Analyse der Zelltyp-spezifischen Genexpression im Endometrium während der initialen Erkennung der Trächtigkeit bei der Stute

A. Rudolf Vegas[1,2,3], G. Podico[4], I. F. Canisso[4], N. Borel[5], C. Almiñana[2,3,6], H. Bollwein[1,3], S. Bauersachs[2,3]

[1]Klinik für Reproduktionsmedizin, Vetsuisse Fakultät, Universität Zürich, Zürich (Schweiz); [2]Institut für Veterinäranatomie, Vetsuisse Fakultät, Universität Zürich, Zürich (Schweiz); [3]AgroVet-Strickhof, Lindau (Schweiz); [4] Department of Veterinary Clinical Medicine, College of Veterinary Medicine, University of Illinois, Urbana, (Illinois, USA)*; [5]Institut für Veterinärpathologie, Vetsuisse Fakultät, Universität Zürich, Zürich (Schweiz); [6]UMR85 PRC, INRA, CNRS 7247, Université de Tours, IFCE, Nouzilly (Frankreich)*

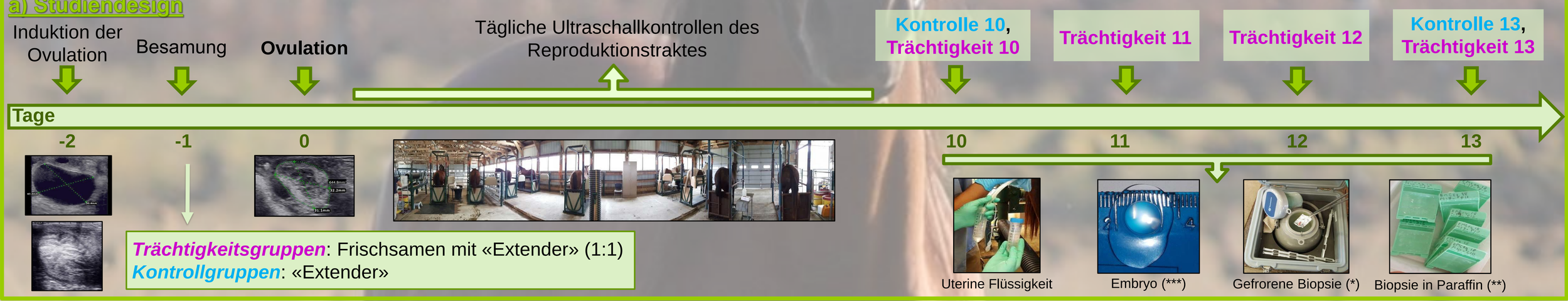
1. Einleitung und Ziel der Studie

Bei einem normalen Zyklus der Stute kommt es zwischen den Tagen 14 und 16 nach der Ovulation zur Regression des Gelbkörpers. Bei Vorliegen einer Gravidität muss der Embryo seine Anwesenheit vor Tag 14 *post ovulationem* signalisieren, um den Gelbkörper und damit die Produktion von Progesteron aufrecht zu erhalten. Bei der Stute sind diese noch nicht ausreichend erforscht. Der Embryo wandert vom Zeitpunkt der Ankunft im Uterus am Tag 6 bzw. 7 (Ankunft im Uterus) bis zum Tag 16 ständig im gesamten Uterus umher (Rivera del Alamo, Reilas et al. 2008) und sezerniert dabei Östrogene (Raeside, Christie et al. 2004), Prostaglandin E2 (Stout and Allen 2002), 17α-Hydroxyprogesteron (Goff, Leduc et al. 1993) und Delta-Interferone. Diese Substanzen tragen zur Verhinderung der Luteolyse bei.

Unser **Ziel** war es, die durch die Anwesenheit des Embryos im Uterus der Stute ausgelösten Änderungen der Genexpression in verschiedenen Zelltypen des Endometriums im Vergleich zu zyklischen Stuten genauer zu untersuchen.

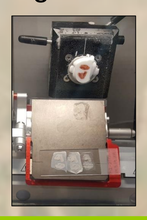
2. Methodik

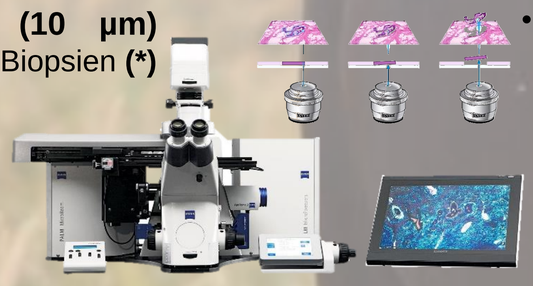
a) Studiendesign



b) Isolierung der wichtigsten Zelltypen

- **Kryoschnitte (10 µm)** von gefrorenen Biopsien **(*)**





- **Laser Capture Microdissection (LCM)** von den wichtigsten Zelltypen aus den Schnitten: Luminales Epithel (LE), Drüsenepithel (DE), Stroma mit Blutgefässen (ST)

c) RNA-Extraktion, Quantifizierung and Qualitätskontrolle:

- RNA Isolierung mit **PicoPure™ RNA Isolation Kit** (Arcturus)
- RNA Quantifizierung und Qualitätskontrolle mit **Agilent Bioanalyzer RNA 6000 Pico Assay (Agilent Technologies)**

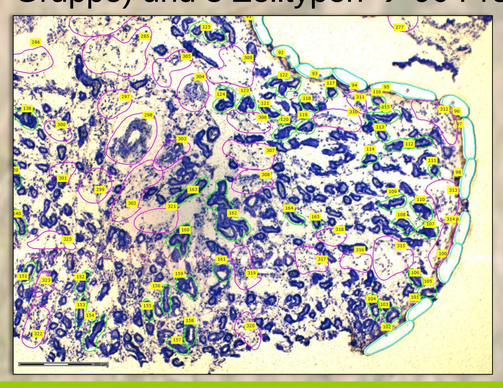
d) Vorbereitung von RNA-Seq Libraries mit **Ovation® Solo RNA-Seq System (NuGEN)**

e) Sequenzierung von **RNA-Seq Libraries (HiSeq 2500, Illumina)**

3. Ergebnisse und Schlussfolgerung

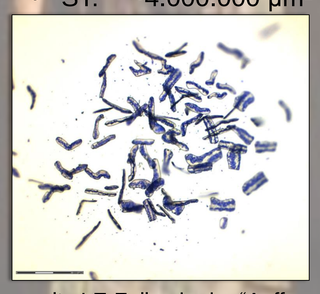
LCM aus den gesammelten Biopsien:

LCM von 30 Biopsien (5 Replikate per Gruppe) und 3 Zelltypen → 90 Proben



Mittlere Arealgrösse der gesammelten Zellen:

- LE: ~ 730.000 µm²
- DE: ~ 690.000 µm²
- ST: ~4.000.000 µm²



Gesammelte LE-Zellen in der “Auffangkappe”

Schlussfolgerung

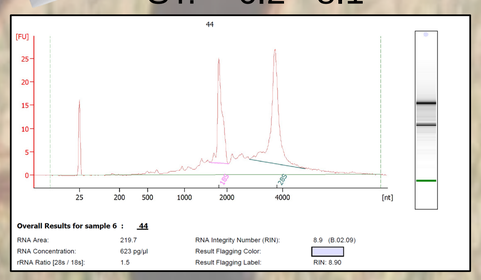
RNA-seq Daten werden die Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelltypen in trächtigen, sowie zyklischen Stuten hervorheben und zeigen, wo die grössten Änderungen der Genexpression im Endometrium als Antwort auf die Anwesenheit des Konzeptus erfolgen.

Isolierung von RNA:

RNA Qualität

(RIN= RNA Integrity Number)

- LE: 6.9 - 8.9
- DE: 7.1 - 8.8
- ST: 6.2 - 8.1



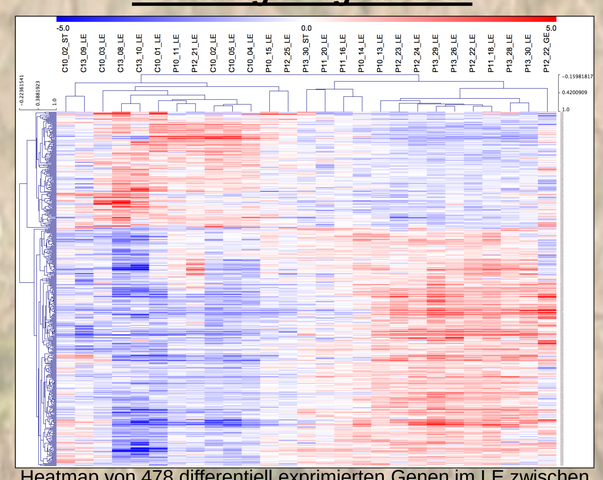
RNA Konzentration [pg/µl]

- LE: 290-1626 (mean=779.4)
- DE: 304-1386 (mean=837.4)
- ST: 387-1337 (mean=736.4)

Erstellung von 90 low-input RNA-seq libraries

Die RNA-Sequenzierung der 90 verschiedenen LCM-Proben ist noch nicht abgeschlossen.

Vorläufige Ergebnisse



Heatmap von 478 differentiell exprimierten Genen im LE zwischen zyklischen Kontrollen und trächtigen Stuten (“false discovery rate”:1%; rot: hochreguliert, blau: runterreguliert).

4. “Take Home Message” und Outlook

Die Ergebnisse dieser Studie werden dazu beitragen, die Mechanismen der maternalen Erkennung der Trächtigkeit in der Stute besser zu verstehen.

- Identifizierung von Schlüsselgenen und molekularen Pathways als Beitrag zur Verbesserung der Pferdezucht
- Grundlage für die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien zur Erhöhung derTrächtigkeitsraten von subfertilen Stuten

Nächste Schritte:

- Validierung der Ergebnisse durch **Immunohistochemie und In Situ Hybridisierung** anhand der in Paraffin eingebetteten Biopsien (**) für ausgewählte Gene
- **Genexpression** der **Embryonen** (***)

5. Literatur

[1] Rivera del Alamo MM, Reilas T, Kindahl H, Katila T. Mechanisms behind intrauterine device-induced luteal persistence in mares. Animal Reproduction Science. 2008.
[2] Raeside JI, Christie HL, Renaud RL, Waelchli RO, Betteridge KJ. Estrogen Metabolism in the Equine Conceptus and Endometrium During Early Pregnancy in Relation to Estrogen Concentrations in Yolk-Sac Fluid1. Biology of Reproduction. 2004.
[3] Stout T, Allen W. Prostaglandin E(2) and F(2 alpha) production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and dioestrous mares. Reproduction. 2002.
[4] Goff AK, Leduc S, Poitras P, Vaillancourt D. Steroid synthesis by equine conceptuses between days 7 and 14 and endometrial steroid metabolism. Domestic Animal Endocrinology. 1993.

PRO PFERD STIFTUNG VEREIN

FNSNF Swiss National Science Foundation