

## 5 Ergebnisse

Die in der Real-Time-PCR gemessenen Proben wurden mit dem Referenzgen 18S rRNA normalisiert. Die Ergebnisse der in vivo-Untersuchungen wurden als Verhältniswerte aus der spezifischen mRNA Menge des Untersuchungsfaktors (fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA) und der 18S rRNA Menge (fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA)  $\times 10^6$  derselben Probe präsentiert und als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.

Die Ergebnisse der Zellkulturversuche wurden in Prozent angegeben. Die Kontrollproben zum Zeitpunkt 0 Stunden wurden auf 100% gesetzt und die restlichen Proben desselben Tiers wurden auf diesen Wert bezogen. Diese Verrechnung der Daten wurde gewählt, um ein einheitliches Basisniveau zu erhalten, da es große Schwankungen zwischen den erhaltenen Werten der verschiedenen Tiere gab.

## 5.1 18S rRNA

Wie aus Abbildung 6A hervorgeht, schwankte der 18S rRNA Gehalt der Gesamt-RNA in den bovinen Oviduktzellen während des gesamten Zyklus nur wenig. Die 18S rRNA Konzentration erreichte jedoch in der post-ovulatorischen Phase signifikant höhere Werte als in den anderen Zyklusphasen. Zwischen den verschiedenen Oviduktabschnitten wurden in derselben Zyklusphase keine Unterschiede festgestellt (Abbildung 6B).

Die 18S rRNA wurde im Bereich von 100-150 ng/ $\mu$ g Gesamt-RNA exprimiert. Die Sequenzierung des PCR-Produkts ergab eine 99%ige Homologie zu der bekannten bovinen 18S rRNA Sequenz (EMBL Nr.: AF176811).

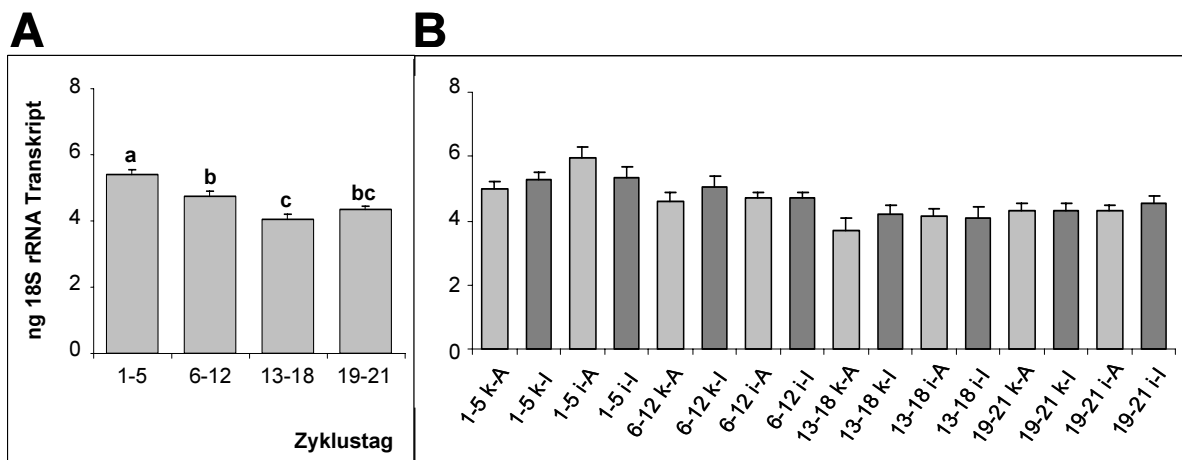


Abbildung 6: **18S rRNA Expression in den Oviduktzellen während des Sexualzyklus ohne (A) und mit (B) Berücksichtigung der verschiedenen Oviduktabschnitte.** Angegeben sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=7 Tiere). Verschieden gekennzeichnete Werte sind signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ ). 1-5: postovulatorische Phase; 6-12: frühe Lutealphase; 13-18: späte Lutealphase; 19-21: präovulatorische Phase; k-A: kontralaterale Ampulle; k-I: kontralateraler Isthmus; i-A: ipsilaterale Ampulle; i-I: ipsilateraler Isthmus.

Anhand von Abbildung 7 und 8 ist zu erkennen, dass Östradiol, Progesteron, PGE<sub>2</sub> und Arachidonsäure in den Zellkulturversuchen keinen Einfluss auf die 18S rRNA Expression in bovinen Oviduktzellen hatten, da es keine Expressionsunterschiede zwischen den unbehandelten und behandelten Zellen gab. Es zeigte sich, dass die 18S rRNA Expression in vitro über die gesamte Versuchszeit hinweg konstant blieb und keine Unterschiede zu den Ausgangswerten festgestellt werden konnten. Das Expressionsniveau der 18S rRNA hat sich durch die Kultivierung der Oviduktzellen nicht verändert, es entspricht dem der gespülten Oviduktzellen für die in vivo Untersuchungen.

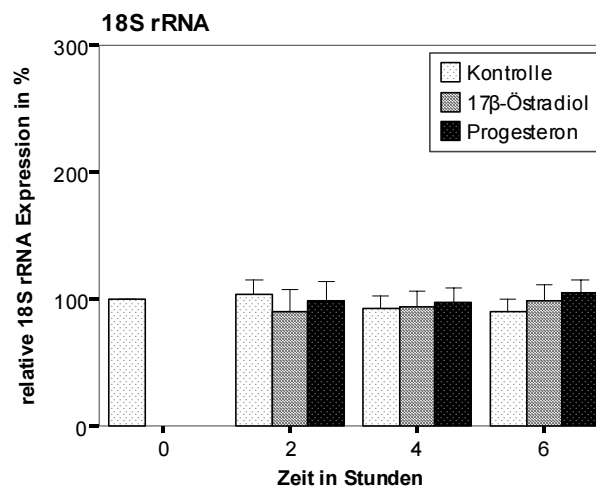


Abbildung 7: **18S rRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen nach Stimulierung mit 10 pg/ml 17 $\beta$ -Östradiol oder 10 ng/ml Progesteron.** Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=6).

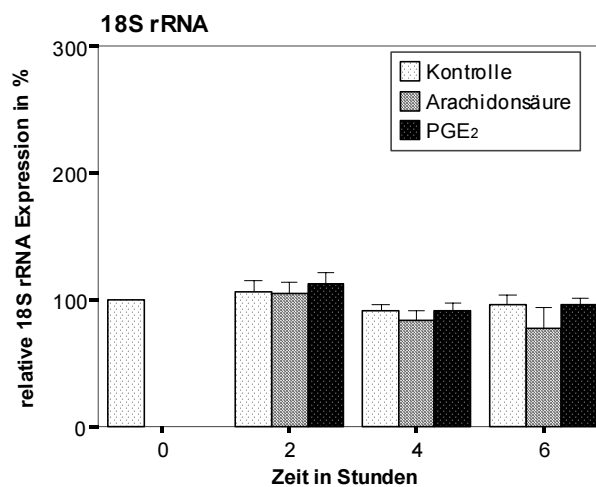


Abbildung 8: **18S rRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen nach Stimulierung mit 10  $\mu$ M Arachidonsäure oder 0,25  $\mu$ M PGE<sub>2</sub>.** Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=6).

## 5.2 Sekretorische PLA<sub>2</sub>IB (sPLA<sub>2</sub>IB)

Mit Hilfe der quantitativen Real-Time-RT-PCR wurden die mRNA Gehalte der sekretorischen Form der Phospholipase A<sub>2</sub> ermittelt. Dabei zeigte sich, dass die sPLA<sub>2</sub>IB mRNA während des gesamten Zyklus in allen Oviduktabschnitten exprimiert wurde. In den verschiedenen Zyklusphasen wurden dabei keine signifikanten Veränderungen festgestellt (Abbildung 9A). Es wurden außerdem keine Unterschiede zwischen ipsilateralen und kontralateralen Ovidukten derselben Zyklusphase gefunden. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Oviduktabschnitte wurden jedoch lokale Expressionsunterschiede innerhalb der Ovidukte festgestellt. Über den gesamten Zyklusverlauf war die sPLA<sub>2</sub>IB mRNA Expression in den Ampullenabschnitten stets höher als in den Isthmusabschnitten desselben Ovidukts (Abbildung 9B). Die Expressionsunterschiede zwischen den Ampullen- und Isthmusabschnitten desselben Ovidukts waren in der postovulatorischen Phase und in der späten Lutealphasen signifikant.

Die sPLA<sub>2</sub>IB mRNA wurde im Bereich von 0,14-2,6 fg/μg Gesamt-RNA exprimiert. Die Sequenzierung des PCR-Produkts ergab eine 100%ige Homologie zu der bekannten bovinen sPLA<sub>2</sub>IB Sequenz (EMBL Nr.: Y00120).

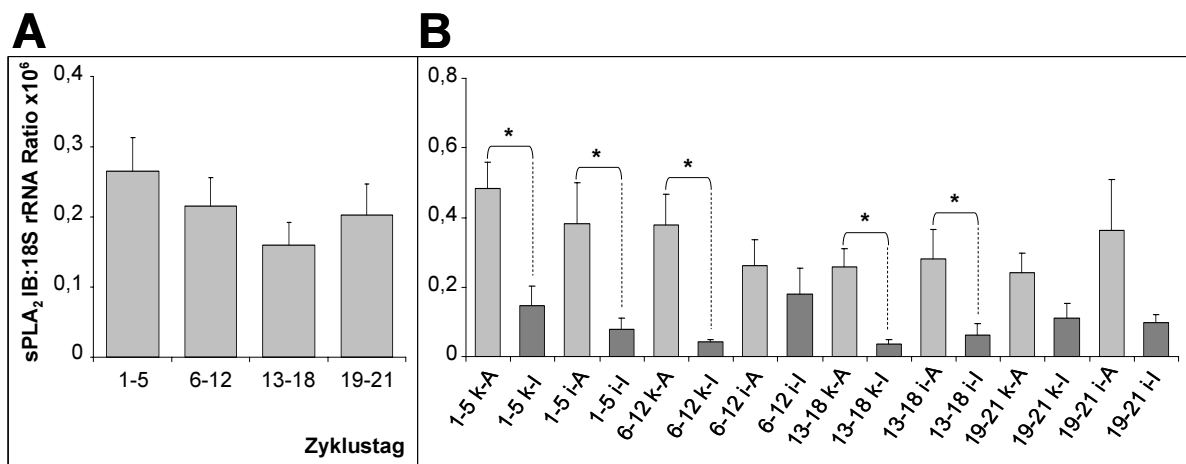


Abbildung 9: **sPLA<sub>2</sub>IB mRNA Expression in den Oviduktzellen während des Sexualzyklus ohne (A) und mit (B) Berücksichtigung der verschiedenen Oviduktabschnitte.** Angegeben sind jeweils Mittelwerte ± SEM (n=7 Tiere). Mit \* verbundene Werte sind signifikant unterschiedlich (p<0,05). 1-5: postovulatorische Phase; 6-12: frühe Lutealphase; 13-18: späte Lutealphase; 19-21: präovulatorische Phase; k-A: kontralaterale Ampulle; k-I: kontralateraler Isthmus; i-A: ipsilaterale Ampulle; i-I: ipsilateraler Isthmus.

In den 72 Stunden kultivierten Zellen (siehe 2.2.16) konnte keine oder nur eine sehr geringe Menge sPLA<sub>2</sub>IB mRNA gemessen werden und zwar unabhängig von einer Behandlung mit Östradiol, Progesteron, Arachidonsäure oder PGE<sub>2</sub> über 6 Stunden. Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurde eine Kultivierung der Oviduktzellen über einen Zeitraum von 96 Stunden durchgeführt (Abbildung 10). Acht Stunden nach Beginn der Kultivierung konnte noch in allen Proben sPLA<sub>2</sub>IB mRNA gemessen werden. Die sPLA<sub>2</sub>IB mRNA Konzentration verringerte sich innerhalb der folgenden 16 Stunden um 95%. Nach weiteren 72 Stunden war die sPLA<sub>2</sub>IB mRNA nicht oder fast nicht mehr detektierbar. Die durchschnittliche spezifische mRNA Menge betrug weniger als 1% des Vergleichswerts der 8 Stunden Kultivierung. Die sPLA<sub>2</sub>IB mRNA Expression ging also im Laufe der Kultivierung verloren.

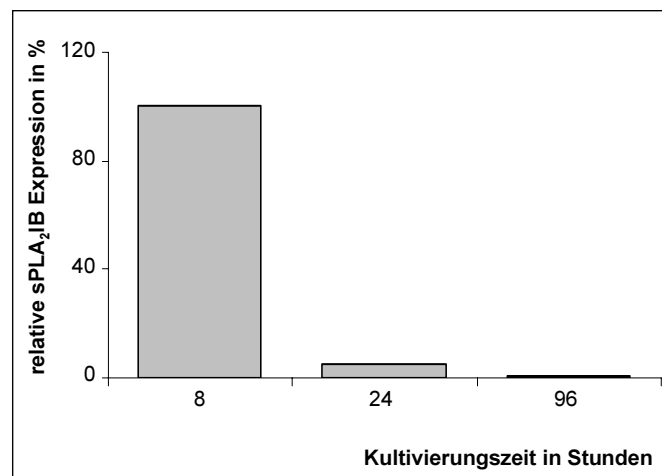


Abbildung 10: **sPLA<sub>2</sub>IB mRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen über einen Zeitraum von 96 Stunden.** Angegeben sind die Mittelwerte der relativen mRNA Expressionen zu den Zeitpunkten 8, 24 und 96 Stunden (n=6).

### 5.3 Cytosolische PLA<sub>2</sub>α (cPLA<sub>2</sub>α)

cPLA<sub>2</sub>α mRNA Transkripte wurden in den Oviduktzellen mittels Real-Time-PCR in allen Oviduktabschnitten und in allen Zyklusphasen nachgewiesen. Es wurden keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Zyklusphasen festgestellt (Abbildung 11A). Unter Berücksichtigung der verschiedenen Oviduktabschnitte ergaben sich keine Unterschiede zwischen ipsi- und kontralateralen Ovidukten in derselben Zyklusphase (Abbildung 11B). Außerdem wurden zwischen Ampullen- und Isthmusabschnitten desselben Ovidukts mit Ausnahme der kontralateralen Ovidukte der frühen Lutealphase und den ipsilateralen Ovidukten der präovulatorischen Phase keine signifikanten Unterschiede gefunden.

cPLA<sub>2</sub>α wurde im Bereich von 13-37 fg/μg Gesamt-RNA exprimiert. Die Überprüfung des PCR-Produkts mittels Sequenzierung ergab eine 100%ige Homologie mit der bekannten bovinen cPLA<sub>2</sub>α Sequenz (EMBL Nr.: XM\_603415).

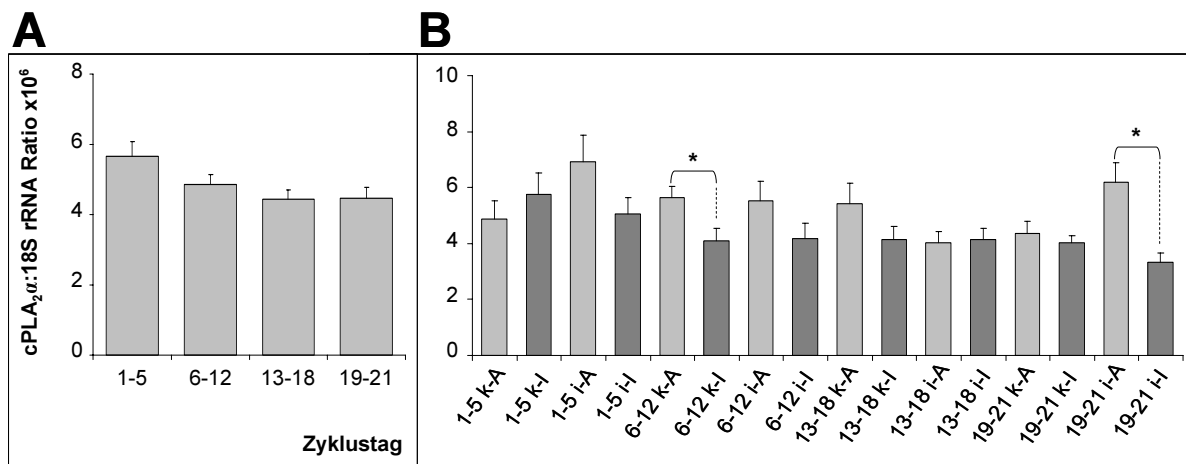


Abbildung 11: cPLA<sub>2</sub>α mRNA Expression in den Oviduktzellen während des Sexualzyklus ohne (A) und mit (B) Unterscheidung der verschiedenen Oviduktabschnitte. Angegeben sind jeweils Mittelwerte ± SEM (n=7 Tiere). Mit \* verbundene Werte sind signifikant unterschiedlich (p<0,05). 1-5: postovulatorische Phase; 6-12: frühe Lutealphase; 13-18: späte Lutealphase; 19-21: präovulatorische Phase; k-A: kontralaterale Ampulle; k-I: kontralateraler Isthmus; i-A: ipsilaterale Ampulle; i-I: ipsilateraler Isthmus.

In den kultivierten Oviduktzellen wurde cPLA<sub>2</sub>α mRNA über die gesamte Versuchszeit detektiert (Abbildung 12). In den ersten 4 Stunden nach der Behandlung mit Östradiol oder Progesteron war kein Unterschied zu den unbehandelten Kontrollen zu erkennen. 6 Stunden nach Behandlung wurde eine signifikant höhere cPLA<sub>2</sub>α mRNA Expression in den östradiol- und progesteronbehandelten Proben im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen festgestellt. Während die Expression in den Kontrollzellen 6 Stunden nach Behandlung auf 60% verglichen mit dem Ausgangswert (0 Stunden) gesunken war, befand sich die Expression in den progesteronbehandelten Zellen auf dem Ausgangsniveau und war in den östradiolbehandelten Zellen leicht angestiegen.

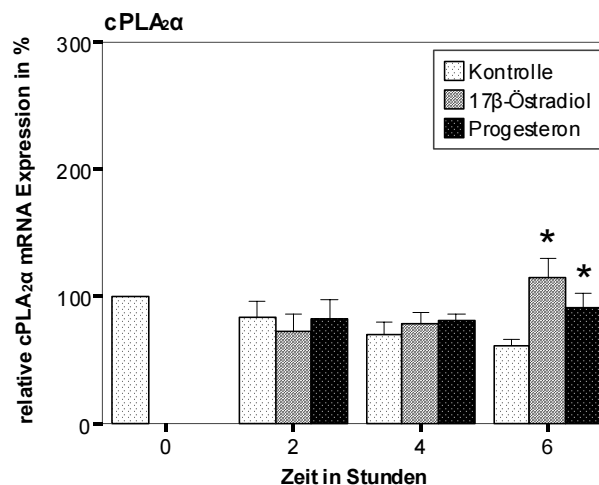


Abbildung 12: **cPLA<sub>2</sub>α mRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen nach Stimulierung mit 10 pg/ml 17β-Östradiol oder 10 ng/ml Progesteron.** Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM (n=6). Mit \* wurden die behandelten Gruppen gekennzeichnet, die sich signifikant von der Kontrollgruppe desselben Versuchszeitpunkts unterschieden ( $p < 0,05$ ).

Bei den Stimulationsversuchen mit Arachidonsäure und PGE<sub>2</sub> wurde ebenfalls in allen kultivierten Zellen cPLA<sub>2</sub>α mRNA detektiert (Abbildung 13). Während das Expressionsniveau von cPLA<sub>2</sub>α mRNA in den unbehandelten Zellen über den Versuchszeitraum relativ konstant blieb, stieg die cPLA<sub>2</sub>α mRNA Menge in den behandelten Zellen nach 4 und 6 Stunden signifikant an. Die cPLA<sub>2</sub>α mRNA Konzentration war sowohl in den mit Arachidonsäure als auch mit PGE<sub>2</sub> behandelten Zellen nach 4 Stunden etwa 25% und nach 6 Stunden circa 30% höher als in den unbehandelten Kontrollzellen.

Die cPLA<sub>2</sub>α mRNA wurde in den kultivierten Oviduktzellen auf demselben Niveau exprimiert wie in den gespülten Oviduktzellen der in vivo Untersuchungen.

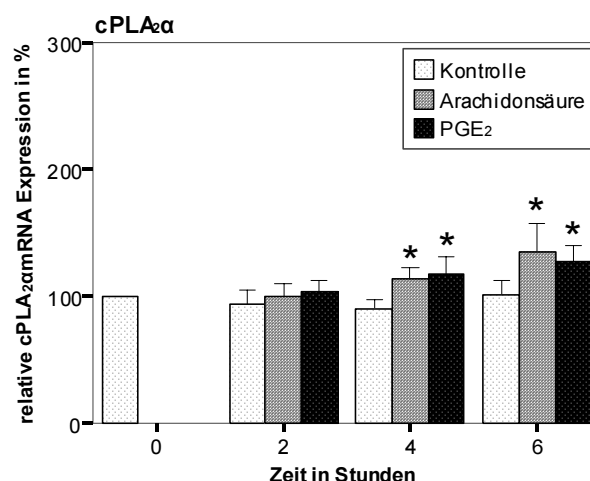


Abbildung 13: **cPLA<sub>2</sub>α mRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen nach Stimulierung mit 10 μM Arachidonsäure oder 0,25 μM PGE<sub>2</sub>.** Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM (n=6). Mit \* wurden die behandelten Gruppen gekennzeichnet, die sich signifikant von der Kontrollgruppe desselben Versuchszeitpunkts unterschieden ( $p < 0,05$ ).

## 5.4 Cytosolische PLA<sub>2</sub>β (cPLA<sub>2</sub>β)

In allen Oviduktabschnitten und in allen Zyklusphasen wurden cPLA<sub>2</sub>β Transkripte mittels Real-Time-PCR detektiert. Die cPLA<sub>2</sub>β mRNA Expression unterlag einer starken Zyklusabhängigkeit (Abbildung 14A). Die niedrigste cPLA<sub>2</sub>β mRNA Expression wurde im bovinen Ovidukt in der frühen Lutealphase gemessen. Es folgte ein signifikanter Anstieg der cPLA<sub>2</sub>β mRNA Expression in der späten Lutealphase, der sein Maximum in der prä-ovulatorischen Phase erreichte. In der post-ovulatorischen Phase verringerte sich die cPLA<sub>2</sub>β mRNA Expression wieder. Sowohl zwischen kontra- und ipsilateralen Oviduktabschnitten als auch zwischen Isthmus und Ampulle derselben Ovidukts wurden keine Unterschiede festgestellt (Abbildung 14B).

cPLA<sub>2</sub>β wurde im Bereich von 8-80 fg/μg Gesamt-RNA exprimiert. Die Sequenzierung des PCR-Produkts wies eine 100%ige Homologie zu der bekannten bovinen cPLA<sub>2</sub>β Sequenz auf (EMBL Nr.: XM\_595922).

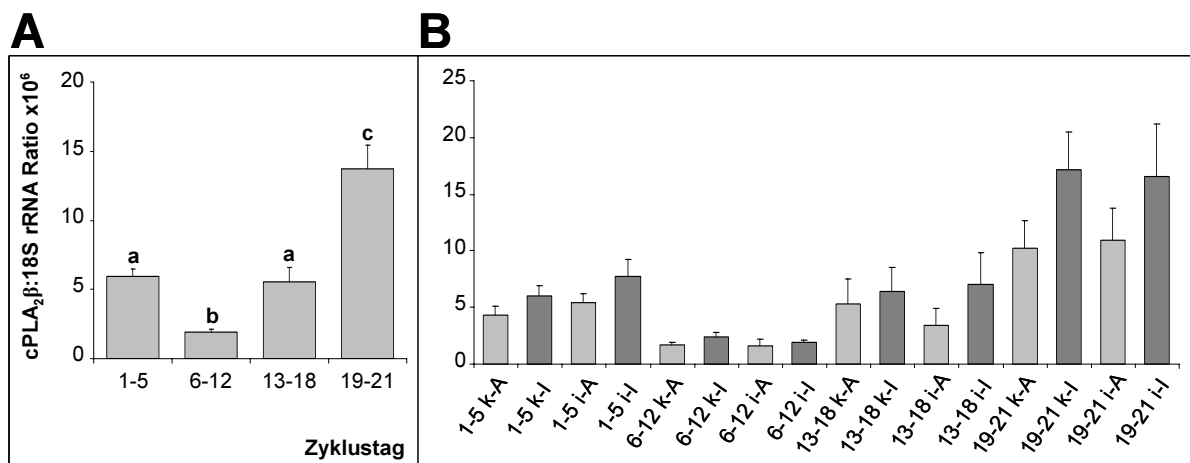


Abbildung 14: cPLA<sub>2</sub>β mRNA Expression in den Oviduktzellen während des Sexualzyklus ohne (A) und mit (B) Unterscheidung der verschiedenen Oviduktabschnitte. Angegeben sind jeweils Mittelwerte ± SEM (n=7 Tiere). Verschieden gekennzeichnete Werte sind signifikant unterschiedlich (p<0,05). 1-5: postovulatorische Phase; 6-12: frühe Lutealphase; 13-18: späte Lutealphase; 19-21: präovulatorische Phase; k-A: kontralaterale Ampulle; k-I: kontralateraler Isthmus; i-A: ipsilaterale Ampulle; i-I: ipsilateraler Isthmus.

Die in vitro Experimente zeigten im Versuchsverlauf einen kontinuierlichen Anstieg der cPLA<sub>2</sub>β mRNA Menge in den unbehandelten kultivierten Oviduktzellen, welche nach 6 Stunden 170% des Ausgangswerts erreichte. Die cPLA<sub>2</sub>β mRNA Menge in den östradiolbehandelten Zellen stieg ebenfalls im Verlauf des Versuchs an. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen östradiolbehandelten und unbehandelten Zellen festgestellt. Die progesteronbehandelten Oviduktzellen wiesen ebenfalls einen leichten Anstieg der cPLA<sub>2</sub>β mRNA Konzentration verglichen mit der 0 Stunden Kontrolle auf, dabei war die cPLA<sub>2</sub>β mRNA Expression in den progesteronbehandelten Zellen 2 und 4 Stunden nach Versuchsbeginn etwa 25% signifikant niedriger als in den unbehandelten Kontrollzellen zum gleichen Zeitpunkt (Abbildung 15).



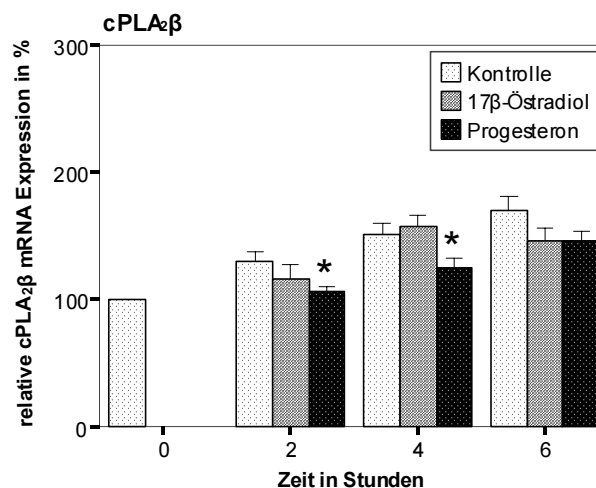


Abbildung 15: **cPLA<sub>2</sub>β mRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen nach Stimulierung mit 10 pg/ml 17β-Östradiol oder 10 ng/ml Progesteron.** Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM (n=6). Mit \* wurden die behandelten Gruppen gekennzeichnet, die sich signifikant von der Kontrollgruppe desselben Versuchszeitpunkts unterschieden ( $p < 0,05$ ).

Die mRNA Menge in den arachidonsäurebehandelten Zellen blieb im Verlauf des Versuchs auf dem Ausgangsniveau, sie war dabei sechs Stunden nach Versuchsbeginn signifikant geringer als in den unbehandelten Zellen desselben Zeitpunkts (Abbildung 16).

In den ersten zwei Stunden nach der Behandlung mit PGE<sub>2</sub> blieb die cPLA<sub>2</sub>β mRNA Expression in den Zellen unverändert. Nach 4 Stunden war die Expression in den PGE<sub>2</sub>-behandelten Zellen signifikant niedriger als in den unbehandelten Zellen. Nach 6 Stunden hatte sich die Expression in den unbehandelten Zellen nicht weiter erhöht, während die Expression in den PGE<sub>2</sub>-behandelten Zellen jedoch bis auf 160% des Ausgangswerts angestiegen war. Damit war nach 6 Stunden kein Unterschied zwischen unbehandelten und PGE<sub>2</sub>-behandelten Zellen mehr vorhanden.

Das Expressionsniveau der cPLA<sub>2</sub>β mRNA entsprach in den kultivierten bovinen Oviduktzellen dem Expressionsniveau in den Oviduktzellen der in vivo Untersuchungen.

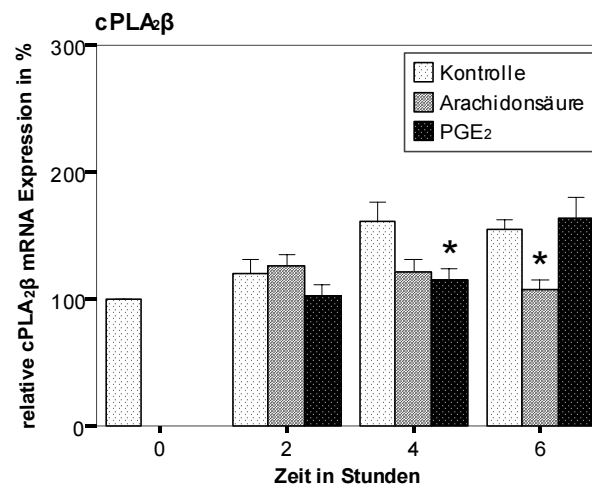


Abbildung 16: **cPLA<sub>2</sub>β mRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen nach Stimulierung mit 10 μM Arachidonsäure oder 0,25 μM PGE<sub>2</sub>.** Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM (n=6). Mit \* wurden die behandelten Gruppen gekennzeichnet, die sich signifikant von der Kontrollgruppe desselben Versuchszeitpunkts unterschieden (p<0,05).

## 5.5 Cyclooxygenase 1 (COX-1)

Die mRNA der normalerweise konstitutiv exprimierten COX-1 wurde über den gesamten Zyklusverlauf in allen Oviduktabschnitten nachgewiesen. Die COX-1 mRNA Konzentrationen waren in der prä- und postovulatorischen Phase etwa doppelt so hoch wie in den Lutealphasen (Abbildung 17A). Es bestanden signifikante Unterschiede zwischen der COX-1 mRNA Expression der Lutealphasen und der COX-1 Expression in den Phasen um die Ovulation herum. Mit Ausnahme des kontralateralen Ovidukts der späten Lutealphase, in dem die COX-1 mRNA Expression in der Ampulle doppelt so hoch war wie im dazugehörigen Isthmus, konnten ansonsten innerhalb derselben Zyklusphase keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen ipsi- und kontralateralem Ovidukt oder Ampulle und Isthmus desselben Ovidukts festgestellt werden (Abbildung 17B).

Die COX-1 mRNA wurde im Bereich von 1,1-4,4 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA exprimiert. Bei der Sequenzierung des PCR-Produkts wurde eine 98%ige Homologie zur bekannten bovinen COX-1 Sequenz (EMBL Nr.: AF004943) festgestellt.

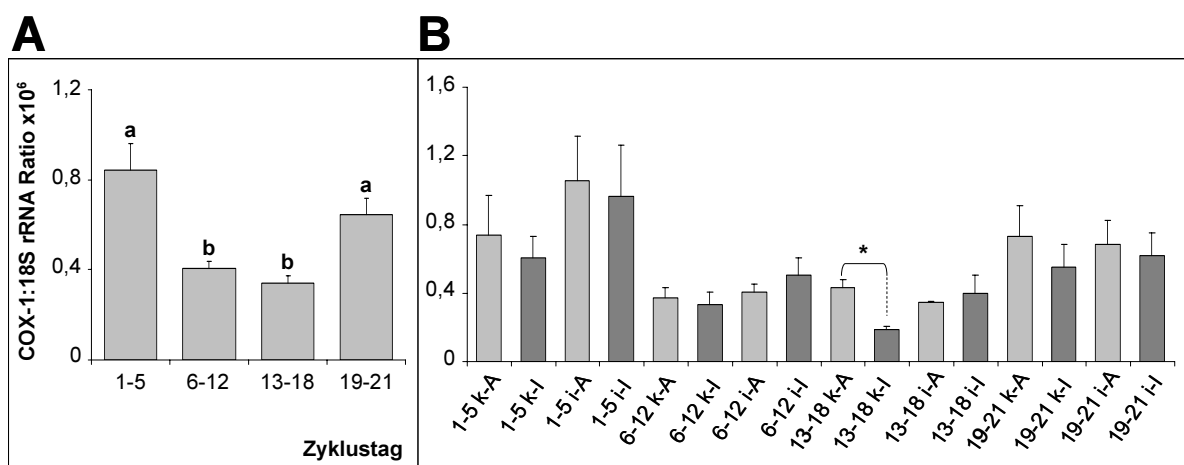


Abbildung 17: **COX-1 mRNA Expression in den Oviduktzellen während des Sexualzyklus ohne (A) und mit (B) Unterscheidung der verschiedenen Oviduktabschnitte.** Angegeben sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=7 Tiere). Unterschiedlich gekennzeichnete Werte sind signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ). Mit \* verbundene Werte sind signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ ). 1-5: postovulatorische Phase; 6-12: frühe Lutealphase; 13-18: späte Lutealphase; 19-21: präovulatorische Phase; k-A: kontralaterale Ampulle; k-I: kontralateraler Isthmus; i-A: ipsilaterale Ampulle; i-I: ipsilateraler Isthmus.

Im Verlauf des Stimulationsversuchs sank die COX-1 mRNA Expression nach 6 Stunden in allen Oviduktzellen unabhängig von einer Behandlung mit Östradiol oder Progesteron auf durchschnittlich 70% des Ausgangswerts (Abbildung 18). In den steroidbehandelten Oviduktzellen fand diese Abnahme schneller statt. Nach 2 Stunden war der COX-1 mRNA Gehalt unverändert. Nach 4 Stunden war sie in den steroidbehandelten Zellen bereits um durchschnittlich 20-25% gesunken und damit temporär signifikant niedriger als in den unbehandelten Zellen.

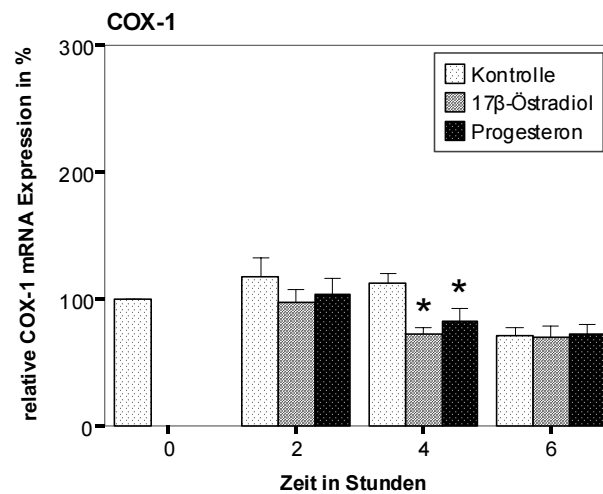


Abbildung 18: **COX-1 mRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen nach Stimulierung mit 10 pg/ml 17β-Östradiol oder 10 ng/ml Progesteron.** Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=6). Mit \* wurden die behandelten Gruppen gekennzeichnet, die sich signifikant von der Kontrollgruppe desselben Versuchszeitpunkts unterschieden ( $p < 0,05$ ).

Die Zellkulturversuche zeigten, dass die COX-1 mRNA Expression in den Oviduktzellen über den gesamten Versuchszeitraum unabhängig von einer Behandlung mit Arachidonsäure oder PGE<sub>2</sub> auf relativ gleichbleibendem Niveau blieb (Abbildung 19). Nur nach 4 Stunden war die COX-1 mRNA Expression in den PGE<sub>2</sub>-behandelten Zellen durchschnittlich 30% signifikant höher als in den unbehandelten Zellen desselben Zeitpunkts. Ansonsten wurden zu keinem weiteren Zeitpunkt Expressionsunterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen festgestellt.

Die COX-1 mRNA Expression war in den kultivierten Oviduktzellen 10-100fach höher als in den gespülten Oviduktzellen für die in vivo Untersuchungen.

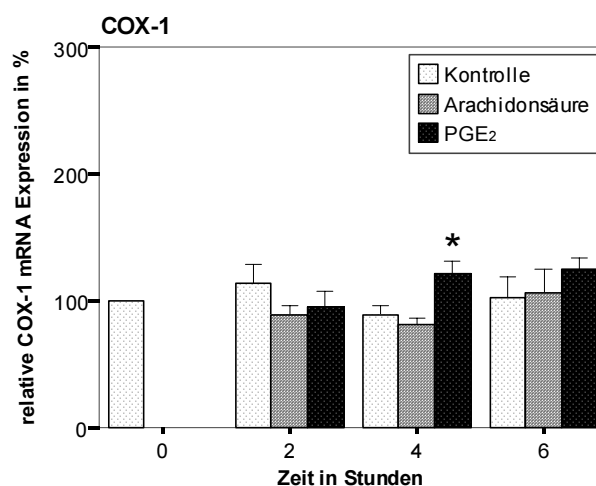


Abbildung 19: **COX-1 mRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen nach Stimulierung mit 10 μM Arachidonsäure oder 0,25 μM PGE<sub>2</sub>.** Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=6). Mit \* wurden die behandelten Gruppen gekennzeichnet, die sich signifikant von der Kontrollgruppe desselben Versuchszeitpunkts unterschieden ( $p < 0,05$ ).

Mittels immunhistologischer Färbungen wurde COX-1 in allen bovinen Oviduktabschnitten über den gesamten Zyklusverlauf nachgewiesen. Immunreaktives COX-1 kam ausschließlich in den Epithelzellen der Mukosa und in den glatten Muskelzellen der Muskularis, jedoch nicht in den Stromazellen vor. Im Epithel wurden in den Follikelphasen vor allem zilientragende Zellen angefärbt. In den Lutealphasen wurde meist das komplette Epithel unabhängig von der Zellart angefärbt. Insgesamt wurde COX-1 in den Lutealphasen in mehr Zellen exprimiert als in den Phasen um die Ovulation herum. Innerhalb der Epithelzellen war COX-1 im gesamten Zytoplasma lokalisiert. Teilweise waren auch die Zellkerne COX-1 positiv gefärbt. Es wurden keine Unterschiede zwischen den Ampullen- und Isthmusabschnitten festgestellt. Die glatten Muskelzellen zeigten unabhängig von der Zyklusphase eine starke zytoplasmatische und nukleäre Färbung. Eine repräsentative Negativkontrolle des Epithels und eine Negativkontrolle der glatten Muskelzellen, die keine spezifische Färbung zeigten, sind in Abbildung 20G und 20I dargestellt.

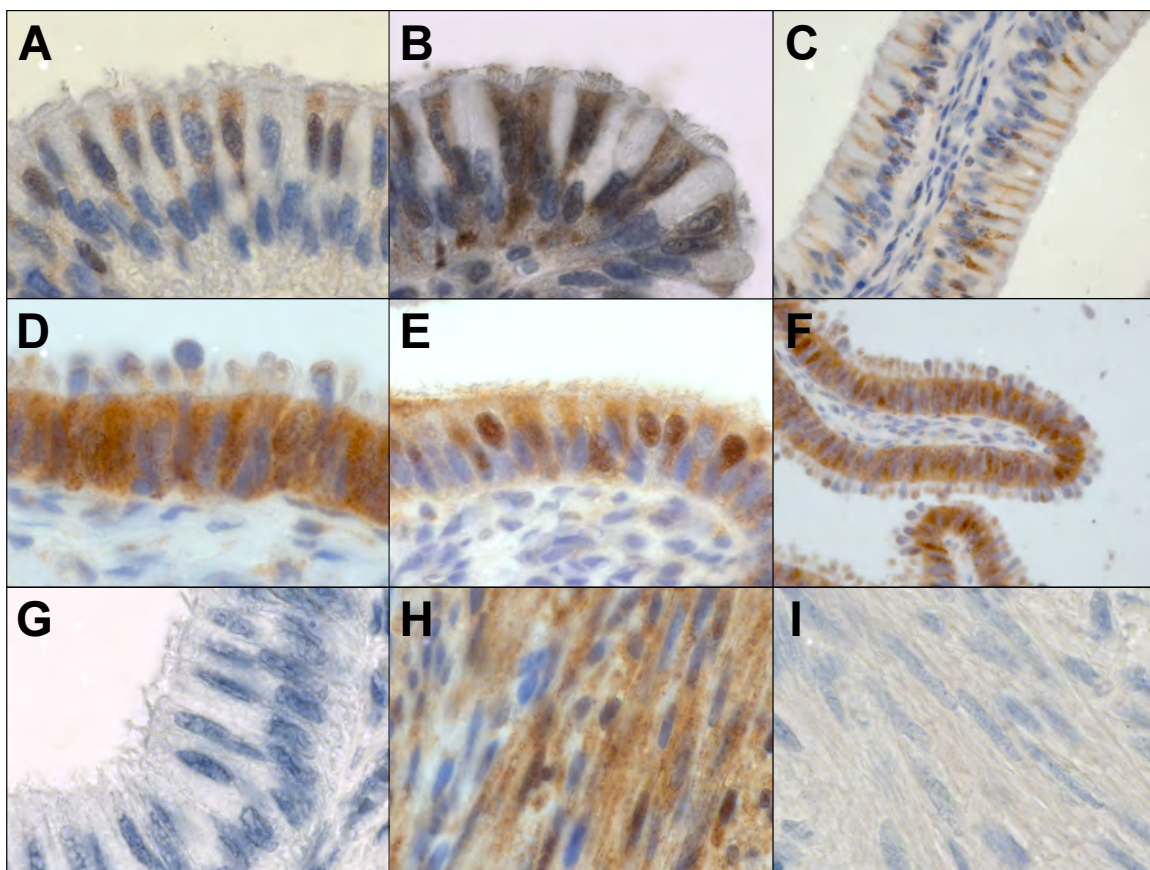


Abbildung 20: **Immunhistologische Lokalisierung von COX-1 in bovinen Oviduktzellen.** **A:** Ampulle, präovulatorische Phase; **B+C:** Ampulle, postovulatorische Phase; **D:** Ampulle, frühe Lutealphase; **E:** Isthmus, frühe Lutealphase; **F:** Ampulle, späte Lutealphase; **G:** Negativkontrolle, Ampulle, postovulatorische Phase; **H:** glatte Muskelzellen; **I:** Negativkontrolle, glatte Muskelzellen 1000-fache Vergrößerung (Ausnahme C+F: 400-fache Vergrößerung)

Um die Antikörperspezifität und mögliche Veränderungen im COX-1 Proteingehalt in den gespülten Oviduktzellen aufzuzeigen, wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Das eingesetzte polyklonale Antiserum war gegen ovines COX-1 gerichtet. Es erkannte eine spezifische ovine COX-1 Bande bei ca. 70 kDa und eine Bande der entsprechenden Größe aus den Proteinextrakten der bovinen Oviduktzellen (Abbildung 21A). Die densitometrische Analyse der Banden zeigte einen Anstieg von der niedrigsten COX-1 Menge in der präovulatorischen Phase auf die höchsten COX-1 Mengen in der frühen Lutealphase (Abbildung 21B). In der späten Lutealphase nahm die COX-1 Menge in den bovinen Oviduktzellen wieder ab. Es wurden keine signifikanten Unterschiede der Bandenintensitäten zwischen den unterschiedlichen Lokalisationen festgestellt, das heißt es gab keine offensichtlichen Unterschiede im COX-1 Proteingehalt zwischen ipsi- und kontralateralem Ovidukt oder zwischen den Ampullen- und Isthmusabschnitten (Abbildung 21C).

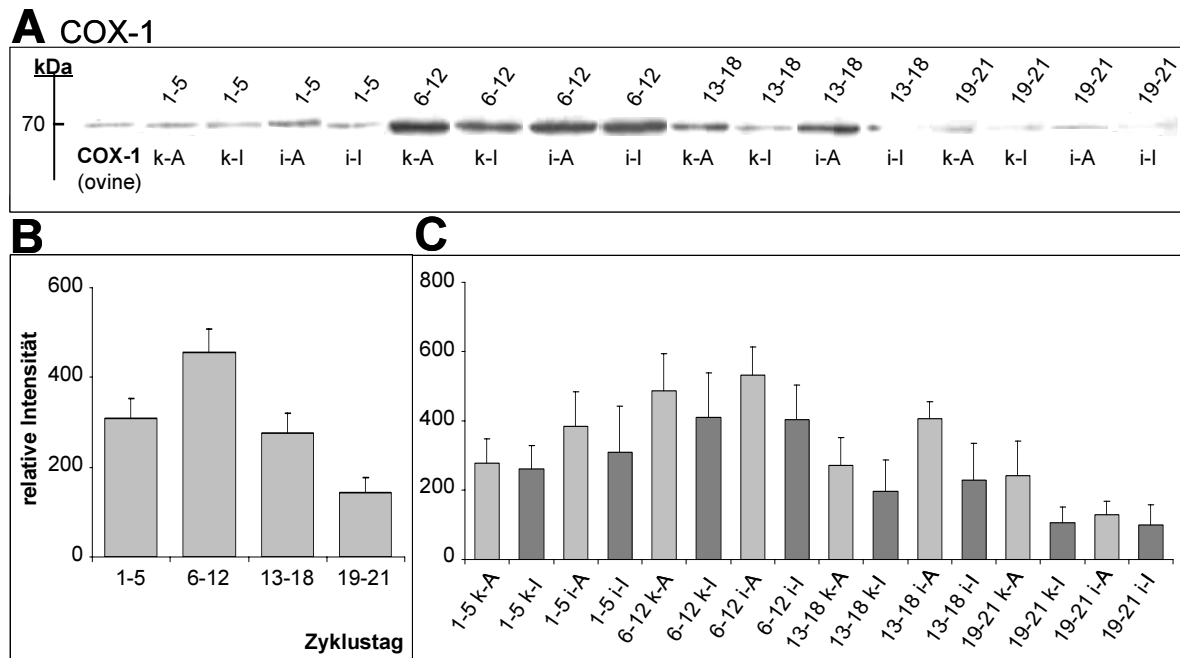


Abbildung 21: **COX-1 Proteinexpression in den Oviduktzellen während des Sexualzyklus ohne (B) und mit (A,C) Unterscheidung der verschiedenen Oviduktabschnitte.** A, zeigt eine repräsentative Bande der Western Blot Analyse. B+C, zeigen die densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse von COX-1. Angegeben sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM der relativen Bandenintensität (n=4 Tiere). 1-5: postovulatorische Phase; 6-12: frühe Lutealphase; 13-18: späte Lutealphase; 19-21: präovulatorische Phase; k-A: kontralaterale Ampulle; k-I: kontralateraler Isthmus; i-A: ipsilaterale Ampulle; i-I: ipsilateraler Isthmus.

## 5.6 Cyclooxygenase 2 (COX-2)

Wie aus Abbildung 22A ersichtlich wird, war COX-2 mRNA in allen Oviduktabschnitten und in allen Zyklusphasen vorhanden. Die höchste COX-2 mRNA Konzentration wurde direkt nach der Ovulation gemessen (Abbildung 22A). Die mittlere COX-2 mRNA Expression war in der post-ovulatorischen Phase mehr als doppelt so hoch wie in der frühen und späten Lutealphase. Die mittlere COX-2 mRNA Menge stieg vor der Ovulation wieder auf knapp das Doppelte der Werte in der Lutealphase an. Diese Veränderungen über den Zyklus waren jedoch nicht signifikant, denn bei Betrachtung der einzelnen Oviduktabschnitte zeigte sich, dass die höhere Konzentration an COX-2 mRNA direkt nach der Ovulation lediglich von der höheren Expression in einem Oviduktabschnitt herrührte. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 22B zu erkennen: Der durchschnittliche COX-2 mRNA Gehalt war in den ipsilateralen Ampullenabschnitten der postovulatorischen Phase 3-10mal so hoch wie in den anderen Oviduktabschnitten. Dieser hohe durchschnittliche Gehalt an COX-2 mRNA in den ipsilateralen Ampullen der postovulatorischen Phase wurde jedoch nur durch zwei Proben verursacht, die wesentlich höhere Gehalte an COX-2 mRNA aufwiesen als die restlichen Proben. Dies ist in einem Streudiagramm dargestellt (Abbildung 23). Ansonsten wurde COX-2 relativ gleichmäßig über den Zyklus hinweg exprimiert.

COX-2 wurde im Bereich von 0,48-1,34 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA exprimiert. Es traten Einzelwerte bis 7,8 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA in der ipsilateralen Ampulle nach der Ovulation auf. Die Sequenzierung des PCR-Produkts ergab eine 99%ige Homologie mit der bekannten bovinen COX-2 Sequenz (EMBL Nr.: AF031698).

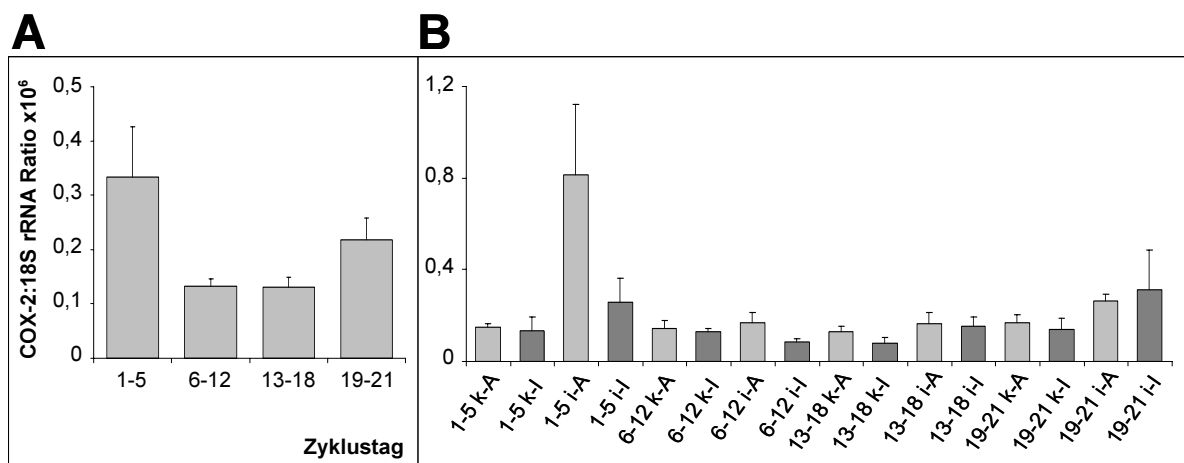


Abbildung 22: **COX-2 mRNA Expression in den Oviduktzellen während des Sexualzyklus ohne (A) und mit (B) Unterscheidung der verschiedenen Oviduktabschnitte.** Angegeben sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=7 Tiere). 1-5: postovulatorische Phase; 6-12: frühe Lutealphase; 13-18: späte Lutealphase; 19-21: präovulatorische Phase; k-A: kontralaterale Ampulle; k-I: kontralateraler Isthmus; i-A: ipsilaterale Ampulle; i-I: ipsilateraler Isthmus.

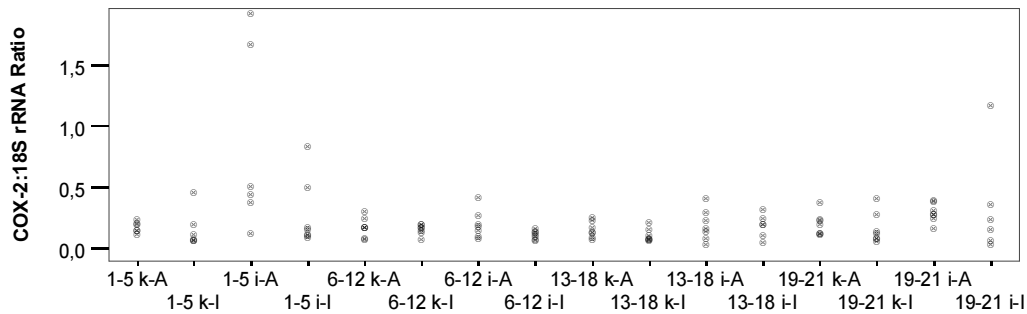


Abbildung 23: **Streudiagramm der Einzelwerte der COX-2 mRNA Expression im Verlauf des Sexualzyklus unter Berücksichtigung der verschiedenen Oviduktabschnitte.** 1-5: postovulatorische Phase; 6-12: frühe Lutealphase; 13-18: späte Lutealphase; 19-21: präovulatorische Phase; k-A: kontralaterale Ampulle; k-l: kontralateraler Isthmus; i-A: ipsilaterale Ampulle; i-l: ipsilateraler Isthmus.

Die kultivierten Oviduktzellen zeigten nach Behandlung mit Östradiol eine Zunahme der COX-2 mRNA Konzentration (Abbildung 24). Bereits nach 2 Stunden war ein durchschnittlicher Anstieg auf das Doppelte des Ausgangswerts zu sehen. Für diese Beobachtung wurde keine Signifikanz ermittelt, da diese Veränderung nur bei der Hälfte der behandelten Zellen zu erkennen war. Nach 4 Stunden wiesen die östradiolbehandelten Oviduktzellen dann einen signifikanten Anstieg auf das 3fache gegenüber den unbehandelten Oviduktzellen auf. Zu diesem Zeitpunkt war die COX-2 mRNA Expression in den behandelten Zellen aller 6 Tiere wesentlich höher als in den unbehandelten Zellen. Auch nach 6 Stunden war in den östradiolbehandelten Zellen noch ein durchschnittlicher Anstieg der COX-2 mRNA auf das Dreifache des Ausgangswerts zu beobachten. Diese Differenz war jedoch nicht signifikant, da hier bei der Hälfte der behandelten Zellen der COX-2 Gehalt bereits wieder auf sein Ausgangsniveau gesunken war.

Nach der Behandlung der Oviduktzellen mit Progesteron stieg die COX-2 mRNA Konzentration über die gesamte Versuchsdauer kontinuierlich an (Abbildung 24). 2 Stunden nach Versuchsbeginn wurde in den progesteronbehandelten Zellen durchschnittlich eine doppelt so hohe COX-2 mRNA Expression gemessen wie in den unbehandelten Zellen. Diese Tendenz war ebenfalls nicht signifikant, da auch hier eine Zunahme der COX-2 mRNA Menge nur bei der Hälfte der kultivierten Zellen auftrat. Bei der anderen Hälfte der Zellen befand sich die COX-2 mRNA Konzentration auf Ausgangsniveau. 4 und 6 Stunden nach der Progesteronbehandlung wurde ein signifikanter Anstieg der COX-2 mRNA Expression in den behandelten Zellen auf das 3-4fache gegenüber den unbehandelten Zellen festgestellt. Die COX-2 mRNA war zu diesen Zeitpunkten in allen behandelten Zellen um ein Vielfaches gegenüber den unbehandelten Zellen erhöht.



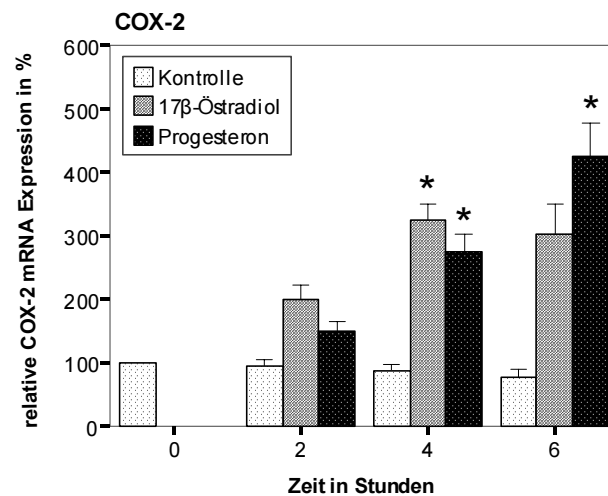


Abbildung 24: **COX-2 mRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen nach Stimulierung mit 10 pg/ml 17β-Östradiol oder 10 ng/ml Progesteron.** Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM (n=6). Mit \* wurden die behandelten Gruppen gekennzeichnet, die sich signifikant von der Kontrollgruppe desselben Versuchszeitpunkts unterschieden ( $p < 0,05$ ).

Auch die Behandlung mit Arachidonsäure und PGE<sub>2</sub> führte in den bovinen Oviduktzellen zu einem Anstieg der durchschnittlichen COX-2 mRNA Menge verglichen mit den unbehandelten Zellen (Abbildung 25). Zu jedem Zeitpunkt war die COX-2 mRNA Expression in 4 von 5 behandelten Proben um ein Vielfaches höher als in den unbehandelten Zellen desselben Zeitpunkts. Zusätzlich fiel eine Probe aus technischen Gründen aus, sodass für diese starken Expressionsänderungen keine Signifikanzen ermittelt werden konnten.

Entsprechend den Ergebnissen der COX-1 mRNA Expression, war auch die COX-2 mRNA Expression in den kultivierten Oviduktzellen 10-100fach höher als in den Oviduktzellen der in vivo Untersuchungen.

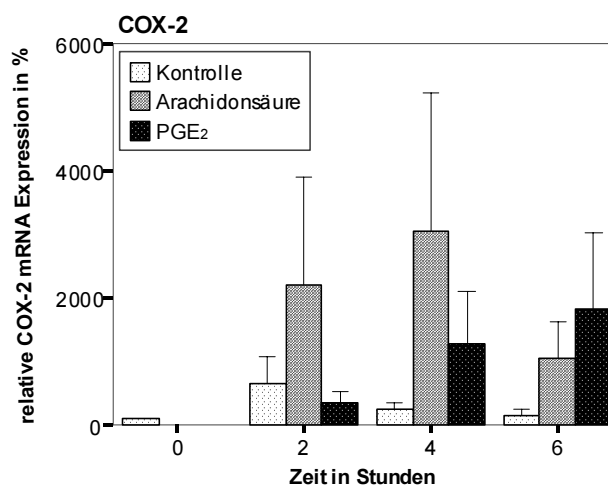


Abbildung 25: **COX-2 mRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen nach Stimulierung mit 10 μM Arachidonsäure oder 0,25 μM PGE<sub>2</sub>.** Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM (n=5).

Das Vorhandensein von COX-2 im bovinen Ovidukt konnte ebenfalls durch eine spezifische immunhistologische Färbung festgestellt werden. Dabei zeigten die immunhistologischen Färbungen, dass sich das COX-2 Expressionsmuster von dem COX-1 Expressionsmuster unterschied. Die Färbung machte deutlich, dass COX-2 ausschließlich in Epithelzellen lokalisiert war und zwar hauptsächlich in zilientragenden Zellen. In Stromazellen und in glatten Muskelzellen wurde kein COX-2 detektiert (Abbildung 26E). Es waren regionale Unterschiede der COX-2 Lokalisation innerhalb der Epithelzellen sichtbar. So war COX-2 in den Ampullenabschnitten innerhalb der Epithelzelle vorwiegend im apikalen Zytoplasma lokalisiert (Abbildung 26A+B). Im Isthmus hingegen wurde COX-2 im gesamten Zytoplasma gefunden, d.h. es befand sich sowohl apikal als auch basal (Abbildung 26D). Die Zellkerne zeigten dagegen keine spezifische Färbung für COX-2. Dies galt sowohl für die verschiedenen Oviduktabschnitte als auch für die einzelnen Zyklusphasen. Die Färbung der Epithelzellen unterschied sich im Gegensatz dazu in den verschiedenen Zyklusphasen. So war die spezifische COX-2 Färbung in der postovulatorischen Phase und der frühen Lutealphase (Abbildung 26A+B) wesentlich intensiver als in der späten Lutealphase und der präovulatorischen Phase (Abbildung 26C). Es konnte zudem eine tendenziell stärkere Färbung im ipsilateralen Ovidukt verglichen mit dem kontralateralen Ovidukt festgestellt werden. Eine repräsentative Negativkontrolle zeigte keine Färbung.

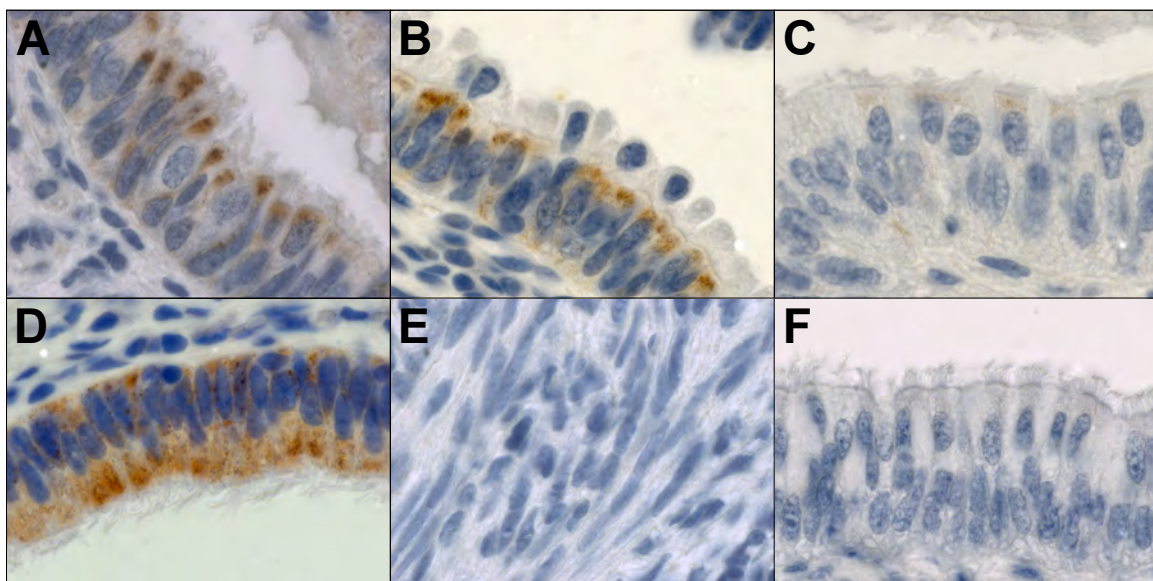


Abbildung 26: **Immunhistologische Lokalisierung von COX-2 in bovinen Oviduktzellen.** A: Ampulle, postovulatorische Phase; B: Ampulle, frühe Lutealphase; C: Ampulle, präovulatorische Phase; D: Isthmus, frühe Lutealphase; E: glatte Muskelzellen; F: Negativkontrolle, Ampulle; 1000-fache Vergrößerung

Um die Spezifität des eingesetzten Antikörpers und eventuelle Veränderungen der COX-2 Proteinmengen in bovinen Oviduktzellen zu untersuchen, wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Das verwendete COX-2 Antiserum erkannte ovines COX-2. Die spezifische Bande hatte eine Größe von ungefähr 72 kDa. Bei den bovinen Oviduktzellen konnte jedoch ein Signal mit einer ungefähren Größe von nur 60 kDa detektiert werden (Abbildung 27A). Die durchschnittlichen COX-2 Proteinmengen schwankten im Verlauf des Zyklus stark. Es war keine offensichtliche Regulation der COX-2 Proteinexpression zu erkennen (Abbildung 27B) und keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Oviduktabschnitten derselben Zyklusphase konnten detektiert werden (Abbildung 27C).

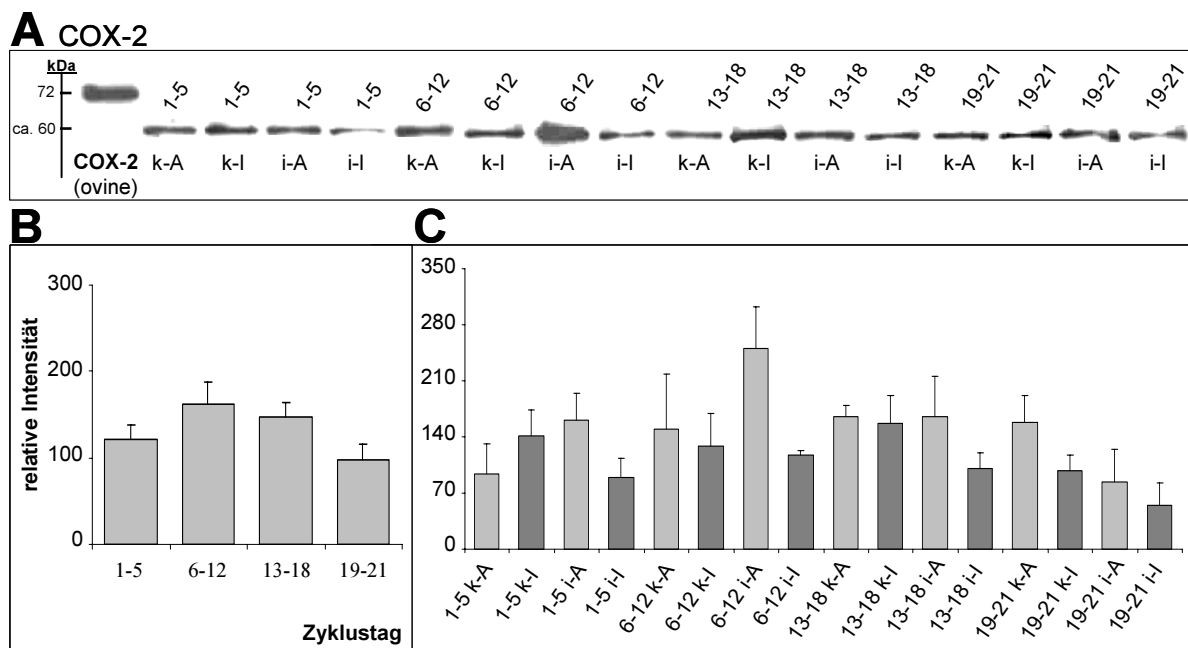


Abbildung 27: **A: Repräsentativer COX-2 Western Blot mit Oviduktzellen während des Sexualzyklus mit Unterscheidung zwischen den verschiedenen Oviduktabschnitten. B, C: Densitometrische Analyse der COX-2 Proteindetektion in Oviduktzellen während des Sexualzyklus ohne (B) und mit (C) Unterscheidung der verschiedenen Oviduktabschnitte mittels Western Blot.** Angegeben sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM der relativen Bandenintensität (n=4 Tiere). 1-5: postovulatorische Phase; 6-12: frühe Lutealphase; 13-18: späte Lutealphase; 19-21: präovulatorische Phase; k-A: kontralaterale Ampulle; k-I: kontralateraler Isthmus; i-A: ipsilaterale Ampulle; i-I: ipsilateraler Isthmus.

## 5.7 Cyclooxygenase-Aktivität

Der Cyclooxygenase-Aktivitätstest mit Oviduktzellen zeigte, dass die Hemmung von COX-1 mit SC-560 in der Probe zu einem signifikanten Rückgang der COX-Aktivität auf 25% der Kontrollprobe führte. In Abbildung 28 ist zu erkennen, dass die Behandlung der Proben mit COX-2 Inhibitor DuP-697 zu einer Reduktion der Cyclooxygenaseaktivität auf 75% der unbehandelten Kontrollprobe führte. Durch die Erhöhung der Konzentrationen der Inhibitoren konnte keine stärkere Inhibition der einzelnen Cyclooxygenasen erreicht werden (Daten nicht abgebildet). Es konnte festgestellt werden, dass der selektive COX-1 Inhibitor SC-560 die COX-2 Aktivität und der selektive COX-2 Inhibitor DuP-697 die COX-1 Aktivität um etwa 10% hemmten (Daten nicht abgebildet). Alle Positivkontrollen zeigten eine starke Cyclooxygenaseaktivität sowie die gleichzeitig durchgeführten Negativkontrollen keine messbare COX-Aktivität (Daten nicht abgebildet). Zusammenfassend ist festzustellen, dass COX-1 mit 70-80% Anteil an der gesamten COX-Aktivität die Hauptquelle für PGH<sub>2</sub> im bovinen Ovidukt war.

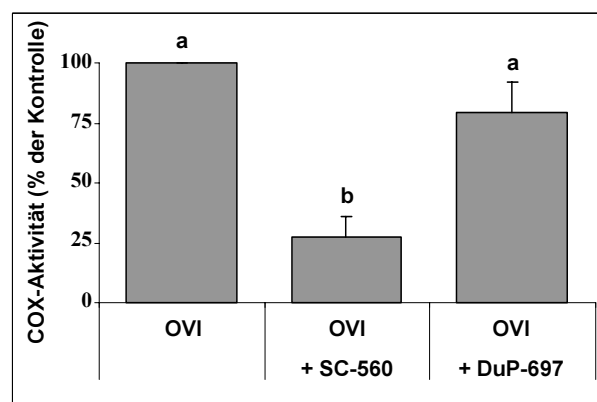


Abbildung 28: **Relative Cyclooxygenaseaktivität in bovinen Oviduktzellen ohne und mit Inhibition der COX-1 und COX-2 Aktivität.** Angegeben sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=5 Tiere). Unterschiedlich gekennzeichnete Werte sind signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ). OVI: Lysat der nicht inhibierten bovinen Oviduktzellen; OVI+SC-560: Lysat der mit COX-1 Inhibitor behandelten bovinen Oviduktzellen; OVI+DuP-697: Lysat der mit COX-2 Inhibitor behandelten bovinen Oviduktzellen.

## 5.8 Cytosolische PGE<sub>2</sub>-Synthase (cPGES)

In Abbildung 29B ist zu erkennen, dass cPGES mRNA über den gesamten Zyklusverlauf und in allen Oviduktabschnitten exprimiert wurde. Das in der Literatur als konstitutiv beschriebene cPGES wurde im Ovidukt auf gleich bleibendem Niveau exprimiert (Abbildung 29A). Unter Berücksichtigung der verschiedenen Oviduktabschnitte wurden weder Unterschiede zwischen ipsi- und kontralateralen Ovidukten noch zwischen den verschiedenen Lokalisationen innerhalb der Ovidukte festgestellt (Abbildung 29B).

cPGES wurde im Bereich von 350-600 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA exprimiert. Die Überprüfung des PCR-Produkts mittels Sequenzierung ergab eine 100%ige Homologie mit der bekannten bovinen cPGES Sequenz (EMBL Nr.: NM\_001007806).

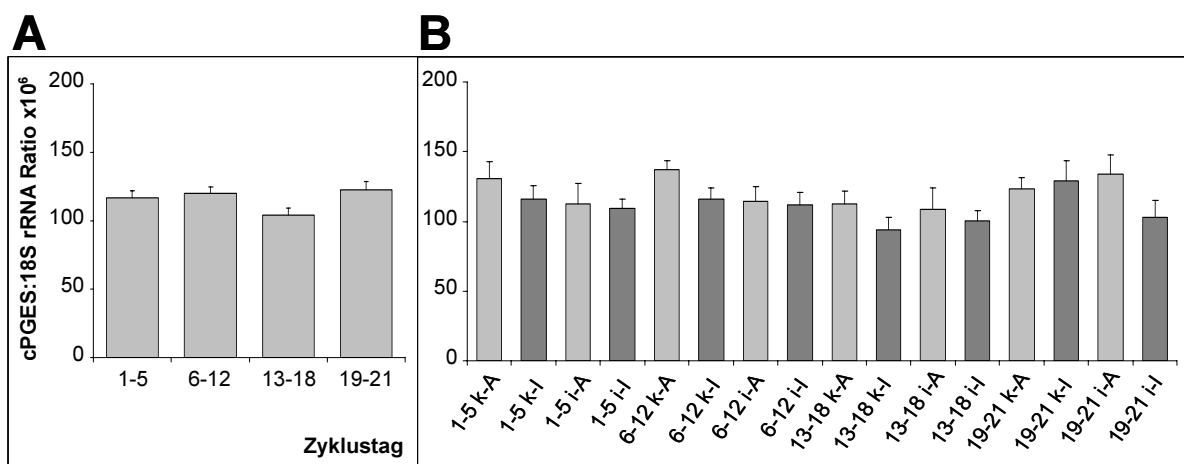


Abbildung 29: cPGES mRNA Expression in den Oviduktzellen während des Zyklus ohne (A) und mit (B) Unterscheidung der verschiedenen Oviduktabschnitte. Angegeben sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=7 Tiere). 1-5: postovulatorische Phase; 6-12: frühe Lutealphase; 13-18: späte Lutealphase; 19-21: präovulatorische Phase; k-A: kontralaterale Ampulle; k-I: kontralateraler Isthmus; i-A: ipsilaterale Ampulle; i-I: ipsilateraler Isthmus.

Ein Einfluss von Östradiol oder Progesteron auf die cPGES mRNA Expression in bovinen Oviduktzellen konnte in den Zellkulturversuchen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 30). Sowohl bei den unbehandelten als auch bei den behandelten Zellen nahm die cPGES Expression über die gesamte Versuchsdauer kontinuierlich ab. 6 Stunden nach der Behandlung mit Östradiol oder Progesteron war die cPGES mRNA Konzentration in den behandelten und den unbehandelten Zellen auf etwa 50% des Ausgangswerts (0 Stunden Kontrolle) gesunken.

Die cPGES mRNA Konzentration war in den kultivierten Oviduktzellen in etwa genauso hoch wie in den Oviduktzellen für die in vivo Untersuchungen.

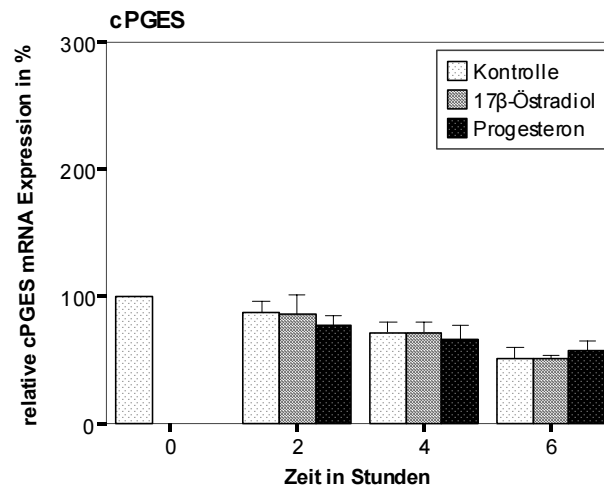


Abbildung 30: **cPGES mRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen nach Stimulierung mit 10 pg/ml 17β-Östradiol oder 10 ng/ml Progesteron.** Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM (n=6).

Eine Behandlung mit Arachidonsäure oder PGE<sub>2</sub> hatte keinen Einfluss auf die cPGES mRNA Konzentration in den Oviduktzellen, da die Konzentration im Versuchsverlauf sowohl in den Kontrollen als auch in den behandelten Zellen auf 80% des Ausgangswerts sank. 2 Stunden nach Versuchsbeginn war der cPGES mRNA Gehalt in den unbehandelten Zellen bereits auf 80% des Ausgangsniveaus gesunken, die cPGES mRNA Konzentration in den behandelten Zellen war unverändert hoch (Abbildung 31). Der Expressionsunterschied ist zum Zeitpunkt 2 Stunden zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen zwar sehr gering, aber in den Zellen aller Tiere konstant vorhanden. Nach 4 und 6 Stunden war kein Unterschied mehr zwischen behandelten und unbehandelten Zellen zu finden.

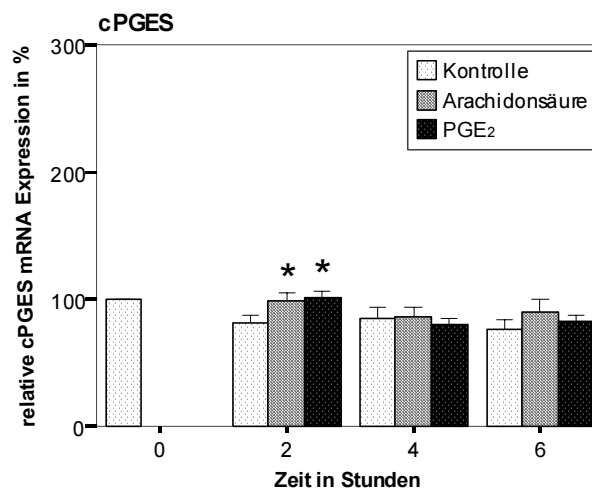


Abbildung 31: **cPGES mRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen nach Stimulierung mit 10 μM Arachidonsäure oder 0,25 μM PGE<sub>2</sub>.** Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM (n=6). Mit \* wurden die behandelten Gruppen gekennzeichnet, die sich signifikant von der Kontrollgruppe desselben Versuchszeitpunkts unterschieden ( $p < 0,05$ ).

## 5.9 Membrangebundene PGE<sub>2</sub>-Synthase 1 (mPGES-1)

Die Ergebnisse der Real-Time-PCR zeigten, dass die induzierbare Form der PGE<sub>2</sub>-Synthasen, mPGES-1, über den Zyklus hinweg reguliert wird. Die höchste mPGES-1 mRNA Konzentration wurde direkt nach der Ovulation gemessen (Abbildung 32A). Es folgte eine signifikante Abnahme der mPGES-1 mRNA Konzentration auf weniger als die Hälfte in der frühen Lutealphase. Die Expression stieg danach leicht, aber kontinuierlich bis kurz vor der Ovulation an. Unter Berücksichtigung der verschiedenen Oviduktabschnitte derselben Zyklusphase waren keine Unterschiede zwischen ipsi- und kontralateralem Ovidukt vorhanden. Zwischen den verschiedenen Oviduktabschnitten allerdings zeigten sich Unterschiede. So waren die gemessenen Konzentrationen von mPGES-1 mRNA in den Isthmusabschnitten in allen Zyklusphasen durchschnittlich höher als in den dazugehörigen Ampullenabschnitten (Abbildung 32B). Werden die Werte von ipsi- und kontralateralen Ovidukten zusammengefasst, so zeigte sich, dass sich die Expression der mPGES-1 mRNA in der postovulatorischen Phase und der frühen Lutealphase zwischen Isthmus- und Ampullenabschnitten signifikant unterschied (Abbildung 33).

mPGES-1 wurde im Bereich von 0,13-1,6 fg/μg Gesamt-RNA exprimiert. Die Sequenzierung des PCR-Produkts ergab eine 100%ige Homologie mit der bekannten bovinen mPGES-1 Sequenz (EMBL Nr.: AY032727).

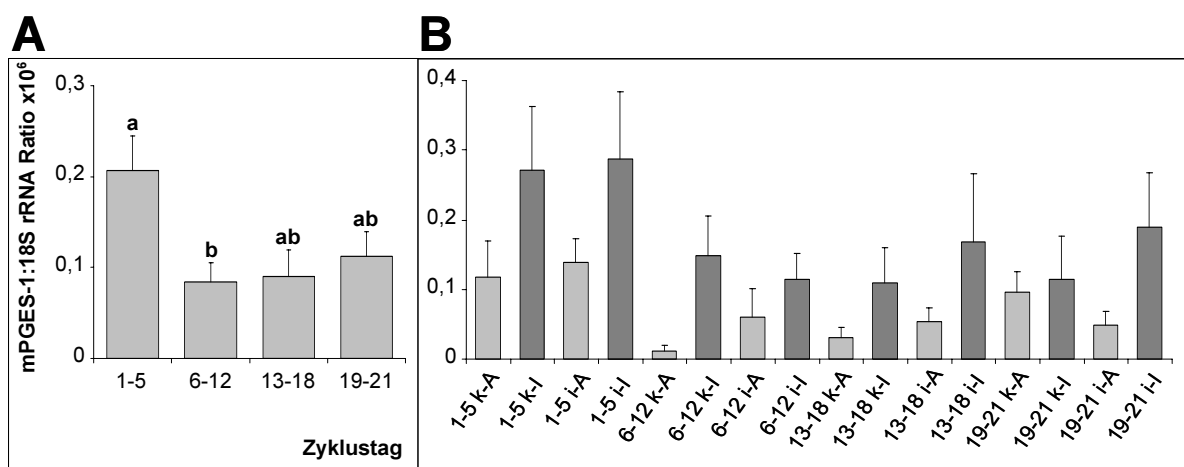


Abbildung 32: **mPGES-1 mRNA Expression in den Oviduktzellen während des Zyklus ohne (A) und mit (B) Unterscheidung der verschiedenen Oviduktabschnitte.** Angegeben sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=7 Tiere). Unterschiedlich gekennzeichnete Werte sind signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ). 1-5: postovulatorische Phase; 6-12: frühe Lutealphase; 13-18: späte Lutealphase; 19-21: präovulatorische Phase; k-A: kontralaterale Ampulle; k-I: kontralateraler Isthmus; i-A: ipsilaterale Ampulle; i-I: ipsilateraler Isthmus.

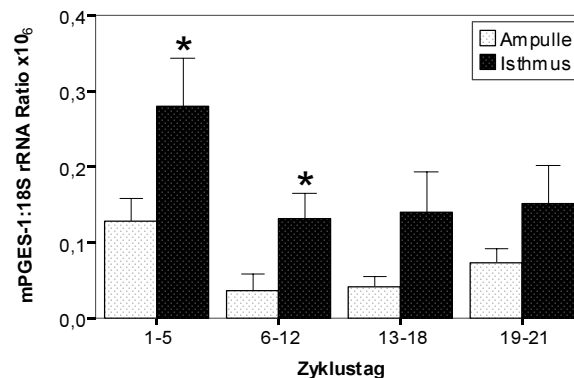


Abbildung 33: mPGES-1 mRNA Expression in den Oviduktzellen während des Zyklus ohne Unterscheidung zwischen ipsi- und kontralateraler Seite. Angegeben sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=14 Tiere). Mit \* gekennzeichnete Ampullen sind signifikant ( $p < 0,05$ ) unterschiedlich zu den Isthmusabschnitten derselben Zyklusphase. 1-5: postovulatorische Phase; 6-12: frühe Lutealphase; 13-18: späte Lutealphase; 19-21: präovulatorische Phase.

Die Behandlung der Zellen mit Steroiden resultierte in einer kontinuierlichen mPGES-1 mRNA Zunahme während des Versuchszeitraums (Abbildung 34). Die Behandlung mit Östradiol führte nach 6 Stunden zu einem Anstieg auf das 3fache des Ausgangswerts. Die Behandlung mit Progesteron ergab ebenfalls einen starken Anstieg. Nach 6 Stunden wurde in den behandelten Zellen sogar eine 5fach höhere mPGES-1 mRNA Konzentration gemessen als in den unbehandelten Oviduktzellen zu Beginn des Versuchs.

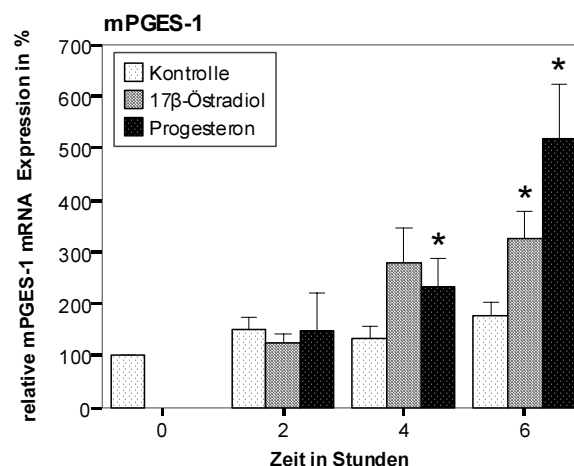


Abbildung 34: mPGES-1 mRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen nach Stimulierung mit 10 pg/ml 17β-Östradiol oder 10 ng/ml Progesteron. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=6). Mit \* wurden die behandelten Gruppen gekennzeichnet, die sich signifikant von der Kontrollgruppe desselben Versuchszeitpunkts unterschieden ( $p < 0,05$ ).



Auch die Behandlung der kultivierten bovinen Oviduktzellen mit Arachidonsäure führte zu einem signifikanten Anstieg der mPGES-1 mRNA 4 und 6 Stunden nach Behandlung (Abbildung 35). Die Zunahme erfolgte kontinuierlich und betrug nach 4 Stunden das Dreifache und nach 6 Stunden bereits das Vierfache der unbehandelten Kontrolle desselben Zeitpunkts.

Die Behandlung der Oviduktzellen mit PGE<sub>2</sub> führte ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme der mPGES-1 mRNA Konzentration. Dies galt jedoch nur für den Zeitpunkt 6 Stunden nach der Behandlung. Zu dieser Zeit betrug die mPGES-1 mRNA Menge 50% mehr als die Kontrolle desselben Zeitpunkts (Abbildung 35). Nach 2 und 4 Stunden waren dagegen keine Veränderungen messbar.

Die mPGES-1 mRNA Menge war in den kultivierten bovinen Oviduktzellen bis zu 10mal höher als in den gespülten Oviduktzellen für die in vivo Untersuchungen.

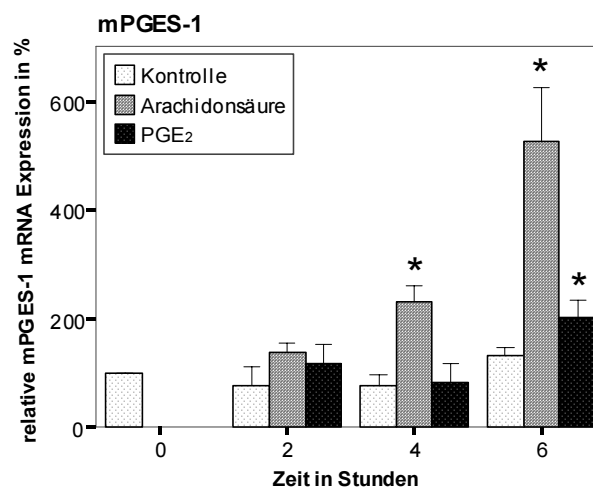


Abbildung 35: mPGES-1 mRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen nach Stimulierung mit 10  $\mu$ M Arachidonsäure oder 0,25  $\mu$ M PGE<sub>2</sub>. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=6). Mit \* wurden die behandelten Gruppen gekennzeichnet, die sich signifikant von der Kontrollgruppe desselben Versuchszeitpunkts unterschieden ( $p < 0,05$ ).

Es wurde eine spezifische Färbung für das mPGES-1 Protein in den bovinen Oviduktproben festgestellt. Die immunhistologischen Färbungen zeigten, dass sich das mPGES-1 Expressionsmuster von dem der Cyclooxygenasen unterschied. mPGES-1 war in den Epithelzellen ausschließlichs im Kern lokalisiert (Abbildung 36A,B,D,E). Es war zu erkennen, dass in der postovulatorischen Phase (Abbildung 36A) eine größere Anzahl an Epithelzellen positiv für mPGES-1 angefärbt war als in den anderen Phasen (Abbildung 36B). Regionale Unterschiede wurden hingegen nicht festgestellt. Außerdem wurde mPGES-1 im Zytoplasma der glatten Muskelzellen und in Endothelzellen angefärbt (Abbildung 36G,H). Vereinzelt waren auch Zellen im Stroma angefärbt. Repräsentative Negativkontrollen zeigten keine Färbung (Abbildung 36C,F,I).

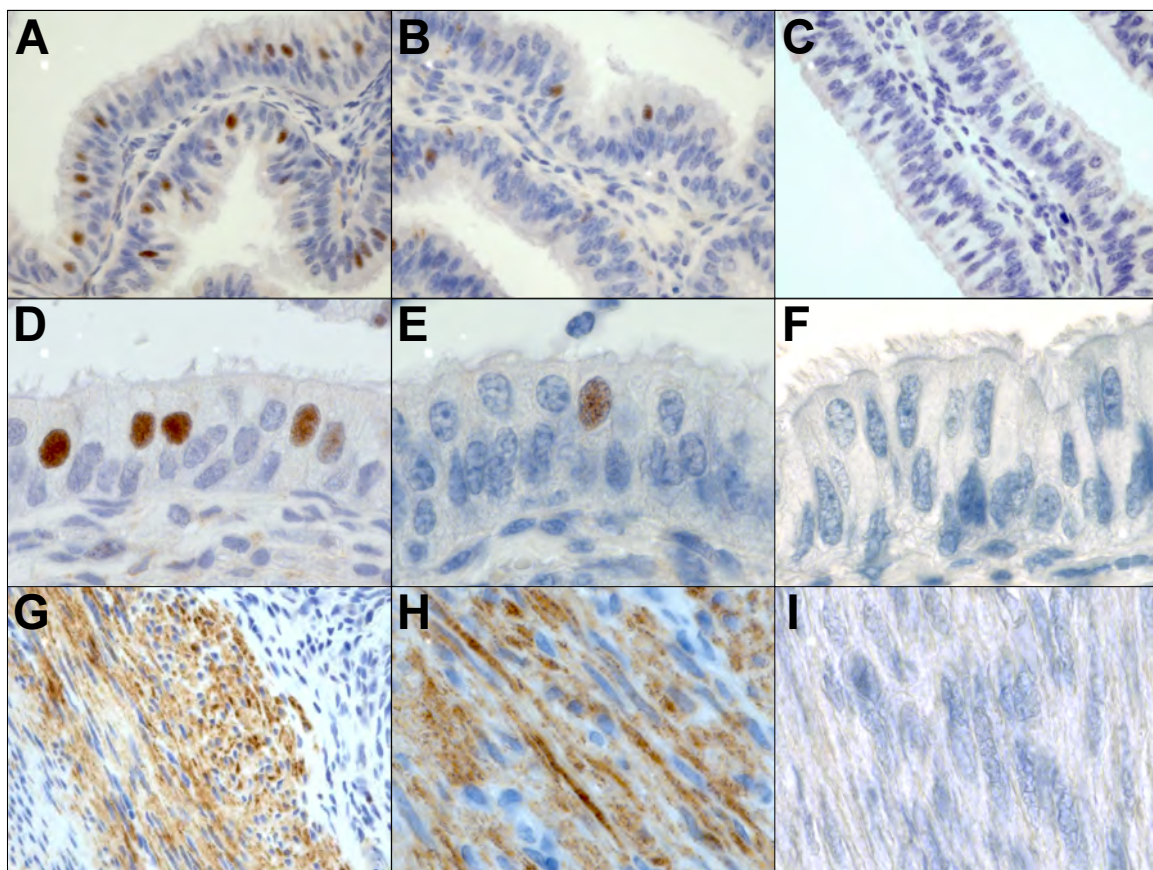


Abbildung 36: **Immunhistologische Lokalisierung von mPGES-1 in bovinen Oviduktzellen.** **A+D:** Ampulle, postovulatorische Phase; **B+E:** Ampulle, frühe Lutealphase; **C+F:** Negativkontrolle, Ampulle, postovulatorische Phase; **G+H:** glatte Muskelzellen; **I:** Negativkontrolle, glatte Muskelzellen

**A-C:** 400-fache Vergrößerung; **D-I:** 1000-fache Vergrößerung

Die Anwendung des Antikörpers in der Western Blot Analyse führte nicht zur Detektion einer Proteinbande. Dies spricht dafür, dass der Antikörper beim Rind nicht zur Western Blot Analyse geeignet ist oder die spezifische Proteinmenge unter der Detektionsgrenze vorlag.

## 5.10 Membrangebundene PGE<sub>2</sub>-Synthase 2 (mPGES-2)

Auch mPGES-2 mRNA wurde in allen Oviduktabschnitten nachgewiesen und die Expression war über den Zyklus hinweg sehr konstant (Abbildung 37A). Unter Einbeziehung aller Oviduktabschnitte der verschiedenen Zyklusphasen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen ipsi- und kontralateralen Ovidukten oder Ampullen- und Isthmusabschnitten gefunden. Der einzige signifikante Unterschied zwischen zwei Oviduktabschnitten zeigte sich in der frühen Lutealphase im ipsilateralen Ovidukt zwischen Ampulle und Isthmus (Abbildung 37B).

mPGES-2 wurde im Bereich von 5-8 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA exprimiert. Mittels Sequenzierung des PCR-Produkts konnte eine 100%ige Homologie zu der bovinen mPGES-2 Sequenz (EMBL-Nr.: AY692441) festgestellt werden.

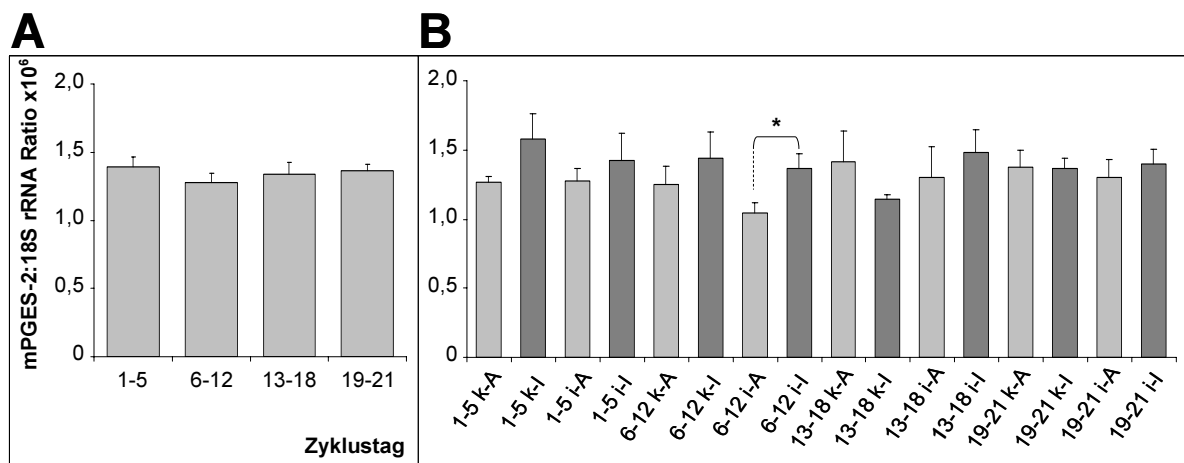


Abbildung 37: mPGES-2 mRNA Expression in den Oviduktzellen während des Zyklus ohne (A) und mit (B) Unterscheidung der verschiedenen Oviduktabschnitte. Angegeben sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=7 Tiere). Mit \* verbundene Werte sind signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ ). 1-5: postovulatorische Phase; 6-12: frühe Lutealphase; 13-18: späte Lutealphase; 19-21: präovulatorische Phase; k-A: kontralaterale Ampulle; k-I: kontralateraler Isthmus; i-A: ipsilaterale Ampulle; i-I: ipsilateraler Isthmus.

Die mPGES-2 mRNA Konzentration in den kultivierten Oviduktzellen nahm über den Versuchszeitraum stetig ab und erreichte nach 6 Stunden eine Konzentration von etwa 50% des Ausgangswerts (Abbildung 38). Diese Abnahme war größtenteils unabhängig von einer Behandlung mit Östradiol oder Progesteron. Allerdings war die mPGES-2 mRNA Konzentration in den progesteronbehandelten Zellen nach 6 Stunden durchschnittlich 10% höher als in den unbehandelten Zellen. Dieser Unterschied war signifikant, da er bei allen Proben konstant gemessen wurde.

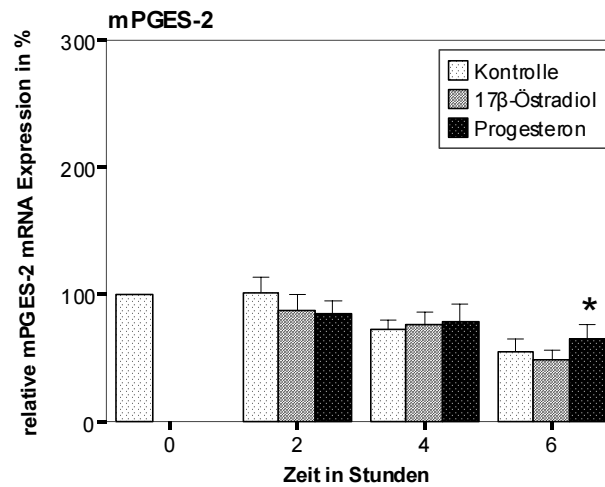


Abbildung 38: **mPGES-2 mRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen nach Stimulierung mit 10 pg/ml 17β-Östradiol oder 10 ng/ml Progesteron.** Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM (n=6). Mit \* wurden die behandelten Gruppen gekennzeichnet, die sich signifikant von der Kontrollgruppe desselben Versuchszeitpunkts unterschieden ( $p < 0,05$ ).

Der Gehalt an mPGES-2 mRNA blieb im Allgemeinen unbeeinflusst von der Behandlung mit Arachidonsäure und PGE<sub>2</sub> (Abbildung 39). Nur zum Zeitpunkt 2 Stunden nach der Behandlung lag die mRNA Konzentration in allen mit PGE<sub>2</sub> behandelten Proben höher als in den dazugehörigen Kontrollproben. Die mPGES-2 mRNA Menge betrug nach 6 Stunden in allen Gruppen durchschnittlich 85% des Ausgangswerts.

Das Expressionsniveau der mPGES-2 mRNA war in den kultivierten Oviduktzellen 2-3mal höher als in den gespülten Oviduktzellen für die in vivo Untersuchungen.

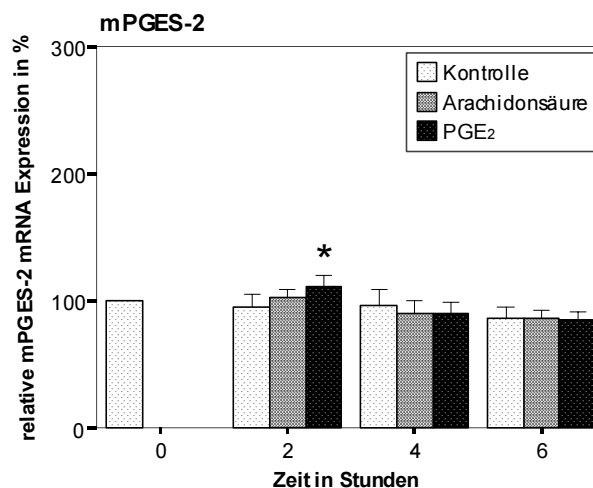


Abbildung 39: **mPGES-2 mRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen nach Stimulierung mit 10 μM Arachidonsäure oder 0,25 μM PGE<sub>2</sub>.** Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM (n=6). Mit \* wurden die behandelten Gruppen gekennzeichnet, die sich signifikant von der Kontrollgruppe desselben Versuchszeitpunkts unterschieden ( $p < 0,05$ ).

### 5.11 20 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSD)

Die Menge an HSD Transkripten unterlag starken Veränderungen über den Zyklusverlauf. Die höchste HSD mRNA Konzentration wurde in der postovulatorischen Phase gemessen (Abbildung 40A). Die HSD mRNA Konzentration sank kontinuierlich bis zur präovulatorischen Phase ab. In der postovulatorischen Phase war der HSD mRNA Gehalt 3fach höher als in der präovulatorischen Phase. Für diese Expressionsunterschiede waren ausschließlich die HSD mRNA Konzentrationen in den Isthmusabschnitten verantwortlich. So wurde unter Betrachtung der einzelnen Oviduktabschnitte festgestellt, dass die HSD Expression in den Ampullenabschnitten über den gesamten Zyklusverlauf auf niedrigem und konstantem Niveau erfolgte (Abbildung 40B), wohingegen die HSD Expression in den Isthmen stark reguliert war. In der postovulatorischen Phase und in der frühen Lutealphase war die HSD mRNA Expression in den Isthmusabschnitten 4-8fach so hoch wie in den dazugehörigen Ampullenabschnitten. Die HSD Expression in den Isthmusabschnitten verringerte sich in der späten Lutealphase und war vor der Ovulation kaum messbar. Zwischen ipsilateralen und kontralateralen Ovidukten gab es keine Unterschiede bezüglich der HSD Expression. Werden die Werte von ipsi- und kontralateralen Ovidukten zusammengefasst, zeigte sich, dass sich die Expression der HSD mRNA in der post-ovulatorischen Phase und in den Lutealphasen zwischen Isthmus- und Ampullenabschnitten signifikant unterschied (Abbildung 41).

HSD wurde im Bereich von 8-118 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA exprimiert. Die Sequenzierung des PCR-Produkts ergab eine 100%ige Homologie mit der bekannten bovinen HSD Sequenz (EMBL Nr.: S54973).

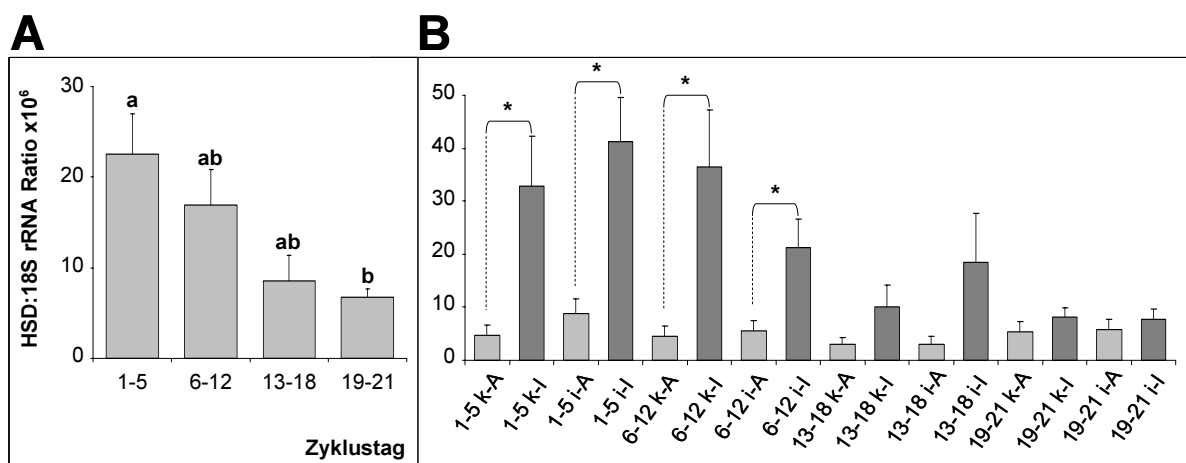


Abbildung 40: **HSD mRNA Expression in den Oviduktzellen während des Zyklus ohne (A) und mit (B) Unterscheidung der verschiedenen Oviduktabschnitte.** Angegeben sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=7 Tiere). Unterschiedlich gekennzeichnete Werte sind signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ). Mit \* verbundene Werte sind signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ ). 1-5: postovulatorische Phase; 6-12: frühe Lutealphase; 13-18: späte Lutealphase; 19-21: präovulatorische Phase; k-A: kontralaterale Ampulle; k-I: kontralateraler Isthmus; i-A: ipsilaterale Ampulle; i-I: ipsilateraler Isthmus.

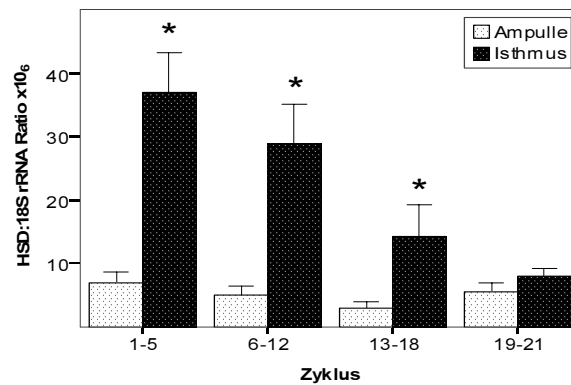


Abbildung 41: **HSD mRNA Expression in den Oviduktzellen während des Zyklus ohne Unterscheidung zwischen ipsi- und kontralateraler Seite.** Angegeben sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=14 Tiere). Mit \* gekennzeichnete Ampullen sind signifikant ( $p < 0,05$ ) unterschiedlich zu den Isthmusabschnitten derselben Zyklusphase. 1-5: postovulatorische Phase; 6-12: frühe Lutealphase; 13-18: späte Lutealphase; 19-21: präovulatorische Phase.

Bezüglich des Einflusses von Östradiol und Progesteron auf die HSD mRNA Expression lässt sich folgendes feststellen: Die HSD Expression in den kultivierten Oviduktzellen war 4 Stunden nach Behandlungsbeginn mit Östradiol noch unverändert und sank dann nach 6 Stunden auf etwa 60% des Ausgangswertes ab (Abbildung 42). Diese Differenz zur unbehandelten Kontrolle stellte sich jedoch als nicht signifikant heraus.

Progesteron hatte über die gesamte Versuchsdauer keinen Einfluß auf die HSD mRNA Expression in den kultivierten Oviduktzellen (Abbildung 42). Die progesteronbehandelten Zellen wiesen ein den unbehandelten Zellen desselben Zeitpunkts sehr ähnliches Expressionsmuster auf.

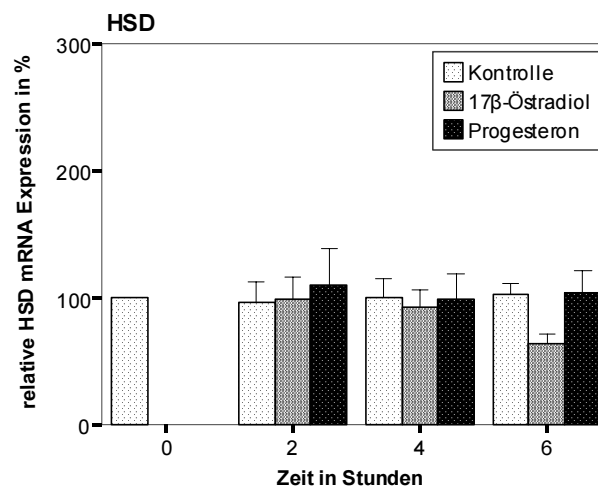


Abbildung 42: **HSD mRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen nach Stimulierung mit 10 pg/ml 17 $\beta$ -Östradiol oder 10 ng/ml Progesteron.** Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=6).

Auch die Behandlung der bovinen Oviduktzellen in der Zellkultur mit Arachidonsäure oder PGE<sub>2</sub> führte zu keinen signifikanten Veränderungen der HSD mRNA Konzentration. Aus Abbildung 43 wird jedoch ersichtlich, dass das Expressionsniveau in diesem Versuchsansatz generell leicht anstieg, im Gegensatz zur vorherigen Steroidbehandlung. Dies galt sowohl für die Kontrollen als auch für die behandelten Zellen.

Das Expressionsniveau der HSD mRNA in den kultivierten Oviduktzellen entsprach dem Expressionsniveau der HSD mRNA in den Isthmusabschnitten der post-ovulatorischen Phase und war damit bis zu 5mal höher als die durchschnittlichen HSD mRNA Konzentrationen in den Oviduktzellen für die in vivo Untersuchungen.

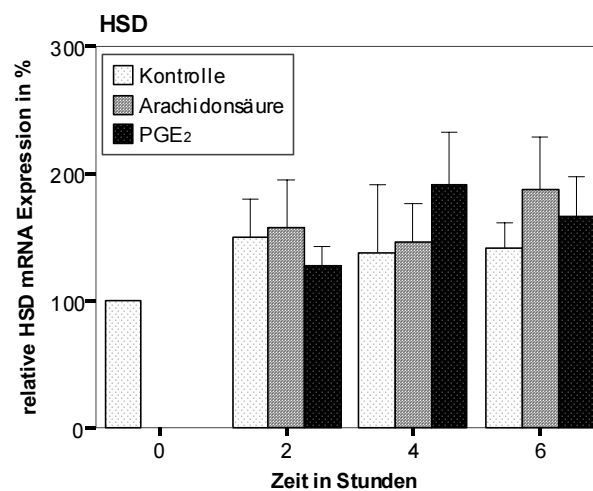


Abbildung 43: HSD mRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen nach Stimulierung mit 10  $\mu$ M Arachidonsäure oder 0,25  $\mu$ M PGE<sub>2</sub>. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=6).

## 5.12 PGF<sub>2α</sub>-Synthase (PGFS)

Da beim Rind viele verschiedene PGF<sub>2α</sub> synthetisierenden Enzyme beschrieben wurden, die eine sehr große Sequenzhomologie (89-100%) besitzen, wurden Primer verwendet, die bis auf 20α-HSD alle PGFS erkennen konnten. Die Primer passten für die folgenden PGF<sub>2α</sub> synthetisierenden Enzyme: PGFS I (EMBL Nr. J03570), PGFS II (EMBL Nr. M86544), PGFSL-1 (EMBL Nr. AY135400), PGFSL-2 (EMBL Nr. AY135401), 20α-(3α)-HSD/Dihydrodiol-dehydrogenase 1 (EMBL Nr. NM\_181027), 3α-HSD (EMBL Nr. BC102646) und Dihydrodiol-dehydrogenase 3 (EMBL Nr. D49542). Die Sequenzierung des PCR-Produkts ergab eine 100%ige Übereinstimmung mit der 20α-(3α)-HSD/Dihydrodiol-dehydrogenase 1 und der Dihydrodiol-dehydrogenase 3. Diese zwei PGF<sub>2α</sub>-Synthasen wurden im bovinen Ovidukt als Hauptprodukte identifiziert und werden im Folgenden Ergebnisteil als PGFS bezeichnet.

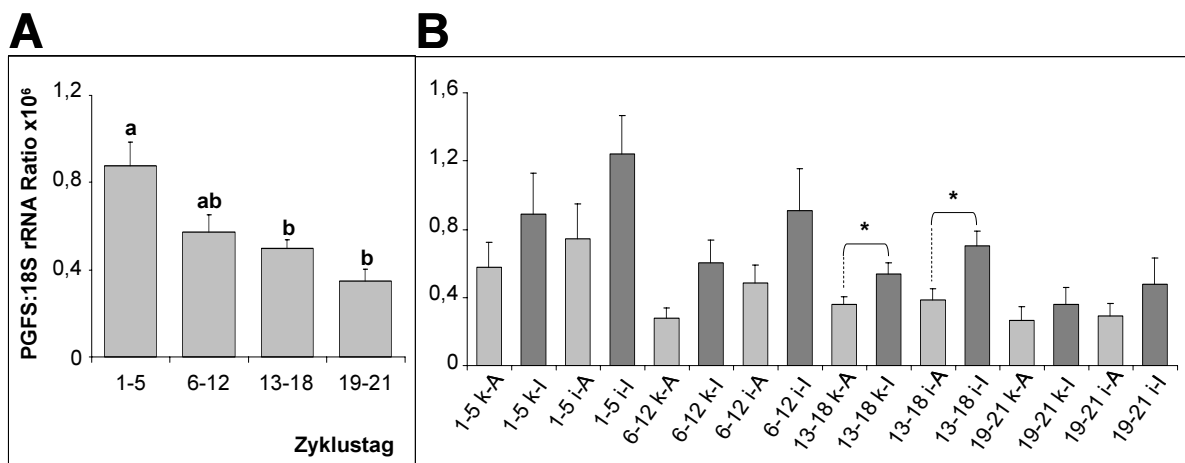


Abbildung 44: **PGFS mRNA Expression in den Oviduktzellen während des Zyklus ohne (A) und mit (B) Unterscheidung der verschiedenen Oviduktabschnitte.** Angegeben sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=7 Tiere). Unterschiedlich gekennzeichnete Werte sind signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ). Mit \* verbundene Werte sind signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ ). 1-5: postovulatorische Phase; 6-12: frühe Lutealphase; 13-18: späte Lutealphase; 19-21: präovulatorische Phase; k-A: kontralaterale Ampulle; k-I: kontralateraler Isthmus; i-A: ipsilaterale Ampulle; i-I: ipsilateraler Isthmus.

Zunächst lässt sich feststellen, dass PGFS mRNA in allen Oviduktabschnitten und in allen Zyklusphasen nachgewiesen wurde. Die PGFS mRNA Expression war im Ovidukt direkt nach der Ovulation am höchsten und nahm in den darauffolgenden Phasen kontinuierlich ab (Abbildung 44A). Direkt vor der Ovulation war der PGFS mRNA Gehalt am niedrigsten. Dieses Absinken der PGFS mRNA Konzentration von der post- zur präovulatorischen Phase erwies sich als signifikant. Bei Betrachtung der verschiedenen Oviduktabschnitte ist zu erkennen, dass die Expression in den Isthmusabschnitten in allen Zyklusphasen und Lokalisationen höher war als in den dazugehörigen Ampullenabschnitten (Abbildung 44B). Dieser Unterschied war jedoch nur in der späten Lutealphase sowohl ipsilateral als auch kontralateral signifikant. Werden die Werte von ipsi- und kontralateralen Ovidukten



zusammengefasst, zeigte sich, dass sich die Expression der PGFS mRNA in den Lutealphasen zwischen Isthmus- und Ampullenabschnitten signifikant unterschied (Abbildung 45).

PGFS wurde im Bereich von 0,8-4,6 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA exprimiert.

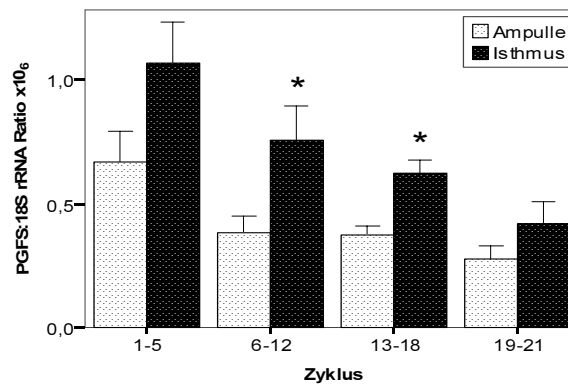


Abbildung 45: **PGFS mRNA Expression in den Oviduktzellen während des Zyklus ohne Unterscheidung zwischen ipsi- und kontralateraler Seite.** Angegeben sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=14 Tiere). Mit \* gekennzeichnete Ampullen sind signifikant ( $p < 0,05$ ) unterschiedlich zu den Isthmusabschnitten derselben Zyklusphase. 1-5: postovulatorische Phase; 6-12: frühe Lutealphase; 13-18: späte Lutealphase; 19-21: präovulatorische Phase.

Die PGFS mRNA wurde über den gesamten Versuchszeitraum in allen kultivierten Oviduktzellen nachgewiesen. Über den Versuchszeitraum unterlag die PGFS mRNA Konzentration unabhängig von ihrer Behandlung nur geringen Schwankungen. In Abbildung 46 ist zu erkennen, dass die PGFS mRNA Expression in den progesteron- oder östradiolbehandelten Zellen über die gesamte Versuchsdauer sehr konstant war. Die PGFS mRNA Expression in den unbehandelten Zellen war hingegen 2 und 4 Stunden nach Versuchsbeginn um 25% gesunken, erreichte aber nach 6 Stunden wieder das Ausgangsniveau. Trotz der nur sehr geringen Expressionsänderungen war die PGFS mRNA Expression in den progesteronbehandelten Zellen 4 Stunden nach Versuchsbeginn signifikant höher als in den unbehandelten Zellen. 6 Stunden nach Versuchsbeginn war die PGFS mRNA Expression in den östradiolbehandelten Zellen signifikant niedriger als in den unbehandelten Kontrollzellen.

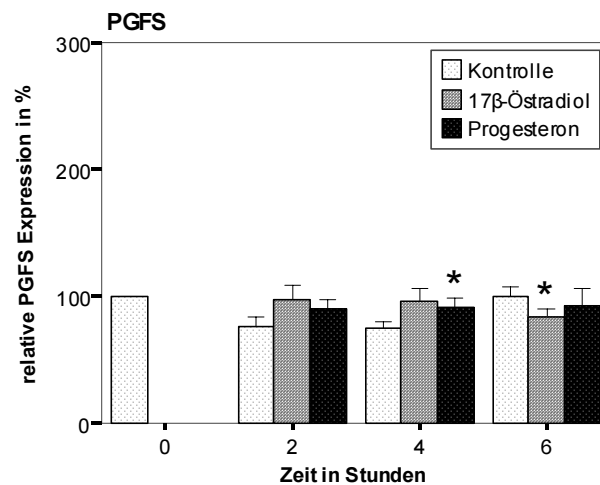


Abbildung 46: **PGFS mRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen nach Stimulierung mit 10 pg/ml 17β-Östradiol oder 10 ng/ml Progesteron.** Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM (n=6). Mit \* wurden die behandelten Gruppen gekennzeichnet, die sich signifikant von der Kontrollgruppe desselben Versuchszeitpunkts unterschieden (p<0,05).

PGFS mRNA wurde in allen kultivierten Oviduktzellen exprimiert. In Abbildung 47 ist zu erkennen, dass die Behandlung der bovinen Oviduktzellkultur mit Arachidonsäure oder PGE<sub>2</sub> weder zum Anstieg noch zum Abfall der PGFS mRNA Konzentration in den Zellen führte. Das Expressionsniveau blieb über den gesamten Versuchszeitraum relativ konstant.

Zwischen den PGFS mRNA Konzentrationen der kultivierten Oviduktzellen und der gespülten Oviduktzellen für die in vivo Untersuchungen wurden keine Unterschiede festgestellt.

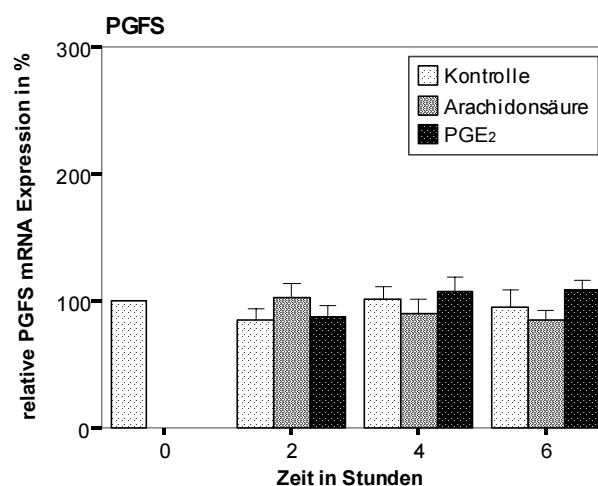


Abbildung 47: **PGFS mRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen nach Stimulierung mit 10 μM Arachidonsäure oder 0,25 μM PGE<sub>2</sub>.** Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM (n=6).

### 5.13 Hämatopoetische PGD<sub>2</sub>-Synthase (H-PGDS)

Die H-PGDS mRNA Expression zeigte eine deutliche Regulation über den Zyklusverlauf. Die H-PGDS mRNA Menge war in der späten Lutealphase 6-9fach niedriger als in den darauf folgenden prä- und postovulatorischen Phasen (Abbildung 48A). Dabei war die Expression in den Phasen um die Ovulation herum signifikant höher als in der späten Lutealphase. Nach Unterscheidung der verschiedenen Oviduktabschnitte ist besonders auffällig, dass H-PGDS im ipsilateralen Ovidukt in der späten Lutealphase nicht detektiert wurde (Abbildung 48B). Die höchste H-PGDS Expression wurde in der ipsilateralen Ampulle der postovulatorischen Phase gefunden, die Expression war hier signifikant höher als im ipsilateralen Isthmus derselben Zyklusphase.

H-PGDS wurde im Bereich von 0-0,54 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA exprimiert. Durch die Sequenzierung des PCR-Produkts konnte eine 99%ige Homologie mit der bekannten bovinen H-PGDS Sequenz (EMBL Nr.: XM\_865246) festgestellt werden.

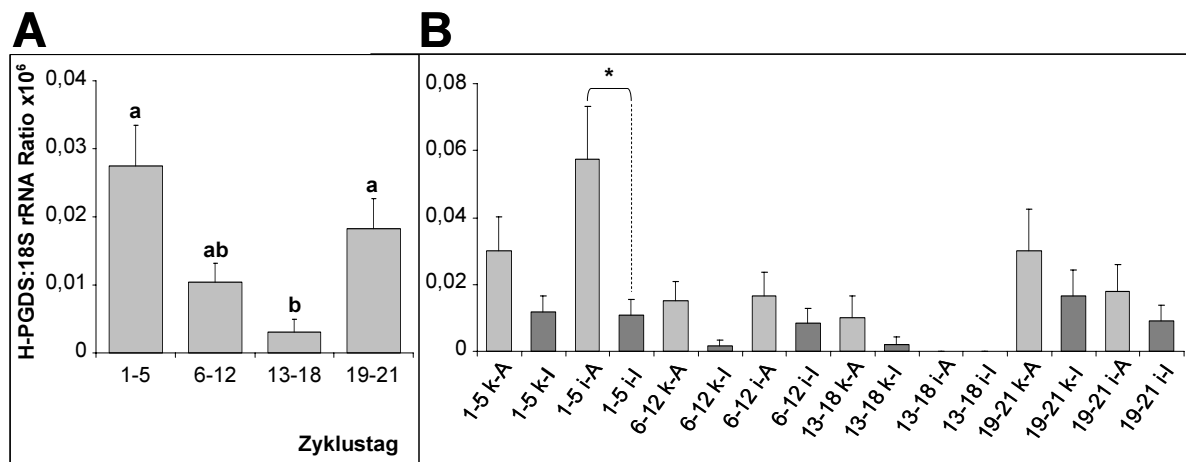


Abbildung 48: H-PGDS mRNA Expression in den Oviduktzellen während des Zyklus ohne (A) und mit (B) Unterscheidung der verschiedenen Oviduktabschnitte. Angegeben sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=7 Tiere). Unterschiedlich gekennzeichnete Werte sind signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ). Mit \* verbundene Werte sind signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ ). 1-5: postovulatorische Phase; 6-12: frühe Lutealphase; 13-18: späte Lutealphase; 19-21: präovulatorische Phase; k-A: kontralaterale Ampulle; k-I: kontralateraler Isthmus; i-A: ipsilaterale Ampulle; i-I: ipsilateraler Isthmus.

Die Zellkulturversuche zeigten, dass keine oder nur sehr geringe Mengen an H-PGDS mRNA in den kultivierten adhärennten Oviduktzellen vorkamen, auch nicht nach der Behandlung mit Östradiol, Progesteron, Arachidonsäure oder PGE<sub>2</sub> über 6 Stunden. Deshalb wurden weitere Verlaufsversuche durchgeführt bei denen die bovinen Oviduktzellen über einen Zeitraum von 8, 24 oder 96 Stunden kultiviert wurden. Die Gesamt-RNA wurde zu den entsprechenden Zeitpunkten aus den Zellen gewonnen und die spezifische H-PGDS mRNA Menge mittels Real-Time-RT-PCR bestimmt. Die H-PGDS mRNA Expression reduzierte sich im Verlauf der Kultivierung über 96 Stunden auf weniger als 5% der Menge, die in den nur 8 Stunden lang kultivierten Suspensionskulturen gemessen wurde (Abbildung 49). Die H-

PGDS mRNA ist also nach 96 stündiger Kultivierung der bovinen Oviduktzellen nicht oder fast nicht mehr messbar.

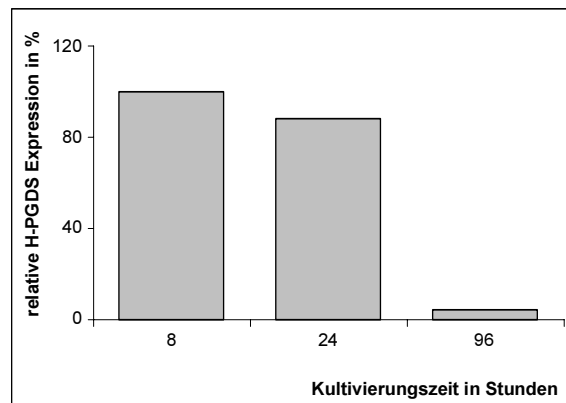


Abbildung 49: **H-PGDS mRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen über einen Zeitraum von 96 Stunden.** Angegeben sind die Mittelwerte der relativen mRNA Expressionen zu den Zeitpunkten 8, 24 und 96 Stunden (n=6).

### 5.14 Lipocalintyp PGD<sub>2</sub>-Synthase (L-PGDS)

L-PGDS mRNA wurde in allen Oviduktabschnitten und allen Zyklusphasen detektiert. Dabei zeigte sich, dass in der späten Lutealphase und der präovulatorischen Phase die L-PGDS mRNA Konzentration etwa 2-3mal höher war als in der postovulatorischen Phase (Abbildung 50A). Unter Betrachtung der einzelnen Oviduktabschnitte ist zu erkennen, dass die L-PGDS mRNA Menge über den kompletten Zyklus in der Ampulle 3-12fach höher ist als in dem entsprechenden Isthmus (Abbildung 50B). Die Expressionsunterschiede zwischen Ampulle und Isthmus waren bis auf zwei Ausnahmen (ipsilaterales Ovidukt in der frühen Lutealphase und kontralaterales Ovidukt der späten Lutealphase) jeweils signifikant unterschiedlich.

L-PGDS wurde im Bereich von 18-460 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA exprimiert. Die Sequenzierung des PCR-Produkts zeigte eine 100%ige Homologie mit der bekannten bovinen L-PGDS Sequenz (EMBL Nr.: AB004647).

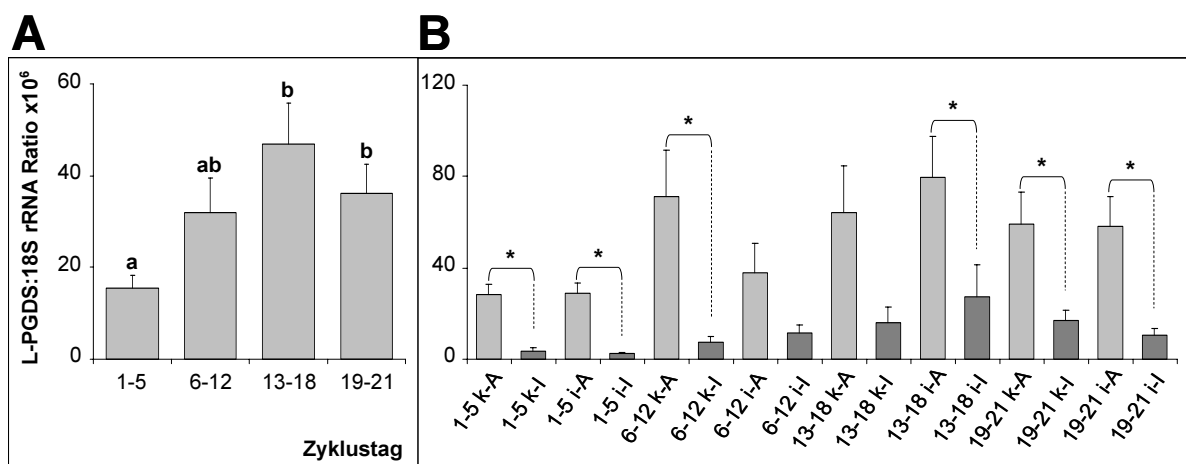


Abbildung 50: **L-PGDS mRNA Expression in den Oviduktzellen während des Zyklus ohne (A) und mit (B) Unterscheidung der verschiedenen Oviduktabschnitte.** Angegeben sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=7 Tiere). Unterschiedlich gekennzeichnete Werte sind signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ). Mit \* verbundene Werte sind signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ ). 1-5: postovulatorische Phase; 6-12: frühe Lutealphase; 13-18: späte Lutealphase; 19-21: präovulatorische Phase; k-A: kontralaterale Ampulle; k-I: kontralateraler Isthmus; i-A: ipsilaterale Ampulle; i-I: ipsilateraler Isthmus.

L-PGDS mRNA wurde über den gesamten Versuchszeitraum in allen kultivierten Oviduktzellen nachgewiesen. Die L-PGDS mRNA Konzentration nahm im Versuchsverlauf in den unbehandelten Zellen leicht zu. Die Zellen, die mit Östradiol behandelt wurden, zeigten 2 und 4 Stunden nach Behandlungsbeginn eine jeweils 20% und 35% höhere L-PGDS mRNA Expression als die unbehandelten Kontrollen zum selben Zeitpunkt (Abbildung 51). Dieser Unterschied war signifikant. Die progesteronbehandelten Zellen zeigten zu denselben Zeitpunkten keine Expressionsunterschiede.

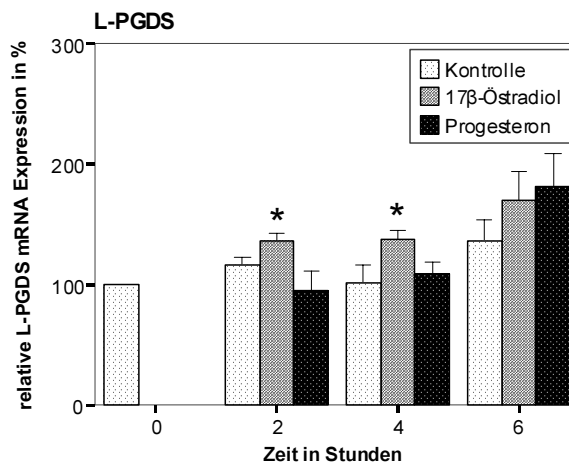


Abbildung 51: **L-PGDS mRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen nach Stimulierung mit 10 pg/ml 17β-Östradiol oder 10 ng/ml Progesteron.** Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM (n=6). Mit \* wurden die behandelten Gruppen gekennzeichnet, die sich signifikant von der Kontrollgruppe desselben Versuchszeitpunkts unterschieden ( $p < 0,05$ ).

In Abbildung 52 ist dargestellt, dass die mit Arachidonsäure behandelten Zellen nach 2 und 6 Stunden eine um jeweils 10 und 25% signifikant höhere L-PGDS mRNA Expression als die unbehandelten Kontrollen zum selben Zeitpunkt aufwiesen. Die PGE<sub>2</sub>-Behandlung der kultivierten Oviduktzellen führte nach 2 Stunden zu einer vorübergehenden signifikanten Abnahme der L-PGDS mRNA Expression. Gegenüber den unbehandelten Zellen war die L-PGDS mRNA Expression in den PGE<sub>2</sub>-behandelten Zellen durchschnittlich 30% niedriger. Die L-PGDS mRNA Menge war in den kultivierten bovinen Oviduktzellen 5-10mal geringer als in den gespülten Oviduktzellen für die in vivo Untersuchungen.

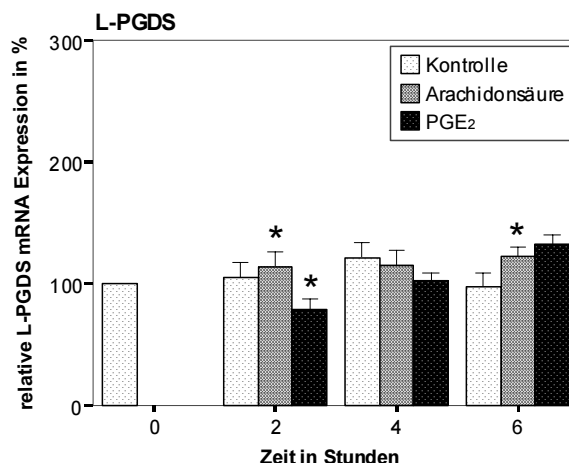


Abbildung 52: **L-PGDS mRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen nach Stimulierung mit 10 μM Arachidonsäure oder 0,25 μM PGE<sub>2</sub>.** Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM (n=6). Mit \* wurden die behandelten Gruppen gekennzeichnet, die sich signifikant von der Kontrollgruppe desselben Versuchszeitpunkts unterschieden ( $p < 0,05$ ).

### 5.15 PGI<sub>2</sub>-Synthase (PGIS)

PGIS mRNA wurde in allen Oviduktabschnitten nachgewiesen wie in Abbildung 53 dargestellt. Die PGIS mRNA wurde von der postovulatorischen bis zur späten Lutealphase relativ konstant exprimiert. Erst in der präovulatorischen Phase stieg die PGIS mRNA Expression signifikant an und war dann etwa 50% höher als in den anderen Zyklusphasen. Bei Betrachtung der verschiedenen Oviduktabschnitte ist zu erkennen, dass die durchschnittliche PGIS mRNA Menge in den Ampullen stets höher war als in den Isthmen. Dieser 2-4fache Unterschied ist in der prä- und post-ovulatorischen Phase signifikant.

PGIS wurde im Bereich von 16-80 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA exprimiert. Durch die Sequenzierung des PCR-Produkts konnte eine 99%ige Homologie mit der bekannten bovinen PGIS Sequenz (EMBL Nr.: L34208) festgestellt werden.

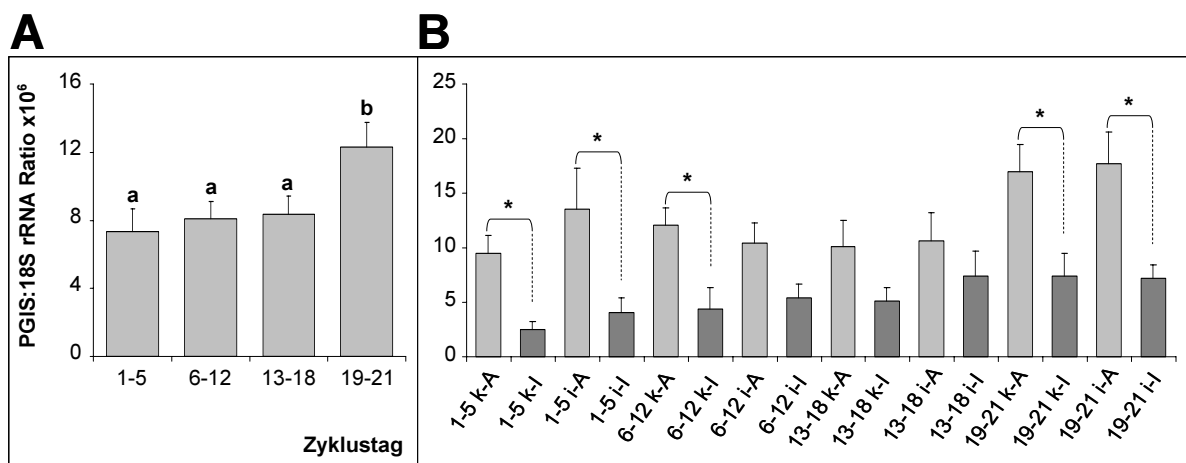


Abbildung 53: **PGIS mRNA Expression in den Oviduktzellen während des Zyklus ohne (A) und mit (B) Unterscheidung der verschiedenen Oviduktabschnitte.** Angegeben sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=7 Tiere). Unterschiedlich gekennzeichnete Werte sind signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ). Mit \* verbundene Werte sind signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ ). 1-5: postovulatorische Phase; 6-12: frühe Lutealphase; 13-18: späte Lutealphase; 19-21: präovulatorische Phase; k-A: kontralaterale Ampulle; k-I: kontralateraler Isthmus; i-A: ipsilaterale Ampulle; i-I: ipsilateraler Isthmus.

PGIS mRNA wurde über den gesamten Versuchszeitraum in allen kultivierten Oviduktzellen nachgewiesen. Die PGIS mRNA Konzentrationen liessen sowohl zwischen den verschiedenen Tieren, aber auch zwischen den Zellen ein und desselben Tieres und derselben Behandlungsform sehr große Schwankungen erkennen. Aufgrund der sehr inhomogenen PGIS mRNA Expressionsdaten sind hier keine signifikanten Veränderungen der Expressionsmengen in behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu erkennen (Abbildung 54).

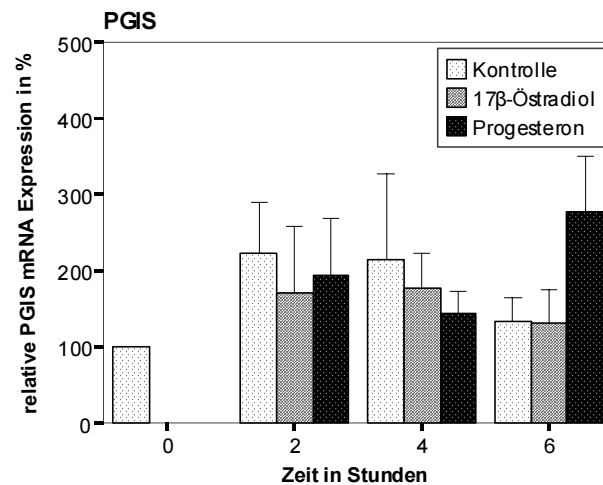


Abbildung 54: **PGIS mRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen nach Stimulierung mit 10 pg/ml 17β-Östradiol oder 10 ng/ml Progesteron.** Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM (n=6). Mit \* wurden die behandelten Gruppen gekennzeichnet, die sich signifikant von der Kontrollgruppe desselben Versuchszeitpunkts unterschieden ( $p < 0,05$ ).

Wie in Abbildung 55 zu erkennen ist, führte die Behandlung mit PGE<sub>2</sub> zu einem signifikanten Anstieg der PGIS mRNA in den kultivierten bovinen Oviduktzellen. Die Zunahme erfolgte kontinuierlich und war nach 4 Stunden etwa 60% und nach 6 Stunden bereits über 80% höher als in den unbehandelten Zellen desselben Zeitpunkts. Die Behandlung der Oviduktzellen mit Arachidonsäure führte dagegen zu keinen signifikanten Veränderungen der PGIS mRNA Konzentration verglichen mit den unbehandelten Kontrollen.

Die Expressionsleistung der PGIS mRNA war in den kultivierten bovinen Oviduktzellen 100fach niedriger als in den gespülten Oviduktzellen für die in vivo Untersuchungen.

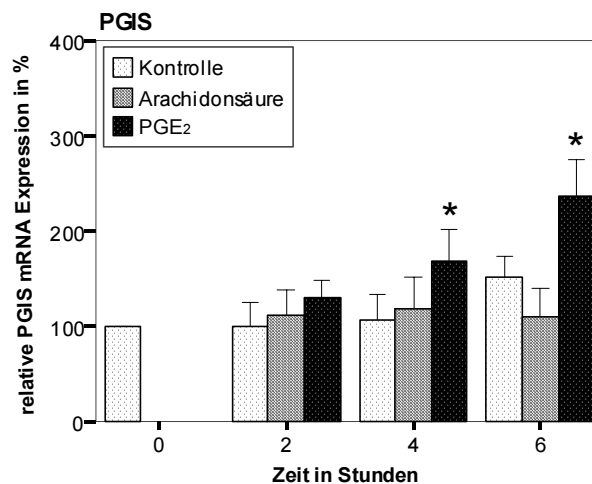


Abbildung 55: **PGIS mRNA Expression in kultivierten Oviduktzellen nach Stimulierung mit 10 μM Arachidonsäure oder 0,25 μM PGE<sub>2</sub>.** Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM (n=6). Mit \* wurden die behandelten Gruppen gekennzeichnet, die sich signifikant von der Kontrollgruppe desselben Versuchszeitpunkts unterschieden ( $p < 0,05$ ).