

**Untersuchungen zur Interferon-Signaltransduktion  
im Endometrium des Rindes**

von Simone Tamara Schabmeyer

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

**Untersuchungen zur Interferon-Signaltransduktion im  
Endometrium des Rindes**

von Simone Tamara Schabmeyer

aus Hilgertshausen

München 2022



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

Lehrstuhl für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Mitbetreuung durch:

Dr. Marie Margarete Meyerholz

Dr. Dipl. Ing. Agr. Frank Weber



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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Univ.-Prof. Dr. Eckard Wolf

Priv.-Doz. Dr. Elisabeth G. Kemter

Univ.-Prof. Dr. Ellen Kienzle

Tag der Promotion: 12.02.2022



Für alle, die mich begleitet haben





## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Störung der frühen embryo-maternalen Kommunikation beim Rind.....</b>	<b>3</b>
1.1.	Embryo-maternale Kommunikation .....	4
1.2.	Störfaktoren der frühen embryo-maternalen Kommunikation.....	7
1.2.1.	Nicht-infektionsassoziierte Störfaktoren.....	8
1.2.2.	Infektionsassoziierte Störfaktoren .....	8
1.2.3.	Entzündung der Gebärmutter.....	10
1.2.3.1.	Metritis.....	10
1.2.3.2.	Endometritis.....	11
1.2.3.3.	Virale Infektionen des Endometriums .....	14
<b>2.</b>	<b>Interferone.....</b>	<b>15</b>
2.1.	Einteilung, Aufbau und Funktion der Interferone – Ein Überblick .	15
2.2.	Typ-1 Interferone.....	16
2.2.1.	Typ-1 Interferon Rezeptor .....	16
2.2.2.	Typ-1 Interferon Signaltransduktionswege.....	17
2.2.2.1.	Klassischer Signaltransduktionsweg.....	17
2.2.2.2.	Nicht-klassischer Signaltransduktionsweg .....	18
2.2.3.	Typ-1 Interferon stimulierte Gene .....	19
2.2.3.1.	Klassische Interferon stimulierte Gene.....	19
2.2.3.2.	Nicht-klassische Interferon stimulierte Gene.....	19
2.2.4.	IFN $\tau$ : Das Schlüsselsignal der bovinen Trächtigkeitserkennung....	21

3.	Immunologisches Wechselspiel zwischen Endometrium und IFN $\tau$ .....	23
III.	PUBLIKATION .....	25
IV.	DISKUSSION.....	45
1.	Validierung des verwendeten endometrialen Explantmodells...	46
2.	Konkurrenzsituation von IFN $\tau$ und IFN $\alpha$ entlang des Signalweges.....	51
3.	Typ-1 Interferon induzierte konzentrationsabhängige Regulation von MX1 und FABP3 .....	54
4.	Fazit und Ausblick .....	59
V.	ZUSAMMENFASSUNG .....	63
VI.	SUMMARY .....	67
VII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	71
VIII.	DANKSAGUNG .....	97

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
BHV-4	Bovines Herpes Virus Typ-4
BTV	Blauzungenvirus
BVDV	Bovines Virusdiarrhoe Virus
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CST3	Cystatin-3
CST6	Cystatin-6
FABP3	Fatty Acid Binding Protein 3
GAS	Interferon Gamma Activated Site
IFN $\alpha$	Interferon alpha
IFN $\beta$	Interferon beta
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IFN $\delta$	Interferon delta
IFN $\varepsilon$	Interferon epsilon
IFN $\zeta$	Interferon zeta

IFN $\kappa$	Interferon kappa
IFN $\lambda$	Interferon lambda
IFN $\nu$	Interferon ny
IFN $\tau$	Interferon tau
IFN $\omega$	Interferon omega
IFNAR	Typ-1 Interferon Rezeptor
IFNAR1	Typ-1 Interferon Rezeptoruntereinheit 1
IFNAR2	Typ-1 Interferon Rezeptoruntereinheit 2
IRF	Interferon regulatorischer Faktor
ISG	Interferon stimuliertes Gen
ISG15	Interferon stimuliertes Gen 15
ISRE	Interferon stimulated response element
JAK	Janus-aktivierte Kinase, <i>auch Plural</i>
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase, <i>auch Plural</i>
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MTOR	Mammalian Target of Rapamycin

MX1	Interferon-induziertes Guanosintriphosphat-bindendes Protein 1, <i>früher</i> Myxomatose Resistenz Protein 1
MX2	Interferon-induziertes Guanosintriphosphat-bindendes Protein 2, <i>früher</i> Myxomatose Resistenz Protein 2
ng	Nanogramm
OAS1	Oligoadenylatsynthetase 1
p.c.	post conceptionem
p.p.	postpartum
P4	Progesteron
PAG	Pregnancy Associated Glycoproteins
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandin F2 α
PI3K	Phosphoinositol 3-Kinase
PMN	Polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt, <i>auch Plural</i>
SBV	Schmallenbergvirus
SE	subklinische Endometritis
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
u.a.	unter anderem
ULF	uterine luminale Flüssigkeit

vgl.

vergleiche

## **I. EINLEITUNG**

Hohe Fruchtbarkeitsraten bei Milchkühen stellen aufgrund ihres Einflusses sowohl auf das Tierwohl als auch auf die Wirtschaftlichkeit der Betriebe eine große Herausforderung für die Veterinärmedizin und die Milchviehindustrie dar. Ihre Aufrechterhaltung ist eine wichtige Aufgabe für jeden landwirtschaftlichen Betrieb und dessen betreuenden Veterinär. Trotz hoher Fertilisationsraten von ca. 90 %, kommt es nur bei 40-55 % der Tiere zu einer erfolgreichen Kalbung (SCREENAN und DISKIN, 1986; DISKIN et al., 2006). Die Folge sind hohe Remontierungsraten aufgrund von Fertilitätsstörungen, die sich laut Literatur auf bis zu 20 % belaufen können (BASCOM und YOUNG, 1998; BUGUEIRO et al., 2019). Der Hauptanteil der Trächtigkeitsverluste findet zwischen Tag 8-16 post conceptionem (p.c.) statt und wird auf 70-80 % geschätzt (SCREENAN und DISKIN, 1986; DISKIN et al., 2006). In diesem präimplantativen Zeitraum findet 16-17 Tage p.c. die maternale Trächtigkeitserkennung statt, welche durch das embryonale Signal Interferon tau (IFN  $\tau$ ) vermittelt wird (BETTERIDGE et al., 1980; NORTHEY und FRENCH, 1980). Die Gründe für eine reduzierte Fruchtbarkeit bei Milchkühen sind multifaktoriell und komplex. Häufige Ursachen für Subfertilität beim Milchrind sind klassische Erkrankungen postpartum (p.p.) wie Nachgeburtsverhaltung, Mastitis, Metritis und Endometritis. Entzündliche Prozesse innerhalb der Gebärmutter sind meist bakteriellen Ursprungs, können aber auch durch virale Infektionen verursacht oder begünstigt werden (WATHES et al., 2020).

Die Beeinträchtigung der uterinen Rezeptivität infolge einer Infektion könnte darin begründet sein, dass die IFN  $\tau$ -Signaltransduktion nicht ausreichend vermittelt wird und somit die erfolgreiche maternale Erkennung der Trächtigkeit ausbleibt. Ein Grund dafür könnte der Wettbewerb um die Besetzung des IFN  $\tau$  Rezeptors sein, der



durch Mitglieder derselben Interferongruppe, z.B. Interferon alpha (IFN  $\alpha$ ), genutzt wird. Eine Konkurrenzsituation zwischen IFN  $\tau$  und anderen Interferonen um freie Rezeptorstellen könnte damit zur Behinderung der Trächtigkeitsetablierung und Subfertilität bei betroffenen Tieren führen.

Für die nähere Untersuchung dieses komplexen Themengebietes sind etablierte *in vitro*-Modelle erforderlich, mit denen *in vivo*-Zustände realitätsnah abgebildet werden können, um Zusammenhänge zwischen Entzündung und Trächtigkeitsetablierung untersuchen zu können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb ein hoch definiertes endometriales Explantmodell einzuführen, um:

- die Induzierbarkeit der Typ-1 Interferon Rezeptoruntereinheiten zu testen,
- eine Konkurrenzsituation zwischen dem embryonalen Signal IFN  $\tau$  und anderen Typ-1 Interferonen (exemplarisch IFN  $\alpha$ ) nachzuahmen,
- klassische und nicht-klassische Typ-1 Interferon-Signalwege mithilfe ausgewählter Zielgene abzubilden.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Störung der frühen embryo-maternalen Kommunikation beim Rind**

Die embryo-maternale Kommunikation bezeichnet den Austausch von Informationen und Signalen zwischen Embryo und Muttertier und dient unter anderem der Vorbereitung, Erkennung, Etablierung und Aufrechterhaltung der Trächtigkeit. Beim Rind wandert die befruchtete Eizelle nach erfolgreicher Fertilisation in der Ampulle des Eileiters (Tag 0 p.c.) in Richtung Uterushornspitze. Neueste Studien deuten darauf hin, dass bereits im Eileiter eine wechselseitige Kommunikation zwischen Embryo und Muttertier stattfindet (BANLIAT et al., 2020). Ein positiver Einfluss auf das Wachstum und die Entwicklung des Embryos durch das Eileiter-Milieu konnte bereits nachgewiesen werden (RIZOS et al., 2018). Weitere Untersuchungen lieferten bisher nur Hinweise auf die Beeinflussung des Eileitergewebes durch den Embryo (BUHI, 2002; MAILLO et al., 2015). Die wechselseitige Kommunikation ist daher noch nicht eindeutig belegt.

Ob in diesem frühen Abschnitt der embryonalen Entwicklung ein tatsächlicher Austausch von Signalen zwischen Embryo und maternalem Eileiter stattfindet, bedarf weiterer Forschung. Weitaus detaillierter untersucht ist die embryo-maternale Kommunikation im Zielorgan Gebärmutter. Die Schlüsselemente des Signalaustausches zwischen Embryo und Muttertier während des präimplantativen Stadiums der Frühträchtigkeit und deren infektionsassoziierte Beeinträchtigung soll im Folgenden näher erörtert werden.

### **1.1. Embryo-maternale Kommunikation**

An Tag 3-4 p.c. befindet sich der bovine Embryo im 8/16-Zell-Stadium. In diesem Stadium erreicht der Embryo die Gebärmutter und entwickelt sich dort durch weitere Zellteilungsschritte zur Morula (Tag 5/6 p.c.) und Blastozyste (Tag 7/8 p.c.) (HACKETT et al., 1993). Diese Entwicklungsstufen durchläuft der Embryo unabhängig von dem umgebenden uterinen Milieu. Nach Austritt aus der Zona pellucida (Tag 9/10 p.c.) (FLÉCHON und RENARD, 1978) wird die Entwicklung des kugelförmigen Embryos maßgeblich von maternaler Seite beeinflusst. Dabei sind die ausreichende Sekretion des glandulären Uterusepithels sowie die Zusammensetzung dieses Sekretes essentiell für das Wachstum und die Entwicklung des Embryos (GRAY et al., 2001; CLEMENTE et al., 2009). Durch Elongation formt sich der Embryo erst zum ovoiden (Tag 12 p.c.), dann tubulären (Tag 14 p.c.) und schließlich zum filamentösen Embryo (Tag 16-18 p.c.) (WINTERS et al., 1942; GILLER et al., 2018). Die äußerste Zellschicht bezeichnet man als Trophektoderm, das im direkten Kontakt zum umgebenden uterinen Milieu steht. In den mononukleären Zellen des Trophektoderms wird IFN  $\tau$  gebildet. Dieses Interferon stellt beim Rind das Schlüsselsignal der embryo-maternalen Kommunikation dar. Durch Freisetzung von IFN  $\tau$  in das uterine Lumen signalisiert der Embryo seine Anwesenheit an das Muttertier und leitet die maternale Trächtigkeitserkennung an Tag 16/17 p.c. ein (BETTERIDGE et al., 1980; NORTHEY und FRENCH, 1980; ROBERTS et al., 2003).

IFN  $\tau$  zählt zu den Typ-1 Interferonen und verhindert beim Rind die Luteolyse des Gelbkörpers durch die Beeinflussung der endometrialen maternalen Transkription der Oxytocin Rezeptoren (vgl. II.2.2.4.) (THATCHER et al., 1986; ØSTRUP et al., 2011; BASAVARAJA et al., 2021). Durch diese antiluteolytische Wirkung wird die Aufrechterhaltung der Gelbkörperfunktion und damit die ausreichende Produktion

von Progesteron (P4) und letztendlich die Erhaltung der Trächtigkeit sichergestellt (SPENCER und BAZER, 2002; CLEMENTE et al., 2009).

Für die erfolgreiche Vermittlung der Trächtigkeit ist eine ausreichend hohe IFN  $\tau$ -Konzentration notwendig. Die Menge des sezernierten IFN  $\tau$  korreliert mit der Größe und damit dem Entwicklungsstand des Embryos (KERBLER et al., 1997; RIZOS et al., 2012). Ein größerer Embryo ist daher in der Lage mehr IFN  $\tau$  zu produzieren und zu sezernieren (MANN und LAMMING, 2001; ROBINSON et al., 2006). Es wird vermutet, dass sich die IFN  $\tau$ -vermittelte Genexpression innerhalb der Gebärmutter wiederum positiv auf die Elongation und damit die Weiterentwicklung des Embryos auswirkt (SPENCER et al., 2008; RIZOS et al., 2012; BROOKS et al., 2014; SPENCER et al., 2016). Weiterhin ist eine indirekte Beeinflussung der embryonalen Elongation durch P4 nachgewiesen (CLEMENTE et al., 2009). Dabei reguliert das ovarielle P4 die Zusammensetzung des endometrialen Transkriptoms und somit die Zellproliferation und die Elongation des Embryos (CARTER et al., 2008; CLEMENTE et al., 2009; FORDE et al., 2009). Als potentes Steroidhormon beeinflusst P4 außerdem die uterine Rezeptivität, die Implantation, die Plazentation und das Überleben des Embryos durch vielseitige Einflüsse auf das maternale System. Es stellt somit neben IFN  $\tau$  einen der bedeutendsten Mediatoren innerhalb der embryo-maternalen Kommunikation dar (SPENCER et al., 2006; DORNIK et al., 2013). Zusammenfassend kann diese wechselseitige Beeinflussung zwischen maternalem Transkriptom, P4 und embryonalem IFN  $\tau$  als selbstverstärkendes System angesehen werden.

Es wird vermutet, dass die embryo-maternale Kommunikation neben IFN  $\tau$ -abhängigen Signalen ebenso aus IFN  $\tau$ -unabhängigen Signalen gebildet wird (FORDE et al., 2012). Durch mehrere *in vitro*-Studien konnten unterschiedlich exprimierte Gene im maternalen Endometrium identifiziert werden. MATHEW et

al. (2019) beschrieben 179 unterschiedlich exprimierte Gene innerhalb von endometrialen Explants, die jeweils mit einem aus künstlicher Besamung stammenden Konzeptus co-kultiviert wurden, verglichen zu endometrialen Explants ohne Konzeptus-Co-Kultur. Zu den am stärksten exprimierten Genen zählten u.a.: Trophoblast kunitz domain protein 1, Casein 151, S100 calcium binding protein A8 und mehrere Vertreter der Solute Carrier-Transporter. Deren Stimulation scheint dabei IFN  $\tau$ -unabhängig zu sein und von anderen embryonalen Faktoren induziert zu werden (BAUERSACHS et al., 2012; FORDE et al., 2015; MATHEW et al., 2019). Allerdings bedarf es zum aktuellen Zeitpunkt noch weiterer Forschung zu diesen IFN  $\tau$ -unabhängigen Signalen im Zuge der embryo-maternalen Kommunikation.

Im präimplantativen Zeitraum, findet die embryo-maternale Kommunikation nur durch Diffusion der verschiedenen Botenstoffe zwischen maternalem Endometrium und embryonalen Trophektoderm über die uterine luminale Flüssigkeit (ULF) statt. Die Zusammensetzung der ULF ist hochkomplex und wird einerseits durch die Sekretion des glandulären und luminalen uterinen Epithels und andererseits durch hämatogen transportierte Moleküle bestimmt (BAZER, 1975). Sie beinhaltet unter anderem verschiedene Transportproteine, Wachstumsfaktoren, Hormone, Lipide, Enzyme und Glukose zur Versorgung des Embryos und zur Etablierung eines geeigneten Milieus (FORDE et al., 2014). Ein direkter Zell-zu-Zell-Kontakt wird erst nach erfolgreicher Implantation des Embryos (Tag 19 p.c.) eingegangen.

## **1.2. Störfaktoren der frühen embryo-maternalen Kommunikation**

Bereits 1986 zeigten SCREENAN und DISKIN (1986), dass 70-80% der Trächtigkeitsverluste in den Tagen 8-16 p.c. der Trächtigkeit auftreten. Wie WILTBANK et al. (2016) in einem Übersichtsartikel anschaulich dargelegt haben, liegen diese Zahlen trotz vielseitiger Bemühungen der Milchviehbestände weiterhin bei bis zu 41% in den Tagen 8-27 p.c. Das präimplantative Stadium stellt einen besonders kritischen Zeitraum für den Embryo dar, da sein Überleben von der erfolgreichen IFN  $\tau$ -vermittelten maternalen Erkennung der Trächtigkeit an Tag 16 p.c. abhängt.

MORAES et al. (2018) konnten zeigen, dass der Fertilitätsstatus von Kühen maßgeblich die embryonale Elongation und die Zusammensetzung des endometrialen Transkriptoms beeinflusst. Der Fertilitätsstatus der Kühe wurde anhand der Trächtigkeitsrate an Tag 28 p.c. nach aufeinanderfolgenden Embryotransfers als hochfertil, subfertil oder infertil klassifiziert. Subfertile Tiere produzierten dabei weniger gut elongierte Embryonen und wiesen eine abweichende Zusammensetzung des endometrialen Transkriptoms verglichen mit den Ergebnissen fertiler Tiere auf. Wie oben dargelegt wurde, bilden der elongierte Embryo und dessen IFN  $\tau$ -Signal und die Zusammensetzung des Transkriptoms ein selbstverstärkendes System. Eine veränderte Zusammensetzung des Transkriptoms, wie sie von MORAES et al. (2018) beschrieben wurde, könnte sich deshalb negativ auf die embryo-maternale Kommunikation auswirken.

Faktoren, die zu einer gestörten embryo-maternalen Kommunikation und einer verringerten Fertilität von Rindern führen, können nicht-infektionsassoziierten oder infektionsassoziierten Ursprungs sein.

### **1.2.1. Nicht-infektionsassoziierte Störfaktoren**

Zu den nicht-infektionsassoziierten Störfaktoren zählen: Fütterung (GILLER et al., 2018), Körperkondition (GRIMARD et al., 2006), Milchleistung und Laktationsstadium (SARTORI et al., 2002) des Muttertieres. Auch Hitzestress durch erhöhte Außentemperaturen während der Sommermonate kann sich negativ auf die Fertilität und die Embryonalentwicklung auswirken (EALY et al., 1993; KRININGER III et al., 2002; GARCÍA-ISPIERTO et al., 2006). Ein ausschlaggebender Faktor ist dabei der Zeitpunkt, an dem das Muttertier Hitzestress erfährt. EALY et al. (1993) konnten zeigen, dass Hitzestress an Tag 1 p.c. einen direkten Einfluss auf die Embryonalentwicklung besitzt, während Hitzestress im fortgeschrittenen Trächtigkeitsablauf ab Tag 3 p.c. keine Auswirkungen mehr hat.

Auch folgende Faktoren können nachweislich die frühe Trächtigkeit, die Entwicklung des Embryos und die damit assoziierte embryo-maternale Kommunikation beeinflussen: Führung des Milchviehbetriebes (ZOBEL et al., 2011), Anzahl bereits durchlaufener Trächtigkeiten und deren Ausgang (THURMOND et al., 2005) sowie genetische Eigenschaften des Vater- und des Muttertieres (VANRADEN et al., 2004; VANRADEN et al., 2011). Allerdings beschreiben die aufgeführten Studien teilweise einen über den präimplantativen Zeitraum hinausgehenden Einfluss dieser Faktoren auf die Trächtigkeit und die embryonale Entwicklung betroffener Tiere.

### **1.2.2. Infektionsassoziierte Störfaktoren**

Infektionen und dadurch ausgelöste entzündliche Prozesse innerhalb des maternalen Organismus können die Fruchtbarkeit maßgeblich beeinflussen. Wie bereits in Kapitel II.1.1. erläutert wurde, spielt das uterine Milieu eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung. Eine negative Beeinflussung des uterinen Milieus kann

im Weiteren zu einer unzureichenden embryo-maternalen Kommunikation führen. Somit liegt die Vermutung nahe, dass sich infektionsassoziierte Prozesse innerhalb des maternalen Systems durch Beeinträchtigung der adäquaten embryo-maternalen Kommunikation auf die Trächtigkeitsetablierung auswirken.

RIBEIRO et al. (2016) konnten in ihrer Studie zeigen, dass bestehende entzündliche Erkrankungen vor und während der Insemination des Muttertieres einen negativen Einfluss auf das uterine Milieu und die Entwicklungsfähigkeit der Eizelle sowie des Embryos besitzen. Dabei konnte dieser Effekt bei entzündlichen Erkrankungen des Uterus, aber auch bei Erkrankungen anderer Organsysteme, wie z.B. des Euters, des Respirations- und Verdauungstraktes und bei Erkrankungen der Gliedmaßen beobachtet werden.

Ein sehr relevantes Beispiel für eine extrauterine Infektion und Entzündung, die im präimplantativen Zeitraum vorliegen kann, ist die Mastitis. Mastitiden sind definiert als klinische oder subklinische Entzündungen des Euters, die primär durch Bakterien hervorgerufen werden. HANSEN et al. (2004) beschrieben, dass die Entzündung der Milchdrüse beim Rind einen negativen Einfluss auf die Trächtigkeitsrate hat und eine Ursache für die Embryonalsterblichkeit darstellen könnte. Tiere mit einer klinischen oder subklinischen Mastitis mussten im Vergleich zu eutergesunden Tieren signifikant häufiger belegt werden, um erfolgreich eine Trächtigkeit zu etablieren (SCHRICK et al., 2001). Es wird diskutiert, ob die erhöhte Körpertemperatur im Zuge einer Euterentzündung ähnliche Auswirkungen auf die embryonale Entwicklung und das Überleben des Embryos hat wie Hitzestress (HANSEN et al., 2004). Eine negative Beeinträchtigung der Oozyten- und Embryonalentwicklung durch eine erhöhte Produktion und Ausschüttung von Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , Stickstoffmonoxid und Prostaglandin F2  $\alpha$  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) in Folge einer Mastitis ist ebenfalls möglich (SEALS et al., 1998; SOTO et al., 2003b, 2003a).



Während extrauterine Infektionen und Entzündungen die Trächtigkeitsetablierung indirekt beeinflussen, liegen bei uterinen Infektionen direkte Effekte nahe. In den folgenden Kapiteln sollen die verschiedenen Entzündungsformen der Gebärmutter als infektionsassoziierte Störfaktoren der embryo-maternalen Kommunikation thematisiert werden. Da das Endometrium die Erstkontaktstelle des sich entwickelnden Embryos mit dem maternalen System darstellt, soll dabei der Schwerpunkt auf den entzündlichen Veränderungen des Endometriums liegen.

### **1.2.3. Entzündung der Gebärmutter**

Die Gebärmutterentzündung des Rindes wird je nach tiermedizinischer Disziplin aus pathologisch-anatomischer, histopathologischer und klinischer Perspektive definiert. Aufgrund variierender Beschreibungen der Gebärmutterentzündung aus klinischer Perspektive wurde von SHELDON et al. (2006) eine eindeutige Definition dieses Krankheitskomplex eingeführt. Demnach wird die Metritis als eine Entzündung der Gebärmutter innerhalb der ersten 21 Tage p.p. und die Endometritis als Entzündung der Gebärmutter ab Tag 21 p.p. klassifiziert.

#### **1.2.3.1. Metritis**

Die frühe und akute uterine Entzündungsform wird meist durch bakterielle Infektion mit ubiquitär vorkommenden Pathogenen wie *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum* oder Vertretern der *Prevotella*-Spezies hervorgerufen (RUDER et al., 1981; BONNETT et al., 1991; SHELDON et al., 2006; WILLIAMS et al., 2007). Die puerperale Metritis tritt innerhalb der ersten 10 Tage p.p. auf und äußert sich v.a. durch übelriechenden rotbraunen Scheidenausfluss sowie eine meist vergrößerte Gebärmutter mit graduell unterschiedlicher Flüssigkeitsansammlung. Zudem treten unspezifische systemische Symptome wie Fieber, reduzierte Milchleistung und/oder reduzierte Futteraufnahme bis hin zur

Sepsis auf. Mangelhafte Hygiene während geleisteter Geburtshilfe und Komplikationen wie Geburtsverletzungen, unzureichende Uterusinvolution, Nachgeburtsverhaltung, Zwillings- oder Totgeburten stehen mit der puerperalen Metritis in Verbindung (SHELDON et al., 2006). Weiterhin wird die klinische Metritis als eine bakterielle Entzündung der Gebärmutter mit eitrigem Scheidenausfluss ohne systemische Krankheitsanzeichen unterschieden (SHELDON et al., 2006). Durch verlängerte Rastzeiten, reduzierte Erstbesamungserfolge und daraus resultierend verlängerte Günstzeiten, kann die postpartale Entzündung der Gebärmutter zu Subfertilität führen, wie FOURICHON et al. (2000) in ihrer Metaanalyse zusammengefasst haben.

### **1.2.3.2. Endometritis**

Chronische Entzündungen des Endometriums werden in klinische und subklinische Endometritiden unterteilt.

Eine klinische Endometritis liegt bei purulentem Vaginalausfluss ab Tag 21 p.p. oder mukopurulentem Vaginalausfluss ab Tag 26 p.p., einem vergrößerten Durchmesser der Zervix ( $>7,5$  cm), ohne weitere systemische Krankheitsanzeichen vor (LEBLANC et al., 2002; SHELDON et al., 2006).

Die subklinische Endometritis (SE) wird definiert als Entzündung des Endometriums ab Tag 21 p.p. in Abwesenheit von purulentem Vaginalausfluss oder anderen klinischen Symptomen (KASIMANICKAM et al., 2004; GILBERT et al., 2005; SHELDON et al., 2006). Die SE ist gekennzeichnet durch einen erhöhten Gehalt polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN) von  $>18$  % an Tag 21-33 p.p.,  $>10$  % an Tag 34-47 p.p. und  $>5$  % an Tag 48-60 p.p. diagnostiziert mittels Zytologie (KASIMANICKAM et al., 2004). Der zytologische Abstrich wird mittels kleinvolumiger uteriner Spülung oder Cytobrush-Beprobung gewonnen

(KASIMANICKAM et al., 2004; GILBERT et al., 2005; BARLUND et al., 2008). Eine histopathologische Untersuchung endometrialer Biopate kann ebenfalls zur Diagnose der SE herangezogen werden. Beim Vergleich von zytologischer und histologischer Diagnostik von SE fällt eine geringe diagnostische Übereinstimmung der beiden Untersuchungsmethoden auf (MADOZ et al., 2014). HELFRICH et al. (2020) verwendeten ein von HILLMER (2018) entwickeltes Gerät zur sukzessiven Entnahme einer unverdünnten uterinen Sekretprobe, einer Biopsie und einer Cytobrushprobe, bei einmaliger Passage der Zervix. Mittels AlphaLISA-Technologie erfolgte die Analyse des uterinen Sekretes im Hinblick auf Entzündungsmediatoren. Dabei wiesen Tiere mit zytologisch diagnostizierter SE signifikant höhere Konzentrationen ausgewählter Zytokine im uterinen Sekret auf, verglichen mit zytologisch unauffälligen Tieren (HELFRICH et al., 2020). Die geringe Übereinstimmung zwischen histologischer und zytologischer Diagnostik könnte auf die Ausprägung der jeweiligen subklinischen Entzündung zurückzuführen sein. Es wird angenommen, dass durch die zytologische Untersuchung des endometrialen PMN-Gehaltes eine akute Entzündung und durch die histologische Untersuchung endometrialer Veränderungen, wie z.B. lymphoplasmazellulärer Infiltration des Endometriums, eine chronische Entzündung detektiert werden kann. Aufgrund der einfacheren Handhabung der Probenentnahme und Analyse sowie der geringeren Invasivität, findet derzeit in den meisten wissenschaftlichen Untersuchungen die Zytologie mittels Cytobrush Anwendung.

Da eine eindeutige Ursache der SE bisher nicht ermittelt werden konnte, werden verschiedene zugrundeliegende Mechanismen diskutiert. HERATH et al. (2009) vermuten eine übermäßig starke und andauernde Immunreaktion infolge fehlender oder unzureichender Regulationsmechanismen. Im Gegensatz dazu zeigten GALVÃO et al. (2011), dass eine schwächere Immunreaktion nicht nur eine

vollständige Eliminierung bakterieller Infektionen beeinträchtigt, sondern auch zur Entwicklung einer Endometritis führen kann. Zur Evaluierung der Immunreaktion wurde die Genexpression pro- und antiinflammatorischer Zytokine in uterinen Biopaten zum Zeitpunkt der Kalbung und 1, 3, 5 und 7 Wochen p.p. gemessen. Ebenso ist eine weiterbestehende Entzündungsreaktion nach vollständiger Eliminierung der bakteriellen Stressoren als Ursache der SE denkbar (MADOZ et al., 2014). Zusammengefasst kann die individuelle Immunreaktion auf unspezifische Infektionen im Puerperium und deren Dysregulation als Ursache der SE angenommen werden (BARAŃSKI et al., 2012; WAGENER et al., 2017). Dagegen konnte eine bakterielle Infektion nicht eindeutig als Ursache der SE definiert werden (BARAŃSKI et al., 2012; MADOZ et al., 2014).

Die SE kann bis zu Tag 100 p.p. und darüber hinaus vorliegen und beeinflusst nachweislich die Fertilität des Muttertieres. Ein Zusammenhang mit der frühembryonalen Entwicklung und der Embryoqualität konnte von HILL und GILBERT (2008) festgestellt werden. Dabei zeigten 7 Tage alte Embryonen eine reduzierte Anzahl der Trophektodermzellen nach zweitägiger *in vitro*-Kultivierung mit endometrialer Flüssigkeit, die aus Milchkühen mit aseptischer Entzündung des Endometriums gewonnen wurde, im Vergleich zu Embryonen, die mit endometrialer Flüssigkeit gesunder Tiere kultiviert wurden. Durch die endometriale Reaktion auf entzündliche Reize wird die Zusammensetzung der ULF verändert, was zu einer negativen Beeinflussung der embryonalen Entwicklung führen kann. Die Entwicklung des embryonalen Trophektoderms ist wiederum essentiell für eine ausreichende Produktion von IFN  $\tau$ , welches als Schlüsselement der embryo-maternalen Kommunikation die Erkennung der Trächtigkeit durch das Muttertier vermittelt (vgl. II.1.1.).

### **1.2.3.3. Virale Infektionen des Endometriums**

Neben bakteriellen Entzündungen können auch virale Infektionen die Fruchtbarkeit beim Rind beeinträchtigen. Beschriebene Einflüsse viraler Infektionen auf Fertilitätsparameter wurden kürzlich von WATHES et al. (2020) in einem eindrücklichen Übersichtsartikel zusammengefasst.

Infektionen mit dem Bovinen Herpes Virus Typ-4 (BHV-4) (GÜR und DOGAN, 2010), sowie mit dem Bovinen Viralen Diarrhoe Virus (BVDV) (CHENG et al., 2016) konnte in Verbindung mit Metritis und Endometritis gebracht werden. Außerdem beschrieben CHENG et al. (2017), dass eine BVDV-Infektion zum frühembryonalen Tod führen kann. Als Ursache dafür konnte die Störung der IFN  $\tau$ -Signaltransduktion identifiziert werden (CHARLESTON et al., 2001; CHENG et al., 2017). Es wird vermutet, dass durch verschiedene virale Faktoren die Typ-1 Interferon-Signaltransduktion verhindert wird und eine Herabregulation von Typ-1 Interferonen und der Typ-1 Interferon-induzierten Genexpression stattfindet.

Des Weiteren gibt es Hinweise, dass sowohl Infektionen mit dem Schmallenbergvirus (SBV) (VARELA et al., 2013; LECHNER et al., 2017), als auch mit dem Blauzungenvirus (BTV) einen negativen Einfluss auf die Trächtigkeitsetablierung und die frühembryonale Entwicklung besitzen (SANTMAN-BERENDS et al., 2010; VANDAELE et al., 2011). Ein ähnlicher Mechanismus, wie im Zusammenhang mit BVDV bereits beschrieben wurde, könnte auch hier den Einfluss auf die IFN  $\tau$ -abhängige Vermittlung der Trächtigkeit im Falle einer SBV- (VARELA et al., 2013) oder BTV-Infektion (RATINIER et al., 2016) erklären.

Ein Einfluss viraler Infektionen auf die frühe embryo-maternale Kommunikation und somit auf die Subfertilität beim Rind kann durch die oben genannten Beispiele

angenommen werden. Jedoch müssen die zugrundeliegenden Mechanismen noch genauer untersucht werden.

## **2. Interferone**

### **2.1. Einteilung, Aufbau und Funktion der Interferone – Ein Überblick**

Speziesübergreifend lassen sich Interferone in drei Gruppen unterteilen: Typ-1, -2 und -3 Interferone. Beim Rind stellt IFN  $\tau$  das Schlüsselsignal in der Kommunikation zwischen dem bovinem Embryo und dem Muttertier dar (HANSEN et al., 1999). Es bildet zusammen mit den Interferonen alpha (IFN  $\alpha$ ), beta (IFN  $\beta$ ), delta (IFN  $\delta$ ), epsilon (IFN  $\epsilon$ ), zeta (IFN  $\zeta$ ), kappa (IFN  $\kappa$ ), ny (IFN  $\nu$ ) und omega (IFN  $\omega$ ) die Gruppe der Typ-1 Interferone (ORITANI und TOMIYAMA, 2004). Interferon gamma (IFN  $\gamma$ ) ist der einzige Vertreter der Typ-2 Interferone (YOUNG und HARDY, 1995; SCHRODER et al., 2004). Dagegen zählen die vier Molekülvarianten des Interferon lambda (IFN  $\lambda$ ) IFN  $\lambda$ -1/-2/-3/-4 zur Gruppe der Typ-3 Interferone (KOTENKO et al., 2003; SHEPPARD et al., 2003).

Hinsichtlich des Aminosäure-Aufbaus der Typ-1, -2 und -3 Interferone, besteht nur zwischen den Typ-1 und -3 Interferonen eine geringe strukturelle Homologie (GRAY und GOEDDEL, 1982; SCHRODER et al., 2004). Alle drei Interferongruppen verbindet dagegen ihre Funktion viralen Infektionen entgegenzuwirken, also zu „interferieren“, was zur Namensgebung „Interferone“ führte (LINDENMANN et al., 1957).

Interferone stellen damit einen wichtigen Bestandteil der ersten unspezifischen Antwort des angeborenen Immunsystems auf infektiöse Reize dar (ISAACS und LINDENMANN, 1957). Neben bedeutsamen antiviralen Eigenschaften, können sie

auch im Zuge einer durch Pilze oder Bakterien hervorgerufenen Infektion eine Immunantwort vermitteln (ESPINOSA et al., 2017; KANGFENG et al., 2017; KAPLAN et al., 2017; GOTTSCHALK et al., 2019). Die Einteilung der Interferone ist durch die spezifische Bindung an den Typ-1, -2 oder -3 Interferon Rezeptoren begründet, welche jeweils aus Heterodimeren aufgebaut sind (PESTKA, 1997; PESTKA et al., 1997; KOTENKO et al., 2003). Während die Typ-1 und -2 Interferon Rezeptoren von nahezu allen Zelltypen exprimiert werden, wird der Typ-3 Interferon Rezeptor vorwiegend von epithelialen Zellen an Schleimhautbarrieren innerhalb der Lunge, der Leber und des Gastrointestinal-Traktes exprimiert (SOMMEREYNS et al., 2008; GALANI et al., 2017).

## **2.2. Typ-1 Interferone**

### **2.2.1. Typ-1 Interferon Rezeptor**

Alle Typ-1 Interferone binden an den sogenannten Typ-1 Interferon Rezeptor (IFNAR), der aus der Typ-1 Interferon Rezeptoruntereinheit 1 (IFNAR1) und der Typ-1 Interferon Rezeptoruntereinheit 2 (IFNAR2) aufgebaut ist (PESTKA et al., 2004; PLATANIAS, 2005). Es ist bekannt, dass sich die Typ-1 Interferone bezüglich ihrer Bindungsaffinitäten gegenüber dem Rezeptor unterscheiden und somit eine kompetitive Bindung am Rezeptor vorliegen kann. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass IFN  $\tau$  eine niedrigere Bindungsaffinität als IFN  $\alpha$  gegenüber IFNAR aufweist (SUBRAMANIAM et al., 1995; JAKS et al., 2007). Außerdem demonstrierten JAKS et al. (2007) mit ihrer Studie, dass IFNAR1 eine stärkere Bindungsaffinität als IFNAR2 gegenüber Typ-1 Interferonen besitzt. In der Studie konnte außerdem eine positive Korrelation zwischen der Typ-1 Interferon Bindungsaffinität und der Signalaktivierung gezeigt werden.

Die Rezeptoruntereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 stellen somit die oberste Ebene der Signalkaskade der Typ-1 Interferone dar.

### **2.2.2. Typ-1 Interferon Signaltransduktionswege**

Bindet ein Interferon am jeweiligen Rezeptor wird eine Signalkaskade ausgelöst, die je nach Art des Interferons, der Zelle und des vorherrschenden Milieus eine spezifische biologische Antwort nach sich zieht. Diese Signalkaskade kann dabei auf klassischem Weg oder nicht-klassischem Weg vermittelt werden.

#### **2.2.2.1. Klassischer Signaltransduktionsweg**

Bindet ein Typ-1 Interferon an den IFNAR wird das Signal über den klassischen Signaltransduktionsweg durch die sogenannten Janus-aktivierten Kinasen (JAK) und Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) vermittelt (BINELLI et al., 2001). Dabei interagieren die beiden Rezeptoruntereinheiten jeweils mit einem Bestandteil der JAK. Durch Autophosphorylierung aktiviert IFNAR1 die Tyrosin Kinase 2 und IFNAR2 die JAK1 (DARNELL et al., 1994; STARK et al., 1998; PLATANIAS, 2005). Die Kinasen wiederum regulieren die Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT1, STAT2, STAT3 oder STAT5 innerhalb der Signalkaskade (DARNELL et al., 1994). Während diese STAT-Vertreter in allen Zellen aktiviert werden können, werden STAT4 und STAT6 nur in bestimmten Zellarten wie z. B. endothelialen oder lymphoiden Zellen aktiviert (FASLER-KAN et al., 1998; TORPEY et al., 2004). Nach Phosphorylierung bilden die STAT Homo- oder Heterodimere, die als sogenannte Transkriptionskomplexe in der Lage sind, in den Zellkern zu wandern (STARK et al., 1998). Dort leiten sie die Transkription von Interferon stimulierten Genen (ISGs) ein, indem sie an Elementen innerhalb der ISGs Promotoren binden (DARNELL et al., 1994; STARK et al., 1998). Eines dieser Elemente ist das sogenannte Interferon-stimulated response



element (ISRE). An diesem Promotorelement kann ausschließlich der Transkriptionskomplex ISG Faktor 3 binden, der aus STAT1, STAT2 und dem Interferon regulatorischen Faktor-9 (IRF-9) zusammengesetzt ist (PLATANIAS, 2005). Alle anderen STAT-geformten Transkriptionskomplexe binden an das Promotorelement Interferon Gamma Activated Site (GAS) (BOEHM et al., 1997; STARK et al., 1998). STAT1 stellt somit einen Vertreter der regulativen Faktoren innerhalb der klassischen Signaltransduktionskaskade der Interferone dar.

#### **2.2.2.2. Nicht-klassischer Signaltransduktionsweg**

Die nicht-klassische oder nicht-kanonische Vermittlung des Typ-1 Interferon-Signals kann durch mehrere mögliche Transduktionswege repräsentiert werden. Diese Signaltransduktionswege agieren STAT1 unabhängig (HANSEN et al., 2017). Dabei kann das Signal durch die Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) (DAVID et al., 1995), die Phosphoinositol 3-kinase (PI3K) und das Protein Mammalian Target of Rapamycin (MTOR) weitergeleitet werden (STARK et al., 1998; PESTKA et al., 2004; BAZER et al., 2008). Beim Schaf sind diese nicht-klassischen Signaltransduktionswege für eine IFN  $\tau$ -induzierte Genexpression essentiell, da kritische Signalkomponenten des klassischen JAK-STAT Signalweges nicht im luminalen Epithel exprimiert sind (CHOI et al., 2001; HANSEN et al., 2017). In Bezug auf das Rind sind die nicht-klassischen Signaltransduktionswege weitaus weniger detailliert untersucht. Es kann davon ausgegangen werden, dass für eine vollständige biologische Antwort auf IFN-Stimuli beide Signaltransduktionswege benötigt werden. Innerhalb der vorliegenden Studie wurde PI3K als Vertreter der regulativen Faktoren innerhalb der nicht-klassischen Signaltransduktionskaskade als Zielgen ausgewählt.

### **2.2.3. Typ-1 Interferon stimulierte Gene**

Sowohl der klassische als auch der nicht-klassische Signaltransduktionsweg sind essentiell für eine erfolgreiche und spezifische Gewebeantwort auf verschiedene Interferonstimuli. Im Gewebe wird die Expression von ISGs induziert, die u.a. immunmodulatorische und metabolische Funktionen besitzen und sowohl Zellwachstum als auch Angiogenese regulieren können (SPENCER et al., 2006). Innerhalb der ISGs werden klassische und nicht-klassische ISGs unterschieden.

#### **2.2.3.1. Klassische Interferon stimulierte Gene**

Nach Bindung eines Typ-1 Interferons am IFNAR und Weitergabe dieses Signals über den klassischen JAK-STAT Signaltransduktionsweg, werden klassische ISGs als Gewebeantwort auf diesen Reiz transkribiert. Sie bilden die Zielebene der IFN-Signaltransduktionskaskade und besitzen diverse biologische Funktionen. Dominierend ist die antivirale Aktivität der klassischen ISGs und beinhaltet u.a. die Hemmung der Virusreplikation, die Aktivierung von Faktoren innerhalb der IFN-Signaltransduktionskaskade und die Induktion der IFN- und ISG-Expression, wie von SCHOGGINS und RICE (2011) in einem Übersichtsartikel zusammengefasst wurde. Zu den am häufigsten untersuchten klassischen ISGs zählt neben Interferon stimuliertes Gen 15 (ISG15) und Oligoadenylatsynthetase 1 (OAS1) auch Interferon-induziertes Guanosintriphosphat-bindendes Protein MX1, das früher als Myxomatose Resistenz Protein 1 bekannt war (BAUERSACHS et al., 2006; BAZER et al., 2008; KIM et al., 2013; SCHNEIDER et al., 2014; TOJI et al., 2017).

#### **2.2.3.2. Nicht-klassische Interferon stimulierte Gene**

Nicht-klassische, auch neuartige oder nicht-kanonische ISGs sind in der Literatur weitaus weniger beschrieben als die klassischen Vertreter. Eine eindeutige

Zuordnung ist aufgrund der in der Literatur beschriebenen variierenden Definitionen nicht immer möglich. So wurden „neuartige ISGs“ als diejenigen ISGs definiert, die erst kürzlich entdeckt wurden, oder als solche, die nur nach Aktivierung des nicht-klassischen Signalweges exprimiert werden. Andere Autoren ordnen ISGs der nicht-klassischen Gruppe zu, wenn sie neben einer P4-induzierten Interferon Stimulierbarkeit auch spezielle funktionelle Charakteristika aufweisen und nicht durch andere Typ-1 Interferone induzierbar sind (SPENCER et al., 2004; BAZER et al., 2011; DORNIK et al., 2013). Diese Eigenschaften umfassen Änderungsprozesse der uterinen Schleimhaut und des uterinen Milieus, um eine bestmögliche Voraussetzung für die spätere Implantation des Embryos zu schaffen (SPENCER et al., 2008; DORNIK et al., 2013). Es wurde berichtet, dass bereits minimale Veränderungen der Sekretom-Zusammenstellung zu einer Beeinflussung und sogar Störung der frühen Trächtigkeit bei Kühen führen können (BAUERSACHS und WOLF, 2015; MARTINS et al., 2018). IFN  $\tau$ -induzierte nicht-klassische ISGs, wie z.B. Cystatin-3 (CST3), und Cystatin-6 (CST6), Mitglieder der Solute Carrier-Transporter und das Gastrin Releasing Peptide, sind vor allem für die Gattung Schaf umfassend beschrieben (DORNIK et al., 2013). Im Vergleich dazu sind nicht-klassische ISGs beim Rind weniger detailliert untersucht. Einige Studien haben jedoch bereits Vertreter nicht-klassischer ISGs identifizieren können (FORDE et al., 2015). Das Fatty Acid Binding Protein 3 (FABP3) wurde als vielversprechender Kandidat ausgewählt, um ein Zielgen des nicht-klassischen Signalweges zu repräsentieren. Dafür erfüllt es folgende Voraussetzungen: es wird von P4 induziert und ist während der embryonalen Elongation in Transport- und Zellproliferations-Mechanismen involviert (FORDE et al., 2009; MANSOURI-ATTIA et al., 2009; BROOKS et al., 2014).

#### **2.2.4. IFN $\tau$ : Das Schlüsselsignal der bovinen Trächtigkeitserkennung**

IFN  $\tau$  wurde zum ersten Mal im Zuge von verschiedenen Experimenten zur Etablierung und Aufrechterhaltung der Trächtigkeit beim Schaf beschrieben. In den 1960er Jahren begannen Moor und Rowson, Embryonen von Schafen innerhalb verschiedener Zeiträume aus dem Uterus zu entnehmen und Empfängerschafen einzusetzen (MOOR und ROWSON, 1964, 1966; ROWSON und MOOR, 1966). Dabei beobachteten sie, dass für die Aufrechterhaltung des Gelbkörpers und damit der erfolgreichen Trächtigkeit die Anwesenheit eines Konzeptus zwischen Tag 12 und 13 nach Ovulation essentiell ist. In weiteren Experimenten von MARTAL et al. (1979) und GODKIN et al. (1982) wurden Proteine innerhalb von Gewebeproben von Embryonen nachgewiesen, die als Trophoblastin oder ovines Trophoblastprotein 1 bezeichnet wurden. Durch weitere Studien verschiedener Arbeitsgruppen gelang es das Protein durch seine hohe komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) Sequenzhomologie mit den anderen Typ-1 Interferonen  $\omega$  (85%) und  $\alpha$  (55-65%) in Verbindung zu bringen. So wurde es als Interferon-like Molekül eingeordnet. Auch beim Rind wurde ein solches Protein nachgewiesen, das folglich als bovines Trophoblastprotein 1 bezeichnet wurde (HELMER et al., 1987). ROBERTS et al. (1992) führten schließlich diese Molekülgruppe als neuartiges IFN  $\tau$  ein, nachdem sie eine Sezernierung von IFN  $\tau$  durch Blutzellen ausschließen konnten und so eine eindeutige Abgrenzung zu anderen Typ-1 Interferonen zeigen konnten.

Im Gegensatz zu den anderen Typ-1 Interferonen wird IFN  $\tau$  während einer viralen Infektion nicht exprimiert (ROBERTS et al., 1999). Die wichtigste Eigenschaft und Schlüsselrolle von IFN  $\tau$ , welches nur innerhalb der Wiederkäuerspezies vorkommt, ist die erfolgreiche embryonale Vermittlung der Trächtigkeit an den maternalen

Organismus. Die bovine IFN  $\tau$ -Bildung und -Freisetzung erfolgt durch die mononuklearen Zellen des embryonalen Trophektoderm. Die Produktion beginnt an Tag 4 p.c., erreicht ihr Maximum zwischen Tag 16 und 17 p.c. und endet zwischen Tag 21 und 25 p.c. (BAZER et al., 1997; SPENCER et al., 2004). Für die erfolgreiche Trächtigkeitserkennung durch das Muttertier an Tag 16-17 p.c. steht die antiluteolytische Wirkung im Vordergrund (BETTERIDGE et al., 1980; NORTHEY und FRENCH, 1980). Durch IFN  $\tau$ -vermittelte Herabregulation der Oxytocin Rezeptoren innerhalb des glandulären und luminalen uterinen Epithels, wird die Oxytocin-abhängige pulsatile PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  Synthese im Endometrium unterdrückt und damit die Luteolyse des Gelbkörpers am Ovar verhindert (THATCHER et al., 1986; BAZER et al., 1996; ØSTRUP et al., 2011). Die Progesteron-Produktion des Gelbkörpers und somit die Trächtigkeit werden dadurch aufrechterhalten.

Neben dieser parakrinen Wirkweise gibt es Hinweise, dass IFN  $\tau$  die Expression von ISGs in den Reproduktionsorganen und den zirkulierenden mononukleären Zellen des peripheren Blutes (englisch: Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) induziert (HAN et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008; SPENCER et al., 2013; KUNII et al., 2018). Auch in der Leber konnte eine höhere Expression klassischer ISGs bei tragenden im Vergleich zu nicht-tragenden Rindern festgestellt werden (MEYERHOLZ et al., 2016; RUHMANN et al., 2017). Da der direkte Nachweis von IFN  $\tau$  im zirkulierenden Blut bisher nicht möglich ist, bleibt vorerst unklar, ob die ISG-Expression direkt durch IFN  $\tau$  induziert wurde. Eine indirekte Induktion durch IFN  $\tau$ -stimulierte Immunzellen oder andere Typ-1 Interferon-Stimuli könnten ebenfalls die Genexpressionserhöhung in der Leber induzieren. Zur Abbildung von extrauteriner embryo-maternaler Kommunikation etablierten ENDRIß et al. (2021) ein Modell unter Verwendung boviner primärer Hepatozyten. Ob eine endokrine oder systemische Wirkung des embryonalen IFN  $\tau$ -Signals existiert, muss nach wie

vor durch weitere Forschung eindeutig belegt werden.

### **3. Immunologisches Wechselspiel zwischen Endometrium und IFN $\tau$**

Um die Aufrechterhaltung der Trächtigkeit zu gewährleisten, ist die immunologische Anpassung der maternalen Kontaktzone zwingend notwendig (WALKER et al., 2010). Durch den Kontakt der embryonalen Trophoblastzellen mit dem maternalen Endometrium während der Implantation steht der maternale Organismus zum ersten Mal im direkten Kontakt mit den paternalen Antigenen des Embryos. Eine alloreaktive Antwort des Muttertieres könnte zur Resorption oder zur Abstoßung des Konzeptus führen, wie BAZER et al. (2008) und TALUKDER et al. (2020) zusammengefasst haben. Das embryonale IFN  $\tau$ -Signal besitzt in diesem Zusammenhang neben seiner Rolle als trächtigkeitsvermittelndes Signal auch eine immunsuppressive Wirksamkeit auf den maternalen Organismus. So wird die Resorption oder Abstoßung des Embryos vermieden, und dieser wird als „semi-allogen“ vom maternalen Immunsystem toleriert. Aktuelle Studien zeigen, dass ein 7 Tage alter Embryo bereits IFN  $\tau$  sezernieren und damit eine antiinflammatorische Antwort des Muttertieres hervorrufen kann (TALUKDER et al., 2017; RASHID et al., 2018). Beispielsweise konnte eine durch IFN  $\tau$ -verursachte Unterdrückung der Lymphozyten-Proliferation und eine Vielzahl IFN  $\tau$ -induzierter ISGs festgestellt werden, die mit einer lokalen immunsuppressiven Wirkung auf die Gebärmutter assoziiert werden konnten (WALKER et al., 2010).

Uterine sowie nicht-uterine entzündliche Prozesse können direkte und indirekte immun-modulatorische Funktionen von IFN  $\tau$  während der maternalen Trächtigkeitserkennung beeinträchtigen (RIBEIRO et al., 2016; CHENG et al., 2017). Allerdings ist es nach wie vor unklar, inwieweit inflammatorische

Bedingungen, wie beispielsweise eine Endometritis, zu einem unzureichenden embryo-maternalen Signalaustausch führen können. Dies gilt ebenso für entzündliche Prozesse, die sich im Falle einer SE subklinisch darstellen. In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese einer kompetitiven Situation zwischen IFN  $\tau$  und IFN  $\alpha$  (exemplarisches Typ-1 Interferon) aufgestellt und mittels endometrialem Explantmodell überprüft. Bei vorliegender viraler oder bakterieller Infektion könnte IFN  $\tau$  mit anderen Typ-1 Interferonen um die Bindung am IFNAR konkurrieren. Dadurch könnte der embryo-maternale Dialog maßgeblich beeinträchtigt und eine erfolgreiche Vermittlung der Trächtigkeit durch das embryonale IFN  $\tau$  verhindert werden.

### **III. PUBLIKATION**

#### **Concentration-Dependent Type 1 Interferon-Induced Regulation of MX1 and FABP3 in Bovine Endometrial Explants**

**Simone Tamara Schabmeyer, Anna Maria Kneidl,  
Julia Katharina Schneider, Sandra Kirsch, Yury Zablotski, Wolfram  
Petzl, Frank Weber, Holm Zerbe and Marie Margarete Meyerholz \***





\* Clinic for Ruminants with Ambulatory and Herd Health Services, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig Maximilians University Munich, 85764 Oberschleissheim, Germany

Animals **2021**,11, 262.



## Article

# Concentration-Dependent Type 1 Interferon-Induced Regulation of MX1 and FABP3 in Bovine Endometrial Explants

Simone Tamara Schabmeyer, Anna Maria Kneidl, Julia Katharina Schneider, Sandra Kirsch, Yury Zablotski ,  
Wolfram Petzl , Frank Weber, Holm Zerbe  and Marie Margarete Meyerholz \* 

Clinic for Ruminants with Ambulatory and Herd Health Services, Centre for Clinical Veterinary Medicine Ludwig Maximilians University Munich, 85764 Oberschleissheim, Germany; Simone.Schabmeyer@campus.lmu.de (S.T.S.); A.Kneidl@med.vetmed.uni-muenchen.de (A.M.K.); Schneider.Julia@campus.lmu.de (J.K.S.); Sandra.Kirsch@med.vetmed.uni-muenchen.de (S.K.); Y.Zablotski@med.vetmed.uni-muenchen.de (Y.Z.); wpetzl@lmu.de (W.P.); weber@lmu.de (F.W.); h.zerbe@lmu.de (H.Z.)

\* Correspondence: marie.meyerholz@lmu.de; Tel.: +49-(89)-2180-78830

**Simple Summary:** Low fertility rates in high-yielding cows have been reported for many years. Due to its impact on animal welfare, this topic is relevant to the dairy industry, veterinary medicine, and consumers. This study was designed to apply a highly defined model to simulate complex mechanisms that occur in the inner layer of the uterus (endometrium) during pregnancy recognition. Samples were taken from animals with healthy uteri at the slaughterhouse and challenged in vitro. The endometrial gene expression of selected target genes differed according to the differing concentrations of the challenging admixtures. The findings indicated that the bovine embryonic pregnancy signal might compete with similar infection-associated signals for binding capacity at the receptor level, which might be relevant to pregnancy outcomes. In conclusion, an endometrial explant model was successfully applied to answer questions related to fertility in dairy cattle. According to the 3R principle (replacement, reduction, refinement), further studies could lead to new diagnostic and therapeutic strategies for tackling subfertility in dairy cows without the need for animal experiments.



**Citation:** Schabmeyer, S.T.; Kneidl, A.M.; Schneider, J.K.; Kirsch, S.; Zablotski, Y.; Petzl, W.; Weber, F.; Zerbe, H.; Meyerholz, M.M. Concentration-Dependent Type 1 Interferon-Induced Regulation of MX1 and FABP3 in Bovine Endometrial Explants. *Animals* **2021**, *11*, 262. <https://doi.org/10.3390/ani11020262>

Received: 20 December 2020

Accepted: 19 January 2021

Published: 21 January 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The inadequate maternal recognition of embryonic interferon  $\tau$  (IFN $\tau$ ) might explain subfertility in cattle. This study aimed at modeling the inducibility of type 1 interferon receptor subunits 1/2 (IFNAR1/2), mimicking competition between IFN $\tau$  and infection-associated interferon  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ), and simulating type 1 interferon pathways in vitro. Endometrial explants ( $n = 728$  from  $n = 26$  healthy uteri) were collected at the abattoir, challenged with IFN $\tau$  and/or IFN $\alpha$  in different concentrations, and incubated for 24 h. Gene expression analysis confirmed the inducibility of IFNAR1/2 within this model, it being most prominent in IFNAR2 with 10 ng/mL IFN $\alpha$  ( $p = 0.001$ ). The upregulation of interferon-induced GTP-binding protein (MX1, classical pathway) was higher in explants treated with 300 ng/mL compared to 10 ng/mL IFN $\tau$  ( $p < 0.0001$ ), whereas the non-classical candidate fatty acid binding protein 3 (FABP3) exhibited significant downregulation comparing 300 ng/mL to 10 ng/mL IFN $\tau$ . The comparison of explants challenged with IFN $\tau$  + IFN $\alpha$  indicated the competition of IFN $\tau$  and IFN $\alpha$  downstream of the regulatory factors. In conclusion, using this well-defined explant model, interactions between infection-associated signals and IFN $\tau$  were indicated. This model can be applied to verify these findings and to mimic and explore the embryo-maternal contact zone in more detail.

**Keywords:** endometrial explant model; embryo-maternal communication; type 1 interferon signaling; type 1 interferon receptor subunits 1/2 (IFNAR1/2); 3R principle; cattle; interferon  $\tau$ ; interferon  $\alpha$ ; interferon stimulated gene (ISG); subfertility

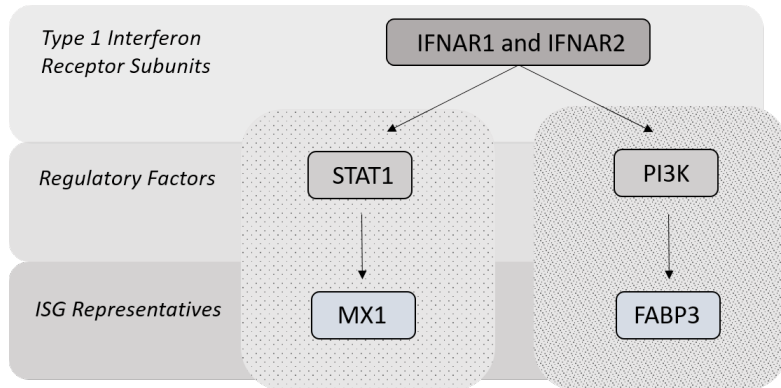
### 1. Introduction

Maintaining high fertility rates in dairy cowherds is a recurrent task for every farmer and veterinarian. Inflammatory processes of the endometrium lead to subfertility in cows, which might be due to inadequate maternal recognition of the embryonic signal, interferon  $\tau$  (IFN $\tau$ ). The restocking rate because of fertility problems in cattle is currently 20% [1,2]. It has been reported in multiple studies that low fertility rates in cattle are associated with classical postpartum diseases, such as mastitis [3], the retention of fetal membranes, metritis, and endometritis typically caused by bacterial infections [4–7]. In the postpartum period of 60–100 days, endometritis can still be present in a subclinical manner. As recently reviewed by Wathes and coworkers [8], not only bacterial but also viral infections can impact fertility parameters. Bovine herpes virus type-4 (BHV-4) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) have been associated with metritis and endometritis [9,10]. Schmallenberg virus (SBV) and bluetongue virus (BTV) have been described to impact early embryonic survival [11,12]. However, the mechanisms linking viral infections and bovine subfertility remain to be investigated. It has been further reported that fertilization rates in dairy cows are generally high, but the percentage of early pregnancy loss before implantation is ~40% [13–15]. This could indicate the malfunctioning of embryo–maternal crosstalk. Adequate maternal recognition, the transmission of early embryonic signals, and the establishment of a suitable niche for the developing conceptus are indispensable [16,17]. IFN $\tau$  appears to be a key regulator of the fine-tuned maternal immunomodulation required for pregnancy establishment. IFN $\tau$  and all other type 1 interferons bind to the type 1 interferon receptor, which is formed by two subunits [18]. After interferon binding, the cell signal can be transmitted either via the classical pathway through the Janus-activated kinase and signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT), or via non-classical pathways, such as phosphoinositide 3-kinase (PI3K) [19]. Both classical and non-classical pathways are essential for a successful and specific tissue response to different interferon stimuli, and this response is formed by classical and non-classical interferon-stimulated genes (ISGs) [18].

In general, type 1 interferons, such as interferon  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ), represent the first line of defense against viral infections. Unlike the others, IFN $\tau$  is not upregulated by viral infections [20], but has been described to have antibacterial activity in mice [21]. However, the most important quality of IFN $\tau$  is its key role in maternal recognition of pregnancy. This type 1 interferon inhibits pulsatile prostaglandin F-2  $\alpha$  release from the endometrium via the downregulation of estrogen receptor 1 and the oxytocin receptor, thereby preventing luteolysis of the corpus luteum and allowing pregnancy maintenance [22,23]. IFN $\tau$  further induces the expression of ISGs within the reproductive tract [24–26]. The respective proteins have immunomodulatory and metabolic functions and regulate growth and angiogenesis [27]. Minor alterations in the secretome composition have been reported to impair early pregnancy in cattle [28,29]. IFN $\tau$  is also known to have immunosuppressive functions. Recent studies indicate that day-seven embryos secrete IFN $\tau$  and trigger an anti-inflammatory response [30,31]. Exposure to paternal antigens occurs during embryo implantation. The immunomodulation of the maternal contact zone is required to avoid rejection, resorption, or expulsion of the conceptus [16,32]. Inflammatory processes can disturb the direct and indirect immunomodulatory actions of IFN $\tau$  in the maternal system. In the case of present viral infections, type 1 interferons other than IFN $\tau$ , such as IFN $\alpha$ , might disturb embryo–maternal crosstalk via competitive signaling.

In this study, six target genes were selected to exemplarily simulate both the classical and non-classical pathways of type 1 interferon signaling (Figure 1). In this regard, the type 1 interferon receptor subunits 1 and 2 (IFNAR1 and IFNAR2) represent the top level of the signaling pathways for type 1 interferons. The intermediate level is represented by regulatory factors: the signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1), exemplarily for classical type 1 interferon signaling, and phosphoinositide 3-kinase (PI3K), exemplarily for non-classical type 1 interferon signaling. At the basal level, interferon-induced GTP-binding protein (MX1, earlier myxomatose resistance protein 1) was selected,

as it is one of the most prominent classical ISGs [33–36]. Fatty acid-binding protein 3 (FABP3) was chosen as a promising candidate that represents the non-classical pathway in bovine species in this study [37,38].



**Figure 1.** Schematic illustration of selected target gene representatives. Type 1 interferon receptor subunit 1 (IFNAR1); Type 1 interferon receptor subunit 2 (IFNAR2); signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1); phosphoinositide 3-kinase (PI3K); interferon-stimulated gene (ISG); interferon-induced GTP-binding protein (MX1); fatty acid-binding protein 3 (FABP3).

Although many researchers have contributed work to this field, it remains unknown why inflammatory conditions such as subclinical endometritis can lead to inadequate embryo–maternal crosstalk. Therefore, the aim of this project was to apply a highly defined endometrial explant model to achieve the following:

- Test the inducibility of type 1 interferon receptor subunits 1/2 (IFNAR1/2);
- Mimic a competitive situation between the embryonic signal  $\text{IFN}\tau$  and other type 1 interferons (exemplarily  $\text{IFN}\alpha$ ) in the presence of progesterone (P4);
- Simulate exemplarily classical and non-classical type 1 interferon signaling pathways.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Donor Cows and Sample Criteria

Bovine uteri ( $n = 26$ ) were collected at the local abattoir between May and October 2019. The breeds included Brown Swiss ( $n = 9$ ), Simmental ( $n = 8$ ), Holstein–Friesian ( $n = 6$ ), Red Holstein ( $n = 1$ ), and unknown breed ( $n = 2$ ). The age of the donor cows ranged from 2.6 to 13.3 years. A pre-selection of the uteri was made right after evisceration. The selected organs were transferred to a separate room within the facility. A thorough adspetoral and palpatory examination for pathological changes, such as increased fluctuation, hemorrhage, mucosal lesions, and other anomalies, was then conducted. Only uteri that had not been contaminated during the process of slaughter were used for sample collection. All uteri that were selected for further sample collection were intact, symmetrical, and did not show any obvious pathological alterations. Additionally, the attached ovaries had at least one mature corpus luteum, indicating that the donor cow was in diestrus, and displayed no signs of pathological alterations.

### 2.2. Sample Collection

All instruments and materials were sterile and for each uterus, a new set of instruments and materials was applied. After cleaning and disinfecting the outer surface of the uterus with water and 70% ethanol, the uterine lumen ipsilateral to the mature corpus

luteum was opened via a 2–3 cm longitudinal incision with a scalpel and forceps. The intercaruncular endometrial surface was first swabbed (UNI-TER sterile swab with Amies medium, Vacutest Kima s.r.l., Arzergrande, Italy), and then cytobushed (Celltip Cytobrush, Servoprax GmbH, Wesel, Germany) for further bacteriological and cytological examination. The cut was extended along the uterine body up to the horn tip and the tissue margins were pinned to an underlying styrofoam plate covered with tinfoil (Carl Roth, Karlsruhe, Germany). To ensure a continuative and reproducible size of endometrial explants, a disposable 5 mm biopsy punch (kai medical, Seki, Japan), precision forceps, and scissors were used, adapted from the method described by Borges et al. [39]. After gently pressing the biopsy punch through the intercaruncular endometrial and myometrial tissue, the explant was held in position with precision forceps and dissected with scissors (see Figure S1a). The obtained explants were placed in 60 mL sample vials (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) containing approximately 40 mL Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS, Merck, Darmstadt, Germany) and stored on ice until further processing. From each donor cow,  $n = 28$  ( $n = 728$  in total) endometrial explants were obtained for the endometrial explant model. After sample collection had been completed, the uterus was separated from the ovaries, oviducts, and their mesentery, including the mesometrium, to measure the weight of the uterus. The time between the slaughter of the cow and the completion of sampling was <90 min.

### 2.3. Bacteriological Examination

Obtained bacteriological swabs of each sampled uterus were applied to non-selective Columbia Sheep Blood Agar, *Streptococcus* selective Edwards Agar, and Enterobacteriaceae selective Violet Red Bile Agar, and incubated for 48 h at 37 °C. The agar plates were checked for bacterial growth at 24 h and 48 h of incubation.

### 2.4. Cytological Examination

Cytological examination of the endometrium was performed as previously described by Helfrich et al. [40]. In short, the collected cytobrush samples were smeared onto two glass slides and stained with Haema LT-SYS Quick-Stain (Labor + Technik Eberhard Lehmann GmbH, Berlin, Germany) in the laboratory. Under a microscope (Leitz, Stuttgart, Germany) using 100 × magnification and oil immersion, 300 nucleated cells were enumerated and the proportion of polymorphonuclear cells (PMN) was evaluated by two independent examiners [41]. A PMN proportion of  $\geq 5\%$  was classified as subclinical endometritis (SE) [42].

### 2.5. Leukocyte Esterase Test

After the cytological smear, the endometrial cytobrush was rinsed with 2 mL H<sub>2</sub>O and the fluid was probed with a Multistix® 10 SG urine stick (Siemens Healthineers, Erlangen, Germany) to evaluate the leucocyte content after a 2 min incubation time, as previously described in low-volume lavage samples of the uterus [43,44].

### 2.6. Endometrial Explant Culture

In the laboratory, each step of the endometrial explant handling was performed in a class II biosafety cabinet (Biowizard Golden Line, Kojair, Vilppula, Finland). The uterus medium contained 99% Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (Merck) supplemented with 1% 10,000 µg/mL Penicillin–Streptomycin (Merck). Cellstar® 24-well culture plates (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) containing 1 mL uterus medium were pre-incubated (Heracell vios 160i, Thermo Fisher Scientific) at 37 °C, with 5% CO<sub>2</sub> and 5.5% O<sub>2</sub>, for 1 h. Endometrial explants were placed in sterile glass Petri dishes with PBS. Remaining myometrial tissue was removed with precision forceps and a scalpel (see Figure S1b). After preparation, the explants were transferred into the pre-incubated 24-well culture plates, with one per well, and left to rest for 1 h at 4 °C. Meanwhile, IFN $\gamma$  and IFN $\alpha$  (Cloud Clone Corp., Houston, TX, USA) were prepared with uterus medium in

dilutions of 10, 100, and 300 ng/mL each. Furthermore, the IFN $\tau$  + IFN $\alpha$  combinations of 10 + 100, 100 + 10, and 100 + 100 ng/mL were prepared with uterus medium and 20 ng/mL P4 (pre-diluted with uterus medium) was thawed. Only uterus medium ("control uterus medium"), uterus medium only with 100 ng/mL IFN $\tau$  ("control 100 $\tau$ "), and uterus medium only with 20 ng/mL P4 ("control P4") served as controls. After resting, the uterus medium was replaced by the prepared admixtures. The explants were challenged with IFN $\tau$  and/or IFN $\alpha$  in different concentrations in the presence of P4, according to the above-mentioned concentrations (see pipetting layout, Figure S2). The plate was incubated for 24 h at 37 °C, with 5% CO $_2$  and 5.5% O $_2$ . These conditions had been evaluated as suitable in previous experiments [45]. After the completed incubation time, the endometrial explants were preserved in 0.5 mL cryogenic tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) containing 450  $\mu$ L RNA storage reagent RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, Crawley, UK) at  $-80$  °C. The supernatants were aspirated and preserved in 1.4 mL microcentrifuge tubes (Eppendorf, Lelystad, The Netherlands) at  $-20$  °C.

### 2.7. Determination of Tissue Viability

The tissue viability of the endometrial explants of each donor cow was determined with water-soluble tetrazolium salt-8 (WST-8; Merck). WST-8 is reduced to the orange-red formazan by dehydrogenases that are only present in viable cells. The amount of the color indicator formazan is thereby directly proportional to the metabolic cell activity of viable cells, and can be photometrically measured as the optical density (OD).

Therefore, four endometrial explants of each donor cow were handled identically for the challenge experiment until incubation. These explants were cultured in a separate 24-well culture plate with 1 mL uterus medium at 37 °C with 5% CO $_2$  and 5.5% O $_2$ . Groups of two explants were treated at either 0 h or 21 h with WST-8, and incubated for another 3 h. At the end of the respective incubation time (3 h/24 h), the supernatants of the incubated explants were aspirated and photometrically measured at a wavelength of 460 nm (CLARIOstar<sup>®</sup>, BMG LABTECH, Ortenberg, Germany) to determine the OD at 3 h and 24 h, as well as their percentage difference.

### 2.8. Gene Expression Analysis

For total RNA extraction, the explant duplicates of each animal were pooled in one innuSPEED Lysis Tube P (Analytic Jena AG, Jena, Germany) containing 450  $\mu$ L lysis buffer for homogenization in a SpeedMill Plus device (Analytic Jena AG, Jena, Germany). The lysis buffer was part of the Bio&Sell RNA Mini Kit (Bio&SELL GmbH, Nürnberg, Germany) that was used according to the manufacturer's instructions, with an additional DNase I digestion reaction using 50  $\mu$ L DNase I reaction buffer and 5  $\mu$ L DNase I (Bio&SELL GmbH). After RNA extraction, the approximately 80  $\mu$ L eluate containing the purified RNA was subdivided: 2  $\mu$ L was used for further RNA quality analysis, 10  $\mu$ L for cDNA synthesis, and the residual volume for cryopreservation at  $-80$  °C in a 0.2 mL reaction tube (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Germany). Additionally, 10  $\mu$ L of one sample from each animal was used for minus-reverse transcriptase (–RT) control synthesis. RNA quality analysis was performed with the automated Experion electrophoresis station with RNA StdSens Chips (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), according to the manufacturer's instructions, to estimate the level of RNA degradation using the RNA Quality Indicator (RQI). The RQI values range from 1 to 10, with the classifications "unacceptable quality", (1–3), "possibly acceptable quality", (4–6), and "acceptable quality", (7–10).

Through reverse transcriptase, cDNA synthesis was performed directly after RNA extraction, according to the manufacturer's 25  $\mu$ L protocol, with 10  $\mu$ L purified RNA and the following Promega reagents: 1  $\mu$ L Oligo(dT)15 Primer, 0.625  $\mu$ L RNasin<sup>®</sup> Ribonuclease Inhibitor, 5  $\mu$ L M-MLV RT 5X Buffer, 1.25  $\mu$ L dNTP Mix, 0.5  $\mu$ L M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA), and 6.625  $\mu$ L PCR-grade water (Carl Roth). To synthesize the –RT control, reverse transcriptase synthesis was carried out in the absence of the reagent M-MLV Reverse Transcriptase. The cDNA products were photometrically mea-

sured to determine their concentration and diluted to the end concentration of 200 ng/μL with PCR-grade water (Carl Roth). The cDNA and –RT control products were then stored in 0.2 mL reaction tubes (Biozym Scientific GmbH) at –20 °C until further use.

A quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) was executed with the thermocycler qTOWER<sup>3</sup> 84 G (Analytic Jena AG) and 384-well skirted PCR plates (FrameStar<sup>®</sup>, 4titude<sup>®</sup> Limited, Wotton, Surrey, UK). The mastermix used consisted of 5 μL fluorescent dye (SensiFAST<sup>™</sup> SYBR No-ROX Kit, Meridian Bioscience, Cincinnati, OH, USA), 0.4 μL forward/reverse primer, and 3.2 μL PCR-grade water. The applied primers for IFNAR1, IFNAR2, STAT1, PI3K, MX1, and FABP3 were designed with the Primer-BLAST software (NCBI, Rockville Pike, MD, USA), purchased from Biomers (biomers.net GmbH, Ulm, Germany), and diluted with PCR-grade water from a starting concentration of 100 μM to an end concentration of 5 μM. Primer sequences are provided in Table 1.

**Table 1.** Oligonucleotide primer sequences used in the quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) with the accession number and fragment size in base pairs (bp).

Gene	Accession Number	Forward (F) and Reverse (R) primer (5'–3')	Fragment Size
IFNAR1 <sup>1</sup>	NM_174552.2	F: ACAGGCGGAATAAAGGGAGC R: AAGGCAGGTCCAATGACAGG	683 bp
IFNAR2 <sup>2</sup>	NM_174553.2	F: GTGGGTAAACACGACGGACA R: CTCGTCCTGGGTCGAAAGAGG	419 bp
STAT1 <sup>3</sup>	NM_001077900.1	F: CGGTCCCAAAATGGAGGTGA R: ACATGCCACTCTTCTGTGTCA	308 bp
PI3K <sup>4</sup>	NM_174575.1	F: CTGAAGCAGACAGTGAGCAA R: CCAAGGAGGCGGTATCACAA	207 bp
MX1 <sup>5</sup>	NM_173940.2	F: TTGGGAATGAAGACGAGTG R: CCTCTGTGGTAGCGATGCC	342 bp
FABP3 <sup>6</sup>	NM_174313.2	F: TCGGTGTCGGTTTGCTACC R: TCAACCATCTCCCGCACAAAG	262 bp

<sup>1</sup> Type 1 interferon receptor subunit 1; <sup>2</sup> type 1 interferon receptor subunit 2; <sup>3</sup> signal transducer and activator of transcription 1;

<sup>4</sup> phosphoinositide 3-kinase; <sup>5</sup> interferon-induced GTP-binding protein; <sup>6</sup> fatty acid-binding protein.

Frozen cDNA samples, –RT controls, and primers were tempered for 5 min at 60 °C (on the BioShake iQ (Quantifoil Instruments GmbH, Jena, Germany)). The mastermix was prepared according to protocol in a class I biosafety cabinet (LTF Labortechnik, Wasserburg, Germany) and pipetted in 9 μL portions, adding 1 μL of each standard, no template control (NTC), sample cDNA, or –RT control. All measurements were performed in duplicates. Amplification was executed at 95 °C for 2 min, 40 cycles at 95 °C for 5 s, and 15 s at 60 °C. For each data point in every PCR run, a melting curve was conducted, starting from 60 °C and heating up in 0.5 °C steps until 95 °C. Analyzing the melting curve derivations, a single peak representing the calculated melting temperature of each target gene sequence was identified. The standard curve method for the absolute quantification of gene expression was carried out for each primer with the defined cDNA subclone concentrations of 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, and 10<sup>6</sup> copies/μL. The cDNA subclones were produced with the Promega cloning kit pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System (Promega) and sequenced for product verification at the Eurofins laboratory (Eurofins Genomics, Munich, Germany). PCR amplification efficiency was recorded for each PCR run and ranged from 90% to 109%, except for the target gene PI3K, with amplification efficiencies of 85%, and 87%.

## 2.9. Statistical Analysis and Graphical Illustration

Gene expression data were statistically analyzed with the R program for statistical computing (Version 4.0.3, 2020-10-10). A simple linear mixed effects model was used to study the IFNAR1, IFNAR2, STAT1, PI3K, MX1 and FABP3 parameters as fixed effects with



a random effect of animal. The normality and homoscedasticity of residuals were assessed via visual residual-diagnostics. Due to the not-normally distributed and heteroskedastic residuals, data of all target genes in final models were log transformed (natural logarithm). Because of the exploratory approach of the study, the correction of the  $p$  values for multiple comparisons was not performed. Calculated differences with  $p < 0.1$  were regarded as statistical tendencies. Differences with  $p < 0.05$  were regarded as statistically significant. Data presented in the text are provided in the form of mean  $\pm$  standard deviation (SD).

### 3. Results

#### 3.1. Characterization of Sampled Uteri

The weights of the examined uteri were  $630 \pm 149$  g. Evaluation of the bacteriological swabs did not show any kind of bacterial growth. Cytological evaluation revealed that none of the uteri ( $n = 26$ ) showed a PMN proportion  $\geq 5\%$ . The additional leukocyte esterase test did not indicate any leukocyte positive results. Therefore, all sampled uteri were classified as having bacteriologically and cytologically healthy endometria.

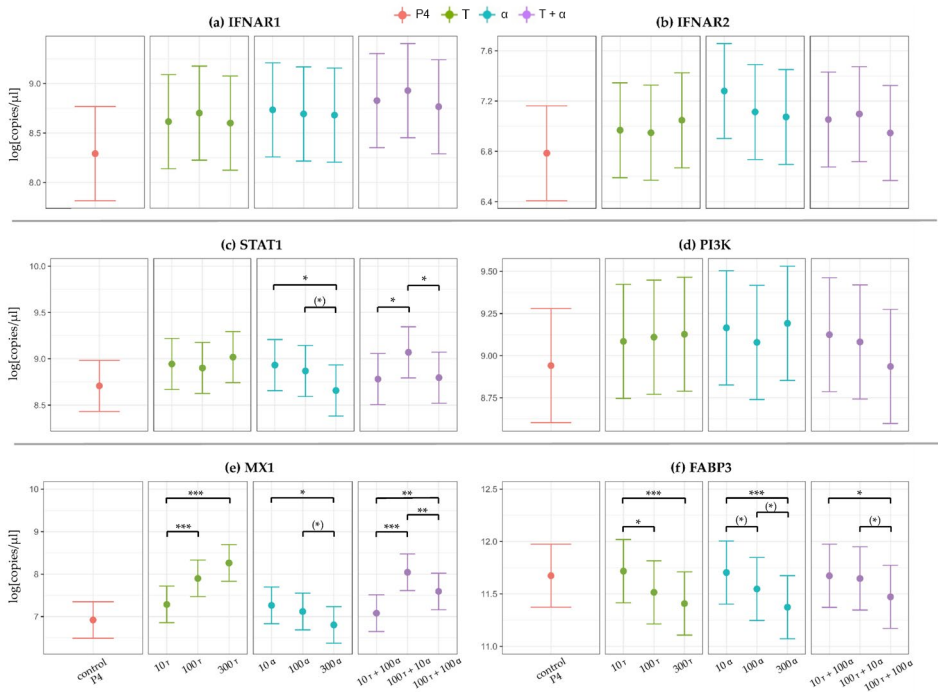
#### 3.2. Successful Application of the Highly Defined Endometrial Explant Model

In this study, an endometrial explant model was successfully implemented *in vitro*. After WST-8 incubation, the obtained OD of endometrial explant supernatants was  $0.91 \pm 0.22$  (3 h) and  $1.62 \pm 0.36$  (24 h). The measured OD proved the viability of the endometrial explants. The percent increase from the OD at 3 h to the OD at 24 h was 78.45%. This increase reflects the acclimatization to the new incubation environment. As additional quality control, RQI values were measured. RNA quality analysis showed a mean RQI value of  $9.3 \pm 0.4$ , and the RQI was  $\geq 7.9$  in all samples except for one, which had an RQI value of 6.8. For the absolute quantification of gene expression, cDNA subclones were generated and successfully applied to exemplarily demonstrate downstream type 1 interferon signaling via selected target genes.

To mimic the physiological cycle stage diestrus during the challenge experiment, all endometrial explants were incubated in the presence of P4. Therefore, the expression of target genes was calculated and illustrated in relation to the control, “control P4”. The data concerning the controls “control uterus medium” and “control 100 $\tau$ ” served as internal validation. The log-transformed (natural logarithm) gene expression of target genes in relation to “control P4” is illustrated in Figure 2a–f. Each panel contains the following: (1) the “control P4” and the three treatment group sets; (2) IFN $\tau$  at three concentrations (10, 100, and 300 ng/mL); (3) IFN $\alpha$  at three concentrations (10, 100, and 300 ng/mL); and (4) the three combinations of IFN $\tau$  and IFN $\alpha$  (10 + 100, 100 + 10, and 100 + 100 ng/mL). Figure 2a–f includes statistically significant differences within these treatment group sets, indicated by asterisks. Significant differences between the treatment group sets and “control P4” are shown in Table S1a–f.

##### 3.2.1. Higher Expression of IFNAR1 and IFNAR2 After IFN $\alpha$ Challenge

Gene expression analysis confirmed the inducibility of IFNAR1/2 within the established endometrial explant model. In comparison to “control P4”, IFNAR1 was upregulated by trend in all explants challenged with IFN $\alpha$  (10, 100, and 300 ng/mL;  $p < 0.1$ ) and in all explants challenged with combinations containing IFN $\alpha$  ( $p < 0.04$ ). In comparison, only the gene expression after the challenge with 100 ng/mL IFN $\tau$  was upregulated ( $p = 0.066$ ). Comparisons of the treatment group sets (Table S1a), as well as within treatment group sets (Figure 2a), did not show any significant differences concerning the gene expression of IFNAR1.



**Figure 2.** Illustration of the log-transformed gene expression of (a) type 1 interferon receptor subunit 1 (IFNAR1), (b) type 1 interferon receptor subunit 2 (IFNAR2), (c) signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1), (d) phosphoinositide 3-kinase (PI3K), (e) interferon-induced GTP-binding protein (MX1), and (f) fatty acid-binding protein (FABP3) measured in bovine endometrial explants via a quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR). X-axis: explants were treated with 20 ng/mL progesterone (control P4, displayed in red) or with 20 ng/mL P4 and interferon  $\tau$  ( $\tau$ ) and/or interferon  $\alpha$  ( $\alpha$ ) at different concentrations (10, 100 and 300 ng/mL  $\tau$  or  $\alpha$ ) and in different combinations (10 $\tau$  + 100 $\alpha$ , 100 $\tau$  + 10 $\alpha$  and 100 $\tau$  + 100 $\alpha$ ). The Y-axis represents log-transformed data of linear mixed effect models (natural logarithm). Significance codes: statistical tendencies  $p < 0.1$  are marked with (\*), statistical significances at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , and  $p < 0.001$  are marked with \*, \*\*, and \*\*\*, respectively. Only significant differences within the three subsets  $\tau$  (displayed in green),  $\alpha$  (displayed in blue), and  $\tau + \alpha$  (displayed in purple) are marked with asterisks. Significant differences between the treatment group sets or between treatment groups and the control P4 are not marked in this graph, but can be found in Table S1a–f.

The induction of IFNAR2 was visible, as the gene expression was upregulated in all explants challenged with IFN $\alpha$  ( $p < 0.06$ ) in comparison to “control P4”. Upregulation was most prominent with 10 ng/mL IFN $\alpha$  ( $p = 0.001$ ). Comparisons of the treatment group sets showed a significantly higher gene expression in explants challenged with 10 ng/mL IFN $\alpha$  compared to 10 ng/mL IFN $\tau$  ( $p = 0.040$ ), 100 ng/mL IFN $\tau$  ( $p = 0.029$ ), and the combination of 100 ng/mL IFN $\tau$  + 100 ng/mL IFN $\alpha$  ( $p = 0.028$ ) (Table S1b). There were no significant changes in IFNAR2 gene expression within treatment group sets (Figure 2b).

### 3.2.2. IFN $\alpha$ Concentration-Dependent Gene Expression in STAT1

The target genes selected as representatives for regulatory factors concerning classical (exemplarily STAT1) and non-classical (exemplarily PI3K) interferon signaling were



differentially regulated. Both target genes were upregulated in most treatment groups in comparison to “control P4” (Table S1c,d).

STAT1 gene expression was comparable between the treatment groups with IFN $\tau$  (10, 100, and 300 ng/mL;  $p > 0.1$ ). The gene expression decreased at higher IFN $\alpha$  concentrations, with a significant difference between 10 and 300 ng/mL IFN $\alpha$  ( $p = 0.021$ ) (Table S1c). When comparing the combinations of IFN $\tau$  and IFN $\alpha$ , the highest gene expression was detected in the treatment group with low IFN $\alpha$  (100 ng/mL IFN $\tau$  + 10 ng/mL IFN $\alpha$  versus 10 ng/mL IFN $\tau$  + 100 ng/mL IFN $\alpha$  ( $p = 0.016$ ) and versus 100 ng/mL IFN $\tau$  + 100 ng/mL IFN $\alpha$  ( $p = 0.022$ ); Figure 2c). Downregulation was most prominent in the 300 ng/mL IFN $\alpha$  group compared to the 100 ng/mL IFN $\tau$  + 10 ng/mL IFN $\alpha$  group ( $p < 0.001$ ) (Table S1c).

Concerning PI3K gene expression, only the combination of 100 ng/mL IFN $\tau$  + 100 ng/mL IFN $\alpha$  tended to be downregulated in comparison to 10 ng/mL IFN $\alpha$  ( $p = 0.096$ ) and 300 ng/mL IFN $\alpha$  ( $p = 0.063$ ) (Figure 2d, Table S1d). When comparing the combinations of IFN $\tau$  and IFN $\alpha$ , the lowest gene expression was detected in the treatment group with 100 ng/mL IFN $\alpha$  + 100 ng/mL IFN $\tau$ , but this was not significantly different in comparison to other combinations ( $p > 0.1$ ) (Figure 2d).

### 3.2.3. Type 1 Interferon-Specific, Concentration-Dependent Regulation of MX1 and FABP3

In comparison to “control P4”, MX1 gene expression was upregulated in most treatment groups, especially in those containing IFN $\tau$  (Table S1e). In contrast, FABP3 gene expression was similar or decreased in all treatment groups compared to “control P4” (Table S1f).

MX1 gene expression significantly increased along with rising IFN $\tau$  concentrations (10 versus 100 ng/mL ( $p < 0.001$ ), 10 versus 300 ng/mL ( $p < 0.0001$ ), and 100 versus 300 ng/mL ( $p = 0.026$ )). In comparison, rising IFN $\alpha$  concentrations led to a significant decrease in MX1 gene expression (10 versus 300 ng/mL ( $p = 0.005$ ) and 100 versus 300 ng/mL ( $p = 0.052$ )) (Figure 2e). When comparing the combinations of IFN $\tau$  and IFN $\alpha$ , the highest gene expression was detected in the treatment group with low IFN $\alpha$  (100 ng/mL IFN $\tau$  + 10 ng/mL IFN $\alpha$  versus 10 ng/mL IFN $\tau$  + 100 ng/mL IFN $\alpha$  ( $p < 0.0001$ ) and versus 100 ng/mL IFN $\tau$  + 100 ng/mL IFN $\alpha$  ( $p = 0.006$ ); Figure 2e). Comparisons of the treatment group sets revealed the highest difference in gene expression between 300 ng/mL IFN $\tau$  and 300 ng/mL IFN $\alpha$  ( $p < 0.0001$ ) (Table S1e).

In contrast to MX1, the gene expression of FABP3 significantly decreased along with rising IFN $\tau$  concentrations (10 versus 100 ng/mL ( $p = 0.029$ ), and 10 versus 300 ng/mL ( $p < 0.001$ )). Identically to MX1, rising IFN $\alpha$  concentrations led to a decrease in FABP3 gene expression (10 versus 100 ng/mL ( $p = 0.089$ ), 10 versus 300 ng/mL ( $p < 0.001$ ), and 100 versus 300 ng/mL ( $p = 0.061$ )). When comparing the combinations of IFN $\tau$  and IFN $\alpha$ , the lowest gene expression was detected in the treatment group with 100 ng/mL IFN $\tau$  + 100 ng/mL IFN $\alpha$  ( $p < 0.06$ ) (Figure 2f).

Comparisons of the treatment group sets revealed the highest difference in gene expression between 10 ng/mL IFN $\tau$  and 300 ng/mL IFN $\alpha$  ( $p < 0.001$ ) (Table S1f).

## 4. Discussion

The two adversaries IFN $\tau$  and IFN $\alpha$  were chosen to simulate the competitive situation between embryo–maternal communication and infection-associated signaling, which might impact subfertility in cattle. The applied concentrations of P4, IFN $\tau$ , and IFN $\alpha$  were chosen in accordance with those mentioned in the literature [46,47]. The targets IFNAR1/2, STAT1, PI3K, MX1, and FABP3 were selected and successfully applied to simulate exemplarily classical and non-classical type 1 interferon signaling pathways. The gene expression of these highly defined samples showed a significant upregulation of IFNAR1 and IFNAR2 after challenge with IFN $\tau$  and IFN $\alpha$  at differing concentrations and combinations, in comparison to “control P4”. Concentration-dependent upregulation of the classical ISG MX1 confirmed the validity of this model and its application for the simulation of the embryo–maternal contact zone.

In the literature, there is a limited number of studies focused on the establishment of endometrial explant models. Borges and coworkers established a model with intact endometrial tissue from bovine uteri [39], which focused on investigating the accumulation of differing interleukins in response to a challenge with heat-killed bacteria. The same explant-collecting technique was used by Mathew et al. to elucidate IFN $\tau$ -dependent and -independent effects on bovine endometrial gene expression [48]. Schäfer et al. tested human endometrial explants as suitable for analyzing the functional effects of chemicals outside the human body, and aspiration curettage was used to assess the endometrial tissue [49]. Bersinger and coworkers found that the cell morphology of human endometrial explants started to disrupt after 12 h in culture [50]. However, they were also able to show that this process was decelerated in the presence of P4. The advantage of explant models in contrast to cell culture models or chopped tissue is the maintenance of the integrity of the three-dimensional structure, which might reflect the tissue-specific reaction in a more accurate way. It was recently shown that endometrial explants from non-pregnant heifers collected on day 18 after insemination displayed a significantly higher gene expression of ISG-15 (classical ISG) when challenged with pregnancy-associated glycoproteins (PAG) after 24 h, in comparison to explants from non-pregnant heifers without PAG exposure [51]. This finding reflects a tissue-specific reaction towards a signal associated with early pregnancy. However, to the best of the authors' knowledge, no bovine endometrial explant model has been previously applied to test the inducibility of type 1 interferon receptor subunits, and to mimic classical and non-classical type 1 interferon signaling pathways via exposure to IFN $\tau$  and IFN $\alpha$  at different concentrations and combinations.

In the present study, the gene expression results indicate a competitive situation between the two signals, IFN $\tau$  and IFN $\alpha$ , in the presence of P4. This effect was expected to be visible at the receptor level. Instead of that, this was detected downstream of the regulatory genes. The gene expression of IFNAR1 and IFNAR2 did not differ within the three treatment group sets. However, all treatment group sets with the combinations of IFN $\tau$  and IFN $\alpha$  exhibited significant differences downstream of the regulatory factor level, and along the classical type 1 interferon signaling pathway side (exemplarily STAT1 and MX1) and the non-classical type 1 interferon signaling pathway side (exemplarily PI3K and FABP3).

When comparing MX1 and STAT1 gene expressions in treatment group sets with combinations of IFN $\tau$  and IFN $\alpha$ , it was shown that higher IFN $\alpha$  concentrations led to decreased gene expression. It seems that with rising IFN $\alpha$  concentrations, entire successful IFN $\tau$  stimulation is prevented. These findings indicate that a competitive situation between IFN $\tau$  and IFN $\alpha$  can be simulated with this model on a regulatory factor level, and further downstream. Additional stressors, such as viral infections, might also lead to the parallel modulation of the type 1 interferon signaling cascade [10,52]. This might impede the discrimination of the systemic effects of IFN $\tau$  from those of other type 1 interferons. Bauersachs et al. [37] showed a wide overlap of endometrial gene expression in early pregnant heifers compared to heifers that underwent the intrauterine administration of IFN $\alpha$ . Furthermore, dairy cows are in a high lactation phase during pregnancy establishment. Metabolic challenges, in addition to immune-endocrine changes, affect the intrauterine adaption capacity. This might affect important receptor expression and the complex intracellular downstream signaling of IFN $\tau$  in the endometrium, and can negatively affect embryo-maternal communication. In relation to MX1 and STAT1, FABP3 and PI3K also showed similarities in their gene expression when comparing the treatment group sets with combinations of IFN $\tau$  and IFN $\alpha$ . Although the detected differences in FABP3 and PI3K are not as strong as in MX1 and STAT1, it can be noted that the treatment groups with the highest type 1 interferon concentrations have the lowest gene expression. This could also indicate a negative feedback response or dose effect due to excessive type 1 interferon signaling, or a counteraction of IFN $\alpha$  versus IFN $\tau$ . It might be possible that the competitive situation is also reflected by the gene expression data on the interferon receptor level,

because both IFNAR1 and IFNAR2 gene expressions were higher after IFN $\alpha$  challenge, and the smallest amount of IFN $\alpha$  (10 ng/mL) led to the most prominent upregulation of IFNAR2. This could indicate regulative negative feedback or saturation mechanisms that might finetune the response to type 1 interferons at the receptor level. However, the evaluation of data in this direction is limited and highly interpretative, as only candidate gene expression data were considered.

It has been reported in multiple studies that ISGs are upregulated by IFN $\tau$  [33,37,53,54]. Our results are in line with these observations, as MX1 was significantly upregulated by IFN $\tau$ . Interestingly, MX1 was significantly downregulated by IFN $\alpha$ . In contrast, the non-classical candidate FABP3 was downregulated by both type 1 interferons. These findings could reflect the necessity of a more adjusted IFN $\tau$  concentration approach, as only three concentrations were tested in this study. The physiological concentrations of IFN $\tau$  *in vivo* still need to be determined. This is a major task, because IFN $\tau$  levels are difficult to measure, as reviewed by Hansen et al. [55]. Concentrations of IFN $\tau$  applied in other *in vitro* studies ranged from 0.025 ng/mL [56] to 10,000 ng/mL [57]. In addition, the definition and described characteristics of non-classical ISGs vary between studies [58–60]. Predominantly non-classical ISGs are described to be induced via P4, and exhibit biological functions associated with pregnancy establishment [55,61,62]. In the present study, FABP3 was selected as a promising candidate to represent non-classical ISGs, because it had previously been described as P4-dependent and functionally involved in the modulation of cell growth and proliferation [58]. It was also promising because Bauersachs et al. [37] described FABP3 as being strongly upregulated on day 15 and 18 of pregnancy, but not after a challenge with IFN $\alpha$ . This group even described a significant decrease in FABP3 between day 13 and 19 in the estrus cycle in the same study. Unexpectedly, FABP3 was downregulated by differing concentrations of IFN $\tau$  and IFN $\alpha$  in our study, which has not been described before. Whether FABP3 is a suitable candidate for non-classical ISGs needs to be investigated. However, the model applied in this study could allow the evaluation of typical characteristics and the identification of the differences between classical and non-classical ISGs in future approaches.

Taken together, the present data generated with our highly defined endometrial explant model, used to simulate the embryo–maternal contact zone, indicate a competitive situation between IFN $\tau$  and IFN $\alpha$ . Of course, the interpretation of functionality is limited. *In vitro* models only reflect a snapshot of a far more complex situation *in vivo*. The implementation of data on the protein level would be a logical and desirable next step, but was outside of the feasible scope of this study. Furthermore, type 1 interferon signaling pathways are very complex, and no signaling pathway alone is considered sufficient to generate a complete biological response. Further studies with holistic techniques, such as transcriptomics and proteomics, are required to determine why different signal-transmitting possibilities are chosen over others. The possible applications of this model include simulations of inflammatory conditions, such as endometritis.

## 5. Conclusions

In conclusion, a highly defined endometrial explant model was successfully implemented *in vitro* and applied to test the inducibility of type 1 interferon receptor subunits (IFNAR1/2). Exemplarily, classical and non-classical type 1 interferon pathways were simulated via selected target genes. Further *in vitro* studies with this model might mimic and explore the embryo–maternal contact zone in more detail, to answer research questions in this area. This might lead to new diagnostic and therapeutic strategies for tackling subfertility in dairy cows without the need for animal experiments.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/2076-2615/11/2/262/s1>: Figure S1 (a) and (b), graphical illustration of sampling procedure; Figure S2, graphical illustration of pipetting layout for the 24-well culture plate; Table S1, (a) IFNAR1, (b) IFNAR2, (c) STAT1, (d) PI3K, (e) MX1, and (f) FABP3: *p* values of gene expression comparisons of treatment groups and the control (“control P4”).

**Author Contributions:** Conceptualization, S.T.S., W.P., F.W., H.Z., and M.M.M.; methodology, S.T.S., S.K., F.W., H.Z., and M.M.M.; formal analysis, software, data curation, and visualization, S.T.S., Y.Z., and M.M.M.; validation, S.T.S., S.K., and F.W.; investigation, S.T.S., A.M.K., J.K.S., and S.K.; writing—original draft preparation, S.T.S. and M.M.M.; writing—review and editing, S.T.S., A.M.K., J.K.S., S.K., Y.Z., W.P., F.W., H.Z., and M.M.M.; resources, supervision, project administration, and funding acquisition, F.W., H.Z. and M.M.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the 08LMU Mentoring Program for Young Scientists (Ludwig Maximilians University Munich) and by the VET Research Program 2018, 2019, and 2020 (Ludwig Maximilians University Munich).

**Institutional Review Board Statement:** The study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig Maximilians University Munich (code: AZ 246-22-12-2020).

**Data Availability Statement:** Data are contained within the article or supplementary material. Raw data are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** We thank our VET Research students Karina Schechner, Angela Pitz, and Lisa Oberberger for their valued support with the sample collection and analysis. Special thanks to Viktoria Balasopoulou, Elena Gerdes, and Anna Rieger for their much-appreciated technical support and Apl. Hans-Joachim Schubert for his valuable advice concerning the study design.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

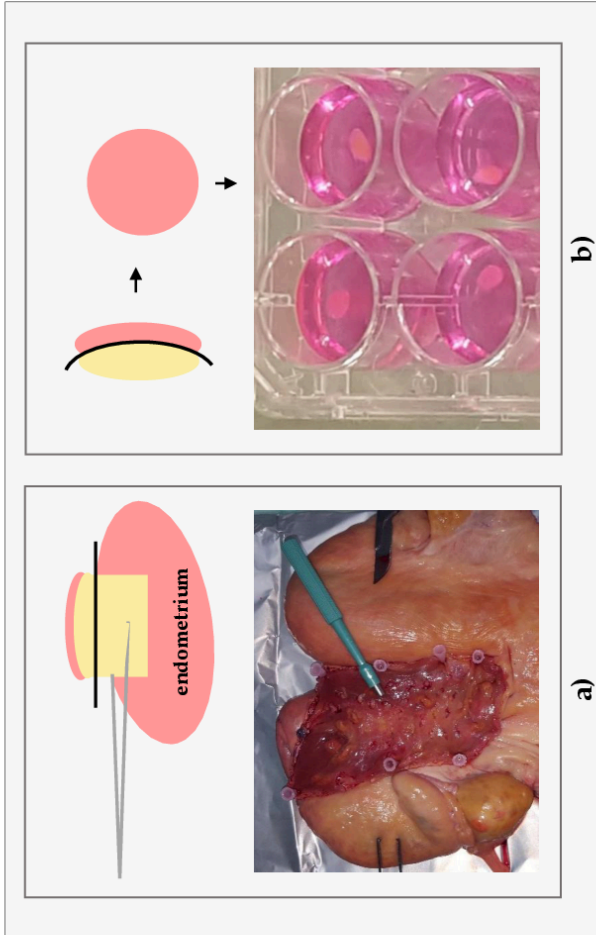
## References

- Bugueiro, A.; Fouz, R.; Camino, F.; Yus, E.; Diéguez, F.J. Robot milking and relationship with culling rate in dairy cows. *Animal* **2019**, *13*, 1304–1310. [\[CrossRef\]](#)
- Bascom, S.S.; Young, A.J. A Summary of the Reasons Why Farmers Cull Cows. *J. Dairy Sci.* **1998**, *81*, 2299–2305. [\[CrossRef\]](#)
- Hansen, P.J.; Soto, P.; Natzke, R.P. Mastitis and Fertility in Cattle—Possible Involvement of Inflammation or Immune Activation in Embryonic Mortality\*. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2004**, *51*, 294–301. [\[CrossRef\]](#)
- Hill, J.R.; Gilbert, R. Reduced quality of bovine embryos cultured in media conditioned by exposure to an inflamed endometrium. *Aust. Vet. J.* **2008**, *86*, 312–316. [\[CrossRef\]](#)
- Sheldon, I.; Noakes, D.; Rycroft, A.; Pfeiffer, D.; Dobson, H. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction* **2002**, *123*, 837–845. [\[CrossRef\]](#)
- Kasimanickam, R.; Duffield, T.; Foster, R.; Gartley, C.; Leslie, K.; Walton, J.; Johnson, W. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* **2004**, *62*, 9–23. [\[CrossRef\]](#)
- Sheldon, I.M.; Lewis, G.S.; Leblanc, S.; Gilbert, R.O. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* **2006**, *65*, 1516–1530. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Wathes, D.C.; Oguejiofor, C.F.; Thomas, C.; Cheng, Z.; Tomas, C. Importance of Viral Disease in Dairy Cow Fertility. *Engineering* **2020**, *6*, 26–33. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Gür, S.; Doğan, N. The possible role of bovine herpesvirus type-4 infection in cow infertility. *Anim. Sci. J.* **2010**, *81*, 304–308. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Cheng, Z.; Chauhan, L.; Barry, A.; Abudureyimu, A.; Oguejiofor, C.; Chen, X.; Wathes, D.C. Acute bovine viral diarrhoea virus infection inhibits expression of interferon tau-stimulated genes in bovine endometrium. *Biol. Reprod.* **2017**, *96*, 1142–1153. [\[CrossRef\]](#)
- Lechner, I.; Wüthrich, M.; Meylan, M.; Borne, B.H.P.V.D.; Schüpbach-Regula, G. Association of clinical signs after acute Schmallenberg virus infection with milk production and fertility in Swiss dairy cows. *Prev. Vet. Med.* **2017**, *146*, 121–129. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Santman-Berends, L.; Hage, J.; Van Rijn, P.A.; Stegeman, J.; Van Schaik, G. Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) infection reduces fertility of Dutch dairy cattle and is vertically transmitted to offspring. *Theriogenology* **2010**, *74*, 1377–1384. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sreenan, J.; Diskin, M.; Morris, D. Embryo survival rate in cattle: A major limitation to the achievement of high fertility. *BSAP Occas. Publ.* **2001**, *26*, 93–104. [\[CrossRef\]](#)
- Diskin, M.G.; Murphy, J.; Sreenan, J. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Anim. Reprod. Sci.* **2006**, *96*, 297–311. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sreenan, J.M.; Diskin, M.G. Early embryonic mortality in the cow: Its relationship with progesterone concentration. *Vet. Rec.* **1983**, *112*, 517–521. [\[CrossRef\]](#)

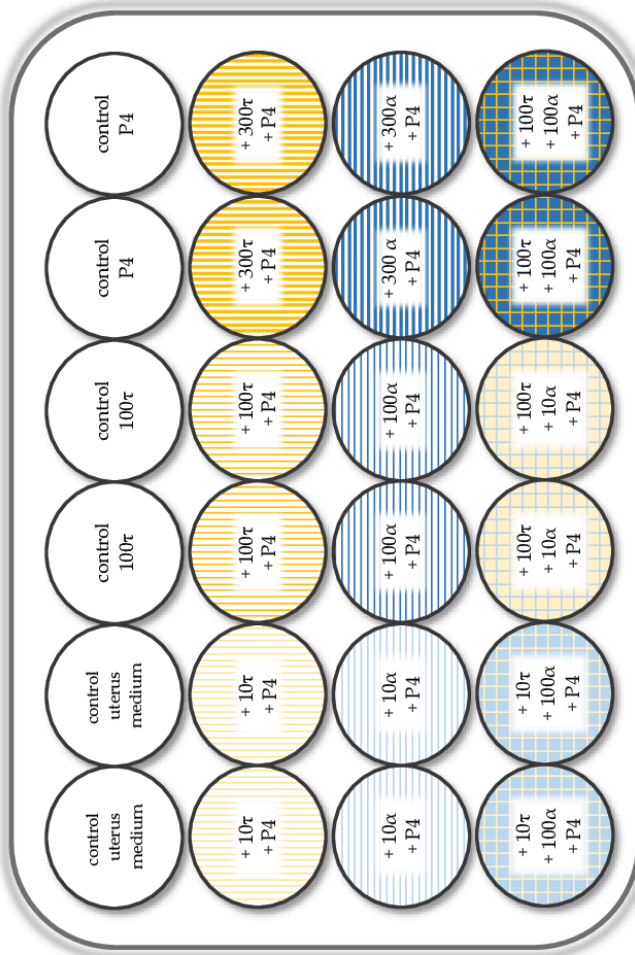
16. Talukder, A.K.; Marey, M.A.; Shirasuna, K.; Kusama, K.; Shimada, M.; Imakawa, K.; Miyamoto, A. Roadmap to pregnancy in the first 7 days post-insemination in the cow: Immune crosstalk in the corpus luteum, oviduct, and uterus. *Theriogenology* **2020**, *150*, 313–320. [\[CrossRef\]](#)
17. Fair, T. The Contribution of the Maternal Immune System to the Establishment of Pregnancy in Cattle. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 7. [\[CrossRef\]](#)
18. Platanius, L.C. Mechanisms of type-I and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5*, 375–386. [\[CrossRef\]](#)
19. Pestka, S.; Krause, C.D.; Walter, M.R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* **2004**, *202*, 8–32. [\[CrossRef\]](#)
20. Roberts, R.; Ealy, A.; Alexenko, A.; Han, C.-S.; Ezashi, T. Trophoblast Interferons. *Placenta* **1999**, *20*, 259–264. [\[CrossRef\]](#)
21. Jiang, K.; Chen, X.; Zhao, G.; Wu, H.; Mi, J.; Qiu, C.; Peng, X.; Deng, G. IFN- $\tau$  Plays an Anti-Inflammatory Role in Staphylococcus aureus-Induced Endometritis in Mice Through the Suppression of NF- $\kappa$ B Pathway and MMP9 Expression. *J. Interf. Cytokine Res.* **2017**, *37*, 81–89. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Østrup, E.; Hyttel, P.; Østrup, O. Embryo-maternal communication: Signalling before and during placentation in cattle and pig. *Reprod. Fertil. Dev.* **2011**, *23*, 964–975. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Wu, G.; Spencer, T.E.; Ott, T.L. Placental Interferons. *Am. J. Reprod. Immunol.* **1996**, *35*, 297–308. [\[CrossRef\]](#)
24. Spencer, T.E.; Forde, N.; Dorniak, P.; Hansen, T.R.; Romero, J.J.; Lonergan, P. Conceptus-derived prostaglandins regulate gene expression in the endometrium prior to pregnancy recognition in ruminants. *Reproduction* **2013**, *146*, 377–387. [\[CrossRef\]](#)
25. Oliveira, J.F.; Henkes, L.E.; Ashley, R.L.; Purcell, S.H.; Smirnova, N.P.; Veeramachaneni, D.N.R.; Anthony, R.V.; Hansen, T.R. Expression of Interferon (IFN)-Stimulated Genes in Extrauterine Tissues during Early Pregnancy in Sheep Is the Consequence of Endocrine IFN- $\tau$  Release from the Uterine Vein. *Endocrinology* **2008**, *149*, 1252–1259. [\[CrossRef\]](#)
26. Kunii, H.; Koyama, K.; Ito, T.; Suzuki, T.; Balbouda, A.Z.; Shirozu, T.; Bai, H.; Nagano, M.; Kawahara, M.; Takahashi, M. Hot topic: Pregnancy-induced expression of interferon-stimulated genes in the cervical and vaginal mucosal membranes. *J. Dairy Sci.* **2018**, *101*, 8396–8400. [\[CrossRef\]](#)
27. Spencer, T.E.; Johnson, G.A.; Bazer, F.W.; Burghardt, R.C.; Palmarini, M. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: Roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reprod. Fertil. Dev.* **2007**, *19*, 65–78. [\[CrossRef\]](#)
28. Martins, T.; Pugliesi, G.; Sponchiado, M.; Gonella-Díaz, A.M.; Ojeda-Rojas, O.A.; Rodríguez, F.D.; Ramos, R.D.S.; Basso, A.C.; Binelli, M. Perturbations in the uterine luminal fluid composition are detrimental to pregnancy establishment in cattle. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2018**, *9*, 70. [\[CrossRef\]](#)
29. Bauersachs, S.; Wolf, E. Uterine Responses to the Preattachment Embryo in Domestic Ungulates: Recognition of Pregnancy and Preparation for Implantation. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **2015**, *3*, 489–511. [\[CrossRef\]](#)
30. Rashid, M.B.; Talukder, A.K.; Kusama, K.; Haneda, S.; Takedomi, T.; Yoshino, H.; Moriyasu, S.; Matsui, M.; Shimada, M.; Imakawa, K.; et al. Evidence that interferon-tau secreted from Day-7 embryo in vitro generates anti-inflammatory immune response in the bovine uterus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *500*, 879–884. [\[CrossRef\]](#)
31. Talukder, A.K.; Yousef, M.S.; Rashid, M.B.; Awai, K.; Acosta, T.J.; Shimizu, T.; Okuda, K.; Shimada, M.; Imakawa, K.; Miyamoto, A. Bovine embryo induces an anti-inflammatory response in uterine epithelial cells and immune cells in vitro: Possible involvement of interferon tau as an intermediary. *J. Reprod. Dev.* **2017**, *63*, 425–434. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Ott, T.L. Immunological detection of pregnancy: Evidence for systemic immune modulation during early pregnancy in ruminants. *Theriogenology* **2020**, *150*, 498–503. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Kim, M.-S.; Min, K.-S.; Imakawa, K. Regulation of Interferon-stimulated Gene (ISG)12, ISG15, and MX1 and MX2 by Conceptus Interferons (IFNTs) in Bovine Uterine Epithelial Cells. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **2013**, *26*, 795–803. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Toji, N.; Shigeno, S.; Kizaki, K.; Koshi, K.; Matsuda, H.; Hashiyada, Y.; Imai, K.; Takahashi, T.; Ishiguro-Oonuma, T.; Hashizume, K. Evaluation of interferon-stimulated genes in peripheral blood granulocytes as sensitive responders to bovine early conceptus signals. *Vet. J.* **2017**, *229*, 37–44. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Bauersachs, S.; Ulbrich, S.; Gross, K.; Schmidt, S.E.M.; Meyer, H.H.D.; Wenigerkind, H.; Vermehren, M.; Sinowatz, F.; Blum, H.; Wolf, E. Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. *Reproduction* **2006**, *132*, 319–331. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Wu, G.; Burghardt, R.C.; Johnson, G.A.; Spencer, T.E.; Wu, G. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: Interactions among novel cell signaling pathways. *Reprod. Biol.* **2008**, *8*, 179–211. [\[CrossRef\]](#)
37. Bauersachs, S.; Ulbrich, S.E.; Reichenbach, H.-D.; Reichenbach, M.; Büttner, M.; Meyer, H.H.; Spencer, T.E.; Minten, M.; Sax, G.; Winter, G.; et al. Comparison of the Effects of Early Pregnancy with Human Interferon, Alpha 2 (IFNA2), on Gene Expression in Bovine Endometrium. *Biol. Reprod.* **2012**, *86*, 46. [\[CrossRef\]](#)
38. Mansouri-Attia, N.; Sandra, O.; Aubert, J.; Degrelle, S.; Everts, R.E.; Giraud-Delville, C.; Heyman, Y.; Galio, L.; Hue, I.; Yang, X.; et al. Endometrium as an early sensor of in vitro embryo manipulation technologies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 5687–5692. [\[CrossRef\]](#)
39. Borges, A.M.; Healey, G.D.; Sheldon, I.M. Explants of Intact Endometrium to Model Bovine Innate Immunity and Inflammation Ex Vivo. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2012**, *67*, 526–539. [\[CrossRef\]](#)
40. Helfrich, A.L.; Reichenbach, H.-D.; Meyerholz, M.M.; Schoon, H.-A.; Arnold, G.J.; Fröhlich, T.; Weber, F.; Zerbe, H. Novel sampling procedure to characterize bovine subclinical endometritis by uterine secretions and tissue. *Theriogenology* **2020**, *141*, 186–196. [\[CrossRef\]](#)



41. Melcher, Y.; Prunner, I.; Drillich, M. Degree of variation and reproducibility of different methods for the diagnosis of subclinical endometritis. *Theriogenology* **2014**, *82*, 57–63. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Madoz, L.; Giuliodori, M.J.; Jaureguierry, M.; Plöntzke, J.; Drillich, M.; De La Sota, R. The relationship between endometrial cytology during estrous cycle and cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* **2013**, *96*, 4333–4339. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Van Schyndel, S.J.; Pascottini, O.B.; Leblanc, S. Comparison of cow-side diagnostic techniques for subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology* **2018**, *120*, 117–122. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Cheong, S.H.; Nydam, D.; Galvão, K.; Crosier, B.; Ricci, A.; Caixeta, L.; Sper, R.; Fraga, M.; Gilbert, R. Use of reagent test strips for diagnosis of endometritis in dairy cows. *Theriogenology* **2012**, *77*, 858–864. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Schabmeyer, S.; Kneidl, A.; Schneider, J.; Weber, F.; Kirsch, S.; Petzl, W.; Zerbe, H.; Schuberth, H.-J.; Meyerholz, M.M. Reduced circumfluent oxygen concentration increases cell functionality of bovine endometrial tissue explants in vitro. *Reprod. Domest. Anim.* **2020**, *55*, 26. [\[CrossRef\]](#)
46. Haeger, J.-D.; Loch, C.; Pfarrer, C. The newly established bovine endometrial gland cell line (BEGC) forms gland acini in vitro and is only IFN $\tau$ -responsive (MAPK42/44 activation) after E 2 and P 4 -pre-incubation. *Placenta* **2018**, *67*, 61–69. [\[CrossRef\]](#)
47. Toji, N.; Koshi, K.; Furusawa, T.; Takahashi, T.; Ishiguro-Onuma, T.; Kizaki, K.; Hashizume, K. A cell-based interferon-tau assay with an interferon-stimulated gene 15 promoter. *Biomed. Res.* **2018**, *39*, 13–20. [\[CrossRef\]](#)
48. Mathew, D.J.; Sánchez, J.; Passaro, C.; Charpigny, G.; Behura, S.K.; Spencer, T.E.; Lonergan, P. Interferon tau-dependent and independent effects of the bovine conceptus on the endometrial transcriptome. *Biol. Reprod.* **2019**, *100*, 365–380. [\[CrossRef\]](#)
49. Schäfer, W.R.; Fischer, L.; Roth, K.; Jüllig, A.K.; Stuckenschneider, J.E.; Schwartz, P.; Weimer, M.; Orlowska-Volk, M.; Hanjalic-Beck, A.; Kranz, I.; et al. Critical evaluation of human endometrial explants as an ex vivo model system: A molecular approach. *Mol. Hum. Reprod.* **2010**, *17*, 255–265. [\[CrossRef\]](#)
50. A Bersinger, N.; Genewein, E.M.; Müller, O.; Altermatt, H.J.; McKinnon, B.; Mueller, M.D. Morphology of human endometrial explants and secretion of stromal marker proteins in short- and long-term cultures. *Gynecol. Surg.* **2009**, *7*, 75–80. [\[CrossRef\]](#)
51. Wallace, R.M.; Hart, M.L.; Egen, T.E.; Schmelzle, A.; Smith, M.F.; Pohler, K.G.; Green, J.A. Bovine pregnancy associated glycoproteins can alter selected transcripts in bovine endometrial explants. *Theriogenology* **2019**, *131*, 123–132. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Takino, T.; Okamura, T.; Ando, T.; Hagiwara, K. Change in the responsiveness of interferon-stimulated genes during early pregnancy in cows with Borna virus-1 infection. *BMC Vet. Res.* **2016**, *12*, 1–4. [\[CrossRef\]](#)
53. Forde, N.; Duffy, G.B.; Mcgettigan, P.A.; Browne, J.A.; Mehta, J.P.; Kelly, A.K.; Mansouri-Attia, N.; Sandra, O.; Loftus, B.J.; Crowe, M.A.; et al. Evidence for an early endometrial response to pregnancy in cattle: Both dependent upon and independent of interferon tau. *Physiol. Genom.* **2012**, *44*, 799–810. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Forde, N.; Carter, F.; Spencer, T.; Bazer, F.; Sandra, O.; Mansouri-Attia, N.; Okumu, L.; Mcgettigan, P.; Mehta, J.; McBride, R.; et al. Conceptus-Induced Changes in the Endometrial Transcriptome: How Soon Does the Cow Know She Is Pregnant? *Biol. Reprod.* **2011**, *85*, 144–156. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Hansen, T.R.; Sinedino, L.D.P.; E Spencer, T. Paracrine and endocrine actions of interferon tau (IFNT). *Reproduction* **2017**, *154*, F45–F59. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Talukder, A.K.; Rashid, M.B.; Yousef, M.S.; Kusama, K.; Shimizu, T.; Shimada, M.; Suarez, S.S.; Imakawa, K.; Miyamoto, A. Oviduct epithelium induces interferon-tau in bovine Day-4 embryos, which generates an anti-inflammatory response in immune cells. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 7850. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Chethan, S.G.; Singh, S.K.; Nongsiej, J.; Rakesh, H.B.; Singh, R.P.; Kumar, N.; Agarwal, S.K. IFN- $\tau$  Acts in a Dose-Dependent Manner on Prostaglandin Production by Buffalo Endometrial Stromal Cells Cultured in vitro. *Reprod. Domest. Anim.* **2014**, *49*, 403–408. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Spencer, T.E.; Forde, N.; Lonergan, P. The role of progesterone and conceptus-derived factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants. *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 5941–5950. [\[CrossRef\]](#)
59. Spencer, T.E.; Hansen, T.R. Implantation and Establishment of Pregnancy in Ruminants. In *Transformations in the Facial Region of the Human Embryo*; Springer Nature: Berlin, Germany, 2015; Volume 216, pp. 105–135.
60. Spencer, T.E.; Sandra, O.; Wolf, E. Genes involved in conceptus–endometrial interactions in ruminants: Insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction* **2008**, *135*, 165–179. [\[CrossRef\]](#)
61. Brooks, K.; Burns, G.; Spencer, T.E. Conceptus elongation in ruminants: Roles of progesterone, prostaglandin, interferon tau and cortisol. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2014**, *5*, 53. [\[CrossRef\]](#)
62. Dorniak, P.; Bazer, F.W.; Spencer, T.E. Physiology and Endocrinology Symposium: Biological role of interferon tau in endometrial function and conceptus elongation. *J. Anim. Sci.* **2013**, *91*, 1627–1638. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)



**Figure 51.** Graphical illustration of sampling procedure. Endometrial tissue displayed in pink, myometrial tissue displayed in yellow, dissections displayed as black lines, precision forceps displayed in gray. **(a)** Obtaining endometrial explants with a 5 mm biopsy punch, held in position with precision forceps and dissected from the myometrium (photo below, draft above). **(b)** Separating residual myometrial tissue from endometrial explants (draft above) and transfer to the 24-well culture plate (photo below).



**Figure S2.** Graphical illustration of pipetting layout for the 24-well culture plate. Each well contains 1 mL uterus medium and respective admixtures interferon  $\tau$  ( $\tau$ ), interferon  $\alpha$  ( $\alpha$ ) in differing concentrations and combinations [ng/mL], additionally 20 ng/mL progesterone (P4) were added to indicated wells.



Table S1a). IFNAR1<sup>1</sup>: *p* values of gene expression comparisons between treatment groups and "control P4"

Treatment Group [ng / ml] <sup>2</sup>	10 $\tau$	100 $\tau$	300 $\tau$	10 $\alpha$	100 $\alpha$	300 $\alpha$	10 $\tau$ + 100 $\alpha$	100 $\tau$ + 10 $\alpha$	100 $\tau$ + 100 $\alpha$	control P4
10 $\tau$		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
100 $\tau$	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.066
300 $\tau$	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
10 $\alpha$	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.047
100 $\alpha$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.072
300 $\alpha$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	0.081
10 $\tau$ + 100 $\alpha$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	0.017
100 $\tau$ + 10 $\alpha$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	0.005
100 $\tau$ + 100 $\alpha$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		0.034
control P4	n.s.	0.066	n.s.	0.047	0.072	0.081	0.017	0.005	0.034	

<sup>1</sup>Type 1 interferon receptor subunit 1 (IFNAR1); <sup>2</sup>Log transformed gene expression of target genes was measured in bovine endometrial explants via real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) for every treatment group. Explants were treated with 20 ng/mL progesterone ("control P4") or with 20 ng/mL P4 and interferon  $\tau$  ( $\tau$ ) and/or interferon  $\alpha$  ( $\alpha$ ) at different concentrations (10, 100 and 300 ng/mL  $\tau$  or  $\alpha$ ), and combinations (10 $\tau$  + 100 $\alpha$ , 100 $\tau$  + 10 $\alpha$  and 100 $\tau$  + 100 $\alpha$ ). Comparisons of treatment groups were calculated with a linear mixed effect models. Significance codes: *p* values > 0.1 were regarded as not significant (n.s.), *p* values < 0.1 as statistical tendencies and *p* < 0.05 as statistically significant.

Table S1b). IFNAR2<sup>2</sup>: *p* values of gene expression comparisons between treatment groups and "control P4"

Treatment Group [ng / ml] <sup>2</sup>	10 $\tau$	100 $\tau$	300 $\tau$	10 $\alpha$	100 $\alpha$	300 $\alpha$	10 $\tau$ + 100 $\alpha$	100 $\tau$ + 10 $\alpha$	100 $\tau$ + 100 $\alpha$	control P4
10 $\tau$		n.s.	n.s.	0.040	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
100 $\tau$	n.s.		n.s.	0.029	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
300 $\tau$	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.083
10 $\alpha$	0.040	0.029	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.028	0.001
100 $\alpha$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.030
300 $\alpha$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	0.057
10 $\tau$ + 100 $\alpha$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	0.077
100 $\tau$ + 10 $\alpha$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	0.040
100 $\tau$ + 100 $\alpha$	n.s.	n.s.	n.s.	0.028	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
control P4	n.s.	n.s.	0.083	0.001	0.030	0.057	0.077	0.040	n.s.	

<sup>2</sup>Type 1 interferon receptor subunit 2 (IFNAR2)

Table S1d). STAT1<sup>4</sup>; *p* values of gene expression comparisons between treatment groups and “control P4”

Treatment Group [ng./ml] <sup>2</sup>	10 $\tau$	100 $\tau$	300 $\tau$	10 $\alpha$	100 $\alpha$	300 $\alpha$	10 $\tau$ + 100 $\alpha$	100 $\tau$ + 10 $\alpha$	100 $\tau$ + 100 $\alpha$	control P4
10 $\tau$		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.016	n.s.	n.s.	n.s.	0.048
100 $\tau$	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	0.042	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
300 $\tau$	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	0.003	0.046	n.s.	0.062	0.009
10 $\alpha$	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	0.021	n.s.	n.s.	n.s.	0.060
100 $\alpha$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		0.077	n.s.	0.089	n.s.	n.s.
300 $\alpha$	0.016	0.042	0.003	0.021	0.077		n.s.	< 0.001	n.s.	n.s.
10 $\tau$ + 100 $\alpha$	n.s.	n.s.	0.046	n.s.	n.s.	n.s.		0.016	n.s.	n.s.
100 $\tau$ + 10 $\alpha$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.089	< 0.001	0.016		0.022	0.003
100 $\tau$ + 100 $\alpha$	n.s.	n.s.	0.062	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.022		n.s.
control P4	0.048	n.s.	0.009	0.060	n.s.	n.s.	n.s.	0.003	n.s.	

<sup>4</sup>Signal transducer and activator of transcription (STAT1)Table S1d). PI3K<sup>5</sup>; *p* values of gene expression comparisons between treatment groups and “control P4”

Treatment Group [ng./ml] <sup>2</sup>	10 $\tau$	100 $\tau$	300 $\tau$	10 $\alpha$	100 $\alpha$	300 $\alpha$	10 $\tau$ + 100 $\alpha$	100 $\tau$ + 10 $\alpha$	100 $\tau$ + 100 $\alpha$	control P4
10 $\tau$		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
100 $\tau$	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
300 $\tau$	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
10 $\alpha$	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.096	n.s.
100 $\alpha$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
300 $\alpha$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	0.063	0.069
10 $\tau$ + 100 $\alpha$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.
100 $\tau$ + 10 $\alpha$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.
100 $\tau$ + 100 $\alpha$	n.s.	n.s.	n.s.	0.096	n.s.	0.063	n.s.	n.s.		n.s.
control P4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.069	n.s.	n.s.	n.s.	

<sup>5</sup>Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)

Table S1e), MX1<sup>e</sup>; *p* values of gene expression comparisons between treatment groups and "control P4"

Treatment Group	10 $\tau$	100 $\tau$	300 $\tau$	10 $\alpha$	100 $\alpha$	300 $\alpha$	10 $\tau$ + 100 $\alpha$	100 $\tau$ + 10 $\alpha$	100 $\tau$ + 100 $\alpha$	control P4
10 $\tau$		<0.001	<0.0001	n.s.	n.s.	0.003	n.s.	<0.0001	0.059	0.024
100 $\tau$	<0.001		0.026	0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	n.s.	0.059	<0.0001
300 $\tau$	<0.0001	0.026		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	n.s.	<0.0001	<0.0001
10 $\alpha$	n.s.	0.0001	<0.0001		n.s.	0.005	n.s.	<0.0001	0.043	0.034
100 $\alpha$	n.s.	<0.0001	<0.0001	n.s.		0.052	n.s.	<0.0001	0.004	n.s.
300 $\alpha$	0.003	<0.0001	<0.0001	0.005	0.052		0.091	<0.0001	<0.0001	n.s.
10 $\tau$ + 100 $\alpha$	n.s.	<0.0001	<0.0001	n.s.	n.s.	0.091		<0.0001	0.002	n.s.
100 $\tau$ + 10 $\alpha$	<0.0001	n.s.	n.s.	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001		0.006	<0.0001
100 $\tau$ + 100 $\alpha$	0.059	0.059	<0.0001	0.043	0.004	<0.0001	0.002	0.006		<0.0001
control P4	0.024	<0.0001	<0.0001	0.034	n.s.	n.s.	n.s.	<0.0001	<0.0001	

<sup>e</sup> Interferon-induced GTP-binding protein (MX1)Table S1f), FABP3<sup>7</sup>; *p* values of gene expression comparisons between treatment groups and "control P4"

Treatment Group	10 $\tau$	100 $\tau$	300 $\tau$	10 $\alpha$	100 $\alpha$	300 $\alpha$	10 $\tau$ + 100 $\alpha$	100 $\tau$ + 10 $\alpha$	100 $\tau$ + 100 $\alpha$	control P4
10 $\tau$		0.029	<0.001	n.s.	0.065	<0.001	n.s.	n.s.	0.008	n.s.
100 $\tau$	0.029		n.s.	0.041	n.s.	n.s.	0.088	n.s.	n.s.	0.086
300 $\tau$	<0.001	n.s.		0.002	n.s.	n.s.	0.004	0.01	n.s.	0.004
10 $\alpha$	n.s.	0.041	0.002		0.089	<0.001	n.s.	n.s.	0.012	n.s.
100 $\alpha$	0.065	n.s.	n.s.	0.089		0.061	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
300 $\alpha$	<0.001	n.s.	n.s.	<0.001	0.061		0.001	0.003	n.s.	0.001
10 $\tau$ + 100 $\alpha$	n.s.	0.088	0.004	n.s.	n.s.	0.001		n.s.	0.030	n.s.
100 $\tau$ + 10 $\alpha$	n.s.	n.s.	0.01	n.s.	n.s.	0.003	n.s.		0.058	n.s.
100 $\tau$ + 100 $\alpha$	0.008	n.s.	n.s.	0.012	n.s.	n.s.	0.03	0.058		0.029
control P4	n.s.	0.086	0.004	n.s.	n.s.	0.001	n.s.	n.s.	0.029	

<sup>7</sup> Fatty acid-binding protein 3 (FABP3)

## IV. DISKUSSION

Subfertilität beim Milchrind ist von großer wirtschaftlicher sowie ethischer Relevanz. Die Zusammenhänge zwischen inadäquater embryo-maternalen Kommunikation und subklinischen Entzündungszuständen des Endometriums sind trotz intensiver Forschungsaktivität auf diesem Gebiet weiterhin nicht endgültig geklärt. Aufgrund der Komplexität dieses Wissenschaftsgebietes bietet der Einsatz von *in vitro*-Modellen große Vorteile. Mithilfe dieser Modelle wird die *in vivo*-Situation simuliert, um sich systematisch den offenen Fragen anzunähern. In dieser Studie wurde ein hoch definiertes endometriales Explantmodell verwendet, um drei übergeordnete Aspekte zu bearbeiten. Zunächst sollte mit dem Modell die Induzierbarkeit der Typ-1 Interferon Rezeptoruntereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 getestet werden. Im zweiten Schritt sollte eine kompetitive Situation zwischen dem embryonalen Signal IFN  $\tau$  und IFN  $\alpha$ , als weiteren Vertreter der Typ-1 Interferone, in Anwesenheit von P4 nachgestellt werden. Im dritten Schritt wurden durch die Messung ausgewählter Zielgene exemplarisch klassische und nicht-klassische Typ-1 Interferon-Signalwege abgebildet. Im Folgenden werden die Ergebnisse der drei übergeordneten Teile des Projektes im Kontext der aktuellen Literatur diskutiert.

Die verwendeten bovinen endometrialen Gewebeproben wurden am Schlachthof gewonnen. Die bakteriologische und zytologische Untersuchung der Spenderorgane ergab, dass alle verwendeten endometrialen Explants von uterusgesunden Spendertieren stammten. Die endometrialen Explants wurden *in vitro* mit IFN  $\tau$  und IFN  $\alpha$  in unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen versetzt. Durch Supplementierung von P4 wurde der Zyklusstand Diöstrus simuliert. Die Typ-1 Interferone IFN  $\tau$  und IFN  $\alpha$  wurden ausgewählt, um eine kompetitive

Situation zwischen dem embryonalen Signal zur maternalen Trächtigkeitserkennung und einem infektionsassoziierten Signal zu simulieren. Dieser Untersuchung lag unter anderem folgende Hypothese zugrunde: eine höhere Affinität anderer Typ-1 Interferone als IFN  $\tau$  für die Typ-1 Interferon Rezeptoruntereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 führt zu unzureichender Bindung von IFN  $\tau$  an IFNAR1 und IFNAR2. Eine adäquate Weiterleitung des embryonalen Signals IFN  $\tau$  könnte somit behindert oder unterbunden und die maternale Trächtigkeitserkennung verhindert werden, sobald ein anderes Typ-1 Interferon im uterinen Milieu vorhanden ist. Neue Erkenntnisse über diese potenzielle Konkurrenzsituation könnten zu einem besseren Verständnis der Subfertilität beim Rind beitragen. Das endometriale Explantmodell wurde für diese Untersuchung herangezogen, da es die Möglichkeit bietet, endometriales Gewebe mit physiologischen Zell-Zell-Kontakten unter kontrollierten Bedingungen *in vitro* gezielt zu simulieren. Die angewendeten Konzentrationen von P4, IFN  $\tau$  und IFN  $\alpha$  wurden gemäß den in der Literatur verwendeten Konzentrationen ausgewählt (CHETHAN et al., 2014; CHENG et al., 2017; HAEGER et al., 2018; ZHAO et al., 2018). Nach *in vitro*-Stimulation mit IFN  $\tau$  und IFN  $\alpha$  in unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen wurden IFNAR1, IFNAR2, STAT1, PI3K, MX1 und FABP3 als Zielgene ausgewählt, um beispielhaft klassische und nicht-klassische Typ-1 Interferon-Signalwege abzubilden.

## **1. Validierung des verwendeten endometrialen Explantmodells**

In der Literatur liegen einige Studien vor, die sich mit der Etablierung und Verwendung von endometrialen Explantmodellen befassen. Die Modelle unterscheiden sich bezüglich der Entnahmetechnik, Spezies und der inhaltlichen Ausrichtung der bearbeiteten Fragestellungen.

BORGES et al. (2012) etablierten ein Modell mit endometrialem Gewebe von

geschlachteten Kühen, um Immunitäts- und Entzündungsmechanismen näher zu untersuchen. Dabei wurde die Akkumulierung unterschiedlicher Interleukine als Reaktion des endometrialen Gewebes auf die Belastung mit hitzegetöteten Bakterien gemessen. Es wurde festgestellt, dass die Antwort auf entzündliche Reize stark abhängig vom jeweiligen Zyklusstand des Tieres war. Darüber hinaus konnte die Arbeitsgruppe einen Einfluss der Explant-Präparation auf die Gewebeantwort feststellen. Die mithilfe einer 8 mm Hautbiopsiestanze gewonnenen Explants wurden zum Teil in einem weiteren Schritt mechanisch zerkleinert. Anschließend wurde die Interleukin-Akkumulierung innerhalb nicht-zerkleinerter und zerkleinerter Explants verglichen und es fiel eine erhöhte Interleukin-Akkumulierung innerhalb der Gruppe zerkleinerter Explants auf. Die Arbeitsgruppe führte diesen Effekt auf eine durch die Zerkleinerung ausgelöste sterile Entzündung zurück, die die Aussagekraft des Modells bzgl. der entzündlichen Gewebereaktion beeinträchtigt.

In der vorliegenden Studie wurde die Explant-Entnahmemethode mittels 5 mm Hautbiopsiestanze nach BORGES et al. (2012) angewendet. Im Rahmen von Vorversuchen waren verschiedene Entnahmetechniken evaluiert worden. Dabei wurde der Zeitaufwand bei der Entnahme, die durch Manipulation verursachte Gewebeirritation, die Reproduzierbarkeit gleichgroßer Explants und die Handhabbarkeit der Instrumente während der Probenentnahme bewertet. Verglichen wurde die Entnahme mittels Hautbiopsiestanze in den Durchmesserausführungen 3, 5 und 8 mm (BORGES et al., 2012) und die Gewinnung von Explants mittels federgespannten Biopsie Entnahmegerätes (LIND, 2011; MACÍAS LUACES, 2019). Zusätzlich wurde der erste Arbeitsschritt der Explantgewinnung nach BARTELS (2014), das Abpräparieren endometrialen Gewebes mittels Skalpell und Pinzette, evaluiert. Basierend auf den oben genannten Parametern, wurde die 5 mm

Hautbiopsiestanze ohne nachfolgendes Zerteilen des endometrialen Explantgewebes als am besten geeignetes Verfahren ausgewählt.

MATHEW et al. (2019) verwendeten ebenfalls die Explant-Entnahmemethode mittels Hautbiopsiestanze, um IFN  $\tau$ -abhängige und -unabhängige Effekte auf die Genexpression innerhalb des bovinen Endometriums zu untersuchen. Dafür wurden endometriale Explants für 6 Stunden entweder mit Embryonen, die am Tag 15 nach Fertilisation gewonnen worden waren oder mit 100 ng/ml ovinem IFN  $\tau$  inkubiert. Im Rahmen dieser Studie konnten Hinweise auf weitere embryonale Faktoren detektiert werden, die in Zusammenhang mit einer erfolgreichen Trächtigkeitsetablierung stehen. Diese können dabei abhängig sowie unabhängig von IFN  $\tau$  agieren. Im Gegensatz zu den von BAUERSACHS et al. (2012) *in vivo* identifizierten Genen, die bei Tag 15-18 p.c. tragenden Rindern, aber nicht nach IFN  $\alpha$ -Stimulation hochreguliert waren, konnten innerhalb der von MATHEW et al. (2019) durchgeführten Studie keine erhöhten Genexpressionen nach Inkubation mit Embryonen oder ovinem IFN  $\tau$  festgestellt werden. Dies kann auf die Verwendung eines *ex vivo*-Modells, der Inkubation mit ovinem statt bovinem IFN  $\tau$  und/oder einer begrenzten Inkubationszeit von 6 Stunden zurückzuführen sein. Auch eine fehlende Supplementierung des Inkubationsmediums mit P4 könnte diese abweichenden Ergebnisse bedingen.

Ein humanes endometriales Explantmodell wurde von SCHÄFER et al. (2010) angewendet, um funktionelle Auswirkungen von Chemikalien und Arzneimitteln auf Genexpressionsebene *ex vivo*, aber mit erhaltener gewebespezifischer Konnektivität zwischen Endometriumszellen, zu untersuchen. Das mittels Aspirationskürettage gewonnene Gewebe wies jedoch starke individuelle Schwankungen und Unterschiede in der Gewebequalität auf und begrenzte so die Aussagekraft des Modells. BERSINGER et al. (2010) untersuchten die

morphologische Integrität von humanen endometrialen Explants. Dabei stellten die Autoren fest, dass die Zellbeschaffenheit bereits nach 12 Stunden in Kultur autolytischen Veränderungen unterlag. Sie konnten jedoch zeigen, dass dieser Prozess in Anwesenheit von P4 verlangsamt wurde.

Insgesamt betrachtet besteht der Vorteil von Explantmodellen verglichen mit zweidimensionalen (2D) Zellkulturmodellen in der Aufrechterhaltung der Integrität einer dreidimensionalen (3D) Struktur. Durch die strukturelle Erweiterung von Zellkulturmodellen, ist die Abbildung eines Zelltypus in 3D Struktur jedoch ebenfalls möglich und gewinnt innerhalb der *ex vivo*-Modelle immer mehr an Bedeutung (YAMAUCHI et al., 2003; HILLREINER et al., 2017). Zu den Vorteilen der 3D Zellkultur gegenüber Explantmodellen zählen die Reproduzierbarkeit und flexiblere Nutzbarkeit durch sterile Anzucht nach festgelegtem Protokoll, ohne die Notwendigkeit einer Vielzahl an Explants von lebenden oder geschlachteten Rindern. Auch kann die Degeneration der Zellen innerhalb der Zellkultur besser überwacht werden als bei Explants. Dennoch zeigen sich beim Vergleich mit Explantmodellen in der 3D Zellkultur ähnliche Schwächen, wie innerhalb der 2D Zellkultur. So können durch den aus dem lebenden oder frisch geschlachteten Organismus entnommenen Gewebeverband innerhalb der Explants gewebespezifische Reaktionen realitätsnaher und umfassender widerspiegelt werden, wie bereits von mehreren Arbeitsgruppen zusammenfassend erläutert wurde (RESAU et al., 1991; SCHINDLER et al., 2005). Auch stellt die Gewinnung von Explants aus dem originären Organismus eine umfassendere Abbildung tierindividueller Unterschiede dar, die infolge der Anzucht nur einer Zelllinie verloren geht. Bezüglich der Überprüfung von Gewebedegeneration innerhalb der Explants wären histologische Untersuchungen vor und nach durchgeführter Inkubation informativ. Innerhalb der vorliegenden Studie lagen solche



Untersuchungen außerhalb des realisierbaren Rahmens.

Die maternale Erkennung des embryonalen Signals IFN  $\tau$  ist entscheidend für die Implantation des Embryos und den Trächtigkeitsausgang beim Rind. *In vitro*-Modelle, die für die Untersuchung der embryo-maternalen Kontaktzone verwendet werden, sollten diese Signalübertragung möglichst umfassend abbilden. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass am Tag 18 p.c. entnommene Explants von nicht-tragenden Färsen eine signifikant höhere Genexpression von ISG 15 zeigten, wenn sie 24 Stunden mit trächtigkeitsassoziierten Glykoproteinen (englisch: Pregnancy Associated Glycoproteins, PAG) inkubiert wurden, im Vergleich zu Explants von nicht-tragenden Färsen ohne PAG Inkubation (WALLACE et al., 2019). Dieses Ergebnis spiegelt eine gewebespezifische Reaktion auf ein mit der frühen Trächtigkeit verbundenes Signal wider. Nach aktuellem Kenntnisstand wurde bisher kein bovines endometriales Explantmodell verwendet, um a) die Induzierbarkeit von IFNAR1 und IFNAR2 zu testen, b) klassische sowie nicht-klassische Typ-1 Interferon-Signalwege, c) eine Konkurrenzsituation zwischen IFN  $\tau$  und IFN  $\alpha$  durch Exposition mit verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen von IFN  $\tau$  und IFN  $\alpha$  nachzuahmen.

In der vorliegenden Studie konnten mithilfe des hoch definierten Probenmaterials signifikante und biologisch sinnvolle Reaktionsunterschiede bzgl. der Interferon-Signaltransduktion modelliert und nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bekräftigen die Validität des Modells zur Simulation der embryo-maternalen Kontaktzone.

## **2. Konkurrenzsituation von IFN $\tau$ und IFN $\alpha$ entlang des Signalweges**

Die in der vorliegenden Studie erzielten Genexpressions-Ergebnisse ausgewählter Zielgene lassen vermuten, dass eine kompetitive Situation zwischen den beiden Signalen IFN  $\tau$  und IFN  $\alpha$  in Gegenwart von P4 bezüglich der Signalweiterleitung besteht. Es wurde zunächst angenommen, dass die Konkurrenzsituation zwischen IFN  $\tau$  und IFN  $\alpha$  bereits auf Rezeptorebene beobachtet werden kann. Diesbezüglich konnte zwar die Induzierbarkeit beider Untereinheiten des Rezeptors nach Stimulation mit IFN  $\tau$  und IFN  $\alpha$  in verschiedenen Konzentrationen gezeigt werden. Die Genexpression von IFNAR1 und IFNAR2 unterschied sich jedoch nicht signifikant innerhalb der Inkubationsansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen von IFN  $\tau$ , IFN  $\alpha$  und den Kombinationen IFN  $\tau + \alpha$ . Weder IFNAR1 noch IFNAR2 zeigten eine konzentrationsabhängige Regulation der Genexpression nach Stimulation mit IFN  $\tau$  oder IFN  $\alpha$ . Auch die verschiedenen Kombinationen von IFN  $\tau + \alpha$  induzierten auf Rezeptorebene keine unterschiedliche Genexpression. Stattdessen konnte ein kompetitives Verhalten der beiden Interferone ab der Ebene der regulatorischen Faktoren und insbesondere entlang des klassischen (exemplarisch STAT1 und MX1) und entlang des nicht-klassischen Typ-1 Interferon-Signalweges (exemplarisch PI3K und FABP3) festgestellt werden.

Beim Vergleich der Genexpression von MX1 und STAT1 innerhalb der Inkubationsansätze IFN  $\tau + \alpha$ , konnte gezeigt werden, dass höhere IFN  $\alpha$ -Konzentrationen zu einer verminderten MX1 und STAT1 Genexpression führten, wobei dieser Effekt bei der Expression des Zielgens MX1 deutlicher ersichtlich war. Es scheint, dass mit steigenden IFN  $\alpha$ -Konzentrationen eine vollständig erfolgreiche IFN  $\tau$ -Stimulation verhindert wird. Die Annahme, dass eine

Konkurrenzsituation zwischen IFN  $\tau$  und IFN  $\alpha$  mit dem verwendeten Explantmodell ab der Ebene der regulatorischen Faktoren simuliert werden kann, wird damit unterstützt. *In vivo* könnte eine solche Parallelmodulation des Typ-1 Interferon-Signalweges durch unterschiedliche Interferone nach Infektion, z.B. einer Virusinfektion, ausgelöst werden. TAKINO et al. (2016) beschreiben in ihrer Studie eine höhere Genexpression von ISG15 und von Interferon-induziertem Guanosintriphosphat-bindenden Protein 2 (MX2) in PBMCs frühträchtiger Rinder, die serologisch positiv auf das Borna Virus getestet wurden, als bei serologisch negativ getesteten Rindern. Sie führen diese Ergebnisse darauf zurück, dass bei einer bestehenden Borna Virus Infektion mehr IFN  $\tau$  benötigt wird und in Folge eine höhere Genexpression stimuliert wird, um die Trächtigkeit erfolgreich zu vermitteln. Jedoch wird der Umstand vernachlässigt, dass bei einer Borna Virus Infektion eine Typ-1 Interferon-Antwort bestehend aus IFN  $\alpha$  und IFN  $\beta$  induziert wird (STAEHELI et al., 2001). Diese Typ-1 Interferone können ebenfalls lokal oder systemisch die Genexpression klassischer ISGs, wie z.B. ISG15 und MX2, stimulieren. Die Abgrenzung einer tatsächlich von IFN  $\tau$ -gesteuerten ISG-Expression von der einer induzierten Expression anderer Typ-1 Interferone ist kaum möglich. Die Expression von ISGs in PBMCs wirft die generelle Frage auf, ob das embryonale IFN  $\tau$ -Signal endokrine oder systemische Wirksamkeit besitzt. GIFFORD et al. (2007) untersuchten die Genexpression von ISG15, MX1 und MX2 in PBMCs gewonnen aus dem Blut der Vena caudalis mediana von Rindern an Tag 0, 16, 18 und 20 p.c. Sie stellten eine Erhöhung der Genexpression von ISG15 und MX1 an Tag 16 und 18 und eine vermehrte Expression von MX2 an Tag 16, 18 und 20 p.c. bei tragenden gegenüber besamten jedoch nicht tragenden Rindern fest. Es wurde ebenfalls die Genexpression der Interferon-regulatorischen Faktoren-1 und -2 (IRF-1/-2) bestimmt, die allerdings keine Unterschiede zwischen tragenden und nicht tragenden Rindern aufwies. IRF-1 und IRF-2 sind bedeutende Faktoren

innerhalb der IFN  $\tau$ -Signaltransduktion und regulieren die Expression von ISGs (STARK et al., 1998). GIFFORD et al. (2007) folgerten aus ihren Ergebnissen, dass ein anderes Signal als IFN  $\tau$  die systemische ISG-Expression induzieren könnte. Im Gegensatz dazu werden in anderen Studien Hinweise auf einen möglichen Transfer des embryonalen Signals IFN  $\tau$  über die Gebärmuttervene und die Induktion einer ISG-Expression innerhalb des Gelbkörpers, der Leber oder wie den bereits genannten PBMCs diskutiert (OLIVEIRA et al., 2008; MEYERHOLZ et al., 2016; RUHMANN et al., 2017). Wie HANSEN et al. (2017) zusammengefasst haben, könnte der direkte Nachweis von IFN  $\tau$  auf systemischer Ebene einen zentralen Bestandteil der frühen Trächtigkeitsdiagnostik darstellen, jedoch muss dieser durch weitere Forschungsarbeit noch eindeutig erbracht werden.

Darüber hinaus sollte berücksichtigt werden, dass sich Milchkühe während der Etablierung der Trächtigkeit im Regelfall in der Phase der Hochlaktation befinden. Zusätzlich zu den immun-endokrinen Veränderungen des Organismus, wirken sich hohe Stoffwechselanforderungen indirekt auf die intrauterine Anpassungsfähigkeit aus, wie von ESPOSITO et al. (2014) zusammenfassend dargestellt wurde. Dadurch kann ebenfalls die Expression der Rezeptoruntereinheiten und die komplexe intrazelluläre Signalübertragung von IFN  $\tau$  im Endometrium gestört und damit die embryo-maternale Kommunikation negativ beeinträchtigt werden. Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnten allerdings keinerlei Informationen zum aktuellen Laktationsstand oder der Stoffwechselanforderung gesammelt werden, da die Probengewinnung am Schlachthof ohne Kontakt zum Patientenbesitzer oder lebenden Tier stattfand.

### **3. Typ-1 Interferon induzierte konzentrationsabhängige Regulation von MX1 und FABP3**

Innerhalb der Gruppe von Inkubationsansätzen mit drei verschiedenen Kombinationen von IFN  $\tau$  +  $\alpha$  wiesen die Zielgene der nicht-klassischen Signaltransduktion (FABP3 und PI3K) Parallelen in ihrer Genexpression auf, ähnlich wie die klassischen Kandidaten (MX1 und STAT1). Trotz weniger stark ausgeprägter Unterschiede in der Genexpression von FABP3 und PI3K nach Stimulation mit verschiedenen Kombinationen von IFN  $\tau$  und IFN  $\alpha$ , konnte gezeigt werden, dass die Inkubationsansätze mit den höchsten Typ-1 Interferon-Konzentrationen die niedrigsten Expressionen dieser Zielgene aufwiesen. Sowohl auf klassischer, als auch auf nicht-klassischer Seite des Signalweges sind die Unterschiede auf Ebene der ISGs stärker ausgeprägt, als auf Ebene der Regulationsfaktoren. Eine Erklärung für die reduzierte Genexpression von MX1, STAT1 und FABP3 nach Stimulation mit hohen IFN  $\alpha$ -Konzentrationen, könnte auf einer negativen Rückkopplung innerhalb der Signaltransduktionskaskade als Folge einer starken Typ-1 Interferon-Stimulation beruhen. Wie in mehreren Übersichtsartikeln bereits zusammengefasst wurde, führt dieser Rückkopplungs-Mechanismus zu einer Feinabstimmung des Typ-1 Interferon-Signalweges und stellt einen natürlichen Schutzmechanismus vor einer überschießenden Gewebereaktion dar (IVASHKIV und DONLIN, 2014; SCHREIBER und PIEHLER, 2015; ARIMOTO et al., 2018). Ein Artefakt, hervorgerufen durch eine unphysiologisch absolut zu hohe IFN  $\alpha$ -Konzentration innerhalb des Versuchsaufbau ist als Erklärung ebenfalls denkbar. Bezieht man die Rezeptorebene in diese Beobachtung ein, fällt eine höhere Genexpression von IFNAR1 und IFNAR2 nach Stimulation mit IFN  $\alpha$  auf, im Vergleich zur Kontrolle Uterusmedium + P4. Auf Rezeptorebene wurde die höchste Expression von IFNAR2 nach Exposition mit der geringsten

Menge IFN  $\alpha$  (10 ng/ml) beobachtet. Es ist denkbar, dass die Induktion von IFNAR1 und IFNAR2 durch andere Konzentrationen an IFN  $\alpha$  als IFN  $\tau$  angeregt wird. Auch ein regulatorisches negatives Feedback oder ein Sättigungsmechanismus, der die Reaktion auf Typ-1 Interferon-Signale auf Rezeptorebene optimiert, sind denkbar. Allerdings ist die Aussagekraft der vorliegenden Daten in Bezug auf regulatorische Mechanismen begrenzt, da lediglich eine Auswahl von Zielgenen betrachtet wurde. Da in der vorliegenden Studie, die stärksten Unterschiede auf Ebene der ISGs zu finden waren, soll im Folgenden der Fokus auf die Interpretation dieser Ergebnisse gelegt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine konzentrationsabhängige Steigerung der Genexpression des klassischen ISGs MX1 nach Stimulation mit IFN  $\tau$  nachgewiesen werden. Die damit abgebildete Induktion des Zielgens MX1 durch IFN  $\tau$  entspricht den Ergebnissen anderer Studien (FORDE et al., 2011; BAUERSACHS et al., 2012; FORDE et al., 2012; KIM et al., 2013). Allerdings konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die MX1 Genexpression durch Stimulation mit IFN  $\alpha$  konzentrationsabhängig reduziert wurde. In einer von KIM et al. (2013) publizierten Studie konnte nach Stimulation für 24 Stunden mit IFN  $\alpha$  keine konzentrationsabhängige Reduktion der Genexpression von MX1 in endometrialen Zellen festgestellt werden. Diese Ergebnisse stehen somit im Kontrast zu den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten. Es bestehen jedoch Unterschiede im Rahmen des Modells, da in der zitierten Studie ein bovines endometriales Zellkulturmodell statt eines Explantmodells verwendet wurde. Außerdem wurden die IFN  $\alpha$ -Konzentrationen (1.000/5.000/10.000 ng/ml) um ein Vielfaches höher gewählt, als in der vorliegenden Arbeit (10/100/300 ng/ml). Die beobachtete verminderte Genexpression des klassischen ISGs MX1 nach Stimulation mit steigenden IFN  $\alpha$ -Konzentrationen wurde jedoch auch in anderen Studien bisher nicht

beschrieben.

Dagegen wurde FABP3 nach Stimulation mit beiden Typ-1 Interferonen entlang steigender Konzentrationen weniger exprimiert. Für die vorliegende Studie wurde FABP3 als vielversprechender Vertreter der nicht-klassischen ISGs ausgewählt. In der Literatur wird FABP3 als P4-abhängig beschrieben (FORDE et al., 2009). Außerdem ist FABP3 funktionell an der Modulation von Zellwachstum und -proliferation beteiligt (MANSOURI-ATTIA et al., 2009; SPENCER et al., 2016). Des Weiteren konnten BAUERSACHS et al. (2012) zeigen, dass FABP3 in endometrialem Gewebe von trächtigen Rindern an Tag 15 und 18 p.c. signifikant hochreguliert wurde, jedoch nicht nach intrauteriner IFN  $\alpha$ -Exposition nicht tragender Rinder an Tag 15 und 18 p.c. Es konnte ebenfalls eine signifikante Abnahme der Genexpression von FABP3 zwischen Zyklustag 13 und 19 gezeigt werden. Entsprechend wäre zu erwarten gewesen, dass die Genexpression von FABP3 auch im endometrialen Explantmodell nach Stimulation mit IFN  $\tau$  hochreguliert und nach Stimulation mit IFN  $\alpha$  herabreguliert wird. Anders als erwartet wurde die Genexpression von FABP3 innerhalb des hier präsentierten Versuchs nach Stimulation mit allen verwendeten Konzentrationen von IFN  $\tau$  und IFN  $\alpha$  herabreguliert. Eine Erklärung für diese gegensätzlichen Ergebnisse könnte in den Unterschieden der verwendeten Modelle zu finden sein. Während BAUERSACHS et al. (2012) trächtige Färsen und Färsen nach zusätzlicher einmaliger intrauteriner IFN  $\alpha$ -Applikation *in vivo* beprobt haben, wurde in der vorliegenden Studie endometriales Gewebe *in vitro* mit verschiedenen Zusätzen für 24 Stunden stimuliert. Es ist davon auszugehen, dass ein *in vitro*-Explantmodell weder die Komplexität noch die vollständige Gewebereaktion eines lebenden, intakten Organismus abbilden kann. Gleichzeitig bietet das Explantmodell den Vorteil, einzelne Fragestellungen durch gezielte Simulation expliziter beantworten

zu können. Die beobachteten Unterschiede zwischen den beiden Modellen können somit funktionell oder technisch bedingt sein. Des Weiteren müssen die verwendeten Konzentrationen der Zusätze IFN  $\tau$ , IFN  $\alpha$  und P4 berücksichtigt werden. Wie von HANSEN et al. (2017) in einem Übersichtsartikel anschaulich dargelegt wurde, sind die physiologischen Konzentrationen von IFN  $\tau$  durch die erschwerte Messbarkeit *in vivo* bisher nicht bekannt. Orientiert man sich an anderen *in vitro*-Studien, variieren die dort angewendeten IFN  $\tau$ -Konzentrationen von 0,025 ng/ml bis 10.000 ng/ml (CHETHAN et al., 2014; HAEGGER et al., 2018; LOCH et al., 2018; TALUKDER et al., 2018). Als Anhaltspunkt für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentrationen 10, 100 und 300 ng/ml IFN  $\tau$ /IFN  $\alpha$  dienen die *in vitro*-Studien von HAEGGER et al. (2018); LOCH et al. (2018); MATHEW et al. (2019).

Die Ziele der vorliegenden Studie beinhalteten unter anderem die Simulation einer möglichen Konkurrenzsituation verschiedener Typ-1 Interferone innerhalb des Endometriums. Da das verwendete Explantmodell durch Vorversuche auf Validität geprüft wurde und die Stimulation des klassischen ISGs MX1 nachvollziehbare Ergebnisse geliefert hat, werden die erhobenen Daten innerhalb des Modells als valide betrachtet und spiegeln eine von vielen möglichen Gewebereaktionen wider. Um herauszuarbeiten, ob die beobachteten Unterschiede technischer Art oder funktionell bedingt sind, müssten weitere Konzentrationen zwischen 0 und 10 ng/ml IFN  $\tau$  und/oder IFN  $\alpha$  in Folgestudien geprüft werden. Darüber hinaus sollten verschiedene P4 Konzentrationen verwendet werden, um herauszuarbeiten, ob die P4 Konzentration von 20 ng/ml zu hoch gewählt wurde, um Steigerungen der Genexpression des P4-sensitiven Zielgens FABP3 aufzudecken zu können. Des Weiteren könnte mittels zeitlich begrenzter Stimuli oder mehrfacher Messungen das Vorliegen von Sättigungsmechanismen untersucht werden.



Ob FABP3 ein geeigneter Kandidat der nicht-klassischen ISGs ist, muss ebenfalls in weiteren Untersuchungen überprüft werden. In der Literatur sind Definitionen von nicht-klassischen ISGs und assoziierten Merkmalen vage und variieren zudem zwischen den Autoren (SPENCER et al., 2008; SPENCER und HANSEN, 2015; SPENCER et al., 2016). Es wird beschrieben, dass nicht-klassische ISGs durch P4 induziert und durch IFN  $\tau$  stimuliert werden sowie biologische Funktionen aufweisen, die mit der Etablierung der Trächtigkeit verbunden sind (DORNIK et al., 2013; BROOKS et al., 2014; HANSEN et al., 2017). Auch werden ISGs als nicht-klassisch oder neuartig bezeichnet, wenn bisher keine Stimulation durch ein anderes Typ-1 Interferon beschrieben wurde und ihre Expression nicht über den klassischen JAK-STAT vermittelten Signaltransduktionsweg induziert wird (FORDE et al., 2015). Während die klassischen ISGs beim Rind zum Beispiel als mögliche Trächtigkeitsindikatoren in PBMCs häufig beschrieben worden sind, ist die biologische Funktionalität im Zusammenhang mit der Trächtigkeitsetablierung weitgehend ungeklärt. Außerdem lässt die nachgewiesene Stimulation von klassischen ISGs lediglich einen Rückschluss auf eine Typ-1 Interferon-Wirkung zu, die nicht IFN  $\tau$ -spezifisch sein muss. Untersuchungen zu nicht-klassischen ISGs, deren biologische Funktion hingegen bekannt ist, da sie über diese definiert werden, bieten somit deutlich mehr Informationsgehalt. Eine Vielzahl nicht-klassischer ISGs wurde bei Schafen bereits nachgewiesen. Zu ihnen zählen CST3, Prostaglandinsynthase-2 (PTGS2) und verschiedene Mitglieder der Solute Carrier-Transporter (SLC) (SONG et al., 2006; GAO et al., 2009; DORNIK et al., 2011). Die beschriebenen Funktionen umfassen die Modulation der uterinen Rezeptivität und der Zellproliferation in Zusammenhang mit der Konzeptus-Elongation. Ob diese oder ähnliche nicht-klassische ISGs auch beim Rind von Bedeutung sind, ist bisher ungeklärt. Da ein direkter Nachweis des embryonalen Signals IFN  $\tau$  beispielsweise im maternalen Blut nach wie vor nicht

erbracht wurde, könnte der Nachweis nicht-klassischer ISGs dagegen als indirekter Trächtigkeitsnachweis hilfreich sein. Auch könnten ausgewählte nicht-klassische ISGs als Indikatoren für optimale Bedingungen an der embryo-maternalen Kontaktzone fungieren.

#### **4. Fazit und Ausblick**

Die im vorliegenden Projekt mittels endometrialem Explantmodell zur Simulation der embryo-maternalen Kontaktzone erhobenen Daten weisen auf eine Konkurrenzsituation zwischen IFN  $\tau$  und IFN  $\alpha$  hin. Trotz sorgfältiger Auswahl der untersuchten Zielgene ist die Interpretation der erhobenen Daten teilweise beschränkt, da eine Analyse ausschließlich auf Genexpressionsebene stattfand. Eine Erweiterung der zu untersuchenden Zielgene sowie entsprechende Produktnachweise in Folgestudien wären vielversprechend. Auf Ebene der regulatorischen Faktoren wären STAT2, IRF-9 oder ausgewählte Vertreter der Gruppe der MAPKs oder MTORs hilfreiche Kandidaten. Auch eine Erweiterung der klassischen ISGs durch Kandidaten, wie z.B. ISG15, OAS1, C-X-C Motif Chemokine Ligand 10 (CXCL10) oder MX2, könnte ein breiteres Spektrum abbilden und damit tiefere Einblicke in die Gewebereaktion ermöglichen. Vor allem auf Seite der nicht-klassischen ISGs wäre die Aufnahme weiterer Zielgene erstrebenswert. So stellen CST6, CSTS und weitere von der Arbeitsgruppe FORDE et al. (2015) zusammengefasste Gene potentielle Kandidaten der nicht-klassischen ISGs dar. Ein aussichtsreicher nächster Schritt wäre außerdem die Validierung der erhobenen Daten auf Proteinebene, um zu untersuchen, ob auf die beobachtete Regulation der Genexpression auch die entsprechende Synthese der Zielproteine erfolgt und sich somit die biologische Relevanz der beobachteten Ergebnisse bestätigt.

Des Weiteren sind Typ-1 Interferon-Signalwege hochkomplex, und es ist davon auszugehen, dass ein einzelner Signalweg nicht ausreicht, um alle biologischen Prozesse im Zuge eines Typ-1 Interferon-Signals vollständig zu erzeugen (PLATANIAS, 2005). Somit wäre es naheliegend, mithilfe weiterführender holistischer Techniken (Transkriptomik, Proteomik, Metabolomik) zu untersuchen, aus welchem Grund einzelne Signalübertragungsmöglichkeiten anderen vorgezogen werden.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie kann geschlossen werden, dass das implementierte Modell angewendet werden kann, um die frühe embryo-maternale Kommunikation zu simulieren. Dieses Modell kann also alternativ oder ergänzend zum Einsatz von Tierversuchen verwendet werden, was dem sogenannten 3R-Prinzip (Replacement, Reduction, Refinement) entspricht (RUSSELL und BURCH, 1959). Zudem stellt die Simulation von (subklinischen) endometrialen Entzündungszuständen eine vielversprechende mögliche Anwendung für dieses endometriale Explantmodell dar. Darüber hinaus sind auch verschiedene kombinierte Ansätze denkbar. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Interpretierbarkeit von *in vitro*-Modellen immer begrenzt ist, da lediglich eine Momentaufnahme einer weitaus komplexeren *in vivo*-Situation widerspiegelt wird. In zukünftigen Studien soll dieses Modell angewendet werden, um die Schnittstelle zwischen frühen embryo-maternalen Signalen und dem rezeptiven oder nicht-rezeptiven Endometrium zu simulieren. Mittels solcher Untersuchungen könnten Kandidaten für Biomarker identifiziert werden, die auf pathologische Zustände hinweisen und die Grundlage für weitere diagnostische und therapeutische Strategien bilden könnten.

Die frühzeitige Identifizierung und Therapie von Kühen, die an Subfertilität leiden, würde dazu beitragen, Beeinträchtigungen des Tierwohls und wirtschaftliche

Verluste infolge längerer Zwischenkalbezeiten, erhöhter Behandlungskosten und des frühzeitigen Ausscheidens betroffener Tiere aus der Herde zu verhindern.



## V. ZUSAMMENFASSUNG

### **Simone Schabmeyer (2022)**

#### Untersuchungen zur Interferon-Signaltransduktion im Endometrium des Rindes

Die erfolgreiche embryo-maternale Kommunikation ist für Erkennung, Etablierung und Aufrechterhaltung der Trächtigkeit essentiell. Eine Schlüsselfunktion innerhalb dieses Dialoges nimmt beim Rind das embryonale Interferon  $\tau$  (IFN  $\tau$ ) ein, welches zu den Typ-1 Interferonen gehört und bisher ausschließlich bei Wiederkäuern nachgewiesen wurde. Anders als die übrigen Typ-1 Interferone wird IFN  $\tau$  nicht bei viralen Infektionen ausgeschüttet, sondern dient der maternalen Trächtigkeitserkennung. IFN  $\tau$  wird von den embryonalen Trophektodermzellen produziert und in das uterine Lumen freigesetzt, um dem Muttertier die Anwesenheit des Embryos zu signalisieren und die Luteolyse des Gelbkörpers zu verhindern. Die Signaltransduktion wird dabei auf klassischen und nicht-klassischen Wegen vermittelt und resultiert in der Expression von klassischen und nicht-klassischen Interferon stimulierten Genen (ISGs) im endometrialen Gewebe.

Trotz hoher Fertilisationsraten von ca. 90 % kommt es bei Kühen vor allem im präimplantativen Zeitraum häufig zum Trächtigkeitsverlust. Die Ursachen sind vielseitig und können infektiöse und nicht-infektiöse Stressoren umfassen. Diese beeinflussen die embryo-maternale Kommunikation und können sich direkt oder indirekt negativ auf die IFN  $\tau$ -Signaltransduktion auswirken. Dem vorliegenden Projekt liegt die Hypothese zugrunde, dass im Zuge viraler und bakterieller Infektionen der Gebärmutter abgesehen von IFN  $\tau$  weitere Typ-1 Interferone in das uterine Lumen freigesetzt werden können. Durch eine mögliche kompetitive

Signalweitergabe am gemeinsamen Typ-1 Interferon Rezeptor könnte die IFN  $\tau$ -vermittelte Trächtigkeitserkennung gestört werden und zum frühembryonalen Trächtigkeitsabbruch führen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, mithilfe eines bovinen endometrialen Explantmodells die kompetitive Signaltransduktion von IFN  $\tau$  und Interferon  $\alpha$  (IFN  $\alpha$ ) anhand der Typ-1 Interferon Rezeptoruntereinheiten 1 und 2 (IFNAR1/2) und ausgewählter klassischer (STAT1 und MX1) sowie nicht-klassischer Komponenten (PI3K und FABP3) der Signalkaskade zu untersuchen. Die verwendeten Uteri geschlachteter primi- oder pluriparer Kühe ( $n = 26$ ) waren adspektorisch unauffällig, symmetrisch und wiesen keine Anzeichen von Kontamination, Verletzungen oder makroskopisch erkennbaren pathologischen Veränderungen auf. Die Ovarien verfügten über mindestens einen Gelbkörper in Blüte und zeigten somit den Zyklusstand Diöstrus an. Nach Eröffnung des uterinen Lumens wurde die endometriale Schleimhaut zytologisch und bakteriologisch beprobt. Die zytologische Auswertung des Anteils polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN) an 300 kernhaltigen Zellen erfolgte nach Haema-Schnellfärbung. Mit einem Anteil von  $\leq 5\%$  PMN und keinerlei Keimwachstum in der bakteriologischen Untersuchung innerhalb von 48 Stunden wurde das Endometrium im Falle aller beprobten Organe als gesund eingestuft. Mittels 5 mm Hautbiopsiestanze, Feinpinzette und Schere wurden pro Spendertier  $n = 28$  endometriale Explants gewonnen. Im Labor wurden die Gewebeproben in Uterusmedium, bestehend aus Penicillin-Streptomycin zugesetztem Dulbecco's Modified Eagle's Medium, mit IFN  $\tau$  oder IFN  $\alpha$  in verschiedenen Konzentrationen (10 / 100 / 300 ng/ml) oder IFN  $\tau + \alpha$  in verschiedenen Kombinationen (10 + 100 / 100 + 10 / 100 + 100 ng/ml) inkubiert. Diesen Ansätzen wurde Progesteron (P4) (20 ng/ml) beigelegt, um den Zyklusstand Diöstrus zu simulieren. Drei weitere

Ansätze bestehend aus Uterusmedium, Uterusmedium + P4 (20 ng/ml) und Uterusmedium + IFN  $\tau$  (100 ng/ml) dienten als Kontrollen. Die Gewebevitalität wurde über die gesamte Kulturdauer mithilfe von Water-Soluble Tetrazolium Salt-8 nachgewiesen. Die Inkubation der Explants erfolgte bei 37°C, 5,5 % O<sub>2</sub>- und 5 % CO<sub>2</sub>-Konzentration über einen Zeitraum von 24 Stunden. Nach RNA-Extraktion wurde die Genexpression von IFNAR1, IFNAR2, STAT1, PI3K, MX1 und FABP3 mittels Reverse Transkriptase quantitative real-time PCR (RT-qPCR) ermittelt. Durch zuvor etablierte Standardkurven konnte die Genexpression der Zielgene absolut quantifiziert werden.

Die Auswertung der Genexpressionsdaten belegt die Induzierbarkeit von IFNAR1 und IFNAR2 im Endometrium. Die prominenteste Genexpressionsänderung von IFNAR2 konnte nach Stimulation mit 10 ng/ml IFN  $\alpha$  im Vergleich zur Kontrolle Uterusmedium + P4 ( $p = 0,001$ ) beobachtet werden. Auf Ebene der regulatorischen Faktoren STAT1 und PI3K konnten nur Tendenzen und vereinzelt signifikante Unterschiede in der Genexpression festgestellt werden. Deutlichere Unterschiede konnten dagegen auf Ebene der ISGs beobachtet werden. Das klassische ISG MX1 zeigte eine signifikant höhere Genexpression nach Stimulation mit 300 ng/ml verglichen mit 10 ng/ml IFN  $\tau$  ( $p < 0,0001$ ). Im Gegensatz dazu konnte mit steigender IFN  $\alpha$ -Konzentration eine niedrigere MX1-Genexpression festgestellt werden. Die Auswertung des nicht-klassischen Kandidaten FABP3 zeigte eine signifikant reduzierte Genexpression nach Stimulation mit 300 ng/ml verglichen mit 10 ng/ml sowohl bei IFN  $\tau$  ( $p < 0,001$ ) als auch bei IFN  $\alpha$  ( $p < 0,001$ ). Die Genexpressions-Analyse von Explants, die mit einer Kombination aus IFN  $\tau + \alpha$  stimuliert wurden, wies auf eine kompetitive Konkurrenzsituation zwischen diesen Typ-1 Interferonen hin. Vor allem die MX1-Expression war nach Stimulation mit 100 ng/ml IFN  $\tau + 10$  ng/ml IFN  $\alpha$  verglichen mit 10 ng/ml IFN  $\tau + 100$  ng/ml



IFN  $\alpha$  signifikant höher ( $p < 0,0001$ ).

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass mithilfe des verwendeten hoch definierten endometrialen Explantmodells die klassische sowie nicht-klassische Signaltransduktion via den Typ-1 Interferon Rezeptoruntereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 exemplarisch simuliert werden kann. Die Ergebnisse der Genexpressions-Analyse deuten darauf hin, dass eine Konkurrenzsituation zwischen IFN  $\tau$  und IFN  $\alpha$  möglich ist. Eine Beeinträchtigung der frühen Trächtigkeit beim Rind durch die Störung des IFN  $\tau$ -Signaltransduktion bei infektionsassoziierten Erkrankungen der Gebärmutter ist somit denkbar.

Durch Erweiterung des Zielgen-Spektrums und präzise Anpassung des Modells kann das verwendete Explantmodell auch in zukünftigen Studien zur Simulierung von anderen spezifischen Situationen und Mechanismen an der embryo-maternalen Kontaktzone verwendet werden.

## VI. SUMMARY

### **Simone Schabmeyer (2022)**

#### Studies on the interferon signal transduction in the bovine endometrium

A successful embryo-maternal crosstalk is essential for the recognition, establishment and maintenance of pregnancy in bovine species. One key player in this dialog is the embryonic signal interferon  $\tau$  (IFN  $\tau$ ) which belongs to the type-1 interferons and is exclusively expressed by ruminants. Unlike other type-1 interferons, it is not induced by viral infections but mediates the maternal recognition of pregnancy. This interferon is produced by the trophoctoderm and released into the uterine lumen to signal the embryonic presence to the maternal organism on day 16/17 post conception (p.c.) and to prevent the luteolysis of the corpus luteum. Further signaling is transduced by classical or non-classical pathways and results in the expression of classical and non-classical interferon stimulated genes (ISGs), which form a specific tissue response.

While fertilization rates with up to 90 % remain high, pregnancy loss in cows is especially recorded during the pre-implantation period. The causes are multifactorial and can have infectious or non-infectious origins. These stressors can affect the embryo-maternal crosstalk by negatively influencing the IFN  $\tau$  signal transduction. It is hypothesized, that due to viral and bacterial infections of the uterus, type-1 interferons other than IFN  $\tau$  might be released in the uterine lumen. Hence, a competitive situation at the type-1 interferon receptor might disturb the IFN  $\tau$  signal transduction and could lead to early pregnancy loss.

Therefore, the aim of the present study was to analyze the possible competitive

signal transduction between IFN  $\tau$  and interferon  $\alpha$  (IFN  $\alpha$ ) (exemplarily for other type-1 interferons) with a highly defined bovine endometrial explant model. The type-1 interferon receptor subunit 1 and 2 (IFNAR1/2), selected factors of the classical (STAT1) and non-classical (PI3K) pathway as well as a classical (MX1) and a non-classical (FABP3) ISG candidate were chosen to simulate the complex cascade of interferon signaling in the endometrial tissue.

At the local abattoir, collected uteri of primi- or pluriparous cows ( $n = 26$ ) were intact, symmetrical and showed no signs of contamination, trauma or macroscopic detectable pathological changes. Only donor cows in diestrus, indicated by ovaries with at least one mature corpus luteum, were enrolled in the study. After opening the uterine lumen, the endometrial surface was cytobushed and swabbed for further cytological and bacteriological examination. Cytological smears were stained with diff-quick staining solution and the proportion of polymorphonuclear cells (PMN) in 300 nucleated cells was evaluated. With a PMN proportion of  $\leq 5\%$  and no bacterial growth after 48 hours of incubation, the endometrial tissue of all donor cows enrolled in this study was classified as cytological and bacteriological healthy.

Per animal  $n = 28$  endometrial explants were collected with a 5 mm biopsy punch, precision forceps and scissors. After further preparation in the laboratory, the endometrial explants were incubated with uterus medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium containing penicillin-streptomycin) and admixtures containing either IFN  $\tau$  or IFN  $\alpha$  in different concentrations (10 / 100 / 300 ng/ml) or IFN  $\tau + \alpha$  in different combinations (10 + 100 / 100 + 10 / 100 + 100 ng/ml). Progesterone (P4) (20 ng/ml) was added to each treatment group. Three additional approaches consisting of uterus medium, uterus medium + P4 (20 ng/ml) or uterus medium + IFN  $\tau$  (100 ng/ml) served as controls. Tissue viability was determined over the entire incubation time using Water-Soluble Tetrazolium Salt-8. Incubation

was set at 37°C, 5.5 % O<sub>2</sub> and 5 % CO<sub>2</sub> over a 24 hour time period. After RNA extraction, reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) was executed to determine gene expression of IFNAR1, IFNAR2, STAT1, PI3K, MX1 and FABP3. For absolute quantification of target gene expression, standard curve method with previously established cDNA subclones was used.

Gene expression analysis confirmed the inducibility of IFNAR1 and IFNAR2 with the strongest upregulation of IFNAR2 after stimulation with 10 ng/ml IFN  $\alpha$  compared to the control uterus medium + P4 ( $p = 0.001$ ). STAT1 and PI3K as representatives of the regulatory factor level showed only tendencies in the gene expression analysis. Differences in gene expression were more distinct on the ISG level. The classical ISG MX1 showed significant higher gene expression after stimulation with 300 ng/ml compared to 10 ng/ml IFN  $\tau$  ( $p < 0.0001$ ). In contrast, MX1 gene expression was significantly downregulated along rising IFN  $\alpha$  concentrations. Gene expression analysis of the non-classical candidate FABP3 revealed significant downregulation after stimulation with 300 ng/ml compared to 10 ng/ml with both IFN  $\tau$  ( $p < 0.001$ ) and IFN  $\alpha$  ( $p < 0.001$ ). Evaluation of gene expression after incubation with the different combinations of IFN  $\tau$  +  $\alpha$  indicated a competitive situation between these two type-1 interferons. Especially MX1 gene expression was significantly upregulated after stimulation with 100 ng/ml IFN  $\tau$  + 10 ng/ml IFN  $\alpha$  compared to 10 ng/ml IFN  $\tau$  + 100 ng/ml IFN  $\alpha$  ( $p < 0.0001$ ).

Using this highly defined endometrial explant model, exemplary simulation of classical and non-classical signal transduction via the type-1 interferon receptor subunits IFNAR1 and IFNAR2 was shown within this project. Gene expression analysis indicated a competitive situation between IFN  $\tau$  and IFN  $\alpha$ . In conclusion, malfunctioning of IFN  $\tau$  signaling due to infection-associated changes of the endometrium is imaginable and could negatively impact early pregnancy.

In the future, this endometrial explant model can be applied to simulate the embryo-maternal contact zone in more detail by expanding the target gene spectrum and refining the model to be suitable for other scientific approaches.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

Arimoto K-I, Miyauchi S, Stoner SA, Fan J-B, Zhang D-E. Negative regulation of type I IFN signaling. *J Leukoc Biol* 2018; 103: 1099-116.

Banliat C, Tsikis G, Labas V, Teixeira-Gomes A-P, Com E, Lavigne R, Pineau C, Guyonnet B, Mermillod P, Saint-Dizier M. Identification of 56 Proteins Involved in Embryo–Maternal Interactions in the Bovine Oviduct. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; 21: 466.

Barański W, Podhalicz-Dzięgielewska M, Zduńczyk S, Janowski T. The diagnosis and prevalence of subclinical endometritis in cows evaluated by different cytologic thresholds. *Theriogenology* 2012; 78: 1939-47.

Barlund CS, Carruthers TD, Waldner CL, Palmer CW. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology* 2008; 69: 714-23.

Bartels JJ. Charakterisierung des gesunden und entzündeten Uterus des Rindes. Diss. med. vet. 2014. Imu.

Basavaraja R, Drum JN, Sapuleni J, Bibi L, Friedlander G, Kumar S, Sartori R, Meidan R. Downregulated luteolytic pathways in the transcriptome of early pregnancy bovine corpus luteum are mimicked by interferon-tau in vitro. *BMC Genomics* 2021; 22: 452.

Bascom SS, Young AJ. A Summary of the Reasons Why Farmers Cull Cows. *Journal of Dairy Science* 1998; 81: 2299-305.

Bauersachs S, Ulbrich SE, Gross K, Schmidt SEM, Meyer HHD, Wenigerkind H, Vermehren M, Sinowatz F, Blum H, Wolf E. Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. 2006; 132: 319.

Bauersachs S, Ulbrich SE, Reichenbach H-D, Reichenbach M, Büttner M, Meyer HHD, Spencer TE, Minten M, Sax G, Winter G, Wolf E. Comparison of the Effects of Early Pregnancy with Human Interferon, Alpha 2 (IFNA2), on Gene Expression in Bovine Endometrium. *Biology of Reproduction* 2012; 86: 46, 1-15-46, 1-15.

Bauersachs S, Wolf E. Uterine Responses to the Preattachment Embryo in Domestic Ungulates: Recognition of Pregnancy and Preparation for Implantation. *Annual Review of Animal Biosciences* 2015; 3: 489-511.

Bazer FW. Uterine Protein Secretions: Relationship to Development of the Conceptus. *Journal of Animal Science* 1975; 41: 1376-82.

Bazer FW, Spencer TE, Ott TL. Placental interferons. *Am J Reprod Immunol* 1996; 35: 297-308.

Bazer FW, Spencer TE, Ott TL. Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37: 412-20.

Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, Spencer TE, Wu G. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. *Reproductive Biology* 2008; 8: 179-211.

Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC. Uterine receptivity to implantation of blastocysts in mammals. *Front Biosci (Schol Ed)* 2011; 3: 745-67.

Bersinger NA, Genewein EM, Müller O, Altermatt HJ, McKinnon B, Mueller MD. Morphology of human endometrial explants and secretion of stromal marker proteins in short- and long-term cultures. *Gynecological Surgery* 2010; 7: 75-80.

Betteridge KJ, Eaglesome MD, Randall GCB, Mitchell D. Collection, description and transfer of embryos from cattle 10–16 days after oestrus. *Reproduction* 1980; 59: 205.

Binelli M, Subramaniam P, Diaz T, Johnson GA, Hansen TR, Badinga L, Thatcher WW. Bovine interferon-tau stimulates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway in bovine endometrial epithelial cells. *Biol Reprod* 2001; 64: 654-65.

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard J. Cellular responses to interferon-gamma *Annu Rev Immunol.* 1997;

Bonnett BN, Martin SW, Gannon V, Miller RB, Etherington WG. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. III. Bacteriological analysis and correlations with histological findings. *Canadian Journal of Veterinary Research* 1991; 55: 168.



Borges ÁM, Healey GD, Sheldon IM. Explants of Intact Endometrium to Model Bovine Innate Immunity and Inflammation Ex Vivo. *American Journal of Reproductive Immunology* 2012; 67: 526-39.

Brooks K, Burns G, Spencer TE. Conceptus elongation in ruminants: roles of progesterone, prostaglandin, interferon tau and cortisol. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 2014; 5: 53.

Bugueiro A, Fouz R, Camino F, Yus E, Diéguez FJ. Robot milking and relationship with culling rate in dairy cows. *animal* 2019; 13: 1304-10.

Buhi W. Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction* 2002; 123: 355-62.

Carter F, Forde N, Duffy P, Wade M, Fair T, Crowe M, Evans A, Kenny D, Roche J, Lonergan P. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reproduction, Fertility and Development* 2008; 20: 368-75.

Charleston B, Fray MD, Baigent S, Carr BV, Morrison WI. Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *Journal of General Virology* 2001; 82: 1893-7.

Cheng Z, Abudureyimu A, Oguejiofor CF, Ellis R, Barry AT, Chen X, Anstaett OL, Brownlie J, Wathes DC. BVDV alters uterine prostaglandin production during pregnancy recognition in cows. *Reproduction* 2016; 151: 605-14.

Cheng Z, Chauhan L, Barry AT, Abudureyimu A, Oguejiofor CF, Chen X, Wathes DC. Acute bovine viral diarrhea virus infection inhibits expression of interferon tau-stimulated genes in bovine endometrium. *Biology of Reproduction* 2017; 96: 1142-53.

Chethan SG, Singh SK, Nongsiej J, Rakesh HB, Singh RP, Kumar N, Agarwal SK. IFN -  $\tau$  Acts in a Dose - Dependent Manner on Prostaglandin Production by Buffalo Endometrial Stromal Cells Cultured in vitro. *Reproduction in Domestic Animals* 2014; 49: 403-8.

Choi Y, Johnson GA, Burghardt RC, Berghman LR, Joyce MM, Taylor KM, Stewart MD, Bazer FW, Spencer TE. Interferon regulatory factor-two restricts expression of interferon-stimulated genes to the endometrial stroma and glandular epithelium of the ovine uterus. *Biol Reprod* 2001; 65: 1038-49.

Clemente M, Fuente JdL, Fair T, Naib AA, Gutierrez-Adan A, Roche JF, Rizos D, Lonergan P. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? 2009; 138: 507.

Darnell JE, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins. *Science* 1994; 264: 1415-21.

David M, Petricoin E, Benjamin C, Pine R, Weber MJ, Larner AC. Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon alpha- and interferon beta-stimulated gene expression through STAT proteins. *Science* 1995; 269: 1721.

Diskin MG, Murphy JJ, Sreenan JM. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Animal Reproduction Science* 2006; 96: 297-311.

Dorniak P, Bazer FW, Spencer TE. Prostaglandins regulate conceptus elongation and mediate effects of interferon tau on the ovine uterine endometrium. *Biol Reprod* 2011; 84: 1119-27.

Dorniak P, Bazer FW, Spencer TE. Physiology and Endocrinology Symposium: Biological role of interferon tau in endometrial function and conceptus elongation. *Journal of Animal Science* 2013; 91: 1627-38.

Ealy AD, Drost M, Hansen PJ. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J Dairy Sci* 1993; 76: 2899-905.

Endriß KJ, Meyerholz MM, Fischbach T, Brimmers L, Pfarrer C, Marth CD, Schmicke M. In vitro effects of Type I interferons (IFN $\tau$  and IFN $\alpha$ ) on bovine hepatocytes cultured with or without Kupffer cells. *Reprod Fertil Dev* 2021; 33: 305-17.

Espinosa V, Dutta O, McElrath C, Du P, Chang Y-J, Cicciarelli B, Pitler A, Whitehead I, Obar JJ, Durbin JE, Kotenko SV, Rivera A. Type III interferon is a critical regulator of innate antifungal immunity. *Science immunology* 2017; 2: eaan5357.

Esposito G, Irons PC, Webb EC, Chapwanya A. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science* 2014; 144: 60-71.

Fasler-Kan E, Pansky A, Wiederkehr M, Battegay M, Heim MH. Interferon- $\alpha$  activates signal transducers and activators of transcription 5 and 6 in Daudi cells. *European Journal of Biochemistry* 1998; 254: 514-9.

Fléchon J-E, Renard J-P. A scanning electron microscope study of the hatching of bovine blastocysts in vitro. *Reproduction* 1978; 53: 9-NP.

Forde N, Carter F, Fair T, Crowe MA, Evans ACO, Spencer TE, Bazer FW, McBride R, Boland MP, O'Gaora P, Lonergan P, Roche JF. Progesterone-Regulated Changes in Endometrial Gene Expression Contribute to Advanced Conceptus Development in Cattle. *Biology of Reproduction* 2009; 81: 784-94.

Forde N, Carter F, Spencer TE, Bazer FW, Sandra O, Mansouri-Attia N, Okumu LA, McGettigan PA, Mehta JP, McBride R, O'Gaora P, Roche JF, Lonergan P. Conceptus-Induced Changes in the Endometrial Transcriptome: How Soon Does the Cow Know She Is Pregnant? *Biology of Reproduction* 2011; 85: 144-56.

Forde N, Duffy GB, McGettigan PA, Browne JA, Mehta JP, Kelly AK, Mansouri-Attia N, Sandra O, Loftus BJ, Crowe MA, Fair T, Roche JF, Lonergan P, Evans ACO. Evidence for an early endometrial response to pregnancy in cattle: both dependent upon and independent of interferon tau. *Physiological Genomics* 2012; 44: 799-810.

Forde N, McGettigan PA, Mehta JP, O'Hara L, Mamo S, Bazer FW, Spencer TE, Lonergan P. Proteomic analysis of uterine fluid during the pre-implantation period of pregnancy in cattle. *Reproduction* 2014; 147: 575-87.

Forde N, Bazer FW, Spencer TE, Lonergan P. 'Conceptualizing' the Endometrium: Identification of Conceptus-Derived Proteins During Early Pregnancy in Cattle. *Biology of Reproduction* 2015; 92: 156, 1-13-, 1-13.

Fourichon C, Seegers H, Malher X. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology* 2000; 53: 1729-59.

Galani IE, Triantafyllia V, Eleminiadou EE, Koltsida O, Stavropoulos A, Manioudaki M, Thanos D, Doyle SE, Kotenko SV, Thanopoulou K, Andreakos E. Interferon- $\lambda$  Mediates Non-redundant Front-Line Antiviral Protection against Influenza Virus Infection without Compromising Host Fitness. *Immunity* 2017; 46: 875-90.e6.

Galvão KN, Santos NR, Galvão JS, Gilbert RO. Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows. *Theriogenology* 2011; 76: 290-9.

Gao H, Wu G, Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW. Select Nutrients in the Ovine Uterine Lumen. II. Glucose Transporters in the Uterus and Peri-Implantation Conceptuses<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction* 2009; 80: 94-104.

García-Ispuerto I, López-Gatius F, Santolaria P, Yániz JL, Nogareda C, López-Béjar M, De Rensis F. Relationship between heat stress during the peri-implantation period and early fetal loss in dairy cattle. *Theriogenology* 2006; 65: 799-807.

Gifford CA, Racicot K, Clark DS, Austin KJ, Hansen TR, Lucy MC, Davies CJ, Ott TL. Regulation of Interferon-Stimulated Genes in Peripheral Blood Leukocytes in Pregnant and Bred, Nonpregnant Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 2007; 90: 274-80.

Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 2005; 64: 1879-88.

Giller K, Drews B, Berard J, Kienberger H, Schmicke M, Frank J, Spanier B, Daniel H, Geisslinger G, Ulbrich SE. Bovine embryo elongation is altered due to maternal fatty acid supplementation. *Biology of Reproduction* 2018; 99: 600-10.

Godkin JD, Bazer FW, Moffatt J, Sessions F, Roberts RM. Purification and properties of a major, low molecular weight protein released by the trophoblast of sheep blastocysts at day 13-21. *J Reprod Fertil* 1982; 65: 141-50.

Gottschalk RA, Dorrington MG, Dutta B, Krauss KS, Martins AJ, Uderhardt S, Chan W, Tsang JS, Torabi-Parizi P, Fraser ID, Germain RN. IFN-mediated negative feedback supports bacteria class-specific macrophage inflammatory responses. *Elife* 2019; 8

Gray CA, Taylor KM, Ramsey WS, Hill JR, Bazer FW, Bartol FF, Spencer TE. Endometrial Glands Are Required for Preimplantation Conceptus Elongation and Survival. *Biology of Reproduction* 2001; 64: 1608-13.

Gray PW, Goeddel DV. Structure of the human immune interferon gene. *Nature* 1982; 298: 859-63.

Grimard B, Freret S, Chevallier A, Pinto A, Ponsart C, Humblot P. Genetic and environmental factors influencing first service conception rate and late embryonic/foetal mortality in low fertility dairy herds. *Animal Reproduction Science* 2006; 91: 31-44.

Gür S, Dogan N. The possible role of bovine herpesvirus type-4 infection in cow infertility. *Animal Science Journal* 2010; 81: 304-8.

Hackett AJ, Durnford R, Mapletoft RJ, Marcus GJ. Location and status of embryos in the genital tract of superovulated cows 4 to 6 days after insemination. *Theriogenology* 1993; 40: 1147-53.

Haeger J-D, Loch C, Pfarrer C. The newly established bovine endometrial gland cell line (BEGC) forms gland acini in vitro and is only IFN $\tau$ -responsive (MAPK42/44 activation) after E2 and P4-pre-incubation. *Placenta* 2018; 67: 61-9.

Han H, Austin KJ, Rempel LA, Hansen TR. Low blood ISG15 mRNA and progesterone levels are predictive of non-pregnant dairy cows. *Journal of Endocrinology* 2006; 191: 505.

Hansen PJ, Soto P, Natzke RP. Mastitis and fertility in cattle - possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. *Am J Reprod Immunol* 2004; 51: 294-301.

Hansen TR, Austin KJ, Perry DJ, Pru JK, Teixeira MG, Johnson GA. Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 1999; 54: 329-39.

Hansen TR, Sinedino LDP, Spencer TE. Paracrine and endocrine actions of interferon tau (IFNT). *Reproduction* 2017; 154: F45-F59.

Helfrich AL, Reichenbach H-D, Meyerholz MM, Schoon H-A, Arnold GJ, Fröhlich T, Weber F, Zerbe H. Novel sampling procedure to characterize bovine subclinical endometritis by uterine secretions and tissue. *Theriogenology* 2020; 141: 186-96.

Helmer S, Hansen P, Anthony R, Thatcher W, Bazer F, Roberts R. Identification of bovine trophoblast protein-1, a secretory protein immunologically related to ovine trophoblast protein-1. *Reproduction* 1987; 79: 83-91.

Herath S, Lilly ST, Santos NR, Gilbert RO, Goetze L, Bryant CE, White JO, Cronin J, Sheldon IM. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2009; 7: 55.

Hill J, Gilbert R. Reduced quality of bovine embryos cultured in media conditioned by exposure to an inflamed endometrium. *Aust Vet J* 2008; 86: 312-6.

Hillmer M. Uterussekret zur Diagnostik und Pathogeneseforschung der chronischen Endometritis beim Rind. Diss. med. vet. 2018. LMU München.

Hillreiner M, Müller NI, Koch HM, Schmautz C, Küster B, Pfaffl MW, Kliem H. Establishment of a 3D cell culture model of primary bovine mammary epithelial cells extracted from fresh milk. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 2017; 53: 706-20.



Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences 1957; 147: 258.

Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. Nature Reviews Immunology 2014; 14: 36-49.

Jaks E, Gavutis M, Uzé G, Martal J, Piehler J. Differential receptor subunit affinities of type I interferons govern differential signal activation. Journal of molecular biology 2007; 366: 525-39.

Kangfeng J, Xiuying C, Gan Z, Haichong W, Junxian M, Changwei Q, Xiuli P, Ganzhen D. IFN- $\tau$  Plays an Anti-Inflammatory Role in Staphylococcus aureus-Induced Endometritis in Mice Through the Suppression of NF- $\kappa$ B Pathway and MMP9 Expression. Journal of Interferon & Cytokine Research 2017; 37: 81-9.

Kaplan A, Lee MW, Wolf AJ, Limon JJ, Becker CA, Ding M, Murali R, Lee EY, Liu GY, Wong GCL, Underhill DM. Direct Antimicrobial Activity of IFN- $\beta$ . J Immunol 2017; 198: 4036-45.

Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. Theriogenology 2004; 62: 9-23.

Kerbler TL, Buhr MM, Jordan LT, Leslie KE, Walton JS. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. Theriogenology 1997; 47: 703-14.

Kim M-S, Min K-S, Imakawa K. Regulation of Interferon-stimulated Gene (ISG)12, ISG15, and MX1 and MX2 by Conceptus Interferons (IFNTs) in Bovine Uterine Epithelial Cells. *Asian-Australas J Anim Sci* 2013; 26: 795-803.

Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 2003; 4: 69-77.

Krinninger III CE, Stephens SH, Hansen PJ. Developmental changes in inhibitory effects of arsenic and heat shock on growth of pre-implantation bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* 2002; 63: 335-40.

Kunii H, Koyama K, Ito T, Suzuki T, Balboula AZ, Shirozu T, Bai H, Nagano M, Kawahara M, Takahashi M. Hot topic: Pregnancy-induced expression of interferon-stimulated genes in the cervical and vaginal mucosal membranes. *Journal of Dairy Science* 2018; 101: 8396-400.

LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH. Defining and Diagnosing Postpartum Clinical Endometritis and its Impact on Reproductive Performance in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 2002; 85: 2223-36.

Lechner I, Wüthrich M, Meylan M, van den Borne BHP, Schüpbach-Regula G. Association of clinical signs after acute Schmallenberg virus infection with milk production and fertility in Swiss dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine* 2017; 146: 121-9.

Lind M. Etablierung und Anwendung einer Explantkultur der Zitze zur Analyse initialer Vorgänge bei der Mastitis des Rindes. Diss. med. vet. 2011. lmu.

Lindenmann J, Burke DC, Isaacs A. Studies on the Production, Mode of Action and Properties of Interferon. *British Journal of Experimental Pathology* 1957; 38: 551-62.

Loch C, Haeger JD, Pfarrer C. IFN $\tau$  mediates chemotaxis, motility, metabolism and CK18 downregulation in bovine trophoblast cells in vitro via STAT1 and MAPK42/44 signaling. *Placenta* 2018; 64: 17-26.

Macías Luaces L. Untersuchungen in vitro zu epigenetisch wirksamen Immunmodulatoren bei der Pathogen-spezifischen Mastitis des Rindes. Diss. med. vet. 2019. lmu.

Madoz LV, Giuliadori MJ, Migliorisi AL, Jaureguiberry M, de la Sota RL. Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2014; 97: 195-201.

Maillo V, Gaora PÓ, Forde N, Besenfelder U, Havlicek V, Burns GW, Spencer TE, Gutierrez-Adan A, Lonergan P, Rizos D. Oviduct-Embryo Interactions in Cattle: Two-Way Traffic or a One-Way Street?1. *Biology of Reproduction* 2015; 92

Mann G, Lamming G. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 2001; 121: 175.

Mansouri-Attia N, Sandra O, Aubert J, Degrelle S, Everts RE, Giraud-Delville C, Heyman Y, Galio L, Hue I, Yang X, Tian XC, Lewin HA, Renard J-P. Endometrium as an early sensor of in vitro embryo manipulation technologies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; 106: 5687-92.

Martal J, Lacroix MC, Loudes C, Saunier M, Wintenberger-Torrès S. Trophoblastin, an antiluteolytic protein present in early pregnancy in sheep. *J Reprod Fertil* 1979; 56: 63-73.

Martins T, Pugliesi G, Sponchiado M, Gonella-Diaza AM, Ojeda-Rojas OA, Rodriguez FD, Ramos RS, Basso AC, Binelli M. Perturbations in the uterine luminal fluid composition are detrimental to pregnancy establishment in cattle. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 2018; 9: 70.

Mathew DJ, Sanchez JM, Passaro C, Charpigny G, Behura SK, Spencer TE, Lonergan P. Interferon tau-dependent and independent effects of the bovine conceptus on the endometrial transcriptome. *Biol Reprod* 2019; 100: 365-80.

Meyerholz M, Mense K, Knaack H, Sandra O, Schmicke M. Pregnancy-Induced ISG-15 and MX-1 Gene Expression is Detected in the Liver of Holstein–Friesian Heifers During Late Peri-Implantation Period. *Reproduction in Domestic Animals* 2016; 51: 175-7.

Moor RM, Rowson LE. INFLUENCE OF THE EMBRYO AND UTERUS ON LUTEAL FUNCTION IN THE SHEEP. *Nature* 1964; 201: 522-3.

Moor RM, Rowson LE. The corpus luteum of the sheep: functional relationship between the embryo and the corpus luteum. *J Endocrinol* 1966; 34: 233-9.

Moraes JGN, Behura SK, Geary TW, Hansen PJ, Neibergs HL, Spencer TE. Uterine influences on conceptus development in fertility-classified animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2018; 115: E1749-E58.

Northey DL, French LR. Effect of Embryo Removal and Intrauterine Infusion of Embryonic Homogenates on the Lifespan of the Bovine Corpus Luteum. *Journal of Animal Science* 1980; 50: 298-302.

Oliveira JoF, Henkes LE, Ashley RL, Purcell SH, Smirnova NP, Veeramachaneni DNR, Anthony RV, Hansen TR. Expression of Interferon (IFN)-Stimulated Genes in Extrauterine Tissues during Early Pregnancy in Sheep Is the Consequence of Endocrine IFN- $\tau$  Release from the Uterine Vein. *Endocrinology* 2008; 149: 1252-9.

Oritani K, Tomiyama Y. Interferon-zeta/limitin: novel type I interferon that displays a narrow range of biological activity. *Int J Hematol* 2004; 80: 325-31.

Østrup E, Hyttel P, Østrup O. Embryo–maternal communication: signalling before and during placentation in cattle and pig. *Reproduction, Fertility and Development* 2011; 23: 964-75.

Pestka S. The interferon receptors. *Semin Oncol* 1997; 24: S9-18-s9-40.

Pestka S, Kotenko SV, Muthukumaran G, Izotova LS, Cook JR, Garotta G. The interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) receptor: a paradigm for the multichain cytokine receptor. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 1997; 8: 189-206.

Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews* 2004; 202: 8-32.

Platanias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 375-86.

Rashid MB, Talukder AK, Kusama K, Haneda S, Takedomi T, Yoshino H, Moriyasu S, Matsui M, Shimada M, Imakawa K, Miyamoto A. Evidence that interferon-tau secreted from Day-7 embryo in vivo generates anti-inflammatory immune response in the bovine uterus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2018; 500: 879-84.

Ratinier M, Shaw AE, Barry G, Gu Q, Di Gialleonardo L, Janowicz A, Varela M, Randall RE, Caporale M, Palmarini M. Bluetongue Virus NS4 Protein Is an Interferon Antagonist and a Determinant of Virus Virulence. *Journal of Virology* 2016; 90: 5427-39.

Resau JH, Sakamoto K, Cottrell JR, Hudson EA, Meltzer SJ. Explant organ culture: A review. *Cytotechnology* 1991; 7: 137-49.

Ribeiro ES, Gomes G, Greco LF, Cerri RLA, Vieira-Neto A, Monteiro PLJ, Lima FS, Bisinotto RS, Thatcher WW, Santos JEP. Carryover effect of postpartum inflammatory diseases on developmental biology and fertility in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2016; 99: 2201-20.

Rizos D, Scully S, Kelly AK, Ealy AD, Moros R, Duffy P, Al Naib A, Forde N, Lonergan P. Effects of human chorionic gonadotrophin administration on day 5 after oestrus on corpus luteum characteristics, circulating progesterone and conceptus elongation in cattle. *Reprod Fertil Dev* 2012; 24: 472-81.

Rizos D, Maillo V, Lonergan P. Role of the oviduct and oviduct-derived products in ruminant embryo development. *Animal Reproduction (AR)* 2018; 13: 160-7.

Roberts RM, Cross JC, Leaman DW. Interferons as Hormones of Pregnancy\*. *Endocrine Reviews* 1992; 13: 432-52.

Roberts RM, Ealy AD, Alexenko AP, Han CS, Ezashi T. Trophoblast Interferons. *Placenta* 1999; 20: 259-64.

Roberts RM, Ezashi T, Rosenfeld CS, Ealy AD, Kubisch HM. Evolution of the interferon tau genes and their promoters, and maternal-trophoblast interactions in control of their expression. *Reprod Suppl* 2003; 61: 239-51.

Robinson RS, Fray MD, Wathes DC, Lamming GE, Mann GE. In vivo expression of interferon tau mRNA by the embryonic trophoblast and uterine concentrations of interferon tau protein during early pregnancy in the cow. *Molecular Reproduction and Development* 2006; 73: 470-4.

Rowson LE, Moor RM. Embryo transfer in the sheep: the significance of synchronizing oestrus in the donor and recipient animal. *J Reprod Fertil* 1966; 11: 207-12.

Ruder CA, Sasser RG, Williams RJ, Ely JK, Bull RC, Butler JE. Uterine infections in the postpartum cow: II. Possible synergistic effect of *Fusobacterium necrophorum* and *Corynebacterium pyogenes*. *Theriogenology* 1981; 15: 573-80.

Ruhmann B, Giller K, Hankele AK, Ulbrich SE, Schmicke M. Interferon- $\tau$  induced gene expression in bovine hepatocytes during early pregnancy. *Theriogenology* 2017; 104: 198-204.

Russell WMS, Burch RL (1959) The principles of humane experimental technique. Methuen

Santman-Berends IMGA, Hage JJ, van Rijn PA, Stegeman JA, van Schaik G. Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) infection reduces fertility of Dutch dairy cattle and is vertically transmitted to offspring. *Theriogenology* 2010; 74: 1377-84.

Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC. Fertilization and Early Embryonic Development in Heifers and Lactating Cows in Summer and Lactating and Dry Cows in Winter. *Journal of Dairy Science* 2002; 85: 2803-12.

Schäfer WR, Fischer L, Roth K, Jüllig AK, Stuckenschneider JE, Schwartz P, Weimer M, Orlowska-Volk M, Hanjalic-Beck A, Kranz I, Deppert WR, Zahradnik HP. Critical evaluation of human endometrial explants as an ex vivo model system: a molecular approach. *Molecular Human Reproduction* 2010; 17: 255-65.



Schindler M, Ahmed I, Kamal J, Nur-E-Kamal A, Grafe TH, Young Chung H, Meiners S. A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vivo-like organization and morphogenesis for cells in culture. *Biomaterials* 2005; 26: 5624-31.

Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annual Review of Immunology* 2014; 32: 513-45.

Schoggins JW, Rice CM. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Current Opinion in Virology* 2011; 1: 519-25.

Schreiber G, Piehler J. The molecular basis for functional plasticity in type I interferon signaling. *Trends in Immunology* 2015; 36: 139-49.

Schrick FN, Hockett ME, Saxton AM, Lewis MJ, Dowlen HH, Oliver SP. Influence of Subclinical Mastitis During Early Lactation on Reproductive Parameters. *Journal of Dairy Science* 2001; 84: 1407-12.

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 163-89.

Screenan J, Diskin M. The extent and timing of embryonic mortality in cattle. In: Page 1 In *Embryonic Mortality in Farm Animals*: Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands 1986:

Seals RC, Lemaster JW, Hopkins FM, Schrick FN. Effects of elevated concentrations of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  on pregnancy rates in progestogen supplemented cattle. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 1998; 56: 377-89.

Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 2006; 65: 1516-30.

Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, Kuestner R, Garrigues U, Birks C, Roraback J, Ostrander C, Dong D, Shin J, Presnell S, Fox B, Haldeman B, Cooper E, Taft D, Gilbert T, Grant FJ, Tackett M, Krivan W, McKnight G, Clegg C, Foster D, Klucher KM. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 2003; 4: 63-8.

Sommereyans C, Paul S, Staeheli P, Michiels T. IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS Pathog* 2008; 4: e1000017-e.

Song G, Spencer TE, Bazer FW. Progesterone and Interferon- $\tau$  Regulate Cystatin C in the Endometrium. *Endocrinology* 2006; 147: 3478-83.

Soto P, Natzke RP, Hansen PJ. Actions of tumor necrosis factor-alpha on oocyte maturation and embryonic development in cattle. *Am J Reprod Immunol* 2003a; 50: 380-8.

Soto P, Natzke RP, Hansen PJ. Identification of possible mediators of embryonic mortality caused by mastitis: actions of lipopolysaccharide, prostaglandin F<sub>2</sub>alpha, and the nitric oxide generator, sodium nitroprusside dihydrate, on oocyte maturation and embryonic development in cattle. *Am J Reprod Immunol* 2003b; 50: 263-72.

Spencer TE, Bazer FW. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Front Biosci* 2002; 7: d1879-d98.

Spencer TE, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Animal Reproduction Science* 2004; 82-83: 537-50.

Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC, Palmarini M. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reproduction, Fertility and Development* 2006; 19: 65-78.

Spencer TE, Sandra O, Wolf E. Genes involved in conceptus–endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. 2008; 135: 165.

Spencer TE, Forde N, Dorniak P, Hansen TR, Romero JJ, Lonergan P. Conceptus-derived prostaglandins regulate gene expression in the endometrium prior to pregnancy recognition in ruminants. *Reproduction* 2013; 146: 377.

Spencer TE, Hansen TR. Implantation and Establishment of Pregnancy in Ruminants. In: *Regulation of Implantation and Establishment of Pregnancy in Mammals: Tribute to 45 Year Anniversary of Roger V. Short's "Maternal Recognition of Pregnancy"*. Geisert RD, Bazer FW, eds. Cham: Springer International Publishing 2015: 105-35.

Spencer TE, Forde N, Lonergan P. The role of progesterone and conceptus-derived factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants. *Journal of Dairy Science* 2016; 99: 5941-50.

Staeheli P, Sentandreu M, Pagenstecher A, Hausmann J. Alpha/beta interferon promotes transcription and inhibits replication of borna disease virus in persistently infected cells. *Journal of Virology* 2001; 75: 8216-23.

Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 227-64.

Subramaniam PS, Khan SA, Pontzer CH, Johnson HM. Differential recognition of the type I interferon receptor by interferons tau and alpha is responsible for their disparate cytotoxicities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1995; 92: 12270-4.

Takino T, Okamura T, Ando T, Hagiwara K. Change in the responsiveness of interferon-stimulated genes during early pregnancy in cows with Borna virus-1 infection. *BMC Veterinary Research* 2016; 12: 253.

Talukder A, Yousef M, Rashid M, Awai K, Acosta T, Shimizu T, Okuda K, Shimada M, Imakawa K. Bovine embryo induces an anti-inflammatory response in uterine epithelial cells and immune cells in vitro: Possible involvement of interferon tau as an intermediary. *Journal of Reproduction and Development* 2017; 63

Talukder AK, Rashid MB, Yousef MS, Kusama K, Shimizu T, Shimada M, Suarez SS, Imakawa K, Miyamoto A. Oviduct epithelium induces interferon-tau in bovine Day-4 embryos, which generates an anti-inflammatory response in immune cells. *Sci Rep* 2018; 8: 7850.

Talukder AK, Marey MA, Shirasuna K, Kusama K, Shimada M, Imakawa K, Miyamoto A. Roadmap to pregnancy in the first 7 days post-insemination in the cow: Immune crosstalk in the corpus luteum, oviduct, and uterus. *Theriogenology* 2020; 150: 313-20.

Thatcher WW, Bazer FW, Sharp DC, Roberts RM. Interrelationships between uterus and conceptus to maintain corpus luteum function in early pregnancy: sheep, cattle, pigs and horses. *J Anim Sci* 1986; 62 Suppl 2: 25-46.

Thurmond MC, Branscum AJ, Johnson WO, Bedrick EJ, Hanson TE. Predicting the probability of abortion in dairy cows: a hierarchical Bayesian logistic-survival model using sequential pregnancy data. *Preventive Veterinary Medicine* 2005; 68: 223-39.

Toji N, Shigeno S, Kizaki K, Koshi K, Matsuda H, Hashiyada Y, Imai K, Takahashi T, Ishiguro-Oonuma T, Hashizume K. Evaluation of interferon-stimulated genes in peripheral blood granulocytes as sensitive responders to bovine early conceptus signals. *The Veterinary Journal* 2017; 229: 37-44.

Torpey N, Maher SE, Bothwell AL, Pober JS. Interferon alpha but not interleukin 12 activates STAT4 signaling in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 26789-96.

Vandaele L, Wesselingh W, De Clercq K, De Leeuw I, Favoreel H, Van Soom A, Nauwynck H. Susceptibility of in vitro produced hatched bovine blastocysts to infection with bluetongue virus serotype 8. *Veterinary Research* 2011; 42: 14.

VanRaden PM, Sanders AH, Tooker ME, Miller RH, Norman HD, Kuhn MT, Wiggans GR. Development of a National Genetic Evaluation for Cow Fertility. *Journal of Dairy Science* 2004; 87: 2285-92.

VanRaden PM, Olson KM, Null DJ, Hutchison JL. Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *Journal of Dairy Science* 2011; 94: 6153-61.

Varela M, Schnettler E, Caporale M, Murgia C, Barry G, McFarlane M, McGregor E, Piras IM, Shaw A, Lamm C, Janowicz A, Beer M, Glass M, Herder V, Hahn K, Baumgärtner W, Kohl A, Palmarini M. Schmallenberg Virus Pathogenesis, Tropism and Interaction with the Innate Immune System of the Host. *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003133.

Wagener K, Gabler C, Drillich M. A review of the ongoing discussion about definition, diagnosis and pathomechanism of subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology* 2017; 94: 21-30.

Walker CG, Meier S, Littlejohn MD, Lehnert K, Roche JR, Mitchell MD. Modulation of the maternal immune system by the pre-implantation embryo. *BMC Genomics* 2010; 11: 474.

Wallace RM, Hart ML, Egen TE, Schmelzle A, Smith MF, Pohler KG, Green JA. Bovine pregnancy associated glycoproteins can alter selected transcripts in bovine endometrial explants. *Theriogenology* 2019; 131: 123-32.

Wathes DC, Oguejiofor CF, Thomas C, Cheng Z. Importance of Viral Disease in Dairy Cow Fertility. *Engineering (Beijing, China)* 2020; 6: 26-33.

Williams EJ, Fischer DP, Noakes DE, England GCW, Rycroft A, Dobson H, Sheldon IM. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology* 2007; 68: 549-59.

Wiltbank MC, Baez GM, Garcia-Guerra A, Toledo MZ, Monteiro PLJ, Melo LF, Ochoa JC, Santos JEP, Sartori R. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2016; 86: 239-53.

Winters LM, Green WW, Comstock RE. Prenatal development of the bovine. 1942;

Yamauchi N, Yamada O, Takahashi T, Imai K, Sato T, Ito A, Hashizume K. A Three-dimensional Cell Culture Model for Bovine Endometrium: Regeneration of a Multicellular Spheroid Using Ascorbate. *Placenta* 2003; 24: 258-69.

Young HA, Hardy KJ. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J Leukoc Biol* 1995; 58: 373-81.

Zhao G, Jiang K, Zhang T, Wu H, Qiu C, Deng G. Specific interferon tau gene-regulation networks in bovine endometrial luminal epithelial cells. *Theriogenology* 2018; 105: 51-60.

Zobel R, Tkalić S, Pipal I, Buić V. Incidence and factors associated with early pregnancy losses in Simmental dairy cows. *Animal Reproduction Science* 2011; 127: 121-5.

## VIII. DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Holm Zerbe bedanken, für das Anvertrauen dieses Dissertationsthemas, die Freiheiten es mitzugestalten, die sehr effiziente Zusammenarbeit bei der Erstellung der Publikation, die konstruktiven Gespräche und die Möglichkeit sowohl im Labor als auch im Klinikalltag zu diesem wunderbaren Team gehören zu dürfen. Vielen Dank!

Lieber Frank, als mein Betreuer und Seelsorger ein besonderes Dankeschön für deine kritischen und zielführenden Fragen (auch wenn sie manchmal nicht einfach zu beantworten waren), für deine nie endende Motivation und Kreativität im Labor und für die zahllosen Gummibärchen, die mir jeden schlechten Tag gerettet haben. Frau Meyerholzi, wo soll ich anfangen? Als du mir das erste Mal kurz von diesem Thema erzählt hast, habe ich nicht ahnen können wo die Reise hingeht. Aber ich bin sehr froh, dass wir sie zusammen unternommen haben. Als meine Betreuerin hattest du immer ein offenes Ohr für alle Fragen, Zweifel und Ideen und das zu jeder Tages- und Nachtzeit und in jeder Lebenslage. Danke für dein Vertrauen, deinen unglaublichen Einsatz und vor allem deine Freundschaft!

Marie und Frank, ich schätze mich sehr glücklich euch als meine Betreuer zu haben. Aus tiefstem Herzen: Danke!

Liebe Sandra, mein Laborengel und Telefon-Joker, dir danke ich für deine Geduld, deine Zeit (die du auch gern mit uns am Schlachthof verbracht hast), deine ansteckende Begeisterung für die Laborarbeit, wodurch das Arbeiten mit qTower, PiRo und Experion (fast immer) spielend einfach war, und natürlich für all die schönen Momente ganz weit weg von Klinik- und Laboralltag.

Ein gigantisches Dankeschön an Julia und Anna. Durch euch waren die Schlachthoffahrten ein musikalisches, kulinarisches (Kekse sei Dank) und ab und an auch philosophisches Highlight. Danke für die schönen Stunden an der Lamina,



beim Brotzeitmachen, gegenseitig aufmuntern und TopFM hören. Danke Julia, für deine super Korrekturarbeit (für die ich mich gerne revanchieren will), dein Anfeuern und dass ich irgendwie immer erst mal lachen muss, wenn wir uns im Labor begegnen. Bisher sind wir jeden tiermedizinischen Weg zusammengegangen. Ich warte in der Zielgeraden mit Rotwein und Rockantenne auf voller Lautstärke.

Vielen lieben Dank Elena und Karina für eure bedeutende Unterstützung und Motivation am Schlachthof und im Labor.

Ein besonderes Dankeschön an die gute Seele im 1.Stock. Danke liebe Rita für deine unglaubliche Begabung jedes bürokratische Problem lösen zu können, und dass deine Türe auch für alle anderen Fragen, Probleme und Gespräche offensteht.

An dieser Stelle auch ein großes Dankeschön an alle Mitarbeiter der Klinik für Wiederkäuer. Durch euch ist diese Klinik ein Ort an dem ich mich immer sehr gern aufhalte. Danke für die Aufnahme in dieses super Team!

Vielen Dank an die Ecke, die mir ihre Freundschaft schon seit GMI-Zeiten schenkt. Danke, dass ihr immer noch meine Nummer wählt und mich zu allen Aktivitäten einladet, obwohl ich so oft nicht erreichbar war. Irgendwen vergesse ich schon wieder...Ach ja: Ein riesiges Dankeschön für deine Aufmunterungs- und Ablenkungsversuche und dein Anfeuern während dieser anstrengenden Zeit, und dass ich dich zu meinen Freunden zählen darf. (Du weißt ja, dass du gemeint bist:)

Viktoria, bei dir möchte ich mich besonders bedanken für deine Unterstützung in der Klinik und in Sachen Dissertation, deine sehr wertvolle Freundschaft, und dass du mich aus meinem Alltag holst, um ein bisschen weniger „deutsch“ zu sein.

Liebe Annika, als meine beste und langjährigste Freundin hast du mich stets begleitet, auch während dieser aufregenden Dissertationszeit. Danke für deine ansteckend gute Laune, deine immer hilfreichen Ratschläge, deinen Korrektorendspurt und deine unendliche Freundschaft.

Als letztes möchte ich mich bei meiner kleinen, aber sehr wertvollen Familie bedanken. Danke an meine Eltern Angi und Michael und an meine Schwester Sandi, für all die Jahre der Unterstützung, dass ihr immer an mich glaubt und für euren hoffnungslosen Optimismus, ohne den ich nicht da wäre wo ich jetzt bin. Danke, dass ich mit euch nie das Gefühl von Dahoam verliere. Danke Alex, dass du seit so vielen Jahren an meiner Seite bist, jede Berg- und Talfahrt des Lebens mit mir teilst und für deine Motivation immer weiter zu gehen, auch wenn ich manchmal vor lauter Ravioli die Pasta nicht mehr sehe. Danke für dein seelentröstendes Essen (weil mit vollem Bauch denkt es sich besser), deine kritischen Fragen und Anregungen zur Dissertation, deine immer ehrlichen Worte, deine Freundschaft und am aller meisten für deine Liebe.