

# MORPHOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG UND EX VIVO FUNKTIONSUNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS DES CHOLINERGEN SYSTEMS AUF DEN ZILIÄREN TRANSPORT IM EILEITER DER MAUS

**KATHARINA NOREIKAT**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und –Embryologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Betreuerin: Prof. Dr. S. Kölle**

**Morphologische Charakterisierung und ex vivo  
Funktionsuntersuchungen zum Einfluss des cholinergen Systems  
auf den ziliären Transport im Eileiter der Maus**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**KATHARINA NOREIKAT**

Tierärztin aus Neustrelitz

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter/in:

Prof. Dr. S. Kölle  
Prof. Dr. A. Wehrend

Tag der Disputation:

24.06.2009

## **Meinen Eltern**

---

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b>	<b>2</b>
2.1	Der Eileiter	2
2.1.1	Morphologie des Eileiters	3
2.1.2	Funktion des Eileiters	4
2.2	Der tubare Transport	5
2.2.1	Grundmechanismen des Transportes im Eileiter	5
2.2.2	Der ziliäre Transport	6
2.2.2.1	Zilienmorphologie	6
2.2.2.2	Ziliogenese im Eileiter der Maus	8
2.2.2.3	Metachronismus und Mechanismus der Propulsion	9
2.2.2.4	Zilienschlag und Zilienschlagfrequenz	11
2.3	Das non-neuronale cholinerge System	15
2.3.1	Nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR)	18
2.3.2	Muskarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChR)	21
2.3.2.1	Vorkommen und Funktion der verschiedenen Subtypen	23
2.3.2.2	Signaltransduktionsweg	24
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>26</b>
3.1	Material	26
3.1.1	Versuchstiere	26
3.1.2	Lösungen, Medien, Puffer	26
3.1.3	Verbrauchsmaterial	30
3.1.4	Pharmaka	30
3.2	Methoden	31
3.2.1	Präparation und Probenentnahme der Eileiter	31
3.2.2	Zyklusbestimmung	32
3.2.3	Verpaarung und Trächtignachweis	34
3.2.4	Histomorphologische Untersuchung des Gewebes	34
3.2.4.1	Anfertigung histologischer Paraffinschnitte	34
3.2.4.2	Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbeprotokoll	35
3.2.4.3	Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS)	36
3.2.4.4	Alcianblau-Färbung	37
3.2.4.5	Mikroskopische Auswertung	38

3.2.5	Bestimmung der relativen Häufigkeit von zilientragenden und sekretorischen Zellen im Eileiter	38
3.2.6	Immunhistochemie	39
3.2.6.1	Indirekte Immunhistochemie an Paraffinschnitten mittels Alexa Fluor 555 Labeling Kit	39
3.2.6.2	Mikroskopische Auswertung	41
3.2.7	Rasterelektronenmikroskopie	41
3.2.7.1	Probenaufbereitung	41
3.2.7.2	Kritisch-Punkt Trocknung	41
3.2.7.3	Sputtern	42
3.2.7.4	Mikroskopische Auswertung	42
3.2.8	Untersuchung der Zilienfunktion	42
3.2.8.1	Probenentnahme	42
3.2.8.2	Der Messstand	43
3.2.8.3	Messung der Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG)	45
3.2.8.4	Messung der Zilienschlagfrequenz (ZSF)	49
3.2.8.5	Digitale Auswertung	51
3.2.9	Statistische Auswertung	54
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>55</b>
4.1	Morphologie und Sekretion im Eileiter der Maus in Abhängigkeit vom Zyklusstadium und einer frühen Trächtigkeit	55
4.1.1	Morphologie und Sekretion im Eileiter	55
4.1.1.1	Grundaufbau	55
4.1.1.2	Veränderungen während des Zyklus	57
4.1.1.3	Veränderungen während der frühen Trächtigkeit und Lokalisation der Embryonen im Eileiter	58
4.1.2	Relative Häufigkeit zilientragender Zellen im Eileiter in Abhängigkeit vom Zyklusstand und einer frühen Trächtigkeit	65
4.1.3	Synthese und Sekretion von Mukopolysacchariden, Glycoproteinen und Glycogen	66
4.1.3.1	Synthese und Sekretion während des Zyklus	66
4.1.3.2	Synthese und Sekretion während der frühen Trächtigkeit	67
4.1.4	Synthese und Sekretion von sauren Mukopolysacchariden	70
4.1.4.1	Synthese und Sekretion während des Zyklus	70

4.1.4.2	Synthese und Sekretion während der frühen Trächtigkeit	71
4.2	Partikeltransportgeschwindigkeit und Zilienschlagfrequenz im Eileiter der Maus	76
4.2.1	Messungen der Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG)	76
4.2.1.1	Messungen der Partikeltransportgeschwindigkeit im Eileiter von Wildtyp-Mäusen	77
4.2.1.1.1	Die basale PTG in Ampulla und Isthmus sowie in Abhängigkeit vom Zyklusstand	77
4.2.1.1.2	Wirkung von Stimulantien auf die PTG in der Ampulla von Wildtyp-Mäusen	79
4.2.1.1.3	Wirkung von Agonisten und Antagonisten des cholinergen Systems auf die PTG in der Ampulla von Wildtyp-Mäusen	81
4.2.1.2	Transport von Embryonen sowie die basale PTG und die PTG unter Einfluss von Pharmaka im Eileiter von Wildtyp-Mäusen in der frühen Trächtigkeit	83
4.2.1.3	Messungen der PTG im Eileiter von Muskarinrezeptor-Knockout-Mäusen	87
4.2.1.3.1	Vergleich der basalen PTG bei Wildtyp- und Muskarinrezeptor-Knockout-Mäusen	87
4.2.1.3.2	Einfluss von ATP auf die PTG von M1-, M3-, M4- und M5-Knockout-Mäusen	89
4.2.1.3.3	Einfluss von Atropinsulfat auf die PTG von M1-, M3-, M4- und M5-Knockout-Mäusen	91
4.2.1.4	Basale PTG und Einfluss von ATP und Atropinsulfat auf die PTG in der Trachea	91
4.2.2	Messungen der Zilienschlagfrequenz (ZSF)	93
4.2.2.1	Zilienschlagfrequenz im <i>Eileiter</i> : Basisfrequenz und Einfluss von ATP	93
4.2.2.2	Zilienschlagfrequenz in der <i>Trachea</i> : Basisfrequenz und Einfluss von ATP	94
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>96</b>
5.1	Morphologische Besonderheiten des Eileiters der Maus und deren Bedeutung	96



5.2	Synthese und Sekretion im Eileiter der Maus: Einfluss des Eileiterabschnittes sowie des Zyklusstandes und einer frühen Trächtigkeit	99
5.3	Mukoziliäre Clearance und Einfluss des cholinergen Systems im Eileiter der Maus	102
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>110</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>112</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>114</b>
<b>9</b>	<b>Erklärung</b>	<b>126</b>
<b>10</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>127</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung</b>	<b>128</b>

**Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen**

Abb	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AK	Antikörper
AOI	Area of interest
ATP	Adenosintriphosphat
BChE	Butyrylcholinesterase
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl	Calciumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CarAT	Carnithinacetyltransferase
CBF	ciliary beat frequency
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
ChAT	Cholinacetyltransferase
ChT1	Cholintransporter 1
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cP	Zentipoise
C-Terminal	carboxy-terminales Ende
d	Distanz
DAG	Diacylglycerin
EGF	epidermal growth factor
g	Gramm
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes-Protein
GABA <sub>A+C</sub>	γ-Aminobuttersäure A+C
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Hydrogencarbonat
HE	Hämatoxylin Eosin

---

H <sub>2</sub> O	Wasser
5-HT	5-Hydroxy-Tryptamin (Serotonin)
Hz	Hertz
IFT	intraflagellärer Transport
IGF I+II	Insulin growth factor I+II
IgG	Immunglobulin G
IHC	indirekte Immunhistochemie
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
J	Joule
K <sup>+</sup>	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	Knock-out
l	Liter
M1-5	Muskarinrezeptoruntereinheit 1-5
mA	Milliampere
MgCl	Magnesiumchlorid
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
ms	Millisekunde
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µPIV	Micro Particle Imaging Velocimetry
M. trachealis	Muskulus trachealis
MW	Mittelwert
M1 <sup>-/-</sup>	muskarinischer Rezeptor 1 Knock-out
M3 <sup>-/-</sup>	muskarinischer Rezeptor 3 Knock-out
M4 <sup>-/-</sup>	muskarinischer Rezeptor 4 Knock-out
M5 <sup>-/-</sup>	muskarinischer Rezeptor 5 Knock-out
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NaCl	Natriumchlorid

---

$\text{Na}_2\text{CO}_3$	Dinatriumcarbonat
$\text{NaHCO}_3$	Natriumhydrogencarbonat
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Natriumdihydrogenphosphat
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Dinatriumhydrogenphosphat
$\text{NaN}_3$	Natriumazid
$\text{NaOH}$	Natrumhydroxid
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
nN	Nanonewton
NO	Stickstoffmonoxid
N-Terminal	aminoterminales Ende
OCT	organic cation transporter
OT	Objektträger
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PAS	Periodic Acid Schiff- Reaktion
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCD	primäre ziliäre Dyskinesie
PFA	Paraformaldehyd
$\text{PGF}_{2\alpha}$	Prostaglandin F <sub>2</sub> $\alpha$
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PTG	Partikeltransportgeschwindigkeit
PTS	particle transport speed
$\text{P}_2\text{Y}_2$	purinerges Rezeptor
Rac	Ras-related C3-botulinum toxin substrate 1
Ras	rat sarcoma
Rho	Ras homology
SEM	Standard error of the mean
t	Zeit
Tab	Tabelle
$\text{TGF-}\alpha+\beta$	Transforming growth factor $\alpha+\beta$
v	Geschwindigkeit
VAcHT	vesikulärer Acetylcholintransporter
ZSF	Zilienschlagfrequenz

## 1 Einleitung

Der Transport im Eileiter erfolgt durch die Peristaltik der glatten Muskulatur, durch den Zilienschlag sowie den Flüssigkeitsstrom innerhalb des Lumens. Für die Eizelle ist ein korrekt ablaufender Transport essenziell, um eine erfolgreiche Befruchtung zu gewährleisten. Weiterhin ist ein zeitgenauer und präziser Transport des Embryos für seine Weiterentwicklung und für die Erlangung der Fähigkeit zur Implantation von großer Bedeutung. Der Einfluss der ziliären Aktivität auf den Keimtransport und die Regulation des Zilienschlages ist weitgehend ungeklärt. Bekannt ist, dass Zilien, die unter physiologischen Bedingungen mit einer geringen Frequenz schlagen oder sich in einer Ruhephase befinden, in Abhängigkeit einer Vielzahl von Rezeptorvermittelten Stimuli ihre Aktivität dramatisch verändern können. Im Atmungstrakt konnte gezeigt werden, dass Acetylcholin (ACh), das seine Wirkung sowohl über nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR) wie auch über muskarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChR) vermittelt, die Aktivität der Kinozilien beeinflusst. Die Tatsache, dass im Eileiter der Maus zwar ACh jedoch keine cholinergen Nervenfasern nachgewiesen werden konnten, führen zu der Hypothese, dass im Eileiter der Maus ein epitheliales non-neuronales cholinerges System vorhanden ist. Ein möglicher Einfluss des cholinergen Systems auf die Regulation der Zilienaktivität im Eileiter und damit auf einen Teil des Transports sollte in dieser Arbeit näher untersucht werden. Dazu wurden die Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG) und die Zilienschlagfrequenz (ZSF) im Eileiter von Wildtyp-Mäusen (nicht trächtig und trächtig) sowie von mAChR-Knockout-Mäusen für die Untereinheiten (M1, M3, M4, M5) unter Zugabe von Agonisten und Antagonisten der cholinergen Rezeptoren mit Hilfe eines neu etablierten digitalen videomikroskopischen Analysesystems untersucht. Auf diese Weise sollten beteiligte Rezeptoren genauer charakterisiert und ein lokaler bzw. generalisierter hormoneller Einfluss auf die Zilienaktivität erforscht werden. Zur vergleichenden Darstellung der Regulation zilientragender Systeme wurden Tracheaprobe in die Untersuchung mit einbezogen. Die Ergebnisse der videomikroskopischen Untersuchung wurden mit histomorphologischen und rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen korreliert.

## 2.1 Der Eileiter

### 2.1.1 Morphologie des Eileiters

Der Eileiter (Tuba uterina) besteht aus 4 anatomisch verschiedenen Regionen. Von kranial nach kaudal können das Infundibulum, die Ampulla, der Isthmus und der utero-tubare Übergang unterschieden werden (Menezo und Guerin, 1997). Diese Abschnitte besitzen grundsätzlich den gleichen Wandaufbau, der durch die innen gelegene Tunica mucosa, die sich anschließende Tunica muscularis, bestehend aus sowohl longitudinal als auch zirkulär orientierten Muskelfasern, der Tela subserosa und der äußeren Tunica serosa charakterisiert ist (Liebich 2004). Die Tunica mucosa setzt sich des weiteren aus der Lamina propria mucosae und dem Epithelium mucosae, welches mit der Eileiterflüssigkeit in Kontakt steht, zusammen (Liebich 2004). Prinzipiell ist das Eileiterepithel aus zwei Hauptzelltypen, den zilientragenden Zellen und den sekretorischen Zellen aufgebaut (Umezumi und Tomooka, 2004). Diese besitzen eine hochprismatische Form (Liebich 2004). Zusätzlich treten vereinzelt sogenannte Stiftchenzellen (Drüsenzellen, die ihr Sekret bereits abgegeben haben), und Basalzellen, die als Reservezellen dienen, auf (Liebich 2004). Bei den meisten Tierarten, so auch bei Ziege, Rind, Schwein, Hund und Maus, können in Abhängigkeit vom Zyklusstadium Veränderungen in der relativen Zellzahl bzw. in der Zellform nachgewiesen werden. Besonders im Bereich der Ampulla ist zum Zeitpunkt der Lutealphase eine geringere Anzahl an zilientragenden Zellen im Vergleich zur Follikelphase nachweisbar. Weiterhin wird eine Abnahme der Zellhöhe beschrieben (Abe et al. 1999; Abe und Oikawa, 1993; Abe und Hoshi, 2007; Steinhauer et al. 2004; Morita et al. 1997). Morita et al. (1997) konnten am Eileiter der Maus zeigen, dass sekretorische Zellen im Östrus zu  $76,6 \pm 8,6\%$ , im Metöstrus zu  $> 90\%$ , im Diöstrus zu  $23,9 \pm 3,9\%$  und im Proöstrus zu  $33,2 \pm 2,2\%$  vorkommen. Das **Infundibulum**, auch Tubentrichter genannt, ist an seiner abdominalen Öffnung mit sogenannten Fimbrien, den Eileiterfransen, versehen. Einige von ihnen sind mit dem Ovar verwachsen, so dass eine konstante Verbindung zwischen Eileiter und Ovar besteht (Nickel et al. 2004). Die Mukosa des Infundibulums ist im Bereich des Ostium abdominale einfacher aufgebaut als in seinem engeren in Richtung Ampulla gerichteten Teil, der durch eine Vielzahl an longitudinalen Primärfalten, welche stark mit zilientragenden Zellen besetzt sind, gekennzeichnet ist (Yaniz et al. 2000; Yaniz et al. 2006). Gegenüber der prominent ausgebildeten Mucosa ist die Tunica

muscularis sehr schwach ausgebildet (Eurell und Frappier, 2006). Der Aufbau des distalen Abschnittes des Infundibulums setzt sich bis in die **Ampulla** fort. Die stark ausgeprägten Primärfalten weisen in dieser Eileiterregion zusätzliche Querverbindungen zueinander auf (Yaniz et al. 2000; Yaniz et al. 2006) und verlieren in ihrem Verlauf in Richtung des Isthmus an Höhe. Auch hier ist die Muskulatur nur schwach ausgebildet (Eurell und Frappier, 2006). Der sich an die Ampulla anschließende **Isthmus** ist durch ein enges Lumen, flache Longitudinalfalten und eine stark ausgeprägte Muskulatur gekennzeichnet (Nickel et al. 2004; Liebich 2004; Yaniz et al. 2000; Yaniz et al. 2006). Zusätzlich zu den morphologischen Charakteristika im Isthmus können im **utero-tubaren Übergang** Krypten gefunden werden, die vermutlich als Spermienreservoir dienen (Yaniz et al. 2000; Yaniz et al. 2006). Der Eileiter mündet, bei Hund und Pferd eine Papille bildend, mit dem Ostium uterinum tubae in das Uterushorn (Nickel et al. 2004).

#### Besonderheiten bei der Maus

Der Eileiter der Maus bildet im Gegensatz zu den leichten Windungen anderer Tierarten (Nickel et al. 2004) zahlreiche zu einem Knäuel gelagerte Schlingen (Jung 1962) und besitzt eine sehr hohe Transparenz (Suarez 1987). Im Gegensatz zu den Haussäugetieren und den dort ausgebildeten Fimbrien wird er durch das Ligamentum ovarii proprium an das Ovar herangeführt (Jung 1962) und ragt mit dem Infundibulum in den Peritonealraum (Jung 1962). Die Morphologie des Infundibulums ist individuell und auch zwischen linkem und rechten Eileiter verschieden (Wen und Chen, 2004). Das Infundibulum kann in eine Kopfregion mit ziliärer Krone und in einen sich anschließenden engeren Abschnitt unterteilt werden. Die Kopfregion des Infundibulums einer ovulierenden Maus erscheint geschwollen und mit einer zentralen Öffnung, die von Falten, welche die Krone bilden, umgeben ist. Die äußere Oberfläche der Kronenfalten und die inneren Linien der Eileiterwand haben die gleiche morphologische Charakteristik, da die äußeren Falten Ausstülpungen der inneren Eileiteroberfläche darstellen (Wen und Chen, 2004). Das Infundibulum weist die höchste Anzahl an zilientragenden Zellen auf. Diese nimmt in den distalen Abschnitten des Eileiters stark ab, so dass diese im Isthmus nur noch vereinzelt zu finden sind (Suarez 1987). Die Ampulla ist der transparenteste Abschnitt im Eileiter der Maus (Suarez 1987) und besitzt ein weites Lumen (Jung 1962). Der Isthmus stellt ein enges und kaum zilientragendes Rohr dar (Bedford et al. 1997), welches

Invaginationen oder Falten, die zirkulär orientiert sind, besitzt (Suarez 1987). Die Epithelzellen nehmen im Vergleich zur Ampulla an Größe zu und haben eine prismatische Form (Jung 1962). Der utero-tubare Übergang weist anstelle von Zirkulärfalten longitudinale Invaginationen der epithelialen Wand auf, die im Vergleich zur Ampulla eher flach sind (Suarez 1987). Der Eileiter mündet, eine Papille – den Colliculus tubarius – bildend, mit dem Ostium uterinum tubae in den Uterus (Jung 1962).

### 2.1.2 Funktion

Der Eileiter spielt eine essenzielle Rolle in der Reproduktionsphysiologie. Er dient zunächst der Aufnahme der Eizelle in das Eileiterlumen, welche durch einen komplexen Prozess bestehend aus dem Zilienschlag der Zilien im Bereich des Infundibulums und der Adhäsion zwischen Oocyten-Cumulus-Komplex und dem Eileiterepithel realisiert wird (Lam et al. 2000). Der Oocyten-Cumulus-Komplex wird durch den Zilienschlag in die Eileiteröffnung transportiert und unterzieht sich dort einem Prozess zur Verdichtung, die die eigentliche Aufnahme in den Eileiter ermöglicht (Talbot et al. 1999). Weiterhin erfolgt in der Ampulla die Befruchtung der Eizelle, welche anschließend durch den Eileiter zum Uterus transportiert wird. Um eine Polyspermie zu vermeiden, eine geeignete Mikroumwelt für die Kapazitation der Spermien bereitzustellen und sicherzustellen, dass eine ausreichende Anzahl an Spermien für die Befruchtung zur Verfügung steht, kann bei dem meisten Tierarten ein Spermienreservoir im kaudalen Bereich des Isthmus nachgewiesen werden (Lefebvre et al. 1995; Leese et al. 2001; Suarez und Pacey, 2006). Eizelle, Spermien und die Zygote werden mit den notwendigen Nährstoffen, die für die Maturation sowie das Wachstum und die Entwicklung wichtig sind, über die Eileiterflüssigkeit versorgt (Morita et al. 1997). Die Funktionen werden durch Hormone des Ovars (z.B. PGF2 $\alpha$ , Progesteron, Östrogen), der Hypophyse (Oxytocin) sowie des Hypothalamus reguliert (Kim et al. 2002; Hulten et al. 2000; Osada et al. 1999; Bodkhe und Harper 1972).



## **2.2 Der tubare Transport**

### 2.2.1 Grundmechanismen des Transportes im Eileiter

Die Grundmechanismen des im Eileiter stattfindenden Transportes von Eizelle und Embryo umfasst die ziliäre wie auch muskuläre Aktivität, die Flüssigkeitsströmung innerhalb des Eileiterlumens sowie Druckdifferenzen zwischen den Eileiterabschnitten (Blake et al. 1983; Bourdage und Halbert, 1984). Reguliert wird der Transport durch systemische und ovarielle Hormone sowie durch Signale und Substanzen, die durch die Kopulation freigesetzt und von der Zygote abgegeben werden (Croxatto 2002; Spilman et al. 1978). Einen lokalen Einfluss sowohl von Eizelle als auch von Embryonen auf den Transport im Eileiter konnten Ortiz et al. (1986 und 1989) an Eileitern von Hamster und Ratte aufzeigen. Auf welchen der genannten Mechanismen Eizellen oder Embryonen regulierend einwirken, wurde anhand dieser Studien jedoch nicht deutlich. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte noch nicht genau geklärt werden, ob die ziliäre oder die muskuläre Aktivität eine größere Bedeutung für den Transport im Eileiter besitzt. Nach Untersuchungen von Halbert et al. (1989), die nach einer Blockierung der Muskelaktivität mit Isoproterenol eine unveränderte Transportrate von Eizellen im Eileiter der Ratte nachgewiesen haben, scheint die ziliäre Aktivität nicht nur für die Aufnahme der Eizelle, sondern auch für den Transport bis in den Uterus die tragende Rolle zu spielen. Untersuchungen am Eileiterepithel einer an „Primärer ziliärer Dyskinesie“ (PCD) erkrankten infertilen Frau durch Halbert et al. (1997) zeigen, dass bei einer physiologischen Anzahl von Zilien auf den Zellen die Mehrheit der zilientragenden Regionen keine Aktivität bzw. dyskinetische Bewegungen mit herabgesetzter Zilienschlagfrequenz (ZSF) aufweisen. Dennoch können z.B. Frauen die an PCD erkrankt sind auch fertil sein (Mc Comb et al. 1986). Dies bedeutet, dass die ziliäre Bewegung nicht essenziell für die weibliche Fertilität ist (Afzelius et al. 1978) und dementsprechend die Muskulatur eine größere Bedeutung für den tubaren Transport besitzen muss.

So spricht auch die stark hormonell regulierte Muskelaktivität (lokal bzw. generalisiert) für eine hohe Beteiligung der Muskulatur an dem Transport von Eizelle und Embryonen. Spilman et al. (1978) gehen nach Untersuchungen am Eileiter des Kaninchens davon aus, dass präovulatorische Steroidspiegel eine Erhöhung der Amplitude von Kontraktionen im Isthmus verursachen, um so die Passage von

unfertilisierten Eizellen durch den Eileiter zu verhindern. Im Gegensatz dazu führt ein postovulatorischer Anstieg des Progesteronspiegels zu einer Abnahme der Eileitermotilität und ermöglicht dadurch den Transport der Eizelle durch den Isthmus in den Uterus. Nach Angaben von Boling und Blandau (1971) ist die Muskulatur des Eileiters in Gegenwart einer physiologischen Östrogenkonzentration allerdings minimal aktiv und nimmt erst zu, wenn der Östrogenspiegel fällt. Aufgrund der stark konträren Ergebnisse dieser Arbeitsgruppen wird ersichtlich, dass ein weiterer Bedarf an Untersuchungen hinsichtlich des Transportes im Eileiter besteht.

## **2.2.2 Der ziliäre Transport**

### 2.2.2.1 Zilienmorphologie

Zu unterscheiden sind motile von primären Zilien (Eley et al. 2005). Während die motilen Zilien eine charakteristische Konfiguration von 9 + 2 (9 periphere Dubletten mit einem zentralen Paar) aufweisen, fehlt den primären Zilien (9 + 0) das zentrale Paar (Dustin 1984). Zilien haben im Allgemeinen eine Länge von 5-10  $\mu\text{m}$ , welche unter genetischer Kontrolle liegt. Das tubuläre Zytoskelett (auch Axonem genannt) ist von einer speziellen Ausstülpung der Zellmembran umgeben (Satir und Sleight, 1990). Die 9 äußeren Mikrotubuli-Dubletten umgeben die zwei zentralen Mikrotubuli, welche aus 13 Untereinheiten aufgebaut sind (Dustin 1984), in einer 40° bzw. neunfachen radiären Symmetrie (Warner und Satir, 1974). Sie bestehen aus einem A-Tubulus (zusammengesetzt aus 13 Protofilamenten) und einem B-Tubulus (zusammengesetzt aus 10 oder 11 Protofilamenten) (Satir und Sleight, 1990). Die Tubuli werden hauptsächlich von Dimeren aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin gebildet (Suprenant et al. 1985). Man unterscheidet 2 Typen von Verbindungen, die die Tubuli zu einem funktionierenden Axonem werden lassen; radiäre und periphere (Satir und Sleight, 1990). Radiäre Verbindungen werden als Radiärspeichen bezeichnet und kommen in 3er Gruppen mit einem Abstand von 86 nm entlang des A-Tubulus vor. Sie stellen mittels ihres Kopfes eine Verbindung mit der Umhüllung des zentralen Tubulus-Paares her. Sie besitzen eine links-helikale Struktur sowie einen Neigungswinkel von 40° im Kopfbereich und 30° in ihrer Basisregion (Warner und Satir, 1974). Zusätzlich zu den Radiärspeichen gibt es „Nexin“, eine hoch elastische Verbindung mit einer

Periodizität von 96 nm, welches die zentripedale Seite von jeder Dublette mit der darauf folgenden verbindet (Gibbons 1981). Weiterhin gibt es zur Stabilisierung sowie zur Bewegung des Axonems noch so genannte Dynein-Arme. Diese kommen in zwei Formen, äußere Dynein-Arme und innere Dynein-Arme, vor (Satir und Christensen, 2008). Sie stellen multiproteinelle Strukturen dar, bei welchen ATPase Isoenzyme, Dynein genannt, die funktionelle Hauptkomponente darstellen. Sie sind an den A-Tubulus angeheftet (Satir 1980) und gehen mit dem B-Tubulus nur unter Anwesenheit von ATP eine Verbindung ein. Die Dynein-Arme sind alle in Richtung der Zilienbasis in einem Winkel von  $32^\circ$  orientiert (Warner und Mitchell, 1978). Jedes Dyneinmolekül kann bei einer durchschnittlichen Größe von 50 nm über 50 ATP Moleküle pro Sekunde hydrolysieren (Cosson 1996).

Die Organisation der Tubuli verändert sich von der Basis zur Spitze (Anderson 1972). An der Zilienspitze vereinfachen sich die Dubletten und ausschließlich die 9 A-Tubuli verbinden sich mit einer Platte, um an der zytoplasmatischen Oberfläche einen Transmembrankomplex, die „ziliäre Krone“, zu bilden (Satir und Sleight, 1990). Im Halsbereich der Zilie, unterhalb der Basalplatte, wird kurz vor der Verbindungsstelle von ziliärer Membran und Zellmembran eine drastische Differenzierung der ziliären Membran, die „ziliäre Halskette“, deutlich. Sie besteht aus 3 Einzelsträngen, welche in ihrer Anzahl variieren können, mit übereinander gelagerten Membranpartikeln und ist gegen die Zellmembran gerichtet. Die intramembranären Partikel (stellen eventuell Mechanoenzyme dar) und die Dubletten der Zilie sind über so genannte „Champagner Glas Ausläufer“ miteinander verbunden (Gilula und Satir, 1972). An der Basis der Zilie befindet sich der Basalkörper, welcher aus einem neunfachen Triplet-Set (Anderson 1972), bestehend aus einem vollständigen A-Tubulus, sowie einem unvollständigem B- und C-Tubulus (Eley et al. 2005), aufgebaut ist. Die Triplets verlaufen in einer Linksneigung ( $10-15^\circ$ ) zur Longitudinalachse von der Basis zur Spitze des Basalkörpers (Anderson 1972), wobei der C-Tubulus in der Übergangszone vom Basalkörper zum Schaft endet. In dem oberen Bereich dieser Übergangszone endet bzw. beginnt das zentrale Tubuluspaar der Zilie (Gibbons 1981). Die Orientierung der Zilie wird durch die Basalkörper-Anhänge (Basalfuß und die Wurzelfasern) vorgegeben (Guirao und Joanny, 2007). Der Basalfuß stellt einen Kegel dar, welcher an seiner Basis mit 2 oder 3 der Triplets verbunden ist. Die sich Richtung Zytoplasma verjüngenden

Wurzelfasern sind longitudinal orientiert und in amorphes Material eingebettet (Anderson 1972). Der Aufbau einer Zilie ist schematisch in der Abb. 1 dargestellt.

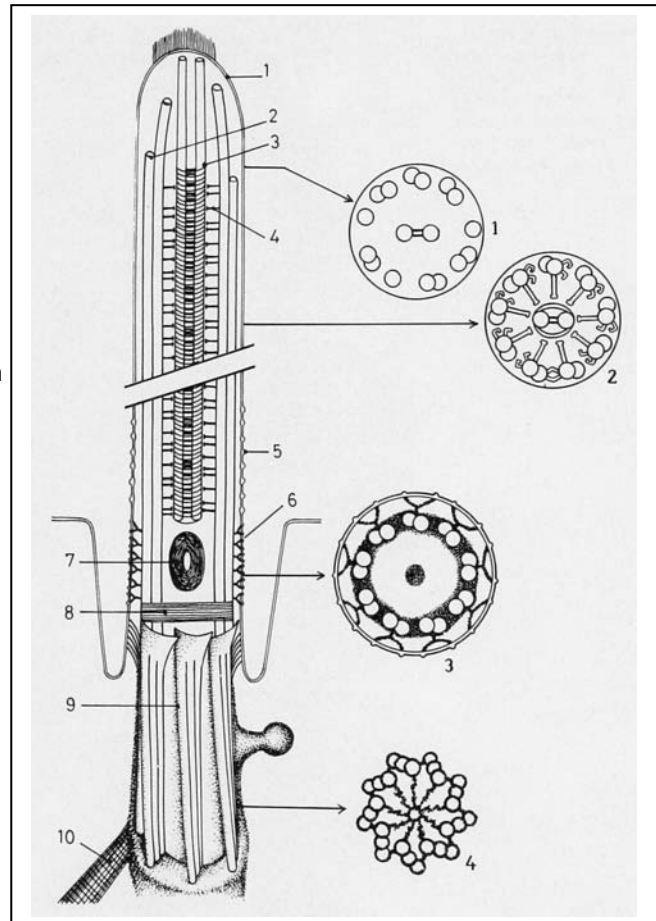
Abb. 1: Schematische Darstellung einer Zilie.

*Links: Längsschnitt:*

1 ziliäre Membran mit apikaler Differenzierung;  
2 ziliäre Dubletten; 3 zentrales Tubuluspaar;  
4 Radiärspeichen, welche das zentrale Tubuluspaar mit den äußeren Dubletten verbinden;  
5 granuläre Differenzierung der Zilienmembran;  
6 „Champagner-Glas“ Einheiten, die die Dubletten mit der Membran verbinden; 7 ziliäres Vesikel;  
8 Basalplatte; 9 Flügelblätter, welche die Tripletts umgeben; 10 gestreifte Zilienwurzel;

*Rechts: Querschnitt:*

1 neun Dubletten mit zentralem Tubuluspaar;  
2 Dyneinarme zwischen den Dubletten, Radiärspeichen und Verbindungen zwischen dem zentralen Tubuluspaar; 3 „Champagner-Glas“ Strukturen verbunden mit dichtem, die Tubuli umgebendes, Material; 4 Basalkörper Tripletts mit radiären Verbindungen. (Dustin 1984)



### 2.2.2.2 Ziliogenese im Eileiter der Maus

Die Neubildung von Zilien im Eileiter der Maus beginnt erst nach der Geburt und dauert etwa bis zum 12. Lebenstag an. Dennoch sind zum Zeitpunkt der Geburt schon wenige zilientragende Zellen vorhanden (Dirksen, 1974). Im Gegensatz dazu sind zilientragende Zellen beim Rind zum Zeitpunkt der Geburt vollständig differenziert und tragen mature Zilien auf ihrer Zelloberfläche (Kenngott et al. 2008). Deutliche Zeichen einer Ziliogenese im Eileiter der Maus stellen Vorläufermoleküle von Zentriolen dar, die mit dem 3. Lebenstag zu erscheinen beginnen, in ihrer Anzahl

zwischen dem 5. und 8. Tag ansteigen und schließlich 12 Tage nach der Geburt wieder verschwinden. Sie bestehen aus fibro-granulären Massen diverser Größe und stellen Kondensationsformen, die mit immaturren Zentriolen verbunden sind dar (Staprans und Dirksen, 1974). Sobald die Zentriolen matur sind, wandern sie zur Zellspitze und fungieren dort als Basalkörper und beginnen mit der Zilienbildung (Dirksen 1971). Die Zilien erscheinen zuerst als stumpfe Zylinder an der Zellperipherie und erst später im Zellzentrum. Eine zukünftige zilientragende Zelle, die noch keine Zilien auf ihrer Oberfläche trägt, kann durch eine hohe Anzahl von Mikrovilli von sekretorischen Zellen unterschieden werden. Am 12. Lebenstag sind nur noch wenige Zilien immatur und die maturen besitzen eine durchschnittliche Länge von 5  $\mu\text{m}$  (Dirksen 1974).

### 2.2.2.3. Metachronismus und Mechanismus der Propulsion

Unter Metachronismus bzw. metachronalen Wellen versteht man Wellen, die über zilientragenden Zellen durch die Interaktion von Hydrodynamik und Zilienaktivität entstehen (Guirao und Joanny, 2007).

Metachronismus tritt bei mukustragenden, ziliären Systemen auf, welche durch eine Epithelschicht an zilientragenden Zellen, einem periziliären Liquid mit geringer Viskosität und einer oberen Mukusschicht, die durch die Zilien transportiert wird, charakterisiert sind (Teff et al. 2007). Mukus stellt einen viskoelastischen Fluid dar, der aufgrund der Steifheit der Zilien nur von kurzen Zilien (5-7  $\mu\text{m}$ ) transportiert werden kann. Dabei penetrieren die Zilienspitzen während ihres „effektiven Schlages“ die Mukusschicht, bewegen sich beim Rückholschlag aber unterhalb dieser (Satir und Sleight, 1990). Eine Zilie kann während ihres „effektiven Schlages“ bei einer Länge von 5  $\mu\text{m}$  und einer Dicke von 0,35  $\mu\text{m}$  eine Wirkungskraft von 0,21 nN erzeugen (Teff et al. 2007). Der energetische Aufwand, um einen Schlag durchzuführen, ist beim „Rückholschlag“ geringer ( $2 \cdot 10^{-6}$  J) als beim „effektiven Schlag“ ( $9 \cdot 10^{-6}$  J) (Gueron und Levit-Gurevich, 1999). Der Verlust des erzeugten Flusses kann zu Erkrankungen, wie Infertilität oder extrauterinen Graviditäten, führen (Marshall und Kintner, 2008).

Gaddum-Rosse und Blandau (1976) konnten aufzeigen, dass beim Schwein und Kaninchen in der Ampulla des Eileiters ein uteruswärts gerichteter Fluss erzeugt wird, dieser jedoch in einigen Teilen des Isthmus ovarwärts gerichtet ist. Anders verhält es sich z.B. bei Rind, Schaf, Meerschweinchen und Ratte. Rind und Schaf

wiesen einen kontinuierlich uteruswärts gerichteten Fluss auf, wohingegen bei Meerschweinchen und Ratte ab dem Isthmus kein durch ziliäre Aktivität hervorgerufener Transport nachgewiesen werden konnte.

Wegen der hohen Ziliendichte auf zilientragenden Zellen, z.B. 250-300 Zilien pro Zelle im humanen Eileiter (Leng et al. 1998), müssen diese koordiniert und effektiv schlagen (Gibbons 1981). Ist der Abstand benachbarter Zilien eng genug, neigen diese sich der Bewegung der anderen anzupassen (Gueron et al. 1997). So ist der Zilienschlag einer Zilie metachronisch mit dem Schlag der benachbarten Zilie gekoppelt, so dass Zilien, die entlang einer Linie rechtwinklig zur Flussrichtung der metachronalen Welle schlagen, stets synchron sind (Abb. 2). Im Gegensatz dazu schlagen Zilien, welche sich in der Ebene des „effektiven Schlags“ befinden, in aufeinander folgenden Phasen (Abb. 3), vergleichbar mit den Schaufeln eines Schaufelrades (Sanderson und Sleight, 1981).

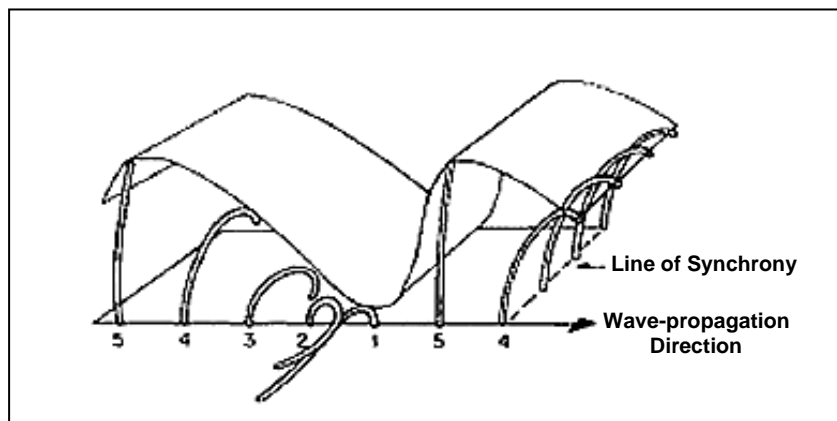


Abb. 2: Metachronische Kopplung benachbarter Zilien

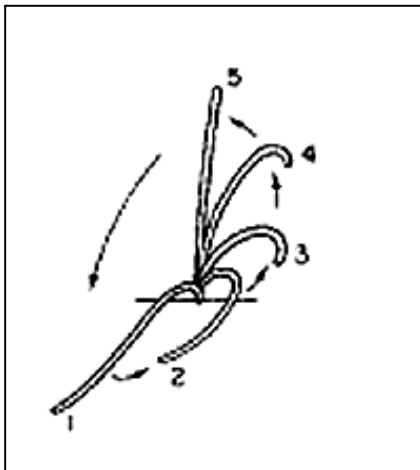
Zilien, welche sich in der Ebene des „effektiven Schlags“ befinden, schlagen in aufeinanderfolgenden Phasen des Zilienschlages (5-1). Im Gegensatz dazu schlagen Zilien entlang einer Linie rechtwinklig zur Flussrichtung der metachronalen Welle synchron (Line of Synchrony). (Omoto und Kung, 1980)

#### 2.2.2.4 Zilienschlag und Zilienschlagfrequenz

Eine der zentralen Gegebenheiten des Zilienschlages ist es in 2 Phasen mit gebrochenen Symmetrien abzulaufen. Jeder Schlag setzt sich aus dem „effektiven Schlag“, der der Propulsion von Fluid dient, und dem „Rückholschlag“, bei welchem die Zilie entgegen der Flussrichtung des Fluids schlägt, zusammen. Am Beispiel von Paramecium konnte gezeigt werden, dass der Rückholschlag (26 ms) wesentlich länger dauert, als der „effektive Schlag“ (9 ms) (Guirao und Joanny, 2007). Die Zilie beginnt ihren „effektiven Schlag“ in einem Neigungswinkel von 40° zur Zelloberfläche, bewegt sich bogenförmig bis zu einem Winkel von 110°, um bei einem Neigungswinkel von 30° in eine Ruheposition zu kommen (Abb. 3). Während dieser Ruhephase zeigen die Zilienspitzen in die Flussrichtung des Fluids. Um erneut die Anfangsposition des „effektiven Schlages“ zu erreichen, muss die ruhende Zilie einen „Rückholschlag“ ausführen (Sanderson und Sleight, 1981). Dieser ist im Gegensatz zum „effektiven Schlag“ nicht eben, sondern 3-dimensional (Holwill et al. 1979) und verläuft in einem im Uhrzeigersinn gerichteten Bogen (Aiello und Sleight, 1972). Dabei wird die Zilienspitze, welche sich Richtung Zilienbasis orientiert, seitlich rückwärts gezogen (Abb. 3) (Sanderson und Sleight, 1981). Bei maturen zilientragenden Zellen ist die Schlagrichtung durch den am Basalkörper befindlichen Basalfuß vorgegeben (Guirao und Joanny, 2007).

Während der Entstehung eines Zilienschlages verschieben sich die Dubletten des Axonems relativ zueinander ohne messbare Kontraktionen (Satir 1980). Dabei agieren sie gegensätzlich, indem die Dubletten 1-4 den „effektiven Schlag“ und die Dubletten 6-9 den „Rückholschlag“ produzieren (Satir und Christensen, 2008). Dieses System von abwechselnd aktiven und passiven Dubletten wird auch „switch point“ genannt. Das aktive Gleiten der Dubletten wird durch die Bindung der am A-Tubulus befestigten Dynein-Arme an den benachbarten B-Tubulus hervorgerufen (Satir 1980). Diese Brückenbildung betrifft nie alle Dynein-Arme vollständig und erfolgt unter Anwesenheit von ATP (Warner und Mitchell, 1978). Nach der Dephosphorylierung von ATP erfolgt die Lösung der Verbindung. Zusätzlich zu ATP ist das Vorhandensein von  $10^{-7}$  M freiem axonemalen  $Ca^{2+}$  erforderlich (Satir 1980). Die äußeren Dynein-Arme arbeiten mit den inneren Dynein-Armen zusammen, wobei die äußeren Dynein-Arme die Schlagfrequenz und die inneren Dynein-Armen die Schlagform regulieren (Satir und Christensen, 2008). Ein ähnlicher Anhaftungs- und Trennungs-Rhythmus kann zwischen den Köpfen der Radiärspeichen und der

Umhüllung des zentralen Tubulus-Paars auf der energetischen Grundlage von ATP nachgewiesen werden (Warner und Satir, 1974). Parallel zu diesen Brückenbildungsformen rotiert das zentrale Tubulus-Paar 360° pro Schlagzyklus entgegen den Uhrzeigersinn und scheint damit eine regulierende Funktion zu übernehmen (Omoto und Kung, 1980). Die Radiärspeichen, die Verbindungen zwischen den Dubletten und die Dynein-Arme bilden damit innerhalb des Axonems ein mechanisches System, welches das Gleiten jederzeit an- und abschalten kann (Satir 1980). Das hervorgerufene Gleiten wird schließlich in einen Zilienschlag umgewandelt (Satir und Christensen, 2008).



*Abb. 3:* Ablauf des 2-phasigen Zilienschlages.

Im Anschluss an den „effektiven Schlag“ (5-1), gefolgt von einer kurzen Ruhephase, schließt sich der 3-dimensionale „Rückholschlag“ (1-5) an. (Omoto und Kung, 1980)

Die ZSF variiert in Abhängigkeit von Spezies und Tierart sowie der Lage des zilientragenden Epithels: Rindereileiter 23,1 Hz (Wessel et al. 2004), Hamstereileiter 12,4 Hz (Hermoso et al. 2001), humaner Eileiter 5,3 – 7,2 Hz (Lyons et al. 2006; Sutto und Conner, 2004; Lyons et al. 2002), neonataler Respirationstrakt der Maus 14 Hz (O`Callaghan et al. 1995), Respirationstrakt Schaf 19,8 Hz (Kilgour et al. 2004) und Ösophagus vom Frosch 10,8 Hz (Zagoory et al. 2001). Eine Analyse der ZSF am Eileiter der Maus oder ein Vergleich der ZSF von Epithelien verschiedener Organe eines Tieres, wie Trachea und Eileiter, wurde noch nicht durchgeführt.

Zilientragende Epithelien modifizieren ihre Schlagfrequenz in Abhängigkeit von mechanischen, elektrischen sowie chemischen Stimuli und können auf diese Weise



die Geschwindigkeit des mukoziliären Transportes kontrollieren (Hermoso et al. 2001). Sind z.B. die Parameter *Viskosität*, *Temperatur* und *pH-Wert* nicht in ihrem physiologischen Bereich, wirkt es sich direkt auf die Schlagfrequenz aus. So haben Gheber et al. (1998) durch eine Erhöhung der *Viskosität* auf 1-30 cP eine Verringerung der Schlagfrequenz um 40 % und bei Erhöhung auf bis zu 2000 cP ein vollständiges Ruhen der Zilien mit anschließender Erholung an Zellkulturen vom Ösophagus des Frosches nachweisen können. Andrade et al. (2005) konnten zwar auch eine Verringerung der Schlagfrequenz um 35% durch eine 2-15%ige Dextranlösung (2-37 cP) an kultivierten zilientragenden Zellen vom Hamstereileiter nachweisen, aber im Gegensatz zu Gheber et al. (1998) keine weitere Senkung durch weitere Erhöhung der Viskosität (37-200 cP). Letzteres Ergebnis zeigt, dass zilientragende Zellen ihre Schlagfrequenz auch bei hohen Viskositäten weitestgehend beibehalten können. Dies deutet auf das Vorhandensein eines autoregulativen Mechanismus hin (Andrade et al. 2005).

Verringerungen der *Temperatur* von 40° auf 32° führten im Respirationstrakt von humanen Neonaten zu einer starken Abnahme (-9,1%) der Schlagfrequenz (O`Callaghan et al. 1995). Ähnliches konnte beim Respirationstraktes des Schafes nachgewiesen werden (Kilgour et al. 2004).

Untersuchungen zum Einfluss des *pH-Wertes* am Respirationstrakt des Menschen durch Sutto et al. (2004) ergaben eine Steigerung der Zilienschlagfrequenz (7,2 auf 9,4 Hz) durch Alkalisierung sowie einen Abfall (7,2 auf 6,1 Hz) durch Ansäuerung.

Hormonelle Einflüsse auf die Zilienschlagfrequenz im Eileiter sind ebenfalls nachgewiesen worden. So stieg die Schlagfrequenz der Zilien (humaner Eileiter) des Infundibulums in der Sekretionsphase gegenüber der Proliferationsphase deutlich an; im Gegensatz zu den Zilien von Ampulla und Isthmus (Lyons et al. 2002). Einen stimulierenden Effekt wiesen auch Follikel- und Peritonealflüssigkeit auf (Lyons et al. 2006). Weiterhin konnten Mahmood et al. (1998) sowie Wessel et al. (2004) eine Reduzierung der Frequenz (im humanen bzw. bovinen Eileiter) durch Zugabe von Progesteron aufzeigen, wohin gegen Östradiol keinen Einfluss ausübte (Mahmood et al. 1998). Untersuchungen zum embryonalen Einfluss auf die Zilienaktivität im Eileiter wurden durch Hermoso et al. (2001) unternommen. Durch die Zugabe der vom Embryo sekretierten Faktoren PAF (Platelet activating factor) sowie PGE<sub>2</sub> (Prostaglandin E<sub>2</sub>) in einer Konzentration von 100 mM auf Epithelzellkulturen vom

Hamstereileiter, konnte jeweils ein Anstieg der Zilienschlagfrequenz um 60% beobachtet werden.

Ebenfalls stimulierende Wirkungen auf die ZSF konnten für ATP und Serotonin gezeigt werden. So steigerte sich die ZSF von kultivierten Eileiterzellen (Hamster) durch Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  ATP um  $83,45 \pm 10,67\%$  innerhalb 2 min nach Zugabe (Morales et al. 2000). Ursächlich dafür scheint eine Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  zu sein (Villalon et al. 1989). Dieses führt zu einer Öffnung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger  $\text{K}^{+}$ -Kanäle und einer anschließenden Membranhyperpolarisation, welche die ZSF über einen noch nicht geklärten Mechanismus erhöht (Tarasiuk et al. 1995). Die Wirkung von ATP in zilientragenden Zellen vom Eileiter wird wahrscheinlich über  $\text{P2Y}_2$ -Rezeptoren vermittelt (Morales et al. 2000). Doran et al. (2004) sowie Nguyen et al. (2001) konnten einen durch Serotonin hervorgerufenen Anstieg der ZSF nachweisen. Dieser wurde über 5-HT-Rezeptoren vermittelt, was ebenfalls zu einer Erhöhung intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  führte.

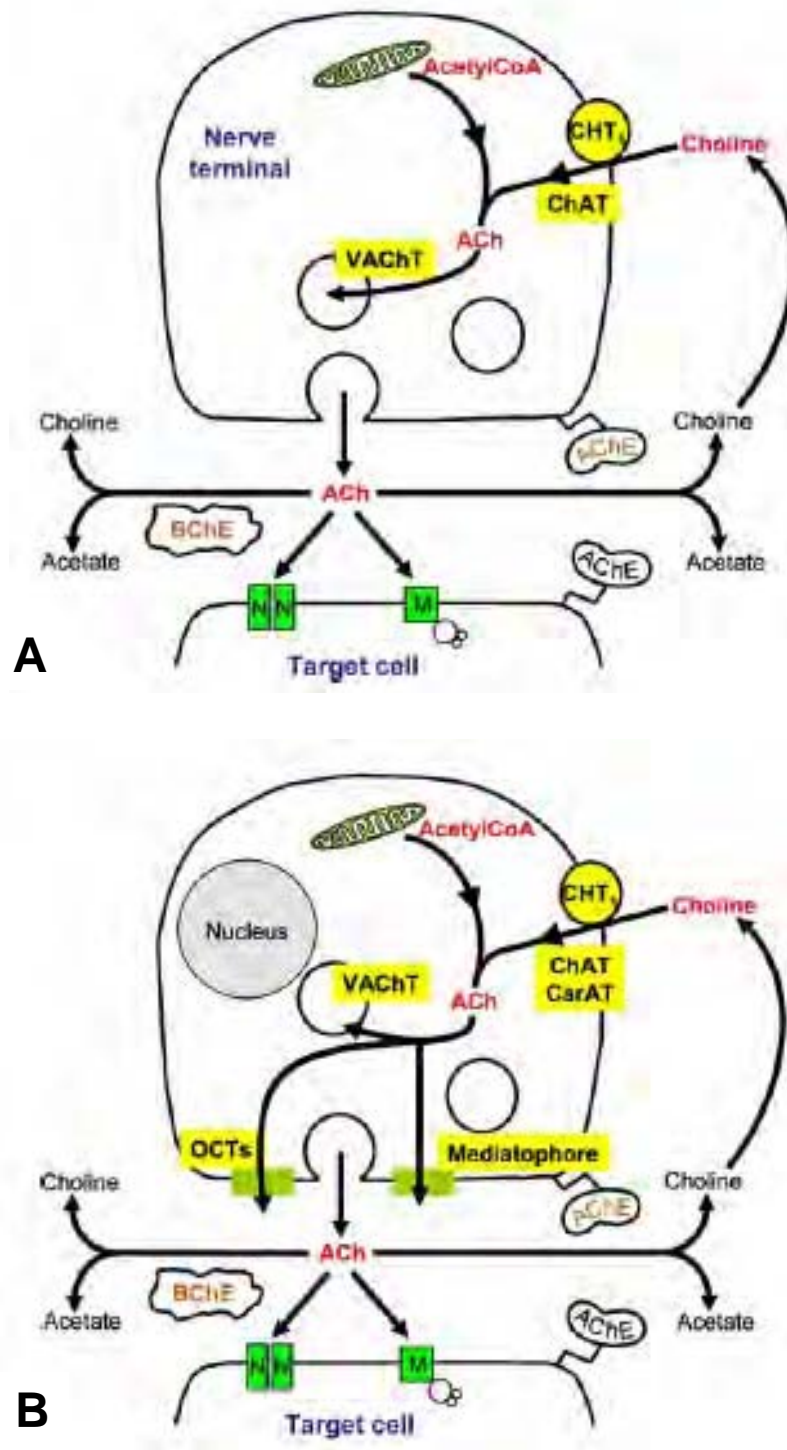
Eine stimulierende Wirkung von *Acetylcholin* (ACh) auf die ZSF konnten Kordik et al. bereits 1952 sowohl im Ösophagus des Frosches ( $10^{-5}$  M) als auch in der Trachea des Kaninchens ( $2 \cdot 10^{-5}$  M) nachweisen, wohingegen in beiden Fällen eine Konzentration von  $10^{-6}$  M Atropinsulfat zur Hemmung der ZSF führte. Mit dem Nachweis der Acetylcholinesterase (AChE) sowie der Cholinacetyltransferase (ChAT) (siehe 2.3.) in der trachealen Mukusmembran von Kaninchen konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Wirkung von ACh an zilientragenden Epithelien auch non-neuronal vermittelt sein kann (Kordik et al. 1952).

## **2.3 Das non-neuronale cholinerge System**

Seit dem Beginn des Lebens haben sich cholinerge Kommunikation und Regulation etabliert; begonnen bei primitiven uni- und multizellulären Organismen, wie Bakterien, Algen, Protozoen, Schwämmen, primitiven Pflanzen und Pilzen (Wessler und Kirkpatrick, 2008). In Abhängigkeit von der Herkunft ACh, einem chemischen Transmitter (Sastry und Sadavongvivad, 1978), welcher 1926 durch Loewi und Navratil seinen Namen erhielt, kann man ein neuronales und ein non-neuronales System unterscheiden (Racke et al. 2006).

Die Synthese von ACh in non-neuronalen Zellen stellt das phylogenetisch ältere System dar (Kummer et al. 2008), da es bereits vor 3-0,2 Milliarden Jahren vorhanden gewesen ist (Wessler et al. 1999). Während der Evolution diente es als ein Modell zur weiteren Optimierung des cholinergen Systems mit der zusätzlichen Funktion als Neurotransmitter (Wessler et al. 2003). So haben sich einige besonders effiziente Enzyme und Transporter der cholinergen Neurone weiterentwickelt, welche in dem „non-neuronalen“ System nicht vorhanden sind (Kummer et al. 2008). Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten Komponenten des „neuronalen“ cholinergen Systems in folgenden Zellen bzw. Geweben nachgewiesen werden: Atemwegsepithel (Lips et al. 2007), zilienträgende Zellen der Trachea (Pfeil et al. 2003), Urothel (Lips et al. 2007; Hanna-Mitchell et al. 2007; Yoshida et al. 2008), Endothel (Kirkpatrick et al. 2001), Epidermis (Kurzen et al. 2007), orale und vaginale Mukosa und Pleura (Klapproth et al. 1997), Granulosazellen des Ovars (Mayerhofer et al. 2003), Eileiterepithel (Steffl et al. 2006), Plazenta (Wessler et al. 2007), Spermatozyten (Sastry und Sadavongvivad, 1978), Blutzellen (Neumann et al. 2007; Fujii et al. 2008), synoviales Gewebe im Kniegelenk (Grimsholm 2008), Auge (Duncan und Collison, 2003), Skelettmuskel (Tucek 1982), Fibroblasten (Anderson et al. 2008) sowie im Darm (Sine et al. 1991). Dort agiert es als ein lokales Zellmolekül parakrin und autokrin (Wessler et al. 2007) um grundlegende Zellfunktionen, wie Proliferation, Differenzierung, Lokomotion, Sekretion, ziliäre Aktivität, Organisation des Zytoskeletts sowie die lokale Abgabe von Mediatoren (NO, proinflammatorische Zytokine) zu kontrollieren (Wessler et al. 2003). Für die Synthese von ACh wird das essenzielle Cholin auch in non-neuronalen Zellen mit Hilfe des hoch-affinen Cholintransporters (CHT1) aus dem extrazellulärem Raum in die Zelle transportiert (Pfeil et al. 2003; Fujii et al. 2003), um dort mit Hilfe der Cholinacetyltransferase (ChAT) und vorhandenem AcetylCoenzym A acetyliert zu werden (Wessler et al.

1998). Im Gegensatz zum „neuronalen“ cholinergen System besitzen einige Zellen des „non-neuronalen“ cholinergen Systems die Möglichkeit, alternativ zur ChAT auf das Enzym Carnitinacetyltransferase (CarAT) zurück zugreifen (Hanna-Mitchell et al. 2007; Mayerhofer et al. 2003). Dieses Enzym arbeitet jedoch nicht so effizient (Tucek 1982). Synthetisiertes ACh kann im Anschluss an seine Synthese entweder direkt (Lips et al. 2007; Hanna-Mitchell et al. 2007) oder nach vorheriger Speicherung in Vesikeln (Lips et al. 2005; Proskocil et al. 2004) seine zellulären Effekte vermitteln. Der Transport von ACh in Vesikel erfolgt über den vesikulären Acetylcholin-Transporter (VAChT), der einen ACh/2H<sup>+</sup> Austauscher darstellt (Parson 2000). Die zellulären Effekte können über 3 verschiedene Signalwege herbeigeführt werden: 1) die Translokation von ACh verursacht einen Ionenstrom, der elektrische Effekte an der Zellmembran bewirkt; 2) ACh kann entweder direkt oder via intrazellulären Rezeptoren mit intrazellulären Signalmolekülen, wie das GTP-Bindungsprotein der Ras-Familie (rat sarkoma), interagieren; 3) von den Zellen abgegebenes ACh aktiviert die klassischen extrazellulären, membrangebundenen „nikotinischen“ bzw. „muskarinischen“ Rezeptoren, entweder der gleichen (autokriner Effekt) oder der benachbarten Zelle (parakriner Effekt) (Wessler et al. 1998). Einen weiteren Unterschied zum „neuronalen“ cholinergen System stellt die Abgabe von zellulärem ACh via aktiven Transport durch Vertreter der Organischen Kationen Transporter Familie (OCT) dar, von welchen 3 Typen bekannt sind (Racke et al. 2006). Diese werden in Abhängigkeit vom Organ unterschiedlich exprimiert (Koepsell et al. 2007); so können z.B. OCT1 und OCT3 in der Placenta (Wessler et al. 2007), OCT1-3 in der Trachea sowie den Bronchien (Lips et al. 2005) nachgewiesen werden. Eine andere Möglichkeit der Freisetzung von ACh besteht über sogenannte „Mediatophore“, bei welchen es sich um Proteine der Plasmamembran mit zentraler Pore handelt (Dunant 1994; Malo und Israel, 2003). Extrazelluläres ACh wird nach Aktivierung der entsprechenden Zielrezeptoren durch die spezifische Acetylcholinesterase (AChE) hydrolysiert und damit zu Cholin abgebaut (Anderson et al. 2008). Wie im neuronalen cholinergen System existiert auch hier die Möglichkeit des weniger spezifischen Abbaus durch die Butyrylcholinesterase (BChE) (Darvesh et al. 2003). Die Synthese, Speicherung, Freisetzung, Rezeptorinteraktion sowie der Abbau von ACh im „non-neuronalen“ cholinergen System sind vergleichend mit dem neuronalen cholinergen System in Abb. 4 dargestellt.



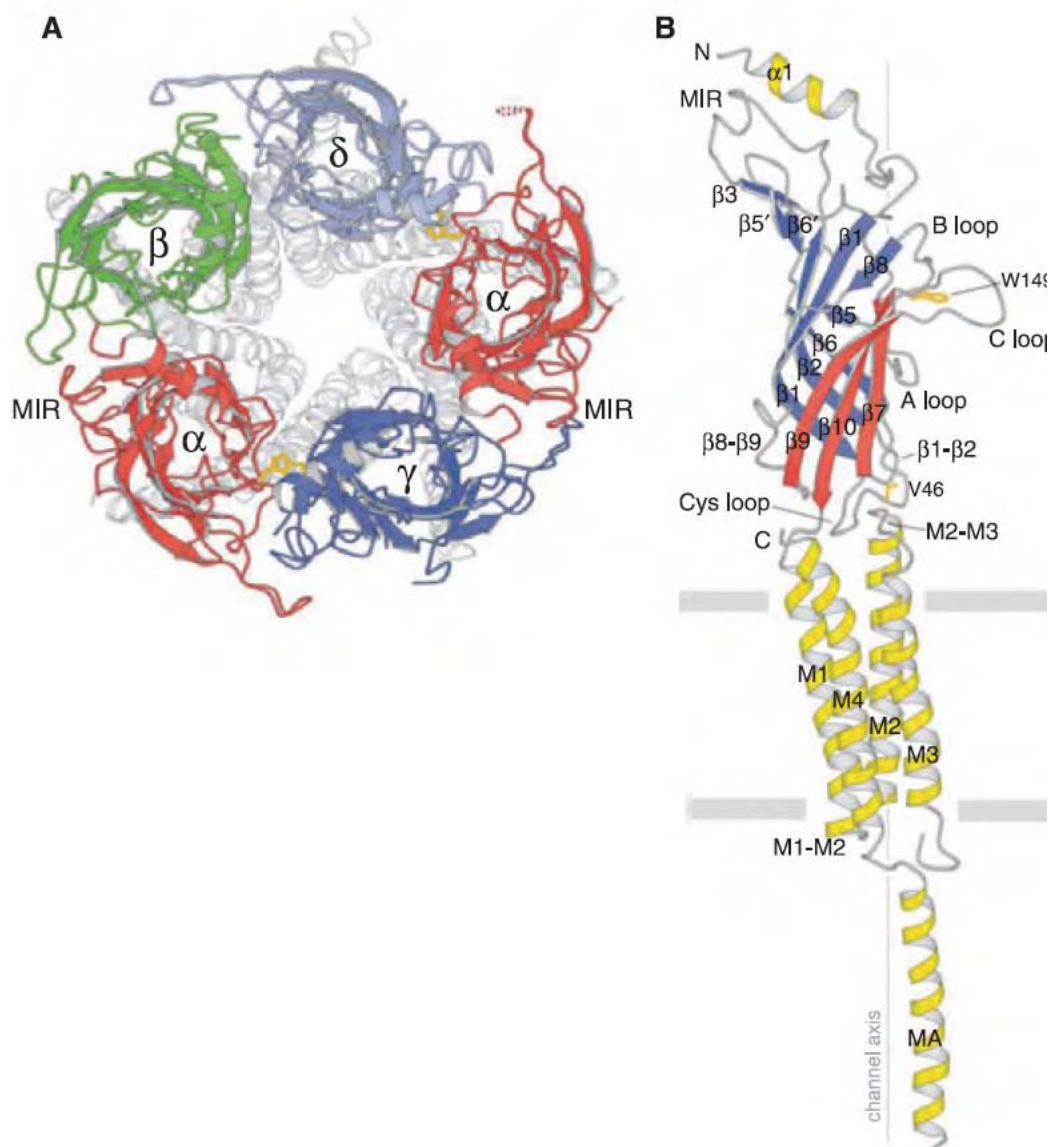
*Abb. 4:* Vergleichende Darstellung der Cholin-Aufnahme, der Acetylcholin-Synthese, -Speicherung, -Freisetzung und Rezeptoraktivierung sowie des Acetylcholin-Abbaus zwischen **neuronalen** (A) und **non-neuronalen** (B) Zellen. *CHT<sub>1</sub>* hoch-affiner Cholintransporter 1; *ChAT* Cholin Acetyltransferase; *CarAT* Carnitin Acetyltransferase; *Ach* Acetylcholin; *VACHT* vesikulärer Acetylcholin Transporter; *OCT* Organic cation transporter; *AChE* Acetylcholinesterase; *BChE* Butyrylcholinesterase; *N* nikotinischer Rezeptor; *M* muskarinischer Rezeptor. (Kummer et al. 2008)

### 2.3.1. Nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR)

NAChR spielen eine essenzielle physiologische Rolle im gesamten Körper. Sie vermitteln einige der Effekte des endogenen Neurotransmitters ACh und stellen einen biologischen Angriffspunkt für das Tabakalkaloid „Nikotin“ dar, das akute Wirkungen von ACh am nAChR imitieren kann (Lukas et al. 1999).

Die nAChR gehören der Superfamilie der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle an, zu denen auch die Serotonin-5-HT<sub>3</sub>-,  $\gamma$ -Amino-Buttersäure- (GABA<sub>A</sub> und GABA<sub>C</sub>) und Glycin-Rezeptoren zählen (Miyazawa et al. 2003). Die Superfamilie ist charakterisiert durch das Vorhandensein einer hohen Homologie der Aminosäuresequenzen jeder Rezeptoruntereinheit (Arias 2000). Unter Ionenkanälen versteht man verschließbare Poren, die den passiven Fluss von Ionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten erlauben (Kalamida et al. 2007). NAChR besitzen eine kationenselektive Pore, gebildet von einem aus 5 Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  und  $\delta$ ) bestehendem Ring (Abb. 5) (Miyazawa et al. 2003). Es existiert eine hohe Variabilität an nAChR, welche durch die Kombinationen genetisch verschiedener Untereinheiten entsteht. Dabei sind jedoch nicht alle Kombinationen der Untereinheiten möglich. Die Untereinheiten verleihen den nAChR Subtypen kennzeichnende, funktionelle und strukturelle Eigenschaften (Lukas et al. 1999). Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten 17 nAChR Untereinheiten definiert werden:  $\alpha$ 1- $\alpha$ 10;  $\beta$ 1- $\beta$ 4; und jeweils eine Untereinheit  $\gamma$ ,  $\epsilon$  und  $\delta$  (Kalamida et al. 2007). Die  $\alpha$ 8 Untereinheit wurde bis jetzt im Gewebe von Vögeln, jedoch nicht in Säugetieren nachgewiesen (Dani und Bertrand, 2007). Prinzipiell kann man homooligomere von heterooligomeren nAChR unterscheiden. Die Kapazität einen homooligomeren, funktionierenden nAChR zu bilden, besitzen ausschließlich die  $\alpha$ 7,  $\alpha$ 8 und  $\alpha$ 9 Untereinheiten (Lukas et al. 1999). Die nAChR kann man entsprechend ihrer Untereinheiten in zwei Typen unterteilen: 1) den muskulären Typ und 2) den neuronalen Typ (Kalamida et al. 2007). Neuronale nAChR sind aus  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheiten aufgebaut (Benowitz 1996), wohingegen muskuläre nAChR zusätzliche Untereinheiten aufweisen (Schuller 2007). Ist die  $\gamma$ -Untereinheit im Rezeptor vorhanden, so handelt es sich um einen fetalen Muskel. In der Entwicklung wird sie durch die Untereinheit  $\epsilon$  ersetzt, so dass eine Kombination der Untereinheiten wie folgt entsteht: 2 $\alpha$ 1,  $\beta$ 1,  $\delta$ ,  $\epsilon$  (Lukas et al. 1999). Alle Untereinheiten bestehen jeweils aus einer extrazellulären, einer transmembranalen sowie einer zytoplasmatischen Domäne (Arias 2000). Diese sind wie folgt aufgebaut (Abb. 5): Die extrazelluläre Domäne besitzt den N-Terminus, besteht aus 210-220

Aminosäuren und beherbergt die Bindungsstellen für Agonisten und kompetitive Antagonisten. Die Transmembrandomäne setzt sich aus 4 Transmembransegmenten (M1-M4) zusammen, die jeweils aus 15-20 Aminosäuren bestehen. Dabei werden die Domänen M1 und M2 sowie M2 und M3 durch hydrophile Schleifen miteinander verbunden. Eine größere Schleife zwischen M3 und M4 beherbergt die Phosphorylierungsseiten und stellt den zyttoplasmatischen Anteil der Untereinheiten dar. Im Anschluss daran folgt das extrazellulär gelegene C-terminale Ende (Kalamida et al. 2007).



**Abb. 5:** Aufbau nikotinischer Acetylcholin Rezeptoren (nAChR)

NAChR bestehen aus 5 Untereinheiten (A), welche jeweils aus 3 Teilbereichen bestehen; einer extrazellulären (mit N-Terminus), einer transmembranalen (bestehend aus 4 Transmembrandomänen) sowie einer zyttoplasmatischen (mit C-Terminus) Domäne (B). (Kalamida et al. 2007)

nAChR vom Muskeltyp besitzen 2 ACh-Bindungsstellen, entsprechend den 2  $\alpha$  Untereinheiten im pentameren Komplex (Wilson und Karlin, 2001). Im Gegensatz dazu können homooligomere Rezeptoren 5 identische ACh-Bindungsstellen pro Rezeptor aufweisen. Diese liegen an der Schnittstelle zwischen den einzelnen  $\alpha$ -Untereinheiten (Gotti und Clementi, 2004). Die Agonist-Bindungsstellen sind oberhalb der Membranoberfläche in einer Tasche im Zentrum der  $\alpha$ -Untereinheiten lokalisiert. Es existieren 2 nicht äquivalente Agonist- (Acetylcholin, Nikotin, Epibatidin, Cyticin, Nitrosamine) bzw. kompetitive Antagonist- (d-Tubocurarin, Lophotoxin, Conotoxin,  $\alpha$ -Bungarotoxin) Bindungsstellen (Arias 2000; Schuller 2007; Kalamida et al. 2007). Zusätzlich zu diesen konnten 2 Bindungsstellen für nicht-kompetitive Antagonisten bzw. negativ allosterische Modulatoren, lokalisiert an der M2 Transmembrandomäne innerhalb der Pore und an der Schnittstelle zwischen Membranlipiden und nAChR Protein, nachgewiesen werden. Die Bindungsstelle für positive allosterische Modulatoren (Eserin, Galanthamin, Codein) befindet sich am N-Terminus der  $\alpha$ 1-Untereinheit und die Bindungsstelle für Steroide befindet sich an einer allosterischen Seite, die weder die ACh-Bindungsstelle noch den Ionenkanal erfasst (Kalamida et al. 2007).

Die nAChR weisen einen Zyklus von 3 funktionellen Stadien auf. Man unterscheidet ein ruhendes, ein geöffnetes und ein desensitives Stadium. Dabei ist das ruhende Stadium das stabilste, wenn kein Agonist gebunden ist und das desensitive Stadium das stabilste, wenn ein Agonist gebunden ist (Wilson und Karlin, 2001). Kurze Kontakte mit hohen Konzentrationen von Neurotransmittern, wie Acetylcholin, führen zu einer Öffnung der Pore (Dani und Bertrand, 2007). Die Öffnung wird durch die Aktivierung der Rezeptoren und der sich anschließenden Rotation innerhalb der  $\alpha$ -Untereinheiten hervorgerufen (Unwin 2003). Ionen (sowohl monovalente Kationen als auch  $\text{Ca}^{2+}$  [Gotti und Clementi, 2004]) strömen dann entlang ihres elektrochemischen Gradienten selektiv durch die Pore, um dadurch eine Veränderung des Membranpotenzials zu bewirken (Miyazawa et al. 2003). Muskel nAChR haben eine geringe, aber signifikante Permeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$ ; neuronale nAChR weisen eine höhere Permeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$  als die Rezeptoren vom Muskeltyp auf (Vernino et al. 1994). Nach einigen Millisekunden schließt sich der Rezeptor zu einem nicht leitfähigem Stadium (Dani und Bertrand, 2007). Nach der Entfernung von freiem ACh und seiner Dissoziation von den Bindungsstellen befindet sich der



Rezeptor in dem desensitiven Stadium, um anschließend direkt in das Ruhestadium überzugehen (Wilson und Karlin, 2001).

(S)-Nikotin, wie es in Tabak gefunden wird, bindet stereoselektiv an nAChR, wodurch es die Freisetzung verschiedener Neurotransmitter, wie Dopamin, Norepinephrin, Acetylcholin, Glutamat, Serotonin,  $\beta$ -Endorphin oder GABA stimulieren kann (Benowitz 2008). Im Gegensatz zu normalen Liganden wie ACh oder Cholin, welche schnell abgebaut und aus der Nähe der Rezeptoren entfernt werden, wird Nikotin nicht sofort abgebaut oder beseitigt. Diese andauernde Rezeptorbindung sowie die Akkumulation resultieren in einer Aufrechterhaltung der Desensitivierung und führen in einigen Fällen zur kompletten Rezeptorinaktivierung (Gahring und Rogers, 2005). Zusätzlich zu den negativen Wirkungen von Nikotin auf das kardiovaskuläre und pulmonale System kann dieses z.B. auch zu einer erhöhten Infektionsrate (z.B. mit Influenzaviren oder Tuberkulose), einer geringeren Wundheilung und zu verschiedenen Komplikationen im Reproduktionssystem, wie Infertilität und extrauterinen Graviditäten, führen (Benowitz 2008).

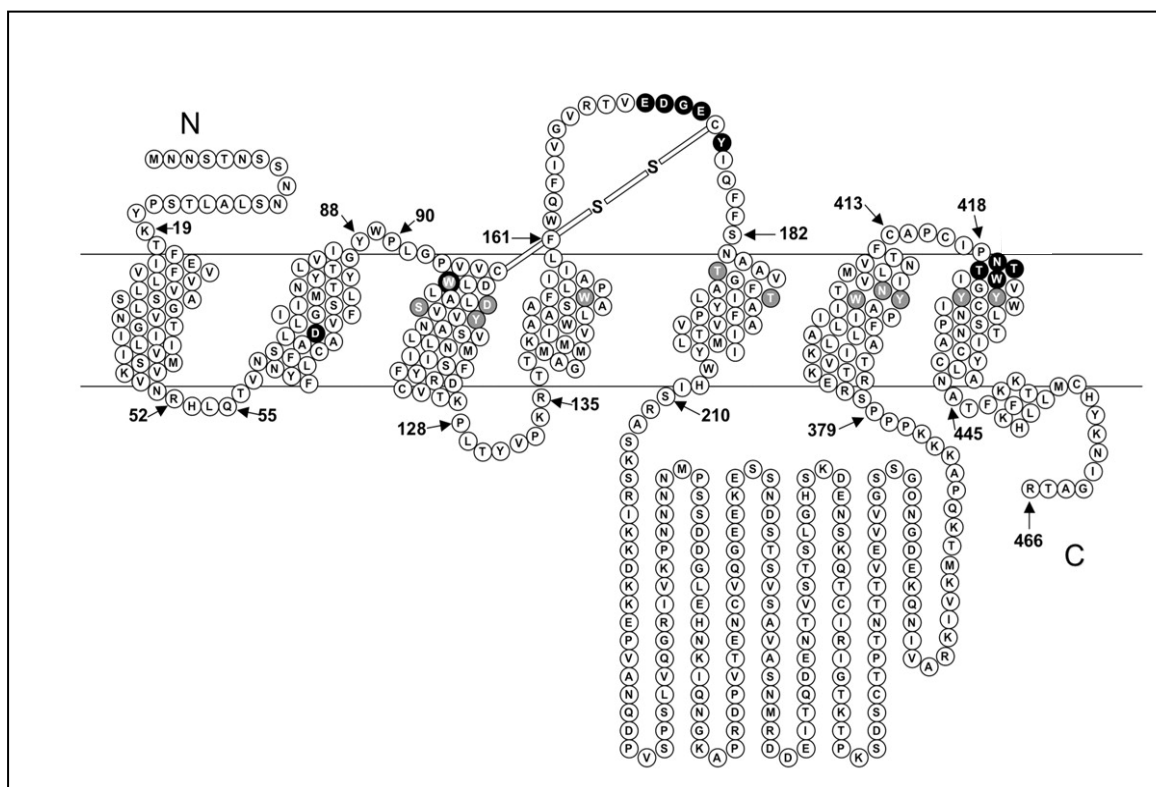
### **2.3.2 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChR)**

MACHR werden durch die selektiv aktivierende Wirkung Muskarins bzw. die Blockierung durch Atropin charakterisiert (Hulme et al. 1990).

Über die Aktivierung der Muskarin-Rezeptor-Familie werden metabotrope Wirkungen von ACh vermittelt (Eglen 2006). Die Muskarin-Rezeptor-Familie gehört der Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren an (Pedretti et al. 2006), die die größte Gruppe von Zelloberflächen-Rezeptoren in der Natur bildet (Li et al. 2007). Von den 3 existierenden Unterfamilien (Rhodopsin/ $\beta$ -adrenerge Rezeptoren; Sekretin/Vasointestinales Peptid Rezeptoren; metabotrope Glutamat-Rezeptoren) können die mAChR der Rhodopsin-Rezeptor Familie zugeordnet werden (Strader et al. 1995; Wess 2005). In Säugetieren wurden 5 verschiedene mAChR-Subtypen (M1-M5) identifiziert, wobei jeder Rezeptorsubtyp das Produkt eines anderen Gens darstellt (van Koppen und Kaiser, 2003). Im Unterschied zu nAChR stellen mAChR Proteine dar, die aus nur einer Untereinheit aufgebaut sind (Hosey 1992). Alle 5 Subtypen setzen sich aus 7 Transmembrandomänen, die jeweils eine Helix darstellen, 3 extra-zytoplasmatischen Schleifen, 3 zytoplasmatischen Schleifen und 2 terminalen Segmenten (N-Terminus und C-Terminus) zusammen (Abb. 6) (Pedretti

et al. 2006). Es besteht eine deutliche Ähnlichkeit zwischen M1- und M3-Rezeptoren sowie zwischen M2- und M4-Rezeptoren. Der M5-Rezeptor ähnelt eher dem M1- und dem M3-Rezeptor, besitzt jedoch Merkmale, die ihn von anderen Rezeptoren unterscheidet (Pedretti et al. 2006). Ein wichtiger molekularer Unterschied zwischen den Rezeptorsubtypen (M1/M3/M5 und M2/M4) besteht in der Sequenz-Divergenz innerhalb der 3. zytoplasmatischen Schleife (Caulfield und Birdsall, 1998).

Die orthosterischen Bindungsstellen für mAChR werden von Aminosäuren gebildet, die sich in den äußeren Bereichen der verschiedenen Transmembransegmente befinden. In ähnlichen Bereichen, jedoch weiter extrazellulär sind die allosterischen Bindungsstellen lokalisiert (Wess 2005). Es gibt *keine* mAChR Agonisten mit einer hohen Selektivität für einen speziellen Subtyp (Caulfield und Birdsall, 1998).



**Abb. 6:** Schematische Darstellung des Aufbaus der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (mAChR). Die Rezeptoren bestehen aus nur einer Untereinheit mit einem N-Terminus, 7 Transmembransegmenten (verbunden durch 3 extrazytoplasmatische sowie 3 intrazytoplasmatische Schleifen) sowie einem C-Terminus. (Avlani et al. 2007)

### 2.3.2.1 Vorkommen und Funktion der verschiedenen Subtypen

Prinzipiell sind die mAChR in fast allen Geweben des Organismus aufzufinden.

#### a) M1-Subtyp

Der M1-Subtyp stellt den wichtigsten mAChR zur Aktivierung von MAP-Kinase (mitogen activated protein) dar, und regelt somit Prozesse, die für Lern- und Erinnerungsvermögen essenziell sind. Damit ist er hauptsächlich in der Kleinhirnrinde, dem Hippocampus und dem Corpus striatum des Großhirns lokalisiert (van Koppen und Kaiser, 2003; Eglén 2006).

#### b) M2-Subtyp

Im Unterschied zu dem M1-Rezeptor wird der M2-Rezeptor weitläufiger im Organismus exprimiert. Er übermittelt Anti-Nozizeption, wird im Myocard exprimiert und vermittelt dort die klassischen negativ chronotropen und ionotropen Effekte von ACh. Weiterhin kann er in den glatten Muskelzellen von verschiedenen Geweben, wie Magenfundus, Blase und Trachea gefunden werden (van Koppen und Kaiser, 2003; Eglén 2006).

#### c) M3-Subtyp

Der M3-Rezeptor übernimmt z.B. die Schlüsselrolle für die Speichelsekretion, die Pupillenkonstriktion und die Blasenkontraktion. Er ist in die Regulation der Nahrungsaufnahme und des Appetits involviert (van Koppen und Kaiser, 2003). Weiterhin stimuliert er den Zilienschlag in der Trachea (Klein et al. 2009) und scheint in der Regulation der Tränenproduktion beteiligt zu sein (Duncan und Collison, 2003).

#### d) M4-Subtyp

Der M4-Rezeptor spielt in der Regulation des peripheren Tonus der glatten Muskulatur eine unbedeutende Rolle. Er ist in die Modulation von zentralen dopaminergen Reaktionen involviert, was durch die Co-Lokalisation zu den dopaminergen Rezeptoren deutlich wird (van Koppen und Kaiser, 2003; Eglén 2006).

#### e) M5-Subtyp

Der M5-Rezeptor wird für die cholinerge Dilatation von zentralen Arterien und Arteriolen benötigt (van Koppen und Kaiser, 2003).

### 2.3.2.2 Signaltransduktionsweg

Die durch einen Agonisten hervorgerufene Desensitivierung eines mAChR beinhaltet für gewöhnlich eine Rezeptor-Phosphorylierung. Diese Rezeptormodifikation findet an Serin- oder Threonin-Resten der 3. zytoplasmatischen Schleife und am C-Terminus der Rezeptoren statt (van Koppen und Kaiser, 2003). Nach der Aktivierung der Rezeptoren koppeln sie sich an heterotrimere Guanin-Nucleotid-Bindungsproteine (G-Proteine) (Eglen 2006). Heterotrimere G-Proteine bestehen aus 3 Untereinheiten, bekannt als  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Durch ihre Aktivierung wird GTP gegen GDP ausgetauscht, was die Abgabe der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit von der  $\alpha$ -Untereinheit zur Folge hat. Diese bleibt mit dem Rezeptor verbunden (Strosberg und Nahmias, 2007) und kann so mit einer 20-100fach höheren Affinität mit den Effektoren interagieren. Diverse  $G\alpha$ -Untereinheiten können mit hoch spezifischer Wirkung ganz bestimmte Effektor-Enzyme beeinflussen. So aktiviert  $G\alpha_s$  die Adenylatcyclase (AC) wohingegen  $G\alpha_i$  diese hemmt;  $G\alpha_q$  aktiviert die Phospholipase C (PLC) (Hamm 1998). Die mAChR M1, M3 und M5 können an die Pertussis-Toxin-insensitiven  $G\alpha_{q/11}$ - und  $G\alpha_{13}$ -Untereinheiten koppeln und dadurch die PLC bzw. Phospholipase D (PLD) aktivieren (van Koppen und Kaiser, 2003). Erstere hydrolysiert wiederum das membranintegrierte Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, was zur Bildung der „second messenger“ Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerin (DAG) führt (Caulfield 1993).  $IP_3$  verursacht primär die Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus  $IP_3$ -sensitiven intrazellulären Speichern (Caulfield 1993), kann  $Ca^{2+}$  aber auch sekundär durch  $Ca^{2+}$ -sensitive oder Speicher-abhängige Mechanismen mobilisieren (Unno et al. 2005). Für  $IP_3$  wurden jedoch noch weitere biochemische Effekte nachgewiesen, die z.B. die Stimulation der Arachidonsäure-Freisetzung und eine Erhöhung des cAMP- bzw. cGMP-Niveaus beinhalten können (Caulfield 1993). DAG hingegen phosphoryliert verschiedene Proteine und kann nicht-selektive Kationenkanäle direkt aktivieren (Unno et al. 2005). M2- und M4-Rezeptoren koppeln dagegen an Pertussis-Toxin sensitive  $G\alpha_i$  und  $G\alpha_o$ -Untereinheiten und inhibieren dadurch die AC (van Koppen und Kaiser, 2003). mAChR können auch andere

Signaltransduktionswege regulieren, welche diverse Effekte auf Zellwachstum, -überleben und -physiologie haben. Zu den Effektoren zählen Mitogen aktivierte Proteinkinasen, Phosphoinositid-3-Kinasen, die kleine GTPase Rho A (Ras homology A) sowie Rac1 (Ras-related C3-botulinum toxin substrate 1) (Nathanson 2008; Eglén 2006). Eine andere Möglichkeit besteht in der von „second messenger“ unabhängigen Regulation von Ionenkanälen. Sie können die Endozytose sowie die Insertion von Ionenkanälen in die Zelloberfläche verursachen (Nathanson 2008).

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Versuchstiere**

Als Versuchstiere wurden spezifiziert pathogenfreie weibliche und männliche Mäuse (>10 Wochen Eileiter; >15 Wochen Trachea) der Zuchtlinie C57Bl6 (Wildtyp) verwendet, die sowohl vom Zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität Gießen, als auch von den Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden. Zum anderen wurden weibliche (>10 Wochen) gendefiziente Tiere (Muskarin-Rezeptor 1, Muskarin-Rezeptor 3, Muskarin-Rezeptor 4, Muskarin-Rezeptor 5 Knockout Mäuse) vom Zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität Gießen genutzt. Die Tiere wurden in Käfigen mit einer ad libitum Wasser- und Futtermittellversorgung sowie einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h gehalten. Alle Versuche wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz, entsprechend §1/§4/§17, durchgeführt.

#### **3.1.2 Lösungen, Medien, Puffer**

##### Alcianblau 8 GX pH 1,0

1 g Alcianblau 8GX (Hopkin and Williams, Chadwell Heath Essex, Großbritannien) wurde in 100 ml erwärmter 0,1 N HCl-Lösung gelöst. Nachfolgend wurde der pH-Wert der Lösung mittels pH-Meter (WTV GmbH, Weilheim, Deutschland) gemessen und mit Hilfe von 25%iger HCl-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf einen pH von 1,0 eingestellt. Die Lösung wurde zum Gebrauch mehrfach filtriert (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland).

##### Alcianblau 8 GX pH 2,5

1 g Alcianblau 8GX (Hopkin and Williams, Chadwell Heath Essex, Großbritannien) wurde in 100 ml erwärmter 3%iger Essigsäure gelöst. Nachfolgend wurde der pH der Lösung mittels pH-Meter (WTV GmbH, Weilheim, Deutschland) gemessen und auf 2,5 (25%ige HCl-Lösung; Merck, Darmstadt, Deutschland) eingestellt. Die Lösung wurde zum Gebrauch mehrfach filtriert (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland).

### Bouin-Lösung

Es wurden 15 Teile gesättigte wässrige Pikrinsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 5 Teile 37%iges Formalin (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und 1 Teil Eisessig (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) miteinander gemischt.

### Giemsa-Lösung

Die Giemsa-Lösung wurde kurz vor Gebrauch durch Mischung von 0,3 ml Giemsa (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 10 ml Aqua dest. hergestellt.

### Glycerol (gepuffert)

Gepuffertes Glycerol wurde aus 2 Stammlösungen hergestellt. Stammlösung A besteht aus 1,5 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , die 159 g/l entsprechen (Merck, Darmstadt, Deutschland) und die Stammlösung B aus 1,5 M  $\text{NaHCO}_3$ , die 126 g/l entsprechen (Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Stammlösung B musste zum Lösen leicht erhitzt werden. Anschließend wurde die Stammlösung A der Stammlösung B zugeführt. Der pH-Wert wurde mittels 1 M NaOH (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf 8,4 eingestellt. Zum Gebrauch wurden wasserfreies Glycerol (Merck, Darmstadt, Deutschland) und Puffer in einem Verhältnis von 1:1 gemischt.

### HCl-Lösung (0,1 N)

Es wurden 2,92 ml einer 25%igen HCl-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 200 ml Aqua dest. gelöst.

### HEPES-Ringer Puffer

1 l HEPES-Ringer Puffer wurde aus 0,418 g KCl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) 7,97 g NaCl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 1 ml einer 1 M MgCl-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 2,2 ml einer 1 M CaCl-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 1,98 g Glucose (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) sowie 2,38 g HEPES (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und 1l Aqua dest. hergestellt. Anschließend ist der pH-Wert der Lösung an einem pH-Meter bestimmt und mit 1 M NaOH (Merck, Darmstadt, Deutschland)

auf 7,4 eingestellt worden. Die Lösung wurde nachfolgend mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt und durch einen Porenfilter (Nalge Nunc International, New York, USA) membranfiltriert.

#### Histoblocklösung

Es wurden 10 ml Pferdeserum (Perbio Science, Bonn, Deutschland), 0,5 ml Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), 0,1 g Bovines Serum Albumin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), sowie 89,4 ml PBS-Puffer (siehe unten) angesetzt, um eine Histoblocklösung von 100 ml mit einem pH-Wert von 7,4 zu erhalten.

#### Kernechtrot (0,1%)

0,2 g Kernechtrot (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden in 200 ml kochender 5%iger Aluminiumsulfatlösung (Schmid GmbH & Co., Stuttgart-Untertürkheim, Deutschland) für 5 - 10 min. gelöst. Nach Erkalten der Lösung wurde diese filtriert (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Deutschland).

#### Paraformaldehyd (4% PFA)

Es wurden 40 g Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 400 ml Aqua dest gelöst und langsam auf 70°C erhitzt. Nachfolgend wurden einige Tropfen 2 M NaOH (Merck, Darmstadt, Deutschland) zugegeben, bis die Lösung klar wurde. Nachdem die Lösung erkaltet war, wurden 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer hinzu gegeben und der pH-Wert (7,2-7,4) mit pH-Indikatorstäbchen (Merck, Darmstadt, Deutschland) bestimmt. Im Anschluss wurde die entstandene Lösung mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt und durch einen Filter (Nalge Nunc International, New York, USA) der Porengröße 0,2 µm membranfiltriert.

#### PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)

Für die Herstellung von 5 l PBS-Puffer wurden folgende Reagenzien benötigt:

- 1) 28,75 ml einer 0,2 M *Lösung A*
- 2) 96,2 ml einer 0,2 M *Lösung B*
- 3) 22,4 g NaCl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)



Lösung A: 31,2 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in 1 l Aqua dest. gelöst

Lösung B: 35,6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 1 l Aqua dest. gelöst

Nach Mischung der Zusatzstoffe wurde die Lösung einer pH-Wert Kontrolle unterzogen (pH 7,4) und anschließend mit Aqua dest. auf 5 l ergänzt.

#### PBS + Natriumazid

Für den Ansatz von PBS + Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) wurden 2,875 ml der Stammlösung A des PBS-Puffers, 9,620 ml der Stammlösung B (siehe PBS-Puffer), sowie 2,24 g NaCl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und 0,05 g  $\text{NaN}_3$  (Merck, Darmstadt, Deutschland) gemischt und mit Aqua dest. auf 500 ml ergänzt.

#### Phosphatpuffer (0,2 M)

Um einen 0,2 M Phosphatpuffer zu erhalten, wurden 115 ml der Stammlösung A (PBS-Puffer) und 385 ml der Stammlösung B (PBS-Puffer) mit Aqua dest. auf 500 ml gefüllt.

#### Sörensenpuffer + 1 % Glutaraldehyd

Der Sörensenpuffer wurde aus zwei Stammlösungen angesetzt. Stammlösung A bestand aus 9,078 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland), die in 100 ml Aqua dest. gelöst wurden. Für die Stammlösung B wurden 11,876 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 1000 ml Aqua dest. gelöst. Anschließend wurden 80,8 ml Lösung B mit Lösung A auf 100 ml aufgefüllt und kurz vor Gebrauch 1% Glutaraldehyd (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben und gut vermischt. Der pH-Wert des Puffers lag bei 7,4.

#### Sulfitwasser

In einem Becherglas wurden 0,5 g Natriumdisulfit (Merck, Darmstadt, Deutschland) abgewogen und in 99 ml Aqua dest. gelöst. Unter dem Abzug wurde anschließend 1 ml einer 25%igen HCl-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) unter ständigem Mischen zugeführt.

Sylgardgel 18

Für die Herstellung des Gels wurden 9 Teile Sylgard 184 Base (Dow Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland) und 1 Teil Sylgard 184 Härter (Dow Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland) abgewogen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur miteinander gemischt. Das Gemisch wurde nach 1 h in einen Exsikkator gestellt, in dem mit Hilfe einer Unterdruckpumpe ein Vakuum erzeugt wurde, um entstandene Luftblasen zu beseitigen. Es wurden 1,2 ml des noch zähflüssigen Gels mittig auf ein Delta T-Dish 0,17 mm, klar (Biotechs Inc., Butler, USA) aufgetragen, über den Boden verteilt und zur Aushärtung bei 60°C über Nacht in den Wärmeschrank (Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland) gestellt.

**3.1.3 Verbrauchsmaterial**

Eppendorf-Gefäße, 1 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Gilson S.A.S., Villiers-le-Bel, Frankreich
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

**3.1.4 Pharmaka**

Pharmaka	Quelle	Konzentration
Acetylcholinchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	$10^{-6}$ M
Adenosin 5` triphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	$10^{-4}$ M
Atropinsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	$10^{-6}$ M
5-Hydroxytryptamin (Serotonin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	$10^{-4}$ M $10^{-6}$ M
Muskarinchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	$10^{-4}$ M

*Tab. 1:* Auflistung der für die Zilienfunktionsmessung genutzten Pharmaka mit der jeweiligen Quelle und ihrer Endkonzentration.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Präparation und Probenentnahme der Eileiter

Die weiblichen Mäuse wurden durch Inhalation einer Überdosis an Isofluran (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) getötet, in Rückenlage fixiert und mit 70% Alkohol befeuchtet. Nach einem Hautschnitt vom Brustbeinknorpel bis zur Mitte des Beckens sowie beidseits entlang des letzten Rippenbogens wurde die Bauchhöhle eröffnet und die Aorta abdominalis dargestellt. Diese wurde mit einem Schnitt durchtrennt, um das Tier zu entbluten. Um sowohl Uterus, Eileiter als auch die Ovarien sichtbar zu machen, musste zunächst das Darmkonvolut nach kranial verschoben bzw. entfernt werden. Der aus dem Mesometrium freipräparierte weibliche Geschlechtsapparat (Abb. 7) konnte anschließend, nach vorangegangener Durchtrennung der beiden Ligg. ovarii proprii und einem Schnitt kaudal der Zervix, entnommen werden. Die weiterführende Präparation erfolgte in einer mit Sylgardgel beschichteten Petrischale (Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland) unter einem Stereomikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland).

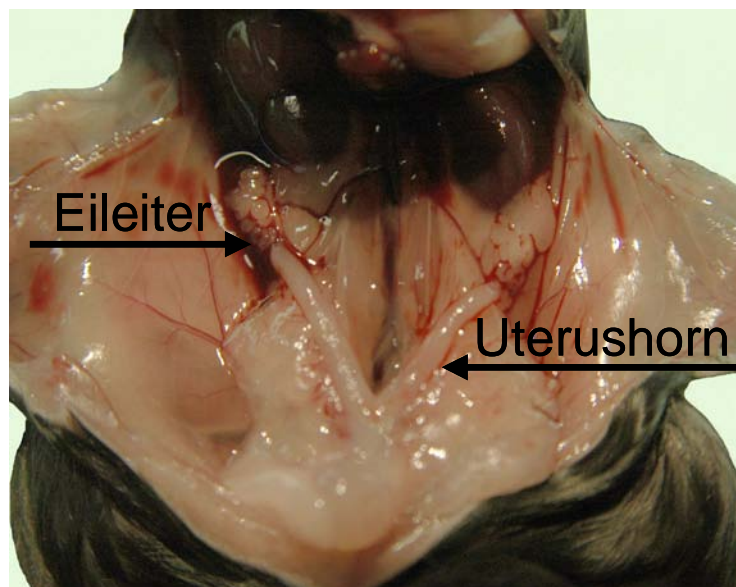
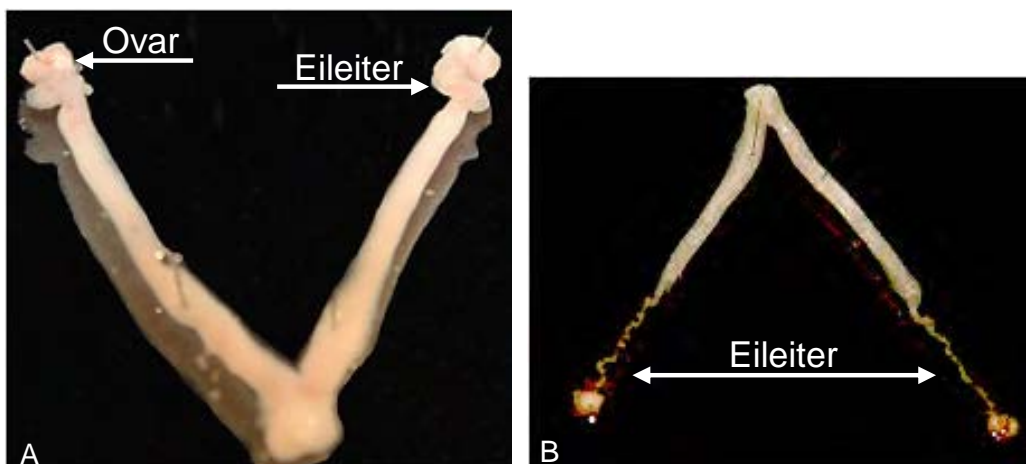


Abb. 7: In situ Darstellung des freipräparierten Uterus sowie der Eileiter. Darstellung der abdominalen in situ Verhältnisse einer weiblichen Maus nach vorangegangener Entnahme des Darmkonvolutes.

Nach Überführung des Organsystems in die Petrischale wurden Uterushörner und Ovarien mittels Minutien (Fiebig Lehrmittel, Berlin, Deutschland) auf dem Sylgardgel fixiert. Zum Schutz vor einer Austrocknung erfolgte umgehend eine Befeuchtung mittels kaltem HEPES-Ringer Puffer. Schließlich wurden beide Bursae ovaricae eröffnet und die Eileiter von der Mesosalphinx frei präpariert (Abb. 8) Ein Eileiter wurde stets für die Zilienfunktionsmessung verwendet, der zweite diente der Gewinnung von Proben für histologische oder rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen.



*Abb. 8:* Illustration des auf Sylgardgel fixierten und frisch entnommenen Organsystems vor (A) und nach der Entfernung (B) der Mesosalphinx.

### 3.2.2 Zyklusbestimmung

Nach Durchtrennung der Aorta abdominalis wurde bei jedem Tier aus der eröffneten Vagina ein Vaginalabstrich mit einem Q-Tip (Velfera, Düren, Deutschland) durchgeführt und die Zellen auf einem SuperFrost Objektträger (Menzel GmbH und Co. KG, Braunschweig, Deutschland) ausgestrichen. Die Abstriche wurden getrocknet, in Methanol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) fixiert und anschließend 30-45 min mit einer Giemsa-Lösung gefärbt. Anhand der unterschiedlich vorkommenden Zelltypen (Tab. 2 und Abb. 9) und von Schleim wurde folgende Zuordnung in Zyklusstadien vorgenommen:

<u>Zyklusstand</u>	<u>Charakteristik</u>
1) Proöstrus	Oberflächenzellen (OZ), Parabasalzellen (PZ),
2) Östrus	Schollen (Sch)
3) Metöstrus	Leukozyten (L), vereinzelt Schollen und Oberflächenzellen
4) Diöstrus	viel Schleim (S), regenerierte Zellen, tlw. Leukozyten

Tab. 2: Übersicht über das Vorkommen zyklusabhängiger Zelltypen im Vaginalabstrich der Maus.

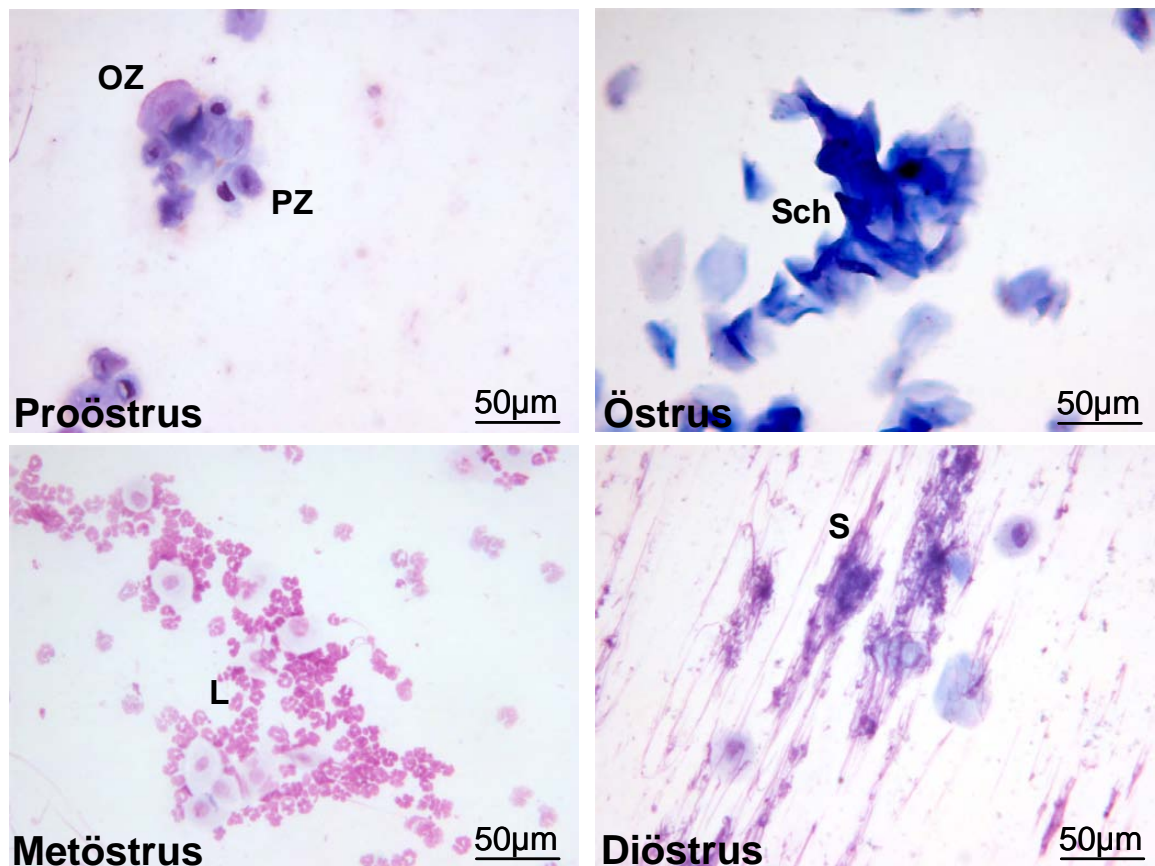
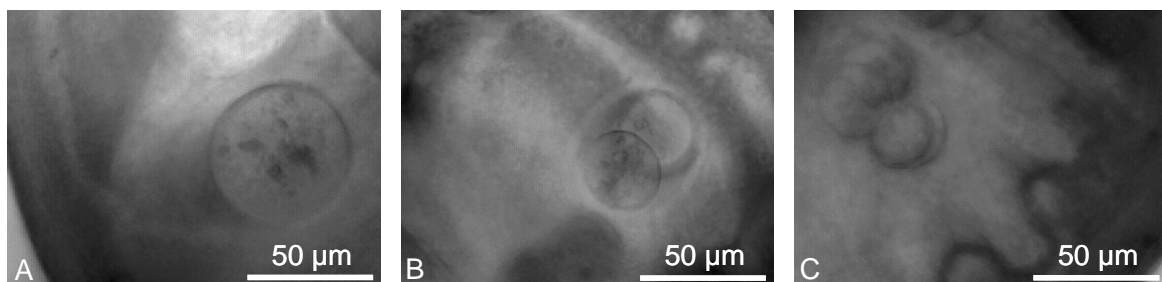


Abb. 9: Darstellung zyklusabhängig vorkommender Zelltypen im Vaginalabstrich mittels Giemsa-Färbung.

### 3.2.3 Verpaarung und Trächtigkeitsnachweis

Um trüchtige Tiere in die Untersuchungen mit einbeziehen zu können, wurden im Zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität Giessen jeweils 2 geschlechtsreife weibliche mit einer geschlechtsreifen männlichen Maus der Linie C57Bl6 miteinander verpaart. Der Begattungserfolg konnte mittels Vaginalplug nachgewiesen werden. Die Plugkontrolle wurde zweimal täglich im Abstand von 8 Stunden durchgeführt. Der Trüchtigkeitnachweis erfolgte nach Entnahme und Präparation der Eileiter (siehe 3.2.1) unter dem Mikroskop des Messstands durch Nachweis von Einzell-, Zweizell- und Vierzell-Stadien im Eileiter der Maus (Abb. 10).



*Abb. 10:* Darstellung der embryonalen Entwicklung im Mäuseeileiter in der frühen Trüchtigkeit. Illustriert sind Einzell- (A), Zweizell- (B) sowie Vierzellembryonen (C) im geschlossenen Eileiter mittels videomikroskopischen Systems. Alle Embryonen befinden sich im Isthmus.

### 3.2.4 Histomorphologische Untersuchung des Gewebes

Die histologischen Untersuchungen erfolgten an jeweils 3 Eileiterproben pro Zyklusstand (PAS + Amylase nur 2 pro Zyklusstand) sowie an 3 Proben pro Trüchtigkeitstag 1 und 2 (PAS + Amylase nur 2 pro Trüchtigkeitstag).

#### 3.2.4.1 Anfertigung von histologischen Paraffinschnitten

Für die Anfertigung von histologischen Paraffinschnitten wurden die frisch entnommenen Eileiter zunächst für 6-8 h in Bouin-Lösung fixiert. Anschließend wurden die Proben 3 Tage mehrmals täglich mit 70%igem Alkohol gespült, um das Fixans vollständig zu entfernen. Nach Entwässerung und Überführung der Proben in Paraffin (Einbether: Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden diese aufgeblickt (Ausgießstation: Leica, Wetzlar, Deutschland). Die am Rotationsmikrotom (Leica,

Wetzlar, Deutschland) 4 µm dick geschnittenen Proben wurden nach Streckung im 60°C warmen Wasserbad (Medita, Burgdorf, Deutschland) auf SuperFrost Objektträger (Menzel GmbH und Co. KG, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht und zur Trocknung bei 37°C über Nacht in den Wärmeschrank (Memmert, Schwabing, Deutschland) gelegt.

### 3.2.4.2 Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung

Die HE-Färbung diente als Übersichtsfärbung zur morphologischen Charakterisierung sowie für die Bestimmung der relativen Häufigkeit der Eileiterepithelzellen. Sie wurde entsprechend Tab. 3 durchgeführt.

Arbeitsschritt	Chemikalien	Dauer	Quelle
1. Entparaffinieren	Xylol	3x10 min	Merck, Darmstadt, Deutschland
	absoluter Alkohol	2 x 5 min	
	96% Alkohol	5 min	
	80% Alkohol	5 min	
	70% Alkohol	5 min	
	50% Alkohol Aqua dest	5 min	
2. Färbung	Hämatoxylin	½ min	Anatomical Pathology International Runcorn, Cheshire, GB
3. Bläuen	Leitungswasser (fließend)	10 min	
4. Gegenfärbung	Eosin	5 min	Merck, Darmstadt, Deutschland
5. Spülen	Leitungswasser	1 min	
6. Entwässern	70% Alkohol	< 1 min	
	80% Alkohol	2 x 2 min	
	96% Alkohol	2 x 2 min	
	absoluter Alkohol	3 x 2 min	
	Xylol	3 x 10 min	
7. Eindeckeln	Vitro Clud und Deckgläser		R.Langenbrinck, Teningen, Deutschland  Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe, Deutschland

Tab. 3: HE-Färbeprotokoll

### 3.2.4.3 Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS)

Die PAS-Reaktion wurde zum Nachweis von neutralen Mukopolysacchariden, vor und nach Amylaseverdau, herangezogen. Die Färbung wurde entsprechend Tab. 4 durchgeführt.

Arbeitsschritt	Chemikalien	PAS ohne Amylase	PAS mit Amylase	Quelle
1. Entparaffinieren	Xylol	3 x 10 min	3 x 10 min	Merck, Darmstadt, Deutschland
	absoluter Alkohol	2 x 5 min	2 x 5 min	
	96% Alkohol	5 min	5 min	
	80% Alkohol	5 min	5 min	
	70% Alkohol	5 min	5 min	
	50% Alkohol	5 min	5 min	
	Aqua dest	5 min	5 min	
2. Amylaseverdau	0,5% Amylase		10 min	Merck, Darmstadt, Deutschland
3. Waschen	Aqua dest		kurz	
4. Färbung	Perjodsäurelösung	10 min	10 min	Merck, Darmstadt, Deutschland
5. Wässern	Leitungswasser (fließend)	10 min	10 min	
6. Waschen	Aqua dest	kurz		
7. Färbung	Schiffs Reagenz	10 min	10 min	Merck, Darmstadt, Deutschland
8. Waschen	Sulfitwasser		2 x 3 min	(siehe 3.1.2)
9. Wässern	Leitungswasser (fließend)	10 min	10 min	
10. Gegenfärbung	Hämatoxylin	2 s	2 s	Anatomical Pathology International Runcorn, Cheshire, Großbritannien
11. Waschen	Leitungswasser (fließend)	10 min	10 min	
12. Entwässern	80% Alkohol	5 min	5 min	
	96% Alkohol	5 min	5 min	
	absoluter Alkohol	2 x 5 min	2 x 5 min	
	Xylol	2 x 10 min	2 x 10 min	
13. Eindeckeln	Vitro Clud			R.Langenbrinck, Teningen, Deutschland
	und Deckgläser (24 x 50 mm)			Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tab. 4: PAS-Färbeprotokoll



3.2.4.4 Alcianblau-Färbung

Saure Mucopolysaccharide wurden durch die Alcianblau-Färbung (Tab. 5) dargestellt. In Abhängigkeit von dem pH-Wert ist eine Unterscheidung zwischen Sulfat- und Karboxylgruppen möglich. Bei einem pH-Wert von 2,5 werden beide Gruppen gefärbt, bei einem pH-Wert von 1,0 nur die Sulfatgruppen.

Arbeitsschritt	Chemikalien	Alcianblau pH 1,0	Alcianblau pH 2,5	Quelle
1. Entparaffinieren	Xylol	3 x 10 min	3 x 10 min	Merck, Darmstadt, Deutschland
	absoluter Alkohol	2 x 5 min	2 x 5 min	
	96% Alkohol	5 min	5 min	
	80% Alkohol	5 min	5 min	
	70% Alkohol	5 min	5 min	
	50% Alkohol	5 min	5 min	
2.	Aqua dest	5 min	5 min	Merck, Darmstadt, Deutschland
	0,1 N HCL	3 min		
3. Färbung	3% Essigsäure		3 min	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
	Alcianblau	30 min	30 min	
4.	Alcianblau	30 min	30 min	Hopkin and Williams, Chadwell Heath Essex, Großbritannien
	0,1 N HCL	kurz		
5. Waschen	3% Essigsäure		kurz	Hopkin and Williams, Chadwell Heath Essex, Großbritannien
	Aqua dest	kurz	kurz	
6. Gegenfärbung	0,1% Kernechtrot	5 min	5 min	Merck, Darmstadt, Deutschland
	Aqua dest	kurz	kurz	
7. Waschen	Aqua dest	kurz	kurz	Merck, Darmstadt, Deutschland
	70% Alkohol	2 min	2 min	
	80% Alkohol	2 min	2 min	
	96% Alkohol	2 min	2 min	
	absoluter Alkohol	2 x 2 min	2 x 2 min	
	Xylol	2 x 10 min	2 x 10 min	
8. Entwässern	Vitro Clud			R.Langensbrinck, Teningen, Deutschland
	und			
9. Eindeckeln	Deckgläser (24 x 50 mm)			Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

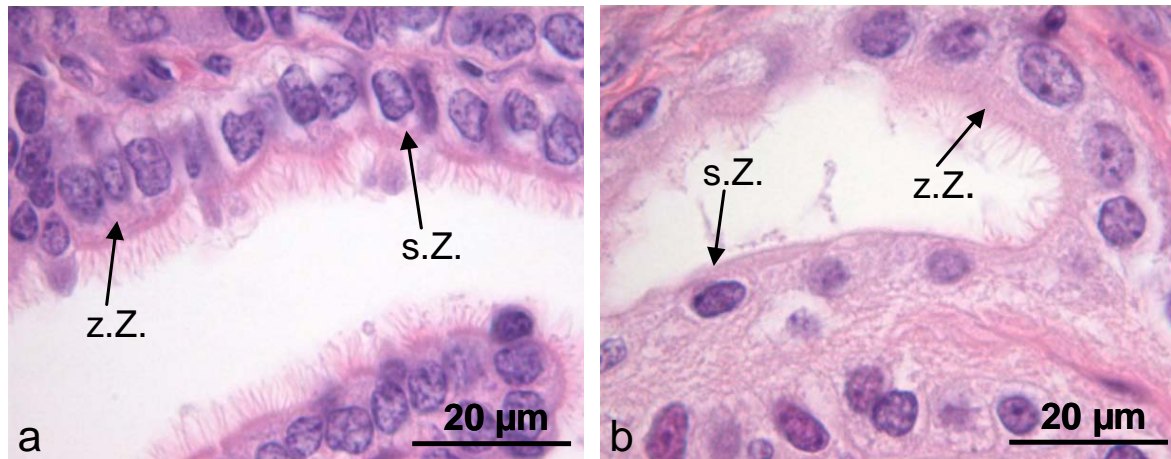
Tab. 5: Alcianblau-Färbeprotokoll

#### 3.2.4.5 Mikroskopische Auswertung

Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte mit Hilfe eines DCM 1000 Lichtmikroskops (Leica, Wetzlar, Deutschland) und dem 10x, 20x, 40x sowie dem 100x Ölimmersionsobjektiv (Olympus, Hamburg, Deutschland).

#### **3.2.5 Bestimmung der relativen Häufigkeit von zilientragenden und sekretorischen Zellen im Eileiter**

Eine Zählung der zilientragenden sowie sekretorischen Zellen erfolgte in den beiden Abschnitten Ampulla und Isthmus an 4 µm dicken, HE gefärbten Paraffinschnitten in den Zyklusstadien Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus sowie an den Trächtigkeitstagen 1 und 2. Zur Auswertung wurden Teilabschnitte (Ampulla: 14-22; Isthmus: 11-20) entlang des Epithels (im Uhrzeigersinn) an einem Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) mit dem 100x Ölobjektiv (Olympus, Hamburg, Deutschland) aufgenommen und zur weiteren Verwendung auf der Festplatte des angeschlossenen Computers gespeichert. Es wurden ausschließlich Zellen gezählt, die einem Zelltypen eindeutig zuzuordnen waren (Abb. 11). Das Zählen wurde erst beendet, wenn das zufällige Auftreten eines Extremwertes in der letzten Messung den Mittelwert der bisherigen Messungen um nicht mehr als einen gewissen zugelassenen Prozentsatz (5%) verändert hat. Dies konnte mit Hilfe eines Makros zur Bestimmung des kleinsten zulässigen Stichprobenumfangs für stereologische Messungen an histologischen Schnitten (Baur 1969) berechnet werden. Im Falle der Zählung im Segment Isthmus war es durch hohe Schwankungen jedoch nicht möglich eine ausreichende Anzahl von Zellen zu zählen, um unter den Prozentsatz von 5% zu gelangen.



*Abb. 11:* Zählung zilienträger (z.Z) sowie sekretorischer Zellen (s.Z) in den Segmenten Ampulla (a) und Isthmus (b) des Eileiters.

### 3.2.6 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie diente dem Nachweis der Zilien mittels Anti- $\beta$ -Tubulin IV Antikörper.

#### 3.2.6.1 Indirekte Immunhistochemie an Paraffinschnitten mittels Alexa Fluor 555 Labeling Kit

Nach Entparaffinierung der Schnitte (siehe Tab. 3-5) wurden diese kurz in PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und die Zellmembranen permeabel zu machen, wurden die Schnitte für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer mit einer Histoblocklösung inkubiert. Zur Konjugation des Primärantikörpers (Tab. 6) mit einem Fluorophor wurde dieser zunächst mit einem Alexa-555-Fluorophor gekoppelten, monovalenten Fab-Fragment (Komponente A) für 5 min inkubiert (Tab. 6). Anschließend wurde der markierte Antikörper mit dem gleichen Volumen (Tab. 7) der Blocking Komponente B für weitere 5 min inkubiert. Pro 1  $\mu$ g IgG1 wurden 10  $\mu$ l der Komponente A/B eingesetzt. Kurz vor Gebrauch wurde die Antikörperlösung mittels PBS +  $\text{NaN}_3$  auf das Endvolumen aufgefüllt. Nachdem die Blocklösung von den Objektträgern entfernt wurde, konnte die Antikörperlösung aufgetragen werden. Nach einer Inkubationsdauer von 1 Stunde im Dunkeln erfolgte das Waschen der Schnitte (3 x

10 min) in PBS mit anschließender Nachfixation in 4% PFA (10 min). Vor dem Eindeckeln (Deckgläser 25 x 60 mm: Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) der Objektträger mit gepuffertem Glycerol wurden diese erneut mit PBS (2 x 10 min) gewaschen. Die Schnitte wurden bei 4°C im Dunkeln gelagert.

<b>Primärantikörper</b>	<b>Wirt</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Quelle</b>
Anti-β-Tubulin IV	Maus	1:250 (indirekte Immunhistochemie 1:1000)	BioGenex, San Ramon, USA

<b>Labeling Kit</b>	<b>Wirt</b>	<b>Funktion</b>	<b>Quelle</b>
Komponente A:	Maus IgG	Zenon Alexa Fluor 555	Invitrogen, Oregon, USA
Komponente B:	Maus IgG	Zenon blocking reagent	Invitrogen, Oregon, USA

*Tab. 6:* Verwendeter Primärantikörper mit dazu gehörigem Labeling Kit.

AK-Antigen	AK-Konz. [µg/ml]	AK-Verdünnung	Anzahl der OT	Vol. des verdünnten AK [µl]	entspricht µl AK	entspricht µg AK	Vol. der Labeling Komponenten A=B [µl]
β-Tubulin	1000	1:250 (indirekte IHC 1:1000)	10	100	4	4	40

*Tab. 7:* Beispiel für die Berechnung des Volumens der Kit-Komponenten. AK=Antikörper, IHC= Indirekte Immunhistochemie, OT=Objektträger.

### 3.2.6.2 Mikroskopische Auswertung

Die Auswertung der Immunhistochemie erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Jena, Deutschland) mittels Cy3-Filter (Detektionsspektrum: 545-610 nm). Zur Betrachtung der Schnitte wurden ein 20x und 40x Objektiv (Olympus, Hamburg, Deutschland) genutzt. Es wurden pro Zyklusstand und Trächtigkeitstag 2 Eileiterproben untersucht.

## 3.2.7 Rasterelektronenmikroskopie

### 3.2.7.1 Probenaufbereitung

Nach Entnahme der Eileiter wurden ein Stück Ampulla und Isthmus auf ein circa 1 cm x 1 cm x 0,4 cm großes Korkstückchen gelegt, befeuchtet, längs durch eine Federschere (FST, Heidelberg, Deutschland) eröffnet und mittels Minutien (Fiebig-Lehrmittel, Berlin, Deutschland) der Größe 10 befestigt. Zur Fixation der Proben wurden die Korkstücke, mit der Probenseite nach unten für mindestens 24 h in ein mit Sörensenpuffer + 1% Glutaraldehyd gefülltes Reagenzröhrchen (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) gegeben. Im Anschluss daran erfolgte ein Auswaschen der Proben in Sörensenpuffer (3 x 10 min). In einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 90% jeweils 10 min, absoluter Alkohol 5 min und absoluter Alkohol für 3 x 20 min), gefolgt von 3:1 Alkohol:Isoamylacetat (Merck, Darmstadt, Deutschland) (10 min), 1:1 Alkohol:Isoamylacetat (10 min), 1:3 Alkohol:Isoamylacetat (10 min), Isoamylacetat (3 x 10 min) wurden die Proben entwässert.

### 3.2.7.2 Kritisch-Punkt Trocknung

Nach Entwässerung der Proben wurden diese mit dem Medium Isoamylacetat in einen speziellen Präparatekorb (BAL-TEC GmbH, Witten/Ruhr, Deutschland) überführt. Dieser wurde in die Druckkammer des Kritisch-Punkt-Apparates (Kritisch-Punkt-Apparat CPD 030, BAL-TEC GmbH, Witten/Ruhr, Deutschland) eingebracht. In dem Gerät wurde das Isoamylacetat bei 10°C durch achtmaliges Spülen mit Trocknungsflüssigkeit vollständig in CO<sub>2</sub> überführt. Danach wurden sowohl die Temperatur als auch der Druck von CO<sub>2</sub> auf den kritischen Punkt erhöht. Mit

Erreichen des kritischen Punktes und dem damit verbundenen Übergang der Flüssigkeit in Gasform ist die Trocknung der Proben ohne schädliche Lufteinwirkung beendet.

#### 3.2.7.3 Sputtern

Die getrockneten Proben wurden auf Probenteller (BAL-TEC GmbH, Witten/Ruhr, Deutschland) mit einem Durchmesser von 12,5 mm aufgeklebt und in ein Sputter-Gerät (BAL-TEC GmbH, Witten/Ruhr, Deutschland) eingesetzt, um dort bei einem Strom von 43 mA (3 min) mit Gold von einer Goldscheibe (BAL-TEC GmbH, Witten/Ruhr, Deutschland) beschichtet zu werden.

#### 3.2.7.4 Mikroskopische Auswertung

Die Auswertung erfolgte an einem Rasterelektronenmikroskop (Zeiss DSM 950, Jena, Deutschland) in Vergrößerungen von 200x bis 10000x. Es wurden pro Zyklusstand 3 Eileiterproben und pro Trächtigkeitstag 1 und 2 jeweils 2 Proben untersucht.

### 3.2.8 Untersuchung der Zilienfunktion

#### 3.2.8.1 Probenentnahme

##### Eileiter

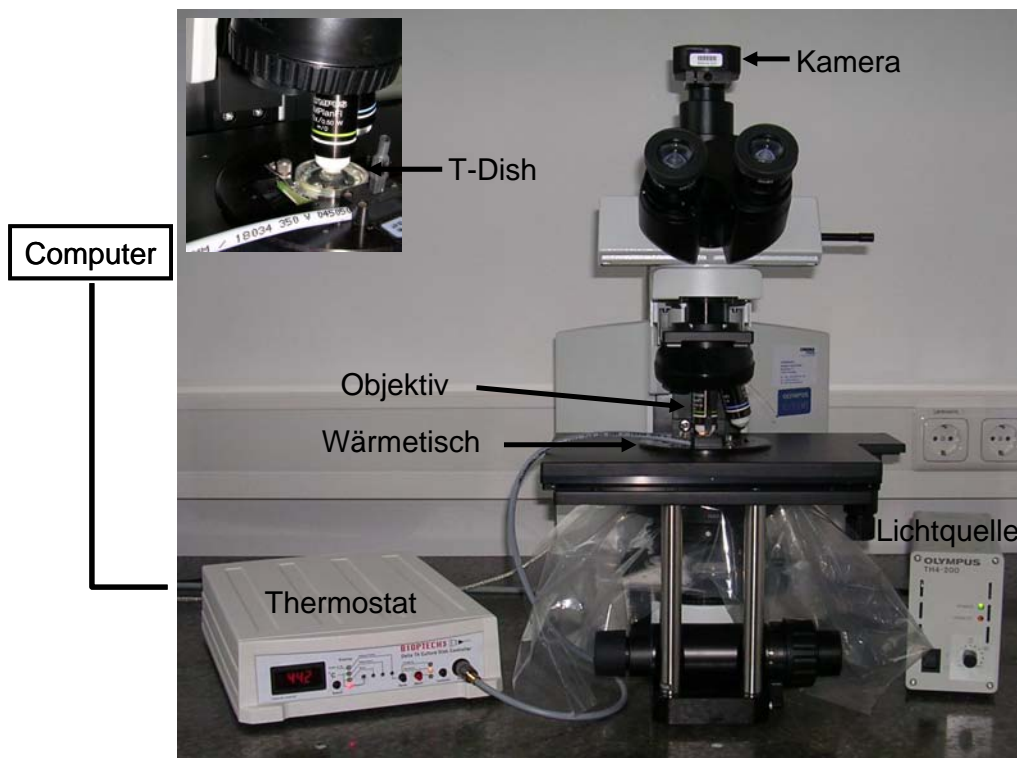
Die Proben für die Zilienfunktionmessungen wurden wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben entnommen. Ein circa 2 mm großes Stück Ampulla (direkt unterhalb des Infundibulums) und ein 3 mm langes Stück aus der Mitte des Isthmus wurden jeweils mittig in ein Delta T-Dish gelegt und längs eröffnet. Die Gewebeproben wurden nachfolgend an jeder Ecke mit Minutien (Größe 10) aufgepinnt und mit kaltem HEPES-Puffer bedeckt.

### Trachea

Zum Vergleich der ziliären Systeme im Eileiter und in der Trachea wurden auch Tracheaprobe in die Untersuchung mit einbezogen. Im Anschluss an die Tiertötung und das Entbluten, (3.2.1), wurde der Thorax durch Entfernen des Diaphragmas eröffnet. Die Rippen wurden beidseits am Knorpel-Knochen Übergang, ausgehend von der kaudalen Thoraxapertur, nach kranial durchtrennt und das Brustbein wurde entfernt. Nach Freipräparation der Trachea wurde diese unterhalb des Kehlkopfes sowie vor der Bifurcatio tracheae zwischen den Knorpelspannen durchtrennt, entnommen und in ein mit HEPES-Ringer Puffer gefülltes Petri-Schälchen der Größe 35 x 10 mm (Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland) gelegt. Innerhalb des Schälchens erfolgte das Waschen und detaillierte Entfernen der bindegewebigen Reste unter einem Stereomikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland). Im Anschluss daran wurde die Trachea mit nach oben gerichteter Öffnung der Trachealringe mittig in ein mit Sylgard-Gel beschichtetes T-Dish gelegt, an beiden Enden mittels Minutien (Größe 15) unter leichter Spannung aufgepinnt und unter Durchtrennung des M. trachealis der Länge nach eröffnet.

#### 3.2.8.2 Der Messstand

Sowohl die Messungen der Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG) als auch die der Zilienschlagfrequenz (ZSF) erfolgten an einem Olympus BX61WI Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland), mit einem 20er und einem 40er Wasserimmersionsobjektiv (Olympus, Hamburg, Deutschland). An dem Mikroskop waren zusätzlich eine Lichtquelle (Olympus, Hamburg, Deutschland), sowie ein Thermostat (Bioprotech Inc., Butler, USA) angeschlossen. Weiterhin befand sich oberhalb des Okulars eine monochrome CMOS Kamera (EHD Imaging GmbH, Damme, Deutschland), die Bilder vom optischen System in bestimmten Frequenzen aufnimmt und an den angeschlossenen Computer überträgt (Abb. 12). Für die Aufnahme und Auswertung wurden die Imaginganalysesoftware „StreamPix“ (Norix Inc., Montreal, Kanada), die Software „Image-Pro Plus“ (MediaCybernetics, Inc., Silver Spring, USA), sowie „AutoSignal v. 1,7“ (SYSTAT Software GmbH, Erkrath, Deutschland) verwendet.



*Abb. 12:* Darstellung des Messstandes.

Die mit den Organproben bestückten Delta T-Dishes dienen als Messkammer und wurden nach Entfernung des kalten HEPES-Puffers mit 1,5 ml 37°C (Eileiterproben) bzw. 30°C (Tracheaprobe) warmen HEPES-Puffer gefüllt und in einen Halter (Bioprotechs Inc., Butler, USA), welcher sich direkt unter den Objektiven befand, gespannt. Die Messkammern wurden von unten (sowohl rechts als auch links) durch Thermostatfühler beheizt, so dass eine konstante Temperatur von 37°C (Eileiterproben) bzw. 30°C (Tracheaprobe) gewährleistet war. Da die gegossenen Sylgardgele nicht exakt dieselbe Schichtdicke aufwiesen, wurde bei jedem verwendeten Delta T-Dish einmalig eine Messung der notwendigen Temperatureinstellung am Thermostat vorgenommen, um im Versuch die optimale Puffertemperatur zu erreichen.



### **3.2.8.3 Messung der Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG)**

#### Versuchstiere

Die Messungen der PTG des *Eileiters* erfolgten an weiblichen Mäusen vom Wildtyp (unverpaart und trächtig) sowie an weiblichen Muskarinrezeptor-Knockout-Mäusen (M1<sup>-/-</sup>; M3<sup>-/-</sup>; M4<sup>-/-</sup>; M5<sup>-/-</sup>). Für die Bestimmung der PTG der *Trachea* wurden ausschließlich Wildtyp-Mäuse (weibliche bzw. männliche) verwendet.

#### Messungen

Die Messungen wurden mit folgenden Einstellungen der Imagingsoftware „StreamPix“ (Norix Inc., Montreal, Kanada) vorgenommen:

- 1) Bildgröße: x: 640 y: 512
- 2) Aufnahmefrequenz: 20 MHz
- 3) Aufnahmen insgesamt: 200 (1 Aufnahme pro 84 ms)

Anschließend wurde die Messkammer mit einem Delta T-Dish, welches ausschließlich mit Aqua dest gefüllt war, bestückt und das 20er Objektiv wurde leicht hineingetaucht. Sowohl die Lichtquelle als auch das Thermostat (Temperatur Delta T-Dish abhängig) wurden angeschaltet, so dass Objektiv und Thermofühler vorgewärmt waren.

Im Anschluss daran erfolgten die Tiertötung, die Organentnahme und das Aufpinnen der geöffneten Organsegmente in Delta T-Dishes. Um das Austrocknen der Proben bis zum Einspannen in die Messkammer zu verhindern, wurden diese kurzzeitig mit kaltem HEPES-Puffer benetzt. 10 min vor Versuchsbeginn wurden die Delta T-Dishes mit 1,5 ml warmen HEPES-Ringer Puffer gefüllt und in die Messkammer eingespannt, damit eine konstante und ausreichend hohe Puffertemperatur von Beginn an erreicht werden konnte. Für die Messung wurden direkt nachfolgend 3,0 µl (Messung Eileiter;  $9 \times 10^6$  Dynabeads) bzw. 2,3 µl (Messung Trachea;  $6,9 \times 10^6$  Dynabeads) Dynabeads (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norwegen) mit einer durchschnittlichen Größe von 2,8 µm in den Puffer pipettiert und anschließend mit diesem durch mehrmaliges Pipettieren so gemischt, dass sich keine Partikel am Boden des Sylgardgels ablagerten.

a) Messungen an Wildtyp-Mäusen

Die Messungen der PTG unter Einwirkung diverser Pharmaka dienen der Etablierung des Systems und der Charakterisierung des Reaktionsvermögens und -art des zilientragenden Epithels.

Folgende Versuche fanden statt:

- 1) Untersuchung der Stimulierbarkeit der Zilien durch Zugabe von:
  - **ATP** nach der 76. Minute  
(5 Messungen im Abstand von 1 Minute)
  - **Serotonin** nach der 76. Minute  
(10 Messungen im Abstand von 1 Minute)
  
- 2) Untersuchungen zur Beteiligung des cholinergen Systems an der Steuerung der Zilienaktivität durch Zugabe von Agonisten und Antagonisten der nikotinischen und muskarinischen Rezeptoren
  - **Atropinsulfat** nach der 81. Minute (5 Messungen im Abstand von 1 Minute) direkt im Anschluss an die Messungen mit ATP
  - **Muskarinchlorid** nach der 81. Minute (5 Messungen im Abstand von 1 Minute) direkt im Anschluss an die Messungen mit ATP
  - **Acetylcholinchlorid** nach der 76. Minute  
(5 Messungen im Abstand von 1 Minute)

b) Messungen an trächtigen Mäusen vom Wildtyp

Zur Untersuchung des lokalen bzw. generalisierten Einflusses der frühen Trächtigkeit auf die Zilientätigkeit sowie auf die Funktion des cholinergen Systems im Eileiter wurden Messungen der PTG unter Einwirkung von ATP, gefolgt von Atropinsulfat durchgeführt (siehe oben).

### c) Messungen an M1-, M3-, M4- und M5-Rezeptor-Knockout-Mäusen

Zur Klärung der Bedeutung der einzelnen Muskarinrezeptoren wurden Messungen mit ATP, gefolgt von Atropinsulfat (wie oben beschrieben) mit jedem Knockout-Mausstamm durchgeführt.

### Messungen am Eileiter

#### a) Ampulla

Die Messungen am Abschnitt Ampulla wurden immer 55 min nach dem Tod des Tieres durchgeführt, gefolgt von weiteren 7 Messungen im Abstand von 3 min zur Bestimmung der Basisgeschwindigkeit. Im Anschluss daran erfolgte umgehend die Zugabe des jeweiligen Pharmakons mit Messungen im Abstand von 1 min. Um zu verhindern, dass sich Dynabeads am Boden ablagern, und zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Verteilung der Zusätze wurde der im T-Dish befindliche Puffer vor jeder Messung mittels Pipette gemischt. Damit die Bewegung des Mediums die Zilientätigkeit nicht während der Messung beeinflusst, musste das Mischen zur Beruhigung des Systems mindestens 1 min vor Messbeginn beendet sein. Zwischen den Messungen erfolgte stets eine Temperaturkontrolle.

Das folgende Zeitschema (Abb. 13) stellt den standardisierten Versuchsablauf zur Messung der PTG in der Ampulla dar:

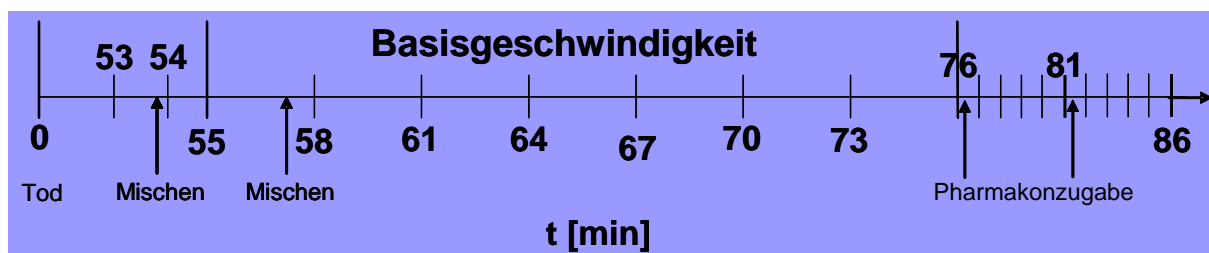


Abb. 13: Zeitlicher Ablauf der PTG-Messungen am Teilstück Ampulla.

b) Isthmus

Die Messung am Teilstück Isthmus (Abb. 14) fanden direkt im Anschluss an die Messungen der PTG in der Ampulla statt. Im Gegensatz zur Ampulla wurden nur 4 Messungen im Abstand von 3 min zur Bestimmung der Basisgeschwindigkeit *ohne nachfolgende Pharmakonzugabe* durchgeführt.

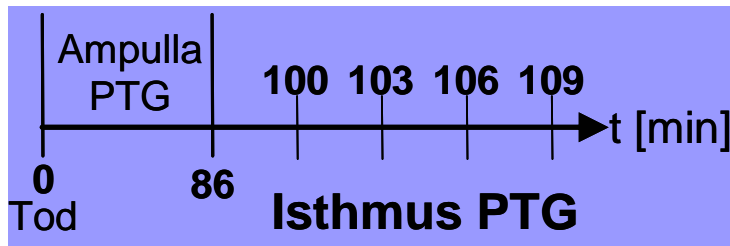


Abb. 14:

Zeitlicher Ablauf der PTG-Messungen am Teilstück Isthmus.

Messungen an der Trachea

Im Gegensatz zum Eileiter erfolgte die erste Messung an der Trachea bereits 30 min nach dem Tod des Tieres. Zur Bestimmung der Basisgeschwindigkeit und dem endgültigen Basisplateau wurden 6 Messungen im Abstand von 5 min durchgeführt. Nach Zugabe der Pharmaka (*ATP*: nach der 55. min; gefolgt von *Atropinsulfat*: nach der 60. min) wurde auch hier jede Minute gemessen. Die Vorgehensweise des Mischens und der Temperaturkontrolle glich denen der Messungen am Eileiter. Alle Messungen erfolgten nach folgendem Schema (Abb. 15).

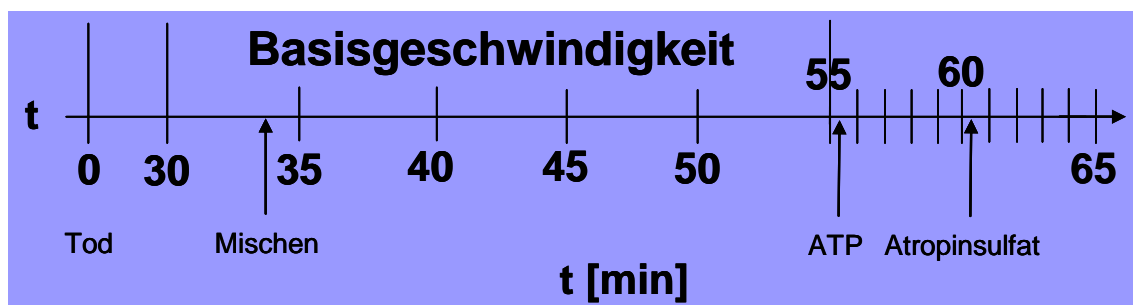


Abb. 15: Zeitlicher Ablauf der PTG-Messungen an der Trachea.

### **3.2.8.4 Messung der Zilienschlagfrequenz (ZSF)**

#### Versuchstiere

Die Messungen der Zilienschlagfrequenz erfolgten ausschließlich an Mäusen vom Wildtyp. Diese konnten im Falle der Messung an der Trachea sowohl männlich als auch weiblich sein.

#### Messungen

Im Vergleich zum Partikeltransport waren folgende Details in der Vorbereitung zu unterscheiden:

- 1) Einstellungen:
  - a) Bildgröße: x: 640 y: 480
  - b) Aufnahmefrequenz: 40 MHz
  - c) Bilder pro Sekunde: 105
  - d) 1000 Bilder insgesamt
- 2) Objektiv: 40x
- 3) *keine* Zugabe von Dynabeads

#### Messungen am Eileiter

Der Versuchsablauf glich dem des Partikeltransportes (3.2.8.3). Es wurde ausschließlich die ZSF im Segment Ampulla bestimmt.

#### Messungen an der Trachea

Sowohl zeitlicher Ablauf als auch Durchführung von Mischen und Temperaturmessung glichen dem des Partikeltransportes (3.2.8.3).

Stimulationsversuch mittels ATP

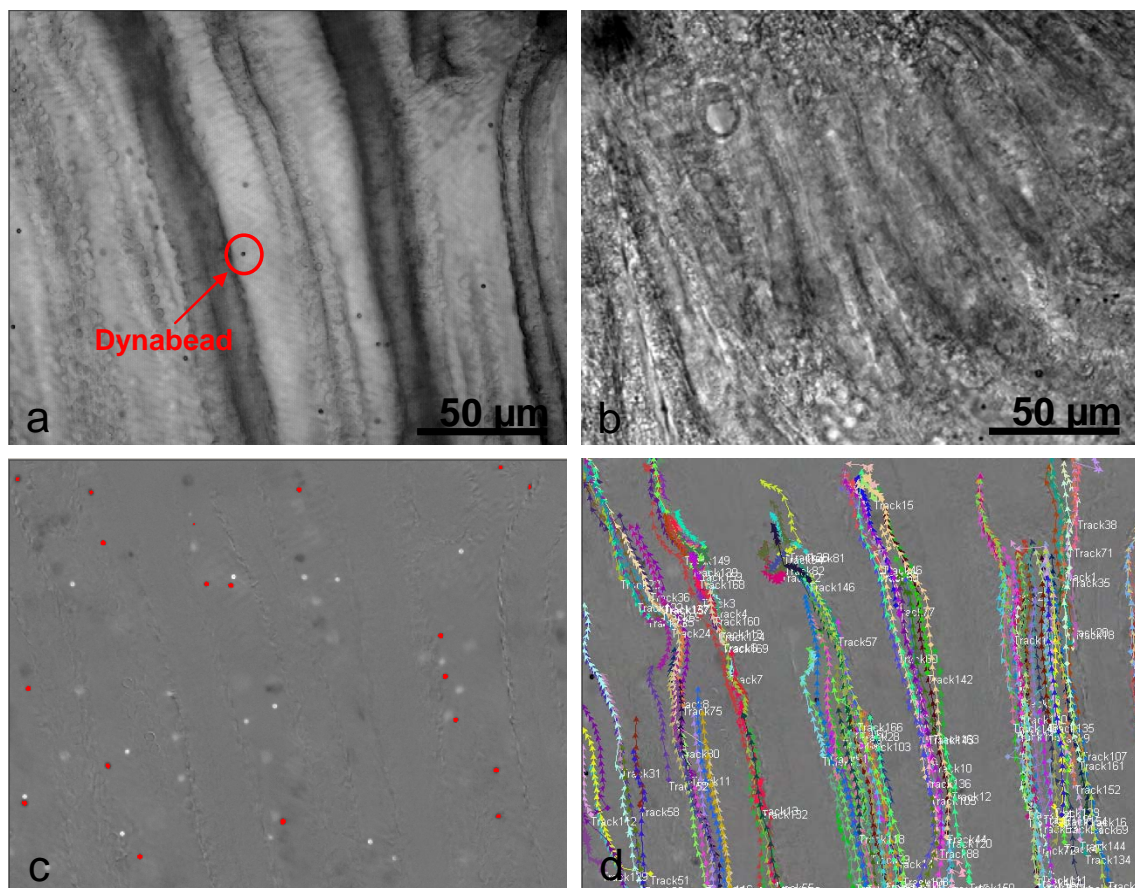
<b>Pharmakon</b>	<b>Zeitpunkt der Zugabe</b>	<b>Anzahl der Messungen</b>
Adenosin - 5`triphospat (ATP)	Eileiter: nach Minute 76 Trachea: nach Minute 55	jeweils 5 Messungen im Abstand von 1 Minute

Tab. 8: Pharmakon, Zeitpunkt der Pharmakonzugabe, sowie Anzahl der sich anschließenden Messungen zur Bestimmung der ZSF.

## 3.2.8.5 Digitale Auswertung

**a) Partikeltransportgeschwindigkeit**

Zur Auswertung der PTG wurde die Software „Image-Pro Plus“ genutzt. Jeder Film musste zunächst von einer 12 bit Graustufe in eine 8 bit Graustufe umgewandelt und einer Hintergrundkorrektur unterzogen werden. Daraufhin konnten sichtbare Dynabeads markiert werden (Abb. 16). Da sich durch die Bewegung der Dynabeads die Graustufen nur an bestimmten Stellen ändern, kann die Software den Weg und die Geschwindigkeit der Partikel bestimmen.



**Abb. 16:** Videomikroskopische Darstellung der Segmente Ampulla (a) und Isthmus (b) sowie Teilbereiche der Auswertung (c+d) zur Ermittlung der PTG („Image-Pro Plus“ Software.)

- a) Darstellung der Ampulla mit umkreistem Dynabead (2,8 µm)
- b) Darstellung des Isthmus
- c) Markierte Dynabeads nach Graustufenveränderung und Hintergrundkorrektur eines aufgenommenen Films.
- d) Darstellung der Position der Partikel zum Zeitpunkt jedes aufgenommenen Images sowie ihr gesamt zurückgelegter Weg (track) innerhalb eines aufgenommenen Films.

Man erhielt 3 Hauptgrößen, aus welchen die Durchschnittsgeschwindigkeit aller gemessenen Partikel, der Median sowie die Durchschnittsgeschwindigkeit der Partikel, die nicht mehr als 15% vom idealen Weg (direkter Weg zwischen Start- und Endpunkt) abweichen (Partikel  $Q < 1,15$ ) berechnet wurden (Abb. 17).

- originale Distanz: Distanz (D) vom Startpunkt bis Endpunkt (idealer Weg)
- akkumulierte Distanz: Summe der Distanzen ( $d_1, d_2$ ) vom Startpunkt aus
- Geschwindigkeit:  $v = d/t_2 - t_1$                        $t$ =Zeit

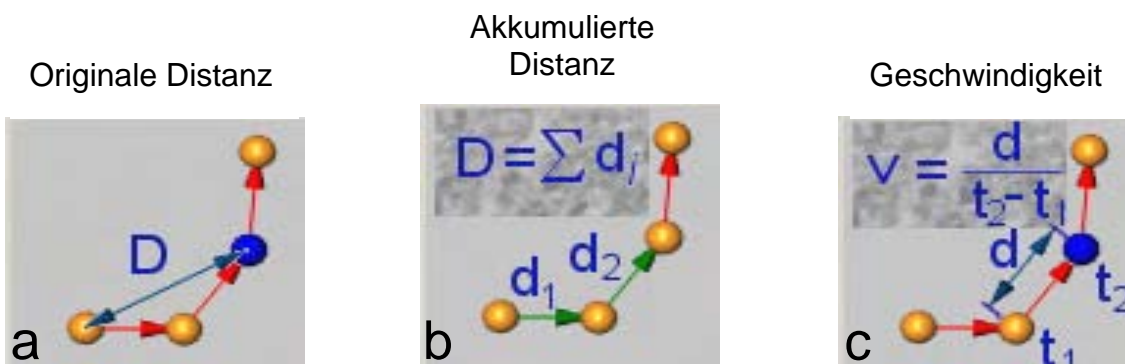


Abb. 17:

Grafische Darstellung der 3 Hauptgrößen (originale Distanz a; akkumulierte Distanz b; Geschwindigkeit c), die zur Berechnung der PTG benötigt werden. (Software „Image-Pro Plus“)

### **b) Zilienschlagfrequenz**

Um die ZSF zu bestimmen, wurden pro Aufnahme stets 10 beliebige zilientragende Zellen ausgewählt, welche mittels der Software „Image-Pro Plus“ in jedem aufgenommenen Film durch Umkreisen markiert wurden (Abb. 18). Durch diese Markierung erhielt man eine so genannte Area of interest (AOI), was die Möglichkeit bot, die einzelne Zelle unabhängig vom Rest des Gewebes zu betrachten. Die Software konnte so die durch den Zilienschlag verursachte Graustufenveränderung für jede markierte Zelle ermitteln. Eine sich anschließende Fast Fourier Transformation mit Hilfe der „AutoSignal“-Software (SYSTAT Software GmbH, Erkath, Deutschland) ermöglichte die Umwandlung der erhaltenen Werte in die



durchschnittliche ZSF (Hertz) der einzelnen Zelle (Abb. 19). Die erhaltenen Frequenzen der 10 AOI's wurden für jede Aufnahme gemittelt.



Abb. 18:

Die Grafik zeigt eine Aufnahmesequenz eines Filmes zur Bestimmung der ZSF mit markierter zilientragender Zelle (AOI = Area of interest) der Ampulla des Eileiters.

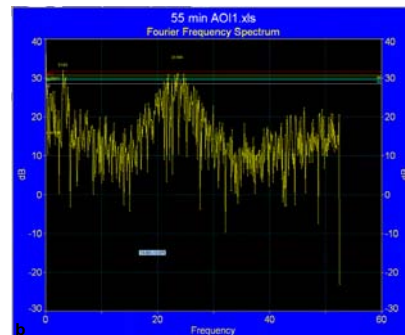
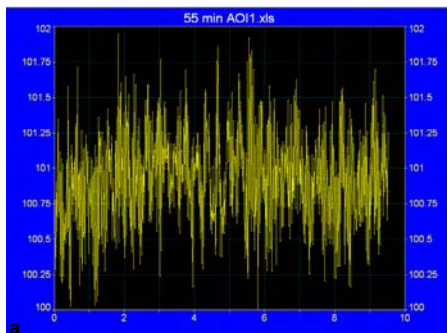


Abb. 19:

Beispielhafte Darstellung der Bildverarbeitung zur Analyse der ZSF mittels der „AutoSignal“-Software.

- a) Mittelwert der Graustufenveränderung eines Films (1000 Bilder) einer Area of interest.
- b) Fourier Frequency Spectrum nach Fast Fourier Transformation des Mittelwertes zur Berechnung der durchschnittlichen ZSF.

### **3.2.9 Statistische Auswertung**

Die statistische Datenanalyse erfolgte unter Anwendung der Software SPSS 15.0 (SPSS Inc. Headquarters Chicago Illinois, USA). Es wurden sowohl explorative Datenanalysen als auch nicht-parametrische Tests (verbunden und unverbunden) durchgeführt. Im Falle von verbundenen Stichproben wurde der Wilcoxon-Test im Anschluss an den Friedman-Test, bei unverbundenen Stichproben der Kruskal-Wallis Test gefolgt vom Mann-Whitney Test angewandt. Die Ergebnisse wurden bei  $p \leq 0,05$  als signifikant und bei  $p \leq 0,001$  als hoch signifikant bezeichnet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Morphologie und Sekretion im Eileiter der Maus in Abhängigkeit vom Zyklusstadium und einer frühen Trächtigkeit

#### 4.1.1 Morphologie und Sekretion im Eileiter

##### 4.1.1.1 Grundaufbau

Der Eileiter der Maus ist durchschnittlich 1 cm lang und 0,5 mm breit. Den größten Anteil besitzt der Isthmus mit circa 2/3 der Länge, gefolgt von der Ampulla mit fast 1/3. Das Infundibulum macht mit etwa 1 mm Länge nur einen sehr geringen Anteil des Eileiters der Maus aus. Folgende morphologische Charakteristika treten unabhängig vom Zyklusstand bzw. einer frühen Trächtigkeit auf:

#### Ampulla

In der Ampulla können verschiedene Bereiche voneinander unterschieden werden. So ähnelt ihr proximales Erscheinungsbild dem des Infundibulums, welches durch sehr prominente, fingerförmige, longitudinal orientierte Primärfalten charakterisiert ist (Abb. 20). Diese besitzen eine schmale Basis und eine schlanke Form. Nur selten gehen von ihnen weitere Falten, Sekundärfalten, ab. Im Anschluss an diesen Teil werden die Falten an ihrer Basis breiter und nehmen an Höhe ab. Ihre Orientierung ändert sich von longitudinal in Richtung zirkulär (siehe Isthmus Abb. 21).

#### *Lamina epithelialis:*

Die Lamina epithelialis ist durch ein hochprismatisches Epithel charakterisiert, wobei zilientragende Zellen gegenüber sekretorischen Zellen im proximalen Teil der Ampulla dominieren (siehe 4.1.2 und Abb. 26). Die zilientragenden Zellen treten sehr homogen verteilt auf (Abb. 20 und 22) und bilden dadurch ein fast durchgehendes Kinetosomenband (Abb. 20), welches nur ab und zu durch sekretorische Zellen (Abb. 20) unterbrochen wird. Letztere zeichnen sich durch eine hohe Anzahl an Mikrovilli aus (Abb. 24). Diese sind homogen über die Oberfläche der einzelnen Zelle verteilt und im Vergleich zu den Zilien um ein Vielfaches kürzer. Die sekretorischen Zellen in der Ampulla erheben sich über das Niveau der zilientragenden Zellen (Abb. 24). Ihre sekretorische Aktivität zeigt sich in Form sekretorischer Vesikel, die mit dem apikalen Plasmalemm in Verbindung stehen (Abb. 20 und 24). Die Zellkerne von sowohl

zilientragenden als auch sekretorischen Zellen sind rund, gleichmäßig gefärbt und nehmen den größten Teil der Zelle ein. Je weiter distal in der Ampulla gelegen, umso variabler wird die Zellform. Auffällig ist das Auftreten von Zellen deren Zytoplasma, beginnend um den Bereich des Zellkerns, aufgelöst erscheint (Abb. 20). Es sind zilientragende und sekretorische Zellen betroffen (Abb. 20). Weiterhin können wenige Immun- und Basalzellen nachgewiesen werden. Die Immunzellen sind vorwiegend im Lumen des Eileiters sichtbar. Teilweise werden Zellkerne direkt in das Eileiterlumen abgegeben (Abb. 20).

#### *Lamina propria:*

Die sich der Lamina epithelialis anschließende Lamina propria ist gering ausgebildet. Sie zieht bis in die Faltenspitzen und ist dabei teilweise fast vollständig von einem zentralen Gefäß ausgefüllt (Abb. 20).

#### *Lamina muscularis:*

Die Lamina muscularis ist in der Ampulla mit 3-4 Lagen sehr dünn ausgebildet. Es können sowohl Zirkulär- als auch Längsmuskelfasern nachgewiesen werden. Diese sind miteinander verwoben (Abb. 20).

### Isthmus

Auch im Isthmus sind fast ausschließlich Primärfalten vorhanden, die im Gegensatz zur Ampulla zirkulär orientiert sind und eine breitere Basis besitzen (Abb. 21). Der Isthmus gestaltet sich im Gesamtbild einheitlicher als die Ampulla, so dass keine Unterteilung in verschiedene Abschnitte vorgenommen werden kann.

#### Lamina epithelialis:

Das Epithel wird im Isthmus aus iso- bis hochprismatischen Zellen gebildet, die vorwiegend sekretorisch sind. Der Mikrovillibesatz der sekretorischen Zellen ist dichter als der in der Ampulla (Abb. 25), aber ebenso homogen. Auch hier weisen die sekretorischen Zellen kleine sekretorische Vesikel auf (Abb. 25). Sind zilientragende Zellen vorhanden, so findet man sie hauptsächlich in der Tiefe zwischen den Zirkulärfalten (Abb. 23 und 25). Sie treten einzeln oder konzentriert in kleinen Gruppen auf. Die Zellkerne sind kleiner als die in der Ampulla und nehmen nur die Hälfte der Zelle ein. Sie besitzen eine runde Form und sind sehr variabel angefärbt

(Abb. 21). Basal- und Immunzellen können in einem geringen Maße gefunden werden, wobei die Immunzellen vorwiegend im Eileiterlumen sichtbar sind.

**Lamina propria:**

Die Lamina propria ist stark vaskularisiert und kräftiger ausgebildet als in der Ampulla (Abb. 21).

**Lamina muskularis:**

Der Isthmus weist eine stark ausgebildete Muskulatur auf, die durchschnittlich 7-8 Zelllagen besitzt. Es treten sowohl Zirkulär- als auch Längsmuskelfasern auf, die eng miteinander verwoben sind (Abb. 21).

#### 4.1.1.2 Veränderungen während des Zyklus

##### Proöstrus

Die Morphologie im Proöstrus zeigt die oben genannten Charakteristika. Die Sekretmenge im Lumen des Oviduktes steigt kontinuierlich an (Abb. 20-25, Proöstrus).

##### Östrus

Der Östrus kennzeichnet sich neben den oben genannten Eigenschaften durch eine, im Vergleich zu Proöstrus, Metöstrus und Diöstrus, erhöhte Menge an Eileitersekret (Ampulla und Isthmus) (Abb. 20/21, Östrus und Abb. 29/31, Östrus). Auffallend ist die gegenüber den anderen Zyklusstadien erhöhte Anzahl an zilientragenden Zellen im Isthmus (Abb. 26).

##### Metöstrus

Der Metöstrus ist durch eine annähernd so hohe Menge an Sekret wie zum Zeitpunkt des Östrus gekennzeichnet. Die sekretorischen Zellen im Bereich der proximalen Ampulla treten deutlich über das Niveau der zilientragenden Zellen und werden vermehrt in das Eileiterlumen abgegeben (Abb. 20, Metöstrus und Abb. 24, Metöstrus). Es treten vermehrt Stiftchenzellen auf (Abb. 20, Metöstrus).

### Diöstrus

Auch im Diöstrus befinden sich die sekretorischen Zellen der Ampulla über dem Niveau der zilientragenden Zellen (Abb. 20/24, Diöstrus). Diese werden ebenfalls verstärkt in das Lumen abgegeben (Abb. 20, Diöstrus). Auch hier sind vermehrt Stiftchenzellen sichtbar (Abb. 20, Diöstrus).

#### 4.1.1.3 Veränderungen während der frühen Trächtigkeit und Lokalisation der Embryonen im Eileiter

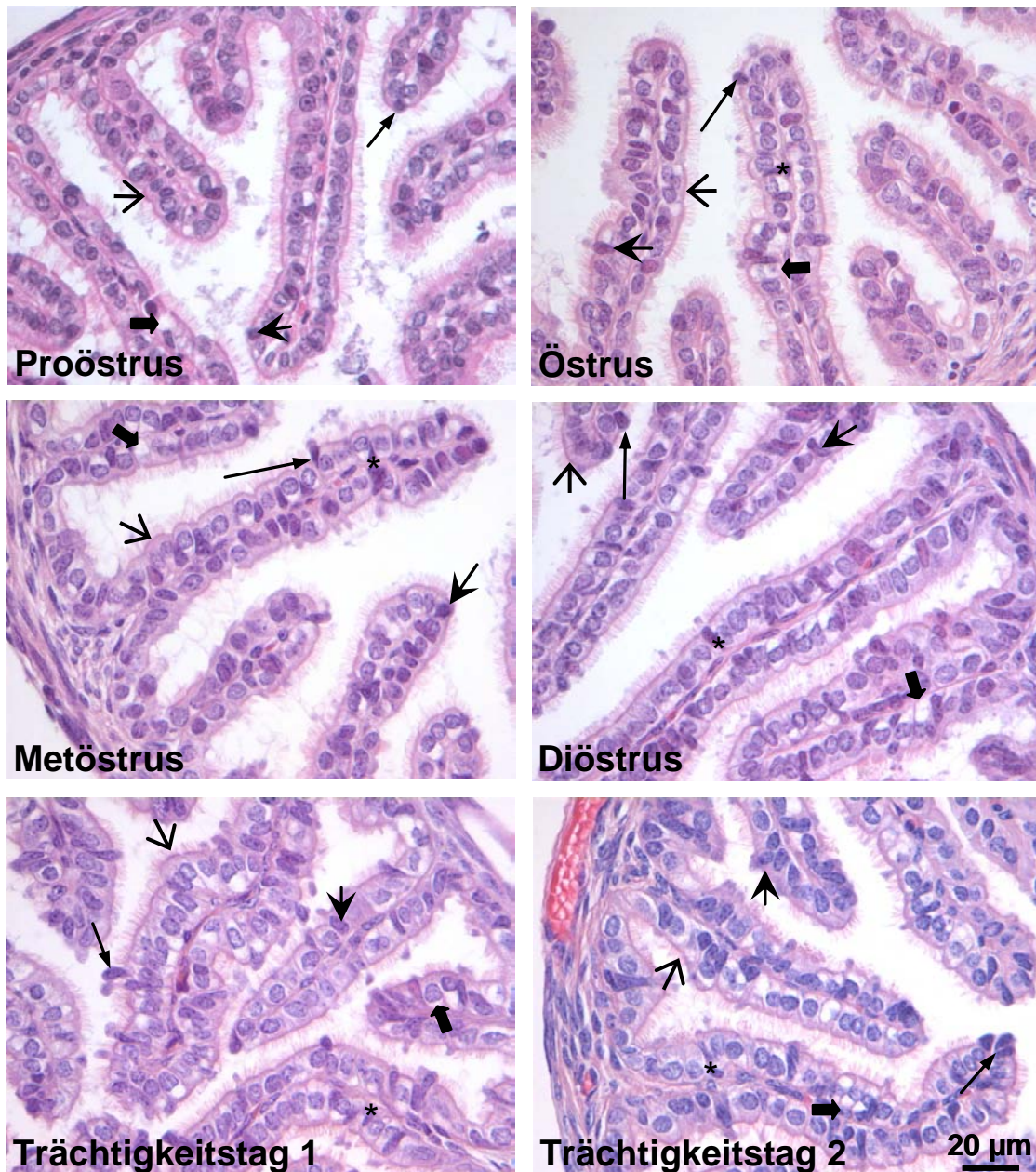
##### Trächtigkeitstag 1

Am Tag 1 der Trächtigkeit sind Embryonen sowohl in der Ampulla als auch im Isthmus lokalisiert. Embryonen im Einzellstadium können in beiden Abschnitten, Embryonen im Zweizellstadium hingegen nur im Isthmus lokalisiert werden. Von 10 videomikroskopisch untersuchten Tieren waren bei 5 Tieren die Embryonen in beiden Eileitern, bei 5 Tieren jeweils nur in einem Eileiter auffindbar.

Im Vergleich zu den verschiedenen Zyklusstadien treten wesentlich mehr Stiftchenzellen im Epithel auf. In der Eileiterflüssigkeit, die in ihrem Volumen erhöht ist, befinden sich zahlreiche Cumuluszellen. Im Bereich der Ampulla ist eine sehr hohe Sekretionsrate ersichtlich, die mit der von Metöstrus und Diöstrus vergleichbar ist (Abb. 20, Trächtigkeitstag 1). Die sekretorischen Zellen im Bereich der Ampulla treten deutlich über das Niveau der zilientragenden Zellen und ragen in das Eileiterlumen (Abb. 20/24, Trächtigkeitstag 1).

##### Trächtigkeitstag 2

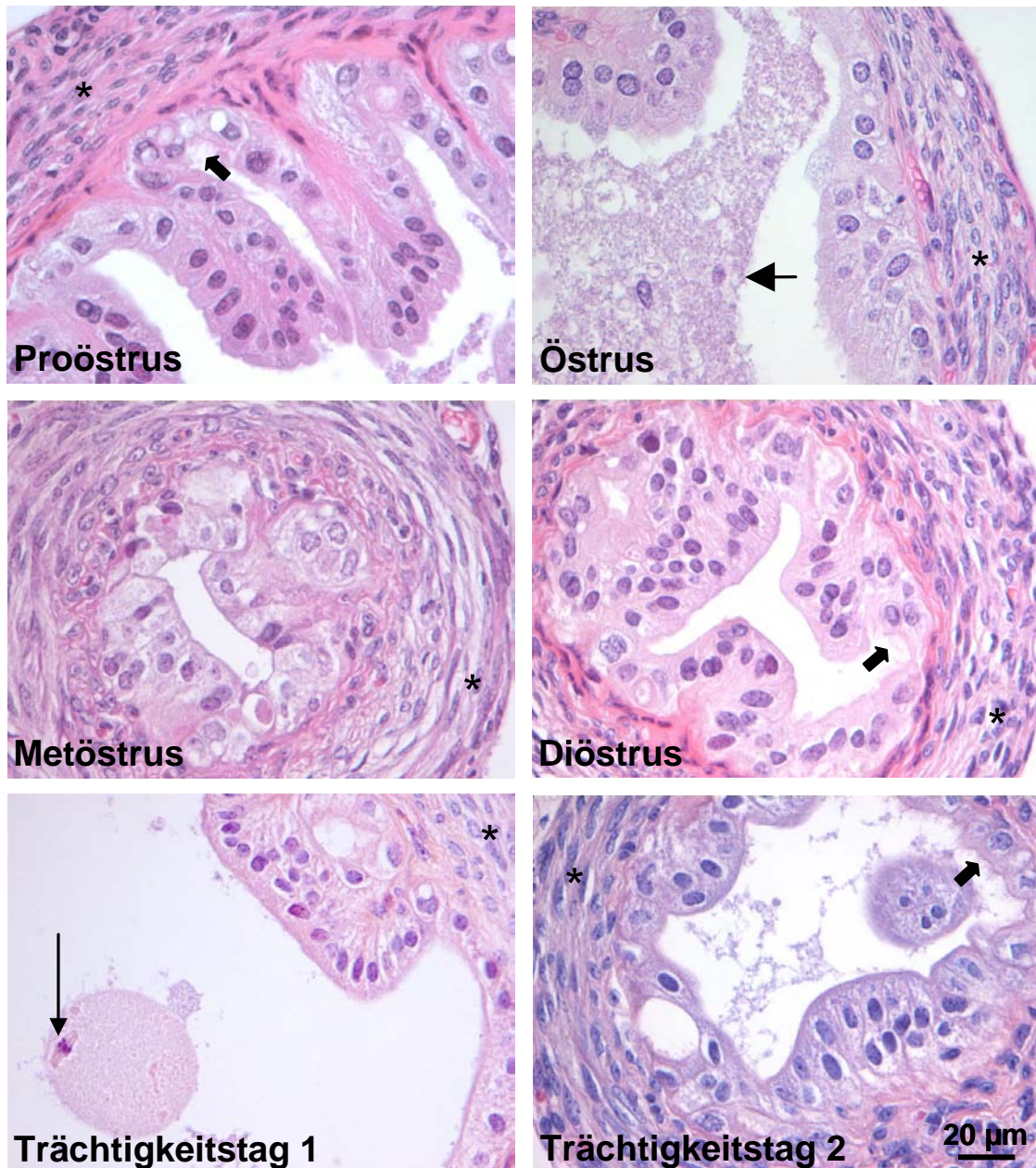
Zum Zeitpunkt des 2. Trächtigkeitstages befinden sich Einzell-, Zweizell- und Vierzellstadien im Eileiter. Diese sind stets im Bereich des Isthmus lokalisiert. Von den 9 videomikroskopisch untersuchten Tieren konnten die Embryonen bei 5 Tieren in beiden Eileitern, bei 4 Tieren jeweils nur in einem Eileiter nachgewiesen werden. Das morphologische Bild am 2. Trächtigkeitstag entspricht weitestgehend dem des 1. Trächtigkeitstages. Die Sekretionsrate ist mit der von Metöstrus und Diöstrus vergleichbar (Abb. 20/21, Trächtigkeitstag 2 und Abb. 24/25, Trächtigkeitstag 2). Es sind deutlich vermehrt Stiftchenzellen sichtbar (Abb. 20, Trächtigkeitstag 2). Weiterhin sind auch hier zahlreiche in das Eileiterlumen hineinragende sekretorische Zellen im Bereich der Ampulla sichtbar (Abb. 20/24, Trächtigkeitstag 2).



*Abb. 20:* Morphologische Charakterisierung des proximalen Abschnittes der **Ampulla** mittels HE-Färbung in Abhängigkeit des Zyklusstandes sowie einer frühen Trächtigkeit.

Der proximale Abschnitt der Ampulla ist durch eine relativ dünne Lage an Muskelfasern, longitudinale Primärfalten sowie einem einschichtigen hochprismatischen, vorwiegend zilientragendem Epithel, das durch ein fast durchgehendes Kinetosomenband (←) gekennzeichnet ist, charakterisiert. Die einzelnen Zyklusstadien sowie die frühen Tage einer Trächtigkeit unterscheiden sich geringfügig. So nimmt die Anzahl an ins Eileiterlumen abgegebenen Zellen (↔) sowie das Auftreten von Stiftchenzellen (\*) vom Proöstrus bis zum 2. Trächtigkeitstag kontinuierlich zu.

Sekretorische Zellen (↔); Zellen mit aufgelöstem Zytoplasma (↔)

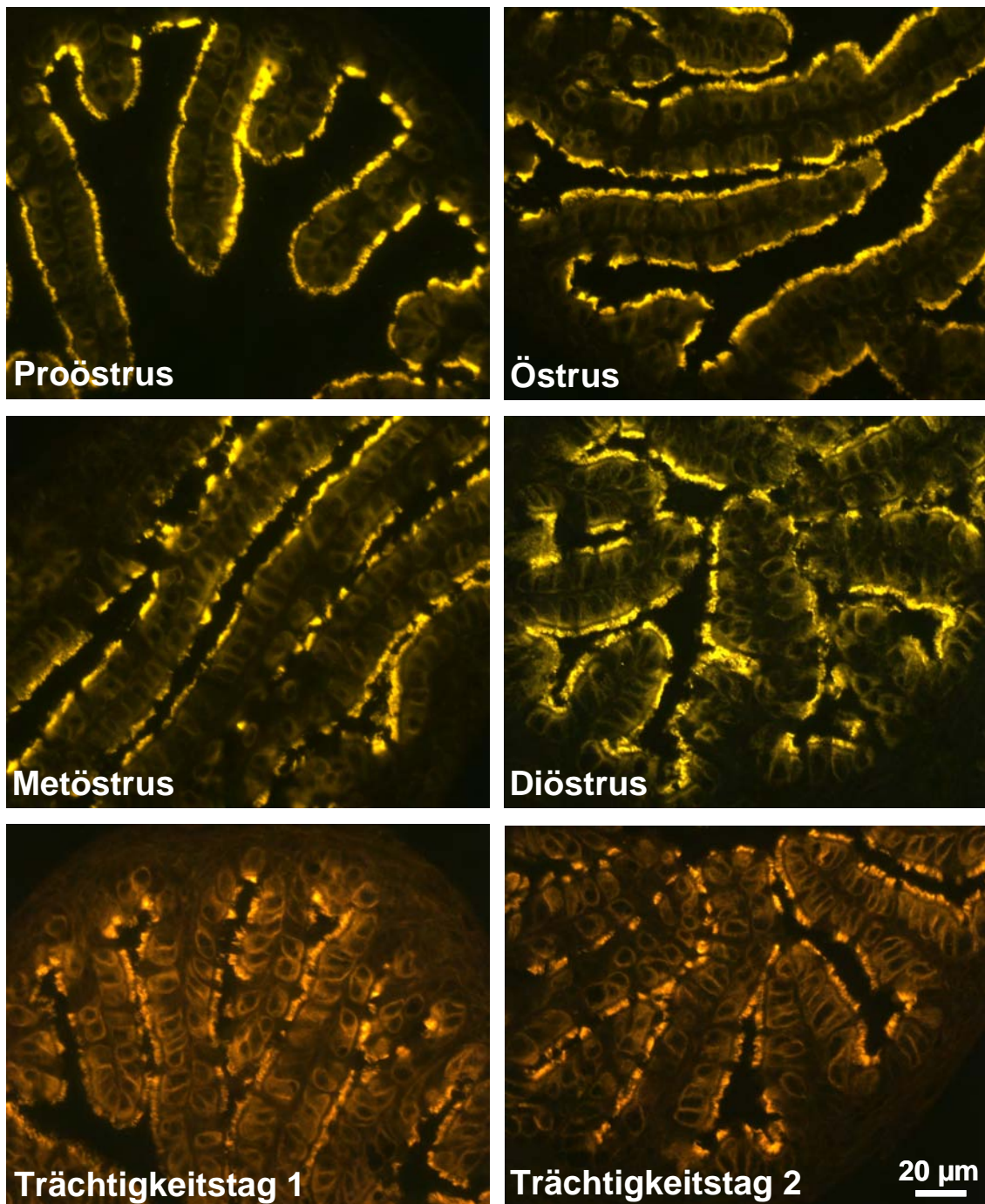


*Abb. 21:* Morphologische Charakterisierung des **Isthmus** mittels HE-Färbung in Abhängigkeit des Zyklusstandes sowie einer frühen Trächtigkeit.

Der Isthmus des Mäuseeileiters ist gekennzeichnet durch eine stark ausgeprägte Muskulatur (\*), eine kräftig ausgebildete Lamina propria, flache Zirkulärfalten sowie einen sehr hohen Anteil an sekretorischen Zellen. Zellhöhe und Kernform sind variabel. Im Östrus ist eine sehr hohe Flüssigkeitsmenge im Lumen sichtbar (←).

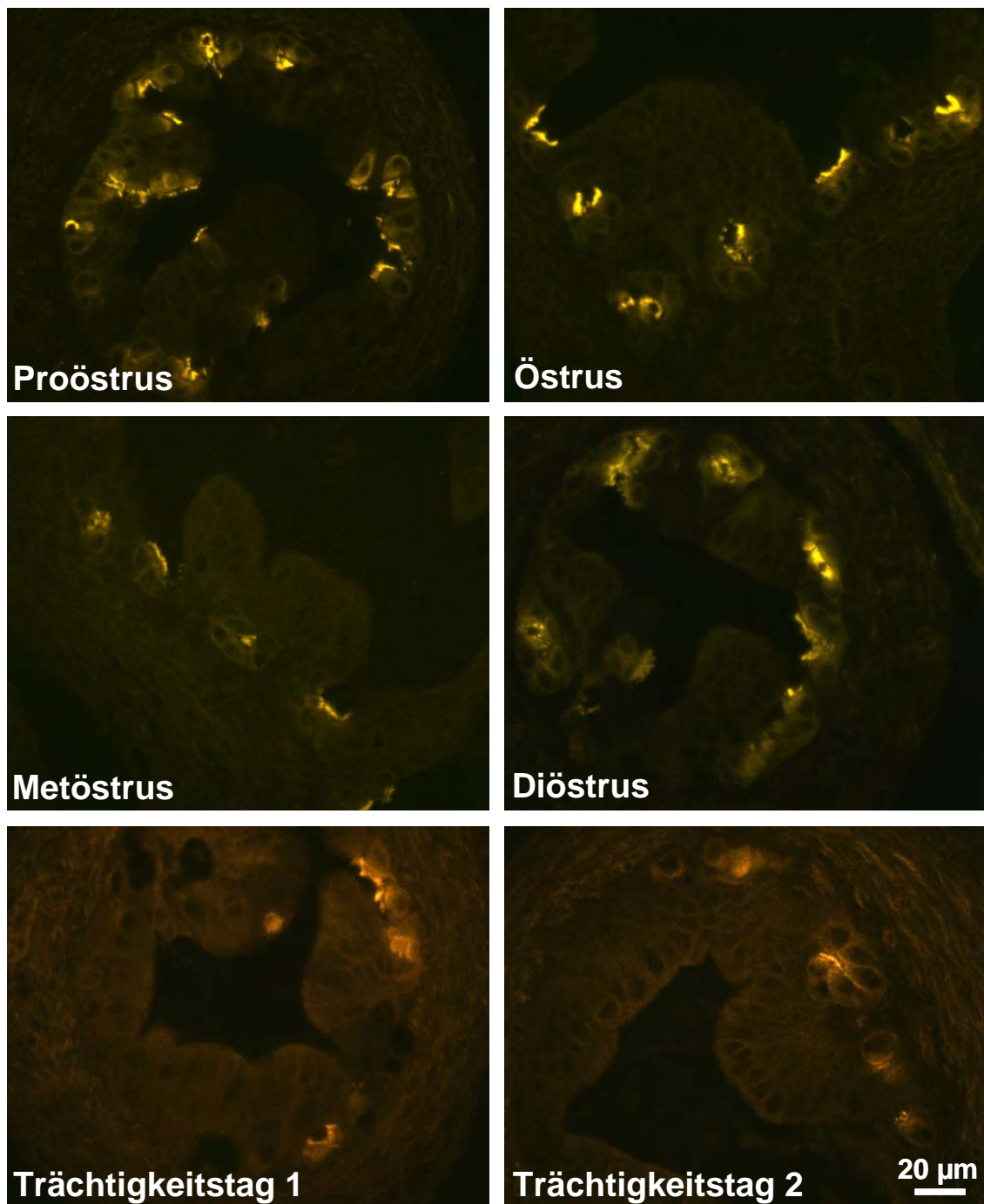
Am 1. Trächtigkeitstag kommt es im Isthmus zur Teilung der Zygote (in der Zygote: Spindelapparat und Metaphasenplatte: ←). Zilientragende Zellen: ←





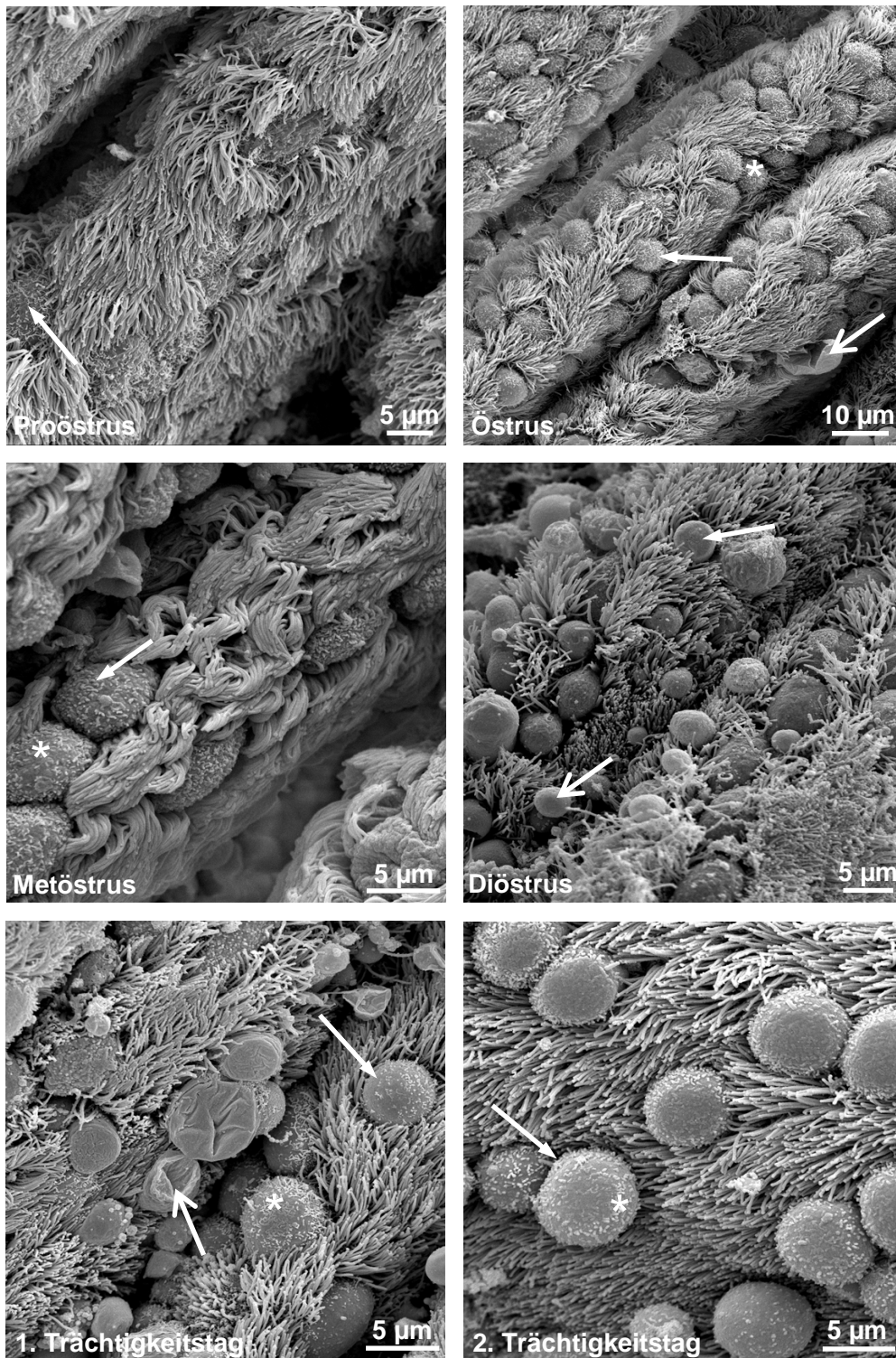
*Abb. 22:* Detektion zilientragender Zellen im proximalen Abschnitt der **Ampulla** mittels eines anti- $\beta$ -Tubulin Antikörpers in Abhängigkeit des Zyklustandes sowie einer frühen Trächtigkeit.

Die zilientragenden Zellen des Mäuseeileiters treten unabhängig vom Zyklusstadium bzw. einer frühen Trächtigkeit in großer Anzahl auf und sind sehr homogen verteilt.



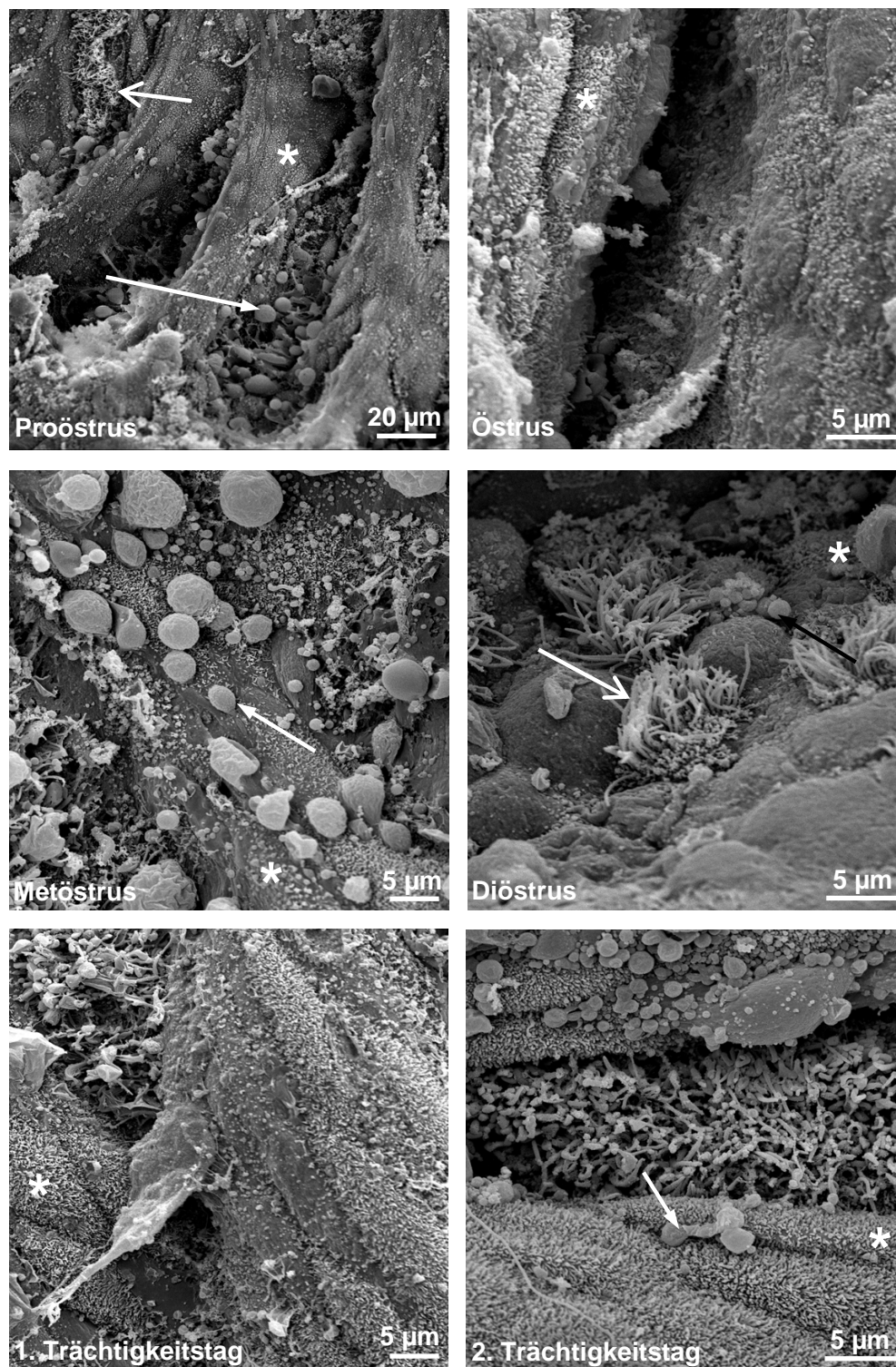
*Abb. 23:* Detektion zilientragender Zellen im **Isthmus** mittels eines anti- $\beta$ -Tubulin Antikörpers in Abhängigkeit des Zyklustandes sowie einer frühen Trächtigkeit.

Im Gegensatz zur Ampulla treten zilientragende Zellen im Isthmus in geringerer Anzahl und fast ausschließlich in der Tiefe zwischen den Zirkulärfalten auf.



**Abb. 24:** Morphologische Charakterisierung des proximalen Abschnittes der **Ampulla** mittels Rasterelektronenmikroskopie.

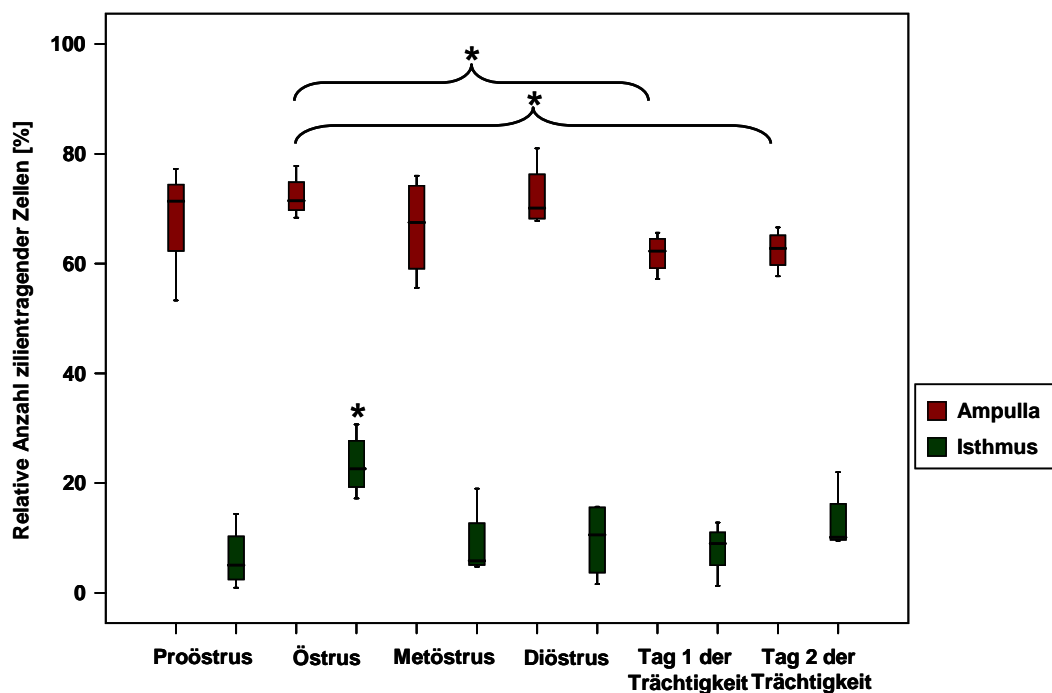
Im Vergleich zu Proöstrus und Östrus treten die sekretorischen Zellen (←) vor allem im Diöstrus und den ersten beiden Tagen der Trächtigkeit deutlich über das Niveau der zilientragenden Zellen und stülpen sich in das Eileiterlumen hervor. Sie sind sekretgefüllt bzw. nach Sekretabgabe eingefallen (←). Auf ihrer Oberfläche sind deutlich Mikrovilli erkennbar (\*).



**Abb. 25:** Morphologische Charakterisierung des **Isthmus** mittels Rasterelektronenmikroskopie. Deutlich sichtbar sind die in der Tiefe zwischen den Zirkulärfalten befindlichen zillientragenden Zellen (←). Aufgrund der hohen Dichte an sekretorischen Zellen und damit der vielen Mikrovilli (\*) erscheint das Epithel rasenartig. Die sekretorischen Vesikel (←) sind im Allgemeinen kleiner als diejenigen im Bereich der Ampulla.

#### 4.1.2 Relative Häufigkeit zilientragender Zellen im Eileiter in Abhängigkeit vom Zyklusstand und einer frühen Trächtigkeit

Die relative Häufigkeit zilientragender Zellen in der Ampulla (proximaler Abschnitt) und im Isthmus ist signifikant verschieden. So treten in der Ampulla durchschnittlich 70% zilientragende Zellen, unabhängig vom jeweiligen Zyklusstand, auf. Es kann ein Minimalwert von 53% und ein Maximalwert von 81% ermittelt werden (Abb. 26). An den ersten beiden Trächtigkeitstagen kann eine durchschnittliche relative Häufigkeit an zilientragenden Zellen von 62% nachgewiesen werden. Diese ist signifikant geringer im Vergleich zum Östrus. Im Gegensatz zur Ampulla sind im Durchschnitt 14% der Zellen im Isthmus (1% bis 31%) zilientragend, wobei im Eileiter von Mäusen, die sich im Östrus befinden, eine signifikant höhere Anzahl zilientragender Zellen, im Vergleich zu Proöstrus, Metöstrus und Diöstrus und dem 1. Trächtigkeitstag nachgewiesen werden kann (Abb. 26).



*Abb. 26:* Anzahl zilientragender Zellen im Eileiter der Maus in Abhängigkeit des Zyklusstandes sowie an den ersten beiden Trächtigkeitstagen.

In der Ampulla ist unabhängig vom Zyklusstadium eine signifikant höhere relative Anzahl an zilientragenden Zellen im Vergleich zum Isthmus zu finden. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen Östrus und den ersten beiden Trächtigkeitstagen. Weiterhin kann im Isthmus zum Zeitpunkt des Östrus eine signifikant höhere Anzahl an zilientragenden Zellen im Vergleich zu Proöstrus, Metöstrus, Diöstrus und dem 1. Trächtigkeitstag verzeichnet werden.

\*  $p \leq 0,05$

### 4.1.3 Synthese und Sekretion von Mukopolysacchariden, Glycoproteinen und Glycogen

#### Allgemein

Unabhängig vom Eileiterabschnitt, dem Zyklusstand sowie einer frühen Trächtigkeit ist im Eileiter der Maus kein Glycogen enthalten, was sich durch ein unverändertes PAS-positives Signal nach Amylaseverdau widerspiegelt.

#### 4.1.3.1 Synthese und Sekretion während des Zyklus

##### Proöstrus

Im Bereich der proximalen Ampulla können PAS-positive Signale vorwiegend in der Lamina propria nachgewiesen werden (Abb. 27, Proöstrus). Weiterhin weisen sekretorische Zellen vereinzelt eine PAS-positive Färbung im apikalen Zellbereich auf (Abb. 27, Proöstrus), wohingegen zillientragende Zellen keine Synthese bzw. Sekretion von PAS positivem Material erkennen lassen (Abb. 27, Proöstrus).

Im Gegensatz zur Ampulla weist der Isthmus eine wesentlich deutlicher positiv angefärbte Lamina propria auf (Abb. 28, Proöstrus). Die sekretorischen Zellen zeigen nur eine sehr geringe Färbung des apikalen Zellbereiches (Abb. 28, Proöstrus). Das im Lumen des Isthmus befindliche PAS positive Material ist dem apikalen Plasmalemm aufgelagert (Abb. 28, Proöstrus).

##### Östrus

Sowohl in der Ampulla als auch im Isthmus können im Vergleich zu den anderen Zyklusstadien wesentlich weniger apikal positiv gefärbte sekretorische Zellen gefunden werden (Abb. 27/28, Östrus). Die Anzahl der positiven Zellen im Isthmus ist geringer als in der Ampulla. Auch hier ist die Lamina propria des Isthmus stärker positiv angefärbt als im proximalen Teil der Ampulla (Abb. 27/28, Östrus).

##### Metöstrus

Zum Zeitpunkt des Metöstrus sind die sekretorischen Zellen sowohl der Ampulla als auch des Isthmus sehr deutlich positiv gefärbt (Abb. 27/28, Metöstrus). Die Färbung umfasst nicht mehr nur den apikalen Zellbereich, sondern schließt das gesamte Zytoplasma mit ein (Abb. 27/28, Metöstrus). Innerhalb der positiv gefärbten Bereiche

sind deutlich Granula sichtbar. Ein Vergleich der beiden Eileiterabschnitte zeigt, dass die Sekretion und Synthese von PAS-positivem Material im Bereich der proximalen Ampulla stärker ausgeprägt ist. Die Lamina propria beider Eileiterabschnitte zeigt erneut die deutlichste Färbung (Abb. 27/28, Metöstrus).

### Diöstrus

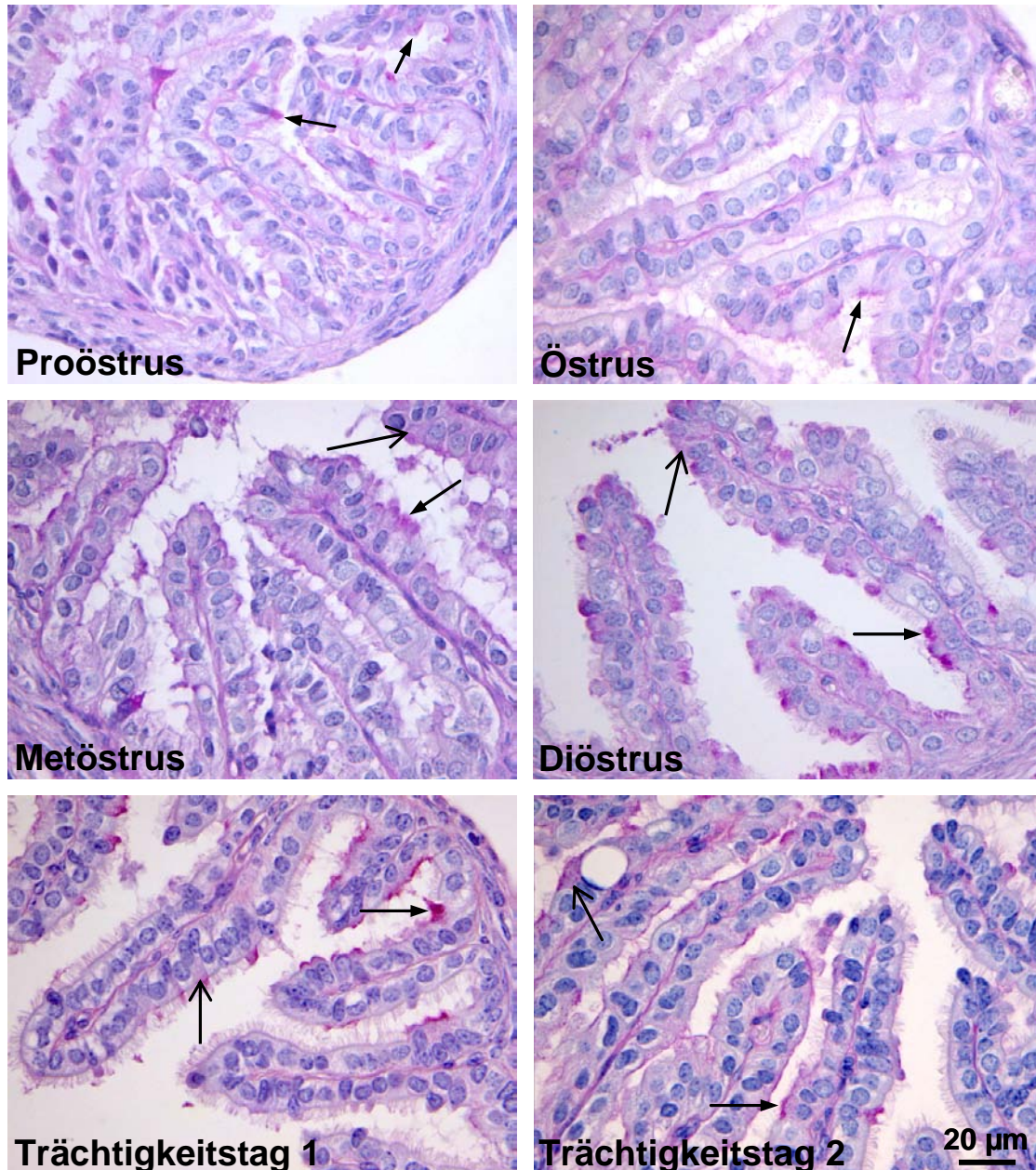
Die sekretorischen Zellen im proximalen Bereich der Ampulla weisen ebenfalls eine apikale (Abb. 27/28, Diöstrus) wie auch komplett intrazytoplasmatische Färbung (Abb. 27/28, Diöstrus) auf, die im Vergleich zu den Befunden zum Zeitpunkt des Metöstrus verstärkt ist. Im Gegensatz zu der deutlich apikalen sowie zum Teil komplett intrazytoplasmatischen Färbung der sekretorischen Zellen im Isthmus zum Zeitpunkt des Metöstrus können diese hier nur vereinzelt nachgewiesen werden. Die Lamina propria des Isthmus ist stärker angefärbt als die im Bereich der proximalen Ampulla (Abb. 27/28, Diöstrus).

#### 4.1.3.2 Synthese und Sekretion während der frühen Trächtigkeit

##### Trächtigkeitstag 1 und Trächtigkeitstag 2

Die Befunde des Nachweises einer Synthese und Sekretion von neutralen Mukopolysachhariden, Glycoproteinen und Glycogen entspricht denen zum Zeitpunkt des Diöstrus. Der proximale Abschnitt der Ampulla zeigt eine höhere Aktivität im Vergleich zum Isthmus, was sich in einer apikalen Färbung (Abb. 27, Trächtigkeitstag 1 und 2) einiger sekretorischer Zellen wie auch teilweise in einem vollständig PAS-positiv gefärbten Zytoplasma (Abb. 27, Trächtigkeitstag 1 und 2) dieser sekretorischen Zellen darstellt.

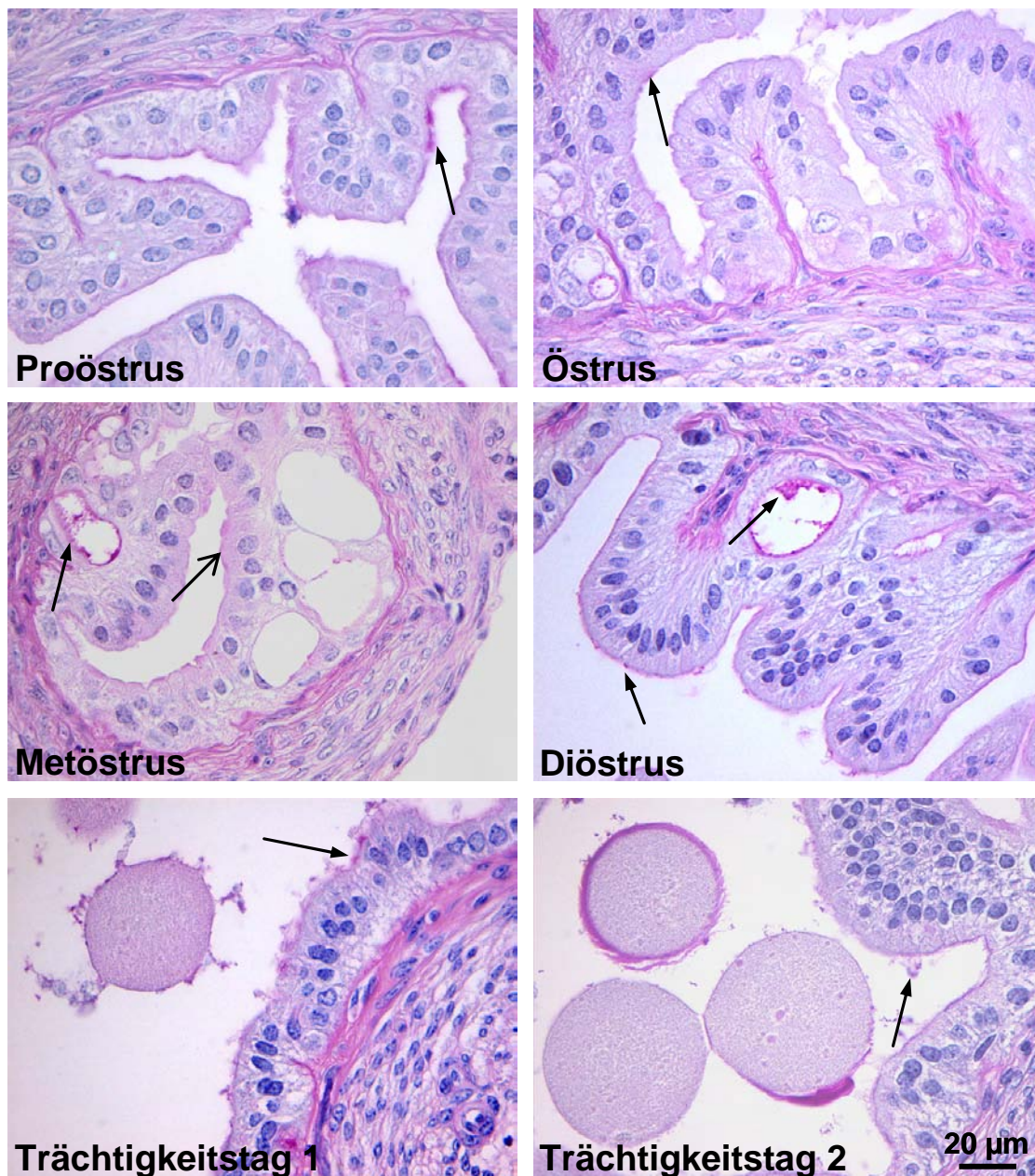
Im Isthmus sind nur wenige apikal positiv gefärbte sekretorische Zellen zu finden (Abb. 28, Trächtigkeitstag 1 und 2). PAS-positives Sekret ist vielmehr auf dem Epithel aufgelagert (Abb. 28, Trächtigkeitstag 1 und 2). Prinzipiell weist die Lamina propria die deutlichste PAS-positive Färbung auf, die im Bereich des Isthmus stärker als in der proximalen Ampulla ist (Abb. 27/28, Trächtigkeitstag 1 und 2).



*Abb. 27:* Nachweis von Glycoproteinen in Abhängigkeit des Zyklusstandes sowie einer frühen Trächtigkeit im proximalen Abschnitt der **Ampulla**.

Die Sekretion und Synthese von Glycoproteinen erfolgt nicht in einzelnen sekretorischen Zellen. Im Metöstrus kann die höchste Synthese- und Sekretionsleistung beobachtet werden, die sich durch das Auftreten intrazytoplasmatischer Granula ( $\leftarrow$ ) sowie stark positiver apikaler Zellbereiche ( $\leftarrow$ ) äußert. Ähnlich, aber mit einer etwas höheren Anzahl intrazytoplasmatischer Granula, verhält es sich im Diöstrus und den ersten beiden Trächtigkeitstagen. Im Gegensatz dazu können im Proöstrus und im Östrus kaum PAS positive Zellen nachgewiesen werden. Die Lamina propria ist in allen Fällen deutlich positiv gefärbt.





**Abb. 28:** Nachweis von Glycoproteinen in Abhängigkeit des Zyklusstandes sowie einer frühen Trächtigkeit im **Isthmus**.

Die höchste Synthese- und Sekretionsleistung kann zum Zeitpunkt des Metöstrus nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum Diöstrus und den ersten beiden Trächtigkeitstagen ist ein PAS-positives Signal nicht nur im apikalen Zellbereich (←) sichtbar, sondern teilweise im gesamten Zytoplasma (←).

#### 4.1.4 Synthese und Sekretion von sauren Mukopolysacchariden

##### Allgemein

Es ist festzustellen, dass sulfatierte Mukopolysaccharide im Eileiter der Maus lediglich in geringer Menge synthetisiert und abgegeben werden (Abb. 29-32). Diese weisen aber entsprechend der Zyklusstände bzw. Trächtigkeitstage die gleiche Lokalisation wie die karboxylierten Mukopolysaccharide auf.

##### 4.1.4.1 Synthese und Sekretion während des Zyklus

###### Proöstrus

Zum Zeitpunkt des Proöstrus können im luminalen Sekret des proximalen Abschnittes der Ampulla viele karboxylierte Mukopolysaccharide nachgewiesen werden (Abb. 29, Proöstrus). Die sekretorischen Zellen weisen ausschließlich im apikalen Zellbereich ein positives Signal auf, wohingegen zilientragende Zellen keine sekretorische Aktivität zeigen (Abb. 29, Proöstrus). Im Isthmus sind saure Mukopolysaccharide sowohl im apikalen Zellbereich wie auch im gesamten Zytoplasma der sekretorischen Zellen zu finden (Abb. 31, Proöstrus). Im Vergleich zur Ampulla ist das positive Signal der Zellen wesentlich stärker, aber es ist weniger Sekret im Lumen des Eileiters sichtbar (Abb. 31, Proöstrus).

###### Östrus

Der Östrus ist durch ein sehr hohes Aufkommen von karboxylierten Mukopolysacchariden im Lumen des gesamten Eileiters charakterisiert (Abb. 29/31, Östrus). Das Synthese- und Sekretionsmuster im Bereich der Ampulla entspricht demjenigen des Proöstrus. Im Gegensatz dazu kann im Isthmus ein erhöhtes Vorkommen karboxylierter Mukopolysaccharide im kompletten Zytoplasma der sekretorischen Zellen nachgewiesen werden (Abb.31, Östrus). Vergleichend zu den übrigen Zyklusstadien wie auch den ersten Trächtigkeitstagen ist das stärkste positive Signal im Isthmus zum Zeitpunkt des Östrus zu erkennen.

### Metöstrus

Im Vergleich zu Proöstrus und Östrus ist weniger Sekret im Eileiterlumen sichtbar, aber im Bereich der proximalen Ampulla kann ein positives Signal sowohl im apikalen Zellbereich der sekretorischen Zellen als auch vollständig intrazytoplasmatisch nachgewiesen werden (Abb. 29, Metöstrus). Dies trifft auch für den Isthmus zu, wobei dort verglichen mit allen anderen Zyklusstadien und dem ersten Tag der Trächtigkeit keine so deutliche Färbung der sekretorischen Zellen erkennbar ist (Abb. 31/32, Metöstrus).

### Diöstrus

Der Diöstrus ist durch die höchste Menge an Alcianblau-positiven sekretorischen Zellen im Bereich der proximalen Ampulla gekennzeichnet, welche apikal aber meist vollständig intrazytoplasmatisch gefärbt sind (Abb. 30, Diöstrus). Die sekretorischen Zellen im Isthmus zeigen ebenfalls eine hohe sekretorische Aktivität, die jedoch nicht an die des Östrus heranreicht (Abb. 31/32, Diöstrus).

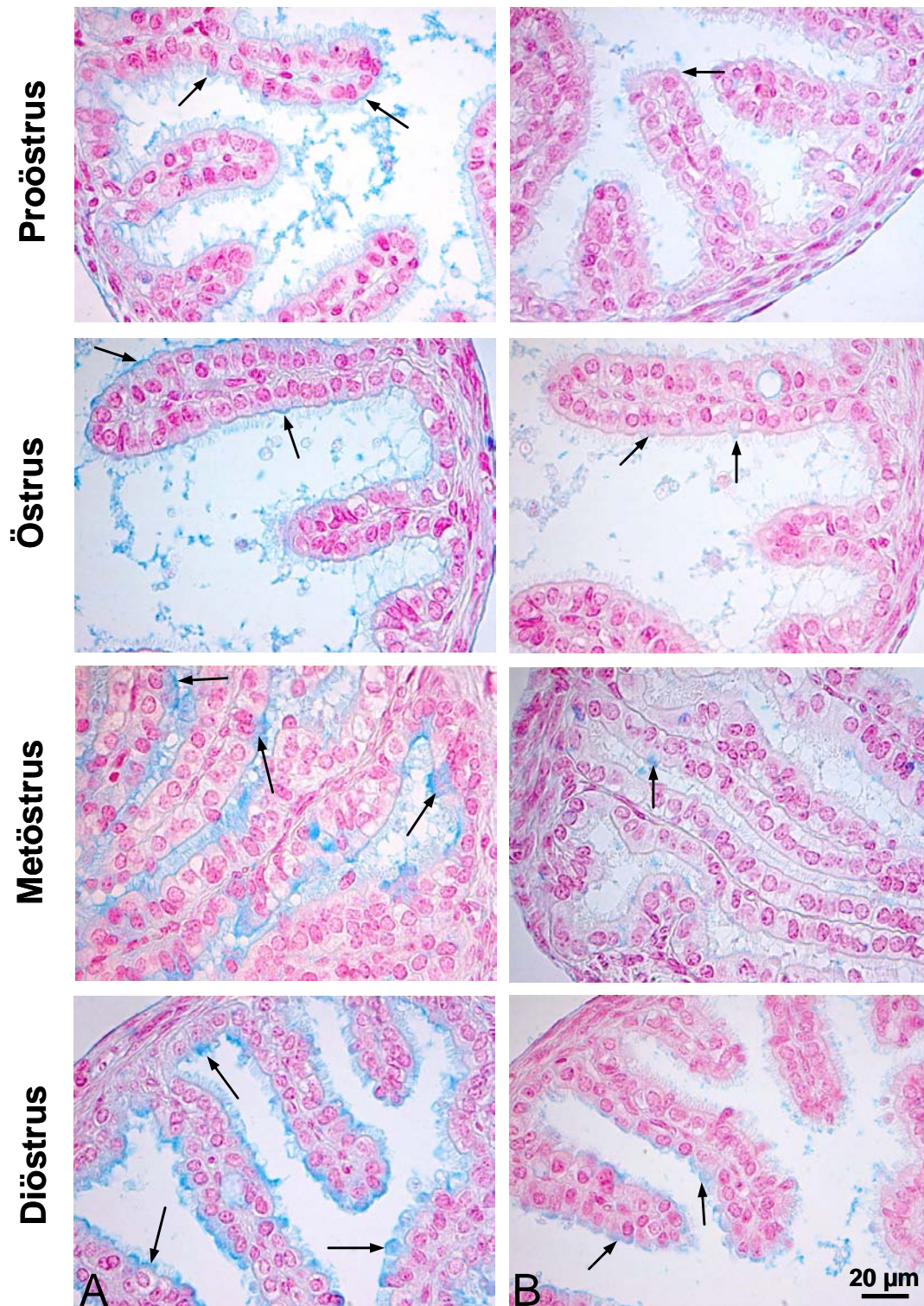
#### 4.1.4.2 Synthese und Sekretion während der frühen Trächtigkeit

##### Trächtigkeitstag 1

Hinsichtlich des Nachweises von sauren Mukopolysacchariden kann der Eileiter der Maus am Trächtigkeitstag 1 im Bereich der Ampulla mit den Befunden zum Zeitpunkt des Metöstrus verglichen werden (Abb. 30, Trächtigkeitstag 1). Im Gegensatz dazu entsprechen die Feststellungen im Isthmus denen des Zyklusstandes Diöstrus (Abb. 32, Trächtigkeitstag 1).

##### Trächtigkeitstag 2

Die Synthese und Sekretion von sauren Mukopolysacchariden am zweiten Trächtigkeitstag in Ampulla und Isthmus des Eileiters der Maus stimmen mit denen des Metöstrus überein (Abb. 30/32, Trächtigkeitstag 2).



*Abb. 29:* Nachweis saurer Mukopolysaccharide (A: sulfatiert und karboxyliert; B: nur sulfatiert) in Abhängigkeit des Zyklusstandes im proximalen Abschnitt der **Ampulla**. Prinzipiell werden **sulfatierte** Mukopolysaccharide in geringer Menge synthetisiert und sezerniert (siehe B im Vergleich zu A). In den Zyklusstadien Proöstrus und Östrus können **saure** Mukopolysaccharide nur im apikalen Zellbereich einiger sekretorischer Zellen nachgewiesen werden, wohingegen im Metöstrus und im Diöstrus teilweise das komplette Zytoplasma involviert ist (←).

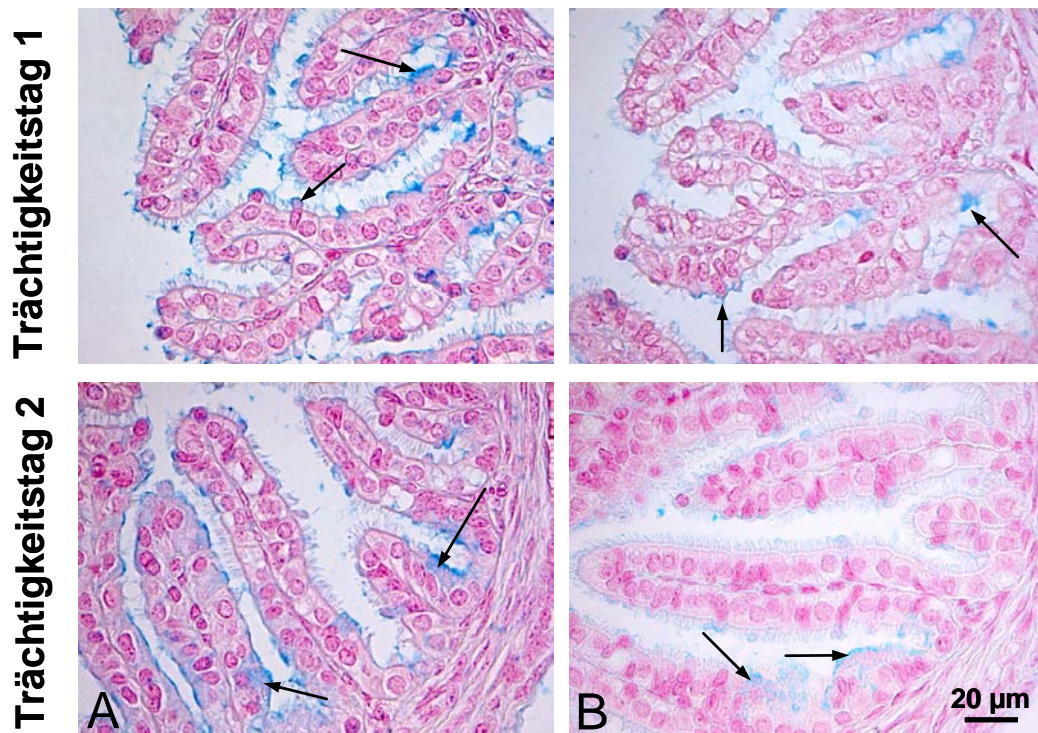


Abb. 30: Nachweis saurer Mukopolysaccharide (A: sulfatiert und karboxyliert; B: nur sulfatiert) in Abhängigkeit einer frühen Trächtigkeit im proximalen Abschnitt der **Ampulla**. Es werden nur wenig **sulfatierte** Mukopolysaccharide synthetisiert und sezerniert (siehe B im Vergleich zu A). Sowohl am ersten als auch am zweiten Tag der Trächtigkeit können **saure** Mukopolysaccharide nicht nur im apikalen Zellbereich der sekretorischen Zellen, sondern auch im gesamten Zytoplasma dieser nachgewiesen werden ← (A).

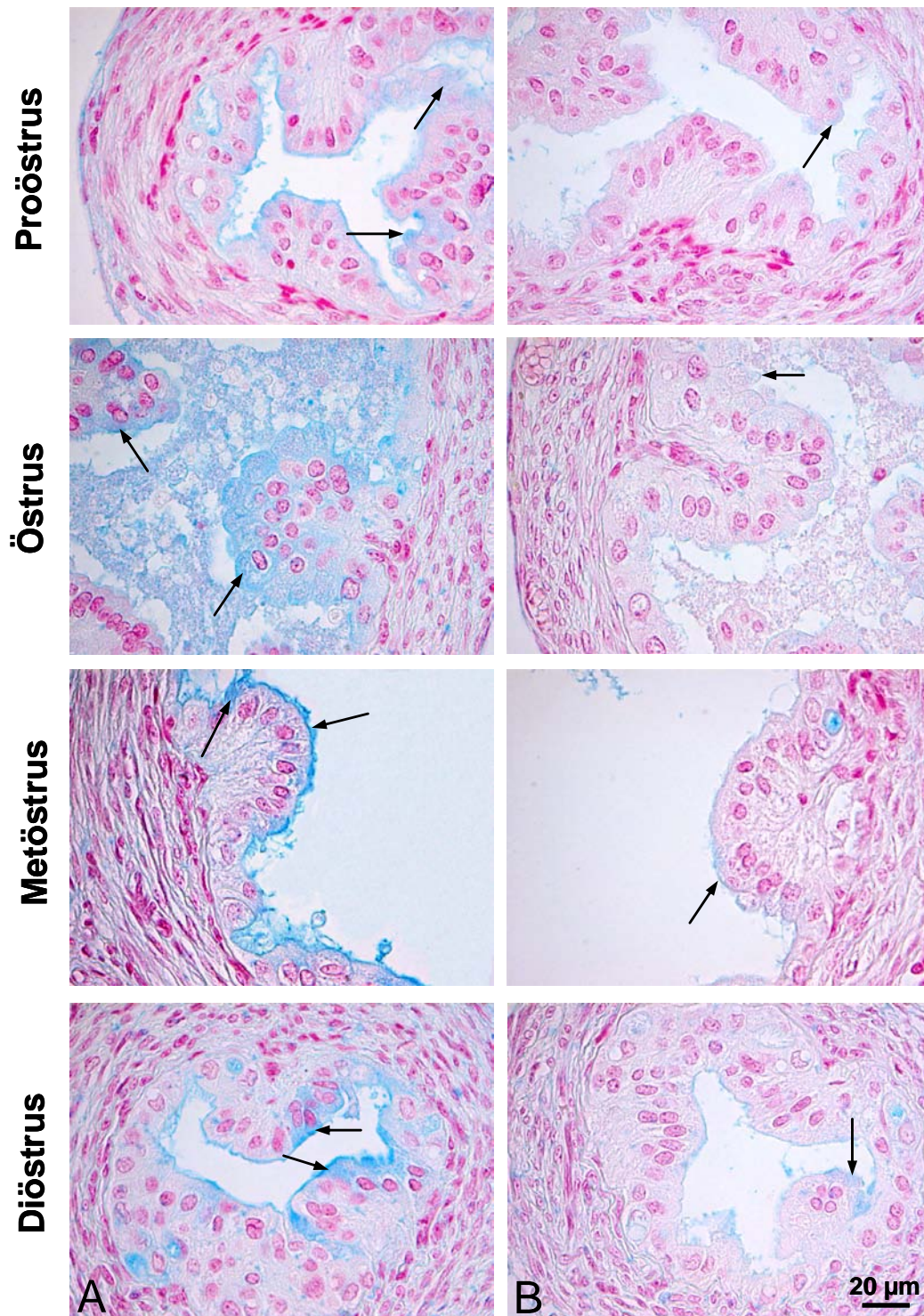


Abb. 31: Nachweis saurer Mukopolysaccharide (A: sulfatiert und karboxyliert; B: nur sulfatiert) in Abhängigkeit der Zyklusstände im **Isthmus**.

In allen Zyklusständen können **saure** Mukopolysaccharide im apikalen Zellbereich der sekretorischen Zellen wie auch im kompletten Zytoplasma nachgewiesen werden(←) (A). Vom Proöstrus zum Östrus steigt die Intensität und Menge der positiv gefärbten sekretorischen Zellen und fällt zum Zeitpunkt des Metöstrus drastisch. Der Anteil **sulfatierter** Mukopolysaccharide ist gering (B).

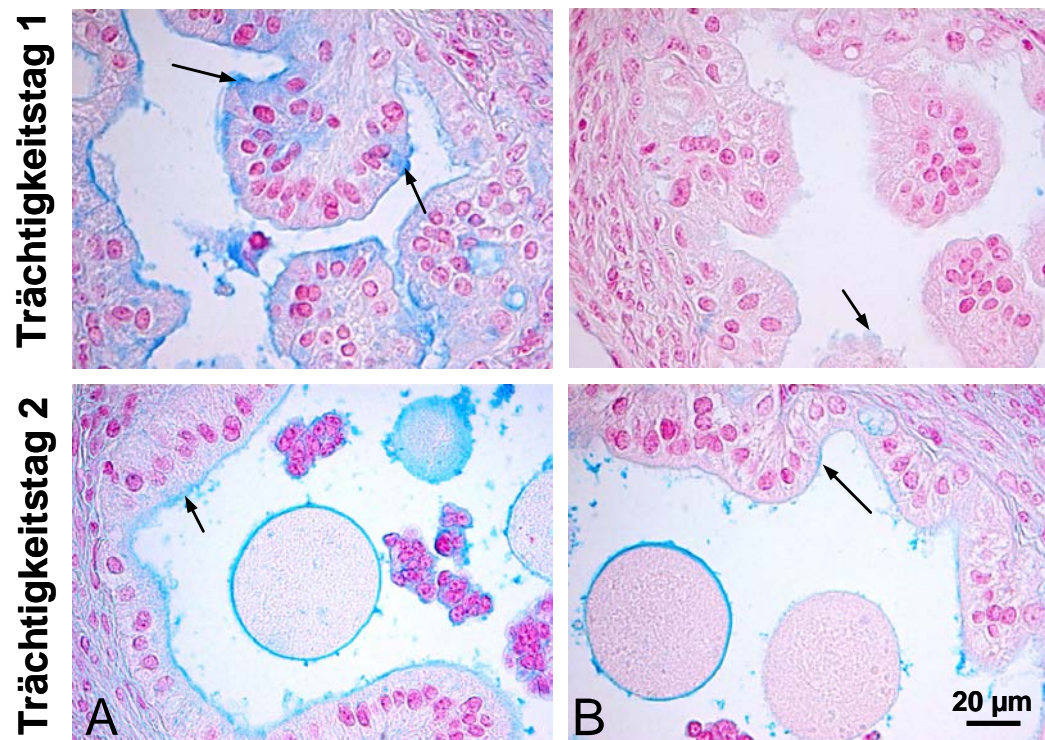


Abb. 31: Nachweis saurer Mukopolysaccharide (A: sulfatiert und karboxyliert; B: nur sulfatiert) in Abhängigkeit einer frühen Trächtigkeit im Isthmus.

Am Tag 1 der Trächtigkeit können **saure** Mukopolysaccharide sowohl im apikalen Zellbereich der sekretorischen Zellen wie auch im kompletten Zytoplasma ← (A) nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu können **saure** Mukopolysaccharide am 2. Tag der Trächtigkeit fast ausschließlich im apikalen Zellbereich gefunden werden ← (A). Der Anteil **sulfatierter** Mukopolysaccharide ist gering (B)

## 4.2 Partikeltransportgeschwindigkeit und Zilienschlagfrequenz im Eileiter der Maus

### 4.2.1 Messungen der Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG)

Die Partikeltransportgeschwindigkeiten werden als Mittelwert in  $\mu\text{m/s}$  und mit dem dazugehörigen Standardfehler (SEM) angegeben.

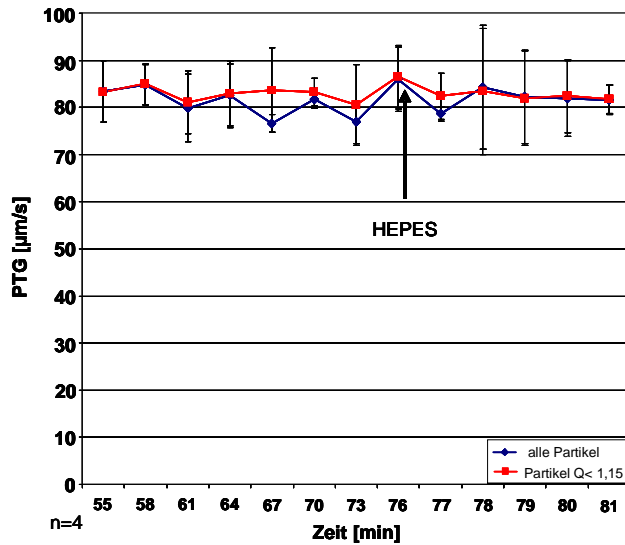
#### Etablierung des Messsystems

Aufgrund der Transparenz des Mäuseeileiters wurde zunächst versucht, die Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG) im geschlossenen Eileiter mit Hilfe der Durchleuchtung zu bestimmen. Dazu wurden Dynabeads in unterschiedlicher Menge (1-2  $\mu\text{l}$ ;  $3-6 \times 10^6$  Dynabeads) über das Infundibulum mittels Pipette injiziert ( $n=5$ ). Die Dynabeads waren jedoch nicht von den sekretorischen Bläschen der intraluminalen Eileiterflüssigkeit zu unterscheiden bzw. waren sie wegen ihrer Größe nicht sichtbar. Weiterhin bestand bei geschlossenem Eileiter eine sehr hohe Kontraktion der Muskulatur, so dass in der Folge Teilbereiche des Eileiters (proximale Ampulla und medialer Isthmus) longitudinal eröffnet und einzeln zur Messung herangezogen wurden. Anschließend wurde die Menge der benötigten Dynabeads getestet, damit zur Auswertung ausreichend Partikel zur Verfügung standen. Zunächst wurde die PTG mit einer Menge von 2,3  $\mu\text{l}$  und anschließend mit 3,0  $\mu\text{l}$  bestimmt ( $n=12$ ). Da mit der Menge von 3,0  $\mu\text{l}$  Dynabeads genügend Partikel gemessen und die PTG dadurch genauer bestimmt werden konnte, wurden alle Folgemessungen zur Bestimmung der PTG im Eileiter mit einer Dynabeadmenge von 3,0  $\mu\text{l}$  durchgeführt.

Um abzuklären, ob durch das Pipettieren Stimulationen oder Inhibitionen der PTG auftreten, wurde nach Messung der basalen PTG (76. min) in der Ampulla dem System eine Menge von 1,5  $\mu\text{l}$  HEPES-Puffer ( $n=4$ ), entsprechend der Menge der in späteren Untersuchungen verwendeten Pharmaka, zugeführt (Abb. 33).

Die Zufuhr von HEPES-Puffer besaß keine Auswirkung auf die PTG im Eileiter (Abb. 33).





*Abb. 33:* Kontrolle des Messsystems durch Zugabe von HEPES-Puffer.

Dargestellt sind der Mittelwert der PTG aller gemessenen Partikel zu jedem Messzeitpunkt (alle Partikel) mit zugehörigem Standardfehler (SEM), sowie die PTG der Partikel, die nicht mehr als 15% vom idealen Weg abgewichen sind (Partikel  $Q < 1,15$ ).

Die Zugabe von HEPES-Puffer übt keinen Einfluss auf die PTG aus.

#### 4.2.1.1. Messungen der Partikeltransportgeschwindigkeit im Eileiter von Wildtyp-Mäusen

##### 4.2.1.1.1 Die basale PTG in Ampulla und Isthmus sowie in Abhängigkeit vom Zyklusstand

###### Basale PTG in der Ampulla

Zur Bestimmung der Basisgeschwindigkeit in der Ampulla sind insgesamt 30 weibliche Tiere in den Zyklusstadien Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus untersucht worden.

Die basale PTG bleibt während der 8 aufeinanderfolgenden Messungen von Beginn (55. min) bis zum Ende (76. min) bei einem Mittel von  $65 \pm 4 \mu\text{m/s}$  (Abb. 34A) konstant (siehe ergänzend Film 01 und 02).

###### Basale PTG im Isthmus

Im Gegensatz dazu kann im Isthmus kein Transport der Partikel durch ziliäre Aktivität nachgewiesen werden (siehe ergänzend Film 03 und 04). Es kann von 27 Proben nur eine Probe zur Auswertung, mit dem Ergebnis eines Partikeltransportes zwischen  $0-10 \mu\text{m/s}$ , herangezogen werden (Abb. 34B). Zu beachten ist dabei, dass sich einige durch den äußeren Flüssigkeitsstrom (um das Gewebestück) im T-Dish in

Bewegung befindliche Partikel mit erfasst wurden, da der Durchmesser des Isthmus nicht ausreichend war, um den gesamten vom Objektiv erfassten Raum auszufüllen. Alle Folgemessungen sind aufgrund des nicht vorhandenen Partikeltransportes im Isthmus ausschließlich an der Ampulla durchgeführt worden.

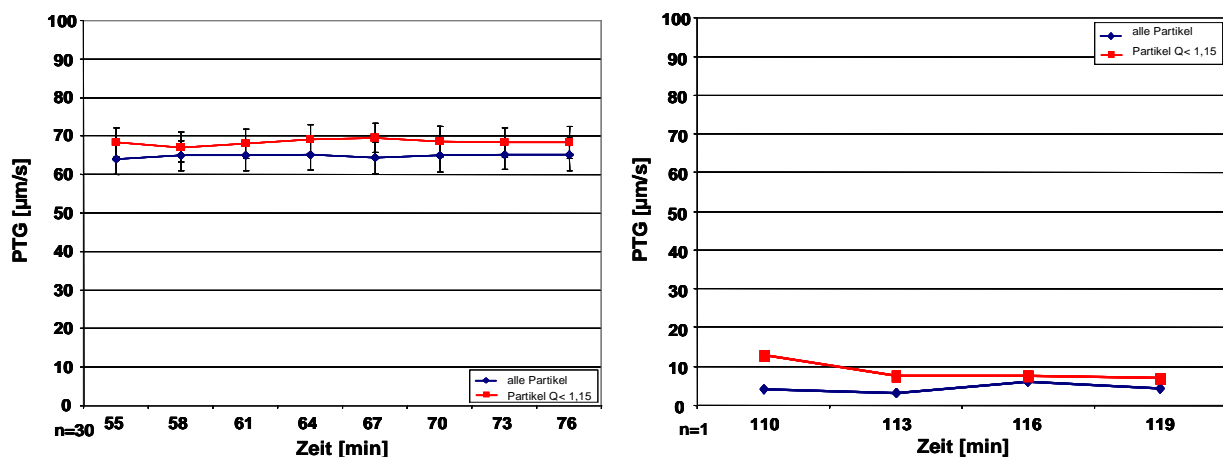
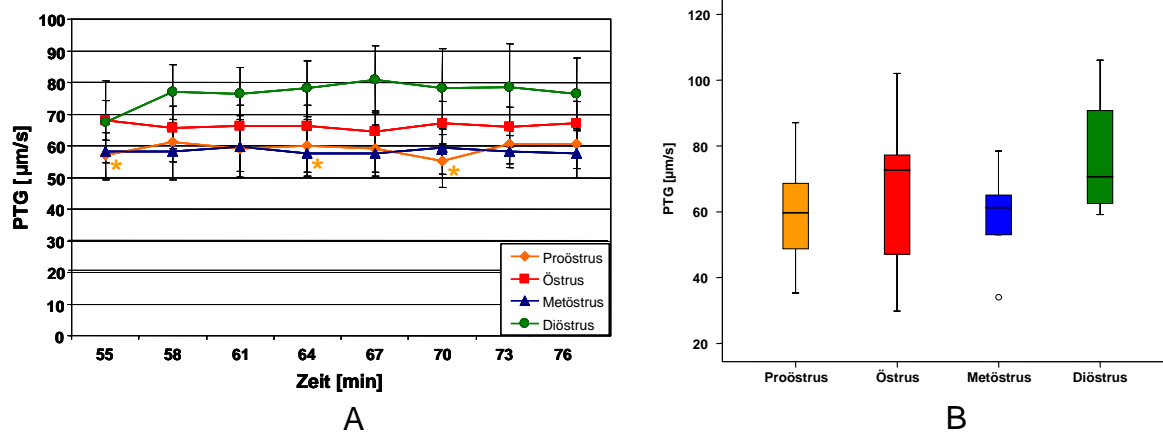


Abb. 34: Basale PTG in der Ampulla (A) und im Isthmus (B) von Wildtyp-Mäusen.

Illustriert sind der Mittelwert der PTG aller gemessenen Partikel (alle Partikel) sowie die PTG der Partikel, die nicht mehr als 15% vom idealen Weg abgewichen sind (Partikel  $Q < 1,15$ ) mit zugehörigem SEM. Im Bereich der proximalen Ampulla kann eine hohe basale PTG von durchschnittlich  $65 \pm 4 \mu\text{m/s}$  ( $n=30$ ) gemessen werden, wohingegen im Isthmus ( $n=1$ ) kein Transport nachgewiesen werden kann.

### Basale PTG in Abhängigkeit des Zyklusstandes

Für die einzelnen Zyklusstände (Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus) kann folgende durchschnittliche PTG ermittelt werden: Proöstrus  $60 \pm 7 \mu\text{m/s}$  ( $n=7$ ), Östrus  $66 \pm 7 \mu\text{m/s}$  ( $n=14$ ), Metöstrus  $58 \pm 7 \mu\text{m/s}$  ( $n=5$ ) sowie  $77 \pm 10 \mu\text{m/s}$  im Diöstrus ( $n=4$ ) (Abb. 35A). Es sind keine signifikanten Unterschiede in der basalen PTG zwischen den einzelnen Zyklusständen nachweisbar (Abb. 35B). Weiterhin ist bei allen Zyklusständen eine konstante basale PTG vom Startpunkt der Messung (55 min) bis zum Endpunkt (76. min) zu registrieren. Auffallend sind jedoch die zum Zeitpunkt des Östrus verstärkt auftretenden Kontraktionen der glatten Muskulatur sowohl in der Ampulla als auch im Isthmus.



**Abb.35:** Die basale PTG in Abhängigkeit der Zyklusstände.

**A:** Dargestellt sind der Mittelwert aller gemessenen Partikel zu jedem Messzeitpunkt mit zugehörigem SEM. Proöstrus (n=7), Östrus (n=14), Metöstrus (n=5) und Diöstrus (n=4). Zu den Messzeitpunkten 55., 64. und 70. min (\*) konnten im Proöstrus statt n=7 jeweils nur n=6 Tiere zur Auswertung herangezogen werden.

**B:** Die Box plots der PTG der Wildtyp-Mäuse in Abhängigkeit des Zyklusstandes.

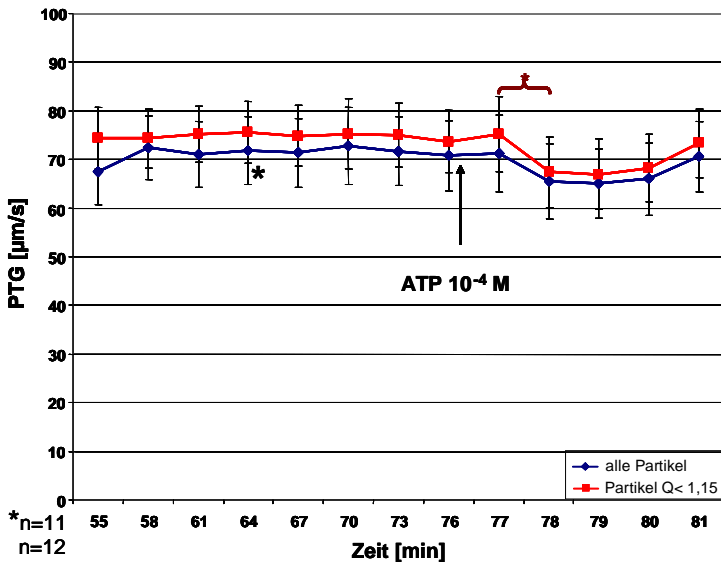
Die Box plots zeigen die 0, 25, 50, 75 und 100 Perzentile. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zyklusständen Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus.

° = Datenpunkt außerhalb der dreifachen Standardabweichung

#### 4.2.1.1.2 Wirkung von Stimulantien auf die PTG in der Ampulla von Wildtyp-Mäusen

##### Einfluss von ATP auf die PTG

Die Zugabe von ATP im Anschluss an die Messung der basalen PTG nach der 76. min (Endkonzentration von  $10^{-4}$  M) führt von dem Basiswert (76 min)  $71 \pm 7$  µm/s (100%) zu einem signifikanter Abfall (Abb. 36) der PTG in der 72. min auf  $66 \pm 8$  µm/s (93%), welcher in der 79. min seinen Tiefpunkt mit einer PTG von  $65 \pm 7$  µm/s (92%) erreicht (Abb. 36). Im Anschluss daran steigt die PTG bereits in der 81 min auf  $71 \pm 7$  µm/s (100%) an und erreicht damit das basale Plateau der PTG (Abb. 36). Damit kann gezeigt werden, dass ATP im Eileiter von Wildtyp-Mäusen keine stimulierende Wirkung auf den Zilienschlag besitzt. Aber nach ATP-Zugabe kann eine einsetzende rhythmische Muskelkontraktion beobachtet werden, die nach 1 min ihr Maximum zu erreichen scheint und anschließend schnell wieder abflacht.



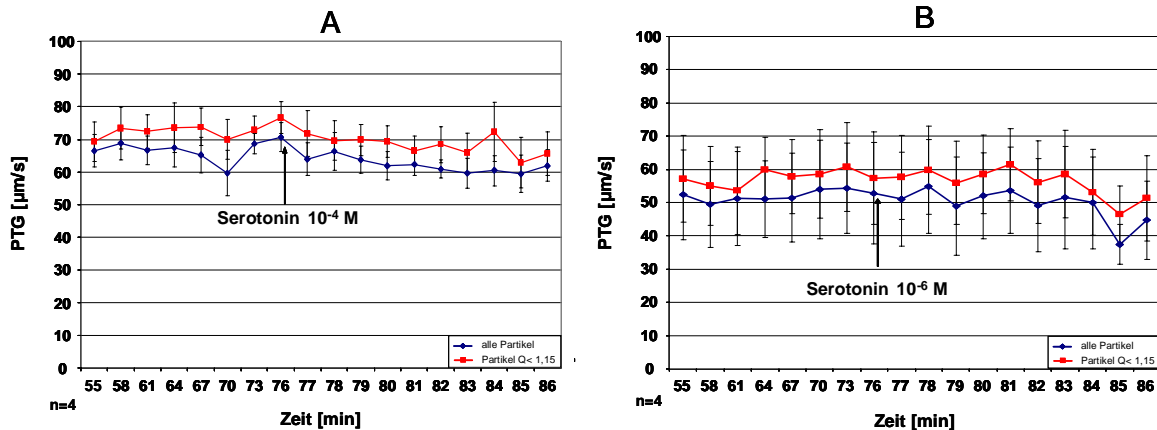
**Abb. 36:** Veränderung der PTG von Wildtyp-Mäusen nach Zugabe von ATP (n=12).

Dargestellt sind der Mittelwert der PTG aller gemessenen Partikel (alle Partikel) sowie die PTG der Partikel, die nicht mehr als 15% vom idealen Weg abgewichen sind (Partikel Q < 1,15) jeweils mit zugehörigem SEM. Die PTG fällt 2 Minuten nach der Zugabe signifikant ab. Bereits nach 5 Minuten erreicht die PTG wieder das Plateau der Basisgeschwindigkeit.

\* p≤0,05

### Einfluss von Serotonin auf die PTG

Die Zugabe von Serotonin in einer Endkonzentration von 10<sup>-4</sup> M (Abb. 37A) sowie 10<sup>-6</sup> M (Abb. 37B) nach der 76. min hat in beiden Fällen bei einer Messdauer von 10 min keine Auswirkung auf die basale PTG (n=4).



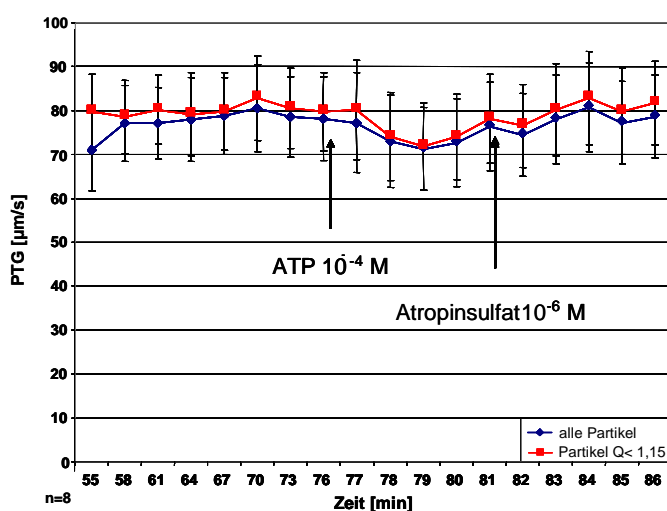
**Abb. 37:** Grafische Darstellung der PTG von Wildtyp-Mäusen unter Einfluss von Serotonin in einer Konzentration von 10<sup>-4</sup> M (A) (n=4) und 10<sup>-6</sup> M (B) (n=4).

Illustriert sind der Mittelwert der PTG aller gemessenen Partikel (alle Partikel) und die PTG der Partikel, die nicht mehr als 15% vom idealen Weg abgewichen sind (Partikel Q < 1,15) mit zugehörigem SEM. Serotonin besitzt keinen Einfluss auf die PTG im Eileiter der Maus.

#### 4.2.1.1.3 Wirkung von Agonisten und Antagonisten des cholinergen Systems auf die PTG in der Ampulla von Wildtyp-Mäusen

##### Einfluss von Atropinsulfat auf die PTG

Die Zufuhr von Atropinsulfat (n=8) in einer Endkonzentration von  $10^{-6}$  M (81. min) im Anschluss an eine vorangegangene ATP-Zugabe ( $10^{-4}$  M) besitzt während einer Messdauer von 5 min keinen Einfluss auf die PTG (Abb. 38). Bei einer Endzahl von 8 Tieren kann kein signifikanter Abfall der PTG nachgewiesen werden.

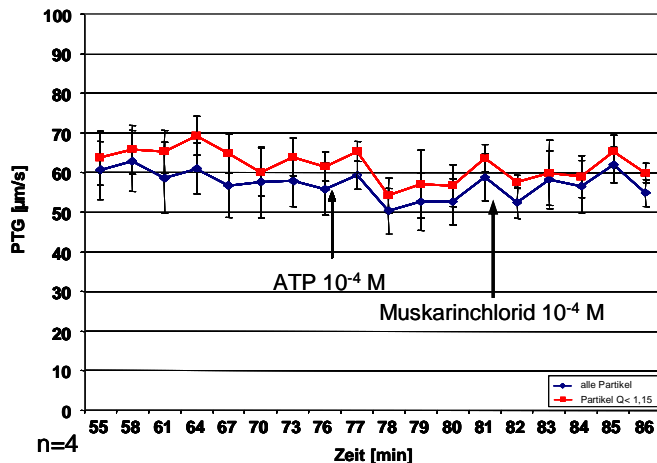


*Abb. 38:* PTG nach Zugabe von ATP und Atropinsulfat im Eileiter von Wildtyp-Mäusen.

Dargestellt sind der Mittelwert der PTG aller gemessenen Partikel (alle Partikel) sowie die PTG der Partikel, die nicht mehr als 15% vom idealen Weg abgewichen sind (Partikel Q < 1,15) mit entsprechendem SEM. ATP und Atropinsulfat besitzen keinen Einfluss auf die PTG im Eileiter der Maus bei n=8 Tieren.

##### Einfluss von Muskarinchlorid auf die PTG

Die Zugabe von Muskarinchlorid ( $10^{-4}$  M), einem mAChR Agonisten, führt nach vorangegangener ATP-Applikation ( $10^{-4}$  M) innerhalb einer 5-minütigen Messung zu keiner Veränderung der PTG im Eileiter von Wildtyp-Mäusen (n=4) (Abb. 39). Auffällig ist jedoch die direkt nach Muskarinchlorid-Zugabe verstärkte Kontraktion der Muskulatur.



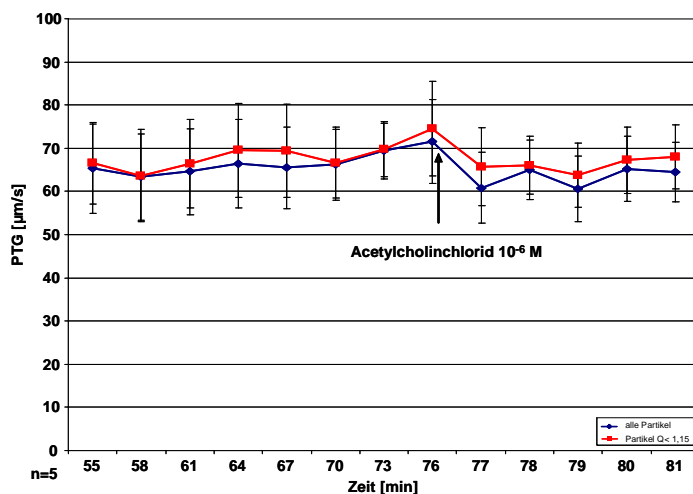
*Abb. 39:* PTG nach Zugabe von ATP und Muskarinchlorid im Eileiter von Wildtyp-Mäusen (n=4).

Dargestellt sind der Mittelwert der PTG aller gemessenen Partikel (alle Partikel) sowie die PTG der Partikel, die nicht mehr als 15% vom idealen Weg abgewichen sind (Partikel Q < 1,15) mit entsprechendem SEM. Muskarinchlorid besitzt keinen Einfluss auf die PTG im Eileiter der Maus.

### Einfluss von Acetylcholinchlorid auf die PTG

Acetylcholinchlorid (Agonist an mAChR und nAChR) in einer Endkonzentration von  $10^{-6}$  M löst bereits kurz nach Zugabe (76. min) Muskelkontraktionen aus, die sich im Laufe der weiteren Messung so sehr verstärken, dass lediglich eine 5-minütige Messung der PTG durchgeführt werden kann.

Innerhalb dieser 5 Minuten ist keine Veränderung der PTG zu verzeichnen (n=5) (Abb. 40).



*Abb. 40:* PTG nach Zugabe von Acetylcholinchlorid im Eileiter von Wildtyp-Mäusen (n=5).

Illustriert sind der Mittelwert der PTG aller gemessenen Partikel (alle Partikel) sowie die PTG der Partikel, die nicht mehr als 15% vom idealen Weg abgewichen sind (Partikel Q < 1,15) mit entsprechendem SEM. Acetylcholinchlorid besitzt keinen Einfluss auf die PTG im Eileiter der Maus.

#### 4.2.1.2 Transport von Embryonen sowie die basale PTG und die PTG unter Einfluss von Pharmaka im Eileiter von Wildtyp-Mäusen in der frühen Trächtigkeit

##### Transport der Embryonen im Eileiter der Maus

###### *a) Trächtigkeitstag 1*

Im Bereich der Ampulla sind die Embryonen kaum in Bewegung und liegen eingebettet von Eileiterfalten in dessen Lumen. Die Eileitermuskulatur weist leichte peristaltische Kontraktionen auf. Im Gegensatz dazu werden die Embryonen im Bereich des Isthmus durch antero- und retrograde peristaltische Kontraktionen innerhalb eines bestimmten Abschnittes hin und her bewegt. Unterstützt wird der Transport der Embryonen von dem durch die Muskelkontraktionen hervorgerufenen Flüssigkeitsstrom (siehe Film 05).

###### *b) Trächtigkeitstag 2*

Die Embryonen werden, wie auch am Tag 1, durch eine peristaltische Kontraktion der tubaren Muskulatur in einem Teilabschnitt des Isthmus hin und her bewegt (Film 06-08). Im Vergleich zu den Kontraktionen der Muskulatur am 1. Trächtigkeitstag sind sie am 2. Trächtigkeitstag intensiver und treten in einer höheren Frequenz auf.

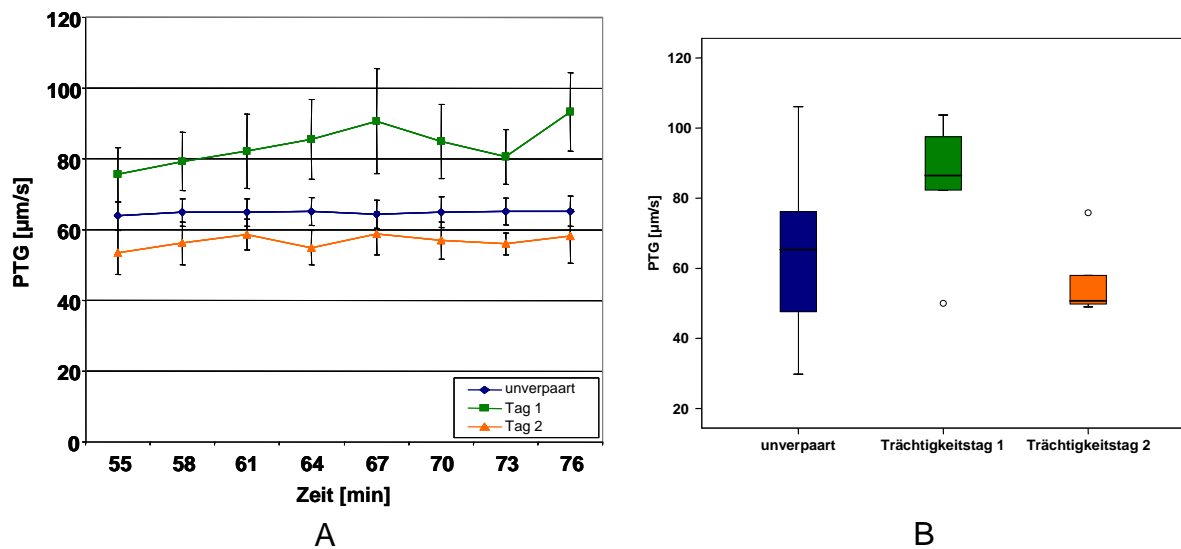
##### Die basale PTG in Abhängigkeit vom Trächtigkeitstag

###### *a) Trächtigkeitstag 1*

Die basale PTG im Eileiter von Wildtyp-Mäusen, welche sich im 1. Trächtigkeitstag befinden, liegt durchschnittlich bei  $84 \pm 10 \mu\text{m/s}$  (Abb. 41A) und weist keinen signifikanten Unterschied zur basalen PTG von unverpaarten Wildtypen auf (Abb. 41B). Der Verlauf der basalen PTG von Messbeginn (55. min) bis zum Messende (76. min) ist nicht konstant. So steigt die basale PTG von der 55. min ( $76 \pm 8 \mu\text{m/s}$ ) auf einen Wert von  $93 \pm 11 \mu\text{m/s}$  in der 76. min (Abb. 30) an ( $n=5$ ). Die Differenz zwischen Start- und Endpunkt erweist sich als signifikant und ist im Vergleich zur Differenz des Start- und Endpunktes bei unverpaarten Tieren hoch signifikant (Abb. 42).

## b) Trächtigkeitstag 2

Mit einer durchschnittlichen basalen PTG von  $57 \pm 5 \mu\text{m/s}$  (Abb. 41A) ( $n=5$ ) besteht kein signifikanter Unterschied in der basalen PTG zwischen unverpaarten Wildtyp-Mäusen sowie trächtigen Mäusen am Tag 1 und Tag 2 der Trächtigkeit (Abb. 41B). Der Verlauf der PTG über den Messzeitraum von der 55. min bis hin zur 76. min erweist sich als beständig (Abb. 41A).



*Abb. 41:* Vergleichende Darstellung der basalen PTG von unverpaarten und trächtigen Mäusen (Tag 1 und 2 der Trächtigkeit).

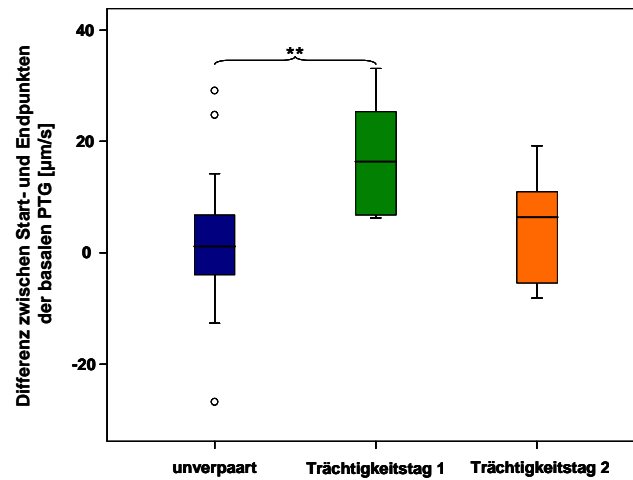
Unverpaarte Tiere ( $n=30$ ), Trächtigkeitstag 1 ( $n=5$ ), Trächtigkeitstag 2 ( $n=5$ )

A: Dargestellt sind die Mittelwerte der PTG aller gemessenen Partikel über den Zeitraum 55. min bis zur 76. min. mit zugehörigem Standardfehler.

B: Die Box plots illustrieren die 0, 25, 50, 75 und 100 Perzentile der basalen PTG von unverpaarten und trächtigen Wildtyp-Mäusen. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen unverpaarten und trächtigen Tieren.

° = Datenpunkt außerhalb der dreifachen Standardabweichung





*Abb. 42:* Vergleich der Differenzen von Start- und Endpunkt der basalen PTG zwischen unverpaarten und trächtigen Wildtyp Mäusen.

Unverpaarte Tiere (n=30), Trächtigkeitstag 1 (n=5), Trächtigkeitstag 2 (n=5)

Die Box plots zeigen die 0, 25, 50, 75 und 100 Perzentile.

Die Differenz von Start- und Endpunkt der am 1. Tag trächtigen Tiere ist hoch signifikant gegenüber der Differenz von den unverpaarten Tieren.

\*\*  $p \leq 0,01$

° = Datenpunkt außerhalb der dreifachen Standardabweichung

### Einfluss von ATP und Atropinsulfat auf die PTG im Eileiter von trächtigen Mäusen

#### *a) Trächtigkeitstag 1*

Nach der Zugabe von ATP in einer Endkonzentration von  $10^{-4}$  M kann bei 2 von 4 Tieren zunächst ein leichter Anstieg der PTG von  $92 \pm 14$   $\mu\text{m/s}$  (100%) beobachtet werden. Die anderen 2 Tiere reagieren sofort mit einem Abfall der PTG. Im Mittel ist ein kontinuierlicher Abfall der PTG auf  $91 \pm 14$   $\mu\text{m/s}$  (99,5%) in der 77. min, gefolgt von  $82 \pm 11$   $\mu\text{m/s}$  (90%) in der 78. min,  $81 \pm 12$   $\mu\text{m/s}$  (89%) in der 79. min bis auf einen Minimalwert von  $77 \pm 11$   $\mu\text{m/s}$  (84%) in der 80. min (Abb. 43) zu ermitteln. Im Anschluss daran steigt die PTG in der 81. min wieder auf einen Wert von  $85 \pm 13$   $\mu\text{m/s}$  (93%) an.

Eine Zugabe von *Atropinsulfat* (nach der 81. min) in einer Endkonzentration von  $10^{-6}$  M, im Anschluss an die vorangegangene ATP-Zufuhr von  $10^{-4}$  M nach der 76. min, bewirkt keine Änderung der PTG (Abb. 43) (n=4).

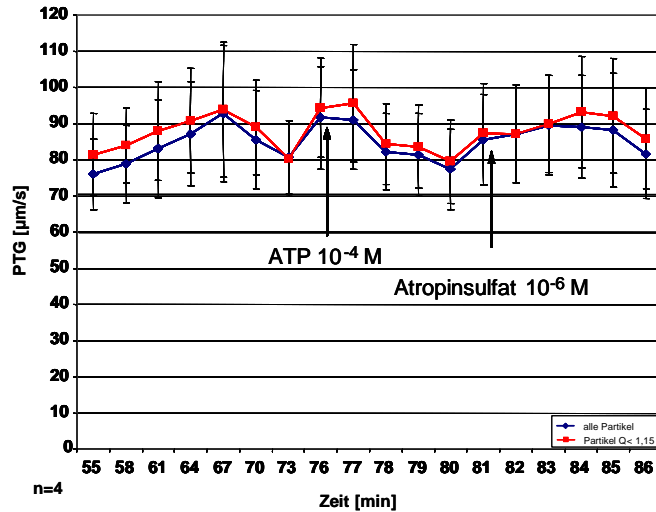


Abb. 43: Grafische Darstellung der PTG von Tieren am 1. Tag der Trächtigkeit unter Wirkung von ATP und Atropinsulfat (n=4).

Illustriert sind der Mittelwert der PTG aller gemessenen Partikel (alle Partikel) sowie die PTG der Partikel, die nicht mehr als 15% vom idealen Weg abgewichen sind (Partikel  $Q < 1,15$ ) mit entsprechendem SEM. Atropinsulfat besitzt keinen Einfluss auf die PTG im Eileiter der Maus.

#### b) Trächtigkeitstag 2

Eine Wirkung von *ATP* oder *Atropinsulfat* kann bei den Tieren, die sich im 2. Trächtigkeitstag befinden, nicht gemessen werden. Grund dafür sind die kontinuierlich an Stärke zunehmenden Kontraktionen der tubaren Muskulatur.

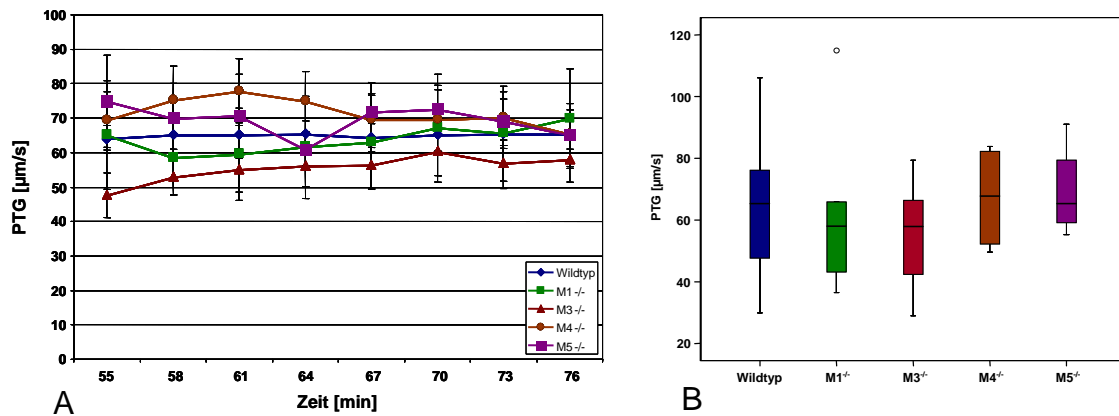
#### 4.2.1.3 Messungen der PTG im Eileiter von Muskarinrezeptor-Knockout-Mäusen

##### Besonderheit der Gewebestruktur des Eileiters von M3-Knockout-Mäusen

Im Vergleich zu den Wildtyp- sowie den M1-, M4- und M5-Knockout-Mäusen kann eine veränderte Gewebestruktur des Eileiters der M3-Knockout-Mäuse beobachtet werden. Deutlich wird dies bei der Freipräparation des Eileiters sowie der Eröffnung der Eileitersegmente. Das Gewebe reißt sehr schnell, erscheint sehr weich und unflexibel.

##### 4.2.1.3.1 Vergleich der basalen PTG bei Wildtyp- und Muskarinrezeptor-Knockout-Mäusen

Da keine zyklusabhängigen Unterschiede in der basalen PTG im Eileiter der Wildtyp-Mäuse vorliegen, wurde die PTG der Muskarinrezeptor-Knockout-Mäuse unabhängig vom Zyklusstand bestimmt. Im Vergleich zur basalen PTG im Eileiter von Wildtyp-Mäusen ( $65 \pm 4 \mu\text{m/s}$ ) liegen die basalen PTG der Muskarinrezeptor-Knockout-Mäuse bei folgenden Mittelwerten: M1<sup>-/-</sup>:  $64 \pm 14 \mu\text{m/s}$  (n=5), M3<sup>-/-</sup>:  $55 \pm 6 \mu\text{m/s}$  (n=8), M4<sup>-/-</sup>:  $67 \pm 9 \mu\text{m/s}$  (n=4) sowie M5<sup>-/-</sup>:  $69 \pm 5 \mu\text{m/s}$  (n=4) (Abb. 44A). Es sind keine signifikanten Unterschiede in der basalen PTG festzustellen (Abb. 44B). Der Verlauf der basalen PTG über den Messzeitraum von der 55. min bis hin zur 76. min, das heißt zwischen Start- und Endpunkt der Messung, weist bei den M1-, M4- und M5-Knockout-Mäusen, wie bei den Wildtyp-Mäusen, eine Konstanz auf (Abb. 44A). Im Gegensatz dazu ist bei den M3-Knockout-Mäusen ein signifikanter Unterschied in der PTG zwischen Start- und Endpunkt zu verzeichnen (Abb. 44A/45). So steigt die PTG von  $48 \pm 7 \mu\text{m/s}$  in der 55. min bis auf  $56 \pm 7 \mu\text{m/s}$  in der 76. min signifikant an. Dieser Anstieg der basalen PTG im Eileiter der M3-Knockout-Mäuse ist signifikant gegenüber dem Verlauf der basalen PTG in den Eileitern von Wildtyp- sowie M4- bzw. M5-Knockout-Mäusen (Abb. 45).

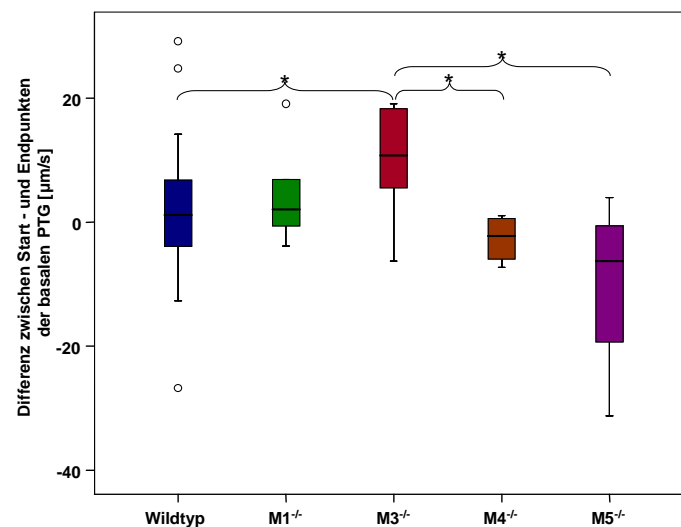


**Abb. 44:** Vergleichende Darstellung der basalen PTG von Wildtyp- und Muskarinrezeptor-Knockout-Mäusen

A: Verlaufsdiagramm der Mittelwerte der basalen PTG aller gemessenen Partikel mit zugehörigem SEM von Wildtyp- (n=30), M1<sup>-/-</sup> (n=5), M3<sup>-/-</sup> (n=8), M4<sup>-/-</sup> (n=4) und M5<sup>-/-</sup> Knockout-Mäusen (n=4).

B: Die Box plots illustrieren die 0, 25, 50, 75 und 100 Perzentile. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp- und den Muskarinrezeptor-Knockout-Mäusen.

° = Datenpunkt außerhalb der dreifachen Standardabweichung



**Abb. 45:** Vergleichende Darstellung der Differenzen von Start- und Endpunkten der basalen PTG der untersuchten Mausstämme.

Die Box plots zeigen die 0, 25, 50, 75 und 100 Perzentile.

Wildtyp- (n=30), M1<sup>-/-</sup> (n=5), M3<sup>-/-</sup> (n=8), M4<sup>-/-</sup> (n=4) und M5<sup>-/-</sup> Knockout-Mäuse (n=4)

Signifikante Unterschiede in der Differenz von Start- und Endpunkten bestehen zwischen den Wildtyp- und M3<sup>-/-</sup>-Mäusen, zwischen den M3<sup>-/-</sup> und M4<sup>-/-</sup> sowie zwischen den M3<sup>-/-</sup> und M5<sup>-/-</sup> Knockout-Mäusen.

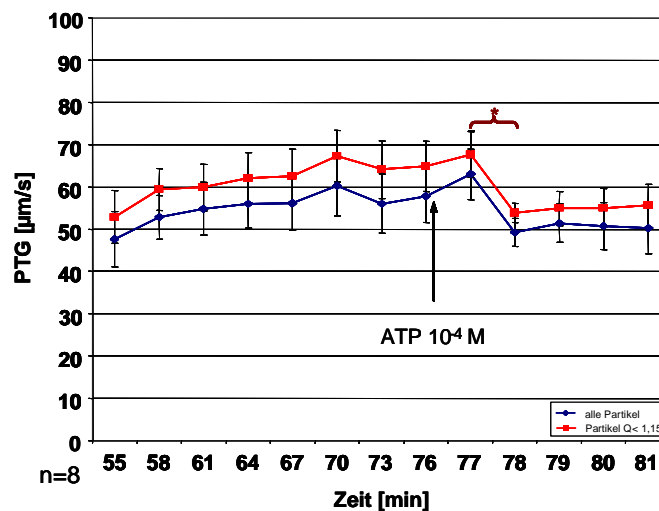
\* p≤0,05

° = Datenpunkt außerhalb der dreifachen Standardabweichung

#### 4.2.1.3.2 Einfluss von ATP auf die PTG von M1-, M3-, M4- und M5-Knockout-Mäusen

##### M3<sup>-/-</sup>-Mäuse

Die basale PTG von  $58 \pm 6 \mu\text{m/s}$  (100%) in der 76. min fällt infolge der Zugabe von ATP, mit einer Endkonzentration von  $10^{-4}$  M im T-Dish, in der 78. min signifikant auf ihren Minimalwert von  $49 \pm 3 \mu\text{m/s}$ , welcher 85% der basalen PTG entspricht, ab (Abb. 46). In den nachfolgenden Messungen wird das Niveau der basalen PTG nicht wieder erreicht (n=8).



*Abb. 46:* Grafische Darstellung der PTG von M3<sup>-/-</sup>-Mäusen unter Zugabe von ATP (n=8).

Dargestellt sind der Mittelwert der PTG aller gemessenen Partikel zu jedem Messzeitpunkt (alle Partikel) mit zugehörigem Standardfehler (SEM), sowie die PTG der Partikel, die nicht mehr als 15% vom idealen Weg abgewichen sind (Partikel  $Q < 1,15$ ).

Nach der Zugabe von ATP sinkt die PTG in der 78. min signifikant und verbleibt im Anschluss daran unterhalb des basalen Plateaus.

\*  $p \leq 0,05$

##### M1-, M4- und M5-Knockout-Mäuse

Der Verlauf der PTG nach Zugabe von ATP ( $10^{-4}$  M) ähnelt dem der M3<sup>-/-</sup>-Mäuse. Bei einer Tierzahl von n=5 (M1<sup>-/-</sup>) bzw. n=4 (M4<sup>-/-</sup> und M5<sup>-/-</sup>) kann jedoch anstelle eines signifikanten Abfalls der PTG in der 2. min nach Zugabe von ATP ausschließlich von einer Tendenz des Abfallens der PTG gesprochen werden. Die Messverläufe

gestalten sich wie folgt. Bei den *M1<sup>-/-</sup>-Mäusen* kann in der 76. min eine basale PTG von  $70 \pm 14 \mu\text{m/s}$  (100%) gemessen werden. In der 78. min liegt die PTG bei  $60 \pm 15 \mu\text{m/s}$  (85%) und zur 79. min bei  $57 \pm 14 \mu\text{m/s}$  (82%) (Abb. 47). Zum Zeitpunkt der 80. und 81. min können folgende Werte der PTG ermittelt werden; 80. min:  $59 \pm 12 \mu\text{m/s}$  und 81. min:  $65 \pm 13 \mu\text{m/s}$  (Abb. 47). Die unter ATP-Einfluss gemessenen Werte bei den *M4<sup>-/-</sup>-Mäusen* sind im Anschluss an den Basalwert der PTG von  $63 \pm 9 \mu\text{m/s}$  (100%) wie folgt: 77. min:  $61 \pm 7 \mu\text{m/s}$  (97%); 78. min:  $61 \pm 9 \mu\text{m/s}$  (97%); 79. min:  $60 \pm 8 \mu\text{m/s}$  (95%); 80. min:  $58 \pm 8 \mu\text{m/s}$  (92%) und 81. min:  $61 \pm 9 \mu\text{m/s}$  (97%) (Abb. 47). Die basale PTG (76 min) der *M5<sup>-/-</sup>-Mäuse* liegt hingegen bei  $65 \pm 8 \mu\text{m/s}$  (100%) und erreicht nach der Zugabe von ATP einen minimalen Wert von  $60 \pm 6 \mu\text{m/s}$  (92%) in der 78. min (Abb. 47). Im weiteren Verlauf der Messung sind die Werte der PTG folgende: 79. min:  $63 \pm 5 \mu\text{m/s}$ , 80. min:  $66 \pm 4 \mu\text{m/s}$  und 81. min  $63 \pm 5 \mu\text{m/s}$  (Abb. 47).

Bei allen Muskarinrezeptor-Knockout-Mäusen kann nach Zugabe von ATP eine verstärkte Kontraktion der Muskulatur beobachtet werden.

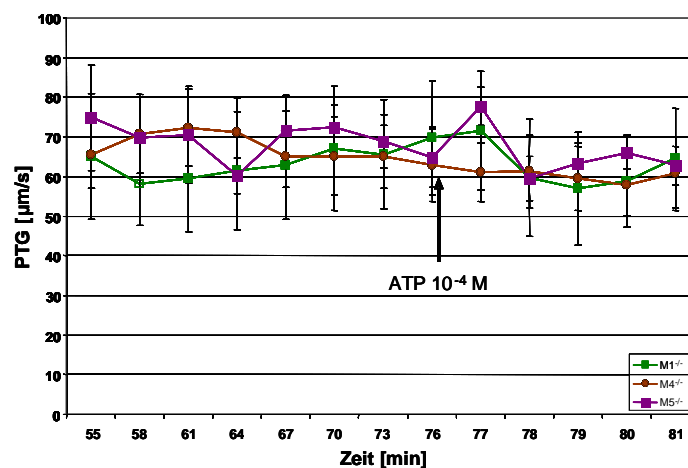
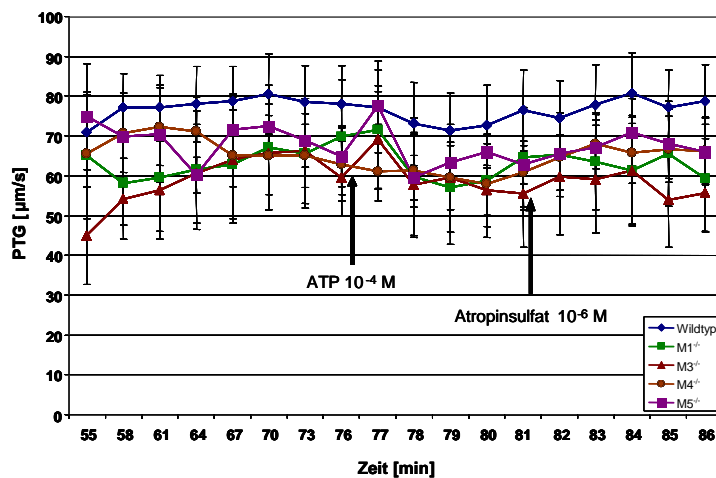


Abb. 47: Grafische Darstellung der PTG von M1-, M4- und M5-Knockout-Mäusen unter Zugabe von ATP.

Illustriert sind die Mittelwerte der PTG aller gemessenen Partikel mit zugehörigem Standardfehler. Bei M1- (n=5), M4- (n=4) und M5-Knockout-Mäusen (n=4) kann ein Abfall der PTG nach Zugabe von ATP beobachtet werden.

#### 4.2.1.3.3 Einfluss von Atropinsulfat auf die PTG von M1-, M3-, M4- und M5-Knockout-Mäusen

Die Zugabe von Atropinsulfat in einer Endkonzentration von  $10^{-6}$  M im Anschluss an einen vorangegangenen Stimulationsversuch mittels ATP ( $10^{-4}$  M Endkonzentration; siehe 4.2.1.3.2) führt innerhalb einer 5-minütigen Messung zu keiner signifikanten Veränderung der PTG in allen untersuchten Mausstämmen (M1- (n=5), M3- (n=8), M4- (n=4) und M5-Mäusen (n=4) (Abb. 48).



*Abb. 48:* Vergleich der PTG unter Einfluss von Atropinsulfat nach vorangegangener Zugabe von ATP. Illustriert sind die Mittelwerte der PTG aller gemessenen Partikel mit zugehörigem Standardfehler. Atropinsulfat besitzt sowohl bei den Wildtyp-Mäusen (n=8), wie auch bei den zur Messung herangezogenen M1- (n=5), M3- (n=4), M4- (n=4) und M5-Knockout-Mäusen (n=4) keinen Einfluss auf die PTG.

#### 4.2.1.4 Basale PTG und Einfluss von ATP und Atropinsulfat auf die PTG in der Trachea

##### Basale PTG

Die PTG in der Trachea ist nicht von Messbeginn an konstant, sondern fällt kontinuierlich ab und erreicht in der 55. min ihren Basalwert von  $21 \pm 5$   $\mu\text{m/s}$  (Abb. 49, siehe ergänzend Film 09 und 10). Zu Beginn der Messung, in der 30. min nach dem Tod der Tiere, kann eine PTG von  $41 \pm 6$   $\mu\text{m/s}$  gemessen werden (siehe Film 11 und 12), welche bereits in der 35. min nur noch  $32 \pm 7$   $\mu\text{m/s}$  beträgt (Abb. 49). Nachfolgend können bis zur 55. min folgende Werte ermittelt werden: 40. min:  $28 \pm 6$   $\mu\text{m/s}$ ; 45. min:  $22 \pm 5$   $\mu\text{m/s}$ ; 50. min:  $22 \pm 5$   $\mu\text{m/s}$  (Abb. 49) (n=6).

### Einfluss von ATP und Atropinsulfat auf die PTG

Unter der Wirkung von ATP (Endkonzentration  $10^{-4}$  M) kann bereits 1 min nach der Zugabe (56. min) eine signifikante Erhöhung der PTG beobachtet werden (Abb. 49). Die PTG steigt von dem Basalwert in der 55. min ( $21 \pm 5$   $\mu\text{m/s}$ ; 100%) auf  $39 \pm 8$   $\mu\text{m/s}$  (187%) in der 56. min an (Abb. 49). Zum Zeitpunkt der 57. min erreicht die PTG einen Wert von  $45 \pm 9$   $\mu\text{m/s}$  (216%), welcher in der 58. min leicht auf  $41 \pm 6$   $\mu\text{m/s}$  (199%) abfällt (Abb. 49). Im Anschluss daran steigt die PTG erneut auf  $47 \pm 5$   $\mu\text{m/s}$  (227%) in der 59. min, um dann in der 60. min einen Maximalwert von  $50 \pm 5$   $\mu\text{m/s}$  (239%) zu erreichen (Abb. 49). Es wurden 6 Tiere untersucht.

Die Zufuhr von Atropinsulfat (Endkonzentration  $10^{-6}$  M) nach der 60. min führt zu keiner Veränderung der PTG (Abb. 49).

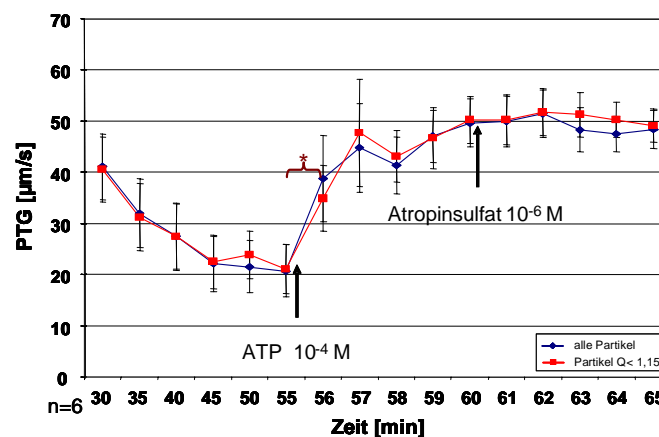


Abb. 49: Die PTG in der Trachea nach Zugabe von ATP und Atropinsulfat.

Dargestellt sind der Mittelwert der PTG aller gemessenen Partikel zu jedem Messzeitpunkt (alle Partikel) sowie die PTG der Partikel, die nicht mehr als 15% vom idealen Weg abgewichen sind (Partikel  $Q < 1,15$ ) jeweils mit zugehörigem SEM.

Die Zugabe von ATP führt in der Trachea zu einer signifikanten Steigerung der PTG, wohingegen Atropinsulfat keinen Einfluss auf die PTG besitzt.

\*  $p \leq 0,05$



## Vergleich der basalen PTG von Eileiter und Trachea

Die basalen PTG in der Ampulla ( $71 \pm 7 \mu\text{m/s}$ ) und die der Trachea ( $21 \pm 5 \mu\text{m/s}$ ) unterscheiden sich zum Zeitpunkt der 55. min hoch signifikant (Abb. 50).

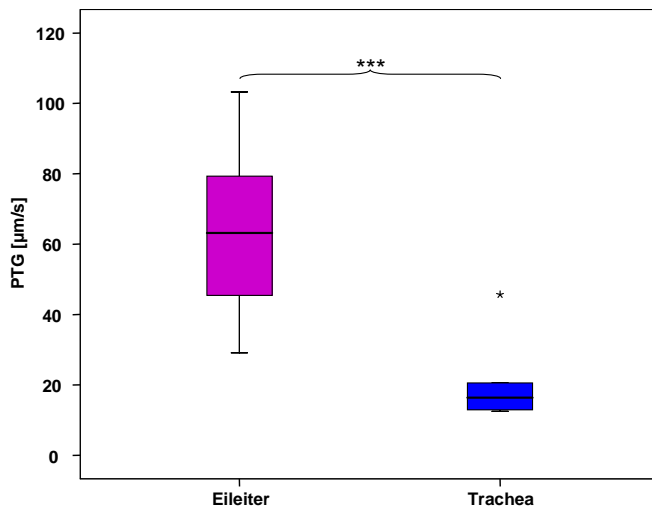


Abb. 50: Vergleichende Darstellung der basalen PTG von Eileiter (Ampulla) und Trachea.

Die box plots illustrieren die 0, 25, 50, 75 und 100 Perzentile. Die basalen PTG von Eileiter (n=29) und Trachea (n=6) von Wildtyp-Mäusen unterscheiden sich hoch signifikant.

\*\*\*  $p \leq 0,001$

## 4.2.2 Messungen der Zilienschlagfrequenz (ZSF)

### 4.2.2.1 Zilienschlagfrequenz im *Eileiter*: Basisfrequenz und Einfluss von ATP

Alle Zilienschlagfrequenzen werden als Mittelwert in Hz und mit dem dazugehörigen Standardfehler (SEM) angegeben.

#### Ampulla

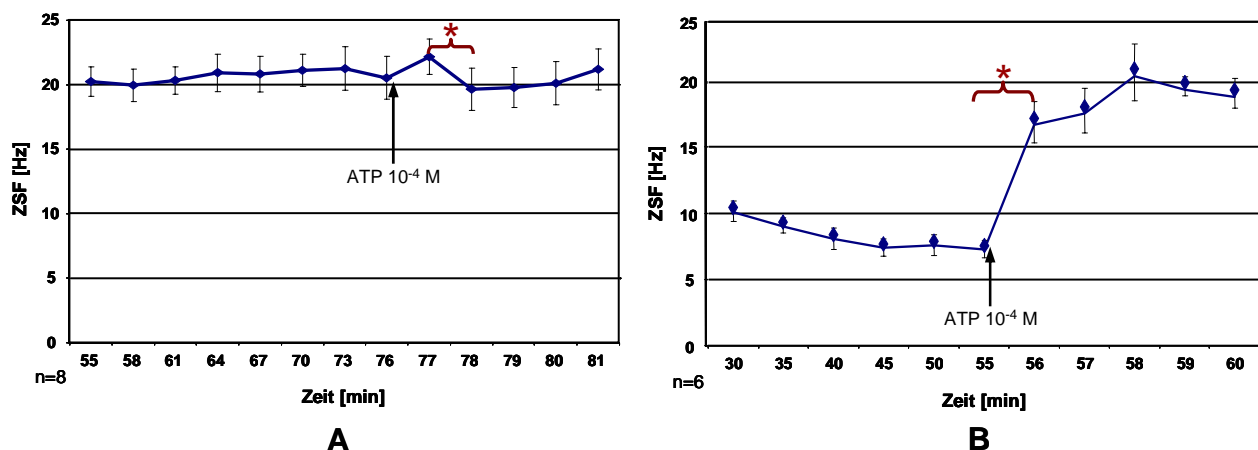
In der Ampulla des Eileiters von Wildtyp-Mäusen (n=8) kann über den Zeitraum 55. min bis 76. min eine Zilienschlagfrequenz (ZSF) von  $21 \pm 1 \text{ Hz}$  ermittelt werden (Abb. 51A, siehe ergänzend Film 13 und 14). Diese erweist sich als konstant. Nach Zugabe von ATP (Endkonzentration  $10^{-4} \text{ M}$ ), im Anschluss an die letzte Messung der Basisfrequenz (76. min;  $21 \pm 2 \text{ Hz}$ ) fällt die ZSF in der 78. min signifikant auf einen Wert von  $20 \pm 2 \text{ Hz}$  (97%) ab (Abb. 51A). Mit einem Minimalwert von  $19,8 \pm 2 \text{ Hz}$  (96 %) erreicht der Abfall in der 79. min seinen Endpunkt.

### Isthmus

Die Zilienschlagfrequenz im Isthmus kann nicht bestimmt werden. Ursächlich dafür sind eine geringe Anzahl an zilientragenden Zellen bzw. deren Lokalisation in der Tiefe zwischen den Falten und die kontinuierliche Kontraktion der Muskulatur (siehe auch Film 03 und 04).

#### 4.2.2.2 Zilienschlagfrequenz in der *Trachea*: Basisfrequenz und Einfluss von ATP

Die Basisfrequenz des trachealen Zilienschlages (n=6) wird in der 55. min erreicht und beträgt  $7 \pm 1$  Hz (100%) (Abb. 51B, siehe ergänzend Film 15 und 16). Zuvor können folgende Frequenzen ermittelt werden: 30. min:  $10 \pm 1$  Hz; 35. min:  $9 \pm 1$  Hz; 40. min:  $8 \pm 1$  Hz; 45. min:  $7 \pm 1$  Hz und in der 50. min:  $8 \pm 1$  Hz (Abb. 51B). Durch die Zugabe von ATP (Endkonzentration  $10^{-4}$  M) steigt die ZSF bereits innerhalb der 1. min nach Zugabe (56 min) signifikant auf  $17 \pm 2$  Hz (231%) an. Sie erreicht mit  $21 \pm 2$  Hz (295%) in der 58. min ihren Maximalwert. Diesem geht ein Anstieg der ZSF in der 57. min auf  $18 \pm 2$  Hz (243%) voraus. In der 59. und 60. min stellt sich die ZSF mit Werten von  $20 \pm 1$  Hz (269%) und  $19 \pm 1$  Hz (261%) auf ein Niveau ein (Abb. 51B).



**Abb. 51:** Grafische Darstellung der basalen ZSF von Eileiter (A) und Trachea (B) sowie unter Zugabe von ATP.

A: Dargestellt sind die Mittelwerte der ZSF zum jeweiligen Messzeitpunkt mit dazugehörigem SEM. Unter Einfluss von ATP fällt die ZSF im Eileiter (n=8) innerhalb von 2 min signifikant ab und steigt anschließend wieder auf die basale Schlagfrequenz an. \*  $p \leq 0,05$

B: Dargestellt sind die Mittelwerte der ZSF zum jeweiligen Messzeitpunkt mit dazugehörigem SEM. Nach Zugabe von ATP stieg die ZSF in der Trachea (n=6) bereits nach 1 min signifikant an. \*  $p \leq 0,05$

### Vergleich der Zilienschlagfrequenz von Eileiter und Trachea

Die ZSF im Eileiter ( $21 \pm 2$  Hz) und in der Trachea ( $7 \pm 1$  Hz) von Wildtyp-Mäusen unterscheiden sich zum Zeitpunkt der 55. min hoch signifikant (Abb. 52).

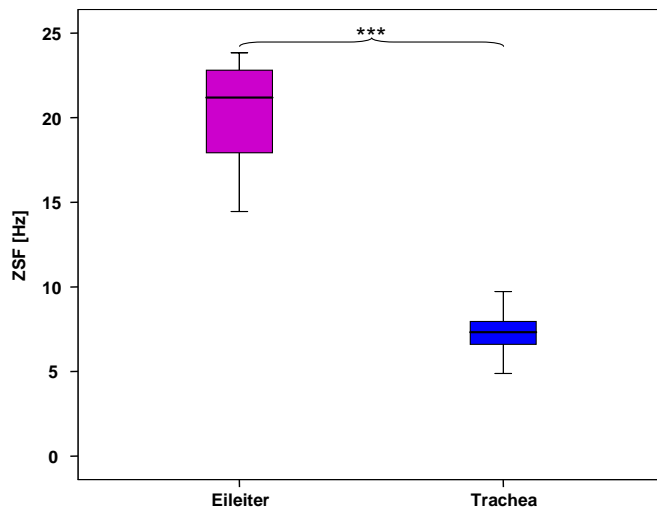


Abb. 52: Vergleichende Darstellung der ZSF im Eileiter und in der Trachea der Maus.

Die Box plots zeigen die 0, 25, 50, 75 und 100 Perzentile.

Die basalen ZSF von Eileiter (n=8) und Trachea (n=6) von Wildtyp-Mäusen unterscheiden sich hoch signifikant.

\*\*\*  $p \leq 0,001$

---

## 5 Diskussion

### 5.1 Morphologische Besonderheiten des Eileiters der Maus und deren Bedeutung

Die Anzahl und die Verteilung zilientragender Zellen im Eileiter sind tierartlich verschieden. Prinzipiell sind sie in allen Bereichen des Eileiters vertreten. Bei den meisten Tierarten, so auch bei Ziege, Schwein, Rind, Kaninchen und Maus (Abe et al. 1999; Abe und Hoshi, 2007; Abe und Oikawa, 1993; Brower und Anderson, 1969; Suarez 1987) befindet sich die höchste Anzahl an zilientragenden Zellen im Bereich des Infundibulums, gefolgt von der Ampulla und dem Isthmus mit der geringsten relativen Anzahl. Unterschiedlich ist jedoch das Verhältnis von zilientragenden zu sekretorischen Zellen. So weisen Ziege, Schwein und Rind im Infundibulum eine nahezu gleiche Anzahl auf, welche sich, je weiter distal im Eileiter gelegen, immer weiter zu Gunsten der sekretorischen Zellen verschiebt (Abe et al. 1999; Abe und Hoshi, 2008; Abe und Oikawa, 1993). Anders verhält es sich im Eileiter des Kaninchens und der Hündin, in welchen zilientragende Zellen die epitheliale Zusammensetzung im Infundibulum dominieren und in Ampulla und Isthmus zu gleichen Teilen zu finden sind (Brower und Anderson, 1969; Steinhauer et al. 2004). Dennoch haben die genannten Tierarten die Gemeinsamkeit, dass die zilientragenden Zellen unabhängig von ihrer Anzahl in den Abschnitten des Eileiters gleichmäßig über das Epithel verteilt sind. In Abhängigkeit des Zyklusstandes und damit einer hormonellen Einwirkung auf das Epithel des Eileiters können Verschiebungen der relativen Anzahl an zilientragenden Zellen und demzufolge auch der sekretorischen Zellen verzeichnet werden. In den meisten Fällen kommt es infolge einer Östrogenwirkung zu einer prozentualen Zunahme an zilientragenden Zellen und bei Progesteronwirkung zu einer Abnahme dieser (Mahmood et al. 1998). Solch zyklusabhängige, morphologische Veränderungen des Eileiterepithels werden auch für den humanen Eileiter beschrieben (Donnez et al. 1985). Wir konnten am Eileiter der Maus zeigen, dass im Vergleich zu anderen Tierarten und zum Menschen die Verteilung und das Auftreten von zilientragenden Zellen in Abhängigkeit vom Eileiterabschnitt extrem variiert. Besonders drastisch gestaltet sich dabei der Übergang von dem proximalen Bereich der Ampulla, in welchem durchschnittlich 70% zilientragende Zellen zu finden sind, zu dem sich anschließenden Bereich, ab

welchem keine gleichmäßige Verteilung der zilientragenden Zellen innerhalb des Epithelverbandes sichtbar wird. Sie sind zunehmend in den tieferen Bereichen zwischen den Falten zu finden und scheinen dort für die Entfernung von Fremdpartikeln sowie für das Loslösen von am Epithel oder den Zilien gebundenen Spermien verantwortlich zu sein. Deutlich wird, dass wir im Gegensatz zu Untersuchungen von Morita et al. (1997), welche in Abhängigkeit des Zyklusstandes verschiedene relative Anzahlen an sekretorischen Zellen nachgewiesen haben (Proöstrus:  $33,2 \pm 2,2\%$ , Östrus:  $76,6 \pm 8,6\%$ , Metöstrus:  $>90\%$ , Diöstrus:  $23,9 \pm 3,9\%$ ), keine zyklusabhängigen Veränderungen im Hinblick auf die relative Anzahl an zilientragenden Zellen im Eileiter (Ampulla) der Maus aufzeigen konnten. Da Morita et al. (1997) den von ihnen zur Zellzählung herangezogenen Bereich der Ampulla nicht genau definieren, gehen wir davon aus, dass die Diskrepanz der Untersuchungsergebnisse durch für die Zellzählung unterschiedlich gewählten Bereiche im Abschnitt Ampulla entsteht. Im Gegensatz zu der während des Zyklus gleichbleibenden relativen Anzahl an zilientragenden Zellen in der Ampulla konnten wir eine signifikante Abnahme dieser an den ersten beiden Tagen der Trächtigkeit im Vergleich zum Östrus nachweisen. Damit wird gezeigt, dass bereits in einer sehr frühen Trächtigkeit die Anzahl der zilientragenden Zellen im Bereich der Ampulla hormonell reguliert wird. Trotz dieser reduzierten Anzahl an zilientragenden Zellen kann die PTG dennoch konstant gehalten werden (siehe 5.3).

Eine Veränderung der relativen Anzahl an zilientragenden Zellen im Bereich des Isthmus konnte während des Zyklus zum Zeitpunkt des Östrus (bis 31%) nachgewiesen werden, was ebenfalls auf eine hormonelle Regulation hindeutet. Die Verteilung zilientragender Zellen und deren Anzahl in den verschiedenen Abschnitten des Eileiters der Maus lassen vermuten, dass die hohe Anzahl im Bereich von Infundibulum sowie der proximalen Ampulla eine große Bedeutung für die Aufnahme der Eizelle besitzt und einen schnellen Transport dieser zum Ort der Befruchtung realisiert. Weiterhin stellen die zilientragenden Zellen aufgrund der durch die Zilien vergrößerten Oberfläche eine ausreichende Kommunikation mit der Eizelle sicher und fördern den Weiter- bzw. Abtransport der Eileiterflüssigkeit. In den tiefer gelegenen Abschnitten des Eileiters kommt diesen jedoch wegen ihrer geringen Anzahl (durchschnittlich 12%) und ihrer versteckten Lage in der Tiefe zwischen den Falten eher keine Bedeutung hinsichtlich des Transportes von Eizellen oder Embryonen zu. Es ist jedoch davon auszugehen, dass sie dort abgesetzte

Schmutzpartikel oder Spermien wieder in den zentralen Flüssigkeitsstrom befördern können und dadurch die Ablagerung von Fremdpartikeln vermeiden. Wie wir zeigen konnten, besitzt der Eileiter der Maus im Gegensatz zu anderen Tieren, wie Rind und Schwein (Yaniz et al. 2000; Yaniz et al. 2006), im Isthmus anstelle von Longitudinal-Querfalten und dort im Vergleich zur Ampulla mindestens die dreifache Anzahl an Lagen von Muskelfasern. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass der glatten Muskulatur im Bereich des Isthmus für den Transport von Eizelle und Embryonen mehr Bedeutung zu kommt, als dem ziliären Transport. Unsere Ergebnisse lassen darauf schließen, dass aufgrund des kurzen Sexualzyklus der Maus (durchschnittlich 4-5 Tage) eine komplexe Umstrukturierung des Epithels, wie für andere Tierarten beschrieben, zu aufwändig ist und deshalb kaum morphologische Veränderungen des Eileiterepithels stattfinden. Nach Angaben von Steffl et al. (2008) müssen sich sekretorische Zellen bei Nagern aufgrund ihrer kurzen Lutealphase, verglichen mit der langen Lutealphase bei anderen Spezies (Rind, Schwein, Schaf und Ziege), einer massiven postovulatorischen Apoptose unterziehen, um eine neue Generation von sich schnell regenerierenden und differenzierenden Zellen zu entwickeln. Entsprechend unserer Resultate erfolgt eine Regeneration des Eileiterepithels der Maus durch die Abgabe von sekretorischen Zellen ins Eileiterlumen, was besonders deutlich in den Zyklusstadien Metöstrus und Diöstrus sowie an den frühen Trächtigkeitstagen (1 und 2) zu beobachten ist. Da die relative Anzahl an zilientragenden bzw. sekretorischen Zellen in der Ampulla der Maus jedoch zyklusunabhängig ist, ist davon auszugehen, dass die abgestoßenen Zellen vermeintlich unmittelbar ersetzt werden, so dass sich die relative Anzahl der Zellen nicht verändert. Anders muss es sich an den ersten beiden Trächtigkeitstagen verhalten. Vermutlich wird die schnelle relative Zunahme an sekretorischen Zellen durch die Abgabe bzw. den Abbau von Kinozilien realisiert. Die deutlichen morphologischen Unterschiede zum Menschen und die geringgradigen Veränderungen während des Zyklus im Bereich des Eileiterepithels stellen Besonderheiten des Mäuseeileiters dar, die eine Verwendung der Maus als Modell für den Menschen in der Reproduktionsforschung als wenig geeignet erscheinen lässt.

## **5.2 Synthese und Sekretion im Eileiter der Maus: Einfluss des Eileiterabschnittes sowie des Zyklusstandes und einer frühen Trächtigkeit**

Die Zusammensetzung der Eileiterflüssigkeit sowie die Konzentration ihrer Inhaltstoffe (Elektrolyte, Energiesubstrate, Vitamine, Fette, Wachstumsfaktoren, Aminosäuren und Proteine) sind ausreichend bekannt. In Abhängigkeit des endokrinen Status können diese variieren (Leese et al. 2001; Nancarrow und Hill, 1994). So sinkt die Konzentration an Glucose nach der Ovulation 10-fach in der porcinen Eileiterflüssigkeit bzw. 6-fach zwischen der Follikelphase und dem Mittzyklus in der Flüssigkeit des humanen Eileiters.

Die Synthese wie auch Sekretion von neutralen Mukosubstanzen, Glycoproteinen sowie von Glycogen im Eileiter der Maus ist entsprechend unseren Ergebnissen ebenfalls hormonell reguliert und in Abhängigkeit des jeweiligen Eileiterabschnittes verschieden. Generell ist festzustellen, dass in der Ampulla im Vergleich zum Isthmus eine höhere Sekretion stattfindet. Da im Isthmus jedoch ein höherer Prozentsatz an sekretorischen Zellen im Epithel vorhanden ist, kann nicht automatisch auf eine insgesamt geringere Menge an abgegebenem Sekret geschlossen werden. So besteht die Möglichkeit, dass die einzelne Zelle zwar eine geringere Menge synthetisiert und abgibt, aber durch die höhere Zellanzahl eine insgesamt gleichwertige Menge an Sekret im Bereich des Isthmus erreicht werden kann. Sollte im Isthmus jedoch eher eine Speicherung der Sekrete stattfinden, würde die Funktion der sekretorischen Zellen im Isthmus, wie auch durch Abe et al. (1999) dargestellt, nicht primär in der Produktion bzw. Freisetzung sekretorischer Produkte, sondern vielmehr in der Förderung der Vitalitätserhaltung der Spermien durch die Bildung eines Spermienreservoir liegen.

Im Eileiter der Maus kann zum Zeitpunkt des Diöstrus, gefolgt von Metöstrus und den ersten beiden Trächtigkeitstagen, in beiden untersuchten Eileiterabschnitten, Ampulla und Isthmus, die höchste Menge an PAS-positivem Material nachgewiesen werden. Erstaunlich ist, dass im Eileiter der Maus im Östrus fast kein PAS-positives Signal vorhanden ist. Dies könnte wie folgt erklärt werden. Da 2-3 h nach Beginn des Östrus die Ovulation bei der Maus stattfindet (Jung 1962), gelangen vermutlich mit den gesprungenen Eizellen zunächst ausreichend neutrale Mukopolysaccharide in den Eileiter. Somit muss erst nach Verbrauch dieser Nährstoffe (Ende Östrus,

Anfang Metöstrus sowie Trächtigkeitstag 1 und 2) eine erhöhte Synthese und Sekretion erfolgen.

Konträr dazu ist die hormonelle Regulation der Synthese und Sekretion von PAS-positivem Material im Eileiter von Spitzmausbeutelratten (*Monodelphis domestica*), bei welchen zum Zeitpunkt des Östrus sowohl in der Ampulla als auch im Isthmus das Maximum und im Proöstrus das Minimum erreicht wird (Kress und Morson, 2007). Nach dem von uns durchgeführten Amylaseverdau waren keine Veränderungen hinsichtlich positiv gefärbten PAS-Materials im Eileiter der Maus nachweisbar, so dass im Gegensatz zu anderen Spezies, wie dem Rind (unveröffentlichte Ergebnisse), in der Eileiterflüssigkeit bzw. im Zytoplasma der sekretorischen Zellen der Maus zyklus- und trächtigkeitsunabhängig kaum Glycogen vorhanden ist.

Wir konnten weiterhin zeigen, dass karboxylierte Gruppen unabhängig vom Eileiterabschnitt, dem Zyklusstand oder einer frühen Trächtigkeit einen höheren Anteil der synthetisierten und sezernierten sauren Mukopolysaccharide ausmachen als die sulfatierten Gruppen. Die Synthese und Sekretion von sauren Mukopolysacchariden findet im Gegensatz zu den neutralen Mukopolysacchariden nicht hauptsächlich im Bereich der Ampulla statt, sondern ebenso stark im Isthmus. Es kann außer im Metöstrus und am 2. Tag der Trächtigkeit eine zur Ampulla adäquate Anzahl an positiven sekretorischen Zellen im Eileiter der Maus nachgewiesen werden. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal liegt in der Tatsache, dass das Sekret im Isthmus zu jeder Zeit sowohl im apikalen Zellbereich als auch im gesamten Zytoplasma der Zellen nachweisbar ist. In der Ampulla hingegen können vollständig zytoplasmatisch gefärbte sekretorische Zellen lediglich im Metöstrus, Diöstrus sowie am 1. und 2. Tag einer Trächtigkeit nachgewiesen werden. Dabei ist die stärkste Synthese und Sekretion der sauren Mukopolysaccharide zum Zeitpunkt des Diöstrus sichtbar. Die Zu- bzw. Abnahme der Menge an Sekret im Verlauf des Zyklus und einer frühen Trächtigkeit ähnelt weitestgehend dem der neutralen Mukopolysaccharide. Ein wesentlicher Unterschied besteht jedoch im Östrus, in welchem im Bereich des Isthmus die höchste Menge an Alcianblau-positivem Material festzustellen ist. Im Gegensatz zur Synthese und Sekretion von sauren Mukopolysacchariden in Ampulla und Isthmus des Mäuseeileiters sind Alcianblau-positive Granula (pH 1,0) im Eileiter des Kaninchen nur im Isthmus und nicht im



Bereich der Ampulla enthalten (Jansen und Bajpai, 1982). Dies kann für die Funktion der sekretorischen Zellen zur Bildung eines Spermienreservoirs sprechen.

Da im Metöstrus und am 2. Tag der Trächtigkeit im Vergleich zu den anderen Zyklusstadien und dem 1. Tag der Trächtigkeit wesentlich weniger saure Mukosubstanzen im Isthmus nachgewiesen werden können, ist davon auszugehen, dass zu diesen Zeitpunkten weniger saure Mukopolysaccharide synthetisiert und sezerniert werden, da noch genügend im Östrus bzw. am 1. Tag der Trächtigkeit gebildete Nährstoffe vorhanden sind, die zur Ernährung der Eizelle bzw. des Embryos dienen. Es wird zudem deutlich, dass sich das Epithel des Mäuseeileiters, im Gegensatz zu den Haussäugetieren, zu keinem Zeitpunkt des Sexualzyklus in einer Ruhephase befindet.

Fasst man die Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen zusammen wird ersichtlich, dass die einzelnen Zyklusstadien und frühen Trächtigkeitstage nur schwer voneinander zu unterscheiden sind und dass sich der Eileiter der Maus zu keiner Zeit in einer richtigen Ruhephase befindet. Die Zyklusstände und frühen Trächtigkeitstage sind wie folgt charakterisiert: Das Epithel zum Zeitpunkt des Proöstrus ist wenig aktiv. In der Ampulla können vereinzelt apikal PAS- und Alcianblau-positive sekretorische Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu ausschließlich apikal PAS-positiven sekretorischen Zellen im Isthmus sind saure Mukopolysaccharide auch vollständig intrazytoplasmatisch zu finden. Der Östrus ist durch eine erhöhte relative Anzahl an zilientragenden Zellen im Bereich des Isthmus, eine sehr hohe Sekretmenge im Lumen, keine bzw. eine sehr geringe apikale Synthese und Sekretion von neutralen Mukopolysacchariden in Ampulla und Isthmus und der höchsten Menge an sauren Mukopolysacchariden im Isthmus gekennzeichnet. Im Metöstrus können vermehrt Stiftchenzellen festgestellt werden, die sekretorischen Zellen befinden sich meist oberhalb des Niveaus der zilientragenden Zellen und werden vermehrt in das Eileiterlumen abgegeben. PAS- und Alcianblau-positives Material kann verstärkt in der Ampulla, apikal und komplett intrazytoplasmatisch in Form von Granula nachgewiesen werden. Im Vergleich mit den anderen Zyklusstadien weist der Isthmus die geringste Menge an sauren Mukopolysacchariden auf. Der Diöstrus gleicht im Wesentlichen dem Metöstrus. Ein markanter Unterschied findet sich in den deutlich Alcianblau-positiven sekretorischen Zellen des Isthmus. Ebenfalls kaum voneinander zu unterscheiden sind Diöstrus und

der erste Tag der Trächtigkeit. Neben der Präsenz von Ein- und Zweizellern kann am ersten Trächtigkeitstag eine erhöhte Transparenz des geschlossenen Eileiters beobachtet werden. Weiterhin ist die Anzahl der Stiftchenzellen erhöht. Tag 2 der Trächtigkeit lässt sich vom Tag 1 ausschließlich durch die Alcianblaufärbung unterscheiden, welche im Isthmus kaum zu einem positiven Signal sekretorischer Zellen führt und so dem Metöstrus gleicht.

### **5.3 Mukoziliäre Clearance und Einfluss des cholinergen Systems im Eileiter der Maus**

Es ist bekannt, dass die ziliäre Aktivität durch eine Vielzahl von Stimuli (elektrische, chemische, mechanische) beeinflusst werden kann (Hermoso et al. 2001). Das neu etablierte videomikroskopische System bietet die Möglichkeit, sowohl die PTG als auch die ZSF von zilientragenden Zellen in frisch entnommenen Explantaten zu bestimmen, so dass unnötige Stimulationen vermieden und natürliche Zellverbindungen erhalten bleiben. Dadurch erreicht man mit dem hier verwendeten System, im Gegensatz zu Messungen an Epithelzellkulturen, bei welchen z.B. eine deutlich niedrigere ZSF nachgewiesen wurde (Delmotte und Sanderson, 2006), Bedingungen, die denen *in vivo* ähneln.

Der Transport von Partikeln, hervorgerufen durch den Zilienschlag, wurde im Eileiter bis zum jetzigen Zeitpunkt ausschließlich ohne Messung ihrer Geschwindigkeit betrachtet. Die Bestimmung der Geschwindigkeit bietet jedoch den Vorteil, dass unter diversen Bedingungen (stimulierende oder hemmende Beeinflussung) erfasste Daten exakt miteinander verglichen werden können. Gaddum-Rosse und Blandau (1976) untersuchten den Richtungsverlauf von Partikeln, z.B. von gefärbten Lycopodium Sporen oder Partikeln einer Größe von 15  $\mu\text{m}$ , an längs eröffneten Eileitern verschiedener Tierarten. Auffällig war, dass im Gegensatz zu den Wiederkäuern bei Nagern (Meerschweinchen und Ratte) ein schneller, stets uteruswärts gerichteter Transport in den Bereichen Infundibulum sowie der oberen Hälfte der Ampulla statt fand, jedoch kein Transport im Bereich des Isthmus zu verzeichnen war. Diese Beobachtungen korrelieren mit den von uns ermittelten Ergebnissen des Partikeltransportes im Eileiter der Maus. Wir haben eine sehr hohe Transportrate im Bereich der Ampulla beobachtet und gemessen, wohingegen im

Isthmus kein Transport von Partikeln, verursacht durch die ziliäre Aktivität, sichtbar war. Gaddum-Rosse und Blandau (1976) gingen damals von einer Zerstörung der Mukosa, verursacht durch das Eröffnen des Eileiters, aus. Am Beispiel der Maus konnten wir zeigen, dass der Grund für einen fehlenden Transport im Isthmus nicht die Präparationstechnik sein muss, sondern dass die sehr geringe Anzahl an zilientragenden Zellen und deren Vorkommen in den Nischen der Zirkulärfalten dafür verantwortlich sein kann. Dies könnte auch für die Eileiter von Ratte und Meerschweinchen zutreffen.

Dass Östrogen und Progesteron die Beschaffenheit der tubaren Mucosa beeinflussen können, in dem sie zu einer Zilienneubildung oder einer Abnahme dieser führen (Mahmood et al. 1998), ist weitestgehend bekannt. Ihre Wirkung auf die Zilienaktivität ist jedoch noch umstritten. Prinzipiell geht man davon aus, dass die Zilien auf wechselnde Östrogen- bzw. Progesteronspiegel mit einer Erhöhung oder Verminderung der Schlagfrequenz reagieren. So konnten Lyons et al. (2006) einen stimulierenden Effekt von Follikel- und Peritonealflüssigkeit auf die Zilien im humanen Eileiter zeigen, und Wessel et al. (2004) gelang es, eine inhibitorische Wirkung von Progesteron auf die Zilienaktivität im Eileiter des Rindes nachzuweisen. Mittels der von uns gewonnenen Ergebnisse war es jedoch nicht möglich, eine zyklus- bzw. trächtigkeitsabhängige Beeinflussung der Zilienaktivität im Eileiter der Maus aufzuzeigen. Eine hormonelle Regulation der Zilienaktivität kann damit im Eileiter der Maus nicht aufgezeigt werden. Dies korreliert mit den in der Histologie gewonnenen Ergebnissen, besonders der relativen Anzahl zilientragender Zellen, welche sich in der Ampulla während des Zyklus nicht verändert. Die Bedeutung der kontinuierlich hohen ziliären Aktivität in der Ampulla des Eileiters der Maus scheint damit in der ständigen Bereitschaft zu liegen, Eizellen aufzunehmen und in die tieferen Abschnitte des Eileiters zu transportieren. Zudem wird auf diese Weise eine regelmäßige Reinigung des Eileiters durch den Weitertransport der Eileiterflüssigkeit sichergestellt. Diese „Clearance-Funktion“ stellt eine wichtige Aufgabe dar, denn der Eileiter steht über den unteren weiblichen Geschlechtsapparat ständig mit der Umwelt in Kontakt und kann dadurch mit Partikeln verschiedener Herkunft in Berührung kommen. Warum ein signifikanter Anstieg der PTG vom Start- zum Endpunkt am Trächtigkeitstag 1 gegenüber den unverpaarten Tieren zu verzeichnen war, verbleibt ungeklärt. Es ist zu vermuten, dass die zilientragenden Zellen zu diesem Zeitpunkt wesentlich sensibler auf Veränderungen in ihrer Umwelt reagieren

und sie sich nach der Entnahme des Eileiters und dessen Präparation erst wieder regenerieren müssen, was den leichten Anstieg in der Messung der basalen PTG erklärt.

Im Gegensatz zu den Befunden des Eileiterepithels konnten wir eine leichte Zunahme der Kontraktion der Eileitermuskulatur in Abhängigkeit vom Zyklusstand beobachten. In beiden Abschnitten des Eileiters (Ampulla und Isthmus) waren zum Zeitpunkt des Östrus verstärkt Kontraktionen im Vergleich zu den anderen Zyklusstadien sichtbar. Die höchste Aktivität der Muskulatur, besonders im Bereich des Isthmus, konnten wir in den frühen Trächtigkeitstagen beobachten. Ein Vergleich der ersten beiden Trächtigkeitstage ließ weiterhin eine Steigerung der Kontraktionen von Tag 1 zu Tag 2 der Trächtigkeit erkennen. Aufgrund dieser Beobachtungen gehen wir davon aus, dass für den Transport der Eizelle im Eileiter der Maus hauptsächlich Kontraktionen der glatten Muskulatur, vor allem im Bereich des Isthmus verantwortlich sind. Boling und Blandau (1971) sowie Spilman et al. (1978) zeigten am Eileiter des Kaninchens, dass die Aktivität der Muskulatur hormonell reguliert wird und einen wesentlichen Anteil am Transport der Eizelle besitzt. So nahm die Intensität der sequenziellen Kontraktionen der Muskulatur im Eileiter zum Zeitpunkt der Ovulation zu (Boling und Blandau, 1971) und der Transport der Eizelle vom Ostium zum isthmo-ampullaren Übergang wurde signifikant beschleunigt. Weiterhin führt ein postovulatorischer Anstieg der Progesteronkonzentration nach Erkenntnissen von Spilman et al. (1978) zu einer Abnahme der Eileitermotilität, um den Eizellen eine Passage durch den Isthmus bis in den Uterus zu ermöglichen. Um den Transport von Eizellen und Embryonen weiter aufzuklären, sollten weitere Untersuchungen zur Regulation der Kontraktion der tubaren Muskulatur erfolgen.

Hormonelle Einflüsse in einer frühen Trächtigkeit auf die Aktivität von Zilien und Muskulatur wurden bereits in verschiedenen Studien diskutiert. Die Hauptauffassung ist, dass eine Trächtigkeit zu einer höheren Aktivität der Zilien bzw. der Muskulatur führt. Ortiz et al. (1986) war es möglich, eine Steigerung des Transportes von fertilisierten gegenüber nicht fertilisierten Eizellen im Eileiter des Hamsters darzustellen, wobei keine exakte Trennung von muskulärer bzw. ziliärer Aktivität unternommen wurde. Eine mögliche Beeinflussung zilientragender Zellen durch vom Embryo sezernierte Faktoren, wie z.B. PAF, wurde durch Hermoso et al. (2001) untersucht. Der Arbeitsgruppe gelang es, einen stimulierenden Effekt von PAF auf

zilientragende Eileiterepithelien nachzuweisen. Auch Velasquez et al. (1995) haben den Einfluss von PAF auf den Hamstereileiter untersucht. Sie wiesen einen deutlich schnelleren Transport von Eizellen durch Zufuhr von PAF auf, was zu der Vermutung führte, dass Embryonen über das von ihnen sekretierte PAF die Möglichkeit besitzen, ihre Transportrate selbst zu bestimmen. Es wird aber nicht erkenntlich, ob die Transportrate über die Zilien, die Muskulatur oder über beide Mechanismen erhöht wird. Anhand der von uns ermittelten Ergebnisse kann man für den Eileiter der Maus folgende Aussagen treffen: Da kein Unterschied in der PTG zwischen unverpaarten, zyklischen Tieren sowie Mäusen in der frühen Trächtigkeit (Tag 1 und Tag 2) besteht, kann nicht auf eine Regulation der Aktivität der Zilien durch vom Embryo sezernierte Faktoren geschlossen werden. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass der tubaren Muskulatur des Mäuseeileiters eine wesentlich größere Bedeutung für den Transport von Embryonen zu kommt als der ziliären Aktivität. Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass bei Präsenz von Eizellen oder Embryonen die peristaltischen Kontraktionen besonders im Bereich des Isthmus deutlich zunahmen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Transport von Eizellen als auch von Embryonen hauptsächlich durch die Kontraktilität der Muskulatur induziert zu sein scheint und dass die Aufgabe der zilientragenden Zellen in der Aufnahme der Eizellen und der Reinigung des Eileiters liegt. Anhaltspunkte dafür finden sich in: 1) der kräftigen Ausprägung der Muskulatur im Isthmus, welcher kaum zilientragende Zellen besitzt, 2) einer leicht erhöhten Kontraktilität der Muskulatur zum Zeitpunkt des Östrus, 3) der stetigen Zunahme der Kontraktilität in der frühen Trächtigkeit und 4) den stetig mit hoher Frequenz schlagenden Zilien.

Da die PTG in der Ampulla der Maus sehr hoch ist und diese durch Pharmaka wie ATP oder Serotonin nicht weiter stimuliert werden konnte, ist davon auszugehen, dass sie bereits ihren Maximalwert erreicht hat und sich kontinuierlich auf diesem hohen Niveau befindet. Gleiches trifft für die ZSF im Eileiter der Maus zu. Auch hier war von Beginn der Messung an eine kontinuierlich hohe ZSF zu verzeichnen, welche ebenfalls nicht weiter stimuliert werden konnte. Ein ähnliches Phänomen wiesen Delmotte und Sanderson (2006) in Lungenschnitten der kleinen Atemwege der Maus nach. In diesen wurde eine sehr hohe basale ZSF (20-25 Hz) gemessen, welche sich nicht durch ATP stimulieren ließ. Delmotte und Sanderson (2006) vermuteten, dass dies Voraussetzungen für eine zuverlässige und fortwährende

mukoziliäre Clearance zum Schutz der Lunge sind. Dementsprechend scheinen die zilientragenden Zellen im Eileiter der Maus eine ebenso wichtige Funktion im Rahmen der Abwehr von Fremdstoffen oder Schmutzpartikeln zu besitzen. Im Gegensatz dazu steht die ziliäre Aktivität von trachealen Epithelzellen. Wie aus unseren Ergebnissen ersichtlich, schlagen diese nicht an der Grenze ihres Leistungsvermögens und können so mittels ATP stimuliert werden. Durch eine Stimulation ist es diesen Zilien möglich eine PTG bzw. eine ZSF zu erreichen, welche der basalen ziliären Aktivität des Eileiterepithels entspricht. Interessant dabei ist, dass zilientragende Zellen in der Trachea der Maus, die gleiche Anzahl Zilien (250-300) auf der Zelloberfläche wie im Eileiter aufweisen, aber im Gegensatz dazu nur 38,7% der gesamte Zellpopulation ausmachen (Woodworth et al. 2007). Dies könnte vermuten lassen, dass die trachealen Zilien mit einer wesentlich stärkeren Kraft als die des Eileiters schlagen müssen, um eine gleichwertige PTG erzeugen zu können. Hussong et al. (2008) haben mittels  $\mu$ PIV (Micro Particle Imaging Velocimetry) Messungen an der Trachea der Maus Änderungen der lokalen Strömungsrichtung und -geschwindigkeit sowie der PTG gemessen, um auf mögliche Änderungen des Zilienschlages schließen zu können. Anstelle der angenommenen Veränderung der Schlagkraft und der dadurch induzierten Erhöhung der PTG konnten sie zeigen, dass durch eine Ausrichtung zilientragender Zellen in der Hauptströmungsrichtung hintereinander eine räumlich begrenzte Geschwindigkeitszunahme hervorgerufen wird. Das bedeutet, dass ab einer bestimmten Anzahl an hintereinander organisierten zilientragenden Zellen keine weitere Geschwindigkeitszunahme der Partikel erreicht werden kann. Somit besitzt der Eileiter zwar eine höhere relative Anzahl an zilientragenden Zellen, diese sind in der Trachea jedoch so verteilt und organisiert, dass dort eine maximale PTG erlangt werden kann, ohne eine Änderung der Schlagkraft der Zilien zu benötigen. Da im Eileiter folglich eine geringere Anzahl an zilientragenden Zellen ausreichen würde, um die gleiche basale PTG zu erreichen, ist anzunehmen, dass die hohe Anzahl einen ausreichenden Kontakt mit den Eizellen bzw. Embryonen sichert. Ob die Zilien des Eileiters jedoch prinzipiell die Fähigkeit besitzen, ihre Schlagkraft zu ändern, sollte mit Hilfe des von uns genutzten videomikroskopischen Systems unter Veränderung der Viskosität des genutzten Mediums, weiterführend untersucht werden.

Die Ursache der in unseren Versuchen durch ATP induzierten Senkung der PTG auf circa 92% der Basisgeschwindigkeit sowie der ZSF auf circa 96% der Basisfrequenz konnte noch nicht genau geklärt werden. Da ATP über  $P_{2Y}$ -Rezeptoren eine Signalkaskade auslöst, die zu einer Erhöhung intrazellulären  $Ca^{2+}$  führt (Tarasiuk et al. 1995), ist anzunehmen, dass es infolge eines möglichen Mehrverbrauchs zu einer Depletion der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speicher kommt, die jedoch innerhalb weniger min durch extrazelluläres  $Ca^{2+}$  wieder aufgefüllt werden können. Solch eine Depletion der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speicher konnten Tarasiuk et al. (1995) durch eine Exposition der zilienträgenden Zellen des Froschösophagus gegenüber Thapsigargin nachweisen. Infolge dessen wurde die zuvor durch ATP induzierte Steigerung der ZSF verringert. Deshalb gehen Tarasiuk et al. (1995), im Gegensatz zu Villalon et al. (1989), die eine Erhöhung des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegels, hervorgerufen durch extrazelluläres ATP, primär in der Öffnung von  $Ca^{2+}$ -Kanälen sehen, davon aus, dass ATP eher eine Mobilisation der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speicher bewirkt. Warum die Zugabe von Serotonin, wie z.B. durch Nguyen et al. (2001) an Ependymzellen gezeigt, keine Wirkung auf die PTG oder die ZSF besitzt, verbleibt ungeklärt. Entweder besitzt Serotonin keine regulatorische Funktion über die ziliäre Aktivität im Eileiter der Maus, oder aber die Hypothese, dass die Zilien im Eileiter der Maus beständig auf ihrem höchsten Niveau schlagen, wird erneut bestätigt.

Der Einfluss des cholinergen Systems, sowohl neuronal als auch non-neuronal, auf die ziliäre Aktivität im Eileiter wurde im Gegensatz zu anderen ziliären Systemen bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht untersucht. Da im Eileiter der Maus keine cholinergen Nervenfasern nachgewiesen werden konnten (Wolff et al. 2008), lag der Fokus unserer Arbeit auf der Beeinflussung des Zilienschlages durch das non-neuronale cholinerge System. Weiterhin haben wir uns in unseren Analysen ausschließlich auf die akute Wirkung von Agonisten und Antagonisten des cholinergen Systems auf die ziliäre Aktivität im Eileiter konzentriert. Der Mangel an Agonisten bzw. Antagonisten mit einer hohen Selektivität für einen mAChR Subtypen und die Gegebenheit, dass in den meisten Zellen verschiedene Subtypen koexprimiert werden (Caulfield und Birdsall, 1998), veranlasste uns für die videomikroskopischen Analysen mAChR Knockout Mäuse zu verwenden. Auf diese Weise bestand die Möglichkeit, den Einfluss des einzelnen Rezeptor-Subtypen auf den Zilienschlag zu untersuchen.

In vorangegangenen Studien zum Einfluss von Komponenten des cholinergen Systems auf die ziliäre Aktivität in der Trachea wurde ACh eine regulatorische Funktion zugeschrieben (Sastry und Sadavongvivad, 1978). Dieses führte in der Trachea des Kaninchens wie auch der des Menschen zu einer Stimulation der Zilienaktivität, welche im Anschluss durch Atropin gehemmt werden konnte (Sastry und Sadavongvivad, 1978). Ähnliche Beobachtungen wurden durch Salathe et al. (1997) an kultivierten zilientragenden, trachealen Zellen des Schafes gemacht. Auch hier reagierten die Zilien mit einer Erhöhung der ZSF auf ACh, welche durch Atropin geblockt werden konnte. Interessanterweise bewirkten Agonisten an den nAChR keine Veränderung der Zilienschlagfrequenz. Entgegen bisherigen Annahmen, dass Nikotin zu einer Senkung der ZSF führt, wiesen Hahn et al. (1992) eine stimulierende Wirkung von Nikotin auf die zilientragenden Zellen der Trachea von Frettchen nach. Die ACh vermittelte Stimulation der ZSF wird nach Angaben von Salathe et al. (1997) und Zaghoory et al. (2001) vorzugsweise über M1- und M3- oder nur über M3-Rezeptoren vermittelt. Klein et al. (2009) konnten durch Messungen der PTG und der ZSF an den Luftröhren von mAChR Knockout Mäusen eine regulatorische Wirkung der M3-Untereinheit auf die ziliäre Aktivität nachweisen, wohingegen der M2-Rezeptor den durch die Zilien geförderten Partikeltransport hemmt. Diese Ergebnisse anderer Studien können am zilientragenden Eileiterepithel der Maus nicht nachvollzogen werden. Weder Agonisten noch Antagonisten bzw. das Fehlen der muskarinergen Rezeptoren wiesen eine Wirkung auf die ziliäre Aktivität auf, so dass eine Regulation des Zilienschlages durch muskarinerge Rezeptoren ausgeschlossen werden kann. Auffällig war hingegen, dass nach Gabe aller verwendeten Agonisten eine verstärkte Kontraktion der Muskulatur einsetzte. Nach Angaben von Jankovic et al. (2004) ist ACh eine der wichtigsten Regelgrößen für die Intensität der muskulären Kontraktion von Ampulla und Isthmus im humanen Eileiter. Entsprechend ihren Untersuchungen kommt dabei dem M3-Rezeptor eine besondere Bedeutung zu. Ähnliche Befunde konnten an der glatten Muskulatur der Trachea des Pferdes sowie dem Gastrointestinaltrakt des Meerschweinchens (Yu et al. 1992; Eglén 2006) erhoben werden. Damit scheint zwar dem non-neuronalen cholinergen System im Eileiter der Maus keine Bedeutung für die Regulation des Zilienschlages zu zukommen, dafür aber umso mehr für die Kontraktion der Muskulatur. Dass die Muskulatur des Eileiters der Maus auch auf Agonisten des cholinergen Systems zu reagiert, weist zusätzlich darauf hin, dass diese selbst stark reguliert wird und für den



Transport von Eizellen oder Embryonen eine größere Bedeutung besitzt als die ziliäre Aktivität. Ob die Muskulatur des Eileiters der Maus tatsächlich der Kontrolle des cholinergen Systems unterliegt, kann anhand unserer ausschließlich visuellen Beurteilung nicht geklärt werden. Dazu sollten Untersuchungen zur Beeinflussung der Kontraktion, z.B. unter Verwendung der Videomorphometrie, durchgeführt werden. Die Zunahme der basalen PTG von Start- zu Endpunkt bei M3-Knockout-Mäusen ist auf die sichtlich veränderten Gewebestruktur bei diesem Stamm und der dadurch entstehenden Sensibilität gegenüber Veränderungen des Umfeldes zurückzuführen.

Mit Hilfe der gewonnenen Ergebnisse wird deutlich, dass der Eileiter der Maus im Vergleich zu anderen Spezies morphologisch und funktionell beträchtliche Unterschiede aufweist. Demzufolge ist es schwer, Rückschlüsse auf eine verminderte Fertilität oder extrauterine Graviditäten bei Frauen, die durch Rauchen verursacht werden, zu ziehen. Um diesem Phänomen weiter auf den Grund zu gehen, sollten Versuche an Eileitern von Tieren unternommen werden, die eine ähnliche Morphologie und hormonelle Regulation besitzen. Solange allerdings keine adäquaten selektiven Agonisten bzw. Antagonisten für die zu untersuchenden Rezeptoren vorhanden sind, besteht die effizienteste Möglichkeit in der Nutzung von gendefizienten Tieren. Da die Bestandteile des Rauches eine hohe Halbwertszeit besitzen und lange im Organismus verbleiben, treten Fertilitätsprobleme vor allem bei Langzeitraucherinnen auf. Da wir ausschließlich die akute Wirkung cholinergischer Pharmaka auf den Eileiter untersucht haben, sollten Folgeuntersuchungen vorgenommen werden, die die chronische Wirkung cholinergischer Pharmaka prüft.



## 6 Zusammenfassung

Der Einfluss des cholinergen Systems auf die ziliäre Aktivität ist bereits an zilientragenden Epithelien der Trachea bzw. der Lunge eingehend untersucht worden. Im Gegensatz dazu ist nichts über eine regulatorische Funktion des cholinergen Systems auf die Zilien des Eileiterepithels bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, einen Einfluss des cholinergen Systems auf die Zilienaktivität des Eileiters, besonders im Hinblick auf mögliche Auswirkungen auf den tubaren Transport, zu untersuchen. Da bis heute keine hoch selektiven Agonisten bzw. Antagonisten für die cholinergen Rezeptoren (mAChR und nAChR) bekannt sind, haben wir unsere funktionellen Studien an Muskarinrezeptor-Knockout-Mäusen der Untereinheiten M1, M3, M4 und M5 sowie an deren korrespondierenden C57Bl6 Wildtyp-Mäusen (verpaart und unverpaart) durchgeführt. Insgesamt wurden 107 Wildtyp- und 5 M1<sup>-/-</sup>, 4 M3<sup>-/-</sup>, 4 M4<sup>-/-</sup> sowie 5 M5<sup>-/-</sup> Mäuse untersucht. Die Funktionalität der Zilien wurde anhand eines neu etablierten digitalen videomikroskopischen Systems durch Messung der Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG) sowie der Zilienschlagfrequenz (ZSF) unter Verwendung der Substanzen ATP, Serotonin, Muskarinchlorid, Atropinsulfat und ACh untersucht. Der Vorteil des videomikroskopischen Analysesystems liegt in der Aufrechterhaltung des natürlichen Gewebeverbandes, so dass die Versuche unter Bedingungen durchgeführt werden konnten, die denen in vivo stark ähneln. Vergleichend zu der ziliären Aktivität im Eileiter wurden die PTG und die ZSF von Tracheaprobeen bestimmt. Korrelierend zu den funktionellen Untersuchungen wurden histomorphologische und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen in Abhängigkeit vom Zyklusstand und einer frühen Trächtigkeit durchgeführt. Der Eileiter der Maus weist segmentabhängig deutliche morphologische Unterschiede auf. So kann die Ampulla anhand der dominanten Anzahl an zilientragende Zellen, Longitudinalfalten und einer weniger stark ausgeprägten glatten Muskulatur leicht vom Isthmus, der durch eine sehr geringe Anzahl an zilientragenden Zellen, Quersfalten und eine stark ausgeprägte glatte Muskulatur gekennzeichnet ist, unterschieden werden. Veränderungen der epithelialen Zusammensetzung und der sekretorischen Aktivität sind in Abhängigkeit des Zyklusstadiums bzw. einer frühen Trächtigkeit sehr gering. Die Anzahl zilientragender Zellen in der Ampulla ist während des Zyklus konstant und verringert sich signifikant an den ersten beiden Trächtigkeitstagen. Im Isthmus ist diese zyklusabhängig, mit einer erhöhten Anzahl im Östrus, jedoch

trächtigkeitsunabhängig. Der Eileiter befindet sich, im Gegensatz zu dem der Haussäugetiere, zu keinem Zeitpunkt (Zyklus oder Trächtigkeit) in einer Ruhephase. Neutrale und saure Mukopolysaccharide können in allen Zyklusstadien und Trächtigkeitstagen nachgewiesen werden. Im Proöstrus wird nur eine geringe Menge an Mukopolysacchariden synthetisiert. Im Östrus wird im Bereich des Isthmus die höchste Menge an sauren Mukopolysacchariden nachgewiesen, im Metöstrus die geringste. Metöstrus, Diöstrus, Tag 1 und Tag 2 einer Trächtigkeit sind durch ein erhöhtes Auftreten von Stiftchenzellen in der Ampulla und durch stets apikal sowie intrazytoplasmatisch PAS- und Alcianblau-positives Material gekennzeichnet. Entsprechend der geringgradigen Veränderungen der Zellmorphologie während des Zyklus und der frühen Trächtigkeit kann in der Ampulla eine zyklus- und trächtigkeitsunabhängige sehr hohe basale PTG bestimmt werden, wohingegen im isoliertem Isthmus kein Partikeltransport stattfindet. Weiterhin besteht kein Unterschied zwischen den PTG von Wildtyp- und Muskarinrezeptor-Knockout-Mäusen. Dies deutet darauf hin, dass die basale ziliäre Aktivität des Eileiters der Maus weder hormonell noch durch das cholinerge System reguliert wird. Eine Veränderung der Zilienaktivität wird sowohl bei den Wildtyp- als auch bei den Muskarinrezeptor-Knockout-Mäusen ausschließlich durch die Zugabe von ATP erreicht. Dies spiegelt sich in einer geringen Senkung der PTG bzw. der ZSF wider. Da weder eine Veränderung der Zilienaktivität durch eine Gendefizienz bzw. durch die Zugabe von Agonisten bzw. Antagonisten des cholinergen Systems hervorgerufen werden kann, besitzt das cholinerge System keinen Einfluss auf die Zilienfunktion im Eileiter der Maus. Ein Vergleich der ziliären Aktivität von Eileiter und Trachea zeigt, dass die Zilien im Eileiter im Gegensatz zu denen der Trachea kontinuierlich auf einem hohen Niveau schlagen und nicht weiter stimuliert werden können. Im Gegensatz dazu können Zilien der Trachea ihre Schlagfrequenz unter ATP-Einfluss so erhöhen, dass diese der basalen ZSF im Eileiter entspricht und dadurch die basale PTG des Eileiters erreichen.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit vorgenommenen strukturellen und funktionellen Charakterisierung des Eileiters der Maus konnte gezeigt werden, dass die PTG und die ZSF auf zyklus- und trächtigkeitsunabhängig hohem Niveau verbleiben und somit eine effektive mukoziliäre Clearance des Eileiters gewährleisten. Im Hinblick auf den Gameten- und Embryonentransport spielt die ziliäre Aktivität gegenüber den Kontraktionen der glatten Muskulatur jedoch lediglich eine untergeordnete Rolle.

## 7 Summary

The influence of the cholinergic system on ciliary activity has extensively been studied in the ciliated cells of the trachea and the lung. Contrary the role of the cholinergic system on ciliary activity of the oviductal epithelium is unknown. Therefore, the aim of our study was to analyse the influence of the cholinergic system on ciliary activity and tubal transport. As highly selective cholinergic receptor (mAChR and nAChR) agonists and antagonists do not exist we utilized muscarinic receptor knockout mice (M1<sup>-/-</sup>, M3<sup>-/-</sup>, M4<sup>-/-</sup> and M5<sup>-/-</sup>) as well as the corresponding C57Bl6 wildtype mice (pregnant and non pregnant). In total, a number of 107 C57Bl6 mice and 5 M1<sup>-/-</sup>, 4 M3<sup>-/-</sup>, 4 M4<sup>-/-</sup> and 5 M5<sup>-/-</sup> mice were investigated. Functional analyses of ciliary activity were performed measuring PTS (particle transport speed) and CBF (ciliary beat frequency) using substances such as ATP, 5-hydroxytryptamine, muscarine chloride, atropine sulphate and Ach. For these studies, a newly established digital videomicroscopic analysis system was used, which allows to investigate PTS and CBF near in vivo conditions. Furthermore, ciliary activity of the oviduct was compared to that of the trachea. Additionally, histomorphological and scanning electron microscopic studies at all cyclic stages and the early days of pregnancy were performed and the results were correlated to the results of the functional experiments. Our studies revealed that the mouse oviduct shows distinct morphological differences depending on the segment. The ampulla is characterized by a dominant number of ciliated cells, longitudinal folds and few layers of smooth muscle cells. Contrary the isthmus shows only a few ciliated cells, circular folds and a distinct thick smooth muscle layer. Merely small changes of the epithelial composition and secretory activity occur during the different cyclic stages and the first two days of pregnancy. While the number of ciliated cells in the ampulla is constant during all cyclic stages, there is a significant decrease in the number of ciliated cells in the course of the first 2 days of pregnancy. Contrary in the isthmus the number of ciliated cells depends on the cyclic stage with the highest number occurring at oestrus. However, during pregnancy the number of ciliated cells stays constant. Contrary to other domestic species the mouse oviduct is never in a state of rest. Neutral and acidic mucopolysaccharides are detected during all cyclic stages and during the first days of pregnancy. At prooestrus the lowest amount of mucopolysaccharides is synthesized. The highest abundance of acidic mucopolysaccharides is detected in the isthmus at oestrus, while the lowest one is at

metoestrus. Metoestrus, dioestrus as well as day 1 and 2 of pregnancy are characterized by the incidence of slim and emptied secretory cells in the ampulla as well as by PAS- and alcianblue-positive material located in the intracytoplasmatic and apical region. According to the few morphological changes during the cycle and in the course of early pregnancy the basal PTS is maintained at a high level in the ampulla, independent of cyclic stage or early pregnancy. Contrary there nearly is no particle transport in the isolated isthmus. Furthermore, there is no difference of the basal PTS between the wildtype- and muscarinic receptor knockout mice pointing to the fact that the basal ciliary activity in the mouse oviduct is regulated neither hormonally nor by the non-neuronal cholinergic system. Ciliary activity of wildtype- and muscarinic receptor knockout-mice is only altered by ATP, which leads to a decrease of PTS and ZSF. These results show that neither a gene deficiency nor the addition of agonist and antagonists of the cholinergic system influences ciliary beating, which implies that the cholinergic system does not regulate ciliary activity in the mouse oviduct. The comparison of the ciliary activity of the oviduct (ampulla) and the trachea demonstrates that the beating of oviductal cilia is maintained at a high level and can not be further stimulated by addition of ATP. Contrary tracheal cilia beat at a low level but can be stimulated by ATP up to the basal beating level of the oviductal cilia.

The structural and functional characterization of the mouse oviduct demonstrate that the PTS and the CBF are maintained on a high level independent on cyclic stage or an early pregnancy thus providing an effective mucociliary clearance of the oviduct. With regard to the transport of gametes and embryos the ciliary activity plays a less important role as compared to smooth muscle contraction.

## 8 Literaturverzeichnis

- ABE H & HOSHI H. (2007). Regional and cyclic variations in the ultrastructural features of secretory cells in the oviductal epithelium of the Chinese Meishan pig. *Reprod Domest Anim* 42, 292-298.
- ABE H & OIKAWA T. (1993). Observations by scanning electron microscopy of oviductal epithelial cells from cows at follicular and luteal phases. *Anat Rec* 235, 399-410.
- ABE H, ONODERA M, SUGAWARA S, SATOH T & 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.
- AFZELIUS BA, CAMNER P & MOSSBERG B. (1978). On the function of cilia in the female reproductive tract. *Fertil Steril* 29, 72-74.
- AIELLO E & SLEIGH MA. (1972). The metachronal wave of lateral cilia of *Mytilus edulis*. *J Cell Biol* 54, 493-506.
- ANDERSON AA, USHAKOV DS, FERENCZI MA, MORI R, MARTIN P & SAFFELL JL. (2008). Morphoregulation by acetylcholinesterase in fibroblasts and astrocytes. *J Cell Physiol* 215, 82-100.
- ANDERSON RG. (1972). The three-dimensional structure of the basal body from the rhesus monkey oviduct. *J Cell Biol* 54, 246-265.
- ANDRADE YN, FERNANDES J, VAZQUEZ E, FERNANDEZ-FERNANDEZ JM, ARNIGES M, SANCHEZ TM, VILLALON M & VALVERDE MA. (2005). TRPV4 channel is involved in the coupling of fluid viscosity changes to epithelial ciliary activity. *J Cell Biol* 168, 869-874.
- ARIAS HR. (2000). Localization of agonist and competitive antagonist binding sites on nicotinic acetylcholine receptors. *Neurochem Int* 36, 595-645.
- AVLANI VA, GREGORY KJ, MORTON CJ, PARKER MW, SEXTON PM & CHRISTOPOULOS A. (2007). Critical role for the second extracellular loop in the binding of both orthosteric and allosteric G protein-coupled receptor ligands. *J Biol Chem* 282, 25677-25686.
- BAUR R. (1969). Zur Schätzung des kleinsten zulässigen Stichprobenumfanges für stereologische Messungen an histologischen Schnitten. *Experientia* 25, 554-555.
- BEDFORD JM, MOCK OB & PHILLIPS DM. (1997). Unusual ampullary sperm crypts, and behavior and role of the cumulus oophorus, in the oviduct of the least shrew, *Cryptotis parva*. *Biol Reprod* 56, 1255-1267.
- BENOWITZ NL. (1996). Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36, 597-613.

- BENOWITZ NL. (2008). Clinical pharmacology of nicotine: implications for understanding, preventing, and treating tobacco addiction. *Clin Pharmacol Ther* 83, 531-541.
- BLAKE JR, VANN PG & WINET H. (1983). A model of ovum transport. *J Theor Biol* 102, 145-166.
- BODKHE RR & HARPER MJ. (1972). Changes in the amount of adrenergic neurotransmitter in the genital tract of untreated rabbits, and rabbits given reserpine or proniazid during the time of egg transport. *Biol Reprod* 6, 288-299.
- BOLING JL & BLANDAU RJ. (1971). Egg transport through the ampullae of the oviducts of rabbits under various experimental conditions. *Biol Reprod* 4, 174-184.
- BOURDAGE RJ & HALBERT SA. (1984). Quantification of intraluminal motion of surrogate ova in the rabbit oviductal isthmus. *Biol Reprod* 30, 1124-1129.
- BROWER LK & ANDERSON E. (1969). Cytological events associated with the secretory process in the rabbit oviduct. *Biol Reprod* 1, 130-148.
- CAULFIELD MP. (1993). Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* 58, 319-379.
- CAULFIELD MP & BIRDSALL NJ. (1998). International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 50, 279-290.
- COSSON J. (1996). A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. *Cell Biol Int* 20, 83-94.
- CROXATTO HB. (2002). Physiology of gamete and embryo transport through the fallopian tube. *Reprod Biomed Online* 4, 160-169.
- DANI JA & BERTRAND D. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47, 699-729.
- DARVESH S, HOPKINS DA & GEULA C. (2003). Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat Rev Neurosci* 4, 131-138.
- DELMOTTE P & SANDERSON MJ. (2006). Ciliary beat frequency is maintained at a maximal rate in the small airways of mouse lung slices. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35, 110-117.
- DIRKSEN ER. (1971). Centriole morphogenesis in developing ciliated epithelium of the mouse oviduct. *J Cell Biol* 51, 286-302.
- DIRKSEN ER. (1974). Ciliogenesis in the mouse oviduct. A scanning electron microscope study. *J Cell Biol* 62, 899-904.



- DONNEZ J, CASANAS-ROUX F, CAPRASSE J, FERIN J & THOMAS K. (1985). Cyclic changes in ciliation, cell height, and mitotic activity in human tubal epithelium during reproductive life. *Fertil Steril* 43, 554-559.
- DORAN SA, KOSS R, TRAN CH, CHRISTOPHER KJ, GALLIN WJ & GOLDBERG JI. (2004). Effect of serotonin on ciliary beating and intracellular calcium concentration in identified populations of embryonic ciliary cells. *J Exp Biol* 207, 1415-1429.
- DUNANT Y. (1994). Hormones and neurotransmitters release: four mechanisms of secretion. *Cell Biol Int* 18, 327-336.
- DUNCAN G & COLLISON DJ. (2003). Role of the non-neuronal cholinergic system in the eye: a review. *Life Sci* 72, 2013-2019.
- DUSTIN P. (1984). *Microtubules*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo, Chapter 4.4, 146-154.
- EGLÉN RM. (2006). Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Auton Autacoid Pharmacol* 26, 219-233.
- ELEY L, YATES LM & GOODSHIP JA. (2005). Cilia and disease. *Curr Opin Genet Dev* 15, 308-314.
- EURELL & FRAPPIER. (2006). *Dellmans Textbook of Veterinary Histology*. Lippincott Williams and Wilkins, Chapter 13, 262-265.
- FUJII T, OKUDA T, HAGA T & KAWASHIMA K. (2003). Detection of the high-affinity choline transporter in the MOLT-3 human leukemic T-cell line. *Life Sci* 72, 2131-2134.
- FUJII T, TAKADA-TAKATORI Y & KAWASHIMA K. (2008). Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of an independent, non-neuronal cholinergic system in lymphocytes and its clinical significance in immunotherapy. *J Pharmacol Sci* 106, 186-192.
- GADDUM-ROSSE P & BLANDAU RJ. (1976). Comparative observations on ciliary currents in mammalian oviducts. *Biol Reprod* 14, 605-609.
- GAHRING LC & ROGERS SW. (2005). Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells. *Aaps J* 7, E885-894.
- GHEBER L, KORNGREEN A & PRIEL Z. (1998). Effect of viscosity on metachrony in mucus propelling cilia. *Cell Motil Cytoskeleton* 39, 9-20.
- GIBBONS IR. (1981). Cilia and flagella of eukaryotes. *J Cell Biol* 91, 107s-124s.
- GILULA NB & SATIR P. (1972). The ciliary necklace. A ciliary membrane specialization. *J Cell Biol* 53, 494-509.
- GOTTI C & CLEMENTI F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* 74, 363-396.

- GRIMSHOLM O, RANTAPAA-DAHLQVIST S, DALEN T & FORSGREN S. (2008). Unexpected finding of a marked non-neuronal cholinergic system in human knee joint synovial tissue. *Neurosci Lett* 442, 128-133.
- GUERON S & LEVIT-GUREVICH K. (1999). Energetic considerations of ciliary beating and the advantage of metachronal coordination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12240-12245.
- GUERON S, LEVIT-GUREVICH K, LIRON N & BLUM JJ. (1997). Cilia internal mechanism and metachronal coordination as the result of hydrodynamical coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6001-6006.
- GUIRAO B & JOANNY JF. (2007). Spontaneous creation of macroscopic flow and metachronal waves in an array of cilia. *Biophys J* 92, 1900-1917.
- HAHN HL, KLEINSCHROT D & HANSEN D. (1992). Nicotine increases ciliary beat frequency by a direct effect on respiratory cilia. *Clin Investig* 70, 244-251.
- HALBERT SA, BECKER DR & SZAL SE. (1989). Ovum transport in the rat oviductal ampulla in the absence of muscle contractility. *Biol Reprod* 40, 1131-1136.
- HALBERT SA, PATTON DL, ZARUTSKIE PW & SOULES MR. (1997). Function and structure of cilia in the fallopian tube of an infertile woman with Kartagener's syndrome. *Hum Reprod* 12, 55-58.
- HAMM HE. (1998). The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* 273, 669-672.
- HANNA-MITCHELL AT, BECKEL JM, BARBADORA S, KANAI AJ, DE GROAT WC & BIRDER LA. (2007). Non-neuronal acetylcholine and urinary bladder urothelium. *Life Sci* 80, 2298-2302.
- HERMOSO M, BARRERA N, MORALES B, PEREZ S & VILLALON M. (2001). Platelet activating factor increases ciliary activity in the hamster oviduct through epithelial production of prostaglandin E2. *Pflugers Arch* 442, 336-345.
- HOLWILL ME, COHEN HJ & SATIR P. (1979). A sliding microtubule model incorporating axonemal twist and compatible with three-dimensional ciliary bending. *J Exp Biol* 78, 265-280.
- HOSEY MM. (1992). Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors. *Faseb J* 6, 845-852.
- HULME EC, BIRDSALL NJ & BUCKLEY NJ. (1990). Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30, 633-673.
- HULTEN F, TANTASUPARUK W, ENGLUND P, KINDAHL H & EINARSSON S. (2000). The influence of inhibited prostaglandin biosynthesis on post-ovulatory oviductal ova transport in sows. *Theriogenology* 53, 1397-1405.

- HUSSONG J, FAULHAMMER P, NOREIKAT K, KUMMER W, SHARP KV & R L. (2008). In vivo  $\mu$ PIV Messungen an Zilien in Mäuseluftröhren. In *Fachtagung "Lasermethoden in der Strömungsmesstechnik"*, Karlsruhe.
- JANKOVIC SM, PROTIC BA & JANKOVIC SV. (2004). Contractile effect of acetylcholine on isolated ampullar segment of Fallopian tubes. *Pharmacol Res* 49, 31-35.
- JANKOVIC SM, PROTIC BA & JANKOVIC SV. (2004). Contractile effect of acetylcholine on isolated isthmic segment of fallopian tubes. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 26, 87-91.
- JANSEN RP & BAJPAI VK. (1982). Oviduct acid mucus glycoproteins in the estrous rabbit: ultrastructure and histochemistry. *Biol Reprod* 26, 155-168.
- JUNG S. (1962). *Grundlagen für die Zucht und Haltung der wichtigsten Versuchstiere*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Kapitel: Maus, 238-239.
- KALAMIDA D, POULAS K, AVRAMOPOULOU V, FOSTIERI E, LAGOUMINTZIS G, LAZARIDIS K, SIDERI A, ZOURIDAKIS M & TZARTOS SJ. (2007). Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. *Febs J* 274, 3799-3845.
- KENNGOTT RA, NEUMULLER C & SINOWATZ F. (2008). Prenatal Differentiation of Bovine Oviductal Epithelium: An Electron Microscopic Study. *Anat Histol Embryol* 37, 418-26.
- KILGOUR E, RANKIN N, RYAN S & PACK R. (2004). Mucociliary function deteriorates in the clinical range of inspired air temperature and humidity. *Intensive Care Med* 30, 1491-1494.
- KIM CH, SEO BB, YAMANOUCHI K, KUROMARU M, SAWASAKI T, HINSCH E, HINSCH KD, NAITO K, TACHI C & TOJO H. (2002). Essential role of ZP molecules in tubal transport of embryos in mice. *Mol Reprod Dev* 61, 327-334.
- KIRKPATRICK CJ, BITTINGER F, UNGER RE, KRIEGSMANN J, KILBINGER H & WESSLER I. (2001). The non-neuronal cholinergic system in the endothelium: evidence and possible pathobiological significance. *Jpn J Pharmacol* 85, 24-28.
- KLAPPROTH H, REINHEIMER T, METZEN J, MUNCH M, BITTINGER F, KIRKPATRICK CJ, HOHLE KD, SCHEMANN M, RACKE K & WESSLER I. (1997). Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 355, 515-523.
- KLEIN MK, HABERBERGER RV, HARTMANN P, FAULHAMMER P, LIPS KS, KRAIN B, WESS J, KUMMER W & KONIG P. (2009). Muscarinic receptor subtypes in cilia-driven transport and airway epithelial development. *Eur Respir J* 33, 1113-1121.
- KOEPSSELL H, LIPS K & VOLK C. (2007). Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res* 24, 1227-1251.

- KORDIK P, BULBRING E & BURN JH. (1952). Ciliary movement and acetylcholine. *Br J Pharmacol Chemother* 7, 67-79.
- KRESS A & MORSON G. (2007). Changes in the oviducal epithelium during the estrous cycle in the marsupial *Monodelphis domestica*. *J Anat* 211, 503-517.
- KUMMER W, LIPS KS & PFEIL U. (2008). The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochem Cell Biol* 130, 219-234.
- KURZEN H, WESSLER I, KIRKPATRICK CJ, KAWASHIMA K & GRANDO SA. (2007). The non-neuronal cholinergic system of human skin. *Horm Metab Res* 39, 125-135.
- LAM X, GIESEKE C, KNOLL M & TALBOT P. (2000). Assay and importance of adhesive interaction between hamster (*Mesocricetus auratus*) oocyte-cumulus complexes and the oviducal epithelium. *Biol Reprod* 62, 579-588.
- LEESE HJ, TAY JI, REISCHL J & DOWNING SJ. (2001). Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction* 121, 339-346.
- LEFEBVRE R, CHENOWETH PJ, DROST M, LECLEAR CT, MACCUBBIN M, DUTTON JT & SUAREZ SS. (1995). Characterization of the oviducal sperm reservoir in cattle. *Biol Reprod* 53, 1066-1074.
- LENG Z, MOORE DE, MUELLER BA, CRITCHLOW CW, PATTON DL, HALBERT SA & WANG SP. (1998). Characterization of ciliary activity in distal Fallopian tube biopsies of women with obstructive tubal infertility. *Hum Reprod* 13, 3121-3127.
- LI JH, HAN SJ, HAMDAN FF, KIM SK, JACOBSON KA, BLOODWORTH LM, ZHANG X & WESS J. (2007). Distinct structural changes in a G protein-coupled receptor caused by different classes of agonist ligands. *J Biol Chem* 282, 26284-26293.
- LIEBICH H-G. (2004). *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere*. Schattauer. Kapitel 14, 303-304.
- LIPS KS, LUHRMANN A, TSCHERNIG T, STOEGER T, ALESSANDRINI F, GRAU V, HABERBERGER RV, KOEPESELL H, PABST R & KUMMER W. (2007). Down-regulation of the non-neuronal acetylcholine synthesis and release machinery in acute allergic airway inflammation of rat and mouse. *Life Sci* 80, 2263-2269.
- LIPS KS, VOLK C, SCHMITT BM, PFEIL U, ARNDT P, MISKA D, ERMERT L, KUMMER W & KOEPESELL H. (2005). Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33, 79-88.
- LIPS KS, WUNSCH J, ZARGHOONI S, BSCHLEIPFER T, SCHUKOWSKI K, WEIDNER W, WESSLER I, SCHWANTES U, KOEPESELL H & KUMMER W. (2007). Acetylcholine and molecular components of its synthesis and release machinery in the urothelium. *Eur Urol* 51, 1042-1053.

- LUKAS RJ, CHANGEUX JP, LE NOVERE N, ALBUQUERQUE EX, BALFOUR DJ, BERG DK, BERTRAND D, CHIAPPINELLI VA, CLARKE PB, COLLINS AC, DANI JA, GRADY SR, KELLAR KJ, LINDSTROM JM, MARKS MJ, QUIK M, TAYLOR PW & WONNACOTT S. (1999). International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 51, 397-401.
- LYONS RA, DJAHANBAKHCH O, MAHMOOD T, SARIDOGAN E, SATTAR S, SHEAFF MT, NAFTALIN AA & CHENOY R. (2002). Fallopian tube ciliary beat frequency in relation to the stage of menstrual cycle and anatomical site. *Hum Reprod* 17, 584-588.
- LYONS RA, SARIDOGAN E & DJAHANBAKHCH O. (2006). The effect of ovarian follicular fluid and peritoneal fluid on Fallopian tube ciliary beat frequency. *Hum Reprod* 21, 52-56.
- LYONS RA, SARIDOGAN E & DJAHANBAKHCH O. (2006). The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Hum Reprod Update* 12, 363-372.
- MAHMOOD T, SARIDOGAN E, SMUTNA S, HABIB AM & DJAHANBAKHCH O. (1998). The effect of ovarian steroids on epithelial ciliary beat frequency in the human Fallopian tube. *Hum Reprod* 13, 2991-2994.
- MALO M & ISRAEL M. (2003). Expression of the acetylcholine release mechanism in various cells and reconstruction of the release mechanism in non-releasing cells. *Life Sci* 72, 2029-2038.
- MARSHALL WF & KINTNER C. (2008). Cilia orientation and the fluid mechanics of development. *Curr Opin Cell Biol* 20, 48-52.
- MAYERHOFER A, DIMITRIJEVIC N & KUNZ L. (2003). The expression and biological role of the non-neuronal cholinergic system in the ovary. *Life Sci* 72, 2039-2045.
- MCCOMB P, LANGLEY L, VILLALON M & VERDUGO P. (1986). The oviductal cilia and Kartagener's syndrome. *Fertil Steril* 46, 412-416.
- MENEZO Y & GUERIN P. (1997). The mammalian oviduct: biochemistry and physiology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 73, 99-104.
- MIYAZAWA A, FUJIYOSHI Y & UNWIN N. (2003). Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* 423, 949-955.
- MORALES B, BARRERA N, URIBE P, MORA C & VILLALON M. (2000). Functional cross talk after activation of P2 and P1 receptors in oviductal ciliated cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C658-669.
- MORITA M, MIYAMOTO H, SUGIMOTO M, SUGIMOTO N & N M. (1997). Alterations in cell proliferation and morphology of ampullar epithelium of the mouse oviduct during the estrous cycle. *J Reprod Dev* 43 (3), 235-241.

- NANCARROW CD & HILL JL. (1994). Co-culture, oviduct secretion and the function of oviduct-specific glycoproteins. *Cell Biol Int* 18, 1105-1114.
- NATHANSON NM. (2008). Synthesis, trafficking, and localization of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Ther* 119, 33-43.
- NEUMANN S, RAZEN M, HABERMEHL P, MEYER CU, ZEPP F, KIRKPATRICK CJ & WESSLER I. (2007). The non-neuronal cholinergic system in peripheral blood cells: effects of nicotinic and muscarinic receptor antagonists on phagocytosis, respiratory burst and migration. *Life Sci* 80, 2361-2364.
- NGUYEN T, CHIN WC, O'BRIEN JA, VERDUGO P & BERGER AJ. (2001). Intracellular pathways regulating ciliary beating of rat brain ependymal cells. *J Physiol* 531, 131-140.
- NICKEL, SCHUMMER & SEIFERLE. (2004). *Lehrbuch der Anatomie der Haussäugetiere, Band 2*. Parey, Kapitel 8, 399-401.
- O'CALLAGHAN C, ACHAVAL M, FORSYTHE I & BARRY PW. (1995). Brain and respiratory cilia: the effect of temperature. *Biol Neonate* 68, 394-397.
- OMOTO CK & KUNG C. (1980). Rotation and twist of the central-pair microtubules in the cilia of Paramecium. *J Cell Biol* 87, 33-46.
- ORTIZ ME, BEDREGAL P, CARVAJAL MI & CROXATTO HB. (1986). Fertilized and unfertilized ova are transported at different rates by the hamster oviduct. *Biol Reprod* 34, 777-781.
- ORTIZ ME, LLADOS C & CROXATTO HB. (1989). Embryos of different ages transferred to the rat oviduct enter the uterus at different times. *Biol Reprod* 41, 381-384.
- OSADA H, FUJII TK, TSUNODA I, TAKAGI K, SATOH K, KANAYAMA K & ENDO T. (1999). Fimbrial capture of the ovum and tubal transport of the ovum in the rabbit, with emphasis on the effects of beta 2-adrenoreceptor stimulant and prostaglandin F2 alpha on the intraluminal pressures of the tubal ampullae. *J Assist Reprod Genet* 16, 373-379.
- PARSONS SM. (2000). Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. *Faseb J* 14, 2423-2434.
- PEDRETTI A, VISTOLI G, MARCONI C & TESTA B. (2006). Muscarinic receptors: A comparative analysis of structural features and binding modes through homology modelling and molecular docking. *Chem Biodivers* 3, 481-501.
- PFEIL U, HABERBERGER RV, LIPS KS, EBERLING L, GRAU V & KUMMER W. (2003). Expression of the high-affinity choline transporter CHT1 in epithelia. *Life Sci* 72, 2087-2090.
- PFEIL U, LIPS KS, EBERLING L, GRAU V, HABERBERGER RV & KUMMER W. (2003). Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the rat trachea. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28, 473-477.

- PROSKOCIL BJ, SEKHON HS, JIA Y, SAVCHENKO V, BLAKELY RD, LINDSTROM J & SPINDEL ER. (2004). Acetylcholine is an autocrine or paracrine hormone synthesized and secreted by airway bronchial epithelial cells. *Endocrinology* 145, 2498-2506.
- RACKE K, JUERGENS UR & MATTHIESEN S. (2006). Control by cholinergic mechanisms. *Eur J Pharmacol* 533, 57-68.
- SALATHE M, LIPSON EJ, IVONNET PI & BOOKMAN RJ. (1997). Muscarinic signaling in ciliated tracheal epithelial cells: dual effects on Ca<sup>2+</sup> and ciliary beating. *Am J Physiol* 272, L301-310.
- SANDERSON MJ & SLEIGH MA. (1981). Ciliary activity of cultured rabbit tracheal epithelium: beat pattern and metachrony. *J Cell Sci* 47, 331-347.
- SASTRY BV & SADAVONGVIVAD C. (1978). Cholinergic systems in non-nervous tissues. *Pharmacol Rev* 30, 65-132.
- SATIR P. (1980). Structural basis of ciliary movement. *Environ Health Perspect* 35, 77-82.
- SATIR P & CHRISTENSEN ST. (2008). Structure and function of mammalian cilia. *Histochem Cell Biol* 129, 687-693.
- SATIR P & SLEIGH MA. (1990). The physiology of cilia and mucociliary interactions. *Annu Rev Physiol* 52, 137-155.
- SCHULLER HM. (2007). Nitrosamines as nicotinic receptor ligands. *Life Sci* 80, 2274-2280.
- SINE JP, FERRAND R, CLOAREC D, LEHUR PA & COLAS B. (1991). Human intestine epithelial cell acetyl- and butyrylcholinesterase. *Mol Cell Biochem* 108, 145-149.
- SPILMAN CH, SHAIKH AA & HARPER MJ. (1978). Oviductal motility amplitude and ovarian steroid secretion during egg transport in the rabbit. *Biol Reprod* 18, 409-417.
- STAPRANS I & DIRKSEN ER. (1974). Microtubule protein during ciliogenesis in the mouse oviduct. *J Cell Biol* 62, 164-174.
- STEFFL M, SCHWEIGER M, SUGIYAMA T & AMSELGRUBER WM. (2008). Review of apoptotic and non-apoptotic events in non-ciliated cells of the mammalian oviduct. *Ann Anat* 190, 46-52.
- STEFFL M, SCHWEIGER M, WESSLER I, KUNZ L, MAYERHOFER A & AMSELGRUBER WM. (2006). Non-neuronal acetylcholine and choline acetyltransferase in oviductal epithelial cells of cyclic and pregnant pigs. *Anat Embryol (Berl)* 211, 685-690.

- STEINHAEUER N, BOOS A & GUNZEL-APEL AR. (2004). Morphological changes and proliferative activity in the oviductal epithelium during hormonally defined stages of the oestrous cycle in the bitch. *Reprod Domest Anim* 39, 110-119.
- STRADER CD, FONG TM, GRAZIANO MP & TOTA MR. (1995). The family of G-protein-coupled receptors. *Faseb J* 9, 745-754.
- STROSBERG AD & NAHMIAS C. (2007). G-protein-coupled receptor signalling through protein networks. *Biochem Soc Trans* 35, 23-27.
- SUAREZ SS. (1987). Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observations in situ. *Biol Reprod* 36, 203-210.
- SUAREZ SS & PACEY AA. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update* 12, 23-37.
- SUPRENANT KA, HAYS E, LECLUYSE E & DENTLER WL. (1985). Multiple forms of tubulin in the cilia and cytoplasm of *Tetrahymena thermophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 6908-6912.
- SUTTO Z, CONNER GE & SALATHE M. (2004). Regulation of human airway ciliary beat frequency by intracellular pH. *J Physiol* 560, 519-532.
- TALBOT P, GEISKE C & KNOLL M. (1999). Oocyte pickup by the mammalian oviduct. *Mol Biol Cell* 10, 5-8.
- TARASIUK A, BAR-SHIMON M, GHEBER L, KORNGREEN A, GROSSMAN Y & PRIEL Z. (1995). Extracellular ATP induces hyperpolarization and motility stimulation of ciliary cells. *Biophys J* 68, 1163-1169.
- TEFF Z, PRIEL Z & GHEBER LA. (2007). Forces applied by cilia measured on explants from mucociliary tissue. *Biophys J* 92, 1813-1823.
- TUCEK S. (1982). The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. *J Physiol* 322, 53-69.
- UMEZU T & TOMOOKA Y. (2004). An evidence of stromal cell populations functionally linked with epithelial cell populations in the mouse oviduct. *Zoolog Sci* 21, 319-326.
- UNNO T, MATSUYAMA H, SAKAMOTO T, UCHIYAMA M, IZUMI Y, OKAMOTO H, YAMADA M, WESS J & KOMORI S. (2005). M(2) and M(3) muscarinic receptor-mediated contractions in longitudinal smooth muscle of the ileum studied with receptor knockout mice. *Br J Pharmacol* 146, 98-108.
- UNWIN N. (2003). Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy. *FEBS Lett* 555, 91-95.
- VAN KOPPEN CJ & KAISER B. (2003). Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol Ther* 98, 197-220.



- VELASQUEZ LA, AGUILERA JG & CROXATTO HB. (1995). Possible role of platelet-activating factor in embryonic signaling during oviductal transport in the hamster. *Biol Reprod* 52, 1302-1306.
- VERNINO S, ROGERS M, RADCLIFFE KA & DANI JA. (1994). Quantitative measurement of calcium flux through muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* 14, 5514-5524.
- VILLALON M, HINDS TR & VERDUGO P. (1989). Stimulus-response coupling in mammalian ciliated cells. Demonstration of two mechanisms of control for cytosolic [Ca<sup>2+</sup>]. *Biophys J* 56, 1255-1258.
- WARNER FD & MITCHELL DR. (1978). Structural conformation of ciliary dynein arms and the generation of sliding forces in Tetrahymena cilia. *J Cell Biol* 76, 261-277.
- WARNER FD & SATIR P. (1974). The structural basis of ciliary bend formation. Radial spoke positional changes accompanying microtubule sliding. *J Cell Biol* 63, 35-63.
- WEN GY & CHEN J. (2004). Scanning electron microscopy of the infundibulum, ampulla, and eggs of mice. *Comp Med* 54, 543-548.
- WESS J. (2005). Allosteric binding sites on muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 68, 1506-1509.
- WESSEL T, SCHUCHTER U & WALT H. (2004). Ciliary motility in bovine oviducts for sensing rapid non-genomic reactions upon exposure to progesterone. *Horm Metab Res* 36, 136-141.
- WESSLER I, HERSCHEL S, BITTINGER F & KIRKPATRICK CJ. (2007). Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is affected by antidepressants. *Life Sci* 80, 2210-2213.
- WESSLER I, KILBINGER H, BITTINGER F, UNGER R & KIRKPATRICK CJ. (2003). The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology. *Life Sci* 72, 2055-2061.
- WESSLER I & KIRKPATRICK CJ. (2008). Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol* 154, 1558-1571.
- WESSLER I, KIRKPATRICK CJ & RACKE K. (1998). Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol Ther* 77, 59-79.
- WESSLER I, KIRKPATRICK CJ & RACKE K. (1999). The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26, 198-205.

- WILSON G & KARLIN A. (2001). Acetylcholine receptor channel structure in the resting, open, and desensitized states probed with the substituted-cysteine-accessibility method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1241-1248.
- WOLFF M, LIPS K, KÖLLE S & KUMMER W. (2008). Muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor subtypes in the mouse oviduct. In *Poster Abstract Booklet of the 103rd Annual Meeting of the Anatomische Gesellschaft*, Innsbruck.
- WOODWORTH BA, ANTUNES MB, BHARGAVE G, PALMER JN & COHEN NA. (2007). Murine tracheal and nasal septal epithelium for air-liquid interface cultures: a comparative study. *Am J Rhinol* 21, 533-537.
- YANIZ JL, LOPEZ-GATIUS F & HUNTER RH. (2006). Scanning electron microscopic study of the functional anatomy of the porcine oviductal mucosa. *Anat Histol Embryol* 35, 28-34.
- YANIZ JL, LOPEZ-GATIUS F, SANTOLARIA P & MULLINS KJ. (2000). Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. *Anat Rec* 260, 268-278.
- YOSHIDA M, MASUNAGA K, SATOJI Y, MAEDA Y, NAGATA T & INADOME A. (2008). Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of non-neuronal acetylcholine in urothelium and its clinical significance. *J Pharmacol Sci* 106, 193-198.
- YU M, ROBINSON NE, WANG Z & DERKSEN FJ. (1992). Muscarinic receptor subtypes in equine tracheal smooth muscle. *Vet Res Commun* 16, 301-310.
- ZAGOORY O, BRAIMAN A, GHEBER L & PRIEL Z. (2001). Role of calcium and calmodulin in ciliary stimulation induced by acetylcholine. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C100-109.

## 9 Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in dieser Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

## 10 Veröffentlichungen

### Originalarbeit

Noreikat K, Wolff M, Kummer W, Kölle S (2009). Ciliary Activity in the Oviduct of Cycling, Pregnant and Muscarinic Receptor Knockout Mice. (in Vorbereitung)

### Kongressbeiträge

Noreikat K, Kummer W, Kölle S (2009). Impact of early pregnancy and the non-neuronal cholinergic system on oviductal transport in the mouse. *Reproduction in Domestic Animals* Vol. 44, Supplement 1(25).

Kölle S, Dubielzig S, Noreikat K, Kummer W (2009). Effects of nicotine and muscarine on gamete transport and fertilization. 42<sup>nd</sup> Annual Conference of Physiology and Pathology of Reproduction, Leipzig. (*Posterpreis*)

HUSSONG J, FAULHAMMER P, NOREIKAT K, KUMMER W, SHARP KV & R L. (2008). In vivo  $\mu$ PIV Messungen an Zilien in Mäuseluftröhren. In *Fachtagung "Lasermethoden in der Strömungsmesstechnik"*, Karlsruhe.

Noreikat K, Wolff M, Kummer W, Kölle S (2008). Structural and Functional Characterization of Ampulla and Isthmus in the mouse oviduct. In *Poster Abstract Booklet of the 103<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Anatomische Gesellschaft*, Innsbruck. (*Posterpreis*)

## 11 Danksagung

***„Keine Schuld ist dringender als die, Dank zu sagen!“***

*(Marcus Tullius Cicero)*

Ich möchte mich zunächst bei Frau Prof. Dr. S. Kölle für die Überlassung des Dissertationsthemas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die Betreuung bedanken.

Herrn Prof. Dr. W. Kummer danke ich für seine ständige Bereitschaft, auch in Tagen bzw. Wochen des Zeitmangels, ein offenes Ohr für mich zu haben. Weiterhin danke ich ihm für das geschenkte Vertrauen, das mir die Möglichkeit bot in Delft neue Erfahrungen zusammen, was mir sehr viel bedeutet hat.

Der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) danke ich für die finanzielle Unterstützung ohne die das Projekt nicht hätte durchgeführt werden können.

Meinen herzlichsten Dank möchte ich an Petra Faulhammer richten, die mich von Beginn an über das normale Maß hinaus unterstützt und mit mir alle Höhen und Tiefen des PC „PD 1760“ durchgestanden hat. Ich freue mich, dass aus dieser Zusammenarbeit eine so gute Freundschaft geworden ist. Danke.

Nicht vergessen möchte ich zudem Martin Bodenbenner, der das Wort „Plug-Maus“ wahrscheinlich am liebsten aus seinem Wortschatz streichen würde sowie Silke Wiegand und Dr. Gabriela Krasteva, die mich ebenfalls zu jeder Zeit sowohl auf freundschaftlicher als auch auf wissenschaftlicher Ebene unterstützt haben.

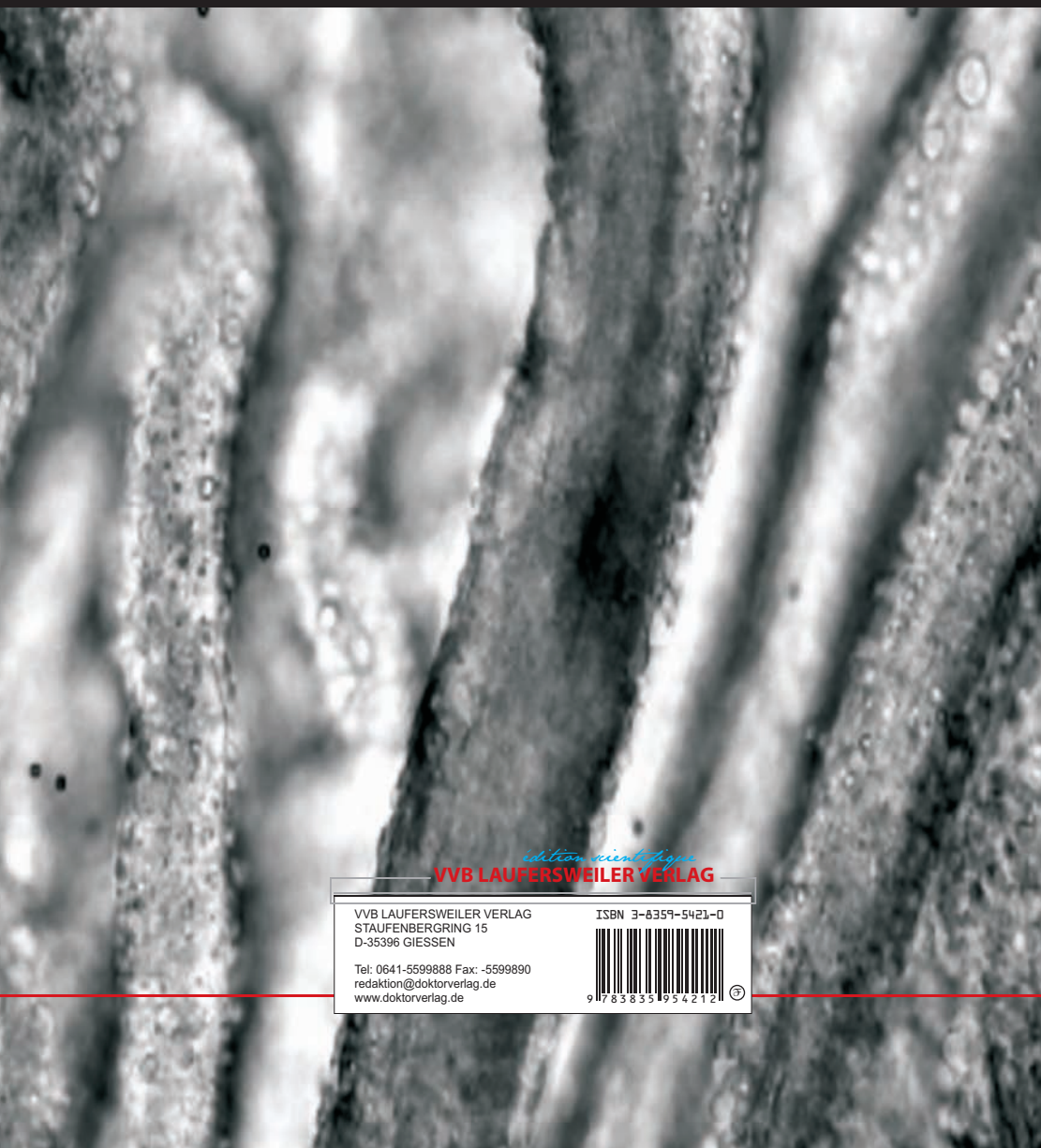
Kathrin Wolf-Hofmann, Susanne Schubert-Porth und Jutta Dern-Wieloch danke ich für die Hilfe und Einarbeitung in die Histologie und Rasterelektronenmikroskopie und die so freundliche und angenehme Zusammenarbeit seit dem ersten Tag.

Karola Michael danke ich für die Hilfe beim Einstieg in die graphische Bearbeitung.

Ein Dankeschön sollen auch meine zwei lieben Mitbewohnerinnen Amelie und Dana erhalten. Durch sie wurden so manch lange Wochen fern der Heimat wunderbar überbrückt. Ich werde die gemeinsamen TV-Abende vermissen.

Ein großer Dank soll auch meine liebste und beste Freundin Monique erreichen, die seit Beginn des Studiums, auch bei einer Entfernung über mehrere 1000 km, immer für mich da war.

An dieser Stelle möchte ich meiner Familie, vor allem meinen Eltern, für ihre Unterstützung über die Jahre hinweg und meinem Freund für die Tatsache danken, dass er meine Entscheidung nach Giessen zu gehen nie in Frage gestellt hat.



*edition scientia*

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5421-0



9 783835 493421 Z

