose sind das besonders Cyclin B1 und Caspase 6. Die Beeinflussung des Umbaus der EZM, quasi im Sinne einer gezielt induzierten Nachreifung, scheint mit Hilfe von MMP25, ADAM19 und ADAMTS4 denkbar. Zudem sind Kombinationen von Stimulatoren oder Inhibitoren dieser beiden biologischen Komplexe mit Induktoren proinflammatorischer Prozesse, die sich aus dem Parallelprojekt ergaben, nicht unrealistisch.

Mittel- bis langfristig könnten im Ergebnis von nachfolgenden v.a. *in vitro*-basierten „proof of mechanism“-Studien Stimulatoren oder Inhibitoren ausgewählter Regulationsmechanismen gefunden und synthetisiert werden, die die Nachgeburtsablösung unterstützen. Im Bereich der Humanmedizin ist die entsprechende weiterführende Beforschung einzelner DEGs immens vorangeschritten. So konnten auch schon einige interessante Inhibitoren bestimmter MMPs oder ADAMS ermittelt werden (ELSO et al., 2004), die eine diagnostische oder/und therapeutische Bedeutung erlangen. Dies auch im Milchviehbereich voranzutreiben, wo die Nachgeburtsverhaltung mit einer Inzidenz von etwa 5-40% eine enorme medizinische und wirtschaftliche Bedeutung hat, sollte Ziel von Nachfolgearbeiten sein.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die *Retentio secundinarum* (*Ret. sec.*) ist eine Erkrankung des Rindes, die bei der Kuh in den ersten Tagen *post partum* (*p.p.*) zu einem medizinisch und wirtschaftlich relevantem Krankheitsgeschehen führen kann. Die Krankheitsinzidenz schwankt zwischen 2 und 40%. Häufigkeit und Vorkommen scheinen durch unterschiedliche prädisponierende und krankheitsauslösende Faktoren beeinflusst zu werden. Das Verständnis der Ätiopathogenese der *Ret. sec.* ist trotz jahrelanger Beforschung im Detail und auch in der Verknüpfung identifizierter Einflussfaktoren nur sehr unbefriedigend. So gibt es keine wirkungsvollen die Krankheitsursachen bekämpfenden Therapie- und Prophylaxekonzepte.

Damit sich die *Placenta fetalis* im physiologisch definierten Zeitraum (beim Rind innerhalb von 12 h *p.p.*) von der *Pars uterina* lösen kann, müssen schon in der antepartalen Phase bestimmte v.a. morphologische Reifungsprozesse starten. Hauptzielsetzung dieser Arbeit war die Identifizierung von für die Ätiologie und Pathogenese der *Ret. sec* relevanten Faktoren und Mechanismen, die sich schon unmittelbar nach Ausstoßung der Frucht in der Plazenta in einem holistischen Ansatz nachweisen lassen. Im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit wurden Genexpressionsprofile von Plazentomgewebeproben von Tieren mit oder ohne *Ret. sec.* mit dem Ziel untersucht, für die Ätiologie der *Ret. sec.* relevante Unterschiede erkennen zu können. Neben diesem Vergleich wurde der Einfluss anerkannter Prädispositionsfaktoren der *Ret. sec.* - die subklinischen Formen der Hypokalzämie und der subklinischen Ketose - auf die plazentare Genexpression geprüft.

Von ursprünglich 180 beprobten Tieren wurden 40 Plazentomproben von 20 Kühen mit und 20 Kühen ohne *Ret. sec.* ausgewählt. Dies geschah auf der Basis von klinischen und Blutparametern. So wurden Tiere rekrutiert, die entweder subklinische Hypokalzämie, subklinische Ketose oder Dysregulationen der peripartalen Progesteronwerte aufwiesen. Diese wurden mit Tieren verglichen, die keine Abweichungen zu den Normwerten der drei genannten Prädispositionsfaktoren aufwiesen. Da jeweils Tiere mit und ohne *Ret. sec.* gruppiert wurden, entstanden 8 Gruppen mit je  $n = 5$ . Der Einfluss inflammatorischer Mechanismen und sexualsteroidaler Dysregulationen auf die plazentare Genregulation wurden in einem Parallelprojekt untersucht.

Mittels „Systematic Random Sampling“ wurden pro Tier aus je drei Plazentomen drei Gewebeproben unmittelbar nach Ausstoßung der Frucht gewonnen und jeweils in RNAlater®, Formalin und Paraformaldehyd asserviert. Zur Sicherstellung der morphologischen Vergleichbarkeit der Plazentomproben aller 40 Kühe als Voraussetzung für die Genexpressionsstudien, wurden die Proben einer quantitativ stereologischen Untersuchung unterzogen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Gewebeproben keine gruppenspezifischen signifikanten Unterschiede im Anteil der Epithelzellen an der Gesamtzellzahl aufwiesen und somit für die Transkriptomanalyse geeignet waren. Diese wurde mit Hilfe eines GeneChip® Bovine Gene 1.0 ST Arrays von Affymetrix (III2.4) durchgeführt.

In den ersten Auswertungsschritten des GeneChip® Bovine Gene 1.0 ST Array von Affymetrix mit Hilfe von BioConductor Software-Paketen ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)) wurden initial bei den 40 Tieren weder zwischen den definierten Prädispositionsgruppen noch zwischen den Tieren mit und ohne *Ret. sec.* ausreichend signifikant differentiell exprimierte Gene (DEGs) nachgewiesen. Ein Vergleich der DEGs einer Vorläuferstudie zur plazentaren Expression im physiologischen Peripartum mit dem hier generierten Datensatz durch eine „Gene Set Enrichment Analyse“ (GSEA) zeigte, dass viele Gene mit *antepartal (a.p.)* höherer Expression in den Proben der Tiere mit *Ret. sec.* stärker exprimiert waren bzw. Gene mit *intrapartal (i.p.)* höherer Expression in den Proben der Tiere ohne *Ret. sec.* stärker exprimiert waren. Von den 22.166 als detektierbar ermittelten Transkripten in vorliegender Studie wurden für weitere Korrelations- und Cluster-Analysen nur die 1.226 mit den DEGs der Vorläuferstudie übereinstimmenden Gene verwendet. Durch die Reduzierung des Datensatzes ergab sich eine wesentlich deutlichere Gruppierung der Proben. So konnte eine Gruppe von Tieren (n = 9) ohne *Ret. sec.* und eine Gruppe von Tieren (n = 9) mit *Ret. sec.* mit jeweils ähnlichen Expressionsmustern identifiziert werden. Die beiden Gruppen wiesen signifikant unterschiedliche Expressionsmuster auf. Die statistische Analyse dieser ausgewählten Proben ergab dann eine deutlich höhere Anzahl an DEGs, wobei vor allem die Expressionsunterschiede stärker waren als bei der Analyse aller 40 Proben.

Durch die Ergebnisse der GSEA und der Analyse der DEGs konnte auf Genexpressionsebene bestätigt werden, dass als Voraussetzung zur Ablösung der Nachgeburt das Plazentagewebe einen ausreichenden Reifungsprozess durchlaufen muss. Die Reifung der EZM der Plazenta wird durch apoptotische

und proinflammatorische Prozesse im Gewebe unterstützt. Diese regulierenden Mechanismen sind somit als bedeutende Vorgänge der Reifung und Ablösung der Nachgeburt zu verstehen. Der Vergleich der GSEA führt zu der Hypothese, dass bei Kühen mit Nachgeburtshaltung keine zur Ablösung der Nachgeburt ausreichende Reifung stattgefunden hat.

Im Detail konnte bei der Analyse auf der Basis des limitierten Datensatzes mittels einer Korrelations-Heatmap bei 18 Kühen eine Clusterung von Kühen mit *Ret. sec.* ( $n = 9$ ) und ohne *Ret. sec.* ( $n = 9$ ) nachgewiesen werden. Bei erneuter statistischer Analyse durch „limma“ (FDR 5%, FC 1,5) dieser nur noch 18 Tiere konnten jetzt 801 DEGs detektiert werden. Hinsichtlich des Umbaus der extrazellulären Matrix (EZM) und der Apoptose erfolgte eine detaillierte Untersuchung dieser Gene. Dabei wurden insgesamt 72 DEGs ermittelt, die potentiell mit Plazentareifungsprozessen im Zusammenhang stehen. Unter diesen 72 Genen wurden v.a. Proteasen identifiziert (z.B. Matrix Metalloproteinase-25, A Disintegrin and Matrixmetallopeptidase 19, A Disintegrin and Matrixmetallopeptidase with Thrombospondin Motif 4, Tissue Inhibitor of Matrixmetallopeptidase 1, Thrombospondin 1 und -2) und Integrin  $\alpha_5$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_8$ , die für den Umbau der EZM benötigt werden. Die Genexpression ist, wie bei *a.p.* beprobten Tieren, bei den Tieren mit *Ret. sec.* herunterreguliert. Bei Kühen mit *Ret. sec.* sind zudem Gene hochreguliert, die an der Apoptose beteiligt sind. Es handelt sich dabei um Gene, deren Produkte die Mitose und den Beginn der Apoptosephase regulieren (z.B. Cyclin B1, Cyclin A2, Aurora Kinase A und B). Die Protease Caspase 6, ein Gen, das unmittelbar den Prozess der Apoptose in der Exekutionsphase reguliert, wurde bei den Tieren mit *Ret. sec.* hochreguliert. Effektorcaspasen, wie Caspase 6, sind für den Verlauf der Apoptose elementar und somit ein relevanter Indikator für den Reifungsprozess, der eine vollständige Ablösung der Nachgeburt innerhalb des physiologisch normalen Zeitraumes gewährt. Dagegen ist die Apoptose bei den Tieren ohne *Ret. sec.* offenbar weiter fortgeschritten, was einen zeitgerechten Nachgeburtshabgang ermöglicht.

Die Untersuchungsergebnisse bilden eine sehr gute Grundlage für weitere Erforschungsaktivitäten. So ist einerseits die Entwicklung von innovativen Prophylaxe- oder Therapiekonzepten denkbar, die auf in diesem Projekt identifizierten, die Plazentareifung beeinflussenden Wirkstoffkandidaten basieren. Besondere Aufmerksamkeit sollte hier den bei *Ret. sec.*-Tieren herunterregulierten Proteasen oder den Inhibitoren der hochregulierten

Mitosegene geschenkt werden. Darüber hinaus ist die Nutzung der Ergebnisse auch unter tierzüchterischen Gesichtspunkten denkbar. So könnte gezielt nach Tieren, Familien oder Rinderrassen gesucht werden, die *peripartal* vermehrt „reife“ oder „unreife“ Genexpressionsmuster aufweisen. Dies wiederum könnte experimentell oder direkt für die Zuchtarbeit ausgenutzt werden. Nicht zuletzt verdeutlicht die vorliegende Arbeit die Bedeutung von kompetenter und erfolgreicher Zusammenarbeit zwischen verschiedenen Fach- und Forschungsbereichen, um neue Erkenntnisse zu einer komplexen Fragestellung zu generieren.

Gefördert durch die Firma Zoetis Animal Health Europa

## VII. SUMMARY

Retained foetal membranes (RFM) are a common and critical postpartum uterine disorder affecting both dairy and suckling cows. The ensuing disease process is of considerable medical and economic impact. Incidence rates can vary between 2 to 40%, with frequency depending on multiple predisposing and pathogenic trigger factors. Despite detailed and longlasting research our understanding of the etiological pathogenesis of RFM in combination with the identified influencing factors is still unsatisfying. Therefore, there are no effective models for controlling the consequences of RFM by treatment or preventing its causing factors.

A physiological expulsion of the foetal membranes in the defined period of time (12 hours in the species cattle) requires a morphological maturation of the cells in the uterine contact zones during the peripartum period. In this study the main objective was to examine the aetiology and pathogenesis of relevant factors and mechanism, which can be detected by a holistic approach immediately after the expulsion of the foetus in bovine placentomes. Within the framework of this research project, the influence in patterns of the mRNA-expression in placentomal tissue samples of cows with and without RFM have been determined to display relevant differences in the etiology of RFM. In the comparable transcriptomic analysis we included the acknowledged predisposed factors of subclinical hypocalcemia and subclinical ketosis, in a chance to reveal a possible link between the etiology of RFM and these factors.

From the original 180 sampled cows we selected 40 placentomal tissue samples of cows, with ( $n = 20$ ) and without RFM ( $n = 20$ ). Selections were made based on clinical signs and blood parameters. Therefore, the sample of the animals shows subclinical forms of hypocalcemia or ketosis or disorders of the peripartal progesterone in the blood samples. These animals were compared to cows with no deviation from standard values regarding these three predisposing factors. Finally there were 8 groups with 5 animals ( $n = 5$ ) per group, to compare each predisposing factor subgroup of cows with and without RFM.

A parallel research project focused on the question whether there is an influence of proinflammatory mechanisms or disorders in sexual steroids in the level of mRNA-expression in the bovine placenta. By means of “systematic random sampling” we collected three placentomes per cow immediately after the



expulsion of the calf. From each placentome there were obtained three tissue samples and those were transferred in RNAlater®, formaline and paraformaldehyde. To ensure comparable placentome tissue of all 40 cows as a prerequisite for the transcriptomic analysis, a quantitative stereological analysis of the tissue samples was performed. The results confirmed that our tissue is suitable for a following transcriptomic analysis, because the number of the epithelium cells of placentomal tissue show no significant difference from the whole cell concept.

The initial statistical analysis of the GeneChip® Bovine Gene 1.0 ST Array of Affymetrix using software packages from BioConductor ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)) provided of all 40 cows, showing only little and thus insufficient differentially expressed genes (DEGs) in the predisposing groups (subclinical hypocalcemia and subclinical ketosis) or in cows with and without RFM.

After the comparison of our data with the DEGs from a precursor study with physiological alterations in peripartal placental gene expression by means of a “Gene Set Enrichment Analysis” (GSEA), we could reconfirm that genes with a higher expression *antepartum* were upregulated in the samples of the cows with RFM and genes with a higher expression *intrapartal* were upregulated in the samples from cows without RFM, respectively. We then limited our 22,166 transcripts to the 1,226 matching DEGs from the former study (STREYL et al., 2012) for the following statistical analyses. The reduction of the data set revealed a pioneering observation into a clearer grouping: We could identify a control-group with similar patterns of gene expression and a group of cows with RFM with apparently different patterns of gene expression compared to the control-group. The statistical analysis of these selected samples resulted in a significant number of DEGs; particularly the gene expression was more appreciable compared to the analysis of all samples. Altogether the data from GSEA and the analysis of DEGs confirmed on the level of gene expression that the placenta has to perform a complex and complete maturation for a successful separation. The process of maturation of the ECM in the placenta is supported by apoptosis and proinflammatory reactions in the tissue. The comparison by the GSEA leads to the hypothesis that there was no complete or sufficient maturation for a total release of the placenta from cows with RFM.

In the analysis of the 40 cows with the limited data set by means of a correlation heatmap we could identify a clustering within 18 animals in cows with RFM

(n = 9) and cows without RFM (n = 9). A renewed statistical analysis by “limma” (FDR 5%, FC 1,5) of these 18 cows revealed 801 DEGs. Afterwards, the genes were examined thoroughly with regard to the degradation of the ECM and apoptosis. In this context we could determine 72 genes with a potentially direct link to the maturation processes of the placenta. Particularly proteases, which are required for the degradation of the ECM, were identified (e.g. Matrixmetalloproteinase-25, a disintegrin and matrixmetalloproteinase 19, a disintegrin and matrixmetalloproteinase with thrombospondin-motif 4, Tissue inhibitor of Matrixmetalloproteinase 1, Thrombospondin 1 and -2 and Integrin  $\alpha_5$ ,  $-\beta_3$ ,  $-\beta_8$ ). The mRNA-concentration of these genes is downregulated in the placentomal tissue of cows with RFM as in placentomes taken ante partum, which presents an immature placenta. Additionally, the cows with RFM showed upregulated genes which participate directly in mitosis and in the beginning phase of apoptosis processes (e.g. Cyclin B1, Cyclin A2, Aurora kinases A and B). The protease caspase 6 is an upregulated gene in cows with RFM and regulates imminently the execution of apoptosis as resembled in this study. Effector caspases as Caspase 6 have a high relevance for an ordinary process of apoptosis and is an elementary indicator for a mature placenta, which ensures a total separation of the foetal membranes in the physiological period of time.

The results of this project form a good basis for further studies. On the one hand there is a possibility for innovative concepts in parts of prophylaxis or treatment, which can be referred to the identified inhibiting placental maturation factors and mechanism in the present study. Particular attention should be given to the downregulated proteases or to the inhibitors of the upregulated mitosis genes in the placentomes from cows with RFM. Furthermore, the results can be beneficial for zootechnical considerations. They allow for a targeted search for animals, families and bovine breeds which exhibit more periparturient mature or immature gene expression patterns. Also, the information can be used for experimental or direct breeding activities. Last but not least the present study is an excellent example for a competent and successful cooperation between scientific different scientific disciplines in working areas on complex issues.

Supported by Zoetis Animal Health Europe

**VIII. LITERATURVERZEICHNIS**

- Adams JC. Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 25-51.
- Agthe VO, Kolm HP. Radioimmunologische Bestimmung physiologischer Östrogenkonzentrationen im Blutplasma von Kühen um den Geburtstermin. *Reproduction in Domestic Animals* 1975; 10: 16-23.
- Ahlers D, Grunert E. Zur Problematik der Behandlung des infizierten Uterus beim Rind im Puerperium. . *Der Prakt. Tierarzt* 1993; *Collegium vet.* XXIV: 57-61.
- Ahlers D, Aurich J; Bleckmann E; Bienek A; Emmer M; Hoedemaker M; Lange J; Manseld S; Scheibl P; Zaremba W; Zerbe H. Verlauf des Puerperiums und das weitere Schicksal von Rindern ohne und mit Retentio secundinarum nach Abkalbungen mit tierärztl. Geburtshilfe intrauteriner Applikation von Ampicillin und Cloxacillin- oder Tetracyclinhaltigen Uterusstäben. Teil 2. *Tierärztl. Umsch.* 2000b; 55: 565-75.
- Ahlers D, Aurich J; Bleckmann E; Bienek A; Emmer M; Hoedemaker M; Lange J; Manseld S; Scheibl P; Zaremba W; Zerbe H. Verlauf des Puerperiums und das weitere Schicksal von Rindern ohne und mit Retentio secundinarum nach Abkalbungen mit tierärztl. Geburtshilfe intrauteriner Applikation von Ampicillin und Cloxacillin- oder Tetracyclinhaltigen Uterusstäben. Teil 1. *Tierärztl. Umsch.* 2000a; 55: 479-88.
- Ahmed FE. Microarray RNA transcriptional profiling: part I. Platforms, experimental design and standardization. *Expert Rev Mol Diagn* 2006; 6: 535-50.
- Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem* 1995; 270: 5872-6.
- Anonick PK, Yoo JK, Webb DJ, Gonias SL. Characterization of the antiplasmin activity of human thrombospondin-1 in solution. *Biochem J* 1993; 289 ( Pt 3): 903-9.
- Arthur GH. Retention of afterbirth in cattle: A review and commentary. *Vet Annual* 1979; 19: 26-36.
- Arthur GH, Bee D (1996) Retention of the Fetal Membranes. In: *Veterinary Reproduction and Obstetrics.*, Seventh edn. Ed Arthur GH, Noakes, D.E., Pearson, H. und Parkinson, T.J. W.B. Saunders Company Ltd.
- Atkinson BA, King GJ, Amoroso EC. Development of the caruncular and intercaruncular regions in the bovine endometrium. *Biol Reprod* 1984; 30: 763-74.
- Aurich JE, Aurich C. Geburtseinleitung bei Haustieren. *Prakt Tierarzt* 1994; 75: 742-50.
- Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002; 115: 3719-27.
- Balasubramanian R, LaFramboise T, Scholtens D, Gentleman R. A graph-theoretic approach to testing associations between disparate sources of functional genomics data. *Bioinformatics* 2004; 20: 3353-62.
- Bekana M, Jonsson P, Kindahl H. Intrauterine bacterial findings and hormonal profiles in post-partum cows with normal puerperium. *Acta Vet Scand* 1996a; 37: 251-63.

- Bekana M, Odensvik K, Kindahl H. Prostaglandin F2 alpha metabolite and progesterone profiles in post-partum cows with retained foetal membranes. *Acta Vet Scand* 1996b; 37: 171-85.
- Benetti R, Sal GD, Monte M, Paroni G, Brancolini C, Schneider C. The death substrate Gas2 binds m-calpain and increases susceptibility to p53-dependent apoptosis. *EMBO J* 2001; 20: 2702-14.
- Björkmann NH. Morphological and histochemical studies on the bovine placenta. *Acta Anatomica* 1954; 22: 1-91.
- Björkmann NH. Light and electron microscopic studies on the cellular alterations in the normal bovine placenta. *Anatomical Record* 1969; 163: 17-30.
- Boos A. Immunohistochemical assessment of collagen types I, III, IV and VI in biopsy samples of the bovine uterine wall collected during the oestrous cycle. *Cells Tissues Organs* 2000; 167: 225-38.
- Boos A, Janssen V, Mulling C. Proliferation and apoptosis in bovine placentomes during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as well as in cows retaining the fetal membranes. *Reproduction* 2003; 126: 469-80.
- Bornstein P. Thrombospondins as extracellular modulators of cell function. *J Clin Invest* 2001; 107: 929-34.
- Borsberry S, Dobson H. Periparturient diseases and their effect on reproductive performance in five dairy herds. *Vet Rec* 1989; 124: 217-9.
- Bortner DM, Rosenberg MP. Overexpression of cyclin A in the mammary glands of transgenic mice results in the induction of nuclear abnormalities and increased apoptosis. *Cell Growth Differ* 1995; 6: 1579-89.
- Bortz J (2005) Statistik: Für Human- und Sozialwissenschaftler. Springer Lehrbuch, Berlin
- Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *The Journal of Pathology* 2003; 200: 423-8.
- Bostedt H. [The fertility status following puerperal diseases in cattle]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1979; 92: 43-7.
- Bostedt H, Schramel P. [Effect of different supplementations of selenium on the selenium concentration of the blood and placental tissue in cows]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1983; 90: 398-401.
- Bostedt H (1993) Stoffwechselerkrankungen in der frühen puerperalen Periode. In: Tiergeburtshilfe Ed Richter J, Götze, R (Hrsg.): Verlag Paul Parey Berlin und Hamburg. 341-438
- Braunert A (2012) Bedeutung immunologischer Mechanismen für die Pathogenese der Retentio secundinarum beim Rind. Ludwig-Maximilians-Universität München
- Bretzlaff KN, Whitmore HL, Spahr SL, Ott RS. Incidence and treatments of postpartum reproductive problems in a dairy herd. *Theriogenology* 1982; 17: 527-35.
- Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 2000; 1477: 267-83.
- Cai TQ, Weston PG, Lund LA, Brodie B, McKenna DJ, Wagner WC. Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. *Am J Vet Res* 1994; 55: 934-43.
- Canales RD, Luo Y, Willey JC, Austermiller B, Barbacioru CC, Boysen C, Hunkapiller K, Jensen RV, Knight CR, Lee KY, Ma Y, Maqsodi B, Papallo A, Peters EH, Poulter K, Ruppel PL, Samaha RR, Shi L, Yang W, Zhang L, Goodsaid FM. Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 1115-22.

- Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, Oyama R, Ravasi T, Lenhard B, Wells C, Kodzius R, Shimokawa K, Bajic VB, Brenner SE, Batalov S, Forrest AR, Zavolan M, Davis MJ, Wilming LG, Aidinis V, Allen JE, Ambesi-Impiombato A, Apweiler R, Aturaliya RN, Bailey TL, Bansal M, Baxter L, Beisel KW, Bersano T, Bono H, Chalk AM, Chiu KP, Choudhary V, Christoffels A, Clutterbuck DR, Crowe ML, Dalla E, Dalrymple BP, de Bono B, Della Gatta G, di Bernardo D, Down T, Engstrom P, Fagiolini M, Faulkner G, Fletcher CF, Fukushima T, Furuno M, Futaki S, Gariboldi M, Georgii-Hemming P, Gingeras TR, Gojobori T, Green RE, Gustincich S, Harbers M, Hayashi Y, Hensch TK, Hirokawa N, Hill D, Huminiecki L, Iacono M, Ikeo K, Iwama A, Ishikawa T, Jakt M, Kanapin A, Katoh M, Kawasawa Y, Kelso J, Kitamura H, Kitano H, Kollias G, Krishnan SP, Kruger A, Kummerfeld SK, Kurochkin IV, Lareau LF, Lazarevic D, Lipovich L, Liu J, Liuni S, McWilliam S, Madan Babu M, Madera M, Marchionni L, Matsuda H, Matsuzawa S, Miki H, Mignone F, Miyake S, Morris K, Mottagui-Tabar S, Mulder N, Nakano N, Nakauchi H, Ng P, Nilsson R, Nishiguchi S, Nishikawa S, Nori F, Ohara O, Okazaki Y, Orlando V, Pang KC, Pavan WJ, Pavesi G, Pesole G, Petrovsky N, Piazza S, Reed J, Reid JF, Ring BZ, Ringwald M, Rost B, Ruan Y, Salzberg SL, Sandelin A, Schneider C, Schonbach C, Sekiguchi K, Semple CA, Seno S, Sessa L, Sheng Y, Shibata Y, Shimada H, Shimada K, Silva D, Sinclair B, Sperling S, Stupka E, Sugiura K, Sultana R, Takenaka Y, Taki K, Tammoja K, Tan SL, Tang S, Taylor MS, Tegner J, Teichmann SA, Ueda HR, van Nimwegen E, Verardo R, Wei CL, Yagi K, Yamanishi H, Zabarovsky E, Zhu S, Zimmer A, Hide W, Bult C, Grimmond SM, Teasdale RD, Liu ET, Brusic V, Quackenbush J, Wahlestedt C, Mattick JS, Hume DA, Kai C, Sasaki D, Tomaru Y, Fukuda S, Kanamori-Katayama M, Suzuki M, Aoki J, Arakawa T, Iida J, Imamura K, Itoh M, Kato T, Kawaji H, Kawagashira N, Kawashima T, Kojima M, Kondo S, Konno H, Nakano K, Ninomiya N, Nishio T, Okada M, Plessy C, Shibata K, Shiraki T, Suzuki S, Tagami M, Waki K, Watahiki A, Okamura-Oho Y, Suzuki H, Kawai J, Hayashizaki Y. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 2005; 309: 1559-63.
- Chakrabarti S, Patel KD. Regulation of matrix metalloproteinase-9 release from IL-8-stimulated human neutrophils. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 279-88.
- Chapman HA. Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Current Opinion in Cell Biology* 1997; 9: 714-24.
- Chinami M, Yano Y, Yang X, Salahuddin S, Moriyama K, Shiroishi M, Turner H, Shirakawa T, Adra CN. Binding of HTm4 to Cyclin-dependent Kinase (Cdk)-associated Phosphatase (KAP)·Cdk2·Cyclin A Complex Enhances the Phosphatase Activity of KAP, Dissociates Cyclin A, and Facilitates KAP Dephosphorylation of Cdk2. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 17235-42.
- Combs CA, Laros RK, Jr. Prolonged third stage of labor: morbidity and risk factors. *Obstet Gynecol* 1991; 77: 863-7.
- Cowley DO, Rivera-Perez JA, Schliekelman M, He YJ, Oliver TG, Lu L, O'Quinn R, Salmon ED, Magnuson T, Van Dyke T. Aurora-A kinase is essential for bipolar spindle formation and early development. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 1059-71.
- Curry TE, Jr., Osteen KG. Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus. *Biol Reprod* 2001; 64: 1285-96.

- Curtis CR, Erb HN, Sniffen CJ, Smith RD, Powers PA, Smith MC, White ME, Hillman RB, Pearson EJ. Association of parturient hypocalcemia with eight periparturient disorders in Holstein cows. *J Am Vet Med Assoc* 1983; 183: 559-61.
- Curtis CR, Erb HN, Sniffen CJ, Smith RD, Kronfeld DS. Path Analysis of Dry Period Nutrition, Postpartum Metabolic and Reproductive Disorders, and Mastitis in Holstein Cows. *Journal of Dairy Science* 1985; 68: 2347-60.
- Davies CJ, Hill JR, Edwards JL, Schrick FN, Fisher PJ, Eldridge JA, Schlafer DH. Major histocompatibility antigen expression on the bovine placenta: its relationship to abnormal pregnancies and retained placenta. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83: 267-80.
- Davies J, Wimsatt WA. Observation on the fine structure of the sheep placenta. *Acta Anat (Basel)* 1966; 65: 182-223.
- de Kruif A. [Treatment protocol of a cow too often in heat]. *Tijdschr Diergeneeskde* 1994; 119: 481-2.
- Dilly M, Hambruch N, Haeger JD, Pfarrer C. Epidermal growth factor (EGF) induces motility and upregulates MMP-9 and TIMP-1 in bovine trophoblast cells. *Molecular Reproduction and Development* 2010; 77: 622-9.
- Dosogne H, Burvenich C, Lohuis JA. Acyloxyacyl hydrolase activity of neutrophil leukocytes in normal early postpartum dairy cows and in cows with retained placenta. *Theriogenology* 1999; 51: 867-74.
- Drillich M, Beetz O, Pfutzner A, Sabin M, Sabin HJ, Kutzer P, Nattermann H, Heuwieser W. Evaluation of a systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy cows. *J Dairy Sci* 2001; 84: 2010-7.
- Drillich M, Reichert U, Mahlstedt M, Heuwieser W. Comparison of two strategies for systemic antibiotic treatment of dairy cows with retained fetal membranes: preventive vs. selective treatment. *J Dairy Sci* 2006a; 89: 1502-8.
- Drillich M, Arlt S, Kersting S, Bergwerff AA, Scherpenisse P, Heuwieser W. Ceftiofur derivatives in serum, uterine tissues, cotyledons, and lochia after fetal membrane retention. *J Dairy Sci* 2006b; 89: 3431-8.
- Drillich M, Mahlstedt M, Reichert U, Tenhagen BA, Heuwieser W. Strategies to improve the therapy of retained fetal membranes in dairy cows. *J Dairy Sci* 2006c; 89: 627-35.
- Du Y, Yin F, Liu C, Hu S, Wang J, Xie H, Hong L, Fan D. Depression of MAD2 inhibits apoptosis of gastric cancer cells by upregulating Bcl-2 and interfering mitochondrion pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006; 345: 1092-8.
- Dyk PB, Emery, R.S.; Liesman, J.L.; Buchholtz, H.F. Prepartum non-esterified fatty acids in plasma are higher in cows developing periparturient health problems. *J. Dairy Sci.* 1995; 78: 264.
- Edqvist LE, Kindahl H, Stabenfeldt G. Release of prostaglandin F 2alpha during the bovine periparturient period. *Prostaglandins* 1978; 16: 111-9.
- Eiler H, Wan PY, Valk N, Fecteau KA. Prevention of retained placenta by injection of collagenase into umbilical arteries of calves delivered by cesarean section: A tolerance study. *Theriogenology* 1997; 48: 1147-52.
- Elso C, Kumar B, Smyth G, Foote S, Handman E. Dissociation of disease susceptibility, inflammation and cytokine profile in *lmr1/2* congenic mice infected with *Leishmania major*. *Genes Immun* 2004; 5: 188-96.
- Esslemont RJ, Kossaibati MA. Incidence of production diseases and other health problems in a group of dairy herds in England. *Vet Rec* 1996; 139: 486-90.

- Euler C (2009) Zusammenhänge zwischen peripartalen Veränderungen stoffwechselrelevanter Blutserum-, Milch- und Körperkonditionsparameter und Erkrankungen der Gebärmutter. Ludwig-Maximilians-Universität München
- Finkelstein CV, Chen LG, Maller JL. A Role for G1/S Cyclin-dependent Protein Kinases in the Apoptotic Response to Ionizing Radiation. *Journal of Biological Chemistry* 2002a; 277: 38476-85.
- Finkelstein CV, Chen LG, Maller JL. A role for G1/S cyclin-dependent protein kinases in the apoptotic response to ionizing radiation. *J Biol Chem* 2002b; 277: 38476-85.
- Fischer C, Drillich M, Gabler C, Heuwieser W, Einspanier R. [Postpartum reproductive failure in cattle: is the examination of gene expression in the endometrium a key to success?]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2006; 119: 197-202.
- Fonseca FA, Britt JH, McDaniel BT, Wilk JC, Rakes AH. Reproductive traits of Holsteins and Jerseys. Effects of age, milk yield, and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, ovulation, estrous cycles, detection of estrus, conception rate, and days open. *J Dairy Sci* 1983; 66: 1128-47.
- Fortin CF, Sohail A, Sun Q, McDonald PP, Fridman R, Fülöp T. MT6-MMP is present in lipid rafts and faces inward in living human PMNs but translocates to the cell surface during neutrophil apoptosis. *International Immunology* 2010; 22: 637-49.
- Fourichon C, Seegers H, Malher X. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology* 2000; 53: 1729-59.
- Fredriksson G, Kindahl H, Sandstedt K, Edqvist LE. Intrauterine bacterial findings and release of PGF2 alpha in the postpartum dairy cow. *Zentralbl Veterinarmed A* 1985; 32: 368-80.
- Freeman WM, Robertson DJ, Vrana KE. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *Biotechniques* 2000; 29: 1042-6, 8-55.
- Fuchs AR, Rust W, Fields MJ. Accumulation of cyclooxygenase-2 gene transcripts in uterine tissues of pregnant and parturient cows: stimulation by oxytocin. *Biol Reprod* 1999; 60: 341-8.
- Fürll M (2002) Damit der Stoffwechsel auch in kritischen Phasen nicht verrückt spielt. In: *Stoffwechselstörungen bei Wiederkäuern: Erkennen – Behandeln – Vorbeugen.*, Med. Tierklinik Leipzig. 2-12
- Fürll M (2003) Stoffwechselkontrollen und Stoffwechselüberwachung bei Rindern. In: *Handlexikon der tierärztlichen Praxis.* Ed Wiesner HH. Enke Verlag, Stuttgart. 804a-q
- Fürll M (2005) Spezielle Untersuchung beim Wiederkäuer. In: *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin.* Ed Kraft WD, U. M. (Hrsg.). Schattauer Verlag, Stuttgart, New York. 444-74
- Gallagher WM, Currid CA, Whelan LC. Fibulins and cancer: friend or foe? *Trends Mol Med* 2005; 11: 336-40.
- Galvin NJ, Vance PM, Dixit VM, Fink B, Frazier WA. Interaction of human thrombospondin with types I-V collagen: direct binding and electron microscopy. *J Cell Biol* 1987; 104: 1413-22.
- Garibay-Vila ME (1978) Einfluß der Energie- und Eiweißversorgung in der Hochträchtigkeit auf das Stoffwechsel- und Fruchtbarkeitsgeschehen bei Milchrindern. Tierärztliche Hochschule Hannover
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C,

- Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004; 5: R80.
- Gilbert RO, Grohn YT, Guard CL, Surman V, Neilsen N, Slauson DO. Impaired post partum neutrophil function in cows which retain fetal membranes. *Res Vet Sci* 1993; 55: 15-9.
- Gilbert SJ, Blain EJ, Al-Sabah A, Zhang Y, Duance VC, Mason DJ. Protein kinase R plays a pivotal role in oncostatin M and interleukin-1 signalling in bovine articular cartilage chondrocytes. *Eur Cell Mater* 2012; 23: 41-57.
- Gloor HF. Zur Therapie der Retentio secundinarum. *Schw. Arch. Tierheilk.* 1965; 107: 319-29.
- Goff JP, Horst RL. Physiological Changes at Parturition and Their Relationship to Metabolic Disorders. *Journal of Dairy Science* 1997; 80: 1260-8.
- Goldman S, Shalev E. The role of the matrix metalloproteinases in human endometrial and ovarian cycles. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 111: 109-21.
- Götze R. Untersuchungen, Erfahrungen und Gedanken zur Retentio secundinarum des Rindes. *Dtsch. tierärztl. Wochenschr.* 1941; 49: 598-601.
- Grohn YT, Rajala-Schultz PJ. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61: 605-14.
- Gross TS, Williams WF, Russek-Cohen E. Cellular changes in the peripartum bovine fetal placenta related to placental separation. *Placenta* 1991; 12: 27-35.
- Gross TS, Williams WF; Manspeaker J.E. In vitro proteolytic activity of the late pregnant and peripartum bovine placenta. *J.Anim.Sci.* 1985; 61: 391-2.
- Grosser O (1909) Vergleichende Anatomie und Entwicklungsgeschichte den Eihäute und der Placenta mit besonderer Berücksichtigung des Menschen, erste edn. Wilhelm Braumüller, Wien. 1-314
- Grunert E, Zaremba W. Untersuchungen über negative Einflüsse von endogenen und exogenen Faktoren auf das Frühpuerperium des Rindes. *Dtsch. tierärztl. Wochenschr.* 1979; 86: 461-4.
- Grunert E (1980) Etiology of retained bovine placenta. In: *Current Therapy in Theriogenology*. Ed Morrow DA. W.B. Saunders Co., Philadelphia. 180-6
- Grunert E. Ätiologie, Pathogenese und Therapie der Nachgeburtsverhaltung beim Rind. *Wien. tierärztl. Monatschr.* 1983; 6/7: 230-5.
- Grunert E. [Multifactorial etiology of a disease based on the example of retentio secundinarum in cattle]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1985; 127: 689-705.
- Grunert E, Ahlers D, Heuwieser W. The role of endogenous estrogens in the maturation process of the bovine placenta. *Theriogenology* 1989; 31: 1081-91.
- Grunert E, Grunert D. Zur Problematik des Erfolgs der Nachgeburtsabnahme beim Rind. *Tierärztliches Gutachten. Tierärztl. Praxis* 1990; 18: 473-6.
- Grunert E (1990) Die klinische Untersuchung des Rindes. In: *Weiblicher Geschlechtsapparat und Euter*. Dirksen G., Gründer H.-D., Stöber M. (Hrsg.), Parey, Berlin. 472- 548
- Grunert E (1993c) Das normale Puerperium. In: *Tiergeburtshilfe*. Grunert, E. und Arbeiter, K. (Hrsg.): Parey Verlag, Berlin. 105-10
- Guard C. Set up fresh and milking cows for successful A. I. *Hoard's Dairyman* 1999; 8-9.
- Guilbault LA, Thatcher WW, Drost M, Hopkins SM. Source of F series prostaglandins during the early postpartum period in cattle. *Biol Reprod* 1984; 31: 879-87.
- Gunnink JW. Retained placenta and leucocytic activity. *Vet Q* 1984a; 6: 49-51.



- Gunnink JW. Post-partum leucocytic activity and its relationship to caesarian section and retained placenta. *Vet Q* 1984b; 6: 55-7.
- Hansen R (1976) Untersuchungen über die nicht-infektiösbedingten Ursachen der Retentio secundinarum beim Rind. Tierärztliche Hochschule Hannover
- Hartmann D (2011) Auswirkungen einer protrahierten Geburtseinleitung beim Rind auf die Plazentareife, den uterinen Blutfluss sowie Steroidhormone im Plasma. Tierärztliche Hochschule Hannover
- Haupt S (2007) Zytoskelettassoziierte Moleküle und Integrinaktivierung in bovinen Plazentazellen: in vivo und in vitro Studie. Justus-Liebig-Universität Gießen
- Heinonen M, Heinonen K. Retained placenta in cattle: the effect of treatment or nontreatment on puerperal diseases and subsequent fertility. *Acta Vet Scand* 1989; 30: 425-9.
- Herschler RC, Lawrence JR. A prostaglandin analogue for therapy of retained placenta. *Vet. Med.* 1984; 79: 822-5.
- Heuwieser W, Woicke J, Grunert E, Ehlert R. [Significance of chemotactic activity and leukocyte infiltration of placental tissue for the expulsion of the fetal membranes in cattle]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1986; 99: 127-30.
- Hirata M, Sato T, Tsumagari M, Shimada A, Nakano H, Hashizume K, Ito A. Differential Regulation of the Expression of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases by Cytokines and Growth Factors in Bovine Endometrial Stromal Cells and Trophoblast Cell Line BT-1 In Vitro. *Biology of Reproduction* 2003; 68: 1276-81.
- Hoffman LH, Wooding FB. Giant and binucleate trophoblast cells of mammals. *J Exp Zool* 1993; 266: 559-77.
- Hoffmann B (1993) Endokrinologie der Hochträchtigkeit, während des Partus und im Puerperium. In: Tiergeburtshilfe. Ed Grunert EA, K. (Hrsg.): Richter J. und Götze R. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg. 111-22
- Hoffmann B, Schuler G. The bovine placenta; a source and target of steroid hormones: observations during the second half of gestation. *Domestic Animal Endocrinology* 2002; 23: 309-20.
- Hoffmann R, Seidl T, Dugas M. Profound effect of normalization on detection of differentially expressed genes in oligonucleotide microarray data analysis. *Genome Biol* 2002; 3: RESEARCH0033.
- Huang H-Y, Wen Y, Irwin JC, Kruessel JS, Soong Y-K, Polan ML. Cytokine-Mediated Regulation of 92-Kilodalton Type IV Collagenase, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-3 Messenger Ribonucleic Acid Expression in Human Endometrial Stromal Cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1998; 83: 1721-9.
- Huszenicza G, Fodor M, Gacs M, Kulcsar M, Dohmen MJW, Vamos M, Porkolab L, Kegl T, Bartyik J, Lohuis JACM, Janosi S, Szita G. Uterine Bacteriology, Resumption of Cyclic Ovarian Activity and Fertility in Postpartum Cows kept in Large-Scale Dairy Herds. *Reproduction in Domestic Animals* 1999; 34: 237.
- Ishikawa Y, Nakada K, Hagiwara K, Kirisawa R, Iwai H, Moriyoshi M, Sawamukai Y. Changes in interleukin-6 concentration in peripheral blood of pre- and post-partum dairy cattle and its relationship to postpartum reproductive diseases. *J Vet Med Sci* 2004; 66: 1403-8.
- Janszen BP, Bevers MM, Ravenshorst MM, van der Weijden GC, Dieleman SJ, Taverne MA. Relationship between prostaglandin-induced luteolysis and temporary inhibition of myometrial activity in late pregnant cows with ear implants containing progestagen. *J Reprod Fertil* 1993; 97: 457-61.

- Johnson LN, De Moliner E, Brown NR, Song H, Barford D, Endicott JA, Noble MEM. Structural studies with inhibitors of the cell cycle regulatory kinase cyclin-dependent protein kinase 2. *Pharmacology & Therapeutics* 2002; 93: 113-24.
- Jones GC, Riley GP. ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: 160-9.
- Jonsson-Rylander AC, Nilsson T, Fritsche-Danielson R, Hammarstrom A, Behrendt M, Andersson JO, Lindgren K, Andersson AK, Wallbrandt P, Rosengren B, Brodin P, Thelin A, Westin A, Hurt-Camejo E, Lee-Sogaard CH. Role of ADAMTS-1 in atherosclerosis: remodeling of carotid artery, immunohistochemistry, and proteolysis of versican. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 180-5.
- Joosten I, Stelwagen J, Dijkhuizen AA. Economic and reproductive consequences of retained placenta in dairy cattle. *Vet Rec* 1988; 123: 53-7.
- Jung J-E, Kim T-K, Lee J-S, Oh S-Y, Kwak S, Jin X, Sohn J-Y, Song M-K, Sohn Y-W, Lee S-Y, Pian X, Lee J-B, Chung YG, Choi YK, You S, Kim H. Survivin inhibits anti-growth effect of p53 activated by aurora B. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 336: 1164-71.
- Kang T, Zhao Y-G, Pei D, Sucic JF, Sang Q-XA. Intracellular Activation of Human Adamalysin 19/Disintegrin and Metalloproteinase 19 by Furin Occurs via One of the Two Consecutive Recognition Sites. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 25583-91.
- Katayama S, Tomaru Y, Kasukawa T, Waki K, Nakanishi M, Nakamura M, Nishida H, Yap CC, Suzuki M, Kawai J, Suzuki H, Carninci P, Hayashizaki Y, Wells C, Frith M, Ravasi T, Pang KC, Hallinan J, Mattick J, Hume DA, Lipovich L, Batalov S, Engstrom PG, Mizuno Y, Faghihi MA, Sandelin A, Chalk AM, Mottagui-Tabar S, Liang Z, Lenhard B, Wahlestedt C. Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science* 2005; 309: 1564-6.
- Katsuta Y, Ogura Y, Iriyama S, Goetinck PF, Klement JF, Uitto J, Amano S. Fibulin-5 accelerates elastic fibre assembly in human skin fibroblasts. *Exp Dermatol* 2008; 17: 837-42.
- Keelan JA, Blumenstein M, Helliwell RJA, Sato TA, Marvin KW, Mitchell MD. Cytokines, Prostaglandins and Parturition—A Review. *Placenta* 2003; 24, Supplement A: S33-S46.
- Kim Y-M, Bombeck CA, Billiar TR. Nitric Oxide as a Bifunctional Regulator of Apoptosis. *Circulation Research* 1999; 84: 253-6.
- Kimura A, Sogawa K, Satoh M, Kodera Y, Yokosuka O, Tomonaga T, Nomura F. The application of a three-step serum proteome analysis for the discovery and identification of novel biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Int J Proteomics* 2012; 2012: 623190.
- Kimura K, Goff JP, Kehrli ME, Jr., Reinhardt TA. Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2002; 85: 544-50.
- Kindahl H, Kornmatitsuk B, Gustafsson H. The cow in endocrine focus before and after calving. *Reprod Domest Anim* 2004; 39: 217-21.
- King GJ, Atkinson BA, Robertson HA. Development of the bovine placentome during the second month of gestation. *Journal of Reproduction and Fertility* 1979; 55: 173-NP.
- King GJ, Atkinson BA, Robertson HA. Development of the bovine placentome from days 20 to 29 of gestation. *J Reprod Fertil* 1980; 59: 95-100.

- King GJ, Atkinson BA, Robertson HA. Development of the intercaruncular areas during early gestation and establishment of the bovine placenta. *Journal of Reproduction and Fertility* 1981; 61: 469-74.
- Kinsel ML. Dairy cows postpartum disease: Definitions decisions and dilemmas. *Bov. Proc.* 1996; 29: 3-6.
- Klauke M, Hoffmann B. Progesterone and estrogen receptors in the myometrium of the cow during the estrous cycle and pregnancy and of the sheep at the time of parturition. *Animal Reproduction Science* 1992; 29: 195-203.
- Klisch K, Hecht W, Pfarrer C, Schuler G, Hoffmann B, Leiser R. DNA content and ploidy level of bovine placentomal trophoblast giant cells. *Placenta* 1999; 20: 451-8.
- Klisch K, De Sousa NM, Beckers JF, Leiser R, Pich A. Pregnancy associated glycoprotein-1, -6, -7, and -17 are major products of bovine binucleate trophoblast giant cells at midpregnancy. *Mol Reprod Dev* 2005; 71: 453-60.
- Klucinski W, Degorski A, Miernik-Degorska E, Targowski S, Winnicka A. Effect of ketone bodies on the phagocytic activity of bovine milk macrophages and polymorphonuclear leukocytes. *Zentralbl Veterinarmed A* 1988; 35: 632-9.
- Kolb E. Neuere biochemische Erkenntnisse zur Entstehung und Verhütung der Nachgeburtsverhaltung des Rindes. Übersichtsreferat. *Monatsh. Vet. Med.* 1984; 39: 325-30.
- König HE, Liebich, H.-G. (2002) *Anatomie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*. Schattauer, Stuttgart, New York
- Kossabati MA, Esslemont RJ. The costs of production diseases in dairy herds in England. *Vet J* 1997; 154: 41-51.
- Kowal RC, Richardson JA, Miano JM, Olson EN. EVEC, a novel epidermal growth factor-like repeat-containing protein upregulated in embryonic and diseased adult vasculature. *Circ Res* 1999; 84: 1166-76.
- Krady MM, Zeng J, Yu J, MacLauchlan S, Skokos EA, Tian W, Bornstein P, Sessa WC, Kyriakides TR. Thrombospondin-2 Modulates Extracellular Matrix Remodeling during Physiological Angiogenesis. *The American Journal of Pathology* 2008; 173: 879-91.
- Krawczynski (1999) Reifung und Lösungsprozeß der Plazenta bei den Wiederkäuern Rind, Schaf und Ziege unter besonderer Berücksichtigung hormoneller Vorgänge in der Hochträchtigkeit. Tierärztliche Hochschule, Hannover
- Kurisaki T, Masuda A, Osumi N, Nabeshima Y-i, Fujisawa-Sehara A. Spatially- and temporally-restricted expression of meltrin  $\alpha$  (ADAM12) and  $\beta$  (ADAM19) in mouse embryo. *Mechanisms of Development* 1998; 73: 211-5.
- Lahav J, Schwartz MA, Hynes RO. Analysis of platelet adhesion with a radioactive chemical crosslinking reagent: interaction of thrombospondin with fibronectin and collagen. *Cell* 1982; 31: 253-62.
- Laven RA, Peters AR. Bovine retained placenta: aetiology, pathogenesis and economic loss. *Vet Rec* 1996; 139: 465-71.
- LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, TenHag J, Walton JS, Johnson WH. The effect of prepartum injection of vitamin E on health in transition dairy cows. *J Dairy Sci* 2002; 85: 1416-26.
- LeBlanc SJ, Herdt TH, Seymour WM, Duffield TF, Leslie KE. Peripartum serum vitamin E, retinol, and beta-carotene in dairy cattle and their associations with disease. *J Dairy Sci* 2004; 87: 609-19.

- Lee MJ, Roy NK, Mogford JE, Schiemann WP, Mustoe TA. Fibulin-5 promotes wound healing in vivo. *Journal of the American College of Surgeons* 2004; 199: 403-10.
- Lewis GS. Uterine health and disorders. *J Dairy Sci* 1997; 80: 984-94.
- Li M, Jung A, Ganswindt U, Marini P, Friedl A, Daniel PT, Lauber K, Jendrossek V, Belka C. Aurora kinase inhibitor ZM447439 induces apoptosis via mitochondrial pathways. *Biochem Pharmacol* 2010; 79: 122-9.
- Liebich H-G (2004) *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*, 4 edn. Schattauer, Stuttgart, New York
- Lim S, MacIntyre DA, Lee YS, Khanjani S, Terzidou V, Teoh TG, Bennett PR. Nuclear Factor Kappa B Activation Occurs in the Amnion Prior to Labour Onset and Modulates the Expression of Numerous Labour Associated Genes. *PLoS ONE* 2012; 7: e34707.
- Lindell JO, Kindahl H, Edqvist LE. Prostaglandin release at dexamethasone induced parturitions in cows. *Acta Vet Scand* 1977; 18: 257-65.
- Lindell JO, Kindahl H, Jansson L, Edqvist LE. Post-partum release of prostaglandin F(2alpha) and uterine involution in the cow. *Theriogenology* 1982; 17: 237-45.
- Lindell JO, Kindahl H. Exogenous prostaglandin F2 alpha promotes uterine involution in the cow. *Acta Vet Scand* 1983; 24: 269-74.
- López-Gatius F, Labèrnia J, Santolaria P, López-Béjar M, Rutllant J. Effect of reproductive disorders previous to conception on pregnancy attrition in dairy cows. *Theriogenology* 1996; 46: 643-8.
- Lordier L, Chang Y, Jalil A, Aurade F, Garçon L, Lécluse Y, Larbret F, Kawashima T, Kitamura T, Larghero J, Debili N, Vainchenker W. Aurora B is dispensable for megakaryocyte polyploidization, but contributes to the endomitotic process. *Blood* 2010; 116: 2345-55.
- Luo J, Qiao F, Yin X. Hypoxia induces FGF2 production by vascular endothelial cells and alters MMP9 and TIMP1 expression in extravillous trophoblasts and their invasiveness in a cocultured model. *J Reprod Dev* 2011; 57: 84-91.
- Macdonald P. Diversity in translational regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 326-31.
- Maddali S, Stapleton PP, Freeman TA, Yan Z, Duff M, Smyth GP, Daly JM. Altered cyclooxygenase-2 expression and nitric oxide metabolism following major elective surgery. *J Surg Res* 2004; 116: 211-8.
- Madej A, Kindahl H, Woyno W, Edqvist LE, Stupnicki R. Blood levels of 15-keto-13, 14-dihydroprostaglandin F(2alpha) during the postpartum period in primiparous cows. *Theriogenology* 1984; 21: 279-87.
- Maj JG, Kankofer M. Activity of 72-kDa and 92-kDa matrix metalloproteinases in placental tissues of cows with and without retained fetal membranes. *Placenta* 1997; 18: 683-7.
- Mandruzzato S. Technological platforms for microarray gene expression profiling. *Adv Exp Med Biol* 2007; 593: 12-8.
- Margolis MJ, Williams W.F., Davidson J.P. und Douglass L.W. . Placental necrosis and giant cell numbers in relation to placental retention in cows. *J. Anim. Sci.* 1983; Suppl. 1: 355.
- Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *The FASEB Journal* 1998; 12: 1075-95.
- Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 1990; 6: 121-5.

- McLaren J, Taylor DJ, Bell SC. Increased incidence of apoptosis in non-labour-affected cytotrophoblast cells in term fetal membranes overlying the cervix. *Human Reproduction* 1999; 14: 2895-900.
- McParland PC, Bell SC, Pringle JH, Taylor DJ. Regional and cellular localization of osteonectin/SPARC expression in connective tissue and cytotrophoblastic layers of human fetal membranes at term. *Molecular Human Reproduction* 2001; 7: 463-74.
- Meikrantz W, Schlegel R. Suppression of apoptosis by dominant negative mutants of cyclin-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 1996; 271: 10205-9.
- Melendez P, Donovan GA, Risco CA, Littell R, Goff JP. Effect of calcium-energy supplements on calving-related disorders, fertility and milk yield during the transition period in cows fed anionic diets. *Theriogenology* 2003; 60: 843-54.
- Melendez P, Donovan GA, Risco CA, Goff JP. Plasma mineral and energy metabolite concentrations in dairy cows fed an anionic prepartum diet that did or did not have retained fetal membranes after parturition. *Am J Vet Res* 2004; 65: 1071-6.
- Mellado M, Reyes C. Associations between periparturient disorders and reproductive efficiency in Holstein cows in northern Mexico. *Preventive Veterinary Medicine* 1994; 19: 203-12.
- Meyer HHD (1989) Enzymimmunologische Meßverfahren zur Hormonanalytik. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart. 147
- Michal JJ, Heirman LR, Wong TS, Chew BP, Frigg M, Volker L. Modulatory Effects of Dietary  $\beta$ -Carotene on Blood and Mammary Leukocyte Function in Periparturient Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 1994; 77: 1408-21.
- Mitterhuemer S (2009) Analyse des Transkriptoms von bovinem Milchdrüsengewebe nach experimenteller Infektion mit E. coli 1303. Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Miyoshi M, Sawamukai Y, Iwanaga T. Reduced phagocytotic activity of macrophages in the bovine retained placenta. *Reprod Domest Anim* 2002; 37: 53-6.
- Monroe DG, Berger RR, Sanders MM. Tissue-Protective Effects of Estrogen Involve Regulation of Caspase Gene Expression. *Molecular Endocrinology* 2002; 16: 1322-31.
- Mumby SM, Raugi GJ, Bornstein P. Interactions of thrombospondin with extracellular matrix proteins: selective binding to type V collagen. *J Cell Biol* 1984; 98: 646-52.
- Murphy-Ullrich JE, Hook M. Thrombospondin modulates focal adhesions in endothelial cells. *J Cell Biol* 1989; 109: 1309-19.
- Murphy-Ullrich JE, Schultz-Cherry S, Hook M. Transforming growth factor-beta complexes with thrombospondin. *Mol Biol Cell* 1992; 3: 181-8.
- Murray RD, Allison JD, Gard RP. Bovine endometritis: comparative efficacy of alfaprostol and intrauterine therapies, and other factors influencing clinical success. *Vet Rec* 1990; 127: 86-90.
- Musah AI, Schwabe C, Willham RL, Anderson LL. Induction of parturition, progesterone secretion, and delivery of placenta in beef heifers given relaxin with cloprostenol or dexamethasone. *Biology of Reproduction* 1987; 37: 797-803.
- Nagase H, Woessner JF. Matrix Metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 21491-4.
- Nakao T, Gamal A, Osawa T, Nakada K, Moriyoshi M, Kawata K. Postpartum plasma PGF metabolite profile in cows with dystocia and/or retained

- placenta, and effect of fenprostalene on uterine involution and reproductive performance. *J Vet Med Sci* 1997; 59: 791-4.
- Narizhneva NV, Razorenova OV, Podrez EA, Chen J, Chandrasekharan UM, DiCorleto PE, Plow EF, Topol EJ, Byzova TV. Thrombospondin-1 up-regulates expression of cell adhesion molecules and promotes monocyte binding to endothelium. *The FASEB Journal* 2005;
- Niculescu MD, Yamamuro Y, Zeisel SH. Choline availability modulates human neuroblastoma cell proliferation and alters the methylation of the promoter region of the cyclin-dependent kinase inhibitor 3 gene. *J Neurochem* 2004; 89: 1252-9.
- Nie J, Pei D. Rapid inactivation of alpha-1-proteinase inhibitor by neutrophil specific leukolysin/membrane-type matrix metalloproteinase 6. *Experimental Cell Research* 2004; 296: 145-50.
- Niskanen R, Emanuelson U, Sundberg J, Larsson B, Alenius S. Effects of infection with bovine virus diarrhoea virus on health and reproductive performance in 213 dairy herds in one county in Sweden. *Preventive Veterinary Medicine* 1995; 23: 229-37.
- Noakes DE (2009) Development of the conceptus In: *Veterinary reproduction and obstetrics*, ninth edn. Ed Noakes DE, Parkinson, T.J., England, G.C.W. Saunders Elsevier, London. 61-76
- Nonaka R, Onoue S, Wachi H, Sato F, Urban Z, Starcher BC, Seyama Y. DANCE/fibulin-5 promotes elastic fiber formation in a tropoelastin isoform-dependent manner. *Clin Biochem* 2009; 42: 713-21.
- Olson JD, K.N. Bretzlaff, R.G. Mortimer und L. Ball (1986) *The metritis-pyometra complex*. Morrow, D.A. (Hrsg.), W.B. Saunders Co, Philadelphia. 227-36
- Osmers RG, Blaser J, Kuhn W, Tschesche H. Interleukin-8 synthesis and the onset of labor. *Obstet Gynecol* 1995; 86: 223-9.
- Paisley LG, Mickelsen WD, Anderson PB. Mechanisms and therapy for retained fetal membranes and uterine infections of cows: A review. *Theriogenology* 1986; 25: 353-81.
- Parkinson TJ (2009) Subfertility and Infertility. In: *Veterinary Reproduction and Obstetrics*, ninth edn. Ed Noakes DE, Parkinson, T.J., England, G.C.W. . Saunders Elsevier, London. 393-476
- Pazin DE, Albrecht KH. Developmental expression of Smoc1 and Smoc2 suggests potential roles in fetal gonad and reproductive tract differentiation. *Developmental Dynamics* 2009; 238: 2877-90.
- Petac D. Untersuchungen zur Aufklärung des Lösungsmechanismus der Plazenta beim Rind. *Tierärztliche Umschau* 1985; 40
- Peter AT, Bosu WT. Relationship of uterine infections and folliculogenesis in dairy cows during early puerperium. *Theriogenology* 1988; 30: 1045-51.
- Pfarrer C, Hirsch P, Guillomot M, Leiser R. Interaction of integrin receptors with extracellular matrix is involved in trophoblast giant cell migration in bovine placentomes. *Placenta* 2003; 24: 588-97.
- Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem. J.* 2005; 386: 15-27.
- Quiroz-Rocha GF, LeBlanc SJ, Duffield TF, Wood D, Leslie KE, Jacobs RM. Reference limits for biochemical and hematological analytes of dairy cows one week before and one week after parturition. *Can Vet J* 2009; 50: 383-8.
- Radichev IA, Remacle AG, Shiryaev SA, Purves AN, Johnson SL, Pellicchia M, Strongin AY. Biochemical Characterization of the Cellular

- Glycosylphosphatidylinositol-linked Membrane Type-6 Matrix Metalloproteinase. *Journal of Biological Chemistry* 2010; 285: 16076-86.
- Ragno P, Montuori N, Salzano S, Rossi G. Urokinase-type plasminogen-activator and normal thyroid cell adhesion to the extracellular matrix. *Biochimie* 1999; 81: 355-8.
- Rexha S, Grunert E. [The forecasting of the time of calving using a rapid progesterone test]. *Tierarztl Prax* 1993; 21: 197-200.
- Ricke WA, Smith GW, McIntush EW, Smith MF. Analysis of luteal tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, and -3 during prostaglandin F(2alpha)-induced luteolysis. *Biol Reprod* 2002; 66: 1387-94.
- Risco CA, Drost M, Thatcher WW, Savio J, Thatcher MJ. Effects of calving-related disorders on prostaglandin, calcium, ovarian activity and uterine involution in postrartum dairy cows. *Theriogenology* 1994a; 42: 183-203.
- Risco CA, Archbald LF, Elliott J, Tran T, Chavatte P. Effect of hormonal treatment on fertility in dairy cows with dystocia or retained fetal membranes at parturition. *J Dairy Sci* 1994b; 77: 2562-9.
- Romaniuk J. Nachgeburtsverhalten bei den Milchkühen- Vorkommen und Einfluss auf die Fruchtbarkeit. *Tierärztl. Umschau* 1985; 40: 130-3.
- Royet J-P. Stereology: A method for analyzing images. *Progress in Neurobiology* 1991; 37: 433-74.
- Rukkwamsuk T, Wensing T, Geelen MJ. Effect of overfeeding during the dry period on regulation of adipose tissue metabolism in dairy cows during the periparturient period. *J Dairy Sci* 1998; 81: 2904-11.
- Rüsse I (1998) Frühgravidität, Implantation und Plazentation. In: *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. Ed Rüsse IS, F. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg
- Saito S, Sakai M, Sasaki Y, Tanebe K, Tsuda H, Michimata T. Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1:Th2 cell ratio during normal human pregnancy and preeclampsia. *Clin Exp Immunol* 1999a; 117: 550-5.
- Saito S, Tsukaguchi N, Hasegawa T, Michimata T, Tsuda H, Narita N. Distribution of Th1, Th2, and Th0 and the Th1/Th2 cell ratios in human peripheral and endometrial T cells. *Am J Reprod Immunol* 1999b; 42: 240-5.
- Sallmann H-P, Fuhrmann H (2000) Physiologische Aspekte der Leberfunktion. In: *Physiologie der Haustiere*. Ed von Engelhardt WB, G. (Hrsg.). Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart
- Sandals WC, Curtis RA, Cote JF, Martin SW. The effect of retained placenta and metritis complex on reproductive performance in dairy cattle -- a case control study. *Can Vet J* 1979; 20: 131-5.
- Sandy JD, Westling J, Kenagy RD, Iruela-Arispe ML, Verscharen C, Rodriguez-Mazaneque JC, Zimmermann DR, Lemire JM, Fischer JW, Wight TN, Clowes AW. Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. *J Biol Chem* 2001; 276: 13372-8.
- Sang QX. Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Cell Res* 1998; 8: 171-7.
- Sarges J, Heuwieser W, Schlüns J, Drewes B. Immunohistological Examination on the Distribution of Collagen Types I, III, IV and V in Bovine Post Partum Placentomes. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 1998; 45: 1-10.

- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270: 467-70.
- Schiemann WP, Blobel GC, Kalume DE, Pandey A, Lodish HF. Context-specific effects of fibulin-5 (DANCE/EVEC) on cell proliferation, motility, and invasion. Fibulin-5 is induced by transforming growth factor-beta and affects protein kinase cascades. *J Biol Chem* 2002; 277: 27367-77.
- Schlafer DH, Fisher PJ, Davies CJ. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61: 145-60.
- Schnorr B, Kressin M (2006) Embryologie der Haustiere
- Schoon HA (1989) Lungen- und Plazentarreifung beim Rind. Untersuchungen zur Pathogenese des Atemnotsyndroms und der Retentio secundinarum. Tierärztliche Hochschule, Hannover
- Schoon HA, Schoon D, Nolte I. Untersuchungen zur Pathogenese des „Endometritis-Pyometra-Komplexes“ der Hündin. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 1992; 39: 43-56.
- Schukken YH, McCulloch CE, Erb HN. Behavior of the Breslow-Storer model in a prospective study on retained placenta in dairy cows. *Acta Vet Scand Suppl* 1988; 84: 453-5.
- Schukken YH. Retained placenta and mastitis. *Cornell Vet* 1989; 79: 129-31.
- Schuler G, Wirth C, Klisch K, Pfarrer C, Leiser R, Hoffmann B. Immunolocalization of progesterone receptors in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition. *Biol Reprod* 1999; 61: 797-801.
- Schulz L-C, Grunert E. Physiologie und Pathologie der puerperalen Involution des Rinderuterus. *Dtsch. tierärztl. Wochenschr.* 1959; 66: 29-37.
- Schulz LC, Merkt H. Morphologische Befunde an exstirpierten Plazentomen, zugleich ein Beitrag zur Ätiologie der Retentio secundinarum beim Rind. *Monatshefte Vet.-Med* 1956; 11: 712-4.
- Schulze A, Downward J. Navigating gene expression using microarrays--a technology review. *Nat Cell Biol* 2001; 3: E190-5.
- Scott HMS, M. J.; Gaiser, J. C.; Belschner, A. P.; Jordan, E. R. . Effect of intrauterine administration of ceftiofur on fertility and risk of culling in postparturient cows with retained fetal membranes, twins, or both. *Am Vet Med Assoc* 2005; 226(12): 2044-52.
- Seals DF, Courtneidge SA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes & Development* 2003; 17: 7-30.
- Senger PL (2005) Placentation, the endocrinology of gestation and parturition. In: *Pathways to Pregnancy and Parturition*, second edn. Ed Senger PL. Current Conceptions, Inc., Pullman, WA. 306
- Sgorbissa A, Benetti R, Marzinotto S, Schneider C, Brancolini C. Caspase-3 and caspase-7 but not caspase-6 cleave Gas2 in vitro: implications for microfilament reorganization during apoptosis. *Journal of Cell Science* 1999a; 112: 4475-82.
- Sgorbissa A, Benetti R, Marzinotto S, Schneider C, Brancolini C. Caspase-3 and caspase-7 but not caspase-6 cleave Gas2 in vitro: implications for microfilament reorganization during apoptosis. *J Cell Sci* 1999b; 112 ( Pt 23): 4475-82.
- Sharpe KL, Eiler H, Cullen WC, Hopkins FM. Morphometric analysis of collagen in gestational and retained bovine placentomes. *Theriogenology* 1989; 32: 485-91.



- Sharpe KL, Eiler H, Hopkins FM. Changes in the proportion of type I and type III collagen in the developing and retained bovine placentome. *Biol Reprod* 1990; 43: 229-35.
- Sheldon IM. The postpartum uterus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2004; 20: 569-91.
- Sheldon IM, Williams EJ, Miller AN, Nash DM, Herath S. Uterine diseases in cattle after parturition. *Vet J* 2008; 176: 115-21.
- Shemesh M, Hansel W, Strauss JF, 3rd. Modulation of bovine placental prostaglandin synthesis by an endogenous inhibitor. *Endocrinology* 1984; 115: 1401-5.
- Shen-Orr SS, Tibshirani R, Khatri P, Bodian DL, Staedtler F, Perry NM, Hastie T, Sarwal MM, Davis MM, Butte AJ. Cell type-specific gene expression differences in complex tissues. *Nat Meth* 2010; 7: 287-9.
- Shi L, Reid LH, Jones WD, Shippy R, Warrington JA, Baker SC, Collins PJ, de Longueville F, Kawasaki ES, Lee KY, Luo Y, Sun YA, Willey JC, Setterquist RA, Fischer GM, Tong W, Dragan YP, Dix DJ, Frueh FW, Goodsaid FM, Herman D, Jensen RV, Johnson CD, Lobenhofer EK, Puri RK, Schrf U, Thierry-Mieg J, Wang C, Wilson M, Wolber PK, Zhang L, Amur S, Bao W, Barbacioru CC, Lucas AB, Bertholet V, Boysen C, Bromley B, Brown D, Brunner A, Canales R, Cao XM, Cebula TA, Chen JJ, Cheng J, Chu TM, Chudin E, Corson J, Corton JC, Croner LJ, Davies C, Davison TS, Delenstarr G, Deng X, Dorris D, Eklund AC, Fan XH, Fang H, Fulmer-Smentek S, Fuscoe JC, Gallagher K, Ge W, Guo L, Guo X, Hager J, Haje PK, Han J, Han T, Harbottle HC, Harris SC, Hatchwell E, Hauser CA, Hester S, Hong H, Hurban P, Jackson SA, Ji H, Knight CR, Kuo WP, LeClerc JE, Levy S, Li QZ, Liu C, Liu Y, Lombardi MJ, Ma Y, Magnuson SR, Maqsoodi B, McDaniel T, Mei N, Myklebost O, Ning B, Novoradovskaya N, Orr MS, Osborn TW, Papallo A, Patterson TA, Perkins RG, Peters EH, Peterson R, Philips KL, Pine PS, Pusztai L, Qian F, Ren H, Rosen M, Rosenzweig BA, Samaha RR, Schena M, Schroth GP, Shchegrova S, Smith DD, Staedtler F, Su Z, Sun H, Szallasi Z, Tezak Z, Thierry-Mieg D, Thompson KL, Tikhonova I, Turpaz Y, Vallanat B, Van C, Walker SJ, Wang SJ, Wang Y, Wolfinger R, Wong A, Wu J, Xiao C, Xie Q, Xu J, Yang W, Zhong S, Zong Y, Slikker W, Jr. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 1151-61.
- Shu L, Peng X, Zhang S, Deng G, Wu Y, He M, Li B, Li C, Zhang K. Non-classical Major Histocompatibility Complex Class Makes a Crucial Contribution to Reproduction in the Dairy Cow. *J Reprod Dev* 2012;
- Smith BI, Donovan GA, Risco C, Littell R, Young C, Stanker LH, Elliott J. Comparison of various antibiotic treatments for cows diagnosed with toxic puerperal metritis. *J Dairy Sci* 1998; 81: 1555-62.
- Smith GW, Juengel JL, McIntush EW, Youngquist RS, Garverick HA, Smith MF. Ontogenies of messenger RNA encoding tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 within bovine periovulatory follicles and luteal tissue. *Domestic Animal Endocrinology* 1996; 13: 151-60.
- Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004; 3: Article3.
- Smyth GK, Michaud J, Scott HS. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 2005; 21: 2067-75.

- Sobiraj A, Draeger K-GB, H. Über den Einfluß von Geburtsverlauf und Nachgeburtsabgang auf den bakteriellen Keimgehalt des bovinen Uterus unter besonderer Berücksichtigung der Resistenzlage von Bakterien unter wiederholter lokal-antibiotischer Behandlung. *Reproduction in Domestic Animals* 1988; 22: 173–83.
- Starr AE, Bellac CL, Dufour A, Goebeler V, Overall CM. Biochemical Characterization and N-terminomics Analysis of Leukolysin, the Membrane-type 6 Matrix Metalloprotease (MMP25). *Journal of Biological Chemistry* 2012; 287: 13382-95.
- Sternlicht MD, Werb Z. How Matrix Metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2001; 17: 463-516.
- Stöber M (2002) Fütterungs- und stoffwechselbedingte Krankheiten der Leber. In: *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. Ed Rosenberger GDGGH-DSMH. Verlag Paul Parey, Berlin. 648- 64
- Stöber MG, H.D. (1990) Kreislauf. In: *Die klinische Untersuchung des Rindes*. Ed Rosenberger G. Paul Paray Verlag, Berlin. 223
- Strahl H (1906) Über die Semiplacenta multiplex von cerphus elaphus L.J.F. Bergmann, Giessen
- Streyl D, Sauter-Louis C, Braunert A, Lange D, Weber F, Zerbe H. Establishment of a standard operating procedure for predicting the time of calving in cattle. *J Vet Sci* 2011; 12: 177-85.
- Streyl D, Kenngott R, Herbach N, Wanke R, Blum H, Sinowatz F, Wolf E, Zerbe H, Bauersachs S. Gene expression profiling of bovine peripartal placentomes: detection of molecular pathways potentially involved in the release of foetal membranes. *Reproduction* 2012; 143: 85-105.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102: 15545-50.
- Takagi M, Yamamoto D, Ohtani M, Miyamoto A. Quantitative analysis of messenger RNA expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9), tissue inhibitor-2 of matrix metalloproteinases (TIMP-2), and steroidogenic enzymes in bovine placentomes during gestation and postpartum. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 801-7.
- Tan K, Lawler J. The interaction of Thrombospondins with extracellular matrix proteins. *J Cell Commun Signal* 2009; 3: 177-87.
- Tang BL. ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 33-44.
- Tang L, Zhang Y, Pan H, Luo Q, Zhu X-M, Dong M-Y, Leung P, Sheng J-Z, Huang H-F. Involvement of cyclin B1 in progesterone-mediated cell growth inhibition, G2/M cell cycle arrest, and apoptosis in human endometrial cell. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2009; 7: 144.
- Targowski SP, Klucinski W. Reduction in mitogenic response of bovine lymphocytes by ketone bodies. *Am J Vet Res* 1983; 44: 828-30.
- Tarui T, Andronicos N, Czekay R-P, Mazar AP, Bdeir K, Parry GC, Kuo A, Loskutoff DJ, Cines DB, Takada Y. Critical Role of Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  in Urokinase (uPA)/Urokinase Receptor (uPAR, CD87) Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 29863-72.
- Taverne MA, Noakes DE (2009) Parturition and the care of parturient animals, including the newborn. In: *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. Eds Noakes D, Parkinson T, England G. Saunders Elsevier, London. 154-205

- Tian W, Noakes DE. Effects of four hormone treatments after calving on uterine and cervical involution and ovarian activity in cows. *Vet Rec* 1991; 128: 566-9.
- Tolhuysen I (1990) Untersuchungen zur spontanen morphologisch-funktionellen Plazentareifung beim Rind in der Endphase der Gravidität sowie modifizierte Effekte einer medikamentellen Geburtseinleitung auf das Endometrium und die Nebennieren. Tierärztliche Hochschule Hannover
- Tortorella MD, Arner EC, Hills R, Easton A, Korte-Sarfaty J, Fok K, Wittwer AJ, Liu R-Q, Malfait A-M.  $\alpha$ 2-Macroglobulin Is a Novel Substrate for ADAMTS-4 and ADAMTS-5 and Represents an Endogenous Inhibitor of These Enzymes. *Journal of Biological Chemistry* 2004a; 279: 17554-61.
- Tortorella MD, Arner EC, Hills R, Easton A, Korte-Sarfaty J, Fok K, Wittwer AJ, Liu R-Q, Malfait A-M.  $\alpha$ 2-Macroglobulin Is a Novel Substrate for ADAMTS-4 and ADAMTS-5 and Represents an Endogenous Inhibitor of These Enzymes. *Journal of Biological Chemistry* 2004b; 279: 17554-61.
- Tsatas D, Baker MS, Rice GE. Differential expression of proteases in human gestational tissues before, during and after spontaneous-onset labour at term. *Journal of Reproduction and Fertility* 1999; 116: 43-9.
- Ulazzi L, Sabbioni S, Miotto E, Veronese A, Angusti A, Gafa R, Manfredini S, Farinati F, Sasaki T, Lanza G, Negrini M. Nidogen 1 and 2 gene promoters are aberrantly methylated in human gastrointestinal cancer. *Molecular Cancer* 2007; 6: 17.
- Van Werven T, Schukken Y. H., Lloyd J., Brand A., Heeringa H. T., Shea M. . The effects of duration of retained placenta on reproduction, milk production, postpartum disease and culling rate. *Theriogenology* 1992; 37: 1191-203.
- Velazquez-Delgado EM, Hardy JA. Zinc-Mediated Allosteric Inhibition of Caspase-6. *Journal of Biological Chemistry* 2012;
- von Engelhardt W, Breves G (2004) Physiologie der Haustiere. Enke, Hannover
- Wagsäter D, Björk H, Zhu C, Björkegren J, Valen G, Hamsten A, Eriksson P. ADAMTS-4 and -8 are inflammatory regulated enzymes expressed in macrophage-rich areas of human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 2008; 196: 514-22.
- Walsh RB, Walton JS, Kelton DF, LeBlanc SJ, Leslie KE, Duffield TF. The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows. *J Dairy Sci* 2007; 90: 2788-96.
- Walter I, Boos A. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor-2 of matrix metalloproteinases (TIMP-2) in the placenta and interplacental uterine wall in normal cows and in cattle with retention of fetal membranes. *Placenta* 2001; 22: 473-83.
- Wang H-X, Zhao Y-G, Wang H-M, Yang Q, Lin H-Y, Sang Q-XA, Zhu C. Expression of adamalysin 19/ADAM19 in the endometrium and placenta of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) during early pregnancy. *Molecular Human Reproduction* 2005; 11: 429-35.
- Wang XX, Liu R, Jin SQ, Fan FY, Zhan QM. Overexpression of Aurora-A kinase promotes tumor cell proliferation and inhibits apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cell line. *Cell Res* 2006; 16: 356-66.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 57-63.
- Weeks AD. The retained placenta. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2008; 22: 1103-17.
- Wei P, Zhao Y-G, Zhuang L, Ruben S, Sang Q-XA. Expression and Enzymatic Activity of Human Disintegrin and Metalloproteinase ADAM19/Meltrin

- Beta. Biochemical and Biophysical Research Communications 2001; 280: 744-55.
- Weinreb RN, Kashiwagi K, Kashiwagi F, Tsukahara S, Lindsey JD. Prostaglandins increase matrix metalloproteinase release from human ciliary smooth muscle cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1997; 38: 2772-80.
- Wessendorf G, Scheibl P, Zerbe PS. [Effect of estrogens on the immune system with regard to bovine placental retention]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1998; 105: 32-4.
- Whitlock BK, Maxwell HS. Pregnancy-associated glycoproteins and pregnancy wastage in cattle. *Theriogenology* 2008; 70: 550-9.
- Whittle WL, Holloway AC, Lye SJ, Gibb W, Challis JRG. Prostaglandin Production at the Onset of Ovine Parturition Is Regulated by Both Estrogen-Independent and Estrogen-Dependent Pathways. *Endocrinology* 2000; 141: 3783-91.
- Williams WF, Margolis MJ, Manspeaker J, Douglass LW, Davidson JP. Peripartum changes in the bovine placenta related to fetal membrane retention. *Theriogenology* 1987; 28: 213-23.
- Willms N (1986) Morphometrische Untersuchungen zur spontanen und induzierten Plazentareifung beim Rind in der Endphase der Gravidität. Tierärztliche Hochschule Hannover
- Woicke J, Schoon HA, Heuwieser W, Schulz LC, Grunert E. [Morphological and functional aspects of placental maturing mechanisms in the cow. 1. Light microscopic findings]. *Zentralbl Veterinarmed A* 1986; 33: 660-7.
- Wooding FB. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta* 1992; 13: 101-13.
- Wooding FB, Morgan G, Monaghan S, Hamon M, Heap RB. Functional specialization in the ruminant placenta: evidence for two populations of fetal binucleate cells of different selective synthetic capacity. *Placenta* 1996; 17: 75-86.
- Wooding FBP, Wathes DC. Binucleate cell migration in the bovine placentome. *Journal of Reproduction and Fertility* 1980; 59: 425-30.
- Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008; 214: 199-210.
- Xie XH, An HJ, Kang S, Hong S, Choi YP, Kim YT, Choi YD, Cho NH. Loss of Cyclin B1 followed by downregulation of Cyclin A/Cdk2, apoptosis and antiproliferation in Hela cell line. *Int J Cancer* 2005; 116: 520-5.
- Yanagisawa H, Davis EC, Starcher BC, Ouchi T, Yanagisawa M, Richardson JA, Olson EN. Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. *Nature* 2002; 415: 168-71.
- Yang H, He L, Kruk P, Nicosia SV, Cheng JQ. Aurora-A induces cell survival and chemoresistance by activation of Akt through a p53-dependent manner in ovarian cancer cells. *Int J Cancer* 2006; 119: 2304-12.
- Yauk CL, Berndt ML. Review of the literature examining the correlation among DNA microarray technologies. *Environ Mol Mutagen* 2007; 48: 380-94.
- Yoshida M, Sagawa N, Itoh H, Yura S, Takemura M, Wada Y, Sato T, Ito A, Fujii S. Prostaglandin F2 $\alpha$ , cytokines and cyclic mechanical stretch augment matrix metalloproteinase-1 secretion from cultured human uterine cervical fibroblast cells. *Molecular Human Reproduction* 2002; 8: 681-7.
- Yu Z, Visse R, Inouye M, Nagase H, Brodsky B. Defining Requirements for Collagenase Cleavage in Collagen Type III Using a Bacterial Collagen System. *Journal of Biological Chemistry* 2012; 287: 22988-97.

- Zdunczyk SA, D.; Grunert, E. The relationship between bovine clinical mastitis at the time of parturition and retained placenta. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 1992; 99: 386-9.
- Zeiler M (2006) In vitro Expression von Integrinen und extrazellulärer Matrix in bovinen Plazentazellen. In: Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie, und -Embryologie. Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen
- Zerobin K (1987) Physiologie der Fortpflanzung. In: "Lehrbuch der Veterinär-Physiologie". Eds Scheunert A, Trautmann A. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg
- Zhao Y-G, Wei P, Sang Q-XA. Inhibitory Antibodies against Endopeptidase Activity of Human Adamalysin 19. Biochemical and Biophysical Research Communications 2001; 289: 288-94.
- Ziegler U (1978) Zytologische Untersuchungen an Plazentomen im Hinblick auf Nachgeburtsverhaltungen beim Rind. Tierärztliche Hochschule Hannover

---

**IX. ANHANG**

Siehe beigelegte CD-Rom auf der letzten Seite.

Tabelle 1: RMA summary present all (Tabelle der RMA-Algorithmus-Analyse aller 40 Proben)

Tabelle 2: AP-IP Datensatz

Tabelle 3: Gentabelle der ausgewählten 9 „ret“- versus 9 „norm“-Tiere

Tabelle 4: vollständige Ergebnisse der DAVID-Analyse, unterteilt in 2 Excelblätter mit den hoch- und herunterregulierten Genen

## **X. DANKSAGUNG**

Mein ganz besonderer Dank gebührt Prof. Dr. Holm Zerbe für die Überlassung des Themas, den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz sowie die Geduld, die stets konstruktive Kritik, die vielen Anregungen, Diskussionen und vor allem das entgegen gebrachte Vertrauen, haben maßgeblich dazu beigetragen, mit Freude diese Arbeit zu erstellen.

Ein ganz herzlicher Dank gilt meinem Betreuer Dr. Dominik Streyl für die Betreuung des vorliegenden Dissertationsprojektes.

Der Firma Zoetis Animal Health danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projektes und Dr. Leopold Götze und Dr. Isabelle Dieuzy-Labaye für die Unterstützung sowie fachlichen Ratschlägen zur Durchführung des Projektes.

Bei Dr. Anna Braunert möchte ich mich aufrichtig für die gemeinsame Zusammenarbeit in den Phasen der Vorbereitung, über die Probennahme bis zur Auswertung der großen Datenmenge bedanken.

Ein herausragendes Dankeschön gilt der Familie Freitag, v.a. Karl-Heinz und Karin, für ihre unermüdliche Mithilfe bei Fragen der Organisation im Stall und der liebevollen Versorgung in schlaf- und rastlosen Probenahmezeiten sowie der Vermittlung des Gefühls, Willkommen und zu Hause zu sein. Genauso bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Betriebs für Ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft in technischen und tierbezogenen Problemen.

Herzlichen Dank an das Institut für Tierpathologie der Tierärztlichen Fakultät, LMU München, insbesondere an die hilfreiche und stets motivierende Betreuung durch Privatdozentin Dr. Nadja Herbach, Dr. Andreas Blutke und Prof. Dr. Rüdiger Wanke bei der Durchführung der quantitativ stereologischen Untersuchungen.

Dem Labor LAFUGA des Genzentrums der LMU München gebührt ein außerordentlicher Dank für die Kooperation, Bearbeitung von Probenmaterial und unabdingbare Hilfestellung, insbesondere durch Privatdozent Dr. Stefan Bauersachs sowie Prof. Dr. Eckhard Wolf, Dr. Blum, Dr. Krebs, Simone Gebhardt, Alexander Graf und Andrea Klanner. Ohne deren Hilfsbereitschaft gäbe es keine Analysen von der Unmenge der Genexpressionsdaten oder deren statistischen Auswertungen.

Im besonderen Maße danke ich dem Labor der Klinik für Wiederkäuer für die konstante Unterstützung durch die medizinisch technischen Assistentinnen und

ihrem Laborleiter, Dr. Frank Weber, inklusive dessen fortwährende motivierende, aufmunternde Art und seinem Ideenreichtum.

Dr. Carola Sauter-Louis erhält ein unbeschreibliches Dankeschön für die Hilfestellung bei den Überlegungen der Probenprotokolle, bei denen auch Dr. Daniel Mehne mitgearbeitet hat. Die statistischen Auswertungen von den unzähligen Blutproben bis zu den multiplen Genexpressionsdaten, wären sonst nicht in dieser Form vorhanden.

Ein buchstäbliches Dankeschön geht an Dr. Oliver Stadler für die Hilfe bei der Gestaltung und Formatierung der Doktorarbeit, genauso möchte ich Dr. Jens Brähmig herzlich für seine unermüdliche Hilfe bei Computerangelegenheiten danken.

Bei Dr. Wolfram Petzl möchte ich mich ausdrücklich für die permanente Motivierung mit seiner stets freundlichen, gutgelaunten und ansteckenden Art bedanken. Zudem hat er meine gesamten elektronischen Daten gerettet und mir immer Hilfe bei der Erstellung von Grafiken geleistet.

Bei allen Mitarbeitern, vom Verwaltungspersonal über die Tierpfleger, die tieärztlichen KollegInnen der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung, bedanke ich mich herzlich für die Unterstützung bei dieser Dissertation. Darüber hinaus danke ich zutiefst Dr. Monique Lind, Dr. Katharina Waldmüller, Panajota Vassiliadis und Dr. Christina Seifert für ihre Freundschaft, Anteilnahme und Korrekturlesen der einzelnen Kapitel und Dr. Rainer Martin für die Unterstützung bei der Lösung von kniffligen Fragestellungen bezüglich der Stoffwechselfparameter.

Rita Radloff danke ich für Alles, was sie für mich getan hat, vom Zuhören, Aufmuntern, Trösten, der Umsorgung bis zur Bereitstellung ihrer absolut selbstlosen Hilfsbereitschaft.

Ein herzliches Dankeschön für die Versorgung mit schmackhaften Köstlichkeiten im kühlen Garten oder an gemütlichen Adventstagen im warmen und harmonischen Haus von Ingrid und Dr. Wilhelm Grötsch und durch ihre zugleich fachlichen, neutralen und liebevollen Ratschläge habe ich mich von Anfang in München ein Stück wie zu Haus und geborgen gefühlt.

Aufrichtig dankbar bin ich Franziska Eisenbeiß für ihre bedingungslose Freundschaft und die unermüdliche Unterstützung beim Suchen der wissenschaftlichen Paper und dem Korrekturlesen.



Meiner Übersetzerin, Sabine Matejek, danke ich vielmals für ihre Unterstützung, insbesondere für die aufmunternden Worte und dir, Stefanie Rudloff, danke ich für unsere gemeinsame Zeit, die wir in München verbracht haben und das Korrekturlesen meiner ersten aufs Papier gebrachten Sätze. Genauso geht ein großes Dankeschön an Julia Mindner für ihre Rückkehr nach München, ihre Freundschaft und tröstende Worte.

Nicht zuletzt bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie für die grenzenlose Unterstützung und den Rückhalt, der mir immer gewährt wird. Ohne dich, meine liebe Mum, wäre das alles nicht durchführbar gewesen. In allen Gemütslagen stehst du mir mit Rat und Tat persönlich, am Telefon oder am PC bei. Bei der Suche nach den richtigen Worten hast du sie gefunden.