

## 6 Diskussion

Die vorliegende Untersuchung befasste sich mit der Expressionsbestimmung ausgewählter Komponenten der Prostaglandinsynthese im bovinen Ovidukt während des normalen Sexualzyklus.

### 6.1 Tiermaterial und Methodik

Aufgrund des Tiermaterials aus dem Schlachthof konnte kein direkter Hormonstatus der Spendertiere erhoben werden. Die Einteilung der Ovidukte in die Zyklusphasen anhand der Ovar- und Uterusbefunde kann jedoch als zuverlässig beurteilt werden, da frühere Untersuchungen zeigten, dass große Übereinstimmungen zwischen den Ovar- und Uterusbefunden und den Hormonwerten im Blut bestehen, die es ermöglichten den Zyklusstand auf einen Tag genau zu bestimmen (Ireland et al., 1980). Die Einteilung der Ovidukte erfolgte in dieser Arbeit in vier mehrere Tage umfassende Zyklusphasen, was die Genauigkeit der Zuordnung zu bestimmten Hormonphasen während des Zyklus verbesserte. So kann definitiv davon ausgegangen werden, dass die folgenden endogenen Hormonwerte bei den Tieren vorlagen: Die postovulatorische Phase zeigte hohe aber abfallende Östradiolkonzentrationen im Blutserum und langsam steigende Progesteronwerte. Die frühe Lutealphase ist gekennzeichnet durch sehr hohe Progesteron- und niedrige Östradiolwerte. In der späten Lutealphase beginnt der Progesteronspiegel zu sinken und der Östradiolspiegel steigt langsam an. In der präovulatorischen Phase sind nur sehr niedrige Progesteronwerte und hohe Östradiolwerte sowie hohe LH und FSH-Konzentrationen zu messen.

Die Beurteilung des Gesundheitsstatus des Reproduktionstrakts erfolgte makroskopisch. Die Ovidukte trächtiger oder erkrankter Tiere (Entzündungen, Zysten, Tumore, etc.) wurden nicht berücksichtigt. Da Prostaglandine wichtige Entzündungsmediatoren sind (Morita, 2002), wurde ein besonderes Augenmerk auf Entzündungsprozesse innerhalb des Genitaltrakts gelegt. Dies war wichtig, da bei dieser Untersuchung nur die zyklusabhängigen Veränderungen betrachtet werden sollten. Die zytologischen Untersuchungen von Fischer (2006) zeigten, dass in 32 Uteri, die identisch gewonnen und eingeteilt wurden, wie die Ovidukte in dieser Arbeit, keine Hinweise auf Entzündungserscheinungen im Uterus gefunden wurden. Da es sich bei Entzündungen des Reproduktionstrakts oftmals um aufsteigende Infektionen handelt, ist anzunehmen, dass in den Ovidukten keine Entzündungen vorlagen, wenn der Uterus nicht betroffen war. Während die Proben für die immunhistologischen Färbungen direkt im Schlachthof präpariert und fixiert wurden, erfolgte für alle anderen Nachweismethoden die Probenpräparation im Berliner Labor innerhalb von 2-4 Stunden. Diese vierstündige gekühlte Lagerung ist für die RNA unkritisch. Untersuchungen von Fitzpatrick et al. (2002) zeigten, dass die RNA von bovinen Reproduktionsorganen, die bei Raumtemperatur gelagert wurden, 24 Stunden stabil und eine Degradierung erst nach 48 und 96 Stunden zu erkennen war.

Es wird angenommen, dass das aktive Epithel ein wichtiger Faktor innerhalb der embryomaternalen Kommunikation ist. Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit, die

Prostaglandinsynthese innerhalb der Mukosaschicht zu untersuchen. Als Probenmaterial wurden Zellen verwendet, die mittels Ringerlösung aus dem Ovidukt gespült wurden. Bei dieser Methode wurden die glatten Muskelzellen der Tunica muscularis von der Untersuchung ausgeschlossen und der Anteil an Stromazellen gering gehalten. Tiemann et al. (1996) und Gabler et al. (1997) zeigten, dass der Epithelzellanteil bei dieser Methode 60% betrug. Auch andere Gewinnungsmethoden zeigten keine höheren Epithelzellanteile, zudem wäre die Gewinnung wesentlich aufwendiger und für die Zellen belastender gewesen (Walter, 1995). Die untersuchten Zellen waren also ein Gemisch aus Epithel- und Stromazellen und keine reinen Epithelzellen. Deshalb wurden die Zellen in dieser Arbeit zusammenfassend als Oviduktzellen bezeichnet.

Dies gilt ebenfalls für die Zellkulturversuche. Auch dort lag ein Gemisch aus Epithel- und Stromazellen vor, was mittels immunhistologischer Färbung für Zytokeratin nachgewiesen wurde (Daten nicht abgebildet). Mit dieser Mischkultur wurde berücksichtigt, dass die Epithelzellen in vivo nicht nur untereinander, sondern auch zu Stromazellen Kontakt haben. Vorversuche bestätigten, dass der Zellverband zwischen Epithel- und Stromazellen für das Wachstum in der Zellkultur wichtig ist. Nachteilig ist, dass die Expressionsleistung nicht für jede einzelne Zellart differenziert ist. Trotzdem bleibt die Zellkultur ein künstliches Modellsystem, das nicht alle physiologischen Vorgänge in der intakten Oviduktmukosa nachstellen kann. Dies war auch daran zu erkennen, dass das Expressionsniveau in den kultivierten Zellen lediglich von 4 Faktoren (cPLA<sub>2</sub>α, cPLA<sub>2</sub>β, cPGES, PGFS) dem der Oviduktzellen in vivo entsprach. Dagegen war die mRNA Expression von COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2 und HSD in den kultivierten Zellen wesentlich höher und die mRNA Expression von L-PGDS und PGIS wesentlich geringer als in den Oviduktzellen aus den in vivo Untersuchungen. Die mRNA Expression von zwei untersuchten Faktoren ging im Verlauf der Kultivierung sogar gänzlich verloren. Es ist anzunehmen, dass in vitro die geeigneten Faktoren fehlten, die die mRNA Expression von sPLA<sub>2</sub>I<sub>B</sub> und H-PGDS stimulieren. Also hat allein die Kultivierung der bovinen Oviduktzellen bereits einen starken Einfluss auf deren Prostaglandinsynthese. Die in vitro Untersuchungen zeigten viele signifikante Unterschiede zwischen der mRNA Expression der behandelten und unbehandelten Zellen, auf die im Ergebnisteil und in der Diskussion nicht näher eingegangen wurde. Bei diesen signifikanten Expressionsunterschieden von nur 10-15% ist die biologische Relevanz dieser Beobachtungen anzuzweifeln.

Die Steroidbehandlung der kultivierten Oviduktzellen zeigte, dass Sexualsteroid bei den Motilitätsveränderungen des Ovidukts eine wichtige Rolle spielen. Ruckebusch und Bayard (1975) haben mittels Elektromyogramm starke Schwankungen der Oviduktaktivität im Zyklusverlauf festgestellt. Dabei traten die stärksten und kontinuierlichsten Kontraktionen der Oviduktmuskulatur während des Östrus und in der postovulatorischen Phase auf. Auch Bennett et al. (1988) fanden mit dem Sinken des Progesteronspiegels 2-3 Tage vor dem Östrus einen Anstieg der Oviduktcontractilität, die bis Tag 5 nach dem Östrus sehr konstant blieb. Zusätzlich stellten sie fest, dass die Aktivität im ipsilateralen Ovidukt stets höher war

als im kontralateralen. Für die seitenabhängigen Effekte scheinen zusätzlich lokale Faktoren aus dem Ovar bzw. aus dem reifenden Follikel verantwortlich zu sein. Wijayagunawardane et al. (1998) zeigten, dass die Gewebekonzentrationen von Progesteron, Östradiol, PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub> im bovinen Ovidukt sowohl zyklusabhängig als auch seitenabhängig variierten. In den ipsilateralen Ovidukten waren die Progesterongehalte in den Lutealphasen 5fach höher und die Östradiolgehalte in der präovulatorischen Phase 4mal höher als im kontralateralen Ovidukt derselben Zyklusphase. Die Konzentrationen der Prostaglandine E<sub>2</sub> und F<sub>2α</sub> waren sowohl in der prä- als auch der postovulatorischen Phase in den ipsilateralen Ovidukten 2-4mal höher als in den kontralateralen. Die PGE<sub>2</sub>-Konzentration erreichte Werte um 850 ng/g Oviduktgewebe, PGF<sub>2α</sub> dagegen eine Konzentration von 250 ng/g Oviduktgewebe. Es ist zu vermuten, dass mit der Follikelflüssigkeit eine wesentlich höhere Steroidkonzentration in das ipsilaterale Ovidukt gelangt als durch die Blutzufuhr. Denn während die Östradiolkonzentration im Blut maximal zwischen 10 und 20 pg/ml liegt, enthält die Follikelflüssigkeit Östradiolkonzentrationen bis zu 50 ng/ml in der postovulatorischen Phase (Brantmeier et al., 1987). Höhere Hormonkonzentrationen könnten wiederum einen großen Einfluss auf die Expressionsleistung der Oviduktzellen haben.

Im Allgemeinen kann davon ausgegangen werden, dass Steroide im bovinen Ovidukt wirken können, da dort sowohl Östradiol- als auch Progesteronrezeptoren gefunden wurden (Ulbrich et al., 2003). Die mRNA Expression der Rezeptoren variierte mit dem Zyklusverlauf. Der Progesteronrezeptor war in der prä-ovulatorischen Phase 4mal so hoch exprimiert wie in den anderen Zyklusphasen. Im Isthmus wies der Östradiolrezeptor  $\alpha$  in der präovulatorischen Phase eine doppelt so hohe mRNA Expression auf wie in den anderen Zyklusphasen, der Östradiolrezeptor  $\beta$  zeigte verglichen mit den Ampullen eine höhere Expression in den Isthmusabschnitten. In vitro führte die Behandlung mit Östradiol führte zu einem starken Anstieg der Östradiol  $\alpha$  und Progesteronrezeptor mRNA Expression. Die Behandlung der Zellen mit Progesteron bewirkte den Anstieg der Östradiolrezeptor  $\beta$  und Progesteronrezeptor mRNA Expression.

In dieser Arbeit wurde die mRNA Expression verschiedenster Enzyme, die an der Synthese von Prostaglandinen beteiligt sind, gemessen. Dies erfolgte mittels Real-Time-PCR, die eine Quantifizierung der mRNA und damit den Vergleich verschiedenener Proben innerhalb desselben Laufs ermöglicht. Die Mengen wurden in fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA gemessen und bezogen auf die Menge der 18S rRNA  $\times 10^{-6}$  dargestellt. Die Normalisierung der Ergebnisse mit 18S rRNA diente dazu leichte Schwankungen zwischen den verschiedenen Proben bezüglich der Effizienz der reversen Transkription auszugleichen. Die 18S rRNA ist ein typisches Referenzgen, das für solche Zwecke verwendet wird. Dies war für die Korrektur der vorliegenden Daten gut geeignet, da ihre Expression in den Zellkulturversuchen konstant war und die Expressionsunterschiede in den Ovidukten im Verlauf des Zyklus maximal 15% betragen. Es war eine Tendenz zu erkennen, dass die 18S rRNA Expression in der postovulatorischen Phase etwas höher war als in den Lutealphasen. Dieser geringe Unterschied wird vermutlich biologisch nicht relevant sein. Die Tatsache, dass das

Expressionsmuster der einzelnen Faktoren nach der Korrektur mit der 18S rRNA dem unkorrigierten Expressionsmuster entsprach, unterstreicht, dass die 18S rRNA als Korrekturfaktor geeignet war.

Die Überprüfung der PCR-Produkte mittels Sequenzierung zeigte, dass es sich um die gesuchten Transkripte handelte. Geringe Abweichungen von der 100%igen Homologie zur bekannten bovinen Sequenz deuten darauf hin, dass es sich hier um einen Polymorphismus innerhalb der Gensequenz oder einen Amplifizierungsfehler während der PCR oder Sequenzierreaktion handeln könnte.

## 6.2 Phospholipasen

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Phospholipasen, deren Sequenzen für das Rind bekannt waren, untersucht und ihre Transkripte erstmalig in bovinen Oviduktzellen nachgewiesen. Der Nachweis verschiedener Phospholipasen im Ovidukt war zu erwarten, da bei anderen Spezies mehrere Phospholipasen innerhalb eines Gewebes und sogar innerhalb einer Zelle vorkommen. Diese sind unabhängig voneinander reguliert und erfüllen verschiedene Funktionen (Murakami et al., 1995). Die drei untersuchten Phospholipasen wurden während des Zyklus ebenfalls unterschiedlich exprimiert und haben möglicherweise unterschiedliche Bedeutungen im Ovidukt.

Zur Untersuchung der Phospholipasen im bovinen Oviduktepithel wurden in dieser Arbeit die Transkripte von cPLA<sub>2</sub>α und cPLA<sub>2</sub>β quantifiziert. Das Expressionsniveau von cPLA<sub>2</sub>α war über den gesamten Zyklusverlauf in den Oviduktzellen relativ konstant und es wurden keine regionalen Unterschiede festgestellt. Dies und die Tatsache, dass cPLA<sub>2</sub>α stark selektiv auf Arachidonsäure in der C-2 Position wirkt (Lappas und Rice, 2004), lässt vermuten, dass cPLA<sub>2</sub>α im bovinen Ovidukt eine „Housekeeping“-Funktion haben könnte, die einen konstanten Gehalt und somit eine Mindestmenge an Arachidonsäure zur Verfügung stellt. In den meisten Geweben wird cPLA<sub>2</sub>α jedoch als induzierbar beschrieben (Kudo und Murakami, 2002). Die Induzierbarkeit konnte durch die Zellkulturversuche demonstriert werden, denn die bovinen Oviduktzellen wiesen 6 Stunden nach der Behandlung mit Östradiol oder Progesteron einen signifikanten Anstieg der cPLA<sub>2</sub>α mRNA Konzentration auf. Der Expressionsanstieg in den Zellkulturversuchen durch Östradiol und Progesteron war ähnlich stark, was eventuell erklären könnte, weshalb beim Rind keine zyklischen Veränderungen zu bemerken sind. Im Gegensatz dazu konnte der Einfluss von Sexualsteroiden auf die Epithelzellen des Kaninchenovidukts von Morishita et al. (1993) nachgewiesen werden. Bei östradiolbehandelten Kaninchen herrschte eine signifikant höhere PLA<sub>2</sub>-Aktivität im Oviduktepithel vor verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren. Dagegen führte die Behandlung der Tiere mit Progesteron zu keinen Veränderungen. Kaninchen, die erst mit Östradiol vorbehandelt und dann mit Progesteron behandelt wurden, zeigten eine signifikante Abnahme der PLA<sub>2</sub>-Aktivität. Eine erhöhte PLA<sub>2</sub>-Aktivität im Ovidukt führte zur Zunahme von PGF<sub>2α</sub>. Das bedeutet, dass Tiere, die gerade einen hohen Östradiolwert haben, vermehrt PGF<sub>2α</sub> im Ovidukt synthetisieren. PGF<sub>2α</sub> wirkt dann auf die

---

zirkuläre Muskulatur des Isthmus, führt zu einer Blockierung des Isthmus und verhindert so das frühzeitige Passieren des frühen Embryos. Mit dem Anstieg des Progesteronspiegels sinkt die PLA<sub>2</sub>-Aktivität und damit der PGF<sub>2α</sub>-Gehalt. Das hat die Auflösung des Isthmusverschlusses zur Folge. Darüberhinaus wurde nachgewiesen, dass im Kaninchenovidukt die PLA<sub>2</sub>-Aktivität im Epithel der Ampulle höher ist als im Epithel des Isthmus.

Eine Behandlung der bovinen Oviduktzellen mit Arachidonsäure und PGE<sub>2</sub> zeigte nach 4 und 6 Stunden einen leichten, aber signifikanten Anstieg. Die biologische Relevanz dieses Effekts ist jedoch fraglich, da es sich um eine sehr moderate Erhöhung der Transkriptmenge handelte. In Mausmodellen konnte die Wichtigkeit von cPLA<sub>2α</sub> gezeigt werden, denn cPLA<sub>2α</sub><sup>-/-</sup> Tiere zeigten starke Defekte in Reproduktionsvorgängen wie z.B. eine reduzierte Trächtigkeitsrate, kleinere Wurfgrößen und viele Totgeburten (Bonventre und Sapirstein, 2002). Inwiefern die Erkenntnisse auf andere Spezies übertragen werden können, ist unklar. Man kann aber davon ausgehen, dass cPLA<sub>2α</sub> die vorherrschende Phospholipase ist, die Arachidonsäure für beide Cyclooxygenasen zur Verfügung stellt (Bonventre und Sapirstein, 2002). Eine ähnlich essentielle Rolle ist auch für das Rind denkbar.

Im Gegensatz zu cPLA<sub>2α</sub> wies cPLA<sub>2β</sub> eine starke zyklusabhängige Regulation auf mit der niedrigsten mRNA Expression in der frühen Lutealphase und der höchsten in der präovulatorischen Phase. Die absoluten Mengen waren wesentlich höher als bei den anderen Phospholipasen. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Angaben in der Literatur, die humane cPLA<sub>2β</sub> als ubiquitäres Enzym beschreiben, das nur auf niedrigem Niveau exprimiert wird (Lucas und Dennis, 2004). Die Funktion von cPLA<sub>2β</sub> im Ovidukt ist noch unklar, denn cPLA<sub>2β</sub> besitzt neben seiner PLA<sub>2</sub>-Aktivität, die geringer ist als die von cPLA<sub>2α</sub>, zusätzlich die ausgeprägte Fähigkeit Fettsäuren vom C-1 Atom der Membranphosphoglyceride abzuspalten (PLA<sub>1</sub>-Aktivität) (Song et al., 1999; Hirabayashi et al., 2004). Es wäre möglich, dass cPLA<sub>2β</sub> neben der Prostaglandinsynthese weitere Funktionen inne hat. Trotzdem lässt die starke Hochregulation der cPLA<sub>2β</sub> mRNA Expression vor der Ovulation vermuten, dass diese Phospholipase eine wichtige Rolle bei den Reproduktionsprozessen in dieser Phase spielen könnte. Das Expressionsmuster von cPLA<sub>2β</sub> würde zu dem deutlich hormonabhängigen Phospholipase-Aktivitätsprofil im Kaninchenovidukt passen. Die Behandlung der kultivierten bovinen Oviduktzellen mit Östradiol hatte jedoch keinen Einfluss auf die cPLA<sub>2β</sub> mRNA Expression. Es ist deshalb anzunehmen, dass in vivo andere Faktoren an der Hochregulation während des Zyklus beteiligt sein müssen. Es ist zudem von einer systemischen Stimulation auszugehen, da es keine regionalen Expressionsunterschiede gab. Die Behandlung der kultivierten Oviduktzellen mit Progesteron führte nach 2 und 4 Stunden nur zu einer leichten Abnahme der cPLA<sub>2β</sub> mRNA Expression. Die starke Regulation der cPLA<sub>2β</sub> mRNA Expression während des Zyklus scheint somit durch nicht-steroidale Faktoren hervorgerufen zu werden. Zusammenfassend lässt sich für die beiden cytosolischen Phospholipasen feststellen, dass die von Morishita et al. (1992) im Kaninchenovidukt gefundenen lokalen Unterschiede in der

Phospholipase-Aktivität im bovinen Ovidukt zumindest auf Transkriptionsebene nicht bestätigt werden konnten. Hierbei könnte es sich um einen Speziesunterschied handeln.

Grippe et al. (1994) haben Phospholipase-Aktivität in boviner Oviduktflüssigkeit gemessen. Das deutet darauf hin, dass Prostaglandine im Lumen des Ovidukts bei der Befruchtung, der Entwicklung des Embryos oder der Spermienreifung eine Rolle spielen könnten. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass eine sekretorische Phospholipase für die PLA<sub>2</sub>-Aktivität in der Oviduktflüssigkeit verantwortlich ist, da die cytosolischen Phospholipasen den Arachidonsäuremetabolismus nur innerhalb der Zelle regulieren (Murakami et al., 1995). Die desweiteren untersuchte sekretorische PLA<sub>2</sub>IB zeigte aber keine Zyklusregulation. Signifikante Expressionsunterschiede bestanden aber zwischen den verschiedenen Oviduktabschnitten: Die sPLA<sub>2</sub>IB mRNA Expression war in den Ampullenabschnitten wesentlich höher als in den Isthmusabschnitten. Dieses Ergebnis unterstreicht die Vermutung, dass Prostaglandine bei der Reproduktion des Rindes eine Rolle spielen könnten, da sich die wichtigen fortpflanzungsrelevanten Prozesse wie Befruchtung und frühe Embryonalentwicklung in der Ampulle abspielen. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den bereits erwähnten Untersuchungen von Grippe et al. (1994), die die höchste PLA<sub>2</sub>-Aktivität nach der Ovulation im Isthmus ermittelten; weitere sPLA<sub>2</sub>-Typen könnten dafür verantwortlich sein.

sPLA<sub>2</sub>IB scheint im Gegensatz zu den cytosolischen Formen der PLA<sub>2</sub> nur in geringen Mengen exprimiert zu werden. Dieser Befund deutet darauf hin, dass sPLA<sub>2</sub>IB eventuell eine untergeordnete Rolle in der Prostaglandinsynthese des Ovidukts spielt. Diese Annahme wird unterstützt durch Angaben in der Literatur, dass sPLA<sub>2</sub>IB hauptsächlich im Verdauungstrakt vorkommt (Kudo und Murakami, 2002), wo sie für den Abbau von Nahrungsphospholipiden zuständig ist (Murakami et al., 1995). Sie wurde aber auch in nicht-digestiven Geweben gefunden, wobei ihre Funktion dort noch unklar ist (Murakami et al., 1995). Außerdem gibt es noch 9 weitere sekretorische PLA<sub>2</sub>, die bisher noch nicht untersucht wurden und für die beschriebene Phospholipase-Aktivität in boviner Oviduktflüssigkeit verantwortlich sein könnten. Sekretorische PLA<sub>2</sub>s können ihre Wirkung nicht nur innerhalb ein und derselben Zelle entfalten, sondern auch extrazellulär als Hormone oder Zytokine wirken und die Funktion benachbarter Zellen beeinflussen (Murakami et al., 1995). Sie regulieren dort beispielsweise die Chemotaxis und Proliferation bestimmter Zellen. Aufgrund dieser parakrinen Eigenschaften könnten sie wichtig sein für das chemotaktische Anlocken der Spermatozoen, die Beteiligung an der Cumulusexpansion oder Kapazitation.

So scheinen die cytosolischen PLA<sub>2</sub>s in den Oviduktzellen von größerer Bedeutung zu sein als sPLA<sub>2</sub>IB, da sie in wesentlich höheren Mengen exprimiert werden. Die Zellkulturversuche bestätigten dies ebenfalls, denn es konnte nach 96 Stunden keine sPLA<sub>2</sub>IB mRNA mehr nachgewiesen werden.

### 6.3 Cyclooxygenasen

Durch die Cyclooxygenasen 1 und 2 wird  $\text{PGH}_2$  synthetisiert, die wichtige Vorstufe aller Prostaglandine. COX-1 wird in den meisten Geweben als konstitutives Enzym beschrieben (Kniss, 1999). In verschiedenen Spezies und Zellarten konnte bereits nachgewiesen werden, dass COX-1 durch verschiedenste Stimuli wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, Hormone oder Interleukine induziert wird (Morita, 2002). In bovinen Oviduktzellen dagegen zeigte die COX-1 mRNA Expression eine starke Regulation im Zyklusverlauf. Die höchste COX-1 mRNA Expression wurde in der postovulatorischen Phase gemessen. Da es keine regionalen Unterschiede zwischen den ipsilateralen und kontralateralen Ovidukten gab, handelt es sich hier wahrscheinlich nicht um einen lokalen Effekt, der durch direkten Kontakt mit Follikelflüssigkeit oder der Oozyte hervorgerufen wurde, sondern um einen systemischen Effekt, der durch Faktoren im Blutkreislauf ausgelöst wurde. Östradiol und Progesteron als wichtige Regulatoren des Sexualzyklus können aber aufgrund der Zellkulturversuche als kurzfristig wirkende Stimulantien ausgeschlossen werden. Die COX-1 mRNA Menge blieb in den kultivierten Oviduktzellen trotz Steroidbehandlung unverändert. In ovinen Endothelzellen dagegen konnte COX-1 durch  $17\beta$ -Östradiol stimuliert werden (Morita, 2002). Für die erhöhte COX-1 mRNA Expression im Rind vor und nach der Ovulation könnten demnach auch die Hormone LH und FSH verantwortlich sein.

Für COX-1 wurde im Western Blot eine spezifische Bande mit einer Größe von etwa 70 kDa detektiert, dies entspricht der von Arosh et al. (2004) im bovinen Reproduktionstrakt detektierten Proteingröße. Die COX-1 Proteinkonzentration im bovinen Ovidukt war im Vergleich zur mRNA ebenfalls stark zyklusabhängig. Es konnte gezeigt werden, dass der Anstieg der COX-1 mRNA in der post-ovulatorischen Phase zu einem verzögerten Anstieg der Proteinmenge in der frühen Lutealphase führte. COX-1 könnte somit an der Bereitstellung der optimalen Bedingungen für eine erfolgreiche Befruchtung und die Entwicklung des Embryos beteiligt sein.

Immunhistologische Färbungen zeigten, dass COX-1 in den bovinen Epithelzellen und den glatten Muskelzellen exprimiert wurde, was den Ergebnissen bei Mensch und Maus entsprach (Huang et al., 2002; Huang et al., 2004b). Unterschiede gab es zwischen diesen Tierspezies nur bezüglich der Verteilung innerhalb des Epithels. In den Epithelzellen des humanen Ovidukts wurde COX-1 überwiegend in nicht zilientragenden Zellen nachgewiesen (Huang et al., 2002). Im bovinen Ovidukt wurde COX-1 dagegen in den Phasen um die Ovulation herum hauptsächlich in zilientragenden Zellen exprimiert. In den Lutealphasen konnte keine Bevorzugung einer Zellart gesehen werden. Innerhalb der bovinen Epithelzellen waren sowohl das Zytoplasma als auch der Kern angefärbt, was identisch mit den immunhistologischen Färbungen in humanen Ovidukten war (Huang et al., 2002). In den glatten Muskelzellen war COX-1 nur im Zytoplasma angefärbt und vermutlich, wie bei anderen Spezies, im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Smith et al., 1996). Die unterschiedlichen Lokalisationen könnten mit den Kopplungen der verschiedenen terminalen Prostaglandinsynthesen zusammenhängen. Denn je näher sich die Cyclooxygenasen in der

Nachbarschaft bestimmter Prostaglandinsynthasen befinden, desto wahrscheinlicher ist ihre Kopplung. COX-1 könnte mit mPGES-1 gekoppelt sein, da die immunhistologischen Färbungen gemeinsame Positionen aufzeigten.

Im Gegensatz zu COX-1 zeigte COX-2 keine zyklusabhängige mRNA- und Proteinexpression im bovinen Ovidukt. Auch im humanen Ovidukt wird COX-2 konstitutiv exprimiert (Huang et al., 2002). Die *in vitro* Versuche zeigten jedoch, dass die COX-2 mRNA Expression in bovinen Oviduktzellen durch die Behandlung mit Östradiol oder Progesteron nach 4 und 6 Stunden aufreguliert werden konnte. Das stimmt mit den Angaben in der Literatur überein, die COX-2 als induzierbare Isoform beschreiben (Kniss, 1999). Wijayagunawardane et al. (1998) konnten die höchsten Östradiolkonzentrationen im ipsilateralen Ovidukt in den Phasen um die Ovulation herum messen, was vermuten lässt, dass Östradiol zu diesem Zeitpunkt aus dem Follikelsprung stammt. Der stimulierende Effekt des Östradiols könnte so einen kurzfristigen Anstieg der COX-2 mRNA direkt nach der Ovulation auslösen, was die sehr hohen COX-2 mRNA Expression in einigen Ampullenabschnitten des ipsilateralen Ovidukts erklären würde. Wijayagunawardane et al. (1999a) zeigten auch, dass 24 Stunden nach der Östradiolbehandlung die PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub> Produktion in bovinen Oviduktzellen gesteigert war. Es ist möglich, dass ein kurzzeitiger Anstieg von COX-2 mRNA in der postovulatorischen Phase für die erfolgreiche Reproduktion notwendig ist. Da die postovulatorischen Oviduktproben einen Zeitraum von mehreren Tagen umspannen, ist es durchaus möglich, dass solche Kurzeiteffekte in unseren Experimenten nicht erfasst wurden. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass eine COX-2 mRNA Stimulation nur für wenige Stunden detektierbar war (Han et al., 1996; Parent et al., 2003). COX-2 ist in der Lage in kurzer Zeit und für einen begrenzten Zeitraum aus niedrigen Arachidonsäurekonzentrationen PGH<sub>2</sub> zu produzieren (Murakami et al., 2000). Bei COX-2 defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von COX-2 essentiell für die frühen Reproduktionsvorgänge ist (Lim et al., 1997). Dies könnte durchaus auch für die Kuh zutreffen.

COX-2 zeigte im Western Blot eine reduzierte Größe von 60 kDa im bovinen Oviduktepithel verglichen mit der bekannten Größe von 72 kDa im Endometrium (Arosh et al., 2002). Spleißvarianten konnten aber durch zusätzliche Untersuchungen unter Einbeziehung aller Exons ausgeschlossen werden. Da die Spezifität des Antikörpers anhand einer Positivkontrolle aber voll bestätigt worden war, ist anzunehmen, dass dieses COX-2 Protein eine posttranslational trunkeerte Form sein könnte. Die Veränderung muss am N-terminalen Ende stattfinden, denn der verwendete Antikörper erkennt den C-Terminus, der auch die katalytische Domäne enthält. Andere Studien unterstützen diese Beobachtungen, da ebenfalls kleinere Banden von 62 oder 59 kDa in bovinen Follikeln und Rattengranulosazellen gefunden wurden (Sirois und Richards, 1992; Sirois, 1994).

Die Lokalisation von COX-2 im bovinen Ovidukt ist hauptsächlich auf die zillientragenden Epithelzellen begrenzt. Obwohl sich COX-2 im Allgemeinen hauptsächlich im Kern befinden sollte (Smith et al., 1996), wurde COX-2 im bovinen Oviduktepithel ausschließlich im



---

Zytoplasma lokalisiert. In glatten Muskelzellen kam COX-2 gar nicht vor, sodass eine Funktion von COX-2 in der Muskulatur nicht indiziert erscheint. Im Gegensatz dazu wurde in humanen und murinen Ovidukten COX-2 sowohl in Epithelzellen als auch in glatten Muskelzellen gefunden (Huang et al., 2002; Huang et al., 2004b). Die verschiedenen lokalen COX-2 Expressionsmuster bei Rind, Maus und Mensch könnten speziesspezifische Unterschiede darstellen. Die von Murakami et al. (2000) beschriebene funktionelle Kopplung und gemeinsame Lokalisation von COX-2 und mPGES-1 innerhalb der Zellen kann für das Rind nicht bestätigt werden. Die Expressionsdaten zeigten keine Korrelation und auch die immunhistologischen Färbungen zeigten unterschiedliche Lokalisationen innerhalb der Zellen. Im Gegensatz zu COX-2, das im Zytoplasma der Epithelzelle lokalisiert war, wurde mPGES-1 ausschließlich im Zellkern gefunden. In den glatten Muskelzellen wurde COX-2 verglichen mit mPGES-1 nicht beobachtet.

Im Gegensatz zum bovinen Endometrium, in dem COX-1 gar nicht, dafür aber COX-2 detektiert wurde (Arosh et al., 2004), war im Ovidukt die Menge an COX-1 mRNA und Protein während des gesamten Zyklus mehrfach höher als die von COX-2. Mittels COX-Aktivitätstest wurde zusätzlich gezeigt, dass COX-1 den überwiegenden Anteil an der Gesamt-COX-Aktivität im bovinen Ovidukt stellt. Dies untermauert die herausragende Rolle von COX-1 im bovinen Ovidukt. Außerdem lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass COX-1 und COX-2 verschiedene Rollen im Ovidukt spielen. So wurde beschrieben, dass COX-1 höhere Arachidonsäurekonzentrationen benötigt als COX-2 (Murakami et al., 2002). Die spezielle Lokalisation von COX-1 in Epithelzellen sowie glatten Muskelzellen unterstützt die Annahme, dass COX-1 unterschiedliche Wirkweisen besitzen könnte: Es ist erstens wahrscheinlich, dass COX-1 in der Lage ist, durch die Zurverfügungstellung von  $\text{PGH}_2$  für die Prostaglandinsynthese die Kontraktilität der Muskulatur zu beeinflussen. Wijayagunawardane et al. (2001) konnten zeigen, dass sich die Kontraktionsstärke des prä- und post-ovulatorischen Ovidukts *in vitro* durch die Behandlung mit  $\text{PGE}_2$  oder  $\text{PGF}_{2\alpha}$  signifikant erhöhte. Dagegen wurde die Kontraktilität der Ovidukte, die sich in der Lutealphase befanden, durch die Behandlung mit Prostaglandinen nicht beeinflusst.  $\text{PGF}_{2\alpha}$  könnte den Isthmus zum richtigen Zeitpunkt blockieren, um eine zu frühe Passage des Embryos zu verhindern und später den Embryotransport durch rhythmische Kontraktionen zu fördern (Goldberg und Ramwell, 1975). Ein Zusammenspiel von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und  $\text{PGE}_2$  könnte für die Bewegung der Oozyte bzw. des Embryos im Ovidukt sorgen. Außerdem könnte  $\text{PGE}_2$  aufgrund seiner inhibitorischen Eigenschaften den Isthmus später für die Passage des Embryos weiten (Spilman und Harper, 1975). Diese physiologische Funktionalität von COX-1 wird dadurch bestätigt, dass das Expressionsmuster von COX-1 in der Mukosa eine Hochregulierung genau in der Zeit erfährt, zu der sich der Embryo im Ovidukt befindet. Es besteht also die Möglichkeit, dass die synthetisierten Prostaglandine mit dem Embryo interagieren und so einen wichtigen Beitrag zur embryo-maternalen Kommunikation zusteuern.

#### 6.4 PGE<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub>-Synthasen

PGE<sub>2</sub> wird durch die spezifischen Prostaglandinsynthasen cPGES, mPGES-1 und mPGES-2 synthetisiert (Regan, 2003). Die als ubiquitär und konstitutiv bekannte cPGES, welche nur von COX-1 stammendes PGH<sub>2</sub> in PGE<sub>2</sub> umwandeln kann (Murakami et al., 2002), zeigte im bovinen Ovidukt keine zyklusabhängige Regulation. Im Allgemeinen ist cPGES auf dem PGE<sub>2</sub>-Syntheseweg mit COX-1 gekoppelt und an der Sofortantwort, die innerhalb weniger Minuten erfolgt, beteiligt (Tanioka et al., 2000). Generell wird angenommen, dass cPGES für die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase verantwortlich ist (Murakami et al., 2002). Genauso verhält es sich mit mPGES-2, die ebenso über den Zyklusverlauf beim Rind nicht reguliert wurde. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass das Expressionsniveau verglichen mit cPGES wesentlich niedriger war. Aufgrund dieser sehr konstanten Expressionsleistung der beiden PGES ist anzunehmen, dass sie zu den basalen PGE<sub>2</sub>-Spiegeln beitragen. Im Gegensatz zu den konstanten Expressionen im bovinen Ovidukt wurde für cPGES im bovinen Uterus eine Zyklusregulation berichtet. mPGES-2 wurde im Uterus konstant exprimiert (Parent und Fortier, 2005). Die genaue Bedeutung von cPGES und mPGES-2 während der Vorgänge bei der Reproduktion muss noch geklärt werden.

Im Gegensatz dazu konnte für die induzierbare mPGES-1 eindeutig eine Zyklusabhängigkeit der mRNA Expression im bovinen Ovidukt nachgewiesen werden. Die höchste Expression wurde in der postovulatorischen Phase gefunden, was sich ebenso in den Ergebnissen der Immunhistologie widerspiegelte. Auch dort waren in der postovulatorischen Phase mehr Epithelzellen für mPGES-1 positiv gefärbt als in den anderen Phasen. Da davon ausgegangen werden kann, dass das synthetisierte PGE<sub>2</sub> ins Lumen des Ovidukts abgegeben wird, läge es dort in höherer Konzentration genau zu dem Zeitpunkt der finalen Reifung der Oozyte und der Befruchtung vor und vermutlich für diese Prozesse von entscheidender Bedeutung. Da dieser Effekt jedoch nicht nur lokal im ipsilateralen Ovidukt auftritt, ist zu vermuten, dass es sich um einen systemischen Effekt handelt und nicht um lokale Effekte, die durch die Bildung des Follikels oder die Freisetzung der Follikelflüssigkeit beim Eisprung zustande kommt. Wijayagunawardane et al. (1998), die den PGE<sub>2</sub>-Gehalt in bovinen Ovidukten im Verlauf des Sexualzyklus untersuchten, fanden einen lokalen Effekt, der sich in signifikant höheren PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen in den ipsilateralen Ovidukten in der prä- und post-ovulatorischen Phase äußerte. Die unterschiedlichen Ergebnisse können so erklärt werden, dass in dieser Arbeit die mRNA in den Mukosazellen quantifiziert wurde, während Wijayagunawardane et al. (1998) die Synthese von PGE<sub>2</sub> im gesamten Ovidukt mit allen Zellschichten gemessen haben.

Die immunhistologischen Untersuchungen wiesen im Ovidukt eine positive Färbung für mPGES-1 im Kern der Epithelzellen und im Zytoplasma der glatten Muskelzellen auf. Der größte Anteil an positiv gefärbten Zellen wurde in der postovulatorischen Phase gefunden. Entgegen den immunhistologischen Untersuchungen von Arosh et al. (2002), die mPGES-1 und COX-2 kolokalisiert in der perinukleären Membran nachgewiesen haben, konnte dies für

das bovine Ovidukt nicht bestätigt werden. Im bovinen Oviduktepithel wurde mPGES-1 nur nukleär detektiert, während COX-2 im Zytoplasma der Epithelzelle lokalisiert war. In den glatten Muskelzellen wurde nur mPGES-1 exprimiert, doch nicht COX-2. Während mPGES-1 im bovinen Ovidukt nur in den Kernen der Epithelzellen und in glatten Muskelzellen exprimiert wurde, haben Parent und Fortier (2005) mPGES-1 im Uterus sowohl in Epithelzellen als auch in Drüsen- und Stromazellen gefunden.

Die Induzierbarkeit der mPGES-1 mRNA konnte in diesem Zellkultursystem gezeigt werden. Dort wurde die mPGES-1 mRNA Expression sowohl durch Östradiol, Progesteron als auch durch Arachidonsäure und PGE<sub>2</sub> stimuliert. Einen besonders stark stimulierenden Effekt scheint Arachidonsäure auf mPGES-1 zu haben. Wenn den bovinen Oviduktzellen viel Arachidonsäure zur Verfügung stand, erhöhte sich proportional auch die mPGES-1 mRNA Menge. Das deutet darauf hin, dass Arachidonsäure als Vorstufe die PGE<sub>2</sub>-Bildung stimuliert. Das Endprodukt PGE<sub>2</sub> stimuliert als positive Rückkopplung wiederum die mPGES-1 mRNA Expression. Murakami et al. (2000) beschrieben, dass mPGES-1 und COX-2 gekoppelt sind und PGE<sub>2</sub> innerhalb von Stunden synthetisieren. In der Oviduktzellkultur wurden mPGES-1 als auch COX-2 durch dieselben exogenen Faktoren stimuliert, was für eine direkte Kopplung der Synthese beider Enzyme spräche. Die in vivo Expressionsdaten zeigten jedoch keine Korrelation über den Sexualzyklus. Die Ergebnisse lassen deshalb keine eindeutige Aussage über eine direkte Koordinierung beider Enzyme zu.

Die Hochregulation der induzierbaren mPGES-1 in der postovulatorischen Phase scheint von großer Bedeutung zu sein, denn es ist bekannt, dass PGE<sub>2</sub> einen positiven Einfluss auf die Expansion der Cumulus-Oozyten-Komplexe in Mäusen (Salustri et al., 1985) und Kühen (Calder et al., 2001) hat. Mäuse, denen der EP2 Rezeptor fehlte, zeigten eine beeinträchtigte Cumulusexpansion und Befruchtung (Kennedy et al., 1999). Eine Supplementierung des Reifungsmediums mit PGE<sub>2</sub> erhöhte die Teilungsrate der Oozyten in der Zellkultur (Gurevich et al., 1993), außerdem produzieren gereifte Oozyten und die Zygote PGE<sub>2</sub> (Gurevich und Shemesh, 1994). Diese PGE<sub>2</sub>-Sekretion scheint für die maternale immunologische Erkennung der Trächtigkeit wichtig zu sein (Lala, 1990). Durch die Stimulierung der Zilienaktivität der Epithelzellen im Kaninchenovidukt (Verdugo et al., 1980) kann PGE<sub>2</sub> den Eizelltransport beschleunigen (Lindblom et al., 1983). Da COX-1 und COX-2 vor allem in Zilienzellen exprimiert wurden, könnte es sein, dass diese Zellen vermehrt PGE<sub>2</sub> produzieren und so im bovinen Ovidukt ebenfalls den Eizelltransport beschleunigen, was im Einklang mit Berichten von Lindblom et al. (1983) für das humane Ovidukt steht.

## 6.5 PGF<sub>2α</sub> und PGF<sub>2α</sub>-Synthasen

PGF<sub>2α</sub> wird durch spezifische PGF<sub>2α</sub>-Synthasen aus den Vorstufen PGH<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> und PGD<sub>2</sub> gebildet (Goff, 2004). Wobei die Synthese von PGD<sub>2</sub> zu PGF<sub>2α</sub> durch viele verschiedene Enzyme erfolgt, die sich in ihren Sequenzen sehr ähnlich sind. Dieser Versuchsansatz ermöglichte es, die Transkripte aller bekannten bovinen PGF<sub>2α</sub>-Synthasen (PGFS) in einem Experiment zu analysieren. Die Synthese von PGE<sub>2</sub> zu PGF<sub>2α</sub> erfolgte durch HSD, welche ebenfalls über mRNA Expressionsanalysen im bovinen Ovidukt charakterisiert wurde. Bei den vorliegenden Ergebnissen ist zu erkennen, dass die Expressionsmuster von HSD und PGFS im bovinen Ovidukt über den Zyklus hinweg sehr ähnlich waren. Die höchste mRNA Expression für diese Enzyme wurde jeweils in der postovulatorischen Phase gefunden. Die Expression nahm über den Zyklus kontinuierlich ab bis zu einem Minimum vor der Ovulation. HSD zeigte in der postovulatorischen Phase und der frühen Lutealphase signifikant höhere Expressionen in den Isthmusabschnitten verglichen mit den Ampullen. In den Lutealphasen waren die durchschnittlichen PGFS mRNA Mengen auch hier in den Isthmusabschnitten höher als in den Ampullenabschnitten. Es wurden keine Unterschiede in den Transkriptmengen zwischen dem ipsi- und dem kontralateralen Ovidukt gefunden, obwohl Wijayagunawardane et al. (1998) in den ipsilateralen Ovidukten der prä- und postovulatorischen Phase eine 3-4mal höhere PGF<sub>2α</sub> Menge gemessen haben als in den Ovidukten der kontralateralen Seite. Doch auch hier muss wieder berücksichtigt werden, dass die Ergebnisse dieser Arbeit die Transkriptmengen in den Mukosazellen umfasst, während Wijayagunawardane et al. (1998) die PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen nicht spezifisch in Epithelzellen, sondern im ganzen Oviduktgewebe inklusive glatter Muskelzellen bestimmt haben.

PGF<sub>2α</sub> wird generell eine starke Wirkung auf glatte Muskelzellen zugesprochen (Sakamoto et al., 1995). Die Hochregulation im Isthmus könnte folglich eine Wirkung auf die starke Tunica muscularis im Isthmus haben, denn PGF<sub>2α</sub> hat einen stimulatorischen Effekt auf die Oviduktkontraktilität (Gelety und Chaudhuri, 1992). Spilman und Harper (1975) berichten, dass dabei der Isthmus wesentlich sensitiver für PGF<sub>2α</sub> war als die Ampulle. Die HSD mRNA Expression war in den Ampullenabschnitten des bovinen Ovidukts im Verlauf des Zyklus dagegen sehr gering und unreguliert, sodass man davon ausgehen muss, dass PGF<sub>2α</sub> in der Ampulle eine untergeordnete Rolle spielt. Es ist offensichtlich, dass HSD eine wesentlich größere Bedeutung im Ovidukt hat als die anderen PGFS, denn seine Expression war im Vergleich zu den anderen PGFS 10-40mal höher. Grundsätzlich ist zu beachten, dass HSD zusätzlich zur PGF<sub>2α</sub>-Synthase-Aktivität noch die Eigenschaft besitzt, Progesteron abzubauen (Saksena und Harper, 1975; Akinola et al., 1997). In diesem Zusammenhang wurde berichtet, dass im bovinen Uterus HSD ebenfalls die Hauptquelle für die PGF<sub>2α</sub>-Synthese darstellt (Madore et al., 2003).

Auch in der Ratte konnte eine kontraktile Wirkung von PGF<sub>2α</sub> auf die Ovidukt Muskulatur nachgewiesen werden (Perez Martinez et al., 1998), so wie im prä- und post-ovulatorischen bovinen Ovidukt die Kontraktionsstärke der glatten Muskelzellen erhöht erschien

(Wijayagunawardane et al., 2001). Speziell die postovulatorische Phase ist ein sehr kritischer Zeitraum für die Entstehung einer Trächtigkeit, während dessen der Isthmus kontrahiert sein sollte, um das frühzeitige Passieren des Embryos in den Uterus zu verhindern (Spilman und Harper, 1975). Es ist also anzunehmen, dass das generell stark muskelkontrahierend wirkende  $\text{PGF}_{2\alpha}$  hierzu beiträgt. Es könnte aber ebenso für den Transport der Oozyte/Embryos wichtig sein, da es die longitudinale Muskelschicht stimulieren kann und so eine Beschleunigung des Transports ermöglicht. So wurde der Eizelltransport im Kaninchen durch  $\text{PGF}_{2\alpha}$  signifikant beschleunigt, der Eizelltransport in der Ratte war dagegen unverändert (Goldberg und Ramwell, 1975). Wie die Zellkulturversuche eindeutig belegten, wird die Hochregulierung nach der Ovulation jedoch nicht durch die Steroide Progesteron oder Östradiol verursacht. Im Gegensatz zu Berichten, dass die  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Produktion in den östradiol-dominierten Phasen erhöht ist (Saksena und Harper, 1975), zeigten die Zellkulturversuche, dass die mRNA Expression von HSD und PGFS durch die Behandlung mit Östradiol und Progesteron nicht beeinflusst wurde. Deshalb müssen für die PGFS und HSD mRNA Expressionserhöhung in der postovulatorischen Phase andere Faktoren wie z.B. LH oder FSH in Betracht gezogen werden. Der LH-Peak vor der Ovulation könnte einen Anstieg der Prostaglandinsynthesen bewirken, die verstärkt Prostaglandine bilden, welche dann Muskelkontraktionen auslösen können.

Verglichen mit  $\text{PGE}_2$  scheint  $\text{PGF}_{2\alpha}$  im bovinen Ovidukt und in den kultivierten Oviduktzellen in geringeren Mengen synthetisiert zu werden (Wijayagunawardane et al., 1998; Wijayagunawardane et al., 1999b). Auch die von den bovinen Prä-Embryonen synthetisierte  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Menge betrug nur ein Viertel der  $\text{PGE}_2$ -Produktion (Gurevich und Shemesh, 1994). Die Rolle von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  im frühen Reproduktionsgeschehen ist bislang noch unklar. Knock-out Studien an Mäusen, denen der  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Rezeptor FP fehlte, hatten erst gegen Ende der Trächtigkeit beim Geburtsvorgang Probleme. Die frühe Trächtigkeit war dagegen ungestört (Sugimoto et al., 1997). Die auftretenden Ausfallserscheinungen äußerten sich in einem Kontraktilitätsverlust des Myometriums. So ist wahrscheinlich, dass auch im Ovidukt die Wirkung von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  überwiegend auf die Kontraktilität beschränkt ist. Physiologische Aussagen über die  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Wirkung im Reproduktionstrakt sind jedoch nach den vorliegenden Untersuchungen nicht möglich.

## 6.6 $\text{PGD}_2$ und $\text{PGD}_2$ -Synthasen

In dieser Arbeit konnte erstmalig die mRNA Expression beider  $\text{PGD}_2$ -Synthasen (H-PGDS, L-PGDS) im bovinen Ovidukt nachgewiesen werden. Es ist somit anzunehmen, dass  $\text{PGD}_2$  im bovinen Ovidukt synthetisiert wird. Über die Rolle von  $\text{PGD}_2$  in der Reproduktion allgemein und speziell im Ovidukt ist jedoch nur sehr wenig bekannt. Generell wurde  $\text{PGD}_2$  auch ein Einfluss auf glatte Muskelzellen bescheinigt. Im Kaninchenovidukt hatte  $\text{PGD}_2$  eine konzentrationsabhängige Wirkung: Während geringe  $\text{PGD}_2$  Mengen die spontanen Kontraktionen im Ovidukt erhöhten, wirkten große Mengen an  $\text{PGD}_2$  inhibitorisch (Heesch et al., 1977). Auch im Ovidukt der Ratte wurde  $\text{PGD}_2$  nachgewiesen (Saito et al., 2002).

Dass Steroide einen Einfluss auf die  $\text{PGD}_2$ -Produktion haben, konnten Chaud et al. (1994) dadurch nachweisen, dass die  $\text{PGD}_2$ -Produktion im Uterus der Ratte durch Progesteron gesenkt wurde. In den bovinen Oviduktzellen wurden dagegen die höchste L-PGDS mRNA Expression in den progesteron-dominierten Lutealphasen gemessen. Die Progesteronbehandlung der kultivierten Oviduktzellen führte dagegen nicht zur Abnahme der L-PGDS mRNA Menge, sodass die Ergebnisse von Chaud et al. (1994) sich für das bovine Ovidukt auf mRNA Ebene nicht bestätigten. In der Lutealphase, wenn die höchste L-PGDS mRNA Expression detektiert wurde, war die Kontraktibilität der Ovidukte am geringsten. Dazu passt, dass  $\text{PGD}_2$  in hohen Mengen als Muskelrelaxans wirkt. L-PGDS ist in der Literatur bisher nicht im weiblichen Reproduktionstrakt beschrieben worden, wobei ihm im männlichen Reproduktionstrakt eine große Bedeutung beigemessen wird. Gerena et al. (1998) beschrieben, dass L-PGDS im Seminalplasma von Bullen mit einer hohen Fertilität korrelierte und dort eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Reifung der Spermien spielt. Außerdem war die L-PGDS mRNA in den Ampullenabschnitten in den Phasen um die Ovulation signifikant höher als in Isthmusabschnitten. Da L-PGDS als Transporter für weitere lipophile Moleküle fungieren kann (Urade und Eguchi, 2002), könnte es sein, dass L-PGDS bevorzugt andere Prostaglandine in die Ampulle transportiert.

Während bei anderen Tierarten wie z.B. der Ratte im Ovidukt sehr hohe Mengen H-PGDS mRNA gefunden wurden (Saito et al., 2002), erreichte die H-PGDS mRNA Expression im bovinen Ovidukt weniger als ein Tausendstel der L-PGDS mRNA Menge. Dieser Befund deutet darauf hin, dass im bovinen Ovidukt L-PGDS eine wichtigere Rolle spielt als H-PGDS. Während die H-PGDS mRNA Menge in der späten Lutealphase größtenteils bis zur Detektionsgrenze reduziert war, wurde die höchste H-PGDS mRNA Konzentration in der post-ovulatorischen Phase gemessen, was eine sehr effektive Hochregulation der H-PGDS mRNA in den Phasen um die Ovulation herum bedeutet. Die absolut höchsten Konzentrationen wurden in der ipsilateralen Ampulle gefunden, wo die ersten Zellteilungen des Embryos stattfinden. Es ist anzunehmen, dass  $\text{PGD}_2$  im Ovidukt für eine erfolgreiche Trächtigkeit von Bedeutung sein könnte, falls es dort eine ähnliche Funktion hat wie im Uterus.  $\text{PGD}_2$  verhindert dort das Abstoßen des Fetus (Saito et al., 2002). Der potentielle Einfluss von Steroiden auf die Expression während des Zyklus konnte in vitro nicht untermauert werden, da die H-PGDS mRNA in kultivierten bovinen Oviduktzellen nicht exprimiert wurde.

## **6.7 PGI<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub>-Synthase**

Aufgrund des Nachweises von PGIS mRNA im Rahmen dieser Arbeit, wird die Synthese von PGI<sub>2</sub> im bovinen Ovidukt postuliert. In murinen und humanen Ovidukten wurde PGIS exprimiert und PGI<sub>2</sub> synthetisiert (Arbab et al., 2002; Huang et al., 2004b). So konnte mittels immunhistologischer Färbungen PGIS in den Ovidukten der Maus in Epithelzellen, glatten Muskelzellen und in Gefäßendothelien lokalisiert werden (Huang et al., 2004b).

Im bovinen Ovidukt wurde die höchste Expression von PGIS mRNA vor der Ovulation

detektiert. Zudem war die Expression um die Ovulation herum in den Ampullen signifikant höher als in den Isthmusabschnitten. Es ist anzunehmen, dass das bovine Ovidukt durch den Anstieg der PGIS mRNA vor der Ovulation auf die Vorgänge in der postovulatorischen Phase vorbereitet werden soll. PGI<sub>2</sub> könnte im Rind eine ähnliche Funktion wie in der Maus haben. Huang et al. (2003) zeigten, dass Mäuseembryonen, die bereits im Ovidukt PGI<sub>2</sub> ausgesetzt waren, besser aus der Zona pellucida schlüpften. Bei Mäusen wurde die größte PGI<sub>2</sub>-Menge wenige Tage nach der Begattung gemessen (Huang et al., 2004b). Da die Entwicklung des Embryos vom 2-Zeller bis zur Morula genau in diesem Zeitraum im Ovidukt stattfindet, trägt die maximale PGI<sub>2</sub>-Synthese dort wahrscheinlich zur Verbesserung des Schlüpfens und der Implantation bei (Huang et al., 2004b).

Die vergleichsweise wichtige Rolle des PGI<sub>2</sub> in murinen Ovidukten wird unterstrichen durch die Tatsache, dass es in viel höheren Konzentrationen vorkam als PGE<sub>2</sub> und PGD<sub>2</sub>. Es wurde ferner gezeigt, dass hauptsächlich COX-2 zur PGI<sub>2</sub>-Synthese im Ovidukt beitrug (Huang et al., 2004b).

Generell wurde PGI<sub>2</sub> in den meisten Säugetieren in fast allen glatten Muskelzellen detektiert (Smith et al., 1983). Es hatte vergleichbar mit PGE<sub>2</sub> einen stimulatorischen Effekt auf die longitudinale Muskulatur des humanen Ovidukts und wirkte leicht inhibitorisch auf die Kontraktibilität der zirkulären Oviduktmuskulatur (Lindblom et al., 1979). So könnte PGI<sub>2</sub> bei der Regulation des Eizell- und Embryotransports beteiligt sein. Die glatten Muskelzellen des Ovidukts können sowohl Wirkort als auch Quelle von PGI<sub>2</sub> sein. Arbab et al. (2002) vermuten, dass PGI<sub>2</sub> aus der glatten Muskulatur in das Lumen diffundieren und dort die bereits erwähnten Vorgänge beeinflussen könnte.

Untersuchungsergebnisse bei der Frau deuten darauf hin, dass durch die mechanische Dehnung des Myometriums während der Schwangerschaft ein PGIS Anstieg ausgelöst wird (Helliwell et al., 2004). Aufgrund dieser Beobachtung muss für das Ovidukt ein mechanischer Dehnungsreiz als Auslöser für den PGIS mRNA Anstieg berücksichtigt werden. Denn unter solchen Umständen könnten die verstärkten Bewegungen des Ovidukts während des Östrus (Ruckebusch und Bayard, 1975) einen Dehnungsreiz darstellen und damit die Erhöhung der PGIS mRNA Expression auslösen.

Ein kurzfristiger Einfluß von Steroiden auf die PGIS mRNA Expression ist durch in vitro-Experimente auszuschließen, da die Behandlung von kultivierten bovinen Oviduktzellen mit Steroiden zu keinen Veränderungen der PGIS mRNA Expression führte. Dagegen zeigten Untersuchungen am Schaf, dass Östradiol und Progesteron die PGIS Proteinexpression in glatten Muskelzellen erhöhen können (Helliwell et al., 2004). Möglicherweise sind andere Hormone wie LH oder FSH für die Stimulation zuständig. Die Zellkulturversuche zeigten, dass die PGIS mRNA Expression durch PGE<sub>2</sub> stimuliert wurde. Damit konnte gezeigt werden, dass es eine gegenseitige Beeinflussung zwischen verschiedenen Prostaglandinen gab. Das könnte wichtig sein, um die Embryonen zur PGE<sub>2</sub>-Synthese anzuregen (Gurevich und Shemesh, 1994), um dem Oviduktepithel ein Signal zu übermitteln, mehr PGI<sub>2</sub> zu produzieren.

## 6.8 Schlußfolgerung

Erstmals konnten in dieser Arbeit die Enzyme für alle Schritte der Prostaglandinsynthese im bovinen Ovidukt nachgewiesen werden. Es wurden sowohl die Transkripte für Phospholipasen gefunden, die für die Freisetzung der Arachidonsäure aus Membranphospholipiden verantwortlich sind, als auch die Transkripte und Proteine beider Cyclooxygenasen, die die Reaktionen von der Arachidonsäure zu  $\text{PGH}_2$  katalysieren (Oda et al., 2006). Außerdem wurde mRNA von spezifischen Prostaglandinsynthasen nachgewiesen, die die Umwandlung der Vorstufe  $\text{PGH}_2$  in  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGD}_2$  und  $\text{PGI}_2$  vermitteln.

Dabei wurden verschiedene Expressionsmuster der einzelnen Synthasen im Verlauf des Zyklus festgestellt, sodass von einem hormonellen oder lokalen Einfluss auf die differentielle Prostaglandinsynthese ausgegangen werden kann. Es ist anzunehmen, dass die in der postovulatorischen Phase hochregulierten Enzyme COX-1, mPGES-1, HSD, PGFS und H-PGDS zur Synthese der Prostaglandine beitragen, die einen entscheidenden Einfluss auf die zu diesem Zeitpunkt stattfindenden Reproduktionsvorgänge wie die Eizellreifung, die Befruchtung oder die frühe Embryonalentwicklung nehmen könnten. So könnte beispielweise  $\text{PGE}_2$  zu diesem Zeitpunkt die Teilungsrate der befruchteten Oozyten erhöhen (Gurevich et al., 1993). Andere Faktoren (cPLA<sub>2</sub> $\beta$  und PGIS) wiesen die höchste mRNA Expression in der präovulatorischen Phase auf. Das durch PGIS gebildete  $\text{PGI}_2$  könnte das Ovidukt auf die im Ovidukt stattfindenden Reproduktionsprozesse vorbereiten. Dabei könnte  $\text{PGI}_2$ , wie in der Maus nachgewiesen, die Schlüpfbarkeit der bovinen Embryonen aus der Zona pellucida verbessern. Einige Faktoren wurden während des Zyklus konstant exprimiert. Dazu gehörten sPLA<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ , COX-2, cPGES und mPGES-2. Diese Synthasen scheinen für den Grundumsatz an Prostaglandinen im bovinen Ovidukt zu sorgen und damit zur Gewebshomöostase beizutragen. Unter Berücksichtigung der verschiedenen Oviduktabschnitte wurde entdeckt, dass sPLA<sub>2</sub>, L-PGDS und PGIS bevorzugt in der Ampulle und mPGES-1 sowie HSD im Isthmus exprimiert wurden. Es ist anzunehmen, dass die in der Ampulle gebildeten Prostaglandine zur Reifung der Oozyte und zur erfolgreichen Befruchtung beitragen könnten. Außerdem könnte  $\text{PGD}_2$ , das für seine immunmodulatorische Wirkung im Uterus bekannt ist, das Abstoßen des Embryos bereits im Ovidukt verhindern. Das durch mPGES-1 und HSD in der postovulatorischen Phase synthetisierte  $\text{PGE}_2$  und  $\text{PGF}_{2\alpha}$  könnte durch den durch Ellington (1991) beschriebenen retrograden Fluss der Oviduktflüssigkeit in die Ampulle gelangen und dort bei Befruchtung und früher Embryonalentwicklung Einfluss nehmen. Ferner sind Prostaglandine für ihre Wirkung auf glatte Muskelzellen bekannt und insofern könnten die höheren Expressionen ihrer Synthasen für die Motilität des Ovidukts und damit verbunden für den Eizell- bzw. Embryotransport durch das Ovidukt von entscheidender Bedeutung sein. Wie durch Wijayagunawardane et al. (2001) demonstriert, hatte die Behandlung mit Prostaglandinen in vitro einen Einfluss auf die Kontraktilität von Ovidukten aus der prä- oder post-ovulatorischen



Phase.

Die *in vitro* Versuche zeigten, dass die mRNA Expression verschiedener Enzyme durch Sexualsteroiden zu stimulieren war, aber auch das Ausgangssubstrat Arachidonsäure als auch PGE<sub>2</sub>, das Endprodukt der PGE<sub>2</sub>-Synthasen, konnten eine Stimulation der mRNA Expression von cPLA<sub>2</sub>α, COX-2 und mPGES-1 auslösen. Die Stimulation der PGIS mRNA Expression durch PGE<sub>2</sub> spricht ganz klar dafür, dass zwischen den verschiedenen Prostaglandinsynthesewegen Interaktionen auftreten. Es ist zu vermuten, dass ein feinabgestimmtes lokales Zusammenspiel der Prostaglandinsynthesen für die erfolgreichen Abläufe im Reproduktionstrakt notwendig ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es im bovinen Ovidukt eine zyklisch regulierte komplette Prostaglandinsynthese gibt. Vermutlich können die Prostaglandine im bovinen Ovidukt in definierten Zyklusphasen direkten Einfluss auf das Überleben, die Reifung und den Transport der Oozyte sowie auf den Befruchtungsvorgang und die Entwicklung des Embryos nehmen. Es ist anzunehmen, dass die Prostaglandine, wie in anderen Tierarten bereits gezeigt, im Genitaltrakt der Kuh eine essentielle Rolle in der Entstehung der Trächtigkeit spielen. Dabei sind die folgenden Wirkungen auf den Genitaltrakt möglich: Gewebshomöostase, Gametentransport, Immunstimulation, Kontraktionssteuerung der glatten Muskelzellen sowie die Beeinflussung der Entwicklungsfähigkeit von Oozyte und Embryo.

## 6.9 Ausblick

In dieser Arbeit wurden erstmals für das bovine Ovidukt umfassende Transkriptanalysen des komplexen Prostaglandinsynthesystems vorgestellt. Aufbauend darauf ist es zur endgültigen Beurteilung der Funktion der terminalen Prostaglandinsynthasen erforderlich, zusätzlich zu den mRNA Mengen die Proteine nachzuweisen und zu quantifizieren. Da es sich bei den untersuchten Faktoren um Enzyme handelt und nicht direkt von mRNA Expression oder Proteinmenge auf die Aktivität geschlossen werden kann, ist die Durchführung von Aktivitätstests für die Prostaglandinsynthasen erforderlich. Dies wäre notwendig, um die physiologische Rolle und Effektivität der Enzyme im bovinen Ovidukt abschließend beurteilen zu können.

Für alle Enzyme, die einen Expressionsunterschied zwischen Ampulle und Isthmus aufwiesen, ist der immunhistologische Nachweis zur Lokalisation essentiell. Zudem wäre der Nachweis von Prostaglandinrezeptoren im Ovidukt zur Untermauerung der Hypothese, dass Prostaglandine dort wirken, in weiterführenden Untersuchungen zu erbringen.

Die Enzyme, welche zyklusabhängig exprimiert, aber deren Expression in den *in vitro* Versuchen nicht durch die Behandlung mit Östradiol oder Progesteron beeinflusst wurden, sollten mit anderen Hormonen wie z.B. LH oder FSH behandelt werden. Wijayagunawardane et al. (2001) wiesen nach Stimulation mit LH eine erhöhte PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub>-Synthese im bovinen Ovidukt nach. Außerdem könnte getestet werden, ob veränderte Progesteron- oder

Östradiolkonzentrationen eine Expressionsveränderung hervorrufen, denn die in dieser Arbeit verwendeten Östradiol- und Progesteronmengen entsprachen den physiologisch maximalen Konzentrationen im Blutserum. Diese sind wesentlich geringer als die Konzentrationen, die durch Follikel oder Corpus luteum lokal freigesetzt werden.

Ein weiterer Einflussfaktor, der berücksichtigt werden muss, ist die Wirkung von Spermien auf das Oviduktepithel. Wijayagunawardane et al. (2005) fanden heraus, dass bei der Kokultivierung von motilen Spermien mit bovinen Oviduktepithelzellen die mRNA Expression der Cyclooxygenasen, PGES und PGFS anstieg. Das bedeutet, dass die Anwesenheit von Spermien im Ovidukt einen großen Einfluss auf die Prostaglandinsynthese hat und so die Kontraktilität des Ovidukts fördert.

Abschließend kann die folgende Momentaufnahme für die Prostaglandinsynthese-Komponenten im bovinen Ovidukt präsentiert werden:

Tabelle 11: **Kurzübersicht der in vivo und in vitro mRNA Expression der analysierten Faktoren.**  
 A: Ampulle; I: Isthmus; i: ipsilateral; E2: 17 $\beta$ -Östradiol; P4: Progesteron; AA: Arachidonsäure;  $\uparrow$ : Anstieg bzw. höchste Expression; -: keine Veränderung bzw. Zyklusabhängigkeit; n.d.: nicht detektiert.

Faktoren	in vivo mRNA Expression		in vitro mRNA Expression			
	Zyklusabhängigkeit	Lokalisation	E2	P4	PGE <sub>2</sub>	AA
sPLA <sub>2</sub> IB	-	A>I	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
cPLA <sub>2</sub> $\alpha$	-	keine Unterschiede	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$
cPLA <sub>2</sub> $\beta$	$\uparrow$ Tag 19-21	keine Unterschiede	-	-	-	-
COX-1	$\uparrow$ um Ovulation	keine Unterschiede	-	-	-	-
COX-2	-	$\uparrow$ (Tag 1-5, i-A)	$\uparrow$	$\uparrow$	( $\uparrow$ )	( $\uparrow$ )
cPGES	-	keine Unterschiede	-	-	-	-
mPGES-1	$\uparrow$ Tag 1-5	A<I	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$
mPGES-2	-	keine Unterschiede	-	-	-	-
PGFS	$\uparrow$ Tag 1-5	keine Unterschiede	-	-	-	-
HSD	$\uparrow$ Tag 1-5	A<I	-	-	-	-
H-PGDS	$\uparrow$ um Ovulation	$\uparrow$ (Tag 1-5, i-A)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
L-PGDS	$\uparrow$ Tag 13-18	A>I	-	-	-	-
PGIS	$\uparrow$ Tag 19-21	A>I	-	-	$\uparrow$	-

Basierend auf diesen ersten wichtigen Grunderkenntnissen sollte die weitere Analyse dieses

physiologisch essentiellen Prostaglandinnetzwerks für das bovine Ovidukt wertvolle Einblicke in das parakrine Reproduktionsgeschehen bringen.