

Aus dem Institut für Tieranatomie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Lehrstuhl für Tieranatomie II  
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz

**Zyklusabhängige Veränderungen am Eileiter des Rindes und  
Charakterisierung boviner Eileiterepithelzellen in Suspensionskultur**

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

von  
Sonja Lücke  
aus  
Johannesburg / Südafrika

München 2005

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle  
Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. F. Sinowatz  
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. A. Scholz

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

*Meinen Eltern und Sabine*

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Literaturübersicht .....	2
2.1	Der Eileiter ex vivo .....	2
2.1.1	Entwicklung und Physiologie des Eileiters .....	2
2.1.2	Makroskopische Anatomie des Eileiters .....	5
2.1.3	Mikroskopische Anatomie des Eileiters .....	6
2.1.4	Innervation und hormonelle Kontrolle des Eileiters .....	11
2.1.5	Ultrastruktureller Aufbau des Eileiterepithels .....	16
2.1.6	Basalzellen sind Immunzellen im Eileiter .....	19
2.1.7	Apoptose und Mitose im Eileiterepithel .....	21
2.1.8	Zyklische Veränderungen im Epithel des Eileiters .....	22
2.2	Eileiterepithelzellkultur .....	27
2.2.1	Isolierung von Eileiterepithelzellen, Anzucht und Kulturmodelle .....	27
2.2.2	Charakterisierung der kultivierten Eileiterepithelzellen .....	30
2.2.3	Ultrastrukturelle Morphologie der kultivierten Eileiterepithelzellen .....	34
2.2.4	Hormonelle Einflüsse auf kultivierte Eileiterepithelzellen .....	35
2.2.5	Zelllinien von Eileiterepithelzellen .....	36
3	Material und Methoden .....	38
3.1	Untersuchungsmaterial .....	38
3.2	Untersuchungen am Eileiter ex vivo .....	39
3.2.1	Entnahme und Präparation der Proben .....	39
3.2.2	Fixierung und Probenaufbereitung für die Lichtmikroskopie .....	40
3.2.3	Histologische Färbungen .....	40
3.2.4	Immunhistochemische Untersuchungen .....	41
3.2.5	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen .....	46
3.2.6	Gewinnung und Auswertung morphometrischer Daten .....	46
3.3	Untersuchungen an kultivierten, bovinen Eileiterepithelzellen (BOEC) .....	47
3.3.1	Entnahme, Präparation und Transport des Probenmaterials .....	47
3.3.2	Isolierung, Reinigung und Aussaat der bovinen Eileiterepithelzellen .....	48
3.3.3	Anzüchtung der bovinen Eileiterepithelzellen und Kulturbedingungen .....	49
3.3.4	Lichtmikroskopische Beurteilung der lebenden Epithelzellen .....	49
3.3.5	Subkultivierung und Kryokonservierung der BOEC .....	50

---

3.3.6	Probengewinnung.....	50
3.3.7	Identifizierung der bovinen Eileiterepithelzellen.....	52
3.3.8	HE-Färbung der Sphäroiden.....	53
3.3.9	Immunhistochemische Untersuchungen an Kulturzellen.....	53
3.3.10	Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Sphäroiden.....	56
3.3.11	Real-time RT-PCR mit Sphäroiden.....	57
4	Ergebnisse .....	62
4.1	Der boviner Eileiter ex vivo .....	62
4.1.1	Histomorphologie.....	62
4.1.2	Immunhistochemische Untersuchungen .....	74
4.1.3	Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	93
4.2	Ergebnisse zur Zellkultur der bovinen Eileiterepithelzellen .....	102
4.2.1	Morphologie und Wachstum der Eileiterepithelzellen in vitro.....	102
4.2.2	Identifizierung der Epithelzellen.....	107
4.2.3	Histologische Färbungen.....	111
4.2.4	Immunhistochemische Nachweise .....	116
4.2.5	Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Sphäroiden.....	123
4.2.6	Relative Quantifizierung der ER $\alpha$ und PR Expression (real-time RT-PCR). 131	
5	Diskussion .....	135
5.1	Der bovine Eileiter im Zyklusverlauf.....	135
5.2	Bovine Eileiterepithelzellen in Suspensionskultur.....	146
6	Zusammenfassung.....	154
7	Summary .....	156
8	Verzeichnisse .....	158
8.1	Literaturverzeichnis.....	158
8.2	Tabellenverzeichnis.....	172
8.3	Verzeichnis über die Abbildungen und Graphiken .....	173
8.4	Abkürzungsverzeichnis .....	178
9	Anhang .....	181
9.1	Lösungen .....	181
9.2	Ergebnistabellen .....	186
	Danksagung.....	193

# 1 Einleitung

Schon länger ist bekannt, dass die Befruchtung der Eizelle beim Rind, wie bei vielen anderen Spezies in der Ampulla des Eileiters stattfindet.

Später wurde festgestellt, dass die Spermien im Eileiter gespeichert werden können und dort ihre Kapazitation stattfindet. Damit erhalten die Spermien erst die Fähigkeit zum Durchdringen der Zona pellucida der Eizelle. Mittels In-vitro-Fertilisation ist es heute möglich, den Eileiter bei der Befruchtung zu umgehen. Die Tatsache, dass der Eileiter eine weitere, bedeutende Rolle im Reproduktionsgeschehen der Säugetiere spielt, wurde lange Zeit nicht erkannt. Nach neueren Ergebnissen erfolgt auch bei der Passage der Eizelle bzw. des Embryos durch den Eileiter eine Interaktion mit dem Epithel. Diese findet hauptsächlich in der Form statt, dass Proteine vom Epithel ins Lumen sezerniert werden. In vitro produzierte Embryonen unterliegen dagegen häufig einem Entwicklungsblock im 8- bis 16-Zellstadium. Die Kommunikation des Embryos mit dem Epithel scheint demnach für die weitere frühe Entwicklung des Embryos von entscheidendem Vorteil zu sein. In vitro produzierten Embryonen wird die Möglichkeit der Kommunikation mit dem Eileiterepithel vorenthalten. Der beschriebene Entwicklungsblock wurde zum Beispiel bereits durch den Zusatz von oviduktaler Flüssigkeit oder durch Kokulturen mit Eileiterepithelzellen teilweise überwunden.

Da Eileiterepithelzellen in adhärennten Kulturen einer schnellen Dedifferenzierung unterliegen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Suspensionskultur der bovinen Eileiterepithelzellen (BOEC) untersucht. Aufgrund der starken Zilienmotilität der Epithelzellen ist es möglich, die Zellaggregate des Eileiterepithels (Sphäroiden) über einen längeren Zeitraum in einem differenzierten Zustand in Suspension zu bewahren. Da es sich hierbei um frisch isolierte Zellen handelt, ist davon auszugehen, dass die Eigenschaften der Eileiterepithelzellen weitestgehend erhalten geblieben sind. Dieses Kultursystem weist weitere Vorteile auf, da es kostengünstig und unkompliziert zu handhaben ist. Des Weiteren erfüllen die Zellen der Suspensionskultur die Voraussetzungen für die Etablierung einer permanenten Zelllinie.

Diese Arbeit dient als Basis für folgende Studien zur embryo-maternalen Kommunikation.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Der Eileiter ex vivo

#### 2.1.1 Entwicklung und Physiologie des Eileiters

##### Entwicklung:

Die keimleitenden Organe entwickeln sich bilateral symmetrisch aus einem beiderseits angelegten epithelialen Schlauch, dem Müller Gang. Dieser wird lateral des Wolff Ganges an der Urniere angelegt. Er beginnt in Eierstocksnähe mit einer trichterförmigen Erweiterung und zieht nach kaudal. Dabei überkreuzt er am kaudalen Urnierenpol den Wolf Gang. In der Medianen vereinigen sich dann die Müller Gänge beider Seiten, um später gemeinsam Uterus und Vagina zu bilden (Rüsse und Sinowatz, 2002). Bei den einzelnen Säugetierspezies verschmelzen die bilateralen Müller Gänge in unterschiedlichem Ausmaß. Beim Wiederkäuer, Schwein und Fleischfresser vereinigen sich die distalen Anteile des Müller Ganges zu einem unpaaren Gebärmutterkörper, der paarige Gebärmutterhörner aufweist zu denen paarige Eileiter hinführen (Koch und Berg, 1985). Da beim Wiederkäuer etwa auf halber Länge des Corpus uteri ein Septum bestehen bleibt, ist die Verschmelzung auch im Bereich des Uteruskörpers nicht vollständig. Der Uterus wird deshalb als Uterus bicornis subseptus bezeichnet (Rüsse und Sinowatz, 2002).

##### Physiologie:

Der Sexualzyklus des Rindes hat durchschnittlich eine Länge von 21 (17-24) Tagen (Rüsse und Sinowatz, 2002). Der Östrus bzw. der Tag der Brunst ist der Tag 0. Die Brunst hat eine relativ kurze Dauer von durchschnittlich 18 Stunden. Demnach findet die Ovulation am Tag 1 im Metöstrus statt, ca. 10-12 Stunden nach Beendigung der Brunst. Ca. 4 Tage nach der Ovulation beginnt die Progesteronkonzentration im Blut auf messbare Werte anzusteigen. Damit wird der Diöstrus eingeleitet (Rüsse und Sinowatz, 2002).

Der Eileiter ist der Ort der Befruchtung. Normalerweise findet diese am Übergang von der Ampulla zum Isthmus statt (Junctio isthmoampullaris). Beim Rind befinden sich 6-8 Stunden nach dem Deckakt die ersten befruchtungsfähigen Spermien im Ovidukt. Für weitere 17-18 Stunden halten sie sich im kaudalen Bereich des Isthmus auf, weshalb dieser Teil auch als funktionelles Spermienreservoir gilt. Die Passage der Spermien durch den Isthmus wird da-

durch verzögert, dass das Lumen in der präovulatorischen Phase sehr eng und ein zähflüssiger Schleim enthalten ist (Suarez et al., 1997). Beim Schwein wurde bereits nachgewiesen, dass die Temperatur im distalen Teil des Isthmus im Vergleich zur Ampulla vermindert ist. Dies hat eine verlangsamte Bewegung der Spermien zur Folge (Hunter und Nichol, 1986). Zudem könnte die Spermienmotilität durch eine lokal erhöhte Kaliumionenkonzentration in der Eileiterflüssigkeit vermindert sein (Leese und Gray, 1988).

Während der Aufenthaltszeit im Isthmus unterliegen die Spermien der Kapazitation. Die Kapazitation, die Hyperaktivierung der Spermien und die Akrosomenreaktion sind Voraussetzung für ihre Befruchtungsfähigkeit. Bei der Akrosomenreaktion verschmilzt die äußere Akrosomenmembran mit der Plasmamembran. Dadurch werden proteolytische Enzyme aus dem Akrosom freigesetzt, die den Spermien den Durchtritt durch die Zona pellucida der Eizelle ermöglichen (Hunter, 1988). Die Spermien, die bis zur Ovulation im Isthmus verbleiben, sind diejenigen, welche die höchste Befruchtungsfähigkeit aufweisen. Spermien des Rindes können im weiblichen Genitale bis zu 72 Stunden lebensfähig bleiben (Barth, 1989). Der Isthmus bietet den weiteren Vorteil, dass die Spermien dort sehr gut vor den Immunzellen geschützt sind, die direkt nach der Paarung die Uterusschleimhaut infiltrieren (Hunter, 1989).

Im Zusammenhang mit der Kapazitation wurden verschiedene interessante Beobachtungen gemacht. Auf der einen Seite wurden Interaktionen zwischen den Zilien der Eileiterepithelzellen und den Flagellen der Bullenspermien beschrieben (Hunter et al., 1991). Im Gegensatz dazu beschreiben andere Autoren, dass die Spermien mit der akrosomalen Region an die ziliotragenden Zellen binden, und dadurch ihre Fähigkeit zur Bewegung und zur Befruchtung erhalten (Pollard et al., 1991; Smith, 1998). Kurz vor der Ovulation werden die Spermien hyperaktiviert und gelangen an den Ort der Befruchtung (Hunter und Wilmut, 1984). Dies ist möglich, da durch die Veränderung an der Spermienmembran die Verbindung zu den Epithelzellen gelockert wird (Suarez, 1998). Die gesteigerte Motilität der Spermien führt zu einer Ablösung vom Eileiterepithel (Pollard et al., 1991) und Weiterwanderung der Spermien in Richtung des Übergangs von der Ampulla zum Isthmus (Smith, 1998).

Die Ovulation findet beim Rind ca. 10-12 Stunden nach Ende der Brunst statt. Dabei legt sich der stark entfaltete Trichter des Eileiters um das Ovar, um die Eizelle aufzufangen. Eine funktionelle Rolle spielt in diesem Zusammenhang ein in den Fimbrien integriertes Mikrogefäßnetz, das auf Ovar- und Plazentahormone empfindlich reagiert. Zuerst sensibilisiert Progesteron das Gefäßbett für Östradiol, welches wiederum eine Vasodilatation im Gefäßbett verursacht. Es entsteht die so genannte Fimbrien-Venen-Dehnung, die wahrscheinlich bei der Auf-

nahme der Eizelle ins Ostium des Trichters hilfreich ist (Koch und Berg, 1985). Andere Autoren beschreiben eine Kontraktion des Aufhängeapparates des Eileiters und der Fimbrien, die dazu führen, dass das Infundibulum das Ovar umschließen kann (Blandau, 1969).

Der Transport der Eizelle zum Ort der Befruchtung (Übergang von der Ampulla zum Isthmus) dauert beim Rind länger als bei anderen Spezies, nämlich ca. 8-10 Stunden (Ellington, 1991; Hunter, 1988). Die Eizelle ist insgesamt nur 10-12 Stunden nach der Ovulation befruchtungsfähig (Hunter, 1988). Nach der Befruchtung verweilt der Embryo ca. 2,5 - 3 Tage am Übergang von der Ampulla zum Isthmus (El-Banna und Hafez, 1970b). Frühe Rinderembryonen können sich nur im Eileiter und noch nicht im Uterus entwickeln (Newcomb und Rowson, 1975). Sie werden über die Eileiterflüssigkeit ernährt. Dabei ist es interessant, dass die Glukosekonzentration gegenüber der Serumglukosekonzentration stark vermindert ist. Glukose behindert die Kapazitation der Spermien (Parrish et al., 1989) und hat zudem noch einen negativen Effekt auf die Entwicklung der frühen Embryonen. Dies konnte in In-vitro-Studien nachgewiesen werden (Ellington et al., 1989).

Die Menge der Eileiterflüssigkeit variiert während des Sexualzyklus. Während sie in der lutealen Phase nur ca. 0,2 ml/d beträgt, so steigt ihre Menge im Östrus auf das zehnfache (ca. 2 ml/d) (Roberts et al., 1975). Die Oviduktflüssigkeit besteht aus einem Transsudat des Blutes (Hunter, 1988), dem die sekretorisch aktiven Eileiterepithelzellen bestimmte Proteine zusetzen (Malayer et al., 1988). Auch die absolute Menge der sezernierten Proteine nimmt im Östrus zu (Gerena und Killian, 1990). Bei diesen vom Epithel sezernierten Proteinen ist zwischen eileiterspezifischen und -unspezifischen Proteinen zu unterscheiden. Einige von ihnen werden vermehrt um die Ovulationszeit sezerniert. Dabei scheint das östrus-assoziierte Glykoprotein 85-97 eine wichtige Rolle zu spielen. Es konnte sowohl in der Zona pellucida, im perivitellinen Raum als auch an der Blastomerenmembran von Rinderembryonen nachgewiesen werden (Boice et al., 1992; Gandolfi et al., 1991).

Um die Zeit der Ovulation herum ist die Frequenz und Amplitude der Kontraktionen im Isthmus besonders auf der ipsilateralen Seite erhöht. Aufgrund der Verminderung des luminalen Durchmessers wird der vorzeitige Übertritt des Embryos in den Uterus verhindert (Bennett et al., 1988; Harper, 1988). Sobald sich der Isthmus relaxiert, werden die Embryonen im 8- bis 16-Zellstadium durch starken Zilienschlag in den Uterus befördert (El-Banna und Hafez, 1970b; Gaddum-Rosse und Blandau, 1976; Hunter, 1988). Dies geschieht ca. 72 Stunden post ovulationem, wobei sich das Isthmuslumen zu dieser Zeit im Vergleich zum Östrus verdoppelt (El-Banna und Hafez, 1970a). Beim Rind erfolgt im Unterschied zu anderen Spezies der Zi-

lienschlag ausschließlich in Richtung Uterus. Die dadurch verursachte Strömung ist im Isthmus wesentlich stärker als in der Ampulla (Gaddum-Rosse und Blandau, 1976).

Die Bedeutung des Eileiters für die frühe Entwicklung von Rinderembryonen gilt mittlerweile als gesichert. In vitro erzeugte Embryonen unterliegen nämlich häufig einem Entwicklungsblock im 8- bis 16-Zellstadium (Gandolfi et al., 1989a). Dieser konnte beim Rind bereits durch Zugabe von Eileiterflüssigkeit zum Kulturmedium (Eyestone und First, 1989; Mermillod et al., 1992) und bei anderen Spezies durch Kokultur mit Eileiterepithelzellen (Gandolfi und Moor, 1987; Rexroad, 1989; Thibodeaux und Godke, 1992) überwunden werden.

### **2.1.2 Makroskopische Anatomie des Eileiters**

Der Eileiter, auch Tuba uterina, Ovidukt oder Salpinx genannt beginnt als paariges, keimleitendes Organ unmittelbar am Eierstock, mit dem er aber nicht in kontinuierlichem Zusammenhang steht. Kaudal mündet er am uterotubalen Übergang in den Uterus.

Als dünner geschlängelter Schlauch, hängt der Eileiter an einem eigenen Gekröse, der Mesosalpinx, welche parallel zum Eierstocksgekröse verläuft. Zwischen den Gekrösen beider Organe ist ein von kranioventral her zugänglicher Raum, die Eierstockstasche (Bursa ovarica) ausgebildet.

Der kraniale Teil des Eierstocks wird vom Eileiter mit seinem fransigen Trichter, dem Infundibulum tubae uterinae, umfasst. Die Fransen des Infundibulums (Fimbriae tubae) sind zum Teil mit dem Ovar verwachsen (Fimbriae ovaricae) und hängen sonst frei in die Peritonealhöhle hinein (Fimbriae liberae). Außen ist der Trichter mit Bauchfell überzogen, in seiner Mitte befindet sich die Bauchhöhlenöffnung des Eileiters, das Ostium abdominale tubae uterinae. Durch diese Öffnung steht das Cavum peritonei über die Geschlechtswege mit der Außenwelt in Verbindung. Nach dem Ostium folgt nach kaudal ein relativ weiter Abschnitt des Eileiters, die Ampulla tubae uterinae, wo gewöhnlich die Befruchtung stattfindet. Der Eileiter verengt sich schließlich im Isthmus tubae uterinae. Er zieht sich weiterhin schlängelnd am Eierstock im Bogen vorbei, um mit der Pars uterina tubae (auch uterotubaler Übergang, UTJ) in das Gebärmutterhorn überzugehen (Koch und Berg, 1985). Die Gesamtlänge des gestreckten adulten Eileiters beträgt beim Rind ca. 25 cm (Koch und Berg, 1985).

In der Mesosalpinx verlaufen die Arteria und Vena ovarica. Sie geben einen Ramus tubarius an den Eileiter ab, bzw. nehmen ihn auf (Wilkens und Münster, 1984). Über der einen Plexus

bildenden Ovararterie liegt das Geflecht der Ovarvene, wodurch folliculäre Hormone direkt in das arterielle Blut, das den Eileiter versorgt, übergehen können. Die Konzentration dieser Hormone ist dadurch lokal im Eileiterblut fünf bis zehnfach höher als im systemischen Blut. Dieser Stofftransport wird als „counter-current-transfer“ bezeichnet (Hunter und Nichol, 1983; Rüsse und Sinowatz, 2002).

### 2.1.3 Mikroskopische Anatomie des Eileiters

Mikroskopisch sind im Eileiter von innen nach außen folgende Schichten zu differenzieren, deren Ausprägung in den verschiedenen Abschnitten des Eileiters variiert:

- a) Tunica mucosa
  - Lamina epithelialis mucosae
  - Lamina propria mucosae
- b) Tunica muscularis
- c) Tela subserosa der Tunica serosa

#### a) Tunica mucosa:

Von der Tunica mucosa werden Falten zur Oberflächenvergrößerung gebildet, die abhängig vom Segment des Eileiters unterschiedlich weit ins Lumen des Hohlorgans hineinreichen. Die Lamina propria bildet die bindegewebige Grundlage der Falten und an deren Basis eine dünne zirkuläre Schicht. In ihr verlaufen die reichhaltigen Gefäße bis in die Falten spitzen (Hees, 1992). Sie ist sehr deutlich im Infundibulum und sehr gering am uterotubalen Übergang ausgebildet (Lombard, 1950). Die Bindegewebszellen der Lamina propria lassen sich mit dem Antikörper gegen Vimentin gut darstellen. Vimentin ist ein Intermediärfilament, das in Zellen mesenchymalen Ursprungs vorkommt. Demnach markiert es in den Geweben unter anderem Fibroblasten, Endothelzellen und Muskelzellen (Osborn et al., 1984).

In allen Abschnitten finden sich Primärfalten (Plicae tubariae). Ihre Länge und sekundäre Fältelung nimmt in Richtung Infundibulum zu (Hees, 1992), während ihre Breite in Richtung Isthmus zunehmend ist (Schmidt-Barth, 1981). In der Ampulla werden bis zu 20 Primär- mit bis zu 8 Sekundärfalten beschrieben, während im Isthmus nur 4-6 Primärfalten vorkommen. Das Infundibulum hat die komplizierteste Faltenarchitektur. Hier kommen zusätzlich Tertiärfalten vor. Am freien Rand des Trichters sind die Falten am größten und haben basal eine starke Tendenz zur Verzweigung (Lombard, 1950). Yaniz (2000) macht sehr genaue Ausführungen über die komplizierte, dreidimensionale Struktur der Falten. Nach seinen Angaben kom-

men in der Ampulla ca. 6-10 Falten mit einer Länge von 900-1300  $\mu\text{m}$  vor. Zwischen zwei dieser langen Falten liegen eine bis drei kurze Falten mit einer Länge von 300-500  $\mu\text{m}$ . Die Anzahl der Falten nimmt nach kaudal ab, so dass im Isthmus nur noch eine Anzahl von 4-6 flachen, dicken Falten beschrieben wird. Weiterhin entdeckt Yaniz (2000) eine Höhlen- und Taschenbildung mit unterschiedlich gerichteten Öffnungen. Im Infundibulum und der Ampulla zeigen sie ovarwärts, während sie im Isthmus und der Pars uteri in Richtung Uterus weisen. Diese Taschen werden durch sekundäre Falten in basalen Bereichen der Primärfalten gebildet, die untereinander verbunden sind.

Die so entstehenden Höhlen sind im Isthmus flacher als in der Ampulla. An ihrem Grund befinden sich zusätzlich Krypten, die als morphologische Barriere für die Spermien gedeutet werden. Die Taschen bildenden Falten sind in Richtung der uterotubalen Verbindung (UTJ) eher schräg und in Richtung der Ampulla vermehrt transversal gerichtet (Yaniz et al., 2000).

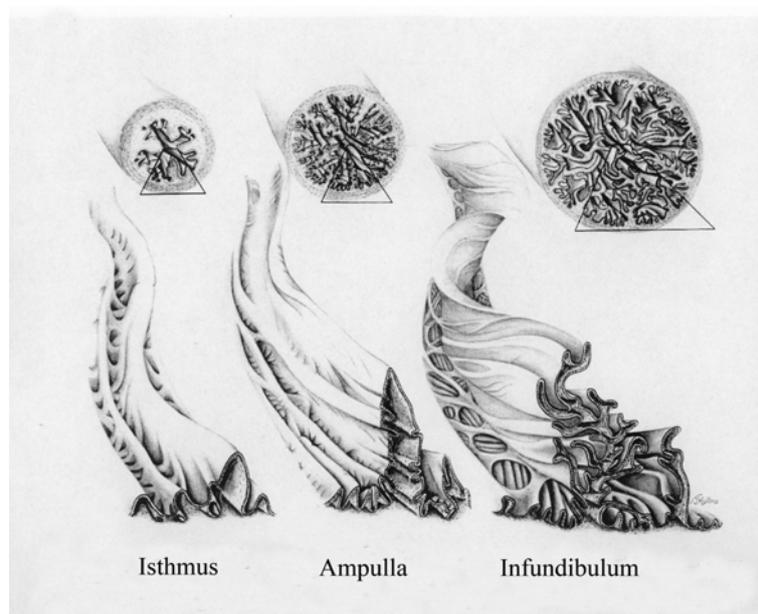


Abb. 1: Dreidimensionale Faltenarchitektur des Eileiters, übernommen von Yaniz et al. (2000).

Das Epithel des Eileiters ist ein einschichtig hochprismatisches Epithel. Es besteht zum größten Teil aus zwei verschiedenen Zelltypen. Die zilientragenden Zellen (Flimmerzellen) besitzen lange, ins Lumen ragende, bewegliche Zilien (Kinozilien) an der apikalen Zellmembran. Die zilientragenden Epithelzellen lassen sich selektiv mit Hilfe des Antikörpers gegen ChromograninA darstellen. Die sekretorischen Zellen (Drüsenzellen) weisen zyklusabhängig verschiedenartige Sekretgranula auf und wölben sich zu bestimmten Zeiten in unterschiedlicher Art und Größe ins Lumen vor (Björkman und Fredricsson, 1961; Hees, 1992).

Lombard (1950) macht Höhenangaben für die Epithelzellen von durchschnittlich ca. 18  $\mu\text{m}$  im

Isthmus, ca. 37,1  $\mu\text{m}$  in der Ampulla und ca. 24  $\mu\text{m}$  im Infundibulum. Auf der Zelloberfläche beider Epithelzellentypen wurde bereits 1959 von Björkman ein dichter Mikrovillibesatz beschrieben. Man findet die Mikrovilli bei den zilientragenden Zellen eher peripher, während ihre Zilien zentral auf der apikalen Zellmembran angeordnet sind (Björkman, 1959). An den lateralen Zellmembranen sind Desmosomen ausgebildet. Dadurch wird eine mechanische Verbindung zur Nachbarzelle geschaffen. An diesen punktförmigen Verbindungselementen sind die Intermediärfilamente verankert. Sie erhalten die Struktur der Zelle und geben ihr Stabilität. Hemidesmosomen befestigen die Zellen an der Basalmembran (Lodish et al., 1993). Die Basalmembran des Epithels kann unter anderem mit Hilfe des Antikörpers gegen Laminin dargestellt werden. Laminin ist das häufigste Glykoprotein der Basalmembran (Martin und Timpl, 1987). Es spielt eine Schlüsselrolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der komplexen dreidimensionalen Matrix der Basalmembran (Beck et al., 1990; Martin und Timpl, 1987).

Neben den beiden bereits dargestellten Zellarten werden Stiftchenzellen und Basalzellen beschrieben. Die Stiftchenzellen auch „peg cells“ oder „intercalary cells“ sind schmal, haben einen stiftchenförmigen Kern und verbreitern sich trichterförmig ein wenig zum Lumen hin. Stiftchenzellen sind nicht zilientragend (Mc Daniel et al., 1968). Während sie von Schaffer (1908) noch als eigenständige Zellform interpretiert wurden, werden sie heute als kollabierte bzw. degenerierende Epithelzellen angesehen, die zur Abstoßung aus dem Epithel bereit sind (Hees, 1992). Bereits 1909 vermutete Hörmann, dass es sich hierbei um inaktive Drüsenzellen nach der Sekretabgabe handelt. Später wurden die Stiftchenzellen als Übergangsformen zwischen sekretorischen und zilientragenden Zellen gedeutet (Verhage et al., 1973a).

Die so genannten „Basalzellen“ sind kleine, runde Zellen, die meist auf der Basallamina zu liegen kommen. Bei ihnen handelt es sich um intraepitheliale Leukozyten, zumeist um Lymphozyten (Abughrien et al., 2000) (siehe auch 2.1.6).

Zellen epithelialen Ursprungs können mit Hilfe eines Antikörpers gegen Zytokeratin (ZK) nachgewiesen werden. Zytokeratine sind ca. 10 nm dicke Intermediärfilamente des Zytoplasmas, die in charakteristischer Weise angeordnet sind und meist im Bereich von mechanischen Zellkontakten, z.B. Desmosomen enden. Zytokeratinfilamente haben eine stabilisierende Funktion. Sie unterliegen wie alle Intermediärfilamente einer Dynamik und werden bei Differenzierungsvorgängen oder Mitosen von Zellen auf-, ab-, oder umgebaut (Sun et al., 1983). Die unterschiedlichen Zytokeratine werden in zwei große Gruppen zusammengefasst. Die Zytokeratine 9-20 gehören dem Typ I an und sind kleine, basische Proteine. Bei den Zytokeratinen 1-8, die dem Typ II angehören, handelt es sich hingegen um große, saure Proteine

(Sundström und Stigbrand, 1994). Perez-Martinez et al. (2001) haben die Expression der Zytokeratinfilamente 1-14 sowie eines Panzytokeratins am bovinen Eileiter während des Zyklus untersucht. Der Panzytokeratin Antikörper reagiert spezifisch mit mehreren verschiedenen Zytokeratintypen. Es wurde ermittelt, dass die Zytokeratine 5, 6, 7, 8, 18, 14 relativ stark und gleichmäßig von den Epithelzellen exprimiert werden, obwohl ZK 5 und ZK 14 eigentlich Marker für Basalzellen sind. Die Antikörper gegen die Zytokeratine 1, 10 und 13 zeigen hingegen keinerlei positive Bindungsreaktion mit dem Epithel des Rindereileiters.

Das Vorkommen und der Anteil zilientragender Zellen im Eileiterepithel wird von den Autoren sehr unterschiedlich dargestellt und scheint stark speziesabhängig zu sein.

Beim Menschen ist die Ausbildung von Zilien in der Ampulla maximal (Palter et al., 2001). Es kommen ca. 50 % zilientragende Zellen vor. Ihr Anteil nimmt in Richtung Isthmus ab (Lyons et al., 2002). Ähnlich scheint es sich beim Hund zu verhalten, wo die zilientragenden Zellen hauptsächlich in der Ampulla vorkommen und sogar nur vereinzelt im Isthmus ausgebildet sein sollen (Nilsson, 1969).

Beim Rind dagegen beschreibt Lombard (1950), dass Kinozilien in allen Abschnitten vorkommen und es keine Unterschiede im Hinblick auf die Verteilung oder Aktivität der Zilien gibt.

Die Zilienanzahl und ihre Funktionalität im Infundibulum korrelieren mit dem erfolgreichen Eitransport. Man findet die Zilien vermehrt in apikalen und lateralen Bereichen der Falten (Yaniz et al., 2000).

#### b) Tunica muscularis:

Die Tunica muscularis beinhaltet die tubeneigene Muskulatur aus glatten Muskelzellen, die zwei gegenläufige, sich durchflechtende Spiralsysteme bilden. Innen und außen ist der Faserverlauf längsorientiert. Im Zentrum der Tunica muscularis liegt eine zirkuläre Schicht vor, was dadurch deutlich wird, dass die Kerne nur einen geringen Steigungswinkel aufweisen. Die Stärke der Tunica muscularis, insbesondere ihre innere Längsmuskellage nimmt von der Pars uteri, wo sie stark ausgebildet ist in Richtung Ampulla ab. Schließlich ist sie nur noch mit einzelnen Fasern an der Basis der Falten vertreten (Hees, 1992). Es ziehen keine Muskelfasern in die Schleimhautfalten (Lombard, 1950).

Die Muskulatur ist stark von faserigem Bindegewebe durchzogen, welches viele, auch größere Blutgefäße führt (Hees, 1992) und zudem elastische sowie retikuläre Fasern enthält (Lombard, 1950).

Die Muskelzellen und die Bindegewebszellen des Eileiters lassen sich mit Hilfe des Antikör-

pers gegen das „ $\alpha$ -smooth muscle actin“ ( $\alpha$ -SMA) genau voneinander abgrenzen. In den verschiedenen Zellen gibt es verschiedene Aktine. So befinden sich im Zytoskelett jeder Zelle  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aktine. In der Skelettmuskelzelle kommt das „ $\alpha$ -sarcomeric actin“, im Herzmuskel das „ $\alpha$ -myocardial actin“ und im glatten Muskel das „ $\alpha$ -“ und das „ $\gamma$ -smooth muscle actin“ vor. Der von Skalli et al. (1986) isolierte Antikörper erkennt nur das N-terminale Ende des  $\alpha$ -Aktins von glatten Muskelzellen. Dadurch ist eine einfache Differenzierung der glatten Muskelzellen von Fibroblasten möglich.

### c) Tunica serosa mit Tela subserosa:

Die Tunica serosa überzieht von außen den Eileiter. Sie geht an der Umschlagstelle des Trichters in das Eileiterepithel über (Hees, 1992). Unterlagert ist ihr einschichtiges Plattenepithel (Mesothel) von der bindegewebigen Tela subserosa, die vor allem größere Gefäße führt. Des Weiteren enthält die Tela subserosa eine subperitoneale Muskulatur, durch welche Lageveränderungen des Eileiters ermöglicht werden. Dies ist z.B. bei der Ovulation von Bedeutung. Die Tela subserosa ist am geringsten im Infundibulum ausgebildet und am stärksten an der uterotubalen Verbindung (Hees, 1992).

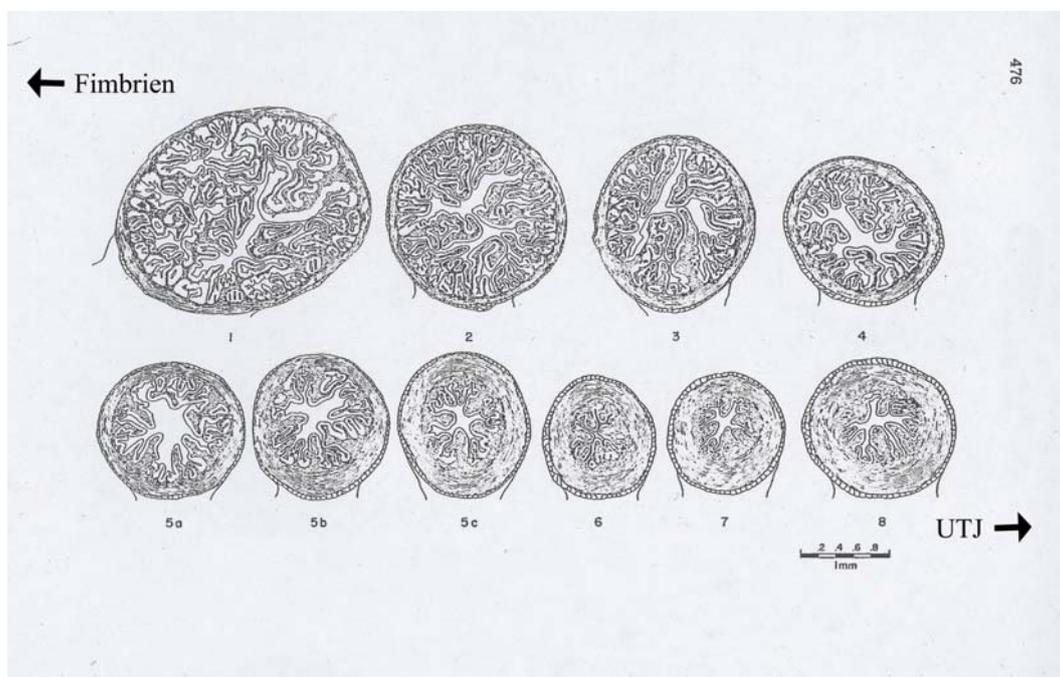


Abb. 2: Veränderung der verschiedenen Eileitersegmente im Querschnitt, übernommen von El-Banna und Hafez (1970a)

### 2.1.4 Innervation und hormonelle Kontrolle des Eileiters

Eine Schlüsselrolle für die Eileiterfunktion spielen die Östrogene und Progesteron.

Östrogene haben einen proliferativen Effekt auf die Epithelzellen und fördern die Differenzierung des Epithels und die Produktion von sekretorischen Proteinen (Abe und Oikawa, 1993b; Sawyer et al., 1984). Außerdem stimulieren sie im Epithel Hypertrophie, Ziliogenese und sekretorische Aktivität (Donnez et al., 1985; Verhage et al., 1979). Einen hypertrophen Effekt sollen Östrogene auch auf die Ausbildung der Zellorganellen haben (Nayak et al., 1976).

Progesteron wurde als Antagonist der Östrogene angesehen. Es hat zumindest im uterinen Epithel einen hemmenden Effekt auf die Proliferation (Kurita et al., 1998). Progesteron soll im Eileiter den Zilienschlag reduzieren (Mahmood et al., 1998). Des Weiteren sollen hohe Konzentrationen von Progesteron im Blut einen Verlust der Zilien und eine Atrophie des Eileiterepithels verursachen (Donnez et al., 1985; Verhage et al., 1979).

Vermittelt werden die Wirkungen der Östrogene und des Progesterons über ihre Rezeptoren, die sich im Kern der Zellen befinden. Der Östrogenrezeptor (ER) wurde von Toft und Gorski bereits 1966 mittels Autoradiographie im Zytosol nachgewiesen. Der hier untersuchte Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) wurde von Gee et al. (1990) erstmals im uterinen Oberflächen- und Drüsenepithel sowie dem Stroma und Endometrium der Ratte mittels mononukleärer Antikörper lokalisiert.

Vor einigen Jahren wurde ein zweiter Typ des Östrogenrezeptors bei der Ratte nachgewiesen, der ER $\beta$  (Kuiper et al., 1996). Dieser hat ein anderes Verteilungsmuster in den Organen als der ER $\alpha$  und vermittelt zum Teil auch gegensätzliche Wirkungen. Als Beispiel ist in diesem Zusammenhang die proliferationshemmende Wirkung, die über ER $\beta$  läuft, zu nennen. In der Expression des ER $\beta$  bestehen große Speziesunterschiede.

Die Existenz eines ER $\gamma$  wurde bisher nur beim Knochenfisch nachgewiesen (Hawkins et al., 2000).

Früher wurde angenommen, dass der ER $\beta$  nur im Ovar und der Milchdrüse vorkommt. Ulbrich et al. (2003) gelang es jedoch mRNA für den ER $\beta$  mittels PCR im Eileiter des Rindes nachzuweisen. Der ER $\beta$  scheint dabei im Isthmus stärker exprimiert zu werden als in der Ampulla.

Die Expression des ER $\alpha$  ist jedoch 10-mal stärker als die des ER $\beta$ . Es wird deshalb davon ausgegangen, dass die rezeptorvermittelten Aktionen der Östrogene im Eileiter hauptsächlich über den ER $\alpha$  vermittelt werden. Die Tatsache, dass beide Subtypen unterschiedliche Lokalisationen aufweisen, spricht allerdings dafür, dass sie unterschiedliche physiologische Funktionen ausüben könnten.

Die Expression des ER $\alpha$  nimmt in der folliculären Phase, also unter Östrogeneinfluß zu. Die Sensitivität für das Hormon steigt dadurch weiter an. Der ER $\beta$  hingegen wird verstärkt in der späten lutealen Phase exprimiert, wenn Progesteron im Blut dominiert. Beides wurde durch In-vitro-Untersuchungen abgesichert. Möglicherweise sind aber für die Rezeptorregulation nicht nur die Bluthormonspiegel, sondern vor allem die Hormonkonzentrationen der oviduktalen Flüssigkeit von Bedeutung. Beide Subtypen des Östrogenrezeptors kommen außerdem im Zytoplasma der Muskel- und Stromazellen vor, was im Zusammenhang mit der Regulation oviduktalear Motilität stehen könnte (Ulbrich et al., 2003).

Für das Endometrium wurde von weiteren Autoren bereits angenommen, dass die Reaktionsfähigkeit der Epithelzellen auf Steroide über bestimmte Botenstoffe der Stroma- und Muskelzellen beeinflusst wird (Kimmins und MacLaren, 2001). Untersuchungen am kaninen Eileiter führten zu ähnlichen Schlussfolgerungen. Vermeirsch et al. (2002) beobachteten, dass die Immunsensitivität der Stromazellen auf ER $\alpha$  und PR wesentlich stärker ist als in den Epithelzellen. Sie vermuteten, dass es für die Rezeptorexpression im Eileiterepithel eine ähnliche Regulation geben könnte wie in der Prostata (Brenner et al., 1990), im Uterus (Cooke et al., 1997), in der Vagina (Buchanan et al., 1998) und in der Milchdrüse (Cunha et al., 1997) bei verschiedenen Spezies. Dort wird die mitogene Aktivität der Epithelzellen über das Stroma vermittelt. Bei dieser parakrinen Regulation könnten Wachstumsfaktoren, die von den Stromazellen abgegeben werden eine entscheidende Rolle spielen. So wären die epithelialen Hormonrezeptoren nicht zwingend für die östrogeninduzierte Epithelproliferation verantwortlich (Vermeirsch et al., 2002).

Uterusepithel von neonatalen Mäusen, welches den ER $\alpha$  nicht exprimiert, reagiert auf eine Östrogengabe mit erhöhter Proliferation. Da der ER $\alpha$  aber in der Lamina propria nachweisbar ist, gehen Cunha et al. (1982) davon aus, dass die Östrogenantwort über das Stroma vermittelt wird.

Signifikanten Veränderungen der Expression des ER $\alpha$  in den verschiedenen Zyklusphasen wurden beim Hund nicht verzeichnet. Der ER $\beta$  konnte in dieser Studie lediglich im Ovar, nicht aber im Eileiter oder im Uterus nachgewiesen werden (Vermeirsch et al., 2002).

Auch bei der Ratte wird eine Expression beider Subtypen des ER im Ovidukt beschrieben (Saunders et al., 1997). Mittels Immunhistochemie (IHC) und In-situ-Hybridisierung wurde eine maximale Konzentration des ER $\alpha$  im Proöstrus in Muskulatur-, Stroma- und Epithelzellkernen nachgewiesen. Es konnte nur wenig mRNA vom ER $\beta$  in Epithelzellen und Muskelzellen mittels In-situ-Hybridisierung sichtbar gemacht werden. Es war ebenfalls eine leichte im-

munhistochemische Farbreaktion in den Muskelzellkernen (MZK) vorhanden (Wang et al., 2000). In anderen Untersuchungen wurde bei der Ratte mittels IHC der ER $\alpha$  (Saunders et al., 1997) und mittels In-situ-Hybridisierung (Mowa und Iwanaga, 2000) die mRNA des ER $\alpha$  in den Zellkernen von Epithel- und glatten Muskelzellen nachgewiesen. Der ER $\beta$  ließ sich nicht nachweisen.

Bei ER $\alpha$  Knock-out-Mäusen atrophiert der Uterus und das Ovidukt. Eine spätere Applikation von Östrogen hat dann keinen Effekt mehr auf das Organgewicht. Beim Wildtyp hingegen werden Hyperämie und erhöhtes Gewicht nach Östrogenapplikation erreicht. Fehlt Mäusen der ER $\beta$ , ist ihre Fertilität zwar vermindert, aber eine normale Trächtigkeit ist möglich (Krege et al., 1998).

Der Progesteronrezeptor (PR) wird beim Rind am stärksten in der durch Östrogen dominierten Zyklusphase exprimiert. Es handelt sich um einen im Kern lokalisierten Steroidrezeptor mit typischer Domänenstruktur (Geene et al., 1986), modifiziert nach (Dechering et al., 2000). Auch beim PR gibt es zwei verschiedene Subtypen, nämlich PR-A und PR-B (Schrader et al., 1981). Dadurch erklärt sich zum Teil bereits die gewebsspezifische Wirkung des Progesterons. Die Expression des PR wird hormonell reguliert. Während Östrogen die Progesteronrezeptorkonzentration z.B. im Uterus steigert (Graham und Clarke, 1997), vermindert Progesteron die Induktion seines eigenen Rezeptors.

Das PR-A-Protein wird am stärksten in der Ampulla in der frühen lutealen Phase exprimiert. Der PR-B unterliegt hingegen keinen zyklischen Schwankungen wird aber im Isthmus stärker exprimiert als in der Ampulla (Ulbrich et al., 2003). In Knock-out-Studien mit Mäusen wurde festgestellt, dass ein Fehlen des PR-B die Progesteronantwort in Ovar und Uterus nicht beeinflusst, während ein Verlust von PR-A die Fertilität vermindert (Conneely et al., 2002). Weiterhin soll der PR-A ein Repressor und der PR-B ein Aktivator von progesteronsensiblen Genen sein. Demnach würden die progesteronvermittelten Aktionen in der lutealen Phase über PR-B verursacht werden. Die Expression des ER $\beta$  könnte deshalb in der lutealen Phase verstärkt sein, da der Repressor wegfällt und so die Progesteronantwort stattfinden kann (Ulbrich et al., 2003).

Im bovinen Endometrium werden die höchsten PR-Konzentrationen an Tag 1-8 nachgewiesen (Meyer et al., 1988).

Beim Hund wurde in der Ampulla mittels IHC eine Abnahme der Reaktionsintensität und der Anzahl PR immunpositiver Zellen vom Proöstrus bis zum Metöstrus festgestellt. In den Epithelzellen sinkt die Reaktivität im Verlauf des Diöstrus weiter, während in Stroma- und Mus-

kelzellkernen die Färbung und die Anzahl positiv reagierender Zellen wieder leicht ansteigt. Auch hier wird übereinstimmend mit anderen Untersuchungen beschrieben, dass die Färbung in den Kernen des Epithels schwächer ist als in den Stroma- und Muskelzellkernen (Vermeirsch et al., 2002).

Das Gen des PR ist eines der am besten untersuchten, von Östrogen regulierten Gene. Der Progesteronrezeptor wird durch Östrogen induziert und ist damit ein Marker für die Hormonwirkung (Graham und Clarke, 1997).

Es konnte am Epithel der Mäusevagina in einer Knock-out Studie nachgewiesen werden, dass der PR nach Östrogenstimulation nur hochreguliert wird, sofern ein ER $\alpha$  vorhanden ist. Am Uterusepithel scheint jedoch eine Expressionsverminderung nach Östrogenapplikation zu erfolgen (Kurita et al., 2000).

Bisher konnte bei der Ratte (Pelletier et al., 2000) und beim Hund (Vermeirsch et al., 2002) auch der Androgenrezeptor im Ovidukt nachgewiesen werden. Die Expression in den Zellkernen scheint keinen wesentlichen Schwankungen zu unterliegen. Die zytoplasmatische Färbung der sekretorischen Zellen in den Fimbrien und der Ampulla ist jedoch im Östrus und Proöstrus am intensivsten. Zu diesem Zeitpunkt ist auch die Testosteronkonzentration im Blut am höchsten.

Der Eileiter ist im Infundibulum und der Ampulla wenig und im Isthmus mit seiner dicken Schicht glatter Muskelzellen stark adrenerg innerviert (El-Banna und Hafez, 1970a). Während jedoch bei anderen Tierarten die  $\alpha$ -adrenerge Rezeptoren überwiegen und durch sie eine peri-ovulatorische Kontraktion im Isthmus ausgelöst wird, hat das Rind hauptsächlich  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptoren. Diese führen bei Stimulierung zu einer Relaxation im Isthmus. Es wird vermutet, dass das Noradrenalin erst postovulatorisch ausgeschüttet wird, damit dann der Embryo in den Uterus wandern kann (Isla et al., 1989). Weiter wurde festgestellt, dass sich das Lumen des Isthmus 72-168 Stunden nach der Ovulation weitet (El-Banna und Hafez, 1970a). Später wurde ermittelt, dass im bovinen Ovidukt die adrenerge Stimulierung vor allem über den  $\beta_2$ -Adrenozeptor vermittelt wird.  $\beta_2$ -Adrenozeptoren kommen hauptsächlich in den Epithelzellen der Ampulla vor, und ihre Expression unterliegt einer zyklischen Kontrolle. Die höchsten Transkriptions- und Expressionsraten werden dabei in der lutealen Phase beschrieben. Sogar in Kultur zeigen die Epithelzellen bei einem Zusatz von Progesteron eine höhere Expressionsrate des  $\beta_2$ -Adrenozeptors. Diese Hochregulation weist auf eine Verbindung zwischen dem adrenergen System und den Steroidhormonen der Gonaden hin (Einspanier et al., 1999). Die Kon-

zentrationen der Katecholamine variieren in der oviduktalen Flüssigkeit beim Schwein und beim Menschen während des Zyklus. Dabei wird im Isthmusbereich stets eine größere Konzentration als in den übrigen Abschnitten des Eileiters gemessen (Chaud et al., 1983; Helm et al., 1982). Dies lässt sich mit der stärkeren Innervation des Isthmussegments erklären (Wrobel und Kujat, 1993). Der Sekretionsaktivität der Eileiterepithelzellen könnte somit neben der steroidalen Beeinflussung durch Katecholamine fein reguliert werden (Einspanier et al., 1999). In einer neuen Untersuchung wurden allerdings andere Ergebnisse erzielt. Kotwica et al. (2003) fanden beim Rind vom Infundibulum in Richtung Isthmus sowohl eine zunehmende Dichte der adrenergen Nervenfasern als auch eine zunehmende Konzentration von Noradrenalin in der Wand des Ovidukts. Das Ovidukt enthält demnach relativ wenig Adrenalin, welches hauptsächlich aus der Zirkulation stammen dürfte. Die Konzentration von Noradrenalin und Dopamin soll jedoch relativ hoch sein. Die Quelle dafür scheinen die Nervenfasern zu sein. Die höchste Konzentration des Noradrenalins finden Kotwica et al. (2003) im periovulatorischen Zeitraum. Sie unterliegt jedoch im Infundibulum keinen zyklischen Schwankungen. Auch von Kotwica et al. (2003) wird eine relaxierende Wirkung des Noradrenalins postuliert. Die höchsten Konzentrationen von Adrenalin werden in der frühen bis mittleren und von Dopamin in der gesamten lutealen Phase beschrieben. Diese zyklischen Konzentrationsveränderungen deuten auf einen Einfluß der Steroidhormone hin. Signifikante Unterschiede in Bezug auf den ipsi- und contralateralen Eileiter konnten nicht festgestellt werden.

Auch der Oxytocinrezeptor wurde im Rindereileiter bereits identifiziert. Er wird vom Tag 16 des vorherigen bis zum Tag 5 des folgenden Hormonzyklus verstärkt exprimiert und könnte deshalb vom Östrogen abhängig reguliert sein. Oxytocin erhöht in einer In-vitro-Studie die Kontraktilität des Eileiters am stärksten in der folliculären Phase. Dies könnte an einer zu diesem Zeitpunkt erhöhten Rezeptordichte liegen (Bennett et al., 1988; Kotwica et al., 2003). Im Allgemeinen scheint das Oxytocin beim Rind jedoch nicht so eine bedeutende Rolle zu spielen wie z.B. beim Mensch (Wildt et al., 1998) oder beim Schwein (Zerobin und Sporri, 1972). Die lokale Konzentration von Oxytocin im Rindereileiter ist sehr niedrig und ändert sich während des Zyklus nicht (Wijayagunawardane et al., 1998). Unabhängig davon wurde ebenfalls von Kotwica et al. (2003) beobachtet, dass Azetylcholin Kontraktionen im Ovidukt in der folliculären und der frühen lutealen Phase stimuliert.

Weiter konnten Rezeptoren für das luteinisierende Hormon (LH) in den Epithelzellen des Rindereileiters nachgewiesen werden. Die zyklusabhängige Sekretion bestimmter oviduktaler Proteine dürfte also auch durch LH beeinflusst sein (Sun et al., 1997). LH erhöht in vitro die Se-

kretion von Endothelin-1 (ET-1), Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und Prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) sowie die Kontraktionsamplitude bei Eileitern, die aus der folliculären oder postovulatorischen Phase stammen. Dabei ist anzunehmen, dass die verstärkten Kontraktion über ET-1, PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub> ausgelöst werden (Wijayagunawardane et al., 2001). Auch in vivo wurden im bovinen Eileiter die höchsten Konzentrationen von Prostaglandinen (PG) und ET-1 in der periovulatorischen Phase festgestellt (Wijayagunawardane et al., 1998). Eine zusätzliche Gabe von Oxytocin hat in der in vitro Studie die LH induzierten Sekretionen bzw. Kontraktionen verhindert (Wijayagunawardane et al., 2001).

Bei den meisten Spezies verursacht PGF<sub>2α</sub> eine Kontraktion und PGE<sub>2</sub> eine Relaxation der Muskulatur im Eileiter (Harper, 1988). Beim Rind besteht jedoch nur eine sehr geringe Sensitivität für PGF<sub>2α</sub>, und es löst deshalb keine Kontraktionen im Eileiter aus (Singh et al., 1979). PGE<sub>2</sub> scheint eine Motilität zu vermindern (Ramwell et al., 1969). Allerdings ist zu erwähnen, dass andere Autoren dem PGE<sub>2</sub> in vitro einen stimulierenden Effekt auf die oviduktale Beweglichkeit zuschreiben (Wijayagunawardane et al., 2001).

Des Weiteren wurde ein Kinin beschrieben, das der folliculären Flüssigkeit entstammt. Es soll ipsilateral die Kontraktilität des Eileiters steigern (Ramwell et al., 1969).

Beim Rind wird im Unterschied zu anderen Spezies zudem eine peptiderge Kontrolle der Eileitermotilität postuliert:

Das vasoaktive Peptid (VIP) soll eine Rolle bei der Relaxation der glatten Muskulatur des Isthmus spielen. In diesem Eileiterabschnitt kommen beim Rind die VIP enthaltenen Nervenfasern in extremer Dichte vor. Das Neuropeptid Y hemmt die Freisetzung von Noradrenalin und damit die Relaxation in der Muskulatur des Isthmus, bis der Embryo in den Uterus übertreten kann (Kannisto et al., 1986).

Eine Substanz P, die Kontraktionen der Eileitermuskulatur auslöst und bei vielen anderen Spezies vorkommt, konnte beim Rind nicht identifiziert werden (Harper, 1988).

### **2.1.5 Ultrastruktureller Aufbau des Eileiterepithels**

Die hochprismatischen Eileiterepithelzellen sind apikal über „junctional complexes“ miteinander verbunden. Während benachbarte ziliotragende Zellen gestreckt verlaufende Zellgrenzen aufweisen, können diese bei den sekretorischen Zellen stärker gewellt sein.

Die sekretorischen Zellen haben zyklusabhängig im Vergleich zu den ziliotragenden Zellen ein deutlich elektronendichtes Zytoplasma, da es viele Polyribosomen enthält. Dieses ist ein Hinweis auf eine hohe Proteinbiosyntheserate in bestimmten Zyklusphasen (Björkman und

Fredricsson, 1961). Im Zytoplasma der nicht zilientragenden Zellen kommen supranukleär sekretorische Granula vor. Diese haben ein sehr variables Aussehen. In den verschiedenen Zyklusphasen unterscheiden sie sich hinsichtlich ihrer Größe, Form und Elektronendichte. Teilweise sind sie lamellär strukturiert (Abe et al., 1993b). Bei den sekretorischen Zellen gibt es zusätzlich das Phänomen der Protrusionsbildung. Dabei wölbt sich das apikale Zytoplasma, ebenfalls zyklusabhängig, mehr oder weniger weit ins Eileiterlumen vor. Diese Protrusionen können sowohl sekretorische Granula und Zellorganellen als auch Kerne enthalten. Sie sind oft nur über sehr schmale Zytoplasmabrücken mit dem Epithel verbunden (Eriksen et al., 1994).

Die Kerne der zilientragenden Zellen sind relativ groß und rund. Sie weisen verschieden strukturierte Nukleoli auf. Nach Björkman und Fredricsson (1961) liegen die Kerne eher apikal und nach Eriksen (1994) zentral im Zytoplasma. Dagegen befinden sich die Kerne der sekretorischen Zellen im basalen Drittel der Zelle, sofern sie nicht in bestimmten Zyklusstadien in die Protrusionen verlagert werden (Björkman und Fredricsson, 1961). Diese Kerne weisen oft starke Einkerbungen in der Kernmembran auf (Eriksen et al., 1994), die gelegentlich Verbindung zu den Zisternen des granulierten endoplasmatischen Retikulum (rER) haben (Björkman und Fredricsson, 1961).

Im Isthmus befindet sich bei beiden Zellarten in Kernnähe eine größere Menge an Lipiden (Wordinger et al., 1977).

In den zilientragenden Zellen sind die Mitochondrien sehr zahlreich. Sie liegen supranukleär gehäuft und sind parallel zur Längsachse der jeweiligen Zelle angeordnet. Die sekretorischen Zellen haben relativ wenige Mitochondrien. Die sind aber groß und treten hauptsächlich im apikalen Zytoplasma auf (Eriksen et al., 1994). Die sekretorischen Zellen weisen ein stark ausgeprägtes granuliertes endoplasmatisches Retikulum (rER) auf. Es liegt meist basal, ist dicht gepackt und ribosomenreich. Das apikal oder supranukleär vorkommende rER besteht meist aus kurzen Zisternen oder ist vesikulär angeordnet. Dilatationen des rER kommen besonders in der folliculären Phase des Zyklus häufig vor. Es enthält dann vermehrt osmiophobes, amorphes Material und es sind viele Transportvesikel vorhanden (Björkman und Fredricsson, 1961; Eriksen et al., 1994).

Der Golgi-Apparat ist bei den sekretorischen Zellen gut ausgebildet und liegt meist im supranukleären, seltener im apikalen Zytoplasmabereich. Die Dictyosomen enthalten bis zu fünf glattwandige, oft auch dilatierte Zisternen.

Zu den Oberflächenstrukturen gehören Mikrovilli und Zilien. Mikrovilli kommen bei beiden Zellarten vor. Während sie bei den zilientragenden Zellen eher peripher ausgebildet sind und

keine Veränderungen im Zyklus zeigen, verändern sie ihre Gestalt und Anzahl bei den sekretorischen Zellen deutlich (Björkman, 1959). Bage et al. (2002) sind der Meinung, dass die Mikrovilli zur Oberflächenvergrößerung und dadurch zur vermehrten Resorption von oviduktaler Flüssigkeit dienen. Bei Kühen nach wiederholter Trächtigkeit sollen die Mikrovilli im Vergleich zu Färsen vermindert sein. Deshalb bleibt bei diesen Kühen mehr oviduktale Flüssigkeit im Lumen zurück (Bage et al., 2002).

Der Aufbau der im Eileiter vorhandenen Kinozilien wurde von verschiedenen Autoren ausführlich beschrieben (Adoutte et al., 1980; Dentler, 1981; Gibbons, 1967; Hees, 1992; Sandoz et al., 1988; Satir, 1989; Stephens et al., 1989).

Sie weisen folgenden Aufbau auf:

Das Axonema (Achsenfaden) ist in eine homogene Matrix eingebettet und von einer Plasmamembran umgeben (Gibbons, 1967). Es besteht aus zwei einzelnen in der Mitte liegenden Mikrotubuli und neun peripher angeordneten Mikrotubuluspaaren. Jedes Paar besteht aus einem A-Tubulus aus 13 Tubulinreihen, der einen vollständigen Ring bildet und einem aus nur 11 Tubulinreihen bestehenden B-Tubulus. Von jedem A-Tubulus reichen zwei Dynein-Arme im Uhrzeigersinn zum jeweiligen B-Tubulus der Nachbardupletten. Dynein ist ein myosinähnliches Protein, das eine ATPase-Aktivität aufweist und für den Zilienschlag wichtig ist (Hees, 1992). Zwischen den Tubuluspaaren sind Nexine vorhanden. Sie ermöglichen es den Mikrotubuli aneinander vorbeizugleiten, wenn eine passive Biegung der Zilien stattfindet. Radiale Stränge verbinden die 9 Paare der peripheren Mikrotubuli mit dem innen liegenden Paar aus Einzelmikrotubuli (Satir, 1989). Jede Zilie hat weiter ein fibröses Skelett, das hauptsächlich aus Tektinen, Nexinverbindungen und anderen Strukturproteinen besteht (Stephens et al., 1989). Zudem wird ein fibrilläres, Y-förmiges Material beschrieben, das die peripheren Paare mit transmembranalen Partikeln verbindet. Es kommt vor allem dicht gepackt am Hals und am basalen Teil der Zilien vor (Sandoz et al., 1988). Am distalen Ende der Zilien sind die Mikrotubuli durch kappenähnliche Strukturen an die modifizierte Zilienmembran angeheftet (Dentler, 1981). Die Zilien enthalten viel Calmodulin. Dieses befindet sich entweder frei im periaxonemalen Raum oder ist mit den Dyneinarmen verbunden (Adoutte et al., 1980).

Die Ziliogenese kann im bovinen Eileiter auf zwei verschiedene Arten stattfinden, es gibt den acentriolären und den centriolären Weg (Abughrien und Dore, 2000; Nayak et al., 1976). Beim acentriolären Weg treten zuerst fibröse Granula in Gruppen im apikalen Zytoplasma auf. Diese nehmen allmählich an Größe zu und sind ein auffälliges Merkmal von zilientragenden Zellen. In einigen Teilen formen sie Aggregate von runder oder ovaler Form, die nicht membranbegrenzt sind und viele elektrondichte Granula sowie eine Matrix aus feinen Filamenten besit-

zen. Die fibrösen Granula werden bei der Ziliogenese zunehmend prominenter. Sie haben eine filamentöse Matrix, die von Granula umgeben ist. Sie vereinigen sich untereinander, einige verlängern sich und transformieren zu „dense bodies“. Durch weitere Reifung und dichtere Packung der „dense bodies“ entstehen die Deuterosomen. Dies sind hohle sphärische Körperchen, die die Organisationszentren für das Wachstum der Procentriolen darstellen. Die Procentriolen können als unreife Centriolen angesehen werden. Sie bestehen anfangs aus filamentösem Material, das sich zu kurzen zylinderartigen Strukturen umbildet. Durch Polymerisation des Tubulins verlängern sich die Procentriolen bis zur definitiven Größe. Sie wandern zum apikalen Zellpol und nehmen dort ihren Platz als Basalkörperchen ein.

Beim centriolären Weg der Ziliogenese gehen aus einer Centriole bis zu 10 Procentriolen hervor. In der Regel entstehen sie im rechten Winkel zu den bereits bestehenden Centriolen.

Durch Verlängerung und Verbreiterung werden die Procentriolen schnell zu reifen Basalkörperchen. Sie lösen sich dann von ihren Elterncentriolen und werden in das apikale Zytoplasma verlagert. Dort sind sie von den Basalkörperchen des acentriolären Wegs nicht zu unterscheiden. Aus den apikalen Basalkörperchen wachsen dann die Zilien heran. Die Zilienformation beginnt mit der Fusion des Basalkörperchens und der apikalen Zellmembran. Es entsteht eine Zytoplasmablase, sie entspricht einer Zilienknospe. In ihr beginnen sich Tubuli zu formieren und zu organisieren. Die Knospenspitze bleibt unorganisiert und enthält Vorläufermaterial.

Die fertige Zilie hat eine konische Form und verliert die Spitze.

In der Zeit der ziliären Knospung erscheinen auch die „striated rootlets“ als assoziierte Strukturen, die der Verankerung dienen. Während ihrer Entstehung sind basal des Basalkörperchens fibröse Granula sichtbar, die vermutlich an der Entstehung der „striated rootlets“ beteiligt sind (Abughrien und Dore, 2000).

Bei der Wachtel konnte Aktin im Zilienschaft lokalisiert werden (Chailley et al., 1986). Auch Myosin scheint bei der Centriolbildung eine Rolle zu spielen. Es ist evtl. an der Wanderung der Basalkörperchen zu den apikalen Zellpolen beteiligt (Lemullois et al., 1987).

### **2.1.6 Basalzellen sind Immunzellen im Eileiter**

Die früher im Allgemeinen als Basalzellen des Eileiters bezeichneten Zellen sind kleine, runde Zellen, die sich meist direkt auf der Basallamina oder zumindest basal im Epithel befinden. Sie haben keinen Kontakt zur Epitheloberfläche. Früher nahm man an, dass diese Zellen tatsächlich als Stammzellen für das Epithel fungieren und in diesem Sinne der Epithelregeneration dienen könnten (Pauerstein und Woodruff, 1967). Heute geht man davon aus, dass es sich um

Leukozyten handelt, was Novak und Sampson schon 1928 postulierten. Eine weitere Vermutung war, dass diese Zellen Mastzellen seien, die aus dem Bindegewebe einwandern und im Epithel ihre Granula abgeben (Rasweiler, 1972). Im Östrus soll dabei die Infiltration mit Mastzellen am stärksten sein. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass das von ihnen freigesetzte Histamin ein Ödem in der Tunica mucosa verursacht. Weiter wurde vermutet, dass dadurch eine vermehrte Durchblutung und erhöhte sekretorische Aktivität bedingt sei (DuBois et al., 1980).

Das Zytoplasma dieser basalen Zellen stellt sich im Allgemeinen dichter als bei zilientragenden oder sekretorischen Zellen dar. Der Kern ist rund, hyperchromatisch und zumeist von einer aufgehellten zytoplasmatischen Zone umgeben (Lombard, 1950). Björkman und Fredricson (1961) stellten fest, dass diese Zellen nicht an der Basalmembran verankert sind. Dies sprach gegen die Interpretation der Basalzellen als Reservezellen. Da eine große morphologische Ähnlichkeit mit den in der Lamina propria befindlichen Lymphozyten besteht, ging Lombard bereits 1950 davon aus, dass es sich bei den Basalzellen um intraepitheliale Lymphozyten handelt. Wesentlich später fanden Eriksen et al. (1994) heraus, dass diese so genannten Basalzellen bis auf wenige Mitochondrien arm an Organellen sind. Zudem fehlen ihnen Haftstrukturen zu den Nachbarzellen, womit ein epithelialer Ursprung ausgeschlossen werden kann.

Diese basal liegenden Zellen zeigen weder eine spezifische positive Reaktion mit dem für den Epithelzellnachweis gebräuchlichen Antikörper gegen Panzytokeratin, noch mit dem Antikörper gegen das S100-Protein, welches sowohl in zilientragenden als auch in sekretorischen Zellen des Eileiterepithels exprimiert wird (Walter und Miller, 1996). Unterstützt wird die Interpretation dieser Rundzellen als Abwehrzellen dadurch, dass sie bei Salpingitis vermehrt auftreten (Abe und Oikawa, 1990; van Bogaert et al., 1978). Dies stellten bereits 1967 Pauerstein und Woodruff fest. Allerdings deuteten sie die erhöhte Zellzahl dieser Rundzellen als Zeichen erhöhter Proliferation aufgrund der Entzündung. Da diese Zellart auch im Stroma zu finden war, interpretierten sie sie als Stammzelle, die sowohl das Bindegewebe als auch das Epithel regeneriert.

Mit Hilfe des CD3 Antikörpers konnten die basalen Zellen im Eileiter als T-Lymphozyten identifiziert werden (Comer et al., 1998a).

Sehr detailliert setzten sich Abughrien et al. (2000) mit der Frage nach der Funktion dieser Zellen auseinander. Diesen Untersuchungen zufolge machen die basalen Zellen ca. 3,5 % der Epithelzellen aus und zeigen quantitativ keine Veränderungen während des Zyklus. Da keine Granula oder Anzeichen für eine Migration durch das Epithel in Richtung Lumen vorhanden sind, wird eine Klassifizierung als Mastzelle ausgeschlossen. Weiter unterscheiden sie zwei

verschiedene Typen dieser Zellen. Zellen vom Typ 1 sind demnach Lymphozyten, die viel peripheres Heterochromatin, wenig Zytoplasma mit wenigen Ribosomen aufweisen. Typ 2-Zellen enthalten viele freie Ribosomen, viel granuliertes endoplasmatisches Retikulum mit engen Zisternen, Vesikeln neben Golgi-Apparaten und Mitochondrien vom Crista-Typ. Ähnliche Zellen konnten sie auch in der Lamina propria ausmachen. Es handelt sich bei den Typ 2-Zellen ihrer Meinung nach um Makrophagen (Abughrien et al., 2000).

### **2.1.7 Apoptose und Mitose im Eileiterepithel**

Insgesamt gibt es bisher wenig Befunde über die Regeneration des Eileiterepithels. Bereits 1950 beschreibt Lombard, dass sich in den Vorwölbungen der Epithelzellen Kerne befinden, die zum großen Teil pyknotisch erscheinen. Auch die frei im Eileiterlumen vorkommenden Zellen scheinen degenerative Veränderungen aufzuweisen. Auch Wrobel et al. (1993) vermuten, dass kernhaltige Protrusionen ein Anzeichen von Epithelerneuerung sind, bei der Zellen aus dem Epithelverband ausgeschleust werden.

Nach Schmidt-Barth (1981) kann man uterusnah in den Sekretionszellen oft Degenerationsmerkmale erkennen, während die Zellen ovarnah vital erscheinen.

Beim Hund wurden mit Hilfe des MIB-1 Antikörpers im caudalen Eileiteristhmus und der uterotubalen Verbindung Mitosen im Anöstrus und in der lutealen Phase nachgewiesen. In der späten folliculären Phase wurde nur noch eine geringe Proliferation in diesem Abschnitt festgestellt. Im restlichen Ovidukt sind in allen Zyklusphasen nur vereinzelt oder keine Zellteilungen vorhanden. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass keine positive Reaktion mit dem MIB-1 Antikörper bei den so genannten Basalzellen zu verzeichnen war. Eine Funktion dieser Zellen als Stammzelle wird damit sehr unwahrscheinlich (Steinhauer, 2002).

Beim Schwein wird eine erhöhte Proliferationsrate im Eileiterepithel im Proöstrus beschrieben.

Das Ki-67 Antigen ist ein nukleäres Protein, das nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus auftritt. Antikörper gegen das Ki-67 Protein zeigen Zellen an, die mitotisch aktiv sind (Gerdes et al., 1984). Die Expression des Ki-67 Antigens beginnt mit Ende der G<sub>1</sub>-Phase, ist während der S-Phase und der G<sub>2</sub>-Phase kontinuierlich zunehmend und erreicht ihr absolutes Maximum in der Mitose. Nach Ablauf der Mitose wird das Protein umgehend abgebaut und ist in der G<sub>0</sub>- als auch in der frühen G<sub>1</sub>-Phase nicht mehr nachzuweisen. Der Name Ki-67 setzt sich zusammen aus Ki für Kiel, weil dort der erste murine monoklonale Antikörper hergestellt wurde und 67 für die Stelle auf der Zellkulturplatte, auf der der Antikörper produzierende Klon gewachsen

ist (Brown und Gatter, 1990). Cattoretti et al. (1992) stellten aus rekombinanten Teilen des Ki-67 Antigens die monoklonale Antikörperreihe MIB 1-3 her. Damit konnten proliferierende Zellen auch in Geweben der Haustiere nachgewiesen werden (Teter et al., 1995).

Mc Daniel et al. (1968) finden abgeschilferte Epithelzellen in fast allen ihrer Proben. Diese werden oft als homogene Masse im Lumen des Eileiters beschrieben. Sie vermuteten eine Desquamation und einen Ersatz dieser Zellen durch andere Epithelzellen. Im Zusammenhang mit der Epithelerneuerung beschreiben sie das Vorkommen von Zellkissen am basalen Ende der Falten. Nach ihren Beobachtungen erhöht Progesteron das Vorkommen von Protrusionen und die Epithelzelldesquamation.

### **2.1.8 Zyklische Veränderungen im Epithel des Eileiters**

Bereits 1959 untersuchte Björkman die Veränderung des Eileiterepithels im Zyklusverlauf. Er beschreibt eine glatte Oberfläche des Epithels in der folliculären Phase und eine von Zellvorwölbungen dominierte in der lutealen Phase. Auch die Mikrovilli variieren in ihrer Form. Während sie sich in der folliculären Phase in langer, dünner Gestalt präsentieren, sind sie in der lutealen Phase flacher und stumpfer und zudem in der Anzahl vermindert. Es wird vermutet, dass sie dann relativ flach erscheinen, wenn die Zellen stärkere Vorwölbungen besitzen. Des Weiteren erscheint das Epithel in der lutealen Phase kompakt, während sich die Zellzwischenräume in der folliculären Phase durch eine Flüssigkeitsansammlung weiten (Björkman, 1959).

Höhenveränderungen des Epithels im Zyklusverlauf wurden beschrieben. Lombard (1950) beschreibt detailliert eine Veränderung der Zellhöhe während des Zyklusverlaufs, welche mit dem Vorkommen von acidophilen Granula in den Zellen korreliert. Nach seinen Angaben ist das Epithel der Ampulla im Östrus am höchsten. Zu dieser Zeit kommen auch die meisten und größten acidophilen Granula vor. Im Metöstrus findet eine leichte Verminderung der Zellhöhe statt. Hier sind zwar relativ viele Granula vorhanden, sie sind aber sehr klein, weit verteilt und färben sich nur schwach an. Im Diöstrus ist die Epithelhöhe am geringsten und die acidophilen Granula werden weniger.

Auch Weeth und Herman (1952) machen übereinstimmende Angaben zu der variierenden Epithelhöhe. Im Östrus beträgt sie ca. 34  $\mu\text{m}$  und in der Zyklusmitte nur noch 18  $\mu\text{m}$ .

Weiter konnten Mc Daniel et al. (1968) zeigen, dass Rinder, die mit Östrogenen behandelt wurden das höchste Epithel aufweisen. Diese Höhe nimmt nach Progesterongaben wieder

deutlich ab.

Nach den Angaben von Yaniz et al. (2000) erreicht das Epithel allerdings schon im Proöstrus die maximale Höhe, die bereits im Östrus wieder abnimmt.

Zu den Anteilen der sekretorischen und zilientragenden Zellen am Oberflächenepithel in den verschiedenen Zyklusphasen gibt es mehrere Untersuchungen, die zum Teil unterschiedliche Ergebnisse liefern.

Abughrien und Dore (2000) untersuchten elektronenmikroskopisch bei einer mit Östrogen behandelten und einer Kontrollgruppe von Rindern die Ziliogenese im Eileiter.

Der Anteil zilientragender Zellen ist demnach in der Ampulla im Östrus am höchsten und beträgt ca. 61 % bei der Kontrollgruppe und ca. 64 % bei der mit Östrogen behandelten Gruppe. Bis zum Tag 7 des Zyklus sinkt die Anzahl zilientragender Zellen um ca. 15 %. Östrogenabhängige Zilienbildung wird auch beim Schwein postuliert (Nayak et al., 1976).

Auch Abe und Oikawa (1993a) finden beim Rind in der Ampulla und den Fimbrien in der lutealen Phase weniger zilientragende und mehr sekretorische Zellen als in der folliculären Phase. Sie vermuten, dass die Abnahme der zilientragenden Zellen an der Oberfläche mit der Verminderung der Epithelhöhe der zilientragenden Zellen in der lutealen Phase zusammenhängt. In der folliculären Phase dagegen überragen die Zilien die sekretorischen Zellen deutlich und sind dadurch gut sichtbar. Im Isthmus und der UTJ finden viele Autoren übereinstimmend keine Protrusionsbildung oder zyklische Veränderung der Zilienanzahl (Abe und Oikawa, 1993a; Abughrien und Dore, 2000; Björkman und Fredricsson, 1961; Lombard, 1950). Im Gegensatz zu Abe und Oikawa (1993a) sowie Abughrien und Dore (2000) werden in anderen Untersuchungen auch in der Ampulla des Rindereileiters keine zyklischen Veränderungen der Zilienanzahl festgestellt (Björkman und Fredricsson, 1961; Lombard, 1950). Yokoki et al. (1982) beobachteten einen Zilienverlust ausschließlich in den Fimbrien während des Diöstrus. Yaniz et al. (2000) stellten eine Abnahme der zilientragenden Zellen in den basalen Faltenregionen der Ampulla und des Infundibulums während der folliculären Phase fest.

Nach Nayak und Ellington (1977) sind die Zilien beim Rind im Östrus länger und haben geringere Tendenz zusammenzukleben als in den anderen Zyklusstadien.

Bei vielen Tierarten wurde eine Verminderung der Zilienanzahl und ihrer Motilität in der lutealen Phase beschrieben (Hafez, 1987; Hunter, 1988; Nilsson, 1969; Odor und Augustine, 1995; Sawyer et al., 1984). Beim Menschen werden Zilienverluste in der lutealen Phase und Zilienregeneration in der folliculären Phase bei ca. 10-12 % der zilientragenden Zellen festgestellt (Verhage et al., 1979). Die höchste Anzahl zilientragender Zellen wird periovulatorisch

beschrieben (Donnez et al., 1983). Insbesondere beim Hund sind die Zilienverluste sehr deutlich (Verhage et al., 1973a). Zudem können qualitative Veränderungen der Zilien während des Zyklus beobachtet werden. Danach erscheinen die Zilien in der späten sekretorischen Phase aufrechter und stärker beweglich (Gaddum-Rosse und Blandau, 1973).

Die in 2.1.3 bereits kurz erwähnten Vorwölbungen des Epithels werden Protrusionen genannt und sind ebenfalls zyklischen Schwankungen unterworfen. In der englischsprachigen Literatur werden sie oft als „blebs“ bezeichnet. Sie können kernhaltig sein, was schon 1959 von Björkman beschrieben wurde. Später wurden drei verschiedene Arten von Protrusionen unterschieden, die abhängig vom Zyklusstadium auftreten:

1. Vorwölbungen der Zellspitze mit intakten Organellen
2. Vorwölbungen, die den Zellkern enthalten
3. Vorwölbungen, die Sekretgranula enthalten, welche merokrin sezerniert werden (Schmidt-Barth, 1981).

Die mit Östrogen behandelten Rinder und die sich im Östrus befindenden Kühe weisen an der Oberfläche der nicht zilientragenden Zellen kleine Vorwölbungen des Zytoplasmas auf („domes“). Diese Zellen sind stärker gefärbt, aber schmaler als die zilientragenden Zellen. Die mit Progesteron behandelten oder sich in der lutealen Phase befindenden Tiere zeigen im Epithel der Ampulla große Protrusionen, die Kerne oder Kernteile enthalten. Diese Zellvorwölbungen sind oft nur durch schmale Zytoplasmabrücken mit dem Epithel verbunden (Mc Daniel et al., 1968). Auch Lombard (1950) beschreibt im Proöstrus große, keulenförmige Protrusionen, die ebenfalls nur dünne Zytoplasmaverbindungen mit ihren Zellen aufweisen. Oft weisen die Zellen pyknotische Kerne auf. Im Östrus und im Metöstrus treten nur selten kleine, unscheinbare Protrusionen auf, die intakte Kerne enthalten. Im Diöstrus ist die Protrusionsbildung am stärksten und gleicht der im Proöstrus. Es kommen jetzt freie Zellen im Lumen vor sowie granuläres Material, das in einer Schicht das Epithel bedeckt. Die Zellen, bei denen Protrusionen vorkommen sollen Degenerationserscheinungen zeigen (Lombard, 1950).

Die Vorwölbungen der sekretorischen Eileiterepithelzellen werden bei den in der Literatur bereits beschriebenen Spezies beobachtet, z.B. beim Mensch (Patek et al., 1972a), beim Pavian (Odor und Augustine, 1995), beim Hund (Sawyer et al., 1984; Steinhauer, 2002) bei der Ziege (Abe et al., 1999) und bei der Ratte (Reeder und Shirley, 1999; Shirley und Reeder, 1996).

Insbesondere beim Hund sind die zyklischen Veränderungen im Epithel aufgrund der Zykluslänge von mindestens 6 Monaten sehr deutlich zu beobachten. In der langen anöstrischen Pha-

se ist das Epithel inaktiv und undifferenziert. Es erscheint sehr flach und der Anteil der zilientragenden Zellen beträgt in der Ampulla nur ca. 1 %. Mit beginnendem Östrogeneinfluß in der frühen folliculären Phase verändern sich die Epithelzellen, um in der späten folliculären Phase (Östrus) ihr maximales Volumen und Höhe zu erreichen. Der Anteil der zilientragenden Zellen beträgt dann ca. 60 %, die Zellkerne liegen nun apikal und haben deutliche Nukleoli. Im Östrus sind die Mikrovilli am längsten. Der supranukleär gelegene Golgi-Apparat der Epithelzellen zeigt die stärkste Entwicklung und besteht aus vielen Zisternen. Die Anzahl der Mitochondrien und die Menge des rER ist erhöht.

Der Eileiterdurchmesser ist im Proöstrus dreimal so groß wie im Anöstrus. Dies ist wahrscheinlich unter anderem durch die Ödematisierung der Lamina propria verursacht. Im Metöstrus kommt es zu einer Abstoßung der Zilien. Der Anteil der zilientragenden Zellen beträgt nunmehr nur noch ca. 30 %. Zudem verlieren die Epithelzellen ihre stark isoprismatische Gestalt. Beim Hund findet die Abstoßung der Zilien innerhalb von 6-9 Tagen in der Form statt, dass die Zilien in Büscheln an ihrer Basis abgetrennt und dann resorbiert werden (Sawyer et al., 1984).

Bei der Ratte hingegen wird die Bildung von membranumgrenzten Zilienpaketen beschrieben, die dann von der Zelle abgeschnürt werden. Die Zilien werden demnach bei der Ratte nicht resorbiert. Dies könnte damit zusammenhängen, dass bei dieser Spezies der Zyklus besonders kurz ist. Auch in anderer Hinsicht scheint das Rattenovidukt nicht mit dem anderer Spezies vergleichbar zu sein. Eine Östrogengabe zum Beispiel wirkt sich nicht stimulierend aus. Zur Zeit der Ovulation wird die geringste Anzahl zilientragender Zellen beschrieben und im Diöstrus die höchste. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass bei der Ratte sekretorische und zilientragende Zellen ineinander übergehen können (Reeder und Shirley, 1999).

Die Sekretion im Eileiter erreicht ihre höchste Aktivität zur Ovulation. Zuvor wird ein maximales Volumen des Golgi-Apparates sowie die größte Menge an dilatiertem rER und Polyribosomen verzeichnet (Nayak und Ellington, 1977; Urhin und Kliment, 1977). Die Zellhöhe variiert demnach abhängig von der sekretorischen Aktivität (Weeth und Herman, 1952).

Eine nur leichte Vermehrung der Granula in der folliculären Phase beschreiben Björkman und Fredricsson (1961). Sie stellen allerdings eine Strukturveränderung der Granula fest. Während diese in der lutealen Phase noch klein und dicht sind, werden sie unter Östrogeneinfluss in der folliculären Phase größer und heller. Obwohl die Granula basophil sind und eine positive Periodic-Acid-Schiff (PAS) Reaktion zeigen, enthalten sie nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen kein Glykogen. Björkman und Fredricsson (1961) beobachteten außerdem die

Fusion von Vesikel- und Zytoplasmamembran. Sie folgerten daraus, dass die Sekretion im Eileiter merokrin erfolgt. Auch Eriksen et al. (1994) beobachteten in allen Segmenten gleichermaßen das Freiwerden des Granulainhaltes aus der Zelle durch Exozytose. Die unregelmäßigen Granula beinhalten zwei verschieden dichte Inhalte. Innen erscheint das Material amorph, außen membranös gegliedert. Die meisten sekretorischen Granula kommen in der durch Östrogen dominierten Phase in Ampulla und Isthmus vor. Die Lokalisation der Granula in der Zelle ist jedoch variabel. So treten sie im Infundibulum vermehrt supranukleär, in der Ampulla eher in der Mitte der Zelle und im Isthmus apikal auf. Dieses Verteilungsmuster ist unter Progesteroneinfluß nicht mehr vorhanden (Eriksen et al., 1994). Ebenso findet Lombard (1950) im Östrus die größten und am intensivsten gefärbten Granula. Am zahlreichsten kommen diese am 2. Tag des Postöstrus vor. Sie sind lediglich in der Ampulla und in ampullanahen Isthmusbereichen zu finden. Am 5. Zyklustag gibt es nur noch wenige, schwach gefärbte Granula. In den späteren Zyklusstadien lassen sich keine Granula mehr nachweisen. Ab dem Tag 17 nimmt ihre Anzahl und die Färbintensität wieder zu (Lombard, 1950).

Abe et al. (1993b) untersuchten immunhistochemisch die Lokalisation des ovidukt-spezifischen-Glykoproteins (OSG) und fanden, dass es, wie auch die sekretorischen Granula, im supranukleären Zytoplasma lokalisiert ist. Die immunhistochemische Reaktion ist in der folliculären Phase stärker ausgeprägt als in der lutealen Phase. Sie ist im Isthmus allgemein schwächer als in der Ampulla. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die OSG positiven Granula unterschiedliche Größe, Form und Dichte aufwiesen (Abe et al., 1993b).

Rüsse und Liebich (1979) erklären die unterschiedlichen Formen der Granula als verschiedene Reifestadien. Diejenigen, die innen amorphes und außen lamelläres Material aufweisen, sind danach die reifsten Granula. Diese Struktur der sekretorischen Granula ist ihrer Meinung nach spezifisch für Wiederkäuer. Die Interpretation der verschiedenen Reifestadien wird jedoch von Eriksen et al. (1994) in Frage gestellt. Sie finden Granula, die noch in Beziehung zu den Diktyosomen stehen und bereits in diesem frühen Stadium ihrer Entwicklung einen lamellären Aufbau haben.

Sehr interessant ist die Feststellung von Wordinger et al. (1977), dass Kühe, die bereits mehrmals gekalbt haben mehr elektronendichte sekretorische Granula im Zytoplasma aufweisen als Färsen. Gelegentlich treten im Epithel der Ampulla auch Lipidtropfen auf. Diese befinden sich verteilt im gesamten Zytoplasma von zilientragenden und sekretorischen Zellen. Ein Beweis, dass sie sezerniert werden, wurde bisher nicht erbracht. Ihr Auftreten könnte auch metabolische Gründe haben, evtl. werden sie sogar aus dem Lumen resorbiert (Wordinger et al., 1977).

## 2.2 Eileiterepithelzellkultur

### 2.2.1 Isolierung von Eileiterepithelzellen, Anzucht und Kulturmodelle

Isolierung von Eileiterepithelzellen:

Die Eileiterepithelzellen können aus dem Gewebeverband nach verschiedenen Methoden isoliert werden. Die mechanische Isolierung durch Ausstreifen oder Ausschaben des Ovidukts wird von einigen Autoren (van Langendonck et al., 1995; Walter, 1995) mittlerweile bevorzugt, da sie leicht durchzuführen, verlässlich und kostengünstig ist. Zudem treten nicht so starke Zellschädigungen wie bei der enzymatischen Isolierung mit Enzymen wie z.B. Kollagenase oder Trypsin auf.

Beim Ausstreifen lösen sich die Zellen von der Basalmembran, ohne dass die Lamina propria mucosae Schaden nimmt (Walter, 1995). Die Methode des mechanischen Ausschabens wird am längs geöffneten Eileiter durchgeführt. Dazu gibt es Untersuchungen am humanen Eileiter (Takeuchi et al., 1991). Darin wird beschrieben, dass diese Methode zu einer starken Kontamination der Kultur mit Fibroblasten führt, die den Epithelzellrasen überwuchern. Aus diesem Grunde wird dort eine 30 minütige Inkubation mit 1%iger Kollagenase zur Isolierung bevorzugt, um einen hohen Reinheitsgrad der Zellkultur zu erreichen.

Kultivierung der Eileiterepithelzellen:

Die bovinen Eileiterepithelzellen werden bei 37-39°C kultiviert. Dies ist wichtig um die Möglichkeit einer Kokultur mit Embryonen zu gewährleisten, da diese eine Umgebungstemperatur von 39°C benötigen, um sich entwickeln zu können (Walter, 1995).

Die Zellen bilden sowohl auf Glas als auch auf kollagenbeschichteten oder unbeschichteten Membranen einen Zellrasen (Walter, 1995). Dieser erreicht eine Konfluenz abhängig von der Unterlage und der Isolierungsmethode. Unter Konfluenz versteht man die Entstehung eines geschlossenen Zellrasens (Wiesner und Ribbeck, 2000). Konfluenz wird z.B. auf Glasplättchen nach 7 (Walter, 1995), auf Membraninserts nach 2-3 (Gomez und Uria, 1997) und auf Matrigel nach 15-20 (Joshi, 1991) Kulturtagen erreicht. Im Vergleich erreichen enzymatisch isolierte Zellen ca. 3 Tage früher eine Konfluenz als mechanisch isolierte auf gleicher Unterlage. Das könnte damit zusammenhängen, dass die enzymatisch isolierten Zellen bereits als Einzelzellen in der Suspension vorliegen (Sattar et al., 1999).

Meistens wird dem Kulturmedium 5%iges Serum zugegeben. Van Langendonck (1995) stellte jedoch fest, dass die adhärenenten bovinen Eileiterepithelzellen (BOEC) bis zu 7 Tagen ohne

Zugabe von Serum in einem funktionellen Stadium erhalten werden können. Allerdings zeigen sich hierbei elektronenmikroskopisch einige degenerative Anzeichen, wie z.B. das Fehlen des Golgi-Apparates und des granulierten endoplasmatischen Retikulums (rER) sowie eine Akkumulation von Intermediärfilamenten. Humane Eileiterepithelzellkulturen zeigen ohne Serumzugabe keine Adhärenz und damit auch kein Wachstum (Takeuchi et al., 1991).

**Tabelle 1: Methoden für die Isolation und Kultur von bovinen Eileiterepithelzellen**

Autor	Isolierung	Regionen	Medium	Serum	Zugaben	Substrate
Witkoska (1976)	mech.	Isthmus und Ampulla	Parker-199	Kälber-Serum (15%)	--	Glassplättchen
Witkoska (1979a,b)	mech.	Isthmus und Ampulla	Parker-199	Kälber-Serum (15%)	(E2, P, T, LH)	Glassplättchen
Joshi (1988)	enzym.	Isthmus und Ampulla	DMEM/F12	FCS (10%), Pferde-S. (10%)	Insulin, Transferrin, Selenium	Plastik
Joshi (1991)	enzym.	Isthmus und Ampulla	DMEM/F12	Pferde-S. (10%)		Matrigel
Eyestone & First (1989)	enzym. und mech.	gesamter Eileiter	Ham's F10, TCM-199	FCS (10%)	--	Plastik
Hishinuma et al. (1989)	enzym.	Isthmus und Ampulla	DMEM/F12	Kälber-Serum (10%)	--	Plastik
Ouhibi et al. (1989)	enzym.	keine Angabe	Menzo B2 Medium	FCS (7,5%)	Lactalbumin, Hydrolysate, Serotonin	Plastik
Ouhibi et al. (1991)	enzym.	fetaler Eileiter	Menzo B2 Medium	FCS (7,5%)		Plastik
Ellington et al. (1990)	enzym.	keine Angabe	Ham's F10	FCS (10%)	Insulin, EGF, Transferrin, Selenium	Plastik
Schmidt et al. (1990)	mech.	Isthmus und Ampulla	RPMI-1640	FCS (10%)	--	Plastik
Hoshi et al. (1992)	enzym.	Ampulla und AIJ	DMEM/F12	FCS (2-10%)	EGF, TGF-b	Kollagenbeschichtetes Plastik
Thibodeaux et al. (1992a)	enzym.	keine Angabe	TCM-199, CMRL-1066, MenzoB2M, Ham's F12	FCS (10%)	Serotonin	Plastik
Tiemann & Hansen (1995)	enzym. und mech.	gesamter Eileiter	MEM	FCS (10%)	--	Matrigel beschichtetes Plastik
van Langendonck et al. (1995)	mech.	Ampulla und AIJ	TCM-199	FCS (10%) oder serumfrei	--	Plastik
Walter (1995)		Isthmus und Ampulla	TCM-199	FCS (10%)	--	Glassplättchen, Polycarbonmembran

(Tabelle übernommen von Abe (1997), abgewandelt)

Abkürzungen: E<sub>2</sub>: Östradiol E<sub>2</sub>-β  
P: Progesteron  
T: Testosteron  
LH: Luteinisierendes Hormon  
FCS: Fetales bovines Serum

**Kulturmodelle:**

Bei der Kultivierung auf permeablen Membranen wird neben morphologischen Unterschieden (siehe 2.3.3) basal ein signifikant niedrigerer pH-Wert festgestellt als im apikalen Medium (Gomez und Uria, 1997).

Durch eine unterschiedliche Verteilung von Glukose, Laktat und anderen Ionen zwischen dem apikalen und basalen Kompartiment entsteht eine Potentialdifferenz (Cox und Leese, 1997).

Dabei ist der apikale Raum negativ gegenüber dem basalen Raum. Auch für K<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup> ent-

stehen kleine aber konstante Gradienten, die der In-vivo-Situation entsprechen.  $K^+$  ist z.B. in der oviduktalen Flüssigkeit bis zu 4-mal höher konzentriert als im Serum und ist in Kultur ebenfalls im apikalen Medium erhöht. Es wird angenommen, dass  $K^+$  eine Rolle für den Erhalt der Fertilität der Spermien und für die Entwicklung von Präimplantationsembryonen spielt. Der Glukosekonsum und die Laktatproduktion sind im basalen Kompartiment höher als im apikalen. Dies dürfte ebenfalls der In-vivo-Situation entsprechen, weil eine Zufuhr von Nährstoffen und ein Abtransport von Metaboliten nach basal über die Kapillaren der Lamina propria des Eileiters stattfindet (Cox und Leese, 1997).

Neben statischen Kulturmodellen etablierten Reischl et al. (1999) ein Perfusionskultursystem für adhärenente bovine Eileiterepithelzellen. Bei diesem System wird ein kontinuierlicher Zufluß von Nährstoffen und ein Abtransport von Metaboliten gewährleistet, der pH-Wert des umgebenden Mediums wird dadurch ebenfalls konstant gehalten. Dieses Modell ermöglicht eine bessere Erhaltung der Zellen. So wird unter anderem die Zellpolarität und der Zilienbesatz aufrechterhalten, die Ausbildung von Zellorganellen verbessert und eine höhere Transkription von eileiterspezifischen Genen (OSG 85-97 und Oviduktin-4) erreicht.

### **2.2.2 Charakterisierung der kultivierten Eileiterepithelzellen**

Die frisch isolierten Eileiterepithelzellen schwimmen frei im Medium oder hängen in kleinen Aggregaten zusammen. Oft bilden sie Bänder, in denen die Epithelzellen aufgereiht erscheinen. Nach ca. 24 Stunden Kultivierung ordnen sie sich zu bläschenförmigen Gebilden (Sphäroiden) um, in denen die apikale, zilientragende Zelloberfläche nach außen gerichtet ist. Nach ca. 72 Stunden Kulturdauer beginnen sich die Zellen an der Unterlage anzuheften. Sind sie einmal adhärenent geworden, vermindert sich die Aktivität der Zilien.

Nach weiteren 24 Stunden beginnen sie sich intensiv zu teilen und nach einigen Tagen hat sich ein konfluenter Zellrasen gebildet. Seine Zellen weisen keine Zilien mehr auf (Takeuchi et al., 1991; Walter, 1995). In diesem Stadium wird die Kultur Primärkultur genannt. Es handelt sich um frisch isolierte Zellen, die noch nicht passagiert worden sind (Wiesner und Ribbeck, 2000).

In anderen Untersuchungen an humanen Zellen sind Zilien in der Primärkultur bis zum Tag 20 sichtbar (Kervancioglu et al., 1994). Sattar et al. (1999) beschreiben ebenfalls ziliäre Aktivität bei adhärenenten Kulturen. Wie lang diese anhält, gibt er allerdings nicht an. Einig sind sich jedoch alle genannten Autoren darin, dass die Eileiterepithelzellen in den Subkulturen keine

Zilien mehr aufweisen. Es ist nicht geklärt, ob die ursprünglich zilientragenden Zellen ihre Zilien verlieren und dedifferenzieren, oder ob alle zilientragenden Zellen zugrunde gehen (Takeuchi et al., 1991; Walter, 1995).

Ungefähr die Hälfte der Zellaggregate erlangt keine Adhärenz. Sie werden zu frei schwimmenden Vesikeln, deren Zellen bis zum Ende der Kulturdauer (hier am Tag 12) Zilien tragen (Walter, 1995). Es handelt sich dabei um eine Art Suspensionskultur. Sie ist dadurch charakterisiert, dass die Zellen durch leichte Bewegung am Absetzen gehindert werden (Wiesner und Ribbeck, 2000). Diese Bewegung erzeugen die Sphäroiden selbst durch ihren Zilienschlag und die daraus resultierende Rotationsbewegung (Walter, 1995). Während sich die Zellen in Suspension nicht teilen, zeigen ca. 59 % der adhärennten Zellen am Tag 7 der Kultur eine mitotische Aktivität und 1-3 % weisen mitotische Kernfiguren auf (nachgewiesen mit dem MIB-1 Antikörper) (Walter, 1995).

In Primärkulturen von humanen Eileiterepithelzellen, die enzymatisch isoliert wurden, proliferieren die Zellen 5-20 Tage und überleben ca. 4-5 Wochen (Takeuchi et al., 1991), bzw. vermehren sich 8 Tage lang und überleben weitere 10 (Sattar et al., 1999), solange sie nicht subkultiviert werden. Je öfter die Zellen jedoch passagiert werden, desto langsamer wachsen sie und bilden dann nur noch lückenhafte Zellrasen aus. Sie erlangen in der 3. Generation keine Konfluenz mehr und zeigen in der 4. Generation keinerlei Wachstum (Sattar et al., 1999; Takeuchi et al., 1991). Bei den mikroskopischen Untersuchungen mit höheren Vergrößerungen wird deutlich, dass die subkultivierten Zellen eine granulierte Zelloberfläche und viele Vakuolen aufweisen. Mechanisch isolierte Zellen hingegen überleben bis zu 8 (Sattar et al., 1999) bzw. 11 (Kervancioglu et al., 1994) Passagierungen und scheinen dabei sogar Anzeichen von Regeneration nach der Subkultivierung zu zeigen. Allerdings gehen sowohl die Primär- als auch die Subkulturen mit geringeren Zellzahlen einher (Sattar et al., 1999). Kervancioglu (1994) legt die Lebensspanne seiner mechanisch isolierten Zellen sogar auf 42-60 Tage fest. Allerdings pflanzte er zur Zellgewinnung Gewebestückchen aus und entfernte diese nach 3 Kulturtagen.

#### Zellmorphologie:

Die Zellen eines konfluenten Monolayers sind flach und von epithelialer Natur. Sie tragen mitunter sehr lange Mikrovilli an ihrer apikalen Zelloberfläche (Bongso et al., 1989a; Dickens et al., 1996; Henriksen et al., 1990; Oubibi et al., 1989; Thibodeaux et al., 1991). Mittlerweile besteht die einstimmige Meinung, dass permeable Membranen als Unterlage förderlich für die Polarisierung und Aufrechterhaltung eines differenzierten Zustands der Zellen sind. Auf Kol-

lagen erhalten die Zellen ihre Polarität bis zu 14 Tage bei (Cox und Leese, 1997). Van Langendonck (1995) und Gomez und Uria (1997) beschreiben Anzeichen verminderter zellulärer Aktivität, wie z.B. lipidfreie Vakuolen und eine verminderte Anzahl von Mitochondrien bei Zellen, die auf Plastik kultiviert wurden.

Bei der Kultivierung mit Membran-Inserts finden Gomez und Uria (1997) den höchsten Organellenreichtum und damit die geringste Dedifferenzierung der Zellen verglichen mit anderen Kulturunterlagen. Auf diese Art kultivierte Zellen bilden allerdings einen Polylyer aus, in denen die Zellen geschichtet aber noch flacher als im Monolayer sind. Zellverbindungen lassen sich bei allen Kulturbedingungen nachweisen.

Die adhärennten Zellen eines 7 Tage alten Zellrasens haben eine polygonale Form mit großen, runden, zentralen Zellkernen, die ein lockeres Chromatin beinhalten (Sattar et al., 1999; Takeuchi et al., 1991; Walter, 1995). Mit Öl-Rot können bei ihnen Lipidtropfen und mit der PAS-Reaktion Glykogen nachgewiesen werden. Mit der Alcianblaufärbung bei pH 2,5 werden saure Glykoproteine in Gruppen von Zellen identifiziert, die von großen nicht reaktiven Zellarealen umgeben sind. Im Eileiterepithel ex vivo konnten mit diesen Methoden hingegen keine größeren Mengen an Lipiden und Glykogen festgestellt werden. Im Isthmus allerdings sind Diastase-resistente, PAS-positive Granula im apikalen Zytoplasma der sekretorischen Zellen zu finden (Walter, 1995).

Einspanier et al. (2001) fanden heraus, dass länger kultivierte BOEC eine stärkere Expression von Caldesmon als frisch isolierte Zellen zeigen. Caldesmon wird in Zusammenhang mit intrazellulären Bewegungen gebracht (Hegmann et al., 1991). Weiter spielt es eine Rolle bei Veränderungen der Zellform und des Zytoskeletts bei Mitosen (Yamashiro et al., 1991; Yamashiro et al., 1990) und der mikrofilamentären Organisation der Zelle (Yamashiro-Matsumura und Matsumura, 1988). Es ist in verschiedenen Kulturzellen an so genannten Stressfasern gleichmäßig angeordnet. Diese Stressfasern bestehen aus gebündelten Aktinfilamenten und bewirken eine Verbindung der Kulturzellen untereinander und eine Verankerung am Kulturuntergrund (Owada et al., 1984).

#### Identifizierung der Kulturzellen:

Die Antikörper gegen die verschiedenen Zytokeratine dienen schon seit langem als Differenzierungsmarker für epitheliale Zellen. Durch seinen Nachweis kann der Gehalt an Epithelzellen einer angezüchteten Zellkultur nachgewiesen werden (Joshi, 1988; Sattar et al., 1999; Takeuchi et al., 1991; Walter, 1995). Auch Kervancioglu (1994) wies mit dem Antikörper gegen Zytokeratin eine 98 %ige Reinheit seiner Primärkultur nach. Er pflanzte Gewebestücken aus

und entfernte diese nach 3 Kulturtagen. Am Tag 40 der Anzucht erreichte er in der Subkultur noch einen Reinheitsgrad von 80 %.

Das Eileiterepithel exprimiert die Zytokeratine (ZK) 7, 8, 18 und 19. Weiter wurde eine Expression von ZK 17 bei einer Subpopulation von sekretorischen Eileiterepithelzellen nachgewiesen (Comer et al., 1998a). In humanen Epithelien wurde das ZK 17 mit Basalzellen assoziiert (Trojanowsky et al., 1989).

Einige Zellen der Eileiterepithelzellkulturen reagieren positiv mit dem Antikörper gegen Vimentin (Abe, 1997; Takeuchi et al., 1991). Desmin kann in BOEC nicht nachgewiesen werden (Abe, 1997).

Eine weitere Möglichkeit der Charakterisierung von Eileiterzellen bietet das S100 Protein. Es wurde von Moore (1965) isoliert und als spezifisches Eiweiß im Nervensystem gedeutet. Es handelt sich dabei um ein saures Protein, welches Kalzium bindet und nur in gesättigtem Ammoniumsulfat bei neutralem pH lösbar ist. Aus diesem Grund wurde es S100 genannt. Später wurde das S100-Protein auch außerhalb des Nervensystems nachgewiesen. Kamiya et al. (1989) untersuchten die Lokalisation des S100 im Eileiter des Rindes. Es konnte unabhängig vom Zyklustag in den Epithelzellen der Ampulla, des Isthmus und des Infundibulums nachgewiesen werden. Seine funktionelle Bedeutung ist nach wie vor unklar.

Frei schwimmende Zellaggregate (Sphäroiden) von Eileiterepithelzellen exprimieren das S100 Protein weiterhin, wohingegen die Zellen eines Monolayers keine positive Reaktion mehr mit dem Antikörper zeigen. Dies könnte ein Hinweis auf eine Dedifferenzierung der adhärennten Zellen sein (Walter und Miller, 1996).

Mittels des Antikörpers gegen ChromograninA können zilientragende Zellen selektiv bestimmt werden. Das ChromograninA wurde ursprünglich in sekretorischen Granula von endokrinen und neuroendokrinen Zellen identifiziert (Huttner et al., 1991). Es hat eine hohe Kapazität  $\text{Ca}^{2+}$  zu speichern aber eine niedrige Affinität zu  $\text{Ca}^{2+}$ . Zudem weist es eine Homologie zu anderen Kalzium bindenden Proteinen auf (Gorr et al., 1988). Später wurde vermutet, dass Chromogranin die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration über einen Kanal zu steuern vermag (Yoo et al., 2000), und dass durch  $\text{Ca}^{2+}$  die ziliäre Aktivität stimuliert wird (Verdugo et al., 1977). Dies könnte erklären, warum ChromograninA im Eileiter selektiv in zilientragenden Zellen am apikalen Zellpol lokalisiert ist (Steffl et al., 2003). ChromograninA und der Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ), der ebenfalls an der apikalen Membran der zilientragenden Zellen lokalisiert ist, sollen gemeinsam für den Zilienschlag verantwortlich sein. ChromograninA hat demnach die Funktion eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichers und  $\text{InsP}_3\text{R}$  ist ein  $\text{Ca}^{2+}$  Kanal, der für dessen Freisetzung verantwortlich ist (Steffl et al., 2003).

Comer (1998a) konnte mit Hilfe zweier spezifischer Antikörper zilienträgende und sekretorische Zellen in der Kultur differenzieren. Das HMFG-2 (Human Milk Fat Globule-2) reagiert positiv mit dem Zytoplasma der sekretorischen Zellen. Ein anderer Antikörper, der LhS28 erkennt hingegen ein Antigen der Basalkörperchen und fungiert somit als Marker von differenzierten, zilienträgenden Zellen. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass eine positive Reaktion mit dem MIB-1 Antikörper nur bei den mit HMFG-2 reagierenden Zellen entdeckt wurde. Daraus lässt sich schließen, dass nur die sekretorischen Zellen eine proliferative Aktivität aufweisen (Comer et al., 1998b).

### **2.2.3 Ultrastrukturelle Morphologie der kultivierten Eileiterepithelzellen**

Elektronenmikroskopische Studien wurden unter anderen bereits von bovinen (Gomez und Uria, 1997; Walter, 1995) und von humanen (Kervancioglu et al., 1994; Takeuchi et al., 1991) Eileiterepithelzellen veröffentlicht. Kervancioglu et al. (1994) haben in ihren Untersuchungen polarisierte Primärkulturen mit nicht polarisierten Subkulturen transmissionselektronenmikroskopisch verglichen.

Adhärente Eileiterepithelzellen sind über Desmosomen miteinander verbunden (Walter, 1995) (Takeuchi et al., 1991). Kervancioglu et al. (1994) beschreiben, dass in einer Sekundärkultur zwischen benachbarten Zellen weniger Desmosomen ausgebildet werden als in der Primärkultur. Die Zellform ist in der Primärkultur säulenförmig, der Zellkern liegt basal. In der Sekundärkultur erscheinen die Zellen hingegen flach. Weiter sind Lipidtropfen im Zytoplasma vorhanden (Kervancioglu et al., 1994).

An der apikalen Zelloberfläche weisen adhärente Kulturzellen weiterhin zahlreiche Mikrovilli mit einer ausgeprägten Glykokalix auf (Takeuchi et al., 1991; Walter, 1995). Kervancioglu et al. (1994) beschreiben das Vorkommen von Mikrovilli lediglich in der Primärkultur.

An der lateralen Zellmembran schieben sich Falten und Einbuchtungen fingerförmig ineinander. Auch „tight-“ und „adhering junctions“ sind zwischen benachbarten Zellen vorhanden. Nach 7 Tagen in Kultur konnten weder Zilien noch Basalkörperchen nachgewiesen werden (Takeuchi et al., 1991; Walter, 1995).

Über die Präsenz von sekretorischen Granula gibt es unterschiedliche Meinungen. Während Walter (1995) in einer 7 Tage alten Kultur keine Granula findet, beschreiben Takeuchi et al. (1991) zahlreiche Granula in den Epithelzellen nach 10-tägiger Kulturdauer. Kervancioglu et al. (1994) finden sogar in einer Sekundärkultur noch viele sekretorische Granula. In der polari-

sierten Primärkultur sind diese hauptsächlich im apikalen Zytoplasma lokalisiert (Kervancioglu et al., 1994).

Mikrofilamente sind im gesamten Zytoplasma mehr oder weniger gleichmäßig verteilt. Sie häufen sich jedoch in der Nähe der apikalen und basalen Membran (Walter, 1995).

Während Walter (1995) und Kervancioglu et al. (1994) Organellenreichtum der Kulturzellen beschreiben, finden Takeuchi et al. (1991) neben dem rER nur sehr wenige Organellen. Nach Walter (1995) beinhalten die meisten Zellen Glycogenansammlungen. Die Zellkerne sind unauffällig (Walter, 1995). Takeuchi et al. (1991) beschreiben sie als stark euchromatisch.

Die Zellen weisen pinocytotische Vesikel sowohl apikal als auch basal auf (Walter, 1995).

Frei schwimmende Zellaggregate haben unterschiedliche Größen. Die Zellen sind einschichtig und polarisiert. Ihre ehemals apikale Zelloberfläche zeigt nach außen. Zwischen benachbarten Zellen sind apikal Schlussleisten ausgebildet. Lateral sind die Zellzwischenräume weiträumig, und werden von fingerförmigen Ausstülpungen der Zellen durchzogen. Die Differenzierung in zilientragende und sekretorische Zellen bleibt erhalten. Eine leichte Tendenz zur Dedifferenzierung kann nach 12 Tagen in Kultur beobachtet werden. Die Anzahl der zilientragenden Zellen und der sekretorischen Granula nimmt ab (Walter, 1995).

#### **2.2.4 Hormonelle Einflüsse auf kultivierte Eileiterepithelzellen**

Hoshi und Oikawa (1992) fanden heraus, dass der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) allein oder in Kombination die Proliferation von BOEC fördern, während der „transforming growth factor- $\beta_1$ “ (TGF- $\beta_1$ ) sie stark hemmt. TGF- $\beta_1$  blockiert zudem die Wirkungen von EGF und FGF. Bovines Insulin, bovines Transferrin, Östradiol-17- $\beta$  (E), Progesteron (P), Follikel stimulierendes Hormon (FSH), Luteinisierendes Hormon (LH) und bovines Serumalbumin haben keinen signifikanten Einfluß auf das Zellwachstum in Kulturen (Hoshi und Oikawa, 1992).

In den Untersuchungen von Witkowska (1979) wurde demonstriert, dass Östrogene, Progesteron, Testosteron (T) und LH die Enzymaktivitäten von BOEC beeinflussen. So wird z.B. durch Östrogen und Testosteron die Biosynthese von Steroiden verstärkt und der Lipidgehalt der Zellen erhöht. Östrogen, Progesteron und LH verstärken die Aktivität der alkalischen Phosphatase und führen zur Einlagerung von Glykogen in die Zellen (Witkowska, 1979).

Takeuchi et al. (1991) untersuchten den Einfluß von EGF, FGF, Insulin, Estradiol-17 $\beta$  und Progesteron auf humane kultivierte Eileiterepithelzellen. Eine Zugabe von EGF hat anfangs

keinen Effekt auf die Kultur. Nach ca. 7 Tagen führt die EGF-Supplementation zu einem verstärkten Zellwachstum und zu einer größeren Zelldichte. Progesteron hingegen scheint eine Tendenz zur Hemmung des Zellwachstums der Eileiterepithelzellen zu haben. Die anderen Zusätze zeigen keinen Einfluß auf die Kultur (Takeuchi et al., 1991).

Comer (1998a) untersuchte den Einfluß von Östrogen auf eine Eileiterepithelzellkultur die nach seinen Angaben bereits dedifferenziert war. Die Zellen dieser Kultur reagieren positiv mit einem Marker für sekretorische Zellen (HFMG). Nach einer Östrogensupplementierung reagiert ein bestimmter Anteil Zellen mit einem Marker für zilientragende Zellen (LhS28). Daraus wird geschlussfolgert, dass Östrogen die Differenzierung einer sekretorischen Vorläuferzelle zu einer zilientragenden Zelle fördert (Comer et al., 1998a). Bereits in früheren Untersuchungen am Eileiter wurden Differenzierungsvorgänge in Zusammenhang mit Östrogen gebracht (Abe und Oikawa, 1989). Keinen Einfluss hat das Östrogen auf die Expression von Zytokeratinen und von Hormonrezeptoren (Comer et al., 1998a).

Der Plättchen aktivierende Faktor (PAF) induziert bei Eileiterepithelzellen des Hamsters einen Zilienschlag in vitro (Harper, 1989). Der PAF-Rezeptor konnte beim Rind auf der Zellmembran und im Zytoplasma nachgewiesen werden. Bei den Zellen, die einem trächtigen oder nicht trächtigen Tier des Zyklustages 2-4 entnommen wurden, ist die Reaktion stärker als bei Zellen, die den Zyklustagen 12-20 entstammen (Tiemann et al., 2001). PAF verursacht eine Erhöhung des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegels in epithelialen und stromalen Zellen des bovinen Ovidukts (Tiemann und Hansen, 1995). Die Proliferation von bovinen Eileiterepithel- und -stromazellen wird ebenfalls durch PAF gefördert (Tiemann et al., 1999).

### **2.2.5 Zelllinien von Eileiterepithelzellen**

Unter einer Zelllinie versteht man eine Zellpopulationen, die auf definiertes Ausgangsmaterial zurückzuführen ist und somit spezifische Eigenschaften besitzt. Eine permanente Zelllinie kann über sehr lange Zeit kultiviert werden (Wiesner und Ribbeck, 2000). Da Zellkulturen mit der Zeit der Dedifferenzierung unterliegen, bieten permanente Zelllinien einen Vorteil, da ihre Eigenschaften konstant erhalten bleiben. Neues Gewebe für herkömmliche Kulturen ist nicht ständig erhältlich und die Isolation häufig technisch aufwendig. Außerdem haben Primärkulturen den Nachteil, dass die Ergebnisse durch die biologische Varianz der Gewebe verschiedener Tiere stärker schwanken (Ando et al., 2000). Es wurden bereits verschiedene permanente Zelllinien von humanen oviduktalen Epithelzellen durch Immortalisation mit Viren hergestellt (Ando et al., 2000; Lee et al., 2001). Diese permanenten Zelllinien haben vor allem in Kokul-

turen mit Embryonen großen Nutzen. Die Entwicklung der Embryonen wird positiv beeinflusst. Die Eileiterepithelzellen sezernieren embryotrophe Faktoren nicht nur unter in vivo Bedingungen, sondern auch in Kultur. Zudem ist die Anzahl der Kulturzellen beim Arbeiten mit permanenten Zelllinien leicht konstant zu halten (Ando et al., 2000).

Einige Zelllinien aus dem Eileiterepithel behalten ihre in vivo Eigenschaften, wie z.B. die Expression von Zytokeratin 19 und ER $\alpha$ , über mindestens 50 Passagen bei (Lee et al., 2001). Die Expression von Zytokeratin 7 sowie das Vorhandensein von Zellverbindungen, Mikrovilli und Kinozilien (Ando et al., 2000) war nach vielen Passagen noch zu verzeichnen.

Während Ando et al. (2000) eine zilientragende Zelllinie des Eileiterepithels erstellten, exprimierten die Zellen von Lee et al. (Lee et al., 2001) das humane oviduktspezifische Glykoprotein. Dieses kann ausschließlich den sekretorischen Epithelzellen zugeordnet werden (Comer et al., 1998a).

Die Zilienbildung wird nach längerer Zeit unter Östrogenstimulation erreicht (Ando et al., 2000). Schon Comer et al. (1998a) befassten sich ausgiebig mit der Frage, ob die zilientragenden Zellen aus Zellen des sekretorischen Typs durch Differenzierung hervorgehen, oder ob sie eine eigene Zellart darstellen. Es ist nach wie vor unklar, ob die zilientragenden Zellen aus der Kultur verschwinden, weil sie nicht in der Lage sind, sich anzuheften oder ob die Zellen einen Verlust der Zilien aufweisen und somit einer Dedifferenzierung unterliegen (Ando et al., 2000).

Umezumi et al. (2003) erstellten klonale Zelllinien aus Eileitergewebe von p53-defizienten Mäusen. Dabei wurden epitheliale und fibroblastische Klone getrennt geschaffen, die alle ER $\alpha$  und PR exprimierten. In einem der epithelialen Klone konnte das Gen des oviduktspezifischen Glykoproteins der Maus identifiziert werden. Es wird durch Östrogensupplementierung stimuliert und durch Progesteron gehemmt. In anderen Klonen wird ein für zilientragende Zellen spezifisches Gen exprimiert. Beide genannten Gene treten nie im gleichen Klon auf. Das legt die Vermutung nahe, dass das Eileiterepithel aus zwei funktionell festgelegten Zellpopulationen, den zilientragenden und den sekretorischen Zellen besteht.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Untersuchungsmaterial**

Für die Untersuchungen wurden Eileiter von Kühen der Rasse Deutsches Fleckvieh verwendet. Das Gewebe wurde spätestens 20 Minuten nach der Schlachtung der Tiere auf dem städtischen Schlachthof München entnommen. Ausgewählt wurden nur Eileiter von Kühen, die keine zystischen Veränderungen an den Ovarien oder andere sichtbare pathologische Veränderungen am gesamten inneren Reproduktionstrakt aufwiesen. Zur Beurteilung der Zyklusstadien wurden makroskopische Kriterien herangezogen (Nickel et al., 1987; Rüsse und Sinowatz, 2002). Um eine zweifelsfreie Zuordnung zu den Zyklusstadien möglich zu machen, erfolgte die Probennahme nur bei eindeutigem ovariellen und uterinen Befund. Der ipsi- und contralaterale Eileiter wurden anhand des Ovarbefunds definiert.

Der zweite Teil der Proben entstammt Färsen, die mittels Brunstsynchronisation in eindeutig definierbare Zyklusstadien gebracht wurden. Die Überprüfung des jeweiligen Stadiums erfolgte hierbei mittels Sonographie des Ovars 48 bis 2 Stunden vor der Schlachtung in Intervallen. Diese Untersuchungen wurden durch die makroskopischen Befunde an Ovar und Uterus bestätigt.

**Tabelle 2: Verwendete Eileiterproben**

	Isthmus		Ampulla		Infundibulum		UTJ	
<b>Proöstrus</b>	170/98	ipsi	171/98	ipsi				
	326/03	ipsi	325/03	ipsi				
	34/03	ipsi	33/99	ipsi				
			834/03	ipsi				
			401/03	ipsi				
	204/04	ipsi	203/04	ipsi				
86/04	ipsi	87/04	ipsi					
<b>Östrus</b>	25/99	ipsi,	28/99	ipsi,				
	644/02	ipsi	642/02	ipsi,				
	616/02	ipsi	614/02	ipsi				
	473/04	ipsi	471/04	ipsi				
	472/04	contra	470/04	contra				
<b>Metöstrus</b>	203/03	ipsi	202/03	ipsi				
	495/03	ipsi	494/03	ipsi				
	519/03	ipsi	518/03	ipsi				
	859/03	ipsi	858/03	ipsi	857/03	ipsi	860/03	ipsi
	864/03	contra	862/03	contra				
	874/03	ipsi	873/03	ipsi				
	878/02	contra	877/03	contra				
<b>Diöstrus</b>	683/03	ipsi	681/02	ipsi				
	700/02	ipsi	699/02	ipsi				
	491/02	ipsi	490/02	ipsi				
	212/04	ipsi	213/04	ipsi				
			892/03	ipsi				
			887/03	contra				
<b>Früher Diöstrus (d 6)</b>			898/03	ipsi				
			903/03	contra				
<b>Trächtig (d 8)</b>			377/03	contra				

UTJ: uterotubaler Übergang  
 ipsi: ipsilateraler Eileiter  
 contra: contralateraler Eileiter

## 3.2 Untersuchungen am Eileiter ex vivo

### 3.2.1 Entnahme und Präparation der Proben

Nach der Entnahme der Eileiter wurde das umgebende Bindegewebe entfernt und das Organ in voller Länge ausgebreitet, um so die präzise Unterteilung der Segmente (Ampulla, Isthmus, Infundibulum und uterotubale Verbindung) durchführen zu können. Zur Orientierung dienten dabei der Eileiterdurchmesser sowie die Elastizität und Färbung der Wand. Am Übergang vom Isthmus zur Ampulla haben wir zur Sicherheit ca. 2 cm des Eileiters herausgetrennt und verworfen, um eine klare Trennung beider Segmente zu gewährleisten und so eindeutige Proben zu erhalten.

### 3.2.2 Fixierung und Probenaufbereitung für die Lichtmikroskopie

Die Proben der einzelnen Segmente wurden in Bouin-Lösung für die Lichtmikroskopie fixiert. Bereits am Schlachthof wurden die Proben mit einer Seitenlänge von ca. 0,5 - 1 cm zurechtgeschnitten und anschließend für 24 Stunden in Bouin-Lösung fixiert. Am folgenden Tag wurden die Proben in 70 %iges Ethanol eingelegt, welches dreimal im Abstand von 24 Stunden erneuert wurde.

Im Einbettungsautomaten (Shandon Duplex Processor, Fa. Reichert-Jung, Wien/ Österreich) erfolgte über eine aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol 80%, 96%, Isopropanol) und Xylol die Entwässerung der Proben sowie die Einbettung in Paraplast<sup>®</sup> (Roth, Karlsruhe) über eine Dauer von 24 Stunden. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe des Histostat-Tissue-Embedding Centers (Fa. Reichert-Jung, Wien/Österreich) in Paraplastblöcke gegossen und bei 4°C ausgekühlt. Von jedem Block wurden mit dem Rotationsmikrotom Typ 1516 (Fa. Leitz GmbH, Wetzlar) 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf unbeschichtete (SuperFrost<sup>®</sup>) sowie beschichtete (SuperFrostUltraPlus<sup>®</sup>-adhäsiv) Objektträger aufgezogen (beide Fa. Menzel-Gläser).

### 3.2.3 Histologische Färbungen

Bei allen nun folgenden Färbungen wurden die Schnitte zuerst in der absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert (2 × 10 min Xylol, kurz durchschwenken in 2 × Isopropanol, 96 % Ethanol, 70 % Ethanol, A. dest).

Nach Durchführung der entsprechenden Färbung wurden die Schnitte dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (Ethanol 70 %, Ethanol 96 %, 2 × Isopropanol 2 × 10 min Xylol) und mit Eukitt<sup>®</sup> (Riedel-de-Haen AG) eingedeckt.

Zur Übersicht wurde von allen Blöcken zuerst ein Schnitt H.E. gefärbt. Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung heben sich die Kerne blau vom übrigen kräftig rosaroten Gewebe ab.

Bei der Periodic-Acid-Schiff-Reaktion nach McManus (PAS) werden alle komplexen Kohlenhydrate nachgewiesen, sie erscheinen rosa bis violett. Die Kerne werden mit Hämalaun blau gegengefärbt.

**Tabelle 3: Bewertungsschema der PAS-Reaktion**

negativ	keine Färbung	-
unklare Reaktion	heller Farbschleier	±
schwach positiv	spezifische aber schwache Färbung	+
deutlich positiv	deutliche Färbung	++
stark positiv	kräftige, leuchtende Rot-Färbung	+++

Die Trichromfärbung nach MASSON und GOLDNER lässt die Kerne durch das Eisenhämatoxylin nach Weigert braun bis schwarz erscheinen. Das Zytoplasma färbt sich ziegelrot, die Erythrozyten zeigen sich orange während Bindegewebe und Schleim eine grüne Färbung annehmen.

Einen Nachweis für saure Mukosubstanzen erlaubt die Alcianblaufärbung. Sie wird parallel bei zwei verschiedenen pH-Werten durchgeführt, um Karboxyl- (bei pH 2,5) von Sulfatgruppen (bei pH 1,0) unterscheiden zu können. Bei einer positiven Reaktion erscheinen die jeweiligen Mukosubstanzen leuchtend blau, während sich die Kerne in hellem Rot absetzen. Der Hintergrund stellt sich zartrosa dar.

Bei der Silberimprägnation nach Gomori schlägt sich Silber durch Reduktion von Silbersalzlösungen an argyrophilen Fasern nieder. Deshalb heben sich retikuläre Fasern tiefschwarz ab, kollagene Fasern sind bräunlich oder grauschwarz imprägniert. Breite Bündel kollagener Fasern erscheinen meist in braunvioletterm Ton. Kerne und zytoplasmatische Granula sind bräunlich bis schwarz gefärbt.

Alle Färbungen wurden nach Romeis, „Mikroskopische Färbungen“ durchgeführt (Romeis, 1989), die Zusammensetzung der Lösungen ist im Anhang detailliert aufgeführt.

Die Auswertung und fotografische Dokumentation erfolgten im Leitz Aristoplan Mikroskop (Leitz GmbH, Wetzlar) gekoppelt mit der Canon Powershot A95 - Digitalkamera (5,0 Megapixel).

### 3.2.4 Immunhistochemische Untersuchungen

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden die in Bouin-Lösung fixierten Präparate verwendet. Eine Entparaffinierung fand in Xylol über eine absteigende Alkoholreihe statt (siehe auch 3.2.3). Die verschiedenen Inkubationen erfolgten in einer feuchten Kammer.

Es wurden unterschiedliche Vorbehandlungen durchgeführt, um maskierte Antigene freizulegen (siehe Tabelle).

**ABC-Methode:**

- Diese Methode beginnt mit der Hemmung der endogene Peroxidase, damit das endogen vorhandene Enzym später nicht mit dem Diaminobenzidin reagieren kann. Dazu wurde Hydrogenperoxid (30 %) im Verhältnis 1:3 mit A. dest verdünnt und für 10 min inkubiert.
- Danach wurden die Präparate 10 Minuten lang mit fließendem Leitungswasser gespült.
- Um unspezifische Bindungen des Antikörpers an Proteine zu verhindern wurde anschließend Dako-Protein-Block-Serum-Free (Dako, Heidelberg) aufgeträufelt.
- Nach 10 minütiger Inkubation wurde der Proteinblocker nur abgossen (nicht mit PBS gespült) und der mit Dako-Antibody-Diluent (Dako, Heidelberg) verdünnte Primärantikörper aufgetragen.
- Nach der entsprechenden Inkubation des verdünnten Antikörpers (siehe Tabelle) wurden die Präparate dreimal für jeweils 5 Minuten mit PBS, pH 7,4 - 7,6 gespült.
- Der entsprechende biotinmarkierte Sekundärantikörper wurde aufgetragen, die Inkubationszeit betrug 30 oder 60 Minuten (siehe Tabelle) bei Raumtemperatur.
- Es folgte das Auftragen des Streptavidin-Biotin-Horseradish-Peroxidase-Complex (=AB-Komplex, Dako, Heidelberg) Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur. Dieser AB-Komplex bindet an den Sekundärantikörper, weil das Avidin (ein Glykoprotein aus dem Hühnereiweiß) eine sehr starke Affinität zum Biotin des Sekundärantikörpers hat.
- Die Präparate wurden dreimal für jeweils 5 min mit PBS gespült.
- Es wurde DAB (3,3-Diamino-benzidin; Kem-En-Tec Diagnostics, Kopenhagen) aufgetragen, welches mit der Peroxidase des AB-Komplex reagiert. An den entsprechenden Stellen mit positiver Reaktion entsteht eine braune Färbung.
- Die Präparate wurden gründlich mit Leitungswasser gespült und die Zellkerne in der Regel mit Hämalaun gegengefärbt. Anschließend wurde erneut für 10 min mit fließendem Leitungswasser gespült.
- Abschließend wurden die fertigen Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (kurz Alkohol 70 %, 96 %, 2 × Isopropanol dann 10 min und 30 min Xylol) und aus dem Xylol mit Eukitt<sup>®</sup> (Riedel-de-Haen AG) eingedeckt.

**APAAP-Methode:**

- Nach der entsprechenden Vorbehandlung wurden die Präparate dreimal für jeweils fünf Minuten in Tris-Puffer, pH 7,4 - 7,6 gespült.
- Der Primärantikörper wurde mit dem Dako-Antibody-Diluent (Dako, Heidelberg) entsprechend verdünnt (siehe Tabelle) und aufgetragen.
- Nach jeweiliger Inkubationszeit und -temperatur des Antikörpers (siehe Tabelle) wurden die Präparate erneut dreimal für jeweils 5 min mit Tris-Puffer, pH 7,4 - 7,6 gespült.
- Der Sekundärantikörper (siehe Tabelle) wurde in Tris-Puffer gelöst und aufgetragen.
- Nach der Inkubation wurde erneut dreimal für 5 min mit Tris-Puffer pH 7,4 - 7,6 gespült.
- Der APAAP-Mouse-Monoclonal-Komplex (Dako, Heidelberg) wurde aufgetragen und 30 Minuten inkubiert.
- Die Präparate wurden erneut dreimal für jeweils 5 min mit Tris-Puffer pH 7,4 - 7,6 gespült.
- Die letzten vier Punkte wurden wie oben beschrieben wiederholt.
- Der Farbstoff Fast-Red (F4648, Sigma, Deisenhofen) wurde aufgetragen und für 10-20 min inkubiert.
- Anschließend wurden die Präparate wieder dreimal für jeweils 5 min mit Tris-Puffer pH 7,4 - 7,6 gespült.
- Dann wurde zusätzlich mit fließendem Leitungswasser für 5 min gespült.
- Teilweise wurde eine Kerngegenfärbung mit Hämalaun durchgeführt und danach für 10 min mit fließendem Leitungswasser gespült.
- Die Präparate wurden aus dem Wasser mit Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

Auswertung und fotografische Dokumentation erfolgten am Leitz Aristoplan Mikroskop (Leitz GmbH, Wetzlar), an das eine Canon-Powershot A95 - Digitalkamera angeschlossen war.

**Fluoreszenz-Markierung:**

- Die entsprechenden Vorbehandlungen wurden durchgeführt (siehe Tabelle).
- Der Primärantikörper wurde mit dem Dako-Antibody-Diluent (Dako, Heidelberg) entsprechend verdünnt (siehe Tabelle), aufgetragen und in einer feuchten Kammer inkubiert.
- Die Präparate wurden 3 mal für jeweils 5 Minuten in PBS gespült, anschließend direkt der Fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (TRITC oder FITC) in entsprechender Verdünnung mit PBS aufgetragen und unter Lichtabschluß inkubiert (siehe Tabelle).
- Nach kurzem Spülen in PBS wurde eine Kernfärbung mit DAPI (Hoechst, Frankfurt / Main) durchgeführt. Als Verdünnung wurde 1:1000 mit PBS gewählt, die Inkubation betrug 5 min.
- Unter Lichtabschluß wurden die Präparate dreimal für jeweils 5 min mit PBS und anschließend für 5 min mit A. dest gespült.
- Die Präparate wurden mit Gel/ Mount<sup>®</sup> (Biomedex, Foster City, USA) eingedeckt und unter Lichtabschluß im Kühlschrank (8 °C) aufbewahrt.
- Die Auswertung und Dokumentation erfolgten am Confokalen Laser Scanning Mikroskop LSM 510-Meta (Zeiss, Jena).

**Tabelle 4: Verwendete Antikörper und Inkubationsbedingungen**

Primär-Antikörper	Verdünnung, Inkubation	AK-liefernde Tierart	Hersteller (Primär-AK)	Sek-AK, (Verdünnung, Inkubation)	Positiv-kontrolle	Vorbehandlung	Methode
<b>Panzyto-keratin</b> (monoklonal)	1:100, über Nacht bei 4°C	Maus	Biocarta (San Diego; USA)	Anti-Maus IgG biot.vom Kaninchen (Sigma, Deisenhofen) Verd: 1:300 für 30 min bei RT	Darm	Trypsin (Sigma, Deisen- hofen), für 30 min bei RT	ABC und Fluoreszenz (TRITC)1)
<b>Vimentin</b> (monoklonal)	1:500, über Nacht bei 4°C	Maus	Dako (Heidelberg)		Darm	Protease 0,1% (Sigma, Deisen- hofen), für 15 min bei RT	ABC
<b>a-SMA</b> (monoklonal)	1:40, 1h bei RT	Maus			Darm	keine	ABC
<b>Progesteron- rezeptor</b> (monoklonal)	1:400, über Nacht bei 4°C	Maus	Beckman- Coulter (Krefeld)		Uterus	Hitzebehand- lung in der Mikrowelle, 3 mal für 5min im Citratpuffer	ABC und Fluoreszenz (TRITC)1)
<b>Estrogen- rezeptor</b> (polyklonal)	1:200, über Nacht bei 4°C	Kaninchen	Santa Cruz (Kalifornien, USA)	Anti- Kaninchen IgG biot. vom Schwein (Dako, Heidelberg) Verd : 1 :400 für 30 min bei RT	Uterus	Hitzebehand- lung in der Mikrowelle, 2 mal 5 min im Citratpuffer	ABC und Fluoreszenz (FITC)2)
<b>Laminin</b> (polyklonal)	1 :500, über Nacht bei 4°C	Kaninchen	Serotec (Düsseldorf)		Hoden		Protease 0,1% (Sigma, Deisen- hofen), für 15 min bei RT
<b>S100</b> (polyklonal)	1:400, 30 min bei RT	Kaninchen	Dako (Heidelberg)		Uterus (Drüsen- epithel)	keine	ABC
<b>Chromo- granin A</b> (polyklonal)	1:400, über Nacht bei 4°C	Kaninchen	Dako (Heidelberg)		Tracheal- epithel		ABC
<b>Ki-67 bzw. MIB</b> (monoklonal)	1:50, 1h bei RT	Maus	Dako (Heidelberg)	Anti-Maus IgG biot. vom Kaninchen (Sigma, Deisenhofen) Verd: 1:25 für 30 min bei RT	Darm, Uterus	Hitzebehand- lung in der Mikrowelle, 3 mal 5 min im Dako-Puffer (Dako, Heidelberg)	APAAP
<b>Caspase-3</b> (polyklonal)	1:150, 1h bei RT	Kaninchen	Biosciences (Pharmingen)	Anti- Kaninchen, Vektor-Elite- Kit (Biosciences, Pharmingen)	Darm, Uterus	Hitzebehand- lung in der Mikrowelle, 3 mal 5 min im Biologo- Puffer (Biosciences, Pharmingen)	ABC (mit Vektor- Elite-Kit, Biosciences, Pharmingen)

1) Anti-Maus aus dem Kaninchen, TRITC-markiert, Verdünnung 1:40 (Dako 166, Heidelberg)

2) Anti-Kaninchen aus der Ziege, IgG (H+L), FITC-markiert, Verdünnung 1:400 (Vektor, 164, Biosciences, Pharmingen)

### 3.2.5 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen

Elektronenmikroskopisch wurden Proben aus der Ampulla untersucht.

Die Proben mit einer Seitenlänge von ca. 2 mm wurden über Nacht in die Fixierungslösung nach Karnovsky gegeben und im Kühlschrank aufbewahrt (Karnovsky, 1975).

Am nächsten Tag wurden die Präparate dreimal jeweils für 20 Minuten mit 0,1M Cacodylat-Puffer (pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurden sie mit Osmiumtetroxid (1%)-Kaliumferrocyanid (1,5%) nachfixiert (2 Stunden bei 4°C unter Lichtabschluß) und nochmals dreimal je 20 Minuten in Cacodylat-Puffer 0,1M gewaschen.

In einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 50%, 70%, 90% je 30 min, absoluter Ethanol drei mal 30 min) wurden die Proben dann entwässert und schrittweise in Epon eingebettet (2 mal 15 min in Propylenoxid, 1 h in Propylen-Epon-Gemisch (2:1), über Nacht in Propylen-Epon-Gemisch (1:1), 30 min reines Epon).

Abschließend wurden sie in Gelatine kapseln eingebettet. Die Polymerisierung der Blöcke erfolgte bei 60°C über 24 Stunden.

Am Ultramikrotom (Ultracut E, Fa. Reichert-Jung, Wien) wurden 1µm dicke Semidünnschnitte angefertigt. Diese wurden zur Übersicht mit Methylen-Blau nach Richardson gefärbt. Dadurch konnten die Proben bereits hinsichtlich der Erhaltung morphologischer Charakteristika untersucht werden. War dies gegeben, wurden die entsprechenden Blöcke ultradünn (60 nm) geschnitten und auf Kupfer Grids aufgezogen. Es folgte eine Nachkontrastierung der Ultradünnschnitte mit einer wässrigen Lösung aus Uranylacetat (5 min) und einer Bleicitratlösung nach Reynolds (Reynolds, 1962).

### 3.2.6 Gewinnung und Auswertung morphometrischer Daten

Die Epithel- und Kerngrößen wurden mit Hilfe eines Messokulars bestimmt. Die Einheiten des Messokulars wurden mit einem in µm skalierten Objektträger abgeglichen und umgerechnet.

Die Auszählung der Zellen erfolgte in einer 8 mal 40er Vergrößerung mit Hilfe eines Planquadrates mit den Kantenlängen von 0,2 mm × 0,2 mm. Bei den immunhistochemischen Nachweisen der Hormonrezeptoren (Östrogenrezeptor und Progesteronrezeptor) wurden die Zellkerne in drei Reaktionsgruppen eingeteilt: 1. negativ (--), 2. positiv (+), 3. intensiv positiv (++ und +++). Die Zellzahlen wurden in jeweils fünf Planquadraten bestimmt.

Im Versuch mit dem MIB-1-Antikörper wurde lediglich die absolute Anzahl Ki-67 positiver Zellen pro Planquadrat ermittelt. Dazu wurden pro Schnitt 10 Planquadrate ausgezählt und der Mittelwert berechnet.

Auch bei den immunhistochemischen Untersuchungen der Zellen aus der Suspensionskultur wurden die absoluten Zahlen positiv reagierender Zellen in 10 Planquadraten bestimmt und der Durchschnitt ermittelt. Es handelte sich hierbei um die Auswertung der Versuche mit den Antikörpern gegen Vimentin, Ki-67, Progesteronrezeptor und Östrogenrezeptor  $\alpha$ . Des Weiteren wurde ebenfalls die durchschnittliche Anzahl pyknotischer Kerne pro Planquadrat gezählt.

Die graphische Darstellung der morphometrischen Daten erfolgte mit Hilfe der Programme SPSS und Excel für Windows. Diese Darstellung erhebt lediglich den Anspruch auf eine Visualisierung der Zahlen und soll die Ergebnisse verdeutlichen.

Aufgrund der geringen Probenmenge von  $n = 3$ , die sowohl in den Untersuchungen am Eileiter ex vivo als auch bei der Sphäroid-Zellkultur vorhanden waren, haben wir grundsätzlich auf eine statistische Auswertung verzichtet.

Die zyklischen Veränderungen der Expressionsstärke der Rezeptoren sind nicht mit der Anzahl positiver Kerne gleichzusetzen, da unterschiedlich starke Immunreaktionen stattfinden. Um die Expression graphisch darstellen und verdeutlichen zu können, wurde die Zahl stark immunpositiver Zellen mit dem Faktor zwei multipliziert und die einfach positiven Kerne addiert.

### **3.3 Untersuchungen an kultivierten, bovinen Eileiterepithelzellen (BOEC)**

#### **3.3.1 Entnahme, Präparation und Transport des Probenmaterials**

Die Auswahl des Materials erfolgte nach den Kriterien, die in 3.1 bereits beschrieben worden sind. Es wurden für die Zellkultur nur Eileiter von Kühen im Östrus bis frühen Diöstrus ausgewählt. Dabei wurde der weibliche Reproduktionstrakt vom Uterus bis zu den Ovarien möglichst sauber, grob abgesetzt. Mit einem sterilen Faden wurde der Eileiter anschließend am Infundibulum und am uterotubalen Übergang abgebunden. Die Enden wurden dann sauber abgeschnitten und das Organ vom umgebenden Bindegewebe soweit wie möglich befreit. Um eine Kontamination möglichst gering zu halten, wurde der Eileiter mit PBS + 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) gewaschen. Der Transport erfolgte in frischem PBS + P/S in 50 ml Zentrifugenröhrchen (ZFR) auf Eis.

### 3.3.2 Isolierung, Reinigung und Aussaat der bovinen Eileiterepithelzellen

Spätestens drei Stunden nach Entnahme wurden die Eileiter im Labor aus dem Transportmedium entnommen und in PBS + P/S erneut gewaschen. Um eine Kontamination der Kultur mit Fibroblasten und Endothelzellen zu minimieren wurde das restliche Bindegewebe nun sorgfältig entfernt. Dabei wurde der Eileiter auf einem mit sterilisierter Alufolie überspannten Styroporbrett mit Nadeln fest geheftet und mit PBS + P/S feucht gehalten. An den Ligaturen wurde der Eileiter abgesetzt und kurz mit geringem Druck mit PBS + P/S gespült. Das Organ wurde nun in ca. 3 cm lange Teile geschnitten. Mit einer Schnabelpinzette wurden die Epithelzellen dann in eine Petrischale ( $\varnothing$  35 mm) mit ca. 3 ml Isoliermedium ausgestrichen. Dazu wurde das Hohlorgan nichts längs geöffnet, sondern die Pinzette außen am Eileiter von der UTJ in Richtung der Ampulla entlanggeführt. Die ausgestrichenen Epithelzellklumpen wurden zur mechanischen Zerkleinerung mehrmals durch eine 22 G Kanüle aufgezogen.

Anschließend wurde das isolierte Material zur Reinigung in 15 ml ZFR bei 1050 U / min (=200 G) für 5 min zentrifugiert (Labofuge GL, Heraeus, Hanau) und der Überstand mit Blutresten und Schleim abgenommen.

Die Zellen wurden zunächst für ca. 2 Stunden in frischem Anzuchtmedium vorinkubiert. Da sich die Fibroblasten schneller als die Epithelzellen am Boden der Petrischale anheften, können sie mit diesem Schritt dezimiert werden. Die Zellsuspension wurde dann vorsichtig entnommen, gemischt und tropfenweise in eine 24-Loch-Platte auf Glasplättchen bzw. in eine 6-Loch-Platte verteilt.

Bei einigen Isolierungen wurden definierte Zellmengen ausgesät. Dazu wurde die Zellanzahl einer Referenzprobe ausgezählt. Zunächst mussten die Zellaggregate in Einzelzellen aufgelöst werden. Dies erfolgte mittels 30 minütiger Inkubation mit Trypsin (0,25% Trypsin EDTA, Sigma, Deisenhofen) bei 37°C im Wasserbad. Dann wurden die Zellen der Referenzprobe mit einer definierten Menge Medium gemischt, mit Trypanblaulösung, 0,4% (Sigma, Deisenhofen) gefärbt und mittels Neubauer Zählkammer (GLW, Würzburg) die lebenden Zellen ausgezählt. Die Zellkonzentration wurde mit den verschiedenen Verdünnungsfaktoren bestimmt, so daß eine definierte Zellmenge ausgesät werden konnte. Die Zählung erfolgte am Invert-Mikroskop Diavert (Leitz GmbH, Wetzlar).

Es wurden Vorversuche mit den Medien DMEM und dem Medium 199 (TCM) durchgeführt. Bei der Anzucht mit DMEM-Medium konnte eine verstärkte Fibroblastenproliferation beobachtet werden. Dieses wurde durch immunhistochemische Vergleichsuntersuchungen von

Kulturen mit TCM bzw. DMEM und den Antikörpern gegen Vimentin und Zytokeratin bestätigt. Deshalb entschieden wir uns bei den folgenden Kultivierungen für das TCM-Medium.

### **3.3.3 Anzucht der bovinen Eileiterepithelzellen und Kulturbedingungen**

Abhängig vom jeweiligen Versuchsablauf wurden folgende Kulturschalen verwendet:

- sterile Plastikpetrischalen (Fa. IWAKI, Tokio; 35mm / Non treated Dish)
- sterile 24-Lochplatten (IWAKI, Tokio; Microplate) mit Glasplättchen am Boden, um immunhistochemische Versuche mit adhären Zellen durchführen zu können
- sterile 6-Lochplatten (IWAKI, Tokio) für die Kultivierung und Erhaltung von Zellkonglomeraten in Suspension

Keimreduziertes Arbeiten ermöglichte eine Bench (Fa. BDK, Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen).

Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Begasungs-Brutschrank (Fa. Binder, Tuttlingen) im offenen System bei 37°C mit 5 % CO<sub>2</sub> und Wasserdampfsättigung.

Das Medium wurde regelmäßig an jedem 2. Tag gewechselt. Dazu wurde es bei den adhären Zellen vollständig abgesaugt. Die Zellrasen wurden einmal mit PBS gespült und frisches Medium (37°C) zugegeben. Die in Suspension befindlichen Zellkonglomerate wurden in 15 ml ZFR gegeben und entweder kurz anzentrifugiert oder 5-10 min zum Sedimentieren gebracht. Eine mikroskopische Kontrolle ergab, dass nach einer 10 minütigen Sedimentationszeit im ZFR keine lebenden Zellen mehr in den oberen zwei Dritteln des Überstandes vorhanden sind. Dieses Sedimentationsverfahren erwies sich als wesentlich schonender für die Zellen als das Zentrifugieren. Das überständige Medium konnte abgenommen werden, die Zellen mit frischem Anzuchtmedium resuspendiert und wieder in die 6-Wellen verbracht werden.

### **3.3.4 Lichtmikroskopische Beurteilung der lebenden Epithelzellen**

Mit Hilfe des Invertmikroskopes Diavert (Fa. Leitz GmbH, Wetzlar) wurden die lebenden Zellen beobachtet und mit dem angeschlossenen Kamerasystem Orthomat (Fa. Leitz GmbH, Wetzlar) fotografiert. So konnte der Zeitpunkt der Adhärenz und Konfluenz exakt bestimmt werden. Zudem haben wir die Mobilität und Motilität der in Suspension befindlichen Zellkonglomerate beobachtet, sowie ihre Form- und Strukturveränderung. Sogar das Schlagen der Zilien an sich war zu erkennen.

### 3.3.5 Subkultivierung und Kryokonservierung der BOEC

Die Eileiterepitelzellkulturen wurden in einigen Versuchen subkultiviert. Dazu wurde bei den konfluenten Kulturen zuerst das Medium abgesaugt, dann die Zellen mit PBS gewaschen und Trypsin-EDTA (0,5 g porcines Trypsin + 0,2 g EDTA  $\times$  4 Na/l HBSS), (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) für 5-10 min aufgetragen. Nach Ablösung der Zellen vom Boden wurde die Enzymwirkung durch Zugabe von Kulturmedium mit Serum gestoppt. Die so entstandene Zellsuspension konnte mit einer Pipette tropfenweise in neue Kulturschalen verteilt werden.

Um Probenmaterial längere Zeit zu konservieren, wurden die adhärenen Zellen zuerst wie bei der Subkultivierung beschrieben (siehe 3.3.5) mit Trypsin-EDTA vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst und zum Zentrifugieren (5 min bei 1050 U/min) mit reichlich Medium in ein Zentrifugenröhrchen gegeben (ebenso die frei schwimmenden Zellaggregate). Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde mit Einfriermedium aufgenommen, um dann die Suspension in 1 ml Portionen auf Kryoröhrchen (Bibby Sterilin Ltd., Staffordshire, UK) aufzuteilen. Die Zellzahl betrug dabei ca.  $1 \times 10^5$  Zellen pro ml Einfriermedium. Letzteres besteht aus normalem Kulturmedium, das mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, ICN, Biochemicals, Aurora, Ohio/USA) versetzt ist. Um die Zellen langsam und gleichmäßig herunterzukühlen, wurden sie in einer Styroporbox bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren und später zur Langzeitaufbewahrung in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.3.6 Probengewinnung

#### Lichtmikroskopie:

Für die histologischen Färbungen und die immunhistochemischen Untersuchungen wurden Zellen von drei verschiedenen Rindern isoliert. Die Zellen wurden nach Herkunft aus der Ampulla und dem Isthmus getrennt kultiviert. An 4 verschiedenen Kulturtagen wurden Suspensionszellen entnommen und fixiert. Dazu wurden die Sphäroiden zuerst sedimentiert bzw. in einer Eppendorf-Zentrifuge 5415 C (Eppendorf, Hamburg) bei 1000 U/min leicht anzentrifugiert. Dann wurde der Überstand an Medium abgenommen und das Zellpellet zweimal mit PBS gewaschen. Nach einer 24-stündigen Fixierung mit Bouin-Lösung wurden die Zellen drei Tage lang in 70 %igen Alkohol gegeben, der täglich gewechselt wurde, um die Pikrinsäure herauszulösen. Später wurden die fixierten Sphäroiden in Paraplast<sup>®</sup> (Sherwood Medical, Crawley, Sussex, GB) eingebettet und geschnitten (siehe 3.2.2).

**Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Tiere zur Probennahme für die Zellkultur**

<b>Tiere</b>	<b>Ovarbefund</b>	<b>Uterusbefund</b>	<b>Zyklusstadium</b>
<b>Rind 1</b>	Ipsi: frisches C. häm., contra: kleine Follike l	Schleimhaut durchsäftet, hyperämisch	Metöstrus
<b>Rind 2</b>	Ipsi: frisches C. häm., contra: C.I. in Rückbildung	Schleimhaut leicht gerötet, muköses Sekret vorhanden	Metöstrus
<b>Rind 3</b>	Ipsi: C.I. in Anbildung (sehr frühes C.I.), contra: C.I. in Rückbildung, kleine Follikel	Schleimhaut leicht gerötet und leicht feucht	Metöstrus bzw. sehr früher Diöstrus

**Tabelle 6: Eingebettete Sphäroiden für die immunhistochemischen Untersuchungen**

<b>Tage nach der Isolierung</b>	<b>Ampullazellen, Tier 1</b>	<b>Ampullazellen, Tier 2</b>	<b>Ampullazellen, Tier 3</b>	<b>Isthmuszellen</b>
<b>Tag 1</b>	20/04	21/04	22/04	-----
<b>Tag 3</b>	23/04	24/04	25/04	32/04 (von Tier 3)
<b>Tag 7</b>	26/04	27/04	28/04	33/04 (von Tier 1)
<b>Tag 9</b>	29/04	30/04	31/04	-----

Elektronenmikroskopie und PCR:

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen und die PCR wurden Zellen von insgesamt 4 Rindern isoliert. Jeweils die Zellen von 2 Rindern wurden gepoolt, so dass eine ausreichend große Zellmenge zustande kam, um an 4 verschiedenen Tagen Proben entnehmen zu können. Rind 1 und Rind 2 befanden sich zum Zeitpunkt der Schlachtung im Metöstrus, Rind 3 im frühen Metöstrus und Rind 4 befand sich im Östrus.

**Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Tiere zur Probennahme für die Elektronenmikroskopie und die PCR**

<b>Tiere</b>	<b>Ovarbefund</b>	<b>Uterusbefund</b>	<b>Zyklusstadium</b>
<b>Rind 1</b>	Ipsi: frisches Corpus hämorrhagicum, contra: kleine Follikel	Schleimhaut leicht hyperämisch	Metöstrus
<b>Rind 2</b>	Ipsi: frisches C. häm., contra: frisches C. häm., kleiner Follikel	Schleimhaut durchsaftet, wenig muköses Sekret vorhanden	Metöstrus
<b>Rind 3</b>	Ipsi: Ovulationsgrube, contra: zwei mittelgroße Follikel	Schleimhaut hyperämisch, reichlich muköses Sekret vorhanden	Östrus bzw. früher Metöstrus
<b>Rind 4</b>	Ipsi: sprungreifer Follikel, contra: ein C.I. in Rückbildung	Schleimhaut hyperämisch, reichlich muköses Sekret vorhanden	Östrus

Die Ampullazellen wurden aufgeteilt. Bei einer Gruppe wurde Medium verwendet, das Estradiol-17 $\beta$  (Sigma, Deisenhofen) in einer Konzentration von 5 % enthielt. Auf eine Aufteilung der Isthmusproben wurde verzichtet, da aus dem Isthmussegment nur eine geringe Zellmenge gewonnen werden kann. Das ist damit zu erklären, dass die epitheliale Oberfläche im Isthmus wesentlich kleiner ist als in der Ampulla, da die Falten nur kurz und nicht verzweigt sind.

#### Probenentnahme und -konservierung:

Die Zellproben wurden aus der Suspensionskultur steril entnommen und 5 min bei 9000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen mit PBS resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand abgenommen.

Auf die Zellpellets, die für die PCR vorgesehen waren, wurden je 500  $\mu$ l RNAlater® (Ambion, Huntingdon, UK) aufpipettiert. Über Nacht lagerten die Proben im Kühlschrank bei 8°C, und am folgenden Tag wurden sie tiefgefroren (-40°C).

Die Proben für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden für 24 Stunden mit je 1000  $\mu$ l Karnovsky-Lösung fixiert und anschließend in Cacodylatpuffer, 0,1 M gegeben. Die Aufbewahrung der Proben bis zur Weiterverarbeitung erfolgte im Kühlschrank bei 8°C.

(Tabelle der Proben siehe Anhang)

### **3.3.7 Identifizierung der bovinen Eileiterepithelzellen**

Da eine Kontamination mit Fibroblasten bei der Isolierung kaum vermeidbar ist, musste der Grad der Reinheit bei den Kulturen mit Hilfe spezifischer Antikörpern bestimmt werden.

Wir benutzten die Antikörper gegen Zytokeratin, welcher nur mit den Zytokeratinen von Epi-

thelzellen reagiert und gegen Vimentin, welcher spezifisch Vimentinfilamente mesenchymaler Zellen markiert. Zusätzlich benutzten wir zur Zellcharakterisierung einen Antikörper gegen das S100-Protein. Dieser geht mit den Eileiterepithelzellen spezifische Bindungen ein. Fibroblasten markiert er jedoch nicht. Um die zilienträgenden Zellen erkennen zu können, benutzten wir den Antikörper gegen ChromograninA, der den apikalen Zellbereich markiert. (Genaue Beschreibung der Antikörper siehe auch 3.2.4.)

### **3.3.8 HE-Färbung der Sphäroiden**

Um die Morphologie der Kulturzellen zu untersuchen, wurde eine HE-Färbung sowohl an adhären Zellen als auch an den in Suspension befindlichen Zellkonglomeraten durchgeführt. Die H.E. Färbung diente uns auch hier dazu, eine Übersicht zu erhalten und das Kern-Plasma-Verhältnis zu bestimmen.

(Genauere Beschreibung der Färbung siehe 3.2.3, Lösungen siehe Anhang)

### **3.3.9 Immunhistochemische Untersuchungen an Kulturzellen**

#### **A) Allgemeines zur Durchführung der immunhistochemischen Nachweise**

Sowohl an adhären Zellen, die in 24-Lochplatten auf Plättchen angezchtet wurden, als auch an den Zellkonglomeraten wurden weitere immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt, um genauere Informationen über die Zellen und ihren Differenzierungsstatus während der Kulturperiode zu erhalten.

Die adhären Zellen wurden zur Durchführung der Immunhistochemie in 24-Lochplatten belassen, während die frei im Medium schwimmenden Zellaggregate (Sphäroiden) auf drei verschiedene Arten weiterverarbeitet wurden, um die beste Methode herauszufinden:

1. Die Sphäroiden wurden mit Bouin-Lösung fixiert, in Paraplast<sup>®</sup> (Sherwood Medical, Crawley, Sussex, GB) eingebettet und geschnitten. In diesem Fall erfolgten die Untersuchungen wie sie unter 3.2.4 beschrieben wurden.
2. Die Sphäroiden wurden einzeln aus der Zellsuspension entnommen und in einen Tropfen der für die immunhistochemischen Nachweise benötigten Lösungen pipettiert. Nach entsprechender Inkubationszeit (siehe Tabelle) wurden die Zellen mit einer 10 µl Eppendorf-Pipette aus dem Tropfen entnommen und in den Tropfen der nach dem Protokoll folgenden Lösung gegeben. Auch bei dieser Methode wurden die Zellen zuerst in PBS im Tropfen gewaschen und anschließend mit einer der unten beschriebenen Lösungen kurz fixiert.

3. Die Zellen wurden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und es wurde abgewartet, bis sie sich in dessen Spitze abgesetzt hatten. Das überstehende Medium wurde abgenommen und eine relativ dichte PBS-Zellsuspension hergestellt. Davon wurde jeweils ein Tropfen auf einen Objektträger gegeben und ausgestrichen (wie ein einfacher Blutausschlag). Dieser Zellausschlag wurde 24 Stunden an der Luft getrocknet und dann 90 sec mit einer gepufferten Aceton-Formaldehyd-Fixierung behandelt (siehe Anhang). Die so behandelten Zellen blieben sogar bei der Hitzebehandlung in der Mikrowelle auf dem Objektträger haften. Eine Behandlung mit Enzymen gestaltete sich schwierig, war aber bei kurzen Inkubationszeiten möglich.

Es wurden insgesamt drei verschiedene Methoden bei den immunzytochemischen Untersuchungen durchgeführt, die unter 3.2.4 detailliert erläutert wurden.

- A) ABC-Methode (Biotin-markierter Sekundärantikörper)
- B) APAAP-Methode
- C) Fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (entweder FITC- oder TRITC-markiert).

## **B) Verwendete Fixierungen**

(Genaue Zusammensetzung der Lösungen siehe Anhang)

- a) Bouin-Lösung (5 min),
- b) Formaldehyd (4 %), PBS gepuffert (90 sec),
- c) Methanol-Aceton (1:1), eiskalt (90 sec),
- d) Aceton-Formaldehyd-Lösung, gepuffert, (90 sec).

Bei den Vorversuchen stellte sich heraus, dass bei den adhärenenten und den im Tropfen pipettierten Zellen die besten Ergebnisse mit Formaldehyd- oder Methanol-Aceton-Fixierung erzielt wurden. Die Aceton-Formalin-Lösung verwendeten wir weiterhin bei den Ausstrichpräparaten, wohingegen die Bouin-Lösung am besten geeignet war für Zellen, die später in Paraplast<sup>®</sup> eingebettet wurden (weiteres Vorgehen siehe oben und 3.2.4).

### C) Vorbehandlungen

Es wurden verschiedene Vorbehandlungen ausgetestet, um maskierte Antigene freizulegen.

**Tabelle 8: Vorbehandlungen bei immunhistochemischen Nachweisen an Kulturzellen**

Vorbehandlungen	Inkubationszeit
Trypsin (Sigma, Deisenhofen)	15, 10 oder 5 min bei RT
Protease, 0,1% (Sigma, Deisenhofen)	15, 10 oder 5 min bei RT
Hitzebehandlung in der Mikrowelle im Citratpuffer, bei 100°C	4 × 5 min, 3 × 5 min, oder 2 × 5 min
Hitzebehandlung in der Mikrowelle im Dakopuffer, (Dako, Heidelberg), bei 100°C	3 × 10 min
Triton-X (Sigma, Deisenhofen)	5 min bei RT

Die bei der ABC-Methode zusätzlich notwendige Vorbehandlung mit Hydrogenperoxidlösung (siehe 3.2.4) war mit einzeln im Tropfen pipettierten Zellen nicht möglich, da alle Zellen aufgeschwemmt wurden und sich die Sphäroiden nicht wiederfinden ließen.

### D) Gegenfärbung, Eindecken der Fluoreszenzmarkierten Proben

Die Fluoreszenzmarkierten Zellen wurden kurz mit DAPI (Hoechst, Frankfurt / Main) gegengefärbt (Verdünnung 1:1000 mit PBS, Inkubationszeit ca. 5 min) und abschließend aus dem wässrigem Milieu mit dem speziell für die Fluoreszenzmikroskopie geeigneten Medium „Gel/ Mount<sup>®cc</sup>“ (Biomedica, Foster City, USA) eingedeckt.

**Tabelle 9: Verwendete Antikörper und Inkubationsbedingungen bei den IHC-Nachweisen an Kulturzellen**

Primär-AK	Verdünnung	Methode	Sekundär-AK	Verd. Sek. AK	Vorbehandlung	Fluoreszenz, Sek-AK, Verd.
<b>Panzyto-keratin</b>	1:500	ABC	Anti-Maus IgG biot. vom Kaninchen	1:300	Keine	TRITC, Anti-Kan v.d. Maus, 1: 40
<b>Vimentin</b>	1:500	ABC		1:400	Keine	--
<b>S100</b>	1:400	ABC	Anti-Kaninchen IgG biot vom Schwein	1:300	Keine	--
<b>Laminin</b>	1:500	ABC		1:400	Protease 0,1%, für 5 min	--
<b>PR</b>	1:400	ABC	Anti-Maus IgG biot. vom Kaninchen	1:300	MW, 3×10min im Citratpuffer	TRITC, Anti-Maus v. Kan. , 1: 40
<b>ER<math>\alpha</math></b>	1:400	ABC	Anti-Kan IgG biot. v. Schwein	1:300	MW, 3×10min im Citratpuffer	TRITC, Anti-Kan v. Maus, 1:40
<b>Ki-67</b>	1:50	APAAP-Mouse MK, 1:50	Anti-Maus IgG vom Kaninchen	1:25	MW, 3×10min im Dakopuffer	--
<b>Chromogranin</b>	1:200	ABC	Anti-Kan IgG vom Schwein	1:300	MW, 2×10min im Citratpuffer	TRITC, Anti-Kan v.d. Maus
<b>Caspase</b>	1:150	ABC	Anti-Kaninchen (Vektor-Elite-Kit)		MW, 3 × 5min im Biologopuffer	--

(Details zu den Antikörpern siehe 3.2.4)

### 3.3.10 Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Sphäroiden

Die frei im Medium schwimmenden Zellaggregate wurden in kleinen Zentrifugenröhrchen (ZFR) zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Fixierung wurde durchgeführt wie unter 3.2.5 beschrieben. Nach der Osmierung (1%iges Osmium) wurden die Zellen abweichend von der Behandlung der Eileiterproben nochmals gewaschen und danach in 25%iges bovines Serum-Albumin gegeben. Nach erneutem Zentrifugieren der Proben und Abnehmen des Überstands wurden 1-2 Tropfen Glutaraldehyd auf die Proben gegeben und abgewartet, bis ein festes Pellet entstand. Anschließend wurde der Konus aufgeschnitten, das Pellet aus dem ZFR gelöst und in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,4) gegeben. Die weitere Behandlung entsprach dem Vorgehen bei den Eileiterproben in 3.2.5.

Die Charakterisierung der Sphäroiden an den verschiedenen Kulturtagen erfolgte mittels folgendem Bewertungsschema.

**Tabelle 10: Bewertungsschema für das Vorkommen von Zellorganellen bei den Zellen der Sphäroiden**

Vorkommen	Bewertung
zahlreich	+++
normal, einige	++
wenig	+
nicht oder sehr selten	--

Es wurde unter anderem der Gehalt von Zellorganellen, das Vorkommen von Gestaltveränderungen, Haftstrukturen und degenerativen Erscheinungen beurteilt.

### 3.3.11 Real-time RT-PCR mit Sphäroiden

#### A) RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte mittels Tri-Reagenz (T9424, Sigma, Deisenhofen).

- Dazu wurde das gewonnene Zellmaterial in 1 ml Tri-Reagenz homogenisiert und die Probe bei Raumtemperatur (RT) für 5 Minuten belassen.
- Dann wurden 0,2 ml Chloroform (C2432, Sigma, Deisenhofen) pro ml Tri-Reagenz hinzugefügt, die Probe gründlich manuell geschüttelt und ca. 10 Minuten bei RT belassen.
- Es folgte 15 minütiges Zentrifugieren der Proben bei 4 °C und 14500 U/min.
- Die oberste, durchsichtige Phase des Überstandes wurde in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und dann 0,5 ml Isopropanol (Merck, Darmstadt) zu jeder Probe hinzugegeben (0,2 ml Isopropanol pro ml Tri-Reagenz). Nach gutem Durchmischen wurden die Proben bei Raumtemperatur für 5-10 Minuten stehen gelassen.
- Anschließend wurden die Proben 10 Minuten bei 4 °C und 12000 U/min zentrifugiert.
- Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 1 ml Ethanol (75%, -20°C) mit dem Vortex (Schultheiss, München) aufgemischt, dann bei 4°C und 7500 U/min zentrifugiert und der Überstand abgkippt (diese Waschung wurde zweimal durchgeführt).
- Das Pellet wurde 10 Minuten zum Trocknen stehen gelassen.
- Das so entstandene RNA-Pellet wurde in 50 µl DEPC-behandeltem A. dest gelöst und die RNA-Konzentration in einer 1 : 100 Verdünnung im Spectrometer (SmartSpec3000, Bio-rad, München) gemessen.
- Die so extrahierte RNA wurde bei -80 °C gelagert, bis sie zur Reversen Transkription weiterverwendet wurde.

## B) Verdünnung der Proben

Zuerst wurden die Proben auf eine Konzentration von 1 ng/μl verdünnt.

Die zuzugebende Menge A. dest wurde anhand der folgenden Formel errechnet:

→  $A. \text{ dest} = \text{Konz. (ng/}\mu\text{l)} \times \text{Vol. der Probe (=50 } \mu\text{l)} - \text{Vol. der Probe (50 } \mu\text{l)}$ .

(Drei der Proben wurden nicht auf eine Konzentration von 1 ng/μl eingestellt, da ihre ursprüngliche Konzentration bereits unter 1 ng/μl lag. Siehe Tabelle).

**Tabelle 11: Verwendete Proben für die PCR, Konzentrationen der RNA und Verdünnungen**

Material	Probennummer	Konz. total RNA in ng /μl	Abs. Menge RNA in ng (gelöst in 50 μl)	Verdünnung mit A.d.d., um Konz. von 1 ng/μl zu erhalten
Isolat, Ampullazellen	93	9,03	451	5 μl Probe + 40 μl A.dd.
Isolat, Isthmuszellen	95	29,32	466	5 μl Probe + 141,6 μl A.dd.
Tag 1, Ampullazellen	97	2,09	104	10 μl Probe + 10,8 μl A.dd.
Tag 1, Isthmuszellen	99	2,09	104	10 μl Probe + 10,8 μl A.dd.
Tag 1, Ampz.+ Östrogen	101	3,02	151	10 μl Probe + 20 μl A.dd.
Tag 3, Ampullazellen	103	0,69	34	----
Tag 3, Isthmuszellen	105	0,87	44	----
Tag 3, Ampz.+ Östrogen	107	0,4	20	----

## C) Herstellung der cDNA (reverse Transkription)

Die komplementäre DNA wurde mittels des iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, München) hergestellt.

- Zu jeweils 5 μl jeder Probe wurden 4 μl des iScript Reaction Mix, 1 μl der iScript Reversen Transcriptase und 10 μl A. dest (nukleasefrei) hinzugegeben. Das ergab ein Volumen von 20 μl je Probe.

Im iCycler (Bio-Rad, München) erfolgte die reverse Transkription der mRNA zu cDNA.

### Transkriptionsprotokoll:

- 5 min bei 25 °C,
- 30 min bei 42 °C,
- 5 min bei 85 °C,
- nach Abschluß der Reaktion wurde die Temperatur auf 4 °C gehalten.

Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

## D) Auswahl der Primer

Der Primer für das PR-Transkript ist nahe des 5' Endes der mRNA lokalisiert und schließt deshalb beide Isoformen des PR (PR-A und PR-B) ein (Schams et al., 2003). Es handelt sich bei beiden Primern um Consensus-Primer. Der Forward-Primer des ER $\alpha$  ist auf dem Exon 5 und der Reverse-Primer auf dem Exon 7 lokalisiert. Der Forward-Primer des PR-Gens ist auf dem Exon 7 und der Reverse-Primer auf dem Exon 8 lokalisiert.

Synthetisiert wurden die Primer von der MWG Biotech AG, Ebersberg.

**Tabelle 12: Verwendete Primer**

Zielgen	Primersequenz	Transkriptlänge	Primerlänge	Literaturstelle, Datenbank
<b>ER<math>\alpha</math></b>	<b>frw.</b> 5'agg gaa gct cct att tgc tcc3'	234 bp	21	(Pfaffl et al., 2001)
	<b>rev.</b> 5'cgg tgg atg tgg tcc ttc tct3'		21	
<b>PR</b>	<b>frw.</b> 5'gag agc tca tca agg caa ttg g3'	227 bp	22	(Pfaffl et al., 2002)
	<b>rev.</b> 5'cac cat ccc tgc caa tat ctt g3'		22	
<b>18s</b>	<b>frw.</b> 5'tca aga acg aaa gtc gga gg3'	493 bp	20	NCBI X00686
	<b>rev.</b> 5'gga cat cta agg gca tca ca3'		20	

## E) Durchführung der real-time PCR

Die Durchführung der real-time PCR erfolgte mit Hilfe des iCycler® (Bio-Rad, München). Jede Probe wurde dreifach bestimmt. Der Versuch wurde für die beiden spezifischen Primer ER $\alpha$  und PR getrennt voneinander durchgeführt. Der Primer für das 18s-Gen diente in beiden Versuchsdurchführungen als Referenz. Es wurden zwei Negativkontrollen durchgeführt:

### RT minus Kontrolle

Um eine Kontamination der cDNA mit DNA auszuschließen, wurde von den einzelnen Proben zusätzlich eine Kontrolle hergestellt, bei der die reverse Transkriptase (RT) durch RNase freies Wasser (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) ersetzt wurde (RT-minus Kontrolle). In diesen Proben ist keine cDNA vorhanden, so dass eine Reaktion nur erfolgt, wenn die Probe mit genomischer DNA kontaminiert ist. Dabei wurden die einzelnen Proben miteinander gepoolt.

No-Template-Control (NTC)

Anstelle der cDNA des Probenmaterials wurde hierbei RNase freies Wasser (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) verwendet.

Anhand dieser Kontrollen werden mögliche Kontaminationen, die während der Versuchsdurchführung entstehen oder z.B. in dem verwendeten Wasser oder den Primern vorhanden sind überprüft. Es wurde in einem Well pro Primer eine NTC durchgeführt (jeweils eine NTC für den Primer der Zielgene ER $\alpha$  oder PR und eine für den Referenzprimer 18s).

Die Real-time PCR erfolgte mit dem IQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (Bio-Rad, München). Bestandteil dieses Gemisches sind Tris-Puffer, die notwendigen Basen, eine Taq-DNA-Polymerase, Fluorescein und Stabilisatoren.

Für die Reaktion im iCycler wurden folgende Mengen in jedes Well pipettiert:

- + 10,1  $\mu$ l iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, München)
- + 5,3  $\mu$ l eines Primergemischs (forward Primer und reverse Primer des zu untersuchenden Gens)
- + 4,6  $\mu$ l DNA-Probe, 1: 10 mit A. dest vorverdünnt
- = 20  $\mu$ l Gesamtvolumen pro Well

Versuchsprotokoll des iCycler<sup>TM</sup> (Bio-Rad, München):

Phase 1 (n = 1)	95,0°C	für 14:45 min (Aktivierung der Taq-Polymerase)
Phase 2 (n = 41)		
Schritt 1:	95,0°C für 00:15 min	(Denaturierung)
Schritt 2:	60,0°C für 01:00 min	(Hybridisierung und Elongation)
Phase 3 (n = 1)		
Schritt 1:	95,0°C für 01:00	
Phase 4 (n = 350)		
Schritt 1:	95,0°C für 00:10	
		(Die Temperatur nimmt ab dem 2. Durchlauf jeweils um 0,1 °C ab.)
Phase 5 (n = 1)		
Schritt 1:	4,0°C	wird gehalten.

Die Reaktion startete mit einem einmaligen Erhitzen des Reaktionsgemischs auf 95°C für 15 min (Zyklus 1). Diese Phase ist notwendig, weil die verwendete Taq-Polymerase (HotStarTaq DNA Polymerase, Qiagen GmbH, Hilden) ein attenuiertes Enzym ist, welches thermisch zu

aktivieren ist. Es folgten 41 Amplifikationszyklen mit jeweils zwei Schritten. Im ersten Schritt (15 s) findet die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95°C statt. Im zweiten Schritt findet die Hybridisierung statt. Dabei lagern sich die Oligonukleotide bei 60°C an die komplementären Teilsequenzen ihrer Zielgen-cDNA an und die Taq-Polymerase leitet die Elongation ein.

Im Anschluß an die PCR-Reaktion wurden mit den entstandenen Amplifikaten Schmelzkurvenanalysen erstellt, um die Spezifität des Produktes zu überprüfen. Dabei sinkt die Temperatur in der Phase 5 pro Schritt um 0,1 °C. Die spezifischen Schmelzpunkte sollten beim Rind für den ER $\alpha$  bei 85,3 °C (Pfaffl et al., 2001) und für den PR zwischen 83 und 83,3 °C (Schams et al., 2003) liegen. Die vorhandene Menge dsDNA ist der Fluoreszenzintensität proportional. Diese wird von einem optischen Modul des Thermocyclers (iCycler<sup>TM</sup>iQ, Optical System Software, BIORAD, München) gemessen und auf einem Monitor dargestellt. Dabei wird die relative Fluoreszenzintensität gegen die Zyklusanzahl abgebildet. Um die Expressionswerte messen zu können, wird ein „trashhold-cycle“ (Ct) bestimmt. Es handelt sich dabei um den Zyklus, bei dem die Hintergrundfluoreszenz überschritten wird. Die waagerechte Linie des „trashhold-cycles“ schneidet die Amplifikationsgraphen im Bereich des linearen Anstiegs der Kurven in der logarhythmischen Darstellung. Um später „trashhold-cycle“-Werte miteinander vergleichen zu können, wurden die Fluoreszenzdaten der verschiedenen Amplifikationskurven vom Programm automatisch auf eine gemeinsame Basislinie eingestellt (Basislinienkorrektur).

## **F) Auswertung**

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programm „Q-Gene“ für Windows. Dabei wurden die benötigten Amplifikationszyklen der zu untersuchenden Gene (ER $\alpha$  oder PR) mit dem Referenzgen (18s) ins Verhältnis gesetzt. Das Referenzgen unterliegt keiner bzw. nur einer geringen Regulation, da es sich bei dem 18s-Gen um ribosomale RNA handelt. Aus den jeweiligen Triplikaten derselben Probe wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Dabei entsteht ein semiquantitativer Expressionswert („mean normalized expression“). Die für jede Ausgangsprobe erhaltenen relativen Expressionswerte konnten untereinander verglichen werden. So war es möglich regulative oder andere Effekte des zu untersuchenden Gens darzustellen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Der boviner Eileiter ex vivo

#### 4.1.1 Histomorphologie

##### Hämatoxylin-Eosin-Färbung

##### Morphologischer Vergleich der Tunica mucosa von Ampulla und Isthmus

Die Lamina propria dient den Falten als Gerüst und führt Leitungsstrukturen wie Gefäße und Nerven. Die Abgrenzung zum Lumen bildet ein einschichtig hochprismatisches Epithel. Die Architektur der Falten unterscheidet sich in den verschiedenen Segmenten des Eileiters. Im Isthmus sind wenige Falten vorhanden, die eine breite Basis aufweisen und sich in Richtung Lumen um ca. die Hälfte verjüngen. In der Ampulla sind die Falten länger, schmaler und weisen Verzweigungen (Sekundärfalten) auf. Das Lumen ist im Isthmus wesentlich weiter als in der Ampulla, obgleich diese einen wesentlich größeren äußeren Organquerschnitt aufweist als der Isthmus. In der Ampulla füllen die Falten den größten Teil des Eileiters aus. Sie erstrecken sich teilweise bis über die Mitte des Lumens. Die morphologischen Veränderungen finden zwischen den Segmenten fließend statt.



Abb. 3: HE-Färbung, Querschnitt durch die Ampulla.



Abb. 4: HE-Färbung, Querschnitt durch den Isthmus.

Sowohl in der Ampulla als auch im Isthmus sind ca. 50 % zilientragende Zellen mit deutlichem Blepharoplastensaum vorhanden. Die Zilien der Epithelzellen im Isthmus sind länger als in der Ampulla. Ihr Länge beträgt im Isthmus ca. 6  $\mu\text{m}$  und in der Ampulla ca. 4  $\mu\text{m}$ . Abhän-

gig vom Zyklusstadium kommen in der Ampulla Zellvorwölbungen an den apikalen Zellpolen der sekretorischen Zellen vor, so genannte Protrusionen. Sie können neben Zellorganellen Zellkerne bzw. Kernteile enthalten (s.unten). Im Isthmus kommen diese Protrusionen unabhängig vom Zyklusstadium grundsätzlich nicht vor.

Das Eileiterepithel besteht aus zilientragenden und sekretorischen Zellen. Die Kerne der sekretorischen Zellen liegen weiter basal, haben eine ovale Form und sind dunkel gefärbt (heterochromatisch). Die Zellkerne der zilientragenden Zellen sind im Allgemeinen im mittleren Zytoplasma lokalisiert, haben eine runde Form und ein helles Karyoplasma (euchromatisch). Allerdings variiert die Anordnung der Kerne in den verschiedenen Abschnitten des Eileiters ein wenig. Im Isthmus sind die Kerne in allen Zyklusstadien auf gleichmäßiger Höhe in der Zelle angeordnet. Sie liegen basal bis leicht mittig, zumindest im unteren Drittel der Zelle. Die Kerne der Ampullaepithelzellen verändern ihre Lage abhängig vom Zyklustag. So sind die Kerne der zilientragenden Zellen in der Mitte des Zytoplasmas oder apikal zu finden. Die Kerne der sekretorischen Zellen liegen in der Regel basal. Durch die Protrusionsbildung findet man sie aber auch in anderen Lagen im Zytoplasma oder in den Protrusionen.

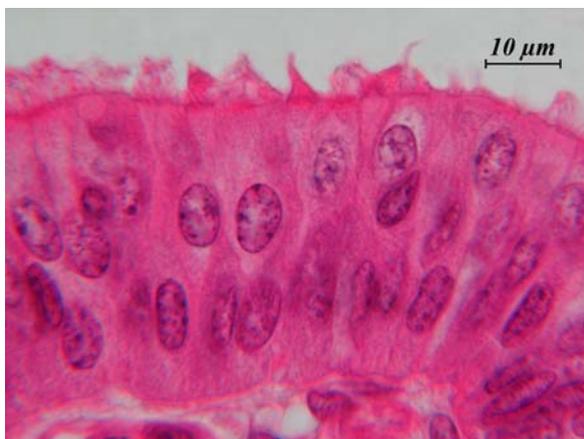


Abb. 5: HE-Färbung, Epithel der Ampulla im Östrus. Die Kerne der sekretorischen Zellen liegen basal und sind oval, während die Kerne der zilientragenden Zellen rund und im mittleren Zytoplasma lokalisiert sind.

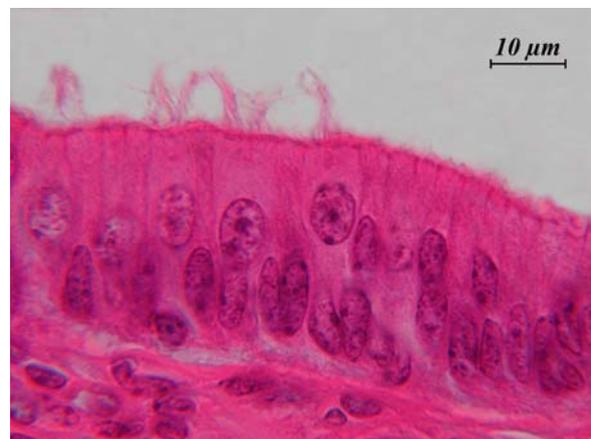


Abb. 6: HE-Färbung, Epithel des Isthmus im Östrus. Die verschiedenen Kernreihen sind auch hier deutlich zu erkennen.

Die sekretorischen Zellen sitzen der Basalmembran breit auf und verzüngen sich nach apikal. Deshalb bilden sie nur einen sehr kleinen Anteil der epithelialen Oberfläche. Die zilientragenden Zellen hingegen sind basal recht schmal und verbreitern sich nach apikal, so dass die Zi-

lien eine großen Teil der Epitheloberfläche bedecken. Insbesondere im Isthmus erweckt es den Eindruck, als sei die Epitheloberfläche von einem lückenlosen Zilienrasen bedeckt. In den basalen, konkaven Epithelbereichen zwischen zwei Falten können wenig sekretorische und vermehrt zilientragende Zellen identifiziert werden.

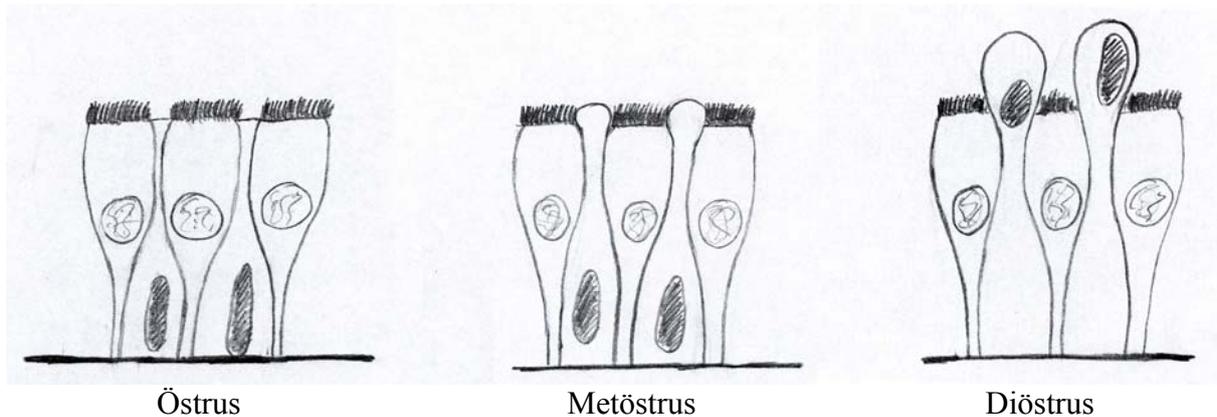


Abb. 7: Schema der Oberflächenveränderungen des Ampullaepithels während des Hormonzyklus sowie der Verlagerung der Zellkerne der sekretorischen Zellen.

In beiden Segmenten sind im unteren Drittel des Epithels so genannte „Basalzellen“ vorhanden. Sie erreichen das Eileiterlumen nicht, sind klein, rund und haben sehr dunkle (hyperchromatische) Kerne. Der Zytoplasmaanteil ist sehr gering. Ca. eine von 25-30 Zellen im Epithel gehört diesen basalen Zellen an. Dem Aussehen nach handelt es sich vorwiegend um intraepitheliale Lymphozyten.



Abb. 8: HE-Färbung, Epithel der Ampulla im Östrus. Zilientragende Zellen verbreitern sich nach apikal, dort liegen ihre Kerne, die sekretorischen Zellen sind basal am breitesten.

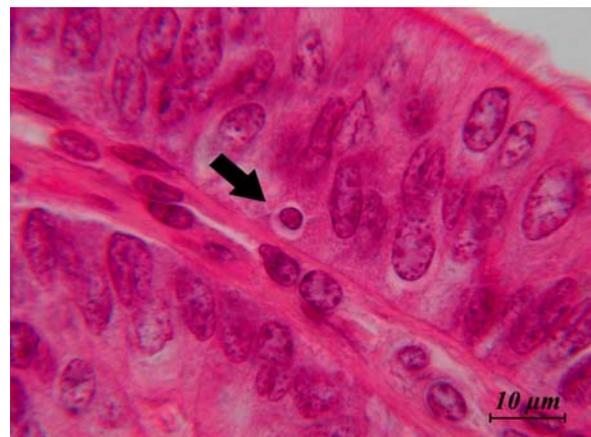


Abb. 9: HE-Färbung, „Basale Zelle“ bzw. Leukozyt (Pfeil) im Epithel der Ampulla.

## Vergleich des Epithels der Ampulla in den verschiedenen Zyklusstadien

Im Östrus weist das Epithel eine glatte apikale Zelloberfläche auf. Es kommen keine Protrusionen vor. Ca. 50 % der Zellen haben einen Blepharoblastensaum und Zilien. Die Lage der Kerne variiert von basal bis mittelständig.

Im Metöstrus sind besonders an kleinen Falten und im basalen Bereich der Falten kleine Protrusionen vorhanden. Sie zeigen sich als sanfte Vorwölbungen der apikalen Zellpole und beinhalten Zytoplasma. In ihrer Ausdehnung überragen sie die Zilien nicht. Das Vorkommen der Protrusionen variiert von Falte zu Falte und auch in verschiedenen Teilen einer Falte. Im ipsilateralen Eileiter sind weniger Protrusionen vorhanden als im contralateralen.



Abb. 10: HE-Färbung, einheitliche epitheliale Oberfläche der Ampulla im Östrus. Die zilien-tragenden Zellen bilden den Großteil der Epitheloberfläche, deshalb scheint der Zilienbesatz fast lückenlos.

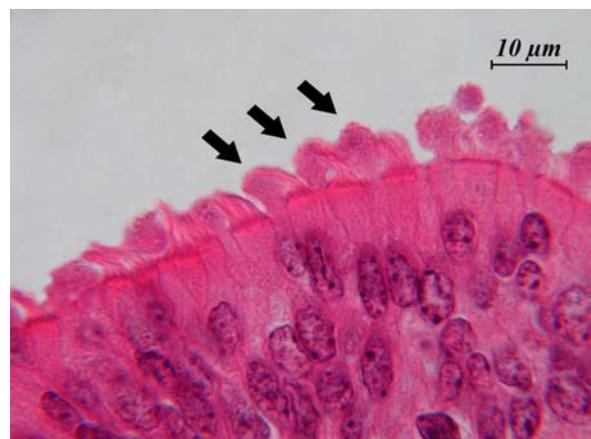


Abb. 11: HE-Färbung, Epithel der Ampulla im Metöstrus. Es sind dezente Protrusionen vorhanden (Pfeile), die keine Kerne enthalten.

Im Diöstrus gestaltet sich die Zelloberfläche eher unregelmäßig. Protrusionen dominieren das Zellbild. Sie wölben sich ballonartig ins Lumen vor und enthalten Kerne bzw. Kernteile. Die Protrusionen überragen die Zilien deutlich. Durch diese Vorwölbungen werden die Zilien verdrängt, so dass die Zilienbüschel komprimiert werden. Teilweise sehen die Vorwölbungen aus wie Tropfen, die nur über eine sehr schmale Zytoplasmabrücke mit dem zugehörigen Epithel verbunden sind. Zwischen einigen Falten findet man basal Ansammlungen von freien Vesikeln im Lumen, die ebenfalls Kernteile enthalten. Diese Vesikel sind auch direkt über den apikalen Zellpolen zu finden, wahrscheinlich ist die Verbindung zur Zelle in diesen Fällen nicht angeschnitten.

Übereinstimmend mit den anderen Stadien sind ca. 60 % der Zellen zilientragend, ihr Blepharoblastensaum ist deutlich zu erkennen. Die Anordnung der Kerne ist sehr unregelmäßig, sie

kommen in verschiedenen Höhen im Zytoplasma vor. An den kleineren Falten bzw. am basalen Teil aller Falten sind vermehrt kernhaltige Protrusionen auszumachen. Es besteht der Eindruck, dass das Epithel des ipsilateralen Eileiters weniger kernhaltige Protrusionen aufweist als der contralaterale.

In der Probe des frühen Diöstrus (Tag 6) sind deutlich weniger Protrusionen und weniger kernhaltige Protrusionen vorhanden als am Zyklustag 12 (mittlerer Diöstrus).

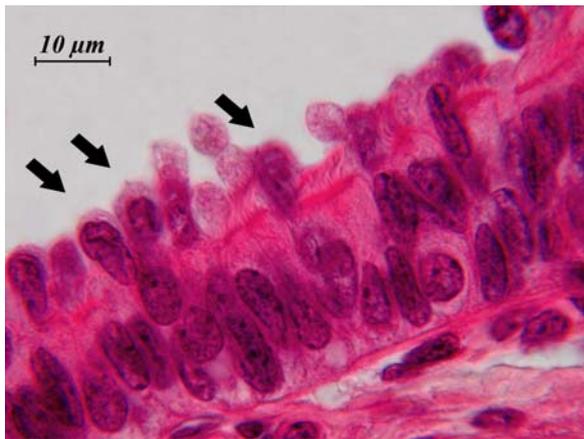


Abb. 12: HE-Färbung, Epithel der Ampulla im Diöstrus mit ausladenden kernhaltigen Protrusionen (Pfeile). Die epitheliale Oberfläche ist sehr ungleichmäßig. Die Kerne sind in unterschiedlicher Höhe im Zytoplasma angeordnet.



Abb. 13: HE-Färbung, Epithel der Ampulla im Diöstrus mit tropfenförmigen Protrusionen (Pfeile), die nur sehr schmale Verbindungen zum Epithel aufweisen.

Der Proöstrus ist schwer zu charakterisieren, da die verschiedenen Proben unterschiedliche Bilder liefern. Es sind weiterhin kernhaltige Protrusionen vorhanden. Sie dominieren das Bild der epithelialen Oberfläche jedoch nicht so stark wie im Diöstrus. Massive, tropfenförmige Vorwölbungen waren nur in einer der 5 Proben vorhanden. In den anderen Proben reichen die Protrusionen nicht so weit ins Lumen wie im Diöstrus. Die Ausdehnung der Protrusionen ins Lumen ist hier (im deutlichen Unterschied zum Metöstrus) weiter als die Länge der Zilien. Kleine Vorwölbungen ohne Kernteile kommen in den Proben aus dem Proöstrus nicht bzw. höchstens vereinzelt vor.

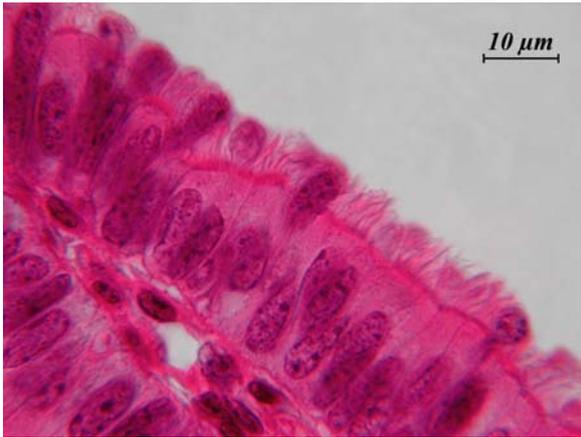


Abb. 14: HE-Färbung, das Epithel der Ampulla im Proöstrus weist kernhaltige Protrusionen auf. Hier reichen diese nicht über die Länge der Zilien ins Lumen hinaus.

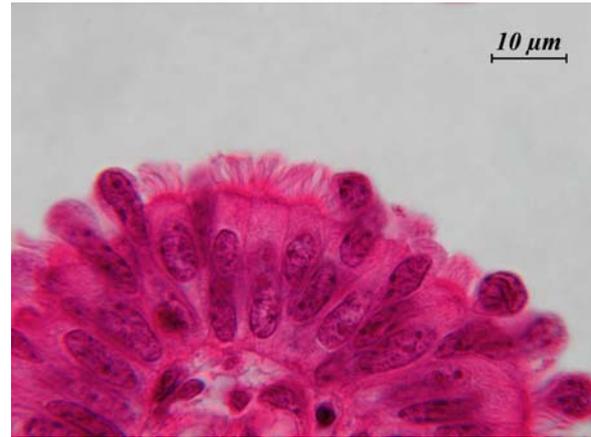


Abb. 15: HE-Färbung, das Epithel der Ampulla im Proöstrus mit den kernhaltigen Protrusionen. Die Protrusionen prägen das Zellbild nicht so stark wie im Diöstrus.

### **Vergleich des Ampullaepithels eines trächtigen mit einem zyklischen Tier am Zyklustag 18**

Das Epithel des trächtigen Tieres enthält deutlich mehr kernhaltige Protrusionen als das des nichtträchtigen. Zudem kommen vermehrt tropfenförmige Protrusionen vor, die nur durch schmale Zytoplasmabrücken mit dem Epithel verbunden sind sowie über der apikalen Zelloberfläche schwebende Vesikel.

### **Kurze Beschreibung von Infundibulum und uterotubaler Verbindung im Metöstrus**

Das Infundibulum ist von einer komplexen Architektur seiner Falten geprägt. Die sehr langen, schmalen Falten sind in Sekundär- und sogar Tertiärfalten verästelt. Das Epithel des Trichters weist kernhaltige Protrusionen auf. Die Zellkerne liegen auf ungleicher Höhe. Sie sind groß und länglich-oval, so dass das Kern-Plasma-Verhältnis relativ groß ist. Ca. 70 % der Zellen haben einen deutlichen Blepharoplastensaum und tragen Zilien, die aber relativ kurz erscheinen.

Die uterotubale Verbindung ist charakterisiert durch sehr flache, plumpe, breite Falten. In der L. propria des Epithels sind bereits Drüsen vorhanden. Das zilientragende Epithel besteht aus auffallend großen, hochprismatischen Zellen. Das Epithel trägt Zilien. Die Kerne liegen konstant im basalen Zytoplasma. Der Zytoplasmaanteil der Zellen ist hoch, so dass das Kern-Plasma-Verhältnis relativ klein ist.

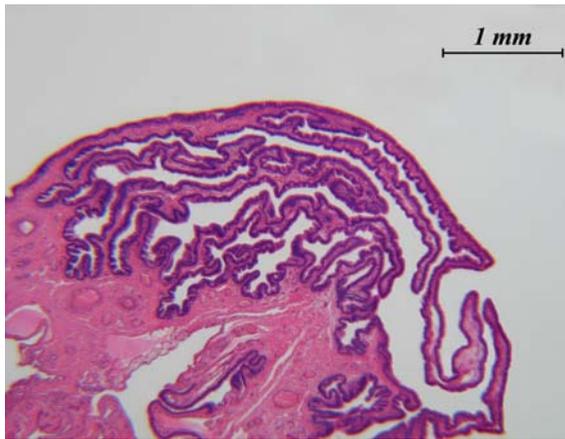


Abb. 16: HE-Färbung, einige Falten des Infundibulums im Metöstrus.

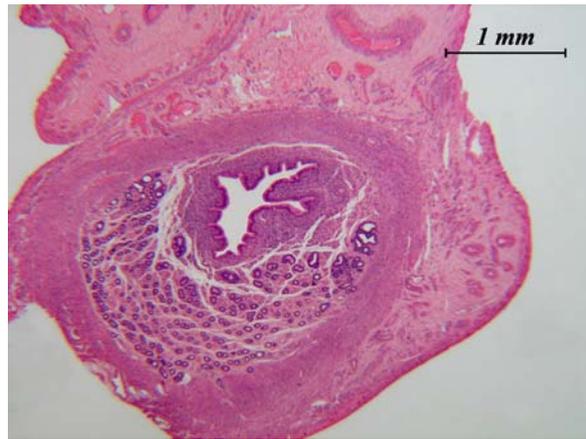


Abb. 17: HE-Färbung, Querschnitt der uterotubalen Verbindung im Metöstrus.

### Tichromfärbung nach MASSON und GOLDNER

Die bindegewebige Tela subserosa ist eine zellarme Schicht, die reich an Grundsubstanz ist. Die Breite der Tela subserosa nimmt in Richtung der uterotubalen Verbindung (UTJ) zu, demnach ist diese Schicht in der Ampulla sehr schmal und im Isthmus breit. Es sind relativ große Arterien und Venen eingelagert. Ihre Zahl ist nicht einheitlich, besonders häufig sind sie in den Präparaten der Ampulla zu finden.

Die Tunica muscularis variiert in ihrem Durchmesser in den Segmenten des Eileiters sehr stark. Außen finden sich querverlaufende Fasern, in Richtung Lumen ist der Faserverlauf variabel. Die glatten Muskelzellen weisen nur wenig Sarkoplasma auf und haben eine spindelige Form. Deutlich zu erkennen ist, dass die Dicke der Muskelschicht in Richtung Trichter abnimmt. Im Trichter ist die T. muscularis nicht als kompakte Schicht ausgebildet. Am Übergang zur Ampulla kommen lediglich vereinzelte Muskelfasern vor.

Die zellreiche Lamina propria ist ebenfalls im Isthmus etwas dicker als in der Ampulla ausgebildet. Am stärksten ausgeprägt ist sie in der UTJ. Dort ist sie zudem besonders zellreich.

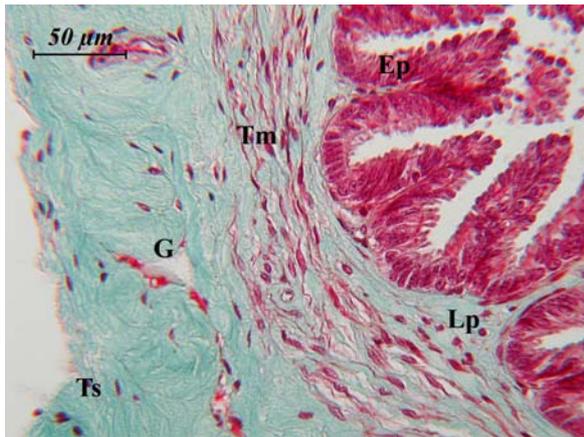


Abb. 18: Goldner-Färbung, Ampulla. Die Tunica muscularis (Tm) erscheint locker und ist reich an Bindegewebe. In der Tela subserosa (Ts) sind relativ große Gefäße (G) eingelagert. Epithel (Ep), L. propria (Lp).

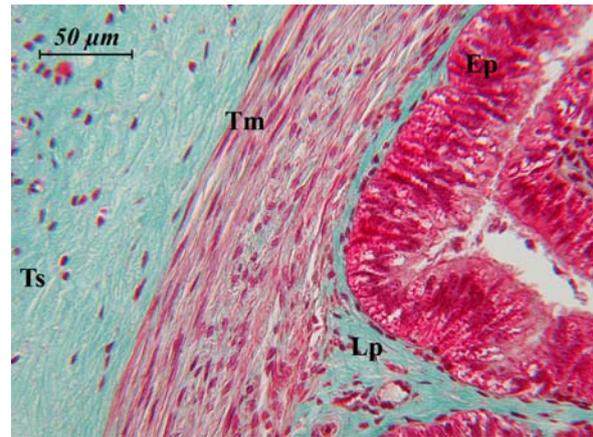


Abb. 19: Goldner-Färbung, Isthmus. Die Tunica muscularis (Tm) erscheint kompakt, es ist wenig Bindegewebe eingelagert. Epithel (Ep), L. propria (Lp), Tela subserosa (Ts).

Das Verhältnis von L. propria zu T. muscularis beträgt im Isthmus ca. 1:7 - 1:9 und in der Ampulla ca. 1:1 - 1:3. Gefäße verlaufen bis in die Spitzen der Falten. Subepithelial ist die L. propria besonders zellreich. Die Gefäßdichte in der L. propria der Falten nimmt vom uterotubalen Übergang in Richtung Infundibulum stetig zu. Während in der Ampulla unter anderem viele relativ weitlumige Kapillaren vorkommen, weisen diese im Isthmus deutlich kleinere Durchmesser auf. Eine Abhängigkeit der Kapillardurchmesser vom Zyklusstand ist nicht erkennbar.



Abb. 20: Goldner-Färbung, Falte in der Ampulla. Es sind weitlumige Kapillaren in der Lamina propria der Falten Spitze zu erkennen.

### Periodic-Acid-Schiff Reaktion (PAS)

Die Intensität der PAS-Reaktion variiert sowohl innerhalb des Zyklus als auch in den verschiedenen Segmenten deutlich. Grundsätzlich sind nur die apikalen Zytoplasmaanteile jeder

zweiten Zelle angefärbt. Es handelt sich hierbei um die Zellen mit basal gelegenen Kernen, also um die sekretorischen Zellen. Es entsteht dadurch ein regelmäßiges Bild von sich abwechselnden positiven (rosa leuchtenden) und negativen (hellen) Zellen. Die zilientragenden Zellen weisen in keiner der Proben eine positive Reaktion auf.

Die basalen Zellen (Lymphozyten) verhalten sich ebenfalls PAS negativ (-). Ihr Zytoplasma erscheint noch heller als das der zilientragenden Zellen.

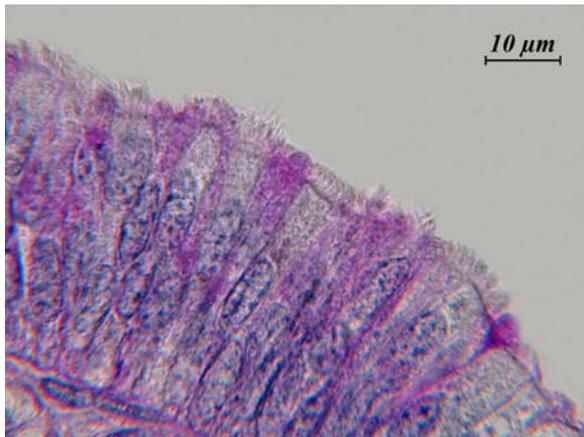


Abb. 21: PAS-Reaktion, Epithel der Ampulla im Östrus. Die sekretorischen Zellen reagieren schwach PAS positiv.

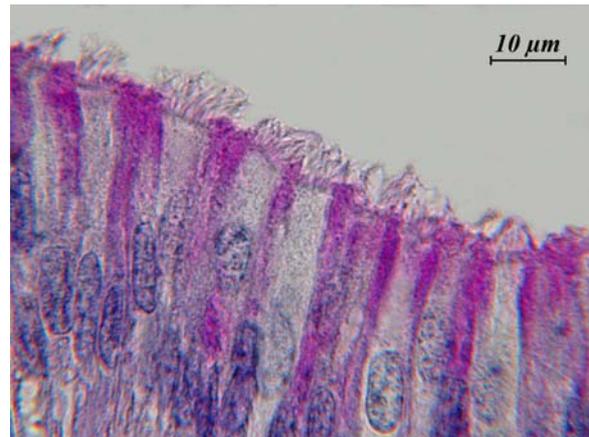


Abb. 22: PAS-Reaktion, Epithel des Isthmus im Östrus. Die sekretorischen Zellen reagieren deutlich PAS positiv.

Im Proöstrus ist im Isthmussegment eine positive PAS-Reaktion zu verzeichnen, während die Reaktion in der Ampulla gänzlich negativ ausfällt. Im Östrus ist die Reaktion im Isthmus stärker (++) als in der Ampulla. Dort erscheinen 2 Proben leicht gefärbt (+), eine Probe ist nur undeutlich PAS-positiv (-/+). Im Metöstrus ist die Färbung sowohl im Isthmus, als auch in der Ampulla deutlich positiv (++)). Die Farbreaktion dehnt sich in den entsprechenden Ampullazellen bis in die Mitte des Zytoplasmas aus. Im Isthmus hingegen bleibt sie auf das apikale Zytoplasma begrenzt.

Im Diöstrus ist nur in einer Probe (aus der Ampulla) eine positive Reaktion (+) auszumachen. Es sind sehr wenige Zellen angefärbt. Sie erscheinen auffallend schmal und verbreitern sich am apikalen Zellpol nur ganz leicht.

Unabhängig vom Zyklusstand zeigt sich die apikale Zelloberfläche in den meisten Proben schwach positiv (+). Die aus dem Diöstrus stammenden Proben weisen allgemein schwächere PAS-Reaktionen auf. Die apikale Oberfläche ist hier nur undeutlich positiv (-/+).

## Alzianblaufärbung

Bei Durchführung der Färbung bei einem pH-Wert von 1,0 ist keine blaue Färbung vorhanden, demnach sind keine sulfatierten Mukosubstanzen vorhanden.

Bei einem pH-Wert von 2,5 hingegen stellen sich die Zilienspitzen blau dar. Auch die vorhandenen Protrusionen sind blau umrandet.

In der Ampulla können karboxylgruppenhaltige Mukosubstanzen im supranucleären Zytoplasma von sekretorischen Epithelzellen nachgewiesen werden. Die entsprechenden Proben stammen aus dem Proöstrus, Östrus oder Metöstrus von ipsi- und contralateralen Ampullasegmenten. Keinerlei positive Alzianblaureaktion findet sich im Epithel von Trichter, Isthmus und UTJ sowie bei den Proben aus dem frühen bzw. späten Diöstrus. Die Alzianblaureaktion in den einzelnen Proben ist nur bei einigen Zellen zu erkennen und fällt teilweise schwach aus. Bei Alzianblaufärbung mit pH 1,0 und 2,5 sind im Bindegewebe Zellen mit leuchtend blauem Zytoplasma und rotem Kern vorhanden, bei denen es sich wahrscheinlich um Mastzellen oder Histozyten handelt.



Abb. 23: Alzianblaufärbung bei pH 2, 5, Ampulla, Metöstrus. Das perinukleäre Zytoplasma der sekretorischen Zellen weist eine deutliche Färbung auf, die Zilienspitzen sind ebenfalls angefärbt.



Abb. 24: Alzianblaufärbung bei pH 1,0, Ampulla, Metöstrus. Das Epithel weist keine Reaktion auf.



Abb. 25: Alzianblau positive Zellen in der bindegewebigen Tela subserosa (Ts) des Eileiters, es handelt sich wahrscheinlich um Mastzellen.

### Silberimprägnation nach Gomori

Die Epithelzellen stellen sich grau dar, ihre Kerne sind etwas heller als das umgebende Zytoplasma und heben sich dadurch leicht ab. An der apikalen Zellmembran weisen die zilientragenden Zellen einen dunklen Saum auf. Es handelt sich hierbei um die Kinetosomen der Zilien. Die Zilien zeichnen sich in einem kräftigen Grau sehr klar ab und machen so eine deutliche Differenzierung zwischen den Zellarten des Epithels möglich. Die Lamina propria ist braunviolett gefärbt. Sie besteht demnach hauptsächlich aus kollagenen Fasern. Subepithelial und die Gefäße umgebend sind feine argyrophile Fasern eingelagert. Die Tunica muscularis enthält viele feine, retikuläre Fasern in den Verschiebeschichten der Muskelzellen. Auch die größeren Gefäße der Tela subserosa enthalten silberimprägnierte Fasern zwischen ihren glatten Muskelzellen. Ansonsten erscheint diese Schicht homogen violett. Ihre Farbintensität ist schwächer als die der L. propria.



Abb. 26: Gomori-Silberimprägnation, Ampulla. Die kollagenen Fasern der L. propria (Lp) einer Bindegewebsfalte erscheinen homogen violett.



Abb. 27: Gomori-Silberimprägnation, das Epithel der Ampulla mit dezenten Protrusionen im Metöstrus. Die Kinetosomen der Zilien stellen sich schwarz dar.

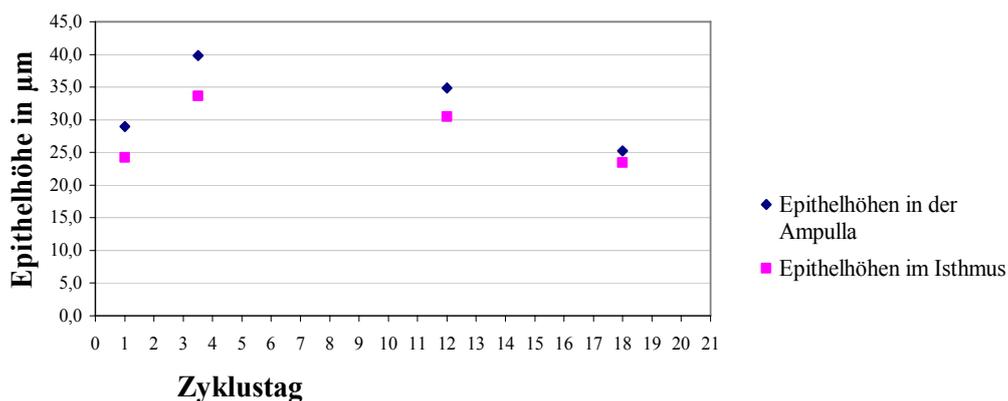
## Morphometrische Untersuchungen

### Epithelhöhen:

Die Höhe des Epithels von der Basallamina zur apikalen Zellmembran beträgt in der Ampulla im Proöstrus durchschnittlich 29  $\mu\text{m}$ , im Östrus 39,9  $\mu\text{m}$ , im Metöstrus 34,9  $\mu\text{m}$ , im Diöstrus 25,2  $\mu\text{m}$ . Im Diöstrus wurden bei einer zweiten Meßvariante die Protrusionen eingeschlossen, dabei ergibt sich ein durchschnittlicher Wert von 32  $\mu\text{m}$ .

Im Isthmus ist das Epithel flacher als in der Ampulla. Die durchschnittliche Höhe der Epithelzellen beträgt im Proöstrus 24,3  $\mu\text{m}$ , im Östrus 33,6  $\mu\text{m}$ , im Metöstrus 30,5  $\mu\text{m}$  und im Diöstrus 23,4  $\mu\text{m}$ . Die Zilien erreichen in der Ampulla eine durchschnittliche Länge von 4  $\mu\text{m}$  und im Isthmus von ca. 6  $\mu\text{m}$ .

### Die Höhe des Epithels im Zyklusverlauf



Graphik 1: Die Höhen des Epithels in  $\mu\text{m}$  in der Ampulla und im Isthmus an vier verschiedenen Zyklustagen. Das Epithel der Ampulla ist in allen Zyklusphasen höher als das Epithel im Isthmus. Die höchsten Werte werden in beiden Segmenten im Östrus, die niedrigsten Werte im Diöstrus gemessen.

### Anzahl zilientragender und sekretorischer Zellen im Zyklusverlauf:

Zilientragende und sekretorische Zellen (bzw. nichtzilientragende Zellen) sind in Ampulla und Isthmus jeweils zu ca. 50 % vorhanden. Es kann keine Veränderung ihrer Anteile während des Zyklus festgestellt werden. Bei den Zählungen wurden die basalen Zellen nicht berücksichtigt. Ungefähr 2-4 Zellen pro hundert gezählter Epithelzellen sind als basale Zellen zu identifizieren.

## 4.1.2 Immunhistochemische Untersuchungen

### Immunhistochemischer Nachweis von Panzytokeratin

Nur die Epithelzellen des Eileiters reagieren mit dem Antikörper gegen Panzytokeratin. Die Serosaepithelzellen sind konstant dunkelbraun angefärbt und zeigen damit eine stark positive Reaktion (+++). Eine konstant negative Reaktion weisen die Gefäßendothelien auf.

Das Zytoplasma der sekretorischen Epithelzellen ist deutlich bis stark immunpositiv. Die Protrusionen haben ein schwach immunpositives Zentrum (+) und reagieren im äußeren Bereich stark positiv (+++) mit dem Antikörper gegen Panzytokeratin. Die zilientragenden Zellen haben ein deutlich immunpositives Zytoplasma (++), supranukleäre Bereiche weisen insbesondere im Isthmus eine stark positive Reaktion (+++) auf.

Die zilientragenden Zellen des Isthmus weisen apikal ein dunkleres Zytoplasma auf als die sekretorischen Zellen.

Die basalen Rundzellen reagieren nicht mit dem Antikörper gegen Panzytokeratin.

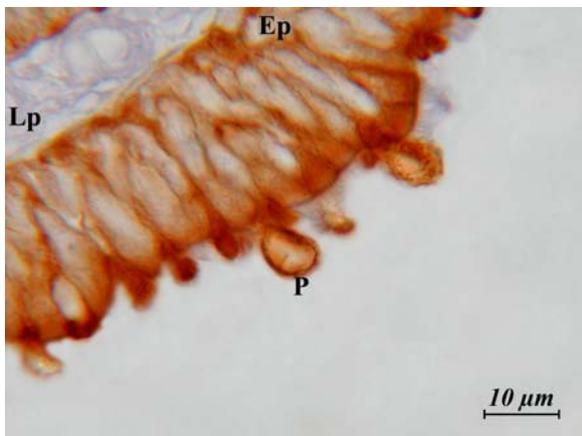


Abb. 28: IHC-Nachweis von Panzytokeratin im Epithel (Ep) der Ampulla. Die Protrusionen (P) weisen eine starke immunpositive Umrandung auf. Die L. propria (Lp) zeigt keine Immunreaktion.



Abb. 29: IHC-Nachweis von Panzytokeratin im Epithel (Ep) des Isthmus, die supranukleären Bereiche der zilientragenden Zellen erscheinen besonders immunreaktiv. Die L. propria (Lp) ist Zytokeratin negativ.



Abb. 30: IHC-Nachweis von Panzytokeratin im Isthmus in der Übersicht. Die spezifische Reaktion des Antikörpers wird deutlich.

### **Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin**

In der Lamina propria befinden sich insbesondere subepithelial viele stark Vimentin positive Zellen (+++). Auch Endothelzellen der Gefäße reagieren stark positiv (+++).

In der T. muscularis gibt es nur wenige Zellen, die Immunreaktionen auf Vimentin zeigen. Es handelt sich hierbei um die Fibroblasten aus den muskulären Verschiebeschichten. Die Muskelzellen selbst reagieren nicht oder nur schwach mit dem Vimentinantikörper.

In der Tela subserosa erscheinen die wenigen vorhandenen Fibroblasten ebenfalls deutlich immunpositiv (++). Die in dieser Schicht enthaltenen größeren Gefäße reagieren im Endothel mit dem Antikörper gegen Vimentin positiv. Ihre Muskelschicht reagiert im Allgemeinen nur sehr schwach (-/+).

Im Eileiterepithel einschließlich der eingestreuten freien Zellen bleibt der Nachweis von Vimentin negativ.

### **Immunhistochemischer Nachweis von $\alpha$ -„smooth-muscle-actin“ ( $\alpha$ -SMA)**

Die Tunica muscularis weist in allen Abschnitten des Eileiters eine stark positive Reaktion mit dem Antikörper gegen  $\alpha$ -SMA auf (+++). Die Dicke dieser Schicht nimmt von der Ampulla in Richtung uterotubaler Verbindung zu (UTJ). Der Verlauf der Muskulatur ist nicht einheitlich. Außen verlaufen die Muskelzellen vornehmlich in der Längsrichtung des Eileiters, innen zunehmend auch quer. Weiter ist zu beobachten, dass die Ausbildung der Längsmuskelschicht nach kaudal zunimmt. In der Ampulla ist nur eine sehr lockere zirkuläre Muskelschicht vorhanden, die zum Ovar hin dünner wird. Am Übergang von der Ampulla zum Infundibulum sind noch einzelne Muskelzellen zu identifizieren. Das Infundibulum lässt keine Tunica

muscularis mehr erkennen.

Die Muskelschicht der Eileitergefäße weist einen hohen Gehalt an  $\alpha$ -SMA auf (+++). Die Endothelien sind immer negativ und heben sich deshalb sehr klar von den Muskelzellen ab.

In der Lamina propria der Falten sind viele Gefäße von unterschiedlicher Größe vorhanden.

Sie zeigen ausnahmslos eine positive Reaktion ihrer Muskelzellen.

In der Lamina propria der Ampulla kommen einzelne, subepitheliale Zellen vor, die stark positiv (+++) reagieren, dabei dürfte es sich um Myofibroblasten handeln.

Im kaudalen Teil des Isthmus sind im Faltenbindegewebe schwach  $\alpha$ -SMA positive Zellen vorhanden. Gefäße kommen in diesem Teil auffallend selten vor. In der Tela subserosa kommen zahlreiche große und kleine Gefäße vor, deren Tunica media stark  $\alpha$ -SMA positiv (+++) erscheint. Das Epithel der Tunica serosa reagiert negativ.

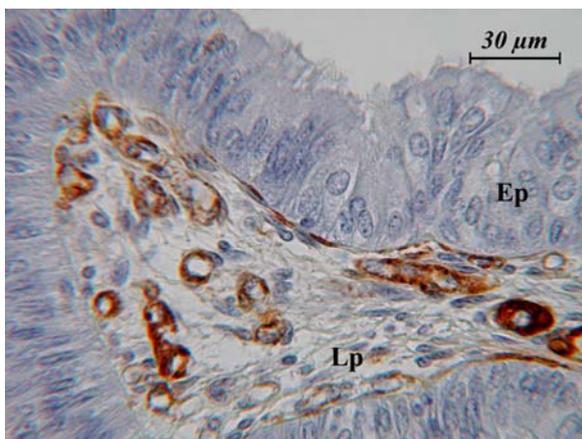


Abb. 31: Nachweis von  $\alpha$ -SMA in einer Falte der Ampulla. Die glatte Muskulatur der Gefäße reagiert stark positiv. L. propria (Lp), Epithel (Ep).

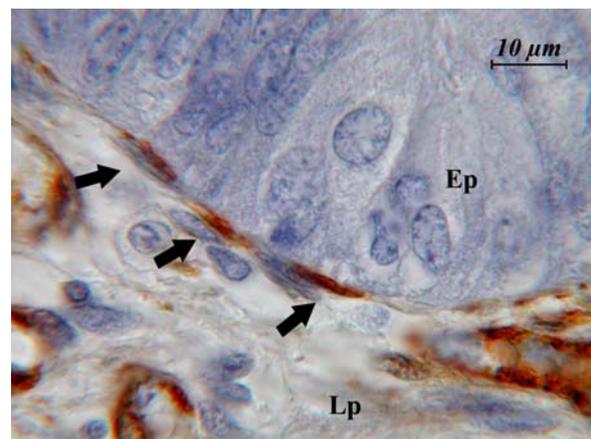


Abb. 32: IHC-Nachweis von  $\alpha$ -SMA, Vergrößerung. Subepithelial gelegene Zellen (Pfeile) der L. propria (Lp) reagieren stark immunpositiv mit dem  $\alpha$ -SMA Antikörper. Epithel (Ep).

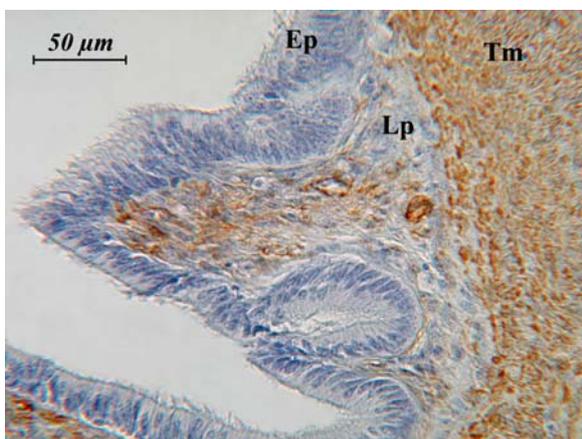


Abb. 33: IHC-Nachweis von  $\alpha$ -SMA in einer Falte des Isthmus. Es sind neben den  $\alpha$ -SMA positiven Muskelzellen der Gefäße deutlich immunpositive Bindegewebszellen in der Falte vorhanden. Epithel (Ep), L. propria (Lp), Tunica muscularis (Tm).

## Vergleich der immunhistochemischen Nachweise von $\alpha$ -SMA und Vimentin

Sowohl  $\alpha$ -SMA als auch Vimentin lassen sich in den Gefäßen des Eileiters nachweisen. Der Vimentin Antikörper (AK) reagiert dabei nur mit den Endothelzellen, während sich  $\alpha$ -SMA ausschließlich in der Tunica media der Gefäße nachweisen lässt. Auch die Lamina propria und die Tunica muscularis können mittels dieser Antikörper gut differenziert werden:

Der Vimentin Antikörper zeigt eine deutlich bis stark positive Reaktion (++ - +++) in der L. propria und den bindegewebigen Verschiebeschichten der Muskulatur. Der  $\alpha$ -SMA Antikörper hingegen reagiert ausschließlich mit den Filamenten im Zytoplasma der Myozyten.

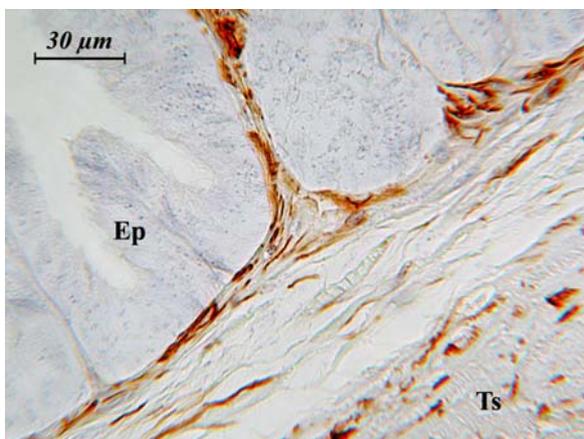


Abb. 34: IHC-Nachweis von Vimentin in der Ampulla. Abb. 35: IHC-Nachweis von  $\alpha$ -SMA in der Ampulla.

Abb. 34 und 35: Eine dünne subepitheliale Schicht der L. propria reagiert mit beiden Antikörpern positiv. Es könnte sich dabei z.B. um Myofibroblasten handeln. Das Epithel (Ep) zeigt keine Reaktion. In der Tela subserosa (Ts) sind Vimentin positive Zellen vorhanden (links).

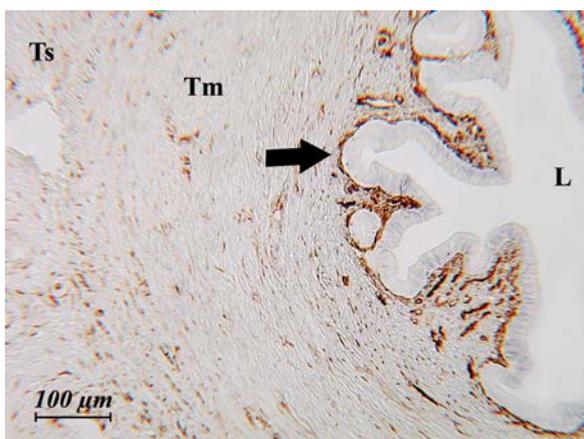


Abb. 36: IHC-Nachweis von Vimentin im Isthmus. Abb. 37: IHC-Nachweis von  $\alpha$ -SMA im Isthmus.

Abb. 36 und 37: Subepithelial findet im Isthmus ausschließlich eine positive Reaktion mit dem Antikörper gegen Vimentin statt. Die Tunica muscularis (Tm) reagiert mit dem  $\alpha$ -SMA Antikörper positiv, während mit dem Vimentin Antikörper nur die Bindegewebszellen der Verschiebeschichten reagieren. Tela subserosa (Ts), Lumen (L).

### Immunhistochemischer Nachweis von S 100

Der Antikörper gegen das S100-Protein bindet im Eileiter spezifisch ausschließlich in den Epithelzellen. Alle Gefäße bleiben ungefärbt.

Die Immunreaktivität der Epithelzellen variiert jedoch: Im Isthmussegment reagieren die zilienträgenden Zellen deutlich positiv (++), während die schmalen, sekretorischen Zellen eher schwach angefärbt sind (-/+ - +). In der Ampulla ist ein anderes Reaktionsmuster festzustellen: Hier sind die sekretorischen Zellen insbesondere apikal und in den Protrusionen deutlich braun gefärbt (++ - +++). Die zilienträgenden Zellen der Ampulla binden weniger Antikörper (+) als die sekretorischen Zellen.

Die Rundzellen weisen keine Reaktion mit dem Antikörper gegen S100 auf.



Abb. 38: IHC-Nachweis von S 100 in der Ampulla.

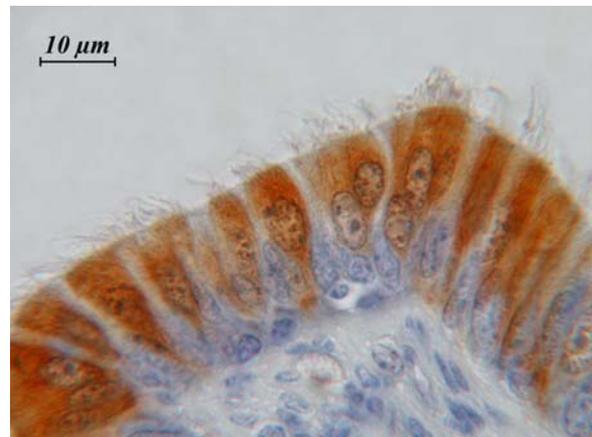


Abb. 39: IHC-Nachweis von S 100 im Isthmus.

Abb. 38 und 39: Im Isthmus (rechts) reagieren die zilienträgenden Zellen stärker mit dem Antikörper gegen S100. In der Ampulla (links) weisen die sekretorischen Zellen (hier mit Protrusionen) eine deutlichere Immunreaktion auf. In Abb. 39 (rechts) ist eine basale Zelle vorhanden, die eindeutig S100-negativ ist.

### Immunhistochemischer Nachweis von Laminin

Der Antikörper gegen Laminin zeigt in der mikroskopischen Auswertung eine leichte, unspezifische Hintergrundfärbung. Die Basallamina reagiert deutlich positiv (++). Direkt subepithelial ist sie als eine klare, kontinuierliche, braune Linie zu erkennen, die jedoch relativ schmal erscheint. In den Gefäßen ist unter dem Endothel ebenfalls eine sehr dünne, durchgängige lamininreaktive Basallamina erkennbar.

Der apikale Zellpol der zilienträgenden Zellen ist schwach immunpositiv (+). Diese Reaktion ist dabei auf Höhe der Kinetosomen lokalisiert.

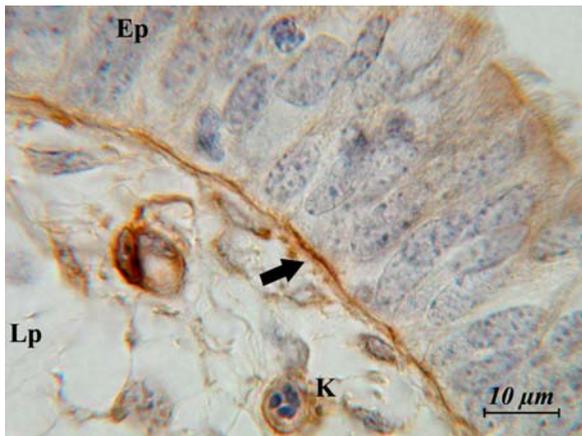


Abb. 40: IHC-Nachweis von Laminin in der Basalmembran (Pfeil) des Eileiterepithels (Ep). L. propria (Lp), Kapillare (K).

### Immunhistochemischer Nachweis von ChromograninA

Es ist bei allen Proben außer der Negativkontrolle eine leichte unspezifische Hintergrundfärbung vorhanden. Sowohl die leichte Färbung des epithelialen Zytoplasmas als auch die schwache Reaktion der Gefäße sind als unspezifisch einzustufen, da sie bei den Kontrollen ebenfalls zu sehen war.

Jede zweite Zelle reagiert im Bereich der apikalen Zellpole deutlich positiv (++). Dadurch entsteht ein regelmäßiges Muster im Epithel. Bei stärkerer Vergrößerung ist zu erkennen, dass es sich bei den positiv reagierenden Zellen ausschließlich um die zilientragenden Zellen handelt. Die Zilien setzen genau an den ChromograninA immunreaktiven apikalen Zellpolen an. Die sekretorischen Zellen lassen keine Immunreaktion auf ChromograninA erkennen. Da diese Zellen nach apikal schmaler werden, beteiligen sie sich nur in geringem Maße an der Bildung der apikalen Epitheloberfläche.

Die in den verschiedenen Zyklusstadien in der Ampulla vorkommenden Protrusionen wölben sich zwischen den chromograninhaltigen Zellpolen der benachbarten zilientragenden Zellen hervor und drücken die Zilien zur Seite. In diesen Bereichen ist die positive Immunreaktion besonders deutlich den zilientragenden Zellen zuzuordnen, da die Protrusionen den gefärbten Saum unterbrechen.

Alle weiteren Zellen im Eileiter reagieren beim Nachweis von ChromograninA nicht.

Bei der Mehrzahl der Proben fällt die immunhistochemische Reaktion im Isthmus stärker aus als in den entsprechenden Proben der Ampulla. Die Expression des ChromograninA unterliegt keiner Regulation in den verschiedenen Zyklusstadien. Auch die Anzahl positiv reagierender Zellen ändert sich während des Zyklus nicht.

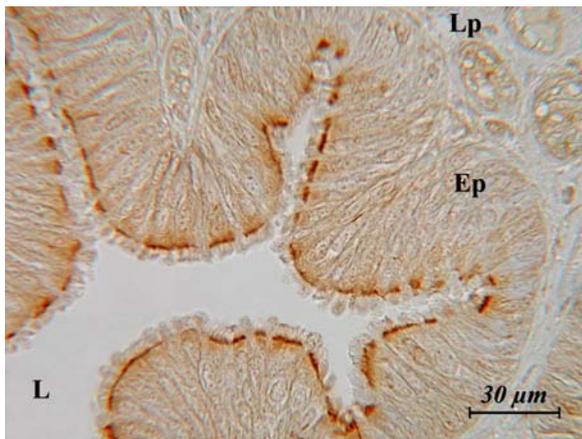


Abb. 41: IHC-Nachweis von ChromograninA an den apikalen Zellpolen der zilientragenden Zellen. Lumen (L), Epithel (Ep), L. propria (Lp).



Abb. 42: IHC-Nachweis von ChromograninA. Vergrößerung des Epithels, die Zilien sind eindeutig den ChromograninA positiven Zellen zuzuordnen.

### Immunhistochemischer Nachweis des Östrogenrezeptor $\alpha$ (ER $\alpha$ )

Der ER $\alpha$  wird vor allem in den Zellkernen des Eileiterepithels, in den Fibrozyten der L. propria und in den glatten Muskelzellen der Tunica muscularis exprimiert. Dies wird durch eine spezifische braune Kernfärbung beim histochemischen Nachweis deutlich. Die leichte Färbung des Zytoplasmas wird als unspezifische Hintergrundfärbung angesehen. Die Negativkontrollen sind vollständig ungefärbt.

#### Ampulla:

In der Ampulla sind die Kerne der glatten Muskelzellen besonders im Proöstrus deutlich bis stark ER $\alpha$  positiv (++ - +++). In den Proben des Östrus, Metöstrus und Diöstrus zeigen sie nur schwach positive, in zwei Fällen sogar keine Reaktionen.

Die Fibrozytenkerne der Lamina propria weisen selbst innerhalb einer Probe große Unterschiede auf. Es sind zwischen 30 und 60 % der Kerne ER $\alpha$  positiv. Auffallend viele ER $\alpha$  positive Kerne sind in den Falten spitzen vorhanden, sehr wenige findet man in basalen Bereichen und in der zirkulären Schicht der L. propria. Auffallend oft liegen die immunpositiven Kerne in der unmittelbaren Nähe des Epithels. Ihre Reaktion ist im Proöstrus und im Östrus durchschnittlich deutlich positiv (++) . Im Metöstrus zeigen 2 Proben stark positiv reagierende Bindegewebszellkerne. Im Diöstrus ist nur eine schwach positive Reaktion zu verzeichnen.

Die Fibrozytenkerne der Tela subserosa sind nur vereinzelt schwach ER $\alpha$  positiv.

Die Serosaepithelzellen zeigen insbesondere im Östrus deutlich positive Reaktionen.

In den Endothelien lässt sich ER $\alpha$  nicht nachweisen.

Insbesondere im Epithel variiert die Reaktionsintensität mit dem Antikörper gegen ER $\alpha$  in den Eileiterabschnitten und mit dem Zyklus. Es ist sehr auffällig, dass sich in beiden Abschnitten gleichermaßen die Zellkerne der verschiedenen Zellen in ihrer Reaktionsintensität unterscheiden. Die basal lokalisierten Kerne weisen im Allgemeinen stärkere ER $\alpha$  Reaktionen auf als die in der Zellmitte gelegenen Kerne. Die basalen Zellen im Epithel sind immer ER $\alpha$  negativ.

#### Zyklische Veränderungen des Östrogenrezeptor $\alpha$ im Epithel der Ampulla

Im Östrus sind viele negative Kerne vorhanden. Sie erscheinen durch die Hämalaunfärbung bläulich. Diese Kerne liegen meist in der Mitte der Zelle. Die basal gelegenen Kerne erscheinen meist schwach positiv (+) bis deutlich positiv (++).

Im Metöstrus ist die Lage der Kerne etwas ungleichmäßiger. Es sind einige stark positive Kerne vorhanden (+++), die von ovaler Form sind. Die basal gelegenen, ovalen Kerne erscheinen uneinheitlich vollständig negativ bis stark ER $\alpha$  positiv (+++). Die ehemals in der Zellmitte gelegenen Kerne sind an ihrer runden Form zu identifizieren. Sie erscheinen oft negativ, meist fraglich positiv (-/+) und selten schwach positiv (+).

Im Diöstrus und im Proöstrus wird ER $\alpha$  auch in den kernhaltigen Protrusionen exprimiert. Die Färbung dieser Kerne ist meist deutlich bis stark ER $\alpha$  positiv (++ -+++). Ansonsten ähnelt das Bild stark dem des Metöstrus. Die schwächste Reaktion mit dem Antikörper ist im Östrus zu verzeichnen.

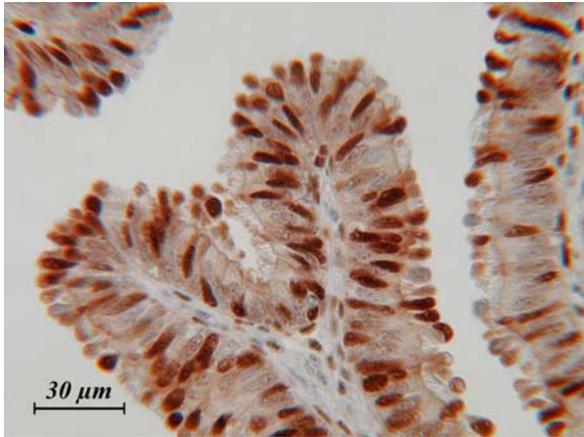


Abb. 43: IHC-Nachweis des ER $\alpha$  in der Ampulla, Proöstrus. Die kernhaltigen Protrusionen der sekretorischen Zellen zeigen starke Reaktionen mit dem ER $\alpha$  Antikörper.

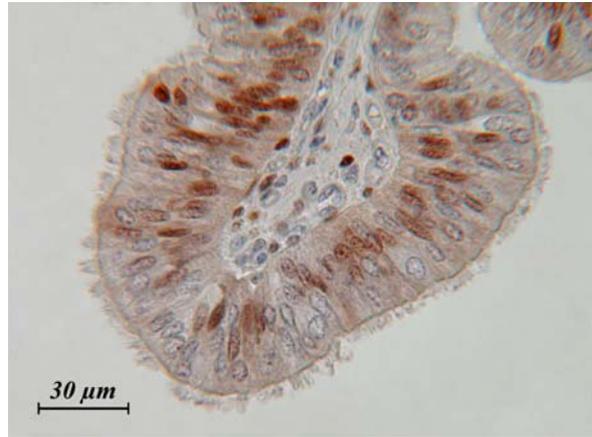


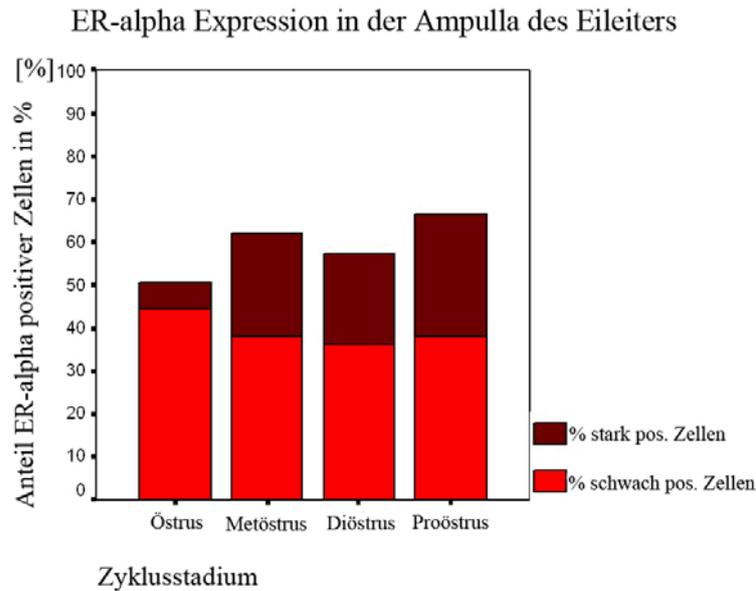
Abb. 44: IHC-Nachweis des ER $\alpha$  in der Ampulla, Östrus. Lediglich die basale Kernreihe (sekretorische Zellen) zeigt eine positive Reaktion mit dem ER $\alpha$  Antikörper.



Abb. 45: IHC-Nachweis des ER $\alpha$  in der Ampulla, Metöstrus. Die basale Kernreihe (sekretorische Zellen) zeigt eine deutlich bis starke Reaktion. Die Kerne der zilientragenden Zellen zeigen eine schwach positive Reaktion mit dem ER $\alpha$  Antikörper.



Abb. 46: IHC-Nachweis des ER $\alpha$  in der Ampulla, Diöstrus. Die Kerne der sekretorischen Zellen weisen deutlich bis stark immunpositive Kerne auf, die entweder basal liegen oder sich in den Protrusionen befinden.



Graphik 2: Graphische Darstellung der Anteile ER $\alpha$  positiver und stark positiver Zellen im Epithel der Ampulla. Anhand der Graphik wird deutlich, dass sowohl der maximale Anteil an Zellkernen, die den ER $\alpha$  exprimieren als auch die maximale Expression des ER $\alpha$  in der Ampulla im Proöstrus gegeben ist. Im Östrus ist sowohl der Anteil aller positiv reagierender Zellen als auch der stark positiv reagierender Zellen (++) am niedrigsten. Im Zyklusvergleich ist der Anteil ER $\alpha$  positiver Zellen im Proöstrus am höchsten und im Östrus am geringsten.

### Isthmus:

Die Proben aus dem Isthmussegment weisen in Muskulatur und Bindegewebe in allen Stadien deutlich bis stark positive Reaktionen der Zellkerne mit dem Antikörper gegen ER $\alpha$  auf. Im Diöstrus scheint die Reaktion etwas schwächer zu sein als in den anderen Zyklusstadien. Die Serosa ist teilweise deutlich ER $\alpha$  positiv. Die Endothelien weisen vor allem im Östrus zum Teil deutlich positive Reaktionen auf, andere Gefäße bleiben gänzlich ohne Reaktion. Die Tunica media der Gefäße ist immer ER $\alpha$  negativ.

### Zyklische Veränderungen des Östrogenrezeptor $\alpha$ im Epithel des Isthmus:

Die Intensität der ER $\alpha$  Immunreaktion ist im Isthmus stärker als in der Ampulla.

Im Östrus ist die Expression des Rezeptors wie in der Ampulla am geringsten. Es sind nur wenige stark positive (+++) Kerne vorhanden. Die Anzahl der deutlich positiv gefärbten Kerne (++) scheint etwas höher zu sein als in der Ampulla.

Im Metöstrus ist die basale Kernreihe fast durchgängig stark ER $\alpha$  positiv (+++). Die in der Mitte der Zelle gelegenen Kerne sind durchschnittlich deutlich positiv (++) .

Im Diöstrus ist die basale Kernreihe nicht ganz so stark ER $\alpha$  positiv (++) wie im Metöstrus. Zudem sind die in der Zellmitte gelegenen, runden Kerne nur schwach ER $\alpha$  positiv gefärbt. Ansonsten entspricht das Bild dem Metöstrus. Im Proöstrus fällt der ER $\alpha$  Nachweis ähnlich

wie im Diöstrus aus, nur sind mehr ungefärbte oder schwach ER $\alpha$  positive Zellkerne in der basalen Kernreihe vorhanden.

Beide Kernreihen sind besonders im Isthmus deutlich zu unterscheiden. Die ER $\alpha$  Immunreaktion der basalen Kernreihe ist stärker als die der in der Epithelmitte gelegenen Kerne.



Abb. 47: IHC-Nachweis des ER $\alpha$  im Isthmus, Proöstrus. In der basalen Kernreihe (sekretorische Zellen) reagieren einige Kerne stark ER $\alpha$  immunpositiv. Die in der Mitte des Zytoplasmas gelegenen Kerne weisen höchstens schwach positive ER $\alpha$  Immunreaktionen auf.

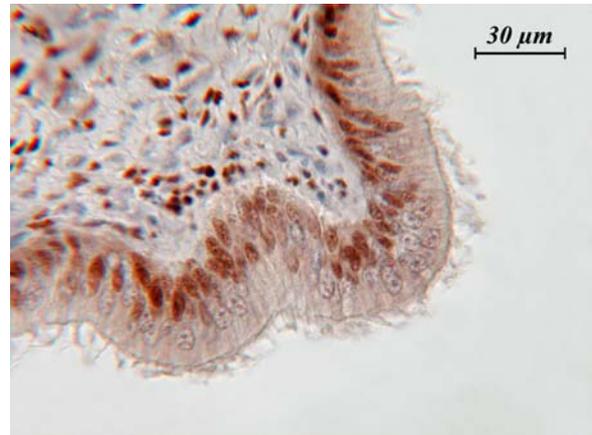


Abb. 48: IHC-Nachweis des ER $\alpha$  im Isthmus, Östrus. In der basalen Kernreihe (sekretorische Zellen) sind schwach bis deutlich positive Immunreaktionen vorhanden, die mittelständigen Kerne der zillientragenden Zellen zeigen eine negative Immunreaktion.

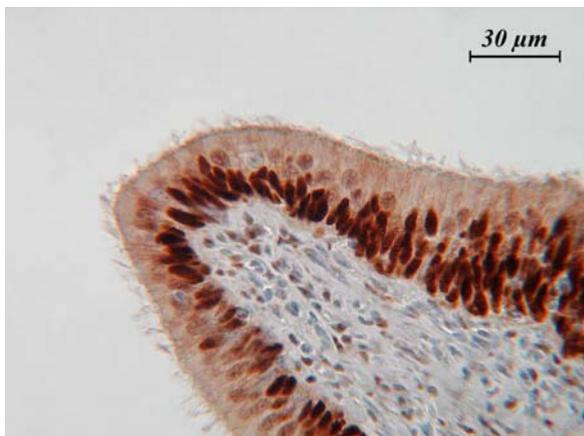


Abb. 49: IHC-Nachweis des ER $\alpha$  im Isthmus, Metöstrus. Es ist insbesondere in der basalen Kernreihe eine starke Immunreaktion vorhanden, auch die mittelständigen Kerne reagieren positiv.

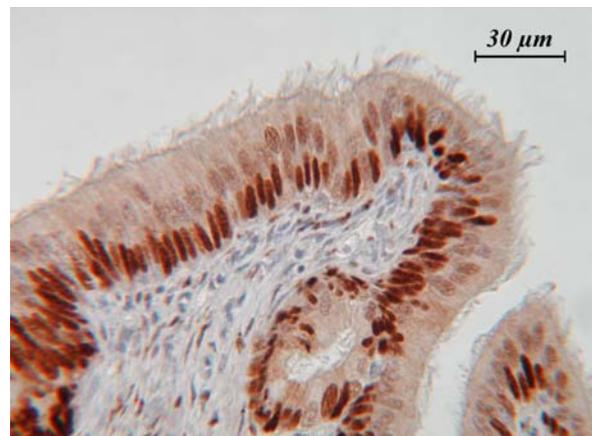


Abb. 50: IHC-Nachweis des ER $\alpha$  im Isthmus, Diöstrus. Die basale Kernreihe weist durchgängig deutliche bis starke Immunreaktionen auf, auch die mittelständigen Kerne reagieren schwach positiv mit dem ER $\alpha$  Antikörper. Die Gesamtreaktion fällt etwas schwächer aus als im Metöstrus.

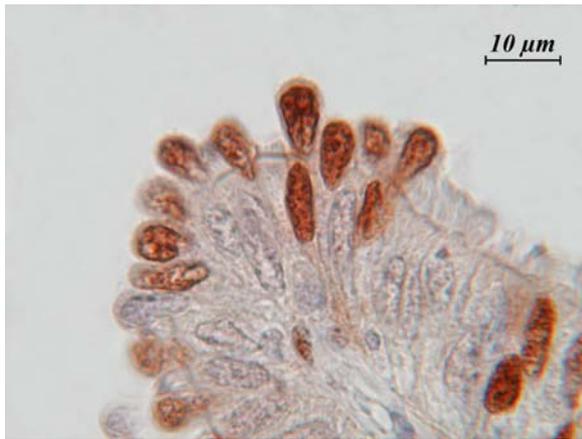
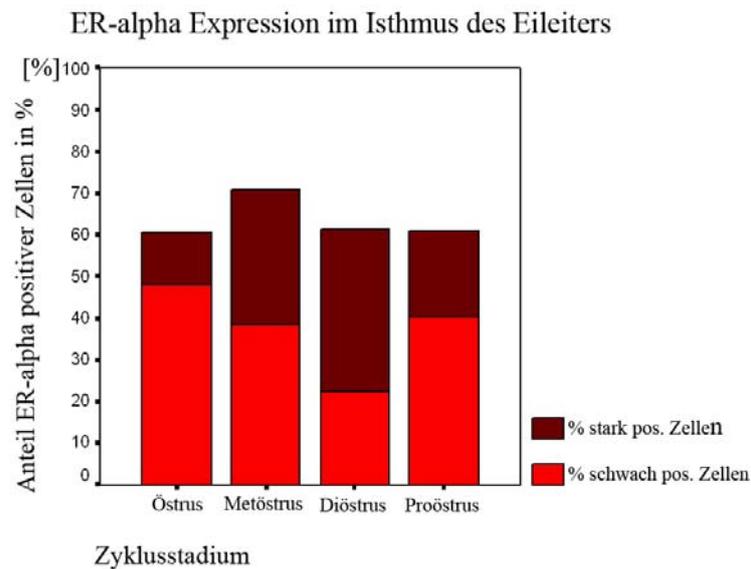


Abb. 51: IHC-Nachweis des ER $\alpha$ . Die kernhaltigen Protrusionen der Ampulla zeigen im Diöstrus hohe ER $\alpha$  Gehalte.

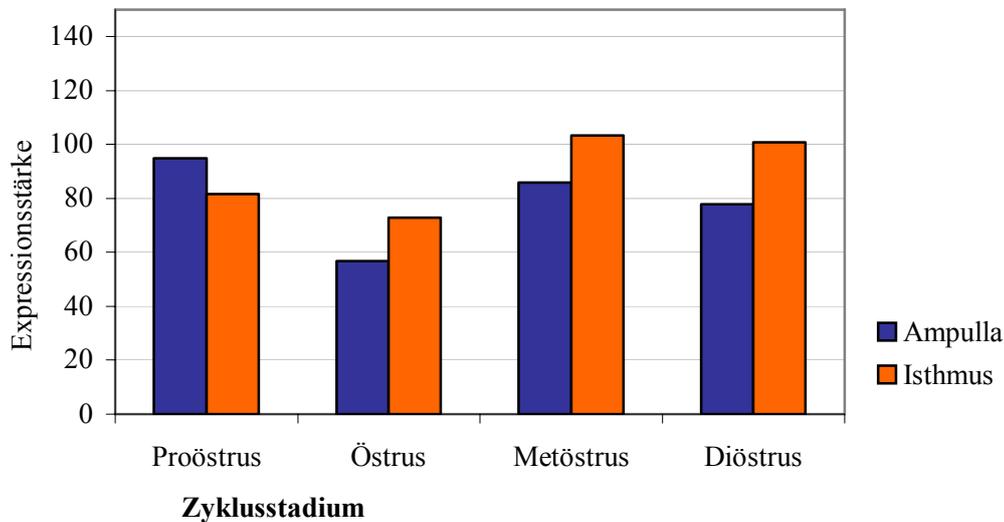


Abb. 52: IHC-Nachweis des ER $\alpha$  im Epithel des Isthmus. Die basal gelegenen Kerne (sekretorische Zellen) reagieren stark ER $\alpha$  positiv. Die mittelständigen Kerne (Pfeil) der zilientragenden Zellen reagieren nur schwach positiv.



Graphik 3: Graphische Darstellung der Anteile ER $\alpha$  positiver und stark positiver Zellen im Epithel des Isthmus. Die größte Zahl ER $\alpha$  positiver Kerne liegt im Metöstrus vor. In den anderen Stadien sind übereinstimmend ca. 60 % positive Zellen vorhanden. Die Anteile der mit schwach positiv und mit stark positiv bewerteten Zellkerne variieren hier relativ stark.

### Expression des Estrogenrezeptor-alpha in Ampulla und Isthmus



Graphik 4: Graphische Darstellung der Expressionsstärke des ER $\alpha$  im Zyklusverlauf in Ampulla und Isthmus. In beiden Segmenten zeigt der ER $\alpha$  ähnliche Verläufe. Im Isthmus ist die ER $\alpha$  Expression jedoch etwas stärker als in der Ampulla. In beiden Segmenten liegt das Expressionsminimum im Östrus und weist bis zum Diöstrus eine steigende Tendenz auf. Die Expressionsstärke hat im Isthmus bis zum Östrus eine fallende Tendenz, während sie in der Ampulla bis zum Diöstrus marginal sinkt und dann im Proöstrus ihr Maximum erreicht.

### Immunhistochemischer Nachweis des Progesteronrezeptors (PR)

Der Antikörper gegen den PR bindet spezifisch in den Kernen des Epithels, den Fibrozyten in der L. propria und der Tunica muscularis.

Den größten Anteil positiver Zellen weist das Epithel des Eileiters auf. Die Intensität der Immunreaktion ist jedoch meist in den Fibrozyten der L. propria stärker. Die Reaktionsstärke des Epithels variiert während des Hormonzyklus und in den beiden untersuchten Abschnitten. In der Ampulla ist die immunhistochemische Reaktion wesentlich schwächer als im Isthmus. In beiden Abschnitten reagieren die in der Mitte des Epithels lokalisierten Kerne schwächer PR immunpositiv als die basal gelegenen.

#### Ampulla:

Die Expression des PR ist im Östrus und Metöstrus höher als im Proöstrus und Diöstrus. Besonders die Kerne der glatten Muskelzellen zeigen im Diöstrus nur sehr schwache oder keine Immunreaktion auf PR. In der Tela subserosa kommen schwach positive (+) Kerne vor. Die meisten Zellen verhalten sich hier aber PR-negativ. Die Serosaepithelzellkerne sind teilweise deutlich positiv (++). Einige Gefäße weisen deutlich PR-positive Endothelien auf (++), wäh-

rend andere Gefäße gänzlich negativ erscheinen. Im Östrus reagieren mehr Zellkerne der Endothelzellen mit dem Antikörper gegen PR als in anderen Zyklusstadien.

#### Zyklische Veränderungen des Progesteronrezeptors im Epithel der Ampulla:

Im Diöstrus und im Proöstrus sind lediglich schwach positive Kerne zu verzeichnen.

Im Östrus ist die Expression des PR in der Ampulla am größten. Von den basal gelegenen Kernen sind im Östrus und Metöstrus nur wenige deutlich oder stark positiv (++ - +++) gefärbt.



Abb. 53: IHC-Nachweis des PR in der Ampulla, Proöstrus. Lediglich in der basalen Kernreihe kommen schwach positiv mit dem Antikörper gegen PR reagierende Zellkerne vor.



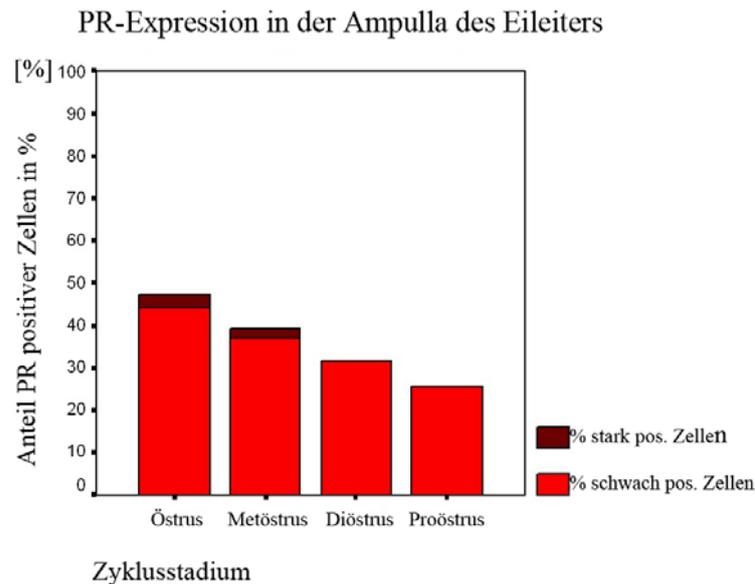
Abb. 54: IHC-Nachweis des PR in der Ampulla, Östrus. In der basalen Kernreihe sind einige deutlich PR immunpositive Zellkerne vorhanden. Die in der Epithelmitte gelegenen Kerne reagieren teilweise schwach positiv mit dem Antikörper gegen PR.



Abb. 55: IHC-Nachweis des PR in der Ampulla, Metöstrus. Die stärker immunpositiv reagierenden Zellkerne sind nicht mehr einheitlich in der basalen Kernreihe angeordnet.



Abb. 56: IHC-Nachweis des PR in der Ampulla, Diöstrus. Nur in der basalen Kernreihe und in den Protrusionen sind vereinzelt schwach immunpositive Zellkerne zu finden.



Graphik 5: Graphische Darstellung der Anteile PR positiver und stark positiver Zellen im Epithel der Ampulla. Stark positive Zellen sind in der Ampulla kaum zu verzeichnen. Die Gesamtanzahl positiver Zellen ist im Östrus am höchsten und hat bis zum Proöstrus eine fallende Tendenz.

### Isthmus:

Im Isthmus ist die Expression des PR in den Zellkernen der L. propria im Gegensatz zu allen anderen Stadien deutlich erhöht. Ebenso verhält es sich mit den Kernen der glatten Muskelzellen, nur dass die Reaktion mit dem Antikörper hier zusätzlich im Metöstrus deutlich positiv ist. Der PR lässt sich in den Endothelien im Östrus und Metöstrus nachweisen. Der Rezeptorgehalt in den Epithelzellen der Serosa ist sehr unterschiedlich.

### Zyklische Veränderungen des Progesteronrezeptors im Epithel des Isthmus:

Im Isthmus ist die Expression des PR in allen Zyklusstadien deutlich stärker als in der Ampulla. Die stärksten immunhistochemischen Reaktionen sind auch hier im Östrus aber zusätzlich noch im Metöstrus zu verzeichnen. Einige Kerne sind sehr kräftig gefärbt. Im Diöstrus nimmt die Intensität der Immunreaktion bei den mittelständig im Epithel gelegenen Kernen im Vergleich zum Metöstrus etwas ab. Das Bild des Proöstrus entspricht in etwa dem des Diöstrus.



Abb. 57: IHC-Nachweis des PR im Isthmus, Proöstrus. In der basalen Kernreihe sind einige deutlich positive Immunreaktionen zu erkennen. Die mittelständigen Kerne weisen schwach positive Reaktionen mit dem PR-Antikörper auf.

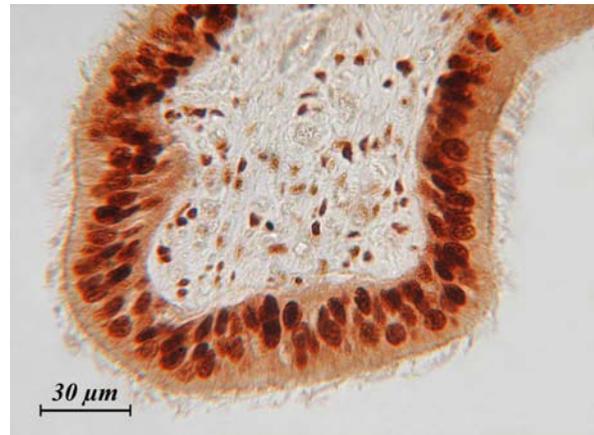


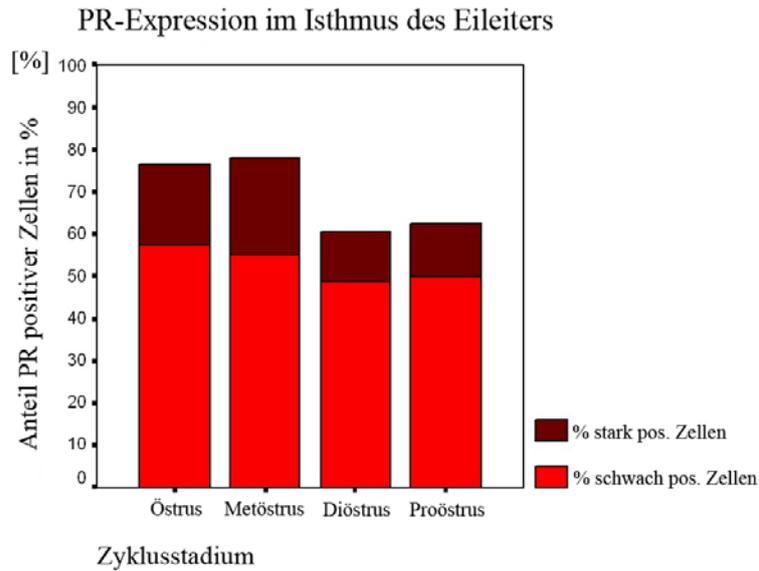
Abb. 58: IHC-Nachweis des PR im Isthmus, Östrus. Stark PR immunpositive Kerne liegen hauptsächlich in der basalen Kernreihe. Auch die mittelständigen Kerne weisen deutliche PR Immunreaktionen auf.



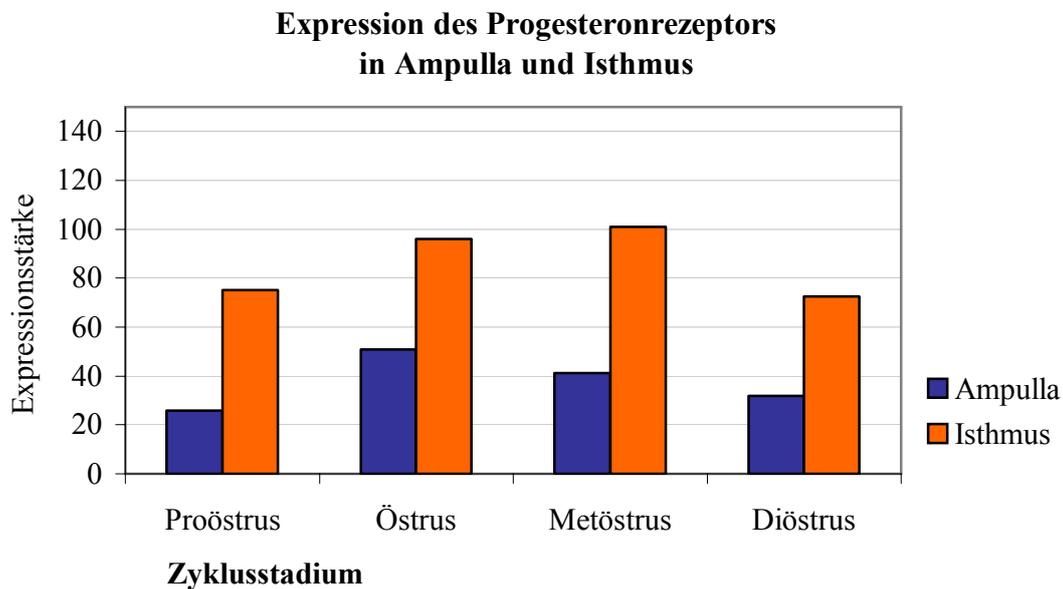
Abb. 59: IHC-Nachweis des PR im Isthmus, Metöstrus. Es sind hauptsächlich deutlich PR immunpositive Kerne vorhanden. Die basal gelegenen Kerne weisen teilweise sogar stark positive Reaktionen auf.



Abb. 60: IHC-Nachweis des PR im Isthmus, Diöstrus. Es sind hauptsächlich deutlich positive Zellkerne mit dem PR-Antikörper zu verzeichnen. Im Allgemeinen fällt die Immunreaktion etwas schwächer als im Metöstrus aus.

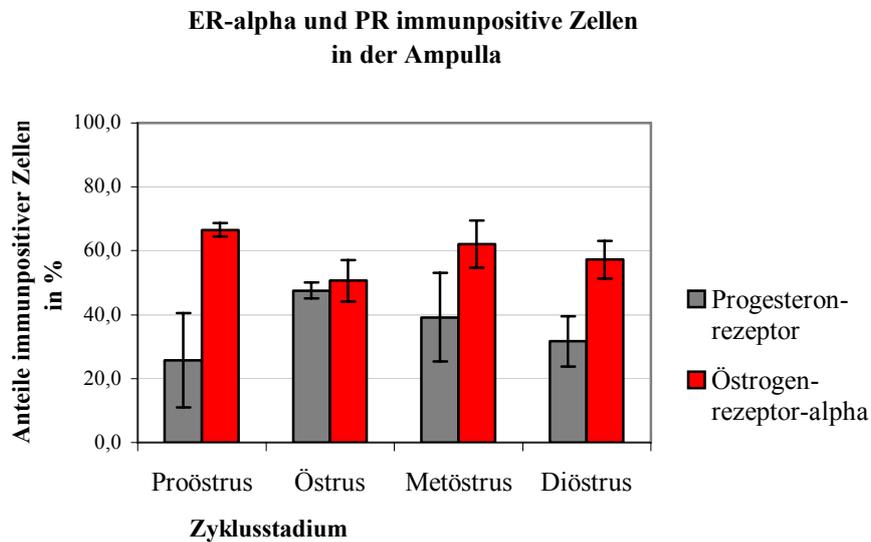


Graphik 6: Graphische Darstellung der Anteile PR schwach positiver und stark positiver Zellen im Isthmus. Der Gesamtanteil positiver Kerne ist im Östrus und Metöstrus am höchsten. Zum Diöstrus fällt der Anteil positiver Kerne tendenziell ab. Auch der Anteil zweifach positiver Kerne weist eine fallende Tendenz auf. Im Diöstrus und Proöstrus sind die Gesamtanteile positiver Zellen am geringsten.

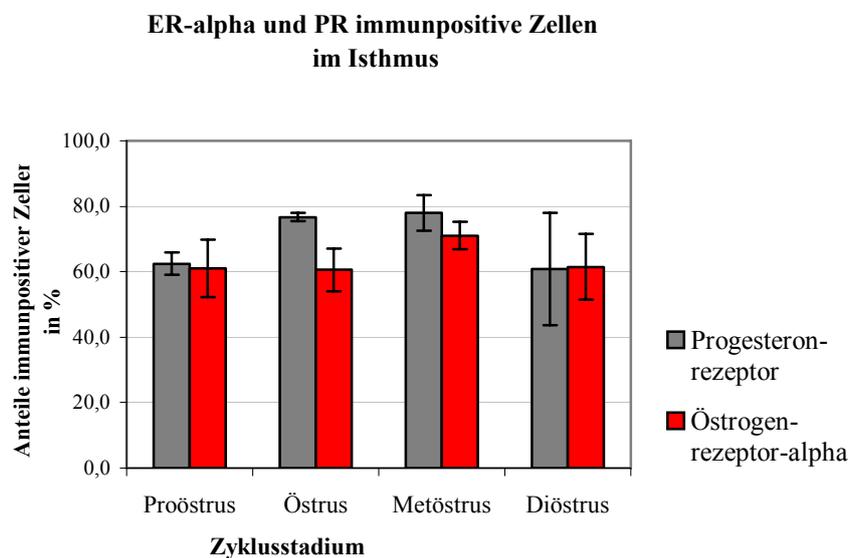


Graphik 7: Graphische Darstellung der Expression des PR in Ampulla und Isthmus im Zyklusverlauf. Die Kerne mit starker Immunreaktion (++ - +++) wurden hierbei gewichtet, um den Rezeptorgehalt graphisch darstellen zu können. Der Expressionslevel des PR ist im Isthmus deutlich höher als in der Ampulla.

### Anteile ER $\alpha$ und PR immunpositiver Zellen in der Ampulla und im Isthmus



Graphik 8: Graphische Darstellung der Anteile positiver Zellen (+ und ++) für ER $\alpha$  und PR (Mittelwerte der 3 Proben) mit den entsprechenden Standardabweichungen in der Ampulla zu vier verschiedenen Zykluszeitpunkten.



Graphik 9: Graphische Darstellung der Anteile positiver Zellen (+, ++, +++) für ER $\alpha$  und PR (Mittelwerte der 3 Proben) mit den entsprechenden Standardabweichungen im Isthmus zu vier verschiedenen Zykluszeitpunkten.

### Caspase-3

Im bovinen Eileiterepithel lassen sich immunhistochemisch keine Caspase-3 positiven Zellen nachweisen.

### Ki-67

Zusammenfassend ist festzustellen, dass nur sehr wenige Zellteilungen im Eileiterepithel stattfinden. Aufgrund dieser geringen Anzahl von MIB-1 positiven Zellen wurde auf eine Auszählung pro Gesamtzellzahl und die Berechnung eines Mitoseindex verzichtet.

In der Ampulla kommen mehr Mitosen als im Isthmus vor (in der Ampulla sind wesentlich mehr Zellen pro Querschnitt vorhanden als im Isthmus). Eine Abhängigkeit vom Zyklusstand lässt sich nicht erkennen. Im Met- und frühen Diöstrus scheinen weniger Mitosen vorhanden zu sein als in den anderen Zyklusstadien, dies ist aber statistisch nicht fassbar. Auch ein Vergleich von ipsi- und contralateraler Seite der Ampulla lässt keine Unterschiede erkennen. Eine der untersuchten Proben aus dem Proöstrus weist im Vergleich zu allen anderen Proben besonders viele Mitosen im Epithel auf. Die Ursache hierfür ist nicht bekannt.

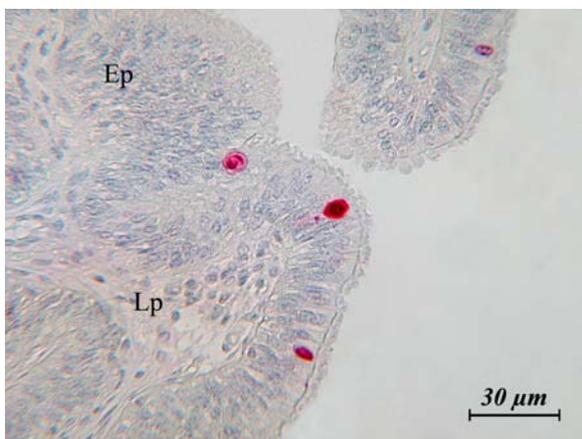


Abb. 61: IHC-Nachweis von Mitosen (Ki-67) mit dem MIB-1-Antikörper in der Ampulla, Östrus.

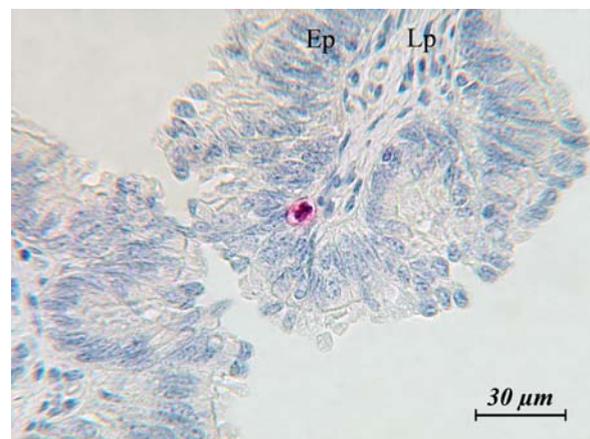


Abb. 62: IHC-Nachweis von Mitosen (Ki-67) mit dem MIB-1-Antikörper in der Ampulla, Proöstrus.

### 4.1.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Morphologie der Ampulla variiert während des Zyklusverlaufs deutlich. Das Epithel besteht aus sekretorischen und zilientragenden Zellen. Sie sind elektronenmikroskopisch anhand ihrer morphologischen Charakteristika leicht voneinander zu unterscheiden. Die sekretorischen Zellen haben ein elektronendichteres Zytoplasma als die zilientragenden Zellen. Während die sekretorischen Zellen vor allem gut ausgebildete Golgi-Komplexe und viel granuliertes endoplasmatisches Retikulum sowie freie Ribosomen aufweisen, finden sich im Zytoplasma der zilientragenden Zellen zahlreiche Mitochondrien vom Crista-Typ. Verschieden strukturierte sekretorische Granula kommen fast ausschließlich in Zellen vor, die keine Zilien tragen. Beide Zelltypen weisen Mikrovilli auf, die der Oberflächenvergrößerung dienen.

Die Zilien im Eileiter enthalten eine für Kinozilien typische Anordnung der Mikrotubuli aus einem zentralen und neun peripher liegenden Mikrotubuluspaaren. Die Zilien sind ca. 4-5  $\mu\text{m}$  lang und bedecken meist die gesamte apikale Zelloberfläche. Ihre Basalkörperchen liegen in regelmäßiger Anordnung direkt unter der apikalen Zellmembran.

Die Kerne der zilientragenden Zellen befinden sich im mittleren bis apikalen Zytoplasma der Zellen. Sie sind relativ rund und wenig gefurcht. Die sekretorischen Zellen hingegen haben längliche Kerne, die teilweise tiefe Einkerbungen aufweisen. Sie sind in den meisten Zyklusphasen im basalen Zytoplasma lokalisiert (Ausnahmen siehe unten). Die Kerne beider Zelltypen enthalten hauptsächlich Euchromatin, nur an ihrem Rand sind kleine Bezirke kondensierten Chromatins (Heterochromatin) vorhanden. Bei vielen Zellen ist ein deutlich ausgebildeter Nukleolus erkennbar.

An den lateralen Zellmembranen kommen Zellverbindungen vor. Es handelt sich zum einen um Desmosomen (Macula adhaerens). Sie stellen sich stark elektronendicht dar, da die Intermediärfilamente des Zytoplasmas in diesen Bereichen zusammenlaufen und dadurch gebündelt vorliegen.

Zum anderen bilden Tight junctions (Zonulae occludens) an den apikalen Polen benachbarter Zellen eine Barriere zwischen dem Lumen und dem Interzellularraum. Es ist deutlich zu erkennen, dass die lateralen Zellmembranen in diesem Bereich miteinander verschmelzen. Als indirekte Zellverbindungen sind Interdigitationen auszumachen.

Die so genannten „Basalzellen“ haben eine runde Gestalt und einen großen, runden, heterochromatischen Kern. Dieser ist von einem hellen, schmalen Zytoplasmabereich umgeben. Obwohl diese Zellen im basalen Teil des Epithels lokalisiert sind, scheinen sie nicht mit der Basalmembran verankert zu sein und liegen ihr oft nicht einmal direkt auf. Die epitheliale Ober-

fläche erreichen sie ebenfalls nicht und weisen zudem keine Verbindungen zu den Nachbarzellen auf. Sie enthalten Granula und eine geringe Menge endoplasmatisches Retikulum. Mitosen können nicht beobachtet werden. Bei diesen basalen Zellen handelt es sich um intraepitheliale Lymphozyten. Einige sind aufgrund ihrer Feinstruktur als Makrophagen zu identifizieren.

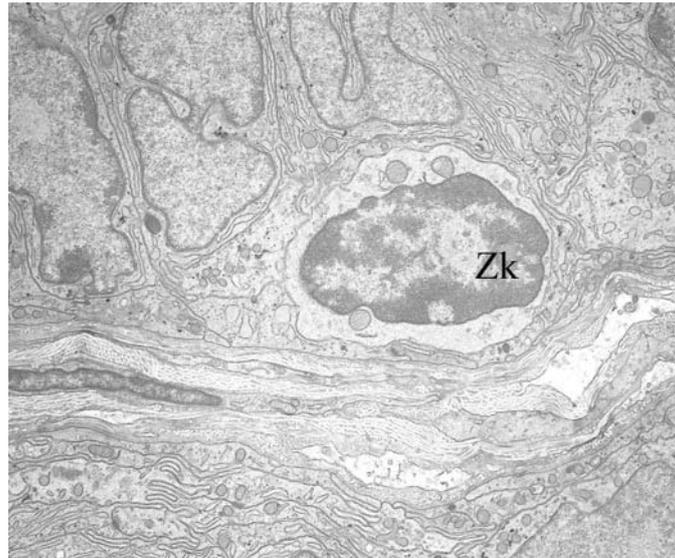


Abb. 63: Lymphozyt im Eileiterepithel der Ampulla. Zellkern (Zk).

Die Epithelzellen der Ampulla unterliegen zyklischen Veränderungen. Die sekretorischen Zellen weisen in bestimmten Stadien Vorwölbungen (Protrusionen) auf. Im Östrus zeigt sich die epitheliale Oberfläche relativ eben. Die sekretorischen Zellen sind zu diesem Zeitpunkt apikal schmaler als die zilientragenden Zellen, so dass letztere im Allgemeinen den größeren Teil der apikalen Epitheloberfläche bilden. Es kommen in diesem Stadium keine Protrusionen vor. Die Zellhöhe beider Zelltypen ist gleich. Die Zilien ragen frei ins Lumen. Ihre Länge beträgt ca. 4-5  $\mu\text{m}$ . Im Metöstrus (Tag 3,5) und frühen Diöstrus (Tag 6) wölben sich die sekretorischen Zellen ins Lumen vor. Diese Protrusionen haben einen unregelmäßigen Umriss. In ihrem Zytoplasma befinden sich vor allem sekretorische Granula, endoplasmatisches Retikulum und vereinzelt Mitochondrien. Ihre Ausdehnung ins Lumen entspricht ungefähr der Hälfte der Zilienlänge. Diese Protrusionsart ist dadurch gekennzeichnet, dass sie sehr häufig vom unterlagernden Epithel durch membranartige Begrenzungen abgetrennt scheint. Diese Membranen sind sehr elektronendicht. Teilweise erscheint es, als würden sich von den Seiten der Protrusion her diese Membranen ausbilden und den oberen Teil der Zelle bzw. des Zytoplasmas damit ab-

schnüren.

Im mittleren (Tag 9 und 12) und späten Diöstrus (Tag 15) sind ebenfalls Protrusionen vorhanden. Diese Protrusionen beinhalten jedoch Kerne bzw. Kernteile neben endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien. Sekretorische Granula sind ebenfalls enthalten, aber nicht in der großen Zahl, wie sie im Metöstrus und frühen Diöstrus vorkommen. Die äußere Erscheinung der Protrusionen ist ballonartig. Sie reichen so weit ins Lumen, dass sie die Zilien bei weitem überragen. Durch ihre Gestalt verdrängen und komprimieren sie die Zilienbüschel. Die luminale Oberfläche wird nun von den massiven Vorwölbungen der sekretorischen Zellen dominiert, während die Zilien darunter verdeckt werden.

Im Proöstrus (Tag 18 und 21) dominieren ebenfalls kernhaltige Protrusionen das Oberflächenbild. Sie enthalten neben den Kernteilen Granula, Mitochondrien und wenig dilatiertes endoplasmatisches Retikulum. Teilweise sind sie tropfenförmig und stehen nur über feine Zytoplasmafäden mit dem Epithel in Verbindung. Auch in diesem Stadium werden die Zilien durch die Vorwölbungen zusammengedrückt und verdeckt. Die in den Protrusionen vorhandenen Kerne entsprechen den Kernen der im epithelialen Verband verbliebenen Zellen. Sie zeigen im Allgemeinen keine degenerativen Veränderungen wie z.B. eine Kondensation des Chromatins oder eine Ablösung der Kernmembran. Freie Vesikel im Lumen sind elektronenmikroskopisch kaum zu finden.

Die Kerne der sekretorischen Zellen, die normalerweise basal lokalisiert sind, ändern durch die Protrusionsbildung ihre Lage. Das bedeutet, es sind in den entsprechenden Zyklusstadien Kerne sekretorischer Zellen auch im mittleren und apikalen Zytoplasma bzw. in den Protrusionen zu finden.

Das Aussehen und die Verteilung der sekretorischen Granula unterliegen ebenfalls zyklischen Veränderungen. Im Östrus und im Metöstrus enthalten die Zellen die meisten sekretorischen Granula. Ihre Form ist rund oder oval bis länglich-oval. Sie sind direkt unter der apikalen Zellmembran lokalisiert, welche im Metöstrus bereits vorgewölbt erscheint. Der Großteil der Granula ist stark elektronendicht und erscheint dadurch homogen dunkel. Im Metöstrus weisen die sekretorischen Zellen zusätzlich weniger elektrondichte Granula auf. Die stark elektronendichten Granula sind hier direkt unter der apikalen Zellmembran lokalisiert. Direkt basal von ihnen sind dann meist die weniger dichten Granula angeordnet. Ab dem mittleren Diöstrus findet man zwar sekretorische Granula, sie liegen aber nicht konzentriert im apikalen Zytoplasma, vielmehr sind sie in den oberen zwei Dritteln der Zelle lokalisiert und weisen unterschiedliche Elektronendichten auf. Im Proöstrus liegen zahlreiche Granula im supranukleären Bereich der Zelle. Diese sind aber nicht so stark wie im Metöstrus an der apikalen Membran

konzentriert.

Im Metöstrus und frühen Diöstrus kommen vermehrt so genannte „digiprints“ vor. Sie sind ausschließlich im apikalen Zytoplasma zu finden, oft liegen sie der apikalen Zellmembran direkt an. Ihr Inhalt ist heteromorph. Sie kommen in unterschiedlicher Dichte vor. Meist erscheinen sie wenig elektronendicht, bis auf dunklere Membranen, die ihr Inneres durchziehen. Diese Strukturen haben Ähnlichkeit mit den Cristae der Mitochondrien. In einigen Bereichen sieht es aus, als würden diese „digiprints“ mit der Zytoplasmamembran verschmelzen und ihren Inhalt ins Lumen des Eileiters entlassen. Dieses heteromorphe Material konnte auch im Eileiterlumen direkt über der apikalen Zelloberfläche identifiziert werden.

Das endoplasmatische Retikulum ist im Östrus und Metöstrus massiv dilatiert.

Ein anderes, interessantes Phänomen ist die Protrusionsbildung bei zilientragenden Zellen, die vereinzelt im Di- und Proöstrus vorkommt. In diesen Protrusionen sind eindeutig Zilienanschnitte zu erkennen. Ansonsten ist ihr Zytoplasma frei von Organellen. Im Gegensatz zu den Vorwölbungen der sekretorischen Zellen gehen Protrusionen, die Zilien enthalten nur aus einem kleinen Teil der Zelloberfläche hervor. Die Protrusionen der Zilienzellen wölben sich nicht so weit ins Lumen vor, wie die Protrusionen der sekretorischen Zellen. Im Zytoplasma der zugehörigen Zellen ist auffällig viel und stark dilatiertes endoplasmatisches Retikulum vorhanden.

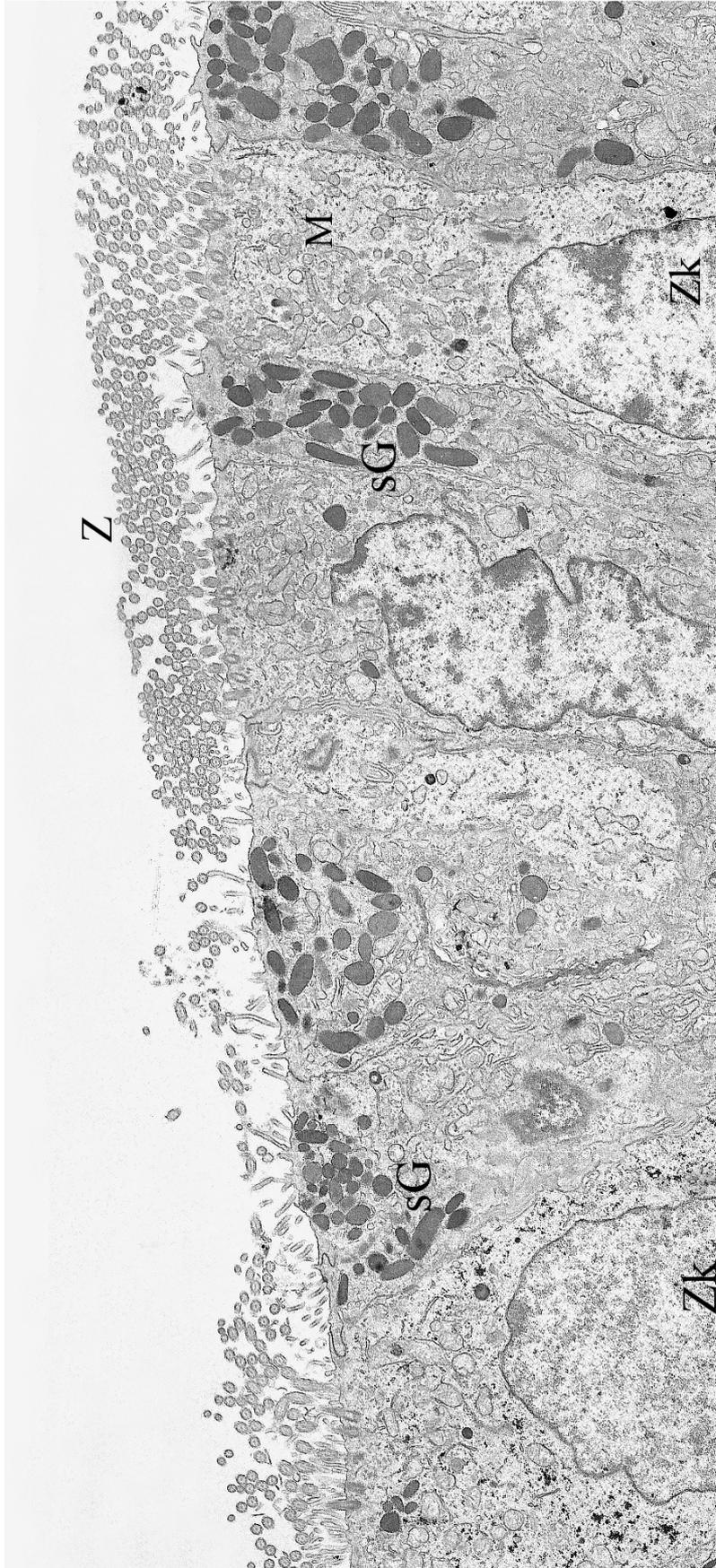


Abb. 64: Epithel der Ampulla im Östrus. Die apikalen Zellpole der sekretorischen und zilienträgenden Zellen liegen auf gleicher Höhe. Die sekretorischen Zellen weisen Ansammlungen von sekretorischen Granula (sG) im apikalen Zytoplasma auf. Das supranukleäre Zytoplasma der Zilienzellen enthält reichlich Mitochondrien (M). Die Zilien (Z) bedecken einen Großteil der apikalen Zelloberfläche. Die Zellkerne (Zk) sind euchromatisch.

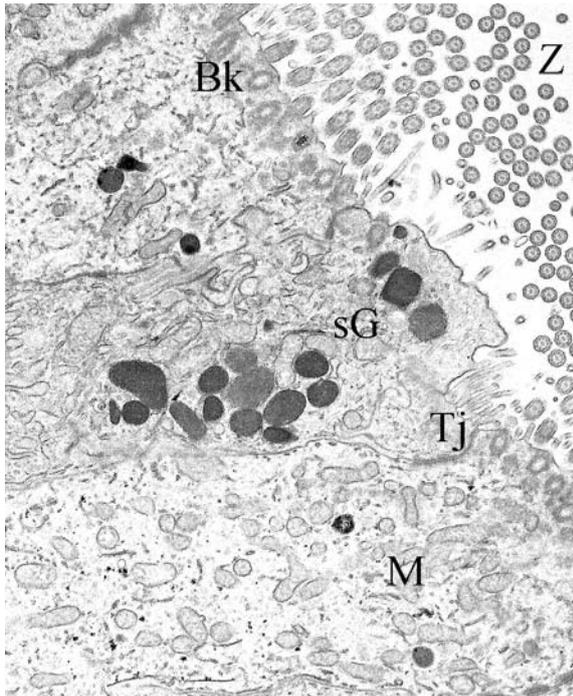


Abb. 65: Elektronendichte, sekretorische Granula (sG) im apikalen Zytoplasma einer sekretorischen Zelle im Östrus. Die zilientragenden Zellen enthalten viele Mitochondrien (M). Zwischen benachbarten Zellen sind „tight junctions“ (Tj) ausgebildet. Die Basalkörperchen (Bk) der Zilien (Z) sind regelmäßig unter der apikalen Zellmembran angeordnet.

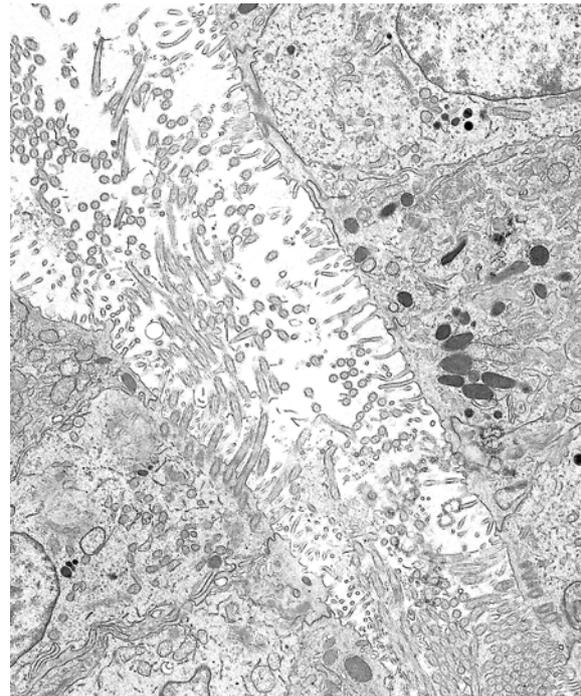


Abb. 66: Einander gegenüberliegende Epithelien der Ampulla im Östrus. Zilientragende und sekretorische Zellen haben die gleiche Höhe, deshalb ist eine gerade, einheitliche Oberflächenlinie des Epithels zu verzeichnen.

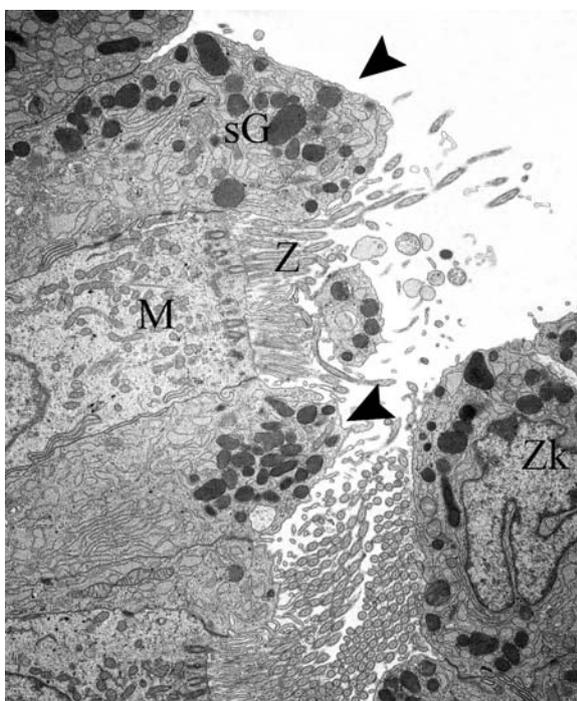


Abb. 67: Metöstrus. Elektronendichte, sekretorische Granula (sG) sind in den Protrusionen (Pfeilspitze) enthalten. Es ist zu erkennen, dass die sekretorischen Zellen reichlich granuliertes endoplasmatisches Retikulum enthalten. Gefurchter Zellkern (Zk) einer sekretorischen Zelle.

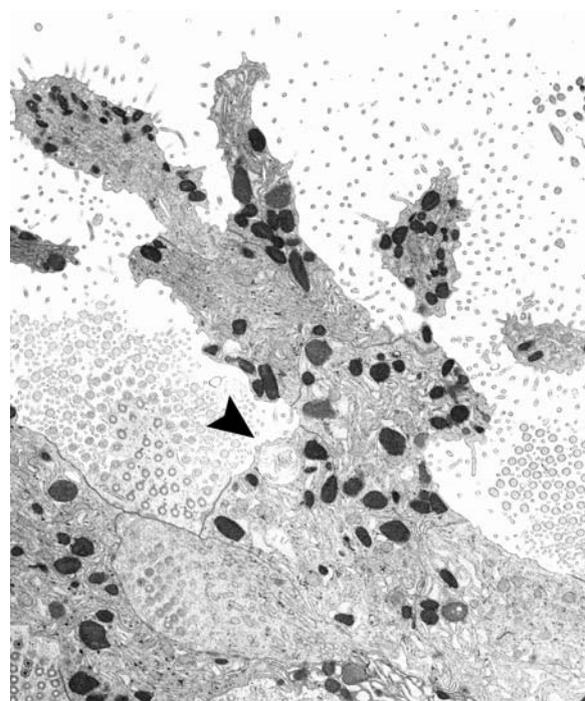


Abb. 68: Große Protrusion im Metöstrus. Es sind viele elektronendichte sekretorische Granula und andere Zellorganellen darin enthalten. Ein „digiprint“ (Pfeilspitze) in der Bildmitte berührt die Zellmembran.

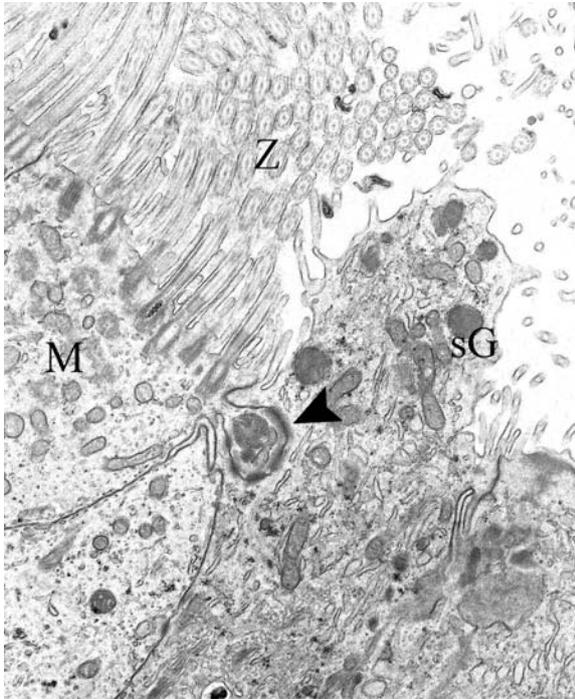


Abb. 69: Protrusionen im Metöstrus überschreiten die Ausdehnung der Zilien (Z) ins Lumen nicht. Interdigitation der lateralen Zellmembran (Pfeilspitze) am apikalen Zellpol. Mitochondrien (M) in einer zilientragenden Zelle.

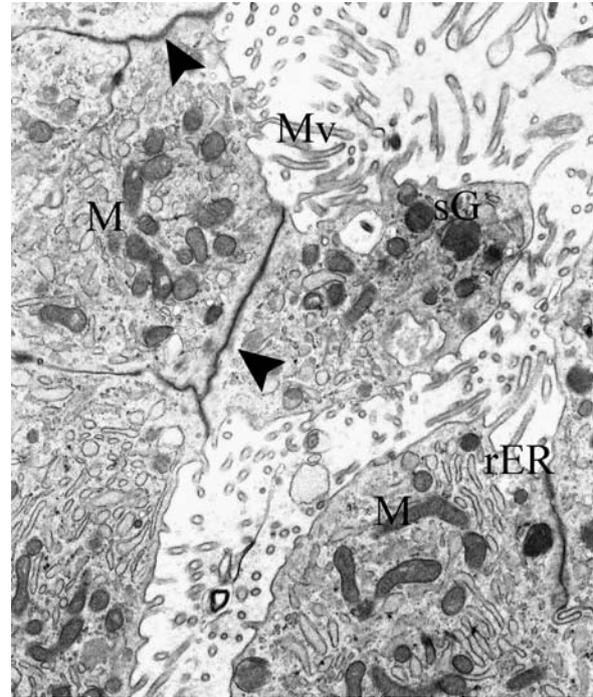


Abb. 70: Protrusionen im Metöstrus. Sekretorische Granula (sG) und Digiprints sind darin enthalten. Diese sekretorische Zelle enthält viel granuliertes endoplasmatisches Retikulum. Die Protrusion scheint durch eine Membran (Pfeilspitze) abgegrenzt zu sein.

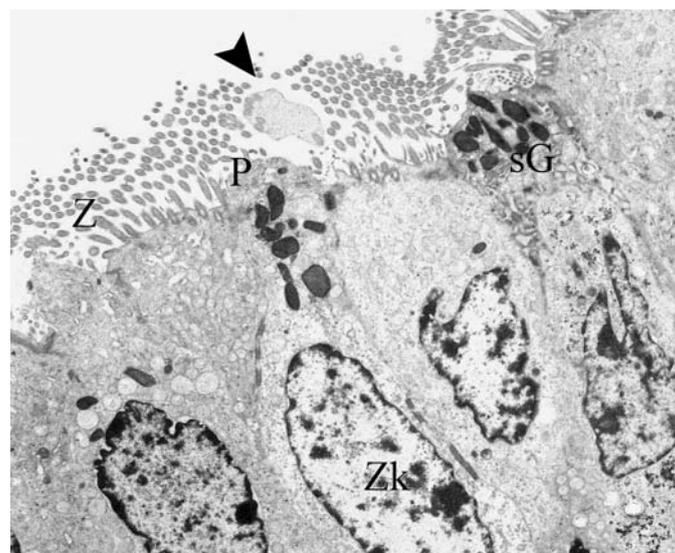


Abb. 71: Epitheliale Oberfläche im frühen Diöstrus (Tag 6). Die Protrusionen der sekretorischen Zellen (P) sind kleiner als im Metöstrus. Sie enthalten sekretorische Granula (sG). Über der apikalen Oberfläche ist ein membranumgrenztes Zellfragment vorhanden, das Zilienanschnitte enthält (Pfeilspitze). Zellkerne (Zk), Zilien (Z).

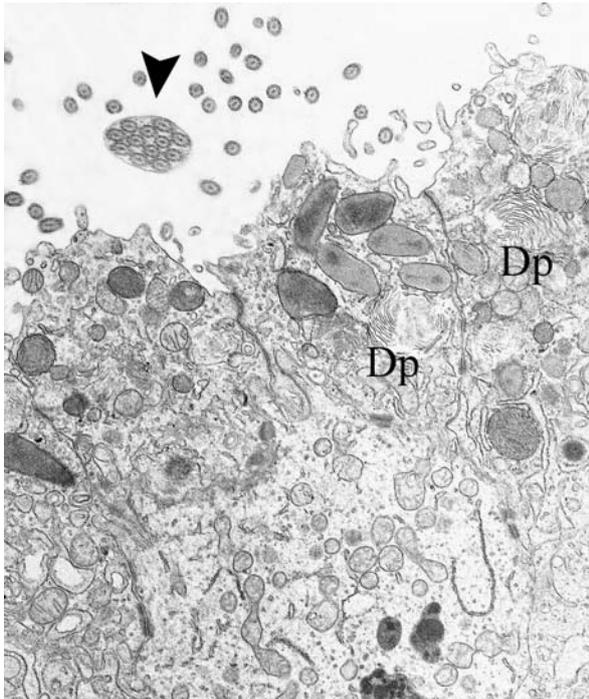


Abb. 72: Früher Diöstrus. Ein membranumgrenztes Zellfragment über der apikalen Zellmembran enthält Zilienanschnitte (Pfeilspitze). Die sekretorischen Granula erscheinen weniger dicht als im Metöstrus. Im apikalen Bereich der Zelle sind außerdem „digiprints“ (Dp) vorhanden.

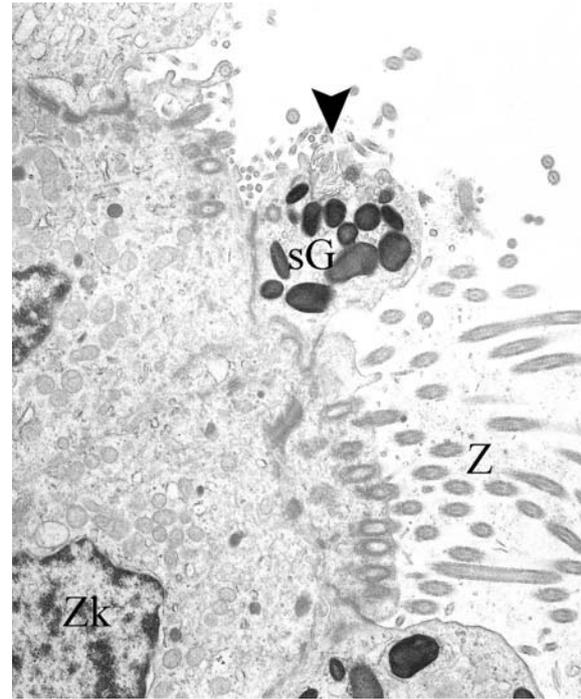


Abb. 73: Ein „digiprint“ (Pfeilspitze) in einer Protrusion des frühen Diöstrus scheint seinen Inhalt ans Lumen abzugeben. In der Protrusion sind außerdem reichlich sekretorische Granula (sG) enthalten. Zellkern (Zk), Zilien (Z).

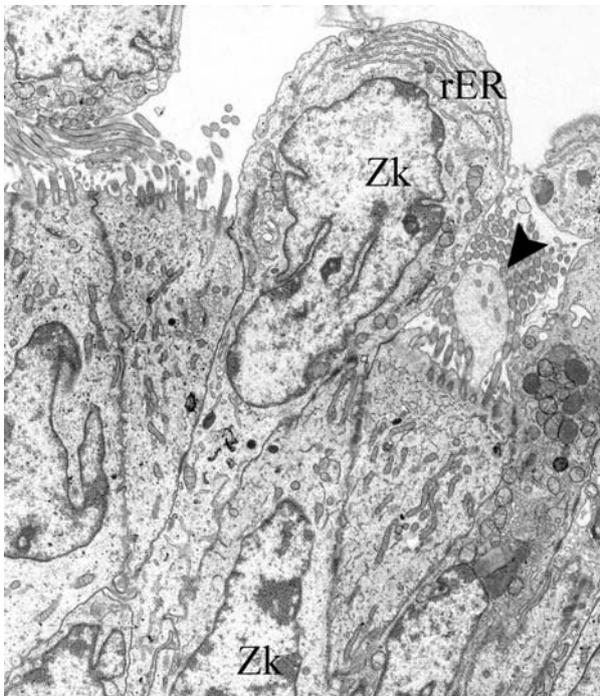


Abb. 74: Diese massive, kernhaltige (Zk) Protrusion einer sekretorischen Zelle im Diöstrus enthält viel rER. Daneben liegt die kleinere Protrusion einer zilientragenden Zelle mit enthaltenen Zilienanschnitten (Pfeilspitze).

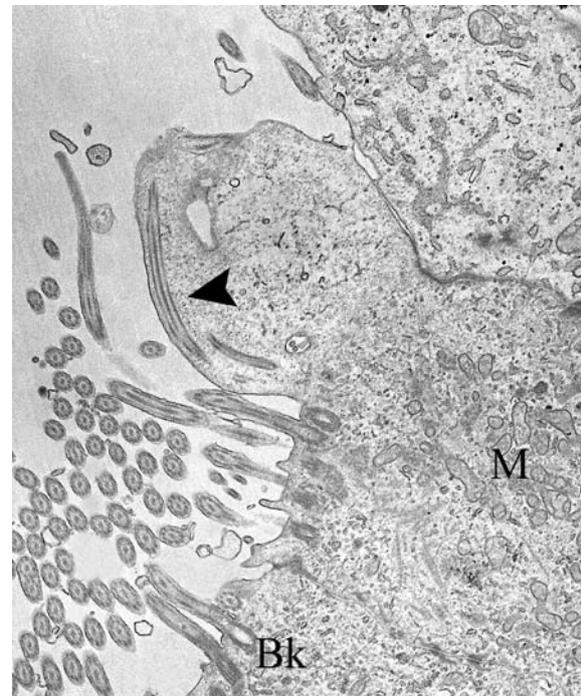


Abb. 75: Protrusion einer zilientragenden Zelle beinhaltet längsgeschnittene Zilienteile (Pfeilspitze). Die Protrusion geht nur aus einem Teil der apikalen Zelloberfläche hervor. Basalkörperchen (Bk), Mitochondrien (M).

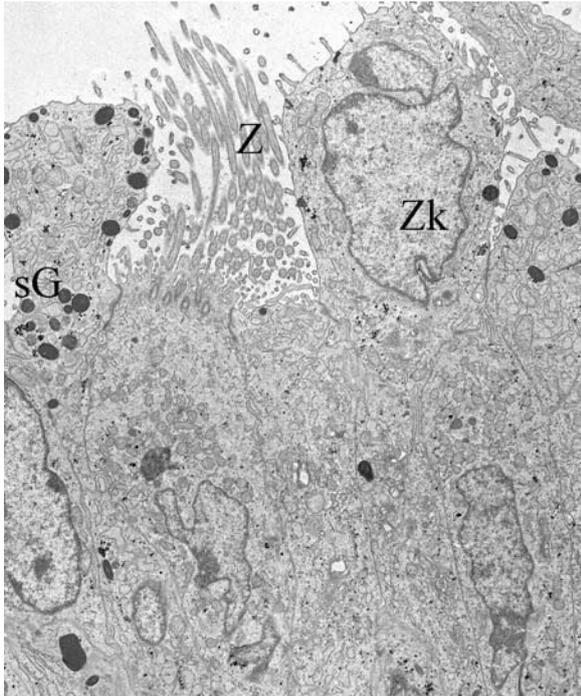


Abb. 76: Massive kernhaltige (Zk) Protrusion einer sekretorischen Zelle im Proöstrus. Sie dehnt sich weiter ins Lumen hinaus als die benachbarten Zilien (Z). In einer weiteren Protrusion sind insbesondere membranah sekretorische Granula (sG) enthalten.

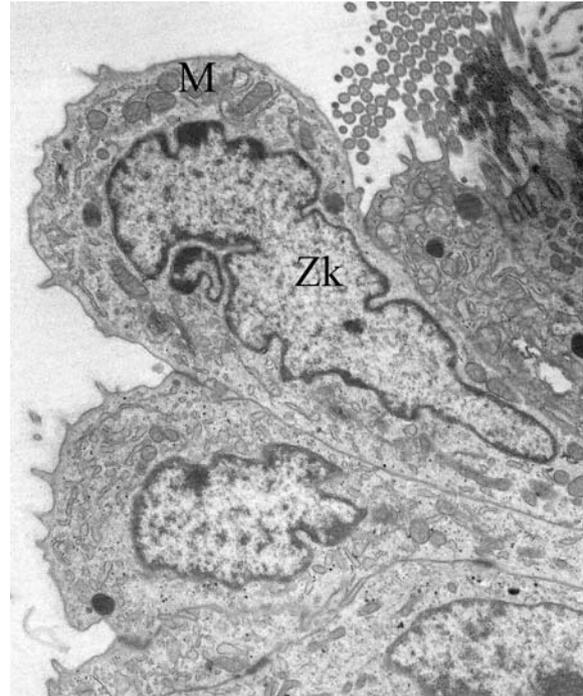


Abb. 77: Protrusionen von sekretorischen Zellen sind im Proöstrus meist kernhaltig (Zk). Hier sind außerdem Mitochondrien (M) und rER enthalten.

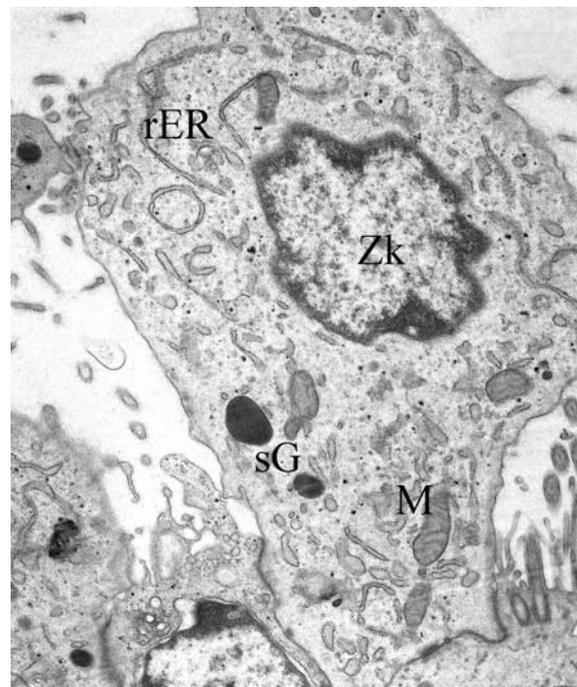


Abb. 78: Vergrößerung einer kernhaltigen (Zk) Protrusion im Proöstrus. Außerdem sind rER, Mitochondrien (M), sekretorische Granula (sG) und Ribosomen enthalten.

## 4.2 Ergebnisse zur Zellkultur der bovinen Eileiterepithelzellen

### 4.2.1 Morphologie und Wachstum der Eileiterpithelzellen in vitro

#### Enzymatische und mechanische Isolierung im Vergleich

Die bei verschiedenen Isolierungsmethoden entstehenden Zellaggregate unterscheiden sich morphologisch voneinander. So entstehen die größten Sphäroiden bei einer mechanischen Isolierung der Epithelzellen der Ampulla. Die stärksten Rotationsbewegungen können bei mechanisch isolierten Epithelzellen des Isthmus beobachtet werden.

**Tabelle 13: Isolierung, Epithelzellen aus der Ampulla**

	Enzymatisch (mit Trypsin)	Mechanisch (Ausstreichen)
<b>Gewonnene Zellzahl pro ml</b>	$30,6 \times 10^4$	$13,7 \times 10^4$
<b>Morphologie</b>	Einzelzellen in Suspension, selten kleine Zellaggregate.	Große Zellaggregate aus bis zu mehreren hundert Zellen.
<b>Zilienmotilität</b>	Kaum sichtbar	Stark
<b>Zellmobilität</b>	Schwach	Starke Rotationsbewegungen
<b>Adhärenz</b>	Nach spätestens 12 Stunden	Nach ca. 24 Stunden

**Tabelle 14: Isolierung, Epithelzellen aus dem Isthmus**

	Enzymatisch (mit Trypsin)	Mechanisch (Ausstreichen)
<b>Gewonnene Zellzahl pro ml</b>	$20,0 \times 10^4$ Zellen / ml	$6,1 \times 10^4$ Zellen / ml
<b>Morphologie</b>	Einzelzellen in Suspension	Große Zellaggregate (kleiner als die der Ampullazellen)
<b>Zilienmotilität</b>	Kaum sichtbar	Stark
<b>Zellmobilität</b>	Schwach	Sehr starke Rotationsbewegungen
<b>Adhärenz</b>	Nach spätestens 12 Stunden	Nach ca. 24 Stunden

## **Vergleich von mechanischer und enzymatischer Zerkleinerung der mechanisch isolierten Zellaggregate**

Nach der Isolierung der Zellen durch Ausstreifen entstehen teilweise sehr große zusammenhängende Epithelzellaggregate. Diese wurden zum Vergleich mit Trypsin oder mechanisch behandelt, um kleinere Zellaggregate zu erhalten.

Die Zellen, die nach der mechanischen Isolierung mit Trypsin behandelt wurden liegen hauptsächlich als Einzelzellen vor. Selten bilden sich kleine Zellverbände aus, die bis zu 30 Zellen enthalten. Das Vorkommen von adhärennten Zellen ist bereits nach 12 Stunden in Kultur zu beobachten. Die mechanisch zerkleinerten Zellaggregate bilden große mobile Verbände aus bis zu mehreren hundert Zellen aus (siehe unten) und beginnen erst nach ca. 24 stündiger Kultivierung sich festzusetzen.

## **Beobachtung einzelner lebender Sphäroide über mehrere Tage**

Bei der mechanischen Isolierung bilden sich Zellaggregate (Sphäroiden), die aus ca. 20-200 Zellen bestehen. Jeweils eine dieser Sphäroiden wurde einzeln in ein Loch der 24-Lochplatten pipettiert, um ihre äußere Erscheinung beschreiben und deren Veränderungen beobachten zu können. Die Zilien einer Sphäroide zeigen immer nach außen und weisen eine starke Motilität auf. Diese Bewegung ist im Invertmikroskop deutlich zu beobachten. Durch den Zilienschlag sind die Zellaggregate mobil. Sie führen Rotationsbewegungen durch und bewegen sich dadurch kreisend vorwärts. Die Zellen im Verband behalten ihre Polarität bei. Nach ca. 2 Tagen in dieser Suspensionskultur kommt es zur Bildung von Hohlräumen, die meist im Zentrum der Zellkonglomerate lokalisiert sind. Diese Hohlräume verändern ihre Lage über die Zeit der Kultur nicht, sie nehmen allerdings an Volumen zu. Beim Kontakt der Sphäroiden mit dem Boden des Kulturgefäßes können sich einzelne Zellen absondern und sich dort festsetzen. Diese adhärennten Zellen sind ca. 24 Stunden nach der Isolierung deutlich zu erkennen (siehe unten). Mit zunehmender Länge der Kultivierung (ungefähr ab dem 14. Tag) erscheinen die schwimmenden Zellaggregate dunkler und die Zilienbewegung wird leicht reduziert. Ansonsten bleiben Größe und Form der Sphäroiden über die beobachtete Zeit (20 Tage) weitestgehend konstant. Fünf von fünfzehn der einzeln beobachteten Sphäroiden heften sich gänzlich an den Boden der Petrischale an. Dabei sitzt die dreidimensionale Sphäroide anfangs dem Kulturboden auf, um später vollständig in den entstehenden flachen, einschichtigen Zellrasen integriert zu werden.

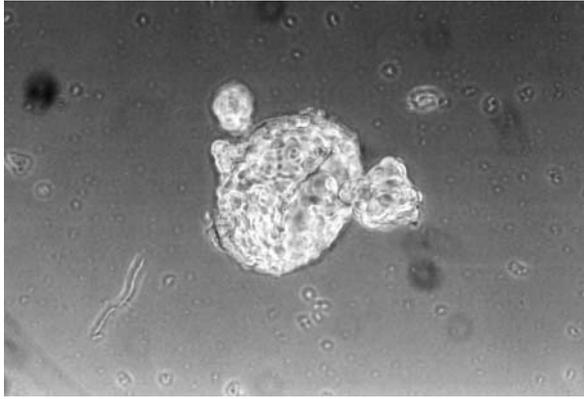


Abb. 79: Kulturtag 5. Eine lebende Sphäroide in Suspensionskultur.

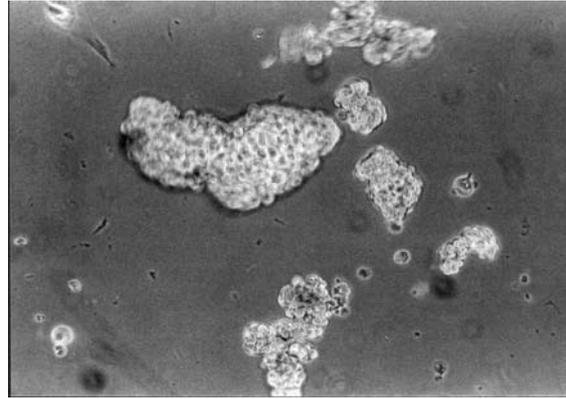


Abb. 80: Kulturtag 5. Mehrere lebende Sphäroiden in Suspensionskultur.

### Ausbildung von Zellrasen

Sobald einzelne Zellen die Adhärenz erreicht haben (nach ca. 24 Stunden), beginnt eine massive Zellproliferation und es entstehen an verschiedenen Stellen schnell wachsende Zellnester. Die Form der Zellen ist polygonal. Sie sind sehr groß, flach und bilden insbesondere am Rand der Zellnester lange Zytoplasmaausläufer mit pseudopodienartigen Fortsätzen an den Spitzen. Die Kerne sind ebenfalls groß und rund. Es gibt unter den Zellnestern einige, deren Zellen stark schollenförmig erscheinen, diese Zellen weisen zudem auffällig viele Sekretvakuolen auf.

Ungefähr 2-3 Tage nachdem einzelne Zellen adhärent geworden sind, entsteht ein konfluenten Zellrasen. Es handelt sich hierbei um die Ausbildung eines einfachen Monolayers.

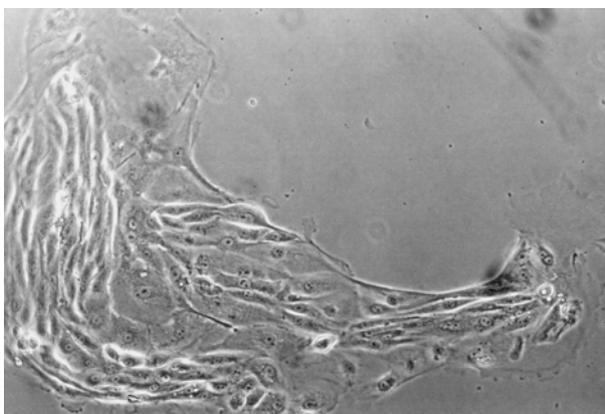


Abb. 81: Kulturtag 3, Nest adhärenter Zellen.

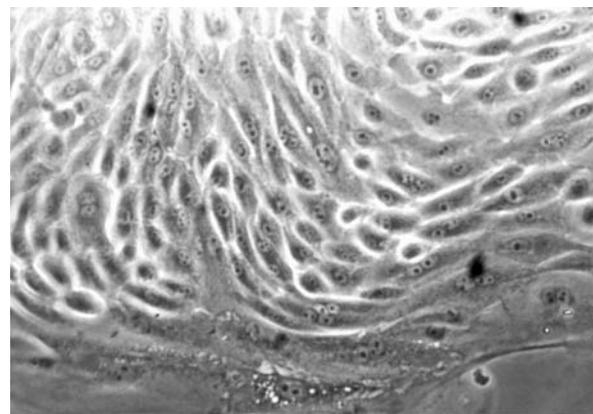


Abb. 82: Kulturtag 7, Ausbildung eines konfluenten Zellrasens.

## Passagierung der Kulturen

Bei diesem Versuch sollten die Anzuchtmedien TCM und DMEM miteinander verglichen werden. Die konfluenten Zellrasen der Primärkultur sind am 5. Kulturtag passagiert worden. Dabei hat sich als erstes gezeigt, dass die mit TCM angezüchteten Zellen schlechter mit Trypsin abzulösen sind als die mit DMEM angezüchteten Zellen. Daraufhin haben wir die Einwirkzeit des Trypsins von 7 min für beide Kulturen auf 10 min verlängert.

**Tabelle 15: Zellzählung nach Isolierung**

Kulturmedium	Zellzahl pro ml nach 7 minütiger Einwirkzeit des Trypsins	Zellzahl pro ml nach 10 minütiger Einwirkzeit des Trypsins
DMEM + FBS	$2,9 \times 10^4$	$3,25 \times 10^4$
TCM/199 + FBS	$0,8 \times 10^4$	$1 \times 10^4$

Für die 1. Passagierung (Sekundärkultur) wurden pro Medium in 4 Löcher der 24-Lochplatten jeweils  $1 \times 10^4$  Zellen pro ml ausgesät.

**Tabelle 16: 1. Passagierung der adhärennten Zellkulturen**

	DMEM-Kultur	TCM-Kultur
<b>Tag 1</b>	Nester aus ca. 50 adhärennten Zellen vorhanden, die Zellen haben eine schollige Form.	
<b>Tag 3</b>	Nester bis ca. 300 Zellen, Zellen haben eine schollige Form.	Nester bis ca. 100 Zellen. Am Rand gelegene Zellen haben lange zytoplasmatische Ausläufer, sonst schollige Form.
<b>Tag 5</b>	Konfluenz vorhanden. Zellrasen bildet „cobblestone“-Muster aus. Zytoplasma enthält viele dunkle Granula.	Nester aus ca. 150 Zellen. Lange Zellausläufer am Rand scheinen der Kontaktaufnahme mit benachbarten Zellnestern zu dienen. Zellen im Inneren der Nester sind groß, und schollig, sie enthalten dunkle Granula.

Die mit TCM angezüchteten Zellen lassen sich schlechter mit Trypsin vom Kulturgefäß ablösen. Nach 7 minütiger Einwirkzeit heftet bei den mit TCM angezüchteten Kulturen noch ein Großteil der Kulturen dem Boden an. Die adhärennten Zellen haben meist eine schollige Form. Am Rand der Nester bilden die Zellen lange zytoplasmatische Ausläufer aus, die sich häufig am Ende fingerförmig aufzweigen. Im Zytoplasma sind vermehrt Vakuolen und dunkle Granula enthalten. Nach der 2. Passage wird bis zum 9. Kulturtag keine Konfluenz mehr erreicht.

Die mit DMEM angezüchteten Zellen proliferieren wesentlich schneller. Bei Erreichen einer Konfluenz ist das Muster des Zellrasens sehr gleichmäßig („cobblestone“). Die Zellen haben nur bei Beginn der Adhärenz eine schollige Erscheinung. Sobald der Zellrasen dichter wird, haben die Zellen eher eine spindelige Gestalt. Bei längerer Kulturdauer wölben sich die Zellen kuppelartig vor oder bilden Stränge, die in einer weiteren Ebene liegen.

**Tabelle 17: 2. Passagierung der adhärennten Zellkulturen**

	<b>DMEM-Kultur</b>	<b>TCM-Kultur</b>
<b>Tag 1</b>	Nester aus ca. 50 Zellen.	Keine adhärennten Zellen sichtbar.
<b>Tag 3</b>	Nester aus ca. 250 Zellen, Zellen haben eine schollige Form.	Kleine Nester aus 20 Zellen. Zellen haben eine schollige Form.
<b>Tag 5</b>	Sehr große zusammenhängende Bereiche mit adhärennten Zellen vorhanden. Zellen haben schollige Form und enthalten viele dunkle Granula im Zytoplasma.	Nester aus bis zu ca. 50 Zellen. Zellen haben eine schollige Form und enthalten viele dunkle Granula im Zytoplasma.
<b>Tag 7</b>	Zellrasen ist nahezu konfluent.	Nester aus bis zu ca. 100 Zellen. Zellen haben schollige Form und enthalten viele dunkle Granula.
<b>Tag 9</b>	Konfluenten Zellrasen vorhanden mit Cobblestone-Muster. Zellen enthalten viele dunkle Granula.	Keine Konfluenz erreicht.

**Tabelle 18: 3. Passagierung der adhärennten Zellkulturen**

	<b>DMEM-Kultur</b>	<b>TCM-Kultur</b>
<b>Tag 1</b>	Kleine Nester aus ca. 30 Zellen.	Keine adhärennten Zellen sichtbar.
<b>Tag 3</b>	Nester aus ca. 100 Zellen. Zellen haben eine spindelige Form.	Keine adhärennten Zellen sichtbar. Vereinzelt schwimmen runde, lebende Zellen im Medium.
<b>Tag 5</b>	Größere Nester aus ca. 300 Zellen vorhanden, Zellen haben spindelige Form, viele dunkle Granula im Zytoplasma.	Vereinzelt Anheftung der Zellen, vereinzelt schwimmen runde, lebende Zellen im Medium. Zellen haben eine schollige Form.
<b>Tag 7</b>	Zellrasen ist nicht vollständig zusammenhängend.	Nester aus bis zu ca. 20 Zellen vorhanden.
<b>Tag 9</b>	Konfluenten Zellrasen vorhanden, bildet Cobblestone-Muster aus. Zellen enthalten viele dunkle Granula.	Keine Konfluenz erreicht. Nester enthalten höchstens 50 Zellen, meist weniger.

Die mit DMEM angezüchteten Kulturen konnten noch mehrmals passagiert werden, verlangsamten ihr Wachstum allerdings ebenfalls sehr stark.

## Suspensionskultur

Bis zum Ende der Kultur am 20. Tag waren beim OCS-Zusatz noch frei schwimmende und mobile Sphäroide vorhanden. Die Zilienmotilität und auch die Mobilität der Aggregate war jedoch im Vergleich zum Anfang der Kultur stark vermindert.

**Tabelle 19: Vergleich der Kulturzusätze FBS und OCS**

	<b>TCM + FBS</b>	<b>TCM + OCS</b>
<b>Größe der Zellaggregate</b>	Ca. 50-300 Zellen	Ca. 50-300 Zellen
<b>Motilität der Zilien am 3. Kulturtag</b>	Stark (++)	Sehr stark (+++)
<b>Mobilität der Sphäroiden am 3. Kulturtag</b>	Stark (++)	Sehr stark (+++)
<b>Adhärenz</b>	Nach ca. 24 Stunden	Nach ca. 3 Tagen
<b>Vorkommen von Sphäroiden am 14. Kulturtag</b>	Kaum vorhanden	Zahlreich vorhanden

### 4.2.2 Identifizierung der Epithelzellen

Die Reinheit der Kulturen wurde mit den Antikörpern gegen Zytokeratin und Vimentin überprüft.

#### Adhärente Kulturen

Bei einer Fixierung der Kulturzellen mit Methanol-Aceton lässt sich das Zytoskelett deutlich darstellen. Die Kulturzellen reagieren zu ca. 98 % positiv mit dem Antikörper gegen Panzytokeratin. Die Farbintensität variiert ein wenig (++ - +++). Am Rand oder in kleineren Nestern gelegene Zellen sowie Zellen, die mitotische Kernfiguren aufweisen sind besonders intensiv gefärbt (+++). Ca. 2 % der Zellen zeigen keine Reaktion.

Bei Inkubation mit dem Vimentin Antikörper sind große zusammenhängende Bereiche deutlich braun gefärbt (++) , andere Bereiche hingegen bleiben vollständig ungefärbt.



Abb. 83: IHC-Nachweis von Panzytokeratin. Die Immunreaktion ist am Rand eines Zellnestes besonders intensiv.



Abb. 84: IHC-Nachweis von Panzytokeratin. Mitotische Kernfiguren in adhärennten Zellen (Pfeile). Die Zytokeratinreaktion ist bei mitotisch aktiven Zellen besonders intensiv.

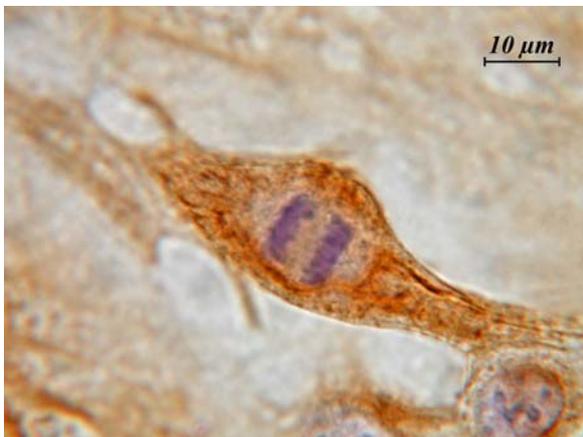


Abb. 85: IHC-Nachweis von Panzytokeratin. Anaphase bei einer adhärennten Eileiterepithelzelle.

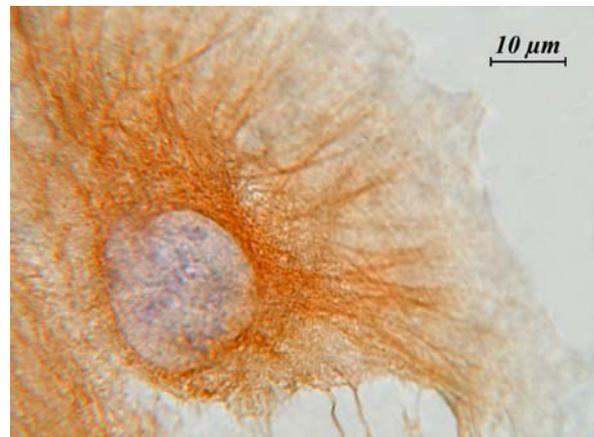


Abb. 86: IHC-Nachweis von Panzytokeratin. Das Zytoskelett lässt sich am Rand eines Zellnestes besonders deutlich darstellen.

## Sphäroiden

In Paraffin eingebettete Sphäroiden und die Ausstrichpräparate wurden am Tag 1 der Kultur auf ihre Zellanteile hin untersucht.

**Tabelle 20: Kulturreinheit**

Sphäroiden	Zytokeratin	Vimentin	S 100
eingebettet	99 % +++	vereinzelte Zellen ++	alle Zellen +++
ausgestrichen	alle Zellen ++	alle Zellen --	alle Zellen ++

Die Zellen zeigen eine stark positive Bindungsreaktion mit dem Antikörper gegen Zytokeratin. In den Sphäroiden sind keine Panzytokeratin negativen Zellen erkennbar.

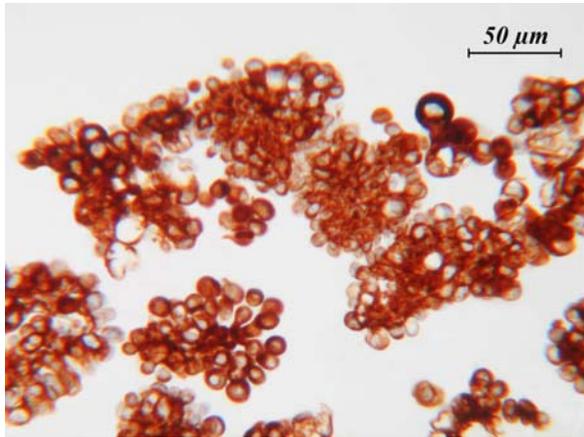


Abb. 87: IHC-Nachweis von Panzytokeratin. Übersichtsaufnahme. Die Zellen innerhalb der Sphäroiden exprimieren Zytokeratinfilamente.



Abb. 88: IHC-Nachweis von Panzytokeratin. Alle Zellen einer Sphäroide sind Zytokeratin positiv.

Die im Zellverband der Sphäroiden vorkommenden Zellen weisen zu ca. 95% eine stark positive Reaktion (+++) mit dem S100-Antikörper auf. In einigen Präparaten der Kulturtag 7 und 9 sind Areale vorhanden, deren Zellen keine bzw. eine unklare zytoplasmatische Immunreaktion zeigen. Die betreffenden Zellen sind nicht in einem Sphäroidenverband organisiert, eher bilden sie eine netzartige Struktur.

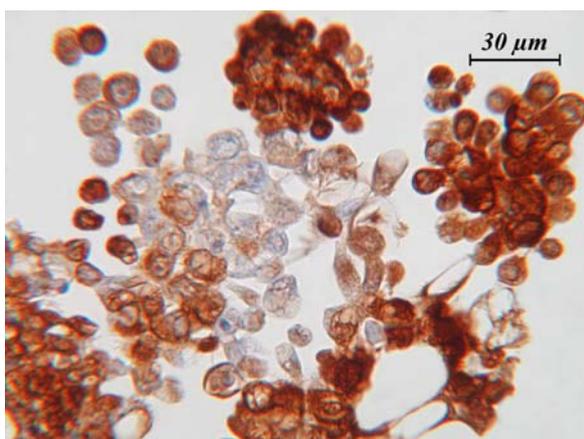


Abb. 89: IHC-Nachweis von S100. Kulturtag 7. Die Sphäroidzellen reagieren S100 positiv. Einige Zellen außerhalb der Sphäroiden erscheinen S100 negativ.

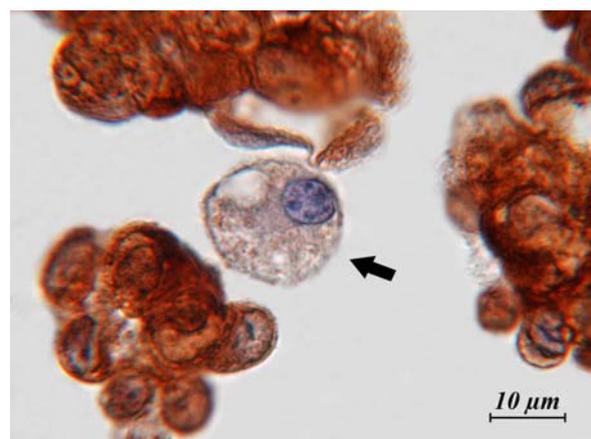


Abb. 90: IHC-Nachweis von S100. Kulturtag 7. Eine große Zelle außerhalb des Zellverbandes exprimiert das S100-Protein nicht (Pfeil). Es könnte sich hierbei um einen Fibroblasten handeln.

Vereinzelte Zellen weisen eine deutlich positive Reaktion (++) mit dem Antikörper gegen Vimentin auf. Man kann zwischen gefärbten Zellen, die außerhalb der Zellaggregate liegen und den in den Sphäroiden enthaltenen Vimentin positiven Zellen unterscheiden. Die einzeln liegenden Zellen sind stark Vimentin positiv (+++) und haben eine runde Form.

In den Sphäroiden sind die positiv bis stark positiv reagierenden Zellen (++ - +++) basal von den hochprismatischen Epithelzellen lokalisiert. Sie liegen somit weitestgehend im Inneren der Sphäroiden. Sie weisen oft eine längliche Form auf. Ihr Zytoskelett zeichnet sich deutlich ab. Allerdings sind nur in wenigen Sphäroiden überhaupt solche Zellen vorhanden.

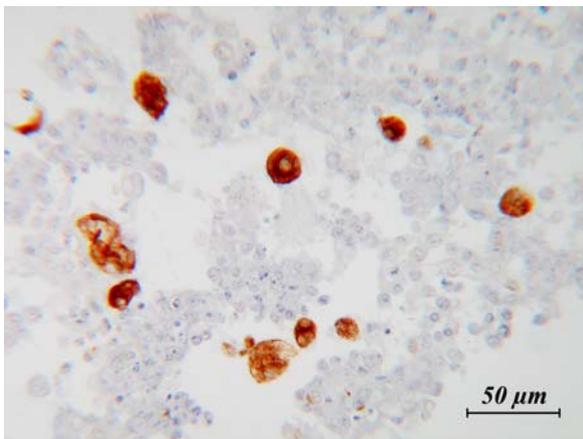


Abb. 91: IHC-Nachweis von Vimentin in Sphäroiden, Kulturtag 9. Einige große, runde Zellen außerhalb der Sphäroiden exprimieren Vimentinfilamente.

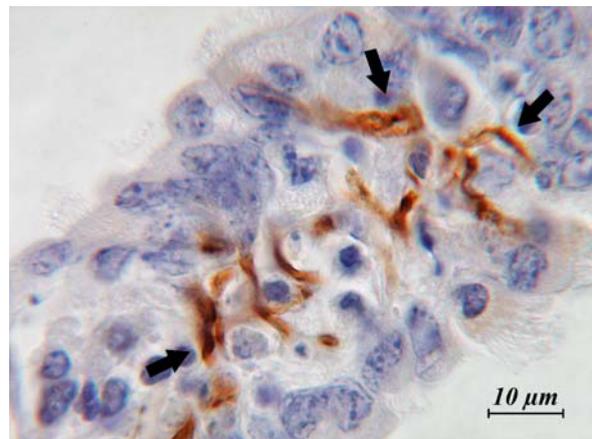
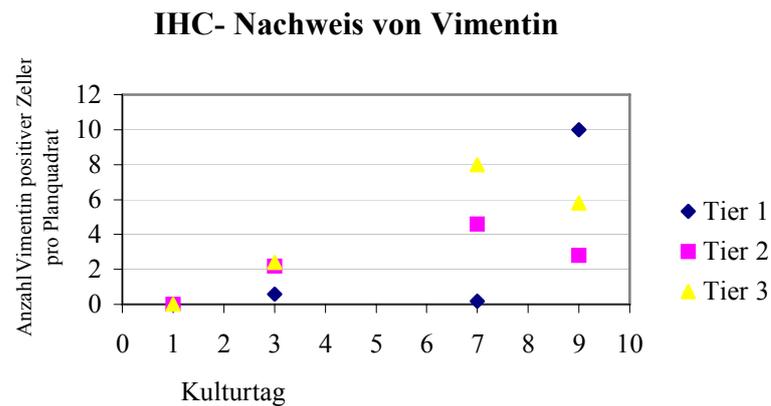


Abb. 92: IHC-Nachweis von Vimentin in Sphäroiden, Kulturtag 7 der Isthmuskultursphäre. In der Mitte der Sphäroide sind längliche immunpositive Zellen vorhanden (Pfeile).

Während der Dauer der Zellkultur ist eine Zunahme der Vimentin positiven Zellen zu verzeichnen. Am Tag 9 der Kultur sind in den Ampullazellen von drei untersuchten Tieren durchschnittlich 6 Vimentin positive Zellen pro Planquadrat ( $0,2 \text{ mm} \times 0,2 \text{ mm}$ ) vorhanden. Am 1. Kulturtag hingegen sind nur bei den Zellen eines der drei Tiere ganz vereinzelt Vimentin positive Zellen zu finden.



Graphik 10: Anzahl Vimentin positiver Zellen (pro Planquadrat) an vier Tagen der Ampullaepithelzellkultur. Über den Kulturverlauf sind steigende Tendenzen der Zahlen Vimentin positiver Zellen festzustellen.

### 4.2.3 Histologische Färbungen

Als Übersichtsfärbung wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt. Dazu wurden sowohl Ausstrichpräparate als auch Schnitte der Sphäroiden verwendet.

Bei den histologischen Schnitten zeigen die Epithelzellen eine hochprismatische Form. Die Zilien sind an den apikalen Zellpolen angeordnet. Der Kern ist im basalen Zytoplasma zu lokalisieren. Das Kern-Plasma-Verhältnis beträgt nach 24 Stunden in Kultur ungefähr 1 : 1,7. In den Ausstrichpräparaten haben die Zellen eine isoprismatische Form. Das Kern-Plasma-Verhältnis der Epithelzellen beträgt nach 24 Stunden in Kultur ungefähr 1 : 1,3.

#### Morphologische Veränderungen der Sphäroiden während der Kulturperiode

##### Ampulla, Tag 1 (Tier 1, 2, 3)

Die Sphäroiden weisen eine gleichmäßige Anordnung auf, benachbarte Zellen liegen dicht nebeneinander. Anzeichen von Degeneration sind nicht zu erkennen. Das Zytoplasma ist gleichmäßig rosa, die Kerne erscheinen blau. Die Zilien sind lang und weisen nach außen.

##### Ampulla, Tag 3 (Tier 1, 2, 3)

Besonders bei nicht im Verband liegenden Zellen erscheinen die Kerne sehr klein und dunkel. Sie scheinen pyknotisch zu sein. In zusammenhängenden, intakten Sphäroiden kommen nur wenige dieser dunklen Kerne vor. Diese liegen im Zentrum der Zellaggregate. Zilien sind vorhanden und zeigen im Vergleich zum ersten Kulturtag keine Veränderungen.

Ampulla, Tag 7 (Tier 1, 2, 3)

Die Sphäroiden weisen auffallend viele Hohlräume auf, die in der Mitte der Zellaggregate lokalisiert sind. Auch zwischen benachbarten Zellen sind lateral erweiterte Zellzwischenräume vorhanden. Die Verbindungsfläche der benachbarten Zellen ist im Vergleich zum ersten und dritten Kulturtag vermindert. Eine Kontaktfläche bilden nunmehr hauptsächlich die apikalen Anteile der lateralen Zellmembranen. Die Hohlräumen beinhalten des Öfteren pyknotische Kernteile und Detritus. Der Zilienbesatz zeigt keine Veränderung (siehe Tag 1 und Tag 3). Die Polarität der Zellen ist demnach weiterhin gegeben. Außerhalb der Zellverbände sind viele untergehende Zellen mit pyknotischen Kernen sowie Detritus auszumachen.

Ampulla, Tag 9 (Tier 1, 2, 3)

Die meisten Zellen liegen nicht mehr im Verband der Sphäroiden sondern einzeln vor. Es ist sehr viel Detritus vorhanden. Es sind weiterhin intakte Sphäroiden vorhanden. Sie weisen sehr große Hohlräume auf. Der Zilienbesatz bei den intakten Sphäroiden scheint unverändert. Einige der Sphäroiden zeigen eine abweichende Gestalt. Hier weisen die Zellen eine abgeflachte Form auf und umschließen einen großen zusammenhängenden Hohlraum. Auch diese atypisch erscheinenden Zellaggregate beinhalten unter anderem zilientragende Zellen.

Isthmus, Tag 3 (Tier 3)

Es sind viele intakte Sphäroiden mit kleinen Hohlräumen und besonders langen Zilien vorhanden. Die Zellzahl pro Sphäroide ist geringer als bei den Kulturen der Ampullazellen. Am dritten Kulturtag ist die Anzahl der pyknotischen Kerne bei den Kulturen der Isthmuszellen geringer als bei den Ampullazellkulturen.

Isthmus, Tag 7 (Tier1)

Viele der Sphäroiden weisen Hohlräume auf. Pyknotische Kerne kommen vermehrt vor. Sie liegen im Lumen bzw. in der Mitte der Sphäroiden. Es sind weiterhin sehr lange, nach außen weisende Zilien vorhanden. Auch bei den Kulturen der Isthmuszellen kommen die oben beschriebenen andersartig gestalteten Sphäroiden mit abgeflachten Zellen und großen Hohlräumen vor.

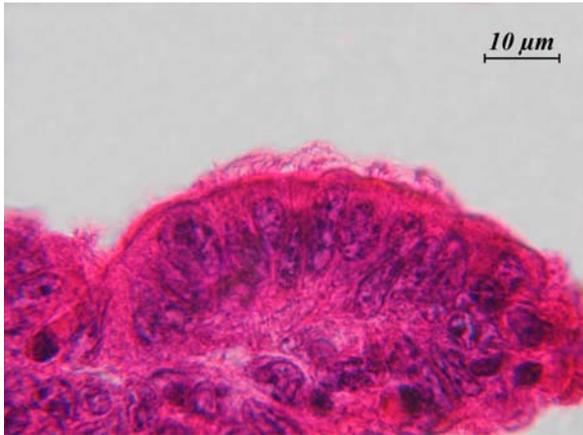


Abb. 93: HE-Färbung einer Sphäroide, Kulturtag 1. Die Zellen haben eine hochprismatische Form.

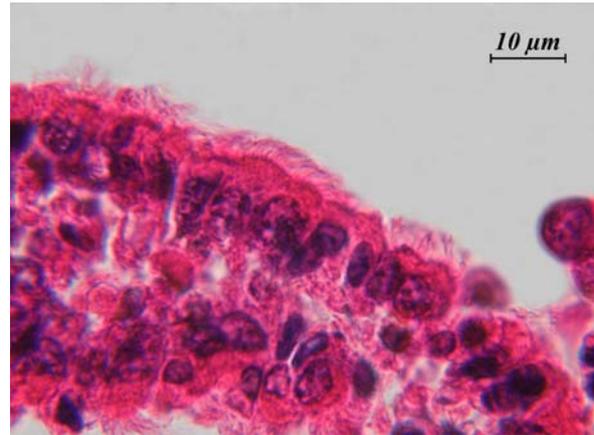


Abb. 94: HE-Färbung einer Sphäroide, Kulturtag 3. Die Zellen haben eine hochprismatische Form. In basalen Zellbereichen sind laterale Spalträume sichtbar.

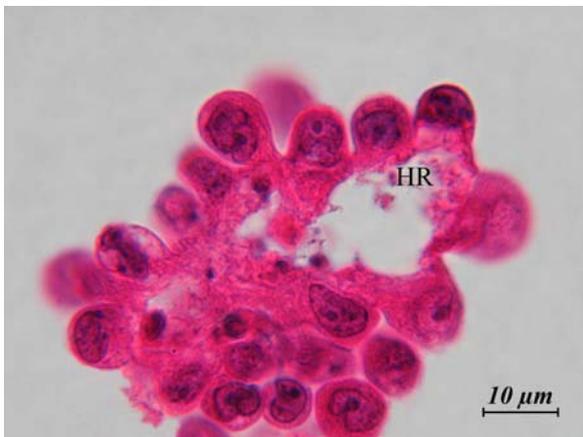


Abb. 95: HE-Färbung einer Sphäroide, Kulturtag 7. Die Zellen haben eine isoprismatische Form. Im Zentrum der Sphäroide ist ein zusammenhängender Hohlraum (HR) vorhanden.

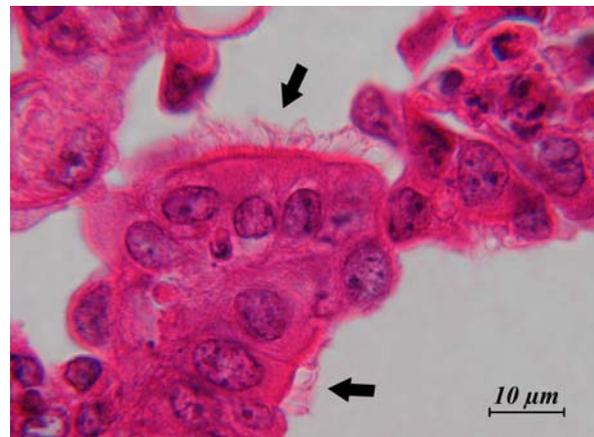


Abb. 96: HE-Färbung einer Sphäroide, Kulturtag 9. Ein dichter Zilienbesatz (Pfeile) ist vorhanden.

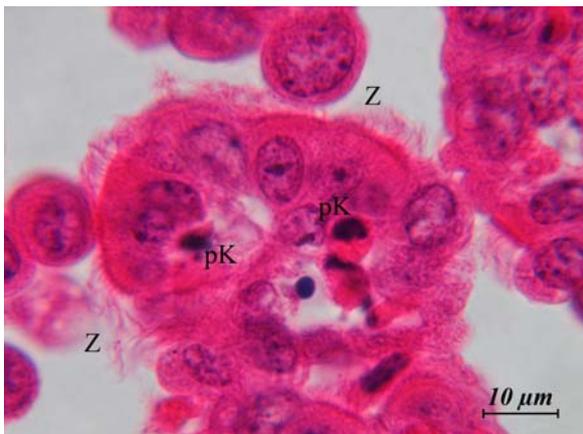


Abb. 97: HE-Färbung einer Sphäroide der Isthmuszellen, Kulturtag 3. Wenige pyknotische Kerne (pK) liegen im Zentrum der Sphäroide. Die Zilien (Z) weisen nach außen.



Abb. 98: HE-Färbung einer Sphäroide der Isthmuszellen, Kulturtag 3. Atypische Sphäroide mit einem großen Hohlraum (HR) und flachen Zellen. Zilienbesatz (Z) ist vorhanden.

Tabelle 21: Sphäroiden, Zellgrößen in  $\mu\text{m}$ 

	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 9
Tier 1, Ampullazellen	22	18e	17	11
Tier 2, Ampullazellen	21	16	11	16
Tier 3, Ampullazellen	14	14	16	15
Tier 1, Isthmuszellen			14	
Tier 3, Isthmuszellen		13		

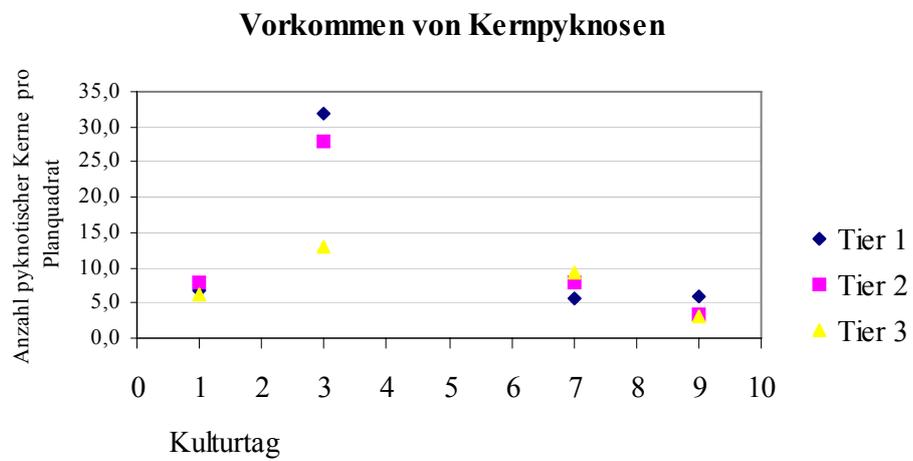
Tabelle 22: Sphäroiden, Kerngrößen in  $\mu\text{m}$ 

	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 9
Tier 1, Ampullazellen	12	11	7	7
Tier 2, Ampullazellen	13	9	7	7
Tier 3, Ampullazellen	9	8	8	8
Tier 1, Isthmuszellen			8	
Tier 3, Isthmuszellen		7		

Tabelle 23: Sphäroiden, Kern-Plasma-Verhältnis

	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 9
Tier 1, Ampullazellen	1 : 1,8	1 : 1,6	1 : 2,4	1 : 1,6
Tier 2, Ampullazellen	1 : 1,6	1 : 1,8	1 : 1,6	1 : 2,3
Tier 3, Ampullazellen	1 : 1,8	1 : 1,6	1 : 2,4	1 : 1,6
Tier 1, Isthmuszellen		1 : 1,9		
Tier 3, Isthmuszellen			1 : 1,8	

Die Zell- und Kerngrößen nehmen bei den Tieren 1 und 2 vom Tag 1 bis Tag 9 ab, beim Tier 3 bleiben Zell- und Kerngrößen relativ konstant. Über die Zeit der Kultur sind allerdings starke Schwankungen in den Größen der Zellen und dem Kern-Plasma-Verhältnis zu verzeichnen. Tendenzen können aus den Messungen nicht abgeleitet werden, da keine signifikanten bzw. einheitlichen Veränderungen über die untersuchten Kulturtage festzustellen sind.



Graphik 11: Anzahl pyknotischer Zellkerne an vier Tagen der Ampullaepithelzellkultur. Die Anzahl pyknotischer Kerne hat eine stark steigende Tendenz vom 1. bis zum 3. Kulturtag. Danach ist eine fallende Tendenz der Anzahl untergehender Kerne zu verzeichnen.

#### 4.2.4 Immunhistochemische Nachweise

##### Immunhistochemischer Nachweis von Chromogranin

Der Antikörper gegen Chromogranin bindet an der apikalen Zellmembran der Epithelzellen.

Zilien sind ausschließlich den Zellen zuzuordnen, die ChromograninA positiv sind.

Die immunhistochemisch positive Reaktion auf ChromograninA ist bei den Sphäroiden außen lokalisiert.

**Tabelle 24: Anteil der ChromograninA positiven Zellen innerhalb der Sphäroiden**

	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 9
Tier 1, Ampullazellen.	10 %	40 %	10 %	30 %
Tier 2, Ampullazellen.	30 %	30 %	30 %	20 %
Tier 3, Ampullazellen.	45 %	40 %	30 %	30 %
Tier 1, Isthmuszellen.			25 %	
Tier 3, Isthmuszellen.		30 %		

(Es wurden lediglich Zellen ausgezählt, die keine pyknotischen Kerne aufwiesen und im Verband einer Sphäroide angeordnet waren.)

Während der Kultur ist keine starke Abnahme der zilientragenden Zellen in den Sphäroiden zu verzeichnen. Noch am Kulturtag 9 sind ca. 30 % der intakten Zellen in den Sphäroiden zilientragend. Die entsprechenden Zellen zeigen eine spezifische ChromograninA Reaktion. Zudem weisen sie eindeutig Zilien auf.

Während die zilientragenden Zellen eine gleichmäßige apikale Oberfläche bilden, wölben sich nicht zilientragende Zellen über diese hervor. Dies erinnert an die Protrusionsbildung im Eileiterepithel. Auch die Proben der Isthmuszellen enthalten zu 25-30 % zilientragende Zellen bei den intakten Sphäroiden.

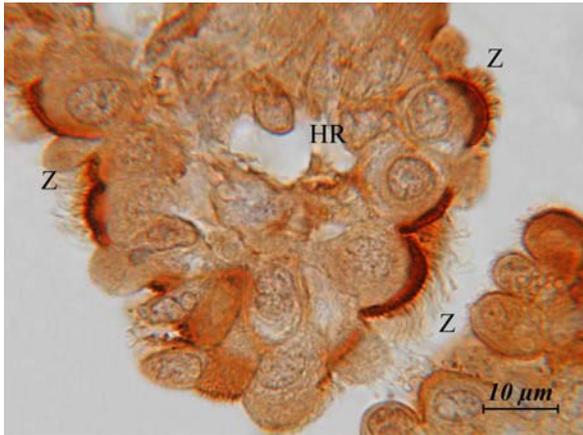


Abb. 99: IHC-Nachweis von ChromograninA, Sphäroide aus der Isthmuszellkultur, Kulturtag 7. Die apikalen Zellpole der zilientragenden Zellen reagieren stark immunpositiv. Hohlraum (HR), Zilien (Z).

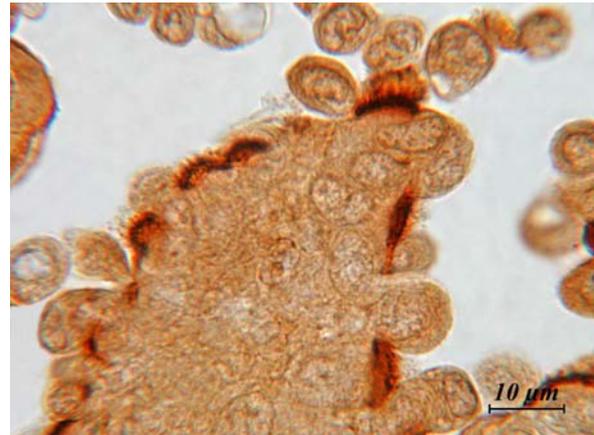


Abb. 100: IHC-Nachweis von ChromograninA, Sphäroide aus der Isthmuszellkultur, Kulturtag 3. Zwischen den ChromograninA positiven zilientragenden Zellen wölben sich sekretorische Zellen hervor.

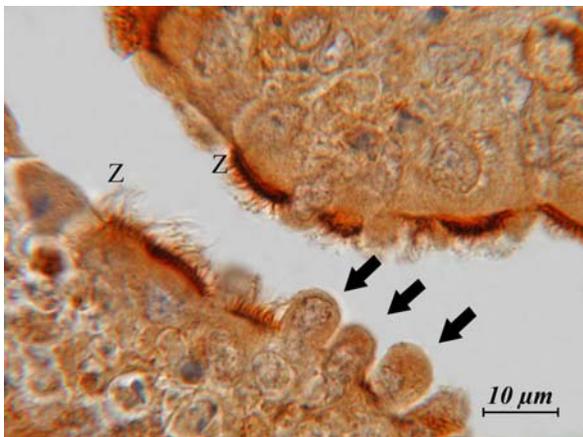


Abb. 101: IHC-Nachweis von ChromograninA, Sphäroide aus der Isthmuszellkultur, Kulturtag 7. Sekretorische Zellen wölben sich zwischen den immunpositiven zilientragenden Zellen hervor (Pfeile).

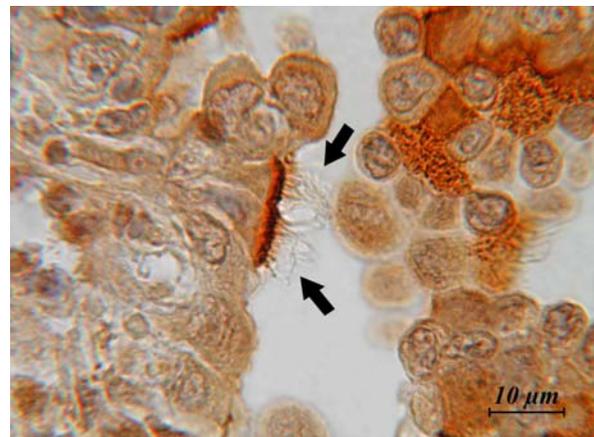


Abb. 102: IHC-Nachweis von ChromograninA, Sphäroide aus der Isthmuszellkultur, Kulturtag 7. Es sind lange Zilien (Pfeile) bei ChromograninA-positiven Zellen zu erkennen.

### Immunhistochemischer Nachweis von Laminin

An den basalen Zellpolen ist keine Immunreaktion erkennbar. Der apikale Zellpol und das apikale Zytoplasma der Epithelzellen ist bei einigen Präparaten leicht unspezifisch gefärbt.

### Immunhistochemischer Nachweis des Östrogenrezeptor $\alpha$

Die Kerne bleiben bei der Mehrzahl der Zellproben von den verschiedenen Tieren und Kulturtagen ungefärbt. Wenige Proben beinhalten vereinzelte Zellen, die eine schwache ER $\alpha$  Reaktion zeigen.

### Immunhistochemischer Nachweis des Progesteronrezeptors (PR)

Die Zellkerne der Sphäroiden weisen teilweise eine schwach positive, gelegentlich auch deutlich positive Reaktionen beim Nachweis von PR auf. Sowohl Kerne von zilientragenden Zellen als auch Kerne von sekretorischen Zellen konnten unter den gefärbten Kernen identifiziert werden. Auffällig ist, dass sich PR positive Kerne innerhalb einer Sphäroide oft häufen, während andere Sphäroiden keine immunhistochemische Reaktion mit dem PR Antikörper zeigen. In den Suspensionskulturen der Isthmuszellen sind wesentlich öfter PR positive Kerne vorhanden als bei den Kulturen der Ampullazellen. Auch die atypischen Sphäroiden mit den besonders großen Hohlräumen und flachen Zellen beinhalten nur wenige Zellen, die deutlich PR positiv sind. Das Vorkommen und die Intensität der Farbreaktionen ist sehr variabel, wobei keine Abhängigkeit von der Kulturdauer festzustellen ist. PR positive Reaktionen kommen bei den Präparaten von allen drei Tieren vor.

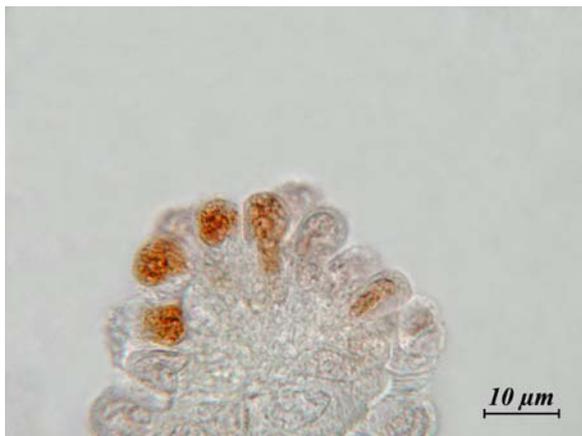


Abb. 103: IHC-Nachweis des PR in der Kultur der Ampullaepithelzellen, Kulturtag 1. Bei dieser Sphäroide sind immunpositive Kerne zu erkennen.



Abb. 104: IHC-Nachweis des PR in der Kultur der Ampullaepithelzellen, Kulturtag 3. Sowohl zilientragende Zellen (zZ) als auch sekretorische Zellen (sZ) weisen positive PR Immunreaktionen auf.



Abb. 105: IHC-Nachweis des PR in der Kultur der Isthmusepithelzellen, Kulturtag 7. In dieser Sphäroide sind viele immunpositive Kerne vorhanden.

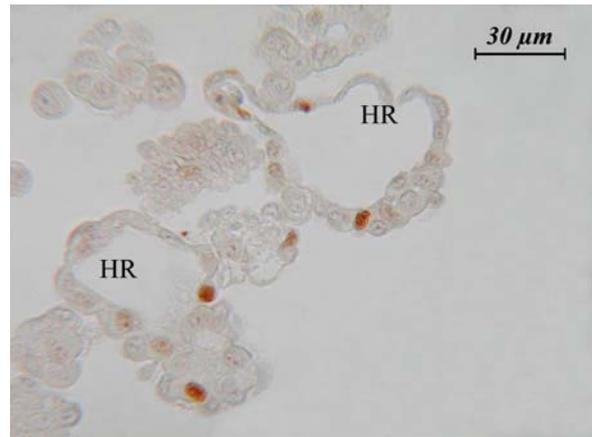


Abb. 106: IHC-Nachweis des PR in der Kultur der Isthmusepithelzellen, Kulturtag 3. Auch in diesen atypischen Sphäroiden mit den flachen Zellen wird der PR teilweise exprimiert.

### Immunhistochemischer Nachweis von Caspase-3

Am ersten Kulturtag ist die Reaktion mit dem Antikörper gegen Caspase-3 in den Sphäroiden gänzlich negativ. An den Kulturtagen 3 und 7 sind Caspase-3 positive Zellen zu erkennen. Bei den Caspase-3 positiven Zellen handelt es sich um Zellen, die oft am Rand der Sphäroiden liegen. Auch pyknotische Kerne, die in den Hohlräumen der Sphäroiden liegen, zeigen eine kräftige Immunfärbung.

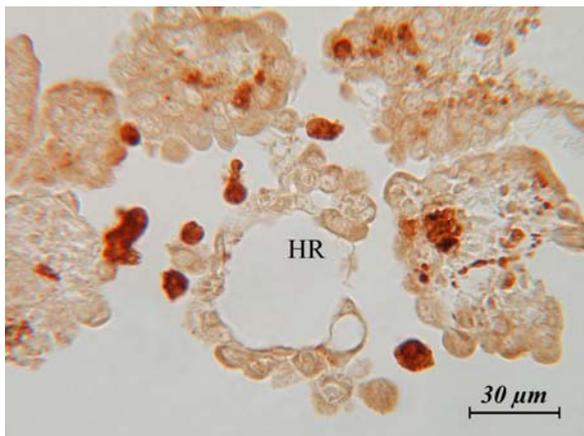


Abb. 107: IHC-Nachweis von Caspase-3 in der Kultur der Isthmusepithelzellen, Kulturtag 7. Übersicht. Hohlraum einer Sphäroide (HR).

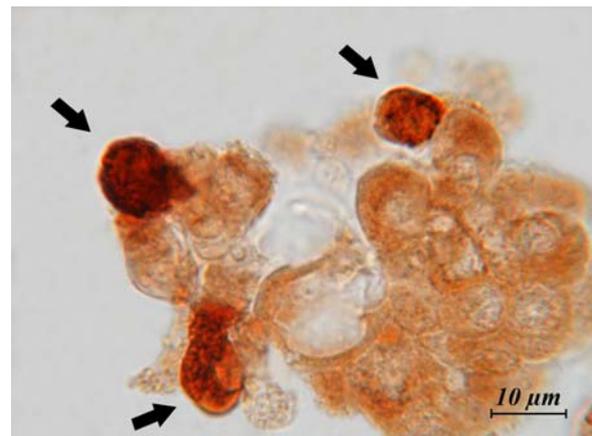


Abb. 108: IHC-Nachweis von Caspase-3 in der Kultur der Isthmusepithelzellen, Kulturtag 7. Es sind Caspase-3 positive Zellen in einer Sphäroide zu finden (Pfeile).

### Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67

Dieser Versuch wurde sowohl mit eingebetteten Sphäroiden (BFPE) als auch mit angezüchteten adhärennten Zellen auf Deckgläschen durchgeführt. Bei letzteren lassen sich außerdem die Sphäroiden beurteilen, die gerade dabei sind sich am Glas anzuheften aber noch als intaktes Zellaggregat vorliegen.

Die adhärennten Zellen zeigen zu mindestens 85 % eine deutliche bis starke positive Reaktion (++) - (+++) und zu ca. 10 % eine schwache Reaktion (+) mit dem MIB-1. Die Kerne erscheinen sehr groß und sind durch den Farbstoff „Fast Red“ kräftig pink gefärbt. Die Zellen der Sphäroiden weisen aufgrund des Hämalauns schwach blau gefärbte Kerne auf. Selten sind einzelne Zellkerne leicht rosafarben und zeigen somit eine schwache Expression des Ki-67 an (+). Die Zellen der Sphäroiden, die sich an das Glasplättchen anheften zeigen jedoch eine kräftige Färbung (+++). Dort findet demnach eine massive Proliferation statt.

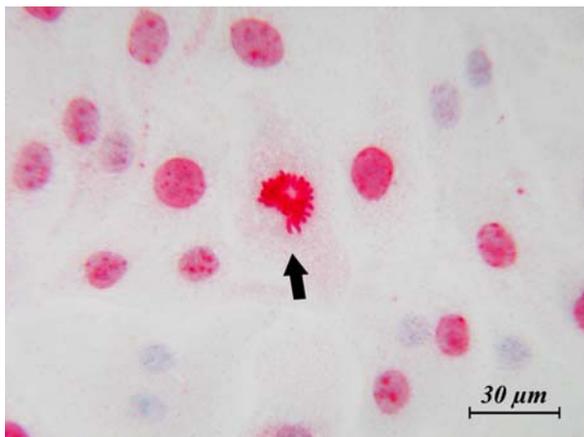


Abb. 109: IHC-Nachweis von Ki-67 bei adhärennten Zellen. Mitose, Metaphase (Pfeil).

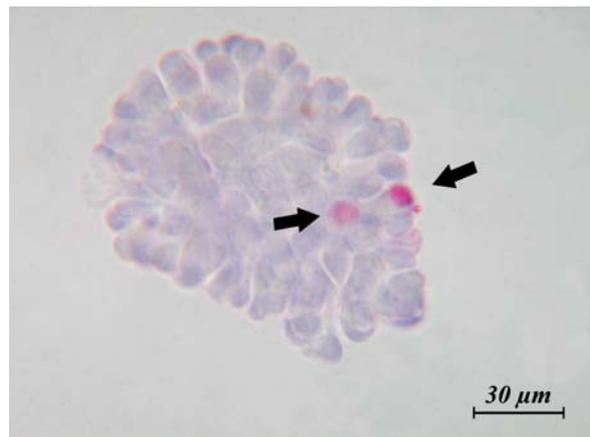


Abb. 110: IHC-Nachweis von Ki-67 bei einer Sphäroide. Nur einzelne Zellen reagieren schwach immunpositiv (Pfeile).

In der Fluoreszenzmikroskopie lässt sich das Fast Red ebenfalls sehr gut darstellen. Die mit MIB-3 positiv reagierenden Kerne nehmen die DAPI-Kernfärbung nicht an. Die meisten Kerne der Sphäroiden und vereinzelt adhärennte Zellen des Zellrasens hingegen erscheinen mit DAPI blau.

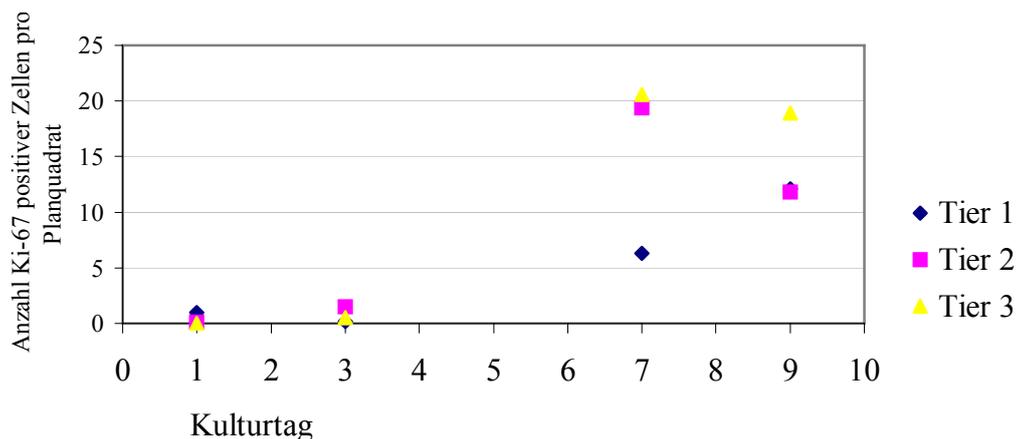
Tabelle 25: Ki-67 positive Zellen bei BFPE-Sphäroiden im Durchschnitt

	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 9
<b>Tier 1, Ampullazellen.</b>	1	0,2	6,3	12,1
<b>Tier 2, Ampullazellen.</b>	0,1	1,5	18,4	11,8
<b>Tier 3, Ampullazellen.</b>	0	0,5	20,6	17,1
<b>Tier 1, Isthmuszellen.</b>		2,2		
<b>Tier 3, Isthmuszellen.</b>			13	

Die Sphäroiden zeigen nach 24 Stunden Kultivierung nur sehr vereinzelt eine schwache Reaktion mit dem MIB-1. Die Anzahl gefärbter Zellen innerhalb der Sphäroiden nimmt mit der Kulturdauer deutlich zu.

Es kommen meist mehrere Ki-67 positive Zellen konzentriert in einer Sphäroide vor, während andere Sphäroiden keine positive Reaktion aufweisen. Auch die atypischen Sphäroiden mit den flachen Zellen weisen positive Ki-67 Reaktionen auf. Mitosefiguren sind unter den kräftig gefärbten Kernen deutlich sichtbar. Es ist keine Ki-67 positive Zelle zu erkennen, die zilienträgend ist.

### IHC-Nachweis von Ki-67



Graphik 12: Graphische Darstellung der Zahlen Ki-67 positiver Zellen an vier Kulturtagen. Zwischen dem 3. und 7. Tag der Ampullaepithelzellkultur ist eine steigende Tendenz der Mitoserate zu erkennen.

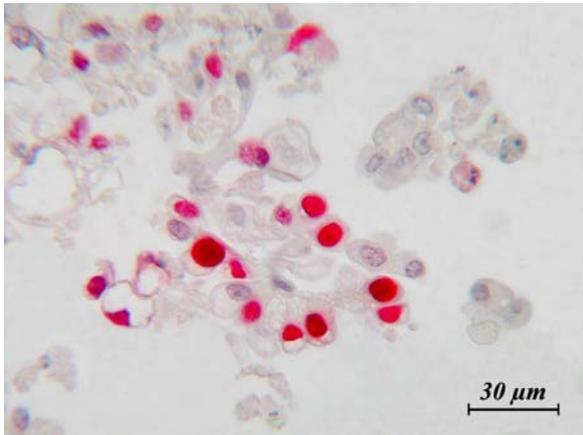


Abb. 111: IHC-Nachweis von Ki-67, Ampullazellkultur, Kulturtag 7. Innerhalb einer Sphäroide sind viele Ki-67 positive Zellen konzentriert.

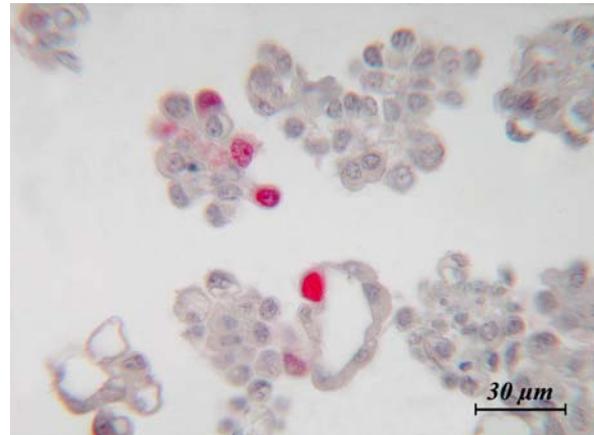


Abb. 112: IHC-Nachweis von Ki-67, Ampullazellkultur, Kulturtag 9. Ki-67 positive Zellen kommen auch in den atypischen Sphäroiden mit flachen Kernen vor.

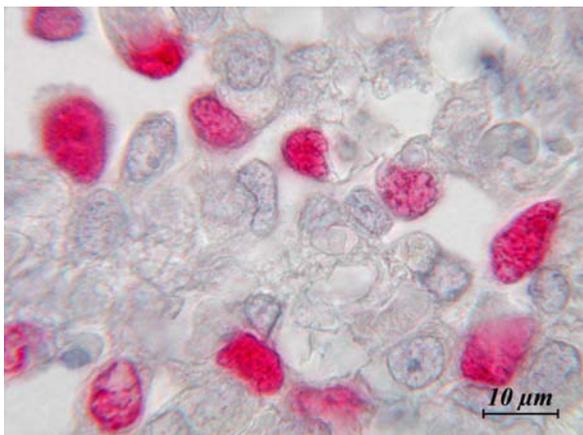


Abb. 113: IHC-Nachweis von Ki-67, Ampullazellkultur, Kulturtag 7. Die Ki-67 positiven Kerne sind kräftig pink gefärbt.

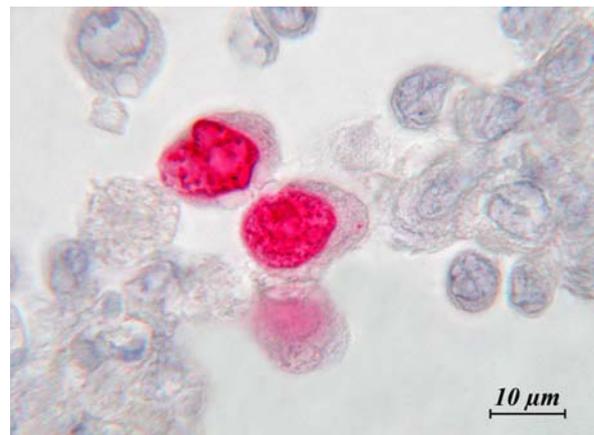


Abb. 114: IHC-Nachweis von Ki-67, Ampullazellkultur, Kulturtag 7. Vergrößerung einer abgeschlossenen Mitose.

#### 4.2.5 Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Sphäroiden

Nach 24 Stunden in Kultur bestehen die Sphäroiden aus hochprismatischen Zellen. Die Verbindungen zwischen benachbarten Zellen sind intakt, d.h. es sind keine interzellulären Spalt-räume vorhanden. Die sekretorischen Zellen enthalten reichlich elektrondichte sekretorische Granula, die unter der apikalen Zellmembran konzentriert sind. Auch „digiprints“ sind vorhanden. Die zilientragenden Zellen weisen einen dichten Zilienbesatz an der apikalen Zelloberfläche auf. Die Zilien weisen immer nach außen, demnach ist eine Polarisierung der Zellen gegeben. Das Zytoplasma beider Epithelzelltypen beinhaltet reichlich Zellorganellen.

**Tabelle 26: Vorkommen von Zellorganellen in Sphäroiden**

	<b>Mitochondrien</b>	<b>rER und freie Ribosomen</b>	<b>Golgi-Apparat</b>	<b>Sekretgranula</b>	<b>Digiprints</b>
<b>Tag 1</b>	+++	+++	++	++	+
<b>Tag 3</b>	+++	+++	++	++	-/+
<b>Tag 5</b>	++	+++	+	+	--
<b>Tag 10</b>	++	++	+	--	--

**Tabelle 27: Weitere intrazelluläre Charakteristika der Sphäroiden**

	<b>Vakuolen</b>	<b>Glykogenspeicherung</b>	<b>Ablösung der Kernmembran</b>
<b>Tag 1</b>	+	+	--
<b>Tag 3</b>	++	++	--
<b>Tag 5</b>	+++	++	--
<b>Tag 10</b>	+++	++	--

**Tabelle 28: Sonstige Merkmale der Sphäroiden**

	<b>Zilien</b>	<b>Mikrovilli</b>	<b>Zellverbindungen</b>	<b>interzelluläre Hohlräume</b>	<b>Detritus in der Sphäroide</b>
<b>Tag 1</b>	+++	+++	+++	+	+
<b>Tag 3</b>	+++	+++	++	++	++
<b>Tag 5</b>	++	+++	+ - ++	+++	++
<b>Tag 10</b>	+ (- ++)	+++	+	+++	+++

Außerhalb der intakten Zellverbände kommen viele Einzelzellen vor, die starke Degenerationserscheinungen und Kernpyknoten aufweisen. Auch Zelldetritus ist reichlich vorhanden. Die untergehenden Zellen wurden bei der Charakterisierung der Sphäroiden nicht miteinbezogen.

### **Veränderung der morphologischen Charakteristika der Sphäroiden während der Kultivierung**

Die Sphäroiden enthalten bis zum Ende der Kultur nach 10 Tagen polarisierte Eileiterepithelzellen. Zilien und Mikrovilli weisen nach außen.

Die Zellen verändern innerhalb der Kulturperiode jedoch ihre Form. Während die Zellen anfangs hochprismatisch sind, erscheinen sie am 5. Kulturtag bereits isoprismatisch und abgekugelt. Das Zytoplasma ist reduziert. Am 7. und 10. Kulturtag sind teilweise sehr flache Zellen vorhanden, die einen besonders großen zentralen Hohlraum einer Sphäroide umschließen.

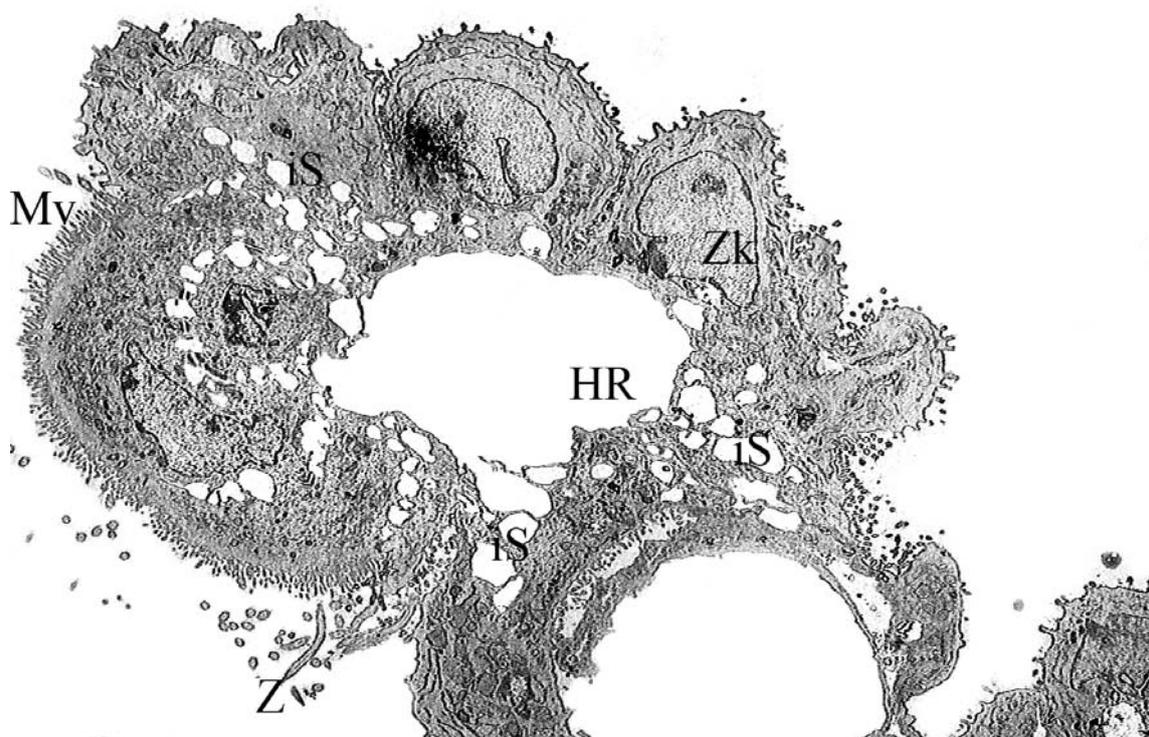


Abb. 115: Kulturtag 7, Sphäroide. Es ist ein zentraler Hohlraum (HR) vorhanden, die interzellulären Spalten (iS) sind erweitert. Die Zellen erscheinen abgekugelt. Mikrovilli (Mv) und Zilien (Z) weisen nach außen. Demnach ist die Polarisierung der Epithelzellen erhalten geblieben. Die Zellkerne (Zk) sind euchromatisch.

Ein dichter Mikrovillibesatz ist bis zum 10. Kulturtag bei den zilientragenden und den sekretorischen Zellen vorhanden. Die Mikrovilli sind lang und schmal, ihre äußere Erscheinung bleibt während der Kultur konstant erhalten. Die Zilien scheinen bis zum Ende der Kultur intakt. Während am 1. und 3. Kulturtag der Zilienbesatz sehr dicht ist, scheinen einzelne Zilien bis zum Kulturrende verloren zu gehen. Am 10. Kulturtag ist die Anzahl der Zilien bei jeder einzelnen Zelle leicht reduziert. Die Zellen sind aber dennoch eindeutig als zilientragende Zellen zu identifizieren.

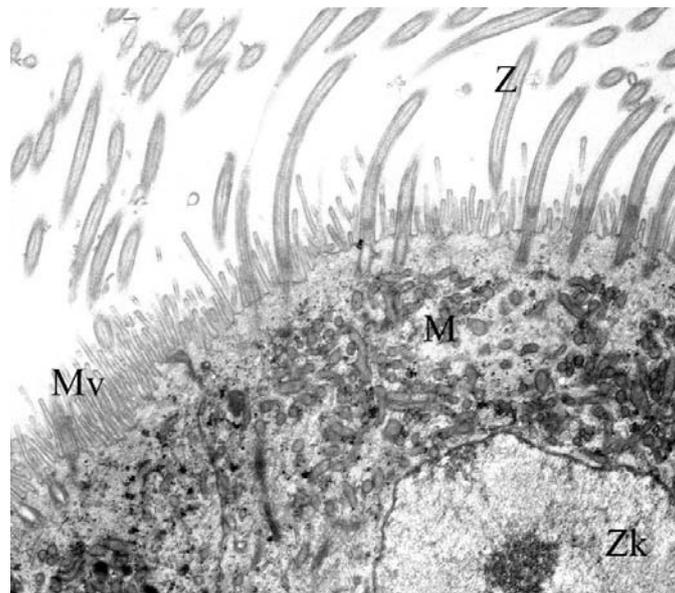


Abb. 116: Kulturtag 10. Die zilientragenden Zellen einer Sphäroide haben zusätzlich einen dichten Mikrovillibesatz (Mv) und enthalten vielen Mitochondrien (M) im apikalen Zytoplasma. Glykogenspeicherung. Zellkern (Zk), Zilien (Z).

Die benachbarten Zellen weisen nach 24stündiger Kultivierung breitflächige Interdigitationen auf. Mit zunehmender Dauer der Kultur entstehen im Interzellularspalt größere Hohlräume. Dabei bilden sich fingerförmige Zytoplasmaausläufer an den lateralen Zellmembranen, zwischen denen sich die großen Spalträume befinden. Die miteinander in Berührung stehenden Flächen benachbarter Zellen werden dadurch reduziert. Die Membranen der Zellen berühren sich nicht mehr großflächig, sondern nur noch punktuell. Dabei nimmt auch die Anzahl der lateralen Desmosomen ab. Die apikal gelegenen „tight junctions“ sind bis zum 10. Kulturtag auszumachen. Am Ende der Kultur scheinen allein diese apikalen Zwischenzellverbindungen die Zellen zusammenzuhalten, während der Interzellularspalt stark erweitert ist.

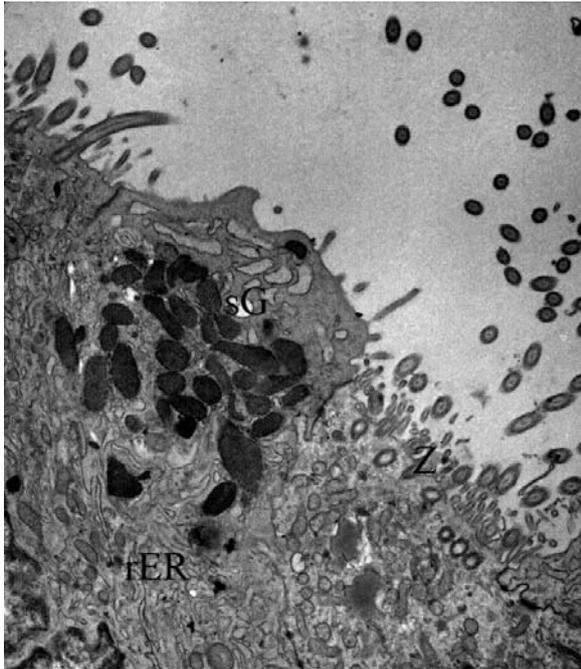


Abb. 117: Kulturtag 1, die sekretorischen Zellen enthalten viele, dichte sekretorische Granula (sG) im apikalen Zytoplasma und reichlich granuliertes endoplasmatisches Retikulum (rER). Zilien (Z).

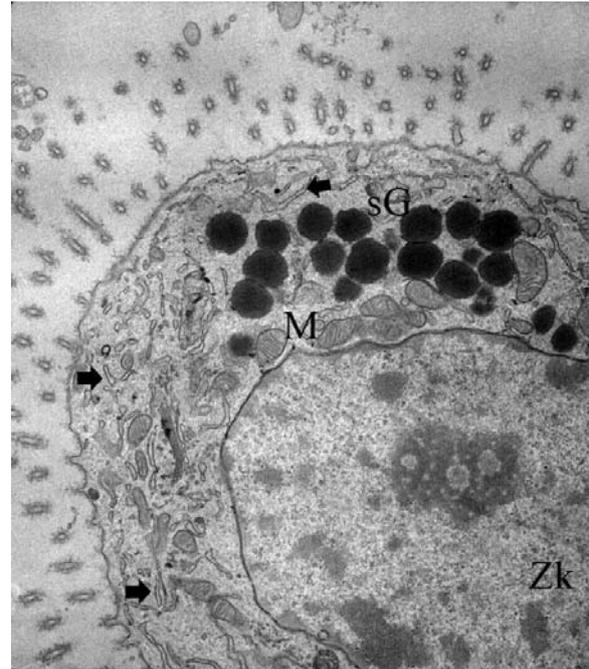


Abb. 118: Kulturtag 1, eine sekretorische Zelle mit elektronendichten, sekretorischen Granula (sG), Mitochondrien (M) und reichlich granuliertem endoplasmatischem Retikulum (Pfeile).

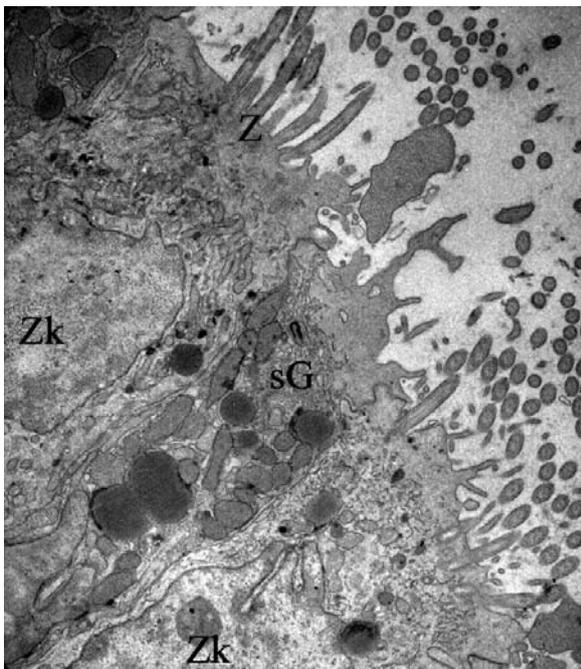


Abb. 119: Kulturtag 3, die sekretorischen Granula (sG) sind weniger dicht als am 1. Tag, aber zahlreich vorhanden. Zilientragende und sekretorische Zellen sind leicht voneinander zu differenzieren. Zellkern (Zk). Zilien (Z).

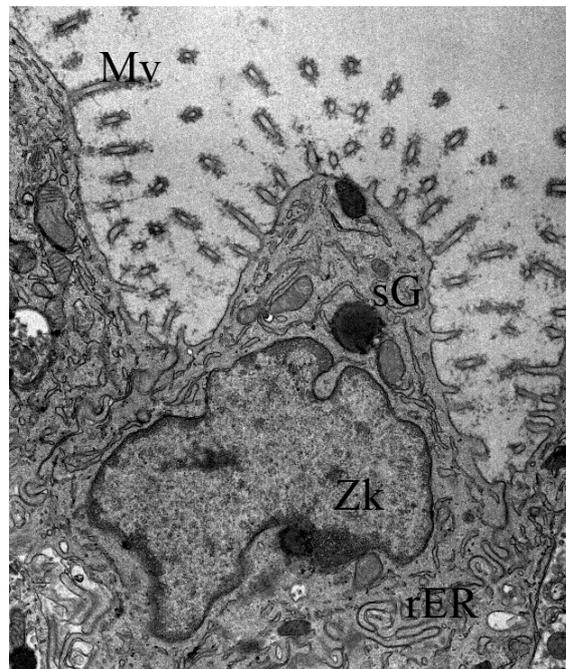


Abb. 120: Kulturtag 5, es sind nur vereinzelt sekretorische Granula (sG) vorhanden. Die Zellen haben eine isoprismatische Gestalt. Organellen, z.B. granuliertes endoplasmatisches Retikulum (rER) und Mitochondrien sind zahlreich vorhanden. Zellkern (Zk).

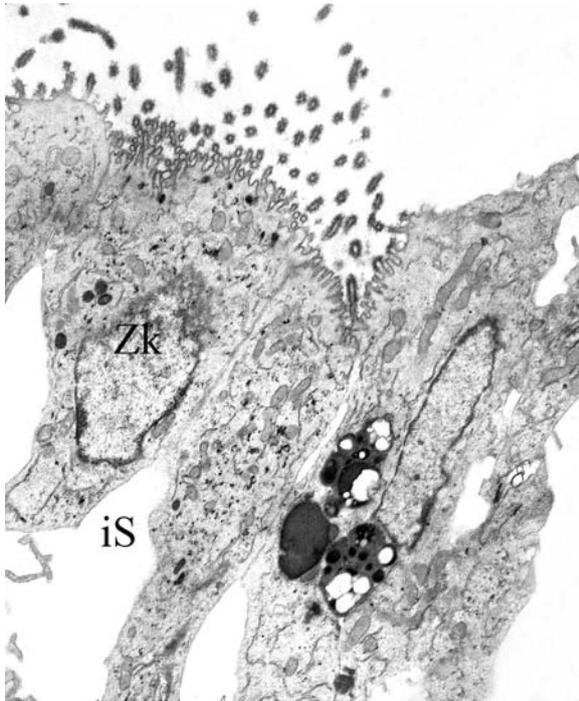


Abb. 121: Kulturtag 7, benachbarte Zellen einer Sphäroide. Die Zellen haben eine hochprismatische Form. Im oberen Drittel sind sie miteinander adaptiert, während basal die Interzellularräume (iS) erweitert sind. Zellkern (Zk).

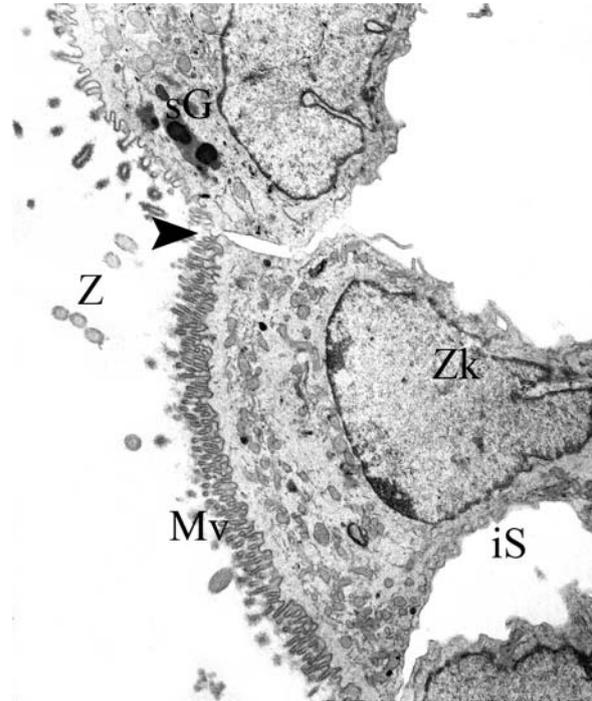


Abb. 122: Kulturtag 10, Zellen einer Sphäroide. Lediglich die apikal gelegenen „tight junctions“ (Pfeilspitze) halten benachbarte Zellen zusammen. Die Interzellularräume (iS) sind stark erweitert. Zellkern (Zk), sekretorische Granula (sG), Mikrovilli (Mv).

Ab dem 3. Kulturtag bilden die Zellen, insbesondere im basalen Zytoplasma, Vakuolen aus. Am 7. Kulturtag wirken die basalen Anteile der Zellen bereits löchrig oder zerrissen. Die basal gelegenen Vakuolen scheinen vermehrt ab dem 7. Tag mit dem zentral gelegenen Hohlraum der Sphäroiden zu fusionieren. Am 10. Kulturtag sind die intrazellulären Vakuolen am größten. Die Sphäroiden bilden während der Kultur keine Basalmembran aus.

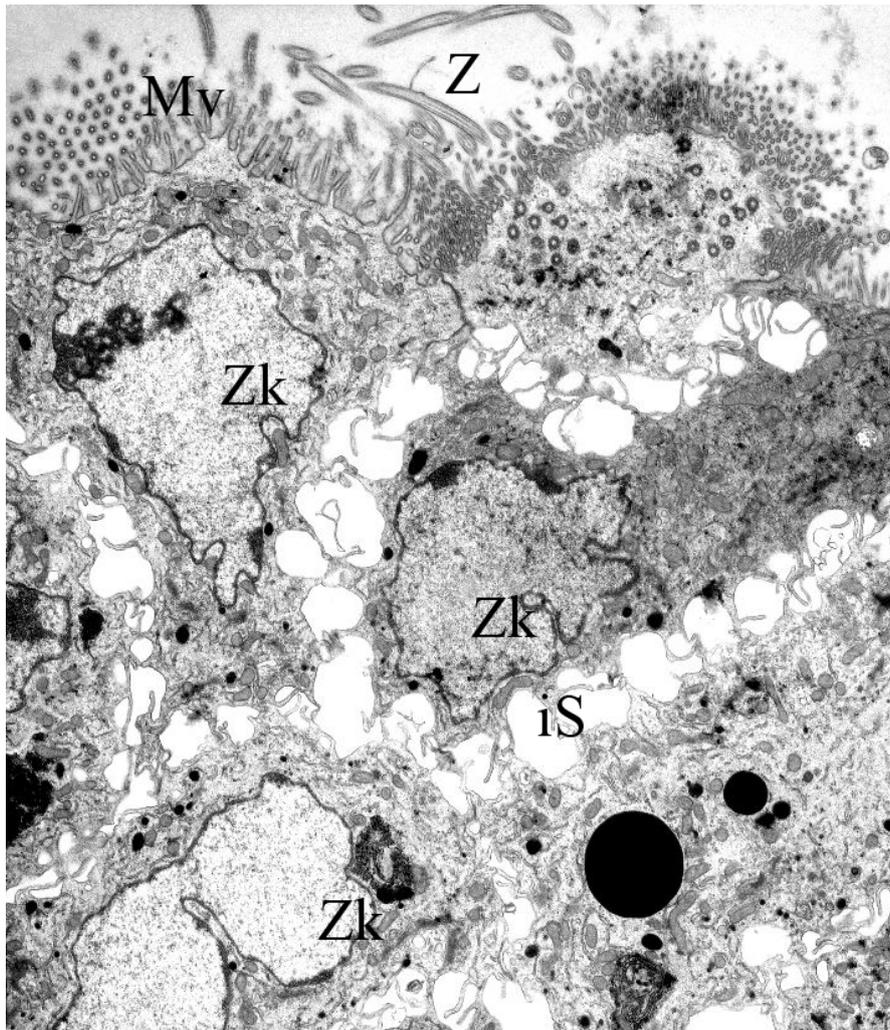


Abb. 123: Kulturtag 10, polarisierte Sphäroide mit großen interzellulären Spalträumen (iS). Zilienbesatz (Z) und Mikrovilli (Mv) sind vorhanden. Das Zytoplasma ist organellenreich. Die Zellkerne (Zk) sind euchromatisch.

Zellorganellen sind an allen untersuchten Kulturtagen weitestgehend unvermindert vorhanden und zeigen keine Anzeichen von Degeneration. Während die zilientragenden Zellen besonders in apikalen Zytoplasmabereichen viele Mitochondrien aufweisen, enthalten die sekretorischen Zellen vor allem rER. Dieses weist bei den einzelnen sekretorischen Zellen unterschiedliche Grade der Dilatation auf, die nicht von der Kulturzeit abhängen.

Der Golgi-Apparat ist auch am 7. Kulturtag noch nachweisbar. Seine Größe während der Kultur ist nicht festzustellen.

Die sekretorischen und zilientragenden Zellen können anhand ihrer Organellen und der Dichte des Zytoplasmas bis zum 10. Kulturtag eindeutig differenziert werden.

Die Kerne der kultivierten Zellen sind größtenteils euchromatisch und enthalten jeweils nur einen bis zwei kleinere heterochromatische Bezirke. Diese liegen häufig der Kernmembran an. Die Kernmembran ist intakt und weist auffallend viele Invaginationen auf.

Sekretorische Granula sind am ersten Kulturtag in Ansammlungen unter der apikalen Zellmembran vorhanden. Auch am 3. Kulturtag findet man zahlreiche Granula im apikalen Zytoplasma. Sie sammeln sich aber nicht direkt an der apikalen Membran an.

Ab dem fünften Tag der Sphäroidkultur sind sekretorische Granula im Vergleich zum Eileiter-epithel ex vivo stark vermindert. Insbesondere eine Ansammlung in apikalen Zellbereichen kann nicht beobachtet werden. „Digiprints“ sind lediglich am Anfang der Kultur (Tag 1) zu finden. Eine Exozytose ist in den vorliegenden Anschnitten an keinem Tag der Kultur zu beobachten. Am 10. Kulturtag sind lediglich vereinzelte sekretorische Granula im Zytoplasma vorhanden. Diese Granula erscheinen weniger dicht als am Tag 1 und 3 der Kultur.

Eine Besonderheit ist das Vorkommen von intrazellulären Vesikeln bzw. Granula, die von einer sehr dicken und elektronendichten Membran umgeben sind. Innen erscheinen diese Granula sehr hell, selten werden sie von ebenfalls elektronendichten Membranen strukturiert. Am Tag 7 der Kultur ist die Präsenz dieser Strukturen besonders ausgeprägt. Sie können nur in sekretorischen Zellen beobachtet werden und sind oft in der Nähe von Ansammlungen des rER und Mitochondrien lokalisiert.

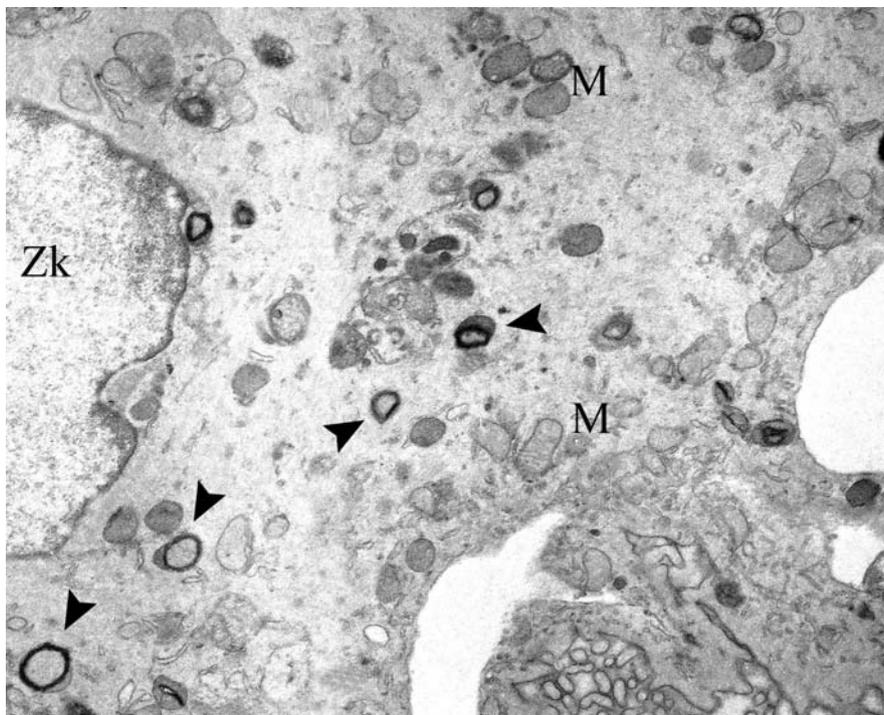


Abb. 124: Kulturtag 7. Atypische, membranumgrenzte Granula im Zytoplasma einer sekretorischen Zelle (Pfeilspitzen). Mitochondrien (M), Zellkern (ZK).

Wie bei der Darstellung der Ultrastruktur des Eileiters bereits beschrieben wurde, sind auch in den Kulturzellen Zellfragmente über der apikalen Oberfläche vorhanden, die Zilien enthalten.

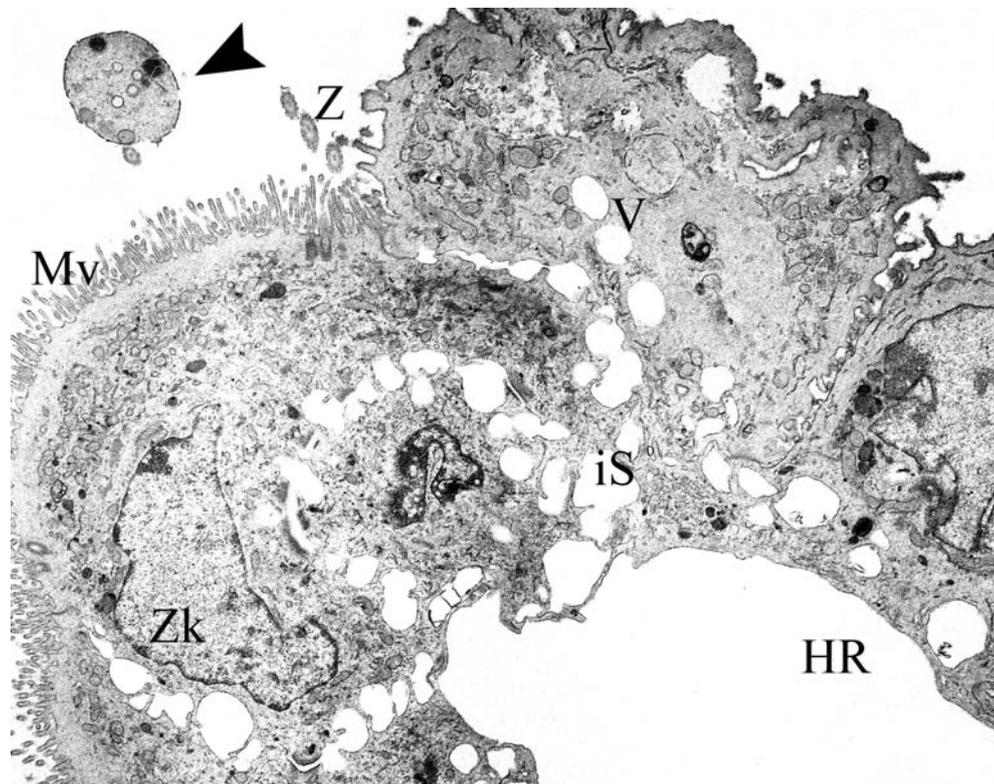
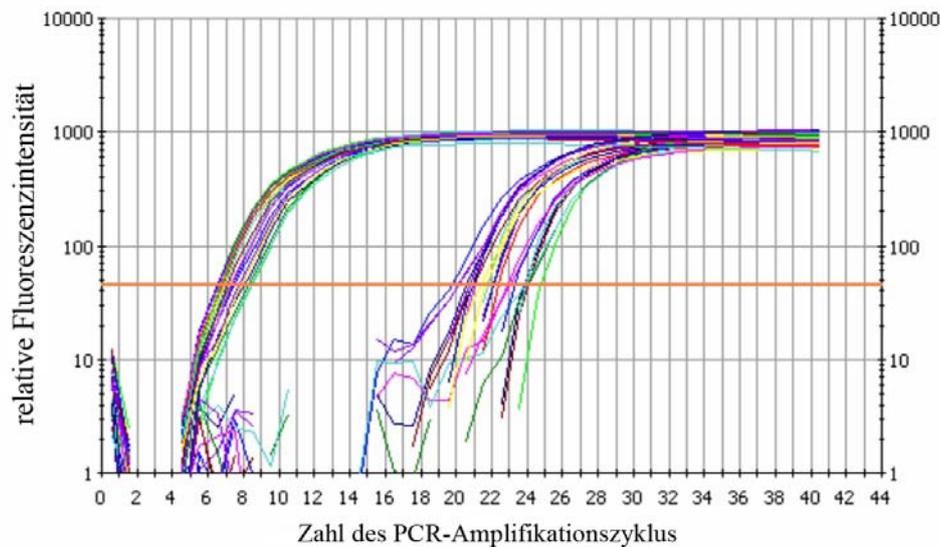


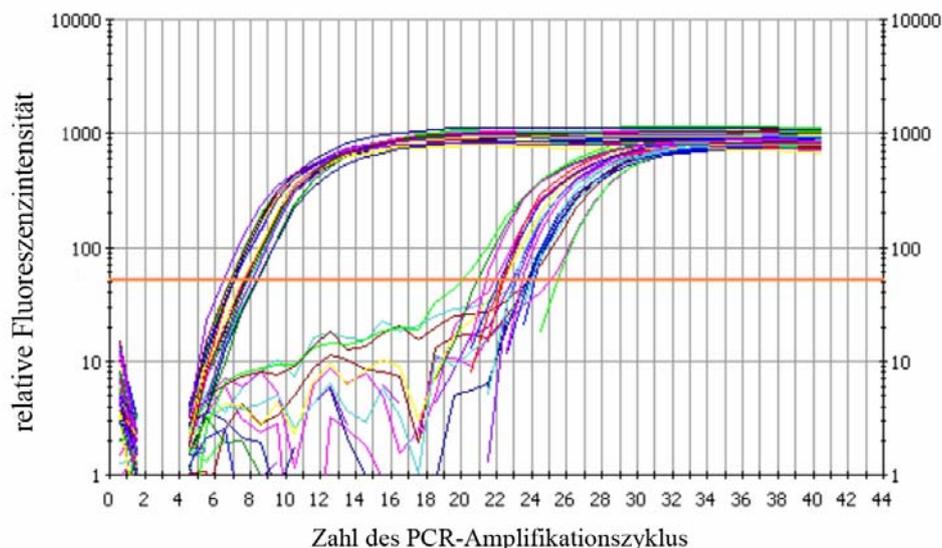
Abb. 125: Kulturtag 7. Über der apikalen Zellmembran befindet sich ein membranumgrenztes Zellfragment, das Anschnitte von Zilien enthält (Pfeil). Im basalen Zytoplasma sind Vakuolen (V) vorhanden. Es sind ein zentraler Hohlraum (HR) und interzelluläre Spalten (iS) ausgebildet.

## 4.2.6 Relative Quantifizierung der ER $\alpha$ und PR Expression (real-time RT-PCR)

Während der real-time RT-PCR wurden die Amplifikationskurven des ER $\alpha$  und des PR sowie des Referenzgens 18s anhand der Fluoreszenzemission auf einem Monitor dargestellt.



Graphik 13: Original - Amplifikationskurven des ER $\alpha$  (rechts) und des Referenzgens 18s (links). Logarithmische Darstellung. Auf der x-Achse sind die Anzahlen der abgelaufenen PCR-Amplifikationszyklen dargestellt, auf der y-Achse ist die relative Fluoreszenzintensität (RFU) der Amplifikate aufgetragen. Der Schwellenwert liegt bei ca. 50 RFU. Die 18s-Amplifikate überschreiten den Schwellenwert ungefähr beim 6. - 8. Zyklus. Die Zielgenamplifikate (ER $\alpha$ ) überschreiten den Schwellenwert ungefähr beim 21. - 26. Zyklus.



Graphik 14: Original - Amplifikationskurven des PR (rechts) und des Referenzgens 18s (links). Logarithmische Darstellung. Auf der x-Achse sind die Anzahlen der abgelaufenen PCR-Amplifikationszyklen dargestellt, auf der y-Achse ist die relative Fluoreszenzintensität (RFU) der Amplifikate aufgetragen. Der Schwellenwert liegt bei ca. 50 RFU. Die 18s-Amplifikate überschreiten den Schwellenwert ungefähr beim 5. - 8. Zyklus. Die Zielgenamplifikate (PR) überschreiten den Schwellenwert ungefähr beim 20. - 25. Zyklus.

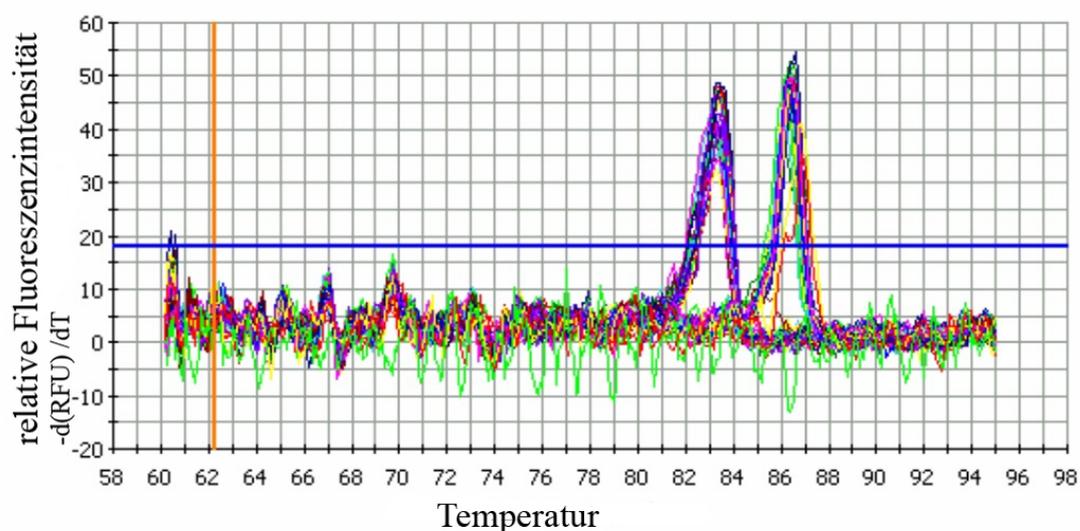
Die PCR-Reaktionen werden als Dreifachansätze („triplets“) durchgeführt. Vom iCycler-Programm werden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Schwellenwertzyklen von den drei Ansätzen einer Proben bestimmt (siehe Anhang).

Der Schwellenwert wird ungefähr nach 6-8 Zyklen vom Amplifikat des Referenzgens 18s und nach ca. 21-26 Zyklen für das Östrogenrezeptor  $\alpha$  Amplifikat überschritten. Beim mRNA-Nachweis des Progesteronrezeptors werden die Schwellenwerte nach 5-8 Zyklen vom Amplifikat des Referenzgens 18s und nach 20-25 Zyklen für das Amplifikat des PR überschritten. Die genauen Werte der beiden Amplifikate von jeder Probe werden ins Verhältnis gesetzt, und es kann ein durchschnittlicher normalisierter Expressionswert berechnet werden.

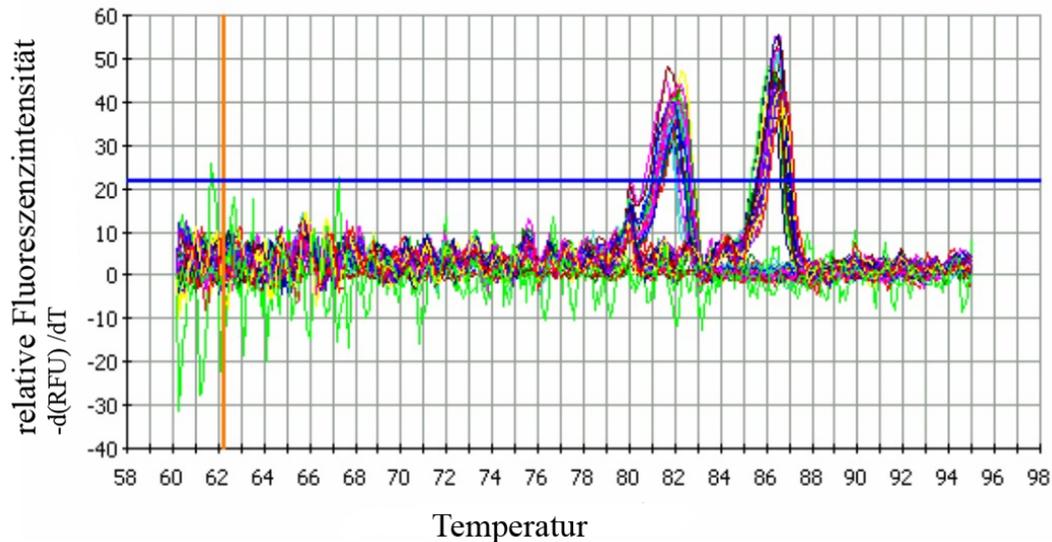
Die Negativkontrollen ohne Probenmaterial (NTC) und die durchgeführte RT-minus Kontrolle zeigen keine signifikante Kontamination mit DNA an, die z.B. im Probenmaterial vorhanden gewesen wäre oder durch Pipettierfehler während des Versuchsablaufs hätte geschehen können.

Im Anschluss an die real-time PCR wurden Schmelzkurvenanalysen durchgeführt.

Dadurch wird die Spezifität des PCR-Produkts und somit die Spezifität des Primers überprüft. Für jedes Amplifikat ist ein eindeutiger, spezifischer Schmelzpunkt von 83,5 °C für den ER $\alpha$  (Graphik 15) und von 82 °C für den PR (Graphik 16) vorhanden.



Graphik 15: Thermoprotokoll der Schmelzkurvenanalyse vom ER $\alpha$ -Amplifikat (links) und vom Amplifikat des Referenzgens 18s (rechts). Auf der x-Achse ist die Temperatur auf der y-Achse ist die Fluoreszenzintensität aufgetragen. Die Schmelzkurve des ER $\alpha$ -Amplifikats (links) zeigt einen steilen Verlauf und einen deutlichen Schmelzpunkt bei 83,3 °C.



Graphik 16: Thermoprotokoll der Schmelzkurvenanalyse vom PR-Amplifikat (links) und vom Amplifikat des Referenzgens 18s (rechts). Auf der x-Achse ist die Temperatur auf der y-Achse ist die Fluoreszenzintensität aufgetragen. Die Schmelzkurve des PR-Amplifikats (links) zeigt einen steilen Verlauf und einen deutlichen Schmelzpunkt bei 82 °C.

#### Auswertung der durchschnittlichen normalisierten Expression der Östrogenrezeptor $\alpha$ mRNA:

(Tabelle mit Rechnungen siehe Anhang)

In den Zellen aus Ampulla und Isthmus nimmt die Expression des Östrogenrezeptor  $\alpha$  vom Moment der Isolierung bis zum 3. Kulturtag ab (im Isthmus um 70 %, in der Ampulla um 60 %). Sowohl das isolierte Material der Isthmuszellen als auch das der Ampullazellen am Tag 0 weist eine ca. 90 % höhere Expression auf als die entsprechenden Kulturzellen am 1. Kulturtag.

Die Expression nimmt in den Zellen der Ampulla bis zum 3. Kulturtag um 30 % zu, die der Isthmuszellen ist nahezu gleich bleibend (7 % Anstieg).

Die Expression des ER $\alpha$  ist in den Zellen aus dem Isthmus zum Zeitpunkt der Isolierung ca. 50 %, am Tag 1 ca. 60 % und am Tag 3 ca. 35 % stärker als in der Ampulla.

Die Expression des ER $\alpha$  ist in den Ampullazellen deutlich höher, wenn kein Östrogen supplementiert wurde. Am 1. Kulturtag zeigen die Zellen ohne Östrogenzugabe eine mehr als doppelt so hohe (2,3 fach) und am 3. Kulturtag eine dreimal so starke Expression des Östrogenrezeptor  $\alpha$  wie die Zellen mit Östrogenzugabe.

Auswertung der durchschnittlichen normalisierten Expression der Progesteronrezeptor mRNA:  
(Tabelle mit Rechnungen siehe Anhang)

Die Expression der mRNA vom Progesteronrezeptor steigt während der Kultur sowohl in den Isthmus- als auch in den Ampullazellen um das Dreifache an. Dabei steigt die Expression bis zum 1. Kulturtag in der Ampulla nicht, im Isthmus aber um 70 % im Vergleich zum Tag der Isolation an. In der Ampulla steigt die Expression der PR mRNA erst nach dem 3. Kulturtag an. Im Isthmus ist sie am 3. Tag 80 % höher als am ersten Kulturtag.

Der PR wird in den Isthmuszellen stärker exprimiert als in den Zellen der Ampulla. Zum Zeitpunkt der Isolation ist die Expression in den Isthmuszellen um ca. 30 %, am Tag 1 um ca. das Doppelte (2,2 fache) und am Tag 3 um ca. 40 % höher als in den Ampullazellen.

Ohne eine Östrogensupplementierung ist die Rezeptorexpression in der Ampullaepithelzellkultur am Tag 1 doppelt und am Tag 3 fast 3 mal so hoch wie mit Östrogenzugabe. Die Expression des PR steigt aber auch bei den Zellen die mit Östrogen supplementiert wurden vom Tag 1 bis zum Tag 3 auf das Doppelte an.

### Expression von PR und ER $\alpha$ im Kulturverlauf

**Tabelle 29: Werte der durchschnittlichen, normalisierten Expression von ER $\alpha$  und PR**

Zeitpunkt der Entnahme	Isthmuszellen		Ampullazellen		Ampullazellen mit Östrogenzugabe	
	PR	ER $\alpha$	PR	ER $\alpha$	PR	ER $\alpha$
<b>Isolat</b>	$2,3 \times 10^{-5}$	$13,6 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-5}$	$9,1 \times 10^{-5}$	----	----
<b>Tag 1</b>	$4,0 \times 10^{-5}$	$7,2 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-5}$	$4,6 \times 10^{-5}$	$0,9 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-5}$
<b>Tag 3</b>	$7,1 \times 10^{-5}$	$7,8 \times 10^{-5}$	$5,3 \times 10^{-5}$	$5,8 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-5}$

(Aus den relativ quantifizierten Expressionswerten der jeweiligen Dreifachansätze einer Probe wurde ein Durchschnittswert gebildet.)

Die mRNA-Expression des ER $\alpha$  hat in den drei verschiedenen Ansätzen eine fallende Tendenz, während die Expression des PR eine steigende Tendenz über die Kulturzeit aufweist. Auch bei den mit Östrogen supplementierten Zellen ist die mRNA-Expression des ER $\alpha$  anfangs höher und nimmt bis zum 3. Tag ab. Die Expression der PR mRNA hingegen nimmt bis zum 3. Tag der Kultur zu.

## 5 Diskussion

Die erste Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich mit den morphologischen Veränderungen des bovinen Eileiters im Zyklusverlauf. Der Schwerpunkt der Untersuchungen wurde dabei auf das Epithel gelegt, um Grundlagen für die Etablierung und Beurteilung der späteren Eileiter-epithelzellkultur zu schaffen. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Suspensionskultur der bovinen Eileiter-epithelzellen untersucht und die kultivierten Zellen morphologisch charakterisiert.

### 5.1 Der bovine Eileiter im Zyklusverlauf

Die Untersuchungen wurden am Isthmus und der Ampulla des Eileiters durchgeführt. Die beiden untersuchten Abschnitte wiesen zilientragende und sekretorische Zellen zu gleichen Anteilen auf. Im Epithel wechseln sich die Zellen gleichmäßig ab.

Während beim Menschen, beim Affen und anderen Spezies lokale Unterschiede in den Anteilen zilientragender und sekretorischer Zellen im Epithel der einzelnen Abschnitte vorhanden sind (Lyons et al., 2002; Odor und Augustine, 1995; Patek et al., 1972b), kann dies hier beim Rind nicht bestätigt werden.

Beim Hund sind die Zilien im Isthmus überhaupt nur vereinzelt ausgebildet (Nilsson, 1969). In Übereinstimmung mit Lombard (1950) sind sowohl im Isthmus als auch in der Ampulla des Rindes gleiche Anteile von zilientragenden und sekretorischen Zellen vorhanden. Nach meinen Untersuchungen sind beim Rind die Zilien im Isthmus ca. 2  $\mu\text{m}$  länger als in der Ampulla. Dies ist bisher nicht beschrieben worden.

Während Yaniz (2000) beim Rind vermehrt Zilien in apikalen und lateralen Faltenbereichen findet, bestehen nach eigenen Beobachtungen vor allem die basalen Bereiche zwischen zwei Falten fast ausschließlich aus zilientragenden Zellen.

Des Weiteren beschreibt Yaniz (2000) eine Abnahme der sekretorischen Zellen in den kaudalen Abschnitten des Eileiters. Dies konnte ich in meinen Untersuchungen nicht bestätigen; vielmehr sind in beiden Segmenten etwa gleiche Anteile beider Epithelzellarten vorhanden. Im Bereich des Isthmus verändert sich die Lage der Kerne der sekretorischen Zellen im Zyklusverlauf nicht. Deshalb sind in diesem Segment zilientragende und sekretorische Zellen besonders eindeutig zu differenzieren. Es zeigt sich auch ganz deutlich, dass immer eine sekretorische Zelle neben einer zilientragenden Zelle liegt. So entsteht eine gleichmäßige Anordnung und eine Aufteilung von 50 % zilientragenden Zellen und 50 % sekretorischen Zellen. Diese

Ergebnisse konnten anhand der Periodic-Acid-Schiff (PAS) Reaktion, der Alzianblaufärbung und immunhistochemischer (IHC) Nachweise mit dem Antikörpern gegen S100 und ChromograninA nachgewiesen werden.

Der S100 Antikörper reagiert mit beiden Zelltypen des Eileiterepithels, die Färbung ist aber unterschiedlich intensiv. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Walter und Miller (1996) konnte ich zeigen, dass die beiden Epithelzelltypen in Isthmus und Ampulla unterschiedlich reagieren. Während im Isthmus die zilientragenden Zellen eine deutlich positive Reaktion (++) mit dem S100 Antikörper aufweisen, sind in der Ampulla die sekretorischen Zellen und insbesondere die Protrusionen intensiver gefärbt. Nach eigenen Untersuchungen sind die sekretorischen Zellen im Isthmus schwach gefärbt (+), während Walter und Miller (1996) sie als negativ beschreiben.

ChromograninA ist hingegen ein sehr guter Marker für die zilientragenden Zellen (Steffl et al., 2003; Steffl et al., 2004). In immunhistochemischen Untersuchungen hat sich bei unserem Material allerdings herausgestellt, dass die Anfertigung der histologischen Schnitte auf Objektträgern möglichst erst kurz vor Versuchsbeginn erfolgen sollte.

Mit älteren Präparaten (einige Monate alt) konnte keine konstante, spezifische Färbung der apikalen Zellpole zilientragender Zellen erreicht werden. Allerdings ist anzumerken, dass in meinen Untersuchungen eine Bouin-Fixierung verwendet wurde, während Steffl et al. (2003) Methanol-Eisessig für die Fixation benutzt haben.

Die sekretorischen Epithelzellen der Ampulla zeigen das Phänomen der Protrusionsbildung, welches beim Rind bereits von verschiedenen Autoren (Björkman, 1959; Lombard, 1950; Schmidt-Barth, 1981) beschrieben wurde. Nach eigenen Untersuchungen kommen unterschiedliche Arten von Protrusionen in den verschiedenen Zyklusstadien vor. Während ich die kernhaltigen Protrusionen im Diöstrus und Proöstrus nachweisen konnte, beschreibt Björkman (1959) sie allgemein in der lutealen Phase. Die hier untersuchten Protrusionen des Metöstrus sind jedoch nicht kernhaltig, sondern enthalten sekretorische Granula. Diese Art der Vorwölbung beschreiben Björkman und Fredricsson (1961) hingegen in der folliculären Phase. In diese Phase wäre auch der Östrus einzuordnen, in dem ich jedoch eine ebene epitheliale Oberfläche vorgefunden habe. Auch Mc Daniel et al. (1968) beschreiben die Vorwölbungen der sekretorischen Zellen unter Östrogenstimulation.

Das Vorkommen von Zellorganellen in den Protrusionen ist nach eigenen Beobachtungen vor allem in den kernhaltigen Protrusionen gegeben. Dabei handelt es sich nicht um eine eigenständige Protrusionsform, wie Schmidt-Barth (1981) es beschreibt.

Über die Funktion der Protrusionen findet man kaum weitere Angaben in der Literatur. Die sekretorischen Zellen nehmen durch ihre sich nach apikal verjüngende Form einen relativ geringen Anteil an der epithelialen Oberfläche ein. Deshalb liegt es nahe, dass die Funktion der Protrusionen im Metöstrus eine Vergrößerung der sekretorisch aktiven Oberfläche sein könnte. In dieser Zyklusphase passiert der Embryo den Eileiter (Eriksen et al., 1994). Es ist daher nahe liegend, dass im Metöstrus die stärkste sekretorische Aktivität im Epithel zu verzeichnen ist, was anhand der Ansammlung dichter Granula im apikalen Zytoplasma verdeutlicht wird.

In Übereinstimmung mit Lombard (1950) sind die Protrusionen besonders im späten Diöstrus oft nur über schmale Zytoplasmaverbindungen mit dem unterlagernden Epithel verbunden. Während er jedoch die enthaltenen Kerne als pyknotisch einstuft, konnte ich keine Degenerationsmerkmale an den Kernen feststellen. Eriksen et al. (1994) deuten die Protrusionsbildung als einen Vorgang, der mit der Zellerneuerung in Verbindung steht. Nach eigenen Untersuchungen deutet nichts auf einen Zelluntergang hin. Erstaunlich ist allerdings, dass die Kerne bzw. die Zellanteile sehr weit aus dem Epithel herausverlagert werden. Der immunhistochemische Nachweis mit dem Antikörper gegen Caspase-3 fiel im Eileiterepithel gänzlich negativ aus, so dass eine Apoptose dieser vorgelagerten Kerne sehr unwahrscheinlich ist. Lombard (1950) beschreibt im Proöstrus ebenfalls frei im Lumen vorkommende Zellen und granuläres Material. Dieses Phänomen kann ich bestätigen. Es handelt sich meiner Meinung nach um Protrusionen, deren dünne, zytoplasmatische Verbindung zum unterlagernden Epithel nicht angeschnitten ist. Allerdings kommen im späten Diöstrus und im Proöstrus gehäuft solche scheinbar freien Vesikel in den basalen Regionen zwischen zwei Falten vor. Es wäre denkbar, dass tatsächlich losgelöste Zellfragmente vorkommen, die insbesondere in diesen Bereichen bei der Präparation nicht herausgelöst werden.

Die Eileiterepithelzellen sind nur vereinzelt Ki-67 positiv. Wenn diese kernhaltigen Protrusionen im Diöstrus ein Anzeichen für eine Epitheldesquamation wären, wie Mc Daniel et al. (1968) postulieren, müsste eine Epithelregeneration festzustellen sein. Insbesondere im Diöstrus oder Proöstrus müsste dann ein größerer Anteil Zellen mitotisch aktiv sein. Neben den wenigen Ki-67 positiven Zellen, die nach eigenen Untersuchungen im Eileiter des Rindes vorhanden sind, sind in Übereinstimmung mit Woodruff und Pauerstein (1969) kaum Mitosen zu verzeichnen. Dies spricht gegen die Hypothese der Zellausstoßung aufgrund von Epithelregeneration im Diöstrus.

Beim Schwein werden allerdings Mitosen im Eileiterepithel beschrieben, deren Anzahl vom Zyklusstand beeinflusst zu sein scheint (Steffl et al., 2004). Nach dieser Studie ist im Proöstrus die höchste Mitoserate zu verzeichnen. In eigenen Untersuchungen gibt es interessanterweise eine Probe, die aus dem Proöstrus stammt und bei der sehr viele Mitosen zu verzeichnen sind. Es wäre denkbar, dass beim Rind die Epithelregeneration zu einem ganz bestimmten Zeitpunkt im Proöstrus stattfindet, an dem wir keine Proben gewonnen haben. Weiter scheint es möglich, dass die Epithelerneuerung im Eileiter einer zirkadianen Rhythmik unterliegt. Fänden vermehrt Mitosen am Abend oder in der Nacht statt, könnten diese zum Schlachtzeitpunkt nicht mehr identifiziert werden.

Abe und Oikawa (1989) beschreiben beim neonatalen Hamster Zellteilungen von undifferenzierten Zellen im Eileiter nur bis zum 10. Lebenstag. Auch bei adulten Ratten wird beschrieben, dass keine Mitosen in den Epithelzellen zu verzeichnen sind (Shirley und Reeder, 1996).

Entgegen verschiedener Ergebnisse beim Mensch (Donnez et al., 1983; Nilsson, 1969), beim Hund (Sawyer et al., 1984; Verhage et al., 1973a) und beim Pavian (Odor und Augustine, 1995) konnten in den eigenen Untersuchungen beim Rind in Übereinstimmung mit Lombard (1950), Björkman und Fredricsson (1961) und Walter und Miller (1996) keine zyklischen Veränderungen in der Anzahl der zilientragenden und der sekretorischen Zellen festgestellt werden. Beide Zellarten liegen in allen untersuchten Zyklusstadien in etwa gleicher Anzahl vor. In der Ampulla gibt es Unterschiede in der äußeren Zellmorphologie, die es erschweren, die Zellen sicher zu differenzieren. Vor allem die Protrusionsbildung spielt dabei eine entscheidende Rolle. Die Protrusionen reichen in ihrer Ausdehnung nach luminal über die apikalen Zilienpole hinweg und komprimieren die Zilienbüschel. Dadurch entsteht der Eindruck, dass im Diöstrus und Proöstrus weniger Zilien vorhanden sind als im Östrus und Metöstrus. In Rasterelektronenmikroskopischen (SEM) Untersuchungen kann man in den betreffenden Stadien die Zilien kaum sehen, da sie von den ballonartigen Vorwölbungen verdeckt werden. Abe und Oikawa (1993a) vermuteten beim Rind bereits einen Zusammenhang zwischen der Verminderung der Epithelhöhe der zilientragenden Zellen in der lutealen Phase und der verminderten Anzahl von Zilien an der Oberfläche. Nach eigenen Untersuchungen werden die Zilien aber nicht abgestoßen, wie von Abe und Oikawa (1993a) postuliert, sondern wie oben beschrieben durch die Vorwölbung der sekretorischen Zellen nur verdeckt.

Abe selbst ergänzte in einer Veröffentlichung über den Eileiter bei der Ziege (Abe et al., 1999) die von ihm mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops (SEM) erzielten Ergebnisse (Abe et al., 1993a). Während er 1993 mittels SEM eine Veränderung des Zilienbesatzes beim Eileiter der

Ziege im Zyklusverlauf feststellte, konnte er 1999 diese Ergebnisse mittels TEM nicht bestätigen. Aufgrund der weit ins Lumen vorgewölbten Protrusionen sind auch seiner Meinung nach die Zilien verdeckt und von der Oberfläche aus nicht zu erkennen.

Beim Hund verändert sich der Anteil zilientragender Zellen im Epithel von ca. 60 % im Östrus auf ca. 20 % im Metöstrus. Im Anöstrus beträgt die Zahl der zilientragenden Zellen nur noch ca. 1 %. Der Hund hat jedoch eine sehr lange Zyklusdauer mit einer langen anöstrischen Phase. Deshalb können beide Spezies nur schwer miteinander verglichen werden. Weiterhin wurde beim Hund elektronenmikroskopisch Ziliogenese in der folliculären Phase nachgewiesen (Verhage et al., 1973 b), die wir beim Rind nicht finden konnten. Abughrien und Dore (2000) finden jedoch in elektronenmikroskopischen Untersuchungen beim adulten Rind deutliche Ziliogenese in der folliculären Phase. Der Anteil zilientragender Zellen sinkt nach deren Angaben bis zum Zyklustag 7 um ca. 15 %. Eine 2. Versuchsgruppe wurde mit Östrogen supplementiert. Die Anzahl zilientragender Zellen war in dieser Gruppe am Tag 1 des Hormonzyklus um ca. 3 % größer als in der Kontrollgruppe. Damit wiesen sie einen Zusammenhang zwischen Östrogen und der Ziliogenese nach. In eigenen Untersuchungen wurde im Östrus keine Ziliogenese beobachtet. Die Anzahl der zilientragenden Zellen wurde mittels lichtmikroskopischer Auszählung bestimmt und nicht wie bei Abughrien und Dore (2000) mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Nach meinen Untersuchungen reicht die mit TEM in einer Probe vorhandene bzw. im richtigen Anschnitt vorhandene Zellzahl nicht aus, um die quantitativen Verhältnisse der Zelltypen im Eileiter richtig beurteilen zu können. Allerdings ist einzuräumen, dass die Bestimmung, ob eine Zelle zilientragend ist oder nicht in der Lichtmikroskopie etwas größeren Fehlern unterworfen ist.

Die in der Literatur zu findenden Angaben zum Vorkommen und den zyklischen Veränderungen des Zilienbesatzes im bovinen Eileiter sind unterschiedlich. Auf der einen Seite wird von einem Zilienverlust gesprochen auf der anderen von einer Veränderung der Anzahl zilientragender Zellen. Dabei ist es schwierig herauszufinden, wie eine ehemals zilientragende Zelle ohne Zilien einzuordnen ist. Die Nomenklatur ist ebenfalls nicht einheitlich. Während in älterer Literatur von nichtzilientragenden Zellen gesprochen wird, entsprechen diese in der neueren Literatur den sekretorischen Zellen. Ob eine nichtzilientragende Zelle grundsätzlich sekretorische Funktion hat, oder ob es sich um eine zilientragende Zelle mit zeitweiligem Zilienverlust handelt, bleibt dabei ungeklärt. Des Weiteren müsste man sicherstellen, dass bei einem Zilienverlust, wie er in der Literatur beschrieben wird, tatsächlich alle Zilien einer Zelle betroffen sind oder nur einzelne Zilien abgeworfen werden.

Weiter stellt sich nun die in der bisherigen Literatur kontrovers diskutierte Frage, ob es sich bei den Eileiterepithelzellen um zwei verschiedene Zellpopulationen handelt oder sich zilientragende Zellen in sekretorische umwandeln können.

Abe und Oikawa (1993b) beschreiben Ziliogenese in sekretorischen Zellen unter Östrogenstimulation. Odor und Augustine (1995) finden sekretorische Granula in zilientragenden Zellen. Beide vertreten die Theorie, dass diese zwei verschiedenen Zellarten sich ineinander umwandeln können. Es konnten in eigenen Untersuchungen keinerlei Anzeichen von Übergangsformen zwischen sekretorischen und zilientragenden Zellen gefunden werden. In Übereinstimmung mit Björkman und Fredricsson (1961) weisen beide Zellarten sehr große, eindeutige morphologische Unterschiede auf. Auch die Beobachtungen aus der Zellkultur lassen nicht den Schluß zu, dass sich die Zellen ineinander umwandeln können. Es sind zwar Anzeichen von Dedifferenzierung und Degeneration vorhanden, aber beide Zellarten lassen sich elektronenmikroskopisch weiterhin eindeutig differenzieren.

Bei der Ratte hingegen ist zyklusabhängig entweder die zilientragende Fraktion oder die sekretorische Fraktion im Eileiter dominant. Die zytoplasmatische Färbung beider Zelltypen ist gleich und es wird eine Umwandlung von sekretorischen in zilientragende Zellen und umgekehrt postuliert. Mitotische Aktivität hingegen wurde bei beiden Zelltypen nicht beobachtet (Shirley und Reeder, 1996).

Abe und Oikawa (1993b) finden nach Östrogenstimulation eine erhöhte Zellteilungsrate bei den sekretorischen Zellen. Nach eigenen Beobachtungen aus der Zellkultur konnte eine erhöhte Ki-67-Expression ab dem 7. Kulturtag festgestellt werden. Keine der MIB-1 positiven Zellen war jedoch zilientragend, obwohl ca. 30 % der Zellen in der Kultur zu diesem Zeitpunkt Zilien aufwiesen. Übereinstimmend mit dieser Feststellung finden Steffl et al. (2004) Mitosen am porcinen Eileiterepithel nur bei den nichtzilientragenden Zellen vor, die hauptsächlich in basalen Regionen der Falten lokalisiert sind. Auch in Untersuchungen am humanen (Comer et al., 1998a) und am neonatalen Eileiter des Hamster (Abe und Oikawa, 1993b) werden Mitosen nur in sekretorischen Zellen beschrieben. Allerdings wird auch in diesen Veröffentlichungen nicht zwischen sekretorischen und nicht-zilientragenden Zellen differenziert.

Ein interessantes Phänomen ist die Protrusionsbildung bei zilientragenden Zellen, die im Diöstrus vereinzelt an der apikalen Zelloberfläche vorkommt. Diese Protrusionen enthalten eindeutig Zilienanschnitte, die keinesfalls schnittbedingt sein können. Eine ähnliche Beobachtung machte Björkman bereits 1959 in seinen elektronenmikroskopischen Studien. Er fand freie Vesikel über der apikalen Oberfläche, die Zilien enthalten. Auch diese Form der membran-

umgrenzten Zellfragmente, die Zilien enthalten wird in eigenen Untersuchungen gefunden. Bei der Ratte wird dieses Phänomen bereits als Abwurf von Zilien (Deziliation) gedeutet. Die von Reeder und Shirley (1999) beschriebenen Zilienpakete gleichen den von mir beobachteten Zellfragmenten, die Zilien enthalten. Bei der Ratte wurden diese Zilienpakete am häufigsten im Proöstrus beobachtet. Die Zilien sollen dabei ihre eigene Membran verlieren (Reeder und Shirley, 1999). Sie unterliegen keiner Resorption, wie es z.B. beim Hund beschrieben wird (Sawyer et al., 1984), sondern werden von der Zelle abgeschnürt. Es wird angenommen, dass diese Form des Zilienverlustes bei der Ratte aufgrund der besonders kurzen Zyklusdauer vorkommt (Reeder und Shirley, 1999). Eine besonders schnelle De- und Reziliation bei der Ratte wurde von Shirley und Reeder (1996) schon früher postuliert.

Die aus den eigenen Beobachtungen beschriebenen Protrusionen der zilientragenden Zellen beinhalten immer nur einen Teil der Zilien einer Zelle. Größere Teile der apikalen Zelloberfläche sind nicht in die Vorwölbungen einbezogen und weisen weiterhin Zilien auf. So wäre es also möglich, dass nur ein Teil der Zilien einer Zelle regeneriert wird. Diese Vermutung würde erklären, warum in der Lichtmikroskopie solche Zellen mit partiellem Zilienverlust weiterhin zu den zilientragenden Zellen gerechnet werden.

Ob diese Protrusionen mit den darin enthaltenen Zilien tatsächlich von der Zelle abgetrennt werden, ist nicht mit letzter Sicherheit nachzuweisen. Die Tatsache, dass diese Fragmente frei im Lumen schwimmen (Björkman, 1959) kann schnittbedingt sein. Es ist schwer vorstellbar, dass ein frei schwimmendes Vesikel nach der notwendigen Präparation für die TEM noch erhalten wäre. Nach dem elektronenmikroskopischen Bild, erscheint es jedoch sehr wahrscheinlich, dass dieses Phänomen auch beim Rind in Zusammenhang steht mit einem zumindest partiellen Zilienverlust bei einigen Zellen.

In der Ampulla ist das Epithel nach eigenen Untersuchungen im Östrus mit 38,8  $\mu\text{m}$  am höchsten. Die Höhe des Epithels sinkt bis zum Diöstrus auf 25,2  $\mu\text{m}$ , um dann im Proöstrus wieder auf 29  $\mu\text{m}$  anzusteigen. Zyklische Veränderungen der Epithelhöhe wurden auch von anderen Autoren gefunden (Lombard, 1950; Mc Daniel et al., 1968; Weeth und Herman, 1952). Auch Mc Daniel et al. (Mc Daniel et al., 1968) konnten nach Östrogenbehandlung der Versuchstiere das höchste Epithel verzeichnen. Progesterongaben bewirkten hingegen eine Verminderung der Epithelhöhe.

Ebenso ist bei der Ziege das Epithel in der lutealen Phase wesentlich flacher (Abe et al., 1999). Da im Östrus beim Rind der höchste Blutöstrogenspiegel vorliegt, kann man einen Zusammenhang zwischen diesem Hormon und der Höhenzunahme des Epithels postulieren.

Die Untersuchungen von Lombard (1950) ergaben insgesamt höhere Werte als meine Messungen. In der Ampulla konnte er im Östrus z.B. 45,3 µm Epithelhöhe messen, in Bereichen mit großer Anzahl an acidophilen Granula sogar 64 µm. Da es sich jedoch um Durchschnittswerte handelt und zudem die Meßmethode nicht standardisiert ist, kann man trotzdem von einem gleichen Trend sprechen.

Unterschiedlich zu meinen Ergebnissen sind jedoch die Messungen von Yaniz et al. (2000). Danach wird die maximale Epithelhöhe schon im Proöstrus erreicht und im Östrus sinken die Werte bereits wieder ab.

Wird die Zellhöhe bis zum apikalen Pol der Protrusionen gemessen sinkt der Wert vom Östrus von 38,8 µm nur auf 33,8 µm. Dies ist ein deutlicher Unterschied zu dem ermittelten Wert von 25,2 µm, den man erhält, wenn nur bis zum apikalen Pol der zilientragenden Zellen gemessen wird. Dies lässt den Schluss zu, dass sich die sekretorischen Zellen nicht vorwölben, sondern dass sich die zilientragenden Zellen zurückziehen, wie es Abe und Oikawa (1993a) bereits vermuteten.

Des Weiteren nehmen Weeth und Herman (1952) an, dass ein Zusammenhang zwischen der Epithelhöhe und der Sekretion besteht. Nach eigenen Untersuchungen ist die stärkste PAS-Reaktion und die größte Anzahl sekretorischer Granula im Metöstrus zu verzeichnen. Das Epithel ist jedoch bereits im Östrus am höchsten. In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (Björkman und Fredricsson, 1961; Nayak und Ellington, 1977; Urhin und Kliment, 1977) finden auch wir vermehrt dilatiertes endoplasmatisches Retikulum und Ribosomen im Östrus. Demnach nimmt das Epithel während der intensivsten Produktionsphase der sekretorischen Granula an Höhe zu, also im späten Proöstrus bis zum Östrus.

Im Östrus haben sich unter der apikalen Zellmembran bereits vermehrt sekretorische Granula angesammelt. Diese Granula haben stark unterschiedliche Größe, Form und Dichte, wie es bereits Abe et al. (1993b) beschreiben. Eine Exozytose der Sekretionsprodukte konnte zu diesem Zeitpunkt nicht beobachtet werden. Im Metöstrus ist die apikale Zellmembran vorgewölbt und die sekretorischen Granula sind in den Vorwölbungen enthalten. In diesem Stadium sind in Übereinstimmung mit (Lombard, 1950) die meisten sekretorischen Granula vorhanden. Abe et al. (1993b) beschreiben das maximale Vorkommen von sekretorischen Granula allerdings bereits in der folliculären Phase.

In Übereinstimmung mit Eriksen et al. (1994) konnte ich im Metöstrus Exozytose nachweisen. Die so genannten „digiprints“ liegen in direktem Kontakt mit der Zytoplasmamembran, entweder in den Protrusionen oder am apikalen Zellpol. In einigen Fällen ist das Verschmelzen dieser Granula mit der apikalen Zytoplasmamembran sehr deutlich. Es ist zu erkennen, dass

diese „digiprints“ ihren Inhalt ins Lumen abgeben. Selbst im Lumen ist der Inhalt der Granula teilweise noch zu identifizieren. Nach Björkman (1959) sowie Björkman und Fredricsson (1961) geben die sekretorischen Granula ihren Inhalt bereits in der folliculären Phase ans Lumen ab.

Die so genannten Stiftchenzellen, die in verschiedenen Arbeiten über den Eileiter erwähnt wurden, spielen nach eigenen Beobachtungen eine sehr untergeordnete Rolle. Außerdem gestaltete es sich schwierig, sie nach den bestehenden Literaturangaben als solche zu identifizieren. Dass es sich bei ihnen um eine Übergangsform zwischen zilientragenden und sekretorischen Zellen handelt (Verhage et al., 1973a), kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da in eigenen Beobachtungen jede Zellart eindeutige, morphologische Merkmale aufweist. Die als Stiftchenzellen interpretierten Zellen ähneln in ihrer Form und Färbung den sekretorischen Zellen, zumindest wenn diese in der Form ohne Protrusionen vorliegen. Die Stiftchenzellen weisen keine Zilien auf, was in Übereinstimmung mit Mc Daniel et al. (Mc Daniel et al., 1968) festgestellt wurde. Die Deutung als untergehende Epithelzelle (Hees, 1992) kann nicht ausgeschlossen werden, da wir die Stiftchenzellen gar nicht eindeutig identifizieren konnten.

Die basalen Zellen („Basalzellen“) sind im basalen Bereich des Epithels lokalisiert und entsprechen den Beschreibungen von Lombard (1950). Sie kommen in unregelmäßigen Abständen und Anzahlen in verschiedenen Faltenbereichen vor. Ca. 2-4 Zellen sind pro 100 Epithelzellen zu finden. Übereinstimmend mit den Aussagen von Björkman und Fredricsson (1961) sind sie nicht mit der Basalmembran verankert. Sie reagieren auch in eigenen Untersuchungen nicht mit den Antikörpern gegen Panzytokeratin und S100. Deshalb kann ein epithelialer Ursprung ausgeschlossen werden (Walter und Miller, 1996). Die „Basalzelle“ ist demnach als mobile Zelle anzusehen. Die Identifikation dieser Zellen als Leukozyten (Abughrien et al., 2000) scheint sehr plausibel. Es handelt sich bei den basalen Zellen vorwiegend um Lymphozyten, daneben sind auch einige intraepitheliale Makrophagen klonifiziert worden (Abughrien et al., 2000).

Der immunhistochemische (IHC) Nachweis des Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) fällt sowohl im Isthmus als auch in der Ampulla im Östrus am schwächsten aus. Im Metöstrus reagieren die Epithelzellkerne in beiden Abschnitten stärker positiv. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Ulbrich et al. (2003) überein, wo mittels Western-Blot das ER $\alpha$  Protein semiquantitativ bestimmt wurde. In Übereinstimmung mit Steffl et al. (2004), die die Ampulla des porcinen Ovidukts untersuchten, wird in der Ampulla die maximale Expression des Rezeptors im Pro-

östrus festgestellt. Eine Zunahme der ER $\alpha$  Expression wird auch beim Menschen (Amso et al., 1994) in der folliculären Phase beschrieben. Die stärkste immunhistochemische Reaktion wird in dieser Studie in der Mitte des Zyklus beobachtet. Dies trifft nach meinen Untersuchungen beim Rind für den Isthmus zu. In der Ampulla hingegen ist im Proöstrus die stärkste ER $\alpha$  Immunreaktion zu verzeichnen.

Beim Hund hingegen wurden in der Ampulla im frühen Metöstrus die schwächsten Immunfärbungen für ER $\alpha$  beobachtet (Vermeirsch et al., 2002). Ulbrich et al. (2003) fanden im bovinen Isthmus eine maximale mRNA-Expression für ER $\alpha$  in der folliculären Phase. Da die mRNA-Synthese in der Zelle der Proteinsynthese vorausgeht, sollte die mRNA Expression vor der Proteinexpression erhöht sein. Demnach korrelieren die PCR-Ergebnisse von Ulbrich et al. (2003) mit meinen immunhistochemischen Untersuchungen betreffend des ER $\alpha$ . Nach meinen immunhistochemischen Nachweisen wird der ER $\alpha$  in der Ampulla im Proöstrus und im Metöstrus stärker exprimiert als im Östrus und Diöstrus. Ulbrich et al. (2003) fanden hingegen eine gleich bleibende Expression der ER $\alpha$  mRNA in der Ampulla.

Nach meinen immunhistochemischen Untersuchungen ist die Expression des Progesteronrezeptors (PR) im Isthmus wesentlich stärker als in der Ampulla. In beiden Segmenten fällt die Immunreaktion im Diöstrus und Proöstrus schwächer aus als im Östrus und Metöstrus. Während jedoch in der Ampulla die maximale Immunreaktion auf den PR-Antikörper bereits im Östrus zu verzeichnen ist, liegt das Expressionsmaximum im Isthmus erst im Metöstrus vor. Diese Beobachtungen stimmen zumindest für das Isthmussegment mit den immunhistochemischen Ergebnissen von Ulbrich et al. (2003) überein, wonach die stärkste Farbintensität in der frühen lutealen Phase vorhanden ist. Mittels Western Blot wurden außerdem der PR-A und PR-B getrennt nachgewiesen. Demnach ist PR-A in der Ampulla und der PR-B im Isthmus in größerer Menge vorhanden. Der in eigenen immunhistochemischen Untersuchungen verwendete Antikörper gegen den PR unterscheidet nicht zwischen den Subtypen A und B.

Beim Hund hat die epitheliale PR Expression in der Ampulla bereits im Proöstrus ihr Maximum erreicht und sinkt bis zum Metöstrus und weiter bis zum Anöstrus ab (Vermeirsch et al., 2002).

Nach eigenen immunhistochemischen Untersuchungen ist die PR-Expression im Isthmus stärker als in der Ampulla. Mittels PCR weisen auch Ulbrich et al. (2003) eine stärkere mRNA-Expression des PR im Isthmus nach. Die stärkste Immunreaktion auf den PR-Antikörper konnte ich in der Ampulla im Östrus und im Isthmus im Metöstrus feststellen. Korrelierend mit meinen Ergebnissen weisen Ulbrich et al. (2003) die maximale mRNA-Expression des PR in

der folliculären Phase nach.

Ein starker Abfall der PR mRNA-Expression auf ein sehr niedriges Niveau in der frühen lutealen Phase, wie von (Ulbrich et al., 2003) mittels PCR festgestellt wurde, korreliert mit meinen immunhistochemischen Ergebnissen in der Ampulla. Im Isthmus ist die Expression des PR in der lutealen Phase nicht so stark vermindert.

In Übereinstimmung mit Vermeirsch et al. (2002) beim Hund ist nach meinen Untersuchungen die Färbeintensität beim immunhistochemischen Nachweis von beiden Rezeptoren (ER $\alpha$  und PR) in den Fibrozyten der Lamina propria am stärksten. Im Epithel ist allerdings ein höherer Anteil immunpositiver Zellen vorhanden. Die Reaktionsstärke der Kerne der zilientragenden Zellen ist dabei deutlich schwächer als die der sekretorischen Zellen. Auch bei Primaten ist der ER $\alpha$  vorwiegend in den sekretorischen Zellen lokalisiert (Brenner et al., 1990). Beim Schwein weisen die zilientragenden Zellen keine Reaktion mit dem Antikörper gegen den ER $\alpha$  auf (Steffl et al., 2004).

Bei der leichten zytoplasmatischen Färbung des ER $\alpha$  in der Tunica muscularis (Ulbrich et al., 2003) handelt es sich wahrscheinlich nur um eine Hintergrundfärbung. Diese fällt bei den immunhistochemischen Nachweisen der Rezeptoren in unseren Versuchen allgemein relativ stark aus, weil wir uns für eine längere Inkubationszeit mit DAB im letzten Schritt des Immunhistochemischen Nachweises entschieden haben. Verschiedene Inkubationszeiten haben bei den selben Präparaten zum Teil sehr unterschiedliche Ergebnisse geliefert. Bei einer achtminütigen Inkubationszeit mit DAB ist zwar eine schwache Hintergrundfärbung vorhanden, aber nur dann besteht die Möglichkeit die verschiedenen Färbeintensitäten der Zellkerne zu differenzieren. Wurde das Präparat kürzer mit DAB inkubiert, erschienen Kerne mit einem hohen Rezeptorgehalt nur schwach positiv. Im Rahmen dieser Austestung der Inkubationszeiten des DAB wurden auch die Antikörperkonzentrationen variiert. Interessanterweise waren die Unterschiede dabei nicht so groß wie bei einer Veränderung der Inkubationszeit des DAB.

Die Grundlage der Falten bildet die Lamina propria mucosae (Hees, 1992). Es ist keine Ausbildung einer Lamina muscularis mucosae beschrieben. Nach Lombard (1950) ziehen keine Muskelfasern in die Schleimhautfalten. Dennoch sind nach eigenen Untersuchungen in der Ampulla auch in den apikalen Faltenbereichen einige, subepithelial gelegene Zellen vorhanden, die mit dem Antikörper gegen  $\alpha$ -SMA stark positiv reagieren. Es handelt sich hierbei nicht um Gefäße, deren Tunica media ebenfalls positiv reagiert. Subepithelial lokalisierte Zellen, die mit dem Antikörper gegen  $\alpha$ -SMA deutliche Reaktionen aufweisen wurden beim Rind

bereits in den Fimbrien beschrieben (Walter, 1998). Es könnte sich dabei um Myofibroblasten oder Myoepithelzellen handeln. Im Bereich des Isthmus ist die Abgrenzung viel klarer, der subepitheliale Bereich bleibt vollständig negativ. Hier finden sich an der Basis der Falten schwach  $\alpha$ -SMA positive Zellen. Zusätzlich konnte in diesen Zellen das Tropomyosin nachgewiesen werden (Walter, 1998).

Elektronenmikroskopisch konnten wir keine subepithelial gelegenen Muskelzellen finden. Beim Nachweis von Zytokeratinfilamenten sind subepithelial keine immunpositiv reagierenden Zellen zu verzeichnen. Aus diesem Grund kann eine epitheliale Natur dieser subepithelialen,  $\alpha$ -SMA positiven Zellen weitestgehend ausgeschlossen werden. Mit dem Antikörper gegen Vimentin reagieren die direkt unter dem Epithel gelegenen Zellen ebenfalls stark positiv. Da unser Antikörper gegen Vimentin nicht mit den Muskelzellen der Tunica muscularis reagiert, ist es nicht sehr wahrscheinlich, dass es sich bei diesen  $\alpha$ -SMA positiven Zellen um glatte Muskelzellen handelt. Es wäre jedoch möglich, dass es sich hierbei um Myofibroblasten handelt, die die Motilität der Ampulla im Rahmen des Gametentransport beeinflussen. Walter (1998) vermutete ähnliches bereits für die Fimbrien. In anderen Epithelien, wie zum Beispiel dem Darmepithel der Ratte sollen solche subepithelialen Myofibroblasten für die Erhaltung eines basalen Tonus verantwortlich sein (Joyce et al., 1987). Auffallend ist in diesem Zusammenhang, dass auch beide untersuchten Steroidhormonrezeptoren (ER $\alpha$  und PR) oft im epithelnahen Bindegewebe lokalisiert sind. Möglicherweise sprechen diese subepithelial gelegenen  $\alpha$ -SMA positiven Zellen auf Östrogen und Progesteron an. Auf diese Art könnte die Kontraktilität der Ampulla beeinflusst werden. Für den Isthmus wurde bereits beschrieben, dass der Kontakt mit der folliculären Flüssigkeit, die sich mit der oviduktalen Flüssigkeit mischt eine Muskelkontraktion verursacht (Ramwell et al., 1969). Die folliculäre Flüssigkeit soll Kinin enthalten. Bradykinin vermag *in vitro* die Isthmusmotilität zu stimulieren (Ramwell et al., 1969).

## 5.2 Bovine Eileiterepithelzellen in Suspensionskultur

Die Suspensionskultur wurde als Kulturmodell gewählt, da adhärente Eileiterepithelzellen relativ schnell dedifferenzieren (Gomez und Uria, 1997). Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der hohen Proliferationsrate *in vitro* und der Dedifferenzierung von adhärennten Eileiterepithelzellen (Walter und Miller, 1996). Nach 24 Stunden Adhärenz ist kaum noch Zilienaktivität zu verzeichnen (Walter und Miller, 1996), später gehen die Zilien verloren (Joshi, 1988; Takeuchi et al., 1991; Walter und Miller, 1996). Auch die sekretorischen Granula

sind bei adhärennten Epithelzellen in der Anzahl stark vermindert und migrieren nicht mehr zur Zelloberfläche (Joshi, 1988).

Die Kulturzellen sollten möglichst in einem differenzierten Zustand erhalten bleiben. Meine Suspensionskultur sollte ein Kurzzeitmodell darstellen. Sphäroiden können maximal bis zu zwei Wochen in Suspension gehalten werden.

Sphäroiden sind für Kokultur-Studien gut geeignet, da man nicht bis zur Konfluenz der Zellen zu einem Monolayer abwarten muss. Demnach könnten den Embryonen frisch isolierte Zellen zugesetzt werden, die nur eine geringgradige Dedifferenzierung aufweisen. Eine verbesserte Erhaltung der Eileiterepithelzellen wurde bereits mittels eines Perfusionskultursystems erreicht (Reischl et al., 1999; Rief et al., 2002). Unter anderem weisen die Zellen aus diesem System eine hochprismatische Form, typische Verteilung von Zellorganellen und Zilien nach dem 8. Kulturtag auf (Reischl, 2000). Bevor die Perfusionskultur für Kokultur-Untersuchungen eingesetzt werden kann, muss allerdings die Adhärenz der Zellen abgewartet werden. Auch die eigentliche Kokultur mit Embryonen kann nicht unter Perfusionsbedingungen durchgeführt werden.

Das Suspensionskulturmodell ist hingegen schnell verfügbar, da die Zellen sofort nach der Isolation verwendet werden können. Des Weiteren werden keine aufwendigen technischen Geräte benötigt. Auch die Handhabung dieser frei im Kulturmedium schwimmenden Zellen ist relativ einfach. Ein Mediumwechsel z.B. kann erfolgen, in dem die Sphäroiden zum Sedimentieren für ca. 5 min in Zentrifugenröhrchen gegeben werden und das überstehende Medium abgesaugt wird.

Bei der Charakterisierung der Sphäroiden haben sich einige technische Probleme ergeben. Die Sphäroiden für die immunzytochemischen Untersuchungen einzeln zu pipettieren, erwies sich als schwierig und war mit großen Zellverlusten verbunden. Zudem war die mikroskopische Darstellung dieser Zellaggregate aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur schwierig. Wir haben mehrere Methoden ausgetestet und uns letztlich für eine Einbettung der Sphäroiden in Paraffin entschieden.

In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen, in denen Zilienaktivität bis zum Ende der Kultur am 12. Tag beobachtet wurde (Walter, 1995), war das Schlagen der Zilien in der eigenen Suspensionskultur bis zum 14. Kulturtag unvermindert vorhanden. Insbesondere die Sphäroiden der Epithelzellen des Isthmus zeigten rege Motilität, sofern eine mittlere Zelldichte der Suspension gewählt wurde.

Mittels des Antikörpers gegen ChromograninA, der als Marker für zilientragende Zellen im Eileiterepithel dienen kann (Steffl et al., 2003; Steffl et al., 2004) konnte auch in den eigenen

immunhistochemischen Untersuchungen bei den Sphäroiden der weitestgehende Erhalt der Zilien bis zum 9. Tag der Kultur festgestellt werden. Der Zilienbesatz war bei den in Paraffin eingebetteten Präparaten (BFPE) der Eileiterepithelzellen auch lichtmikroskopisch deutlich zu erkennen.

Die Sphäroiden zeigten stark positive Reaktionen mit dem Antikörper gegen Panzytokeratin über die gesamte Kulturdauer hinweg. Neben der Unterscheidung von Epithel- und Bindegewebszellen (Joshi, 1988) wird damit zusätzlich deutlich, dass die Erhaltung der epithelialen Natur der Zellen über die Kulturperiode hinweg gegeben ist (Walter, 1995). Alle Zellen der Sphäroiden exprimieren während der gesamten Kulturzeit Zytokeratinfilamente. Deshalb kann man annehmen, dass keine Kontamination mit Fibroblasten vorlag.

Der S100 Antikörper markiert Eileiterepithelzellen unabhängig vom Zyklusstand (Kamiya et al., 1989). In eigenen Untersuchungen reagieren die Zellen der Sphäroiden deutlich positiv mit dem S100 Antikörper, während Zellen eines Monolayers das S100 Protein nicht mehr exprimieren (Walter und Miller, 1996). Dies kann als Zeichen einer Dedifferenzierung gedeutet werden (Walter und Miller, 1996). Eine unterschiedliche Farbintensität der sekretorischen und zilientragenden Zellen beim immunhistochemischen Nachweis von S100, wie sie nach eigenen Untersuchungen im Eileiter vorhanden ist, kann bei den Sphäroiden nicht festgestellt werden. Die kleinen Bereiche mit negativer Reaktion (bzw. schwach positiver Reaktion), die am Tag 7 und 9 der Kultur vorkommen weisen eine vernetzte Struktur unter den Zellen auf. Hier könnte bereits eine Dedifferenzierung der Zellen stattgefunden haben. Dass es sich bei diesen Zellen um Fibroblasten handelt ist unwahrscheinlich, da die entsprechenden Zellen keine Reaktion mit dem Antikörper gegen Vimentin eingehen. In der Suspensionskultur kommen vereinzelt relativ große, runde Einzelzellen vor, die das S100 Protein nicht exprimieren. Mit dem Vimentin Antikörper zeigen sie hingegen positive Reaktionen. Es ist anzunehmen, dass es sich hierbei um vereinzelte Fibroblasten handelt.

Die Anzahl der Vimentin positiven Zellen innerhalb der Sphäroiden nimmt mit Dauer der Kultur zu. Diese Zellen liegen im Zentrum der Zellaggregate. Es scheint möglich, dass sehr wenige Fibroblasten bei der Isolation in die Kultur gelangt sind und sich bis zum Kulturende vermehrt haben. Eine prozentuale Zunahme der Fibroblasten mit der Kulturlänge wird bei einer adhärennten Kultur von humanen Eileiterepithelzellen beschrieben (Kervancioglu et al., 1994). Möglicherweise exprimieren einige Zellen aufgrund von Dedifferenzierungsvorgängen sowohl Zytokeratin- als auch Vimentinfilamente. Dies wurde bereits bei humanen Eileiterepithelzellkulturen vermutet (Henriksen et al., 1990). Diese Hypothese könnte erklären, warum am ersten

Kulturtag keine bzw. nur sehr vereinzelt immunhistochemische Reaktionen beim Vimentin-nachweis vorhanden waren.

Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen (Walter, 1995) fand in unseren Sphäroiden mit zunehmender Kulturlänge auch eine vermehrte Zellteilung statt, wie mittels des MIB-1-Antikörpers nachgewiesen werden konnte. Das bedeutet, dass sowohl die Anzahl der Fibroblasten als auch die Anzahl proliferierender Epithelzellen während der Kultur zunimmt. Wir vermuteten zunächst, dass es sich bei den Ki-67 positiven Zellen um proliferierende Fibroblasten handle. Diese Vermutung konnte aber in weiteren Untersuchungen nicht bestätigt werden, weil wesentlich mehr Zellen eine positive Ki-67 als eine positive Vimentin Reaktion aufwiesen. Außerdem haben die meisten Ki-67 positiven Zellen eine eindeutig epitheliale Morphologie. Allerdings waren bei den proliferierenden Zellen keine Zilien nachzuweisen. Ähnliche Feststellungen wurden bereits für zilientragende Zellen am Eileiterepithel ex vivo gemacht (Comer et al., 1998a). Dabei wurde parallel ein spezieller Marker für zilientragende Zellen (LhS28) und der MIB-1 Antikörper verwendet. Keine der mit MIB-1 positiv reagierenden Zellen zeigte eine positive Reaktion mit dem LhS28-Antikörper (Comer et al., 1998a). Die sekretorischen Zellen wurden in diesen Untersuchungen mit HMFG (Human Milk Fat Globule 2) markiert. Nach einer Östrogenstimulation waren in der selben Kultur LhS28 positive Zellen vorhanden. Aufgrund dieser Erkenntnisse stellte Comer (1998a) die Hypothese auf, dass es eine relativ unreife Form von sekretorischen Zellen gibt, die noch in der Lage ist sich zu einer zilientragenden Zelle zu differenzieren. Er postulierte weiter, dass die Population der sekretorischen Zellen in Stammzellen, Vorläuferzellen und Reifestadien eingeteilt werden kann. Wenn man davon ausgeht, dass zilientragende Zellen keine Mitosefähigkeit mehr besitzen, wäre es nicht verwunderlich, dass sie in adhärennten Kulturen, die massiv proliferieren kaum vorhanden sind. Ein Teil der undifferenzierten, proliferierenden Zellen würde nach einer Östrogenstimulation Zilien ausbilden und sich damit differenzieren (Comer et al., 1998a).

Die Zellen der eigenen Sphäroiden behalten ihre Polarisierung unter Kulturbedingungen weitestgehend bei. Die Zilien zeigen nach außen. Aus diesem Grund versuchten wir festzustellen, ob auch eine Basallamina oder Teile davon bei den Sphäroiden vorhanden sind.

Mit dem Antikörper gegen Laminin konnte bei ex vivo Präparaten des bovinen Eileiters die Basalmembran gut dargestellt werden. Bei den Sphäroiden konnte in keiner der Proben eine Basalmembran identifiziert werden. Auch elektronenmikroskopisch ließ sich keine Basallamina darstellen. Für die längerfristige Erhaltung der Zellpolarisierung und des epithelialen Cha-

rakters ist aber die Ausbildung bzw. das Vorhandensein einer Basalmembran essentiell. Möglicherweise könnte durch eine Kokultur mit Fibroblasten die Neubildung einer Basallamina induziert werden.

Bei den Sphäroiden wurde weiter die Expression der Hormonrezeptoren ER $\alpha$  und PR untersucht. Immunzytochemisch konnte der ER $\alpha$  kaum mehr nachgewiesen werden. Lediglich bei Sphäroiden aus Isthmuskulturen waren vereinzelt schwach positive Kernreaktionen zu verzeichnen. Beim Nachweis des PR waren auch in den Sphäroiden aus der Ampulla Zellen vorhanden, die schwach immunpositiv reagierten. Im Gegensatz dazu beschreiben Comer et al. (1998a) selbst bei adhärennten Zellen noch eine Immunfärbung mit den Antikörpern gegen ER $\alpha$  und PR. Die Intensität der Immunfärbung zeigte in meinen Versuchen große Differenzen besonders zwischen den Sphäroiden. Während bei einigen Zellverbänden in den Kernen aller Zellen ER $\alpha$  bzw. PR nachgewiesen werden konnte, blieben andere Sphäroiden gänzlich negativ. Die Präparate der Isthmuskulturen wiesen einen höheren Anteil Rezeptor positiver Zellen auf als die Präparate der Ampullazellen. Dies korreliert mit der mRNA-Expression für die Rezeptoren. Diese ist ebenfalls im Isthmus stärker als in der Ampulla. Auch bei den immunhistochemischen Untersuchungen am Eileiter ex vivo wurden beide Hormonrezeptoren im Isthmus während des Zyklus stärker exprimiert als in der Ampulla.

In einigen Punkten korrelieren die Ergebnisse aus der real-time RT-PCR mit den immunhistochemischen Untersuchungen nicht. Die Expression des ER $\alpha$  ist am Anfang der Zellkultur höher als die des PR und sinkt erst im Kulturverlauf, während die Expression des PR über die Zeit der Kultur deutlich ansteigt. Erstaunlich war auch, dass beide Rezeptoren in der Gruppe ohne Östrogensupplementierung stärker exprimiert wurden als in der Östrogen stimulierten Gruppe. Nach 24stündiger Kultivierung war die Expression beider Rezeptoren in der Kontrollgruppe doppelt und am Tag 3 der Kultur dreimal so hoch, wie bei der mit Östrogen supplementierten Zellkulturgruppe. Nach Ulbrich et al. (2003) ist die Rezeptorexpression der BOEC bereits 6 Stunden nach der Östrogenapplikation erhöht und sinkt dann unter die Kontrollwerte ab. Wir haben die Expression der Rezeptoren erst 24 Stunden nach der Östrogenzugabe untersucht, so dass zu diesem Zeitpunkt eine vorübergehende Expressionserhöhung möglicherweise nicht mehr nachzuweisen war. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von den Beobachtungen, die Comer (1998a) bei adhärennten Eileiterepithelzellen machte. Er zeigte, dass eine Supplementierung des Nährmediums mit Östrogen keinen Einfluß auf die Expression der Hormonrezeptoren (ER $\alpha$  und PR) hat.

Am 3. Kulturtag konnte eine große Anzahl pyknotischer Kerne bei den kultivierten Zellen festgestellt werden. Demnach gehen viele Eileiterzellen zugrunde, die sich nicht an die Kulturbedingungen adaptieren konnten. Dies führt zu einem massiven Zellverlust, der bei einer Suspensionskultur stark ins Gewicht fällt, weil die Proliferationsrate viel geringer als bei adhären-ten Zellen ist. Der Zelluntergang ist am 7. Kulturtag deutlich zurückgegangen. Dies hängt auf der einen Seite damit zusammen, dass weniger Zellen vorhanden sind. Auf der anderen Seite sind auch innerhalb der Sphäroiden prozentual weniger pyknotische Kerne zu verzeichnen als am Tag 3 der Kultur. Die intakten Zellen scheinen also unter den gegebenen Kulturbedingungen leben zu können. Ein Teil der Zellen weist degenerative Veränderungen auf, wobei sie ihre Form verändern. Zum Teil kugeln sich die Zellen ab oder werden sehr flach, so dass das Kern-Plasma-Verhältnis sinkt. Andernteils nehmen die Zellen z.B. durch Vakuolenbildung extreme Größen an. Das erklärt, warum bei den morphometrischen Auswertungen der Zellen keine klaren Tendenzen zu erkennen waren. Die äußere Gestalt der Kulturzellen variiert zu stark. Ob diese degenerativen Erscheinungen mit einem Funktionsverlust einhergehen bedarf weiterer Untersuchungen. Aufgrund der Polarisierung der Zellen in der Sphäroide hatten wir angenommen, dass von ihnen eine Basalmembran zumindest teilweise ausgebildet wird. Eine Basalmembran konnten wir elektronenmikroskopisch und zytochemisch nicht bestätigen. Hinzu kommt die verminderte Expression der Hormonrezeptoren in den Kulturzellen im Vergleich zum Eileiterepithel in situ. Es erscheint möglich, dass aufgrund einer parakrinen Regulation ein unterlagerndes Bindegewebe für die Polarität und die Erhaltung der Funktionen des Epithels von entscheidender Bedeutung ist (Vermeirsch et al., 2002).

Die zellulären Charakteristika der Sphäroiden wurde mit Hilfe der Elektronenmikroskopie detailliert untersucht. Die Ergebnisse müssen differenziert betrachtet werden. Auf der einen Seite sind im basalen Bereich der Zellen starke morphologische Veränderungen festzustellen, wie z.B. intrazelluläre Vakuolen und eine interzelluläre Spaltbildung. Diese Vergrößerung des Interzellularraums zwischen benachbarten Zellen wurde bereits bei adhären-ten Eileiterepithelzellen als degenerative Erscheinung beschrieben (Reischl, 2000). Andererseits ist bei den Sphäroiden meiner Kultur noch am 10. Kulturtag Zilienbesatz und Organellenreichtum im apikalen Zytoplasma zu verzeichnen. In adhären-ten Kulturen hingegen geht der Zilienbesatz schnell vollständig verloren (Kervancioglu et al., 1994; Takeuchi et al., 1991). Eine normale Ausstattung mit Zellorganellen wird jedoch in der Literatur auch bei adhären-ten Kulturen beschrieben (Gomez und Uria, 1997; Rief, 2001; Takeuchi et al., 1991; Walter, 1995). Bei Verwendung bestimmter Medien, wie z.B. bei dem von uns verwendeten TCM 199 scheint der

Organellengehalt relativ hoch zu sein (Rief, 2001). In anderen Untersuchungen wurde eine Verminderung der Zellorganellen beobachtet. Gomez und Uria (1997) finden neben reichlich granuliertem endoplasmatischen Retikulum nur wenige Zellorganellen und keinen Golgi-Apparat.

Die in den Zellen der Sphäroiden enthaltenen Glykogeneinlagerungen finden auch andere Autoren im Zytoplasma von kultivierten Eileiterepithelzellen vor (Reischl, 2000; Rief, 2001; Takeuchi et al., 1991; Walter, 1995). Eine Abhängigkeit vom Medium wird ebenfalls postuliert (Rief, 2001). Demnach führen reichhaltige Medien, wie z.B. das von uns verwendete TCM 199 zu stärkeren Glykogeneinlagerungen als andere Medien (Rief, 2001).

Während Walter (1995) am 7. Tag ihrer Sphäroidkultur noch eine Ansammlung von sekretorischen Granula unter der apikalen Zellmembran vorfindet, können wir eine deutlich reduzierte Anzahl der sekretorischen Granula und der „digiprints“ im apikalen Zytoplasma bereits ab dem 5. Kulturtag verzeichnen. Reischl (2000) findet Ansammlungen von sekretorischen Granula nur in frisch isolierten Zellen.

Die beobachteten atypischen Granula mit dicker, elektronendichter Membran könnten möglicherweise entspeicherte sekretorische Granula bzw. Digiprints sein. Das ist deshalb wahrscheinlich, weil ihr Auftreten mit dem Verschwinden der typischen sekretorischen Granula korreliert. Nach ihrem Aussehen zu urteilen unterliegen sie degenerativen Prozessen. Eine Verminderung der sekretorischen Granula in den Zellen während der Kultur ist grundsätzlich von großer funktioneller Relevanz. Dies könnte ein Problem bei der Kokultur mit Embryonen darstellen. Die in den Granula der Eileiterepithelzellen enthaltenen Stoffe, werden ins Eileiterlumen sezerniert und haben eine große Bedeutung für die frühe embryonale Entwicklung. Der Verlust der sekretorischen Aktivität wird in vielen Eileiterepithelzellkulturen beschrieben (Joshi, 1988, 1991; Reischl, 2000; Walter, 1995). Es scheint demnach sehr schwierig zu sein, diese wesentliche Funktion der Eileiterepithelzellen in einer Kultur aufrechtzuerhalten.

Grundsätzlich sollte man in der Beurteilung der Eignung der Zellkultur von Eileiterepithelzellen zwei Punkte unterscheiden. Auf der einen Seite sind degenerative Veränderungen von Eileiterepithelzellen festzustellen. Auf der anderen Seite ist ein Differenzierungsverlust der Eileiterepithelzellen in vitro vorhanden. Während am 3. Kulturtag in der Sphäroidzellkultur kaum eine Dedifferenzierung festgestellt werden kann, sind degenerative Veränderungen bereits auszumachen. Die Tatsache, dass Zilien bis zum Ende der Kultur vorhanden sind und die Zellen das S100 Protein stark exprimieren spricht weiter gegen eine starke Dedifferenzierung.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Sphäroidkultur ungefähr bis zum 3. Kulturtag

Zellen liefern kann, die noch keinen massiven Differenzierungsverlust aufweisen. Da Embryonen ca. 3 Tage im Eileiter verweilen, wäre eine Kokultur mit den Sphäroidzellen über eben diese 3 Tage durchaus sinnvoll, auch wenn die sekretorische Fähigkeit der kultivierten Zellen bereits leicht vermindert ist.

Eine Langzeitkultur anzustreben, der man über längere Zeit Zellen für Kokulturen entnehmen kann scheint mit den Sphäroiden hingegen nicht zweckmäßig zu sein. Demnach müsste man für jede Kokultur neue Eileiterepithelzellen isolieren. Dies erscheint mir aufwendig, obgleich das Kultursystem im Vergleich zu den anderen aufgeführten Kulturen relativ einfach zu handhaben ist. Zudem unterliegen Zellen von unterschiedlichen Tieren großen biologischen Variationen. Aus den genannten Gründen haben Ando et al. (2000) und Lee et al. (2001) permanente Zelllinien entwickelt. Die Sphäroidzellen stellen bis zum 3. Kulturtag potentes Ausgangsmaterial für eine mögliche Immortalisierung dar. Der Grad ihrer Dedifferenzierung ist besonders im Vergleich zu adhärenenten Zellkulturzellen sehr gering. Im Vergleich zu den Eileiterepithelzellen ex vivo weisen die Sphäroidzellen bis zum 3. Kulturtag alle wesentlichen morphologischen Charakteristika von differenzierten Eileiterepithelzellen auf.

Um die Differenzierung der bovinen Eileiterepithelzellen längerfristig aufrecht zu erhalten sollte man für weitere Untersuchungen ein Kokulturmodell mit Fibroblasten in Erwägung ziehen.

Nach diesen Erkenntnissen ist die Suspensionskultur der bovinen Eileiterepithelzellen für eine Kokultur mit Embryonen als Kurzzeitmodell gut geeignet.

## 6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der bovinen Eileiterepithelzellen ex vivo und in Suspensionskultur. Ein Schwerpunkt meiner Arbeit bezüglich des bovinen Eileiters ex vivo lag bei den zyklischen Veränderungen des Eileiterepithels, über die bisher wenig präzise Daten vorlagen. Die Ampulla und der Isthmus wurden sowohl bei den Untersuchungen ex vivo als auch in der Zellkultur getrennt betrachtet. Es wurde deutlich, dass das Epithel der Ampulla stärkere morphologische Veränderungen während des Zyklus aufweist, als das Epithel des Isthmus. So war im Epithel der Ampulla die Bildung von Protrusionen zu beobachten, die abhängig vom Zyklusstadium verschiedenen Inhalt aufweisen. Die maximale Höhe des Epithels wurde in beiden Eileiterabschnitten im Östrus erreicht. Im Isthmus war das Epithel jedoch etwas niedriger als in der Ampulla. Im Metöstrus war die stärkste sekretorische Aktivität zu verzeichnen. Dies zeigte insbesondere die massive Ansammlung von sekretorischen Granula unter der apikalen Zytoplasmamembran. Nur in diesem Stadium konnte auch Exozytose der Granula beobachtet werden.

Eine Veränderung der Anteile zilientragender und sekretorischer Zellen im Epithel, wie sie bei anderen Spezies beschrieben wurde, konnte beim Rindereileiter nicht festgestellt werden.

Meine elektronenmikroskopischen Ergebnisse zeigen, dass beim Rind zumindest ein partieller Zilienverlust im Eileiter stattfindet.

Durch die massiven Protrusionen der sekretorischen Zellen werden die Zilienbüschel außerdem im Diöstrus zur Seite gedrängt und teilweise verdeckt. Dadurch kann der Eindruck entstehen, dass die Anzahl der zilientragenden Zellen im Diöstrus abnimmt.

Im bovinen Eileiterepithel wurde eine nur sehr geringe Mitoserate festgestellt, die in den verschiedenen Zyklusstadien kaum variiert. Sowohl in der Zellkultur als auch im Eileiterepithel ex vivo konnten Mitosen ausschließlich bei nicht-zilientragenden Zellen beobachtet werden.

Die Zilien der Sphäroidzellen wiesen nach außen und waren während der gesamten Kultivierung vorhanden. Demnach blieb die Polarisierung der Epithelzellen erhalten. Dies sind Indize dafür, dass die Zellen einer nur geringen Dedifferenzierung während der Kultur unterliegen.

Die sekretorische Aktivität der kultivierten Epithelzellen erscheint aber beeinträchtigt.

Während sich die sekretorischen Granula bis zum 3. Kulturtag unter der apikalen Zellmembran ansammelten, waren sie am 5. Kulturtag bereits großflächig im apikalen Zytoplasma verteilt und an späteren Kulturtagen nur noch vereinzelt vorhanden. Da die sekretorische Funktion jedoch essentiell für die embryo-maternale Kommunikation ist, scheint die Suspensionskultur nur mit frisch isolierten Eileiterepithelzellen sinnvoll zu sein.

Als weiteres Anzeichen einer Dedifferenzierung in Kultur ist die reduzierte Expression der Rezeptoren für Progesteron und Östrogen zu interpretieren.

Nach diesen Ergebnissen sind die Sphäroiden in den ersten drei Kulturtagen für eine Kokultur geeignet, da sie während dieser Zeit nur leichte Anzeichen einer Dedifferenzierung aufweisen. Auch die physiologische Aufenthaltszeit des Embryos im Eileiter beträgt ungefähr drei Tage. Demnach scheint die Suspensionskultur als Kurzzeitmodell für eine Kokultur mit Embryonen gut geeignet zu sein.

## 7 Summary

### **Cycle dependent changes in bovine oviduct and characterisation of bovine oviduct epithelial cells in suspension culture**

The purpose of this study was to analyse the characteristics of the bovine epithelial cells from the oviduct in vivo and in suspension culture. One principal aim of my work concerning the bovine oviduct ex vivo was the analysis of the cyclic changes of the epithelium. Ampulla and isthmic part of the oviduct were examined separately ex vivo as well in cell culture. It became obvious that the ampullary epithelium showed stronger morphological changes during the estrous cycle than the isthmic epithelium.

The ampullary epithelium showed protrusions with different contents depending on the hormone cycle stadium. In both parts of the oviduct maximum height was attained in the estrous phase. In the isthmic part epithelium was somewhat lower than in the ampullary part of oviduct. Strongest secretory activity was detected in metestrous. A massive accumulation of secretory granules was seen beneath the apical cell membrane. Secretory granule exocytosis could only be demonstrated in this stadium of estrous cycle.

Change of ciliated and secretory cell proportions in the epithelium as described for other species could not be seen in the bovine oviduct. My results at transmission electron microscopical level show, that at least a partial loss of cilia takes place in bovine oviduct.

Massive apical protrusions of the secretory cells pushed the cilia aside and partially covered them. This gives the impression that the number of ciliated cells in diestrous is reduced. Only a small mitosis rate was detected in bovine oviduct, hardly varying in different phases of the estrous cycle. Mitosis could only be seen in ciliated cells in cell culture as well as in oviductal epithelium. In suspension culture epithelial cells formed sphaeroids with outward pointing cilia. Cilia were present during complete culture duration. This means polarisation of epithelial cells is maintained in sphaeroids. These cells hardly dedifferentiate during the culture period. Secretory activity of cultured cells seems to be significantly impaired. Secretory granule accumulated beneath the apical cell membrane until culture day three. On day five they are widely dispersed in apical cytoplasm. On following culture days secretory granule can only be found sporadically. As secretory function is essential for embryo-maternal cross talk, suspension culture may be only appropriate, if newly isolated oviductal epithelial cells were used and culture time is kept short. The reduced expression of receptors for estrogens and progesterone

can be interpreted as another sign for loss of differentiation.

According to these results, sphaeroid cells are suitable for a coculture during the first three days, as they showed only minor signs of dedifferentiation in this time period. The physiological time the embryo requires to pass through the oviduct is also approximately three days. Therefore a suspension culture of bovine oviductal epithelial cells seems to be suitable for short term studies of embryo-maternal communication.

## 8 Verzeichnisse

### 8.1 Literaturverzeichnis

- Abe, H.** (1997). Bovine oviductal epithelial cells: their cell culture and applications in studies for reproductive biology. *Cytotechnology* **23**, 171-183.
- Abe, H. und Oikawa, T.** (1989). Differentiation of the golden hamster oviduct epithelial cells during postnatal development: an electron microscopic study. *J Exp Zool* **252**, 43-52.
- Abe, H. und Oikawa, T.** (1990). Study of the differentiation of secretory cells in the golden hamster oviductal epithelium by use of a monoclonal antibody. *J Exp Zool* **254**, 97-106.
- Abe, H. und Oikawa, T.** (1993a). Observations by scanning electron microscopy of oviductal epithelial cells from cows at follicular and luteal phases. *Anat Rec* **235**, 399-410.
- Abe, H. und Oikawa, T.** (1993b). Effects of estradiol and progesterone on cytodifferentiation of epithelial cells in the oviduct of the newborn golden hamster. *Anat Rec* **235**, 390-398.
- Abe, H., Onodera, M. und Sugawara, S.** (1993a). Scanning electron microscopy of goat oviductal epithelial cells at the follicular and luteal phases of the oestrus cycle. *J Anat* **183** ( Pt 2), 415-421.
- Abe, H., Numazawa, C., Abe, M., Onodera, M. und Katsumi, A.** (1993b). 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., Onodera, M., Sugawara, S., Satoh, T. und Hoshi, H.** (1999). Ultrastructural features of goat oviductal secretory cells at follicular and luteal phases of the oestrous cycle. *J Anat* **195** ( Pt 4), 515-521.
- Abughrien, B.M. und Dore, M.A.** (2000). Ciliogenesis in the uterine tube of control and superovulated heifers. *Cells Tissues Organs* **166**, 338-348.
- Abughrien, B.M., Dore, M.A., McGeady, T.A. und Fitzpatrick, E.** (2000). Intraepithelial leucocytes in the bovine uterine tube. *Cells Tissues Organs* **166**, 20-30.
- Adoutte, A., Ramanathan, R. und Lewis, R.** (1980). Biochemical studies of the excitable membrane of *Ramecium tetraurelia*. Proteins of cilia and ciliary membranes. *J Cell Biol* **84**, 717-738.
- Amso, N.N., Crow, J. und Shaw, R.W.** (1994). Comparative immunohistochemical study of oestrogen and progesterone receptors in the fallopian tube and uterus at different stages of the menstrual cycle and the menopause. *Hum Reprod* **9**, 1027-1037.
- Ando, H., Kobayashi, M., Toda, S., Kikkawa, F. und Masahashi, T.** (2000). Establishment of a ciliated epithelial cell line from human Fallopian tube. *Hum Reprod* **15**, 1597-1603.
- Bage, R., Masironi, B., Sahlin, L. und Rodriguez-Martinez, H.** (2002). Deviant peri-oestral hormone patterns affect the epithelium of the uterine tube in repeat-breeder heif-

- ers. *Reprod Fertil Dev* **14**, 461-469.
- Barth, A.D.** (1989). Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. In Ames (Iowa, State University).
- Beck, K., Hunter, J. und Engel, J.** (1990). Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB* **4**, 148-160.
- Bennett, W.A., Watts, T.L., Blair, W.D., Waldham, S.J. und Fuquay, J.W.** (1988). Patterns of oviductal motility in the cow during the estrous cycle. *J Reprod Fertil* **83**, 537-543.
- Björkman, N.** (1959). The ultrastructural organization and the alkaline Phosphatase activity of the epithelial surface of the bovine fallopian tube. *Z Zellforsch* **51**, 589-596.
- Björkman, N. und Fredricsson, B.** (1961). The bovine oviduct epithelium and its secretory process as studied with the electron microscope and histochemical tests. *Z Zellforsch* **55**, 500-513.
- Blandau, R.J.** (1969). Gamete transport - comparative aspects. In: The mammalian oviduct. Comparative Biology and Methodology. Hafez, E.S.E and Blandau, R.J. (Chicago: The University Press), pp. 129-162.
- Boice, M.L., Mavrogianis, P.A., Murphy, C.N., Prather, R.S. und Day, B.N.** (1992). Immunocytochemical analysis of the association of bovine oviduct-specific glycoproteins with early embryos. *J Exp Zool* **263**, 225-229.
- Bongso, A., Ng, S.C. und Sathananthan, H.** (1989a). Establishment of human ampullary cell cultures. *Hum Reprod* **4**, 486-494.
- Brenner, R.M., West, N.B. und McClellan, M.C.** (1990). Estrogen and progesterin receptors in the reproductive tract of male and female primates. *Biol Reprod* **42**, 11-19.
- Brown, D.C. und Gatter, K.C.** (1990). Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* **17**, 489-503.
- Buchanan, D.L., Kurita, T., Taylor, J.A., Lubahn, D.B., Cunha, G.R. und Cooke, P.S.** (1998). Role of stromal and epithelial estrogen receptors in vaginal epithelial proliferation, stratification and cornification. *Endocrinology* **139**, 4345-4352.
- Cattoretti, G., Becker, M.H., Key, G., Duchrow, M., Schluter, C., Galle, J. und Gerdes, J.** (1992). Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* **168**, 357-363.
- Chailley, B., Bork, K., Gounon, P. und Sandoz, D.** (1986). Immunological detection of actin in isolated cilia from quail oviduct. *Biol Cell* **58**, 43-52.
- Chaud, M., Fernandez, P.J., Viggiano, M., Gimeno, M.F. und Gimeno, A.L.** (1983). Is there a role for dopamine in the regulation of motility of sow oviducts? *Pharmacol Res Commun* **15**, 923-936.

- Comer, M.T., Leese, H.J. und Southgate, J.** (1998a). Induction of a differentiated ciliated cell phenotype in primary cultures of Fallopian tube epithelium. *Hum Reprod* **13**, 3114-3120.
- Comer, M.T., Shires, M., Goode, N.P., Leese, H.J., Trejdosiewicz, L.K. und Southgate, J.** (1998b). Expression of an antigen associated with basal bodies of human ciliated epithelial cells. *Histochem J* **31**, 39-43.
- Conneely, B., Mulac-Jericevic, B., De Mayo, F., Lydon, J.P. und O'Malley, B.W.** (2002). Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent Prog Horm Res* **57**, 339-355.
- Cooke, P.S., Buchanan, D.L., Young, P., Setiawan, T., Brody, J., Korach, K.S., Taylor, J.A., Lubahn, D.B. und Cunha, G.R.** (1997). Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *Proc Natl Acad Sci, USA* **94**, 6535-6540.
- Cox, C.I. und Leese, H.J.** (1997). Retention of functional characteristics by bovine oviduct and uterine epithelia in vitro. *Anim Reprod Sci* **46**, 169-178.
- Cunha, G.R., Shannon, J.M., Vanderslice, K.D., Sekkingstad, M. und Robboy, S.J.** (1982). Autoradiographic analysis of nuclear estrogen binding sites during postnatal development of the genital tract of female mice. *J Steroid Biochem* **17**, 281-286.
- Cunha, G.R., Young, P., Hom, Y.K., Cooke, P.S., Taylor, J.A. und Lubahn, D.B.** (1997). Elucidation of a role of stromal steroid hormone receptors in mammary gland growth and development by tissue recombination experiments. *J Mamm Gland Biol Neoplasia* **2**, 393-402.
- Dechering, K., Boersma, C. und Mosselman, S.** (2000). Estrogen receptors alpha and beta: two receptors of a kind? *Curr Med Chem* **7**, 561-576.
- Dentler, W.** (1981). Microtubule-membrane interactions in cilia and flagella. *Int Rev Cytol* **72**, 1-47.
- Dickens, C.J., Comer, M.T., Southgate, J. und Leese, H.J.** (1996). Human Fallopian tubal epithelial cells in vitro: establishment of polarity and potential role of intracellular calcium and extracellular ATP in fluid secretion. *Hum Reprod* **11**, 212-217.
- Donnez, J., Casanas-Roux, F., Ferin, J. und Thomas, K.** (1983). Changes in ciliation and cell height in human tubal epithelium in the fertile and post-fertile years. *Maturitas* **5**, 39-45.
- Donnez, J., Casanas-Roux, F., Caprasso, J., Ferin, J. und Thomas, K.** (1985). Cyclic changes in ciliation, cell height, and mitotic activity in human tubal epithelium during reproductive life. *Fertil Steril* **43**, 554-559.
- DuBois, J.A., Wordinger, R.J. und Dickey, J.F.** (1980). Tissue concentrations of mast cells and lymphocytes of the bovine uterine tube (oviduct) during the estrous cycle. *Am J Vet Res* **41**, 806-808.
- Einspanier, R., Gabler, C., Kettler, A. und Kloas, W.** (1999). Characterization and localization of beta2-adrenergic receptors in the bovine oviduct: indication for progesterone-mediated expression. *Endocrinology* **140**, 2679-2684.

- Einspanier, R., Bieser, B., Reischl, J. und Prelle, K.** (2001). First identification of caldesmon transcripts in bovine oviduct epithelial cells in vitro by means of an RNA differential display technique examining culture-induced expression changes. *Reprod Domest Anim* **36**, 230-235.
- El-Banna, A.A. und Hafez, E.S.** (1970a). Profile analysis of the oviductal wall in rabbits and cattle. *Anat Rec* **166**, 469-478.
- El-Banna, A.A. und Hafez, E.S.** (1970b). Egg transport in beef cattle. *J Anim Sci* **30**, 430-432.
- Ellington, J.E.** (1991). The bovine oviduct and its role in reproduction: a review of the literature. *Cornell Vet* **81**, 313-328.
- Ellington, J.E., E.W., C., Simkin, M.E. und Goote, R.H.** (1989). Comparison of media in an early bovine embryo and oviduct epithelial co-culture system. (Abstract). *Theriogenology* **31**, 189.
- Eriksen, T., Terkelsen, O., Hyttel, P. und Greve, T.** (1994). Ultrastructural features of secretory cells in the bovine oviduct epithelium. *Anat Embryol (Berl)* **190**, 583-590.
- Eyestone, W.H. und First, N.L.** (1989). Co-culture of early cattle embryos to the blastocysts stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fertil* **85**, 715-720.
- Gaddum-Rosse, P. und Blandau, R.J.** (1973). In vitro studies on ciliary activity within the oviducts of the rabbit and pig. *Am J Anat* **136**, 91-104.
- Gaddum-Rosse, P. und Blandau, R.J.** (1976). Comparative observations on ciliary currents in mammalian oviducts. *Biol Reprod* **14**, 605-609.
- Gandolfi, F. und Moor, R.M.** (1987). Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fertil* **81**, 23-28.
- Gandolfi, F., Brevini, T.a.L. und Moor, R.M.** (1989a). Effect of oviduct environment on embryonic development. *J Reprod Fertil Suppl* **38**, 107-115.
- Gandolfi, F., Modina, S., Brevini, T.A., Galli, C., Moor, R.M. und Lauria, A.** (1991). Oviduct ampullary epithelium contributes a glycoprotein to the zona pellucida, perivitelline space and blastomeres membrane of sheep embryos. *Eur J Basic Appl Histochem* **35**, 383-392.
- Gee, J.M., Nicholson, R.I., Jasani, B., Newman, G.R. und Amselgruber, W.** (1990). An immunohistochemical method for localization of estrogen receptors in rat tissues using a dinitrophenyl (DNP)-labeled rat monoclonal primary antibody. *J Histochem Cytochem* **38**, 69-78.
- Geene, G., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y. und Shine, J.** (1986). Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*, **231(4742)**, 1150-1154.
- Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.H., Schwab, U. und Stein, H.** (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the

- monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* **133**, 1710-1715.
- Gerena, R.L. und Killian, G.J.** (1990). Electrophoretic characterization of proteins in oviduct fluid of cows during the estrus cycle. *J Exp Zool* **256**, 113-120.
- Gibbons, I.** (1967). The organization of cilia and flagella. *Molecular organization and biological Function*, 211-236.
- Gomez, E. und Uria, H.** (1997). Morphological and functional characterization of bovine oviductal epithelial cell monolayers cultured on polarizing membranes. *Reprod Nutr Dev* **37**, 151-162.
- Gorr, S.-U., Dean, W.L., Radley, T.L. und Cohn, D.V.** (1988). Calcium-binding and aggregation properties of parathyroid secretory protein-1 (chromogranin A). *Bone and Mineral* **4**, 17-25.
- Graham, J.D. und Clarke, C.L.** (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* **18**, 502-519.
- Hafez, E.S.** (1987). *Reproduction in Farm Animals*. Chicago and London: University of Chicago press.
- Harper, M.J.** (1988). Gamete and zygote transport. In *The Physiology of Reproduction*, e. Knobil & Neill, ed (New York: Raven Press), pp. 103-134.
- Harper, M.J.** (1989). Platelet -activating factor: a paracrine factor in preimplantation stages of development? *Biol Reprod* **40**, 907-913.
- Hawkins, M.B., Thornton, J.W., Crews, D., Skipper, J.K., Dotte, A. und Thomas, P.** (2000). Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proc Natl Acad Sci* **97**, 10751-10756.
- Hees, H.S., F.** (1992). *Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. Hrsg. Hees, H. und Sinowatz, F. Deutscher Ärzteverlag, Köln.
- Hegmann, T.E., Schulte, D.L., Lin, J.L. und Lin, J.J.** (1991). Inhibition of intracellular granule movement by microinjection of monoclonal antibodies against caldesmon. *Cell Motil Cytoskeleton* **20**, 109-120.
- Helm, G., Owman, C., Rosengren, E. und Sjöberg, N.O.** (1982). Regional and cyclic variations in catecholamine concentration of the human fallopian tube. *Biol Reprod* **26**, 553-558.
- Henriksen, T., Tanbo, T., Abyholm, T., Oppedal, B.R., Claussen, O.P. und Hovig, T.** (1990). Epithelial cells from human fallopian tube in culture. *Hum Reprod* **5**, 25-31.
- Hörmann, E.** (1909). Über das Bindegewebe der weiblichen Geschlechtsorgane. *Arch. Gynaek.* **86**, 404-433.
- Hoshi, H.O., M und Oikawa, T.** (1992). Isolation, cell characterization and growth regulation of bovine oviduct epithelial cells in vitro. *Tiss Cult Res Comm* **11**, 5-11.
- Hunter, R.H.F.** (1988). *The fallopian tube: Their role in fertility and infertility*. Springer Ver-

lag, Berlin.

**Hunter, R.H.F.** (1989). Ovarian programming of gamete progression and maturation in the female genital tract. *Zool J Linnean Soc* **95**, 117-124.

**Hunter, R.H.F. und Nichol, R.** (1983). Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: pre-ovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus. *J Exp Zool* **228**, 121-128.

**Hunter, R.H.F. und Nichol, R.** (1986). A preovulatory temperature gradient between the isthmus and ampulla of pig oviducts during the phase of sperm storage. *J Reprod Fertil* **77**, 599-606.

**Hunter, R.H.F., Flechon, B. und 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.R. und Wilmot, I.** (1984). Sperm transport in the cow: periovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod Nutr Devel* **24**, 597-608.

**Huttner, W.B., Gerdes, H.-H. und Rosa, P.** (1991). The granin (chromogranin/secretogranin) family. *Trends Biochem Sci* **16**, 27-30.

**Isla, M., Costa, G., Garcia-Pascual, A., Triguero, D. und Garcia-Sacristan, A.** (1989). Intrinsic spontaneous activity and beta-adrenoceptor-mediated tubal dilation affect ovum transport in the oviduct of the cow. *J Reprod Fertil* **85**, 79-87.

**Joshi, M.S.** (1988). Isolation, cell culture and immunocytochemical characterization of oviduct epithelial cells of the cow. *J Reprod Fertil* **83**, 249-261.

**Joshi, M.S.** (1991). Growth and differentiation of the cultured secretory cells of the cow oviduct on reconstituted basement membrane. *J Exp Zool* **260**, 229-238.

**Joyce, N.C., Haire, M.F. und Palade, G.E.** (1987). Morphologic and biochemical evidence for a contractile cell network within the rat intestinal mucosa. *Gastroenterology* **92**, 68-81.

**Kamiya, S., Tajika, T. und Daigo, M.** (1989). Immunohistochemical demonstration of S-100 protein in epithelial cells of bovine oviduct. *Acta Anat (Basel)* **136**, 76-78.

**Kannisto, R., Ekblad, E. und Helm, G.e.a.** (1986). Existence and coexistence of peptides in nerve of the mammalian ovary and oviduct demonstrated by immunocytochemistry. *Histology* **86**, 25-34.

**Karnovsky, M.** (1975). A formaldehyd-glutaraldehyde fixative of high osmoality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* **27**, 137A-138A.

**Kervancioglu, M.E., Saridogan, E., Martin, J.E., Maguiness, S.D. und Djahanbakhch, O.** (1994). A simple technique for the long-term non-polarised and polarised culture of human fallopian tube epithelial cells. *Biol Cell* **82**, 103-107.

**Kimmins, S. und MacLaren, L.A.** (2001). Oestrus cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta* **22**,

742-748.

**Koch, T. und Berg, R.** (1985). Lehrbuch der Veterinäranatomie, Band 2, Eingeweidelehre. Gustav Fischer Verlag, Jena.

**Kotwica, G., Kurowicka, B., Franczak, A., Grzegorzewski, W., Wrobel, M., Mlynarczuk, J. und Kotwica, J.** (2003). The concentrations of catecholamines and oxytocin receptors in the oviduct and its contractile activity in cows during the estrous cycle. *Theriogenology* **60**, 953-964.

**Krege, J.H., Hodgin, J.B., Couse, J.F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J.F., Sar, M., Korach, K.S., Gustafsson, J.A. und Smithies, O.** (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor  $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci, USA* **93**, 2925-2930.

**Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nisson, S. und Gustafsson, J.A.** (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci* **93**, 5925-5930.

**Kurita, T., Young, P., Brody, J., Lydon, J.P., O'Malley, B.W. und Cunha, G.R.** (1998). Stromal progesterone receptors mediate the inhibitory effects of progesterone on estrogen-induced uterine epithelial cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology* **139**, 1708-1713.

**Kurita, T., Lee, K.J., Cooke, P.S., Taylor, J.A., Lubahn, D.B. und Cunha, G.R.** (2000). Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor by estradiol in the mouse female reproductive tract. *Biol Reprod* **62**, 821-830.

**Lee, Y.L., Lee, K.F., Xu, J.S., Wang, Y.L., Tsao, S.W. und Yeung, W.S.** (2001). Establishment and characterization of an immortalized human oviductal cell line. *Mol Reprod Dev* **59**, 400-409.

**Leese, H.J. und Gray, S.M.** (1988). The formation and function of oviduct fluid. *J Reprod Fertil* **82**, 843-856.

**Lemullois, M., Klotz, C. und Sandoz, D.** (1987). Immunocytochemical localization of myosin during ciliogenesis of quail oviduct. *Eur J Cell Biol* **43**, 429-437.

**Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P. und Darnell, J.** (1993). *Molecular cell biology.* (New York).

**Lombard, L.** (1950). The Morphology of the oviduct of virgin Heifers in relation to the estrous cycle. *J Morphology* **Vol. 86**, 1-15.

**Lyons, R.A., Djahanbakhch, O., Mahmood, T., Saridogan, E., Sattar, S., Sheaff, M.T., Naftalin, A.A. und Chenoy, R.** (2002). Fallopian tube ciliary beat frequency in relation to the stage of menstrual cycle and anatomical site. *Hum Reprod* **17**, 584-588.

**Mahmood, T., Saridogan, E., Smutna, S., Habib, A.M. und Djahanbakhch, O.** (1998). The effect of ovarian steroids on epithelial ciliary beat frequency in the human Fallopian tube. *Hum. Reprod.* **13**, 2991-2994.

- Malayer, J.R., Hansen, P.J. und Buhi, W.C.** (1988). Secretion of proteins by cultured bovine oviducts collected from estrus through early diestrus. *J Exp Zool* **248**, 345-353.
- Martin, G.R. und Timpl, R.** (1987). Laminin and other basement membrane components. *Ann Rev Cell Biol* **3**, 57-85.
- Mc Daniel, J.W., Scalzi, H. und Black, D.L.** (1968). Influence of ovarian hormones on histology and histochemistry of the bovine oviduct. *J Dairy Sci* **51**, 754-761.
- Mermillod, P., Mourmeaux, J.L., Wils, C., Massip, A. und Dessy, F.** (1992). Protein-free oviduct conditioned medium for complete bovine embryo development. *Vet Rec* **130**, 13.
- Meyer, H.H.D., Mittermeier, T. und Schams, S.** (1988). Dynamics of oxytocin, estrogen and progesterin receptors in the bovine endometrium during the estrous cycle. *Acta Endocrinol.* **118**, 96-104.
- Moore, B.W.** (1965). A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* **19**, 739-744.
- Mowa, C.N. und Iwanaga, T.** (2000). Differential distribution of oestrogen receptor-alpha and -beta mRNAs in the female reproductive organ of rats as revealed by in situ hybridization. *J Endocrinol* **165**, 59-66.
- Nayak, R.K. und Ellington, E.** (1977). Ultrastructural and ultracytochemical cyclic changes in the bovine uterine tube epithelium. *Amer J vet Res* **38**, 157-168.
- Nayak, R.K., Zimmerman, D.R. und Albert, E.N.** (1976). Electron microscopic studies of estrogen-induced ciliogenesis and secretion in uterine tube of the gilt. *Am J Vet Res* **37**, 189-197.
- Newcomb, R. und Rowson, L.E.A.** (1975). Conception rate after uterine transfer of cow eggs in relation to synchronization of oestrus and age of eggs. *J Reprod Fertil* **43**, 539-541.
- Nickel, R., Schummer, A. und Seiferle, E.** (1987). *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere* (2). Parey Verlag, Berlin.
- Nilsson, O.R., S.** (1969). Electron microscopic structure of the oviduct. Comparative biology and methodology. (In: *The mammalian oviduct*. E.S.E. Hafez, E.S.E. and Blandau, R.J., London and Chicago, Chicago Press), pp. 57-83.
- Novak, E. und Sampson, R.** (1928). Diskussion des Beitrags von E. NOVAK und H.S. EVERETT: Cyclical and other variations in the tubal epithelium. *Am J Obstet Gynecol* **16**, 499.
- Odor, D.L. und Augustine, J.R.** (1995). Morphological study of changes in the baboon oviductal epithelium during the menstrual cycle. *Microsc Res Tech* **32**, 13-28.
- Osborn, M., Debus, E. und Weber, K.** (1984). Monoclonal antibodies specific for vimentin. *Eur J Cell Biol* **34**, 137-143.
- Oubibi, N., Ménézo, Y. und Benet, G.** (1989). Culture of epithelial cells derived from the

- oviduct of different species. *Hum Reprod* **4**, 229-235.
- Owada, M.K., Hakura, A., Iida, K., Yahara, I., Sobue, K. und Kakiuchi, S.** (1984). Occurrence of caldesmon (a calmodulin-binding protein) in cultured cells: comparison of normal and transformed cells. *Proc Natl Acad Sci, USA* **81**, 3133-3137.
- Palter, S.F., Mulayim, N., Senturk, L. und Arici, A.** (2001). Interleukin-8 in the human fallopian tube. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 2660-2667.
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L. und First, N.L.** (1989). Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol Reprod* **41**, 683-699.
- Patek, E., Nilsson, L. und Johannisson, E.** (1972a). Scanning electron microscopic study of the human fallopian tube. Report II. Fetal life, reproductive life, and postmenopause. *Fertil Steril* **23**, 719-733.
- Patek, E., Nilsson, L. und Johannisson, E.** (1972b). Scanning electron microscopic study of the human fallopian tube. Report I. The proliferative and secretory stages. *Fertil Steril* **23**, 549-565.
- Pauerstein, C.J. und Woodruff, J.D.** (1967). The role of the indifferent cell of the tubal epithelium. *Am J Obstet Gynecol* **98**, 121-125.
- Pelletier, G., Labrie, C. und Labrie, F.** (2000). Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J Endocrinol* **165**, 359-370.
- Perez-Martinez, C., Garcia-Fernandez, R.A., Escudero, A., Ferreras, M.C. und Garcia-Iglesias, M.J.** (2001). Expression of cytokeratins and vimentin in normal and neoplastic tissue from the bovine female reproductive tract. *J Comp Pathol* **124**, 70-78.
- Pfaffl, M.W., Lange, I.G., Daxenberger, A. und Meyer, H.H.D.** (2001). Tissue-specific expression pattern of estrogen receptors (ER): Quantification of ERalpha and ERbeta mRNA with real-time RT-PCR. *APMIS* **109**, 345-355.
- Pfaffl, M.W., Daxenberger, A., Hageleit, M. und Meyer, H.H.D.** (2002). Effects of synthetic progestagens on the mRNA expression of androgen receptor, progesterone receptor, estrogen receptor alpha and beta, insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF-1 receptor in heifer tissues. *J Veterinary Medicine A* **49**.
- Pollard, J.W., Plante, C., King, W.A., Hansen, P.J., Betteridge, K.J. und Suarez, S.S.** (1991). Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding to oviductal epithelial cells. *Biol Reprod* **44**, 102-107.
- Ramwell, P.W., Shaw, J.E. und Jessup, S.J.** (1969). Follicular fluid kinin and its action on fallopian tube. *Endocrinology* **84**, 931-936.
- Rasweiler, J.J.** (1972). The basal or indifferent cell and the ciliary vacuole in the oviductal epithelium of the long-tongued bat, *Glossophaga soricina*. *J Reprod Fertil* **30**, 191-199.
- Reeder, R.L. und Shirley, B.** (1999). Deciliation in the ampulla of the rat oviduct and effects

- of estrogen on the process. *J Exp Zool* **283**, 71-80.
- Reischl, J.** (2000). Etablierung eines Perfusionskultursystems für bovine Eileiterepithelzellen als Basis für Studien der frühen embryomaternalen Kommunikation. Dissertation am Institut für Tierzucht (München: Tierärztliche Fakultät der LMU).
- Reischl, J., Prelle, K., Schol, H., Neumuller, C., Einspanier, R., Sinowatz, F. und Wolf, E.** (1999). Factors affecting proliferation and dedifferentiation of primary bovine oviduct epithelial cells in vitro. *Cell Tissue Res* **296**, 371-383.
- Rexroad, C.E.** (1989). Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology* **31**, 105-113.
- Reynolds, E.** (1962). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* **17**, 208-212.
- Rief, S.** (2001). Etablierung eines Kokultursystems von bovinen Präimplantationsembryonen mit Eileiterepithelzellen vom Rind sowie dessen Einfluß auf Entwicklung, Metabolismus und Genexpression der Embryonen. Dissertation am Institut für Tierzucht (München: Tierärztliche Fakultät der LMU), pp. 150.
- Rief, S., Sinowatz, F., Stojkovic, M., Einspanier, R., Wolf, E. und Prelle, K.** (2002). Effects of a novel co-culture system on development, metabolism and gene expression of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction* **124**, 543-556.
- Roberts, G.P., Prarker, J.M. und Symonds, H.W.** (1975). Proteins in the luminal fluid from the bovine oviduct. *J Reprod Fertil* **45**, 301-313.
- Romeis, B.** (1989). *Mikroskopische Technik.*, 17. Aufl., Böck, P., Urban und Schwarzenegger, München.
- Rüsse, I. und Liebig, H.G.** (1979). Maturation of secretory granules in the endosalpinx one to four days post coitum in sheep. *Cell Tissue Res* **201**, 145-158.
- Rüsse, I. und Sinowatz, F.** (2002). *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere.* Parey, Berlin.
- Sandoz, D., Chailley, B., Boisvieux-Ulrich, E., Lemullois, M., Laine, M. und Bautista-Harris, G.** (1988). Organization and functions of cytoskeleton in metazoan ciliated cells. *Biol Cell* **63**, 183-193.
- Satir, P.** (1989). The role of axonemal components in ciliary motility. *Comp Biochem Physiol* **94A**, 351-357.
- Sattar, S., Abbas, B., Jones, L., Saridogan, E., Mahmood, T., Mehta, J. und Djahanbakhch, O.** (1999). Comparison of the growth patterns and morphological characteristics of mechanically and enzymatically isolated fallopian tube epithelial cells. *Cell Biol Int* **23**, 379-383.
- Saunders, P.T., Maguire, S.M., Gaughan, J. und Millar, M.R.** (1997). Expression of estrogen receptor beta (ER beta) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry. *J Endocrinol* **154**, R13-16.
- Sawyer, H.R., Olson, P.N. und Gorell, T.A.** (1984). Effects of progesterone on the oviductal

- epithelium in estrogen-primed prepubertal beagles: light and electron microscopic observations. *Am J Anat* **169**, 75-87.
- Schaffer, J.** (1908). Über Bau und Funktion des Eileiterepithels beim Menschen und bei Säugtieren. *Monatsschr. Geburtsh. Gynaek.* **28**, 526-542.
- Schams, D., Kohlenberg, S., Amselgruber, W., Berisha, B. und Pfaffl, M.W.** (2003). Expression and localisation of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution. *J Endocrinology* **177**, 305-317.
- Schmidt-Barth, I.** (1981). Histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen am Eileiter des Rindes im Zyklusverlauf. Dissertation, Tierärztliche Fakultät, München.
- Schrader, W.T., Birnbaumer, M., Hughes, M.R., Weigel, N.L., Grody, W.W. und O'Malley, B.W.** (1981). Studies on the structure and function of the chicken progesterone receptor. *Recent Prog Horm Res* **37**, 583-633.
- Shirley, B. und Reeder, R.L.** (1996). Cyclic changes in the ampulla of the rat oviduct. *J Exp Zool* **276**, 164-173.
- Singh, L.P., Sadiku, A. und Verma, O.P.** (1979). Prostaglandin F2 alpha-induced response of the bovine ovary, oviduct and uterus. *Amer J vet Res* **40**, 1789-1791.
- Skalli, O., Ropraz, R., Trzeciak, A., Benzonana, G., Gillessen, D. und Gabbiani, G.** (1986). A monoclonal antibody against alpha-smooth-muscle and fibroblastic tissues. *J Cell Biol* **103**, 2787-2796.
- Smith, T.T.** (1998). The modulation of sperm function by the oviductal fluid proteins with the bovine zona pellucida. *Biol Reprod* **58**, 1102-1104.
- Steffl, M., Schweiger, M. und 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.
- Steffl, M., Schweiger, M. und Amselgruber, W.M.** (2004). Immunophenotype of porcine oviduct epithelial cells during the estrous cycle: a double-labelling immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol.* **121**, 239-244.
- Steinhauer, N.** (2002). Histomorphologische und immunhistochemische (Ki-67) Untersuchungen am Oberflächenepithel des Ovidukts im Zyklusverlauf der Hündin. Dissertation, Tierärztliche Fakultät, Hannover.
- Stephens, R., Oleszko-szuts, S. und Linck, R.** (1989). Retention of ciliary ninefold structure after removal of microtubules. *J Cell Sci* **92**, 391-402.
- Suarez, S.S.** (1998). The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation. *Biol Reprod* **58**, 1105-1107.
- Suarez, S.S., Brockman, K. und Lefebvre, R.** (1997). Distribution of mucus and sperm in bovine oviducts artificial insemination: the physical environment of the oviduct sperm reservoir. *Biol Reprod* **56**, 447-453.

- Sun, T., Lei, Z.M. und Rao, C.V.** (1997). A novel regulation for the oviductal glycoprotein gene expression by luteinizing hormone in bovine tubal epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol* **131**, 97-108.
- Sun, T., Eichner, R., Nelson, W.G. und Woodcock-Mitchell, J.** (1983). Keratin classes: molecular markers for different types of epithelial differentiation. *J Invest Dermatol* **81**.
- Sundström, B.E. und Stigbrand, T.I.** (1994). Cytokeratins and tissue polypeptide antigen. *Int J Biol Markers* **9**, 102-108.
- Takeuchi, K., Maruyama, I., Yamamoto, S., Oki, T. und Nagata, Y.** (1991). Isolation and monolayer culture of human fallopian tube epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* **27A**, 720-724.
- Teter, K.P., Hooloway, D.C. und Sandusky, G.E.** (1995). Assessment of PCNA (19A2) and Ki-67 cell proliferation markers in formalin fixed tissues. *J Histotechnol* **18**, 99-104.
- Thibodeaux, J.K. und Godke, R.A.** (1992). In vitro enhancement of early-stage embryos with co-culture. *Arch Pathol Lab Med* **116**, 364-372.
- Thibodeaux, J.K., Goodeaux, L.L., Roussel, J.D., Menezo, Y., Amborski, G.F., Moreau, J.D. und Godke, R.A.** (1991). Effects of stage of the bovine oestrous cycle on in-vitro characteristics of uterine and oviductal epithelial cells. *Hum Reprod* **6**, 751-760.
- Tiemann, U. und Hansen, P.J.** (1995). Steroidal and growth factor regulation of ( $^3\text{H}$ )-Thymidine incorporation by cultured endosalpingeal cells of the bovine oviduct. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **31**, 640-645.
- Tiemann, U., Neels, P., Pöhland, R., Walzel, H. und Löhrke, B.** (1999). Influence on inhibitors increase in intracellular free calcium and proliferation induced by platelet-activating factor in bovine oviductal cells. *J Reprod Fertil* **116**, 63-72.
- Tiemann, U., Viergutz, T., Jonas, L., Wollenhaupt, K., Pohland, R. und Kanitz, W.** (2001). Fluorometric detection of platelet activating factor receptor in cultured oviductal epithelial and stromal cells and endometrial stromal cells from bovine at different stages of the estrous cycle and early pregnancy. *Domest Anim Endocrinol* **20**, 149-164.
- Toft, D. und Gorski, J.** (1966). A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc Natl Acad Sci* **55**, 1574-1581.
- Troyanowsky, S.M., Guetstein, V.L. und Tchipsheva, T.A.** (1989). Patterns of expression of keratin 17 in human epithelia; dependency on cell position. *J Cell Sci* **93**, 419-426.
- Ulbrich, S.E., Kettler, A. und 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.
- Umezū, T., Hanazono, M., Aizawa, S. und Tomooka, Y.** (2003). Characterization of newly established clonal oviductal cell line and differential hormonal regulation of gene expression. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **4**.
- Urhin, V. und Kliment, J.** (1977). Submicroscopic changes in the secretory cells of the epi-

- thelium of the bovine oviduct during the estrous cycle. *Vet Med (Praha)* **28**, 199-209.
- van Bogaert, L.J., Maldague, P. und Staquet, J.P.** (1978). The percentage of granulocyte-like cells in human oviduct epithelia. *Br J Obstet Gynaecol* **85**, 373-375.
- van Langendonck, A., Vansteenbrugge, A., Dessy-Doizé, C., Flechon, J.E., Charpigny, G. and Mermillod, P.** (1995). Characterization of bovine oviduct epithelial cell monolayers cultured under serum-free conditions. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **31**, 664-670.
- Verdugo, P., Rumery, R.E. und Lee, W.I.** (1977). Calcium-induced activation of ciliary activity in mammalian ciliated cells. *J Cell Biol* **75**, 293a.
- Verhage, H.G., Abel, J.H.j., Tietz, W.J.j. und Barrau, M.D.** (1973 b). Estrogen-induced differentiation of the oviductal epithelium in prepubertal dogs. *Biol. Reprod.* **9**, 475-488.
- Verhage, H.G., Abel, J.H., Jr., Tietz, W.J., Jr. und Barrau, M.D.** (1973a). Development and maintenance of the oviductal epithelium during the estrous cycle in the bitch. *Biol Reprod* **9**, 460-474.
- Verhage, H.G., Bareither, M.L., Jaffe, R.C. und Akbar, M.** (1979). Cyclic changes in ciliation, secretion and cell height of the oviductal epithelium in women. *Am J Anat* **156**, 505-521.
- Vermeirsch, H., Van Den Broeck, W., Coryn, M. und Simoens, P.** (2002). Immunolocalization of sex steroid hormone receptors in the canine uterine tube and their relation to sex steroid hormone concentrations. *Reprod Fertil Dev* **14**, 241-250.
- Walter, I.** (1995). Culture of bovine oviduct epithelial cells (BOEC). *Anat Rec* **243**, 347-356.
- Walter, I.** (1998). Myofibroblasts in the mucosal layer of the uterine tube. *Ital J Anat Embryol* **103**, 259-266.
- Walter, I. und Miller, I.** (1996). S-100 protein subunits in bovine oviduct epithelium: in situ distribution and changes during primary cell culture. *Histochem J* **28**, 671-680.
- Wang, H., Eriksson, H. und Sahlin, L.** (2000). Estrogen receptors alpha and beta in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle. *Biol Reprod* **63**, 1331-1340.
- Weeth, H. und Herman, H.** (1952). A histological and histochemical study of the bovine oviducts, uterus and placenta. Thesis. (Univ Missouri, Columbia).
- Wiesner, E. und Ribbeck, R.** (2000). *Lexikon der Veterinärmedizin.* (Enke, Stuttgart).
- Wijayagunawardane, M.P., Miyamoto, A., Cerbito, W.A., Acosta, T.J., Takagi, M. und Sato, K.** (1998). Local distributions of oviductal estradiol, progesterone, prostaglandins, oxytocin and endothelin-1 in the cyclic cow. *Theriogenology* **49**, 607-618.
- Wijayagunawardane, M.P., Miyamoto, A., Taquahashi, Y., Gabler, C., Acosta, T.J., Nishimura, M., Killian, G. und Sato, K.** (2001). In vitro regulation of local secretion and contraction of the bovine oviduct: stimulation by luteinizing hormone, endothelin-1 and prostaglandins, and inhibition by oxytocin. *J Endocrinol* **168**, 117-130.
- Wildt, L., Kissler, S., Licht, P. und Becker, W.** (1998). Sperm transport in the human female

- genital tract and in modulation by oxytocin as assessed by hysterosalpingoscintigraphy, hysterotonography, electrohysterography and Doppler sonography. *Hum Reprod Sci* **4**, 655-666.
- Wilkins, H. und Münster, W.** (1984). Arterien, Venen. In: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere (3), R. Nickel, Schummer, A. Seiferle, E. (Parey, Berlin), pp. 76-276.
- Witkowska, E.** (1979). Reactivity of the Epithelial cells of bovine oviduct in vitro on the exogenous gonadotropic and steroid hormones. Part I: The effect of gonadotropic and steroid hormones on the amount of lipids and activity of dehydrogenases. Part II: The effect of gonadotropic hormones on the amount of glycogen and of acid and alkaline phosphatases. *Folia Histochem Cytochem* **17**, 225-250.
- Woodruff, J.D. und Pauerstein, C.J.** (1969). The Fallopian tube. (Williams & Wilkins, Baltimore).
- Wordinger, R.J., Dickey, J.F. und Ellicott, A.R.** (1977). Histochemical evaluation of the lipid droplet content of bovine oviductal and endometrial epithelial cells. *J Reprod Fertil* **49**, 113-114.
- Wrobel, K.H. und Kujat, R.** (1993). The bovine tubouterine junction: general innervation pattern and distribution of adrenergic, cholinergic and peptinergic nerve fibers. *Cell Tissue Res* **274**, 493-501.
- Wrobel, K.H., Kujat, R. und Fehle, G.** (1993). The bovine tubouterine junction: general organization and surface morphology. *Cell Tissue Res* **271**, 227-239.
- Yamashiro, S., Yamakita, Y., Ishikawa, R. und Matsumura, F.** (1990). Mitosis-specific phosphorylation causes 83K non-muscle caldesmon to dissociate from microfilaments. *Nature* **344**, 675-678.
- Yamashiro, S., Yamakita, Y., Hosoya, H. und Matsumura, F.** (1991). Phosphorylation of non-muscle caldesmon by p34cdc2 kinase during mitosis. *Nature* **349**, 169-172.
- Yamashiro-Matsumura, S. und Matsumura, F.** (1988). Characterization of 83-kilodalton nonmuscle caldesmon from cultured rat cells: stimulation of actin binding of nonmuscle tropomyosin and periodic localization along microfilaments like tropomyosin. *J Cell Biol* **106**, 1973-1983.
- Yaniz, J.L., Lopez-Gatius, F., Santolaria, P. und Mullins, K.J.** (2000). Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. *Anat Rec* **260**, 268-278.
- Yokoki, Y., Kaneda, Y., Domeki, I., Kamomae, H. und Ogasa, A.** (1982). Scanning electron microscopic observation of cyclic changes of epithelial surface of oviduct in cows. *Nat Ins Anim Health Quart, Japan* **22**, 183.
- Yoo, S.H., So, S.H., Kweon, H.S., Lee, J.S., Kang, M.K. und Jeon, C.J.** (2000). Coupling of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor and chromogranins A and B in secretory granules. *J Biol Chem* **275**, 12553-12559.
- Zerobin, K. und Sporri, H.** (1972). Motility of the bovine and porcine uterus and Fallopian tube. *Acta Vet Sci Comparat Med* **16**, 301-347.

## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Methoden für die Isolation und Kultur von bovinen Eileiterepithelzellen	29
Tabelle 2:	Verwendete Eileiterproben	39
Tabelle 3:	Bewertungsschema der PAS-Reaktion	41
Tabelle 4:	Verwendete Antikörper und Inkubationsbedingungen	45
Tabelle 5:	Übersicht über die verwendeten Tiere zur Probennahme für die Zellkultur	51
Tabelle 6:	Eingebettete Sphäroiden für die immunhistochemischen Untersuchungen	51
Tabelle 7:	Übersicht über die verwendeten Tiere zur Probennahmen für die Elektronenmikroskopie	52
Tabelle 8:	Vorbehandlungen bei immunhistochemischen Nachweisen an Kulturzellen	55
Tabelle 9:	Verwendete Antikörper und Inkubationsbedingungen bei den IHC-Nachweisen an Kulturzellen	56
Tabelle 10:	Bewertungsschema für das Vorkommen von Zellorganellen bei den Zellen der Sphäroiden	57
Tabelle 11:	Verwendete Proben für die PCR, Konzentrationen der RNA und Verdünnungen	58
Tabelle 12:	Verwendete Primer	59
Tabelle 13:	Isolierung, Epithelzellen aus der Ampulla	102
Tabelle 14:	Isolierung, Epithelzellen aus dem Isthmus	102
Tabelle 15:	Zellzählung nach Isolierung	105
Tabelle 16:	1. Passagierung der adhärenen Zellkulturen	105
Tabelle 17:	2. Passagierung der adhärenen Zellkulturen	106
Tabelle 18:	3. Passagierung der adhärenen Zellkulturen	106
Tabelle 19:	Vergleich der Kulturzusätze FBS und OCS	107
Tabelle 20:	Kulturreinheit	108
Tabelle 21:	Sphäroiden, Zellgrößen in $\mu\text{m}$	114
Tabelle 22:	Sphäroiden, Kerngrößen in $\mu\text{m}$	114
Tabelle 23:	Sphäroiden, Kern-Plasma-Verhältnis	114
Tabelle 24:	Anteil der ChromograninA positiven Zellen innerhalb der Sphäroiden	116
Tabelle 25:	Ki-67 positive Zellen bei BFPE-Sphäroiden im Durchschnitt pro Planquadrat	121
Tabelle 26:	Vorkommen von Zellorganellen in Sphäroiden	123
Tabelle 27:	Weitere intrazelluläre Charakteristika der Sphäroiden	123
Tabelle 28:	Sonstige Merkmale der Sphäroiden	123
Tabelle 29:	Werte der durchschnittlichen, normalisierten Expression von ER $\alpha$ und PR	134
Tabelle 32:	Auszählung der ER $\alpha$ und PR immunpositiven Zellkerne im Eileiterepithel	188
Tabelle 33:	Berechnungen zu den Anzahlen ER $\alpha$ und PR immunpositiver Zellkerne im Epithel	189
Tabelle 34:	Anzahlen Ki67 und Vimentin positiver Kerne und Anzahlen pyknotischer Kerne in den Sphäroiden	190

### 8.3 Verzeichnis über die Abbildungen und Graphiken

#### Abbildungen vom Eileiter ex vivo, Färbungen und Immunhistochemie

Abb. 1:	Dreidimensionale Faltenarchitektur des Eileiters, übernommen von Yaniz et al. (2000)	7
Abb. 2:	Veränderung der verschiedenen Eileitersegmente im Querschnitt, übernommen von El-Banna und Hafez (1970a)	10
Abb. 3:	HE-Färbung, Querschnitt durch die Ampulla	62
Abb. 4:	HE-Färbung, Querschnitt durch den Isthmus	62
Abb. 5:	HE-Färbung, Epithel der Ampulla im Östrus	63
Abb. 6:	HE-Färbung, Epithel des Isthmus im Östrus	63
Abb. 7:	Schema der Oberflächenveränderungen des Ampullaepithels während des Hormonzyklus sowie der Verlagerung der Zellkerne der sekretorischen Zellen.	64
Abb. 8:	HE-Färbung, Epithel der Ampulla im Östrus.	64
Abb. 9:	HE-Färbung, „Basale Zelle“ bzw. Leukozyt im Epithel der Ampulla.	64
Abb. 10:	HE-Färbung, einheitliche epitheliale Oberfläche der Ampulla im Östrus.	65
Abb. 11:	HE-Färbung, Epithel der Ampulla im Metöstrus.	65
Abb. 12:	HE-Färbung, Epithel der Ampulla im Diöstrus mit ausladenden kernhaltigen Protrusionen.	66
Abb. 13:	HE-Färbung, Epithel der Ampulla im Diöstrus mit tropfenförmigen Protrusionen.	66
Abb. 14:	HE-Färbung, das Epithel der Ampulla im Proöstrus weist kernhaltige Protrusionen auf.	67
Abb. 15:	HE-Färbung, das Epithel der Ampulla im Proöstrus mit kernhaltigen Protrusionen.	67
Abb. 16:	HE-Färbung, einige Falten des Infundibulums im Metöstrus.	68
Abb. 17:	HE-Färbung, Querschnitt der uterotubalen Verbindung im Metöstrus.	68
Abb. 18:	Goldner-Färbung, Ampulla.	69
Abb. 19:	Goldner-Färbung, Isthmus.	69
Abb. 20:	Goldner-Färbung, Falte in der Ampulla.	69
Abb. 21:	PAS-Reaktion, Epithel der Ampulla im Östrus.	70
Abb. 22:	PAS-Reaktion, Epithel des Isthmus im Östrus.	70
Abb. 23:	Alzianblaufärbung bei pH 2, 5, Ampulla, Metöstrus.	71
Abb. 24:	Alzianblaufärbung bei pH 1,0, Ampulla, Metöstrus.	71
Abb. 25:	Alzianblau positive Zellen in der bindegewebigen T. subserosa des Eileiters	72
Abb. 26:	Gomori-Silberimprägnation, Ampulla.	72
Abb. 27:	Gomori-Silberimprägnation, Epithel der Ampulla.	72
Abb. 28:	Nachweis von Panzytokeratin im Epithel der Ampulla.	74
Abb. 29:	Nachweis von Panzytokeratin im Epithel des Isthmus.	74
Abb. 30:	IHC-Nachweis von Panzytokeratin im Isthmus in der Übersicht.	75
Abb. 31:	Nachweis von $\alpha$ -SMA in einer Falte der Ampulla.	76

Abb. 32:	IHC-Nachweis von $\alpha$ -SMA, Vergrößerung.	76
Abb. 33:	IHC-Nachweis von $\alpha$ -SMA in einer Falte des Isthmus.	76
Abb. 34:	IHC-Nachweis von Vimentin in der Ampulla.	77
Abb. 35:	IHC-Nachweis von $\alpha$ -SMA in der Ampulla.	77
Abb. 36:	IHC-Nachweis von Vimentin im Isthmus.	77
Abb. 37:	IHC-Nachweis von $\alpha$ -SMA im Isthmus.	77
Abb. 38:	IHC-Nachweis von S 100 in der Ampulla.	78
Abb. 39:	IHC-Nachweis von S 100 im Isthmus.	78
Abb. 40:	IHC-Nachweis von Laminin in der Basalmembran des Eileiterepithels.	79
Abb. 41:	IHC-Nachweis von ChromograninA an den apikalen Zellpolen der zilientragenden Zellen.	80
Abb. 42:	IHC-Nachweis von ChromograninA. Vergrößerung des Epithels.	80
Abb. 43:	IHC-Nachweis des ER $\alpha$ in der Ampulla, Proöstrus.	82
Abb. 44:	IHC-Nachweis des ER $\alpha$ in der Ampulla, Östrus.	82
Abb. 45:	IHC-Nachweis des ER $\alpha$ in der Ampulla, Metöstrus.	82
Abb. 46:	IHC-Nachweis des ER $\alpha$ in der Ampulla, Diöstrus.	82
Abb. 47:	IHC-Nachweis des ER $\alpha$ im Isthmus, Proöstrus.	84
Abb. 48:	IHC-Nachweis des ER $\alpha$ im Isthmus, Östrus.	84
Abb. 49:	IHC-Nachweis des ER $\alpha$ im Isthmus, Metöstrus.	84
Abb. 50:	IHC-Nachweis des ER $\alpha$ im Isthmus, Diöstrus.	84
Abb. 51:	IHC-Nachweis des ER $\alpha$ . Kernhaltige Protrusionen.	85
Abb. 52:	IHC-Nachweis des ER $\alpha$ im Epithel des Isthmus.	85
Abb. 53:	IHC-Nachweis des PR in der Ampulla, Proöstrus.	87
Abb. 54:	IHC-Nachweis des PR in der Ampulla, Östrus.	87
Abb. 55:	IHC-Nachweis des PR in der Ampulla, Metöstrus.	87
Abb. 56:	IHC-Nachweis des PR in der Ampulla, Diöstrus.	87
Abb. 57:	IHC-Nachweis des PR im Isthmus, Proöstrus.	89
Abb. 58:	IHC-Nachweis des PR im Isthmus, Östrus.	89
Abb. 59:	IHC-Nachweis des PR im Isthmus, Metöstrus.	89
Abb. 60:	IHC-Nachweis des PR im Isthmus, Diöstrus.	89
Abb. 61:	IHC-Nachweis von Mitosen (Ki-67) mit dem MIB-1 Antikörper in der Ampulla, Östrus.	92
Abb. 62:	IHC-Nachweis von Mitosen (Ki-67) mit dem MIB-1 Antikörper in der Ampulla, Proöstrus.	92

### **Abbildungen vom Eileiter ex vivo, Elektronenmikroskopie**

Abb. 63:	Lymphozyt im Eileiterepithel der Ampulla.	94
Abb. 64:	Epithel der Ampulla im Östrus.	97
Abb. 65:	Elektronendichte, sekretorische Granula im apikalen Zytoplasma einer sekretorischen Zelle im Östrus.	98
Abb. 66:	Einander gegenüberliegende Epithelien der Ampulla im Östrus.	98

Abb. 67:	Metöstrus. Elektronendichte, sekretorische Granula sind in den Protrusionen enthalten.	98
Abb. 68:	Große Protrusion im Metöstrus.	98
Abb. 69:	Protrusionen im Metöstrus überschreiten die Ausdehnung der Zilien ins Lumen nicht.	99
Abb. 70:	Protrusionen im Metöstrus. Sekretorische Granula und Digiprints sind darin enthalten.	99
Abb. 71:	Epitheliale Oberfläche im frühen Diöstrus (Tag 6).	99
Abb. 72:	Früher Diöstrus. Ein membranumgrenztes Zellfragment über der apikalen Zellmembran enthält Zilienanschnitte.	100
Abb. 73:	Ein „digiprint“ in einer Protrusion des frühen Diöstrus scheint seinen Inhalt ans Lumen abzugeben.	100
Abb. 74:	Massive kernhaltige Protrusion einer sekretorischen Zelle im Diöstrus.	100
Abb. 75:	Protrusion einer zilientragenden Zelle beinhaltet Zilienteile.	100
Abb. 76:	Massive kernhaltige Protrusion einer sekretorischen Zelle im Proöstrus.	101
Abb. 77:	Protrusionen von sekretorischen Zellen sind im Proöstrus meist kernhaltig.	101
Abb. 78:	Vergrößerung einer kernhaltigen Protrusion im Proöstrus.	101

### **Abbildungen von Kulturzellen, Färbungen, Immunhistochemie**

Abb. 79:	Kulturtag 5. Eine Lebende Sphäroide in Suspensionskultur.	104
Abb. 80:	Kulturtag 5. Mehrere lebende Sphäroiden in Suspensionskultur.	104
Abb. 81:	Kulturtag 3, Nest adhärenter Zellen.	104
Abb. 82:	Kulturtag 7, Ausbildung eines konfluenten Zellrasens.	104
Abb. 83:	IHC-Nachweis von Panzytokeratin. Die Immunreaktion ist am Rand eines Zellnestes besonders intensiv.	108
Abb. 84:	IHC-Nachweis von Panzytokeratin. Adhärente Zellen, Mitosen.	108
Abb. 85:	IHC-Nachweis von Panzytokeratin. Adhärente Zelle, Anaphase.	108
Abb. 86:	IHC-Nachweis von Panzytokeratin. Das Zytoskelett lässt sich am Rand eines Zellnestes besonders deutlich darstellen.	108
Abb. 87:	IHC-Nachweis von Panzytokeratin. Übersichtsaufnahme.	109
Abb. 88:	IHC-Nachweis von Panzytokeratin. Alle Zellen einer Sphäroide sind Zytokeratin positiv.	109
Abb. 89:	IHC-Nachweis von S100. Kulturtag 7.	109
Abb. 90:	IHC-Nachweis von S100. Kulturtag 7.	109
Abb. 91:	IHC-Nachweis von Vimentin in Sphäroiden, Kulturtag 9.	110
Abb. 92:	IHC-Nachweis von Vimentin in Sphäroiden, Kulturtag 7, Isthmuskulturm.	110
Abb. 93:	HE-Färbung einer Sphäroide, Kulturtag 1.	113
Abb. 94:	HE-Färbung einer Sphäroide, Kulturtag 3.	113
Abb. 95:	HE-Färbung einer Sphäroide, Kulturtag 7.	113
Abb. 96:	HE-Färbung einer Sphäroide, Kulturtag 9.	113
Abb. 97:	HE-Färbung einer Sphäroide der Isthmuskulturen, Kulturtag 3.	113
Abb. 98:	HE-Färbung einer Sphäroide der Isthmuskulturen, Kulturtag 3.	113

	Atypische Sphäroide.	113
Abb. 99:	IHC-Nachweis von ChromograninA, Sphäroide der Isthmuszellkultur, Kulturtag 7.	117
Abb. 100:	IHC-Nachweis von ChromograninA, Sphäroide der Isthmuszellkultur, Kulturtag 3.	117
Abb. 101:	IHC-Nachweis von ChromograninA, Sphäroide der Isthmuszellkultur, Kulturtag 7.	117
Abb. 102:	IHC-Nachweis von ChromograninA, Sphäroide der Isthmuszellkultur, Kulturtag 7.	117
Abb. 103:	IHC-Nachweis des PR in der Kultur der Ampullaepithelzellen, Kulturtag 1.	118
Abb. 104:	IHC-Nachweis des PR in der Kultur der Ampullaepithelzellen, Kulturtag 3.	118
Abb. 105:	IHC-Nachweis des PR in der Kultur der Isthmusepithelzellen, Kulturtag 7.	119
Abb. 106:	IHC-Nachweis des PR in der Kultur der Isthmusepithelzellen, Kulturtag 3.	119
Abb. 107:	IHC-Nachweis von Caspase-3 in der Kultur der Isthmuszellen, Kulturtag 7.	119
Abb. 108:	IHC-Nachweis von Caspase-3 in der Kultur der Isthmuszellen, Kulturtag 7.	119
Abb. 109:	Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67 bei adhärenenten Zellen. Mitose, Metaphase.	120
Abb. 110:	Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67 bei einer Sphäroide.	120
Abb. 111:	IHC-Nachweis von Ki-67, Ampullazellkultur, Kulturtag 7.	122
Abb. 112:	IHC-Nachweis von Ki-67, Ampullazellkultur, Kulturtag 9.	122
Abb. 113:	IHC-Nachweis von Ki-67, Ampullazellkultur, Kulturtag 7. Vergrößerung.	122
Abb. 114:	IHC-Nachweis von Ki-67, Ampullazellkultur, Kulturtag 7, Mitose.	122

### **Abbildungen von Kulturzellen, Elektronenmikroskopie**

Abb. 115:	Kulturtag 7, Sphäroide.	124
Abb. 116:	Kulturtag 10. Zilientragende Zellen einer Sphäroide haben zusätzlich dichten Mikrovillibesatz.	125
Abb. 117:	Kulturtag 1, die sekretorischen Zellen enthalten viele, dichte sekretorische Granula.	126
Abb. 118:	Kulturtag 1, eine sekretorische Zelle mit elektronendichten sekretorischen Granula, Mitochondrien und granuliertem endoplasmatischen Retikulum.	126
Abb. 119:	Kulturtag 3, die sekretorischen Granula sind weniger dicht als am 1. Tag, aber zahlreich vorhanden.	126
Abb. 120:	Kulturtag 5, es sind nur vereinzelt sekretorische Granula vorhanden.	126
Abb. 121:	Kulturtag 7, benachbarte Zellen einer Sphäroide. Die Zellen haben eine hochprismatische Form.	127
Abb. 122:	Kulturtag 10, Zellen einer Sphäroide. Lediglich die apikal gelegenen „tight junctions“ halten benachbarte Zellen zusammen.	127
Abb. 123:	Kulturtag 10, polarisierte Sphäroide mit großen interzellulären Spalträumen.	128
Abb. 124:	Kulturtag 7. Atypische, membranumgrenzte Granula im Zytoplasma einer sekretorischen Zelle.	129
Abb. 125:	Kulturtag 7. Über der apikalen Zellmembran befindet sich ein membranumgrenztes Zellfragment, das Anschnitte von Zilien enthält.	130

## Graphiken zum bovinen Eileiter

Graphik 1:	Die Höhen des Epithels in $\mu\text{m}$ in der Ampulla und im Isthmus an vier verschiedenen Zyklustagen.	73
Graphik 2:	Graphische Darstellung der Anteile ER $\alpha$ positiver und stark positiver Zellen im Epithel der Ampulla.	83
Graphik 3:	Graphische Darstellung der Anteile ER $\alpha$ positiver und stark positiver Zellen im Epithel des Isthmus.	85
Graphik 4:	Graphische Darstellung der Expressionsstärke des ER $\alpha$ im Zyklusverlauf in Ampulla und Isthmus.	86
Graphik 5:	Graphische Darstellung der Anteile PR positiver und stark positiver Zellen im Epithel der Ampulla. Stark positive Zellen sind in der Ampulla kaum zu verzeichnen.	88
Graphik 6:	Graphische Darstellung der Anteile PR schwach positiver und stark positiver Zellen im Isthmus.	90
Graphik 7:	Graphische Darstellung der Expression des PR in Ampulla und Isthmus im Zyklusverlauf.	90
Graphik 8:	Graphische Darstellung der Anteile positiver Zellen (+ und ++) für ER $\alpha$ und PR (Mittelwerte der 3 Proben) mit den entsprechenden Standardabweichungen in der Ampulla zu vier verschiedenen Zykluszeitpunkten.	91
Graphik 9:	Graphische Darstellung der Anteile positiver Zellen (+, ++, +++) für ER $\alpha$ und PR (Mittelwerte der 3 Proben) mit den entsprechenden Standardabweichungen im Isthmus zu vier verschiedenen Zykluszeitpunkten.	91
Graphik 10:	Anzahl Vimentin positiver Zellen (pro Planquadrat) an vier Tagen der Ampullaepithelzellkultur.	111
Graphik 11:	Anzahl pyknotischer Zellkerne an vier Tagen der Ampullaepithelzellkultur.	115
Graphik 12:	Graphische Darstellung der Zahlen Ki-67-positiver Zellen an vier Kulturtagen.	121
Graphik 13:	Original - Amplifikationskurven des ER $\alpha$ und des Referenzgens 18s.	131
Graphik 14:	Original - Amplifikationskurven des PR (rechts) und des Referenzgens 18s.	131
Graphik 15:	Thermoprotokoll der Schmelzkurvenanalyse vom ER $\alpha$ -Amplifikat und vom Amplifikat des Referenzgens 18s.	132
Graphik 16:	Thermoprotokoll der Schmelzkurvenanalyse vom PR-Amplifikat und vom Amplifikat des Referenzgens 18s.	133

## 8.4 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b>	<b>Bezeichnung</b>
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
abs.	absolut
A. dest	Aqua destillata
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
BFPE	Bouin fixiert, in Paraffin eingebettet
biot.	biotinmarkiert
BOEC	bovine Oviduktepithelzellen
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C.häm.	Corpus hämorrhagicum
C.l.	Corpus luteum
cDNA	komplementäre DNA
contra	contralateral
Ct-Wert	trashhold cycle
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
E	Östrogen
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
ER $\alpha$	Östrogenrezeptor $\alpha$
ET-1	Endothelin-1
FBS	fetales bovines Serum
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSH	follikelstimulierendes Hormon
g	Gravitation, Erdbeschleunigung
OSG 85-97	oviduktspezifisches Glykoprotein 85-97 kDa
HMFG	Human milk fat globule
IHC	Immunhistochemie
ipsi	ipsilateral

IVF	In vitro Fertilisation
IVK	In vitro Kultur
IVP	In vitro Produktion
Konz.	Konzentration
L.	Lamina
LH	luteinisierendes Hormon
Lsg.	Lösung
min	Minuten
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
MZK	Muskelzellkerne
n	Anzahl
NTC	No template control (Kontrolle ohne Probenmaterial)
OCS	östrisches Kuhserum
OEC	Oviduktepithelzellen
OSG	Ovidukt spezifisches Glykoprotein
OT	Objektträger
P	Progesteron
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAS	Periodic-Acid-Schiff
PBS	Phosphatgepufferte Salzsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion
PG	Prostaglandin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandin F <sub>2α</sub>
PR	Progesteronrezeptor
RE	RNA Extraktion
rER	rauhes endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
SEM	Rasterelektronenmikroskop (Scanning electron microscop)
SMA (α-SMA)	Smooth-Muscle-Actin
sog.	sogenannt
T	Testosteron
T.	Tunica
Tab.	Tabelle

---

TCM 199	Tissue Culture Medium 199
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop
TGF	transforming growth factor
TRITC	Tetramethyl Rhodamin Isothiocyanat
U / min	Umdrehungen pro Minute
UTJ	uterotubale Verbindung
Verd.	Verdünnung
VIP	vasoaktives Peptid
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel
ZFR	Zentrifugenröhrchen

## 9 Anhang

### 9.1 Lösungen

#### Fixierung für die Lichtmikroskopie (zu 3.2.2):

• Bouin-Lösung:	Pikrinsäure (gesättigt und filtriert)	1500 ml
	Paraformaldehyd 35%	500 ml
	Eisessig	100 ml

#### Lösungen für die lichtmikroskopischen Färbungen (zu 3.2.3)

##### HE-Färbung:

• Eosin:	Stammlösung:	Eosin	2 g
		Aqua dest	198 ml
		Einige Tropfen Formol zur Haltbarkeit	
• Hämalaun:	Verdünnung:	Aqua dest.	600 ml
		Eosin-Stammlösung	60 ml
		Eisessig	8 Tropfen
		Aqua dest.	2000 ml
		Hämatoxylin	2 g
		Natriumjodat	100 g
		Kalialaun (chemisch rein)	100 g
		Chloralhydrat	100 g
		kristalline Zitronensäure	2 g

(Alle Substanzen Fa. Merck, Darmstadt)

##### Periodic-Acid-Schiff-Reaktion:

• wässrige Lösung Perjodsäure:	Perjodsäure	0,5 g
	Aqua dest.	100 ml
• Fuchsin-schwefelige Säure (Schiff'sches Reagenz)		
• SO <sub>2</sub> -haltige Spülflüssigkeit:	Leitungswasser	200 ml
	Kaliumpyrosulfid 10%	10 ml
	n-Salzsäure	10 ml
• n-Salzsäure:	konz. Salzsäure	
	Aqua dest.	ad 1000 ml
• Hämalaun (siehe oben)		

##### Trichromfärbung nach Masson und Goldner:

• Eisenhämatoxylin nach Weigert: (Lösungen A und B im Verhältnis 1:1)		
	Lösung A)	
	Hämatoxylin	1 g
	Ethanol 96%	100 ml

	Lösung B)	Eisen-3-Chlorid	1,16 g
		Aqua dest.	98 ml
• Azophloxin:		Azophloxin	0,5 g
		Aqua dest.	100 ml
		Eisessig	0,2 ml
• Phosphormolybdänsäure-Orange:		Phosphorwolframs.	3-5 g
		Aqua dest.	100 ml
		Orange G	2 g
• Lichtgrün:		Lichtgrün	0,1-0,2 g
		Aqua dest.	100 ml
		Eisessig	0,2 ml
• Essigsäure 1%			

Alcianblau:

- Essigsäure 3%
  - Kernechtrot
  - Alcianblau 8GX
 

Alcianblau 8GX	1 g
Essigsäure 3%	100 ml
- pH 2,5 oder pH 1 einstellen, Lösung filtrieren und Thymolkristall zusetzen.

Silberimprägnation nach Gomori:

- Ammoniakalische Silberlösung:
  1. Zu 10ml einer 10% Silbernitratlösung ( $\text{AgNO}_3$ ) setzt man 2ml 10% Kalilauge (KOH) zu. Es entsteht ein brauner Niederschlag.
  2. Der Niederschlag wird aufgelöst durch tropfenweises Pipettieren von Ammoniak ( $\text{NH}_3$ )
  3. Es wird tropfenweise  $\text{AgNO}_3$  zugegeben bis die dabei entstehenden Schlieren nur noch langsam verschwinden. Die Lösung ist nun klar und braun.
  4. Mit A. dest wird auf das doppelte Volumen aufgefüllt.
- 0,5% Kaliumpermanganatlösung ( $\text{KmnO}_4$ )
- 2% Kaliumdisulfatlösung ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ )
- 2% Eisenammoniumsulfatlösung (Eisenhämalaun,  $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ )
- Formol-Leitungswasser (1:9)
- 0,1% Goldchlorid ( $\text{AuHCl}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ )
- 1% Natriumthiosulfatlösung ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ )

Lösungen für die Elektronenmikroskopie (zu 3.2.5):

## A) Fixierungslösung nach Karnovsky

- 10% Paraformaldehyd-Lösung:
 

Paraformaldehyd	10 g
Aqua dest.	ad 100 ml
NaOH, 1M	bis zu 6 Trpf.
- Karnovsky-Stammlösung:
 

10% Paraformald.-Lsg	20 ml
----------------------	-------

	Cacodylat-Puffer, 0,2M	50 ml
	Kalziumchlorid, wasserfrei	0,05 g
→ Karnovskygebrauchslösung:	Karnovsky Stammlsg	10 ml
	Glutaraldehyd, 25%	1.37 ml
B) Kontrastierungslösung:		
• Osmiumtetroxid-Lösung, 2%:	Osmiumtetroxid, 4%	2 ml
	Cacodylat-Puffer, 0,1M	2 ml
• Kaliumferrocyanid-Lösung, 3%:	Kaliumferrocyanid	0,3 g
	Cacodylat-Puffer, 0,1M	ad 10 ml
→ Osmiumtetroxid (1%)-Kaliumferrocyanid (1,5%) in Cacodylat-Puffer, 0,1 M:	Osmiumtetroxid-Lösung, 2%	4 ml
	Kaliumferrocyanid-Lösung, 3%	4 ml
C) Cacodylat-Puffer:		
• Lösung A:	Na(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsO <sub>2</sub> × 3H <sub>2</sub> O	8,56g
	Aqua dest.	ad 200 ml
• Lösung B:	HCl 0,2M	
• → Cacodylat-Puffer 0,2 M, pH 7,2:	Lösung A	50 ml
	Lösung B	4,2 ml
	Aqua dest.	ad 100 ml
→ Cacodylat-Puffer 0,1 M, pH 7,2:	Cacodylat-Puffer 0,2 M	50ml
	Aqua dest.	50ml
D) Epon:		
• Poly/bed 812		16 ml
• DDSA		10 ml
• NMA		9 ml
• DMP-30		0,3 - 0,5 ml
E) Propylenoxid		
F) Bleicitrat-Lösung nach Reynolds:		
• Bleinitrat		1,33 g
• Na-Citrat		1,76 g
• H <sub>2</sub> O, CO <sub>2</sub> -frei		30 ml
→ erst 1 min stark schütteln, dann 30 min in 50ml Flasche schütteln		
• Na OH, 1molar		8ml
→ dann mit A. dest auf 50ml auffüllen, mischen bis alles gelöst ist.		
G) Uranylacetat		
• Poly/bed 812		16 ml
• DDSA		10 ml

- NMA 9 ml
- DMP-30 0,3 - 0,5 ml

## H) Propylenoxid

## I) Bleicitrat-Lösung nach Reynolds:

- Bleinitrat 1,33 g
- Na-Citrat 1,76 g
- H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>-frei 30 ml  
→ erst 1 min stark schütteln, dann 30 min in 50ml Flasche schütteln
- Na OH, 1molar 8ml  
→ dann mit A. dest auf 50ml auffüllen, mischen bis alles gelöst ist.

## J) Uranylacetat

Pufferlösungen (3.2.4 und 3.2.5):

- PBS-Puffer (Phosphat buffered saline):
 

NaCl:	42,5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O:	6,35 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O:	1,95 g

 → alles lösen in 5 Liter A. dest, dann pH 7,4 - 7,6 einstellen.
- Zitratpuffer:
 

Stammlsg A: C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> × H <sub>2</sub> O (Merck 244)	21,01g
lösen in 1 Liter A. dest	
Stammlsg B: Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> × 2H <sub>2</sub> O (Merck 6448)	29,41g
lösen in 1 Liter A. dest	

 → Gebrauchslösung: 9ml Lösung A und 41ml Lösung B ad 500ml
- TRIS-Puffer:
 

NaCl (Merck 6404):	43,9 g
TRIZMA-Hydrochlorid (Sigma T-3253)	34,25 g
TRIZMA-Base (Sigma T-1503)	4,5 g

 → alles lösen in 5 Liter A. dest, dann pH 7,4- 7,6 einstellen.

Lösungen für die immunhistochemischen Untersuchungen (zu 3.3.4 und 3.3.9) :

- DAB-Herstellung:
 

Stammlösung: PBS-Puffer	5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	15 µl
DAB-Lösung: A. dest.	60 ml
DAB-Tabletten	6 Stück

 → Von der Stammlösung 0,4 ml zur DAB-Lösung hinzufügen, gut mischen und filtern.

Medien für die Zellkultur (zu 3.3):

- Transport- und Spüllösung:
 

PBS	500 ml
Penicillin/ Streptomycin (Sigma, Deisenhofen)	5 ml
- Isoliermedium: TCM / Medium 199 (Sigma, Deisenhofen)

(Earle`s Salts, L-Glutamine, NaHCO<sub>3</sub>)

- Anzuchtmedium: TCM  
 + 10% FBS (GIBCO<sup>®</sup>, Invitrogen GmbH, Karlsruhe)  
 bzw. + 10% OCS(= oestrus cow serum)  
 + 1 % P/S (= Penicillin/Streptomycin)  
 evtl. + 5% Estradiol-17β (Sigma, Deisenhofen)

Fixierungslösungen für die Zellkultur:

- Bouin-Lösung (siehe oben)
- Formaldehyd 37%, PBS gepuffert
 

Formaldehyd, 37%	100 ml
PBS-Puffer (siehe oben)	900 ml
- Methanol-Aceton (1:1), eiskalt
- Aceton-Formaldehyd-Lösung, gepuffert
 

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20 mg
+ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100 mg
lösen in A. dest	30 ml
+ Aceton	45 ml
+ Formaldehyd (37%)	25 ml

## 9.2 Ergebnistabellen

Tabelle 30: Epithelhöhen 1. Teil, morphometrische Untersuchungen (zu 4.1.1)

Schnitt- nummer	Zyklusphase	Segment	Seite	4 Messungen, angegeben in Einheiten des Mebokulars				Mittelwert der Einzel- messungen	Mittelwert der Einzel- messungen in $\mu\text{m}$	Mittelwert eines Zyklus- stadiums und (Stabw.)	Bemerkung	
171/98	Proöstrus	Ampulla	ipsi	0,7	0,8	0,8	0,8	0,78	31			
33/99	Proöstrus	Ampulla	ipsi	0,7	0,7	0,7	0,8	0,73	29			
325/03	Proöstrus	Ampulla	ipsi	0,8	0,8	0,8	0,9	0,83	33	29,0 (3,6)		
834/03	Proöstrus	Ampulla	ipsi	0,85	0,8	0,8	0,8	0,81	33			
401/03	Proöstrus	Ampulla	ipsi	0,7	0,6	0,7	0,7	0,68	27			
87/04	Proöstrus	Ampulla	ipsi	0,6	0,7	0,75	0,6	0,62	26,5			
203/04	Proöstrus	Ampulla	ipsi	0,6	0,55	0,6	0,6	0,59	23,5			
28/99	Östrus	Ampulla	ipsi	1	0,9	1	0,9	0,95	38	39,8 (4,55)		
642/02	Östrus	Ampulla	ipsi	0,8	0,8	0,8	0,9	0,83	33			
614/02	Östrus	Ampulla	ipsi	1	1	1	1,1	1,03	41			
471-04	Östrus	Ampulla	ipsi	1	1,2	1,2	1,1	1,13	45			
470-04	Östrus	Ampulla	contra	1,1	1	0,9	1,2	1,05	42			
202/03	Metöstrus	Ampulla	ipsi	1,1	0,8	0,9	0,8	0,9	36	34,9 (2,8)		
494/03	Metöstrus	Ampulla	ipsi	0,9	0,8	0,8	1	0,88	35			
518/03	Metöstrus	Ampulla	ipsi	0,8	0,7	0,7	0,7	0,73	29			
858/03	Metöstrus	Ampulla	ipsi	0,9	0,8	0,9	0,9	0,88	35			
873/03	Metöstrus	Ampulla	ipsi	0,8	0,9	1	0,9	0,9	36			
862/03	Metöstrus	Ampulla	contra	0,8	1	0,8	0,9	0,88	35			
877/03	Metöstrus	Ampulla	contra	0,85	1	1	0,9	0,94	38			
490/02	Diöstrus	Ampulla	ipsi	0,6	0,6	0,5	0,6	0,58	23		25,2 (4,0)	gemessen ohne Protrusionen
699/02	Diöstrus	Ampulla	ipsi	0,5	0,5	0,4	0,5	0,48	19			
681/02	Diöstrus	Ampulla	ipsi	0,6	0,7	0,5	0,6	0,6	24			
887/03	Diöstrus	Ampulla	ipsi	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	28			
213/04	Diöstrus	Ampulla	ipsi	0,7	0,7	0,6	0,7	0,68	27,2			
892/03	Diöstrus	Ampulla	contra	0,8	0,7	0,8	0,7	0,75	30			

Tabelle 31: Epithelhöhen 2. Teil, morphometrische Untersuchungen (zu 4.1.1)

Schnitt- nummer	Zyklusphase	Segment	Seite	4 Messungen, angegeben in Einheiten des Meßokulars				Mittelwert der Einzel- messungen	Mittelwert der Einzel- messungen in µm	Mittelwert eines Zyklus- stadiums und (Stabw.)	
				0,9	0,8	0,8	0,9				
490/02	Diöstrus	Ampulla	ipsi	0,9	0,8	0,8	0,9	0,85	34	33,8 (2,6)	gemessen inclusive der Protrusionen
699/02	Diöstrus	Ampulla	ipsi	0,9	0,7	0,6	0,7	0,73	29		
681/02	Diöstrus	Ampulla	ipsi	0,9	1	0,8	0,8	0,88	35		
213/04	Diöstrus	Ampulla	ipsi	0,9	0,9	0,85	0,9	0,88	35,5		
887/03	Diöstrus	Ampulla	ipsi	0,8		0,9	0,8	0,83	33		
892/03	Diöstrus	Ampulla	contra	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	36		
170/98	Proöstrus	Isthmus	ipsi	0,7	0,6	0,65	0,7	0,66	26	24,2 (3,5)	
34/99	Proöstrus	Isthmus	ipsi	0,6	0,7	0,7	0,8	0,7	28		
86/04	Proöstrus	Isthmus	ipsi	0,55	0,6	0,55	0,6	0,58	23		
204/04	Proöstrus	Isthmus	ipsi	5,5	5	5	5	0,51	20		
25/99	Östrus	Isthmus	ipsi	0,8	0,7	0,8	0,9	0,8	32	33,6 (5,8)	
616/02	Östrus	Isthmus	ipsi	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	44		
644/02	Östrus	Isthmus	ipsi	1	1	0,9	0,9	7,8	31,2		
473/04	Östrus	Isthmus	ipsi	7,5	7	7,5	8	7,5	30		
472/04	Östrus	Isthmus	contra	8	8	7	8	7,8	31		
203/03	Metöstrus	Isthmus	ipsi	0,7	0,8	0,8	0,9	0,8	32	30,5 (3,9)	
495/03	Metöstrus	Isthmus	ipsi	0,8	0,8	0,8	0,7	0,78	31		
519/03	Metöstrus	Isthmus	ipsi	0,6	0,7	0,6	0,6	0,63	25		
859/03	Metöstrus	Isthmus	ipsi	1	0,8	0,8	0,8	0,85	34		
491/02	Diöstrus	Isthmus	ipsi	0,5	0,5	0,5	0,45	0,49	19,6	23,4 (2,8)	
700/02	Diöstrus	Isthmus	ipsi	0,6	0,6	0,5	0,6	0,58	23		
683/02	Diöstrus	Isthmus	ipsi	0,7	0,5	0,6	0,7	0,63	25		
212/04	Diöstrus	Isthmus	ipsi	0,7	0,6	0,7	0,6	0,65	26		

Tabelle 32: Auszählung der ER $\alpha$  und PR immunpositiven Zellkerne im Eileiterepithel

Schnitt- nummer	Zyklus- stadium.	Segment	AK	Anzahl '-- Zellen	Anzahl '+ Zellen	Anzahl '++ - +++ Zellen	Ges. Pos Zellen (+,++,+++)	Gesamt- anzahl Zellen
170-98	Proöstrus	Isthmus	PR	300	482	80	562	862
204-04	Proöstrus	Isthmus	PR	403	426	145	571	974
86-04	Proöstrus	Isthmus	PR	338	461	126	587	925
644-02	Östrus	Isthmus	PR	213	559	153	712	925
616-02	Östrus	Isthmus	PR	260	592	198	790	1050
473-04	Östrus	Isthmus	PR	182	453	182	635	817
874-03	Metöstrus	Isthmus	PR	222	440	143	583	805
519-03	Metöstrus	Isthmus	PR	156	534	248	782	938
859-03	Metöstrus	Isthmus	PR	210	517	240	757	967
683-02	Diöstrus	Isthmus	PR	339	320	30	350	689
212-04	Diöstrus	Isthmus	PR	138	395	177	572	710
700-02	Diöstrus	Isthmus	PR	512	466	66	532	1044
203-04	Proöstrus	Ampulla	PR	819	97	0	97	916
834-03	Proöstrus	Ampulla	PR	611	409	0	409	1020
401-03	Proöstrus	Ampulla	PR	648	234	0	234	882
642-02	Östrus	Ampulla	PR	511	475	29	504	1015
614-02	Östrus	Ampulla	PR	511	390	24	414	925
470-04	Östrus	Ampulla	PR	560	469	52	521	1081
858-03	Metöstrus	Ampulla	PR	671	207	0	207	878
873-03	Metöstrus	Ampulla	PR	634	492	10	502	1136
518-02	Metöstrus	Ampulla	PR	625	558	63	621	1246
681-02	Diöstrus	Ampulla	PR	504	343	0	343	847
699-02	Diöstrus	Ampulla	PR	707	234	5	239	946
213-04	Diöstrus	Ampulla	PR	777	320	0	320	1097
204-04	Proöstrus	Isthmus	ER	271	314	326	640	911
170-98	Proöstrus	Isthmus	ER	415	475	153	628	1043
86-04	Proöstrus	Isthmus	ER	493	434	115	549	1042
473-04	Östrus	Isthmus	ER	405	390	67	457	862
644-02	Östrus	Isthmus	ER	361	479	165	644	1005
616-02	Östrus	Isthmus	ER	339	493	125	618	957
863-03	Metöstrus	Isthmus	ER	266	316	393	709	975
519-03	Metöstrus	Isthmus	ER	372	491	239	730	1102
874-03	Metöstrus	Isthmus	ER	215	322	292	614	829
491-02	Diöstrus	Isthmus	ER	304	304	504	808	1112
700-02	Diöstrus	Isthmus	ER	536	206	409	615	1151
212-04	Diöstrus	Isthmus	ER	401	209	354	563	964
203-04	Proöstrus	Ampulla	ER	428	508	309	817	1245
401-03	Proöstrus	Ampulla	ER	483	496	406	902	1385
834-03	Proöstrus	Ampulla	ER	392	478	389	867	1259
614-02	Östrus	Ampulla	ER	458	474	158	632	1090
642-02	Östrus	Ampulla	ER	536	486	18	504	1040
470-04	Östrus	Ampulla	ER	557	444	22	466	1023
862-03	Metöstrus	Ampulla	ER	507	438	232	670	1177
877-03	Metöstrus	Ampulla	ER	297	404	309	713	1010
518-03	Metöstrus	Ampulla	ER	553	498	286	784	1337
892-03	Diöstrus	Ampulla	ER	656	536	161	697	1353
213-03	Diöstrus	Ampulla	ER	539	399	310	709	1248
681-02	Diöstrus	Ampulla	ER	455	468	316	784	1239

Tabelle 33: Berechnungen zur Anzahl ER $\alpha$  und PR immunpositiver Zellkerne im Epithel

Schnitt- nummer	AK	% '- Zellen	Mittel- wert	Stabw.	% '+ Zellen	Mittel- wert	Stabw.	% '++ - +++ Zellen	Mittel- wert	Stabw.	% ges. pos. Zellen	Mittel- wert	Stabw.
170-98	PR	34,8	37,6		55,9	49,8		9,3	12,6		65,2	62,4	
204-04	PR	41,4			43,7			14,9			58,6		
86-04	PR	36,5			3,4			49,8			6,1		
644-02	PR	23,0	23,4		60,4	57,4		16,5	19,2		77,0	76,6	
616-02	PR	24,8			56,4			18,9			75,2		
473-04	PR	22,3			1,3			55,4			2,7		
874-03	PR	27,6	22,0		54,7	55,0		17,8	23,0		72,4	78,0	
519-03	PR	16,6			56,9			26,4			83,4		
859-03	PR	21,7			5,5			53,5			1,8		
683-02	PR	49,2	39,2		46,4	48,9		4,4	11,9		50,8	60,8	
212-04	PR	19,4			55,6			24,9			80,6		
700-02	PR	49,0			17,1			44,6			5,9		
203-04	PR	89,4	74,3		10,6	25,7		0,0	0,0		10,6	25,7	
834-03	PR	59,9			40,1			0,0			40,1		
401-03	PR	73,5			14,8			26,5			14,8		
642-02	PR	50,3	52,5		46,8	44,1		2,9	3,4		49,7	47,5	
614-02	PR	55,2			42,2			2,6			44,8		
470-04	PR	51,8			2,5			43,4			2,4		
858-03	PR	76,4	60,8		23,6	37,2		0,0	2,0		23,6	39,2	
873-03	PR	55,8			43,3			0,9			44,2		
518-02	PR	50,2			13,8			44,8			11,8		
681-02	PR	59,5	68,4		40,5	31,5		0,0	0,2		40,5	31,6	
699-02	PR	74,7			24,7			0,5			25,3		
213-04	PR	70,8			7,9			29,2			8,1		
204-04	ER	29,7	38,9		34,5	40,6		35,8	20,5		70,3	61,1	
170-98	ER	39,8			45,5			14,7			60,2		
86-04	ER	47,3			8,8			41,7			5,6		
473-04	ER	47,0	39,4		45,2	48,1		7,8	12,4		53,0	60,6	
644-02	ER	35,9			47,7			16,4			64,1		
616-02	ER	35,4			6,5			51,5			3,2		
863-03	ER	27,3	29,0		32,4	38,6		40,3	32,4		72,7	71,0	
519-03	ER	33,8			44,6			21,7			66,2		
874-03	ER	25,9			4,2			38,8			6,1		
491-02	ER	27,3	38,5		27,3	22,3		45,3	39,2		72,7	61,5	
700-02	ER	46,6			17,9			35,5			53,4		
212-04	ER	41,6			10,0			21,7			4,8		
203-04	ER	34,4	33,5		40,8	38,2		24,8	28,3		65,6	66,5	
401-03	ER	34,9			35,8			29,3			65,1		
834-03	ER	31,1			2,0			38,0			2,5		
614-02	ER	42,0	49,3		43,5	44,5		14,5	6,1		58,0	50,7	
642-02	ER	51,5			46,7			1,7			48,5		
470-04	ER	54,4			6,5			43,4			1,9		
862-03	ER	43,1	37,9		37,2	38,2		19,7	23,9		56,9	62,1	
877-03	ER	29,4			40,0			30,6			70,6		
518-03	ER	41,4			7,4			37,2			1,6		
892-03	ER	48,5	42,8		39,6	36,5		11,9	20,7		51,5	57,2	
213-03	ER	43,2			32,0			24,8			56,8		
681-02	ER	36,7			5,9			37,8			4,0		

**Tabelle 34: Anzahl Ki67 und Vimentin positiver Kerne und Anzahl pyknotischer Kerne in den Sphäroiden**

Schnitt- nummer	Kultur- tag	AK/US	10 Planquadrate (Kantenlänge 0,2 mm x 0,2 mm)									Mittel- wert	Standartab- weichung	
20/04	1	Ki67	1	2	0	1	1						<b>1</b>	0,7
21/04	1	Ki67	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	<b>0,1</b>	0,3
22/04	1	Ki67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	0,0
23/04	3	Ki67	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	<b>0,2</b>	0,4
24/04	3	Ki67	5	2	0	0	5	0	3	0	0	0	<b>1,5</b>	2,1
25/04	3	Ki67	1	3	0	0	1	0	0	0	0	0	<b>0,5</b>	1,0
26/04	7	Ki67	6	6	10	4	1	9	9	6	5	7	<b>6,3</b>	2,7
27/04	7	Ki67	13	13	21	20	19	27	14	28	26	13	<b>19,4</b>	6,1
28/04	7	Ki67	28	25	16	14	29	18	25	16	17	18	<b>20,6</b>	5,5
29/04	9	Ki67	8	11	8	7	18	16	22	10	10	11	<b>12,1</b>	4,9
30/04	9	Ki67	7	12	22	19	11	9	9	4	11	14	<b>11,8</b>	5,4
31/04	9	Ki67	27	28	19	14	29	12	18	19	13	10	<b>18,9</b>	7,0
32/04	3	Ki67	5	0	1	0	4	4	1	6	1	0	<b>2,2</b>	2,3
33/04	7	Ki67	10	17	15	8	13	15	7	17	11	17	<b>13</b>	3,8
20/04	1	Vimentin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	0,0
21/04	1	Vimentin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	0,0
22/04	1	Vimentin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	0,0
23/04	3	Vimentin	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	<b>0,6</b>	0,5
24/04	3	Vimentin	3	0	5	1	2	2	3	4	2	0	<b>2,2</b>	1,6
25/04	3	Vimentin	0	2	5	1	4	5	4	0	0	3	<b>2,4</b>	2,1
26/04	7	Vimentin	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	<b>0,2</b>	0,4
27/04	7	Vimentin	5	2	7	3	7	6	8	2	4	2	<b>4,6</b>	2,3
28/04	7	Vimentin	10	8	5	5	10	6	7	9	11	9	<b>8</b>	2,2
29/04	9	Vimentin	8	12	14	7	9	19	15	0	6	10	<b>10</b>	5,3
30/04	9	Vimentin	0	1	5	1	2	7	5	7	0	0	<b>2,8</b>	2,9
31/04	9	Vimentin	6	3	6	8	6	9	5	6	6	3	<b>5,8</b>	1,9
32/04	3	Vimentin	0	0	2	0	0	1	1	0	0	0	<b>0,4</b>	0,7
33/04	7	Vimentin	6	7	12	8	13	8	8	16	5	21	<b>10,4</b>	5,1
20/04	1	pykn.Kerne	12	12	8	5	6	2	16	5	25	11	<b>10,2</b>	6,7
21/04	1	pykn.Kerne	13	30	10	7	8	10	13	22	25	17	<b>15,5</b>	7,8
22/04	1	pykn.Kerne	10	18	3	4	12						<b>9,4</b>	6,1
23/04	3	pykn.Kerne	27	90	56	44	115	70					<b>67</b>	31,9
24/04	3	pykn.Kerne	52	42	40	73	54	130	42	51	36	42	<b>56,2</b>	28,0
25/04	3	pykn.Kerne	83	66	71	73	74	47	63	64	39	68	<b>64,8</b>	13,0
26/04	7	pykn.Kerne	11	20	17	18	21	6	13	21	7	16	<b>15</b>	5,5
27/04	7	pykn.Kerne	16	17	23	30	17	21	5	18	34	17	<b>19,8</b>	8,0
28/04	7	pykn.Kerne	12	13	9	13	17	34	28	26	28	32	<b>21,2</b>	9,3
29/04	9	pykn.Kerne	33	28	37	21	17	34	28	26	28	32	<b>28,4</b>	6,1
30/04	9	pykn.Kerne	14	10	13	6	10	10	15	5	12	7	<b>10,2</b>	3,4
31/04	9	pykn.Kerne	4	5	11	5	5	7	8	12	5	3	<b>6,5</b>	3,0
32/04	3	pykn.Kerne	24	19	18	21	20	17	7	19	20	18	<b>18,3</b>	4,4
33/04	7	pykn.Kerne	60	37	56	47	36	52	28	67	58	41	<b>48,2</b>	12,5

Tabelle 35: Relative Quantifizierung der ER- $\alpha$  Expression bei den Zellen der Sphäroiden (real-time RT-PCR)

Weil	Beschreibung	Schwellenwert- Zyklus des zu untersuchenden Gens	Schwellenwert- Zyklus des Referenzgens	Normalisierte Expression des zu untersuchenden Gens	Mittelwert der normalisierten Expression (von den Triplets einer Probe)	Standard- abweichung des Mittelwertes der normalisierten Expression	Standard- abweichung in Prozent (%)
A1	Isolat, Ampullazellen	22,6	8,1	6,22902E-05			
A2		21,2	7,9	0,000138825	9,09E-05	2,49E-05	<b>27,36</b>
A3		21,9	7,9	8,69841E-05			
A4	Isolat, Isthmuszellen	22,3	8,7	0,00011362			
A5		21,9	8,6	0,000138825	1,36E-04	1,42E-05	<b>10,44</b>
A6		21,8	8,7	0,000158663			
A10	Tag 1, Ampullazellen	24,5	9,8	5,45019E-05			
A11		24,9	9,7	3,90294E-05	4,56E-05	3,80E-06	<b>8,33</b>
A12		24,8	9,8	4,46067E-05			
B1	Tag 1, Isthmuszellen	23	8,9	8,13646E-05			
B2		22,6	8,7	9,29916E-05	7,28E-05	1,11E-05	<b>15,26</b>
B3		23,2	8,4	5,09809E-05			
B4	Tag 1, Ampullazellen + Estradiol	25,7	9,5	2,00148E-05			
B5		25,4	9,1	1,87218E-05	2,00E-05	2,04E-06	<b>10,20</b>
B6		25,4	9,3	2,13971E-05			
B7	Tag 3, Ampullazellen	22,9	8,1	5,09809E-05			
B8		21,8	7,8	8,69841E-05	5,83E-05	1,42E-05	<b>24,39</b>
B9		22,8	7,8	4,46067E-05			
B10	Tag 3, Isthmuszellen	21,9	7,9	8,69841E-05			
B11		22	7,7	7,11914E-05	7,78E-05	3,87E-06	4,98
B12		21,9	7,7	7,61082E-05			
C1	Tag 3, Ampullazellen + Estradiol	24,7	7,7	1,17306E-05			
C2		24,3	8,4	2,44548E-05	1,81E-05	4,62E-06	<b>25,50</b>
C3		24,2	N/A				

Tabelle 36: Relative Quantifizierung der PR Expression bei den Zellen der Sphäroiden

Well	Beschreibung	Schwellenwert- Zyklus des zu untersuchenden Gens	Schwellenwert- Zyklus des Referenzgens	Normalisierte Expression des zu untersuchenden Gens	Mittelwert der normalisierten Expression (von den Triplets einer Probe)	Standard- abweichung des Mittelwertes der normalisierten Expression	Standard- abweichung in Prozent (%)
A1	Isolat,	25,50	8,60	1,25E-05			
A2	Ampulla- zellen	25,30	8,50	1,34E-05	1,79E-05	7,35E-06	<b>41,05</b>
A3		23,60	8,20	3,41E-05			
A4	Isolat,	25,40	9,30	2,14E-05			
A5	Isthmus- zellen	25,10	9,10	2,29E-05	2,34E-05	5,66E-06	<b>24,18</b>
A6		24,40	8,60	2,61E-05			
A10	Tag 1, Ampulla- zellen	26,70	9,90	1,34E-05			
A11		26,00	9,80	2,00E-05	1,83E-05	4,96E-06	<b>27,08</b>
A12		25,40	9,40	2,29E-05			
B1	Tag 1, Isthmus- zellen	24,30	9,10	3,90E-05			
B2		24,00	9,00	4,46E-05	3,99E-05	8,61E-06	<b>21,58</b>
B3		23,60	8,30	3,65E-05			
B4	Tag 1, Ampullaz. + Estradiol	26,70	9,90	1,34E-05			
B5		28,30	9,50	3,53E-06	8,98E-06	4,95E-06	<b>55,16</b>
B6		25,60	9,00	1,53E-05			
B7	Tag 3, Ampulla- zellen	24,20	9,10	4,17E-05			
B8		23,60	8,60	4,46E-05	5,33E-05	1,79E-05	<b>33,54</b>
B9		22,60	8,50	8,14E-05			
B10	Tag 3, Isthmus- zellen	23,40	9,10	7,12E-05			
B11		22,40	8,50	9,30E-05	7,12E-05	2,34E-05	<b>32,87</b>
B12		22,50	7,80	5,45E-05			
C1	Tag 3, Ampullaz. + Estradiol	25,20	8,90	1,87E-05			
C2		25,20	8,50	1,43E-05	1,87E-05	3,54E-06	<b>18,89</b>
C3		24,60	N/A				

---

## **Danksagung**

Mein größter Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie die stets gewährte freundliche Beratung und Betreuung bei der Anfertigung der Dissertation. Insbesondere möchte ich mich für den mir zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz bedanken, ohne den ich nicht die Möglichkeit gehabt hätte nach München umzuziehen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Katrin Berger, die mich bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Kulturzellen mit Rat und Tat sehr unterstützt hat und mich aus einigen Motivationstiefs gerettet hat, weil sie immer das Richtige zu sagen wusste.

Für das Gelingen der PCR hat Margit Vermehren ein ganz großes Dankeschön verdient. Ihre strukturierte Herangehensweise an neue Problemstellungen hat es mir überhaupt erst möglich gemacht, einige Hürden zu nehmen. Auch für die mir entgegengebrachte konstruktive Kritik bin ich sehr dankbar.

Weiter danke ich Christine Neumüller für die elektronenmikroskopischen Arbeiten und dafür, dass sie sich in vielen Situationen umgehend aller fachlichen und organisatorischen Themen angenommen hat.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. Schuster für die freundliche Einarbeitung und Betreuung in der Zellkultur bedanken.

Meiner Mitdoktorandin Rebecca Kenngott danke ich sehr für die vielen gemeinsamen Stunden am Schlachtband und den stets kollegialen Austausch bezüglich des Eileiters.

Allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern des Instituts für Tieranatomie II der LMU danke ich für das freundliche Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit im Rahmen des EMK-Projekts.

Dr. Susanne Jetschin hat für das Korrekturlesen der Arbeit und die geleistete Motivationsarbeit ein riesiges Dankeschön verdient.

Für die mentale Unterstützung bin ich Claudia Sellner sehr dankbar.

Steffi Kessner danke ich für das Brückenbauen zwischen mir und graphischen Darstellungen.

Ein ganz besonders herzlicher Dank geht an Matthias Stuck, weil er mich in den Hochzeiten dieser Arbeit ertragen hat. Darüber hinaus danke ich ihm sehr für das großartige Managen von diversen Hard- und Softwareproblemen und die Unterstützung bei der fotografischen Dokumentation der Arbeit.

Endlich habe ich hier die Möglichkeit meinen Eltern zu sagen, wie sehr ich Ihnen für die jahrelange, uneingeschränkte Unterstützung auf meinem Lebensweg danke. Trotz großer Entfernung waren sie auch während der Anfertigung der Doktorarbeit immer für mich da. Ganz besonders möchte ich meinem Vater für unzählige anregende Diskussionen und die mir gewährte Unterstützung in sämtlichen Lebensbereichen danken.

Lara bin ich dankbar für ihre unendliche Genügsamkeit und Geduld in den letzten Wochen.