

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Sexualzyklus der Kuh

Der Zyklus der Kuh dauert durchschnittlich 21 Tage und tritt regelmäßig über das gesamte Jahr hinweg auf. Ein Zyklus umfasst 2-3 Follikelreifungswellen und wird in die folgenden Phasen eingeteilt: postovulatorische Phase (Metöstrus), Lutealphase (Diöstrus) und präovulatorische Phase (Proöstrus).

Die Ovulation findet etwa 30 Stunden nach Einsetzen der Brunst statt. Der Tag der Ovulation wird als Tag 1 des Zyklus definiert und steht damit am Beginn der postovulatorischen Phase, die am Tag 5 des Zyklus endet. Die postovulatorische Phase ist somit die Zyklusphase zwischen dem Ende der Brunst und dem Beginn der Lutealphase. An der Ovulationsstelle bildet sich das Corpus luteum, das sukzessiv Progesteron bildet und dadurch den Progesteronspiegel im Blut ansteigen lässt.

Die Progesteron-dominierte Lutealphase (Tag 6-18) ist die Zeit der sexuellen Ruhe. Das Corpus luteum und der Blutprogesteronspiegel erreichen ihr Maximum an Tag 10 und bleiben dominierend. Sofern kein Trächtigkeitssignal vom Embryo vorliegt, wird ab Tag 17 vom Endometrium  $\text{PGF}_{2\alpha}$  gebildet, das über ein Counter current System in die Arteria ovarica und so zum Corpus luteum gelangt.  $\text{PGF}_{2\alpha}$  wirkt luteolytisch und leitet somit die Regression des Corpus luteum ein. Dadurch sinkt der Progesteronspiegel im Blut.

Die präovulatorische Phase entspricht Tag 19-21 des Zyklus. In dieser Phase wird im Hypothalamus verstärkt GnRH produziert, das über das Portalgefäßsystem in den Hypophysenvorderlappen gelangt. Dort stimuliert es die Sekretion von LH und FSH, die über den Blutweg zum Ovar transportiert werden. LH stimuliert die Thekazellen des Follikels zur Bildung von Androgenen, die in die Granulosazellen diffundieren. Die Androgene werden dort unter FSH-Einfluss von der Aromatase in Östradiol umgewandelt. Der Östradiolspiegel im Blutserum steigt zu diesem Zeitpunkt an. Das Corpus luteum hat sich zu diesem Zeitpunkt bereits zurückgebildet.

Das Östradiol des Graafschen Follikels löst über ein positives Feedback auf die LH-produzierenden Zellen im Hypophysenvorderlappen den präovulatorischen LH-Peak aus, der zur Ovulation führt. Die Brunst dauert nur wenige Stunden (15-18 Stunden) und tritt ca. am Tag 21 des Zyklus auf. Es sind die typischen Brunstsymptome zu erkennen wie z.B. Brüllen, Duldung, Unruhe, Brunstschleim, Aufspringen auf andere Tiere, Rötung und Schwellung der Vulva.

## 2.2 Das bovine Ovidukt

### 2.2.1 Anatomie und Histologie

Das Ovidukt ist ein bilateral symmetrisch angelegtes schlauchförmiges Hohlorgan. Es beginnt am Ovar und schlängelt sich in seinem Gekröse, der Mesosalpinx, bis zur Uterushornspitze, in die es mündet. Das im gestreckten Zustand 21-28 cm lange Ovidukt wird in 3 Abschnitte eingeteilt.

- Das trichterförmige **Infundibulum** ist zur Bauchhöhle offen und stellt das kraniale Anfangsstück dar. Seine Ränder tragen unregelmäßige Fortsätze, die Fimbrien.
- Der nachfolgende erweiterte Oviduktabschnitt ist die **Ampulle**. Sie macht zwei Drittel der Gesamtlänge des Ovidukts aus.
- Der **Isthmus** ist der stark geschlängelte Endabschnitt mit sehr kleinem Lumen, der in die Uterushornspitze mündet und das letzte Drittel der Gesamtlänge einnimmt.

Histologisch ist das Ovidukt aus folgenden Schichten aufgebaut: Tunica mucosa, Tunica muscularis, Tela subserosa und Tunica serosa (Abbildung 1).

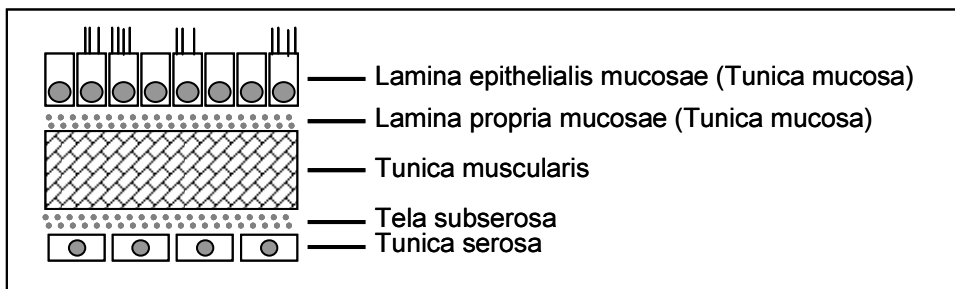


Abbildung 1: **Schematische Darstellung des Oviduktwandbaus.**

Die Tunica mucosa besteht aus der Lamina epithelialis und der lockeren zellreichen Bindegewebsschicht, Lamina propria mucosae. Die Lamina epithelialis ist ein einschichtiges hochprismatisches Epithel, das vorwiegend aus Flimmer- und Drüsenzellen besteht. Die Flimmerzellen tragen Kinozilien, die durch rhythmische Bewegungen den Flüssigkeitsstrom im Ovidukt unterstützen. Die mikrovillitragenden Drüsenzellen sezernieren ihre Produkte durch Exozytose in das Oviduktlumen. Die Sekretionsmenge ist zyklusabhängig, die höchste Oviduktfluidproduktion liegt während des Östrus vor. Die Anzahl der Flimmerzellen bei der Kuh unterliegt keinen zyklischen Veränderungen. In der Lamina epithelialis gibt es in geringer Zahl noch Stiftchenzellen und kleine basale Zellen. Die Stiftchenzellen sind nach Sekretabgabe inaktive Drüsenzellen, die basalen Zellen sorgen für den Zellersatz.

Die Tunica muscularis besteht aus glatten Muskelzellen, die in links- und rechtswindenden Spiralen angeordnet sind. Im Infundibulum und in der Ampulle ist die Muscularis sehr dünn, zum Uterus hin wird sie immer stärker, sodass der Isthmus eine sehr starke Muscularis besitzt. Es folgt die gefäßreiche Tela subserosa, die bauchhöhlenseits von der einschichtigen Tunica serosa bedeckt wird, die strukturell dem Peritoneum gleicht.

### **2.2.2 Funktion des Ovidukts**

Nach der Aufnahme der ovulierten Oozyte durch das Infundibulum wird die Oozyte durch den vorderen Teil der Ampulle überwiegend mittels Zilienschlag und später vor allem durch Muskelkontraktionen weiter transportiert. Der Eizelltransport durch die Ampulle des bovinen Ovidukts dauert etwa 8-10 Stunden. Das Sekret des Ovidukts übernimmt die Ernährung der Oozyte und der Spermien und unterstützt deren finale Reifung.

Die Oozyte ist etwa 6-24 Stunden befruchtungsfähig und dies findet im Allgemeinen am Übergang von der Ampulle in den Isthmus statt. Dort verweilt die Zygote dann etwa 2,5-3 Tage und vollzieht die ersten Zellteilungen. Nicht befruchtete Oozyten degenerieren schnell und werden resorbiert. Die Oviduktflüssigkeit bietet zu diesem Zeitpunkt die optimale Umgebung für die Befruchtung und die frühe embryonale Entwicklung. Die Verweildauer der befruchteten Oozyte im Ovidukt beträgt insgesamt 4 Tage. Der lange Aufenthalt im Ovidukt resultiert aus der vorübergehenden Kontraktion des Isthmus, der den Eintritt der Oozyte in den Uterus verhindert. 72-168 Stunden nach der Ovulation weitet sich der Isthmus und erlaubt dem Embryo zu passieren, worauf dieser schnell in den Uterus transportiert wird. Beim Eintritt in den Uterus besteht der Embryo aus 8-16 Zellen.

Eine weitere wichtige Funktion des Ovidukts ist die Speicherung der Spermien im kaudalen Teil des Isthmus, wo sie bis zu 17 Stunden verbleiben. Dieser Vorgang ist für die Befruchtungsfähigkeit der Spermien ausschlaggebend. Spermien, die die Ampulle erreichen ohne vorher mindestens 8 Stunden im Isthmus gespeichert worden zu sein, verlieren ihre Befruchtungsfähigkeit. Es besteht eine gut regulierte Kommunikation zwischen dem Ovidukt und den Spermien. Die Spermien, die sich nach der Ovulation im ipsilateralen Ovidukt befunden haben, zeigten einen wesentlich höheren Anteil an Akrosomreaktionen, was für die Befruchtungsfähigkeit entscheidend ist (Ellington, 1991).

### **2.3 Prostaglandine**

Prostaglandine gehören zu den Eicosanoiden und sind auto- oder parakrine Mediatoren, die in einer Vielzahl von Zellen und Geweben vorkommen. Sie sind unter anderem an der Apoptose, der Zelldifferenzierung, der Onkogenese, der Inflammation, der Angiogenese und hauptsächlich bei der Relaxation und Dilatation glatter Muskelzellen beteiligt (Narumiya et al., 1999; Morita, 2002). Prostaglandine spielen als bioaktive Lipide auch bei sehr vielen Prozessen im weiblichen Reproduktionstakt eine wichtige Rolle, wie z.B. Zyklusregulation, Ovulation, Befruchtung, Implantation, Zervixdilatation, Uterustonius und Kontraktionen des Myometriums (Kniss, 1999; Saito et al., 2002; Tanabe und Tohnai, 2002) und dem Transport der Gameten und des Embryos (Wijayagunawardane und Miyamoto, 2004).

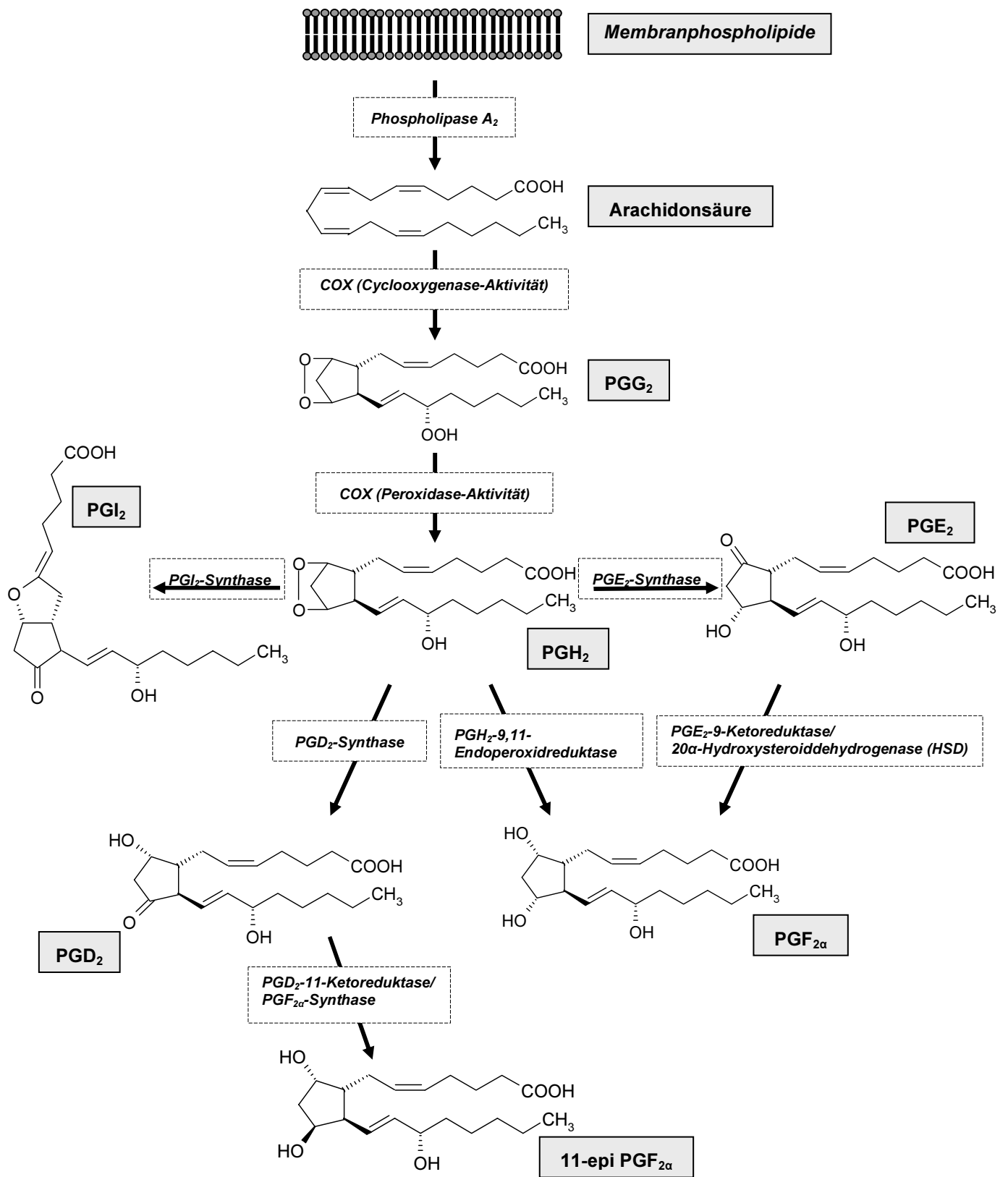


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Prostaglandinsynthese im Tier.

Diverse physiologische und pathologische Stimuli bewirken die Initiation der Prostaglandinsynthese (Narumiya und FitzGerald, 2001). Die Prostaglandine werden sofort nach ihrer Synthese von der Zelle freigesetzt (Narumiya et al., 1999), wobei dieser Transport mittels eines Prostaglandin-Transporters erfolgt (Sales und Jabbour, 2003). Aufgrund ihrer chemischen und/oder metabolischen Instabilität wird angenommen, dass Prostaglandine nur in der Umgebung ihrer Synthese als lokale Kurzzeithormone wirken (Needleman und Isakson, 1997; Tsuboi et al., 2002).

Prostaglandine bestehen aus einem Cyclopentanring und zwei daran gebundenen Seitenketten (Abbildung 2). Anhand ihrer Modifizierung am Cyclopentanring werden die natürlich vorkommenden Prostaglandine in die Typen D<sub>2</sub> bis I<sub>2</sub> klassifiziert (Narumiya et al., 1999). Dabei sind die Typen G<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> die instabilen Zwischenprodukte der Cyclooxygenasereaktionen, die enzymatisch durch spezifische Prostaglandinsynthasen weiter in die natürlich vorkommenden Typen D<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>, F<sub>2α</sub> und I<sub>2</sub> umgesetzt werden (Scholz, 2003). Das Ausgangsprodukt der Prostaglandinsynthese ist immer eine mehrfach ungesättigte C<sub>20</sub>-Fettsäure (Scholz, 2003; Goff, 2004). In den meisten Tierarten handelt es sich dabei um die Arachidonsäure als die wichtigste Vorstufe der Prostaglandine. Arachidonsäure ist im veresterten Zustand in den Phospholipidmembranen der Zellen gespeichert (Goff, 2004). Die Prostaglandinsynthese beginnt mit der Freisetzung von Arachidonsäure aus Membranphosphoglyceriden vermittelt durch Phospholipasen (Needleman und Isakson, 1997). Der nächste Schritt ist die Umwandlung der Arachidonsäure in das instabile PGH<sub>2</sub> über das Zwischenprodukte PGG<sub>2</sub> und nachfolgend in die verschiedenen Prostaglandine (Kniss, 1999; Goff, 2004).

Die vielfältigen Wirkungen der verschiedenen Prostaglandine können durch die große Anzahl unterschiedlicher Rezeptoren erklärt werden (Dubois et al., 1998). Die von der Zelle sezernierten Prostaglandine wirken auto- und parakrin über Oberflächenrezeptoren. Diese befinden sich in den Plasmamembranen der verschiedensten Gewebe (Coleman et al., 1994). Jedes natürlich auftretende Prostaglandin hat mindestens einen spezifischen Rezeptor (Coleman et al., 1994). Die Wirkungen von PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> und PGI<sub>2</sub> werden über ihre jeweiligen spezifischen Rezeptoren DP, EP, FP und IP vermittelt (Ushikubi et al., 2000). Dabei handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren vom Rhodopsintyp mit sieben Transmembrandomänen (Tsuboi et al., 2002). Jeder Rezeptor ist durch ein eigenes Gen kodiert (Narumiya und FitzGerald, 2001) und weist eine selektive Ligandenbindungsspezifität auf, die ihn von den anderen Rezeptoren unterscheidet (Narumiya et al., 1999). Die Prostaglandinrezeptoren hat man anhand ihrer Signaltransduktion und Wirkung in drei Kategorien eingeteilt: relaxierende, kontraktile und inhibitorische Rezeptoren. Die relaxierenden Rezeptoren bewirken einen cAMP-Anstieg und induzieren die Relaxation von glatten Muskelzellen. Dagegen mobilisieren die kontraktile Rezeptoren Ca<sup>2+</sup>-Ionen und lösen die Kontraktion glatter Muskelzellen aus. Die inhibitorischen Rezeptoren senken den cAMP-Spiegel und verhindern damit die Relaxation der glatten Muskelzellen (Narumiya et al., 1999; Narumiya und FitzGerald, 2001). Das

---

Gleichgewicht gegensätzlich wirkender Prostaglandine beeinflusst nachhaltig viele Prozesse wie beispielsweise die Regulation des Blutdrucks, der Blutgerinnung, des Schlafs, der Wehentätigkeit und des Entzündungsgeschehens (Helliwell et al., 2004).

### 2.3.1 Phospholipasen A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)

Arachidonsäure ist im veresterten Zustand in den Phospholipiden der Zellmembranen gespeichert. Den ersten Schritt der Prostaglandinsynthese übernimmt PLA<sub>2</sub>, welche die direkte Abspaltung der Arachidonsäure vom C2-Atom der Membranphosphoglyceride katalysiert (Clark et al., 1995). Diese Fähigkeit wird im Weiteren als PLA<sub>2</sub>-Aktivität bezeichnet.

Die Freisetzung von Arachidonsäure kann durch 3 Gruppen von PLA<sub>2</sub>s erfolgen. Die PLA<sub>2</sub>s werden eingeteilt in Ca<sup>2+</sup>-abhängige sekretorische PLA<sub>2</sub>s (sPLA<sub>2</sub>), cytosolische PLA<sub>2</sub>s (cPLA<sub>2</sub>) und Ca<sup>2+</sup>-unabhängige intrazelluläre PLA<sub>2</sub>s (iPLA<sub>2</sub>) (Chakraborti, 2003). Den Hauptanteil zur Arachidonsäurefreisetzung tragen cPLA<sub>2</sub> und sPLA<sub>2</sub> bei (Morita, 2002).

Es sind 10 verschiedene sPLA<sub>2</sub>-Enzyme bekannt, deren Größe von 14-19 kDa reicht (Lappas und Rice, 2004). Sie sind gekennzeichnet durch eine sehr starre Tertiärstruktur mit 5-8 Disulfidbrücken, die ihnen Stabilität gegen Proteolyse und somit eine gewisse Resistenz gegen Denaturierung verleiht (Chakraborti, 2003). Ihnen ist eine hochkonservierte katalytische Domäne und ein Ca<sup>2+</sup>-Bindungsloop gemein (Murakami und Kudo, 2002). Viele Eicosanoid-produzierende Zellen synthetisieren und sezernieren sPLA<sub>2</sub>. Sezernierte sPLA<sub>2</sub> assoziiert mit der äußeren Oberfläche der Zellen und setzt dort Arachidonsäure frei (Chakraborti, 2003). Die Mitglieder der sPLA<sub>2</sub> Familie haben die einzigartige Eigenschaft, die transzelluläre Prostaglandinsynthese zu fördern. Das von einer Zelle synthetisierte sPLA<sub>2</sub> wirkt autokrin sowie auf die benachbarte COX-exprimierende Zelle (parakrin) und steigert damit deren Prostaglandinsynthese. Die Phospholipasen sPLA<sub>2</sub> IB und IIA sind in den verschiedenen Geweben weitverbreitet und ausreichend vorhanden, während die anderen sPLA<sub>2</sub>s nur in bestimmten Geweben und in sehr geringen Mengen vorkommen (Kudo und Murakami, 2002).

Die cPLA<sub>2</sub>-Enzyme wurden in der cytosolischen Fraktion von praktisch allen Zelltypen gefunden (Chakraborti, 2003). Die Gruppe der cPLA<sub>2</sub>-Enzyme besteht aus den Isozymen cPLA<sub>2</sub>α, cPLA<sub>2</sub>β und cPLA<sub>2</sub>γ. Die Bezeichnung cytosolisch ist allerdings nicht ganz korrekt, da cPLA<sub>2</sub>α nach der Aktivierung eine Translokalisierung durchmacht und cPLA<sub>2</sub>γ konstitutiv membrangebunden ist (Kudo und Murakami, 2002). cPLA<sub>2</sub>-Enzyme haben zwei katalytische Domänen, von denen nur eine für die Lipaseaktivität verantwortlich ist. cPLA<sub>2</sub>α und cPLA<sub>2</sub>β haben außerdem eine N-terminale C2 Domäne, die die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Assoziation mit Phospholipidmembranen vermittelt (Murakami und Kudo, 2002).

cPLA<sub>2</sub>α wird in den meisten Zellen und Geweben ubiquitär und konstitutiv exprimiert (Murakami und Kudo, 2002). Es hat eine Größe von 85 kDa und spielt eine zentrale Rolle in der stimulus-induzierten zellulären Arachidonsäurefreisetzung und verteilt diese an die

Cyclooxygenasen (Kudo und Murakami, 2002). Bei entsprechenden Stimuli findet eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Translokalisierung von  $\text{cPLA}_2\alpha$  vom Cytosol zu den perinukleären Membranen (Golgi, endoplasmatisches Retikulum, Kernhülle) statt. Diese räumlich-zeitliche Lokalisierung gestattet eine effiziente funktionelle Kopplung zwischen  $\text{cPLA}_2\alpha$  und den „Downstream“-Enzymen der Eicosanoidsynthese.

$\text{cPLA}_2\beta$  ist 110 kDa groß und spaltet sowohl am C1- als auch C2-Atom der Membranphosphoglyceride, wobei die Position des C1-Atoms bevorzugt wird. Die 60 kDa große membrangebundene  $\text{cPLA}_2\gamma$  hat keine C2-Domäne und zeigt daher eine  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige katalytische Aktivität (Kudo und Murakami, 2002).  $\text{cPLA}_2\beta$  und  $\text{cPLA}_2\gamma$  sind ebenfalls ubiquitär in verschiedenen Geweben exprimiert (Kudo und Murakami, 2002). Ihre zellulären Funktionen sind noch ungeklärt.

Knock-out Studien zeigten, dass  $\text{cPLA}_2^{-/-}$  Mäuse ähnliche bzw. identische Fertilitätsdefekte aufweisen wie COX-1 und COX-2 defiziente Mäuse (Chakraborti, 2003). Die  $\text{cPLA}_2\alpha^{-/-}$  Mäuse wurden seltener trächtig und lieferten geringere Wurfgrößen mit normalerweise toten Jungtieren, außerdem setzten die Wehen verspätet ein (Kudo und Murakami, 2002).

### 2.3.2 Cyclooxygenasen (COX)

Arachidonsäure wird im nächsten Schritt der Prostaglandinsynthese den Cyclooxygenasen zur Verfügung gestellt. COX (auch  $\text{PGH}_2$ -Synthasen (PGHS) genannt) sind homodimere hämenthaltende Glycoproteine, die zwei katalytische Zentren besitzen (Smith et al., 1996). Wie in Abbildung 2 skizziert, katalysieren sie als Schlüsselenzyme der Prostaglandinsynthese die Umwandlung von Arachidonsäure in  $\text{PGH}_2$  (Tanabe und Tohnai, 2002). Dieser Vorgang besteht aus 2 chemischen Reaktionen: der Bis-oxygenierung von Arachidonsäure in  $\text{PGG}_2$  und der nachfolgenden Reduktion der 15-Hydroxyperoxidgruppe des  $\text{PGG}_2$  zu  $\text{PGH}_2$  (Garavito et al., 2002). Das instabile  $\text{PGH}_2$  ist die Vorstufe aller Prostaglandine und wird durch spezifische Prostaglandinsynthasen in  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und  $\text{PGI}_2$  umgewandelt (Dubois et al., 1998).

Es gibt zwei Isoformen der Cyclooxygenasen: COX-1 und COX-2 (Tanabe und Tohnai, 2002). Die beiden Cyclooxygenasen sind in unterschiedlichen Genen, die auf verschiedenen Chromosomen liegen, kodiert (Smith et al., 1996). Dennoch sind sie sich strukturell relativ ähnlich und weisen in derselben Tierspezies eine 60-65%ige Sequenzhomologie auf (Garavito et al., 2002).

Die beiden Cyclooxygenasen unterscheiden sich zusätzlich in ihrer Aktivität. Während die Arachidonsäure in der Sofortantwort gleichmäßig an beide Cyclooxygenasen verteilt wird, wird sie in der verzögerten Antwort hingegen lediglich COX-2 zur Verfügung gestellt (Chakraborti, 2003). Bei Zellkulturversuchen wurde gezeigt, dass COX-2 bei Arachidonsäurekonzentrationen unter 10  $\mu\text{M}$  wesentlich aktiver war als COX-1, das unter diesen Bedingungen nur eine sehr geringe Aktivität aufwies. Bei höheren Konzentrationen stieg die COX-1 Aktivität jedoch stark an und war dann wesentlich höher als die von COX-2.

Obwohl die COX-2 Aktivität mit steigenden Arachidonsäurekonzentrationen kontinuierlich zunahm, war sie aber bei hohen Konzentrationen verglichen mit der COX-1 Aktivität viel geringer (Murakami et al., 1999).

#### 2.3.2.1 COX-1

Das COX-1 kodierende Gen ist 22 kb groß und enthält 11 Exons (Smith et al., 1996), dabei hat das mRNA Transkript eine Größe von 2,8 kb (Kniss, 1999). COX-1 ist ein etwa 70 kDa großes Glycoprotein bestehend aus 576 Aminosäuren (Tanabe und Tohnai, 2002). Es handelt sich um ein integrales Protein, welches in der Membran des endoplasmatischen Retikulums, aber auch in der Kernmembran lokalisiert ist (Smith et al., 1996). Seine Hauptfunktion ist es,  $\text{PGH}_2$  für die homöostatische Regulation der Prostaglandinsynthese zur Verfügung zu stellen (Dubois et al., 1998). Es wird als Housekeeping-Gen bezeichnet, da es am 5'-Ende nur wenige Transkriptionsstartstellen aufweist und keine TATA-Box enthält (Morita, 2002).

Normalerweise ist die mRNA- und Proteinexpression von COX-1 in den meisten Geweben und Zellarten sehr konstant und unterliegt keinen starken Schwankungen (Morita, 2002). Sein Einfluss auf die physiologischen Reproduktionsvorgänge wurde anhand von Knock-out-Studien demonstriert: COX-1 defiziente Mäuse waren zwar fruchtbar (Saito et al., 2002), Paarungen von COX-1 defizienten Mäusen führten jedoch zu einer geringeren Anzahl an Lebendgeburten (Morita, 2002). Zwar lieferten COX-1 defiziente Mäuse normal große Würfe, sie hatten jedoch Schwierigkeiten beim Geburtsvorgang, da das Einsetzen der Wehen verzögert war (Gross et al., 1998). Die Applikation von exogenem  $\text{PGF}_{2\alpha}$  löste das Einsetzen des Geburtsvorgangs jedoch aus, was die übergeordnete Rolle von COX-1 in der Regulation der  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthese verdeutlicht (Smith und Langenbach, 2001). COX-1 scheint für die frühen Reproduktionsprozesse wie Befruchtung und frühe Embryonalentwicklung nicht entscheidend zu sein.

#### 2.3.2.2 COX-2

Das COX-2 kodierende Gen ist 8 kb groß und enthält 10 Exons (Smith et al., 1996). COX-2 ist ein 72-74 kDa großes Glycoprotein (Kniss, 1999), das vor Abspaltung seiner Signalsequenz aus 604 Aminosäuren besteht (Tanabe und Tohnai, 2002). Es handelt sich um ein induzierbares, integrales Protein, das sowohl in der Membran des endoplasmatischen Retikulums als auch in der Kernmembran vorkommt. Dabei ist COX-2 stärker im Kern konzentriert als COX-1 (Smith et al., 1996). COX-2 ist in den meisten Geweben nur sehr gering oder gar nicht exprimiert, seine Synthese kann jedoch unter einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Bedingungen induziert werden (Regan, 2003). Die Induzierbarkeit der COX-2 Expression lässt sich durch zahlreiche regulatorische Elemente in der 5'-Region des COX-2 kodierenden Gens erklären (Morita, 2002). Dabei kann die Induktion durch verschiedenste Faktoren ausgelöst werden wie z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone und mechanischen Stress (Morita, 2002; Tanabe



und Tohnoi, 2002). COX-2 hat eine Halbwertszeit von 30 Minuten und ist somit weniger stabil als COX-1 (Otto und Smith, 1995). Eine entscheidende Rolle spielt COX-2 bei frühen Ereignissen der Reproduktion. Dies zeigte sich anhand der Beobachtungen, dass weibliche COX-2 defiziente Mäuse infertil waren und eine gestörte Ovulation, Befruchtung und Implantation aufwiesen (Lim et al., 1997). Diese Störungen konnten durch die Applikation von PGE<sub>2</sub> beseitigt werden (Davis et al., 1999).

### **2.3.3 PGE<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub>-Synthasen (cPGES; mPGES-1; mPGES-2)**

PGE<sub>2</sub> ist das im Körper am weitesten verbreitete Prostaglandin. Neben seiner Funktion als Entzündungsmediator spielt es eine entscheidende Rolle bei den Schlüsselprozessen der weiblichen Reproduktion wie der Ovulation und der Befruchtung (Murakami et al., 2002). Außerdem vermittelt PGE<sub>2</sub> die im Ovidukt stattfindende Cumulusexpansion, die für eine erfolgreiche Befruchtung unabkömmlich ist (Ushikubi et al., 2000). PGE<sub>2</sub> könnte ebenfalls eine wichtige Rolle beim Transport der Gameten und des Embryos spielen, denn im humanen Ovidukt inhibiert es die Kontraktion der zirkulären Muskelzellen und stimuliert die Muskelzellen der longitudinalen Muskelschicht (Lindblom et al., 1983).

In Abbildung 2 wird gezeigt, dass PGE<sub>2</sub>-Synthasen die Umsetzung von PGH<sub>2</sub> zu PGE<sub>2</sub> katalysieren (Regan, 2003). Es gibt drei verschiedene PGE<sub>2</sub>-Synthasen: eine cytosolische (cPGES) und zwei membrangebundene (mPGES-1/-2) (Regan, 2003).

cPGES ist ein 23 kDa großes cytosolisches Protein, das ubiquitär und konstitutiv exprimiert wird. Es benötigt GSH als essentiellen Kofaktor (Murakami et al., 2002). Das sich überwiegend im Cytosol befindliche cPGES verändert nach Ca<sup>2+</sup>-Ionenaustausch seine Lage ins endoplasmatische Retikulum, wo es mit COX-1 kolokalisiert ist. Es konnte gezeigt werden, dass cPGES mit COX-1 funktionell gekoppelt ist und nur von COX-1 stammendes PGH<sub>2</sub> in PGE<sub>2</sub> umwandeln kann (Tanioka et al., 2000; Murakami et al., 2002). So ist cPGES für die PGE<sub>2</sub>-Synthese zur Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase verantwortlich (Murakami et al., 2002). Die cPGES Expression ist relativ unempfindlich gegenüber Stimuli (Helliwell et al., 2004).

Die membrangebundene mPGES-1 ist 14-18 kDa groß und zeigt eine signifikante Homologie mit den Mitgliedern der MAPEG Superfamilie (Membranassoziierte Proteine des Eicosanoid und Glutathion Metabolismus) (Murakami et al., 2002). Es handelt sich um ein induzierbares Enzym (Regan, 2003), das GSH als essentiellen Kofaktor für seine Aktivität benötigt (Murakami et al., 2002). Stimulationsversuche in einer Reihe biologischer Systeme zeigten eine synchrone Hochregulation von mPGES-1 und COX-2 begleitet von einem PGE<sub>2</sub>-Anstieg, was auf eine Kopplung von mPGES-1 und COX-2 hindeutet (Helliwell et al., 2004). Die Kolokalisation von COX-2 und mPGES-1 im selben subzellulären Kompartiment (perinukleäre Membran) erlaubt außerdem einen sehr effizienten Transfer des instabilen PGH<sub>2</sub> zwischen den beiden Enzymen (Murakami et al., 2002). Eine Kopplung von COX-1 und mPGES-1 kommt nur bei sehr hohen Arachidonsäurekonzentrationen vor (Murakami et

al., 2002).

mPGES-2, die erst kürzlich entdeckte zweite membrangebundene Form der PGES, unterscheidet sich bezüglich Primärstruktur und Gewebsverteilung von mPGES-1 (Helliwell et al., 2004). mPGES-2 wird als Golgi-Membran-assoziiertes Enzym synthetisiert, das nach der proteolytischen Entfernung der N-terminalen hydrophoben Domäne ein cytosolisches Enzym ist. mPGES-2 kann sowohl mit COX-1 als auch mit COX-2 gekoppelt sein. Seine Expression ist in den verschiedensten Geweben und Zellen eher konstitutiv (Kudo und Murakami, 2005).

Seine Wirkungen vermittelt  $\text{PGE}_2$  über seine spezifischen Rezeptoren, die als EP bezeichnet werden. Der  $\text{PGE}_2$  Rezeptor EP hat 4 Subtypen: EP1, EP2, EP3 und EP4 (Tsuboi et al., 2002). Jeder EP-Subtyp hat eine andere Struktur und ist mit einem anderen Signalweg gekoppelt (Tsuboi et al., 2002). EP1 gehört zu den kontraktiven Rezeptoren, EP2 und EP4 sind relaxierende Rezeptoren und EP3 ist ein inhibitorischer Rezeptor (Narumiya et al., 1999; Narumiya und FitzGerald, 2001). Die Existenz der verschiedenen Subtypen erklärt die Vielfalt biologischer Wirkungen, die durch  $\text{PGE}_2$  vermittelt werden (Tsuboi et al., 2002).

Die Bedeutung von  $\text{PGE}_2$  für die Reproduktion konnte unter anderem anhand von Knock-out Studien mit Mäusen demonstriert werden:  $\text{EP2}^{-/-}$  Knock-out-Mäuse wiesen Störungen der frühen Trächtigkeit auf. Die Mäuse zeigten eine leicht beeinträchtigte Ovulation und eine dramatische Reduktion der Befruchtung (Kennedy et al., 1999). Dies beruhte auf einer gestörten Cumulusexpansion (Hizaki et al., 1999) und machte sich in kleineren Wurfgrößen bemerkbar (Ushikubi et al., 2000). Dagegen lieferte die Implantation von Wildtyp Blastozysten in  $\text{EP2}^{-/-}$  Mäusen keine Abnormalitäten (Ushikubi et al., 2000). Die Bildung von EP2 wird äußerst effektiv durch verschiedene Stimuli wie z.B. Gonadotropine induziert (Narumiya et al., 1999). Weibliche  $\text{EP1}^{-/-}$ ,  $\text{EP3}^{-/-}$  oder  $\text{EP4}^{-/-}$  Mäuse waren fertil und zeigten kein verändertes Reproduktionsgeschehen (Narumiya et al., 1999).

#### **2.3.4 $\text{PGF}_{2\alpha}$ und $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthasen (PGFS; HSD)**

$\text{PGF}_{2\alpha}$  ist wie  $\text{PGE}_2$  bei vielen Reproduktionsvorgängen beteiligt und hat besondere Wirkung auf die Motilität des Reproduktionstrakts (Narumiya et al., 1999). Seine luteolytische Wirkung beeinflusst sowohl die Zyklusregulation als auch das Einsetzen des Geburtsvorgangs (Ushikubi et al., 2000).  $\text{PGF}_{2\alpha}$  stimuliert die Aktivität der glatten Muskelzellen (Wijayagunawardane und Miyamoto, 2004). Es bewirkt den Anstieg myometrialer Kontraktionen und das Relaxieren der Zervix zum Zeitpunkt der Geburt (Helliwell et al., 2004). Es weist strukturell zwei Hydroxygruppen an den Positionen 9 und 11 auf, sodass es 4 Stereoisomere bilden kann, von denen aber nur zwei Formen natürlich vorkommen:  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und 11-epi  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Watanabe, 2002).

$\text{PGF}_{2\alpha}$  kann auf drei verschiedenen Wegen synthetisiert werden (siehe Abbildung 2) und zwar durch die  $\text{PGE}_9$ -Ketoreduktase, durch  $\text{PGD-11}$ -Ketoreduktasen und durch die  $\text{PGH-9,11}$ -Endoperoxidreduktase (Goff, 2004).

Die PGE-9-Ketoreduktase katalysiert die Umwandlung von  $\text{PGE}_2$  zu  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Sie ist Mitglied der Aldo-Ketoreduktase (AKR) Superfamilie, benutzt NADPH als Cofaktor und hat eine Größe von 36 kDa (Watanabe, 2002). Die PGE 9-Ketoreduktase ist identisch mit dem Enzym 20 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSD) (Asselin und Fortier, 2000).

Die PGD-11-Ketoreduktasen werden als PGFS bezeichnet. Sie katalysieren in Anwesenheit von NADPH die Umsetzung von  $\text{PGD}_2$  zu 11-epi  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Watanabe, 2002). Es sind für das Rind derzeit 7 verschiedene Enzyme mit PGD 11-Ketoreduktase-Aktivität bekannt: PGFS I, PGFS II, PGFSL-1, PGFSL-2, 20 $\alpha$ -(3 $\alpha$ )-HSD/Dihydrodiol-dehydrogenase 1, 3 $\alpha$ -HSD und Dihydrodiol-dehydrogenase 3.

Die PGH-9-,11-Endoperoxidreduktase katalysiert die Umsetzung von  $\text{PGH}_2$  zu  $\text{PGF}_{2\alpha}$  in Anwesenheit von NADPH oder NADH. Es ist ein Isoenzym der Glutathion S-Transferase, das als monomeres Protein von 16 kDa eine Peroxidaseaktivität besitzt (Watanabe, 2002).

$\text{FP}^{-/-}$  Mäuse, denen der Rezeptor für  $\text{PGF}_{2\alpha}$  fehlt, wiesen einen normalen Sexualzyklus und eine physiologische Ovulation, Befruchtung und Implantation auf, was darauf hindeutet, dass  $\text{PGF}_{2\alpha}$  für diese Vorgänge nicht essentiell war. Aufgrund des Verlusts der Wehentätigkeit, misslang den Mäusen jedoch das Gebären (Sugimoto et al., 1997). Wurden die Feten per Kaiserschnitt geholt, entwickelten sie sich hingegen normal (Ushikubi et al., 2000).

### **2.3.5 PGD<sub>2</sub> und PGD<sub>2</sub>-Synthasen (H-PGDS; L-PGDS)**

$\text{PGD}_2$  ist ein bedeutendes Prostaglandin in einer Vielzahl von Geweben und spielt eine entscheidende Rolle in vielen physiologischen und pathologischen Vorgängen: bei der Schlafinduktion, der Regulation der Schmerz Wahrnehmung in peripheren Neuronen, der Gerinnungshemmung, der Vasodilatation, als Entzündungsmediator und bei der Relaxation glatter Muskelzellen (Saito et al., 2002; Helliwell et al., 2004).  $\text{PGD}_2$  wird in den verschiedenen Reproduktionsorganen der Ratte wie Uterus, Ovar und Ovidukt synthetisiert (Saito et al., 2002). Es wird vermutet, dass  $\text{PGD}_2$  eventuell eine Schlüsselrolle bei der Immunregulation der materno-fetalen Kommunikation spielt. So könnte  $\text{PGD}_2$  zur Aufrechterhaltung der Trächtigkeit beitragen, indem es das Abstoßen des Embryos verhindert (Helliwell et al., 2004). Im ovinen Endometrium ist  $\text{PGD}_2$  synchron mit COX-2 während der mittleren lutealen Phase erhöht, was impliziert, dass  $\text{PGD}_2$  bei der Implantation des Embryos im Schaf wichtig ist (Saito et al., 2002). Prostaglandine werden normalerweise zu inaktiven Produkten abgebaut,  $\text{PGD}_2$  kann jedoch zu einigen bioaktiven Metaboliten abgebaut werden (Helliwell et al., 2004). So wird  $\text{PGD}_2$  durch die PGD-11-Ketoreduktase zu 9 $\alpha$ ,11 $\beta$   $\text{PGF}_{2\alpha}$ , welches uterine glatte Muskelzellen mit derselben Stärke kontrahieren kann wie  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Dies kann hinsichtlich des Einsetzens der Wehen von Bedeutung sein (Helliwell et al., 2004). Außerdem kann  $\text{PGD}_2$  nicht-enzymatisch zum bioaktiven 15d-PGJ<sub>2</sub> abgebaut werden, das Apoptose hervorruft. Dies könnte zu Frühgeburten führen, da die strukturelle Integrität der fetalen Membranen durch Apoptose geschwächt werden kann und die Membranen somit eventuell vorzeitig reißen (Helliwell et al., 2004).

Seine Wirkung entfaltet PGD<sub>2</sub> durch seinen spezifischen Rezeptor, der als DP bezeichnet wird (Saito et al., 2002). Der DP Rezeptor gehört zu den relaxierenden Rezeptoren, die einen cAMP Anstieg bewirken und damit die Relaxation induzieren (Narumiya und FitzGerald, 2001). Er ist der am seltensten vorkommende Prostaglandinrezeptor (Narumiya et al., 1999), der immer in Verbindung mit mindestens einem anderen Prostaglandinrezeptor auftritt (Coleman et al., 1994).

Die Isomerisation von PGH<sub>2</sub> in PGD<sub>2</sub> wird durch PGD<sub>2</sub>-Synthasen katalysiert (Urade und Eguchi, 2002). Dies ist in Abbildung 2 dargestellt. Es wurden zwei verschiedene Formen der PGDS gefunden, die sich voneinander bezüglich ihrer katalytischen Eigenschaften, der Aminosäuresequenz, der Tertiärstruktur, der chromosomalen Lokalisation, der zellulären Lokalisation, der Genstruktur, der Gewebsverteilung und in ihrer Funktion unterscheiden (Urade und Eguchi, 2002). Die hämatopoetische PGDS (H-PGDS) ist das Schlüsselenzym für die Produktion von PGs der D-Serie im Immunsystem. Sie ist weit verbreitet in peripherem Gewebe, auch im Ovidukt der Ratte (Saito et al., 2002). Die 26 kDa große H-PGDS ist ein cytosolisches Protein und Mitglied der Glutathion-S-Transferase-Familie, das durch Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-Ionen aktiviert wird (Urade und Eguchi, 2002). H-PGDS wird auch Glutathion-abhängige PGDS genannt (Saito et al., 2002), da sie Glutathion als Co-Faktor benötigt. In vitro Versuche an HEK293 Zellen zeigten eine stimulationsabhängige Translokation der H-PGDS vom Cytosol in die perinukleären Kompartimente, in denen COX-1 und COX-2 lokalisiert sind (Urade und Eguchi, 2002).

Die zweite Form der PGDS (L-PGDS) ist Glutathion-unabhängig und gehört zur Lipocalin-Superfamilie, deren Mitglieder sekretorische Proteine sind, die kleine lipophile Moleküle binden und transportieren (Saito et al., 2002). L-PGDS ist ein N-glycosyliertes Protein mit einer Größe von 26 kDa (Urade und Eguchi, 2002). In der Zelle ist L-PGDS im rauen endoplasmatischen Retikulum und in der Kernmembran lokalisiert, kann aber in verschiedenste Körperflüssigkeiten abgegeben werden (Urade und Eguchi, 2002). L-PGDS ist ein bifunktionales Protein. Es produziert PGD<sub>2</sub> in den Zellen und funktioniert nach seiner Sekretion in den Extrazellulärraum als Bindungsprotein für lipophile Liganden (Urade und Eguchi, 2002).

### **2.3.6 PGI<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub>-Synthasen (PGIS)**

Die allgemeinen Aufgaben von PGI<sub>2</sub> (auch Prostacyclin genannt) bestehen im Steigern der Gefäßpermeabilität, dem Inhibieren der Plättchenaggregation und dem Relaxieren glatter Muskelzellen (Ushikubi et al., 2000; Helliwell et al., 2004). Im Reproduktionsgeschehen scheint PGI<sub>2</sub> den Transport des Embryos durch das Relaxieren der Ovidukt Muskulatur zu vermitteln (Arbab et al., 2002). Außerdem konnte die Wichtigkeit seiner Beteiligung an der Implantation und Dezidualisation nachgewiesen werden (Lim et al., 1999). Das vom Muskel stammende ins Lumen diffundierte sowie vom Oviduktepithel abgegebene PGI<sub>2</sub> des humanen Ovidukts beeinflusst dort das Verhalten der Gameten und die Entwicklung des Embryos (Arbab et al., 2002; Huang et al., 2002). Neben dem Oviduktepithel produzieren

auch die Mausblastozysten PGI<sub>2</sub> (Huang et al., 2004a). Es konnte in Experimenten gezeigt werden, dass das über den COX-2 Syntheseweg erhaltene PGI<sub>2</sub> das Schlüpfen der Embryonen aus der Zona pellucida verbesserte (Huang et al., 2004a). Die Entwicklung des Embryos vom 2-Zeller bis zur Morula findet im Ovidukt statt. In dieser Phase wurden die höchsten Konzentrationen an PGI<sub>2</sub> gefunden. So wird vermutet, dass PGI<sub>2</sub> wahrscheinlich die Fähigkeit des Schlüpfens und Implantierens der Embryonen verbessert und den Anteil an Lebendgeburten erhöht (Huang et al., 2004b).

PGI<sub>2</sub> wird nur durch PGIS aus der Vorstufe PGH<sub>2</sub> gebildet (siehe Abbildung 2) und ist chemisch instabil mit einer sehr kurzen Halbwertszeit von 2-3 Minuten (Dusting et al., 1982; Coleman et al., 1994). Die PGIS ist ein membrangebundenes Hämprotein (Tanabe und Ullrich, 1995), das zur Cytochrom P450 Superfamilie gehört (Helliwell et al., 2004). Die bovine PGIS besteht aus 500 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 56 kDa (Tanabe und Ullrich, 1995). In den glatten Muskelzellen des humanen Ovidukts wurde sowohl PGIS als auch IP gefunden (Arbab et al., 2002). Im murinen Ovidukt wird PGIS konstitutiv im luminalen Epithel, in glatten Muskelzellen und in Gefäßendothelzellen exprimiert (Huang et al., 2004b). PGI<sub>2</sub> wirkt über seinen Rezeptor IP. Dieser gehört zu den relaxierenden Rezeptoren, die einen cAMP-Anstieg und somit eine Relaxation der glatten Muskelzellen bewirken (Narumiya et al., 1999). Weibliche IP<sup>-/-</sup> Mäuse waren fertil und zeigten keine abnormalen Reproduktionsprozesse (Narumiya et al., 1999), was vermuten lässt, dass PGI<sub>2</sub> keine entscheidende Rolle im Reproduktionsgeschehen spielt.