

### 3 Material

#### 3.1 Tiermaterial

Das Probenmaterial wurde im Fleischzentrum Lausitz GmbH, Kasel-Golzig, gewonnen.

#### 3.2 Reagenzien

<b>Substanz</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Firmensitz</b>
30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid (w/v) Fertiglösung	Carl Roth	Karlsruhe
Agarose NEEQ, Ultra-Qualität	Carl Roth	Karlsruhe
$\epsilon$ -Amino-n-Caprinsäure	Sigma	Deisenhofen
Ammoniumperoxidsulfat	Merck	Darmstadt
Amphotericin B (250 $\mu$ g/ml)	Sigma	Deisenhofen
Aprotenin	Sigma	Deisenhofen
Arachidonsäure	Sigma	Deisenhofen
Bovines Serumalbumin, Fraktion V	Merck	Darmstadt
Bromphenolblau	Merck	Darmstadt
Citronensäuremonohydrat	Carl Roth	Karlsruhe
DAB+ Chromogen	DAKO Cytomation	Hamburg
DEPC	Sigma	Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck	Darmstadt
DMSO	Sigma	Deisenhofen
dNTP Set, 100 mM Lösungen	Amersham Biosciences	Freiburg
DuP-697	Cayman Chemical	Ann Arbor, USA
ECL Blocking Reagenz	Amersham Biosciences	Freiburg
EDTA (Titriplex III)	Merck	Darmstadt

---

<b>Substanz</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Firmensitz</b>
Essigsäure, konzentriert	Merck	Darmstadt
Ethanol $\geq 99,8\%$	Carl Roth	Karlsruhe
Ethanol, HPLC Gradient Grade (für RNA Extraktion)	Carl Roth	Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)	Carl Roth	Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FKS)	Sigma	Deisenhofen
Formaldehyd 37% (v/v)	Sigma	Deisenhofen
Formaldehydlösung 4%, phosphatgepuffert, säurefrei	Carl Roth	Karlsruhe
Formamid	Sigma	Deisenhofen
Gentamycin (10 mg/ml)	Sigma	Deisenhofen
L-Glutamin (200 mM)	Sigma	Deisenhofen
Glycerin, wasserfrei	Merck	Darmstadt
Glyceringelatine (Kaisers)	Merck	Darmstadt
Glycin	Merck	Darmstadt
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth	Karlsruhe
Hämatin	Sigma	Deisenhofen
HEPES Puffer (1 M)	Sigma	Deisenhofen
Hexamere (pd(N) <sub>6</sub> Random Hexamere)	Amersham Biosciences	Freiburg
Kaninchen-IgG (BNr. I5006)	Sigma	Deisenhofen
Kaninchenserum (BNr. X0902)	DAKO Cytomation	Hamburg
Kochsalzlösung (physiologisch)	B. Braun	Melsungen
Leupeptin	Sigma	Deisenhofen
Medium M199 mit Earle's Salz	Sigma	Deisenhofen

---

<b><i>Substanz</i></b>	<b><i>Bezugsquelle</i></b>	<b><i>Firmensitz</i></b>
β-Mercaptoethanol	Merck	Darmstadt
Methanol	Merck	Darmstadt
Mineralöl	Sigma	Deisenhofen
MOPS	Carl Roth	Karlsruhe
Natriumacetat	Merck	Darmstadt
Natriumchlorid	Merck	Darmstadt
Natrium-deoxycholat	Carl Roth	Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck	Darmstadt
Natriumfluorid	Merck	Darmstadt
Natrium-orthovanadat	Sigma	Deisenhofen
Natrium-Pyruvat (100 mM)	Sigma	Deisenhofen
Natronlauge (1 M)	Merck	Darmstadt
Nonidet P40 Substitute	FLUKA BioChemika	Buchs, Schweiz
Nukleinsäuren-Ladepuffer (5x)	Bio-Rad	München
17β-Östradiol	Sigma	Deisenhofen
Paraffin	Carl Roth	Karlsruhe
Pefabloc SC	Merck	Darmstadt
Phenollösung, pH 8,0	Sigma	Deisenhofen
Ponceau S	Merck	Darmstadt
Progesteron	Sigma	Deisenhofen
Prostaglandin E <sub>2</sub>	Sigma	Deisenhofen
Ringerlösung	B. Braun	Melsungen
Salzsäure (1 M)	Merck	Darmstadt
SC-560	Cayman Chemical	Ann Arbor, USA

---

<b>Substanz</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Firmensitz</b>
SDS	Merck	Darmstadt
TAE-Puffer (10x)	Carl Roth	Karlsruhe
TEMED	Merck	Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma	Deisenhofen
Triton X-100	Sigma	Deisenhofen
Tween 20	Sigma	Deisenhofen
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck	Darmstadt
Xylol	Carl Roth	Karlsruhe
Ziegennormalserum (BNr. X0907)	DAKO Cytomation	Hamburg

### 3.3 Kits

<b>Methode</b>	<b>Produktname</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Firmensitz</b>
DNA-Aufreinigung	Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega	Mannheim
DNA-Quantifizierung	PICO Green dsDNA Quantitation Kit	Molecular Probes	Karlsruhe
Western Blot Detektion	ECL Advance Western Blotting Detection Kit	Amersham Biosciences	Freiburg
Proteinquantifizierung	DC-Protein-Assay	Bio-Rad	München
RNA-Extraktion	Invisorb Spin Cell RNA Mini Kit	Invitek	Berlin
Sequenzierungskit	ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems	Darmstadt
COX-Aktivitätskit	Correlate Enzyme™ Assay	Assay designs	Ann Arbor, USA

### 3.4 Enzyme

<i><b>Methode</b></i>	<i><b>Produktname</b></i>	<i><b>Bezugsquelle</b></i>	<i><b>Firmensitz</b></i>
DNA-Verdau	RQ1 RNase-freie DNase (1 U/μl)	Promega	Mannheim
PCR	iTaq DNA Polymerase (5 U/μl)	Bio-Rad	München
Real-Time-PCR	2x SensiMix (dT)	Quantace	Berlin
Reverse Transkription	M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/μl)	Promega	Mannheim

### 3.5 Antikörper

<i><b>Antikörper</b></i>	<i><b>Antigen/Anwendung</b></i>	<i><b>Wirtstier</b></i>	<i><b>Bezugsquelle</b></i>	<i><b>Firmensitz</b></i>
COX-1 Antiserum (BNr. 160108)	ovines COX- 1 für IHC und WB	Kaninchen polyklonal	Cayman Chemical	Ann Arbor, USA
COX-2 Antikörper (BNr. 160106)	murines COX-2 für IHC	Kaninchen polyklonal	Cayman Chemical	Ann Arbor, USA
COX-2 (BNr. ab6665)	humanes COX-2 für WB	Kaninchen polyklonal	Abcam	Cambridge, UK
Prostaglandin E Synthase-1 (microsomal) (BNr. 160140)	humanes mPGES-1 für IHC	Kaninchen polyklonal	Cayman Chemical	Ann Arbor, USA
Peroxidase-gelabelter Antikörper (BNr. NIF824)	gegen Kaninchen gerichteter Antikörper für WB		Amersham Biosciences	Freiburg
ENVISION + labelled Polymer-HRP	gegen Kaninchen gerichteter Antikörper für IHC	Ziege polyklonal	DAKO Cytomation	Hamburg

### 3.6 Marker/Standards

<b>Produkt</b>	<b>Produktname</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Firmensitz</b>
Proteingrößenmarker	Precision Plus Protein™ Standards Dual Color	Bio-Rad	München
DNA-100bp-Marker	EZ Load™ Molecular Rulers	Bio-Rad	München
COX-1 Standard für Western Blot	COX-1 (ovines) Elektrophoresestandard (BNr. 360100)	Cayman Chemical	Ann Arbor, USA
COX-1 für COX- Aktivitätstest	COX-1 (ovines) (BNr. 60100)	Cayman Chemical	Ann Arbor, USA
COX-2 Standard für Western Blot	COX-2 (ovines) Elektrophoresestandard (BNr. 360120)	Cayman Chemical	Ann Arbor, USA
COX-2 für COX- Aktivitätstest	COX-2 (ovines) (BNr. 60120)	Cayman Chemical	Ann Arbor, USA

### 3.7 Primer

Alle Primer wurden von MWG-Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert.

<b>Gen</b>	<b>Sequenz 5' → 3'</b>	<b>Größe des PCR- Produkts</b>	<b>EMBL Ac. No. (Position d. Amplicons)</b>
18S rRNA	for GAG AAA CGG CTA CCA CAT CCA A	317bp	AF176811 (75-391)
	rev GAC ACT CAG CTA AGA GCA TCG A		
sPLA <sub>2</sub>	for GGA TGA TCT GGA CAG GTG C	248bp	Y00120 (197-444)
	rev TCT TGT CCA GGT TCT TGT GC		
cPLA <sub>2</sub> α	for AAA TGT CAG CCA CAA CCC TC	229bp	XM_603415 (837-1065)
	rev ATG GAG ACA GGT GAA AAG CG		
cPLA <sub>2</sub> β	for CCA GCC TGG ATG AGA TCT TC	218bp	XM_595922 (163-380)
	rev GAA GTT GGA GTT CTC GGC TG		

<b>Gen</b>	<b>Sequenz 5' → 3'</b>	<b>Größe des PCR-Produkts</b>	<b>EMBL Ac. No. (Position d. Amplicons)</b>
COX-1	for CAG ATG CGG AGT TTC TGA GTC G	313bp	AF004943 (155-467)
	rev GGG TAG TGC ATC AGC ACG G		
COX-2	for CTC TTC CTC CTG TGC CTG AT	359bp	NM_174445 (519-877)
	rev CTG AGT ATC TTT GAC TGT GGG AG		
mPGES-1	for TGC TGG TCA TCA AAA TGT ACG	300bp	AY032727 (76-375)
	rev GCA GTT TCC CCA GGT ATG C		
mPGES-2	for CCT CCT ACA GAA AGG TGC C	133bp	AY692441 (19-151)
	rev GTG ATG ATG TCT GCC AGG G		
cPGES	for TGC AAA GTG GTA CGA TCG G	253bp	NM_001007806 (15-267)
	rev TAA CCT TGG CCA TGA CTG G		
HSD	for CAT GGA AGA GCT GGT GGA C	255 bp	S54973 (405-659)
	rev AGT ATG GAA GGG TCC TCC G		
PGFS	for AAC CAG AGT TGG TCC GAC C	237 bp	J03570 (278-514)
	rev GGT TGA AGT TGG ACA CCC C		
H-PGDS	for CAG ATT TGG CTG GAA AAA CAG	310 bp	XM_865246 (233-542)
	rev CGT AAT GTC ACC AGC CTG G		
L-PGDS	for TGA GAC GCG GAC CTT ACT G	193 bp	AB004647 (296-488)
	rev CTG GGA GCG GCT GTA GAG		
PGIS	for CTG TTG TCC CCA ACC AGG	311 bp	L34208 (946-1256)
	rev CTG TCC AGC ACA GGC ATG		

### 3.8 Verbrauchsmaterialien

<b>Produkt</b>	<b>Name/Größe</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Firmensitz</b>
Autoradiografie-Filme	Hyperfilm™ ECL	Amersham Biosciences	Freiburg
Begrenzungsstift	DAKO Pen	DAKO Cytomation	Hamburg
Blotting-Papier	GB 002	Schleicher&Schuell	Dassel
Deckgläser	24x40mm	Menzel	Braunschweig
Einbettkassetten	Histosette II	Merck	Darmstadt
Frischhaltefolie mit Aromaschutz	Dow Saran	Carl Roth	Karlsruhe
Kanülen	Sterican 26G, 20G	Carl Roth	Karlsruhe
Küvette	UVette	Eppendorf	Hamburg
Mikroplatten für Fluoreszenz	µClear, schwarz, transparenter Boden	Greiner Bio-One	Frickenhausen
Nitrocellulosemembran	Hybond-C Extra	Amersham Biosciences	Freiburg
Objektträger	Super frost plus	Menzel	Braunschweig
Pipetten	Serologische Pipetten (10 ml)	Carl Roth	Karlsruhe
Pipettenspitzen, mit Filter	Safeseal TIPS (5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Biozym Scientific	Hess. Oldendorf
Probenröhrchen mit Schraubverschluss	0,5 ml, konisch	Biozym Scientific	Hess. Oldendorf
Reaktionsgefäße	PCR-Tubes 0,2 ml	Eppendorf	Hamburg
Reaktionsgefäße	mit Graduierung 1,5 ml	Carl Roth	Karlsruhe
Reaktionsgefäße für Rotor-Gene Cyclor	Strip Tubes 0,1 ml	LTF-Labortechnik	Wasserburg
Skalpelle	B. Braun Cutfix	Aesculap	Tuttlingen
Spritzen	Omnifix 1 ml	B.Braun	Melsungen
Zellkulturplatten (6-, 24-, 48-Well)	steril mit Abdeckplatte	Greiner Bio-One	Frickenhausen
Zellschaber	25 cm, steril	Greiner Bio-One	Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen	Rotilabo-Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Carl Roth	Karlsruhe



### 3.9 Geräte

<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Name</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Firmensitz</b>
Agarose-Gelkammer	Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad	München
Agarose-Gelkammer	Gel Elektrophoresis Apparatus GNA-100	Amersham Biosciences	Freiburg
Blotgerät	Nova Blot	Amersham Biosciences	Freiburg
Brutschrank	5060 EK-CO2	Heraeus	Hanau
Digitalkamera	AxioCAM MRc	Carl Zeiss Jena	Jena
Einbettautomat	Tissue Tek VIP	Sakura	Heppenheim
Heizplatte	IKAMAG RCT	Janke&Kunkel	Staufen
Mikroplatten-Reader für Fluoreszenz/ Chemilumineszenz	Fluostar Optima	BMG Labtech	Offenburg
Mikroskop	Axioskop 20 + 50	Carl Zeiss Jena	Jena
Mikrotom	Tetrander	Jung	Heidelberg
Mikrowelle	Microstar MD 6459	MTC-Medion Technologie Center	Mülheim/Ruhr
Mixer	Thermomixer compact	Eppendorf	Hamburg
Ofen	Hybridisierungs- ofen OV1/OV2	Biometra	Göttingen
PAGE-System	Mini-Protean 3 Cell	Bio-Rad	München
Paraffin- Ausgießstation	TES 4004	pfm	Köln
Paraffin-Streckbad	GFL 1052	Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel
PCR-Cycler	Mastercycler Gradient	Eppendorf	Hamburg
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646	Knick Elektronische Messgeräte	Berlin
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf	Hamburg
Pipett-Boy	Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt
Pipetten	Research	Eppendorf	Hamburg

---

<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Name</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Firmensitz</b>
Real-Time-PCR-Cycler	Rotor Gene RG-3000	Corbett Research	Mortlake, AUS
Roller Mixer	SRT 1	Bibby Sterilin	Staffordshire, UK
Spannungsgerät	GPS 200/400	Amersham Biosciences	Freiburg
Spannungsgerät	Power Pack P 25	Biometra	Göttingen
Taumelschüttler	REAX3	Heidolph-Instruments	Schwabach
Videodokumentation	Gene Genius	Syngene	Cambridge, UK
Vortex Minischüttler	VF2	Janke&Kunkel	Staufen
Wärmeblock	MBT 250	Kleinfeld Labortechnik	Gehrden
Wasserbad	GFL 1092	Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel
Werkbank	LaminAir	Heraeus	Hanau
Zählkammer	Neubauer-Kammer	Hecht-Assistent	Sondheim
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus	Hanau

---

### 3.10 Rezepte

Durch Umkehrosiose und Ionenaustausch wurde Reinstwasser gewonnen, welches im Folgenden als H<sub>2</sub>O bezeichnet wird. Sofern nichts anderes angegeben ist, wurden Puffer und Lösungen mit H<sub>2</sub>O angesetzt.

#### Anoden-Puffer I für Western Blot

18,15 g Tris  
mit HCl auf pH 10,4 einstellen,  
mit H<sub>2</sub>O auf 400 ml auffüllen,  
dann 100 ml Methanol hinzufügen

#### Anoden-Puffer II für Western Blot

1,5 g Tris  
mit HCl auf pH 10,4 einstellen,  
mit H<sub>2</sub>O auf 400 ml auffüllen,  
dann 100 ml Methanol hinzufügen

#### 10% APS

0,1 g Ammoniumperoxidsulfat  
1 ml H<sub>2</sub>O kurz vor Gebrauch dazu

#### Arachidonsäure-Arbeitslösung

6 µl Arachidonsäure-Stammlösung (50 mg/ml)  
94 µl 0,1 M NaOH  
mischen und dann  
9,9 ml H<sub>2</sub>O hinzufügen und mischen

#### Arachidonsäure-Stammlösung (50 mg/ml)

100 mg Arachidonsäure  
2 ml Ethanol

#### Bromphenolblau/Glycerin-Lösung

15 µl gesättigte Bromphenolblau-Lösung  
85 µl DEPC-H<sub>2</sub>O  
100 µl Glycerin reinst

#### Citratpuffer

2,1 g Citronensäuremonohydrat  
in 1 l H<sub>2</sub>O lösen  
pH 6,0 mit Natronlauge einstellen

#### DEPC-H<sub>2</sub>O

1 l H<sub>2</sub>O  
1 ml DEPC, gut schütteln  
20 min bei 121 °C autoklavieren

#### 1% DNA-Agarosegel mit Ethidiumbromid

0,5 g Agarose  
50 ml 1x TAE-Puffer  
gut mischen und in der Mikrowelle zum  
Kochen bringen und danach  
10 µl Ethidiumbromidlösung dazu  
pipettieren

#### DNase-Reaktionsansatz (pro Probe)

4 µl 5x M-MLV RT-Puffer  
6 µl PCR-H<sub>2</sub>O  
1 µl RNase-freie DNase (1 U/µl)

#### dNTPs (je 10 mM)

10 µl 100 mM dATP  
10 µl 100 mM dCTP  
10 µl 100 mM dGTP  
10 µl 100 mM dTTP  
60 µl H<sub>2</sub>O

#### ECL-Blockierlösung

1 g ECL Blocking Reagenz  
50 ml PBS-T

#### 70% Ethanol für RNA-Extraktion

70 ml Ethanol, HPLC Gradient Grade  
30 ml DEPC-H<sub>2</sub>O

Die Ethanolverdünnungsreihe für die  
Immunhistologie wurde mit H<sub>2</sub>O angesetzt.

3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

20 ml	30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
180 ml	H <sub>2</sub> O

Hämatin-Stammlösung (0,6 mM)

1 mg	Hämatin
2,63 ml	DMSO

Hämatin-Arbeitslösung (0,12 µM)

1 µl	Hämatin-Stammlösung (0,6 mM)
5 ml	0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,5)

Kathoden-Puffer für Western Blot

1,5 g	Tris
2,6 g	ε-Amino-n-Caprinsäure
pH 9,4 mit HCl einstellen,	
mit H <sub>2</sub> O auf 400 ml auffüllen,	
dann 100 ml Methanol hinzufügen	

10x MOPS-Puffer

0,2 M	MOPS
50 mM	Natriumacetat
10 mM	EDTA
diesen Ansatz 20 Minuten bei 120°C	
autoklavieren	

1x MOPS-Puffer

50 ml	10x MOPS-Puffer
450 ml	DEPC-H <sub>2</sub> O

OVI-1 für Mediumswechsel

500 ml	M199 mit Earle's Salz
10 ml	HEPES Puffer (1 M)
11,5 ml	Na-Pyruvat (100 mM)
2,75 ml	Gentamicin (10 mg/ml)
1,7 ml	L-Glutamin (200 mM)
5 ml	FKS

OVI-10 für die Aussaat

500 ml	M199 mit Earle's Salz
10 ml	HEPES Puffer (1 M)
11,5 ml	Pyruvat (100 mM)
2,75 ml	Gentamicin (10 mg/ml)
1,7 ml	L-Glutamin (200 mM)
3 ml	Amphotericin B (250 µg/ml)
50 ml	FKS

PBS (pH 7,5)

14,24 g	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
2,75 g	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
5,84 g	NaCl
auf 1000 ml H <sub>2</sub> O auffüllen,	
pH-Wert einstellen	

PBS-T (0,1%)

1 l	PBS (pH 7,5)
1 ml	Tween 20

PCR-H<sub>2</sub>O

100 ml H<sub>2</sub>O, 20 min bei 121 °C autoklaviert

PCR-Reaktionsansatz (pro Probe)

2,5 µl	10x iTaq-Puffer
0,75 µl	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)
0,5 µl	dNTPs (je 10 mM)
0,5 µl	Primer for (20 µM)
0,5 µl	Primer rev (20 µM)
17,25 µl	PCR-H <sub>2</sub> O
0,1 µl	iTaq-Polymerase (5 U/µl)

Pefabloc SC (0,4 M)

100 mg	Pefabloc SC
1,04 ml	H <sub>2</sub> O

0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,5)

14,24 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat

2,75 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat

mit H<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen,  
pH-Wert mit HCl einstellen

Ponceau S-Färbelösung

1,25 g Ponceau S

2,5 ml konzentrierte Essigsäure

mit H<sub>2</sub>O auf 250 ml auffüllen

Primer

Die Primer wurden in einer Konzentration von 200 µM in PCR-H<sub>2</sub>O gelöst und als Stammlösung bei -20°C gelagert. Für die PCR-Reaktionsansätze wurde durch das Verdünnen der Stammlösung mit PCR-H<sub>2</sub>O eine 20 µM Arbeitslösung hergestellt.

Real-Time-PCR Reaktionsansatz (pro Probe)

0,2 µl Primer for (20 µM)

0,2 µl Primer rev (20 µM)

0,2 µl 50x SYBR Green Solution

3,4 µl PCR-H<sub>2</sub>O

5 µl 2x SensiMix (dT)

RIPA-Puffer

0,876 g NaCl

0,606 g Tris

1 ml Nonidet P40 Substitute

1 ml Triton X-100

2,5 ml Natrium-deoxycholat (10%) (w/v)

1 ml EDTA (0,5 M; pH 8,0)

100 µl Natriumfluorid (1 M)

100 µl Natrium-orthovanadat (1 M)

mit HCl pH 7,4 einstellen

1% denaturierendes RNA-Agarose-Gel

0,4 g Agarose

4 ml 10x MOPS-Puffer

30 ml DEPC-H<sub>2</sub>O

in der Mikrowelle erhitzen,

dann 6,4 ml Formaldehyd (37%) dazu

mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 40 ml auffüllen

RNA-Gel-Probenpuffer

75 µl Formamid

25 µl Formaldehyd (37%)

10 µl 10xMOPS-Puffer

2 µl Ethidiumbromidlösung

6 µl Bromphenolblau/Glycerin-Lösung

RT-Reaktionsansatz (pro Probe)

8 µl 5x M-MLV RT-Puffer

4 µl dNTPs (je 10 mM)

3 µl Random Hexamere (50 µM)

27,75 µl PCR-H<sub>2</sub>O

1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)

10x Saline 1,5 M

87,66 g NaCl in 1000 ml H<sub>2</sub>O lösen

10% SDS-Lösung

10 g SDS

100 ml H<sub>2</sub>O

10x SDS-Laufpuffer

144 g Glycin

30,3 g Tris

10 g SDS

mit H<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen (pH 8,3)

1x SDS-Laufpuffer

100 ml 10x SDS-Laufpuffer

900 ml H<sub>2</sub>O

2x SDS-Probenpuffer

0,4 g SDS  
 1,667 ml Tris-HCl (1,5 M; pH 6,8)  
 7,1 ml H<sub>2</sub>O  
 10 ml Glycerin  
 1 ml β-Mercaptoethanol  
 1 Spatelspitze Bromphenolblau

5% SDS-Sammelgel

0,66 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)  
 0,33 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 6,8)  
 40 µl 10% SDS  
 3 ml H<sub>2</sub>O  
 4 µl TEMED  
 20 µl 10% APS

10% SDS-Trenngel

5 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)  
 0,15 ml 10% SDS  
 3,75 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)  
 10 µl TEMED  
 75 µl 10% APS  
 6,1 ml H<sub>2</sub>O

Stammlösungen für Zellkulturversuche

Arachidonsäure, Östradiol, Progesteron oder PGE<sub>2</sub> wurden jeweils sorgfältig in 1 ml Ethanol gelöst und dann mit OVI-1 für Mediumswechsel auf die in Tabelle 9 aufgeführte Konzentration verdünnt.

1x TAE-Puffer

25 ml 10x TAE-Puffer  
 225 ml H<sub>2</sub>O

TBSA

100 mg BSA in 100 ml TBS lösen

10x Tris-HCl (0,5 M; pH 7,6)

60,55 g Tris  
 in 700 ml H<sub>2</sub>O lösen,  
 pH 7,6 einstellen mit HCl,  
 danach Lösung auf Gesamtvolumen von 1 l  
 mit H<sub>2</sub>O auffüllen

1,5 M Tris-HCl (pH 6,8)

36,34 g Tris  
 150 ml H<sub>2</sub>O  
 mit HCl pH 6,8 einstellen,  
 mit H<sub>2</sub>O auf 200 ml auffüllen

1,5 M Tris-HCl (pH 6,8)

36,34 g Tris  
 150 ml H<sub>2</sub>O  
 mit HCl pH 8,8 einstellen,  
 mit H<sub>2</sub>O auf 200 ml auffüllen

Tris-buffered Saline (TBS)

1 l 10x Tris-HCl (0,5 M; pH 7,6)  
 1 l 10x Saline  
 8 l H<sub>2</sub>O

Tris-EDTA Lysepuffer

100 mM Tris  
 1 mM EDTA  
 1 µg/ml Aprotinin  
 1 µg/ml Leupeptin  
 mit HCl pH 7,8 einstellen

Tris-Phenol-Puffer (pH 7,3)

100 mM Tris  
 0,5 mM Phenol  
 mit HCl pH einstellen

Trypanblaulösung

0,4% (w/v) Trypanblau in physiologischer Kochsalzlösung

Western Blot Lyse-Puffer

1 ml RIPA-Puffer  
 50 µl 20% SDS  
 12,5 µl Pefabloc SC (0,4 M)

## 4 Methodik

### 4.1 Gewinnung der Ovidukte

Das Probenmaterial wurde für alle Versuchsabschnitte von geschlechtsreifen, weiblichen Rindern gewonnen. Die Probennahme erfolgte etwa 20-30 Minuten nach Beginn des Schlachtvorgangs. Zuerst wurden die Reproduktionsorgane eingehend adspektorisch untersucht, um zu verhindern, dass krankhaft veränderte Organe in die Untersuchung mit einbezogen werden. Dabei wurde besondere Aufmerksamkeit auf ovarielle Zysten, pathologische Flüssigkeitsansammlungen im Uterus (Eiter, Blut), Asymmetrien des Uterus und Entzündungssymptome gerichtet. Außerdem wurden alle trächtigen Tiere von der Untersuchung ausgeschlossen. Die gesunden, nicht trächtigen Tiere wurden dann anhand ihrer morphologischen Ovar- und Uterusbefunde (siehe Tabelle 1) in vier verschiedene Zyklusphasen eingeteilt (Ireland et al., 1980; Arosh et al., 2002).

- **Postovulatorische Phase:** Tag 1-5 des Zyklus
- **Frühe Lutealphase:** Tag 6-12 des Zyklus
- **Späte Lutealphase:** Tag 13-18 des Zyklus
- **Präovulatorische Phase:** Tag 19-21 des Zyklus

Tabelle 1: **Ovar- und Uterusbefunde in den verschiedenen Zyklusphasen der Kuh.** (Modifiziert nach Ireland et al., 1980 und Arosh et al., 2002)

Zyklusphase		Postovulation	Frühe Lutealphase	Späte Lutealphase	Präovulation
Zyklustag		1-5	6-12	13-18	19-21
Corpus luteum außen	Farbe	rot	rot oder braun	bräunlich o. orange	hellgelb o. weiss
	Epithelisierung	-	+	+	+
	Vaskularisierung	nicht sichtbar	nur peripher	nur peripher, später bis Spitze	nicht sichtbar
Corpus luteum innen	Farbe	rot, evtl. blutgefüllt	orange; Spitze: rot/braun	orange	orange o. gelb
	Durchmesser	5-15 mm	16-20 mm	16-20 mm	<10 mm
Follikel >10mm		-	+	-/+	+
Zervix		offen	geschlossen	geschlossen	bleistiftstark geöffnet
Uterusschleimhaut		rosa-rot	rosa-braun	blassrosa	blassrosa
Schleim im Uterus		+	-	-	+++

Die Ovidukte wurden in ipsilaterale und kontralaterale Ovidukte unterschieden und anschließend mittels Skalpell aus dem Geschlechtstrakt herausgetrennt. Das ipsilaterale Ovidukt wurde definiert als das Ovidukt, auf dessen Seite sich in der präovulatorischen Phase das Ovar mit dem sprungreifen Follikel oder in den anderen Phasen das Ovar mit dem aktiven Corpus luteum befindet. Das kontralaterale Ovidukt war dementsprechend das gegenüberliegende Ovidukt. Die Proben wurden auf Eis ins Labor transportiert.

#### **4.2 Präparation der Ovidukte und Gewinnung der Oviduktzellen für die in vivo Untersuchungen**

Die Ovidukte wurden sorgfältig von dem umgebenden Gekröse befreit. Das Infundibulum wurde entfernt und das restliche Ovidukt in Ampulle und Isthmus unterteilt. Die Oviduktabschnitte wurden dann dreimal mit Hilfe einer 1 ml Spritze und einer stumpfen Kanüle mit 1 ml Ringerlösung gespült. Die Spülflüssigkeit wurde bei 4°C und 850 x g 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

#### **4.3 Gewinnung der Oviduktzellen für Zellkulturversuche (in vitro)**

Für die Kultivierung von Oviduktzellen wurden die auf dem Schlachthof gewonnenen Ovidukte im Labor unter einer sterilen Werkbank in toto längs eröffnet. Mit einem Zellschaber wurde vorsichtig über das Oviduktepithel geschabt und die so gewonnenen Zellen in 1 ml Medium OVI-10 suspendiert und auf Eis gestellt. Die Zellen wurden dreimal bei 850 x g für 5 Minuten zentrifugiert, wieder mit frischem Medium resuspendiert und dann mit den Zellen des zweiten Ovidukts derselben Kuh vereint, zentrifugiert und in neuem Medium OVI-10 resuspendiert. Danach wurden 5 ml Zellsuspension in einer Konzentration von  $1-2 \times 10^5$  Zellen/ml in jede Vertiefung einer 6-Loch Zellkulturplatte ausgesät.

Um die Vitalität der gewonnenen Zellen zu bestimmen wurde eine Trypanblaufärbung vorgenommen. Dafür wurden zu 90 µl Trypanblaulösung 10 µl Zellsuspension gegeben und gemischt. Das Anion des sauren Trypanblaus bindet an Proteine. Tote Zellen stellen sich unter dem Mikroskop blau dar, da der Farbstoff bei ihnen durch die defekten Zellmembranen eindringen kann. Lebende Zellen färben sich dementsprechend nicht an. Zum Zählen der Zellen wurde die Neubauer Zählkammer verwendet. Es wurde ein Tropfen des Trypanblau-Zellgemischs neben das Deckglas auf den Mittelsteg pipettiert, sodass es unter das Deckglas gesogen wurde. Anschließend wurde die Kammer unter dem Mikroskop betrachtet und alle vier Großquadrate (bestehen aus je 16 Gruppenquadraten) komplett ausgezählt. Es wurden erst die lebenden und danach die toten Zellen gezählt. Die Vitalität wurde mit folgender Formel errechnet:



$$\frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100 = \text{Vitalität der Zellen in \%}$$

Der Anteil der lebenden Zellen betrug immer mehr als 90%.

Die Anzahl der lebenden Zellen pro ml Zellsuspension errechnete sich:

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen}}{4} \times 10^5 \text{ Zellen / ml}$$

#### **4.4 Präparation der Ovidukte für die Immunhistologie**

Für die immunhistologischen Untersuchungen wurden die Ovidukte bereits im Schlachthof vom Gekröse frei präpariert und in Ampulle und Isthmus getrennt. Die Oviduktabschnitte wurden zum Fixieren in 4%ige Formaldehydlösung gegeben und auf Eis ins Labor transportiert.

#### **4.5 Gewinnung der Oviduktzellen für den COX-Aktivitätstest**

Für die Gewinnung der Oviduktzellen für den COX-Aktivitätstest wurden die Ovidukte bereits im Schlachthof vom Gekröse befreit und längs geöffnet. Mit einem Zellschaber wurde vorsichtig über das Oviduktepithel geschabt und die so gewonnenen Zellen in 500 µl eiskaltem Tris-EDTA-Lysepuffer suspendiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### **4.6 RNA-Extraktion**

Um den Abbau von RNA durch RNasen zu verhindern, ist beim Arbeiten mit RNA eine RNase-freie Umgebung und Ausstattung essentiell. Als Hauptquelle für RNasen werden die Haut, aber auch Bakterien oder Hefen an Staubpartikeln in der Luft angesehen. Deshalb wurden bei jedem Arbeitsschritt Einmalhandschuhe getragen und autoklavierte Einweg-Plastikmaterialien verwendet. Um RNasen zu inaktivieren, wurden nicht autoklavierbare Materialien 30 Minuten mit 0,1 M Natronlauge inkubiert und anschließend mit DEPC-H<sub>2</sub>O gespült.

Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem Invisorb Spin Cell RNA Mini Kit bei Raumtemperatur. Auf die Oviduktzellpellets wurden 700 µl Lyse-Puffer gegeben und die Zellen durch mehrmaliges Durchmischen mit der Pipette vollständig lysiert. Das Lysat wurde auf den DNA-Filter des Extraktionskits pipettiert und eine Minute inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für zwei Minuten bei 13500 x g. Die Säule mit der abgetrennten DNA wurde verworfen und der Durchfluss mit 700 µl 70%igem Ethanol gemischt. In zwei Schritten wurden dann jeweils 700 µl dieses Gemisches auf den RNA-Filter eines neuen Reaktionsgefäßes pipettiert, eine Minute inkubiert, für 30 Sekunden bei 9500 x g zentrifugiert und dann der Durchfluss verworfen. Anschließend folgten 3 Waschschrte mit den im Kit enthaltenen Waschpuffern. Nach dem letzten Waschschrte wurde der Filter drei Minuten bei

13500 x g zentrifugiert, was der Trocknung des Filters diente. Anschließend wurde der Filter auf ein neues Reaktionsgefäß gesteckt und 40 µl Elutionspuffer direkt auf die Membran des RNA-Filters pipettiert, zwei Minuten inkubiert und dann bei 9500 x g zentrifugiert. Der RNA-Filter wurde entfernt, der Durchfluss gut gemischt und bei -80°C aufbewahrt.

Die Konzentration der extrahierten RNA wurde in einer 1:25 Verdünnung in DEPC-H<sub>2</sub>O mit einem UV-Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die RNA zeigt eine maximale Absorption bei 260 nm. Es wurde die optische Dichte (OD) gemessen. Für die Berechnung der gesuchten RNA Konzentrationen wurde zugrunde gelegt, dass eine OD<sub>260</sub> von 1 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml entspricht. Zum Überprüfen eventueller Kontaminationen wurden zusätzlich Messungen bei 230 nm (Kohlenhydrate, Peptide, Phenol) und 280 nm (Proteine) durchgeführt. Über das Verhältnis von OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> ist die Reinheit der RNA abzuschätzen; es sollte über 1,6 liegen. Die Qualität der RNA wurde danach mit einem 1% denaturierenden Agarosegel geprüft (siehe 4.8). Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

#### **4.7 Denaturierendes RNA-Agarose-Gel**

Zur Überprüfung der RNA-Integrität wurden die RNA Proben auf ein denaturierendes RNA-Agarose-Gel aufgetragen. Zuerst wurde eine komplette Gelkammer mit Kamm 30 Minuten mit 0,1 M Natronlauge RNase-frei gemacht und anschließend mit DEPC-H<sub>2</sub>O gespült. Der Geltrog wurde mit Klebeband abgeklebt und in die Gelkammer eingesetzt. Ein frisch angesetztes 1% denaturierendes RNA-Agarose-Gel wurde wie in 3.10 angegeben hergestellt, nach Abkühlen auf ca. 50°C in den Geltrog gegossen und der Kamm blasenfrei eingesetzt. Nach einer Stunde war das Gel ausgehärtet und wurde mit 1x MOPS-Puffer überschichtet. 2 µg Gesamt-RNA in 10 µl DEPC-H<sub>2</sub>O wurden mit 10 µl RNA-Gel-Probenpuffer gemischt, 10 Minuten bei 70°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Durch dieses Vorgehen wurden die Sekundärstrukturen der RNA zerstört. Nach 5 Minuten wurden die Proben bei 4°C bei 16000 x g kurz zentrifugiert und 15 µl dieses Gemisches in die Taschen des Gels gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte für 2 Stunden bei konstanten 70 V. Unter UV-Licht konnte die RNA durch Ethidiumbromideinlagerung sichtbar gemacht werden. Eine qualitativ hochwertige RNA stellt sich durch zwei gut sichtbare 28S und 18S rRNA Banden dar. Die Intensität der 28S rRNA-Bande sollte doppelt so stark sein wie die Bande der 18S rRNA. Die Gele wurden mittels Videodokumentationsanlage Gene Genius fotografiert und archiviert (Abbildung 3).

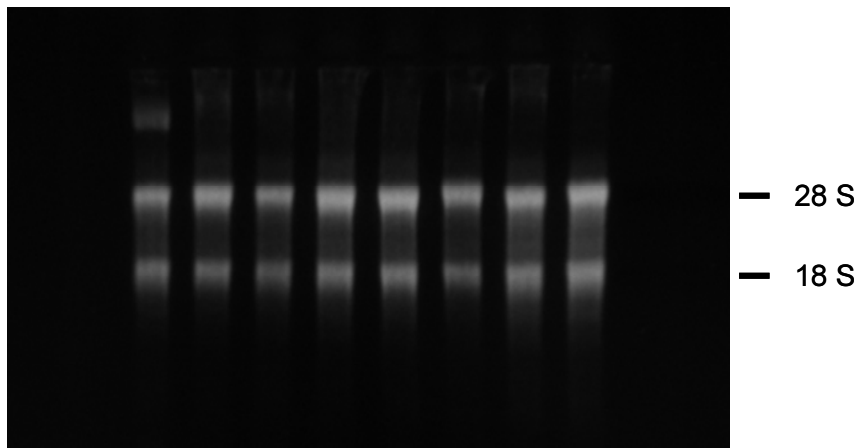


Abbildung 3: **Beispiel eines 1% denaturierenden RNA-Agarosegels** mit einem Auftrag von 2 µg Gesamt-RNA pro Spur.

#### 4.8 Reverse Transkription mit DNase-Verdau

Die reverse Transkription dient der Umschreibung der einzelsträngigen RNA in einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA). Für diese enzymatische Reaktion wurde die aus dem Moloney murine leukemia Virus (MMLV) stammende reverse Transkriptase verwendet. Es wurden je 0,5 µg Gesamt-RNA in 10 µl PCR-H<sub>2</sub>O mit 10 µl DNase-Reaktionsansatz (siehe 3.10) gemischt. Dieser Reaktionsansatz wurde 30 Minuten bei 37°C in einem Cycler inkubiert und anschließend für 5 Minuten auf 75°C erhitzt, um die DNase zu inaktivieren und die Sekundärstrukturen der RNA zu zerstören. Die Proben wurden sofort für 5 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 40 µl RT-Reaktionsansatz (siehe 3.10) durchlief dieses Reaktionsgemisch im Cycler das folgende Temperaturprogramm: 10 Minuten bei 25°C, 50 Minuten 37°C und abschließend 2 Minuten bei 90°C. Jede cDNA wurde in kleine Portionen (20 µl) aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

#### 4.9 Gradienten-PCR zur Ermittlung der primerspezifischen Temperaturoptima

Zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur wurde für jedes Primerpaar eine Gradienten-PCR durchgeführt. Zusätzlich wurden Produktgröße und Sequenz geprüft. Die Temperaturdifferenz im Heizblock des Cyclers umfasste dabei  $60 \pm 8^\circ\text{C}$ , sodass derselbe PCR-Ansatz zur selben Zeit in einem Cycler mit unterschiedlichen Annealingtemperaturen amplifiziert wurde. Die Temperaturverteilung in den 12 nebeneinanderliegenden Vertiefungen des Heizblocks stellte sich folgendermaßen dar: 52°C; 52,2°C; 53,1°C; 54,6°C; 56,4°C; 58,5°C; 60,7°C; 62,9°C; 64,9°C; 66,6°C; 67,8°C; 68,5°C.

Für die Gradienten-PCR wurde ein PCR-Reaktionsansatz für 12 Proben mit 60 µl cDNA gemischt und kurz zentrifugiert, bevor je 25 µl davon auf zwölf PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml) verteilt wurden. Diese wurden dann ebenfalls kurz zentrifugiert und in den 94°C heißen

Gradienten-Cycler gestellt. Der erste Schritt bei 94°C dauerte 10 Minuten und diente der Aktivierung der Hot-Start DNA-Polymerase. Danach folgten 38 Zyklen bestehend aus einem Denaturierungsschritt (94°C für 30 Sekunden) und einer Annealingreaktion (52-68°C für 1 Minute). Am Ende schloss sich ein 2 minütiger Extensionsschritt mit 72°C an, um die Reaktion zu komplettieren.

#### 4.10 DNA-Agarosegel-Elektrophorese

Zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur und zur Überprüfung der erwarteten Größe des amplifizierten PCR-Produkts wurde eine DNA-Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Dazu wurden wie in 3.10 beschrieben 50 ml flüssiges 1% Agarosegel luftblasenfrei in die Gelelektrophoresekammer gegossen. Nach einer Stunde war das Gel gehärtet und wurde mit 200 ml 1x TAE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. Zu den 25 µl PCR-Produkt wurden 6,25 µl 5x Nukleinsäure-Ladepuffer gegeben. Je 20 µl dieses Gemisches wurden in der Reihenfolge, in der sie im Cycler standen, in die Geltaschen pipettiert. Zur Ermittlung der Größe diente ein 100 bp DNA-Marker als Längenmaßstab. Die Elektrophorese wurde 60 Minuten bei 70 V durchgeführt. Die mit Ethidiumbromid eingelagerte DNA wurde durch das UV-Licht eines Transilluminators sichtbar gemacht. Es wurde die Bande mit dem stärksten Signal bestimmt und die dazugehörige Temperatur ermittelt (Abbildung 4). Die daraus abgeleiteten optimalen Annealingtemperaturen für alle untersuchten Faktoren sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die Gele wurden mit einer Videodokumentationsanlage fotografiert, vom Bildverarbeitungssystem erfasst und gespeichert.

Tabelle 2: Liste der optimalen Annealingtemperaturen.

<i>Faktor</i>	°C	<i>Faktor</i>	°C	<i>Faktor</i>	°C
18S rRNA	61	COX-2	60	PGFS	57
sPLA <sub>2</sub>	60	mPGES-1	60	H-PGDS	60
cPLA <sub>2</sub> α	56	mPGES-2	56	L-PGDS	61
cPLA <sub>2</sub> β	61	cPGES	61	PGIS	60
COX-1	61	HSD	60		

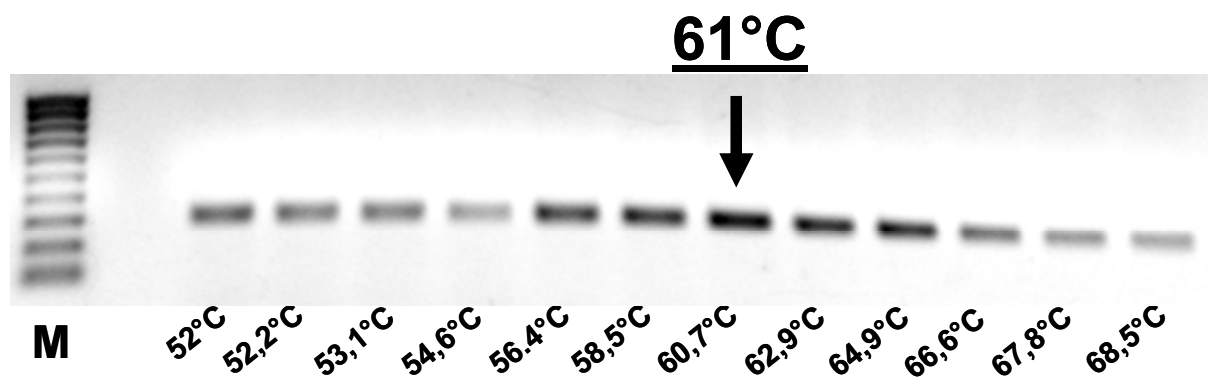


Abbildung 4: **Visualisierung der spezifischen RT-PCR-Produkte** (hier COX-1) **einer Gradienten-PCR** mittels eines 1% DNA-Agarosegels mit Ethidiumbromid zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur (invertiertes Bild). M: DNA-Größenmarker

#### 4.11 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte aus der Gradienten-PCR wurden bei Raumtemperatur mit dem Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System aufgereinigt. Die in der Gradienten-PCR erhaltenen spezifischen Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und abgewogen. Pro mg Gel wurde 1 µl Membranbindungspuffer auf die Gelstücke gegeben. Dieses Gemisch wurde unter gelegentlichem Mischen für 10 Minuten bei 65°C zum Schmelzen gebracht. Das Schmelzprodukt wurde anschließend auf die Säule des Aufreinigungskits gegeben und 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 1 Minute bei 16000 x g. Der Durchfluß wurde verworfen, 700 µl Membran-Waschpuffer auf die Säule pipettiert und erneut zentrifugiert. Der Durchfluß wurde wieder verworfen und ein weiterer Waschschritt mit anschließender Zentrifugation mit 500 µl Membran-Waschpuffer durchgeführt. Es folgte ein Trocknungsschritt bei 16000 x g für 4 Minuten. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 50 µl PCR-H<sub>2</sub>O direkt auf die Membran pipettiert. Nach 1 Minute wurde die Säule für 1 Minute bei 16000 x g zentrifugiert, der Durchfluß in ein neues Probenröhrchen überführt und bei 4°C gelagert.

Die Quantifizierung des PCR-Produkts erfolgte mittels PICO Green dsDNA Quantitation Kit. PICO Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der nur in doppelsträngiger DNA-Struktur interkaliert. Die Intensität der erhaltenen Fluoreszenzemission ist proportional zur DNA-Menge. Die Quantifizierung erfolgte durch Berechnung einer Eichgerade mittels einer Verdünnungsreihe. Die Verdünnungsreihe wurde mit dem mitgelieferten λ-DNA-Standard hergestellt (2, 5, 10, 25 und 50 ng/ml). Zur Messung wurden die Proben in einem Doppelansatz 1:20 mit Tris-EDTA-Puffer (im Kit enthalten) verdünnt, auch die Verdünnungsreihe des λ-DNA-Standards wurde mit Tris-EDTA-Puffer hergestellt. Je 100 µl der Probenlösung und der λ-DNA-Standards wurden in eine schwarze Mikrotiterplatte für Fluoreszenz mit transparentem Boden pipettiert. Danach wurden 100 µl der kurz vorher

lichtgeschützt hergestellten PICO Green-Lösung dazu pipettiert. Nach 5-minütiger Inkubation wurde die Messung im Fluorometer (Fluostar Optima) durchgeführt. Nach 3-sekündigem Schütteln wurde der PICO Green Farbstoff mit 485 nm angeregt und seine Emission bei 520 nm gemessen. Mithilfe der Regressionsgeraden der  $\lambda$ -DNA-Standard-Verdünnungsreihe konnten die Konzentrationen der Proben berechnet werden. Der Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden betrug 0,9998. Die Abweichung der Doppelproben betrug nicht mehr als 10%.

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden in der Sequenzierung und als Quantifizierungsstandard in der Real-Time-PCR eingesetzt.

#### 4.12 Sequenzierung der PCR-Produkte

Zur Ermittlung der DNA-Sequenzen wurde die Sequenziermethode nach dem Prinzip des Kettenabbruchverfahrens nach Sanger et al. (1977) durchgeführt, die einer PCR-Reaktion mit nur einem Primer entspricht. Nach der Denaturierung der doppelsträngigen DNA lagert sich der spezifische Primer an und die Polymerase beginnt mit der Synthese des Einzelstrangs. Dem Reaktionsansatz sind dabei zusätzlich zu den dNTPs eine limitierte Menge an ddNTPs zugesetzt. Die ddNTPs sind mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Beim Einbau der ddNTPs kommt es aufgrund der fehlenden OH-Gruppe am 3'-Ende zu statistischen, basenspezifischen Kettenabbrüchen. So entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die mit einem spezifischen fluoreszenzmarkierten Nukleotid enden. Dieses Gemisch verschieden langer und unterschiedlich fluoreszierender DNA-Fragmente kann dann mittels Kapillar-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt werden und die Sequenz mittels Laserabtastung ermittelt werden.

Die Sequenzierreaktion wurde mit 100-150 ng DNA (aufgereinigtes PCR-Produkt siehe 4.12) mit dem ABI® BigDye® Terminator v.3.1. Cycle Sequencing Kit durchgeführt.

Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet:

Tabelle 3: **Ansatz für die Sequenzierreaktion.**

<b><i>Ansatz pro Probe</i></b>	
Terminator Ready Reaction Mix (enthält DNA-Polymerase, dNTPs, ddNTPs, Puffer)	2 $\mu$ l
PCR-Produkt (20-30 ng/ $\mu$ l)	6 $\mu$ l
Primer forward (3,2 pmol)	2 $\mu$ l

Dieser Reaktionsansatz wurde mit 20  $\mu$ l Mineralöl überschichtet, um ein Verdunsten zu verhindern. Das Temperaturprogramm der Sequenzierreaktion (96°C für 10 Sekunden, 50°C

für 5 Sekunden und 60°C für 4 Minuten) wurde 25mal wiederholt. Danach wurde der Reaktionsansatz auf 4°C heruntergekühlt.

Die Analyse der Sequenzierreaktion wurde kommerziell auf einem Kapillar-Elektrophorese DNA Analyzer ABI 3730XL der Firma GATC Biotech, Konstanz, durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm DNASIS ausgewertet und mit bekannten Sequenzen in der EMBL-Datenbank verglichen.

#### 4.13 Real-Time-PCR mittels SYBR Green

Die Quantifizierung der cDNA wurde mittels Real-Time-PCR durchgeführt. Für die Durchführung wurde der DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet, der sich in die kleine Furche doppelsträngiger DNA einlagert. In gebundenem Zustand steigt die Intensität seiner Fluoreszenzemission. Proportional zur Vermehrung der Amplifikate erhöht sich die Intensität des Fluoreszenzsignals des SYBR Greens. Da die Real-Time-PCR es nach jedem einzelnen Zyklus der PCR ermöglicht, die Fluoreszenz des SYBR Greens zu messen, kann die Amplifikation so bereits in der frühen exponentiellen Phase der Real-Time-PCR detektiert werden. Dies ist ein entscheidender Vorteil gegenüber der traditionellen PCR, die nur den Endpunkt der PCR zeigt. Denn in der exponentiellen Phase sind noch alle Reagenzien frisch und ausreichend vorhanden, die Reaktion erfolgt sehr spezifisch und präzise. In der darauffolgenden linearen Phase verlangsamt sich die Reaktion bereits, da die „Bausteine“ verbraucht sind und die Endprodukte zu degradieren beginnen. In der Plateau-Phase stoppt die Reaktion. Es kommen keine weiteren Endprodukte mehr hinzu und die vorhandenen beginnen zu degradieren.

Bei der Durchführung der Real-Time-PCR wurden 0,1 ml Reaktionsgefäße verwendet. Je 9 µl des Real-Time-PCR-Reaktionsansatzes (siehe 3.10) wurden vorgelegt und anschließend je 1 µl cDNA, Standard oder PCR-H<sub>2</sub>O dazugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden verschlossen und in den Rotor Gene RG-3000 gestellt und das entsprechende Programm gestartet (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Temperaturprogramm für die Durchführung der Real-Time-PCR.

<i>PCR-Programm</i>		<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Zykluszahl</i>
Aktivierung der DNA-Polymerase		95°C	10 min	1
Cycling	Denaturierung	95°C	15s	variabel (Tab. 5)
	Annealing	variabel (Tab. 2)	20s	
	Extension	72°C	30s	
Schmelzen der Amplifikate		50°C-99°C	6s/1°C	1

Für jeden Faktor sind die Annealingtemperatur und die Zykluszahl für das Real-Time-PCR-Programm in Tabelle 2 und Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Anzahl der durchgeführten PCR-Zyklen für den jeweiligen Faktor in der Real-Time-PCR.

<i>Faktor</i>	<i>Zykluszahl</i>	<i>Faktor</i>	<i>Zykluszahl</i>	<i>Faktor</i>	<i>Zykluszahl</i>
18S rRNA	25	COX-2	40	HSD	45
sPLA <sub>2</sub>	45	mPGES-1	45	H-PGDS	45
cPLA <sub>2</sub> α	40	mPGES-2	45	L-PGDS	45
cPLA <sub>2</sub> β	35	cPGES	45	PGIS	45
COX-1	45	PGFS	45		

Aufgereinigte PCR-Produkte dienen zur externen Quantifizierung der spezifischen cDNA. Es wurde eine Verdünnungsreihe in 10er Verdünnungsschritten ( $1:10^3$ - $1:10^9$ ) des aufgereinigten und quantifizierten PCR-Produkts hergestellt und als Standard eingesetzt. Als Negativkontrollen wurden Reaktionsansätze verwendet, bei denen die Probe durch PCR-H<sub>2</sub>O ersetzt wurde oder durch Proben bei denen bei der reversen Transkription kein Enzym (reverse Transkriptase) zugesetzt wurde. Die Negativkontrollen waren bei allen Real-Time-PCR Ansätzen negativ.

Die Amplifizierung des Referenzgens 18S rRNA wurde für alle Proben zur Überprüfung der Qualität und Effizienz der reversen Transkription durchgeführt. Außerdem dienen die 18S rRNA Expressionsmengen zur Normalisierung der Expressionsdaten der Prostaglandinsyntheseenzyme.

Die Spezifität des PCR-Produkts wurde durch die Überprüfung des Schmelzpunktes des PCR-Produkts nachgewiesen (Tabelle 6).

Die Auswertung der Real-Time-PCR erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms Rotor-Gene 6.0. Dabei wurde für alle Proben der C<sub>T</sub>-Wert ermittelt. Dabei handelt es sich um den Wert bei dem der Threshold die Amplifikationskurve schneidet. Die C<sub>T</sub>-Werte werden in einem Bereich der Amplifikationskurve ermittelt, bei dem sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Fluoreszenzhintergrund abhebt und in dem die Amplifikation exponentiell verläuft. In dieser Phase ist die Bestimmung am genauesten, da zu diesem Zeitpunkt noch alle Ausgangsprodukte der PCR im Überschuss vorhanden sind und die Reaktion in dieser Phase noch sehr spezifisch und präzise erfolgt.

Es besteht eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge und dem C<sub>T</sub>-Wert. Durch das Auftragen des Logarithmus der bekannten Standardmenge gegen den C<sub>T</sub>-Wert wurde eine Standardkurve berechnet. So konnte für jede unbekannte Probe durch das Einsetzen ihres C<sub>T</sub>-Werts in die Geradengleichung  $x = (C_T - b)/m$  die Ausgangsmenge bestimmt werden. Der Korrelationskoeffizient der Standardkurven lag bei 0,99. Außerdem berechnete das Softwareprogramm anhand der Steigung der Regressionsgeraden die Effizienz der PCR-Reaktion, die durchschnittlich in einem Bereich von etwa 90% lag.



Tabelle 6: Spezifische Schmelztemperaturen der PCR-Produkte.

<b>Faktor</b>	<b>°C</b>	<b>Faktor</b>	<b>°C</b>	<b>Faktor</b>	<b>°C</b>
18S rRNA	84,8	COX-2	84,6	HSD	86,7
sPLA <sub>2</sub>	83,7	mPGES-1	86,5	H-PGDS	81,1
cPLA <sub>2</sub> α	79,1	mPGES-2	82,7	L-PGDS	88,4
cPLA <sub>2</sub> β	85,5	cPGES	77,7	PGIS	88,5
COX-1	87,9	PGFS	82,7		

#### 4.14 Immunhistologie

Die Oviduktproben wurden in 4%iger gepufferter Formaldehydlösung fixiert. Die Entwässerung und Einbettung der Proben in Paraffin erfolgte maschinell in einem vollautomatischen Unterdruckautomaten. Anschließend erfolgte das Ausgießen der Ovidukte in Paraffinblöcke an einer Paraffin-Ausgießstation. Das in Paraffin eingebettete Gewebe wurde mittels Schlittenmikrotom in 5 µm dicke Präparate geschnitten. Nach dem Strecken der Schnitte in einem 40°C warmen Paraffin-Streckbad wurden sie auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Sie wurden über Nacht im Hybridisierungsofen bei 37°C getrocknet und später bis zum Färbereinsatz bei Raumtemperatur gelagert. Die optimalen Vorbehandlungen der Gewebeschnitte und die Färbbedingungen für die jeweiligen Antikörper wurden in Vorexperimenten ermittelt.

Die zu färbenden Präparate wurden über Nacht im 56°C warmen Ofen gelagert und am nächsten Morgen zur Entparaffinierung unverzüglich direkt aus dem Ofen in frisches Xylol überführt. Nach 30 Minuten wurden die Präparate in einer absteigenden Alkoholreihe für jeweils 5 Minuten in 100%igem, 96%igem, 90%igem, 80%igem, 70%igem und 50%igem Ethanol rehydriert, gefolgt von 2 zehnmütigen Spülschritten mit H<sub>2</sub>O. Als nächstes wurden die Schnitte zur Demaskierung der Antigene für 6 Minuten in 95°C heißem Citratpuffer behandelt und danach in diesem für 30 Minuten zum Abkühlen belassen, bevor sie für 10 Minuten mit H<sub>2</sub>O gespült wurden. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Präparate für 15 Minuten in 3%igem Wasserstoffperoxid inkubiert, anschließend 10 Minuten mit H<sub>2</sub>O und danach mit TBS gespült. Die Präparate wurden mit einem Begrenzungsstift umrandet. Im Folgenden wurden die Paraffinschnitte, wenn erforderlich (siehe Tabelle 7) mit einer Blockierungslösung bei 38°C inkubiert, um elektrostatische Ladungen der Proteine im Untersuchungsmaterial abzusättigen und damit unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren.

Tabelle 7: Hybridisierungsbedingungen für die immunhistologischen Färbungen.

	Blockierung	Verdünnung des Primärantikörpers	Inkubation des Primärantikörpers	
			Temperatur	Zeit
<b>COX-1</b> BNr. 160108	TBSA-T + 10% Ziegennormalserum (v/v) 90 Minuten bei 38°C	1:2750 in TBSA-T+ 1% Ziegennormalserum (v/v)	4°C	über Nacht
<b>COX-2</b> BNr. 160106	nicht erforderlich	1:200 in TBSA	38°C	45 Minuten
<b>mPGES-1</b> BNr. 160140	TBSA-T +5% BSA (w/v) +10% Ziegennormal- serum (v/v) 1h bei 38°C	1:200 in TBSA-T + 1% Ziegennormalserum (v/v)	4°C	über Nacht

Danach wurde das Blockierungsreagenz vorsichtig mittels saugfähigen Zellstoffs entfernt und der Primärantikörper aufgetragen. Alle Inkubationen der Primärantikörper fanden wie in Tabelle 7 beschrieben statt. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Schnitte dreimal je 15 Minuten mit TBS gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde ENVISION+ verwendet, ein mit Meerrettichperoxidase konjugierter Antikörper aus der Ziege, der gegen Kaninchenantikörper gerichtet ist. Hier handelte es sich um eine gebrauchsfertige Antikörperlösung, die unverdünnt für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf die Schnitte verbracht wurde. Es folgten drei Spülschritte mit TBS für je 15 Minuten.

Zur Visualisierung der Immunreaktion wurde nun das Chromogen DAB+ für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf den Gewebeschnitt gegeben. Dieses reagiert mit der an den Sekundärantikörper gebundenen Meerrettichperoxidase zu einem unlöslichen braunen Farbprodukt. Die Schnitte wurden 30 Minuten mit H<sub>2</sub>O gewaschen, danach wurden sie 15 Sekunden mit Hämalaulösung gefärbt und dann 10 Minuten in lauwarmem, fließendem Leitungswasser gebläut. Das Eindeckeln erfolgte mit Glyceringelatine. Um unspezifische Färbungen auszuschließen wurde bei jeder Färbeserie eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der der Primärantikörper weggelassen und durch Normalserum oder IgG des Kaninchens ersetzt wurde. Die Verdünnung des Kaninchennormalserums entsprach mit 1:2750 der Verdünnung des COX-1 Antikörpers. Das Kaninchen-IgG entsprach mit einer Konzentration von 2,5 µg/ml den eingesetzten Konzentrationen des COX-2 Antikörpers.

#### 4.15 Proteinextraktion

Je nach Größe der Oviduktzellpellets wurden 100-300 µl RIPA-Lyse-Puffer auf das Zellpellet pipettiert und die Zellen durch ständiges Mischen lysiert. Dieses Lysat wurde 60 Minuten auf Eis gestellt. Danach erfolgte die auf der Lowry-Methode basierende Proteinmessung mittels

DC-Protein-Assay entsprechend der Herstellervorschrift. Zur Quantifizierung der Proben erfolgte nach Berechnung einer Regressionsgeraden, die mit Hilfe einer Verdünnungsreihe mit 0, 2, 4, 6, 8 und 10 mg/ml BSA erstellt wurde. Danach wurden 12 µl Teilproben hergestellt, die 20 µg Gesamtprotein enthielten, und diese mit 12 µl 2x SDS-Probenpuffer gemischt. Dieses Proteingemisch wurde bei -20°C gelagert.

#### 4.16 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurde mit der Mini PROTEAN 3 Gelelektrophorese-Apparatur durchgeführt. Als erstes wurde ein 10% SDS-Trenngel hergestellt, das zwischen die in die Gelgießapparatur eingespannten Glasplatten pipettiert wurde. Der Glaszwischenraum wurde bis ca. 2 cm zum oberen Rand der dünnen Glasplatte gefüllt und anschließend mit H<sub>2</sub>O überschichtet. Das Gel polymerisierte 2 Stunden, bevor das überschichtete Wasser wieder entfernt wurde. Dann wurde ein 5% SDS-Sammelgel hergestellt und zwischen die Glasplatten bis zum oberen Rand gefüllt. Sehr schnell wurde der Kamm eingesetzt und das Sammelgel 15 Minuten polymerisieren gelassen. In dieser Zeit wurden die Proben in einem Wärmeblock für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die innere und äußere Kammer mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt. Dann wurden jeweils 20 µl der denaturierten Proben in die Geltaschen eingefüllt. Als Positivkontrollen wurden jeweils 0,5 µg des COX-1 (ovine) Elektrophoresestandards oder des COX-2 (ovine) Elektrophoresestandards eingesetzt. Die Elektrophorese wurde mit folgendem Programm gestartet:

35 Minuten	80 V <sub>MAX</sub>	240 mA <sub>MAX</sub>	10 W <sub>MAX</sub>
70 Minuten	150 V <sub>MAX</sub>	400 mA <sub>MAX</sub>	30 W <sub>MAX</sub>

Die Elektrophorese wurde zu dem Zeitpunkt gestoppt, an dem der blaue Farbstoff aus dem Trenngel lief. Um die Größe der Proteinbanden zu bestimmen, wurden immer auch 20 µl Proteingrößenmarker (4 µl Precision Plus Protein Standards + 8 µl H<sub>2</sub>O + 12 µl 2x SDS-Probenpuffer) mit aufgetragen.

#### 4.17 Western Blot

Beim Blotting wurden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dies geschah mit dem Semi-Dry-Blot Verfahren nach Kyhse-Andersen (1984) mit Graphitelektroden. Die Elektrodenplatten wurden 1 Stunde vor dem Blot mit reichlich H<sub>2</sub>O befeuchtet, das vor dem Blot mit Filterpapier abgesaugt wurde. Als erstes wurden zwei mit Anoden-Puffer I getränkte Blotting-Papiere auf die Anode gelegt. Ein Blotting-Papier mit Anoden-Puffer II wurde darüber geschichtet. Als nächste Schicht kam die mit H<sub>2</sub>O angefeuchtete Nitrocellulosemembran, gefolgt von dem mit H<sub>2</sub>O gewaschenen SDS-Gel.

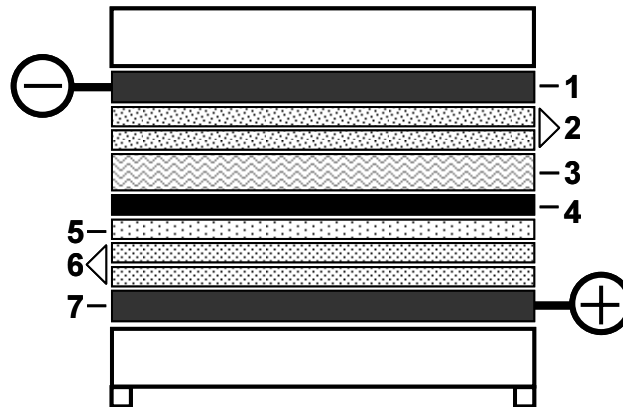


Abbildung 5: **Aufbau einer Semi-Dry-Blot Apparatur** 1: Graphitelektrode (Kathode); 2: Filterkarton getränkt mit Kathodenpuffer; 3: SDS-Gel; 4: Nitrocellulosemembran; 5: Filterkarton getränkt mit Anodenpuffer II; 6: Filterkarton getränkt mit Anodenpuffer I; 7: Graphitelektrode (Anode).

Auf das SDS-Gel wurden noch zwei mit Kathoden-Puffer getränkte Blotting-Papiere gelegt. Nach jeder Lage Papier wurden Luftblasen durch das Glattrollen mit einem Zentrifugenröhrchen entfernt. Anschließend wurde die Kathode aufgesetzt und beschwert. Die Proteine wurden 1 Stunde mit einer Stromstärke von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Danach wurde die Apparatur auseinander gebaut, die Nitrocellulosemembran 10 Minuten getrocknet und die Position der Markerbanden mit Kugelschreiber markiert.

#### 4.18 Western Blot Detektion

Die gesamten Inkubationen fanden in 50 ml Zentrifugenröhrchen unter ständigem Drehen statt. Die Nitrocellulosemembran wurde 10 Minuten mit Ponceau S-Lösung gefärbt, um den Proteintransfer zu überprüfen. Es handelt sich um eine reversible Färbung, die die anschließende Immunfärbung nicht beeinträchtigt. Nach 3 Waschschritten à 10 Minuten mit  $\text{H}_2\text{O}$  war der Farbstoff vollständig ausgewaschen. Zur Absättigung überschüssiger Proteinbindungsstellen wurde die Membran 60 Minuten mit ECL Blockierlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Dies verhinderte die unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte unter ständigem Drehen über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$ . Die eingesetzten Konzentrationen können der Tabelle 8 entnommen werden.

Tabelle 8: **Antikörperverdünnungen für Western Blot Detektion.**

	<i>Primärantikörper</i>	<i>Sekundärantikörper (BNr. NIF824)</i>
<b>COX-1</b> (BNr. 160108)	1:2000 in ECL Blockierlösung	1:100.000 in ECL Blockierlösung
<b>COX-2</b> (BNr. ab6665)	1:2500 in ECL Blockierlösung	1:100.000 in ECL Blockierlösung

Es folgten 6 Waschvorgänge mit PBS-T für jeweils 10 Minuten. Die Inkubation des HRP-konjugierten gegen Kaninchenantikörper gerichteten Sekundärantikörpers (NIF824) erfolgte dann für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem sorgfältigen Waschen mit PBS-T (6x

10 Minuten), wurde die Membran für 5 Minuten mit 2 ml ECL-Luminolreagenz überschichtet. Das ECL-Luminolreagenz wurde abgeschüttelt, die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen und für verschiedene Zeiten (30 Sekunden bis 1 Minute) auf einen Hyperfilm+ ECL Röntgenfilm aufgelegt. Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte in einem Röntgenfilm-Entwicklungsautomaten.

#### 4.19 Zellkultur

Die wie in 4.4 beschrieben ausgesäten Zellen wurden im Brutschrank bei 38°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% kultiviert. Nach 72 Stunden waren die Zellen adhärent und es wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Das alte Medium wurde abgesaugt und 4,75 ml OVI-1 pro Vertiefung dazu gegeben. Nach weiteren 12-16 Stunden wurden die Oviduktzellen mit 17β-Östradiol, Progesteron, PGE<sub>2</sub> oder Arachidonsäure stimuliert (siehe Tabelle 9). Die gewählten Steroid-Konzentrationen entsprachen den maximalen Blutserumwerten von 17β-Östradiol in der prä-ovulatorischen Phase und Progesteron in der Lutealphase des Rindes. 250 µl der Stammlösung wurden zum Medium geben, die Platten kurz geschwenkt und für 2, 4 und 6 Stunden im Brutschrank inkubiert. Als Kontrollen wurden nicht behandelte Proben nach 0, 2, 4 und 6 Stunden gewonnen, um eine Stimulation durch äußere, nicht hormonelle Einflüsse ausschließen zu können. Zur Probengewinnung wurde das Medium abgenommen und 700 µl Lysepuffer in die Vertiefung pipettiert. Die Platte wurde geschwenkt und der Lyse-Puffer abgenommen und wie in 4.6 beschrieben wurde die RNA aus diesen Proben extrahiert.

Tabelle 9: In den Stimulationsversuchen eingesetzte Hormonkonzentrationen.

<b>Substanz</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Endkonzentration</b>
17β-Östradiol	200 pg/ml	10 pg/ml
Progesteron	200 ng/ml	10 ng/ml
Arachidonsäure	60 µg/ml	3 µg/ml
PGE <sub>2</sub>	1,76 µg/ml	88 ng/ml

#### 4.20 COX-Aktivitätstest

Zur Bestimmung der Anteile der COX-1 und COX-2 Aktivitäten an der COX-Gesamtaktivität wurde der COX-Aktivitätstest Correlate-Enzyme™ Assay durchgeführt. Die Oviduktzellproben (4.5) wurden aufgetaut und durch kräftiges Auf- und Abpipettieren lysiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4°C für 5 Minuten bei 855 x g. Der Überstand wurde abgenommen und als Probe weiter verwendet. Der Aktivitätstest wurde in der im Kit enthaltenen Mikrotiterplatte durchgeführt.

Jede Probe wurde als Duplikat gemessen. Als COX-1 Inhibitor wurde SC-560 und als COX-2 Inhibitor wurde DuP-697 verwendet. Bei jedem Messvorgang wurden als Positivkontrollen ovines COX-1 und COX-2 verwendet. Es wurden die Ovidukte von 5 Tieren untersucht.

Tabelle 10: **Versuchsschema für den Cyclooxygenase-Aktivitätstest eines Ovidukts.**

Probe	Probe +	Probe +	Probe ohne	COX-1	COX-2
	SC-560	DuP-697	Arachidon- säure	120 IU/ml	40 IU/ml
			Negativ- kontrolle	Positiv- kontrolle	Positiv- kontrolle
2x	2x	2x			

In jede Vertiefung wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

50 µl Tris-Phenol-Puffer

50 µl Hämatin-Arbeitslösung

50 µl Probe oder Standard (siehe Tabelle 10)

In jeweils zwei Vertiefungen einer Probe wurden 24 µg SC-560, in zwei weitere 10 µg DuP-697 gegeben und 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 50 µl kaltes Chemilumineszenzsubstrat dazugegeben. Mittels Injektionsfluorometer wurden in alle Vertiefungen mit Ausnahme der Negativkontrolle 50 µl kalte Arachidonsäure-Arbeitslösung injiziert und sofort danach die Lumineszenz gemessen.

Für die Auswertung der Ergebnisse wurden die Duplikate gemittelt. Die unbehandelten Proben wurden auf 100% gesetzt und die inhibierten Proben dazu ins Verhältnis gesetzt.

#### 4.21 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), die graphischen Darstellungen mittels Excel-Software oder SPSS 13.0. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit ihren dazugehörigen Standardfehlern in Form von Balkendiagrammen dargestellt. Als Daten dienten die Verhältnisse (Ratio) aus der Menge an spezifischer mRNA korrigiert durch die Menge an 18S rRNA derselben Probe  $\times 10^6$ . Es wurde für jeden Faktor eine univariate Varianzanalyse durchgeführt. Ergab sich für den Faktor Zyklustag ein signifikanter Unterschied, so wurden weitere Post-hoc-Tests angeschlossen. Zeigten die standardisierten Residuen eine symmetrische Verteilung, so wurden parametrische Post-hoc-Tests (Tukey, Dunnett-T3) durchgeführt, bei einer schiefen Verteilung der standardisierten Residuen wurde mit nicht-parametrischen Tests (Wilcoxon, Kruskal-Wallis) weitergearbeitet. Bei Vorliegen einer symmetrischen Verteilung wurde der Levene-Test durchgeführt, um die Homologie der Varianzen zu überprüfen. Im positiven Falle wurde der Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt. Beim Vorliegen einer Varianzheterogenität wurde der Dunnett-T3 Test durchgeführt. Für die statistische Analyse der lokalen Expressionsunterschiede innerhalb derselben Zyklusphase und derselben Oviduktseite wurde der T-Test für unabhängige Stichproben verwendet, da die Information über die paarige Zuordnung der Oviduktabschnitte zu demselben Ovidukt beziehungsweise demselben Tier nicht vorhanden war. Bei der Ergebnisinterpretation muss daher beachtet werden, dass die nicht berücksichtigte Information der Paarigkeit dazu führen kann, dass ermittelte Unterschiede nicht die Grundgesamtheit widerspiegeln oder in der Grundgesamtheit auftretende Unterschiede nicht gefunden werden. Für die Ergebnisse der Zellkulturversuche wurde aufgrund der unterschiedlichen mRNA-Grundexpressionen in den Zellen der unterschiedlichen Tiere die mRNA Expression zum Zeitpunkt 0 Stunden für jedes Tier auf 100% gesetzt und die Proben der folgenden Zeitpunkte auf diesen Wert bezogen. Da bei Prozentwerten eine Normalverteilung nicht zugrunde gelegt werden kann, musste hier ein nicht-parametrischer Test durchgeführt werden. Beim Wilcoxon-Test für zwei abhängige Stichproben wurden die Kontrolle und Probe desselben Zeitpunkts und desselben Tiers auf Unterschiede untersucht. Die Ergebnisse der Western Blot Analysen wurden aufgrund der niedrigen Fallzahl von  $n=4$  pro Oviduktabschnitt lediglich einer deskriptiven Statistik unterzogen. Die Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen wurden ebenfalls deskriptiv statistisch ausgewertet. Für die statistische Auswertung COX-Aktivitätstests wurde aus denselben Gründen wie bei den Zellkulturversuchen der Wilcoxon-Test für zwei abhängige Stichproben verwendet. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  festgelegt.