

Aus dem Institut für Tierzucht der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie
(Vorstand: Prof. Dr. E. Wolf)

**Systematische Analyse zyklusabhängiger Veränderungen
des Transkriptoms im bovinen Eileiterepithel**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Susanne Cornelia Nicole Rehfeld
aus Nürnberg

München 2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. E. Wolf
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. H. Zerbe

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

Für Steffen

Am Anfang jeder Forschung steht das Staunen.
Plötzlich fällt einem etwas auf.

Wolfgang Wickler (*1931)
dt. Verhaltensforscher und Zoologe

Aus dieser Arbeit ging folgende Publikation hervor:

Monitoring gene expression changes in bovine oviduct epithelial cells during the oestrous cycle

S. Bauersachs, S. Rehfeld, S. E. Ulbrich, S. Mallok, K. Prella, H. Wenigerkind,

R. Einspanier, H. Blum, E. Wolf

Journal of Molecular Endocrinology April 2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literatur	4
2.1	Anatomie und Histologie des Eileiters	4
2.1.1	Anatomie	4
2.1.2	Histologie	5
2.2	Der Sexualzyklus beim Rind	8
2.2.1	Spezielle histologische Veränderungen des Eileiters im Zyklusverlauf	11
2.2.2	Spezielle Veränderungen der Eileitermotilität im Zyklusverlauf	11
2.3	Funktion des Eileiters im Reproduktionsgeschehen	13
2.3.1	Eiauffangmechanismus	13
2.3.2	Spermienreservoir	13
2.3.3	Kapazitation	15
2.3.4	Transport der Gameten und des Embryos	15
2.3.5	Frühe Embryonalentwicklung	17
2.4	Änderungen auf molekularer Ebene im Zyklusverlauf	17
2.5	Eine Kombination aus subtraktiven cDNA-Bibliotheken und cDNA-Array-Hybridisierung als Strategie zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene	21
3	Zielsetzung	25
4	Material und Methoden	27
4.1	Material	27
4.1.1	Geräte	27
	Gelelektrophorese-Apparaturen	28
	PCR Geräte	28
	Hybridisierungsöfen	28
	Zentrifugen	28
4.1.2	Chemikalien	28
4.1.3	Lösungen und Reagenzien	29
	Medien	29
	Lösungen und Puffer	29
	Wasser	30
	Reagenzien und Enzyme	30
4.1.4	Sonstiges Material	30
	Verwendete Software	31
4.1.5	Oligonukleotide	31
	Oligonukleotide für Sequenzierung und Kolonie PCR	31
	Oligonukleotide für die subtraktive Hybridisierung (Suppression Subtractive Hybridisation (SSH)) und cDNA-Array-Hybridisierung	31
	Primer-Paare für die Real-time RT-PCR	32
4.1.6	DNA-Molekulargewichtsstandards	32
	Molekulargewichtstandards für DNA:	32
4.1.7	Radiochemikalien	32
4.1.8	Versuchstiere	33
4.2	Methoden	33
4.2.1	Auswahl und Zyklussynchronisation der Tiere	33
4.2.2	Probenentnahme	36
	Schlachtung der Tiere	36
	Eileiterpräparation	36
	Probengewinnung	38
	Probennomenklatur	39

4.2.3	Agarosegelelektrophorese, allgemein	40
4.2.4	Isolierung von RNA	41
4.2.5	cDNA-Synthese.....	42
	RNA-Probenvorbereitung:	42
	Erststrangsynthese:	43
	Zweitstrangsynthese:	43
	Abbau der ribosomalen RNA:	44
	Reinigung der cDNA:	44
4.2.6	Erstellen von cDNA-Arrays	44
	Bakterienkulturen für die Kolonie-PCR.....	44
	Amplifizierung der cDNA-Fragmente aus den Bakteriensuspensionen	45
	Agarosegelelektrophorese der PCR-Reaktionen	46
	Vorbereitung der 384-well-Platten:	47
	Vorbereitung der Membranen	47
	Spotten der Arrays.....	47
	Denaturierung und Fixierung der Proben auf den Membranen.....	48
4.2.7	Array Hybridisierung	49
	Vorhybridisierung der Membranen:	49
	Radioaktive Markierung der cDNA	49
	Hybridisierung der Membranen	50
	Waschen der Membranen.....	51
	Optimierung der Arrays	51
4.2.8	Analyse der Array Daten.....	51
4.2.9	Sequenzierung und Identifizierung von auffälligen cDNA Fragmenten	53
	Mikrodialyse der cDNAs	53
	Sequenzierung der cDNAs	53
	Auswertung der DNA-Sequenzen	54
4.2.10	Erstellung eines Ovidukt-Arrays.....	54
	Auswahl der verwendeten cDNAs	54
	Herstellung des Arrays	54
4.2.11	Array Hybridisierungen mit dem Ovidukt-Array.....	55
4.2.12	Analyse und Weiterbearbeitung der Daten aus den Hybridisierungen des Ovidukt-Arrays.....	55
5	Ergebnisse	57
5.1	Tierprotokoll.....	57
5.2	Probenentnahme	59
5.3	Isolierung von RNA	60
5.4	Synthese von cDNA	61
5.5	Herstellung der Arrays aus den subtraktiven Banken	63
5.6	Vergleich Östrus-Diöstrus	65
5.7	Validierung der Ergebnisse durch quantitative Real-time RT-PCR	75
5.8	Der Vergleich von Ampulle und Isthmus getrennt zu vier Zykluszeitpunkten mit dem Ovidukt-Array	77
5.9	<i>In situ</i> -Hybridisierung	120
5.10	Analyse von AGR2 auf Proteinebene	122
6	Diskussion	125
	Analyse der subtraktiven cDNA-Bibliotheken	125
	Validierung durch quantitative Real-time RT-PCR.....	125
	Untersuchungen mit dem Ovidukt-Array.....	127
	Gene Ontology-Klassifizierung zur Identifizierung regulierter biologischer Prozesse und molekularer Funktionen	127

Funktion ausgewählter Gene und mögliche Zusammenhänge ihrer Rolle im	
Eileiter	128
Ovidukt-spezifisches Glykoprotein (OVGP1)	128
Gastrin-releasing Peptide	130
Komplement-Komponente C3	131
Tumor Rejection Antigen 1 (TRA1)	132
Heat shock protein A5 (HSPA5), DNAJB11, EDEM, P5	134
Matrix Gla Protein (MGP)	136
Anterior Gradient Homologue 2 (AGR2)	137
Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4 (HCN4)	138
7 Zusammenfassung	140
8 Summary	142
9 Abkürzungsverzeichnis	144
10 Abbildungsverzeichnis	147
11 Tabellenverzeichnis	148
12 Literaturverzeichnis	149
13 Danksagung	158
Lebenslauf	160

1 Einleitung

Die Fruchtbarkeit konnte in der Zuchtarbeit bislang nur wenig berücksichtigt werden, da entsprechende funktionale Selektionsparameter fehlen. Daher ist es notwendig, reproduktionsbiologische Mechanismen auf molekularer Ebene systematisch zu untersuchen. Neben den zyklischen Veränderungen am Eierstock sind vor allem auch die spezifischen Funktionen der unterschiedlichen Zellpopulationen im Eileiter und im Uterus interessant. Speziell der Eileiter hat in diesem Kontext eine herausragende Bedeutung. Hier finden der Transport der Gameten, die Kapazitation der Spermien, die Reifung der Eizelle, die Befruchtung und die früheste Phase der Embryonalentwicklung statt (Leese et al. 2001). Die Eileiterepithelzellen sind die ersten Zellen, die Kontakt mit der Eizelle und dem frühen Embryo haben. Das Eileiterepithel unterliegt während des Geschlechtszyklus unterschiedlichsten morphologischen und funktionellen Veränderungen, die mit Veränderungen des Genexpressionsprofils einhergehen. Einige Daten zur Eileiterphysiologie im Zyklusverlauf sind bereits bekannt. So ist aus intensiven histologischen Studien bereits einiges über die umfangreichen Veränderungen der Epithelzellen im Eileiter während eines Geschlechtszyklus bekannt. Es wurde beobachtet, dass im Proöstrus und Östrus vor allem sekretorisch aktive Zellen dominieren, wohingegen im Diöstrus das histologische Bild vor allem von zilienträgenden Zellen geprägt wird (Yaniz et al. 2000d). Eine neuere Studie lässt vermuten, dass die individuellen Epithelzellen ihren funktionellen Status ändern, und nicht wie bisher angenommen, eine Erneuerung der gesamten Zellpopulation stattfindet (Suuroia et al. 2002).

In der Ampulle des Eileiters finden die Maturation der Eizelle sowie die Befruchtung statt, wohingegen der kaudale Teil des Isthmus als Spermienreservoir fungiert. Die Spermien haften an das Epithel an und werden durch Interaktionen mit dem Eileiterepithel in ihrer Motilität gehemmt, wodurch sie ihre limitierten Energiereserven sparen. Kurz vor der Ovulation kommt es zu einer wieder einsetzenden Motilität und Aktivität der Spermien; sie lösen sich von den Epithelzellen und können zum für die Befruchtung perfekten Zeitpunkt in der Ampulle nachgewiesen werden (Hunter & Wilmut 1984). Bei Ratten wurde nach künstlicher Besamung eine zyklusabhängig unterschiedliche Spermienkonzentration im Eileiter nachgewiesen, was unter anderem auf spezifische Änderungen der Eileiter- und Uterusmotilität und des biochemischen Milieus zurückgeführt wurde (Orihuela et al. 1999). Eine ähnliche Beobachtung konnte auch bei Rindern gemacht werden, bei denen die

Eileitermotilität im ipsilateralen Ovidukt zum Zeitpunkt des Östrus am größten war (Bennett et al. 1988c). Nach der Befruchtung finden die ersten Phasen der Embryonalentwicklung bis zum 8-Zell-Stadium im Eileiter statt, und auch hier hat das Eileiterepithel offensichtlich durch das von ihm geschaffene Milieu eine positive Wirkung auf die Entwicklung des frühen Embryos (Sirard et al. 1985a).

Es wurden in den vergangenen Jahren vermehrt molekulare Faktoren untersucht, die von Eileiterepithelzellen sezerniert werden; vor allem im Hinblick auf Verbesserungsmöglichkeiten der *in vitro* Produktion von qualitativ hochwertigen Embryonen für Forschung und Reproduktion (Choi et al. 1998). Meist fehlte aber auch hier eine Untersuchung des Genexpressionsmusters im Zyklusverlauf. Erkenntnisse über Genexpressionsveränderungen können erste Hinweise auf die mögliche Rolle identifizierter Faktoren im Reproduktionsgeschehen liefern. Einzelne reproduktionsbiologisch relevante Parameter wurden bereits vermehrt mit dem Schwerpunkt auf einer eventuellen Zyklusregulation von verschiedenen Arbeitsgruppen analysiert, wie z.B. das IGF-System (Insuline-like-Growth-Faktor System) (Pushpakumara et al. 2002). Das Protein, das den größten Anteil der vom Eileiterepithel sekretierten Proteine ausmacht, ist das bovine Ovidukt-spezifische Glykoprotein (OVGP1) (Boice *et al.* 1990). Für dieses Protein wurde beschrieben, dass es eine positive Wirkung auf die Spermienkapazitation und -motilität, die Interaktion der Gameten und die Fertilisation hat (Buhi 2002). Die Expression dieses Glykoproteins ist Östrogen-abhängig mit der höchsten Konzentration im Östrus und der niedrigsten Konzentration in der Lutealphase. Sogar leichte Unterschiede in der mRNA-Konzentration des OVGP1-Gens zwischen ipsilateralem und kontralateralem Eileiter in der postovulatorischen Phase sind bereits bekannt (Bauersachs et al. 2003i; Bauersachs et al. 2003h). Die Produktion einer Null-Mutation des *ovgp1*-Gens in einer Studie bei Mäusen zeigte jedoch, dass die Fertilität von *ovgp1*^{-/-} Weibchen im normalen Rahmen lag. Das beweist, dass OVGP1 zumindest in der Maus nicht essentiell für die Reproduktion ist (Araki *et al.* 2003). Trotz all dieser Anstrengungen, die in den letzten Jahren unternommen wurden, sind auf molekularer Ebene nach wie vor nur wenige Gene oder Proteine bekannt, die sich in Aktivität oder Abundanz während des Sexualzyklus ändern, und die möglicherweise wichtig sind für Befruchtung und Fertilität.

Kurz vor Beginn dieser Doktorarbeit wurde eine erste systematische Analyse der Genexpression in bovinen Eileiterepithelzellen an Tag 3,5 des Sexualzyklus durchgeführt, in der die ipsilaterale mit der kontralateralen Seite verglichen wurde (Bauersachs et al. 2003g). Für diese Untersuchung wurde erfolgreich eine Kombination von subtraktiven cDNA-

Bibliotheken und cDNA-Array-Hybridisierung verwendet, um cDNAs von differenziell exprimierten Genen im ipsilateralen versus kontralateralen Eileiter zu identifizieren. In dieser Studie wurde gezeigt, dass sich diese Technik sehr gut eignet, um einen Überblick über die verschiedensten Veränderungen der Genexpression auf der Ebene der mRNA in einem Gewebe zu erhalten. Dieser experimentale Ansatz wurde auch im Rahmen dieses Dissertations-Projektes mit dem Ziel angewendet, einen holistischen Einblick in die molekularbiologischen Vorgänge im Eileiterepithel im Zyklusverlauf zu gewinnen.

2 Literatur

2.1 Anatomie und Histologie des Eileiters

2.1.1 Anatomie

Der Eileiter, *Tuba uterina*, ist ein häutig-muskulöser Schlauch, dessen Aufgaben darin bestehen, die Eizelle nach der Ovulation aufzunehmen, die Umgebung für die Maturation der Gameten sowie für die Befruchtung bereit zu stellen und anschließend den frühen Embryo zum Uterus zu transportieren, welchem er auf dem Weg dorthin das optimale Milieu für die ersten Reifeteilungen bietet. Das paarige Organ befindet sich mit der Gebärmutter, *Uterus*, und den Eierstöcken, *Ovarien*, in der Beckenhöhle, *Cavum pelvis*. Der weibliche Reproduktionstrakt reicht je nach Alter des Tieres und je nach individueller Größe der Geschlechtsorgane unterschiedlich weit in die Bauchhöhle, *Cavum abdominis*, hinein. Am Eileiter können sowohl morphologisch als auch funktionell drei Abschnitte unterschieden werden: Der eierstockseitig trichterförmig erweiterte Anfang, das *Infundibulum tubae uterinae*, der weite Mittelteil, die *Ampulla tubae uterinae*, und der sehr enge Endabschnitt, welcher in den Uterus mündet, der *Isthmus tubae uterinae*. Der Isthmus ist der längste Abschnitt des Eileiters, viel länger als der Abstand zwischen Uterus und Ovar beträgt. Aus diesem Grund beschreibt er zahlreiche Windungen auf dem Weg vom Ovar zu seiner Ansatzstelle am Uterus. Das Infundibulum geht mit dem *Ostium abdominale tubae uterinae* in die Ampulla über und der Isthmus mündet mit dem *Ostium uterinum tubae* in die Gebärmutter. Das Infundibulum trägt bereits makroskopisch deutlich sichtbare Eileiterfransen, *Fimbriae tubae*, die teilweise mit dem Ovar verwachsen sein können und dann *Fimbriae ovaricae* genannt werden. Der Fimbrientrichter ist beim Rind so groß, dass er das Ovar vollständig umfassen kann (Schummer & Vollmerhaus 1995).

Den Aufhängeapparat des Eileiters stellt ausschließlich das schleierartig dünne Eileitergekröse, *Mesosalpinx*, dar. Es handelt sich hierbei um eine Serosafalte, die aus der lateralen Fläche des *Mesovariums* abzweigt. Die *Mesosalpinx* bildet gemeinsam mit dem *Ligamentum ovarii proprium*, dem *Mesovarium* und dem Ovar die Eierstocktasche, *Bursa*

ovarica. Die *Mesosalpinx* umhüllt das Ovar von kranial und lateral, und lässt das Ovar vollständig in der *Bursa ovarica* verschwinden (Schummer & Vollmerhaus 1995).

Vaskularisiert wird der Eileiter vom *Ramus tubarius* der *Arteria ovarica*, die aus der *Aorta abdominalis* entspringt. Der *Ramus tubarius* verläuft mit mehreren geschlängelten Ästen in der *Mesosalpinx*. Für den venösen Abfluss sorgt der *Ramus tubarius* der *Vena ovarica*. Die *Vena ovarica* ist um ein Vielfaches stärker als die *Arteria ovarica*. Die *Vena ovarica dextra* entspringt aus der *Vena cava caudalis* und die *Vena ovarica sinistra* entspringt aus der *Vena iliaca communis* (Waibl et al. 1996). Die dünnere *Arteria ovarica* schlängelt sich um die dickere *Vena ovarica* und im weiteren Verlauf um die *Vena uterina*, wobei es durch den engen Kontakt der beiden Blutgefäße zum Stoffaustausch kommen kann (Rüsse & Sinowatz 1991).

2.1.2 Histologie

Die Wand des Eileiters besteht aus folgenden drei Schichten: der *Tunica mucosa*, der *Tunica muscularis* und der *Tunica serosa*. Da der Eileiter subperitoneal gelegen ist, ist er von Serosaepithel überzogen, der *Tunica serosa*. Die Serosa liegt einer Schicht aus subserösem Bindegewebe auf und geht an den freien Enden des Infundibulums in das Eileiterepithel über. In der Subserosa verlaufen neben Blutgefäßen auch subperitoneale Muskelfaserschichten. Sie bestehen aus einem kranialen Längszug und einem Netzwerk aus schrägen Muskelsträngen. Sie sind für die Motilität des Eileiters wichtig, vor allem im Hinblick auf die Eiaufnahme durch das Infundibulum nach der Ovulation. (Hees & Sinowatz 1992), Die tubeneigene Muskulatur liegt in der *Tunica muscularis*. Sie besteht aus zwei Schichten glatter Muskelzellen, die sich gegenläufig, spiralig um den Eileiter winden. Auch in dieser Schicht finden sich Bindegewebe und Blutgefäße. Die Kontraktion dieser Muskelschichten verläuft in peristaltischen Wellen, wodurch der Eileiterinhalt Richtung Uterus transportiert wird. Damit unterstützt die *Tunica muscularis* mit ihrer Aktivität die Kinozilien des Eileiterepithels. (Hees & Sinowatz 1992) Seite 270f

Die *Tunica mucosa* besteht aus einem einschichtigen, hochprismatischen, zilientragenden Epithel und einer *Lamina propria* die aus lockerem, feinfaserigem Bindegewebe besteht. (Hees & Sinowatz 1992) Seite 270. Die innere Oberfläche des Ovidukts wird durch primäre und sekundäre Falten vergrößert. Diesen Falten sitzen die Epithelzellen auf. Die primären Falten verlaufen in longitudinaler Richtung, während sich die sekundären tief ins Eileiterlumen erstrecken und sich dort weiter aufzweigen. Die Höhe und Komplexität der Falten ist im Infundibulum am größten und nimmt Richtung Isthmus bzw. zum utero-tubarem

Übergang hin ab. Auch die Komplexität der Falten und Taschen zwischen den Hauptfältelungen des Eileiters nimmt vom Infundibulum zum Isthmus ab. Die gebildeten Taschen sind im Infundibulum und im kranialen Teil der Ampulle Richtung Ovar geöffnet, wohingegen sie im Isthmus und in der kaudalen Ampulle Richtung Uterus geöffnet sind. Die Anordnung der Falten im Isthmus weist Richtung Peripherie, im Übergang zwischen Ampulle und Isthmus sowie in der kaudalen Ampulle weist die Faltenanordnung wieder Richtung Lumen. Grundsätzlich besteht das Epithel im oberen, lumenzugewandten Teil der Falten hauptsächlich aus zilientragenden Zellen, wohingegen weiter zum basalen Bereich der Falten, und damit zur Peripherie hin, die sekretorisch aktiven Zellen zunehmen. Sekretorisch aktive Zellen sind vor allem basal an den Falten und in den Taschen zu finden. Da die Tiefe der Taschen und Falten Richtung Uterus abnimmt, wird auch die Zahl an sekretorisch tätigen Zellen vom Infundibulum zum Isthmus geringer. Die höchste Dichte an zilientragenden Zellen findet sich auf den hohen, stark hervorragenden Falten im Infundibulum (Yaniz et al. 2000e).

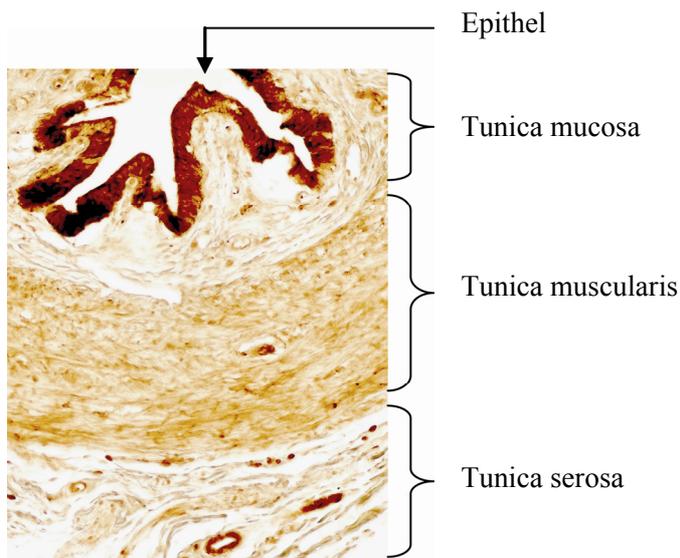


Abbildung 1: Lichtmikroskopisches Bild des Eileiters

Es handelt sich bei diesem Bild um ein *in situ*-Bild für die mRNA für TRA1. Es eignet sich hervorragend um die einzelnen Eileiterschichten darzustellen. Außen (im Bild unten) ist die *Tunica serosa* gelegen, die aus Bindegewebe, Muskelfasern, Nerven und Blutgefäßen besteht. In der Mitte (in der Bildmitte) befindet sich die *Tunica muscularis*, die aus der tubeneigenen Muskulatur besteht. Das Lumen begrenzend liegt die *Tunica mucosa* (im Bild oben). Sie besteht aus dem Epithel (im Bild sehr dunkel gefärbt) und der Lamina propria (im Bild sehr hell gefärbt) der bindegewebigen Unterlage des Epithels.

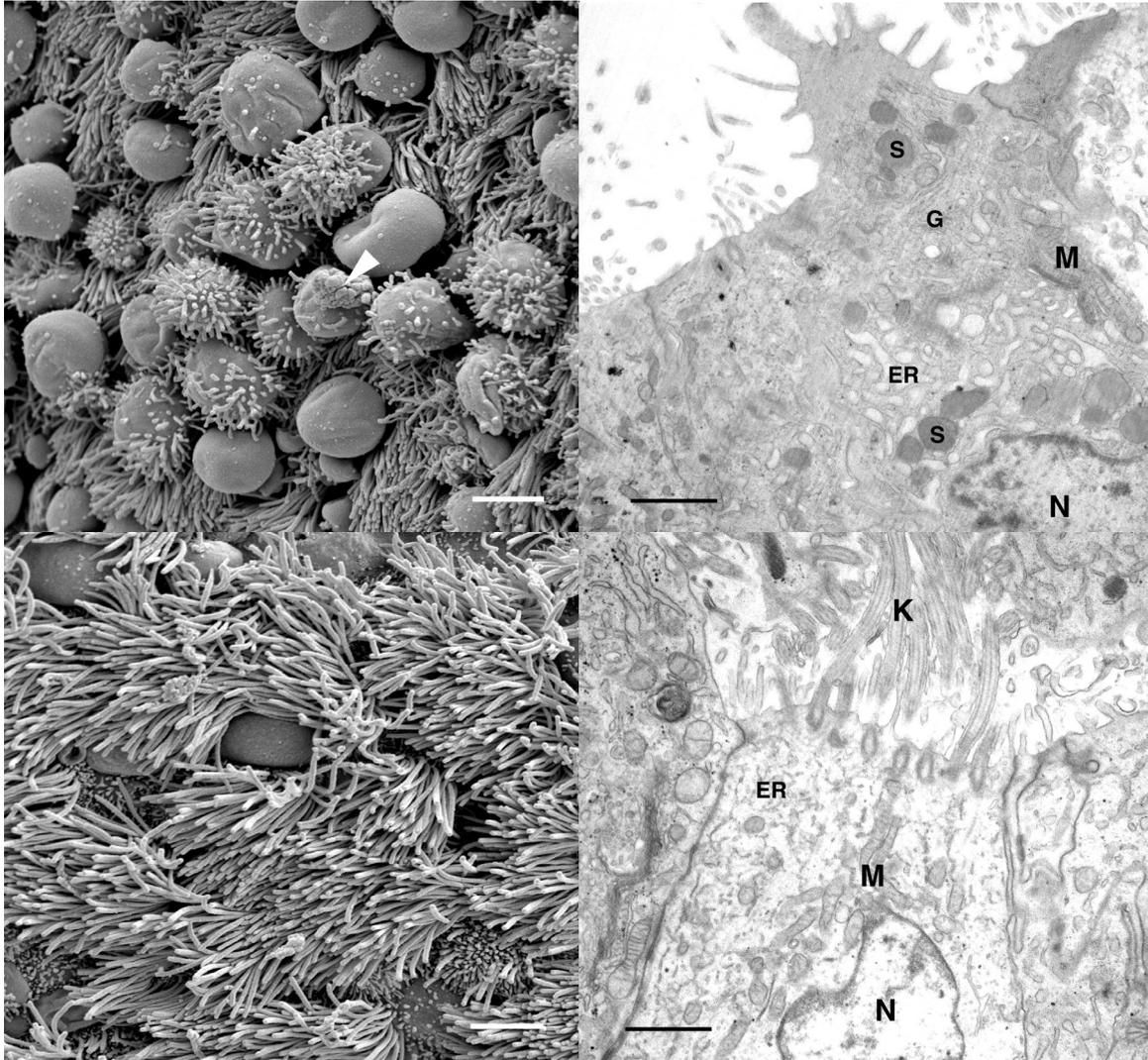


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Eileiterepithel aus der Ampulle
 oben: Eileiterepithel im Östrus; unten: Eileiterepithel im Diöstrus; linke Seite: Raster-
 elektronenmikroskopische Aufnahmen, rechte Seite: Transmissions-elektronenmikroskopische
 Aufnahmen; ER: Endoplasmatisches Retikulum, G: Golgi Apparat, K: Kinozilien, M:
 Mitochondrien, N: Nucleus, S: sekretorische Granula; Im Östrus (obere Bildreihe) besteht das
 Epithel der Ampulle aus sekretorischen und zilierttragenden Zellen. Die sekretorischen Zellen
 wölben sich stark über die Oberfläche des Epithels hinaus und Sekretion kann häufig beobachtet
 werden (Pfeil). Im Zytoplasma der sekretorischen Zellen finden sich zahlreiche sekretorische
 Granula und ein hochaktives ER und Golgi Apparat. Im Diöstrus (untere Reihe) bestimmen
 zilierttragende Zellen das histologische Bild. Im Zytoplasma dieser Zellen finden sich viele aktive
 Mitochondrien.

Diese Bilder stammen aus dem Lehrstuhl für Tieranatomie der tiermedizinischen Fakultät der
 LMU-München.



Abbildung 3: schematische Schnitte durch den Eileiter:

a+d: Isthmus; b+e: Übergang zwischen Ampulle und Isthmus; c+f: Ampulle (Yaniz et al. 2000b).
a bis c stellen schematische Schnitte durch den intakten Eileiter dar. Es ist deutlich der zunehmende Außendurchmesser des Eileiters Richtung Ampulle und die Zunahme der Faltenanzahl und -Höhe zu erkennen. d bis f stellen eine Vergrößerung von einzelnen Eileiterfalten dar. In der Vergrößerung wird ersichtlich, dass nicht nur die Anzahl und Höhe der Schleimhautfalten zunimmt, sondern auch die Komplexität des Aufbaus.

2.2 Der Sexualzyklus beim Rind

Im weiblichen Sexualzyklus wiederholen sich bestimmte funktionelle Veränderungen der Geschlechtsorgane, die ihre Ursache in periodischen Schwankungen der Geschlechtshormone haben. Der Zyklus wird in vier Phasen eingeteilt, wobei die Kriterien für die Einteilung messbare Hormonschwankungen im peripheren Blut und klinisch auffällige Verhaltensänderungen sind. Man unterscheidet den Proöstrus (Vorbrunst), den Östrus (Brunst), den Metöstrus und den Diöstrus (Zwischenbrunst). Der erste Tag des Zyklus ist definiert als der erste Tag, an dem Brunsterscheinungen auftreten, im Gegensatz zum

Menschen, bei dem der erste Tag der Menstruation als erster Tag des Zyklus definiert wird. Das Hausrind ist polyöstrisch, das bedeutet, dass das ganze Jahr über regelmäßig Sexualzyklen ablaufen (Rüsse & Sinowatz 1991).

Im Proöstrus wachsen die für die Ovulation selektierten Tertiärfollikel heran. Die Follikel exprimieren Rezeptoren für FSH (follikelstimulierendes Hormon), das im Hypophysenvorderlappen (HVL) gebildet und pulsatil ausgeschüttet wird. Die FSH-Abgabe wird durch das Neurohormon GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormon) aus dem Hypothalamus reguliert. FSH bewirkt das Wachstum und die Östrogenproduktion des Follikels, die gegen Ende des Proöstrus stark ansteigt (Rüsse & Sinowatz 1991).

Östrogene werden gebildet, indem die Zellen der *Theka interna* Androgene bilden, die von den basalen Follikelzellen zu Östrogenen aromatisiert werden. Sie gelangen einerseits in die Follikelflüssigkeit und andererseits ins Blut und dominieren das hormonelle Bild im Östrus. Die Östrogene bewirken eine stärkere Durchblutung des weiblichen Genitale und eine Ödematisierung der Schleimhäute. Die Kontraktionsbereitschaft der glatten Muskulatur von Uterus und Ovidukt steigt. Es erhöht sich auch der Zilienschlag der Flimmerzellen des Eileiterepithels, die dadurch den Transport der Eizellen und des Sekretes bewirken. Die Sekretionszellen des Eileiterepithels bilden unter dem Einfluss der Östrogene Granula, die *post ovulationem* in das Lumen des Eileiters abgegeben werden. Infolge des Östrogeneinflusses erschlafft der Gebärmutterhals, *Cervix uteri*, öffnet sich und sezerniert Brunstschleim. Östrogene lösen auch das Brunstverhalten und die Paarungsbereitschaft aus. Typische Brunstsymptome sind Aufspringen auf Partnertiere, sich selbst bespringen lassen, häufiges Muhen, den Schwanz zur Seite heben, Unruhe, Rötung und Schwellung der Vulva und ein aus der Vulva austretender Schleimfaden (Rüsse & Sinowatz 1991).

Durch die hohe Östrogenkonzentration und die niedrige Progesteronkonzentration wird die Ausschüttung von LH (Luteotropes Hormon) und Prolaktin aus der Hypophyse ausgelöst. Dadurch tritt ein LH-Gipfel auf und die Ovulation findet im Durchschnitt 26 Stunden später statt. LH bewirkt die Fortsetzung der Meiose der Eizelle, den letzten Wachstumsschub des Follikels vor der Ovulation, und nach der Ovulation leitet es die Umwandlung des Follikels in den Gelbkörper, *Corpus luteum*, im nachfolgenden Metöstrus ein (Rüsse & Sinowatz 1991).

Der Metöstrus kann von den anderen Zyklusstadien nur schwer abgegrenzt werden. Es dominieren weder Östrogene noch Gestagene das hormonelle Bild. Die Eizelle befindet sich jetzt im Ovidukt. Der Eileiter weist eine maximale sekretorische Aktivität auf, wohingegen die Ödematisierung der Schleimhäute zurückgeht. Die Erregbarkeit der glatten Muskulatur nimmt ebenfalls ab. Die Follikelzellen werden in Luteinzellen umgewandelt, die mit der

Progesteronproduktion beginnen, und der Follikel baut sich zum Gelbkörper, *Corpus luteum*, um (Rüsse & Sinowatz 1991).

Im Diöstrus dominiert Progesteron das hormonelle Bild. Es verhindert zwar nicht das Wachstum, aber die Ovulation weiterer Follikel, da es nicht die Ausschüttung von FSH, jedoch die von LH aus der Hypophyse blockiert. Dadurch kann es zu mehreren, aufeinander folgenden Phasen der Follikelanbildung im Diöstrus kommen, die jedoch in der Regel nicht zur Ovulation führen, da der LH-Gipfel fehlt. Diese diöstrischen Follikel gehen alle wieder zugrunde. Durch das fehlende Östrogen geht die sekretorische Aktivität der Schleimhaut zurück und die Kontraktionsbereitschaft der glatten Muskulatur sinkt weiter ab. Gegen Ende des Diöstrus, am 17ten bis 18ten Tag des Zyklus, beginnt das Endometrium mit der Bildung von $\text{PGF}_{2\alpha}$. Dieses gelangt in die *Vena uterina* und über den Stoffaustausch zwischen der *Vena uterina* und der *Arteria ovarica* direkt wieder zurück ans Ovar. Hier löst es die Luteolyse aus. Dadurch nimmt der Progesteronspiegel ab, ein neuer dominanter Follikel kann heranreifen, und durch den Wegfall des Progesteronblocks kann LH von der Hypophyse auch wieder ausgeschüttet werden (Rüsse & Sinowatz 1991). Progesteron verhindert nicht die Bildung von LH sondern nur die Ausschüttung, wodurch es zu einer Ansammlung dieses Hormons in der Hypophyse kommt und nach dem Wegfall der Blockade durch Progesteron durch eine plötzliche Ausschüttung einer großen Menge LH zum sogenannten LH-Gipfel.

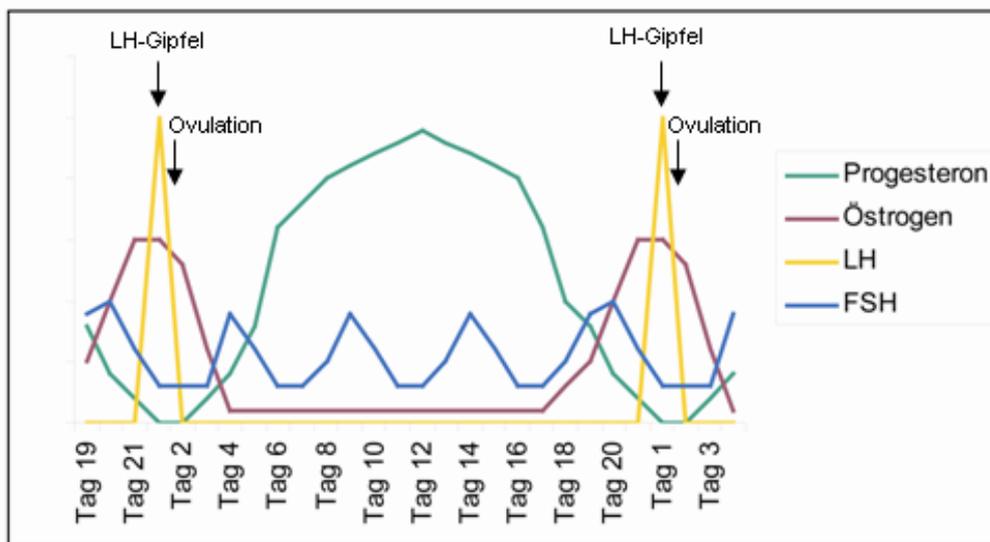


Abbildung 4: Hormonprofil

In dieser Graphic ist das schematische Hormonprofil bei Rindern dargestellt.

Auf der X-Achse sind die Zyklustage und auf der Y-Achse die Hormonkonzentrationen aufgetragen.

2.2.1 Spezielle histologische Veränderungen des Eileiters im Zyklusverlauf

Allen Veränderungen des Eileiterepithels im Zyklusverlauf liegt das sich zyklisch verändernde Hormonprofil zugrunde. Das Hormon mit dem größten Einfluß auf das Eileiterepithel ist das Östrogen. Es bewirkt eine verstärkte Durchblutung und Ödematisierung, wodurch das Epithel insgesamt höher wird (Rüsse & Sinowatz 1991). Es werden zahlreiche Sekretvakuolen in den sekretorischen Zellen gebildet, die zur Vorwölbung der apikalen Zellabschnitte in das Lumen des Eileiters führen (Hees & Sinowatz 1992). Diese sekretorischen Granula werden *post ovulationem* ins Eileiterlumen abgegeben. Im Metöstrus weist der Eileiter die maximale sekretorische Aktivität auf, die danach wieder abnimmt. Dadurch verschiebt sich auch das Verhältnis von zilientragenden zu sekretorisch aktiven Zellen zu Gunsten der Flimmerzellen (Rüsse & Sinowatz 1991). Es werden auch Zellen im Eileiter gefunden, die Eigenschaften von beiden Zelltypen, sowohl von sekretorischen als auch von zilientragenden Zellen, haben. Sie lassen vermuten, dass die zilientragenden Zellen und die sekretorischen Zellen zwei verschiedenen Stadien ein und desselben Zelltyps sind. Die Transformation zwischen diesen beiden Zelltypen wird vermutlich durch die Sexualhormone geregelt (Suuroia et al. 2002).

2.2.2 Spezielle Veränderungen der Eileitermotilität im Zyklusverlauf

Die Kontraktionsbereitschaft der glatten Muskulatur steigt gegen Ende des Zyklus mit steigendem Östrogenwert im Blut an, wohingegen hohe Progesteronwerte die Motilität hemmen (Rüsse & Sinowatz 1991).

Misst man die elektrische Aktivität der Eileitermuskulatur, so kann man zeitgleich mit einem starken Abfall des Blut-Progesteron Spiegels eine Steigerung der Dauer und Amplitude der Kontraktionen vor dem Beginn des Östrus beobachten. Dieses Phänomen ist besonders auffällig im Bereich des utero-tubaren Überganges. Zwei Tage vor dem Östrus treten gesteigerte Potenziale und Phasen starker Aktivität immer häufiger gruppiert auf, zunächst noch anscheinend zufällig, aber während des Östrus werden die Aktivitäten geordneter und erreichen auch ein Maximum an Frequenz und Amplitude. Die Stärke, aber nicht die Frequenz, nimmt in den nächsten Tagen ab, bis eine Phase der totalen Inaktivität im Diöstrus folgt. Der letzte noch aktive Bereich ist der utero-tubare Übergang (Ruckebusch & Bayard 1975). Die Motilität besteht vor allem aus longitudinalen Muskelkontraktionen mit einer dazwischengeschobenen Aktivität der zirkulären Muskeln während des Östrus (Bennett et al. 1988b). Diese Aktivitätsveränderungen der Eileitermuskulatur scheinen durch die ovariellen

Steroidhormone moduliert zu werden. Progesteron und Östrogen modulieren die lokale Synthese von Prostaglandinen und die Reaktion des Eileiters auf diese Hormone. So steigert Progesteron die Antwort auf PGE1 und senkt die Antwort auf PGF_{2α}. Prostaglandine der Klasse E relaxieren, während Prostaglandine der Klasse F die muskuläre Aktivität stimulieren. Die Konzentration an PGF ist im Isthmus höher als in der Ampulle. Vermutlich verursacht der präovulatorische Anstieg von Östrogen eine Stimulation der PGF-Synthese im Ovidukt mit einem Höhepunkt, wenn der Isthmus am sensitivsten für die Stimulation durch PGF_{2α} ist. Es kann sogar zu einem Verschluss des Isthmus kommen, was die vorzeitige Passage von prämaternen Eizellen in den Uterus verhindert. Der Anstieg der ovariellen Progesteron-Synthese reduziert die lokale PGF-Synthese und die Sensibilität des Isthmus auf PGF_{2α} und erhöht die Antwort auf PGE1. Die resultierende Relaxation erlaubt eine zügige Wanderung der Eizelle durch den Isthmus in den Uterus (Spilman & Harper 1975). Der Aktivitätslevel des Oviduktes ist auf der ipsilateralen Seite größer als auf der kontralateralen Seite. Dieser Unterschied könnte auf lokale Effekte, ausgelöst durch das aktive Ovar oder die Eizelle, zurückzuführen sein (Bennett et al. 1988a). Angiotensin II (Ang II) und atrial natriuretic peptide (ANP) sind möglicherweise in die lokale Regulation der Ovidukt-Kontraktionen während des Zyklus involviert. Die Konzentrationen von Prostaglandinen (PGs), Endothelin-1 (ET-1) und Angiotensin II (Ang II) wurden untersucht und waren während der folliculären und postovulatorischen Phase am höchsten. In diesen beiden Phasen des Sexualzyklus können Ang II und ANP *in vitro* die Amplitude der Eileiterkontraktionen steigern. Zusätzlich zur direkten Wirkung auf die Kontraktilität kann Ang II die Sekretion von ET-1 und PGs im Eileiter steigern. In ähnlicher Weise stimuliert ANP die Sekretion von Ang II und PGs. Diese Effekte konnten *in vitro* allerdings nicht in der lutealen Phase ausgelöst werden. Dadurch wird möglicherweise die Steigerung der Eileitermotilität auf molekularer Ebene reguliert (Wijayagunawardane et al. 2001b).

Zusätzlich zu den regulatorischen Einflüssen von Hormonen gibt es noch einen regulatorischen Effekt durch lokale Druckveränderungen im weiblichen Genitale. Eine vaginale Dehnung verursacht eine gesteigerte Eileitermotilität. Das scheint den Transport von Spermien und Eizelle zu unterstützen. Diese Motilitätsänderungen werden auf einen vaginotubalen Reflex zurückgeführt (Shafik et al. 2005).

Zusätzlich gibt es einen Bereich im Isthmus, der vermutlich die Aufgabe eines Sphinkters hat. Dieser Bereich kontrahiert beziehungsweise relaxiert sich, je nachdem ob es zu einer Druckerhöhung in der Vagina oder respektive im Eileiterbereich kommt. Das wird wahrscheinlich durch einen tubo-uterinen Reflex gesteuert (Shafik 1996).

2.3 Funktion des Eileiters im Reproduktionsgeschehen

2.3.1 Eiauffangmechanismus

In der Subserosa verlaufen neben Blutgefäßen auch subperitoneale Muskelfaserschichten. Sie bestehen aus einem kranialen Längszug und einem Netzwerk aus schrägen Muskelsträngen. Sie sind für die Motilität des Eileiters wichtig, vor allem im Hinblick auf die Eiaufnahme durch das Infundibulum nach der Ovulation (Hees & Sinowatz 1992). Die tubeneigene Muskulatur, die in der *Tunica muscularis* liegt, kontrahiert sich in peristaltischen Wellen und unterstützt damit die Muskelfasern der Subserosa und die Zilienzellen bei der Aufnahme der Eizelle in den Eileiter (Hees & Sinowatz 1992). Kurz vor der Ovulation lagern sich die Fimbrien des stark hyperämisierten Infundibulums aktiv der Stelle des sprungbereiten Follikels an und befördern die frisch ovulierte Oozyte in das *Ostium abdominale tubae uterinae* (Nickel et al. 1995). Hierbei hilft der lebhaft Zilienschlag der Flimmerzellen. Die höchste Dichte an zilientragenden Zellen findet sich auf den hohen, stark hervorragenden Fimbrien des Infundibulums. Das erleichtert die Aufnahme der Eizelle und den Transport in Richtung Ampulle (Yaniz et al. 2000c).

2.3.2 Spermienreservoir

Die Spermien passieren den Isthmus nicht auf direktem Weg, um an die Stelle der Befruchtung im Übergang zwischen Ampulle und Isthmus zu gelangen. Sie werden hingegen in großer Menge im Isthmus zurückgehalten. Zum Zeitpunkt der Ovulation werden die Spermien wieder frei, gelangen ins Eileiterlumen und können dadurch zum richtigen Zeitpunkt bei der Eizelle sein (Hunter & Wilmut 1984). Im Eileiterlumen halten sie sich jedoch nur relativ kurze Zeit auf, da in histologischen Studien nur wenig Spermien im Lumen nachgewiesen werden können. Die meisten werden vor der Ovulation im kaudalen Isthmus festgestellt, meistens zwischen Falten und in der Anwesenheit von viskösen Sekreten. Vor der Ovulation zeigen die Spermien noch einen intakten Kopf, das heißt ein intaktes Akrosom, wohingegen alle Phasen der Kapazitation bis hin zu fertig kapazitierten Spermien in der Zeit direkt nach der Ovulation gefunden werden. Die abgeschlossene Kapazitation scheint einen engeren Kontakt der rostralen Spitze des Spermiums mit den Mikrovilli der Flimmerzellen zur Folge zu haben, wodurch diese zusammen mit dem engen Lumen und den viskösen Sekretionsprodukten im kaudalen Isthmus zur Regulation des periovulatorischen

Spermienaufstieges zum Ort der Fertilisierung beitragen können (Hunter et al. 1991). Nicht nur die Sekretionsprodukte des Eileiters, die eine mechanische Barriere vor der Ovulation darstellen, sind an der Ausbildung des Spermienreservoirs beteiligt, sondern auch Oberflächenproteine auf der apikalen Plasmamembran von Eileiterepithelzellen, an die Spermien aktiv binden können. Diese Bindung der Spermien führt auch zu einer Verlängerung der Lebensfähigkeit und Motilität. Die Lebensfähigkeit wird verlängert, indem der Ca^{2+} -Influx in die Spermien hinausgezögert. Dadurch erreichte die Spermien keine letale intrazytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration und die Kapazitation wird hinausgezögert (Boilard et al. 2002b). Die Proteine, an die die Spermien auf der Eileiteroberfläche spezifisch binden können, scheinen Glykoproteine zu sein. Im Schwein wurde gezeigt, dass auf den Eileiterepithelzellen vorhandene Mannosyl-Oligosaccharide hoch-affine Liganden für Spermien-assoziierte Lektine sind. Spermadhesine, eine neue Klasse von tierischen Lektinen stellen den Hauptanteil der sekretierten Proteine der porzinen Samenblasendrüse, *Glandula vesicularis*, dar und assoziieren mit den Spermien während der Ejakulation sowie mit den epithelialen Karbohydrat-Gruppen (Topfer-Petersen et al. 2002b). Die Spermien können daneben auch an fucosylierte Liganden auf der Epitheloberfläche binden. Die Fucose-bindenden Proteine, die hierfür auf der Spermienoberfläche nötig sind, stammen vermutlich aus den akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Sie können relativ leicht von den Spermien entfernt werden und nach erneuter Zugabe auch wieder leicht an die Spermien anbinden (Ignotz et al. 2001). Andere Arbeitsgruppen konnten in weiteren Untersuchungen dieses Fucose-bindende Protein als PDC-109 identifizieren. Es wird von den Samenblasendrüsen produziert und assoziiert mit der Plasma-Membran der Spermien während der Ejakulation. So wurde gezeigt, dass signifikant weniger Nebenhodenspermien im Vergleich zu ejakulierten Spermien an Eileiterepithelzellexplante binden. Wurde PDC-109 zu Nebenhoden-Spermien zugegeben, stieg der Anteil an bindenden Spermien auf den von ejakulierten Spermien an. Weiterhin verlieren ejakulierte Spermien die Bindungskapazität nach Heparin-induzierter Kapazitation. Aber die Zugabe von PDC-109 stellt die Bindungsfähigkeit wieder her. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass PDC-109 Spermien befähigt, an Eileiterepithelzellen zu binden und eine große Rolle bei der Formierung des Spermienreservoirs spielt (Gwathmey et al. 2003a). Es binden jedoch nur Akrosom-intakte Spermien an Eileiterepithelzellen. Das Akrosom von gebundenen Spermien wird als intakt konserviert. Durch das Einsetzen der Kapazitation lösen sich dann die Spermien ab. Das verstärkt die Hypothese, dass das Anbinden an Eileiterepithelzellen essenziell ist für den Erhalt der Befruchtungs-Kapazität der Spermien im Zeitraum vom Beginn des Östrus bis zur Ovulation (Gualtieri & Talevi 2000).

2.3.3 Kapazitation

Die Kapazitation wird synergistisch einerseits durch das Anheften an Eileiterepithelzellen und andererseits durch die Oviduktflüssigkeit beeinflusst. Es wird vermutet, dass das Isthmusepithel wichtig ist zur Aufrechterhaltung der Motilität und das Anheften im Isthmus auch dazu dient, die Anzahl der ankommender Spermien bei der Eizelle zu reduzieren. Das Anheften an Ampullenepithel hingegen beschleunigt die Kapazitation (Chian & Sirard 1995). Die Kapazitation und damit die Ablösung vom Eileiterepithel könnte durch ein Einsetzen des Lipidaustausches zwischen Spermien und Eileiterepithelzellen gegen Ende des Östrus eingeleitet werden. Wie bereits weiter oben erwähnt, wird dies durch Megalin und Cubilin vermittelt, die in nicht zilientragenden Zellen im Östrus und Metöstrus in der apikalen Region der Zellen exprimiert werden. Sie bewirken die Endozytose von ApoJ/ApoA-I-Lipid-Komplexen und spielen damit eine wichtige Rolle für den Lipid-Efflux aus den Spermien, der einen wichtigen Initiator der Kapazitation darstellt (Argraves & Morales 2004b). Spermien, die einmal mit dem Vorgang der Kapazitation begonnen haben, verlieren ihre Bindungskapazität (Gwathmey et al. 2003b). Dadurch wird der Influx von Ca^{2+} und die Phosphorylierung von Spermienproteinen nicht mehr gehemmt und die Kapazitation kann ungestört durch die Eileiterepithelzellen, ablaufen (Topfer-Petersen et al. 2002a).

2.3.4 Transport der Gameten und des Embryos

Die innere Oberfläche des Ovidukts wird durch primäre und sekundäre Falten vergrößert. Die primären Falten verlaufen in longitudinaler Richtung, während sich die sekundären tief ins Eileiterlumen erstrecken und sich dort weiter aufzweigen. Durch diese komplexe Anordnung werden Taschen und Falten gebildet, die sich im Infundibulum und im kranialen Teil der Ampulle Richtung Ovar öffnen, wohingegen sie im Isthmus und in der kaudalen Ampulle Richtung Uterus geöffnet sind. Die Flussrichtung die die Falten vorgeben weisen im Isthmus Richtung Peripherie, wodurch Spermien die vom Uterus in den Eileiter gelangen in die Tiefe der Taschen geleitet werden. Hier entgehen sie dem Sekretstrom, der vom Infundibulum zum Isthmus und weiter Richtung Uterus führt. Dadurch können sie leichter im Eileiter aufsteigen. Im Übergang zwischen Ampulle und Isthmus und in der kaudalen Ampulle weist die Flussrichtung zwischen den Falten wieder Richtung Lumen, wodurch Spermien, die es bis hierhin geschafft haben wieder das Eileiterlumen erreichen und dann entweder weiter Richtung Eizelle oder im Sinne der tubaren Clearance zusammen mit den Eileitersekreten Richtung Uterus befördert werden. Grundsätzlich besteht das Epithel im oberen,

lumenzugewandten Teil der Falten hauptsächlich aus zilientragenden Zellen, die in diesem Bereich vor allem für den Transport der Gameten, des frühen Embryos und der Eileitersekrete wichtig sind (Yaniz et al. 2000a). Die *Tunica muscularis*, die aus zwei Schichten glatter Muskelzellen besteht, kontrahiert sich vor allem im Östrus in peristaltischen Wellen. Dadurch wird der Eileiterinhalt in Richtung Uterus transportiert (Hees & Sinowatz 1992).

Die Kontraktionsbereitschaft der glatten Muskulatur nimmt gegen Ende des Zyklus mit steigendem Östrogenwert im Blut zu (Rüsse & Sinowatz 1991), wobei dieser Effekt scheinbar durch Prostaglandine (PGs) vermittelt wird. Östrogene steigern die lokale Produktion von kontraktionssteigernden PGs und Progesteron steigert die Produktion und Reaktion auf kontraktionshemmenden PGs im Eileiter. Dadurch kann es zu einem Verschluss des Eileiters im Bereich des Isthmus kommen, was die vorzeitige Passage von prämaternen Eizellen in den Uterus verhindert. Aus dem Anstieg der ovariellen Progesteron-Synthese resultiert eine Relaxation des Isthmus was eine zügige Wanderung des Embryos durch den Isthmus in den Uterus erlaubt (Spilman & Harper 1975). Bovine Eileiterepithelzellen produzieren weiterhin auch Endothelin und sind deshalb lokal in die muskuläre Kontraktilität des Oviduktes involviert. Dadurch spielen sie eine wichtige Rolle beim Transport von Gameten und Embryonen (Rosselli et al. 1994). Die Expression eines weiteren kontraktionsfördernden Faktors, Angiotensin II wurde ebenfalls im Eileiterepithel nachgewiesen. Es steigert die Amplitude der Kontraktionen der Eileitermuskulatur (Wijayagunawardane et al. 2001a). Ein weiterer Faktor, TNF α (Tumor Necrosis Factor α), reguliert die Expression von Prostaglandinen (PGs), Endothelin-1 (ET-1) und Angiotensin II (Ang II). Die Eileiterepithelzellen exprimieren TNF α und seine beiden Rezeptoren, wobei die höchste Expression in der folliculären und postovulatorischen Phase zu finden ist. Immunzellen, die in großer Menge im Eileiter während der periovulatorischen Phase vorhanden sind, werden als weitere mögliche Quelle für TNF α angesehen. Im *in vitro* Modell stimulierte TNF α deutlich die lokale Produktion und Ausschüttung von PGs, ET-1 und Ang II. Dadurch scheint TNF α die Eileiterkontraktilität während der periovulatorischen Phase zu steigern und damit zur Bildung einer optimalen lokalen Umgebung für den Transport der Gameten bzw. des Embryos beizutragen. Auch der Embryo im 2-4 Zellstadium produziert TNF α und kann damit selbst lokal auf die Produktion von PG, ET-1 und Ang II im Eileiter einwirken und zur aktiven lokalen Kontraktion seiner direkten Umgebung beitragen. Das stellt sicher, dass der Embryo zur optimalen Zeit den Uterus erreicht (Wijayagunawardane & Miyamoto 2004).

2.3.5 Frühe Embryonalentwicklung

Die positive Wirkung des Eileiterepithels und seiner Sekretionsprodukte auf die Entwicklung des frühen Embryos wurde gezeigt, indem *in vitro* fertilisierte Oozyten in ligierten Kaninchen-Eileitern vorkultiviert und Trächtigkeitsraten wie *in vivo* erzielt wurden (Sirard et al. 1985b). Diese positive Wirkung, die sogar im speziesfremden Eileitermilieu vorhanden ist, kann durch die starke phylogenetische Konservierung von bestimmten eileiterspezifischen Proteinen erklärt werden (Gandolfi et al. 1993). Auch die Kokultur mit bovinen Ovidukt-Epithelzellen (BOEC) hat einen positiven Effekt auf die frühe Embryonalentwicklung. In der Kokultur entwickeln sich die Embryonen schneller, und es gelangen mehr Embryonen bis zum Stadium der geschlüpften Blastozyste als in Medium, mit vorher gefrorenen und wieder aufgetauten BOEC oder in Medium, das vorher als Kulturmedium für BOEC diente. Dies deutet auf eine Interaktion der Eileiterepithelzellen mit der Oozyte und dem frühen Embryo hin (Ellington et al. 1990).

2.4 Änderungen auf molekularer Ebene im Zyklusverlauf

Viele Arbeitsgruppen haben mit den unterschiedlichsten Methoden versucht, physiologische Vorgänge im Eileiter während des Zyklus auf molekularer Ebene zu untersuchen. Aus histologischen Studien weiss man, dass sich die sekretorische Aktivität des Epithels im Zyklusverlauf ändert (Rüsse & Sinowatz 1991). Durch die starke Durchblutung und Ödematisierung wird das Eileiterepithel insgesamt höher und zahlreiche Sekretvakuolen, die die Zellen ausfüllen, führen zur Vorwölbung der apikalen Zellabschnitte in das Lumen des Eileiters (Hees & Sinowatz 1992). Bei Analysen des Proteingehaltes des Eileitersekretes hat man festgestellt, dass zwar die Proteinkonzentration des Sekretes in der Sekretionsphase am niedrigsten ist, aber die gesamt Menge an sekretiertem Protein ist in dieser Phase trotzdem am höchsten. Das deutet auf eine gesteigerte Sekretion und Transsudation des Ovidukts von östrischen Tieren hin (Gerena & Killian 1990).

Bei Kokulturversuchen von Spermien mit Eileiterepithelzellen wurde ein verändertes Proteinsekretionsmuster der Eileiterzellen in Anwesenheit der Spermien festgestellt. Eileiterepithelzellen synthetisieren ein großes Spektrum an Proteinen. In der Kokultur mit Spermien traten einerseits neu synthetisierte Proteine auf, andererseits verschwanden auch verschiedene Proteine. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Eileitersekretion auch durch äußere Einflüsse, wie die Bindung von Spermien, beeinflusst werden kann und der Eileiter sich aktiv an seine verschiedenen Aufgaben im Reproduktionsgeschehen anpassen

kann (Ellington et al. 1993). Es wurde ebenfalls festgestellt, dass der pH-Wert im Eileiter durch einen aktiven Prozess aufrecht erhalten wird. Er unterliegt zwar keinen signifikanten zyklischen Schwankungen, ist aber während des gesamten Zyklus signifikant höher als der pH-Wert des Blutes (Hugentobler et al. 2004).

Viele der zyklischen Veränderungen im Eileiter werden durch die beiden wichtigsten Hormone Progesteron und Östrogen reguliert. Untersuchungen zur Expression der zugehörigen Rezeptoren unterstrichen diese Hypothese. So wurde die mRNA für den Progesteron-Rezeptor (PR) und den Östrogen-Rezeptor α (ER α) während der folliculären Phase verstärkt exprimiert. Die höchste Menge an PR- und ER α -Protein wurde etwas zeitversetzt während der frühen Luteal-Phase gemessen. *In vitro* resultierte eine Östradiol-17- β Supplementierung in einer Erhöhung von PR- und ER α -Protein. Im Gegensatz dazu war sowohl die mRNA für ER β als auch die Protein-Expression in der Luteal-Phase am höchsten. Nach Progesteronzugabe zur Zellkultur stieg die ER β -Expression an (Ulbrich et al. 2003). Aber nicht nur die Rezeptoren für die Steroidhormone, sondern auch ein Rezeptor für Adrenalin und Noradrenalin, der β 2 Adrenozeptor, wird in einer zyklusabhängigen Weise exprimiert. Es wurden höhere Transkript-Spiegel und eine erhöhte Bindungskapazität in der Luteal-Phase gemessen. In der Zellkultur stieg die Rezeptor-Expression nach Progesteron-Supplementierung an. Daraus lässt sich schließen, dass Progesteron die Expression der β 2-adrenergen Rezeptoren reguliert. Möglicherweise sind Katecholamine aus dem peripheren Blut oder aus lokaler Innervation fähig, den reproduktiven Erfolg durch die Regulation der Eileitersekretion zu beeinflussen (Einspanier et al. 1999).

Aus Zellkulturexperimenten ist bekannt, dass reaktive Sauerstoff-Spezies schon in geringer Konzentration in der Zellkultur negative Wirkungen zeigen. Beispielsweise wirkt H₂O₂ nicht nur negativ auf die Spermiovitalität sondern auch auf die Akrosom-Reaktion, die Spermien-Eizellen-Bindung und die Eizell-Penetration (Lapointe et al. 1998). Die Zugabe von Antioxidantien zum Kulturmedium hat deshalb einen positiven Effekt auf Spermienfunktion, Eizellen-Maturation, Befruchtung und Embryonalentwicklung. Da H₂O₂ eines der Schlüssel Reaktanten in der Kettenreaktion von freien radikalen ist, könnte die Katalase (Spaltung von H₂O₂ in H₂O und O₂) eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit dem Überleben der Spermien im weiblichen Reproduktionstrakt spielen (Lapointe et al. 1998). Bei Untersuchungen zur Expression von Glutathionperoxidasen (GPx), Katalase und Superoxid-Dismutase auf mRNA-Ebene konnte eine Zyklus- und Abschnitts-abhängige Expression festgestellt werden. GPx-3 wurde vor allem im Isthmus, GPx-1 und GPx-2 dagegen vor allem in der Ampulle und im Infundibulum exprimiert. Die mRNA-Konzentration für GPx-1 war

gegen Ende des Zyklus bis kurz vor der Ovulation am höchsten. Für GPx-2 hingegen stieg sie erst nach der Ovulation an und war in der Mitte des Zyklus am höchsten. Die mRNAs für Katalase und Superoxid-Dismutase wurden gleichmäßig im gesamten Eileiter exprimiert. Die Superoxid-Dismutase-Aktivität war während des Zyklus konstant, die Glutathionperoxidasen dagegen hatten ihre höchste Aktivität in der Mitte des Zyklus (Tag 10-12) und die Katalase am Ende des Zyklus (Tag 18-20). Die heterogene Expression der antioxidativ wirkenden Enzyme über den Eileiter lässt ihre wichtige Funktion erahnen (Lapointe & Bilodeau 2003).

Auch IGF-1 (Insulin like Growth Factor)-Transkripte zeigen eine zyklusabhängige Expression. Nach der Ovulation war die Konzentration der IGF-1 mRNA am höchsten und konnte in den sekretorischen Zellen des Eileiterepithels lokalisiert werden. Da IGF-1 ein wichtiger Wachstumsfaktor ist, werden mögliche Effekte von IGF-1 entweder auf das Eileiterepithel oder den frühen Embryo während der Ovulation vermutet (Schmidt et al. 1994).

Ebenfalls ein wichtiger regulatorischer Faktor ist VEGF (Vascular endothelial growth factor). Er erfüllt Aufgaben als angiogenes Protein sowie bei der Regulation der Permeabilität. Die Expression der mRNA für VEGF war relativ konstant während des Zyklus. Im Gegensatz dazu zeigten beide Rezeptortranskripte zyklusabhängige Variationen mit einer signifikant gesteigerten mRNA-Konzentration vor der Ovulation. Die Proteinkonzentration von VEGF war während der prä-ovulatorischen Phase signifikant erhöht. Es wird vermutet, dass VEGF bei der Herstellung einer optimalen lokalen Umgebung für die Fertilisation und den frühen Embryo im Eileiter beteiligt ist (Gabler et al. 1999).

Wichtig für den Lipidaustausch zwischen der Spermien-Plasmamembran und den Epithelzellen, die den männlichen Reproduktionstrakt auskleiden, sind Apolipoprotein J (ApoJ) und Apolipoprotein A-I (ApoA-I). Dieser Prozess wird weiterhin von den auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran liegenden Rezeptoren Megalin und Cubilin vermittelt, die sich im Bereich der apikalen Oberfläche von absorptiven Epithelien befinden. Dieses System für den Austausch von Lipiden zwischen Spermien und dem sie umgebenden Epithel wurde auch im Eileiter nachgewiesen. Megalin und Cubilin wurden vor allem in nicht zilientragenden Zellen im Östrus und Metöstrus in der apikalen Region der Zellen exprimiert. ApoJ und ApoA-I wurden ebenfalls in der apikalen Region der Epithelzellen exprimiert. Megalin und Cubilin sind im Ovidukt möglicherweise für die Vermittlung der Endozytose von ApoJ/ApoA-I-Lipid-Komplexen zuständig und spielen damit eine wichtige Rolle für den Lipid-Efflux aus den Spermien, der einen wichtigen Initiator der Kapazitation darstellt (Argraves & Morales 2004a).

GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) kann *in vitro* die Entwicklung des Embryos bis zum Blastozystenstadium bei Rindern positiv beeinflussen. Durch Immunfärbung konnte GM-CSF auch im Epithel von Ampulle und Isthmus nachgewiesen werden, mit einer höheren Intensität in der Ampulle. GM-CSF war sowohl in den zilientragenden als auch in den nicht-zilientragenden Zellen zu finden und wurde auch in die Ovidukt-Flüssigkeit abgegeben. Die Vermutung liegt nahe, dass GM-CSF auch *in vivo* einen positiven Effekt auf die frühe Embryonalentwicklung im Eileiter hat (de Moraes et al. 1999).

Die Konzentration von Ca^{2+} war im Isthmus signifikant höher als in der Ampulle, vor allem im Östrus nahe am Zeitpunkt der Ovulation (Grippe et al. 1992). In diesem Zusammenhang ist die Stickstoff-Monoxid-Synthase (NOS) von großem Interesse. Sie ist verantwortlich für die Produktion von Stickstoff-Monoxid in verschiedenen Organen. Sowohl die Ca^{2+} -abhängige konstitutive Form der NOS als auch die induzierbare Form der NOS (iNOS) war im bovinen Eileiter vorhanden (Rosselli et al. 1996). Die beiden Formen der NOS sind zusammen mit der unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentration möglicherweise an der physiologischen Regulation der Eileiterfunktionen, wie zum Beispiel der Eileitermotilität, beteiligt (Ekerhovd et al. 1999). Chromogranin A ist ein Ca^{2+} -Speicherprotein mit hoher Kapazität. Es interagiert mit dem Inositol-tri-phosphat / Ca^{2+} -Kanal, der im Ovidukt der Maus nachgewiesen wurde. Chromogranin A wurde im bovinen Eileiter vor allem in zilientragenden Zellen exprimiert, hauptsächlich in der apikalen Region in direkter Nachbarschaft zum Zilienapparat. Chromogranin A-positive Zellen waren vor allem im Diöstrus zu beobachten. Das Expressionsmuster des Typ 2 Inositol-tri-phosphat Rezeptors war ist dem von Chromogranin A sehr ähnlich. Daraus kann man ableiten, dass Chromogranin A und der Inositol-tri-Phosphat Rezeptor möglicherweise gemeinsam in die Kontrolle der Zilienaktivität des Ovidukts involviert sind (Steffl et al. 2003).

Von Osteopontin und Integrinen ist bekannt, dass sie Zellmigration und Zelladhäsion vermitteln. Osteopontin konnte in allen Zyklusstadien in der Eileiterflüssigkeit aus allen Abschnitten nachgewiesen werden. Integrin $\alpha\beta 3$ -Protein wurde in der späten Lutealphase am schwächsten exprimiert. Integrin $\beta 3$ -Protein stieg signifikant vom Zeitpunkt der niedrigsten Expression in der späten Luteal-Phase zum Zeitpunkt der stärksten Expression kurz vor der Ovulation an. Es wird vermutet, dass Osteopontin und Integrine eine Rolle bei der Interaktion zwischen Gameten, dem Embryo und dem Eileiterepithel spielen (Gabler et al. 2003).

Komponenten der extrazellulären Matrix beteiligen sich an der Neusynthese von Geweben und aktivieren oberflächengebundene Wachstumsfaktoren. Die mRNA einer Komponente der

extrazellulären Matrix, dem Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA), konnte im Eileiter in hoher Konzentration im Östrus gemessen werden. Diese fiel nach der Ovulation wieder stark ab. Im Gegensatz dazu blieb die Konzentration der mRNA für den Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1) über den Zyklus gleich. Erhöhte mRNAs-Spiegel wurden um den Zeitpunkt der Ovulation für TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1) und MMP-2 (matrix metalloproteinase 2) nachgewiesen. Im Gegensatz dazu waren MMP-1-Transkripte während des Met- und Diöstrus in ihrer Konzentration erhöht (Gabler et al. 2001).

Insgesamt sind bereits eine Reihe von Faktoren aus Einzeluntersuchungen in verschiedenen Modellsystemen bekannt, deren mRNA- und/oder Protein-Expression im Zyklusverlauf und in den verschiedenen Abschnitten des Eileiters Veränderungen zeigen. Es fehlt allerdings bisher ein holistischer Ansatz, um einen Überblick über alle Regulationsvorgänge auf Ebene der mRNA-Expression während des Sexualzyklus und zwischen verschiedenen Eileiterabschnitten zu erhalten.

2.5 Eine Kombination aus subtraktiven cDNA-Bibliotheken und cDNA-Array-Hybridisierung als Strategie zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene

Für einen Vergleich der Genexpression von unterschiedlichen Zellpopulationen gibt es unterschiedliche Strategien. Einerseits gibt es Kandidatengenansätze, wobei Gene zur Untersuchung ausgewählt werden, von denen man bereits vorher vermutet, dass sie im untersuchten System eine wichtige Rolle spielen könnten. Auf der anderen Seite gibt es holistische Ansätze zur Untersuchung der Gesamtheit der Genexpressionsveränderungen in einem biologischen System. Ein modernes Verfahren zur Durchführung solcher Analysen ist beispielsweise die Microarray-Technologie, mit der das Expressionsniveau tausender Gene parallel bestimmt werden kann (Schena et al. 1995). Für den Menschen gibt es mittlerweile bereits kommerziell erhältliche Microarrays, die genomweite Untersuchungen erlauben. Zu Beginn dieser Arbeit existierten solche Arrays noch nicht für das Rind. Deshalb wurde ein Ansatz gewählt, der die Vorteile von sogenannten subtraktiven cDNA-Banken und Microarray-Analysen verbindet. Dabei werden differenziell exprimierte Gene in Form von cDNAs in diesen speziellen Genbanken angereichert. Die cDNA-Klone dieser Banken werden dann zur Herstellung von cDNA-Arrays verwendet, mit deren Hilfe die differenziell exprimierten Gene identifiziert werden. Ein besonders effizienter Ansatz zur Herstellung subtraktiver cDNA-Bibliotheken ist die SSH Methode (Suppression Subtractive Hybridisation) (Gurskaya et al. 1996; Diatchenko et al. 1996a; Diatchenko et al. 1999; Bauersachs et al.

2003f; Bauersachs et al. 2003e). Je nach Untersuchungssystem kann ein Anreicherungsgrad an differenziell exprimierten Genen von bis zu 90 % erzielt werden (Diatchenko et al. 1996b). Weil die Anreicherung in den meisten Fällen nicht in diesem Maße möglich ist, stellt die Kombination der Array-Technologie und der SSH-Methode einen besonders effektiven Ansatz dar, um differenziell exprimierte Gene zu identifizieren (Yang et al. 1999). Die Abbildung 5 zeigt schematisch den Ablauf des SSH-Verfahrens. Die cDNA-Population aus dem Gewebe, für das cDNAs von differenziell exprimierten Genen angereichert werden sollen, wird „Tester“-cDNA und die cDNA-Population aus dem Vergleichsgewebe „Treiber“-cDNA genannt. In einer subtraktiven Bank können immer nur cDNAs von Genen angereichert werden, die in der „Tester“-Population häufiger vorkommen. Deshalb müssen zur Identifizierung von hoch- und herunterregulierten Genen eines biologischen Systems immer zwei subtraktive Banken hergestellt und dabei jeweils eines der beiden zu untersuchenden Gewebe als „Tester“ verwendet werden. Bei der subtraktiven Hybridisierung wird die Hybridisierungskinetik komplexer cDNA-Gemische ausgenutzt. Dabei gilt, dass je öfter eine cDNA im Ansatz vorkommt, sie umso schneller ihren Hybridisierungspartner finden kann. Diejenigen cDNAs, die nur sehr selten im Hybridisierungsansatz vorkommen, brauchen längere Zeit, um mit dem komplementären Strang zu hybridisieren und liegen deshalb bei Abbruch der Reaktion nach einer bestimmten Zeit noch einzelsträngig vor. Der erste Hybridisierungsschritt wird in zwei getrennten Ansätzen durchgeführt, die sich dadurch unterscheiden, dass mit unterschiedlichen Adaptoren versehene „Tester“-cDNA eingesetzt wird. Nur die „Tester“-cDNA besitzt an den 5'-Enden spezielle Adaptoren, die später für die PCR-Primer in der Suppressor-PCR als Bindungsstelle dienen. Um die subtraktive Hybridisierung zu beschleunigen, wird die „Treiber“-cDNA in hohem Überschuss eingesetzt. Dadurch werden cDNAs, die in beiden zu vergleichenden Geweben in annähernd gleicher Konzentration vorkommen, abgefangen. Während dem ersten Hybridisierungsschritt kommt es neben der Subtraktion auch zur Normalisierung der „Tester“-cDNA. Das bedeutet, dass sich cDNAs, die hauptsächlich in der „Tester“-Population, aber dort in sehr hoher Konzentration vorkommen, selbst finden können. Dadurch sind nach Klonierung der PCR-Produkte in der subtraktiven Bank sowohl cDNAs von schwach als auch von stark exprimierten Genen zu finden. Nach der ersten Hybridisierung in getrennten Ansätzen, werden beide Ansätze zusammengegeben. Dann können sich bis dahin noch einzelsträngig gebliebene cDNAs finden und auch „Tester“-Moleküle mit unterschiedlichen Adaptoren an den Enden miteinander zum Doppelstrang hybridisieren. Dies sind vor allem solche cDNA-Moleküle, die in der „Treiber“-Population nicht vorhanden sind oder eine deutliche niedrigere

Konzentration aufweisen. In der anschließenden „Suppressor“-PCR werden nur solche doppelsträngigen „Tester“-Moleküle exponentiell amplifiziert, die an ihren Enden verschiedene Adaptoren tragen (Adaptor 1 und Adaptor 2). Alle anderen Moleküle werden gar nicht oder nicht exponentiell amplifiziert. Die PCR-Produkte werden anschließend in einem geeigneten Plasmid-Vektor kloniert und damit die subtraktive cDNA-Bibliothek erstellt. Die Methode besitzt mehrere Vorteile im Vergleich zu anderen Subtraktionsverfahren. So werden relativ kurze cDNA-Moleküle (< 2000 bp) für die Hybridisierung eingesetzt, die gegenüber langen Molekülen eine bessere Hybridisierungskinetik aufweisen. Durch die gleichzeitige Normalisierung können auch cDNAs von sehr schwach exprimierten Genen erfasst werden. Die Abtrennung der gewünschten cDNAs von den anderen erfolgt nach der subtraktiven Hybridisierung durch die Suppressor-PCR. Damit wird ein physikalisches oder chemisches Abtrennungsverfahren vermieden, das meist nur unscharf arbeitet. Zudem wird vergleichsweise wenig poly(A)⁺-RNA als Ausgangsmaterial benötigt, was von großer Bedeutung ist, weil die verfügbaren Mengen an Probenmaterial oft begrenzt sind.

Da aber durch dieses Verfahren trotzdem nur eine bestimmte Anreicherung von differenziell exprimierten Genen möglich ist, wird ein zusätzliches Verfahren zur Identifizierung der differenziell exprimierten Gene benötigt. Ideal dazu geeignet ist die cDNA-Array-Hybridisierung, in Form von Microarray-Hybridisierungen. Hierfür werden die klonierten cDNA-Fragmente von einigen tausend cDNA-Klonen via PCR amplifiziert und auf einen festen Träger gedruckt (Bauersachs et al. 2003d; Diehl et al. 2005a; Bauersachs et al. 2004c). Die identischen Arrays werden dann mit komplexen cDNA-Proben aus den zu untersuchenden Geweben hybridisiert. Jede cDNA-Probe aus einem Gewebe erzeugt ein Signalmuster auf dem Array, das spezifisch für den Zustand des jeweiligen Gewebes ist. Werden nun die Signale auf den Arrays aus den Hybridisierungen mit den unterschiedlichen cDNA-Proben verglichen, können Intensitätsunterschiede in der Signalstärke festgestellt werden. Die cDNAs, die reproduzierbare Signalunterschiede zeigen, werden anschließend sequenziert und durch einen Vergleich mit öffentlichen Sequenzdatenbanken identifiziert. Ausgehend von den gefundenen Genen können dann weiterführende Untersuchungen sowohl auf Transkriptom- als auch auf Proteom-Ebene erfolgen.

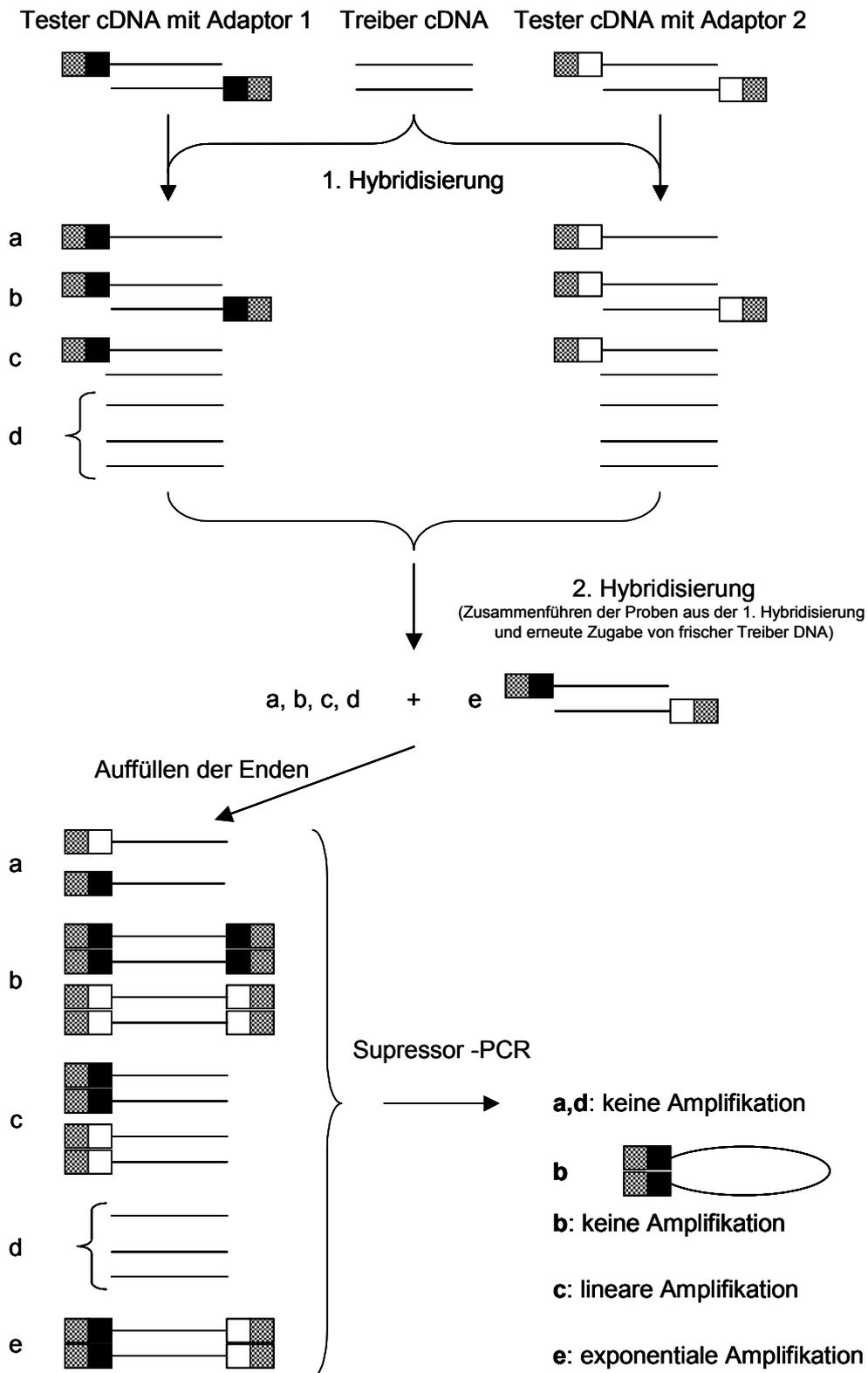


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Ablaufs der Suppression Subtractive Hybridisation (SSH)-Methode.

Bildliche Darstellung in Anlehnung an das Modell von Diatchenko et al. 1996.

3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, einen Überblick über Genexpressionsveränderungen im bovinen Eileiterepithel im Sexualzyklus zu liefern. Bis dato wurde noch keine Arbeit mit ähnlicher Zielsetzung oder ähnlichem Umfang durchgeführt.

Diese Doktorarbeit war angegliedert an die DFG-Forschergruppe „Mechanismen der embryo-maternalen Kommunikation“, die die Änderungen der Genexpression zu frühen Zeitpunkten der embryonalen Entwicklung beim Rind im Endometrium, aber auch im Eileiter auf der Ebene der mRNA untersucht. Dafür werden auch Daten zur Genexpression im Eileiter während eines normalen Sexualzyklus, ohne Besamung oder Embryotransfer, benötigt, da in dieser Umgebung die initialen Ereignisse der embryo-maternalen Kommunikation ablaufen. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, einen Überblick über die Veränderungen der Genexpression der Eileiterepithelzellen sowohl im Zyklusverlauf als auch in den einzelnen funktionellen Abschnitten des Eileiters zu liefern.

Für die Durchführung systematischer Untersuchungen eines solchen Umfangs war es wichtig, zu Beginn Kriterien zu erarbeiten nach denen Tiere für die Probenentnahme ausgewählt werden konnten, um ein möglichst homogenes Probenmaterial zu gewährleisten. Aus diesem Grund war es ein Ziel dieser Arbeit, ein Protokoll und einen Kriterienkatalog zu erarbeiten, nach denen die Tiere zyklussynchronisiert und für die Schlachtung ausgewählt wurden. Die Art der Entnahme des Probenmaterials ist ebenfalls ein sehr wichtiger Punkt. Deshalb sollte ein standardisiertes Protokoll für die Probenentnahme erstellt werden, um sicher zu stellen, dass zur Minimierung von Verfälschungen der Untersuchungsergebnisse durch Schwankungen bei der Probenentnahme die Proben immer unter den gleichen Bedingungen gewonnen werden.

Auf dieser Grundlage sollte dann eine erste Analyse der Genexpression im bovinen Eileiterepithel mit Hilfe von subtraktiven cDNA-Banken durchgeführt werden. Schwerpunkt dieser Untersuchung war es, einen Überblick über Veränderungen von mRNA-Konzentrationen im Eileiterepithel (Ampulle und Isthmus gemeinsam) im Vergleich von Östrus zu Diöstrus zu erhalten. Diese Untersuchung sollte dann zur Weiterentwicklung eines Arrays dienen, das alle bisher in der Arbeitsgruppe als möglicherweise bedeutungsvoll für die Funktion des Eileiters identifizierten Gene in Form ihrer cDNAs enthält. Mit Hilfe dieses Arrays sollte dann eine systematische Analyse von Ampulle und Isthmus getrennt zu vier verschiedenen Zykluszeitpunkten erfolgen. Damit sollte ein tieferes Verständnis der

Vorgänge im Eileiterepithel auf molekularer Ebene während des Sexualzyklus möglich werden. Mit Hilfe von Datenbank-Analysen, wie zum Beispiel einer Klassifizierung der Gene nach ihrer Funktion und Identifizierung beteiligter molekularer Pathways sollte ein erstes Modell für die Veränderung des Eileiterepithels im Verlauf des Sexualzyklus entworfen werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Agarosegel-Dokumentationsgerät, Eagleeye II	Stratagene, Heidelberg
Analysenwaage Mettler AE 200	Mettler Toledo GmbH, Giessen
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Automatische Pipette EDOS 5222	Eppendorf, Hamburg
3100 Avant Genetic Analyzer;	Applied Biosystems, Langen,
Crosslinker	Spectrolinker, Albany, NY
Gewebe-Homogenisator DIAX 900	Heidolph, Schwabach
Luftbefeuchter	Holmes
Magnetrührer Ikamag® RCT	Ika Labortechnik, Staufen
Mehrkanalpipetten	Eppendorf / Gilson
Membran Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Mikrowelle 8521	Privileg
Rock'n Roller	Breda
Scanner Storm 860	Molecular Dynamics
Schüttler KS 250 basic	Ika Labortechnik, Staufen
Solid pins (SSP015) für Omnigrid Accent	Telechem International, Sunnyvale, CA, USA
Spotter Omnigrid Accent	Gene Machines, San Carlos, CA, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator 256 nm	Bachofer, Reutlingen
Transilluminator 366 nm	Bachofer, Reutlingen
Vortex Genie 2	Scientific Industries, INC., NY
Voyager 5	Air Liquid, Paris, Frankreich

Gelelektrophorese-Apparaturen

Gibco BRLHorizontal Gel Life Technologies, Rockville MD,
USA

PCR Geräte

T3 Thermocycler Biometra Biometra, Göttingen
Thermocycler Biometra UnoII Thermoblock Biometra Göttingen

Hybridisierungsöfen

VT 5042EK Heraeus, Langenselbold

Zentrifugen

Micro Centrifuge II neolab, Heidelberg
Zentrifuge 5417 R Eppendorf Hamburg
Zentrifuge 5417 Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge GS-15R Beckman, München

4.1.2 Chemikalien

Ampicillin Boehringer, Mannheim
Bromphenolblau Serva, Heidelberg
Chloroform Riedel-de Hâen, Deisenhofen
Essigsäure Roth, Karlsruhe
Ethanol Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (10 mg/ml) Roth, Karlsruhe
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) Merck, Darmstadt
Isopropanol Roth, Karlsruhe
NaOH (2 N) Merck, Darmstadt
Natriumacetat Merck, Darmstadt
SeaKem LE® Agarose Biozym, Hess. Oldendorf
Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan (Tris) Roth, Karlsruhe
Trizol™ Reagenz GibcoBRL Life Technologies

4.1.3 Lösungen und Reagenzien

Medien

LB-(Luria-Bertani)-Medium	1 %	Trypton
	0,5 %	Hefeextrakt
	0,5 %	NaCl
	mit ca. 0,1 %	2 M NaOH auf pH = 7 bis 7,5
Für Agarplatten zusätzlich:	1,2 %	Agar

Lösungen und Puffer

50 x TAE-Puffer (für 1 Liter)	242 g	Tris Base
	57,1 ml	Essigsäure
	37,2 g	Na ₂ EDTA-Dihydrat
10 x TBE (für 1 Liter)	108 g	Tris Base
	55 g	Borsäure
	40 ml	0,5 M EDTA pH 8,0 ad 1 Liter Wasser
2,5 x Probenpuffer für Agarosegele (10 ml)	2,4 g	Harnstoff
	5 g	Saccharose
	1 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
	1 ml	1 % Bromphenolblau ad 10 ml Wasser
PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung, pH 7,5)	250 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,25 mM	NaCl Lösung A
	250 mM	NaH ₂ PO ₄
	1,25 mM	NaCl Lösung B
Lösung B wird zu Lösung A gegeben bis zum Erreichen des gewünschten pH Wertes		
TE-Puffer	10 mM	Tris/HCl, (pH 8,0)
	1 mM	EDTA
2xProbenpuffer für Microarray	40 mM	Tris-HCl pH 8,4
	4 M	NaCl
	2 mM	EDTA
		Bromphenolblau

Wasser

Für PCR Reaktionen wurde entsalztes (Reinstwasseranlage, Millipore), autoklaviertes Wasser verwendet.

Für Reaktionen mit RNA wurde das Wasser steril filtriert (Millex GP, Millipore, Schwalbach).

Reagenzien und Enzyme

Advantage cDNA Polymerase-Mix	BD Clontech, Heidelberg
DNA Ligase (<i>E. coli</i>) (10 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
DNA Polymerase I (<i>E. coli</i>) (10 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
DNase I (1 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
Erststrang-Puffer (5x) für cDNA	Invitrogen, Karlsruhe
High-Prime-Mix (5x)	Roche, Mannheim
Human C0T-1 DNA (1 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Ligasepuffer für T4-Ligase (10x)	New England Biolabs
RNase-Inhibitor (40 U/μl) RNaseOUT™	Invitrogen, Karlsruhe
SuperScript™ II RNaseH ⁻ Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase	peQLab, Erlangen
Superscript II Reverse Transcriptase (200 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
Zweitstrang-Puffer (5x) für cDNA	Invitrogen, Karlsruhe

4.1.4 Sonstiges Material

96-Well PCR Reaktionsgefäße	AbGene, Hamburg
Dialyse Membranen Millipore	Millipore, Schwalbach
Porendurchmesser 0,025 μm Durchmesser 47 mm	
Filter Millex GP Porendurchmesser 0,22 μm	Millipore Express, Irland
Hybridisierungsgefäße, Poly Q Vials 18 ml	Beckman, München
Kanülen	Braun, Melsungen
Klebefolie Adhesive PCR Foil Seals	Abgene, Hamburg
MicroSpin™ G-25 Columns	Amersham Pharmacia, Freiburg
Mikrotiterplatten 384 well	Nalge Nunc International, NY
Nylon Transfer Membran, Nytran Supercharge, Porendurchmesser 0,45 μm	Schleicher & Schuell, Dassel

Objektträger	Roth, Karlsruhe
Omnifix 2 ml Luer Lock Spritzen	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
PCR Gummimatten Micro Amp Full Plate Cover	Perkin Elmer, Connecticut
Reaktionsgefäße "safe lock" (2, 1,5, 0,5, 0,2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Spritze 20 ml	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
Transportgefäß Rotilabo (5 ml)	Karlsruhe, Roth
Zellkultur Testplatte 96 well	TPP, Schweiz
<i>Verwendete Software</i>	
AIDA Array Metrixm, Version 3.52	raytest, Straubenhardt

4.1.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide für Sequenzierung und Kolonie PCR

PM0	5'-CCAAATATCTCTCCCACCAGC-3'
T7ex	5'-GTAATACGACTCACTAGGGC-3'
NLT7	5'-GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG G -3'
LT3	5'-CTC ACT AAA GGG AAC AAA AGC TG-3'

Oligonukleotide für die subtraktive Hybridisierung (Suppression Subtractive Hybridisation (SSH)) und cDNA-Array-Hybridisierung

Die folgenden Oligonukleotide wurden für SSH benutzt:

cDNA Primer 1: AACTGCGGCCGCGTACAGCT20VN (V=A, C der G),

cDNA Primer 2: GAGAT20VN,

Adaptor 1: 5_-GTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGCGCCGCAGGGCAGTG-3_,
Adaptor 1 reverse: 5_-CACTGCCCTGCGGG-3_,

Adaptor 2: 5_-GTAATACGACTCACTATAGGGCAGGGCGTGGTGC GCGCTGCTGG-3_,

Adaptor 2 reverse: 5_-CCAGCAGCGCGCAG-3_,

PCR Primer 1: 5_-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3_,

nested Primer 1: 5_-TCGAGCGCGCCGCAGGGCAGTG-3_,

und nested Primer 2: 5_-AGGGCGTGGTGC GCGCTGCTGG-3_.

Primer-Paare für die Real-time RT-PCR

Die folgenden Primer wurden für die Real-time RT-PCR verwendet:

TRA1 (für 5_-TGGCAGAGACCATCGAAAG-3_; rev 5_-GGTAACTTCCCCTTCAGCAG-3_ [120 bp]),

ERP70 (für 5_-TCGACTACATGATGGAGCAG-3_; rev 5_-CCGACTTAAAGACTCCGATG-3_ [117 bp]),

GRP78/ HSPA5 (für 5_-AACGACCCCTGACGAAAGAC-3_; rev 5_-CACTCGAAGAATGCCATTCAC-3_ [129 bp]),

AGR2 (für 5_-AACTCAAACCTGCCCCAGACC-3_; rev 5_-ACAAACTGCTCTGCCAATCTC-3_ [205 bp]),

OVGP1 (für 5_-TG TCCACGTTTTCCAACCG-3_; rev 5_-GGAGGGCGATCACTGAACTG-3_ [856 bp]),

C3 (für 5_-AAGTTCATCAGCCACATCAAG-3_; rev 5_-CACTGTTTCTGGTTCTCCTC-3_ [191 bp]),

MS4A8B (für 5_-CTGACCTGCTACCAAACCAAC-3_; rev 5_-GCCCAAACAAGGGAGGTATTC-3_ [191 bp])

18S rRNA (für 5_-AAGTCTTTGGGTTCGGG-3_; rev 5_-GGACATCTAAGGGCATCACA-3_ [365 bp])

4.1.6 DNA-Molekulargewichtsstandards

Molekulargewichtstandards für DNA:

1 kb DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Gene Ruler™ (100 bp DNA Ladder Plus: SM0321/2/3)	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Gene Ruler™ (100 bp DNA Ladder: SM0241/2/3)	MBI Fermentas, St. Leon Roth

4.1.7 Radiochemikalien

α -[³³ P]-dCTP (2500 Ci/mmol)	Amersham Pharmacia, Freiburg
--	------------------------------

4.1.8 Versuchstiere

Deutsches Fleckvieh Färsen zwischen 22 und 24 Monaten. Aus Offen-Laufstall Haltung mit Tiefstreu. Die Fütterung bestand aus Heu und Grassilage.

4.2 Methoden

4.2.1 Auswahl und Zyklussynchronisation der Tiere

Für den Vergleich der Genexpression zwischen verschiedenen Zykluszeitpunkten ist es von äußerster Wichtigkeit, als Grundlage der Untersuchungen ein standardisiertes und genau definiertes Probenmaterial zur Verfügung zu haben. Aus diesem Grund war es nicht adäquat, Material von Schlachthof-Tieren zu verwenden. Auch das Alter der Tiere und die Haltungsbedingungen sollten so vergleichbar wie möglich sein, um jegliche äußeren Einflüsse auf die Genexpression zu minimieren. Grundsätzlich wurden nur gesunde Fleckvieh Färsen im Alter von 22 bis 36 Monaten in den Versuch aufgenommen. Die Tiere stammten alle aus Offenlaufstallhaltung mit Tiefstreu und die Fütterung erfolgte immer mit Grassilage und Heu. Für jeden Schlachtermin wurde ca. die doppelte Anzahl der benötigten Tiere vorbereitet, um die jeweiligen Tiere im optimalen Zykluszustand auswählen zu können. Die Auswahl erfolgte nach einem detaillierten Bewertungssystem, das extra für diesen Versuch entwickelt wurde, und im folgenden beschrieben wird. Den Tieren wurde zur Zyklussynchronisation im Diöstrus einmalig eine Einzeldosis von 500 µg Cloprostenol (PGF_{2α}, Estrumate; Essex Tierarznei, München) i.m. verabreicht. 24 Stunden nach Verabreichung von PGF_{2α} wurde mit Blutprobenentnahmen aus der Schwanzvene im sechsstündigen Rhythmus begonnen. In ca. dreistündigem Rhythmus wurde das Verhalten der Tiere beobachtet und in Art und Ausprägung notiert. 54 Stunden nach PGF_{2α}-Gabe wurde, ebenfalls in sechsstündigem Intervall, die Ultraschallkontrolle des Uterus und der Ovarien mit den darauf befindlichen Funktionsgebilden begonnen. Zielsetzung war es, den Zeitpunkt des einsetzenden Duldungsreflexes, die Ovulation und durch die nachfolgenden Hormonuntersuchungen den LH-Peak zeitlich so genau wie möglich zu bestimmen. Die endgültige Auswahl aus der Gruppe der vorbereiteten Tiere erfolgte erst am Tag der Schlachtung, zwei Stunden vor dem Schlachtermin. Grundsätzlich sollten die Tiere 45 bis 51 Stunden nach PGF_{2α} Gabe bereits ein Vulvaödem und eine beginnende Rötung der Vaginalschleimhaut aufweisen. 57 bis 63 Stunden nach PGF_{2α}-Gabe sollten die Tiere deutlich ausgeprägte Brunstsymptome, wie

Unruhe, Schwitzen, Aufspringen auf Partnertiere und erhöhte Produktion von Vaginalsehlein zeigen. Der Uterustonos sollte zu diesem Zeitpunkt bereits deutlich erhöht sein. Tiere, die an Tag 0 des Sexualzyklus geschlachtet wurden, mussten seit 9 bis 12 Stunden eine deutliche Brunstsymptomatik zeigen und der Uterustonos sollte deutlich (++) bis stark (+++) erhöht sein; das entspricht einem Zeitintervall von 57 +/- 6 Stunden nach PGF_{2α}-Gabe. Damit sollten zum Zeitpunkt der Schlachtung die maximalen Brunstsymptome mit Duldungsreflex ausgeprägt sein. Der Follikel durfte zum Zeitpunkt der letzten Ultraschallkontrolle noch nicht gesprungen sein, die Färsen mussten aber eine, deutlich als dominanter Follikel identifizierbare, Eiblaste haben. Für die Schlachtung am Zyklustag 3,5 musste der Uterustonos in seiner Intensität bereits wieder nachgelassen haben. Frühestens 70 spätestens 104 Stunden nach PGF_{2α}-Gabe sollte die Ovulation stattgefunden haben. Für die Schlachtung an Tag 12 des Zyklus wurden nur Tiere ausgewählt, die frühestens 70, spätestens 100 Stunden nach PGF_{2α}-Gabe ovuliert hatten. Die Schlachtung erfolgte dann 14 Tage nach PGF_{2α}-Gabe. Nur bei Tieren, die an Tag 18 des Sexualzyklus geschlachtet wurden, wurde ein weniger aufwändiges Protokoll verwendet. Bei diesen Tieren wurde lediglich intensiv die Brunst beobachtet und einige Male die Ovarien mittels Ultraschalltechnik auf entsprechende Funktionsgebilde untersucht, um den Zeitpunkt des Duldungsreflexes und des Eisprunges eingrenzen zu können. Auf eine Bestimmung des LH-Wertes im Plasma wurde verzichtet. 20 Tage nach PGF_{2α}-Gabe wurden diese Tiere geschlachtet.

LOM/Stallnummer:D093..... /						
Geburtsdatum:.....						
Haltungsbedingungen:						
Erkrankungen/Besonderheiten:.....						
Datum	Uhrzeit	Brunst	Uteruston	Sono Ovar		Bemerkungen
				Li	Re	
04.02.03	09:00					
04.02.03	15:00					
04.02.03	21:00					
05.02.03	06:00					
05.02.03	12:00					
05.02.03	18:00					
06.02.03	00:00					
06.02.03	06:00					
06.02.03	12:00					
06.02.03	18:00					

Abbildung 6: Tierprotokoll:

Dieses Protokoll wurde für jedes Tier zunächst per Hand ausgefüllt und danach in eine zentrale Datenbank übertragen. Der Eintrag der Ultraschall-Ergebnisse in das Protokoll erfolgte nur mit klinisch allgemein anerkannten Abkürzungen und für Brunstsymptome wurden Abkürzungen in Form von Zahlen vereinbart (Tabelle1). Diese sind in der Spalte „Bemerkungen“ eingetragen worden und mit Hilfe der Tabelle 2 wurde dann die Stärke der Brunst ermittelt.

1	Aufspringen
2	Duldungsreflex
3	Vaginalschleim
4	Schwitzen, Unruhe
5	Vulvaödem, Rötung

Tabelle 1: Brunstsymptome

+	1 oder 4 oder 5 oder 1 & 4
++	1 & 4 & 5 oder 3 oder 1 & 2 oder 1 & 3 oder 2 & 5
+++	2 & 3 oder 3 & 4 & 5 oder 2 & 4 & 5 oder 1 & 2 & 4 & 5 oder 1 & 3 & 4 & 5 oder 1 & 2 & 4 oder 1 & 2 & 5 oder 1 & 3 & 4 oder 1 & 3 & 5

Tabelle 2: Beurteilung der Brunstsymptome

4.2.2 Probenentnahme

Schlachtung der Tiere

Die Schlachtung der Tiere erfolgte routinemäßig in gemeldeten Schlachthäusern oder Metzgereien. Nach der Schlachtung erfolgte umgehend die Präparation des Eileiters noch in der Schlachthalle.

Eileiterpräparation

Zunächst wurde das Ovar aufgesucht. Am Ovar befindet sich das Infundibulum. Zwischen Infundibulum und Ovar wurde die Mesosalpinx mit der spitzen Schere durchschnitten und möglichst nah am Eileiter auf seiner ganzen Länge bis kurz vor den utero-tubaren Übergang durchtrennt. Um den Eileiter vom Uterus zu trennen, erfolgte der erste Schnitt mit einer spitzen Schere in der Uterushornspitze (siehe Abbildung 7 Nummer 1). Erst dann wurde der Übergang zum Eileiter durch einen Schnitt im Isthmus-Bereich abgetrennt (siehe Abbildung 7 Nummer 2). Der utero-tubare Übergang wurde mit einem Skalpell vom restlichen Eileiter getrennt und für die Histologie fixiert. Nun wurde der Eileiter auf einem herkömmlichen Küchenschneidbrett aus Plastik in seiner ganzen Länge ausgebreitet und mit zwei Kanülen dicht an der Ansatzstelle des Gekröses auf dem Brett fixiert. Mit Hilfe der spitzen Pinzette und dem Skalpell wurde das Gekröse so vollständig wie möglich entfernt. Die sorgfältige Präparation des Eileiters war für die nachfolgenden Schritte von entscheidender Bedeutung. Waren alle Eileiterbänder und das Gekröse entfernt, erfolgte die Einteilung in die funktionalen Abschnitte mit Hilfe eines Skalpells. Das Infundibulum wurde ausgebreitet. Daran schließt sich direkt die Ampulle an. Sie ist etwas dicker, in der Palpation weicher und meist etwas rötlicher gefärbt als der Isthmus. Das längste und dünnste Stück des Eileiters ist der Isthmus. Das Infundibulum wurde durch einen Skalpell-Schnitt von der Ampulle getrennt (siehe Abbildung 7 Nummer 3). Von der Ampulle wurde am distalen Ende ein 1,5 – 2 cm langes Stück für nachfolgende histologische Untersuchungen mit einem geraden Schnitt

abgetrennt und in Bouin und Formol fixiert. Der Übergang von Ampulle zum Isthmus konnte nicht genau definiert werden. Deshalb wurde in diesem Bereich ein ca. 1 cm langes Stück herausgeschnitten und verworfen (siehe Abbildung 7 Nummern 4 und 5). Aus dem Isthmus wurde am proximalen Ende anschließend ebenfalls ein 1,5 - 2 cm langes Stück mit einem glatten Skalpellsschnitt für histologische Studien abgetrennt und fixiert.

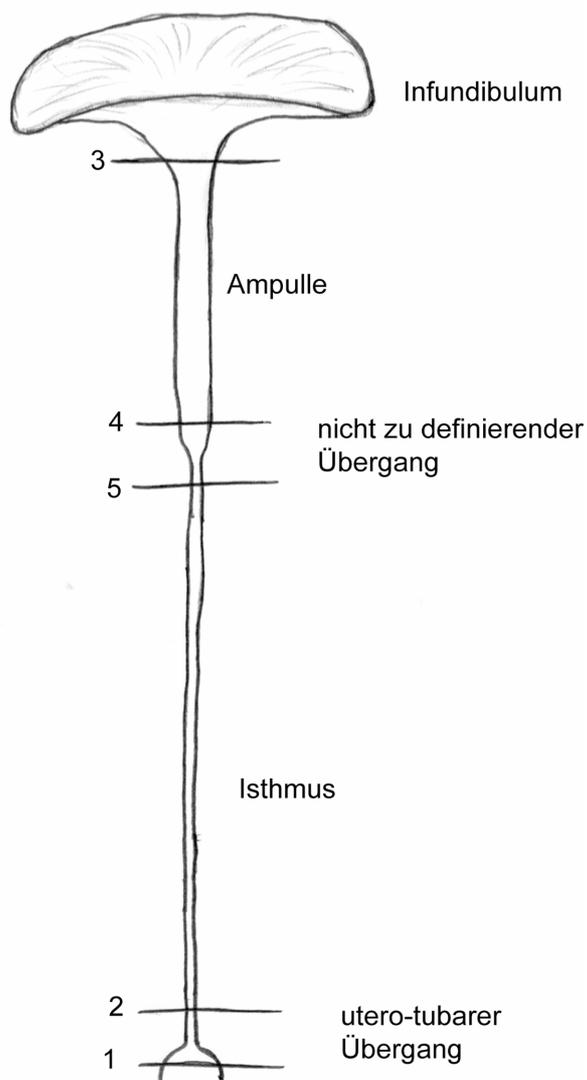


Abbildung 7: Abschnitte des Eileiters

Der frei präparierte und ausgebreitete Eileiter wird in seine Abschnitte unterteilt. 1: die Schnittstelle für die Abtrennung vom Uterus. 2: die Abtrennung des utero-tubaren Überganges. 3: die Trennung des Infundibulums von der Ampulle. 4: und 5: das Verwerfen des makroskopisch nicht zu definierenden Stückes im Übergang von Ampulle zu Isthmus.

Probengewinnung

Das Epithel wurde durch Ausstreifen gewonnen. Dazu wurden die Ampulle und der Isthmus zunächst in ca. 1 cm lange Teilstücke geschnitten. Ein Ende wurde mit der anatomischen Pinzette gefasst, das andere freie Ende wurde nahe an den Rand des entsprechenden Kryoröhrchens gehalten. Dann wurde das Teilstück kurz unterhalb der anatomischen Pinzette mit einer spitzen Pinzette umfasst und diese unter gleichmäßigem Druck nach unten gezogen. Dadurch löste sich das Epithel als gelblicher, zähflüssiger „Tropfen“ aus dem Eileiterstück und wurde in das Tiefgefrierrohrchen überführt. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis kein Epithel mehr gewonnen werden konnte, jedoch maximal drei Mal, da das Gewebe sonst zu stark geschädigt und die Probe verunreinigt würden. Durch diese Methode ist sichergestellt, dass ausschließlich die Epithelzellen gewonnen wurden, da die Bindegewebszellen deutlich fester auf ihrer Unterlage verankert sind und sich durch angemessenen Kraftaufwand nicht aus dem Eileiter herausstreifen lassen.

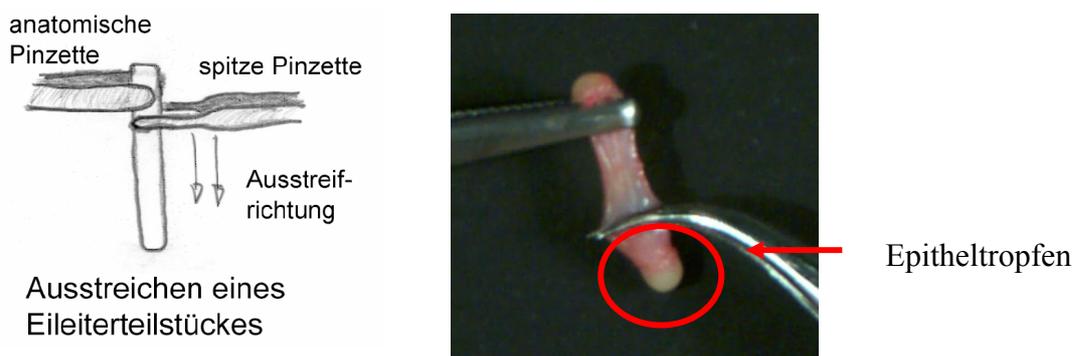


Abbildung 8: Gewinnung des Eileiterepithels

In der linken Abbildung ist schematisch das Vorgehen beim Ausstreifen der Eileiter-Teilstücke gezeigt. Man fasst das Eileiter-Teilstück an einem Ende mit einer anatomischen Pinzette und streift mit mäßigem Druck mit einer spitzen Pinzette aus. In der rechten Abbildung ist dieser Vorgang mit einem Nativpräparat abgebildet und das Eileiterepithel als gelblicher Tropfen am unteren Ende des Teilstückes zu erkennen.

Zur Gewinnung des Infundibulum-Epithels wurde der Fimbrientrichter mit der Schleimhautseite nach oben auf dem Brett ausgebreitet. Das Epithel wurde mit einem scharfen Löffel, unter leichtem Druck, abgeschabt und mit der Spitze einer anatomischen Pinzette vom Löffel in das Probenröhrchen überführt. Ein Ausstreifen des Epithels und damit eine Vermeidung von Verunreinigungen durch Bindegewebszellen, war hier aus praktischen Gründen leider nicht möglich. Die Kryoröhrchen werden sofort in fein zerkleinertes Trockeneis überführt, um ein schnelles Einfrieren der Proben zu gewährleisten. Der Transport

erfolgt in entsprechenden Transportbehältern (Voyager 5, Air Liquide, Paris, Frankreich) und die Lagerung bei – 80 °C.

Um gleiche Bedingungen bei der Probenentnahme zu gewährleisten, wurde stets mit der Präparation des ipsilateralen Eileiters begonnen, und es wurde immer auf eine hohe Luftfeuchtigkeit im Raum geachtet, um ein Austrocknen des kontralateralen Eileiters bis zur Weiterverarbeitung zu verhindern. Die Zeit vom Bolzenschuss bis zur Tiefgefrierung der letzten Probe betrug nie mehr als 20 Minuten. Pro Schlachtermin wurden jeweils maximal 4 Tiere geschlachtet, um ein optimales Probenhandling zu gewährleisten.

Probennomenklatur

Den geschlachteten Tieren wurde eine fortlaufende Versuchsnummer zugeordnet, die das Tier im Folgenden unverwechselbar machte und versuchsintern das Tier identifizierte. Auf jeder Probe wurde weiterhin der jeweilige Zyklustag, an dem das Tier geschlachtet wurde, vermerkt. Außerdem wurde die Probe durch die Bezeichnung der ipsilateralen bzw. kontralateralen Seite und des jeweiligen Eileiterabschnittes definiert. Auch das jeweilige Teilprojekt der Forschergruppe, für welches die Probe entnommen wurde, wurde auf das Etikett geschrieben. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: „A“ = Ampulle, „I“ = Isthmus, „T“ = Infundibulum, „G“ = Gesamteileiterepithel, „i“ = ipsilateral, „c“ = kontralateral, „R“ = Proben für das Projekt Transkriptomics, „P“ = Proben für das Projekt Proteomics, „H“ = Proben für die Histologie, „Z“ = Proben für die Zellkultur.

Das Probenetikett machte jede Probe unverwechselbar und eindeutig zuordenbar.

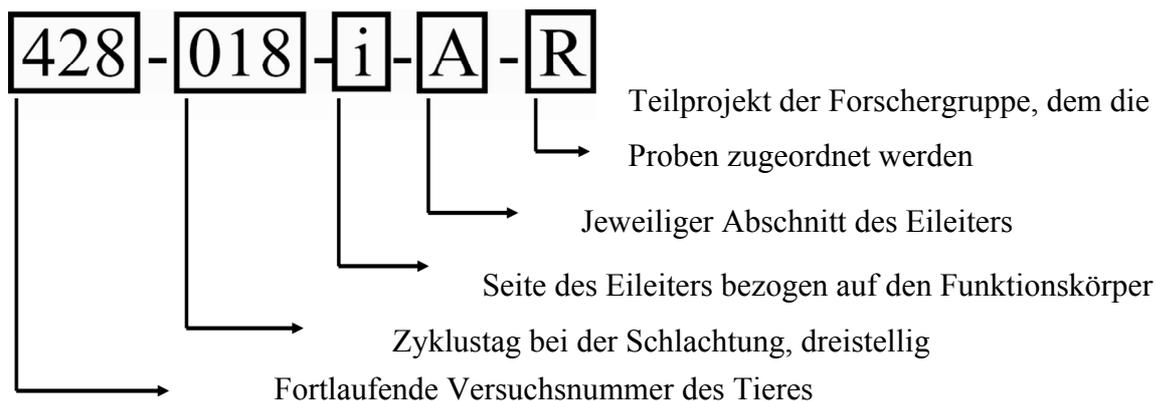


Abbildung 9: Proben-Identifikationsnummer

Diese Proben-Identifikationsnummer kennzeichnete jedes Kryoröhrchen mit Gewebeproben und auch alle weiteren daraus gewonnenen Proben (z.B. RNA, cDNA oder Proteine). Damit ist jede Probe die im Verbund der Forschergruppe existiert eindeutig einem Tier, einem Zyklustag und dem jeweiligen anatomischen Abschnitt zuzuordnen.

4.2.3 Agarosegelelektrophorese, allgemein

Durch Agarosegelelektrophorese kann man Nukleinsäuren mit Hilfe des Molekularsieveffekts der Agarose trennen. Agarose bildet je nach Konzentration ein dreidimensionales Netz, durch das die Nukleinsäure hindurch wandert, wenn ein elektrisches Feld angelegt wird und die Nukleinsäure mit den negativen Phosphatgruppen von der Kathode zur Anode wandert. Je kleiner eine Nukleinsäure ist, desto schneller wandert sie in Richtung Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit verhält sich bei linearisierten doppelsträngigen Molekülen im Agarosegel umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts. Dadurch können komplexe Nukleinsäuregemische mit Fragmenten unterschiedlichster Länge nach der Größe aufgetrennt werden. Die Sichtbarmachung erfolgte mittels Ethidiumbromid (EtBr). Es handelt sich hierbei um einen fluoreszierenden Farbstoff, der in die Nukleinsäure interkaliert, wobei bis zu drei Moleküle pro 10 Basenpaare eingelagert werden. Durch die Interkalierung verändert sich das Emissionsspektrum des EtBr und es kann durch UV-Licht unterschiedlichster Wellenlängen angeregt werden und ist dann auch mit bloßem (aber vor der UV-Strahlung geschütztem) Auge sichtbar. Das EtBr wurde sowohl in das Gel als auch in den Laufpuffer in einer Konzentration von 0,5 µg/ml gegeben. EtBr ist positiv geladen und läuft zur Kathode, deshalb muß es auch im Puffer vorhanden sein, da es sonst nur zu einer sehr schwachen Bandenfärbung kommt. Vor der Zugabe des EtBr musste die entsprechende Menge Agarose zunächst durch Aufkochen vollständig in Wasser gelöst werden. Hierbei war zu beachten, dass beim Aufkochen Wasser verdampfte, das anschließend wieder zugefügt werden musste. Erst nach dem Aufkochen wurde die Stammlösung aus TBE-Puffer und EtBr zugesetzt, da EtBr einen verhältnismäßig großen Dampfdruck besitzt und beim Aufkochen mit verdampfen würde. Zudem könnte die Borsäure mit der Agarose reagieren und die Laufeigenschaften des Gels verändern.

Zur Dokumentation wurde ein Agarosegel-Dokumentationsgerät (Eagleeye II, Stratagene, Heidelberg) benutzt. Die Gele wurden auf einen Transilluminator gelegt. Bei einer Wellenlänge von 256 nm bekommt man ein besonders klares Bild und es können auch geringe Mengen der Nukleinsäure noch deutlich nachgewiesen werden. Allerdings führt ein so hoch energetisches Licht zu Strangbrüchen in der Nukleinsäure und ist dann im Nachhinein nicht mehr zu verwenden. Hier wurden für Analysen von cDNA und RNA immer ein Transilluminator mit einer Wellenlänge von 256 nm (Bachofer, Reutlingen) verwendet und bei der Kontrolle der Kolonie-PCR für die Array Herstellung ein Transilluminator mit einer Wellenlänge von 366 nm (Bachofer, Reutlingen).

4.2.4 Isolierung von RNA

Aus den gewonnen Gewebeproben wurde die Gesamt-RNA mittels Trizol™-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Zu 50–100 mg tiefgefrorener Probe wurde 1 ml Trizol™-Reagenz gegeben. Anschließend wurde das Gewebe umgehend mit einem Gewebe-Homogenisator (DIAX 900, Heidolph, Schwabach) aufgeschlossen. Dann wurde das Homogenisat 5 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt, damit noch vorhandene Ribonukleoprotein-Komplexe vollständig dissoziieren konnten. Anschließend wurden 200 µl Chloroform pro eingesetztem Milliliter Trizol™-Reagenz zugegeben, kräftig 15 Sekunden per Hand geschüttelt und 2 – 3 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Um die einsetzende Phasentrennung zu beschleunigen, wurde 15 Minuten bei 12000 x g bei 2-8 °C zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren waren die untere organische Phase und die obere wässrige Phase deutlich durch eine Interphase getrennt. Die wässrige obere Phase enthielt die RNA und wurde so vollständig wie möglich abgenommen. Das Volumen der wässrigen Phase betrug ca. 60 % der eingesetzten Trizol™-Reagenz Menge.

Die RNA wurde dadurch gefällt, dass ihr Wasser entzogen wurde. Das erreichte man durch Zugabe von Alkohol und Salzen. Das Salz war im Trizol™-Reagenz bereits enthalten. Pro eingesetztem Milliliter Trizol™-Reagenz wurde 500 µl Isopropanol zugegeben. Nach dem Mischen der Lösungen wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 2-8 °C bei 12000 x g zentrifugiert.

Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren zügig abgegossen und 1 ml 75 % Ethanol pro eingesetztem ml Trizol™-Reagenz zugeben. Anschließend wurde wieder für 5 Minuten bei 7500 x g bei 2-8 °C zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Nach erneuter kurzer Zentrifugation wurde die restliche Flüssigkeit vorsichtig abpipettiert. Bei diesem Arbeitsschritt wurden die verbliebenen Salze aus der Fällungsreaktion mit dem 75%igen Ethanol gewegewaschen.

Das RNA-Sediment wurde anschließend an der Flamme getrocknet, bis es durchsichtig war. Zum Lösen wurde 100 µl RNase freies Wasser zugegeben, der Ansatz anschließend 10 Minuten bei 58 °C im Thermomixer inkubiert und danach noch ca. eine halbe Stunde auf Eis gelöst.

Die RNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines UV-Spektrometers (DU640, Beckman, München) in einer 1:70 Verdünnung in TE-Puffer bestimmt. Vor Beginn der eigentlichen Messung, wurde das Lösungsmittel ohne RNA, das heißt TE-Puffer, als Standard gemessen. Das Gerät misst die Lichtintensität des Lichtstrahles, der durch eine Quarzküvette mit der zu messenden Probe geführt wird. Durch den Quotienten aus der Lichtintensität bei Messung des

reinen Lösungsmittels im Verhältnis zur Messung mit der Probe errechnet sich die Absorption des Lichtes durch die RNA. Der dekadische Logarithmus dieses Quotienten $\log_{10}(I_0/I)$ ergibt die optische Dichte (OD) der Probe. Die OD der Probe wird bei 260 nm und bei 280 nm gemessen, wobei der Quotient aus beiden Messungen wiederum charakteristisch für RNA bzw. DNA ist. RNA hat charakteristischer Weise einen Quotienten von 2,1 und DNA von 1,8. Da es aber zu einer unerwünschten Lichtbrechung in den Lösungen durch eventuell enthaltene Mikropartikel kommen kann, führt das Gerät vor jeder Probenmessung 10 Messungen in einem Wellenlängenbereich von 400 nm bis 320 nm durch und bestimmt auf Grund dieser Messergebnisse einen individuellen Korrekturfaktor für jede Probe bei 260 nm und bei 280 nm Wellenlänge. Der ideale Messbereich für das Gerät liegt innerhalb eines OD Bereiches von 0,1 bis 0,8. In diesem OD-Bereich entspricht eine OD einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml RNA.

Anschließend wurde die RNA-Qualität mittels Agarosegelelektrophorese in einem 1%igen Gel (SEAKEM[®]-Agarose) mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid beurteilt. Es wurde darauf geachtet, dass die Gel-Apparatur und die verwendeten Reagenzien möglichst RNase-frei waren, da es sonst während des Laufprozesses im Gel zur RNA-Degradation kommen könnte. Es wurden von jeder Probe ca. 250 ng RNA im Gel aufgetrennt, damit die Qualität der einzelnen RNAs besser vergleichbar war. Die Feldstärke für das Einlaufen ins Gel betrug 3 V/cm für 18 min und für den Hauptlauf 5 V/cm für 1 bis 1,5 Stunden. Anschließend wurde das Gel mittels eines Agarosegel-Dokumentationsgeräts auf einem UV-Transilluminator (254 nm, Bachofer, Reutlingen) fotografiert. Zur genauen Durchführung einer Agarosegelelektrophorese siehe weiter Kapitel 4.2.3.

4.2.5 cDNA-Synthese

RNA-Probenvorbereitung:

Die eingesetzte Menge an Gesamt-RNA pro Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese beträgt 50 µg. Für die cDNA-Synthese wurde die RNA durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen 3 M NaOAc pH 5,2 gefällt. Der Ansatz wurde 10 min bei RT inkubiert und anschließend 10 min bei 25.000 x g und 18 °C zentrifugiert. Nach dem Abgießen des Überstandes wurde das Sediment mit 500 µl 75 % EtOH gewaschen, für 10 min bei 25000 x g und 18 °C zentrifugiert und der Überstand wieder abgegossen. Nach erneuter kurzer Zentrifugation und Entfernung des restlichen Überstandes wurde das Sediment an der Flamme getrocknet und anschließend in 13,5 µl Wasser ca. 30 Minuten auf Eis gelöst.

Erststrangsynthese:

Zur RNA wurden 0,5 µl cDNA-Synthese-Primer (100 pmol/µl) zugegeben. Anschließend wurde die RNA für 10 min bei 80 °C im Wasserbad denaturiert und danach sofort in einem Eis/EtOH-Bad abgeschreckt, damit die durch die Erhitzung denaturierte RNA nicht wieder doppelsträngige Bereiche ausbilden konnte. Danach wurden auf Eis 11 µl Mastermix (Tabelle 3) zugegeben und gemischt.

Chemikalien	Menge [µl]
RNase-Inhibitor (40 U/µl, Roche)	0,5
5 x Erststrang-Puffer (Invitrogen)	5,0
100 mM DTT (Invitrogen)	2,5
dNTP-Mix (10 mM each, Invitrogen)	1,0
Superscript III (200 U/µl, Invitrogen)	2,0

Tabelle 3: Mastermix für die Erststrangsynthese (1 Reaktion)

Anschließend wurden der Reaktionsansatz für 10 min bei 37 °C in einem Thermomixer (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg) und 80 min bei 45 °C in einem Hybridisierungsofen (VT 5042 EK, Heraeus, Langenselbold) inkubiert. Die Reverse Transkriptase synthetisierte ausgehend vom cDNA-Synthese-Primer, der mit dem poly-(A)-Schwanz hybridisiert, vom 3'-Ende der RNA zum 5'-Ende einen komplementären DNA-Strang, die sogenannte cDNA (complementary DNA). Anschließend wurden die Reaktionsansätze wieder auf Eis abgekühlt. Wichtig für alle Schritte bis hierher war RNase-freies Arbeiten.

Zweitstrangsynthese:

Chemikalien	Menge [µl]
Wasser	86,0
5 x Zweitstrang-Puffer (Invitrogen)	30,0
dNTP-Mix (10 mM each)	3,0
E. coli DNA-Ligase (10 U/µl, Life Technologies)	1,0
E. coli DNA-Polymerase I (10 U/µl, Life Technologies)	4,0
E. coli RnaseH (2 U/µl, Life Technologies)	1,0

Tabelle 4: Mastermix für die Zweitstrangsynthese (1 Reaktion)

Auf Eis wurden 125 µl Zweitstrang-Mastermix (Tabelle 4) zugegeben, gemischt und der Reaktionsansatz für 2,5 h bei 16 °C im Wasserbad inkubiert. Dabei baute die RNaseH

spezifisch RNA ab, die als RNA/DNA-Doppelstrang vorlag. Das Verhältnis von RNaseH zur DNA-Polymerase I war so eingestellt, dass die RNA nur partiell abgebaut wurde und verbliebene RNA-Stückchen als Primer für die Zweitstrangsynthese dienen konnten. Die DNA-Ligase schloß dabei entstehende Einzelstrangbrüche. Zur Beendigung der Reaktion und Inaktivierung der Enzyme wurde der Reaktionsansatz für 10 min bei 75 °C im Wasserbad hitzeinaktiviert.

Abbau der ribosomalen RNA:

Nachdem der Zweitstrang synthetisiert wurde, musste alle verbliebene RNA, hauptsächlich ribosomale RNA, abgebaut werden. Hierfür wurden 3 µl RNase (0,5 mg/ml, DNase-frei, Roche) zugegeben, und die Reaktion für 90 min bei 37 °C im Thermomixer für den RNA-Abbau inkubiert.

Reinigung der cDNA:

Die nicht eingebauten Nukleotide, Primer und kleine Synthese- oder Abbauprodukte (< 200 bp) wurden durch eine Gelfiltration (Microspin S-200 HR, Amersham Bioscience, Stadt) abgetrennt. Hierfür wurde zunächst der Puffer aus den Säulchen durch Zentrifugation für 1 min bei 700 x g entfernt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf die Säule gegeben und 2 min bei 700 x g zentrifugiert. Im Eluat befindet sich nun die neu synthetisierte cDNA und in den Säulen Nukleotide, Primer und kleinere Produkte unter 200 bp. Die Kügelchen haben Mikro-Poren, in die kleine DNA/RNA-Stücke und Nukleotide passen, große DNA-Stücke hingegen nicht. Diese laufen zwischen den Kügelchen durch die Säule und werden damit vor den Nukleotiden im Eluat aufgefangen.

Zur Fällung der gereinigten cDNA wurde in einem Volumenverhältnis von 1:1 Isopropanol und in einem Volumenverhältnis von 1:10 3 M NaOAc zugegeben. Nach kurzem Mischen wurde der Reaktionsansatz 10 min bei RT stehen gelassen und anschließend für 30 min bei 25000 x g und RT zentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend, wie oben beschrieben, gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die cDNA in 20 µl 0,5 x TE-Puffer pH 8,0 gelöst.

4.2.6 Erstellen von cDNA-Arrays

Bakterienkulturen für die Kolonie-PCR

Aus der Dauerkultur der subtraktiven Banken wurden 10 µl entnommen, mit 150 µl LB-Medium verdünnt mit einem Drigalsky-Spatel auf vorgetrockneten LB-Agar-Platten (100

µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Plasmide, in die das cDNA-Konstrukt eingebaut wurde, enthielten ein Gen für eine Ampicillin Resistenz. Daher konnte man bei jeder Kolonie, die auf dem Ampicillin-haltigen Agar wuchs, davon ausgehen, dass zumindest das Plasmid erfolgreich eingeschleust wurde.

Wichtig war es, alle Arbeiten unter sterilen Bedingungen durchzuführen.

In 96-well-Zellkulturplatten wird 100 µl LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin vorgelegt. Von den Agar-Platten mit den *E.coli*-Kolonien der subtraktiven Bibliotheken wurden die Einzelkolonien mit sterilen Plastikborsten (Küchenbesen oder -bürste) in jeweils eine Vertiefung der 96-well Zellkulturplatte überführt. Diese Zellkulturplatten wurden über Nacht bei 37 °C und 400 Umdrehungen pro min geschüttelt, jedoch nicht länger als 16 Stunden, da sonst die Plasmid-Ausbeute gesunken wäre.

Es wurden insgesamt 3072 *E.coli*-Bakterienkolonien gepickt und kultiviert.

In 96-well PCR-Platten (AbGene, Hamburg) wurden pro Vertiefung 40 µl TE-Puffer auf Eis vorgelegt. In die Vertiefungen wurden anschließend je 2 µl der Bakteriensuspensionen überführt. Zur Lyse der Bakterien wurden die verdünnten Bakteriensuspensionen für 15 min bei 96 °C erhitzt. Die lysierten Bakteriensuspensionen wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

Amplifizierung der cDNA-Fragmente aus den Bakteriensuspensionen

Chemikalien	Menge [µl]
Primer NLT7 15 pmol/µl	0,4
Primer LT3 15 pmol/µl	0,4
dNTPs, 10 mM	0,4
10x Reaktionspuffer	2,0
Taq DNA Polymerase (peQLab), 5U/µl	0,2
ddH ₂ O	14,6

Tabelle 5: Mastermix für PCR (1 Reaktion)

18 µl des Mastermixes (Tabelle 5) wurden in die Vertiefungen einer 96-well PCR-Platte vorgelegt. Anschließend wurden je 2 µl der lysierten Bakteriensuspensionen zugegeben. Die PCR-Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen.

Programmschritt	Temperatur und Zeit	Wiederholungen
1. Schritt	96 °C 2 min	
2. Schritt	94 °C 25 sec	} 24 x
3. Schritt	64 °C 25 sec	
4. Schritt	72 °C 90 sec	} 15 x
5. Schritt	94 °C 25 sec	
6. Schritt	62 °C 25 sec	
7. Schritt	72 °C 90 sec	
8. Schritt	72 °C 300 sec	
9. Schritt	20 °C ∞	

Tabelle 6: Temperaturprofil für die Kolonie-PCR

Durch Verwendung der Vektor-spezifischen Primer LT3 und NLT7 wurde sichergestellt, dass nur das in die Plasmide ligierte cDNA-Konstrukt amplifiziert wurde.

Agarosegelelektrophorese der PCR-Reaktionen

Für die Agarosegelelektrophorese der Kolonie-PCR wurden 4,5 µl einer einfach konzentrierten HSE Lösung in einer 96-well PCR-Platte vorgelegt. Anschließend wurden 0,5 µl des PCR-Produktes dazu gegeben. Die Proben wurden mit Hilfe einer 12-Kanal-Multipipette (Typ, Hersteller) in die Taschen eines 0,8%igen Gels mit EtBr (0,5 µg/ml) und einfach konzentriertem TBE überführt. Als Molekulargewichtstandard wurde der GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (20 ng/µl) verwendet. Anhand der Fragmente des Molekulargewichtsstandards, konnte die ungefähre Größe der aufgetrennten Nukleinsäuren durch den Vergleich mit dem Marker bestimmt werden. Als Feldstärke für das Einlaufen ins Gel wurden 2 V/cm für 18 min und als Feldstärke für den Hauptlauf 4 V/cm ebenfalls für 18 min gewählt. Bei der Kontrolle der Kolonie-PCR für die Array-Herstellung wurde ein Transilluminator mit einer Wellenlänge von 366 nm (Bachofer, Reutlingen) verwendet. Im Gelbild konnte der Erfolg der cDNA Amplifizierung der Kolonie-PCR kontrolliert werden. Man konnte auf dem Foto ebenfalls erkennen, ob ein *E.coli*-Klon ein Plasmid ohne cDNA-Fragment aufgenommen hat oder ob versehentlich in ein und dieselbe Zellkulturvertiefung zwei verschiedene *E.coli*-Klone mit zwei unterschiedlichen cDNA-Konstrukten gerieten. Auf diese Art und Weise wurden alle 3072 PCR-Produkte analysiert.

Vorbereitung der 384-well-Platten:

Das Gerät zum Drucken der Arrays arbeitete mit 384-well Mikrotiterplatten. Den PCR-Reaktionen musste außerdem ein spezieller Puffer zugesetzt werden. Aus diesem Grund wurden die PCR-Reaktionen aus den 96-well-PCR-Platten in 384-well Mikrotiterplatten überführt. In jede Vertiefung der 384-well-Platten wurden 15 µl eines 2 x Probenpuffers (40 mM Tris/HCl, pH 8, 2 M NaCl, 2 mM EDTA, 600 µl BPB pro 50 ml) vorgelegt. Anschließend wurden in jede Vertiefung 16 µl der PCR-Reaktionen zugegeben und dabei gemischt. Die Platten wurden dann über Nacht im Kühlschrank bis zum Spotten am nächsten Tag gelagert. Mussten sie länger gelagert werden, geschah dies bei -20 °C.

Vorbereitung der Membranen

Zur Herstellung der Arrays wurden positiv geladene Nylon-Membranen (Nytran Supercharge, Schleicher&Schuell, Dassel), verwendet. Auf ihnen haftete die negativ geladene DNA besonders gut. Aber neben DNA würden auch andere negativ geladene Dinge, wie z. B. Staubpartikel, auf den Membranen haften und starke Hintergrundsignale verursachen. Aus diesem Grund war hier sauberes Arbeiten und das Tragen von Handschuhen von besonderer Wichtigkeit. Zum Anfassen der Membranen wurde eine Briefmarken-Pinzette benutzt, um Fingerabdrücke zu vermeiden.

Zunächst wurden die Membranen 5 min in Reinstwasser und anschließend 5 min in Ethanol (100%) gewaschen. Das Trocknen erfolgte an der Luft auf Filterpapier (GB002, Schleicher&Schuell, Dassel). Anschließend wurden die Membranen auf eine Größe von 7,4 x 2,4 cm zugeschnitten und auf einer Seite am Rand mit Heißleim mit zwei Klebepunkten auf Glasobjektträgern (Roth, Karlsruhe) befestigt.

Spotten der Arrays

Das Drucken der Arrays auf die Nylon Membranen erfolgte mit Hilfe eines Omnigrid Accent Spotting-Roboters (GeneMachines, San Charlos, CA, USA) und solid pins (SSP015, diameter 0,015 inches; Telechem International, Sunnyvale, CA, USA). Der Spotter bestand aus einem in einer Schiene beweglichen Robotterarm, an dem der Druckkopf mit den Steckplätzen für die Pins befestigt war. Für das Reinigen der Pins waren ein Ultraschall-Waschbad mit stationärem Waschpuffer, ein Wasserbad mit Wasserdurchfluss und eine Lufttrockenstation vorhanden. Für die Befestigung der Glasobjektträger mit den Membranen waren 5 Halteschienen für jeweils 10 Slides vorgesehen. Die Halteschienen waren magnetisch im Spotter befestigt. Weiterhin könnten maximal drei Mikrotiterplatten mit zu spottenden Proben

im Gerät befestigt werden. Durch das verschließbare Gehäuse konnte eine, von der Raumluft abweichende, Luftfeuchtigkeit im Gerät erzeugt werden. Die Arrays für diese Untersuchung, wurden alle bei 45 % Luftfeuchte gedruckt. Vor dem Spotten wurden die Pins in 60% Isopropanol äquilibriert, um Ablagerungen an den Pins zu vermeiden. Die auf den Objektträgern befestigten Membranen wurden im Gerät auf den Halterungen fixiert. Durch die Luftfeuchte im Gerät dehnten sich die Membranen etwas aus und wurden dann an den freien Enden auf der Unterseite mit einem Tropfen Kleber (Scotch Prittstift) befestigt, um eine Wellung der Membranen und damit ein Verwischen der Spots beim Druckvorgang zu vermeiden. Jede Probe wurde sechsmal auf die gleiche Position gedruckt, um eine gleichmäßige und ausreichende Probenmenge aufzutragen. Zwischen jeder Probe wurden die Pins nach einem speziellen Schema gereinigt: 2 s Waschbad, 2 s Ultraschall, 2 s Waschbad, 2 s Trockenstation. Wenn eine Mikrotiterplatte gewechselt wurde, wurde das Waschprotokoll zwei Mal durchgeführt. Die Waschlösung im Ultraschallbad bestand aus 0,1% SDS und aus einer 0,005 fach konzentrierten PBS Lösung. Ein Array enthielt 1536 PCR-Produkte auf einer Fläche von 20 x 50 mm. Es wurde mit 4 x 12 Pins gedruckt, wobei ein Pin 6x6 Spots druckt. Der Spotdurchmesser betrug 750 µm und es befanden sich insgesamt 1728 Positionen auf dem Array, wovon 192 für Blanks und für 1536 cDNAs verwendet wurden. Deshalb mussten die insgesamt 3072 PCR-Produkte auf zwei Arrays mit je 1536 Proben (768 cDNAs von jeder subtraktiven Bibliothek pro Array) verteilt werden. Pro Druckvorgang wurden jeweils ca. 25 Arrays gedruckt.

Denaturierung und Fixierung der Proben auf den Membranen

Nach dem Drucken wurden die Membranen zunächst auf der linken Seite (später bei der Auswertung unten) beschriftet, damit nach dem Entfernen der Glasobjektträger noch die Orientierung der Membran zu erkennen war. Danach wurden sie durch einen glatten Scherenschnitt von den Objektträgern gelöst. Um die aufgedruckte doppelsträngige cDNA später für die Hybridisierung zugänglich zu machen, musste sie auf den Membranen denaturiert werden. Hierfür wurden die Arrays auf ein dünnes Filterpapier (20 x 30 cm, GB002, Schleicher&Schuell, Dassel) und zwei dicke Filterpapiere (20 x 30 cm, GB004, Schleicher&Schuell, Dassel), die mit 0,5 M NaOH getränkt waren, für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei war es wichtig, dass die NaOH immer frisch hergestellt wurde, da sie bei längerer Lagerung mit dem CO₂ der Luft reagiert. Anschließend wurden die cDNAs durch Backen bei 80 °C für 30 Minuten im Ofen und UV-Bestrahlung (120 mJ/cm², XL-1500 UV Crosslinker; Spectronics Corp., New York, USA) fixiert.

4.2.7 Array Hybridisierung

Vorhybridisierung der Membranen:

Je 5 Arrays wurden zum Blockieren der Membranen in eine Hybridisierungsröhre (15 cm, Glas, VWR) verbracht. In diesem Arbeitsschritt wurden die noch freien Bindungsstellen der Membran blockiert, damit beim nachfolgenden Hybridisierungsexperiment die cDNA der Sonde nicht unspezifisch an die Membran binden konnte. Das SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) band dabei mit seiner hydrophilen, negativ geladenen Sulfat-Gruppe an den noch freien Stellen der hoch positiv geladene Membran. Die hydrophoben Schwänze, die von der Membran abstehen, verhinderten bei der anschließenden Hybridisierung ein unspezifisches Binden der cDNA-Sonde an die Membran.

Blockierungsprotokoll:

2 x 10 min 10 ml 1 x PBS / 10 % SDS bei 65 °C

1 x 10 min 10 ml 1 x PBS / 10 % SDS dabei von 65 °C auf 85 °C

2 x 10 min 10 ml 0,1 x PBS / 1 % SDS bei 85 °C

1 x 10 min 10 ml 1 x PBS / 10 % SDS bei 65 °C

10 ml 1 x PBS / 10 % SDS bei 65 °C bis zur Weiterverarbeitung

Radioaktive Markierung der cDNA

Der Nachweis der Expressionshöhe der in Form von cDNAs aufgetragenen Gene erfolgte mittels radioaktiv markierter cDNA-Sonden, die mit den cDNAs auf den Arrays hybridisiert wurden. Zuerst wurden je 50 µg Gesamt-RNA von sechs Tieren (Östrus n=3, Diöstrus n=3) in doppelsträngige cDNA umgeschrieben (im wesentlichen wie oben beschrieben aber unter Verwendung von cDNA Primer 2). Zur Markierung der doppelsträngigen cDNAs wurde der High-Prime-Mix (Roche) verwendet, der auf dem Verfahren nach Feinberg & Vogelstein (Feinberg & Vogelstein 1984)(1983 und 1984) beruht. Pro Markierungsreaktion wurde eine Menge an cDNA eingesetzt, die etwa 7,5 – 15 µg Gesamt-RNA entspricht. Anhand der Agarosegel-Analyse der cDNA wurden möglichst gleiche Mengen an cDNA für die zu vergleichenden Proben eingesetzt. Die cDNA wurde mit H₂O auf 6 µl aufgefüllt und für 10 Minuten bei 98 °C im Hybridisierungsofen auf einem Metallblock hitzedenaturiert und dann auf Eis gekühlt. Nach Zugabe des Mastermix (Tabelle 7) wurden die Reaktionen für 4 Stunden bei 37 °C im Hybridisierungsofen inkubiert. Das Verhältnis von radioaktivem dCTP zum nicht-radioaktiven dCTP wurde so gewählt, dass möglichst viel markierte cDNA synthetisiert aber das radioaktive Nukleotid auch zu einem möglichst hohen Anteil eingebaut

wurde. Nach Ablauf der 4 h wurden die Reaktionen 20 min bei 65 °C im Hybridisierungssofen hitzeinaktiviert.

Chemikalien	Menge [µl]
dNTP-Mix dCTP 10 pmol/µl; dATP, dGTP, dTTP je 100 pmol/µl	0,375
α -[³³ P]-dCTP (2500 Ci/mmol; 10 µCi/µl)	10
5 x High-Prime-Mix (Roche)	4

Tabelle 7: Reaktionsmischung für die radioaktive Markierung (1 Reaktion)

Nach Zugabe von 5 µl humaner C0T-1 DNA (1 µg/µl, Life Technologies/Invitrogen) und 100 µl TE-Puffer (pH 7,2) wurden die nun radioaktiv markierten cDNAs mit Hilfe von Gelfiltrationssäulchen (MicroSpin G-25 Columns, Amersham Biosciences, Freiburg) gereinigt, um nicht eingebaute Nukleotide abzutrennen und die Effektivität des Einbaus abzuschätzen. (Vorgehen siehe Reinigungs-Protokoll der cDNA in Kapitel 4.2.5.) Danach wurden zum Eluat 30 µl TE (pH 7,2) gegeben. Die C0T-1 DNA stellt eine Anreicherung von hoch repetitiven Sequenzen dar. Sie soll die repetitiven Sequenzen in den cDNAs abblocken und damit unspezifische Hybridisierungseffekte minimieren. Idealerweise wird die tierartspezifische C0T-1 DNA benutzt. Da es aber bisher eine solche Anreicherung repetitiver DNA-Sequenzen nur für Mensch und Maus gibt, wurde hier humane C0T-1 DNA verwendet. Zusätzlich reduzierte die C0T-1 DNA die unspezifische Bindung an die Membran, da sie nicht markiert war und im Überschuss gegenüber der Sonde vorlag.

Hybridisierung der Membranen

Die Hybridisierungsproben wurden für 15 Minuten bei 96 °C im Hybridisierungssofen vor der Zugabe zur Hybridisierungslösung denaturiert. Anschließend wurden die Hybridisierungsproben gemeinsam mit dem Hybridisierungspuffer durch 0,22 µm Filter (Millex®GP, Ø 25 mm, Millipore, Schwalbach) filtriert. Die Filtration der Hybridisierungslösung diente der Entfernung von Mikropartikeln, die z.B. durch die Gelfiltration in den Microspin Gelfiltrationssäulchen in die Hybridisierungslösung gelangen konnte und unspezifische Hintergrundsignale verursachen würden. Die Hybridisierung von je zwei Membranen wurde zusammen in je einem Plastik Gefäß (Poly-Q Gefäße, 18 ml; Beckman Coulter, München) in 2 ml Hybridisierungslösung (1 x PBS, pH 7,5 / 10 % SDS) für 45 h bei 65 °C durchgeführt. Die Plastikgefäße wiederum wurden in Glas-

Hybridisierungsröhren (30 cm, VWR) gegeben, um bei der Rotation des Hybridisierungsofens eine optimale Verteilung der Hybridisierungslösung auf den Membranen zu gewährleisten.

Waschen der Membranen

Nach der Hybridisierung wurde zuerst die Hybridisierungslösung abgegossen und durch 8 ml Puffer-Lösung (1 x PBS / 10 % SDS) ersetzt. Nach dem Abkühlen der Membranen wurden je sechs zusammen in einer Hybridisierungsröhre (15 cm Glas) wie folgt gewaschen:

3 x 5 Minuten 10 ml 1 x PBS / 10 % SDS bei 65 °C;

3 x 10 Minuten 10 ml 1 x PBS / 10 % SDS bei 65 °C;

3 x 10 Minuten 0,1 x PBS / 1 % SDS bei 65 °C und abschließend

2 x 5 Minuten 10 ml 1 x PBS / 1 % SDS / 2 mM EDTA bei Raumtemperatur.

Anschließend wurden die Membranen auf Filterpapier (GB002, Schleicher&Schuell, Dassel) gelegt und für 20 Minuten bei 80 °C im Hybridisierungsofen getrocknet. Danach wurden sie mit Fotoecken auf PVC-Platten, die mit herkömmlicher Frischhaltefolie bespannt waren, befestigt. Die Bildspeicherplatte (BAS-SR, Fuji Photo Film Co., Düsseldorf) wurde direkt auf die Membranen aufgelegt.

Optimierung der Arrays

Jede Sonde erzeugt ein charakteristisches Muster an Signal-Intensitäten. Die Intensität des Signals eines cDNA-Klons entspricht der Häufigkeit der entsprechenden mRNA im untersuchten Gewebe. Der Vergleich von Sonden aus verschiedenem Geweben zeigt, ob die mRNA differenziell exprimiert ist. Hierbei hat der radioaktive Nachweis den Vorteil einer sehr hohen Nachweisempfindlichkeit und -genauigkeit. So reicht eine mRNA-Kopie pro Zelle, um sie nachweisen zu können.

Der erste Hybridisierungsversuch ergab, dass einzelne cDNAs eine so hohe Signalintensität aufwiesen, dass ca. 20 % der Signale durch Überstrahlung nicht auswertbar waren. Aus diesem Grund wurden 212 der 3072 cDNA Fragmente von den Arrays entfernt, um eine optimale Auswertung der Hybridisierungssignale zu ermöglichen.

4.2.8 Analyse der Array Daten

Es wurden mehrere Exponierungen unterschiedlicher Dauer gemacht, um sowohl Signale mit sehr hoher als auch mit sehr geringer Intensität erfassen zu können. Bei der Exponierung der Bildspeicherplatte kommt es durch die radioaktive Strahlung zur Anregung von Elektronen in bestimmten Atomen des Screens. Es handelt sich dabei um seltene Erden, sogenannte

Lanthaniden. Die Funktionsweise beruht darauf, dass die Valenzelektronen der Lanthaniden durch die radioaktive β -Strahlung auf höhere Energieniveaus gehoben werden. Diese sind allerdings instabil, wodurch es zu einem Zurückfallen der Elektronen auf das nächst niedrigere Niveau kommt. Dieses immer noch erhöhte Niveau ist dann stabil. Durch die erneute Anregung der Elektronen beim Auslesen der Platte durch den Laser des Phosphor Imagers (Storm 860, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) fallen die Elektronen wieder auf ihr Ausgangsniveau zurück. Die in Form von Licht frei werdende Energie wird vom Gerät gemessen und in ein digitales 16-Bit-Graustufen-Bild mit einer Auflösung von 50 μm (Pixelgröße) umgewandelt.

Die Analyse der Array Daten wurde mit der AIDA Image Analyzer Software (Version 3,27; Raytest, Straubenhardt, Deutschland) durchgeführt. Zunächst wurde das Array definiert. In einer ersten Ebene wurde die Anzahl der Subarrays angegeben, bei dieser Untersuchung 48. Anschließend wurde in einer zweiten Ebene des Array-Aufbaus die Spotanzahl pro Subarray angegeben, bei dieser Untersuchung 36. Abschließend wurde noch die Spotgröße definiert. Sie wurde mit 700 μm etwas kleiner als der Spotabstand gewählt. Anschließend versuchte das Programm, die genauen Positionen der Spots zu finden. Dennoch musste jeder einzelne Spot visuell nachkontrolliert werden, da es in Einzelfällen vorkommen konnte, dass das Programm die Position des Signals nicht genau identifiziert hatte und damit die Signalintensität fehlerhaft berechnet worden wäre. Anschließend errechnete das Programm die Spotintensität anhand der jeweiligen Graustufe. Der Hintergrund wurde mit der „Weighted background dot“ Funktion abgezogen. Das bedeutet, dass einzelne Spots innerhalb des Arrays manuell als Hintergrund definiert wurden. Hierbei handelte es sich um Blanks oder Spots bei denen kein Signal zu erkennen war. Die so gewonnenen Signalwerte (Integral-Background), wurden in Microsoft Excel exportiert. Dann wurde der Median der Signale jedes einzelnen Arrays bestimmt und der Quotient aus dem Signal und dem Median gebildet. Diese normalisierten Werte der sechs Hybridisierungsexperimente wurden dann für statistische Analysen verwendet (Students' t-Test, heteroskedastisch, einseitig). Die Unterschiede zwischen den Signalintensitäten von östrischen und diöstrischen Tieren wurden als signifikant bezeichnet, wenn $p < 0,05$ und der Faktor $> 1,5$ waren.

4.2.9 Sequenzierung und Identifizierung von auffälligen cDNA Fragmenten

Mikrodialyse der cDNAs

Alle mit Hilfe der Array-Hybridisierung gefundenen differenziell exprimierten cDNAs wurden durch Sequenzierung identifiziert. Dazu wurden die cDNAs direkt aus der Probenlösung für die Array-Herstellung aus den 384-well-Platten verwendet. Zur Entfernung von Salzen, Primern und Nukleotiden aus diesen Proben wurde zunächst eine Mikrodialyse durchgeführt. Es wurden 3 µl der Proben auf spezielle Membran-Filterscheiben (Millipore, Porendurchmesser 0,025 µm, Durchmesser 45 mm) aufgetragen. Diese schwammen in einer Petrischale (100 mm Durchmesser) auf 40 ml 0,25 fach konzentriertem TE-Puffer pH 7,2. Nach 1 h Dialyse (dabei mit einem Mini-Rührfisch rühren) wurden die Proben nach vorheriger Entfernung des TE-Puffers wieder abgenommen und in eine 96-well-Platte überführt. Es wurden jeweils 40 Proben gleichzeitig auf den Membran-Filterscheiben dialysiert.

Sequenzierung der cDNAs

Zu den dialysierten Proben (ca. 1,8 µl) wurden 1 µl Sequenzierprimer (PMO oder T7ex, 3 pmol/µl) und 3,2 µl Wasser gegeben. Anschließend wurden 2 µl Sequenzier-Kid (ABI prism dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kid, Applied Biosystems) und 2 µl Better Buffer zugegeben. Das Sequenzier-Reagenz beruht auf dem Dideoxy-Sequenzierverfahren (Sanger-Methode), wobei jedes Dideoxy-Nukleotid (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP) mit einem anderen Farbstoff markiert wurde. Die Sequenzierreaktion erfolgte wie in Tabelle 8 dargestellt.

Temperatur in °C	Dauer in Sekunden	Wiederholungen
96	120	
96	30	} 34x
54	30	
60	30	
20	unendlich	

Tabelle 8: Bedingungen für die Sequenzierreaktion

Die Reinigung und Auftrennung der Sequenzprodukte erfolgte durch den Sequenzierservice des Genzentrums (AG Dr. H. Blum, LAFUGA Genomix) in einem automatischen Sequenziergerät.

Auswertung der DNA-Sequenzen

Um die cDNA dann letztendlich einem Gen zuordnen zu können, wurden die erhaltenen Sequenzen mit öffentlichen Sequenz-Datenbanken mit Hilfe des „basic local alignment search tools“ am National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) verglichen. Alle cDNAs ohne Suchergebnis in der „nr“ Datenbank (all GenBank + RefSeq Nucleotides + EMBL + DDBJ + PDB Sequenzen, aber keine EST, STS, GSS, oder Phase 0, 1 oder 2 HTGS Sequenzen) wurden untereinander verglichen, um redundante cDNA Fragmente zu finden. Um einen besseren Überblick über die verschiedenen gefundenen Gen-Funktionsklassen und deren eventuelle gleiche Regulation im Zyklus zu erhalten, wurden basierend auf den humanen oder murinen orthologen Genen vereinfachte Ontologien mit Hilfe der GeneSpring Software Version 6.1 (Silicon Genetics, Redwood City, CA, USA) erstellt. Mit weiteren Daten aus UniGene (www.ncbi.nlm.nih.gov/uniGene/), LocusLink (www.ncbi.nlm.nih.gov/locusLink/), und PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi) wurden diese „Gene Ontologies“ ergänzt. Die erhaltenen Sequenzen wurden in dbEST (eine Abteilung von GeneBank) veröffentlicht.

4.2.10 Erstellung eines Ovidukt-Arrays

Auswahl der verwendeten cDNAs

432 cDNAs, die in vorangegangenen Genexpressionsuntersuchungen (Bauersachs et al. 2004b; Bauersachs et al. 2003c) als differenziell exprimiert identifiziert wurden, sind für das neue Array ausgewählt worden. Zusätzlich wurden 94 ausgewählte cDNAs gespottet, die in den bisherigen Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede zeigten. Sie sollten als interne Kontrolle bei der Hybridisierung dienen. Auch 23 cDNAs, die Kooperationspartner ausgewählt hatten, wurden mit auf das neue Array gedruckt.

Herstellung des Arrays

Für die Herstellung des Arrays wurden die cDNAs erneut aus den Bakterien-Suspensionen amplifiziert. Dies wurde, wie bereits in Kapitel 4.2.6. beschrieben, durchgeführt. Auch hier schloss sich eine Kontrolle des PCR-Ergebnisses mittels Agarosegelelektrophorese und eine Sequenzanalyse zur Verifizierung wie oben beschrieben an. Die Herstellung des Arrays erfolgte wie bei der Herstellung des Arrays für den Vergleich der Östrus- und Diöstrus-Proben. Das Array beinhaltete auf einer Fläche von 1,7 cm x 3,5 cm insgesamt 640

Positionen, davon wurden 549 mit cDNAs bedruckt und 91 waren Blanks. Es wurden jeweils 30 Arrays gleichzeitig hergestellt.

4.2.11 Array Hybridisierungen mit dem Ovidukt-Array

Im Wesentlichen wurde das Hybridisierungsexperiment mit dem Ovidukt-Array genauso durchgeführt wie bereits in Kapitel 4.2.7. im Zusammenhang mit dem Vergleich von Östrus und Diöstrus beschrieben. Die Gewebeproben für die Herstellung der radioaktiven Sonden stammten von 12 Tieren, da Eileiterepithel-Proben von jeweils 3 Tieren Tag 0, Tag 3,5, Tag 12 und Tag 18 verwendet wurden. Das Epithel von Ampulle und Isthmus bildete in diesem Experiment jeweils eine eigenständige Probe. Aus praktischen Gründen konnten immer nur Proben von vier Tieren gemeinsam hybridisiert werden. Daher wurden immer Proben von Tieren aus allen vier untersuchten Zyklustagen gemeinsam hybridisiert.

4.2.12 Analyse und Weiterbearbeitung der Daten aus den Hybridisierungen des Ovidukt-Arrays

Die Auswertung und Analyse erfolgte genauso wie bei der Auswertung der Östrus-Diöstrus Vergleiche. Lediglich der Spotdurchmesser für die Arrays in der AIDA Software wurde bei diesen Auswertungen kleiner als bei der vorangegangenen Auswertung gewählt (500 µm statt 700 µm). Im Laufe der Analysen hatte sich herausgestellt, dass dieser kleinere Spotdurchmesser die automatische Findung der Spots durch das Programm erleichtert, die weiteren Analysen aber nicht beeinträchtigt. Auch die Art und Weise der Hintergrunddefinition wurde leicht abgeändert. Es wurden keine Spots innerhalb des Arrays (weightet background dots) als Hintergrund gewählt, sondern Bereiche der Membran am Rande des Arrays (weightet image reagions). Dadurch wurde die Auswertung der Arrays erleichtert.

Die mittels AIDA Array Software gewonnenen Rohdaten, wurden in Microsoft Excel exportiert und der Median jedes einzelnen Arrays gebildet. Alle Signalwerte (Integral-Background) wurden durch den Median aller Membransignale geteilt. Anschließend wurden für den Vergleich von Ampulle bzw. Isthmus über den Zyklusverlauf Quartette mit Proben aus jeweils einem untersuchten Zyklustag gebildet. Hierbei handelte es sich um die Arrays die gemeinsam in einem Experiment hybridisiert wurden. Diese vier Tiere sollten dann auch in der anschließenden Auswertung als Vergleichs-Quatette dienen. Die einzelnen Signalwerte wurden durch den Mittelwert der Quartette geteilt. Diese normalisierten Werte waren dann

zwischen allen Hybridisierungen vergleichbar und wurden anschließend für statistische Analysen verwendet (Studentischer t-Test, einseitig, ungepaart). Die Unterschiede wurden als signifikant angenommen wenn $p < 0,05$ und der Faktor > 2 war.

Die Auswertung der Abschnitte innerhalb eines Tieres wurde etwas modifiziert durchgeführt. Hier wurde nur der Median der Signalwerte (Integral-Background) gebildet und alle Signalwerte der Membran durch diesen Median geteilt. Die so normalisierten Werte dienten dann zum Vergleich der beiden Eileiterabschnitte innerhalb eines Tieres. Es wurde nur ein Vergleich der Werte aus der Ampulle und aus dem Isthmus ein und des selben Tieres durchgeführt. Es wurden keine Gruppen für Ampulle und Isthmus gebildet. Die Faktoren die sich aus diesen Vergleichen ergaben, wurden zwischen den Tieren pro Zeitpunkt verglichen, dann allerdings nur noch in Bezug auf die Signifikanz der erhaltenen Faktoren. Alle Faktoren größer 2 und mit einem p-Wert kleiner 0,05 (Students' T-Test, gepaart, einseitig) wurden als signifikant angenommen.

Die Sequenzen der cDNAs des Ovidukt-Arrays wurden noch einmal zur Aktualisierung mit öffentlichen Sequenzdatenbanken wie bereits oben beschrieben verglichen und nach der Auswertung der Signal-Werte wurde eine Einteilung in Gen-Funktionsklassen für das Erstellen von Gene Ontologies mit GeneSpring Software Version 6,1 (Silicon Genetics, Redwood City, CA, USA) durchgeführt. Weiterhin erfolgte eine Analyse von Stoffwechsel- und Signalwegen, in die gefundene Gene möglicherweise involviert sind, mit Hilfe der Kegg-Datenbank (www.kegg.com) und der biobase-Datenbank Transpath (www.biobase.de).

5 Ergebnisse

5.1 Tierprotokoll

In dieser Studie wurde zuerst ein Protokoll für die Zyklussynchronisation und Auswahl der Tiere erarbeitet, um eine standardisierte Probengewinnung von definierten Zyklusstadien zu ermöglichen. Der Zyklustag konnte, durch die Erfassung der Brunstsymptome, die Beobachtung der Funktionsgebilde auf den *Ovarien* und Bestimmung der wichtigsten Hormone genau zugeordnet werden. Die Ovulation und der LH-Gipfel konnten in den meisten Fällen auf ± 6 Stunden genau bestimmt werden. Zusätzlich diente Progesteron als grober Indikator für das Zyklusstadium. Der Progesteron-Wert kann nur darüber eine Aussage liefern, ob sich ein Tier eher im Östrus oder im Diöstrus befindet. Östrogen wurde nicht gemessen, da laut veterinärmedizinischer Endokrinologen (Prof. Dr. Schams, Weihenstephan und Prof. Dr. Hoppen, Hannover) die Schwankungen des Östrogenspiegels im peripheren Blut kaum nachweisbar sind. Für die Feinbestimmung des Zyklustages ist LH durch den charakteristischen, ca. sechs Stunden dauernden, LH-Gipfel ca. 26 h vor der Ovulation alleinig aussagekräftig. Zusammen mit den charakteristischen Veränderungen an *Ovar* und *Uterus* (Follikelwachstum; Herausbildung eines d.F.; Uterustonius, der in der Hauptbrunst am stärksten ist; Brunstschleim; Brunstverhalten) kann der Zyklustag eindeutig bestimmt werden (Abbildung 10).

Das Untersuchungsprotokoll wurde bei Tag 18-Tieren nicht so ausführlich wie bei den anderen Tieren durchgeführt. Die exakte Bestimmung des Ovulationszeitpunktes wurde bei diesen Tieren als nicht so wichtig wie bei den anderen Zykluszeitpunkten angesehen.

Jedes Tier konnte durch die Zuweisung einer individuellen Tier-ID eindeutig identifiziert werden. Diese stellte eine fortlaufende Nummer dar, in die das Jahr der Schlachtung und die Reihenfolge, in der die Tiere geschlachtet wurden, einging

Bisher wurden mehr als 100 Tiere für die gesamte Forschergruppe „Mechanismen der embryomaternale Kommunikation“ nach dem erarbeiteten Protokoll vorbereitet und geschlachtet. Für die vorliegende Genexpressionsstudie wurden Tiere von vier verschiedenen untersucht. Von den bisher nach dem erarbeiteten Protokoll geschlachteten Tieren entsprachen über 90 % den Anforderungen.

ERGEBNISSE

Tier 401		Tag 3,5							
LOM	DE 0934790254	Stall-Nr.:		420					
Geburtsdatum: 16.03.2002									
Haltungsbedingungen: Laufboxen; Tiefstreu; Futter: Grassilage, Heu									
Datum	Uhrzeit	Brunst	Uterus-tonus	Sono Ovar		Besonderh.	P4 [ng/ml]	LH [ng/ml]	
				Li	Re				
06.01.2004	09:00	-				PGF ₂	2,75	0,80	
07.01.2004	09:00	-				-			
07.01.2004	12:00	-				-		1,62	
07.01.2004	18:00	-				-		0,56	
08.01.2004	06:00	+				-		1,06	
08.01.2004	12:00	++	+++	größerer F.	kleiner F. mittlerer F.	-	0,57	13,19	
08.01.2004	18:00	+++	+++	größerer F.	kleiner F. größerer F.	-		1,45	
09.01.2004	00:00	+++	+++	größerer F.	kleiner F. größerer F.	-		1,66	
09.01.2004	06:00	++	+++	mehrere kleine F.	mittlerer F. größerer F. (unrund)	-		0,74	
09.01.2004	12:00	++	+++	mehrere kleine F.	mittlerer F. (diffus)	-		0,75	
09.01.2004	18:00	+	+++	C.l.	d.F.	-			
12.01.2004	09:00	-	Schlachtung		C.l.		0,73	0,53	
Proben:		für Proteomics und Transcriptomics; Uterus und Ovidukt							

Abbildung 10: Tierprotokoll, ausgefüllt

F: Follikel; d.F.: dominanter Follikel; C.l.: Corpus luteum, für die Bewertung der Brunst siehe Tabelle 1 und Tabelle 2. In dem abgebildeten Protokoll können sowohl der LH-Gipfel als auch die Ovulation eindeutig angegeben werden. Dadurch ist der Zyklustag, an dem das Tier geschlachtet wurde (Tag 3,5), genau bestimmbar. Die geschlachteten Tiere wurden nicht nur für das vorliegende Dissertationsprojekt verwendet, sondern auch für andere Teilprojekte der Forschergruppe. Deshalb wurde zusätzlich auf dem Protokoll vermerkt, für welche Teilprojekte (Proteomics, Transcriptomics, Histologie) Proben entnommen wurden.

In dieser Studie wurde der Zyklus der untersuchten Tiere mit Hilfe von PGF_{2α} synchronisiert. Tiere zu verwenden, die sich im natürlichen Zyklus gerade im richtigen Zyklusstadium befanden, war für die Probenentnahme nicht praktikabel, weil der Schlachttag mindestens zwei Wochen vor Beginn der Vorbereitung feststand und auf keine größere Herde zurückgegriffen werden konnte. Auch wenn es durch den iatrogen abgebrochenen, vorangegangenen Zyklus zu einer Veränderung der Expression einzelner Gene gekommen sein sollte, wäre dieser Effekt bei

allen verwendeten Tieren im gleichen Maße aufgetreten und würde damit nicht als differenziell exprimiert auffallen. Außerdem wird PGF_{2α} in der Regel relativ schnell abgebaut. Damit überwiegen die Vorteile der Zyklussynchronisation gegenüber der spontanen Brunst.

5.2 Probenentnahme

Das einschichtig hochprismatische Epithel sitzt auf einem bindegewebigen Grundstock auf, der *Lamina propria*. Durch das Ausstreifen der Eileiterstücke wird sichergestellt, dass nur das Epithel isoliert wird, da die Bindegewebszellen zu fest sitzen, dass sie durch einfaches Ausstreifen abgelöst werden. Würde man den Eileiter eröffnen und ausstreifen, würde man wahrscheinlich die Falten des Eileiterepithels inklusive Bindegewebszellen verletzen, was das spätere Ergebnis der Genexpressionsanalysen verfälschen könnte. Es ist selbstverständlich darauf zu achten, dass das Eileiterteilstück beim Ausstreifen intakt bleibt, damit es zu keiner Kontamination mit Bindegewebszellen kommt. Beim Ausstreifen wird auch der Eileiterlumen-Inhalt mit seinen sezernierten Proteinen mit ausgestriffen. Da es sich aber hierbei ausschließlich um Proteine handelt, behindern diese Sekrete die Transkriptom-Analysen nicht. Das Ausstreifen des Eileiters zur Gewinnung der Epithelzellen ist auch eine allgemein anerkannte Methode, um intakte Zellen für die Zellkultur zu erhalten (Boilard et al. 2002a; Boilard et al. 2004).

Die vorliegende Untersuchung hat sich auf die Analyse der Genexpression in Ampulle und Isthmus beschränkt, vor allem weil die Untersuchung dieser Abschnitte am interessantesten erschien. Es wurde bewusst auf eine Einbeziehung des kontralateralen Eileiterepithels in Genexpressionsanalysen mittels subtraktiver Hybridisierung und Array-Technik verzichtet, da bisher unveröffentlichte Untersuchungen von Herrn Dr. S. Bauersachs keine signifikanten Unterschiede zwischen ipsilateraler Seite und kontralateraler Seite an Tag 0 oder 12 ergaben. Nur an Tag 3,5 des Zyklus konnten geringe, aber signifikante Unterschiede gemessen werden (Bauersachs et al. 2003b). Zusätzlich konnte ein vor allem lokaler und auf die ipsilaterale Seite begrenzter Effekt der ovariellen Hormone bei Schafen nachgewiesen werden (Schramm et al. 1986), was ebenfalls die Entscheidung bestärkte, in diesem Dissertationsprojekt nur die ipsilaterale Eileiterseite zu verwenden.

Obwohl in einer Studie über die Stabilität der RNA in Geweben innerhalb eines Zeitintervalls von 24 Stunden *post mortem* keine auf Agarosegelen sichtbare RNA-Degradation in Gewebeproben aus dem bovinen weiblichen Reproduktionstrakt nachgewiesen wurde (Fitzpatrick et al. 2002), wurde es in dieser Arbeit trotzdem als äußerst wichtig erachtet, die Proben unverzüglich nach dem Tod des Tieres zu gewinnen und zu konservieren. Es kann nicht

mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass es nicht doch zu einer schnellen Degradation von einzelnen RNAs kommt. Da es sich bei dem verwendeten Nachweissystem um eine sehr sensitive Methode handelt, würde bereits eine geringe Degradation von einzelnen RNAs in bestimmten Proben zu falsch positiven Untersuchungsergebnissen führen. Deshalb wurde hier darauf geachtet, dass alle Proben innerhalb von 20 Minuten nach der Betäubung der Tiere durch den Bolzenschuss tiefgefroren waren. Auf diese Weise konnten mit der standardisierten Probenentnahmetechnik durchwegs RNA-Proben mit sehr hoher Qualität gewonnen werden (siehe Ergebnisse RNA-Isolierung). Aufgrund der vorhandenen Kapazitäten zur Tiervorbereitung, zur Konservierung sowie zum tiefgekühlten Transport der Proben konnten maximal vier Tiere pro Schlachtermin getötet werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass nicht nur Eileiterproben sondern auch Uterusproben sowohl für Transkriptom-, Proteom- als auch histologische Untersuchungen gleichzeitig entnommen wurden.

Das erarbeitete, streng standardisierte Protokoll für die Tiervorbereitung und für die Probenentnahme machen es auch nach Abschluss dieser Promotionsarbeit möglich, für die Forschergruppe Proben zu gewinnen, ohne dass es zu bemerkbaren Schwankungen in der Probenqualität kam.

5.3 Isolierung von RNA

Für die erste Genexpressionsuntersuchung, den Vergleich von Östrus (Tag 0) und Diöstrus (Tag 12), wurden bereits vorhandene RNA-Proben von jeweils drei Tieren pro Zeitpunkt verwendet. Das Eileiterepithel für diese Proben war bereits vor Beginn dieser Arbeit noch nach einem anderen Verfahren aus den ipsilateralen Eileitern isoliert worden (Reischl et al. 1999). Für die Untersuchungen mit dem Ovidukt-Array wurden insgesamt 24 RNA-Proben isoliert. Diese stammten von je drei Tieren für die vier untersuchten Zeitpunkte, jeweils aus Ampulle und Isthmus getrennt. Die Eileiterepithelproben für diese RNA-Isolierungen wurden nach dem optimierten Probenentnahme-Protokoll gewonnen.

Abbildung 11 zeigt beispielhaft die Analyse mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese von 10 RNA-Proben. Die isolierte RNA war von gleichmäßig hoher Qualität. Deutlich waren die beiden Banden der großen ribosomalen RNAs zu erkennen. Die Bande der 28 S-rRNA war in der Regel intensiver als die der 18 S rRNA, was auf eine intakte RNA schließen lässt. Die mRNA wird in Form eines gleichmäßigen Schmiere aufgetrennt. Am unteren Gelrand ist noch eine diffuse Bande zu erkennen, welche kleine RNAs, wie z. B. tRNAs, die 5 S und die 5,8 S rRNA enthält.

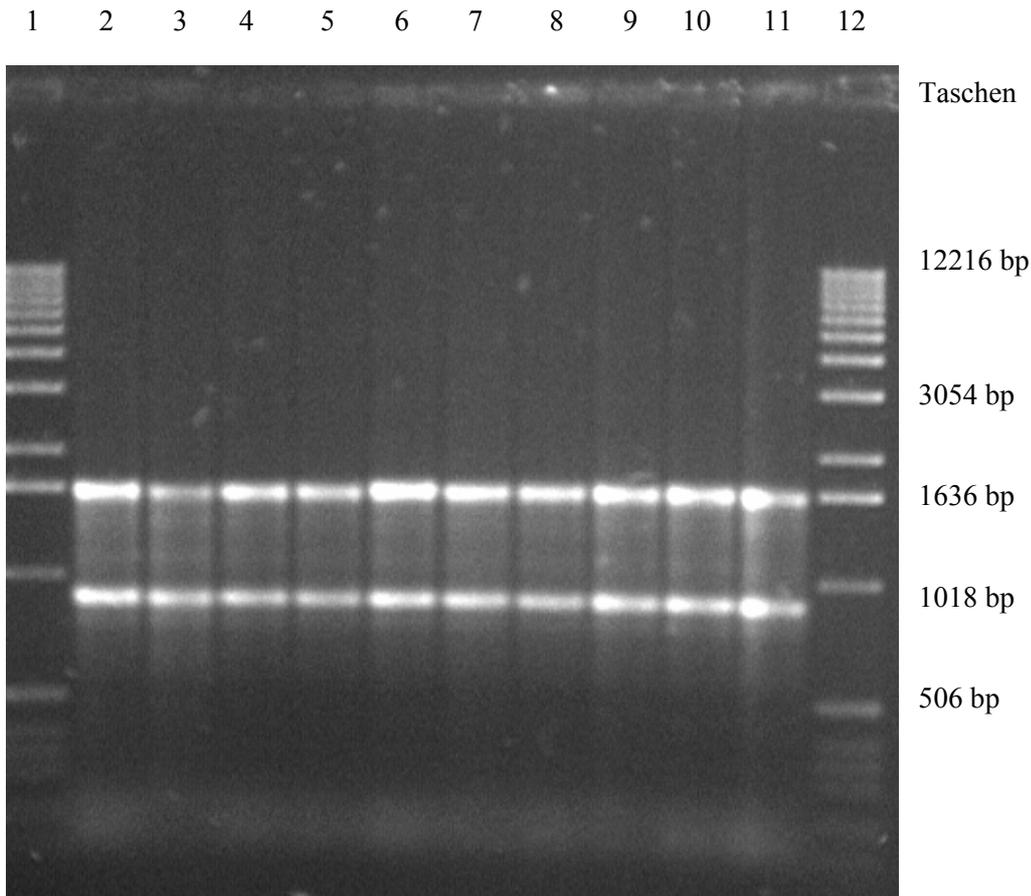


Abbildung 11: Agarosegelelektrophorese-Analyse der RNA

In den Spuren 1 und 12 wurde ein DNA-Molekulargewichtsstandard 1kb DNA Ladder (Invitrogen) aufgetragen. In den Spuren 2 bis 11 wurden jeweils 250 ng Gesamt-RNA aufgetrennt.

5.4 Synthese von cDNA

Für den Vergleich von Östrus und Diöstrus wurden sechs RNA-Proben in cDNA umgeschrieben als Ausgangsmaterial für die Herstellung radioaktiv markierter cDNA-Proben zur Array-Hybridisierung. Für die Hybridisierungen mit dem Ovidukt-Array wurden insgesamt 24 cDNA-Synthesen erfolgreich durchgeführt.

Abbildung 12 zeigt beispielhaft die Analyse von 10 cDNA-Proben in einer Agarose-Gelelektrophorese.

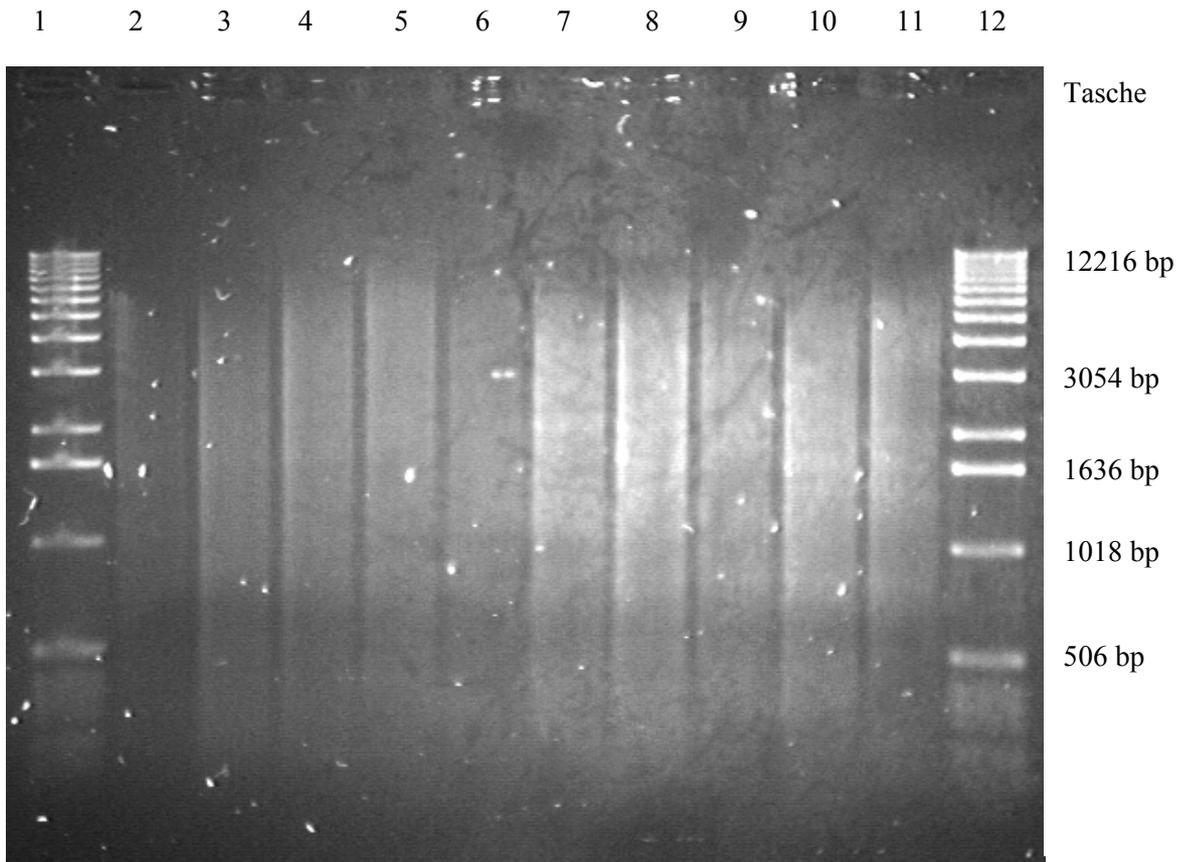


Abbildung 12: Agarosegelelektrophorese der cDNA

Ausgehend von 50 µg Gesamt-RNA wurde doppelsträngige cDNA synthetisiert. Nach Abtrennung von kleinen Molekülen (<200 bp) durch Gelfiltration wurde die cDNA gefällt und in 20 µl 0,5 x TE gelöst. Davon wurde je 1 µl durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (Spuren 2-11). In den Spuren 1 und 12 wurden der Molekulargewichtsstandart (1kb DNA Ladder) aufgetragen.

Die synthetisierte cDNA war ebenfalls von gleichbleibend hoher Qualität. Sie wurde im Agarosegel in Form einer gleichmäßigen breiten Bande von etwa 200 bp bis über 10000 bp ohne diskrete Banden aufgetrennt. Dies deutet auf eine hauptsächliche Amplifizierung der mRNA durch den poly(A)-spezifischen Primer hin. Die cDNAs wiesen alle eine gleichmäßige Längenverteilung auf. Dadurch ist eine RNA-Degradation vor der cDNA-Synthese so gut wie auszuschließen. Der Molekulargewichtsstandart (1kb DNA Ladder) in Tasche 1 erscheint in diesem Bild weniger hell als in Tasche 12, obwohl in beiden Taschen die gleiche Menge von 100 ng aufgetragen wurde. Das wurde durch eine ungleichmäßige Ausleuchtung des Transilluminators verursacht. Dadurch erklärt sich auch, dass die cDNAs in den Taschen 2 bis 6 etwas schwächer erscheinen als die anderen. Geringere Unterschiede in der cDNA-Konzentration wurden bei der Herstellung der Proben für die Array-Hybridisierung bei der eingesetzten cDNA-Menge berücksichtigt.

5.5 Herstellung der Arrays aus den subtraktiven Banken

Die subtraktiven cDNA-Banken für den Vergleich von Östrus und Diöstrus waren bereits vor Beginn dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe von Hr. Dr. Helmut Blum hergestellt worden. Sie lagen in Form einer Bakterien-Dauerkultur vor. Von dieser wurden Teile auf Agarplatten ausgestrichen und 1536 Bakterienkolonien pro subtraktiver Bank zufällig gepickt. Die Bakterien wurden über Nacht im 96-well-Format in Kulturmedium vermehrt. Am folgenden Tag wurde ein Teil der Bakterienkulturen entnommen, verdünnt und die Zellen durch Hitze lysiert. Aus diesen Bakteriensuspensionen wurden für die Herstellung der Arrays die cDNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert. Bei der anschließenden Agarosegelelektrophorese wurden die Qualität und die Quantität der PCR-Produkte überprüft. In Abbildung 13 ist ein exemplarisches Gelbild von 96 der 3072 PCR-Produkte zu sehen. Jeweils in den Taschen 1 und 26 in einer Reihe wurde ein Molekulargewichtsstandard (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder) aufgetragen. In allen 96 Reaktionen konnte ein spezifisches Produkt erhalten werden. Es ist zu erkennen, dass nur 1,5 % der PCR-Produkte zwei Fragmente enthalten. Die Ausbeute an PCR-Produkten war insgesamt sehr gleichmäßig. Die Produkte wiesen eine Größe von ca. 100 bp bis > 1 kb auf.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26

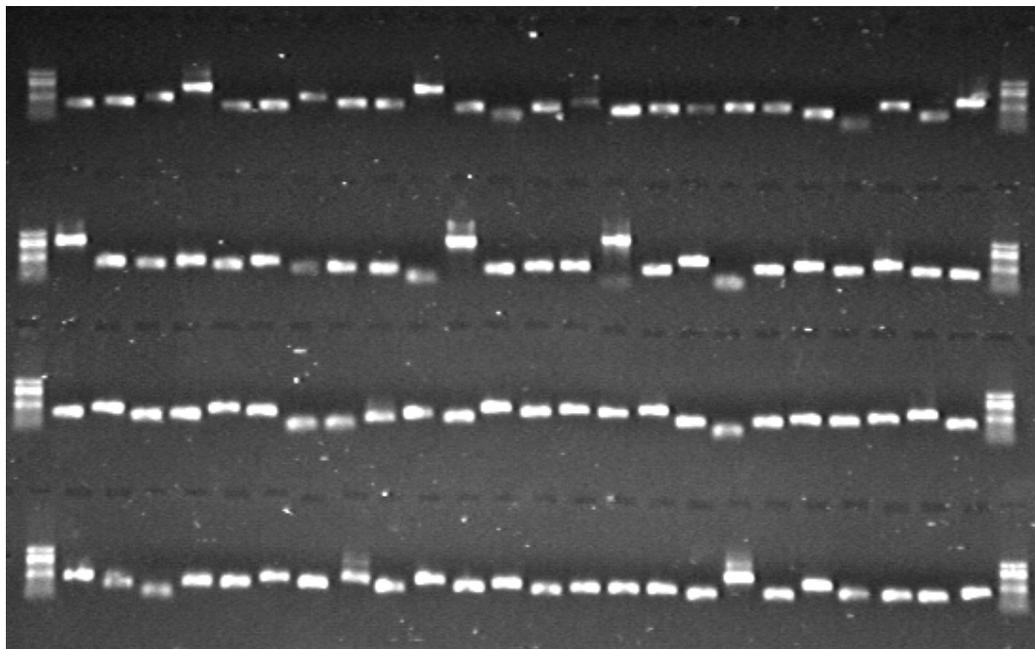


Abbildung 13: Agarosegelelektrophorese der Kolonie-PCR

In den Taschen 1 und 26 wurde jeweils ein Molekulargewichtsstandard GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas) aufgetragen. In den Taschen 2 bis 25 wurden jeweils 0,5 µl der Kolonie-PCR aufgetragen.

Die erste Array-Hybridisierung zeigte, dass viele cDNAs auf dem Array waren, die sehr starke Signale verursachten (Abbildung 14, links) und die Analyse von bis zu 20 % aller Signale störten. Eine Hybridisierung des Arrays mit einer cDNA-Probe für die bovine mRNA für OVGP1 zeigte, dass ungefähr 70 der 3072 cDNAs von diesem Gen stammten (Abbildung 14, Mitte). Es ist aus früheren Untersuchungen bereits bekannt, dass diese mRNA besonders im Östrus extrem stark exprimiert wird. Die OVGP1-positiven cDNA-Fragmente kamen von der Östrus-Bibliothek und zeigten eine höhere Expression im Östrus. Sie wurden bis auf eines entfernt. Zusätzlich wurden weitere 142 cDNA-Fragmente, die ebenfalls sehr starke Signale zeigten, aber keine Signalunterschiede, von den Arrays entfernt. Daraufhin waren die Hybridisierungssignale wesentlich besser auswertbar (Abbildung 14, rechts). Von den entfernten cDNA-Fragmenten waren 103 cDNAs aus der Östrus-Bibliothek und 109 aus der Diöstrus-Bibliothek.

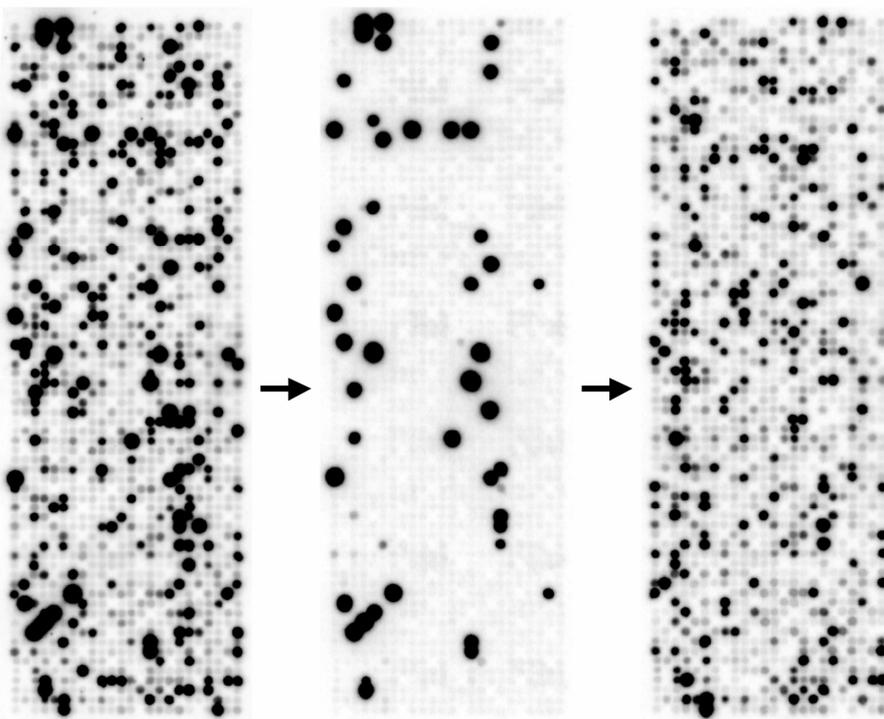


Abbildung 14: Entfernung von cDNAs mit sehr intensiven Signalen

Aus den subtraktiven cDNA-Banken wurden cDNA-Arrays hergestellt und mit radioaktiv markierten Östrus- und Diöstrus-cDNA-Proben hybridisiert (links). Die gleichen Arrays wurden mit einer radioaktiv markierten cDNA des Gens für das Bovine Ovidukt-spezifische Glykoprotein (OVGP1) hybridisiert (Mitte). Anschließend wurden die cDNA-Fragmente für OVGP1 und weitere 142 cDNA-Fragmente, die sehr starke Signale ergaben, von den Arrays entfernt und die Hybridisierung mit den Proben aus Eileiterepithel erneut durchgeführt (rechts).

5.6 Vergleich Östrus-Diöstrus

Diese optimierten cDNA Arrays wurden dann mit radioaktiv markierten komplexen cDNA-Proben von 6 zyklischen Färsen (Östrus n=3, Diöstrus n=3) hybridisiert. Die Datenanalyse der Arrayhybridisierungen ergab 235 cDNA-Fragmente mit signifikanter Signaldifferenz zwischen Östrus und Diöstrus. In Abbildung 15 wird ein Scatter Plot der Array-Daten für diese cDNA-Fragmente gezeigt. Diese graphische Darstellung zeigt deutlich, dass mehr cDNA-Fragmente mit stärkeren Signalen im Östrus gefunden wurden. Weiterhin war bei diesen auch der Signalunterschied im Durchschnitt höher. Der durchschnittliche Signal-Quotient für die hochregulierten Gene im Östrus war 4,8 und der durchschnittliche Quotient für die Gene, die im Diöstrus hochreguliert waren, betrug 2,2.

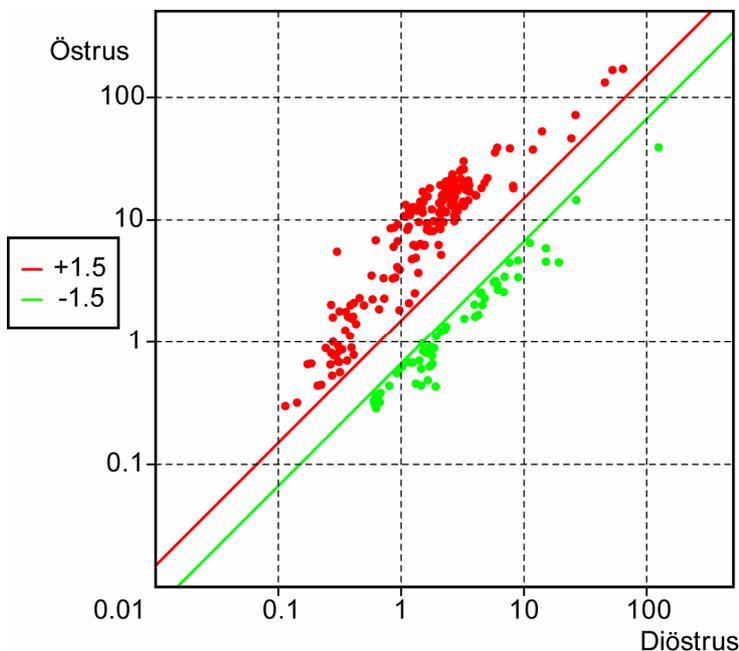


Abbildung 15: Scatter Plot der normalisierten Signalwerte

Die normalisierten Werte (Mittelwerte aus n=3) der als differenziell exprimierten identifizierten cDNA-Fragmente der Östrus- und der Diöstrus-Proben wurden gegeneinander aufgetragen.

Die Sequenzanalyse der 235 cDNA Fragmente ergab 37 verschiedene Gene mit einem höheren mRNA-Spiegel im Östrus und 40 mit erhöhtem mRNA-Spiegel im Diöstrus (Abbildung 16).

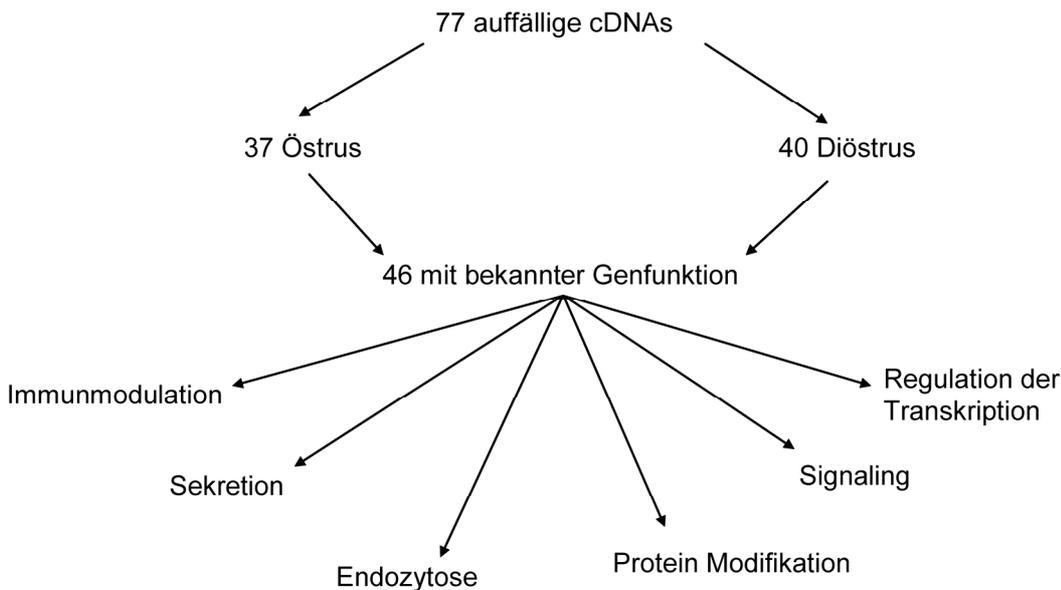


Abbildung 16: Übersicht über die identifizierten Gene aus dem Östrus-Diöstrus Vergleich

21 Gene wurden mehr als einmal gefunden, am häufigsten das Ovidukt-spezifische Glykoprotein (OVGP1) ($n=70$), das *Bos taurus tumor rejection antigen* (gp96) 1 (TRA1) ($n=56$), das bovine orthologe Gen zum *Homo sapiens anterior gradient 2 homologue* (*Xenopus laevis*) (AGR2) ($n=24$) und das *Homo sapiens heat shock 70 kDa protein 5* (glucose-regulated protein, 78 kDa) (HSPA5) ($n=16$). Die Expressionsunterschiede dieser mehrfach vorhandenen cDNA-Fragmente eines Gens korrelierten sehr gut. Auch die Expressionsveränderungen waren, wie bereits im Vorfeld beobachtet (Bauersachs *et al.* 2003), bei verschiedenen Fragmenten einer cDNA sehr ähnlich. Tabelle 9 zeigt die Gene, deren zugehörige mRNAs eine höhere Abundanz in Ovidukt-Epithelzellen zum Östrus aufweisen. Die Gene sind alphabetisch nach ihrer möglichen Proteinfunktion und absteigend nach dem Signal-Quotienten (Östrus:Diöstrus) geordnet.

Der größte Signal-Unterschied von Östrus zu Diöstrus war 18-fach. 24 der cDNAs wurden Genen zugeordnet, deren Funktion bekannt war oder vom wahrscheinlichen menschlichen orthologen Gen abgeleitet wurden. Für 5 cDNAs wurde kein Treffer in der GenBank Datenbank („nr“ und „est“) gefunden. Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse für die mRNAs, die eine höhere Abundanz in den Ovidukt-Epithelzellen zum Diöstrus-Zeitpunkt zeigten. Hier lag die größte Differenz in der Genexpression im Diöstrus im Vergleich zum Östrus bei 4,4 fach. Die Tabellen 9 und 10 zeigen neben dem allgemein gebräuchlichen Namen, die Gene Ontology-Kategorien, die GenBank Accession Nummer, die prozentuale Homologie zur Datenbank-Sequenz und den p-Wert des verwendeten Studentischen t-Tests. 22 der 40 cDNAs entsprachen Genen deren Funktion bekannt war oder abgeleitet werden konnte. 2 cDNAs konnten keiner Sequenz in der GenBank-Datenbank zugeordnet werden.

Um einen genaueren Überblick über die differenzielle Expression der Gene in Hinblick auf die Zugehörigkeit zu funktionellen Gruppen zu bekommen, wurden vereinfachte Gene Ontologies für biologische Prozesse und molekulare Funktionen erstellt (Abbildung 17). Einige der biologischen Prozesse und molekularen Funktionen waren klar von Genen, die entweder im Östrus oder im Diöstrus hochreguliert sind, dominiert. Zum Beispiel der biologische Prozess „Protein-Sekretion“ war eindeutig im Östrus hochreguliert, dargestellt durch 7 Chaperone und zwei andere Proteine, die im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert sind. Im Gegensatz dazu sind im Diöstrus Gene, die mit der Transkriptions-Regulation zu tun haben, und Gene, die mit dem Immunsystem in Verbindung gebracht werden, hochreguliert. Für andere biologische Prozesse und molekulare Funktionen, die in Abbildung 17 gezeigt werden, ist die mRNA-Abundanz der identifizierten Gene entweder im Östrus oder im Diöstrus höher. Tiefergehende Analysen dieser Gengruppen zeigten aber, dass sie zu verschiedenen funktionellen Subklassen gehören.

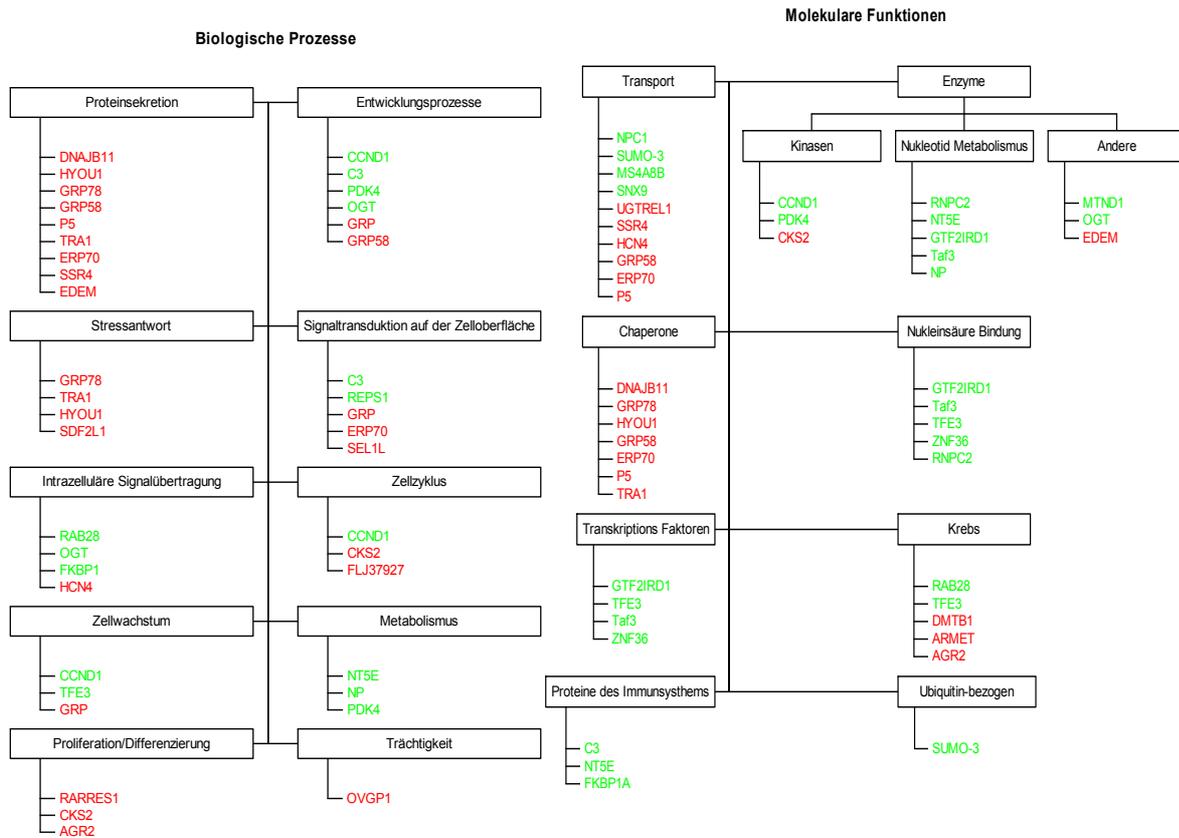


Abbildung 17: Gene Ontology

In dieser Abbildung sind die Gene Ontologies für biologische Prozesse und molekulare Funktionen dargestellt. Die Darstellung der Genfunktionsklassen untereinander ist nicht mit einer Wertung in Bezug auf die Wichtigkeit für die Zellfunktion gleichzusetzen. Die Genfunktionsklassen der Gene Ontology stellen gleichwertige Gruppen dar. Gene deren mRNA-Konzentration im Östrus höher war, sind in roter Farbe dargestellt und Gene deren mRNAs im Diöstrus häufiger waren, wurden in grüner Farbe dargestellt.

ERGEBNISSE

Tabelle 9: Im Östrus hochregulierte Gene

Genbeschreibung	Abkürzung	GenBank Accession Nummer	UniGene	Homology (%)	Proteinfunktion	GO biological process	GO molecular function	GO cellular component	Oe:Di* p-Wert
Homo sapiens CDC20-like protein (FLJ37927)	FLJ37927; G6VTS76519	NM_152623	Hs.170708	78	Zellzykluskontrolle				7.5 0.023
Homo sapiens CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	CKS2; CKSHS2	NM_001827	Hs.83758	93	Zellzykluskontrolle	regulation of CDK activity; cell cycle; cytokinesis	cyclin-dependent protein kinase activity		7.1 0.006
Homo sapiens mRNA for KIAA1154 protein	KIAA1154; DCDC2; RU2	AB032980	Hs.61345	78	Zelluläre Abwehr	cellular defence response	tumour antigen		1.9 <0.001
Homo sapiens lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)	LCP1 ; CP64 ; PLS2 ; LC64P ; L-PLASTIN	NM_002298	Hs.381099	91	Zytoskelet; Actin-bindendes Protein		actin binding; calcium ion binding	cytosol	2.6 0.048
Homo sapiens retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	RARRES1; TIG1	NM_002888	Hs.82547	84	Membranrezeptor; Zelladhäsionsmolekül	negative regulation of cell proliferation		integral to membrane	3.2 0.002
Homo sapiens hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4	HCN4	NM_005477	Hs.225671	93	Muskelkontraktion; Schrittmacherkanal	microtubule-based movement; sodium ion transport; potassium ion transport; circulation; muscle contraction	voltage-gated potassium channel activity; structural molecule activity; 3',5'-cAMP binding	microtubule; integral to plasma membrane; membrane fraction	2.9 <0.001
Bos taurus mRNA for putative endoplasmic reticulum nucleotide sugar transporter Homo sapiens UDP-galactose transporter related (UGTREL1)	SLC35B1; UGTREL1	AJ489254 NM_005827	Hs.154073	100 96	Transporter	transport	UDP-galactose transporter activity	microsome	2.3 0.017
Homo sapiens arginine-rich, mutated in early stage tumors	ARMET; ARP	NM_006010	Hs.436446	86	Onkogenese				4.0 0.006
Homo sapiens stromal cell-derived factor 2-like 1	SDF2L1	NM_022044	Hs.303116	81	Proteinmodifikation; Stressprotein			membrane; endoplasmic reticulum	9.3 <0.001
Homo sapiens signal sequence receptor, delta (translocon-associated protein delta)	SSR4; TRAPD	NM_006280	Hs.409223	87	Proteinsekretion	intracellular protein transport	calcium ion binding	endoplasmic reticulum; integral to membrane; translocon	2.3 0.004
Homo sapiens protein disulfide isomerase related protein (calcium-binding protein, intestinal-related)	ERP70; ERP72	NM_004911	Hs.93659	90	Proteinsekretion; Chaperon	protein secretion	protein disulfide isomerase activity	endoplasmic reticulum lumen	12.3 0.005
Bos taurus glucose regulated protein 58 kDa	GRP58; ERp57; ERp60; ERp61; GRP57; PI-PLC	NM_174333	Hs.308709	99	Proteinsekretion; Chaperon	protein-nucleus import ; protein-ER retention ; signal transduction	phospholipase C activity; protein disulfide isomerase activity; cysteine-type endopeptidase activity	endoplasmic reticulum	3.1 0.005
Homo sapiens hypoxia up-regulated 1	HYOU1; ORP150	NM_006389	Hs.277704	83	Proteinsekretion; Chaperon	response to stress	chaperone activity	endoplasmic reticulum	5.4 0.002

ERGEBNISSE

Fortsetzung von Tabelle 9 1

Homo sapiens Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily B, member 11	DNAJB11; EDJ; HEDJ; ABBP2; ABBP-2	NM_016306	Hs.317192	94	Proteinsekretion; Chaperon	protein folding	chaperone activity	endoplasmic reticulum	4.4	0.002
Homo sapiens heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	HSPA5; BIP; MIF2; GRP78	NM_005347	Hs.310769	93	Proteinsekretion; Chaperon		Hsp70/Hsp90 organizing protein activity; ATP binding	endoplasmic reticulum lumen	6.1	<0.001
Homo sapiens protein disulfide isomerase-related protein	P5	NM_005742	Hs.212102	91	Proteinsekretion; Chaperon	electron transport; protein folding	protein disulfide isomerase activity	endoplasmic reticulum	3.6	0.001
Bos taurus tumor rejection antigen (gp96) 1	TRA1; GP96; GRP94	NM_174700	Hs.192374	99	Proteinsekretion; Chaperon;	protein folding	chaperone activity	endoplasmic reticulum	11.4	<0.001
Homo sapiens ER degradation enhancing alpha mannosidase-like	EDEM; KIAA0212	NM_014674	Hs.154332	91	Proteinsekretion; Degradation fehlgefalteter Proteine	N-linked glycosylation; carbohydrate metabolism	mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase activity; calcium ion binding	integral to membrane	3.3	<0.001
Oryctolagus cuniculus hensis	DMBT1; GP340	AF043112	Hs.279611	86	sekretiertes Protein; ECM		tumour suppressor		3.1	<0.001
Homo sapiens deleted in malignant brain tumors 1 (DMBT1)		NM_007329		79	Protein					
Homo sapiens anterior gradient 2 homolog (Xenopus laevis)	AGR2; AG2; GOB-4; HAG-2; XAG-2	NM_006408	Hs.226391	80	sekretiertes Protein; ECM Protein; Differenzierung			extracellular space	6.9	0.029
Bovine mRNA for 95 kDa oviduct-specific glycoprotein	OVGP1; MUC9	D16639	Hs.1154	99	sekretiertes Protein; Fruchtbarkeitskontrolle	pregnancy; fertilization	hydrolase activity	extracellular space	2.7	0.003
Gastrin-releasing peptide GRP (sheep)	GRP	S75723	Hs.153444	97	sekretiertes Protein; Hormonkontrolle; multifunktional	neuropeptide signaling pathway; signal transduction	growth factor activity	soluble fraction	4.0	<0.001
Homo sapiens sel-1 suppressor of lin-12-like	SEL1L; IBD2; SEL1-LIKE	NM_005065	Hs.181300	91	Signaltransduktion			integral to membrane, extracellular space	3.7	0.003
Human gene for U3 small nuclear RNA	U3 snRNA	X14945		87	Small nuclear RNA				3.6	0.005
Mus musculus adult male corpus striatum cDNA	C030027L06Rik	AK021108	Mm.71000	83	Unbekannt				5.0	0.022
Human DNA sequence from clone RP11-244N9 on chromosome 9		AL162385		80	Unbekannt				4.8	0.021
Homo sapiens, Similar to RIKEN cDNA 1700018O18 gene		BC011587	Hs.75668	90	Unbekannt				2.3	0.007
1JBJ21G7 Bos taurus Jejunum #1 library Bos taurus cDNA		CB223287		100	Unbekannt				5.8	0.006
Homo sapiens chromosome 5 clone CTD-2124P24		AC079465		78	Unbekannt				18.4	0.005
153052 MARC 4BOV Bos taurus cDNA		BE665083		100	Unbekannt				1.9	0.004

Fortsetzung von Tabelle 9 2

528733 MARC 3BOV Bos taurus cDNA		BM287908		97	Unbekannt			2.2	0.004
Homo sapiens hypothetical protein FLJ10707	FLJ10707; KIAA1757	NM_018187	Hs.405917	96	Unbekannt			4.7	<0.001
5 cDNA fragments without homology to database sequences					Unbekannt				

* MW Östrus:MW Diöstrus.

GO = Gene Ontology

Tabelle 10: Im Diöstrus hochregulierte Gene

Genbeschreibung	Abkürzung	GenBank Accession Nummer	UniGene	Homology (%)	Proteinfunktion	GO biological process	GO molecular function	GO cellular component	Di:Oe* p-Wert
Homo sapiens cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)	CCND1; BCL1; PRAD1; U21B31; D11S287E	NM_053056	Hs.371468	81	Zellzyklusregulation	G1/S transition of mitotic cell cycle; cell growth and/or maintenance; cytokinesis		nucleus	2.9 <0.001
Bos taurus mRNA for similar to NADH dehydrogenase subunit 1	MTND1	AB098969		98	Enzym, Energiemetabolismus	mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone	NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity; oxidoreductase activity	respiratory chain complex I; mitochondrion; integral to membrane	1.8 0.009
Homo sapiens nucleoside phosphorylase	NP; PNP	NM_000270	Hs.75514	84	Enzym, Purinesynthese	DNA modification; nucleobase, nucleoside and nucleic acid metabolism	purine-nucleoside phosphorylase activity; transferase activity, transferring glycosyl groups		2.6 0.018
Homo sapiens complement component 3	C3; ASP	NM_000064	Hs.284394	82	Immune Antwort, Komplementaktivität	complement activation, classical pathway, alternative pathway; G-PCR protein signaling pathway; immune response	complement activity; endopeptidase inhibitor activity; receptor binding	extracellular	4.0 <0.001
Homo sapiens 5'-nucleotidase, ecto	NT5E; eN; NTE; eNT; CD73; E5NT	NM_002526	Hs.153952	79	Immune-bezogen, henzündungshemmend, Signaltransduktion	DNA metabolism; nucleotide catabolism	hydrolase activity, acting on ester bonds; IMP-GMP specific 5'-nucleotidase	membrane fraction	1.7 0.017

ERGEBNISSE

Fortsetzung von Tabelle 10 1

Mus musculus FK506 binding protein 1a	FKBP1A; PKC12; PKCI2; FKBP12; PPIASE; FKBP-12; FKBP12C	NM_008019	Hs.374638	92	Immune-bezogen, Proteinfaltung, Signaltransduktion	protein folding	receptor activity; FK506 binding; FK506-sensitive peptidyl-prolyl cis-trans isomerase; cyclophilin-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity		2.6	<0.001
Homo sapiens pyruvate dehydrogenase kinase 4 mRNA	PDK4	AF334710	Hs.8364	85	Kinase	glucose metabolism; signal transduction	[pyruvate dehydrogenase (lipoamide)] kinase activity; ATP binding; protein kinase activity; transferase activity	mitochondrion	1.8	<0.001
598768 MARC 6BOV Bos taurus cDNA 3' Homo sapiens SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 (yeast), mRNA	SMT3H1; SMT3A; SUMO-3	CB424507	Hs.85119	100	Kinetochor Regulation			kinetochore	1.9	0.019
Homo sapiens O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N-acetylglucosaminyl transferase)	OGT; HRNT1; FLJ23071; MGC22921; O-GLCNAC	NM_003605		90	Proteinmodifikation, Signaltransduktion	response to nutrients; O-linked glycosylation; signal transduction	acetylglucosaminyltransferase activity; protein binding; transferring glycosyl groups	cytosol; nucleus	1.8	<0.001
Bos taurus mRNA for similar to ribosomal protein L26	RPL26	AB098829	Hs.406682	99	Proteinsynthese; ribosomales Protein	protein biosynthesis	structural constituent of ribosome; RNA binding	cytosolic large ribosomal subunit; intracellular	1.7	0.003
Homo sapiens ribosomal protein L5 (RPL5),	RPL5; MSTP030	NM_000969	Hs.180946	90	Proteinsynthese; ribosomales Protein	protein biosynthesis	structural constituent of ribosome; rRNA binding; 5S rRNA binding	cytosolic large ribosomal subunit; ribosome; intracellular	1.9	0.003
Homo sapiens RALBP1 associated Eps domain containing 1	REPS1; RALBP1	NM_031922	Hs.333141	94	Signaltransduktion, Endozytose		calcium ion binding		2.1	0.001
Homo sapiens transcription factor binding to IGHM enhancer 3	TFE3	NM_006521	Hs.274184	82	Transcriptions Regulation	cell growth and/or maintenance; regulation of transcription, DNA-dependent; transcription from Pol II promoter	transcription factor activity	nucleus	2.1	0.019
Homo sapiens GTF2I repeat domain containing 1	GTF2IRD1; GTF3; RBAP2; CREAM1; MUSTRD1; WBSR11; WBSR12	NM_016328	Hs.430854	93	Transcriptions Regulation	regulation of transcription, DNA-dependent; development	RNA polymerase II transcription factor activity, enhancer binding	nucleus	1.8	0.009
Homo sapiens zinc finger protein 36 (KOX 18) (ZNF36), mRNA	ZNF36; KOX18; PHZ-37; ZNF139; pHZ-37	XM_168302	Hs.24758	80	Transcriptions Regulation	regulation of transcription, DNA-dependent	transcription factor activity	nucleus	2.4	0.004
Mus musculus TAF3 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 140kDa	Taf3; TAF140; TAFII140; mTAFII140; 4933439M23Rik	XM_129997		75	Transcriptions Regulation	transcription from Pol II promoter	protein binding; RNA polymerase II transcription factor activity	transcription factor TFIID complex	1.7	0.001

ERGEBNISSE

Fortsetzung von Tabelle 10 2

RC0-BN0284-260700-023-f09 BN0284 Homo sapiens cDNA Homo sapiens RNPC2 RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 2	RNPC2; HCC1; CAPER; CC1.3; CC1.4	BE818469	Hs.282901	84	Transcriptions Regulation, RNA processing	mRNA splicing; regulation of transcription, DNA- dependent	RNA binding	nucleus	2.1	0.006
Homo sapiens WD repeat domain 13	WDR13; FLJ20563	NM_017883	Hs.12142	88	Transcriptions Regulation			nucleus	1.9	0.004
Homo sapiens sorting nexin 9	SNX9; SDP1; WISP; SH3PX1	NM_016224	Hs.7905	81	Transport, intrazellulär, Endozytose	protein localization	SH3/SH2 adaptor protein activity		1.6	<0.001
Bos taurus Niemann-Pick disease, type C1	NPC1	NM_174758	Hs.404930	97	Transport, Membranprotein, intrazellulärer Cholesterol Transport,	intracellular protein transport; cholesterol transport	sterol transporter activity; intracellular transporter activity; transmembrane receptor activity; hedgehog receptor activity	lysosome; integral to membrane; membrane fraction	1.6	0.002
Homo sapiens, similar to RAB28, member RAS oncogene family	RAB28	BC018067	Hs.306899	84	Transport, small GTPase, Vesikel Transport		RAB small monomeric GTPase activity		1.7	0.007
211208 MARC 2BOV Bos taurus cDNA		BE756907		99	Unbekannt				1.5	0.027
713065 MARC 6BOV Bos taurus cDNA 3'		CB455882		100	Unbekannt				4.4	0.022
IBE603019914.R1 CSEQFXN35 kidney Bos taurus cDNA		CB166522	Bt.6973	99	Unbekannt				1.9	0.020
Homo sapiens chromosome 5 clone RP11- 215G15		AC106760		80	Unbekannt				1.8	0.017
534395 MARC 4BOV Bos taurus cDNA 5'		BM481842		94	Unbekannt				2.3	0.013
TPA: Homo sapiens chromosome 7, Length = 158409401		BL000002		80	Unbekannt				2.3	0.008
IMU602702614.R1 CSEQFXL22 stomach- omasum Bos taurus cDNA.		CB168971	Bt.13764	99	Unbekannt				2.9	0.006
592942 MARC 6BOV Bos taurus cDNA 3'		CB420030	Bt.13766	100	Unbekannt				2.1	0.005
Homo sapiens PAC clone RP5-1032B10 from 7		AC004455		87	Unbekannt				2.0	0.004
Homo sapiens hypothetical protein LOC283152, mRNA	LOC283152	BC043548	Hs.114777	83	Unbekannt				1.7	0.004
BP250016A20A10 Soares normalized bovine placenta Bos taurus cDNA		BF039581	Bt.5872	98	Unbekannt				1.7	0.002

ERGEBNISSE

Fortsetzung von Tabelle 10 3

BP250010A10E9 Soares normalized bovine placenta Bos taurus cDNA	BF046719			99	Unbekannt			BP250010A10E9 Soares normalized bovine placenta Bos taurus cDNA	BF046719
Human Chromosome 16 BAC clone CIT987SK-A-211C6	AC002394			77	Unbekannt				1.8 <0.001
BX093047 Soares adult brain N2b5HB55Y Homo sapiens cDNA clone	BX093047	Hs.153661		91	Unbekannt				2.2 <0.001
Homo sapiens NMDA receptor-regulated gene 2	FLJ11896; NARG2	NM_024611	Hs.145608	84	Unbekannt				1.9 <0.001
Bos taurus ORF1 mRNA	ORF1	Z24674		99	Unbekannt				3.2 <0.001
2 cDNA fragments without homology to database sequences					Unbekannt				
Homo sapiens membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 8B	MS4A8B; MS4A4; 4SPAN4	NM_031457	Hs.150184	82	Membranrezeptor, Signaltransduktion	transport	transporter activity; receptor activity	integral to membrane	2.1 0.001

* MW Diöstrus:MW Östrus.

GO = Gene Ontology

5.7 Validierung der Ergebnisse durch quantitative Real-time RT-PCR

Die Ergebnisse der cDNA-Array-Hybridisierung wurden durch absolute Quantifizierung unter Verwendung von quantitativer Real-time RT-PCR validiert. Die gleichen sechs RNA-Proben (Östrus n=3, Diöstrus n=3) wie für die Array-Hybridisierung wurden benutzt. Als Kontrolle wurde die 18 S ribosomale RNA verwendet, die sich nicht zwischen den Proben von Östrus und Diöstrus unterschied (Tabelle 11). Die absoluten mRNA-Mengen wurden auf die Menge an Gesamt-RNA bezogen. Gleiche Werte für die 18 S rRNA belegen, dass gleiche Mengen an Gesamt-RNA für die cDNA Synthese eingesetzt wurden. Alle 7 ausgewählten Gene, die mittels Array-Hybridisierung gefunden wurden, zeigten auch signifikante Unterschiede in der Real-time PCR. Die mittlere mRNA-Menge, die mittlere Genexpressions-Differenz zwischen Östrus und Diöstrus und die p-Werte des t-Tests sind in Tabelle 11 dargestellt. Die mRNA-Konzentrationen bewegten sich zwischen 2 pg (AGR2) und 371 pg (OVGP1) pro µg Gesamt-RNA im Östrus. Die entsprechenden Konzentrationen im Diöstrus waren 0,2 und 70 pg/µl Gesamt-RNA. Aus der Gruppe der ausgewählten Gene, die im Östrus hochreguliert sind, war der 19-fache Anstieg von TRA1 am höchsten, wohingegen ein 1,7-facher Anstieg von MS4A8B im Diöstrus gemessen werden konnte, was den niedrigsten, noch signifikanten Expressionsunterschied darstellt. Für alle untersuchten Transkripte wurde eine enge Korrelation (r=0,94-0,99) zwischen cDNA-Array-Hybridisierung und Real-time RT-PCR Daten festgestellt (Abbildung 18).

Gen	GenBank Accession Nr	MW pg mRNA/µg total RNA ±SEM im Östrus	MW pg mRNA/µg total RNA ±SEM im Diöstrus	Oe:Di*	p-Wert	Effizienz der PCR
TRA1	NM_174700	22,21±4,24	1,17±0,31	19,0	0,002	1,99
ERP70	NM_004911	8,37±1,10	0,51±0,11	16,5	<0,001	1,86
GRP78/HSPA5	NM_005347	11,64±1,34	1,32±0,24	8,8	<0,001	1,93
AGR2	NM_006408	2,09±0,82	0,23±0,08	9,1	0,03	1,93
OGP	D16639	371,3±21,3	71,9±20,1	5,2	<0,001	1,83
C3	NM_000064	0,63±0,02	2,26±0,10	0,28	<0,001	1,86
MS4A8B	NM_031457	0,69±0,07	1,20±0,06	0,59	0,001	1,95
18S rRNA	-	2250±140	1950±140	1,15	n.s.	1,93

*MW Östrus:MW Diöstrus

Tabelle 11: Ergebnisse der Real-time RT-PCR; MW = Mittelwert

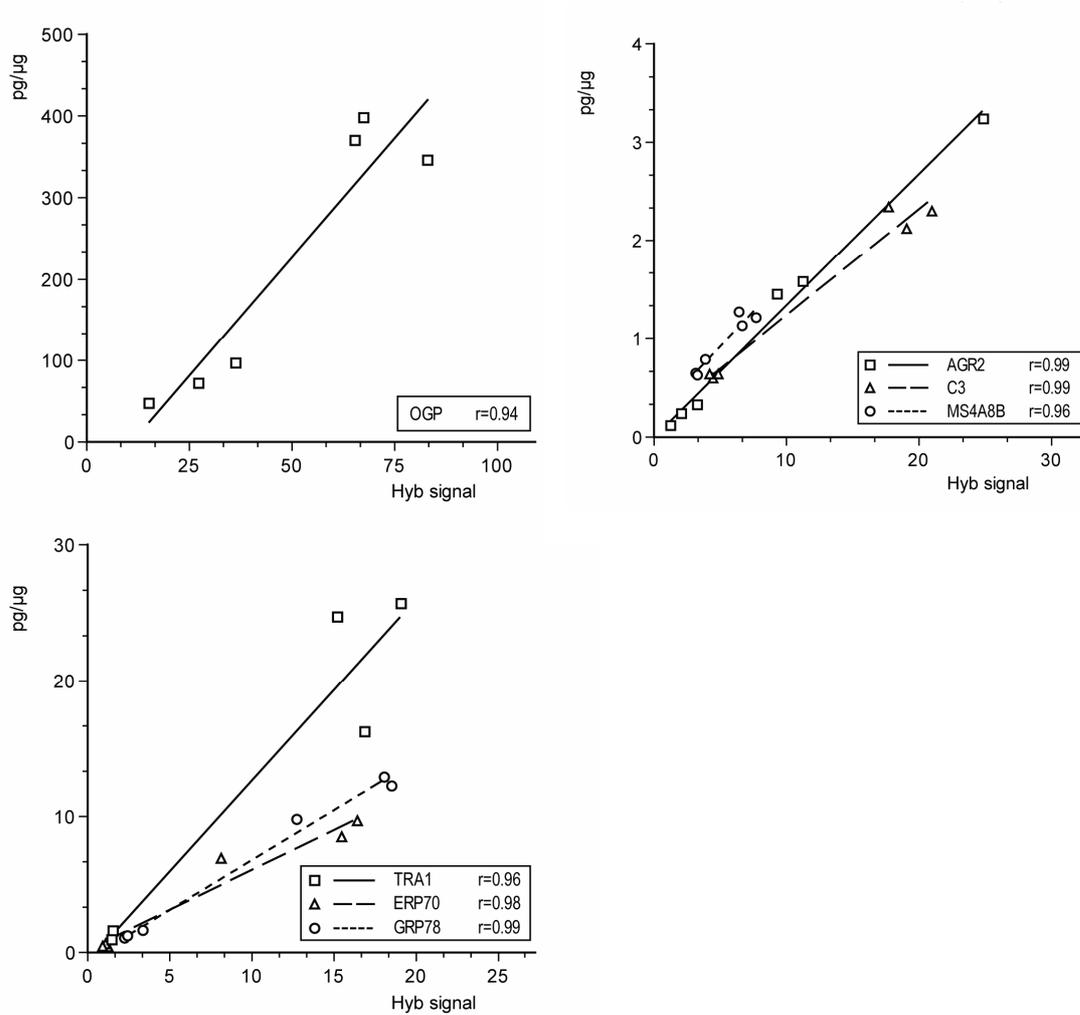


Abbildung 18: Korrelation von cDNA-Array-Hybridisierung und quantitativer Real-time RT-PCR

In der graphischen Darstellung wurden die normalisierten Signale der Hybridisierung (X-Achse) gegen die RNA-Konzentration aus der quantitativen PCR (Y-Achse) aufgetragen. r = Korrelationskoeffizient.

Diese Arbeiten wurden im Rahmen der Kooperation in der DFG-Forschergruppe „Mechanismen der embryo-maternalen Kommunikation“ mit dem Institut für Physiologie, im Speziellen von Frau S. Ulbrich durchgeführt.

5.8 Der Vergleich von Ampulle und Isthmus getrennt zu vier Zykluszeitpunkten mit dem Ovidukt-Array

Zur weiterführenden und differenzierteren Analyse des Transkriptoms in Eileiterepithelzellen wurde ein Ovidukt-Array hergestellt, das aus insgesamt 549 cDNAs bestand. 94 der gespotteten cDNAs waren Kontrollen, von denen keine signifikanten Veränderungen im Zyklusverlauf erwartet wurden. Diese Gene zeigten auch tatsächlich bei der späteren Auswertung keine signifikanten Expressionsunterschiede, weder zwischen den beiden Abschnitten noch im Zyklusverlauf. 23 der aufgespotteten Gene stammten aus einer anderen Arbeitsgruppe der Forschergruppe „Embryo-maternale Kommunikation“ und waren dort im Zusammenhang mit der Eileiterfunktion als interessant aufgefallen. Dieses Array wurde in Hybridisierungsexperimenten mit jeweils 3 Tieren an Tag 0, Tag 3,5, Tag 12 und Tag 18 verwendet. Die beiden Eileiterabschnitte Ampulle und Isthmus wurden getrennt voneinander untersucht. Die mRNA-Konzentrationen wurden als signifikant unterschiedlich angesehen, wenn der Quotient zwischen zwei Zeitpunkten bzw. zwischen den Abschnitten über Faktor zwei lag und der p-Wert unter 0,05. Die Auswertung der Hybridisierungsdaten ergab insgesamt 253 cDNAs, die zwischen einem der Zeitpunkte und/oder den beiden Abschnitten signifikante Unterschiede in ihren mRNA-Konzentrationen aufwiesen. Diese entsprachen 196 verschiedenen Genen. In der Ampulle waren insgesamt 108 verschiedene mRNAs und im Isthmus 141 verschiedene mRNAs zwischen den vier Zeitpunkten reguliert. In beiden Eileiterabschnitten wiesen die meisten mRNAs an Tag 0 die niedrigste Expression auf, in der Ampulle 39 und im Isthmus 78 der 108 respektive 141 verschiedenen cDNAs. An Tag 3,5 des Sexualzyklus zeigten die wenigsten der regulierten cDNAs ihr niedrigstes Konzentrations-Niveau, 16 in der Ampulle und 14 im Isthmus. An Tag 12 des Zyklus war die mRNA für 31 cDNAs in der Ampulle und für 19 im Isthmus am schwächsten vertreten und an Tag 18 waren es 22 in der Ampulle und 38 im Isthmus. In Bezug auf die Unterschiede zwischen den beiden Eileiterabschnitten innerhalb eines Zykluszeitpunktes zeigte sich ein ganz anderes Bild. 34 der insgesamt im Abschnittvergleich als differenziell exprimiert identifizierten Gene fielen alleine an Tag 18 auf. Beim Abschnittvergleich war im Gegensatz zum Vergleich der Genexpression im Zyklusverlauf Tag 0 der Zeitpunkt mit den wenigsten Veränderungen. Hier konnten nur 6 Gene als differenziell exprimiert identifiziert werden. An Tag 3,5 waren es 19 und an Tag 12 13 Gene. Manche dieser Gene zeigten an mehreren Zyklustagen eine signifikante Differenz in den mRNA-Konzentrationen und wurden zur Gesamtheit der differenziell exprimierten Gene im Abschnittvergleich aber nur ein einziges Mal gezählt. Der

größte Expressionsunterschied in der Ampulle konnte bei SDF2L1 im Vergleich Tag 0 mit Tag 12 gemessen werden und war hier mehr als 38fach. Im Isthmus lag der größte Unterschied bei 61fach und wurde im Vergleich Tag 0 gegen Tag 18 gemessen, wobei die Funktion des zugehörigen Gens noch nicht bekannt ist. Grundsätzlich korrelierten die Expressionsergebnisse bei cDNAs, die mehr als einmal auf dem Array vertreten waren sehr gut. Die Tabellen 13 bis 18 zeigen die detaillierten Ergebnisse der Array-Auswertung. Es wurden der Sequenzname aus GenBank, die offizielle Abkürzung, die Genbank Accession Nummer, eventuelle Signal- oder Stoffwechselwege, in die das Gen involviert ist und die Gene Ontology zur funktionellen Klassifizierung der Gene aufgeführt. Weiterhin geben die Tabellen 13 bis 18 die Faktoren zwischen den einzelnen Zeitpunkten bzw. Abschnitten und den p-Wert des jeweiligen studentischen t-Tests an. In den Tabellen 13 bis 14 sind zusätzlich die normalisierten Expressionswerte dargestellt, wobei der Zeitpunkt mit der niedrigsten Expression immer auf den Wert 1 gesetzt wurde und die Expressionshöhen der anderen Zeitpunkte im Verhältnis dazu berechnet wurden. Dadurch ist aus der jeweiligen Expressionshöhe auch immer der Faktor im Vergleich zur niedrigsten Expression zu erkennen. Tabelle 12 zeigt alle Gene die in der Ampulle und Tabelle 13 zeigt alle Gene die im Isthmus im Zyklusverlauf reguliert waren. Diejenigen Gene die an Tag 0, Tag 3,5, Tag 12 und Tag 18 jeweils einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Eileiterabschnitten zeigten sind in den Tabellen 15 bis 18 aufgelistet.

Die Abbildungen 19 und 21 zeigen exemplarisch zwei Gene, die signifikante Signalunterschiede aufwiesen. Es sind jeweils die Signale der jeweiligen Array-Hybridisierungen dargestellt, in der oberen Reihe diejenigen für die Ampulle und in der unteren Reihe für den Isthmus. In den dazugehörigen Graphen sind immer auf der X-Achse die einzelnen Zyklusstadien und auf der Y-Achse die jeweiligen Expressionsintensitäten abgebildet. In Abbildung 19 sind die Daten für TRA1 (*Bos taurus* tumor rejection antigen 1) dargestellt, das zur Klasse der molekularen Chaperone gehört. TRA1 zeigt an Tag 0 die höchste mRNA-Konzentration, die dann zu Tag 3,5 stark abfällt und erst an Tag 18 wieder leicht ansteigt. Dieses Expressionsmuster ist charakteristisch für viele der gefundenen molekularen Chaperone und weicht, wie in Abbildung 20 zu sehen, in dieser Proteingruppe von Gen zu Gen immer nur leicht ab. Das Expressionsmuster dieser Genklasse ist in beiden Eileiterabschnitten gleichermaßen zu finden, nur mit individuellen Unterschieden in der Stärke der Ausprägung. Abbildung 20 zeigt die Daten für MS4A8B (*Homo sapiens* membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 8B), das bei der Signaltransduktion in der Zelle eine wichtige Rolle spielt. Es steht beispielhaft für Gene, deren mRNA einen

deutlichen Unterschied zwischen Ampulle und Isthmus zeigen. Die mRNA diese Gens war an Tag 3,5 im Isthmus dreimal so häufig vorhanden wie in der Ampulle.

Die Gene, die beim Vergleich von Ampulle und Isthmus zu vier verschiedenen Zykluszeitpunkten als differenziell exprimiert erschienen, wurden ebenfalls in Gene Ontologies eingeteilt. Im Wesentlichen wurden die Gene Ontologies aus dem Östrus-Diöstrus-Vergleich bestätigt, weshalb auf eine weitere graphische Darstellung aus Gründen der Verständlichkeit der Abbildung verzichtet wurde.

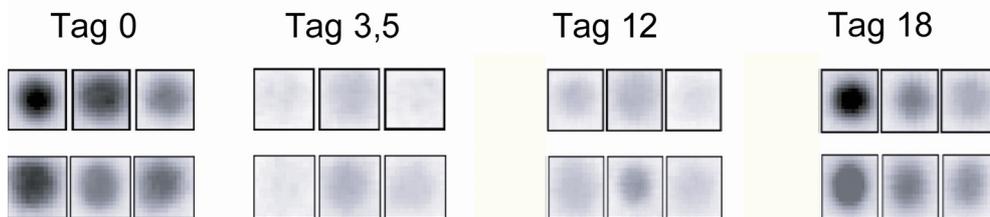
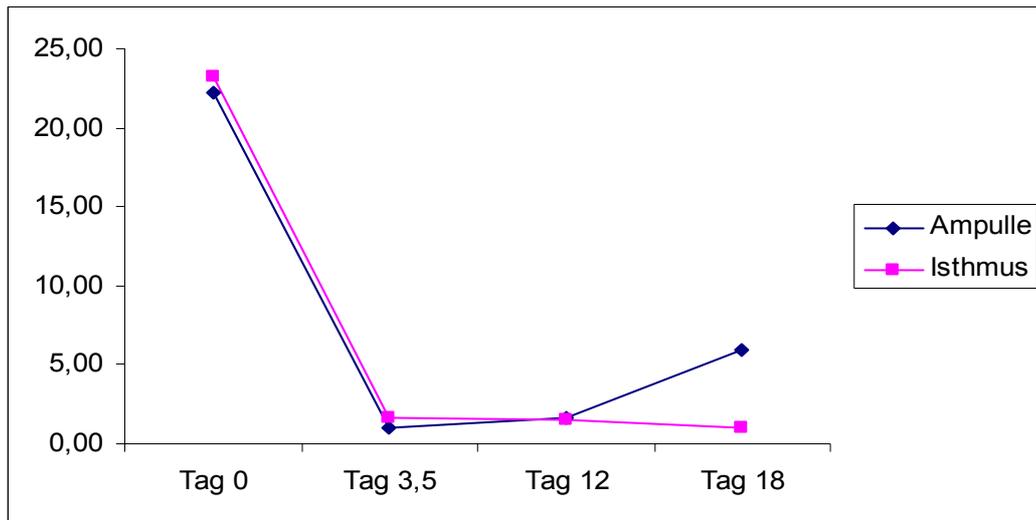


Abbildung 19: Veränderungen im Zyklusverlauf A/I (Bos taurus tumor rejection antigen (gp96) 1 (TRA1))

In der Graphik sind die normalisierten Signalwerte von TRA1 auf der Y-Achse aufgetragen und die jeweiligen Zyklustage sind auf der X-Achse zu finden. Unter der Graphik sind die zugehörigen Spots, in der oberen Reihe diejenigen aus der Ampulle und in der unteren Reihe diejenigen aus dem Isthmus, abgebildet.

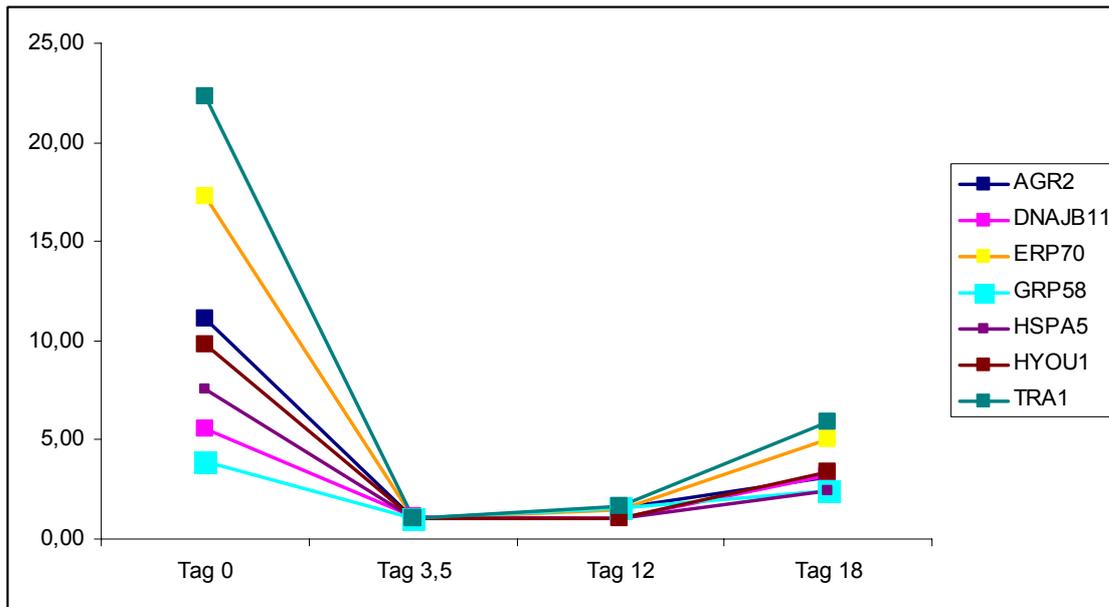


Abbildung 20: Übersicht über die Genexpression einer Auswahl an molekularen Chaperonen in der Ampulle im Zyklusverlauf

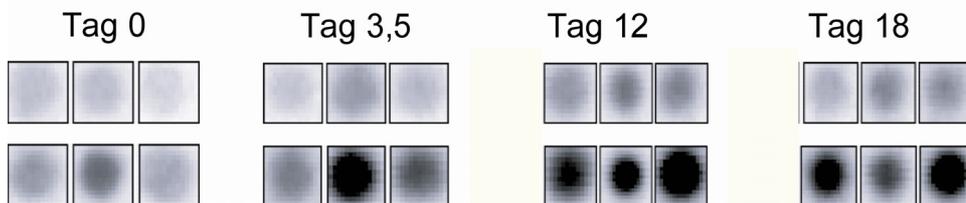
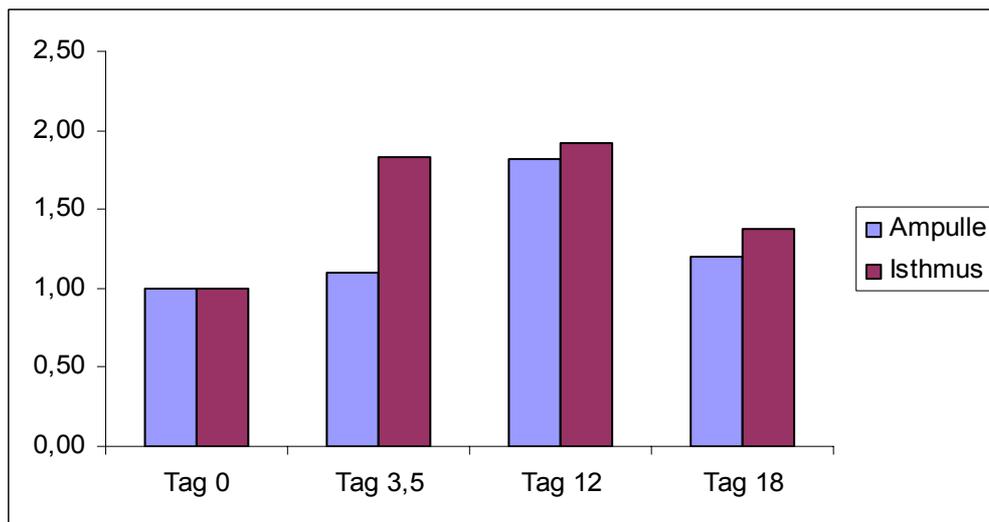


Abbildung 21: Veränderungen Vergleich Ampulle/Isthmus

(Homo sapiens membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 8B (MS4A8B)) In der Graphik sind die normalisierten Signalwerte von MS4A8B auf der Y-Achse aufgetragen und die jeweiligen Zyklustage sind auf der X-Achse zu finden. Unter der Graphik sind die zugehörigen Spots, in der oberen Reihe diejenigen aus der Ampulle und in der unteren Reihe diejenigen aus dem Isthmus, abgebildet.

Tabelle 12: differenziell exprimierte Gene in der Ampulle

Genbeschreibung	Abkürzung	Accession Nr.	Stoffwechsel/Signalweg	Ontologie	p-Wert 0-3,5	p-Wert 3,5-12	p-Wert 12-18	p-Wert 18-0	Tag 0	Tag 3,5	Tag 12	Tag 18
1JEJ21G2 Bos taurus Jejunum #1 library Bos taurus cDNA similar to anterior gradient 2; Bt.29129; agr2: Anterior gradient 2 homologue	AGR2	CB223282			0,003	0,047	0,127	0,002	11,11	1,00	1,60	3,09
1JEJ21G7 Bos taurus Jejunum #1 library Bos taurus cDNA		CB223287			0,029	0,289	0,361	0,026	4,00	1,29	1,00	1,21
275979 MARC 3BOV MARC 3BOV Bos taurus cDNA; Bt.4688; Transcribed locus, strongly similar to NP_060371.2 two pore segment channel 1 [Homo sapiens]	Tpcn1	NM_017901		ion transport;	0,016	0,032	0,089	0,272	1,21	2,90	1,41	1,00
283452 MARC 3BOV Bos taurus cDNA; Bt.8933; Transcribed locus, strongly similar to NP_005820.1 adaptor-related protein complex 3, sigma 2 subunit [Homo sapiens]	AP3S2	NM_005829		intracellular protein transport	0,427	0,065	0,032	0,022	2,12	2,18	1,68	1,00
397282 MARC 4BOV Bos taurus cDNA		BI537421			0,005	0,012	0,146	0,402	1,00	2,54	1,44	1,08

Fortsetzung Tabelle 12 1

471854 MARC 2BOV Bos taurus cDNA; Bt.4054; Transcribed locus, moderately similar to NP_996877.1 gonadotropin-releasing hormone (type 2) receptor 2 [Homo sapiens]	GNRHR2	NM_206994		cell-cell signaling; signal transduction; cytoskeleton organization and biogenesis; G-protein coupled receptor protein signaling pathway;	0,389	0,440	0,110	0,025	2,07	1,95	1,85	1,00
528733 MARC 3BOV Bos taurus cDNA		BM287908			0,013	0,317	0,114	0,015	5,73	1,15	1,00	2,12
529250 MARC 3BOV Bos taurus cDNA ; Bt.3904 Transcribed locus, strongly similar to NP_057043.1 thioredoxin-related transmembrane protein 2 [Homo sapiens]	TMX2	NM_015959		electron transport; protein transport;	0,208	0,116	0,033	0,001	1,98	2,34	1,74	1,00
721593 MARC 6BOV Bos taurus cDNA		CB421974			0,228	0,016	0,021	0,005	2,54	2,79	1,84	1,00
AJ696860 KN261 Bos taurus cDNA clone KN261-058_L24; Bt.33277 Transcribed locus, strongly similar to NP_082956.2 estrogen-related receptor beta like 1 [Mus musculus]	ESRRBL1	NM_018010			0,046	0,288	0,221	0,002	1,00	1,91	2,13	2,33
AV662610 Bos taurus brain fetus Bos taurus cDNA; Bt.5445 TUBB: Tubulin, beta polypeptide	TUBB	NM_006087		signal transduction; cytoskeleton organization and biogenesis;	0,101	0,001	0,013	0,003	2,02	2,23	1,78	1,00

Fortsetzung Tabelle 12 2

B.taurus mRNA for immunoglobulin light chain		X62917			0,029	0,008	0,087	0,001	1,00	1,92	3,51	4,23
Bos taurus actin, beta (ACTB)	ACTB	NM_173979			0,200	0,386	0,097	0,047	1,00	1,31	1,41	2,24
Bos taurus endothelial dysfunction inducing protein (EDIP)	EDIP	AF529136			0,058	0,363	0,167	0,013	1,00	2,24	2,52	1,82
Bos taurus glucose regulated protein 58kD (GRP58)	GRP58	NM_174333		signal transduction; cytoskeleton organization and biogenesis; electron transport; ion transport; protein transport;	0,001	0,090	0,117	0,035	3,93	1,00	1,59	2,42
Bos taurus immunoglobulin IgA heavy chain constant region gene		AF109167			0,288	0,006	0,167	0,002	1,00	1,29	3,26	3,64
Bos taurus immunoglobulin lambda light chain (IgL)	IgL	AF396698		host-pathogen interaction; cytoskeleton organization and biogenesis;	0,116	0,059	0,145	0,027	1,00	1,50	2,71	3,76
Bos taurus matrix Gla protein mRNA	MGP	AF210379		regulation of gene expression, epigenetic	0,013	0,047	0,338	0,029	1,00	17,15	7,23	5,47
Bos taurus microsatellite MNB-131 sequence		AF271933			0,036	0,305	0,243	0,004	1,00	1,68	1,88	2,12
Bos taurus pepsinogen A (pga)	pga	NM_001001600			0,003	0,002	0,032	0,029	1,00	7,75	1,00	2,50
Bos taurus retinal short-chain dehydrogenase/reductase retSDR1	SDR1	AF061742			0,038	0,219	0,391	0,027	1,00	2,30	1,85	1,74

Fortsetzung Tabelle 12 3

Bos taurus tumor rejection antigen (gp96) 1 (TRA1)	TRA1	NM_174700		response to abiotic stimulus; cell recognition; host-pathogen interaction; response to external stimulus; cytoskeleton organization and biogenesis; cell growth; protein folding; response to unfolded protein;	0,006	0,153	0,099	0,003	22,27	1,00	1,61	5,89
BovGen_15956 normal cattle brain Bos taurus cDNA clone RZPDp1056N1918Q; Hs.368823; KIAA1026: KIAA1026 protein Homo sapiens	KIAA1026	XM_048825			0,001	0,086	0,093	0,004	1,00	2,06	1,79	2,13
BovGen_22121 normal cattle brain Bos taurus cDNA clone RZPDp1056H0831Q; Bt.24933; Transcribed locus, moderately similar to XP_130987.3 retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1 [Mus musculus]	RARRES1	NM_002888		regulation of gene expression, epigenetic; negative regulation of cell proliferation;	0,076	0,077	0,268	0,039	2,59	1,59	1,00	1,24

ERGEBNISSE

Fortsetzung Tabelle 12 4

BovGen_24721 normal cattle brain Bos taurus cDNA clone RZPDp1056G1447Q; Bt.23128; erp70: Protein disulfide isomerase related protein	ERP70	NM_004911		electron transport; ion transport; protein transport;	0,009	0,097	0,127	0,009	17,26	1,00	1,43	5,01
Bovine mRNA for 95 kDa oviduct-specific glycoprotein	OVGP1	D16639			0,053	0,077	0,099	0,026	7,28	3,45	1,00	1,80
Bovine phospholipase C	PLCB4	L13938		signal transduction; cytoskeleton organization and biosynthesis; carbohydrate metabolism; catabolism; lipid metabolism; intracellular signaling cascade;	0,256	0,183	0,106	0,009	2,11	2,36	1,81	1,00
Di214F11PM0 Bovine SSH library; oviduct; dioestrus; DI2 Bos taurus cDNA clone Di214F11		CK280156			0,011	0,073	0,005	0,004	1,00	3,86	2,49	3,89
EST284 Bovine Lambda Zap Express corpus luteum cDNA library Bos taurus cDNA clone cl_007_a11 5' similar to Bos taurus X-inactivation center region, Jpx and Xist genes		BU917342			0,022	0,457	0,166	0,000	1,00	2,06	2,09	1,93
Estrogen Receptor alpha	ESR1	X66841			0,223	0,011	0,440	0,042	1,16	1,00	2,65	2,56

Fortsetzung Tabelle 12 5

H. sapiens 33 kDa Vamp-associated protein (VAMP)	VAPA	AF154847		signal transduction; cytoskeleton organization and biogenesis; regulation of gene expression, epigenetic;	0,042	0,202	0,220	0,045	3,14	1,30	1,00	1,38
HA-receptor					0,213	0,028	0,214	0,000	10,01	12,63	3,23	1,00
Homo sapiens 12 BAC RP11-186F10 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library)		AC078860			0,336	0,067	0,362	0,015	1,00	1,14	2,26	2,05
Homo sapiens 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (PHACS)	PHACS	NM_032592		amino acid and derivate metabolism; biosynthesis; carbohydrate metabolism;	0,003	0,053	0,123	0,002	3,61	1,82	1,00	1,56
Homo sapiens 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase (HMGCR)	HMGCR	NM_000859		biosynthesis; carbohydrate metabolism; coencymes and prosthetic group metabolism; electron transport; lipid metabolism; cell growth; cell differentiation;	0,018	0,206	0,141	0,455	2,12	1,00	1,22	2,04
Homo sapiens androgen induced protein (AIG-1)	AIG-1	NM_016108			0,228	0,015	0,002	0,000	3,54	3,32	2,34	1,00
Homo sapiens anterior gradient 2 homolog (Xenopus laevis) (AGR2)	AGR2	NM_006408			0,006	0,172	0,103	0,005	10,03	1,00	1,43	2,78
Homo sapiens arginine-rich, mutated in early stage tumors (ARMET)	ARMET	NM_006010		cell growth;	0,005	0,288	0,100	0,004	9,89	1,29	1,00	2,50

Fortsetzung Tabelle 12 6

Homo sapiens ATP-binding cassette, subfamily G (WHITE), member 1 (ABCG1)	ABCG1	NM_004915		electron transport; lipid metabolism; ion transport;	0,003	0,008	0,258	0,476	1,00	2,08	1,19	1,02
Homo sapiens CDC28 protein kinase regulatory subunit 2 (CKS2)	CKS2	NM_001827		cell cycle; regulation of gene expression, epigenetic;	0,018	0,232	0,095	0,032	7,19	1,00	1,20	3,08
Homo sapiens CGI-85 protein (CGI-85)	CGI-85	NM_017635			0,268	0,080	0,111	0,016	3,58	4,03	2,38	1,00
Homo sapiens chromosome 16 clone RP11-21M24		AC092338			0,007	0,103	0,107	0,009	2,97	1,48	1,00	1,53
Homo sapiens cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1) (CCND1)	CCND1	NM_053056	scheint im Komplex mit CDK6 den Übertritt von der G1-Phase in die S-Phase zu hemmen; über MAPK signaling pathway indirekter Effect auf cell cycle	cell cycle; cell growth; growth; regulation of gene expression, epigenetic; regulation of cell cycle;	0,019	0,430	0,369	0,011	1,00	2,96	2,83	3,06
Homo sapiens DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 11 (DNAJB11)	DNAJB11	NM_016306		protein folding;	0,030	0,365	0,087	0,114	5,54	1,16	1,00	3,21
Homo sapiens dynein, axonemal, heavy polypeptide 9 (DNAH9)	DNAH9	NM_004662		cytoskeleton organization and biogenesis;	0,025	0,048	0,379	0,014	2,80	1,64	1,00	1,08
Homo sapiens egl nine homolog 1 (C. elegans) (EGLN1)	EGLN1	NM_022051		carbohydrate metabolism; electron transport;	0,122	0,327	0,011	0,006	1,00	1,29	1,19	2,23
Homo sapiens ER degradation enhancing alpha mannosidase-like (EDEM)	KIAA0212	NM_014674			0,023	0,273	0,441	0,025	2,71	1,17	1,00	1,07

Fortsetzung Tabelle 12 7

Homo sapiens eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2 (EEF1B2)	EEF1B2	NM_001959		protein biosynthesis; biosynthesis;	0,053	0,098	0,436	0,022	3,16	1,75	1,00	1,04
Homo sapiens heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa) (HSPA5)	HSPA5	NM_005347	inhibits proliferation and differentiation	response to stress;	0,011	0,432	0,126	0,011	7,53	1,00	1,04	2,42
Homo sapiens hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4 (HCN4)	HCN4	NM_005477		signal transduction; cytoskeleton organization and biogenesis; ion transport;	0,011	0,229	0,125	0,012	16,52	1,80	1,00	4,25
Homo sapiens hypothetical protein FLJ10707 (FLJ10707)	FLJ10707	XM_371614			0,015	0,178	0,141	0,025	11,43	1,00	1,66	4,21
Homo sapiens hypothetical protein FLJ12270 (FLJ12270)	FLJ12270	XM_290704			0,014	0,141	0,113	0,009	3,87	1,67	1,00	1,56
Homo sapiens hypothetical protein FLJ20254 (FLJ20254)	FLJ20254	NM_017727			0,020	0,004	0,106	0,089	3,25	1,00	1,37	2,18
Homo sapiens hypothetical protein FLJ37927 (FLJ37927)		NM_152623			0,011	0,143	0,095	0,012	32,17	8,69	3,61	1,00
Homo sapiens hypothetical protein MGC32124 (MGC32124)	MGC32124	NM_144611			0,482	0,154	0,029	0,337	1,66	1,70	1,00	1,99
Homo sapiens hypoxia up-regulated 1 (HYOU1)	HYOU1	NM_006389		response to stress; protein folding;	0,013	0,402	0,123	0,020	9,79	1,00	1,08	3,41
Homo sapiens KIAA0638 protein (KIAA0638)	KIAA0638	AB014538			0,028	0,293	0,182	0,016	1,00	1,66	1,78	2,09
Homo sapiens KIAA0638 protein (KIAA0638)	KIAA0638	AB014538			0,470	0,092	0,099	0,008	2,53	2,50	1,74	1,00

Fortsetzung Tabelle 12 8

Homo sapiens Kruppel-like factor 5 (intestinal) (KLF5)	KLF5	NM_001730		DNA metabolism; transcription; regulation of gene expression, epigenetic; regulation of transcription, DNA-dependent;	0,180	0,030	0,018	0,007	1,00	1,27	1,75	2,28
Homo sapiens LUC7-like (<i>S. cerevisiae</i>) (LUC7L)	LUC7L	NM_201412			0,167	0,004	0,029	0,002	2,41	2,60	1,57	1,00
Homo sapiens mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MAP2K5)	MAP2K5	NM_145160	stimulates proliferation and differentiation; Aktivierung von F-actin und indirekt der Zellproliferation	signal transduction; cytoskeleton organization and biogenesis;	0,491	0,140	0,067	0,007	2,22	2,23	1,75	1,00
Homo sapiens mRNA for immunoglobulin heavy chain variable region	IGHM	AF109167			0,062	0,426	0,407	0,044	1,00	2,37	2,50	2,36
Homo sapiens mRNA for KIAA1154 protein; Hs.61345 Homo sapiens RU2 RU2S	RU2	AB032980			0,036	0,184	0,108	0,022	3,25	1,59	1,00	1,54
Homo sapiens mRNA for membrane glycoprotein LIG-1; Hs.4193 Homo sapiens LRIG1 Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1	LRIG1	AB050468		host-pathogen interaction; cytoskeleton organization and biogenesis;	0,022	0,177	0,289	0,000	1,00	1,82	2,17	2,34
Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686D1394; Hs.494312; NTRK2: Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2 Homo sapiens, 373 sequence(s)	NTRK2	NM_006180			0,003	0,430	0,042	0,005	5,71	1,06	1,00	1,97

Fortsetzung Tabelle 12 9

Homo sapiens PAC clone RP5-1032B10 from 7		AC004455			0,031	0,071	0,221	0,129	1,00	4,49	2,35	1,69
Homo sapiens protein disulfide isomerase-related protein (P5)	P5	NM_005742	Caspase network; HIF-1alpha pathway; IL-1 pathway; p38 pathway; p53 degradation; p53 nuclear import; p53 pathway		0,004	0,057	0,144	0,001	8,35	1,00	1,27	2,07
Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, U (PTPRU)	PTPRU	NM_133178		cell adhesion; protein amino acid dephosphorylation	0,002	0,143	0,056	0,046	1,00	2,85	2,50	1,78
Homo sapiens pyruvate dehydrogenase kinase 4	PK4	AF334710		signal transduction; cytoskeleton organization and biogenesis; mitochondrion organization and biogenesis; carbohydrate metabolism; electron transport; energy pathway;	0,245	0,027	0,016	0,009	2,28	2,49	1,82	1,00
Homo sapiens ralA binding protein 1 (RALBP1)	RALBP1	NM_006788		signal transduction; cytoskeleton organization and biogenesis; ion transport; protein transport; transport;	0,002	0,068	0,134	0,495	1,00	2,00	1,40	1,00
Homo sapiens retinoblastoma binding protein 7 (RBBP7)	RBBP7	NM_002893		cell growth; cell proliferation; cell differentiation; cell proliferation; development;	0,027	0,011	0,050	0,217	2,36	1,00	1,26	1,99

Fortsetzung Tabelle 12 10

Homo sapiens retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1 (RARRES1)	RARRES1	NM_002888			0,012	0,008	0,116	0,003	4,02	2,15	1,00	1,48
Homo sapiens retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1 (RARRES1)	RARRES1	NM_206963			0,029	0,042	0,239	0,009	4,07	2,38	1,00	1,26
Homo sapiens ribophorin I (RPN1)	RPN1	NM_002950			0,029	0,095	0,297	0,055	2,26	1,00	1,29	1,44
Homo sapiens ribosomal protein S15 (RPS15)	RPS15	NM_001018			0,214	0,187	0,287	0,014	2,05	1,61	1,13	1,00
Homo sapiens SAR1 protein (SAR1)	SARA1	NM_020150		signal transduction; cytoskeleton organization and biogenesis; ion transport; protein transport; intracellular protein transport	0,037	0,037	0,278	0,018	3,66	2,11	1,00	1,19
Homo sapiens signal sequence receptor, delta (translocon-associated protein delta) (SSR4)	SSR4	NM_006280		ion transport; protein transport; intracellular protein transport	0,085	0,153	0,028	0,034	3,36	1,92	1,00	1,47
Homo sapiens signal sequence receptor, gamma (translocon-associated protein gamma) (SSR3)	SSR3	NM_007107		protein biosynthesis;	0,013	0,188	0,109	0,016	2,59	1,24	1,00	1,34
Homo sapiens solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 3 (SLC7A3), mRNA	SLC7A3	NM_032803		ion transport;	0,009	0,049	0,137	0,423	1,00	4,26	2,18	1,10

Fortsetzung Tabelle 12 11

Homo sapiens stromal cell-derived factor 2-like 1 (SDF2L1)	SDF2L1	NM_022044			0,009	0,065	0,162	0,005	38,27	1,76	1,00	6,96
Homo sapiens SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 2 (SMARCD2)	SMARCD2	NM_003077			0,113	0,205	0,116	0,001	1,00	1,47	1,82	2,26
Homo sapiens TAR (HIV) RNA binding protein 2 (TARBP2)	TARBP2	NM_134324		transcription; regulation of gene expression, epigenetic;	0,413	0,072	0,124	0,000	2,77	2,86	1,76	1,00
Homo sapiens Thy-1 glycoprotein and Thy-1 co-transcribed protein	THY1	AF261093			0,011	0,012	0,197	0,045	1,00	10,30	3,10	1,56
Homo sapiens transcription factor binding to IGHM enhancer 3 (TFE3)	TFE3	NM_006521		cell-cell signaling; cytoskeleton organization and biogenesis; DNA metabolism; transcription; protein biosynthesis; cell growth; growth; regulation of gene expression, epigenetic; regulation of transcription, DNA-dependent;	0,122	0,000	0,019	0,002	2,31	2,58	1,63	1,00
Homo sapiens UDP-galactose transporter related (UGTREL1)	UGALT2	AJ489254			0,025	0,228	0,176	0,142	5,43	1,00	1,40	3,17
Homo sapiens WAP four-disulfide core domain 2 (WFDC2)	WFDC2	NM_006103			0,069	0,196	0,059	0,034	1,00	1,47	1,25	2,14

Fortsetzung Tabelle 12 12

Homo sapiens WD repeat domain 13 (WDR13)	WDR13	NM_017883			0,046	0,297	0,048	0,000	1,00	1,76	2,06	3,25
Homo sapiens, neuronatin	NNAT	BC001768		ion transport; protein transport; cell growth; cell differentiation;	0,034	0,270	0,237	0,079	1,00	2,20	1,86	1,53
Homo sapiens, translation factor sui1 homolog	SUI1	NM_005875			0,055	0,478	0,013	0,004	1,00	1,34	1,35	2,00
Human DNA sequence from clone RP11-552M11 on chromosome 1. Contains the OVGPI gene for oviductal glycoprotein 1 (mucin 9, oviductin), three novel genes, the ATP5F1 gene for mitochondrial F0 complex H+ transporting ATP synthase b1, the ADORA3 gene for adenosine A3 receptor and an RPS29 (40S ribosomal protein S29) pseudogene. Contains ESTs, STSs, GSSs and two CpG islands		AL390195			0,008	0,042	0,134	0,005	5,29	1,75	1,00	1,67

Fortsetzung Tabelle 12 13

IGF-binding protein-4	IGFBP4	NM_174557		cell-cell signaling; signal transduction; cytoskeleton organization and biogenesis; DNA metabolism; transcription; carbohydrate metabolism; cell growth; cell proliferation; cell differentiation; growth; regulation of gene expression, epigenetic; cell proliferation;	0,190	0,047	0,255	0,072	3,54	5,18	1,80	1,00
Immunglobulin mRNA					0,211	0,011	0,018	0,007	1,00	1,28	2,95	5,16
Immunglobulin mRNA					0,228	0,087	0,099	0,029	1,00	1,29	2,23	3,48
inducible NO-Synthase; Bt.23126 Bos taurus NOS2A: Nitric oxide synthase 2A (inducible, hepatocytes)	NOS2A	AF340236		amino acid and derivate metabolism; biosynthesis; carbohydrate metabolism; electron transport; ion transport;	0,299	0,258	0,228	0,033	1,00	1,28	1,91	2,66
MARC 6BOV Bos taurus cDNA		CB461614			0,013	0,041	0,038	0,021	3,14	1,51	1,00	1,81
Mus musculus ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 1 (Abtb1)	Abtb1	NM_030251		protein biosynthesis;	0,042	0,385	0,302	0,073	1,00	2,57	2,85	3,62

Fortsetzung Tabelle 12 14

Mus musculus fibroblast growth factor receptor-like 1 (Fgfr1)	Fgfr1	NM_054071		cell-cell signaling; cytoskeleton organization and biogenesis; cell growth; growth; regulation of gene expression, epigenetic;	0,045	0,453	0,250	0,001	1,00	1,96	2,03	2,32
nicht in NCBI database gefunden					0,030	0,064	0,080	0,492	1,00	2,19	1,34	1,01
nicht in NCBI database gefunden					0,249	0,212	0,069	0,041	2,12	1,80	1,59	1,00
nicht in NCBI database gefunden					0,004	0,004	0,073	0,003	4,86	2,46	1,00	1,92
nicht in NCBI database gefunden					0,018	0,017	0,091	0,007	4,01	2,26	1,00	1,63
nicht in NCBI database gefunden					0,316	0,010	0,033	0,004	3,88	4,08	2,20	1,00
Oe207F06PM0 Bovine SSH library; oviduct; oestrus; OE2 Bos taurus cDNA clone Oe207F06		CK280113			0,025	0,350	0,099	0,102	5,23	1,09	1,00	3,01
Oe215H08PM0 Bovine SSH library; oviduct; oestrus; OE2 Bos taurus cDNA clone Oe215H08		CK280131			0,003	0,415	0,182	0,002	7,35	1,06	1,00	1,46
Oe217H11PM0 Bovine SSH library; oviduct; oestrus; OE2 Bos taurus cDNA clone Oe217H11		CK280135			0,005	0,178	0,239	0,005	22,30	3,60	1,00	2,19
Ovis aries immunoglobulin alpha heavy chain (IgA)	IgA	AF024645	c-Kit pathway	host-pathogen interaction; cytoskeleton organization and biogenesis;	0,347	0,010	0,495	0,007	1,00	1,19	2,78	2,78

Fortsetzung Tabelle 12 15

Rattus norvegicus genes for 18S, 5.8S, and 28S ribosomal RNAs		V01270			0,038	0,111	0,155	0,090	1,20	2,62	1,67	1,00
steroidogenic acute regulatory protein	STAR	NM_174189		cell-cell signaling; cytoskeleton organization and biogenesis; mitochondrion organization and biogenesis; biosynthesis; energy pathways; lipid metabolism; ion transport;	0,024	0,201	0,461	0,104	1,00	1,55	2,06	2,15

Tabelle 13: Differenziell exprimierte Gene im Isthmus

Genbeschreibung	Abkürzung	Accession Nr.	Stoffwechsel/ Signalweg	Ontologie	p-Wert 0-3,5	p-Wert 3,5-12	p-Wert 12-18	p-Wert 18-0	Tag 0	Tag 3,4	Tag 12	Tag 18
B.taurus (HEL18) microsatellite DNA		Z33885			0,006	0,099	0,050	0,007	1,00	1,43	1,84	2,51
1JEJ21G2 Bos taurus Jejunum #1 library Bos taurus cDNA similar to anterior gradient 2.	AGR2	CB223282			0,000	0,306	0,319	0,000	11,92	1,00	1,30	1,00
1JEJ21G7 Bos taurus Jejunum #1 library Bos taurus cDNA		CB223287			0,011	0,191	0,245	0,002	4,93	1,80	1,26	1,00
275979 MARC 3BOV Bos taurus cDNA; Bt.4688; Transcribed locus, strongly similar to NP_060371.2 two pore segment channel 1 [Homo sapiens]	Tpcn1	NM_017901		ion transport;	0,024	0,455	0,195	0,015	1,00	2,84	2,76	2,14
503268 MARC 2BOV Bos taurus cDNA; Bt.7932 Transcribed locus, weakly similar to NP_443737.1 low density lipoprotein-related protein 1B (deleted in tumors) [Mus musculus]	LRP2	NM_004525		amino acid and derivate metabolism; carbohydrate metabolism; lipid metabolism	0,009	0,182	0,082	0,003	5,42	1,76	2,75	1,00

ERGEBNISSE

Fortsetzung Tabelle 13 1

506078 MARC 3BOV Bos taurus cDNA		BM104817			0,037	0,159	0,172	0,039	1,00	1,71	2,47	3,51
528733 MARC 3BOV Bos taurus cDNA		BM287908			0,041	0,263	0,163	0,238	3,03	1,00	1,29	2,25
616455 MARC 6BOV Bos taurus cDNA		CB436136			0,001	0,006	0,259	0,031	1,00	2,64	1,54	1,72
721593 MARC 6BOV Bos taurus cDNA		CB461614			0,210	0,034	0,258	0,029	3,74	2,93	1,00	1,48
AJ696860 KN261 Bos taurus cDNA clone KN261-058_L24; Bt.33277 Transcribed locus, strongly similar to NP_082956.2 estrogen-related receptor beta like 1	ESRRBL1	NM_018010			0,043	0,438	0,133	0,029	1,00	1,73	1,65	2,37
AV613192 Bos taurus adipocyte cell line Bos taurus cDNA clone E0AD001C06		AV613192			0,004	0,202	0,024	0,012	1,00	2,59	4,84	13,14
B.taurus mRNA for immunoglobulin light chain Length = 900		X62917			0,240	0,045	0,016	0,403	1,00	1,55	3,29	1,09
B.taurus ORF1 mRNA		Z24674			0,290	0,074	0,058	0,008	1,00	1,18	1,97	3,03
Bos taurus clone F1 IgM mRNA		U50559			0,007	0,473	0,322	0,005	2,02	1,08	1,07	1,00
Bos taurus endothelial dysfunction inducing protein	EDIP	AF529136			0,025	0,469	0,121	0,161	1,00	2,05	2,09	1,37
Bos taurus glucose regulated protein 58kD	GRP58	NM_174333		signal transduction; cytoskeleton organization and biogenesis; electron transport; ion transport; protein transport;	0,010	0,351	0,116	0,006	3,35	1,47	1,34	1,00
Bos taurus immunoglobulin IgA heavy chain constant region gene		AF109167			0,222	0,031	0,027	0,282	1,40	1,07	3,76	1,00
Bos taurus immunoglobulin IgA heavy chain constant region gene		AF109167			0,307	0,014	0,012	0,259	1,31	1,11	3,39	1,00
Bos taurus immunoglobulin IgA heavy chain constant region gene		AF109167			0,047	0,051	0,018	0,258	1,12	1,87	2,84	1,00

ERGEBNISSE

Fortsetzung Tabelle 13 2

Bos taurus immunoglobulin lambda light chain	IgL	AF396698		host-pathogen interaction; cytoskeleton organization and biogenesis;	0,391	0,020	0,027	0,186	1,00	1,13	3,43	1,25
Bos taurus luman mRNA; Bt.7492 Bos taurus CREB3 ;CAMP responsive element binding protein 3 (luman)	CREB3	NM_006368		signal transduction; transcription; protein biogenesis; regulation of gene expression, epigenetic; regulation of transcription, DNA dependent	0,010	0,439	0,120	0,019	1,00	1,89	1,96	2,74
Bos taurus micromolar calcium activated neutral protease 1 (CAPN1) gene	CAPN1	AF248054	Apoptosis in Ca2+ induced Cell Death Pathway; im Komplex mit CAPNS1, aktivieren auch MAP2K5, Aktivierung von F-actin und indirekt der Zellproliferation	regulation of gene expression, epigenetic; positive regulation of cell proliferation;	0,017	0,103	0,030	0,009	1,00	1,54	2,40	4,19
Bos taurus mRNA for calcium-binding protein in amniotic fluid 1; Bt.357 Bos taurus S100A12 S100 calcium binding protein A12 (calgranulin C)	S100A12	NM_005621		carbohydrate metabolism;	0,090	0,029	0,352	0,199	2,04	3,97	1,00	1,13

Fortsetzung Tabelle 13 3

Bos taurus mu- and alpha-immunoglobulin-associated J-chain	IGJ	L20311		response to stress; cell recognition; host-pathogen interaction; response to external stimulus; cytoskeleton organization and biogenesis; immune response;	0,134	0,090	0,386	0,031	1,00	1,67	2,56	2,72
Bos taurus myosin, light peptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle	MYL6	NM_175780			0,036	0,066	0,483	0,020	2,22	1,31	1,00	1,01
Bos taurus pancreatic anionic trypsinogen (TRYP8) gene	TRYP8	AF453325			0,272	0,144	0,082	0,022	1,00	1,15	1,49	2,10
Bos taurus pepsinogen A	pga	NM_001001600			0,064	0,189	0,107	0,000	2,05	1,52	1,25	1,00
Bos taurus polymeric immunoglobulin receptor mRNA	PIGR	L04797			0,015	0,141	0,153	0,024	2,18	1,00	1,95	1,05
Bos taurus retinal short-chain dehydrogenase/reductase retSDR1 mRNA	SDR1	AF061742			0,005	0,166	0,130	0,139	1,00	2,28	3,06	1,91
Bos taurus ribosomal protein S2 mRNA	RPS2	AF013215			0,024	0,315	0,127	0,022	2,15	1,38	1,49	1,00
Bos taurus thioredoxin mRNA	TXN	AF104105		cell-cell signaling; signal transduction; electron transport; ion transport; cell proliferation;	0,016	0,481	0,033	0,003	2,29	1,48	1,49	1,00

Fortsetzung Tabelle 13 4

Bos taurus tumor rejection antigen (gp96) 1	TRA1	NM_174700		response to abiotic stimulus; cell recognition; host-pathogen interaction; response to external stimulus; cytoskeleton organization and biogenesis; cell growth; protein folding; response to unfolded protein;	0,000	0,436	0,211	0,000	23,19	1,62	1,56	1,00
BovGen_15956 normal cattle brain Bos taurus cDNA; Hs.368823 KIAA1026: KIAA1026 protein Homo sapiens	KIAA1026	XM_048825			0,005	0,028	0,089	0,067	1,00	3,15	2,28	1,69
BovGen_22121 normal cattle brain Bos taurus cDNA; Bt.24933; Transcribed locus, moderately similar to XP_130987.3 retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1 [Mus musculus]	RARRES1	NM_002888		regulation of gene expression, epigenetic; negative regulation of cell proliferation;	0,115	0,018	0,185	0,368	2,04	2,81	1,00	1,78
BovGen_24721 normal cattle brain Bos taurus cDNA ; Bt.23128; erp70: Protein disulfide isomerase related protein	ERP70	NM_004911		electron transport; ion transport; protein transport;	0,003	0,100	0,441	0,000	11,00	1,30	1,11	1,00
Bovine mRNA for a 70 Kd heat shock cognate protein; Bt.12309 Bos taurus HSPA8 Heat shock 70 kDa protein 8	HSPA8	X53335	inhibits proliferation and differentiation	electron transport; response to stress; protein folding; response to unfolded protein;	0,137	0,481	0,073	0,009	2,55	2,09	2,06	1,00

Fortsetzung Tabelle 13 5

BP230009A10G9 Soares normalized bovine placenta Bos taurus cDNA; Bt.24933; Transcribed locus, moderately similar to XP_130987.3 retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1 [Mus musculus]	RARRES1	NM_206963			0,102	0,009	0,162	0,123	2,12	2,86	1,00	1,50
Cow lactoferrin mRNA	LTF	L08604		ion transport; cell homeostasis;	0,043	0,037	0,104	0,126	1,13	3,17	1,00	2,10
CR850351 Normalized and Subtracted bovine endometrium tissues (bcbp) Bos taurus cDNA		CR850351			0,051	0,287	0,047	0,003	1,00	1,87	1,51	2,85
Di214F11PM0 Bovine SSH library; oviduct; dioestrus; DI2 Bos taurus cDNA clone Di214F11		CK280156			0,013	0,103	0,261	0,027	1,00	2,63	4,81	3,78
Di216D05PM0 Bovine SSH library; oviduct; dioestrus; DI2 Bos taurus cDNA clone Di216D05; Bt.32546 Transcribed locus, weakly similar to XP_235886.2 similar to ovarian cancer related tumor marker CA125 [Rattus norvegicus]		CK280164			0,045	0,350	0,062	0,012	1,00	1,64	1,93	3,51
Di217B08PM0 Bovine SSH library; oviduct; dioestrus; DI2 Bos taurus cDNA clone Di217B08		CK280170			0,003	0,004	0,135	0,229	1,20	3,02	1,28	1,00
EST284 Bovine Lambda Zap Express corpus luteum cDNA library Bos taurus cDNA clone clr_007_a11 5' similar to Bos taurus X-inactivation center region, Jpx and Xist genes		BU917342			0,060	0,483	0,182	0,016	1,00	1,76	1,74	2,24
Estrogen Receptor alpha	ESR1	X66841			0,287	0,234	0,125	0,028	1,00	1,31	1,91	3,06
Gastrin-releasing peptide GRP	GRP	S75723	EGF pathway; T-cell antigen receptor pathway	cell-cell signaling; signal transduction; cytoskeleton organization and biogenesis; growth;	0,037	0,213	0,186	0,031	9,74	1,47	4,61	1,00
HA-receptor					0,272	0,052	0,432	0,010	7,65	6,10	1,00	1,20

ERGEBNISSE

Fortsetzung Tabelle 13 6

Homo sapiens 12 BAC RP11-186F10 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library)		AC078860			0,049	0,168	0,424	0,049	1,00	1,68	2,27	2,14
Homo sapiens 12 BAC RP11-864A19 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library)		AC012083			0,144	0,163	0,065	0,013	2,07	1,68	1,39	1,00
Homo sapiens 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase	PHACS	NM_032592		amino acid and derivate metabolism; biosynthesis; carbohydrate metabolism;	0,065	0,071	0,420	0,026	3,85	2,05	1,00	1,10
Homo sapiens 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	HMGCR	NM_000859		biosynthesis; carbohydrate metabolism; coencymes and prosthetic group metabolism; electron transport; lipid metabolism; cell growth; cell differentiation;	0,071	0,462	0,090	0,022	2,43	1,79	1,83	1,00
Homo sapiens anterior gradient 2 homolog (<i>Xenopus laevis</i>)	AGR2	NM_006408			0,002	0,136	0,454	0,000	10,98	1,00	1,27	1,19
Homo sapiens arginine-rich, mutated in early stage tumors	ARMET	NM_006010		cell growth;	0,011	0,418	0,442	0,005	6,86	1,07	1,00	1,15
Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	ABCG1	NM_004915		electron transport; lipid metabolism; ion transport;	0,009	0,034	0,367	0,157	1,00	3,29	1,78	1,62
Homo sapiens BAC clone RP11-207O24 from 2		AC074289			0,119	0,104	0,286	0,048	1,00	1,48	2,43	2,98
Homo sapiens BAC clone RP11-364L4 from 4		AC097658			0,009	0,363	0,181	0,030	1,00	1,63	1,75	2,22

ERGEBNISSE

Fortsetzung Tabelle 13 7

Homo sapiens casein kinase 1, epsilon	CSNK1E	NM_152221	canonical pathway; blockt im Komplex mit anderen das Clock-Gen	protein amino acid phosphorylation; signal transduction;	0,007	0,162	0,303	0,011	1,00	1,75	1,89	2,02
Homo sapiens catenin (cadherin-associated protein), delta 1	CTNND1	NM_001331		cytoskeleton organization and biogenesis;	0,012	0,196	0,001	0,000	1,00	2,01	1,78	2,47
Homo sapiens CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	CKS2	NM_001827		cell cycle; regulation of gene expression, epigenetic;	0,006	0,139	0,380	0,002	6,72	1,00	1,37	1,22
Homo sapiens cell division cycle 2-like 5 (cholinesterase-related cell division controller)	CDC2L5	NM_003718		cell growth; cell differentiation; regulation of gene expression, epigenetic; cell cycle; development; positive regulation of cell proliferation; protein amino acid phosphorylation;	0,273	0,034	0,142	0,003	1,00	1,11	1,74	2,00
Homo sapiens chromosome 16 clone RP11-21M24		AC092338			0,008	0,018	0,177	0,002	3,61	2,27	1,27	1,00
Homo sapiens claudin 1	CLDN1	NM_021101		cell adhesion	0,036	0,111	0,171	0,095	1,00	2,13	1,42	2,24

Fortsetzung Tabelle 13 8

Homo sapiens complement component 3	C3	NM_000064	B-cell antigen receptor pathway; Epo pathway; IFN pathway; IL-1 pathway; stress-associated pathways; T-cell antigen receptor pathway; TLR3 pathway; TLR4 pathway	signal transduction; cytoskeleton organization and biogenesis; G-protein coupled receptor protein signaling pathway; immune response; signal transduction;	0,241	0,097	0,096	0,040	1,28	1,00	3,07	5,97
Homo sapiens cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)	CCND1	NM_053056	scheint im Komplex mit CDK6 den Übertritt von der G1-Phase in die S-Phase zu hemmen*; über MAPK signaling pathway indirekter Effect auf cell cycle	cell cycle; cell growth; growth; regulation of gene expression, epigenetic; regulation of cell cycle;	0,283	0,032	0,352	0,023	1,00	1,40	2,92	3,18

ERGEBNISSE

Fortsetzung Tabelle 13 9

Homo sapiens cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) gene	CDK6	AY128534	scheint im Komplex mit CCND1 den Übertritt von der G1-Phase in die S-Phase zu hemmen; E2F network; G1 phase (Cdk6)	cell cycle; regulation of gene expression, epigenetic; protein amino acid phosphorylation; regulation of cell cycle;	0,024	0,352	0,270	0,077	1,00	1,57	1,75	2,22
Homo sapiens DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 11 (CHL1-like helicase homolog, S. cerevisiae)	DDX11	NM_004399		DNA metabolism; transcription; electron transport; ion transport; protein transport; cell cycle; cell proliferation; regulation of gene expression, epigenetic; carbohydrate metabolism; positive regulation of cell proliferation; regulation of cell cycle;	0,102	0,015	0,337	0,008	1,00	1,41	2,88	2,69
Homo sapiens DNA for phosphodiesterase 3B, exon 16 and complete cds Homo sapiens phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited	PDE3B	NM_000922	3',5'-cyclic GMP --> GMP-->> Guanosin oder IMP	signal transduction;	0,069	0,491	0,102	0,009	1,00	1,73	1,72	2,48
Homo sapiens DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 11	DNAJB11	NM_016306		protein folding;	0,008	0,084	0,294	0,002	5,92	1,00	1,36	1,01
Homo sapiens dynein, axonemal, heavy polypeptide 9	DNAH9	NM_004662		cytoskeleton organization and biogenesis;	0,342	0,013	0,206	0,093	1,92	2,02	1,00	1,34

Fortsetzung Tabelle 13 10

Homo sapiens epithelial protein up-regulated in carcinoma, membrane associated protein 17	MAP17	NM_005764			0,012	0,009	0,225	0,195	1,33	4,72	1,32	1,00
Homo sapiens eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	EEF1A1	NM_001402		Protein biosynthesis;	0,038	0,453	0,128	0,007	1,00	1,77	1,73	2,08
Homo sapiens H1 histone family, member 0	H1F0	NM_005318		cytoskeleton organization and biogenesis;	0,049	0,153	0,398	0,196	1,00	2,62	1,55	1,34
Homo sapiens heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	HSPA5	NM_005347	inhibits proliferation and differentiation	response to stress;	0,000	0,443	0,350	0,000	9,07	1,20	1,23	1,00
Homo sapiens hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4	HCN4	NM_005477		signal transduction; cytoskeleton organization and biogenesis; ion transport;	0,000	0,470	0,368	0,001	9,04	1,44	1,38	1,00
Homo sapiens hypothetical protein FLJ10707	FLJ10707	XM_371614			0,000	0,227	0,354	0,000	10,11	1,00	1,36	1,15
Homo sapiens hypothetical protein FLJ12270	FLJ12270	XM_290704			0,029	0,074	0,434	0,016	3,41	1,68	1,00	1,06
Homo sapiens hypothetical protein FLJ20254	FLJ20254	NM_017727			0,029	0,044	0,328	0,093	2,45	1,00	1,63	1,33
Homo sapiens hypothetical protein FLJ37927 (FLJ37927)		NM_152623			0,001	0,061	0,342	0,001	5,95	1,59	1,00	1,13
Homo sapiens hypoxia up-regulated 1	HYOU1	NM_006389		response to stress; protein folding;	0,002	0,361	0,416	0,001	7,49	1,28	1,16	1,00
Homo sapiens importin 8	IPO8	NM_006390		signal transduction; cytoskeleton organization and biogenesis; ion transport; protein transport; protein transport; signal transduction; transport;	0,283	0,016	0,049	0,004	1,00	1,21	2,51	1,73

ERGEBNISSE

Fortsetzung Tabelle 13 11

Homo sapiens iodotyrosine dehalogenase 1	DEHAL1	NM_203395			0,000	0,306	0,289	0,000	36,11	1,19	1,80	1,00
Homo sapiens KIAA0638 protein	KIAA0638	AB014538			0,001	0,251	0,249	0,012	1,00	2,11	1,89	1,66
Homo sapiens limkain b1 (LKAP), mRNA	LKAP	NM_019081			0,010	0,075	0,435	0,047	1,00	1,52	2,29	2,19
Homo sapiens lipocalin-interacting protein mRNA	LIMR	AF260728			0,052	0,093	0,457	0,023	1,00	1,55	1,98	2,02
Homo sapiens mitochondrial carrier homolog 1 isoform b	MTCH1	NM_014341		signal transduction; mitochondrion organization and biogenesis; energy pathways; ion transport; protein transport; cell death; regulation of gene expression, epigenetic; transport	0,027	0,214	0,153	0,037	1,00	1,54	1,77	2,32
Homo sapiens mRNA for KIAA1154 protein; Hs.61345 Homo sapiens RU2 RU2S	RU2	AB032980			0,043	0,074	0,371	0,004	2,85	1,86	1,00	1,15
Homo sapiens mRNA for KIAA1199 protein	KIAA1199	AB033025			0,002	0,224	0,032	0,015	1,00	2,98	5,77	16,11
Homo sapiens mRNA for KIAA1343 protein; Hs.94042 Homo sapiens FLJ10876 Hypothetical protein FLJ10876	FLJ10876	AB037764			0,033	0,249	0,065	0,017	1,00	1,85	1,62	2,42
Homo sapiens mRNA for lanthionine synthetase C-like protein 1	LANCL1	NM_006055		signal transduction; cytoskeleton organization and biogenesis; G-protein coupled receptor protein signaling pathway;	0,019	0,435	0,058	0,024	1,00	1,82	1,76	2,89

Fortsetzung Tabelle 13 12

Homo sapiens mRNA for membrane glycoprotein LIG-1; Hs.4193 Homo sapiens LRIG1 Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1	LRIG1	AB050468		host-pathogen interaction; cytoskeleton organization and biogenesis;	0,129	0,129	0,423	0,017	1,00	1,56	2,13	2,07
Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686D1394; Hs.494312 NTRK2: Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2 Homo sapiens	NTRK2	NM_006180			0,002	0,378	0,487	0,000	10,46	1,00	1,09	1,06
Homo sapiens mucin 16	MUC16	AF361486		cell growth;	0,070	0,400	0,062	0,036	1,00	1,61	1,76	3,59
Homo sapiens NMDA receptor-regulated gene 2	NARG2	NM_024611			0,017	0,339	0,087	0,038	1,00	1,83	1,60	2,88
Homo sapiens ovarian cancer related tumor marker CA125 mRNA	CA125	AF414442			0,010	0,283	0,086	0,037	1,00	2,13	3,46	8,22
Homo sapiens PAC clone RP5-1032B10 from 7		AC004455			0,029	0,143	0,182	0,025	1,00	2,31	3,47	4,78
Homo sapiens phospholipid scramblase 1	PLSCR1	NM_021105		lipid metabolism;	0,043	0,055	0,064	0,001	1,00	1,50	1,97	2,30
Homo sapiens protein disulfide isomerase-related protein	P5	NM_005742	Caspase network, HIF-1alpha pathway, IL-1 pathway, p38 pathway, p53 degradation, p53 nuclear import, p53 pathway		0,002	0,394	0,314	0,000	8,21	1,18	1,23	1,00
Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	PTPRF	NM_002840		cell adhesion; protein amino acid dephosphorylation	0,085	0,318	0,027	0,003	1,00	1,59	1,39	2,35
Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, U	PTPRU	NM_133178			0,039	0,419	0,034	0,013	1,00	3,58	3,33	6,52
Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, U	PTPRU	NM_133178		cell adhesion; protein amino acid dephosphorylation	0,007	0,133	0,032	0,011	1,00	2,95	2,15	4,18

Fortsetzung Tabelle 13 13

Homo sapiens ralA binding protein 1	RALBP1	NM_006788		signal transduction; cytoskeleton organization and biogenesis; ion transport; protein transport; protein transport; signal transduction; transport;	0,037	0,177	0,049	0,015	1,00	2,32	1,79	2,80
Homo sapiens RALBP1 associated Eps domain containing 1	REPS1	NM_031922			0,017	0,405	0,447	0,078	1,00	2,23	2,06	1,96
Homo sapiens retinoblastoma binding protein 7	RBBP7	NM_002893		cell growth; cell proliferation; cell differentiation; cell proliferation; development;	0,013	0,430	0,096	0,012	4,79	1,92	1,81	1,00
Homo sapiens retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	RARRES1	NM_002888			0,447	0,042	0,229	0,087	2,84	2,96	1,00	1,58
Homo sapiens retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	RARRES1	NM_206963			0,433	0,009	0,227	0,039	3,23	3,37	1,00	1,42
Homo sapiens ribosomal protein S9 (RPS9)	RPS9	NM_001013		protein biosynthesis; biosynthesis; biosynthesis;	0,130	0,038	0,324	0,277	1,46	1,00	2,53	2,05
Homo sapiens S100 calcium binding protein A11 (calgizzarin) (S100A11), mRNA	S100A11	NM_005620		cell proliferation; regulation of gene expression, epigenetic	0,213	0,049	0,261	0,020	1,00	1,21	2,00	2,31
Homo sapiens SAR1a gene homolog 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	SARA1	NM_020150		signal transduction; cytoskeleton organization and biogenesis; ion transport; protein transport; intracellular protein transport	0,222	0,014	0,155	0,117	2,57	3,00	1,00	1,74
Homo sapiens signal sequence receptor, delta (translocon- associated protein delta)	SSR4	NM_006280		ion transport; protein transport; intracellular protein transport	0,031	0,138	0,426	0,008	4,48	2,11	1,12	1,00

Fortsetzung Tabelle 13 14

Homo sapiens signal sequence receptor, gamma (translocon-associated protein gamma)	SSR3	NM_007107		protein biosynthesis;	0,006	0,216	0,183	0,002	3,84	1,70	1,45	1,00
Homo sapiens similar to hypothetical protein FLJ21963	FLJ21963	NM_024560		carbohydrate metabolism;	0,013	0,051	0,454	0,089	1,00	2,90	1,86	1,93
Homo sapiens SP1224; Hs.5297 Homo sapiens DKFZP564A2416 DKFZP564A2416 protein	DKFZP564A2416	AF193059			0,399	0,017	0,089	0,021	1,00	1,05	1,74	2,46
Homo sapiens splicing factor, arginine/serine-rich 11	SFRS11	NM_004768			0,037	0,273	0,215	0,020	1,00	1,62	1,75	2,01
Homo sapiens sterol carrier protein 2	SCP2	NM_002979		mitochondrion organization and biogenesis; protein biosynthesis; biosynthesis; energy pathways; lipid metabolism; ion transport; protein transport;	0,033	0,062	0,327	0,072	1,00	6,70	2,89	2,27
Homo sapiens stromal cell-derived factor 2-like 1	SDF2L1	NM_022044			0,001	0,208	0,394	0,000	32,42	1,25	1,00	1,40
Homo sapiens SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2	SMARCA2	NM_003070		transcription; regulation of gene expression, epigenetic;	0,004	0,044	0,057	0,022	1,00	2,50	1,82	2,95
Homo sapiens TAF15 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 68kDa	TAF15	AY197697		cell-cell signaling; DNA metabolism; transcription; cell growth; growth;	0,072	0,001	0,077	0,004	1,00	1,28	2,08	2,55
Homo sapiens Thy-1 glycoprotein and Thy-1 co-transcribed protein mRNAs	THY1	AF261093			0,035	0,037	0,390	0,366	1,00	2,16	1,13	1,05
Homo sapiens tight junction protein 1 (zona occludens 1) (TJP1), transcript variant 2	TJP1	NM_003257			0,022	0,224	0,094	0,010	1,00	2,55	2,18	2,84

Fortsetzung Tabelle 13 15

Homo sapiens transducin (beta)-like 1	TBL1X	NM_024665	Ubiquitin mediated proteolysis	transcription; regulation of gene expression, epigenetic; regulation of transcription, DNA-dependent;	0,004	0,404	0,029	0,007	1,00	1,47	1,55	2,58
Homo sapiens transmembrane 4 superfamily member 2	TM4SF2	NM_004615			0,024	0,281	0,184	0,017	1,00	2,04	1,72	2,20
Homo sapiens ubiquitin specific protease 54	USP54	NM_152586			0,011	0,278	0,237	0,064	1,00	2,63	3,32	2,41
Homo sapiens UDP-galactose transporter related	UGALT2	AJ489254			0,001	0,348	0,263	0,001	6,03	1,56	1,36	1,00
Homo sapiens WD repeat domain 34	WDR34	NM_052844			0,067	0,201	0,489	0,048	1,00	1,59	2,11	2,12
Homo sapiens zinc finger protein 161 (ZNF161)	ZNF161	NM_007146		DNA metabolism; transcription; regulation of gene expression, epigenetic;	0,070	0,035	0,120	0,011	1,00	1,64	2,54	3,09
Homo sapiens, delta sleep inducing peptide, immunoreactor	DSIPI	NM_004089		host-pathogen interaction; cytoskeleton organization and biogenesis; transcription; regulation of gene expression, epigenetic; regulation of transcription, DNA-dependent;	0,000	0,113	0,123	0,402	1,00	2,67	1,86	1,09
Homo sapiens, dual specificity phosphatase 6	DUSP6	BC003562	inhibits proliferation and differentiation	cell cycle; regulation of gene expression, epigenetic; protein amino acid dephosphorylation; regulation of cell cycle;	0,081	0,219	0,040	0,409	1,08	1,71	2,04	1,00

Fortsetzung Tabelle 13 16

Homo sapiens, folate receptor 1	FOLR3	NM_000804		ion transport; cell growth; cell differentiation; development;	0,394	0,078	0,088	0,034	4,16	4,54	2,57	1,00
Homo sapiens, neuronatin, clone MGC:1439 IMAGE:3353944	NNAT	BC001768		ion transport; protein transport; cell growth; cell differentiation;	0,035	0,337	0,173	0,003	1,00	4,13	3,58	4,57
Homo sapiens, Similar to methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent), methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase; Hs.44155 Homo sapiens FTHFSDC1;Formyltetrahydrofolate synthetase domain containing 1	FTHFSDC1	NM_015440		mitochondrion organization and biogenesis; biosynthesis; electron transport; energy pathways;	0,063	0,301	0,040	0,038	1,82	2,23	2,01	1,00
Homo sapiens, Similar to RAB28, member RAS oncogene family	RAB28	BC018067		signal transduction; cell growth;	0,012	0,396	0,213	0,058	1,00	1,74	1,85	2,47
Human DNA sequence from clone RP11-552M11 on chromosome 1. Contains the OVGP1 gene for oviductal glycoprotein 1 (mucin 9, oviductin), three novel genes, the ATP5F1 gene for mitochondrial F0 complex H+ transporting ATP synthase b1, the ADORA3 gene for adenosine A3 receptor and an RPS29 (40S ribosomal protein S29) pseudogene. Contains ESTs, STSs, GSSs and two CpG islands		AL390195			0,063	0,354	0,018	0,008	1,00	2,32	1,95	4,99

Fortsetzung Tabelle 13 17

IGF-binding protein-4	IGFBP4	NM_174557		cell-cell signaling; signal transduction; cytoskeleton organization and biogenesis; DNA metabolism; transcription; carbohydrate metabolism; cell growth; cell proliferation; cell differentiation; growth; regulation of gene expression, epigenetic; cell proliferation; signal transduction;	0,072	0,151	0,406	0,011	4,26	2,65	1,29	1,00
Immunglobulin mRNA					0,287	0,043	0,033	0,495	1,00	1,18	2,56	1,00
Immunglobulin mRNA					0,349	0,024	0,036	0,101	1,00	1,16	3,22	1,42
Mus musculus ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 1	Abtb1	NM_030251		protein biosynthesis;	0,022	0,033	0,009	0,003	1,00	2,34	4,52	8,30
Mus musculus extra cellular link domain-containing 1	Xlkd1	NM_053247		catabolism; cell adhesion;	0,188	0,178	0,478	0,005	3,13	2,09	1,00	1,03
nicht in NCBI database gefunden					0,001	0,006	0,070	0,013	2,16	1,00	1,67	1,16
nicht in NCBI database gefunden					0,060	0,048	0,251	0,006	1,00	1,27	1,98	2,21
nicht in NCBI database gefunden					0,121	0,130	0,304	0,036	1,00	1,46	2,33	2,76
nicht in NCBI database gefunden					0,039	0,092	0,058	0,000	1,00	1,47	1,82	2,21
nicht in NCBI database gefunden					0,008	0,304	0,466	0,015	2,87	1,17	1,04	1,00
nicht in NCBI gefunden					0,342	0,035	0,265	0,042	3,55	3,13	1,00	1,48
non-selenium glutathione peroxidase; Bt.5319 Bos taurus AOP2: Anti-oxidant protein 2 (non-selenium glutathione peroxidase, acidic calcium-independent phospholipase A2)	AOP2	NM_174643			0,011	0,027	0,037	0,475	1,01	2,40	1,59	1,00

Fortsetzung Tabelle 13 18

Oe207F06PM0 Bovine SSH library; oviduct; oestrus; OE2 Bos taurus cDNA clone Oe207F06		CK280113			0,035	0,452	0,159	0,192	2,43	1,00	1,04	1,75
Oe215H08PM0 Bovine SSH library; oviduct; oestrus; OE2 Bos taurus cDNA clone Oe215H08		CK280131			0,000	0,438	0,249	0,000	12,88	1,34	1,30	1,00
Oe217H11PM0 Bovine SSH library; oviduct; oestrus; OE2 Bos taurus cDNA clone Oe217H11		CK280135			0,001	0,096	0,375	0,002	61,20	10,58	1,33	1,00
Ovis aries immunoglobulin alpha heavy chain	IgA	AF024645	c-Kit pathway	host-pathogen interaction; cytoskeleton organization and biogenesis;	0,147	0,002	0,006	0,262	1,37	1,00	3,00	1,09
Sus scrofa uteroferrin (ACP5) gene	ACP5	AF292105			0,010	0,018	0,092	0,050	2,27	5,23	2,35	1,00

Tabelle 14: differenziell exprimierte Gene Tag 0 im Abschnittsvergleich

Genbeschreibung	Accession Nr.	Abkürzung	Stoffwechsel/Signalweg	Ontologie	MW Tag 0	p-Wert Tag 0
Bos taurus polymeric immunoglobulin receptor mRNA	L04797	PIGR			6,89	0,051
Cow lactoferrin mRNA	L08604	LTF		ion transport; cell homeostasis;	0,37	0,048
Di213E02PM0 Bovine SSH library; oviduct; dioestrus; DI2 Bos taurus cDNA clone Di213E02, mRNA sequence	CK280152				0,08	0,020
Gastrin-releasing peptide GRP	S75723	GRP	EGF pathway LAT ---> Ras Src ---> Rap2B T-cell antigen receptor pathway	cell-cell signaling; signal transduction; cytoskeleton organization and biogenesis; growth;	0,03	0,086
nicht in NCBI database gefunden						
Sus scrofa secreted folate binding protein mRNA	BC002947	FOLR3		ion transport; cell growth; cell differentiation; development;	0,31	0,065

Tabelle 15: differenziell exprimierte Gene Tag 3,5 im Abschnittsvergleich

Genbeschreibung	Accession Nr.	Abkürzung	Stoffwechsel/Signalweg	Ontologie	MW Tag 3,5	p-Wert Tag 3,5
1Duo21H12.ab1 Bos taurus Duodenum #1 library Bos taurus cDNA. Length = 375 Homo sapiens membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 8B (MS4A8B), mRNA Length = 1369					0,39	0,026
456223 MARC 1BOV Bos taurus cDNA; Bt.22487 Bos taurus ESTs, Weakly similar to S17564 alpha-2-glycoprotein (Zn) - human [H.sapiens]	NM_001185	AZGP1			0,39	0,011
Bos taurus annexin VIII mRNA, complete cds Contig 38					2,52	0,015
Bos taurus immunoglobulin IgA heavy chain constant region gene, partial cds	AF109167				6,45	0,099
Bos taurus matrix Gla protein mRNA, complete cds	AF210379	MGP		regulation of gene expression, epigenetic	4,29	0,028
Bos taurus pepsinogen A (pga), mRNA Length = 1294	NM_001001600	pga			21,23	0,015
Bos taurus polymeric immunoglobulin receptor mRNA, complete cds Length = 3527	L04797	PIGR			15,03	0,014
Cow lactoferrin mRNA, complete cds Length = 2457	L08604	LTF		ion transport; cell homeostasis;	0,21	0,059
Di213E02PM0 Bovine SSH library; oviduct; dioestrus; DI2 Bos taurus cDNA clone Di213E02, mRNA sequence. Length = 305	CK280152				0,25	0,079
Gastrin-releasing peptide GRP [sheep, term endometrial and myometrial tissue, mRNA, 820 nt], Length = 820	S75723	GRP	EGF pathway LAT ---> Ras Src ---> Rap2B T-cell antigen receptor pathway	cell-cell signaling; signal transduction; cytoskeleton organization and biogenesis; growth;	0,20	0,036
Homo sapiens complement component 3 (C3), mRNA Length = 5067	NM_000064	C3	B-cell antigen receptor pathway; Epo pathway; IFN pathway; IL-1 pathway; stress-associated pathways; T-cell antigen receptor pathway; TLR3 pathway; TLR4 pathway	signal transduction; cytoskeleton organization and biogenesis; G-protein coupled receptor protein signaling pathway; immune response;	5,58	0,047

Fortsetzung Tabelle 15 1

Homo sapiens cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1) (CCND1), mRNA Length = 4306 266494 MARC 3BOV Bos taurus cDNA 5', Length = 348	NM_053056	CCND1	scheint im Komplex mit CDK6 den Übertritt von der G1-Phase in die S-Phase zu hemmen* β-catenin --> DNA --> CCND1 --> cell cycle* über MAPK signaling pathway indirekter Effect auf cell cycle	cell cycle; cell growth; growth; regulation of gene expression, epigenetic; regulation of cell cycle;	3,25	0,002
Homo sapiens GTF2I repeat domain containing 1 (GTF2IRD1), transcript variant 1, mRNA, Length = 3446					2,26	0,006
Homo sapiens membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 8B (MS4A8B), mRNA Length = 1369 453113 MARC 1BOV Bos taurus cDNA 5'. Length = 573		MS4A8B			0,38	0,011
Homo sapiens mitochondrial ribosomal protein S36 (MRPS36), mRNA	NM_033281	MRPS36		mitochondrion organization and biogenesis; protein biosynthesis; biosynthesis; energy pathways;	0,13	0,000
Homo sapiens sterol carrier protein 2 (SCP2), mRNA	NM_002979	SCP2		mitochondrion organization and biogenesis; protein biosynthesis; biosynthesis; energy pathways; lipid metabolism; ion transport; protein transport;	0,18	0,055
Homo sapiens Thy-1 glycoprotein and Thy-1 co-transcribed protein mRNAs, complete cds	AF261093	THY1			6,27	0,018
nicht in NCBI database gefunden Contig 27					13,84	0,022
Sus scrofa secreted folate binding protein mRNA, complete cds Length = 1218 Homo sapiens, folate receptor 1 (adult), clone MGC:10473 IMAGE:3956659, mRNA, complete cds Length = 1079	BC002947	FOLR3		ion transport; cell growth; cell differentiation; development;	0,12	0,007

Tabelle 16: differenziell exprimierte Gene Tag 12 im Abschnittsvergleich

Genbeschreibung	Accession Nr.	Abkürzung	Stoffwechsel/Signalweg	Ontologie	MW Tag 12	p-Wert Tag 12
Homo sapiens mitochondrial ribosomal protein S36	NM_033281	MRPS36		mitochondrion organization and biogenesis; protein biosynthesis; biosynthesis; energy pathways; biosynthesis;	0,36	0,113
Homo sapiens membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 8B		MS4A8B			0,29	0,090
Homo sapiens complement component 3 (C3)	NM_000064	C3	B-cell antigen receptor pathway; Epo pathway; IFN pathway; IL-1 pathway; stress-associated pathways; T-cell antigen receptor pathway; TLR3 pathway; TLR4 pathway	signal transduction; cytoskeleton organization and biogenesis; G-protein coupled receptor protein signaling pathway; immune response;	2,50	0,053
Homo sapiens PAC clone RP5-1032B10 from 7	AC004455				0,33	0,018
1Duo21H12.ab1 Bos taurus Duodenum #1 library Bos taurus cDNA					0,25	0,054
Di214F11PM0 Bovine SSH library; oviduct; dioestrus; DI2 Bos taurus cDNA clone Di214F11, mRNA sequence	CK280156				0,33	0,056
Bos taurus complement component C4 mRNA					2,80	0,106
Bos taurus polymeric immunoglobulin receptor mRNA	L04797	PIGR			11,23	0,115
Bos taurus immunoglobulin IgA heavy chain constant region gene	AF109167				4,68	0,109
Bovine mRNA for 95 kDa oviduct-specific glycoprotein	D16639	OVGP1			0,34	0,036
Homo sapiens deleted in malignant brain tumors 1	NM_007329	DMBT1		cell recognition; cytoskeleton organization and biogenesis; cell growth; cell differentiation;	3,16	0,075
nicht in NCBI database gefunden					6,50	0,023
HA-receptor					79,68	0,173

Tabelle 17: differenziell exprimierte Gene Tag 18 im Abschnittsvergleich

Genbeschreibung	Accession Nr.	Abkürzung	Stoffwechsel/Signalweg	Ontologie	MW Tag 18	p-Wert Tag 18
Homo sapiens KIAA0638 protein	AB014538	KIAA0638			0,39	0,006
Homo sapiens mRNA for KIAA1199 protein	AB033025	KIAA1199			0,13	0,053
Homo sapiens PAC clone RP5-1032B10 from 7	AC004455				0,20	0,091
Homo sapiens 12 BAC RP11-864A19 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library)	AC012083				3,07	0,020
Ovis aries immunoglobulin alpha heavy chain	AF024645	IgA			13,46	0,152
Ovis aries immunoglobulin lambda-6b light chain variable region mRNA	AF038146				3,91	0,003
Bos taurus immunoglobulin IgA heavy chain constant region gene	AF109167				30,38	0,162
Bos taurus matrix Gla protein mRNA	AF210379	MGP		regulation of gene expression, epigenetic	0,77	0,153
Bos taurus micromolar calcium activated neutral protease 1	AF248054	CAPN1	Ca ²⁺ -i Rises and ER Stress --> Calpain -->> Apoptosis in Ca ²⁺ -induced Cell Death Pathway* im Komplex mit CAPNS1, aktivieren auch MAP2K5, Aktivierung von F-actin und indirekt der Zellproliferation	positive regulation of cell proliferation; regulation of gene expression, epigenetic	0,27	0,014
Bos taurus immunoglobulin lambda light chain	AF396698	IgL		host-pathogen interaction; cytoskeleton organization and biogenesis;	14,31	0,154
Bos taurus immunoglobulin lambda light chain	AF396698	IgL			11,02	0,179
Human DNA sequence from clone RP11-552M11 on chromosome 1. Contains the OVGPI gene for oviductal glycoprotein 1 (mucin 9, oviductin), three novel genes, the ATP5F1 gene for mitochondrial F0 complex H ⁺ transporting ATP synthase b1, the ADORA3 gene for adenosine A3 receptor and an RPS29 (40S ribosomal protein S29) pseudogene. Contains ESTs, STSs, GSSs and two CpG islands	AL390195				0,34	0,013
AV613192 Bos taurus adipocyte cell line Bos taurus cDNA clone E0AD001C06	AV613192				0,15	0,046
59567 MARC 4BOV Bos taurus cDNA	AW426100				0,36	0,006
275979 MARC 3BOV Bos taurus cDNA; Bt.4688 Transcribed locus, strongly similar to NP_060371.2 two pore segment channel 1 [Homo sapiens]	BF652426	Tpcn1			0,30	0,018

Fortsetzung Tabelle 17 1

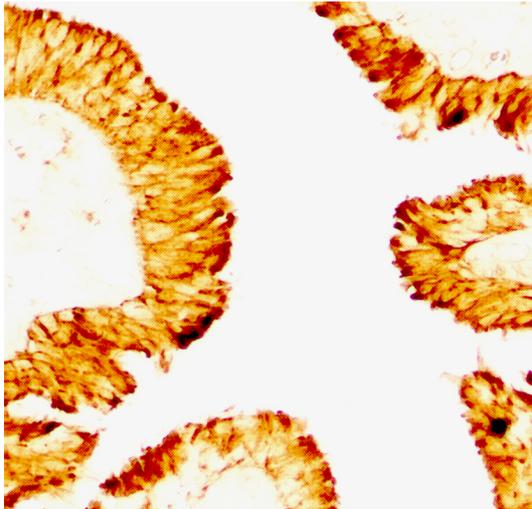
ERGEBNISSE

529250 MARC 3BOV Bos taurus cDNA; Bt.3904 Transcribed locus, strongly similar to NP_057043.1 thioredoxin-related transmembrane protein 2 [Homo sapiens]	BM288271	TMX2		electron transport; protein transport;	0,39	0,002
1Duo24C3.ab1 Bos taurus Duodenum #1 library Bos taurus cDNA; Bt.9637 Transcribed locus, strongly similar to NP_055241.1 sorting nexin 5 [Homo sapiens]	BM431578	SNX5		protein transport; intracellular signaling cascade;	0,34	0,004
CR850351 Normalized and Subtracted bovine endometrium tissues (bcbp) Bos taurus cDNA clone bcbp0013c.l.23	CR850351				0,28	0,044
Bos taurus polymeric immunoglobulin receptor mRNA	L04797	PIGR			27,35	0,031
Homo sapiens phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited (PDE3B)	NM_000922	PDE3B	3',5'-cyclic GMP --> GMP-->> Guanosin oder IMP	signal transduction;	0,34	0,018
Bos taurus pepsinogen A (pga)	NM_001001600	pga			9,50	0,013
Homo sapiens transmembrane 4 superfamily member 2	NM_004615	TM4SF2			0,38	0,016
Homo sapiens deleted in malignant brain tumors 1	NM_007329	DMBT1		cell recognition; cytoskeleton organization and biogenesis; cell growth; cell differentiation;	3,69	0,028
Homo sapiens WD repeat domain 13	NM_017883	WDR13			3,06	0,001
Homo sapiens TAR (HIV) RNA binding protein 2	NM_134324	TARBP2		transcription; regulation of gene expression, epigenetic;	0,24	0,014
Gastrin-releasing peptide GRP	S75723	GRP	EGF pathway; T-cell antigen receptor pathway	cell-cell signaling; signal transduction; cytoskeleton organization and biogenesis; growth;	146,84	0,028
B.taurus mRNA for immunoglobulin light chain	X62917				12,55	0,170
Homo sapiens membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 8B (MS4A8B), mRNA Length = 1369 453113 MARC 1BOV Bos taurus cDNA 5'. Length = 573		MS4A8B			0,33	0,053
Immunglobulin mRNA					19,03	0,161
Bos taurus annexin VIII mRNA, complete cds					2,34	0,014
Homo sapiens lymphocyte cytosolic protein 1		LCP1			0,48	0,003
Homo sapiens hypothetical protein FLJ37927		FLJ37927			0,23	0,011
Immunglobulin mRNA					9,36	0,180
nicht in NCBI database gefunden Contig 27					28,26	0,024

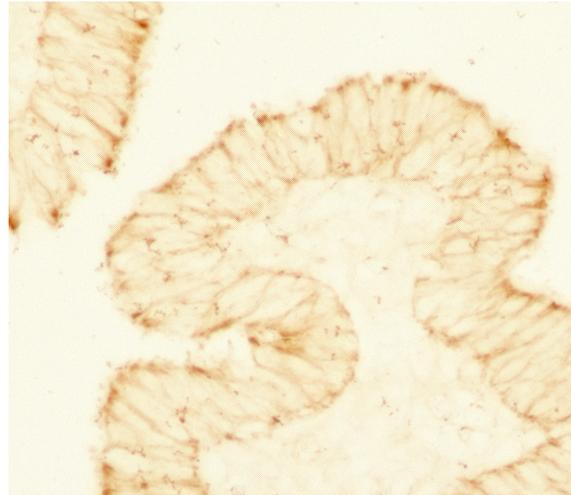
5.9 *In situ*-Hybridisierung

Für die Lokalisation der mRNA im Eileiterepithel wurden vorerst drei Gene für eine *in situ*-Hybridisierung ausgewählt. Es handelte sich dabei um MGP (*Bos taurus* matrix Gla protein mRNA), AGR2 (*Homo sapiens* anterior gradient 2 homolog (*Xenopus laevis*)) und TRA1 (*Bos taurus* tumor rejection antigen (gp96) 1). Die Funktion der Proteine im Eileiter ist für alle Drei noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wurde jeweils das Zyklusstadium für die *in situ*-Hybridisierung verwendet, das bei den Array-Analysen das höchste Expressionsniveau zeigte, bei AGR2 und TRA1 Tag 0 und bei MGP Tag 3,5. Bei TRA1 wurde zusätzlich noch Tag 3,5 untersucht, da hier das niedrigste Expressionsniveau in der Array-Hybridisierung festgestellt wurde. Für alle Analysen wurde jeweils die ipsilaterale Ampulle verwendet aber es standen leider keine Proben von denselben Tieren zur Verfügung die auch für die Array-Hybridisierung benutzt wurden. Es konnte bei diesem Gen sogar in der *in situ*-Hybridisierung eine deutliche Konzentrationsdifferenz zwischen beiden Zeitpunkten nachgewiesen werden (Abbildung 1). Bei der mRNA für TRA1 scheint die Konzentration im Östrus so hoch zu sein, das es zu einer fast homogenen Anfärbung der Epithelzellen kommt. An Tag 3,5 ist eine Konzentrierung in den apikalen Zellbereichen auffällig. Alle drei Gene wurden eindeutig im Eileiterepithel lokalisiert, wobei sich bei allen die Expression fast ausschließlich auf die Epithelzellen beschränkte. Nur bei TRA1 sind zum Zeitpunkt der stärksten Expression auch Gefäßendothelzellen der Tunica muscularis gefärbt. Die mRNA für AGR2, ein Protein das vermutlich für verschiedene Differenzierungsvorgänge wichtig ist, wurde vor allem in supranukleärer Lokalisation nachgewiesen.

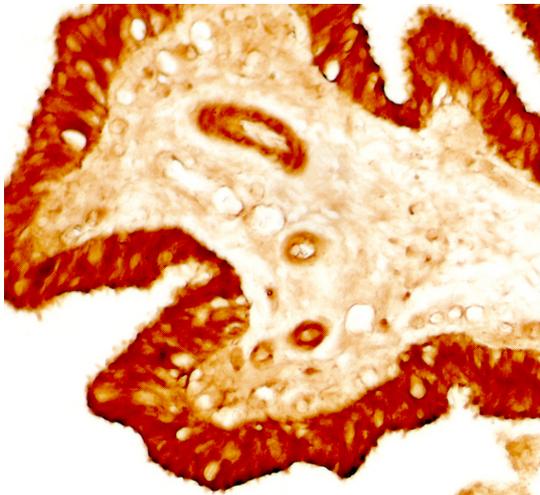
Diese Arbeiten wurden im Rahmen der Kooperation in der DFG-Forschergruppe „Mechanismen der embryo-maternalen Kommunikation“ in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. F. Sinowatz, von Frau Vermehren durchgeführt.



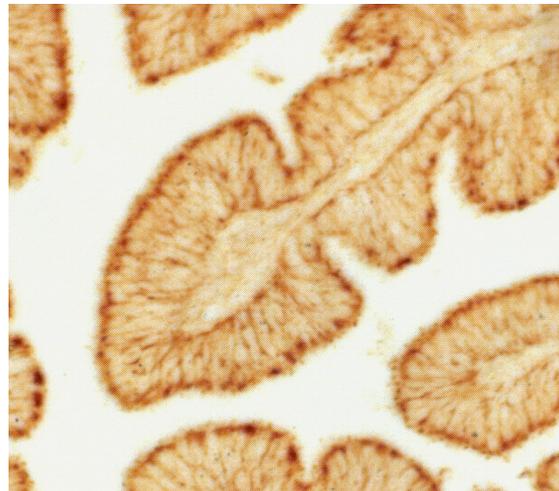
AGR2 Tag 0



MGP Tag 3,5



TRA1 Tag 0



TRA1 Tag 3,5

Abbildung 22: *In situ*-Hybridisierung

Für die mRNAs von AGR2, MGP und TRA1 in der ipsilateralen Ampulle, jeweils zum Tag ihrer stärksten Expression, wurden *in situ*-Hybridisierungen durchgeführt. Nur bei TRA1 wurde sowohl der Tag mit der stärksten (Tag 0) als auch der Tag mit der schwächsten (Tag 3,5) Expression gewählt.

5.10 Analyse von AGR2 auf Proteinebene

Konzentrationsveränderungen auf der Ebene der mRNA korrelieren nicht unbedingt mit den gleichen Konzentrationsveränderungen des zugehörigen Proteins. Deshalb wurde begonnen, auch die Proteinexpression ausgewählter Kandidaten zu untersuchen. Für einen sensitiven Proteinnachweis im Eileiterepithel ist allerdings ein spezifischer Antikörper für das jeweilige Protein notwendig. Im Rahmen der DFG-Forschergruppe „Mechanismen der embryo-maternalen Kommunikation“ stand eine Technologie zur Erzeugung Epitop-spezifischer Antikörper zur Verfügung, die direkt von den vorhandenen cDNA-Sequenzen abgeleitet wurden. Für das AGR2-Protein wurde bereits ein solcher Antikörper erzeugt und mit verschiedenen Eileiterepithelproben getestet. Abbildung 25 zeigt links ein 2D-Proteingel für bovines Eileiterepithel. Rechts ist der zugehörige 2D-Western-Immuno-Blot dargestellt. Eindeutig wurde ein Proteinspot nachgewiesen, der nach Sequenzierung mit Hilfe eines Massenspektrometers als AGR2 identifiziert werden konnte. Nach diesem Nachweis der Spezifität des Antikörpers wurden Western-Immunoblots von Proben aus Ampulle und Isthmus der ipsilateralen und der kontralateralen Seite zu vier verschiedenen Zykluszeitpunkten durchgeführt. Es zeigte sich, dass wahrscheinlich am Tag 3,5 im Isthmus die Proteinkonzentration am höchsten ist. Ansonsten wurden keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen. Dieses Ergebnis muss noch durch die Untersuchung weiterer Proben untermauert werden, um die Reproduzierbarkeit bei weiteren Proben zu zeigen. Deshalb ist bisher die Aussage dieser Analyse auf den Nachweis des Proteins in bovinen Eileiterepithelzellen begrenzt, was aber zu jedem Zykluszeitpunkt eindeutig gelang.

Diese Arbeiten wurden im Rahmen der Kooperation innerhalb der DFG-Forschergruppe „Mechanismen der embryo-maternalen Kommunikation“ durch die Arbeitsgruppe Dr. G. Arnold und hier durch Herrn Dr. T. Fröhlich durchgeführt.

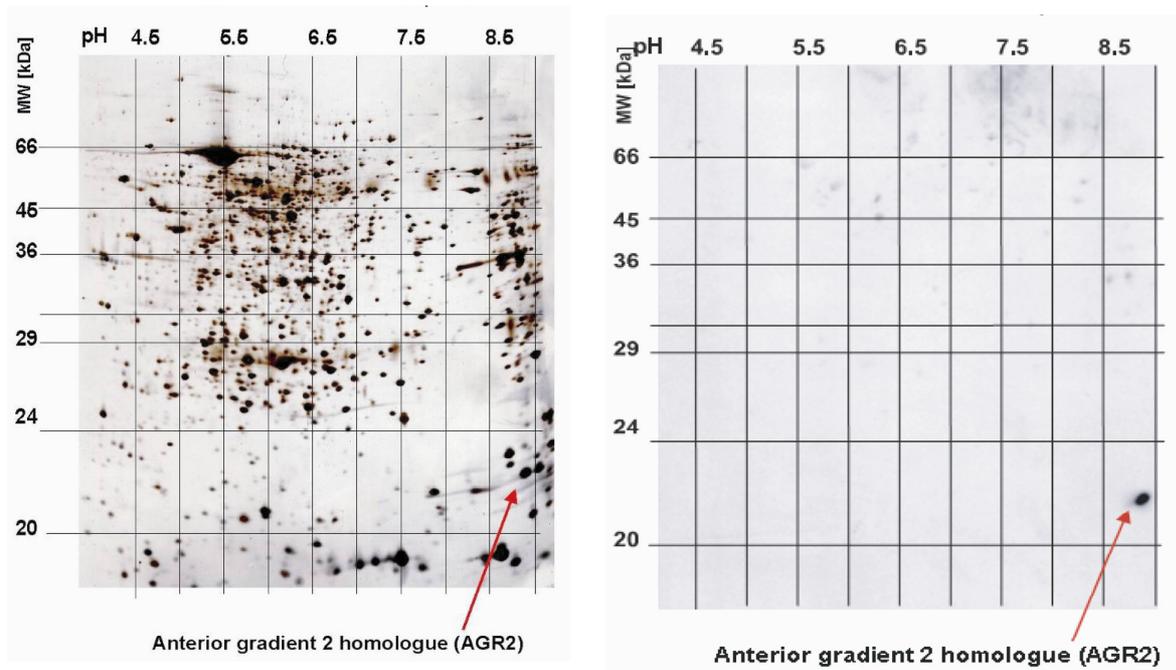


Abbildung 23: 2-D-Gel von Gesamt-Protein und 2-D-Western-Immuno-Blot für das AGR2-Protein in bovinem Eileiterepithel

Links wurden die Proteine einer Eileiterepithelprobe in einem 2D-Proteingel aufgetrennt und durch Silberfärbung nachgewiesen. Rechts ist der entsprechende Immuno-Blot mit dem Nachweis des AGR2-Proteins dargestellt.

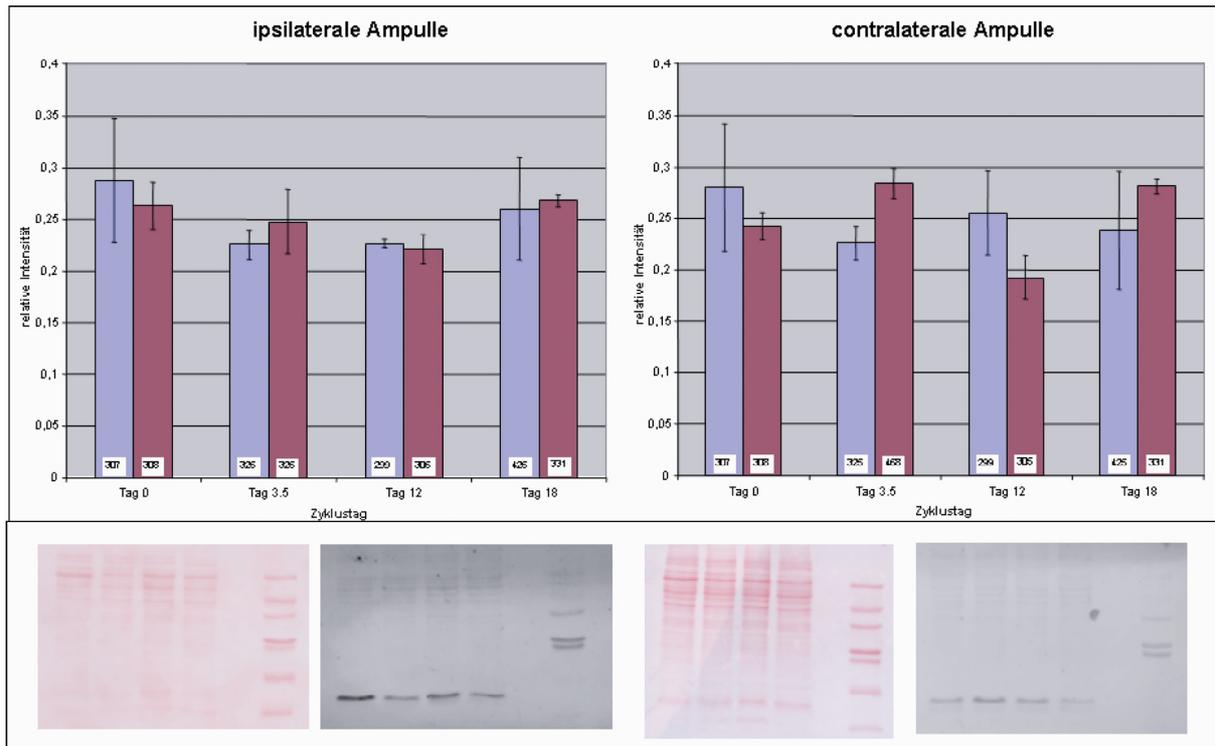


Abbildung 24: Western-immuno-Blot für das AGR2-Protein aus Ampullen-Epithel
 Der obere Teil der Graphik zeigt die quantitative Auswertung der hergestellten Gele. Die rosa angefärbeten Gele wurden mit Pnceaus-Färbung gefärbt, und die grauen Gele stellen den Fluoreszenz-Nachweis des Antikörpers dar.

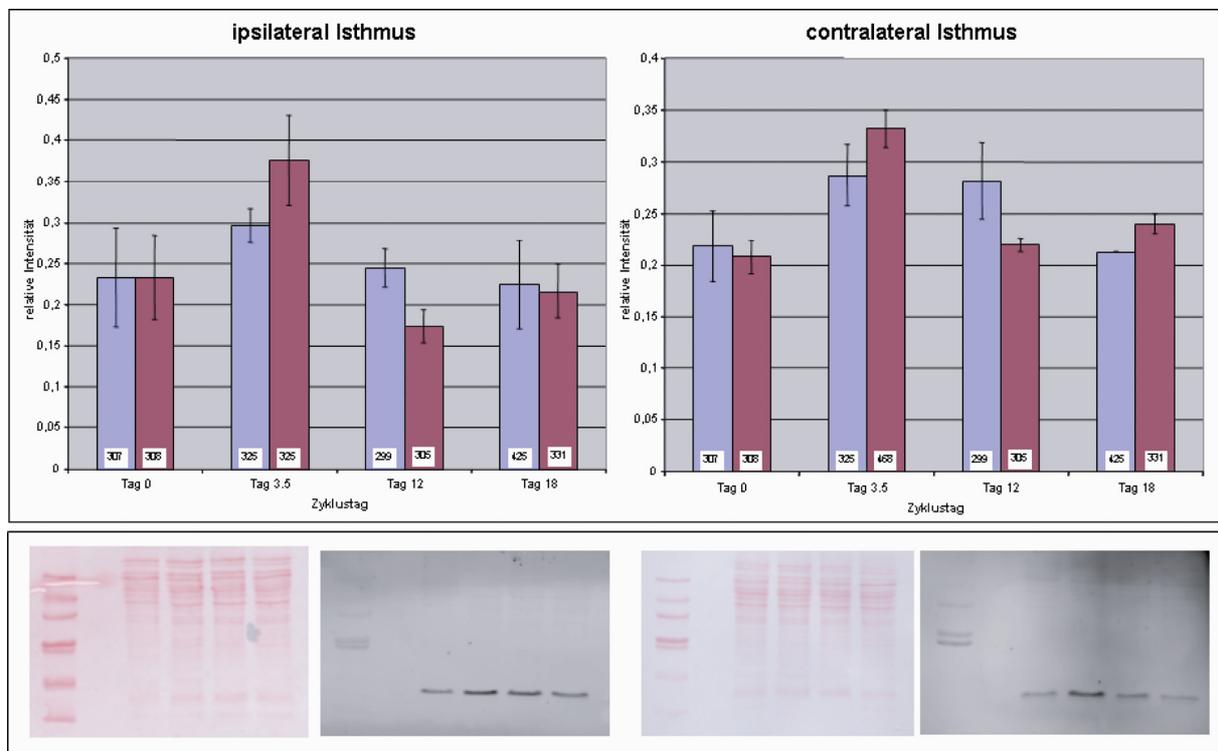


Abbildung 25: Western-immuno-Blot für das AGR2-Protein aus Isthmus-Epithel
 Legende siehe Abbildung 24

6 Diskussion

Analyse der subtraktiven cDNA-Bibliotheken

Das Ziel dieser Studie war, Unterschiede in der Genexpression auf der Ebene der mRNA im Ovidukt-Epithel im Zyklusverlauf zu finden, um einen ersten Einblick in die komplexe Regulation der Genexpression während des Sexualzyklus zu bekommen. Um Veränderungen der Genexpression zu identifizieren, wurden zuerst subtraktive cDNA-Bibliotheken für Eileiterepithel-Zellen im Östrus und im Diöstrus angelegt. Dazu wurde die SSH (Suppression Subtractive Hybridization) -Methode verwendet. Aus diesen Banken wurden jeweils 1536 zufällig gepickte Klone mittels cDNA-Array-Hybridisierung analysiert. Die Anzahl von 1536 an untersuchten cDNA-Klonen aus den Bibliotheken ergab sich einerseits aus praktischen Gründen (Kapazität der Arrays, 96-well- bzw. 384-well-Format), basierte aber auch auf der langjährigen Erfahrung der Arbeitsgruppe mit dieser Technik (Wolf et al. 2003; Bauersachs et al. 2004a; Bauersachs et al. 2003a; Diehl et al. 2005b). In der Regel enthalten 1536 Klone einer subtraktiven Bank bereits alle deutlich regulierten Gene. Dafür spricht hier z.B., dass für fast alle Gene mit einem Signalunterschied > 3 mehrere cDNA-Fragmente gefunden wurden. Im Gegensatz hierzu haben andere Arbeitsgruppen, die sich ebenfalls mit differenzieller Genexpression in verschiedenen Geweben beschäftigt haben und auch die SSH-Methode benutzten, wesentlich weniger cDNA-Klone analysiert. Lee et al. haben sich mit Genexpressionsveränderungen im Eileiter von Mäusen in der prä-Implantationsphase beschäftigt. Hierfür wurden aus vier verschiedenen subtraktiven Banken insgesamt nur 378 Klone untersucht (Lee et al. 2000). In einer weiteren Studie hat die gleiche Arbeitsgruppe Genexpressionsveränderungen in Eileitern von Mäusen untersucht, welche durch einen frühen Embryo induziert werden. Hierfür wurde ebenfalls die SSH-Methode verwendet, aber hier wurden nur 250 Klone analysiert (Lee et al. 2002). Diese geringe Zahl untersuchter Klone reicht sicher nicht aus, um einen repräsentativen Querschnitt einer subtraktiven Bank widerzugeben.

Validierung durch quantitative Real-time RT-PCR

Die Ergebnisse, die im Vergleich von Eileiterepithel im Östrus und im Diöstrus gewonnen wurden, konnten durch die Verifizierung der Expressionsunterschiede mittels einer absoluten Quantifizierung durch Real-time RT-PCR bestätigt werden. Hierfür wurden aus den 77

verschiedenen cDNAs 7 Gene ausgewählt. Da die gleichen RNA-Proben wie für die Array-Hybridisierung benutzt wurden, konnten beide Methoden direkt verglichen werden. Die Ergebnisse der Real-time RT-PCR bestätigten durch ihre starke Korrelation mit den Hybridisierungsergebnissen klar die aus der Array-Hybridisierung gewonnenen Daten. Die Quotienten für die hochregulierten Gene im Östrus waren in der Real-time RT-PCR etwas höher als bei der Array-Hybridisierung. Im Gegensatz dazu waren die Quotienten für die beiden Gene, die im Diöstrus hochreguliert waren, etwas niedriger als bei der Array-Hybridisierung. Die höheren Faktoren der qPCR, vor allem bei Genen mit größeren Expressionsunterschieden, lassen sich dadurch erklären, dass in die Hybridisierung beide Stränge der cDNA als Hybridisierungsprobe eingesetzt wurden. Obwohl die Hybridisierung an das entsprechende cDNA-Fragment auf dem Array überwiegt, ist trotzdem eine Reassoziations der cDNA in der Hybridisierungslösung möglich. Die Rate der Reassoziations hängt dabei von der Konzentration der jeweiligen cDNA ab, und diese ist größer in der Probe, in der die jeweilige cDNA häufiger vorkommt. Dieser Effekt verstärkt sich noch bei sehr stark exprimierten Genen, wie OVGPI oder TRA1. Darüber hinaus kann die Methode der Hintergrund-Subtraktion und der Normalisierung zu etwas zu niedrigen oder etwas zu hohen normalisierten Werten führen. Das gilt ebenfalls für die Real-time PCR Daten. In dieser Untersuchung basierte die Berechnung der Quotienten auf der absoluten mRNA-Konzentration. Eine weitere Möglichkeit ist es, die Daten auf einen Standard zu beziehen, wie zum Beispiel die 18S rRNA. In diesem Fall würden alle Östrus-Werte etwas niedriger und alle Diöstrus-Werte etwas höher ausfallen, was zu einem etwas niedrigeren Östrus:Diöstrus-Quotienten führen würde. In dieser Studie hätte das aber die Schlussfolgerung nicht geändert. In vielen Studien, in denen Array-Hybridisierungen und Real-time RT-PCR Ergebnisse verglichen wurden, waren die Expressions-Quotienten für manche der untersuchten Gene komplett verschieden oder die Quotienten, die bei der Array-Hybridisierung erhalten wurden, waren niedriger (Rajeevan et al. 2001; Bangur et al. 2002; Jiang et al. 2002; Chuaqui et al. 2002). Im Gegensatz dazu korrelierten die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse für alle ausgewählten Gene sehr gut und die Array-Daten wurden eindeutig bestätigt. Dies zeigte erneut, dass die Methode der Array-Hybridisierung auf Nylon-Membranen unter Verwendung von radioaktiv markierten Proben eine sehr sensitive und zuverlässige Vorgehensweise zur Identifizierung von differenziell exprimierten Genen ist.

Untersuchungen mit dem Ovidukt-Array

Anschließend an diese Untersuchung wurden alle cDNAs, die in der Forschergruppe bisher im Zusammenhang mit der Eileiterfunktion aufgefallen waren, auf einem neuen Array gesammelt. Diese cDNAs waren ebenfalls durch subtraktive cDNA-Banken und anschließende Array-Hybridisierung identifiziert worden. Die 77 im ersten Teil dieser Arbeit identifizierten Gene wurden zu diesem Array hinzugefügt. Insgesamt enthielt das Ovidukt-Array 549 cDNAs, die 432 verschiedenen Genen entsprachen. Beim Vergleich Östrus-Diöstrus wurde gesamtes Eileiterepithel (Ampulle+Isthmus) von jeweils drei Tieren verwendet. Bei diesen Tieren wurde das Eileiterepithel durch Abschaben mit Glasobjektträgern (Reischl et al. 1999) isoliert. Für die Untersuchungen mit dem Ovidukt-Array hingegen wurde Eileiterepithel aus der Ampulle und dem Isthmus getrennt zu vier verschiedenen Zykluszeitpunkten verwendet, das nach der neu etablierten Ausstreif-Methode gewonnen wurde. Obwohl für diese beiden Untersuchungen verschiedene Tiere und unterschiedliche Isolierungsmethoden für das Eileiterepithel verwendet worden sind, konnten sehr gut übereinstimmende Ergebnisse erhalten werden. Das belegt einerseits eindrucksvoll die Reproduzierbarkeit der verwendeten Methode zur cDNA-Array-Hybridisierung. Das zeigt aber auch, dass mit beiden Isolierungsmethoden vergleichbare Ergebnisse erzielt werden und keine der Methoden die Ergebnisse im messbaren Bereich verfälscht.

Durch die ausführliche Analyse der Eileiterabschnitte Ampulle und Isthmus zu vier verschiedenen Zykluszeitpunkten, konnten die gewonnenen Einblicke in die Genexpression im bovinen Eileiterepithel vertieft werden. Einerseits konnten Unterschiede in der mRNA-Konzentration in den beiden Eileiterabschnitten zugeordnet werden, wie z.B. bei GRP, das mit dem Ovidukt-Array in der Ampulle so gut wie nicht nachweisbar war. Andererseits konnte auch der zeitliche Verlauf der Expression genauer untersucht werden, wie z.B. bei C3 und GRP. Außerdem konnten neben den 77 Genen aus der ersten Studie weitere Gene identifiziert werden, deren mRNAs Konzentrationsunterschiede während des Zyklus oder zwischen den Abschnitten aufweisen.

Gene Ontology-Klassifizierung zur Identifizierung regulierter biologischer Prozesse und molekularer Funktionen

Für die weitere Interpretation und Klassifizierung der identifizierten Gene wurde eine vereinfachte Gene Ontology erstellt. Diese basierte zunächst auf den gewonnenen Daten aus dem Östrus-Diöstrus-Vergleich. Im Allgemeinen wurden verschiedene funktionelle Klassen zu den beiden wichtigsten Zyklusphasen, Östrus und Diöstrus, hochreguliert. Die

Hochregulierung von Genen, die für Protein-Sekretion wichtig sind und von vier sekretierten Proteinen im Östrus korreliert mit den morphologischen Beobachtungen, da mehr sekretorisch aktive Zellen in der Ampulle im Östrus verglichen mit dem Diöstrus vorhanden sind (Yaniz *et al.* 2000). Diese Beobachtung konnte mit den Ergebnissen aus der Hybridisierung mit dem Ovidukt-Array bestätigt werden.

Außerdem wurde eine Gruppe von Genen, die für Differenzierung und Regulation der Proliferation wichtig sind (beispielsweise RARRES1, GRP, AGR2, DMTB1), als im Östrus hochreguliert identifiziert. Auch dieses Ergebnis aus dem Östrus-Diöstrus-Vergleich korrelierte sehr gut mit den Ergebnissen aus der Hybridisierung mit dem Ovidukt-Array. Für DMTB1 konnte sogar ein signifikanter Unterschied in der Genexpression an den Tagen 12 und 18 festgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Gene-Ontology-Klassifizierung verschiedene Phänotypen des Ovidukt-Epithels widerspiegelte, ein mehr differenzierter, sekretorisch aktiver Phänotyp im Östrus und ein weniger differenzierter im Diöstrus. Da diese Phänotypen vor allem durch die ovariellen Hormone reguliert werden, können die Ergebnisse dieser Studie prinzipiell auch auf andere Epithelien, die unter der Kontrolle dieser Hormone stehen, übertragen werden.

Funktion ausgewählter Gene und mögliche Zusammenhänge ihrer Rolle im Eileiter

Nur wenige der identifizierten Gene wurden bereits im Kontext mit dem Eileiter oder anderen reproduktiven Organen beschrieben. Im Folgenden werden die möglichen Funktionen der bisher am besten beschriebenen Gene im Einzelnen diskutiert.

Ovidukt-spezifisches Glykoprotein (OVGP1)

Das wahrscheinlich am besten untersuchte Gen im Eileiter ist das OVGP1-Gen. Das OVGP1-Protein ist das häufigste Glykoprotein im Eileiter. Seine mRNA zeigte die höchste Konzentration im Eileiter zum Östrus-Zeitpunkt. Der von uns gemessene Unterschied von 2,7-fach ist verglichen mit Literaturangaben etwas niedrig, aber auch der Real-time PCR Ansatz ergab nur einen 5,2-fachen Unterschied. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass bei der Probenentnahme für den Östrus-Diöstrus-Vergleich nicht zwischen Ampulle und Isthmus unterschieden wurde. Die Untersuchung mit dem Ovidukt-Array ergab, dass im Isthmus zu keinem Zykluszeitpunkt signifikante Konzentrationsunterschiede gemessen werden konnten. Für die Ampulle konnte das Ergebnis aus der ersten Studie bestätigt und sogar ein Unterschied von mehr als Faktor 7 zwischen Östrus und Tag 12 bzw. Tag 18 festgestellt

werden. Arbeiten zur Expression des OVGP1-Proteins haben gezeigt, dass, im Vergleich zum Isthmusepithel, signifikant mehr OVGP1-Protein im bovinen Ampullenepithel produziert wird. Die größte Konzentration konnte dabei im Östrus nachgewiesen werden, gefolgt von Diöstrus und trächtigen Tieren (Wegner & Killian 1992). Auch die immunzytochemische Lokalisation des OVGP1 bestätigte diese Ergebnisse. Es konnte eine intensive Färbung in Epithelzellen der Ampulle während der folliculären Phase nachgewiesen werden. Weniger stark waren die Zellen in der Lutealphase oder im Isthmus gefärbt. Es konnte sogar eine selektive Färbung der sekretorischen Granula der nicht-zilientragenden Zellen in Ampulle und Infundibulum, aber nicht im Isthmus, festgestellt werden (Abe et al. 1993).

Studien, die den Zusammenhang der hormonellen Veränderungen im Eileiter und der Expression von OVGP1 untersuchten, konnten einen Anstieg von bovinen OVGP1-Transkripten nach LH- bzw. hCG-Stimulation *in vitro* nachweisen. Es konnte sowohl ein Anstieg an mRNA als auch an Protein in den Zellen gemessen werden. Diese Arbeitsgruppe führte den Anstieg der mRNA-Konzentration allerdings nicht auf eine Erhöhung der Transkription zurück, sondern auf einen signifikanten Anstieg in der Halbwertszeit der Transkripte, der in der Kontrolle von 23 Stunden auf 28 Stunden mit hCG anstieg. Da OVGP1 möglicherweise eine wichtige Rolle in der Fertilisation sowie im Wachstum und der Entwicklung des frühen Embryos spielt, nimmt ein hoher LH-Spiegel in der periovulatorischen Phase, möglicherweise direkt Einfluss auf die Ereignisse in der frühen Trächtigkeit, indem er die Synthese von OVGP1 erhöht (Sun et al. 1997). Auch der Eileiter von Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) produziert OVGP1. Hier konnte eine Östrogen-abhängige Synthese nachgewiesen werden. Das OVGP1-Protein ist beim Rhesusaffen sowohl immunologisch als auch strukturell identisch mit dem OVGP1 des Pavian und des Menschen (Verhage et al. 1997).

Um festzustellen, ob OVGP1 für die Fertilität essenziell ist, wurde eine Knock-out Mauslinie für das *ovgp1*-Gen etabliert. Es hat sich in Versuchen sowohl mit *in vivo* als auch *in vitro* Methoden kein signifikanter Unterschied zu Kontrolllinien gezeigt. Dies weist darauf hin, dass *ovgp1* anscheinend für die Fertilität zumindest bei der Maus nicht essenziell ist (Araki et al. 2003). Zahlreiche andere Studien bei den unterschiedlichsten Spezies weisen allerdings auf eine aktive Einbindung des OVGP1-Proteins ins Reproduktionsgeschehen hin. So hat OVGP1 beispielsweise einen positiven Einfluss auf die Lebensfähigkeit und Motilität von Spermien im Kulturmedium. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass dieser Effekt konzentrationsabhängig ist (Abe et al. 1995). Auch wurde die Befruchtungsfähigkeit von bovinen Spermien durch die Inkubation mit OVGP1 erhöht (King et al. 1994). Bovines

OVGP1 bindet selektiv an den Kopf und das Mittelstück von bovinen Spermien (King & Killian 1994). Die Inkubation von Eizelle und Spermien vor und während der Fertilisierung mit OVGP1 reduzierte auch das Auftreten von Polyspermie bei Schweinen, indem es die Anzahl der gebundenen Spermien an die Eizelle reduzierte (Kouba et al. 2000). Weiterhin erhöhte es die Entwicklungskapazität von Embryonen, indem es die Teilungsrate und die Entwicklungsrate bis zur Blastzyste im Vergleich zu Kontrollen ohne OVGP1 erhöhte (McCauley et al. 2003). Mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers wurde eine eindeutige Bindung an die *Zonae pellucidae* von bovinen Oozyten *in vitro* und an die *Zonae pellucidae* von *in vivo* produzierten (Spülung an Tag 7) Embryonen festgestellt. Die Färbung war dann am stärksten, wenn Eileiterflüssigkeit aus dem Proöstrus oder Östrus verwendet wurde (Wegner & Killian 1991).

Ovines OVGP1 konnte die bovinen Embryo-Entwicklungsraten und bovine Embryoqualität nicht verbessern. Daraus wird eine speziesspezifische Wirkung abgeleitet (Hill et al. 1997). Trotzdem kann ein gewisser Grad an phylogenetischer Konservierung bei verschiedenen ovidukt-spezifischen Glykoproteinen festgestellt werden, was auf eine wichtige Rolle dieser Moleküle für die Eileiterphysiologie schließen lässt (Gandolfi et al. 1993).

Gastrin-releasing Peptide

Die Abundanz der GRP-mRNA (Gastrin-releasing Peptide) war beim Vergleich von Östrus und Diöstrus in Gesamt-Eileiterepithel-Proben von östrischen Tieren vierfach höher als im Diöstrus. Dieses Ergebnis konnte durch den Vergleich der einzelnen Abschnitte noch bestärkt und differenziert werden. Hier war die mRNA in der Ampulle nicht nachweisbar. Im Vergleich von Epithel aus dem Isthmus zu den vier verschiedenen Zykluszeitpunkten konnte ein Unterschied von mehr als neunfach zwischen Tag 0 und Tag 18 des Zyklus gemessen werden. Weiterhin stellte sich bei der Untersuchung von vier verschiedenen Zykluszeitpunkten heraus, dass die Zeitpunkte Tag 0 und Tag 12 des Sexualzyklus nicht die Zeitpunkte mit dem größten Konzentrationsunterschied der GRP-mRNA waren. Dieser konnte zwischen Tag 0 und Tag 18 gemessen werden.

Im Myenterium fungiert GRP als Neurotransmitter und ist dort für die Vermittlung von peristaltischen Reflexen zuständig (Grider 2004). Von GRP wurde zuerst angenommen, dass es hauptsächlich als Neurotransmitter agiert und fast ausschließlich in Neuronen und neuroendokrinen Geweben zu finden wäre. Es wurde dann aber auch im Uterus und in der Plazenta von Säugetieren nachgewiesen. Die exokrine Weise, in der GRP in den

Reproduktionsorganen benutzt wird, wurde im Mutterschaf gezeigt. Hier konnte eine Sekretion ins Uteruslumen durch die uterinen Drüsen sowie eine Sekretion in den Blutkreislauf nachgewiesen werden (Shulkes et al. 1996a). Auch bei Kühen konnte eine Lokalisation des GRP-Proteins im uterinen Drüsengewebe und die Sekretion ins Lumen nachgewiesen werden (Budipitojo et al. 2004a). Bei trächtigen Tieren scheint GRP sowohl vom mütterlichen Endometrium (weniger vom Myometrium) als auch von fötalen Anteilen der Plazenta gebildet zu werden. Daher ist der Anstieg von GRP im fetalen Plasma im Laufe der Trächtigkeit nicht auf eine reduzierte GRP-Clearance durch den Fötus zurückzuführen, sondern auf eine gesteigerte Produktion von GRP im Laufe der Trächtigkeit durch die Plazenta (Shulkes et al. 1996b).

Auch die genaue Lokalisation und der zeitliche Verlauf der GRP-Protein-Produktion im Uterus war bereits Gegenstand verschiedenster Arbeiten. Bei Schafen zeigte sich, dass die Expression der GRP-mRNA verglichen mit Tag 4, 10, 12 und 14 deutlich zu Tag 16 ansteigt. Tag 0 wurde allerdings nicht untersucht (Whitley et al. 1998). Die Expression im trächtigen Uterus war hauptsächlich in den Epithelzellen der uterinen Drüsen lokalisiert (Budipitoj et al. 2001). Auch bei Kühen ist es vor allem in den uterinen Drüsen von trächtigen und nicht-trächtigen Tieren nachzuweisen. GRP-mRNA kann im Endometrium aller Zyklusstadien nachgewiesen werden und zeigte zwischen Tag 0 und Tag 12 einen Unterschied von Faktor 2 (Bauersachs et al. 2005 in press). GRP-Protein konnte ebenfalls in den uterinen Drüsen im ganzen Uterus zu jedem Zykluszeitpunkt nachgewiesen werden. Sowohl GRP-mRNA als auch die Proteinfärbung stieg jedoch vom Proöstrus zum Diöstrus an (Budipitojo et al. 2003). Nicht nur im Uterushorn und -körper wurde GRP lokalisiert, sondern auch in der bovinen Cervix. Hier ist sind sowohl die mRNA als auch das Protein vor allem in peripheren tiefen Bereichen der Epitheltaschen zu finden. Sie waren in der folliculären Phase am stärksten exprimiert (Budipitojo et al. 2004b).

Sowohl das GRP-Rezeptor-Gen als auch eine zur GRP-mRNA ähnliche, aber größere, mRNA konnten in schwangeren humanen Uteri nachgewiesen werden. Auch hier werden sie in den maternalen und den fetalen Kreislauf sezerniert (Whitley et al. 1996).

Komplement-Komponente C3

Für die Komplement-Komponente C3 wurde eine Rolle bei der Interaktion von humanen Gameten postuliert (Anderson et al. 1993). Darüber hinaus wurden eine Östrogen-abhängige Expression und negative Regulation durch Progesteron der C3-mRNA im Uterus von Ratten

gezeigt (Brown et al. 1990). Dennoch fanden wir eine vierfach höhere Genexpression im Diöstrus in den Ovidukt-Epithel-Zellen. In der detaillierteren Untersuchung stellte sich heraus, dass in unserem Untersuchungssystem die stärkste Expression an Tag 18 und die schwächste Expression an Tag 3,5 vorlag. Bei Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass C3 durch Östrogen und Progesteron beeinflusst wird. So konnte die größte Expressionssteigerung durch die iatrogene Zufuhr von beiden Hormonen in Kombination erreicht werden (Li et al. 2002). Dies passt mit unserem Bild der Genexpression sehr gut zusammen, mit der stärksten Expression an Tag 18, an dem beide Hormone in einem moderaten Level vorhanden sind, einem leichten Abfall zu Tag 0, und dem niedrigsten Expressionsniveau an Tag 3,5, wenn der Östrogenspiegel seinen niedrigsten Stand erreicht. In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante Veränderung im Isthmus nachgewiesen werden. Möglicherweise war die individuelle Varianz zwischen den Tieren für diese mRNA in der Ampulle zu groß. Dies fällt bei der Ampulle am meisten ins Gewicht, da hier vorangegangene Studien auch die größten Expressionslevel zeigen konnten (Buhi & Alvarez 2003) und auch die größten tierspezifischen Variationen im individuellen Expressionsniveau zu erwarten waren.

Ein äußerst interessanter Effekt des C3-Proteins wurde kürzlich von Lee et al. publiziert. Sie untersuchten einen vom humanen Ovidukt gebildeten embryotropen Faktor, ETF-3. Dieser Faktor steigert die Entwicklung des Trophektoderms und fördert das Schlüpfen der Blastozyste aus der *Zona pellucida in vitro*. Ein monoklonaler Antikörper gegen ETF-3 konnte ein Protein in der Oviduktflüssigkeit nachweisen, das überraschenderweise als C3 identifiziert werden konnte. Für C3 selbst konnte zwar keine embryotrophe Funktion nachgewiesen werden, sehr wohl aber für seine beiden Derivate C3b und iC3b. Die stärkste embryotrophe Wirkung zeigte iC3b (Lee et al. 2004). Somit scheint der Eileiter in Abhängigkeit von Östrogen und Progesteron, C3 zu produzieren, das zum embryotropen Faktor iC3b umgewandelt wird.

Tumor Rejection Antigen 1 (TRAI)

Eine wichtige und große Gruppe an Proteinen, deren Gene in unserer Studie als differenziell exprimiert auffielen, waren die molekularen Chaperone. Sie sind eine Gruppe von Proteinen, zu denen die verschiedensten Hitzeschock-Proteine und Glukose-regulierten Proteine gehören. Sie haben unter anderem die Aufgabe, für die richtige Faltung und den richtigen Zusammenbau von Proteinen in der Zelle zu sorgen (Nicchitta et al. 2004).

Die cDNA, die nach OVGP1 am stärksten in den subtraktiven cDNA-Banken angereichert wurde, war die für das TRA1-Gen. Es erhielt seinen Namen, da es im Zusammenhang mit der körpereigenen Tumorerkennung und –bekämpfung auffiel. So löste es in Karzinogenese-Modellen eine tumorspezifische protektive Immunität aus. Es wurde vermutet, dass TRA1-Peptid-Antigene binden kann, und darauf die tumorspezifische Immunantwort basiert (Baker-Lepain et al. 2002). Diese Annahme konnte später bestätigt werden, indem Mäuse mit TRA1, das aus murinen Tumorzellen gewonnen worden war, geimpft wurden. Dadurch konnte eine für den jeweiligen Tumor spezifische Immunantwort ausgelöst werden. TRA1 bindet das antigene Peptid-Repertoire seiner Mutterzelle und stellt es dann dem Immunsystem zur Verfügung. Damit wurde TRA1 zusätzlich zu seiner Funktion als molekulares Chaperon eine Rolle bei der Generierung, Prozessierung und dem Zusammenbau von Peptid-Antigenen auf MHC Klasse I Molekülen zugewiesen (Nicchitta et al. 2004). Eine allgemeine Funktion im Zusammenhang mit der Aktivierung des Immunsystems vermuteten auch andere Arbeitsgruppen. So wurde eine aktivierende Wirkung auf CD4⁺ T-Lymphozyten (Baker-Lepain et al. 2004) durch eine mögliche Hilfsfunktion bei der Kreuzpräsentation von Antigenen durch dendritische Zellen postuliert (Berwin et al. 2003). Es wurde auch gezeigt, dass TRA1 Endotoxin mit hoher Affinität binden kann. Dadurch kommt es im Gewebe zur Aktivierung von Makrophagen und zur Freisetzung von NO (Reed et al. 2003). Diese immunogene Funktion der Chaperone, vor allem von TRA1 ist auf drei wichtige Fähigkeiten zurückgeführt worden. Sie binden eine Vielzahl an immunogenen Peptiden (Ag) und können (auch im Komplex mit den Ag) sehr gut von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen werden. Einmal in den antigenpräsentierenden Zellen, wandern sie sofort an einen Ort, an dem sie die gebundenen Ag freilassen, damit sie mit MHC Klasse I Molekülen auf der Oberfläche der Zelle präsentiert werden können. Dies alles führt letztendlich zu einer CD8⁺ T-Zell-Antwort (Berwin & Nicchitta 2001). Somit führt TRA1 in seiner Funktion als Aktivator des Immunsystems zur Produktion und Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen durch Makrophagen und Monozyten und löst die Aktivierung und Reifung von dendritischen Zellen (antigenpräsentierenden Zellen) aus (Tsan & Gao 2004). Eine ähnliche Funktion scheint es auch im Reproduktionsgeschehen zu haben. Auch hier ist seine Fähigkeit der Peptidbindung wichtig. Es bindet zusammen mit hsp60 an den Spermienkopf und im Rahmen der Kapazitation kommt es zur Phosphorylierung von Tyrosin-Resten. Dadurch wird ein funktioneller Zona-Rezeptorkomplex am Spermienkopf gebildet und das Spermium kann an die Zona pellucida binden (Asquith et al. 2004). TRA1 wird im Nebenhoden gebildet und bindet hier an die Spermien an (Asquith et al. 2005). Allerdings ist ein Effekt des im Eileiter

gebildeten TRA1 nicht auszuschließen, auch wenn für diese Zellen eine sekretorische Funktion in Bezug auf dieses Protein nicht nachgewiesen ist. Bei Untersuchungen in murinen Uteri wurde eine Östrogen-abhängige Expression von TRA1 und anderen molekularen Chaperonen nachgewiesen. Dieser Effekt konnte sogar direkt mit dem Östrogenrezeptor in Zusammenhang gebracht werden (Papaconstantinou et al. 2001; Papaconstantinou et al. 2003; Papaconstantinou et al. 2002). Diesen östrogenabhängigen Effekt kann die vorliegende Untersuchung bestätigen. Beim Vergleich von Gesamt-Eileiterepithel im Östrus und im Diöstrus wurde eine ca. 11-fache Erhöhung im Östrus gemessen. Das bestätigte die getrennte Untersuchung von Ampulle und Isthmus. Das höchste Expressionsniveau war hier ebenfalls im Östrus (Tag 0) nachzuweisen und fiel zum Tag 3,5 um das 18-fache stark ab. Abweichungen der Faktoren der beiden Untersuchungen (Ovidukt-Array und Arrays der subtraktiven Banken) können auch dadurch zustande kommen, dass der Spot-Abstand beim Oviduct-Array größer war, was eine genauere Quantifizierung der Signale erlaubt. Während der ganzen Lutealphase war die Expression auf einem niedrigen Niveau und begann im Präöstrus (Tag 18) wieder leicht anzusteigen. Ein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen Ampulle und Isthmus konnte nicht gemessen werden. Damit konnten nachgewiesen werden, dass TRA1 im bovinen Eileiter in der folliculären Phase sowohl in der Ampulle als auch im Infundibulum, am stärksten exprimiert wird. Sogar in der *in situ*-Hybridisierung war der starke Abfall der mRNA-Konzentration in den Eileiterepithelzellen zu erkennen. Das lässt sich sehr gut mit den bisher für dieses Protein postulierten Funktionen in Einklang bringen. Zum einen zeigt der Eileiter im Östrus seine größte sekretorische Aktivität (Rüsse & Sinowatz 1991), weshalb die gesteigerte Expression eines molekularen Chaperons, das die korrekte Faltung von synthetisierten Proteinen katalysiert, einleuchtend erscheint. Zum anderen ist es gerade in dieser Phase des Sexualzyklus besonders wichtig, dass eventuelle Infektionen sofort durch eine schnelle Aktivierung der Immunantwort abgewehrt werden. Weiterhin könnte aus dem Eileiterepithel stammendes TRA1 eine Funktion bei der Bindung der Spermien an die Zona pellucida besitzen.

Heat shock protein A5 (HSPA5), DNAJB11, EDEM, P5

Ein weiteres Protein aus der Gruppe der molekularen Chaperone, das in dieser Studie als differenziell exprimiert identifiziert werden konnte, ist das HSPA5. Es ist im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und wurde bereits als differenziell exprimiert in den glandulären Zellen des murinen Endometriums beschrieben (Simmons & Kennedy

2000). In unserer Studie war die mRNA-Konzentration von HSPA5 im Östrus am höchsten, im Vergleich des Gesamt-Eileiterepithels um das Sechsfache im Vergleich zum Diöstrus. Bei der Betrachtung der einzelnen Eileiterabschnitte zeigte sich, dass die Expression jeweils im Östrus (Tag 0) am höchsten war, nämlich um ca. das Achtfache. Auch hier konnte mit dem Ovidukt-Array ein etwas höherer Unterschied gemessen werden als mit den Arrays der subtraktiven Banken. Bereits an Tag 3,5 war die Expression der HSPA5-mRNA auf einem sehr niedrigen Niveau und stieg erst zum Proöstrus wieder leicht an. Ein signifikanter Unterschied der Genexpression zwischen Ampulle und Isthmus konnte nicht nachgewiesen werden. HSPA5 hat neben seinen Aufgaben als molekulares Chaperon auch eine Funktion bei der Unterdrückung der Mitochondrien-abhängigen Apoptose (Qin et al. 2004). HSPA5 und TRA1 konnten auch im Zusammenhang mit der Kontrolle und Regulation von falsch gefalteten Glykoprotein-Rezeptoren wie z.B. dem LH-Rezeptor nachgewiesen werden (Mizrachi & Segaloff 2004). Dies würde zu der Beobachtung passen, dass beide Chaperone zu Tag 18 des bovinen Sexualzyklus langsam ansteigen und ihr höchstes Expressionsniveau im Östrus erreichen. Gerade zu diesem Zeitpunkt des Zyklus werden intakte LH-Rezeptoren auf der Zelloberfläche benötigt, da im Östrus der LH-Gipfel liegt.

HSPA5 und HSP60 konnten auch auf der Lumen-zugewandten Oberfläche von Oviduktepithelzellen nachgewiesen werden. Sie binden an den Spermienkopf, wobei HSP60 vermutlich von den männlichen akzessorischen Geschlechtsdrüsen gebildet wird (Boilard et al. 2004) und HSPA5, als membranpermeables Protein, vom Oviduktepithel (Qin et al. 2004). HSPA5 wurde auch im Zusammenhang mit der Faltung und der Zusammensetzung von leichten Ketten der Immunglobuline nachgewiesen. Hierbei fiel ein weiteres Chaperon auf, das DNAJB11. Dieses Protein bindet an das Substrat, verhindert dadurch eine verfrühte Aggregation von unvollständig gefalteten Proteinketten und ermöglicht dadurch die Anheftung von HSPA5. DNAJB11 dissoziiert nach der Anbindung von HSPA5 wieder vom Substrat ab, während HSPA5 bis zur vollständigen Faltung gebunden bleibt (Shen & Hendershot 2005). DNAJB11 ist ein essenzielles Chaperon für die Aufrechterhaltung der Stresstoleranz gegenüber ER-Stress, zum Beispiel der Ansammlung von ungefalteten Proteinen im ER (Nakanishi et al. 2004). Ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der auch im Kontext mit ER-Stress aufgefallen ist, ist XBP-1. Er aktiviert die Transkription der Gene für eine ganze Reihe von molekularen Chaperonen, so auch DNAJB11, HSPA5, EDEM, protein-disulfid isomerase P5 und drei weitere Chaperone (Lee et al. 2003). Neben DNAJB11 und HSPA5 konnten wir auch eine differenzielle Expression für EDEM und protein-disulfid isomerase P5 im bovinen Eileiterepithel mit dieser Studie nachweisen. Der mRNA-

Konzentrationsverlauf war für alle diese Chaperone sehr ähnlich, mit der höchsten Konzentration im Östrus, einem deutlichen Abfall zu Tag 3,5 und erst wieder einem moderaten Anstieg zu Tag 18 des Sexualzyklus. Dies erklärt sich wohl dadurch, dass alle diese molekularen Chaperone durch den gleichen Transkriptionsfaktor reguliert werden.

Die Chaperone werden aber nicht nur gleich in ihrem Expressionsverlauf reguliert, sie scheinen auch in ihrer Funktion synergistisch zu wirken. So konnte im ER ein großer Multiproteinkomplex aus zehn Proteinen nachgewiesen werden, der beispielsweise bei der Synthese der schweren Ketten der Immunglobuline eine wichtige Rolle spielt. Er assoziiert bereits ohne Substrat und bindet die Proteinketten als Komplex (Meunier et al. 2002). Aus diesem großen Multiproteinkomplex wurden in unserer Studie die mRNAs von fünf Proteinen als differenziell exprimiert im bovinen Eileiterepithel gefunden; HSPA5, TRA1, DNAJB11, ERP70 und SDF2-L1. Wahrscheinlich sind die mRNAs für diese Gruppe der molekularen Chaperone im Östrus hauptsächlich wegen der gesteigerten Proteinsekretion hochreguliert. Es könnten aber zusätzlich noch andere, spezifischere Funktionen vorliegen, wie z.B. bei TRA1 und HSPA5.

Matrix Gla Protein (MGP)

MGP ist ein Protein der extrazellulären Matrix (ECM). Es ist Vitamin K-abhängig und in den Geweben des Körpers weit verbreitet (Zhao & Warburton 1997), allerdings mit einem deutlichen Schwerpunkt in Knochen und Knorpel (Pinto et al. 2003). Es hat eine wichtige Funktion bei der Regulierung der Kalzifizierung von Geweben. Es inhibiert BMP2 (bone morphogenic protein-2), das die Gewebemineralisierung induziert (Cola et al. 2004). So reguliert es die Verkalkung von Knochen und Knorpeln aller Wirbeltiere vom Knochenfisch bis zum Menschen. MGP ist ein hoch konserviertes Protein (Pinto et al. 2003). Endothelzellen von Blutgefäßen, die arteriosklerotischen Stimuli ausgesetzt werden, steigern ihre Expression an MGP, um eine Kalzifizierung zu verhindern (Cola et al. 2004). Da natürliches Östrogen bei Frauen und auch die Östrogen-Substitution in der Menopause das Risiko für Gefäßverkalkung reduziert, wurde eine Östrogen-abhängige Expression von MGP in Gefäßendothelien vermutet, konnte in Untersuchungen jedoch nicht bestätigt werden (Rzewuska-Lech et al. 2005). Im Zusammenhang mit Gefäßendothelien fiel ein weiterer Effekt von MGP auf. Es scheint äußerst wichtig für die korrekte Differenzierung dieser Zellen zu sein, da ein Defizit an MGP in einem Defekt des Gefäßendothels resultierte. Es wird vermutet, dass MGP den TGF- β (transforming growth factor beta) -Signalweg moduliert. Weiterhin wird die

Expression von MGP durch TGF- β 1 induziert (Bostrom et al. 2004). In den Untersuchungen von Ampulle und Isthmus getrennt im Zyklusverlauf fiel die cDNA für dieses Gen mit einem mehr als 17-fachen Unterschied von Tag 3,5 zu Tag 0 in der Ampulle auf. Die stärkste Expression zeigte die cDNA an Tag 3,5 und fiel dann langsam über den Zyklus bis zum Zeitpunkt der niedrigsten Expression im Östrus ab. An Tag 3,5 konnte auch ein signifikanter Unterschied in der Expressionshöhe zwischen Ampulle und Isthmus gezeigt werden, mit einer vierfach stärkeren Expression in der Ampulle. Im Isthmus konnte kein signifikanter Genexpressionsunterschied im Zyklus nachgewiesen werden. Beim Vergleich des Gesamteileiterepithels zwischen Tag 0 und Tag 12 konnte dieses Gen nicht identifiziert werden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass der Unterschied zwischen Tag 0 und Tag 12 (siebenfach) nur in der Ampulle vorliegt und bei Verwendung des gesamt Epithels nicht auffällt. In der *in-situ* Hybridisierung konnte die RNA eindeutig im bovinen Eileiterepithel nachgewiesen werden. Dieser histologische Befund und die Ergebnisse der Array-Hybridisierung weisen auf eine wichtige Funktion von MGP auch in Eileiterepithelzellen hin. Die Funktion wäre in ähnlicher Weise wie bei Gefäßendothelzellen denkbar, worauf auch der Zyklustag mit der stärksten Expression hinweist. An Tag 3,5 des Zyklus beginnen Progesteron-induziert die Differenzierungsprozesse, die zum Bild des hauptsächlich Zilienzellen beherbergenden Eileiters im Diöstrus führen. Auch an Tag 18 beträgt der Expressionsunterschied zu Tag 0 immer noch Faktor 5. Auch zu diesem Zykluszeitpunkt sind wieder neue Differenzierungsprozesse im Eileiterepithel nötig, um zum sekretorischen Phänotyp des Eileiters zu gelangen. Bei all diesen Umbau- und Differenzierungsprozessen ist eine Involvierung des ECM-Proteins MGP denkbar.

Anterior Gradient Homologue 2 (AGR2)

AGR2 ist ein weiteres Protein, das möglicherweise in Differenzierungsprozesse involviert ist. Es wurde zuerst in *Xenopus laevis* als XAG-2 identifiziert und spielt möglicherweise eine Rolle bei der Ausbildung des Ektoderms. Seine Funktion ist wahrscheinlich an den FGF (Fibroblast Growth Factor) -Signalweg gekoppelt (Aberger et al. 1998). In anderen Spezies wurde es bisher hauptsächlich im Zusammenhang mit Tumorzellen beschrieben (Thompson & Weigel 1998a). Interessanterweise wurde für die Expressierung des AGR2-Gens beim Menschen bereits eine Östrogenabhängigkeit nachgewiesen. So wird es sowohl in Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinom Zelllinien (Thompson & Weigel 1998b) als auch in anderen Östrogenrezeptor-positiven Zelllinien nachgewiesen (Fletcher et al. 2003a).

Es wurde eine positive Korrelation der Expression dieses Gens mit dem Östrogenrezeptor (Thompson & Weigel 1998c) und eine negative Korrelation mit der Expression des EGFR (Epidermal growth factor receptor) gezeigt (Fletcher et al. 2003b). Beim Vergleich der mRNA-Konzentration im Gesamt-Eileiterepithel zwischen Östrus und Diöstrus ergab sich ein mehr als sechsfacher Unterschied. Dieses Ergebnis konnte durch die getrennte Untersuchung von Epithel aus Ampulle und Isthmus bestätigt werden. Zwischen Tag 0 und Tag 3,5 konnte sogar ein noch höherer Faktor (ca. zehnfach) gemessen werden. Hier zeigte sich erneut, dass es notwendig war, noch weitere Zeitpunkte im Sexualzyklus zu untersuchen, um ein genaues Bild des Genexpressionsverlaufs zu erhalten. Die mRNA von AGR2 ist in Ampulle und Isthmus auf gleiche Weise und ohne signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen diesen beiden Kompartimenten exprimiert. In der *in-situ* Hybridisierung konnte die mRNA im Eileiterepithel eindeutig nachgewiesen werden, wobei sich die Expression nur auf die Epithelschicht beschränkte. In den Epithelzellen kam es zu einer verstärkten Färbung des apikalen Zellbereiches. Dies könnte auf eine Sekretion dieses Proteins in das Eileiterlumen hindeuten. Beim Nachweis des Proteins durch Western-Immunoblot mit einem epitopspezifischen Antikörper konnte das AGR2-Protein zu jedem Zykluszeitpunkt detektiert werden. Dabei wurde eine leichte Erhöhung der Proteinkonzentration im Isthmus an Tag 3,5 gemessen, wobei zu diesem Zeitpunkt die mRNA-Konzentration am niedrigsten ist. Die Signifikanz dieser erhöhten Proteinkonzentration muss aber noch durch Untersuchung von Proben weiterer Tiere gezeigt werden. Dies ist ein Beispiel dafür, dass Veränderungen von mRNA-Spiegeln nicht mit entsprechenden Veränderungen auf Proteinebene einhergehen müssen. Das kann beispielsweise an völlig unterschiedlichen Halbwertszeiten der entsprechenden mRNA und des zugehörigen Proteins liegen. Aufgrund der bei *Xenopus leavis* und bei humanen Östrogenrezeptor-positiven Karzinomzelllinien postulierten Funktion im Zusammenhang mit Differenzierungsprozessen ist auch im Eileiter eine solche Funktion im Hinblick auf die Epitheldifferenzierung im Zyklusverlauf, aber auch im Hinblick auf eine positive Beeinflussung der frühen Embryonalentwicklung, denkbar.

Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4 (HCN4)

Weiterhin fiel die mRNA eines Ionenkanal-Proteins, HCN4, im Genexpressionsvergleich auf. Mit dem Array der subtraktiven Banken wurde ein ca. dreifacher Unterschied im Vergleich von Östrus zu Diöstrus gemessen. Hingegen konnte bei der Untersuchung der beiden Eileiterabschnitte getrennt auf dem Ovidukt-Array ein mehr als 16facher Unterschied in der

Ampulle im Vergleich Tag 0 zu Tag 12 festgestellt werden. Die HCN4-mRNA zeigte in Ampulle und Isthmus einen sehr ähnlichen Konzentrationsverlauf, mit der höchsten Konzentration an Tag 0, einem starken Abfall zu Tag 3,5 und sehr niedrigen Werten bis Tag 18. Ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den beiden Kompartimenten konnte nicht festgestellt werden. Dieser Ionenkanal ist z.B. in Herzmuskelzellen für das Generieren von Schrittmacherpotenzialen zuständig (Stieber et al. 2003). HCN4 konnte vor allem im Sinusknoten des Herzens, die anderen drei Vertreter dieser Ionenkanal-Protein-Familie in Ganglienzellen des Gehirns oder in Photorezeptoren der Retina gefunden werden (Moosmang et al. 2001). HCN4 wurde bisher noch nicht im Zusammenhang mit reproduktiven Organen oder gar dem Eileiter beschrieben. Über seine Funktion in diesem Organ kann daher nur spekuliert werden. Es ist denkbar, dass er eine Rolle bei der gesteigerten Motilität des Eileiters im Östrus einnimmt, indem er die Reizschwelle für Muskelkontraktionen durch eine Erhöhung des Ruhepotenzials herabsetzt.

Die vorliegende Arbeit ist die erste, die systematisch Veränderungen von mRNA-Spiegeln im bovinen Eileiterepithel im des Zyklusverlauf untersuchte. Sie bietet nun, vor allem in Hinblick auf die DFG- Forschergruppe „Mechanismen der embryo-maternalen Kommunikation“, eine Grundlage für weitere funktionelle Untersuchungen. Diese wurden mit der Verifizierung der Signalunterschiede durch quantitative RT-PCR, durch die Lokalisation der mRNA im Eileiterepithel mit Hilfe von *in-situ* Hybridisierung sowie Untersuchungen auf Proteinebene bereits begonnen. Die erhaltenen Ergebnisse können auch bei der Betrachtung der Kommunikation zwischen mütterlichen Zellen und dem frühen Embryo von Bedeutung sein. So flossen die Ergebnisse dieser Arbeit in die Charakterisierung eines Kokultursystems aus primären Eileiterepithelzellen und *in vitro*-produzierten Embryonen ein.

7 Zusammenfassung

Der Eileiter spielt eine bedeutende Rolle im Reproduktionsgeschehen und ist dabei in viele wichtige Prozesse involviert. Er unterstützt durch das Milieu, das er bereit stellt, die Kapazitation der Spermien, die Reifung und die Befruchtung der Eizelle, und er fördert durch sezernierte Faktoren die frühe Embryonalentwicklung. Während des Zyklus durchläuft er deutliche morphologische und histologische Veränderungen, um seinen verschiedenen Aufgaben gerecht zu werden. Da viele Veränderungen in einem Gewebe mit einer Veränderung des Transkriptom einhergehen, haben wir bovines Eileiterepithel als Ausgangsmaterial für Untersuchungen auf der Ebene der mRNA ausgewählt. Um ein homogenes und definiertes Probenmaterial erhalten zu können, musste die Schlachtung der Tiere zur Probengewinnung zu einem möglichst genau definierten Zykluszeitpunkt stattfinden. Hierfür wurde ein Protokoll zur Tiervorbereitung erarbeitet, mit dessen Hilfe alle Tiere für die Versuche einheitlich ausgewählt und zyklussynchronisiert wurden. Weiterhin wurde ein Entnahmeprotokoll für die Eileiterepithelproben entwickelt, das Schwankungen in der Probenqualität unabhängig von der durchführenden Person minimiert.

Zur Untersuchung von Veränderungen des Transkriptom wurde in einem ersten Ansatz eine Kombination aus subtraktiven cDNA-Banken und radioaktiver cDNA-Array-Hybridisierung verwendet. Zuerst wurde Eileiterepithel (Ampulle und Isthmus gemeinsam) von drei Tieren im Östrus und drei Tieren im Diöstrus untersucht. Insgesamt wurde die Expression von 3072 cDNA-Klonen (1536 cDNAs pro subtraktiver Bank, eine Bank pro Zykluszeitpunkt) im Östrus versus Diöstrus verglichen. Dabei konnten 77 verschiedene cDNAs mit signifikanten Konzentrationsunterschieden zwischen den beiden Zykluszeitpunkten identifiziert werden. Davon waren 37 im Östrus und 40 im Diöstrus stärker exprimiert. Die identifizierten Gene wurden in Funktionsklassen eingeordnet. Dadurch konnten vereinfachte „Gene Ontologies“ gebildet werden, die einen Überblick geben, welche biologischen Prozesse und molekularen Funktionen zwischen Östrus und Diöstrus reguliert werden. So sind Gene, die für die Synthese und Sekretion von Proteinen wichtig sind, im Östrus hochreguliert, wohingegen Gene, die Aufgaben in der Regulation der körpereigenen Immunantwort und der Transkription haben, im Diöstrus hochreguliert sind.

In einem zweiten Ansatz wurden die gewonnenen Einblicke in die Genexpressionsveränderungen während des Zyklus weiter vertieft. Dazu wurde ein Ovidukt-Array

hergestellt, das auf vorangegangene Arbeiten zur Genexpression im Eileiterepithel aufbaute und durch alle cDNAs, die im Vergleich von Eileiterepithel im Östrus zu Diöstrus als differenziell exprimiert auffielen sowie durch einige Kandidatengene, erweitert wurde. Zusätzlich enthielt es, als interne Kontrolle, 94 cDNAs, von denen keine Veränderung der Genexpression im Zyklusverlauf zu erwarten waren. Auf dem Ovidukt-Array befanden sich insgesamt 549 cDNAs von 432 Genen. Mit diesem Array wurden Hybridisierungsexperimente mit bovinen Eileiterproben aus vier verschiedenen Zyklusstadien durchgeführt, jeweils drei Tiere an Tag 0, Tag 3,5, Tag 12 und Tag 18 des Sexualzyklus. Dabei wurden Proben aus Ampulle und Isthmus getrennt voneinander untersucht. Die Auswertung der Hybridisierungsergebnisse ergab 196 differenziell exprimierte Gene. Die mit den Ovidukt-Array erhaltenen Daten konnten die beim Östrus-Diöstrus-Vergleich erhaltenen Ergebnisse sehr gut bestätigen, weiter vertiefen und spezifizieren.

Zusätzlich wurden Veränderungen der mRNA-Spiegel ausgewählter Gene durch quantitative Real-time RT-PCR genauer quantifiziert und Lokalisationsstudien im Eileiterepithel mittels *in situ* Hybridisierung durchgeführt. Weiterhin wurde damit begonnen, Veränderungen auf Proteinebene in den Eileiterepithelzellen im Zyklusverlauf für einzelne Kandidatengene zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit ergab grundlegende Erkenntnisse zur Veränderung der mRNA-Zusammensetzung während des Sexualzyklus im bovinen Eileiterepithel aus der Ampulle und dem Isthmus. Damit wurden histologische Veränderungen des Epithels während des Zyklus auf molekularer Ebene charakterisiert. Auf dieser Grundlage können auch spezifische Reaktionen, die von anwesenden Spermien, befruchteten Eizellen oder Embryonen ausgelöst werden, untersucht werden.

8 Summary

Transcriptome analysis of bovine oviduct epithelial cells during the estrous cycle

The oviduct plays a central role for different reproductive processes. The epithelial cells provide the appropriate environment for oocyte maturation, sperm capacitation, fertilization, and the first cleavage stages of embryonic development. To fulfill these tasks the oviduct epithelium undergoes marked morphological and functional changes during the estrous cycle. Most phenotypic changes in tissues or cells are accompanied by changes of the transcriptome. Therefore, we performed an analysis of gene expression changes at the mRNA level of bovine oviduct epithelial cells to identify genes involved in these specific changes of these cells.

First of all we had to make sure that only homogeneous and well defined tissue samples were used for the analyses. For this reason a standardized protocol for the synchronization of the estrous cycle and the collection of tissue samples was established. With these protocols an exact definition of day of estrous cycle at the time of slaughter and a standardized sample collection was possible.

To investigate changes of the transcriptome a combination of subtracted cDNA libraries and cDNA array hybridization was used. In a first approach epithelial cells derived from ampulla and isthmus were analyzed at estrus (n=3) and diestrus (n=3). In total; mRNA levels of 3072 cDNA clones (1536 of each library, one library for each day of estrous cycle) were compared at estrus versus diestrus. This analysis revealed 77 different cDNAs with significant differences in their mRNA concentrations. 37 of these showed higher levels at estrus and 40 at diestrus. A simplified Gene Ontology was built for the identified genes. They provided a better insight into biological processes and molecular functions, which are modulated during the estrous cycle. Genes that are involved in protein synthesis and secretion were upregulated during estrus and those assigned to regulatory functions of immune response or transcription were upregulated during diestrus.

In a second approach a deeper insight into gene expression changes during the estrous cycle was obtained. Therefor an oviduct array was established that was based on genes identified in previously performed gene expression analyses of oviduct epithelial cells. All cDNAs identified in the estrus versus diestrus analysis and some candidate genes were added. As controls, 94 cDNAs for which no changes of their mRNA levels was expected were also

spotted on the array. In total the oviduct array consisted of 549 cDNAs which correspond to 432 different genes. Array hybridization was performed with oviduct epithelial cells derived from animals (n=3 for each group) slaughtered at day 0, day 3.5, day 12 and day 18 of the estrous cycle. Epithelial cells of the ampulla and the isthmus were analyzed separately. This analysis revealed 196 differentially expressed genes. The oviduct array results confirmed the findings of the first approach, and assigned expression changes to distinct compartments of the oviduct and showed a more detailed time-course during the estrous cycle. Absolute quantification of mRNA levels using quantitative real-time RT-PCR and localization of the mRNA in the oviduct by *in situ* hybridization were also performed. Furthermore, analyses at the protein level were started to investigate candidate genes in the epithelial cells during the estrous cycle.

The results of this analysis provide a basis for the understanding of changes at the mRNA level in bovine oviduct epithelial cells during the estrous cycle. They characterize histological changes of epithelial cells during the estrous cycle at a molecular level. This is the basis for future analyses, e. g. of embryo-maternal communication.

9 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar (µmol/l)
Abb.	Abbildung
APS	Ammonium Peroxodisulfat
bGH	bovines Wachstumshormon
bp	Basenpaare (base pairs)
BPB	Bromphenolblau
BSA	Albumin aus Rinderserum (bovine serum albumin)
bzw.	Beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (cyclic adenosine monophosphate)
CDK	cyklinabhängige Kinasen (cyclin dependent kinase)
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA (complementary deoxyribonucleic acid)
cm	Zentimeter
cpm	Impulse pro Minute (counts per minute)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTPs	2' Desoxy-nucleotid 5' Triphosphat (deoxynucleotide triphosphates)
dpm	Zerfälle pro Minute (desintegrations per minute)
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
ECM	extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER α	Östrogen-Rezeptor α
ER β	Östrogen-Rezeptor β
et al.	et alii
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
g	relative centrifugal force (RCF) (= $1,119 \times 10^{-5} \times \text{rpm}^2 \times r$)

G-Proteine	Guanosin-Triphosphat bindende Proteine
h	Stunde
H&E	Hämatoxylin und Eosin
hCG	menschliches Choriongonadotropin (human chorion gonadotropin)
IGF I	Insulin-like growth factor I
IGF II	Insulin-like growth factor II
<i>IGF2</i>	IGF-II-Gen
IGFBP 1 – 6	IGF Bindungsproteine 1 – 6
IGFBPs	IGF-Bindungsproteine (IGF binding proteins)
IGF-I, -II	Insulin-like growth factor-I bzw. II
IGF-IIR	IGF-Rezeptor Typ II
IGF-IR	IGF-Rezeptor Typ I
IL	Interleukin
i.m.	intra muskulär
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulin Rezeptor Substrat
kb	Kilo Basenpaare (kilo basepairs)
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
MapK	Mitogen aktivierte Kinase
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar (mmol/l)
mRNA	messenger RNA
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NaOac	Natriumacetat

OD	optische Dichte
P4	Progesteron
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
pg	Picogramm
PGF2 α	Prostaglandin 2 α
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro min (rounds per minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
SSH	Suppression Subtractive Hybridization
STATs-1, -3, -5a, 5b	Signal transducers and activators of transcription
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (Tris buffered saline)
tg	Transgen
TNF	Tumornekrosefaktor (tumor necrosis factor)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultra-Violett
V	Volt
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lichtmikroskopisches Bild des Eileiters..... 6

Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Eileiterepithel aus der Ampulle..... 7

Abbildung 3: schematische Schnitte durch den Eileiter: 8

Abbildung 4: Hormonprofil 10

Abbildung 5: Schematische Darstellung des Ablaufs der Suppression Subtractive
Hybridisation (SSH)-Methode. 24

Abbildung 6: Tierprotokoll: 35

Abbildung 7: Abschnitte des Eileiters..... 37

Abbildung 8: Gewinnung des Eileiterepithels 38

Abbildung 9: Proben-Identifikationsnummer 39

Abbildung 10: Tierprotokoll, ausgefüllt..... 58

Abbildung 11: Agarosegelelektrophorese-Analyse der RNA 61

Abbildung 12: Agarosegelelektrophorese der cDNA 62

Abbildung 13: Agarosegelelektrophorese der Kolonie-PCR..... 63

Abbildung 14: Entfernung von cDNAs mit sehr intensiven Signalen 64

Abbildung 15: Scatter Plot der normalisierten Signalwerte..... 65

Abbildung 16: Übersicht über die identifizierten Gene aus dem Östrus-Diöstrus Vergleich.. 66

Abbildung 17: Gene Ontology 68

Abbildung 18: Korrelation von cDNA-Array-Hybridisierung und quantitativer Real-time RT-
PCR 76

Abbildung 19: Veränderungen im Zyklusverlauf A/I (Bos taurus tumor rejection antigen
(gp96) 1 (TRA1)) 79

Abbildung 20: Übersicht über die Genexpression einer Auswahl an molekularen Chaperonen
in der Ampulle im Zyklusverlauf 80

Abbildung 21: Veränderungen Vergleich Ampulle/Isthmus 80

Abbildung 22: *In situ*-Hybridisierung 121

Abbildung 23: 2-D-Gel von Gesamt-Protein und 2-D-Western-Immuno-Blot für das AGR2-
Protein in bovinem Eileiterepithel..... 123

Abbildung 24: Western-immuno-Blot für das AGR2-Protein aus Ampullen-Epithel..... 124

Abbildung 25: Western-immuno-Blot für das AGR2-Protein aus Isthmus-Epithel 124

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Brunstsymptome	35
Tabelle 2: Beurteilung der Brunstsymptome	36
Tabelle 3: Mastermix für die Erststrangsynthese (1 Reaktion).....	43
Tabelle 4: Mastermix für die Zweitstrangsynthese (1 Reaktion).....	43
Tabelle 5: Mastermix für PCR (1 Reaktion)	45
Tabelle 6: Temperaturprofil für die Kolonie-PCR.....	46
Tabelle 7: Reaktionsmischung für die radioaktive Markierung (1 Reaktion).....	50
Tabelle 8: Bedingungen für die Sequenzierreaktion	53
Tabelle 9: Im Östrus hochregulierte Gene	69
Tabelle 10: Im Diöstrus hochregulierte Gene	71
Tabelle 11: Ergebnisse der Real-time RT-PCR; MW = Mittelwert.....	75
Tabelle 12: differenziell exprimierte Gene in der Ampulle	81
Tabelle 13: Differenziell exprimierte Gene im Isthmus.....	96
Tabelle 14: differenziell exprimierte Gene Tag 0 im Abschnittvergleich.....	114
Tabelle 15: differenziell exprimierte Gene Tag 3,5 im Abschnittvergleich.....	115
Tabelle 16: differenziell exprimierte Gene Tag 12 im Abschnittvergleich.....	117
Tabelle 17: differenziell exprimierte Gene Tag 18 im Abschnittvergleich.....	118

12 Literaturverzeichnis

- Abe, H., Numazawa, C., Abe, M., Onodera, M. & Katsumi, A. 1993. Immunocytochemical localization of oviduct-specific glycoproteins in the oviductal epithelium from cows at follicular and luteal phases. *Cell Tissue Res.* 274: 41-47.
- Abe, H., Sendai, Y., Satoh, T. & Hoshi, H. 1995. Bovine oviduct-specific glycoprotein: a potent factor for maintenance of viability and motility of bovine spermatozoa in vitro. *Mol.Reprod.Dev.* 42: 226-232.
- Aberger, F., Weidinger, G., Grunz, H. & Richter, K. 1998. Anterior specification of embryonic ectoderm: the role of the *Xenopus* cement gland-specific gene XAG-2. *Mech.Dev.* 72: 115-130.
- Anderson, D. J., Abbott, A. F. & Jack, R. M. 1993. The role of complement component C3b and its receptors in sperm-oocyte interaction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90: 10051-10055.
- Araki, Y., Nohara, M., Yoshida-Komiya, H., Kuramochi, T., Ito, M., Hoshi, H., Shinkai, Y. & Sendai, Y. 2003. Effect of a null mutation of the oviduct-specific glycoprotein gene on mouse fertilization. *Biochem.J.* Pt.
- Argaves, W. S. & Morales, C. R. 2004b. Immunolocalization of cubilin, megalin, apolipoprotein J, and apolipoprotein A-I in the uterus and oviduct. *Mol.Reprod.Dev.* 69: 419-427.
- Asquith, K. L., Baleato, R. M., McLaughlin, E. A., Nixon, B. & Aitken, R. J. 2004. Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *J.Cell Sci.* 117: 3645-3657.
- Asquith, K. L., Harman, A. J., McLaughlin, E. A., Nixon, B. & Aitken, R. J. 2005. Localization and significance of molecular chaperones, heat shock protein 1, and tumor rejection antigen gp96 in the male reproductive tract and during capacitation and acrosome reaction. *Biol.Reprod.* 72: 328-337.
- Baker-Lepain, J. C., Sarzotti, M., Fields, T. A., Li, C. Y. & Nicchitta, C. V. 2002. GRP94 (gp96) and GRP94 N-terminal geldanamycin binding domain elicit tissue nonrestricted tumor suppression. *J.Exp.Med.* 196: 1447-1459.
- Baker-Lepain, J. C., Sarzotti, M. & Nicchitta, C. V. 2004. Glucose-regulated protein 94/glycoprotein 96 elicits bystander activation of CD4+ T cell Th1 cytokine production in vivo. *J.Immunol.* 172: 4195-4203.
- Bangur, C. S., Switzer, A., Fan, L., Marton, M. J., Meyer, M. R. & Wang, T. 2002. Identification of genes over-expressed in small cell lung carcinoma using suppression subtractive hybridization and cDNA microarray expression analysis. *Oncogene* 21: 3814-3825.

- Bauersachs, S., Blum, H., Mallok, S., Wenigerkind, H., Rief, S., Prella, K. & Wolf, E. 2003a. Regulation of ipsilateral and contralateral bovine oviduct epithelial cell function in the postovulation period: a transcriptomics approach. *Biol.Reprod.* 68: 1170-1177.
- Bauersachs, S., Rehfeld, S., Ulbrich, S. E., Mallok, S., Prella, K., Wenigerkind, H., Einspanier, R., Blum, H. & Wolf, E. 2004a. Monitoring gene expression changes in bovine oviduct epithelial cells during the oestrous cycle. *J.Mol.Endocrinol.* 32: 449-466.
- Bennett, W. A., Watts, T. L., Blair, W. D., Waldhalm, S. J. & Fuquay, J. W. 1988c. Patterns of oviducal motility in the cow during the oestrous cycle. *J.Reprod.Fertil.* 83: 537-543.
- Berwin, B., Hart, J. P., Rice, S., Gass, C., Pizzo, S. V., Post, S. R. & Nicchitta, C. V. 2003. Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells. *EMBO J.* 22: 6127-6136.
- Berwin, B. & Nicchitta, C. V. 2001. To find the road traveled to tumor immunity: the trafficking itineraries of molecular chaperones in antigen-presenting cells. *Traffic.* 2: 690-697.
- Boilard, M., Bailey, J., Collin, S., Dufour, M. & Sirard, M. A. 2002b. Effect of bovine oviduct epithelial cell apical plasma membranes on sperm function assessed by a novel flow cytometric approach. *Biol.Reprod.* 67: 1125-1132.
- Boilard, M., Reyes-Moreno, C., Lachance, C., Massicotte, L., Bailey, J. L., Sirard, M. A. & Leclerc, P. 2004. Localization of the chaperone proteins GRP78 and HSP60 on the luminal surface of bovine oviduct epithelial cells and their association with spermatozoa. *Biol.Reprod.* 71: 1879-1889.
- Bostrom, K., Zebboudj, A. F., Yao, Y., Lin, T. S. & Torres, A. 2004. Matrix GLA protein stimulates VEGF expression through increased transforming growth factor-beta1 activity in endothelial cells. *J.Biol.Chem.* 279: 52904-52913.
- Brown, E. O., Sundstrom, S. A., Komm, B. S., Yi, Z., Teuscher, C. & Lyttle, C. R. 1990. Progesterone regulation of estradiol-induced rat uterine secretory protein, complement C3. *Biol.Reprod.* 42: 713-719.
- Budipitoj, T., Matsuzaki, S., Cruzana, M. B., Baltazar, E. T., Hondo, E., Sunaryo, S., Kitamura, N. & Yamada, J. 2001. Immunolocalization of gastrin-releasing peptide in the bovine uterus and placenta. *J.Vet.Med.Sci.* 63: 11-15.
- Budipitojo, T., Sasaki, M., Cruzana, M. B., Matsuzaki, S., Iwanaga, T., Kitamura, N. & Yamada, J. 2004a. Ultrastructural localization of gastrin-releasing peptide (GRP) in the uterine gland of cow. *Anat.Embryol.(Berl)* 208: 1-6.
- Budipitojo, T., Sasaki, M., Matsuzaki, S., Cruzana, M. B., Iwanaga, T., Kitamura, N. & Yamada, J. 2003. Expression of gastrin-releasing peptide (GRP) in the bovine uterus during the estrous cycle. *Arch.Histol.Cytol.* 66: 337-346.
- Budipitojo, T., Sasaki, M., Matsuzaki, S., Cruzana, M. B., Iwanaga, T., Kitamura, N. & Yamada, J. 2004b. Localization and expression of gastrin-releasing peptide (GRP) in the bovine cervix. *J.Reprod.Dev.* 50: 119-129.

- Buhi, W. C. & Alvarez, I. M. 2003. Identification, characterization and localization of three proteins expressed by the porcine oviduct. *Theriogenology* 60: 225-238.
- Chian, R. C. & Sirard, M. A. 1995. Fertilizing ability of bovine spermatozoa cocultured with oviduct epithelial cells. *Biol.Reprod.* 52: 156-162.
- Choi, Y. H., Takagi, M., Kamishita, H., Wijayagunawardane, M. P., Acosta, T. J., Miyazawa, K. & Sato, K. 1998. Effects of follicular fluid on fertilization and embryonic development of bovine oocytes in vitro. *Theriogenology* 49: 1103-1112.
- Chuaqui, R. F., Bonner, R. F., Best, C. J., Gillespie, J. W., Flaig, M. J., Hewitt, S. M., Phillips, J. L., Krizman, D. B., Tangrea, M. A., Ahram, M., Linehan, W. M., Knezevic, V. & Emmert-Buck, M. R. 2002. Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nat.Genet.* 32 Suppl: 509-514.
- Cola, C., Almeida, M., Li, D., Romeo, F. & Mehta, J. L. 2004. Regulatory role of endothelium in the expression of genes affecting arterial calcification. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 320: 424-427.
- de Moraes, A. A., Paula-Lopes, F. F., Chegini, N. & Hansen, P. J. 1999. Localization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the bovine reproductive tract. *J.Reprod.Immunol.* 42: 135-145.
- Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D. & Siebert, P. D. 1996b. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93: 6025-6030.
- Diatchenko, L., Lukyanov, S., Lau, Y. F. & Siebert, P. D. 1999. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol.* 303: 349-380.
- Diehl, D., Lahm, H., Wolf, E. & Bauersachs, S. 2005b. Transcriptome analysis of a human colorectal cancer cell line shows molecular targets of insulin-like growth factor-binding protein-4 overexpression. *Int.J.Cancer* 113: 588-599.
- Einspanier, R., Gabler, C., Kettler, A. & Kloas, W. 1999. Characterization and localization of beta2-adrenergic receptors in the bovine oviduct: indication for progesterone-mediated expression. *Endocrinology* 140: 2679-2684.
- Ekerhovd, E., Brannstrom, M., Weijdegard, B. & Norstrom, A. 1999. Localization of nitric oxide synthase and effects of nitric oxide donors on the human Fallopian tube. *Mol.Hum.Reprod.* 5: 1040-1047.
- Ellington, J. E., Carney, E. W., Farrell, P. B., Simkin, M. E. & Foote, R. H. 1990. Bovine 1-2-cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. *Biol.Reprod.* 43: 97-104.
- Ellington, J. E., Ignatz, G. G., Ball, B. A., Meyers-Wallen, V. N. & Currie, W. B. 1993. De novo protein synthesis by bovine uterine tube (oviduct) epithelial cells changes during co-culture with bull spermatozoa. *Biol.Reprod.* 48: 851-856.

- Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. 1984. "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal.Biochem.* 137: 266-267.
- Fitzpatrick, R., Casey, O. M., Morris, D., Smith, T., Powell, R. & Sreenan, J. M. 2002. Postmortem stability of RNA isolated from bovine reproductive tissues. *Biochim Biophys Acta* 1574: 10-14.
- Fletcher, G. C., Patel, S., Tyson, K., Adam, P. J., Schenker, M., Loader, J. A., Daviet, L., Legrain, P., Parekh, R., Harris, A. L. & Terrett, J. A. 2003b. hAG-2 and hAG-3, human homologues of genes involved in differentiation, are associated with oestrogen receptor-positive breast tumours and interact with metastasis gene C4.4a and dystroglycan. *Br.J.Cancer* 88: 579-585.
- Gabler, C., Chapman, D. A. & Killian, G. J. 2003. Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the oestrous cycle. *Reproduction.* 126: 721-729.
- Gabler, C., Einspanier, A., Schams, D. & Einspanier, R. 1999. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its corresponding receptors (flt-1 and flk-1) in the bovine oviduct. *Mol.Reprod.Dev.* 53: 376-383.
- Gabler, C., Killian, G. J. & Einspanier, R. 2001. Differential expression of extracellular matrix components in the bovine oviduct during the oestrous cycle. *Reproduction.* 122: 121-130.
- Gandolfi, F., Passoni, L., Modina, S., Brevini, T. A., Varga, Z. & Lauria, A. 1993. Similarity of an oviduct-specific glycoprotein between different species. *Reprod.Fertil.Dev.* 5: 433-443.
- Gerena, R. L. & Killian, G. J. 1990. Electrophoretic characterization of proteins in oviduct fluid of cows during the estrous cycle. *J.Exp.Zool.* 256: 113-120.
- Grider, J. R. 2004. Gastrin-releasing peptide is a modulatory neurotransmitter of the descending phase of the peristaltic reflex. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 287: G1109-G1115.
- Grippo, A. A., Henault, M. A., Anderson, S. H. & Killian, G. J. 1992. Cation concentrations in fluid from the oviduct ampulla and isthmus of cows during the estrous cycle. *J.Dairy Sci.* 75: 58-65.
- Gualtieri, R. & Talevi, R. 2000. In vitro-cultured bovine oviductal cells bind acrosome-intact sperm and retain this ability upon sperm release. *Biol.Reprod.* 62: 1754-1762.
- Gurskaya, N. G., Diatchenko, L., Chenchik, A., Siebert, P. D., Khaspekov, G. L., Lukyanov, K. A., Vagner, L. L., Ermolaeva, O. D., Lukyanov, S. A. & Sverdlov, E. D. 1996. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal.Biochem.* 240: 90-97.
- Gwathmey, T. M., Ignatz, G. G. & Suarez, S. S. 2003b. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. *Biol.Reprod.* 69: 809-815.
- Hees, H. & Sinowatz, F. 1992. Histologie. Köln: Deutscher Ärzteverlag.

- Hill, J. L., Wade, M. G., Nancarrow, C. D., Kelleher, D. L. & Boland, M. P. 1997. Influence of ovine oviducal amino acid concentrations and an ovine oestrus-associated glycoprotein on development and viability of bovine embryos. *Mol.Reprod.Dev.* 47: 164-169.
- Hugentobler, S., Morris, D. G., Kane, M. T. & Sreenan, J. M. 2004. In situ oviduct and uterine pH in cattle. *Theriogenology* 61: 1419-1427.
- Hunter, R. H., Flechon, B. & Flechon, J. E. 1991. Distribution, morphology and epithelial interactions of bovine spermatozoa in the oviduct before and after ovulation: a scanning electron microscope study. *Tissue Cell* 23: 641-656.
- Hunter, R. H. & Wilmut, I. 1984. Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod.Nutr.Dev.* 24: 597-608.
- Ignotz, G. G., Lo, M. C., Perez, C. L., Gwathmey, T. M. & Suarez, S. S. 2001. Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviducal sperm reservoir. *Biol.Reprod.* 64: 1806-1811.
- Jiang, Y., Harlocker, S. L., Molesh, D. A., Dillon, D. C., Stolk, J. A., Houghton, R. L., Repasky, E. A., Badaro, R., Reed, S. G. & Xu, J. 2002. Discovery of differentially expressed genes in human breast cancer using subtracted cDNA libraries and cDNA microarrays. *Oncogene* 21: 2270-2282.
- King, R. S., Anderson, S. H. & Killian, G. J. 1994. Effect of bovine oviducal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes. *J.Androl* 15: 468-478.
- King, R. S. & Killian, G. J. 1994. Purification of bovine estrus-associated protein and localization of binding on sperm. *Biol.Reprod.* 51: 34-42.
- Kouba, A. J., Abeydeera, L. R., Alvarez, I. M., Day, B. N. & Buhi, W. C. 2000. Effects of the porcine oviduct-specific glycoprotein on fertilization, polyspermy, and embryonic development in vitro. *Biol.Reprod.* 63: 242-250.
- Lapointe, J. & Bilodeau, J. F. 2003. Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. *Biol.Reprod.* 68: 1157-1164.
- Lapointe, S., Sullivan, R. & Sirard, M. A. 1998. Binding of a bovine oviducal fluid catalase to mammalian spermatozoa. *Biol.Reprod.* 58: 747-753.
- Lee, A. H., Iwakoshi, N. N. & Glimcher, L. H. 2003. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol.Cell Biol.* 23: 7448-7459.
- Lee, K. F., Kwok, K. L. & Yeung, W. S. 2000. Suppression subtractive hybridization identifies genes expressed in oviduct during mouse preimplantation period. *Biochem.Biophys Res.Commun.* 277: 680-685.
- Lee, K. F., Yao, Y. Q., Kwok, K. L., Xu, J. S. & Yeung, W. S. 2002. Early developing embryos affect the gene expression patterns in the mouse oviduct. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 292: 564-570.

- Lee, Y. L., Lee, K. F., Xu, J. S., He, Q. Y., Chiu, J. F., Lee, W. M., Luk, J. M. & Yeung, W. S. 2004. The embryotrophic activity of oviductal cell-derived complement C3b and iC3b, a novel function of complement protein in reproduction. *J.Biol.Chem.* 279: 12763-12768.
- Leese, H. J., Tay, J. I., Reischl, J. & Downing, S. J. 2001. Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction.* 121: 339-346.
- Li, S. H., Huang, H. L. & Chen, Y. H. 2002. Ovarian steroid-regulated synthesis and secretion of complement C3 and factor B in mouse endometrium during the natural estrous cycle and pregnancy period. *Biol.Reprod.* 66: 322-332.
- McCauley, T. C., Buhi, W. C., Wu, G. M., Mao, J., Caamano, J. N., Didion, B. A. & Day, B. N. 2003. Oviduct-Specific Glycoprotein Modulates Sperm-Zona Binding and Improves Efficiency of Porcine Fertilization In Vitro. *Biol.Reprod.*
- Meunier, L., Usherwood, Y. K., Chung, K. T. & Hendershot, L. M. 2002. A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol.Biol.Cell* 13: 4456-4469.
- Mizrachi, D. & Segaloff, D. L. 2004. Intracellularly located misfolded glycoprotein hormone receptors associate with different chaperone proteins than their cognate wild-type receptors. *Mol.Endocrinol.* 18: 1768-1777.
- Moosmang, S., Stieber, J., Zong, X., Biel, M., Hofmann, F. & Ludwig, A. 2001. Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur.J.Biochem.* 268: 1646-1652.
- Nakanishi, K., Kamiguchi, K., Torigoe, T., Nabeta, C., Hirohashi, Y., Asanuma, H., Tobioka, H., Koge, N., Harada, O., Tamura, Y., Nagano, H., Yano, S., Chiba, S., Matsumoto, H. & Sato, N. 2004. Localization and function in endoplasmic reticulum stress tolerance of ERdj3, a new member of Hsp40 family protein. *Cell Stress.Chaperones.* 9: 253-264.
- Nicchitta, C. V., Carrick, D. M. & Baker-Lepain, J. C. 2004. The messenger and the message: gp96 (GRP94)-peptide interactions in cellular immunity. *Cell Stress.Chaperones.* 9: 325-331.
- Nickel, R., Schummer, A. & Seiferle, E. 1995. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, BandII. Berlin: Blackwell Wissenschafts-Verlag.
- Papaconstantinou, A. D., Fisher, B. R., Umbreit, T. H., Goering, P. L., Lappas, N. T. & Brown, K. M. 2001. Effects of beta-estradiol and bisphenol A on heat shock protein levels and localization in the mouse uterus are antagonized by the antiestrogen ICI 182,780. *Toxicol.Sci.* 63: 173-180.
- Papaconstantinou, A. D., Goering, P. L., Umbreit, T. H. & Brown, K. M. 2003. Regulation of uterine hsp90alpha, hsp72 and HSF-1 transcription in B6C3F1 mice by beta-estradiol and bisphenol A: involvement of the estrogen receptor and protein kinase C. *Toxicol.Lett.* 144: 257-270.
- Papaconstantinou, A. D., Umbreit, T. H., Goering, P. L. & Brown, K. M. 2002. Effects of 17 alpha-methyltestosterone on uterine morphology and heat shock protein expression are mediated through estrogen and androgen receptors. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 82: 305-314.

- Pinto, J. P., Conceicao, N., Gavaia, P. J. & Cancela, M. L. 2003. Matrix Gla protein gene expression and protein accumulation colocalize with cartilage distribution during development of the teleost fish *Sparus aurata*. *Bone* 32: 201-210.
- Pushpakumara, P. G., Robinson, R. S., Demmers, K. J., Mann, G. E., Sinclair, K. D., Webb, R. & Wathes, D. C. 2002. Expression of the insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine oviduct at oestrus and during early pregnancy. *Reproduction*. 123: 859-868.
- Qin, Q., Patil, K. & Sharma, S. C. 2004. The role of Bax-inhibiting peptide in retinal ganglion cell apoptosis after optic nerve transection. *Neurosci.Lett.* 372: 17-21.
- Rajeevan, M. S., Vernon, S. D., Taysavang, N. & Unger, E. R. 2001. Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. *J.Mol.Diagn.* 3: 26-31.
- Reed, R. C., Berwin, B., Baker, J. P. & Nicchitta, C. V. 2003. GRP94/gp96 elicits ERK activation in murine macrophages. A role for endotoxin contamination in NF-kappa B activation and nitric oxide production. *J.Biol.Chem.* 278: 31853-31860.
- Reischl, J., Prella, K., Schol, H., Neumuller, C., Einspanier, R., Sinowatz, F. & Wolf, E. 1999. Factors affecting proliferation and dedifferentiation of primary bovine oviduct epithelial cells in vitro. *Cell Tissue Res.* 296: 371-383.
- Rosselli, M., Dubey, R. K., Rosselli, M. A., Macas, E., Fink, D., Lauper, U., Keller, P. J. & Imthurn, B. 1996. Identification of nitric oxide synthase in human and bovine oviduct. *Mol.Hum.Reprod.* 2: 607-612.
- Rosselli, M., Imthurn, B., Macas, E. & Keller, P. J. 1994. Endothelin production by bovine oviduct epithelial cells. *J.Reprod.Fertil.* 101: 27-30.
- Ruckebusch, Y. & Bayard, F. 1975. Motility of the oviduct and uterus of the cow during the oestrous cycle. *J.Reprod.Fertil.* 43: 23-32.
- Rüsse, I. & Sinowatz, F. 1991. Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. Berlin; Hamburg: Verlag Paul Parey.
- Rzewuska-Lech, E., Jayachandran, M., Fitzpatrick, L. A. & Miller, V. M. 2005. Differential Effects of 17{beta}-Estradiol and Raloxifene on Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype and Expression of Osteoblast-Associated Proteins. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab.*
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brown, P. O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470.
- Schmidt, A., Einspanier, R., Amselgruber, W., Sinowatz, F. & Schams, D. 1994. Expression of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in the bovine oviduct during the oestrous cycle. *Exp.Clin.Endocrinol.* 102: 364-369.
- Schramm, W., Einer-Jensen, N., Schramm, G. & McCracken, J. A. 1986. Local exchange of oxytocin from the ovarian vein to ovarian arteries in sheep. *Biol.Reprod.* 34: 671-680.
- Schummer, A. & Vollmerhaus, B. 1995. Harn- und Geschlechtsapparat. In Nickel, R., Schummer, A. & Seiferle, E. (Eds) Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, BandII Berlin: Blackwell Wissenschafts-Verlag.

- Shafik, A. 1996. Study of the intramural oviduct response to tubal and uterine distension: identification of tubo-uterine sphincter and reflex. *Hum.Reprod.* 11: 2527-2530.
- Shafik, A., El Sebai, O., Shafik, A. A. & Shafik, I. 2005. Oviduct contractile response to vaginal distension: identification of vagino-tubal reflex. *Arch.Gynecol.Obstet.* 271: 148-151.
- Shen, Y. & Hendershot, L. M. 2005. ERdj3, a stress-inducible endoplasmic reticulum DnaJ homologue, serves as a cofactor for BiP's interactions with unfolded substrates. *Mol.Biol.Cell* 16: 40-50.
- Shulkes, A., Whitley, J., Hardy, K. & Giraud, A. 1996b. Foetal metabolism, placental transfer and origin of gastrin releasing peptide in the sheep. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 23: 861-865.
- Shulkes, A., Whitley, J., Hardy, K. & Giraud, A. 1996a. Foetal metabolism, placental transfer and origin of gastrin releasing peptide in the sheep. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 23: 861-865.
- Simmons, D. G. & Kennedy, T. G. 2000. Induction of glucose-regulated protein 78 in rat uterine glandular epithelium during uterine sensitization for the decidual cell reaction. *Biol.Reprod.* 62: 1168-1176.
- Sirard, M. A., Lambert, R. D., Menard, D. P. & Bedoya, M. 1985a. Pregnancies after in-vitro fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in rabbit oviduct and their transfer to the cow uterus. *J.Reprod.Fertil.* 75: 551-556.
- Spilman, C. H. & Harper, M. J. 1975. Effects of prostaglandins on oviductal motility and egg transport. *Gynecol.Invest* 6: 186-205.
- Steffl, M., Schweiger, M. & Amselgruber, W. M. 2003. Colocalization of chromogranin A and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in ciliated cells of the bovine oviduct. *Ann.Anat.* 185: 103-108.
- Stieber, J., Herrmann, S., Feil, S., Loster, J., Feil, R., Biel, M., Hofmann, F. & Ludwig, A. 2003. The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100: 15235-15240.
- Sun, T., Lei, Z. M. & Rao, C. V. 1997. A novel regulation of the oviductal glycoprotein gene expression by luteinizing hormone in bovine tubal epithelial cells. *Mol.Cell Endocrinol.* 131: 97-108.
- Suuroia, T., Aunapuu, M., Arend, A. & Sepp, E. 2002. ["Light" epithelial cells of swine and bovine oviducts]. *Tsitologia* 44: 656-660.
- Thompson, D. A. & Weigel, R. J. 1998c. hAG-2, the human homologue of the *Xenopus laevis* cement gland gene XAG-2, is coexpressed with estrogen receptor in breast cancer cell lines. *Biochem.Biophys Res.Commun.* 251: 111-116.
- Topfer-Petersen, E., Wagner, A., Friedrich, J., Petrunkina, A., Ekhlasi-Hundrieser, M., Waberski, D. & Drommer, W. 2002b. Function of the mammalian oviductal sperm reservoir. *J.Exp.Zool.* 292: 210-215.

- Tsan, M. F. & Gao, B. 2004. Cytokine function of heat shock proteins. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 286: C739-C744.
- Ulbrich, S. E., Kettler, A. & Einspanier, R. 2003. Expression and localization of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and progesterone receptor in the bovine oviduct in vivo and in vitro. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 84: 279-289.
- Verhage, H. G., Mavrogianis, P. A., Boomsma, R. A., Schmidt, A., Brenner, R. M., Slayden, O. V. & Jaffe, R. C. 1997. Immunologic and molecular characterization of an estrogen-dependent glycoprotein in the rhesus (*Macaca mulatta*) oviduct. *Biol.Reprod.* 57: 525-531.
- Waibl, H., Wilkens, H. & Münster, W. 1996. Arterien, Arteriae und Venen, Venae. In Nickel, R., Schummer, A. & Seiferle, E. (Eds) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band III* Berlin: Parey Buchverlag.
- Wegner, C. C. & Killian, G. J. 1991. In vitro and in vivo association of an oviduct estrus-associated protein with bovine zona pellucida. *Mol.Reprod.Dev.* 29: 77-84.
- Wegner, C. C. & Killian, G. J. 1992. Origin of oestrus-associated glycoproteins in bovine oviductal fluid. *J.Reprod.Fertil.* 95: 841-854.
- Whitley, J. C., Giraud, A. S. & Shulkes, A. 1996. Expression of gastrin-releasing peptide (GRP) and GRP receptors in the pregnant human uterus at term. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 81: 3944-3950.
- Whitley, J. C., Shulkes, A., Salamonsen, L. A., Vogliagis, D., Familari, M. & Giraud, A. S. 1998. Temporal expression and cellular localization of a gastrin-releasing peptide-related gene in ovine uterus during the oestrous cycle and pregnancy. *J.Endocrinol.* 157: 139-148.
- Wijayagunawardane, M. P. & Miyamoto, A. 2004. Tumor necrosis factor alpha system in the bovine oviduct: a possible mechanism for embryo transport. *J.Reprod.Dev.* 50: 57-62.
- Wijayagunawardane, M. P., Miyamoto, A., Taquahashi, Y., Acosta, T. J., Nishimura, M. & Sato, K. 2001a. Angiotensin II and atrial natriuretic peptide in the cow oviductal contraction in vitro: direct effect and local secretion of prostaglandins, endothelin-1, and angiotensin II. *Biol.Reprod.* 65: 799-804.
- Wolf, E., Arnold, G. J., Bauersachs, S., Beier, H. M., Blum, H., Einspanier, R., Frohlich, T., Herrler, A., Hiendleder, S., Kolle, S., Prella, K., Reichenbach, H. D., Stojkovic, M., Wenigerkind, H. & Sinowatz, F. 2003. Embryo-maternal communication in bovine - strategies for deciphering a complex cross-talk. *Reprod.Domest.Anim* 38: 276-289.
- Yang, G. P., Ross, D. T., Kuang, W. W., Brown, P. O. & Weigel, R. J. 1999. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res.* 27: 1517-1523.
- Yaniz, J. L., Lopez-Gatius, F., Santolaria, P. & Mullins, K. J. 2000c. Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. *Anat.Rec.* 260: 268-278.
- Zhao, J. & Warburton, D. 1997. Matrix Gla protein gene expression is induced by transforming growth factor-beta in embryonic lung culture. *Am.J.Physiol* 273: L282-L287.

13 Danksagung

Am Ende meiner Arbeit möchte ich mich herzlich bei den Menschen und Institutionen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht gelungen wäre:

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und der Akademie für Tiergesundheit e.V. für die großzügige finanzielle Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. med. vet. E. Wolf für die Vermittlung der Dissertation und die stets freundliche und hilfreiche Unterstützung.

Herrn Dr. rer. nat. Stefan Bauersachs für die Überlassung des Themas und die exzellente Betreuung, die immer hilfreichen Erklärungen und das stets offene Ohr für Fragen. Vielen Dank, ich habe viel gelernt. Herrn Dr. Helmut Blum für die freundliche Aufnahme in seinem Labor und die vielen hilfreichen Tipps. Vielen Dank für die vielen überaus anregenden Diskussionsabende und immer gedulden und aufschlussreichen Erklärungen.

Vielen Dank auch Herrn Dr. Georg Arnold für die unermüdliche und unglaublich engagierte Vermittlung von Wissen aus allen Bereichen der Wissenschaft. Herrn Dr. Thomas Fröhlich vielen Dank für die freundliche Überlassung der Proteinanalyse-Daten.

Frau Susanne Schmidt, die mich freundschaftlich durch meine Doktorarbeit begleitet hat, mit der ich alle Sorgen und viele gemeinsame Labor- und Stallnächte teilen konnte. Sie hat durch ihre Anwesenheit und Anteilnahme die Zeit der Doktorarbeit zu einem echten Vergnügen gemacht und ohne sie wäre diese Arbeit nie möglich gewesen, da sie mich bei allen Probenentnahmen selbstlos unterstützt hat.

Ich danke Frau Sylvia Mallok für die Einführung in Laborarbeitstechniken, die stete Hilfsbereitschaft, die überaus freundschaftliche Zusammenarbeit und die engelhaftige Geduld bei allen Fragen.

Frau Dr. Anja Schütte und Frau Dominique Possmann Dias für Ihre Freundschaft über viele Jahre, dafür, dass Ihr immer ein offenes Ohr für mich hattet und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standet.

Herrn Peter Rieblinger für das exzellente Handling und die hervorragende Pflege der Tiere. Und für die immer selbstlose Hilfe in den Versuchen.

Ich danke Frau Regine Rottmayer für die Anteilnahme an allen Problemen und für die Unterstützung die mir durch sie immer zuteil wurde. Durch ihre Engels-Geduld und Kameradschaft hat sie jede lange Arbeitsnacht zu einem wunderschönen Erlebnis gemacht.

Frau Angelika Kammerer, Herrn Dr. Hendrik Wenigerkind, Herrn Christian Erdle, Frau Mirjam Weppert und Herrn Dr. Horst-Dieter Reichenbach für die freundschaftliche Hilfe bei den Tieren.

Ich danke der Metzgerei Christian Mair in Stetten und dem Team des Versuchsschlachthauses der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Abteilung Versuchsstationen (AVS), in Grub. Hier vor allem dem Leiter des Versuchsschlachthauses, Herrn Josef Möstl. Ich danke Herrn Maximilian Pickl (LfL - Institut für Tierzucht), der bei der Organisation der außerordentlichen Schlachtungen im Rahmen der Versuchsdurchführung vor Ort geholfen hat. Ohne die optimale Zusammenarbeit und großzügige Kooperation dieser Menschen wäre das ganze Projekt nie möglich gewesen.

Frau Susanne Ulbrich für die Ausführung der RT-PCR und für die nette Aufnahme in den Kreis ihrer Freunde.

Herrn Prof. Dr. Dr. F. Sinowatz und Frau Margarete Vermehren aus dem Institut für Anatomie und Histologie der Haussäugetiere, für die exzellente Ausführung und die schnelle Auswertung der *in situ*-Hybridisierungen, die immer freundliche Unterstützung und vor allem für die Überlassung der histologischen Bilder.

Allen Kolleginnen und Kollegen aus dem Institut für molekulare Tierzucht, viele von ihnen mittlerweile gute Freunde. Sie haben mich in der Zeit meiner Dissertation immer mit Rat und Tat begleitet, bei Problemen unterstützt, und stets ein offenes Ohr gehabt.

Ich bedanke mich sehr bei meinen Eltern, für ihre finanzielle Unterstützung über all die vielen Jahre, für ihre Liebe und Geduld und dass sie immer an mich geglaubt haben. Danke, dass Ihr mir geholfen habt, das zu sein, was ich heute bin.

Meinem Bruder und seiner Familie, der mir immer ein großes Vorbild sein wird und immer einer der wichtigsten Menschen in meinem Leben bleibt. Auch danke ich meinen beiden Nichten, Luca und Nele. Sie haben mir immer gezeigt, dass es Wichtigeres auf der Welt gibt, als den Stress in der Arbeit.

Meinen Schwiegereltern, für das stete Vertrauen auf meine Fähigkeiten und darauf, dass ich schon meinen Weg machen werde.

Abschließend danke ich dem wichtigsten Menschen in meinem Leben, meinem Partner Steffen Schwarz. Ich danke Dir für die Treue in all den Jahren, für Dein Durchhaltevermögen durch die anstrengenden Jahre des Studiums und der Dissertation, und ich danke Dir für Deine bedingungslose Liebe. Dir möchte ich diese Arbeit widmen.

Lebenslauf

Name: Susanne Cornelia Nicole Rehfeld,

persönliche Daten:

Geburtsdatum: 18.01.1977

Geburtsort: Nürnberg

Familienstand: Ledig

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Eltern: Helene Rehfeld, geborene Wansch, Hausfrau
Herbert Rehfeld, dipl. Ing.

Geschwister: Peter Rehfeld, Arzt

Schule:

1983 bis 1987 Grundschule in Stein

1987 bis 1996 Gymnasium in Stein,

Juli 1996 Allgemeine Hochschulreife

Studium:

WS 1996 bis SS 2002 Tiermedizin-Studium an der LMU München

Abschluss: Staatsexamen

13.09.2002 Approbation

Promotion:

Seit 01.10.2002 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für molekulare Tierzucht der
LMU München

Seit 01.05.2003 Graduiertenstipendium des Bayerischen Staates

Mitte 2004 Sachmittelstipendium der Akademie für Tiergesundheit e.V.

Tiermedizinische Praktika:

Landwirtschaftliches Praktikum im LVG Oberschleißheim,

Praktikum in der Tierärztlichen Praxis Dr. Lederer, Stein,

Praktikum in der Reptilienklinik der LMU, München

Praktikum am Schlachthof Ansbach,

Seminar in der BFAV in Tübingen