

Charakterisierung des non-neuronalen cholinergen Systems in der Tuba uterina der Maus

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Im Fachbereich Biologie der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Miriam Wolff
aus Schwäbisch Gmünd, Baden-Württemberg

Gießen, 2012

Diese Arbeit wurde am
Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
in der Arbeitsgruppe Kardiopulmonale Neurobiologie
unter der Leitung von Prof. Dr. W. Kummer angefertigt.

Erstgutachter: **Prof. Dr. R. Lakes-Harlan**
Institut für Tierphysiologie
Fachbereich Biologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Zweitgutachter: **Prof. Dr. W. Kummer**
Institut für Anatomie und Zellbiologie
Fachbereich Medizin
Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der Disputation:
08.05.2012

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis I

II. Abkürzungsverzeichnis IV

1. Einleitung 1

1.1 Der Eileiter 1

1.1.1 Die Morphologie des Eileiters 1

1.1.2 Innervation der Tuba uterina 4

1.1.3 Funktion der Tuba uterina 8

1.1.3.1 Tubarer Transport 9

1.1.3.2 Funktionsstörungen des tubaren Transports 11

1.2 Neuronales und non-neuronales cholinerges System 13

1.2.1 Synthese, Speicherung und Freisetzung von ACh in einem cholinergen Neuron 13

1.2.2 Unterschiede zwischen dem neuronalen und non-neuronalen cholinergen System 14

1.2.3 Acetylcholinrezeptoren 16

1.2.3.1 Nikotinische Acetylcholinrezeptoren 16

1.2.3.2 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren 19

1.3 Ziel der Arbeit 21

2. Material und Methoden 23

2.1 Materialien 23

2.1.1 Versuchstiere 23

2.1.2 Chemikalien/Pharmaka 23

2.1.3 Antikörper 24

2.1.4 Oligonukleotide 25

2.1.5 Molekularbiologische Kits 27

2.2 Methoden 27

2.2.1 Probengewinnung 27

2.2.1.1 Erstellung eines Vaginalabstrichs 27

2.2.1.2 Gewinnung von nativem Gewebe 29

2.2.1.3 Perfusionsfixierung 29

2.2.1.4 Gewinnung von Proben für die Reverse Transcriptase- Polymerasekettenreaktion 29

2.2.2 Reverse Transcriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) 30

2.2.2.1 Primerdesign 30

2.2.2.2 Qualitative RT-PCR 31

2.2.2.3 Gelaufreinigung und Sequenzierung von PCR-Produkten 33

2.2.2.4 Laser-assistierte Mikrodisektion 34

2.2.3 Indirekte Immunfluoreszenz 36

2.2.3.1 Diaminobenzidin (DAB)-basierte Preembedding-Immunhistochemie und Transmissionselektronenmikroskopie 40

2.2.4 Histochemie 41

2.2.4.1 Acetylcholinesterase (AChE)-Histochemie 41

2.2.4.2 Butyrylcholinesterase (BChE)-Histochemie 42

2.2.5 Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) 42

2.2.6 Desorptions-Elektrospray-Ionisierung (DESI) 43

2.2.7 Calcium-Imaging an isolierten Zellen des Eileiters 44

3. Ergebnisse	47
3.1. Expression und Lokalisation von Komponenten des cholinergen Systems in der Tuba uterina der Maus	47
3.1.1 Vergleich der Expression von Komponenten des cholinergen Systems mittels qualitativer RT-PCR bei tragenden und nicht-tragenden Mäusen.....	47
3.1.1.1 Syntheseeenzyme und Transporter	47
3.1.1.2 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren	48
3.1.1.3 Nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR).....	51
3.1.2 Lokalisation von Komponenten des cholinergen Systems	52
3.1.2.1 Cholinacetyltransferase (ChAT), VAChT und CHT1	52
3.1.2.2 Organische Kationentransporter 1-3	56
3.1.2.3 Muskarinische Rezeptoren	57
3.1.2.4 Nikotinische Rezeptoruntereinheiten	59
3.1.2.4 Acetylcholinesterase- (AChE) und Butyrylcholinesterase- (BChE) Histochemie	63
3.1.3 Acetylcholin-Messungen	64
3.2 Funktionelle Untersuchungen des cholinergen Systems im Eileiter der Maus mittels Calcium-Imaging	65
3.2.1 Nicht-zilientragende Zellen.....	65
3.2.1.1 Einfluss der cholinergen Blocker Atropinsulfat und Mecamylamin auf die Reaktion nicht-zilientragender Zellen auf cholinerge Agonisten.....	65
3.2.1.2 Reaktionen oviduktaler nicht-zilientragender Zellen von WT-, M1KO- und M3KO-Mäusen auf cholinerge Agonisten.	68
3.2.2. Zilientragende Zellen.....	70
3.2.2.1 Einfluss der cholinergen Blocker Atropinsulfat und Mecamylamin auf die Reaktion zilientragender Zellen auf cholinerge Agonisten.....	71
3.2.2.2 Reaktionen oviduktaler zilientragender Zellen von WT-, M1KO- und M3KO-Mäusen auf cholinerge Agonisten.	73
3.3 Innervation der Tuba uterina der Maus	75
3.3.1 Immunhistochemische Einfachinkubationen.....	75
3.3.1.1 Protein gene product 9.5 (PGP 9.5)	75
3.3.1.2 Calcitonin gene-related peptide (CGRP)	76
3.3.1.3 Neuropeptid Tyrosin (NPY).....	78
3.3.1.4 Vasoaktives intestinales Peptid (VIP).....	79
3.3.1.5 Neurofilament light (NFI).....	79
3.3.3 Untersuchungen zur Kollokalisierung verschiedener Neuropeptide	80
3.3.4 Vorkommen verschiedener Neuropeptide in cholinergen Nervenfasern	86
4. Diskussion	87
4.1 Vorkommen von Komponenten des cholinergen Systems in der Tuba uterina der Maus	87
4.2 Untersuchungen zur Funktionalität der vorhandenen ACh-Rezeptoren mittels Calcium-Imaging-Experimenten	91
4.3 Die Innervation der Tuba uterina der Maus	96
4.4 Möglicher Einfluss des cholinergen Systems auf die Kontraktilität der Tuba uterina	98
4.5 Modulation der CGRP-Freisetzung durch MR	99
4.5.1 Möglicher Einfluss auf die Nozizeption	99
4.5.2 Möglicher Einfluss auf die neurogene Inflammation/B-Zelldifferenzierung.....	100
4.6 Schlussfolgerung	101
5. Zusammenfassung	103

6. Summary.....	105
7. Literaturverzeichnis	107
8. Erklärung	124
9. Lebenslauf.....	125
10. Danksagung	128

II. Abkürzungsverzeichnis

Acc.Nr.	<i>Genbank Accessionnumber</i>
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AK	Antikörper
Amp	Ampulla
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<i>bacterial artificial chromosom</i>
BChE	Butyrylcholinesterase
bg	Blutgefäß
βMG	β-Mikroglobulin
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calciumkonzentration
CaCl	Calciumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CarAT	Carnithinacetyltransferase
CD5	<i>cluster of differentiation 5</i> T-Lymphozytenmarker
CD19	<i>cluster of differentiation 19</i> B-Lymphozytenmarker
cDNA	<i>complementary DNA</i> (engl)
CGRP	<i>calcitonine gene related peptide</i>
ChAT	Cholinacetyltransferase
CHT1	Cholintransporter 1
cm	Zentimeter
ConA	Concanavalin A
C-Terminal	carboxy-terminales Ende
Cy3	Indocarbocyanin
DAB	Diaminobenzidin
DESI	Desorption Elektrospray Ionisierung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced Green-Fluorescent-Protein</i>
ep	Epithel

Abkürzungsverzeichnis

<i>et al.</i>	<i>et alii (lat.):</i> und andere
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Fim	Fimbrie
For	Forward-Primer für die PCR
g	Gramm
gm	glatte Muskulatur
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes-Protein
h	Stunde
HCL	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
I.E.	internationale Einheit
IgG	Immunglobulin G
IHC	indirekte Immunhistochemie
IP ₃	Inositoltriphosphat
Isth	Isthmus
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KO	Knock-out
Konz.	Konzentration
l	Liter
M1-5	Muskarinrezeptorsubtyp 1-5
M	molar
Meso	Mesosalpinx
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mRNA	<i>messengerRNA</i>
ms	Millisekunde
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
MW	Mittelwert
M2/3 ^{-/-}	muskarinischer Rezeptor 2 und 3 Knock-out
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Dinatriumcarbonat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat

Abkürzungsverzeichnis

NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NCR	nicht kodierende Region
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NO	Stickstoffmonoxid
NPY	Neuropeptide Tyrosin
N-Terminal	aminoterminales Ende
OCT	organischer Kationentransporter
OT	Objektträger
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PGF ₂ α	Prostaglandin F ₂ α
PGP 9.5	Proteingeneprodukt 9.5
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PP	Phosphatpuffer
PTG	Partikeltransportgeschwindigkeit
P ₂ X	purinerger Rezeptor
Rac	<i>Ras-related C3-botulinum toxin substrate 1</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
Rev	Reverse-Primer für die PCR
Rho	<i>Ras homology</i>
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Rotationen pro Minute
RT	reverse Transkriptase
s	Sekunde
S	Salz
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SMA	<i>smooth muscle actin</i>
s.o.	siehe oben
SP	Substanz P
Sub	Subserosa
t	Zeit
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TGF-α+β	<i>Transforming growth factor α+β</i>

Abkürzungsverzeichnis

TH	Tyrosinhydroxylase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TV	Transkriptvariante
U	Unit
UCHL1	Ubiquitin carboxy terminale Hydrolase
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
VACht	vesikulärer Acetylcholintransporter
VIP	<i>vesicular integral-membrane protein</i>
WT	Wildtyp
ZSF	Zilienschlagfrequenz

1. Einleitung

1.1 Der Eileiter

1.1.1 Die Morphologie des Eileiters

Der Eileiter (Tuba uterina, gr.: Salpinx) ist ein mit Schleimhaut ausgekleideter Muskelschlauch, der das Ovar mit dem Uterus verbindet. Bei der Maus liegt er intraperitoneal, angeheftet an eine Serosafalte, die Mesosalpinx, welche zusammen mit dem Ligamentum ovarii proprium, dem Mesovarium und dem Eierstock die Eierstocktasche, Bursa ovarica bildet. Der Eileiter kann makroskopisch in vier verschiedene Segmente unterteilt werden, vom ovarnahen bis zum uterusnahen Ende, in das Infundibulum, die Ampulla, den Isthmus und den Übergang zum Uterus (pars uterina bzw. intramuraler Teil).

Im Gegensatz zu den meisten anderen Spezies ist der Eileiter der Maus eng um sich selbst gewunden (Wen & Chen 2004). Die Schichten der Wand sind in allen vier Segmenten prinzipiell gleich aufgebaut; von innen nach außen: Tunica mucosa, Tunica muscularis, gefäßführende Tela subserosa und Tunica serosa. Die zwei Hauptzelltypen des Epithels der Tunica mucosa sind zilientragende und sekretorische Zellen. Zilientragende Zellen erzeugen einen Flüssigkeitsstrom in Richtung des Uterus, der unter anderem zur Aufnahme des Cumulus-Oozyten-Komplexes in die Tuba uterina dient (Odor & Blandau 1973). Sekretorische Zellen synthetisieren und sezernieren unter anderem Glykoproteine (Oliphant 1986) zur Ernährung des Embryos. Die Anzahl und das Verhältnis der verschiedenen Zelltypen zueinander sind sowohl spezies-, segment- als auch zyklusabhängig. Die Anzahl der zilientragenden Zellen nimmt von Infundibulum in Richtung Uterus stark ab (Suarez 1987).

Die vier Segmente können bei der Maus wie folgt charakterisiert werden:

Das **Infundibulum**, der sogenannte Tubentrichter, dient der Aufnahme der Oozyte in die Tuba uterina und ist eine Ausstülpung der inneren Eileiteroberfläche (Wen & Chen 2004). Das Infundibulum vieler anderer Spezies besitzt sogenannte Eileiterfransen, oder Fimbrien, welche Ovar und Öffnung des Ovidukts miteinander verbinden. Das Epithel ist fast nur aus zilientragende Zellen aufgebaut, welche essenziell für die Aufnahme der Oozyte in den Eileiter sind (Odor & Blandau 1973).

Das Infundibulum zeigt keine klar differenzierte Muskelschicht. Die hier vorhandenen dünnen, elongierten Zellen enthalten kleine Myofilamentbündel und bilden ein Netzwerk mit großen Maschen, welche mit Bindegewebe gefüllt sind (Faussone-Pellegrini et al. 1990).

Die **Ampulla** ist der Ort der Befruchtung. Charakterisiert ist sie durch eine relativ dünne, durchscheinende Muskelschicht und viele in das Lumen hineinreichende Falten, welche in Richtung des Isthmus an Höhe verlieren. In der Muskulatur der Ampulla sind ähnliche, irregulär geformte Zellen wie im Infundibulum vorhanden (Faussone-Pellegrini et al. 1990). In Richtung des Isthmus nimmt die Anzahl der Myofilamentbündel zu und es bilden sich zwei Muskelschichten, eine innere zirkuläre und eine äußere longitudinale aus (Faussone-Pellegrini et al. 1990). Das Epithel besteht fast nur aus zilientragende Zellen, deren Anteil in Richtung des Uterus abnimmt.

Der **Isthmus** hat eine dickere Muskulatur, welche aus zwei Muskelschichten, einer inneren zirkulären und eine äußeren longitudinalen besteht. Hier sind die Muskelschichten eindeutig durch eine Bindegewebeschicht voneinander getrennt (Faussone-Pellegrini et al. 1990). Die Morphologie der Zellen entspricht der von klassischen glatten Muskelzellen (Faussone-Pellegrini et al. 1990). Es sind nur noch vereinzelte, niedrigere Falten vorhanden. Zilientragende Zellen sind fast nur noch in den Krypten zwischen den Falten zu finden, dafür hat der Anteil der sekretorischen Zellen stark zugenommen (Noreikat 2009).

Im **utero-tubaren Übergang**, welcher Eigenschaften eines Sphinkters besitzt, sind dieselben Muskelschichten wie auch im Uterus vorhanden (Faussone-Pellegrini et al. 1990).

Bereits 1928 beschrieben Novak und Everett zyklusabhängige Veränderungen in der Tuba uterina des Menschen und führten sie auf die Wirkung von Östrogen bzw. Progesteron zurück (Novak & Everett 1928). Beim Menschen sind die maximale Zellhöhe und die stärkste Zilienbildung besonders in der Ampulla und dem Infundibulum in der späten folliculären Phase vorhanden (Verhage et al. 1979). In der späten lutealen Phase sind dagegen Atrophie und der Verlust von Zilien, besonders im Infundibulum zu beobachten (Verhage et al. 1979). In der frühen Follikelphase kommt es dann wieder zu erneuter Zilienbildung und Zellhypertrophie (Verhage et al. 1979). Während der Schwangerschaft und nach der Geburt ist eine noch stärkere

Atrophie und Deziliation als in der Lutealphase zu beobachten (Verhage et al. 1979). In Explantaten des humanen Ovidukts konnte die Initiierung der Deziliation mittels Östradiolgabe verhindert werden (Goldberg & Friedman 1995). Sekretorische Zellen der Ampulla der Maus weisen besonders im Östrus und Metöstrus viel sekretorische Granula auf, welche hauptsächlich im Metöstrus mit der Plasmamembran verschmelzen (Morita et al. 1997b). Im Isthmus dagegen kommt es hauptsächlich im Proöstrus zur Exozytose (Morita et al. 1997b). Diese spezifische Regulation weist darauf hin, dass die sekretorischen Produkte der Ampulla und des Isthmus vermutlich unterschiedliche Funktionen haben (Morita et al. 1997b). So sind sie in der Ampulla vermutlich wichtig für die Fertilisation und die frühe embryonale Entwicklung, im Isthmus dagegen für die Kapazitation der Spermien (Morita et al. 1997b). Entsprechende Beobachtungen wurden auch in Proben der Ziege gemacht (Abe et al. 1999). Zyklusabhängige Veränderungen der Mukosa wurden auch in anderen Spezies, z.B. der Kuh (Abe & Oikawa 1993b; Yaniz et al. 2000), der Ziege (Abe et al. 1993), dem Hund (Steinhauer et al. 2004) und dem Hamster (Abe & Oikawa 1993a) beschrieben. Im Schwein sind die zyklusabhängigen Veränderungen hauptsächlich in der Fimbrie und der Ampulla zu beobachten (Abe & Oikawa 1992). Die Ergebnisse zu zyklusabhängigen Veränderungen des Epithels der Maus sind widersprüchlich. So berichten Morita et al. (1997a) von starken zyklusabhängigen Veränderungen des Epithels (Morita et al. 1997a), wohingegen Noreikat (2009) kaum zyklusabhängige Veränderungen der relativen Anzahl der zilientragenden Zellen in der Ampulla feststellen konnten (Noreikat 2009). Sie nehmen an, dass eine komplexe Umstrukturierung der Mukosa aufgrund des sehr kurzen Sexualzyklusses der Maus einen unverhältnismäßig großen Aufwand darstellen würde (Noreikat 2009). Auch in der Maus kommt es bereits in den ersten Tagen der Trächtigkeit zu einem starken Rückgang der zilientragenden Zellen der Ampulla (Noreikat 2009). Unstrittig ist, dass die Muskulatur der Maus zyklusabhängigen Veränderungen unterworfen ist (Faussone-Pellegrini & Bani 1990; Faussone-Pellegrini et al. 1991; 1995). Im Proöstrus und Östrus sind vermehrt Myofilamente und dense-core Vesikel vorhanden (Faussone-Pellegrini & Bani 1990). Im Östrus führt die Zunahme von Organellen und kontraktilen Apparaten zu einer ausgeprägten Hypertrophie der Zellen, besonders im Vergleich mit dem Zustand im Diöstrus (Faussone-Pellegrini & Bani 1990). Kollagenfasern sind kaum vorhanden (Faussone-Pellegrini & Bani 1990). Im Metöstrus und Diöstrus ist der kontraktile Apparat nur schwach ausgebildet und es

sind nur wenige dense-core Vesikel, dafür aber Lysosomen und myelinähnliche Körperchen zu finden (Faussone-Pellegrini & Bani 1990). Der interzelluläre Raum ist mit Kollagenfasern angefüllt (Faussone-Pellegrini & Bani 1990). Diese Veränderungen können den Zyklusständen mit hohen Östrogenkonzentrationen (Proöstrus, Östrus) und denen mit einem Abfall der Östrogenkonzentrationen und gleichzeitig geringer Progesteronkonzentrationen zugeordnet werden. Während der Trächtigkeit und nach der Geburt kommt es zu starken Veränderungen der Anzahl von Zellorganellen, wie z.B. Mitochondrien, Caveolae, glattem endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat sowie dem interstitiellem Bindegewebe (Faussone-Pellegrini et al. 1991; 1995).

All diese zyklischen Veränderungen von Muskulatur und Epithel des Eileiters sind auf die veränderten physiologischen Anforderungen im Laufe des Zykluses und der Trächtigkeit zurückzuführen.

1.1.2 Innervation der Tuba uterina

Studien zur Innervation der Tuba uterina wurden an verschiedenen Spezies, hauptsächlich Rind, Schwein und Mensch durchgeführt. Die Innervation der Tuba uterina der Maus wurde dagegen bisher nicht näher untersucht. Mittels Tracingexperimenten konnte gezeigt werden, dass die efferente Innervation der Tuba uterina des Schweines hauptsächlich über hypogastrische Nerven aus dem Ganglion mesentericum inferius, dem Ganglion ovaricum und dem Ganglion coeliacomesentericum entspringt (Owman & Sjoberg 1966; Czaja et al. 2001a). Zusätzlich entspringen kurze adrenerge Nerven aus parazervikalen Ganglien (Owman & Sjoberg 1966; Czaja et al. 2001a). Afferente Neurone liegen in den Spinalganglien T10-L3, im Schwein hauptsächlich in den Ganglien T13-15 (Czaja 2000). Die größte Subpopulation dieser Nervenzellen enthält Substanz P (SP) und Calcitonin gene-related Peptid (CGRP; Czaja 2000). Generell weist die Tuba uterina eine dichte adrenerge Innervation der Muskulatur und der Blutgefäße auf. Am dichtesten ist diese Innervation im Isthmus und nimmt Richtung Infundibulum stark ab (als Zusammenfassung siehe Owman und Stjernquist 1988). Im Isthmus sind die adrenergen Fasern hauptsächlich in der Muskulatur zu finden, wohingegen sie in der Ampulla und Fimbrie eher assoziiert mit Blutgefäßen vorkommen (Owman & Sjoberg 1966; Owman & Stjernquist 1988). Czaja et al. konnten 2001 mittels retrogradem Tracing zeigen, dass 78,6% der aus parazervikalen Ganglien entspringenden

Nervenfasern zum Isthmus und nur 21,4% zur Ampulla ziehen (Czaja et al. 2001b). 70% der aus den Parazervikalganglien entspringenden Axone sind noradrenerg, wobei die nicht-noradrenergen Axone meist die Neuropeptide CGRP und/oder SP enthalten (Czaja et al. 2001b). Die cholinerge Innervation ist im Vergleich zur adrenergen schwächer ausgeprägt. Auch sie ist häufiger im Isthmus und assoziiert mit Blutgefäßen anzutreffen (Kraus et al. 1991; Czaja et al. 1993).

Wie z.B. Lakomy et al. (1994) für das Rind beschreiben, laufen die meisten Nerven peri- und paravaskulär in der Subserosa und in der Mesosalpinx. Viele Nerven laufen entlang der Längsachse der Tuba uterina und senden kleinere Verzweigungen aus, welche eine Art Netz um die Wand der Tuba uterina bilden. Seltener sind Nervenfasern unterhalb des Epithels und in der Muskularis anzutreffen.

In verschiedenen Studien wurden verschiedene Neuropeptide, mit leichten speziesabhängigen Unterschieden im Vorkommen, unter anderem in der Tuba uterina von Rind (Lakomy et al. 1994, Majewski et al. 1995), Schwein (Majewski et al. 1995), Ratte (Papka et al. 1985) und Mensch (Reinecke et al. 1989, Häppölä et al. 1991) nachgewiesen. Es wurde unter anderem die Anwesenheit der Neuropeptide Neuropeptid Tyrosin (NPY), SP, Vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP), CGRP, Neurotensin (NT) und Somatostatin (ST) untersucht. NPY-positive Nervenfasern kommen in allen Spezies vor. Im Rind und der Ratte ist eine mäßige Zahl in der inneren zirkulären Muskelschicht, um Arterien und Venen und subepithelial zu finden (Lakomy et al. 1994; Papka et al. 1985). Im Gegensatz dazu wurde eine dichte NPY-positive Innervation im Ovidukt von Mensch und Schwein gefunden (Reinecke et al. 1989; Häppölä et al. 1991). SP-positive Nervenfasern bilden um die Tuba uterina der Ratte ein dichtes Geflecht (Papka et al. 1985), sind im Rind aber eher selten anzutreffen (Lakomy et al. 1994). VIP-positive Nervenfasern sind in den meisten Spezies selten (Lakomy et al. 1994; Majewski et al. 1995; Papka et al. 1985). Die Berichte über ihr Vorkommen im Menschen sind allerdings widersprüchlich (Owman & Stjernquist 1988; Reinecke et al. 1989).

Im Folgenden werden die Charakteristika der für diese Arbeit verwendeten neuronalen Marker, Neurotransmitter und Neuropeptide kurz zusammengefasst:

Die Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) wird auch als Protein gene product 9.5 (PGP 9.5) bezeichnet und ist ein panneuronaler Marker. PGP 9.5 kommt in allen Neuronen (Doran et al. 1983) und Zellen des neuroendokrinen Systems (Thompson et al. 1983) und deren Tumoren (Rode et al. 1985) vor. Es wird hier als Marker für Nervenzellen im Allgemeinen verwendet.

Die Tyrosinhydroxylase (TH) dient als Marker für katecholaminhaltige Nervenfasern. Sie katalysiert den ersten Schritt der Katecholaminebiosynthese und wandelt dabei die Aminosäure L-Tyrosin in L-Dopa (Dihydroxyphenylalanin) um (Nagatsu et al. 1964). Zu den Katecholaminen gehören unter anderem Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin. Noradrenalin dient als Neurotransmitter postganglionärer, sympathischer Neurone (Von Euler 1946) und gemeinsam mit Adrenalin als Hormon, welches vom Nebennierenmark gebildet wird (Holton 1949; Von Euler & Hamberg 1949).

Neuropeptide:

Neuropeptid Tyrosin (NPY) ist ein 36 Aminosäuren langes Peptid (Tatemoto et al. 1982), welches durch Spaltung aus einem Präkursor, dem sogenannten PräproNPY, hervorgeht (Minth et al. 1984). Die NPY-Rezeptoren gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Mittlerweile wurden 6 verschiedenen NPY Rezeptoren Y1-y6 beschrieben (Michel et al. 1998), wobei NPY y6 bisher nur geklont wurde, ein funktioneller y6-Rezeptor konnte dagegen bisher nicht nachgewiesen werden (Michel et al. 1998). NPY kann viele verschiedene Funktionen im zentralen und peripheren Nervensystem ausüben, es ist unter anderem wichtig für das Essverhalten (als Zusammenfassung siehe z.B. Silva et al. 2002).

Das Calcitonin gene-related peptide (CGRP) kommt in zwei Varianten vor. Das 37 Aminosäuren lange α CGRP entsteht durch alternatives Splicen von Transkripten des Calcitonin-Gens (Amara et al. 1982). Die zweite Form, β CGRP, wird von einem anderen Gen ohne ein für Calcitonin kodierendes Exon kodiert (Amara et al. 1985). Beide Peptide können an einen Rezeptorkomplex aus dem „calcitonin receptor like receptor“ (CRLR) und dem „receptor activity modifying protein 1“ (RAMP1;

(McLatchie et al. 1998; Buhlmann et al. 1999) binden. CGRP kommt in sensorischen Neuronen vor (Rosenfeld et al. 1983) und wirkt unter anderem als Vasodilatator (Brain et al. 1985).

Substanz P (SP) ist ein elf Aminosäuren langes Neuropeptid. Es gehört zur Familie der Neurokinine (früher Tachykinine) und entsteht durch alternatives Splicen aus α - und β -Präprotachykinin (Nawa et al. 1984). SP bindet an den Neurokinin 1 Rezeptor (NK1R), welcher zu der Tachykininrezeptor-Subfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) gehört. Es kommt häufig zusammen mit CGRP (Wiesenfeld-Hallin et al. 1984) in nozizeptiven Neuronen vor (Hokfelt et al. 1975) und ist außerdem in entzündliche Prozesse involviert (Bozic et al. 1996).

Das vasoaktive intestinale Peptid (VIP) besteht aus 28 Aminosäuren und entsteht bei der Spaltung des Präkursors PräproVIP (Itoh et al. 1983). Es kommt hauptsächlich im Darm vor und wirkt als Neurotransmitter im zentralen und peripheren Nervensystem. VIP bindet an die VIP-Rezeptoren 1 (VPAC1) und 2 (VPAC2), welche zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren der Familie der Sekretin-ähnlichen GPCR gehören. Darüber vermittelt VIP Vasodilatation, Relaxation glatter Muskulatur, exo- und endokrine Sekretion, Wasser und Ionenaustausch, z.B. in der Lunge und dem Darm (zitiert nach Ballesta et al. 1985).

Das Neurofilament light (NF-L) gehört zu Familie der Typ IV Intermediärfilamente. Diese sind Bestandteile des Zytoskeletts von Neuronen. Sie bestimmen den Durchmesser des Axons und sind hauptsächlich in myelinisierten Axonen mit einem großen Durchmesser ($> 5 \mu\text{m}$), wie z.B. in peripheren Motoneuronen zu finden. Neurofilamente bestehen aus drei Untereinheiten, welche nach ihrem Molekulargewicht in NF-L (light, 68-70 kDa), NF-M (middle, 145-160 kDa) und NF-H (heavy, 200-220 kDa) unterschieden werden. Diese Untereinheiten lagern sich zu 10 nm langen Filamenten zusammen (als Zusammenfassung Lee & Cleveland 1996).

1.1.3 Funktion der Tuba uterina

Die Tuba uterina ist für eine problemlose Befruchtung und eine gesunde Entwicklung des Embryos von großer Bedeutung. Sie dient nicht nur dem Transport der Oozyte und der Spermien zum Ort der Befruchtung bzw. des Embryos zum Uterus, sondern stellt außerdem ein geeignetes Umfeld sowohl für die Befruchtung, als auch für die ersten Tage der Entwicklung des Embryos zur Verfügung. Außerdem findet hier die Selektion gesunder, kräftig schlagender Spermien für die Befruchtung statt. Nach Erreichen der Tuba uterina binden viele Spermien im sogenannten Spermienreservoir an ziliotragende Zellen des Epithels; dort wird auch nach der Ovulation die Kapazitation und Hyperaktivierung der Spermien durchgeführt. In verschiedenen Spezies wurde gezeigt, dass ein kurzes Segment im distal zum uterotubaren Übergang gelegenen Isthmus als Spermienreservoir dient (Yanagimachi & Chang 1963; Harper 1973; Hunter & Nichol 1983; Suarez 1987; Suarez et al. 1991). Dieses Reservoir stellt sicher, dass zum Zeitpunkt der Ovulation Spermien im Eileiter vorhanden sind, dass diese während der Lagerung fertil bleiben (Smith & Yanagimachi 1990; Pollard et al. 1991; Smith & Yanagimachi 1991) und es verhindert außerdem durch kontrollierte Freisetzung der Spermien Polyspermie (Hunter 1973; Hunter & Nichol 1988). Die Spermien binden mit der akrosomalen Region an ziliotragende Zellen des Ovidukts (Suarez 1987; Suarez et al. 1991). Diese gebundenen Spermien zeigen im Vergleich zur unselektierten Spermienpopulation und zu der nicht-gebundenen Spermienfraktion sowohl eine überlegene Fähigkeit, an die Zona pellucida der Oozyte zu binden, als auch eine höhere Fertilisationskompetenz (Gualtieri & Talevi 2003). Aufgrund ihrer veränderten Eigenschaften ist die Bindungskapazität von als Monolayern kultivierten oviduktalen Epithelzellen wesentlich niedriger als die von Eileiterexplanten (Sostaric et al. 2008). Die Bindungskapazität von Eileiterexplanten wiederum ist präovulatorisch wesentlich höher als nach der Ovulation (Sostaric et al. 2008). Aufgrund eines Ovulation-assoziierten Signals werden die Spermien hyperaktiviert und können das Spermienreservoir verlassen. Nur hyperaktivierte Spermien sind dazu fähig (Demott & Suarez 1992) und können später die Cumulusmatrix und die Zona pellucida der Oozyte durchdringen (Stauss et al. 1995). Dieses Ovulations-assoziierte Signal beruht eventuell auf sulfatierten Glycoconjugaten, wie z.B. Heparin-ähnlichen Glucosaminglycanen, welche um den Zeitpunkt der Ovulation herum in der Eileiterflüssigkeit in ihrer höchsten Konzentration vorkommen (Parrish et al. 1989a;

1989b; Talevi & Gualtieri 2001). Durch diese Mechanismen soll sichergestellt werden, dass nur gesunde Spermien die Oozyte erreichen, so können z.B. Spermatozoen mit fragmentierter DNA aussortiert werden (Ellington et al. 1999; Ardon et al. 2008; Hourcade et al. 2010). Außerdem verbessert Kokultur mit Zellen des Ovidukts die Qualität von Embryonen, z.B. wurden weniger Fragmentierung der Blastozysten (Bongso et al. 1989), eine verbesserte Blastomerbildung (Yeung et al. 1992) und eine höhere Anzahl von Zellkernen je Blastozyste beobachtet (Vlad et al. 1996). Klinische Studien zeigen eine verbesserte Embryonenqualität oder Schwangerschafts- bzw. Implantationsrate sowohl bei Kokultur mit humanen (Yeung et al. 1996) als auch bovinen Eileiterepithelzellen (BOEC) (Wiemer et al. 1993; Ellington et al. 1999). Dies wird darauf zurückgeführt, dass die biochemische Kommunikation zwischen Embryo und Ovidukt zu einer problemlosen Entwicklung des Embryos beiträgt. Aufgrund von hohem Aufwand und Kosten wird dieses Verfahren allerdings nur bei einer besonders schlechten Prognose des Paares eingesetzt (Wiemer et al. 1998).

Generell hat die Anwesenheit von Spermien bzw. eines Embryos eine modulatorische Wirkung auf das Proteom (Ellington et al. 1993; Georgiou et al. 2005) bzw. die Genexpression des Ovidukts (Fazeli et al. 2004; Georgiou et al. 2007).

1.1.3.1 Tubarer Transport

Der tubare Transport ist ein Zusammenspiel von Muskelkontraktionen und Aktivität der Zilien. Bisher ist unklar, welcher dieser Faktoren essenziell für die Funktion der Tuba uterina ist. So konnten Halbert et al. bereits 1976 zeigen, dass eine Blockade der Muskelkontraktionen mittels des β -Rezeptor Agonisten Isoproterenol zwar die sonst typischen Hin- und Herbewegungen der Oozyte in der Tuba uterina stoppt, die Oozyte den Ort der Fertilisation aber trotzdem in einer normalen Zeitspanne erreicht (Halbert et al. 1976). Halbert schloss daraus, dass die Aktivität der Zilien für den geordneten Transport des Embryos zum Uterus wichtiger ist als die Aktivität der Muskulatur. Außer β -Agonisten wie Isoproterenol haben auch α -Agonisten wie Noradrenalin, aber auch cholinerge Agonisten wie ACh Einfluss auf die Kontraktilität der Tuba uterina (Samuelson & Sjostrand 1986). Sie wirken allerdings im Gegensatz zu β -Agonisten stimulierend (Samuelson & Sjostrand 1986). Trotz des bereits beschriebenen Einflusses der adrenergen Innervation auf die Kontraktilität der Tube scheint sie weder einen Einfluss auf die Fertilität im Allgemeinen noch auf den

Transport des Embryos zu haben (Johns et al. 1974; Johns et al. 1975; Eddy & Pauerstein 1980). Allerdings kann die Gabe des β -Agonisten Isoproterenol die durch eine Endocannabinoidrezeptor 1 (CB1)-Defizienz hervorgerufene Retention des Embryos im Ovidukt aufheben (Wang et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die Kontraktilität zyklusabhängigen Veränderungen unterworfen ist (Lindblom et al. 1980). Der Transport wird also von ovariellen Hormonen, wie Östrogen und Progesteron (Meiri et al. 1978; Lindblom et al. 1980; Croxatto 2002), aber auch systemischen Hormonen, wie Prostaglandinen (Lindblom et al. 1978; Wanggren et al. 2006; Wanggren et al. 2008) und Signalmolekülen der Eizelle (Ortiz et al. 1986) bzw. des Embryo selbst (Ortiz et al. 1989; Velasquez et al. 1995) gesteuert. Auch die Zilienschlagfrequenz wird von Hormonen, wie z. B. Progesteron (Mahmood et al. 1998; Paltieli et al. 2000) beeinflusst. Progesteron führt zu einer Reduktion der Zilienschlagfrequenz (Mahmood et al. 1998; Paltieli et al. 2000) wohingegen Follikelflüssigkeit die Zilienschlagfrequenz steigert (Lyons et al. 2006). McComb et al. konnten zeigen, dass die korrekte Schlagrichtung der Zilien wichtig für den problemlosen Transport des Embryos ist. Sie zeigten dies, indem sie bei Kaninchen ein Stück Ampulla entnahmen und verkehrt herum wieder einsetzten. Nach dieser Veränderung kam es nur in Ausnahmefällen zu einer Trächtigkeit (McComb et al. 1980). Der durch die in Richtung Ovar schlagenden Zilien hervorgerufene Flüssigkeitsstrom konnte also nicht überwunden werden (McComb et al. 1980). Die Wichtigkeit der ziliären Aktivität für den problemlosen Transport des Embryos und damit auch für die erfolgreiche Implantation im Uterus zeigt sich auch dadurch, dass bei Frauen mit tubaren Graviditäten eine starke Deziliation der Mukosa beobachtet wurde (Vasquez et al. 1983). Andererseits können Frauen mit dem Kartagener Syndrom, welches unter anderem zu immotilen Zilien sowohl im Respirations- als auch im Reproduktionstrakt führt, fertil sein (Afzelius et al. 1978; McComb et al. 1986). Dies spricht wiederum gegen eine notwendige Rolle der Zilien beim Embryotransport. Popescu et al. konnten 2005 im Eileiter, ähnlich wie im Darm, oviduktale, interstitielle Cajalzellen ähnliche Zellen (interstitial Cajal-like cells, ICLC= Telocyte; Popescu und Faussone-Pellegrini 2010) nachweisen (Popescu et al. 2005; 2007). Im Darm dienen Cajal-Zellen (ICC) als Schrittmacherzellen der Peristaltik (Barajas-Lopez et al. 1989; Ward et al. 1994). Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass diese ICLCs auch für die Peristaltik des Eileiters verantwortlich sein könnten (Dixon et al. 2009). Diese Zellen bilden, assoziiert mit glatten Muskelzellen,

ein enges Netzwerk um die Tuba uterina (Popescu et al. 2005; 2007; Dixon et al. 2009). Mittels eines neutralisierenden Antikörpers gegen den Biomarker für ICCs (c-KIT; Ward et al. 1994) konnten die Kontraktionen der Tuba uterina gestoppt werden (Dixon et al. 2009). Die von diesen Zellen generierten langsamen elektrischen Wellen sind abhängig von intra- und extrazellulärem Ca^{2+} (Dixon et al. 2011a), genauer gesagt von Ca^{2+} -aktivierten Chlorid-Kanälen (Anoctamin 1, Tmem16a; Dixon et al. 2011b). Außerdem exprimieren diese Zellen Östrogen- und Progesteronrezeptoren (Cretoiou et al. 2009). Im Magen konnte gezeigt werden, dass die von ICCs erzeugten langsamen elektrischen Wellen über den muskarinischen Rezeptor M3 reguliert werden (Kim et al. 2003). Diese neuen Erkenntnisse könnten eventuell eine Erklärung für die Regulation der Kontraktilität der Tuba uterina darstellen.

1.1.3.2 Funktionstörungen des tubaren Transports

Etwa 1-2 % aller Schwangerschaften entwickeln sich außerhalb des Uterus (CDC MMWR 1995; Boufous et al. 2001), davon sind etwa 98% Eileiterschwangerschaften, wobei es in etwa 70% der Fälle zu einer Einnistung des Embryos in der Ampulla kommt (Bouyer et al. 2002). Auch heutzutage sterben noch Frauen an den Folgen einer Eileiterschwangerschaft, zwischen 2003 und 2005 in Großbritannien z.B. etwa 0,35 von 1000 betroffenen Frauen (Lewis 2007). Als Risikofaktoren für extrauterine Graviditäten sind z.B. Verletzung der Tube aufgrund von Operationen oder Infektionen (z.B. Chlamydia trachomatis), Rauchen und in vitro Fertilisation bekannt. Diese Faktoren beeinträchtigen entweder den Transport in der Tube und/oder führen zu einer frühzeitigen Implantation durch eine ungünstige Veränderung des Milieus der Tuba uterina. Bei Shaw et al. (2010) sind die Forschungsergebnisse zu den verschiedenen Risikofaktoren ausführlich zusammengefasst (Shaw et al. 2010). Eine Infektion mit Chlamydien führt im Ovidukt der Maus z.B. zu einem Verlust der ICLC Schrittmacherzellen (Dixon et al. 2009). Außerdem ist seit langem bekannt, dass Rauchen einen negativen Einfluss auf sowohl die weibliche als auch die männliche Reproduktionsfähigkeit hat. Bei Frauen führt es unter anderem zu einer veränderten Steroidsynthese, Follikulogenese, Embryoentwicklung, Embryotransport, Implantation und Plazentation (als Zusammenfassung siehe z.B. Dechanet et al. 2011). Direkt messbare Effekte auf die Funktion der Tuba uterina zeigen sich z.B. bei Messungen der Oozyten-

Aufnahmerate, Zilienschlagfrequenz und Kontraktilität. Viele Studien beschäftigen sich mit der Wirkung von Zigarettenrauch an sich auf die Funktion der Tuba uterina. So konnte gezeigt werden, dass Haupt- und Nebenstromrauch sowohl auf die Oozyten-Aufnahmerate, die Zilienschlagfrequenz und auch auf die Kontraktilität inhibierend wirkt (Knoll et al. 1995; Gieseke & Talbot 2005; Riveles et al. 2007). Eine Aufschlüsselung nach verschiedenen Giftstoffen zeigt z.B., dass sowohl Pyrazine (Riveles et al. 2004) als auch Phenole (Riveles et al. 2005) eine inhibierende Wirkung auf diese drei Bioassays haben. Auch Nikotin hat negative Effekte auf die Reproduktion im Allgemeinen und auf die Funktion der Tuba uterina im Besonderen. So konnte gezeigt werden, dass Nikotin, vermutlich aufgrund einer verspäteten Progesteronsekretion, die Eizellteilung, den Eintritt des Embryos in den Uterus, die Blastozystenbildung und die Implantation des Embryos verzögert (Yoshinaga et al. 1979). Außerdem beeinflusst Nikotin die Kontraktilität der Tuba uterina des Rhesusaffen (Neri & Marcus 1972) und reduziert in der Ratte den Blutfluss in der Tuba uterina und die Proliferation des Embryos (Mitchell & Hammer 1985). Nikotinlevel, welche tatsächlich einen physiologischen Effekt haben könnten, wurden z.B. in der Uterusflüssigkeit (McLachlan et al. 1976), dem zervikalen Mukus (McCann et al. 1992) und der Follikelflüssigkeit (Weiss & Eckert 1989) von Raucherinnen gemessen. Kürzlich wurde der Einfluss des Nikotinmetaboliten Cotinin über die nAChR Untereinheit $\alpha 7$ auf die Expression des Prokinectinrezeptors 1 (PROKR1) in der Tuba uterina beschrieben (Shaw et al. 2010). Prokinectinen (PROK) wird eine Beteiligung an der Regulation der Angiogenese, der Kontraktilität glatter Muskelzellen und an der Regulation der Implantation zugesprochen (Maldonado-Perez et al. 2007). In Proben von Frauen mit ektopischen Schwangerschaften wurde eine Reduktion von PROKR-Transkripten im Vergleich zu nicht schwangeren Frauen festgestellt (Shaw et al. 2010).

1.2 Neuronales und non-neuronales cholinerges System

Acetylcholin (ACh) ist ein weitverbreiteter Neurotransmitter des zentralen und peripheren Nervensystems. Es dient unter anderem als Transmitter an neuromuskulären Endplatten, peripheren Ganglien und im Parasympathikus. ACh ist evolutionär gesehen aber wesentlich älter als die Entwicklung des Nervensystems (Wessler et al. 1999). Es wurde in Bakterien, Pflanzen, Protozoen und Pilzen nachgewiesen (als Zusammenfassung z.B.: Rama Sastry und Sadavongvivad, 1979). Auch in höheren Organismen wurde ACh in non-neuronalem Gewebe detektiert, z.B. in Cornea (Williams & Cooper 1965), Plazenta (Comline 1946; Rama Sastry & Sadavongvivad 1979), Atemwegen (als Zusammenfassung: Wessler und Kirkpatrick 2001), Endothelium (Furchgott & Zawadzki 1980; Parnavelas et al. 1985), Immunzellen (Fuji et al. 1996; 1998) und Urothel (Chess-Williams 2002). Abgesehen von der Plazenta wurde das non-neuronale cholinerge System auch in anderen Organen des Reproduktionstrakts, z.B. im Ovar (Mayerhofer et al. 2003), Spermatozoen (Bishop et al. 1976) und im Ovidukt des Schweins (Steffl et al. 2006) nachgewiesen. Die sogenannte „non-neuronale“ Funktion von ACh wurde erstmals 1963 von Whittaker et al. angenommen (Whittaker et al. 1963). Durchsetzen konnte sich dieses Konzept aber erst Ende des 20. Jahrhunderts mit den Arbeiten von Grando (Grando 1997), Wessler und Kirkpatrick (Klapproth et al. 1997; Wessler et al. 1998; 1999) und Kawashima (Fujii et al. 1996; 1998; Kawashima et al. 1998). Im non-neuronalen Gewebe dient ACh als para- und autokrines Signalmolekül. Es reguliert viele grundlegende Zellfunktionen, wie z.B. Mitose, Zelldifferenzierung, Organisation des Zytoskeletts, Zell-Zell Kontakte, Zilienschlag, Sekretion und Immunfunktionen (Wessler et al. 1998).

1.2.1 Synthese, Speicherung und Freisetzung von ACh in einem cholinergen Neuron

Der hochaffine Cholinetransporter 1 (CHT1) transportiert Cholin an den Nervenendigungen ins Cytoplasma (Okuda & Haga 2000), dort wird es von dem Synthesenzym Cholinacetyltransferase (ChAT) mittels AcetylCoA zu ACh und Coenzym A azetyliert (Nachmansohn & Machado 1943). Daraufhin transportiert der vesikuläre Acetylcholintransporter (VAChT) ACh in die synaptischen Vesikel (Anderson et al. 1983; Erickson et al. 1994). Diese Vesikel fusionieren nach Nervstimulation und Calcium-Eintritt in die Nervenendigung mit der Zellmembran und

entlassen ihren Inhalt in den synaptischen Spalt. Fernandez-Busnadiego et al. konnten diesen lange bekannten Mechanismus erstmals 2010 mittels Cryoelektronentomographie sichtbar machen (Fernandez-Busnadiego et al. 2010). Diese Exozytose führt zu einer genau synchronisierten Freisetzung großer Mengen Transmitter. Auf der Zielzelle interagiert ACh dann mit nikotinischen (nAChR) oder muskarinischen (MR) ACh-Rezeptoren. Beide Rezeptortypen werden in späteren Abschnitten genauer besprochen. Die durch die Bindung des Transmitters an die Rezeptoren ausgelöste Reaktion wird von der Acetylcholinesterase (AChE) terminiert, indem ACh in Cholin und Acetat hydrolysiert wird. Das Cholin wird daraufhin wieder von CHT1 in die Nervenendigung transportiert. Die Aufnahme von Cholin in die Zelle ist der geschwindigkeitsbegrenzende Schritt dieses Kreislaufs (Haga & Noda 1973). Inaktives CHT1 ist auf Vesikeln lokalisiert, durch Verschmelzen dieser Vesikel mit der Zellmembran wird weiteres CHT1 zum Transport von Cholin in die Zelle zur Verfügung gestellt (Ribeiro et al. 2003). Über diesen Prozess kann die Aufnahme von Cholin in die Zelle reguliert werden (Taylor & Brown 2006).

1.2.2 Unterschiede zwischen dem neuronalen und non-neuronalen cholinergen System

Da das neuronale System evolutionär gesehen aus dem non-neuronalen System entstanden ist, sind im non-neuronalen System weniger spezialisierte, langsamere und zueinander redundante Systeme vorhanden. So gibt es zu allen bereits im obigen Abschnitt beschriebenen Schritten alternative Enzyme und Transporter, welche in verschiedenen Organen in verschiedenen Kombinationen vorkommen können. Im Folgenden werden die möglichen Alternativen zusammengefasst. Auch die Annahme, dass ChAT, VAChT und CHT1 exklusiv in neuronalem Gewebe anzutreffen sind, ist widerlegt. So ist mittlerweile bekannt, dass CHT1 auch in non-neuronalen Zellen, wie z.B. Keratinozyten (Haberberger et al. 2002), ziliotragenden Zellen der Trachea (Pfeil et al. 2003) und Arterien (Lips et al. 2003) vorhanden ist. Auch VAChT kommt nicht nur in der Synapse, sondern auch in non-neuronalen Zellen, wie z.B. Neuroendokrinen Zellen (Adriaensen et al. 2003; Song et al. 2003a; 2003b) und sekretorischen Zellen der Trachea (Lips et al. 2005) vor. Generell dominieren aber in non-neuronalen Zellen Freisetzungsmechanismen, welche nicht wie bei der Exozytose schnell große Mengen an Transmitter, sondern langsam und

kontinuierlich kleinere Mengen an ACh freisetzen. Dies geschieht z.B. mittels organischer Kationentransporter (OCT1-3, Mitglieder der Solute Carrier Familie 22), welche abhängig von Substratkonzentration und elektrischem Potenzial verschiedene organische Kationen in beide Richtungen über die Plasmamembran transportieren können (Koepsell et al. 2003). Erstmals gezeigt wurde dies für ACh in der Plazenta (Wessler et al. 2001). Indem *Xenopus* Oozyten mit humanen bzw. Ratten OCTs transfiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass OCT1 und 2, aber nicht 3 zum Transport von ACh in der Lage sind (Lips et al. 2005). Außer den OCTs sind auch andere niedrig affine Cholinaufnahmesysteme, wie die Choline Transporter like Transporter (CTL, Mitglieder der Solute Carrier Familie 44) vorhanden. Niedrig affine Cholinaufnahmesysteme gibt es in allen Geweben (Taylor & Brown 2006). Ein weiterer, allerdings umstrittener, Freisetzungsmechanismus ist der über das sogenannte Mediatophor, ein Proteolipid, welches ursprünglich in der Plasmamembran des elektrischen Organs des Zitterrochens entdeckt wurde (Israel et al. 1986). Dieses Proteolipid soll eventuell über Bildung einer Fusionspore zwischen Vesikel und Plasmamembran ACh aus der Zelle transportieren (Morel 2003). Das Säugerhomolog dieses Proteolipids gehört zu der vakuolären H^+ -ATPase (V-ATPase, V_0 Untereinheit c). Non-neuronale Zellen, welche mit ChAT und Mediatophor kotransfiziert werden, sind in der Lage, ACh über die Plasmamembran zu transportieren (Morel 2003). Die ChAT hat eine hohe Spezifität für sein Substrat, das Cholin, kann aber verschiedene Substrate als Acylgruppendonator verwenden, unter Anderem Propionyl-CoA und Butyryl-CoA (Rossier 1977). Es können außer ACh also auch andere Cholinderivate gebildet werden, welche mit einer gewissen Affinität an die verschiedenen Rezeptoren binden können. ACh kann außer von ChAT auch von der eher ubiquitär vorkommenden Carnitintransferase (CarAT) synthetisiert werden (White & Wu 1973; Tucek 1982). Die zwei Formen von Cholinesterasen werden hauptsächlich nach ihrer Substratspezifität unterschieden (Augustinsson & Nachmansohn 1949). AChE hydrolysiert ACh mit der höchsten Substrat-Umsetzungsrate, die bisher in einem biologischen System gemessen wurde (Augustinsson & Nachmansohn 1949). Butyrylcholine oder andere Cholinderivate mit einer größeren Acylgruppe werden dagegen sehr langsam hydrolysiert (Augustinsson & Nachmansohn 1949). AChE kommt hauptsächlich in cholinergen Nervenfasern und Synapsen vor, außerdem ist es auch in non-neuronalen Zellen, wie z.B. Fibroblasten, den nicht innervierten Teilen der Skelettmuskulatur (Rama

Sastry & Sadavongvivad 1979) und Erythrozyten (Alles & Hawes 1940) vorhanden. Auch die Butyrylcholinesterase (BChE) kann ACh spalten. BChE wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert und kommt im Blutplasma aber auch in fast allen anderen Geweben, z.B. der Lunge und der glatten Muskulatur vor (Small et al. 1990; Adler et al. 1991; Norel et al. 1993). Diese ubiquitäre Präsenz von Cholinesterasen führt zu einer lokalen Begrenzung der Wirkung von non-neuronalem ACh.

1.2.3 Acetylcholinrezeptoren

Auf der Zielzelle bindet ACh entweder an ionotrope nikotinsche (nAChR) oder G-Protein gekoppelte metabotrope muskarinische Rezeptoren (MR). Beide Rezeptortypen kommen auf Säugerneuronen, cholinerg innervierten Zellen, aber auch auf nicht innervierten Zellen vor. Klassischerweise kommen nAChR an der neuromuskulären Endplatte vor. Sie werden in muskuläre und neuronale, welche allerdings auch im non-neuronalen Gewebe vorkommen, Typen unterteilt. In der Peripherie vermitteln MR z.B. die Kontraktion glatter Muskulatur und die Sekretion von Drüsen.

1.2.3.1 Nikotinsche Acetylcholinrezeptoren

Bereits 1907 wurde die „nikotinsche rezeptive Substanz“ an der neuromuskulären Endplatte entdeckt (Langley 1907). Ende der 60er Jahre konnten nAChR dann als erster Rezeptor eines Neurotransmitters mit Hilfe des Schlangengiftes α Bungarotoxin (α BTX) aus dem elektrischen Organ des Stachelrochens isoliert werden (Changeux et al. 1970; Cohen et al. 1972). nAChR gehören zu der Superfamilie der Liganden bindenden Ionenkanäle und werden aufgrund ihrer speziellen Struktur auch Cys-Loop Rezeptoren genannt. Zu dieser Superfamilie gehören unter anderem auch Serotonin-, GABA- und Glycinrezeptoren. Die Mitglieder dieser Superfamilie weisen eine große Sequenzhomologie auf (als Zusammenfassung siehe z.B. Karlin & Akabas 1995; Ortells & Lunt 1995). Vermutlich aufgrund dieser Ähnlichkeit können Liganden anderer Rezeptoren, wie z.B. Strychnin als Ligand des Glycinrezeptors oder Serotonin modulierend auf nAChR einwirken (zusammengefasst in Arias 2000). Diese Rezeptoren kommen in 4 funktionellen Konformationen vor: geschlossen, offen und in zwei desensitisierten Konformationen (Galzi & Changeux 1995; Galzi et al. 1996). „Fast-onset“ desensitisierte Rezeptoren können innerhalb von

Millisekunden, „slow-onset“ desensitisierte Rezeptoren innerhalb von Minuten wieder aktiviert werden. Ohne Agonist ist die geschlossene Konformation die stabilste, bei Anwesenheit eines Agonisten ist die „slow-onset“ desensitisierte Konformation am stabilsten. nAChR sind sogenannte allosterische Rezeptoren, das heißt, sie besitzen außer Bindungsstellen für ihren Liganden, an die auch kompetitive Antagonisten binden können, auch Bindungsstellen für nicht-kompetitive Agonisten (Monod et al. 1965; Changeux & Edelstein 1998). Die Bindungsstellen für nicht-kompetitive Agonisten, wie z.B. Physostigmin, Galanthamin, Codein und Serotonin sind auch auf der α -Untereinheit lokalisiert. Genaues zu den Bindungsstellen der verschiedenen Liganden kann z.B. bei Arias (2000) nachgelesen werden.

nAChR sind aus jeweils fünf Untereinheiten aufgebaute Ionenkanäle. Diese Untereinheiten sind symmetrisch um eine Pore herum angeordnet. Bisher sind insgesamt 10 verschiedene α -, 4 β - und jeweils eine γ -, δ - und ε -Untereinheit bekannt. Auch hier zeigen die verschiedenen Untereinheiten große Sequenzhomologien zueinander (Raftery et al. 1980; Noda et al. 1983; Ortells & Lunt 1995). Die Zusammensetzung der pentameren Ionenkanäle aus den verschiedenen Untereinheiten kann variieren, es gibt allerdings klassische Kombinationen, welche im Folgenden näher erläutert werden. Kombinationen unterschiedlicher Untereinheiten führen auch zu funktionell und pharmakologisch unterschiedlichen nAChR (zusammengefasst in McGehee und Role 1995). Diese Unterschiede betreffen die Kinetik der Kanäle und können z.B. die Ligandenspezifität und -affinität, die Kationenpermeabilität und das Verhalten der Kanäle bei Desensitisierung beeinflussen (Luetje & Patrick 1991; Covernton et al. 1994; Chavez-Noriega et al. 1997). Dementsprechend kommen verschiedene Kombinationen auch in unterschiedlichen Geweben vor. Aufgrund ihrer hauptsächlichlichen Lokalisation wurden die nAChR in zwei Gruppen unterteilt. Der Motortyp, welcher hauptsächlich an der Motorendplatte im Skelettmuskel und im elektrischen Organ des Stachelrochens vorkommt, und der neuronale Typ, welcher im ZNS und peripheren Nervensystem vorkommt. Mittlerweile ist bekannt, dass besonders die als neuronal bezeichneten Untereinheiten auch häufig in non-neuronalen Zellen vorkommen.

Der Motortyp setzt sich zusammen aus zwei α_1 - und jeweils einer β_1 -, δ - und ε -Untereinheit. Im fötalen Muskel ist die ε -Untereinheit durch eine γ -Untereinheit ersetzt (Takai et al. 1985; Mishina et al. 1986). Die Untereinheiten sind zirkulär in der Reihenfolge $\alpha\gamma\alpha\beta\delta$ angeordnet (Karlin et al. 1983). Die beiden Bindungsstellen für

ACh sind mittlerweile genau charakterisiert und liegen zwischen den Untereinheiten $\alpha\gamma$ bzw. ε und $\alpha\delta$ im aminoterminalen extrazellulären Bereich des Rezeptors (Arias 2000; Brejc et al. 2001). Der Kanal öffnet sich nur, wenn beide Bindungsstellen besetzt sind (Jackson 1989). Durch diese Bindungen ändert sich die Konformation des Rezeptors, der Ionenkanal wird geöffnet und abhängig vom elektrochemischen Gradienten können mono- oder divalente Kationen passieren. Bis zur Öffnung des Rezeptors dauert es nur wenige Millisekunden. Bereits 1957 konnten Katz und Thesleff zeigen, dass Motortyp-nAChR nach Ligandenbindung schnell desensibilisieren (Katz & Thesleff 1957). In der Motorendplatte liegen nAChR in subsynaptischen Falten mit Rapsyn assoziiert vor (Sealock et al. 1984). Die Rapsyn-Bindungsstelle liegt auf der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors. Rapsyn ist notwendig für korrektes Rezeptor-clustering (Phillips et al. 1991).

Der neuronale Typ besteht aus den als Homo- oder Heteropentamer angeordneten Untereinheiten $\alpha 2-10$ und $\beta 2-4$. Die Untereinheit $\alpha 8$ wurde bisher allerdings nur im Huhn nachgewiesen (Lukas et al. 1999). Die Bindungsstellen sitzen auch bei den neuronalen nAChR an den α -Untereinheiten, genauer gesagt an der Kontaktfläche zu den β - bzw. α -Untereinheiten. Heteromere nAChR haben demnach zwei Bindungsstellen, wohingegen Homomere bis zu 5 Bindungsstellen haben könnten (Arias 2000; Brejc et al. 2001). Neuronale nAChR desensibilisieren wie Motortyp-nAChR, dies ist allerdings von der Zusammensetzung der Rezeptoren aus den verschiedenen Untereinheiten abhängig. Im non-neuronalen Gewebe sind nAChR, nicht wie an der motorischen Endplatte und an Synapsen in Clustern organisiert, sondern sie sind gleichmäßiger verteilt.

Neuronale nAChR können nach ihrer Affinität für α BTX in toxinsensitive und -insensitive nAChR unterteilt werden. Zu den α BTX-sensitiven nAChR gehören neben den Muskeltyp-nAChR auch aus den Untereinheiten $\alpha 7, 8, 9, 10$ zusammengesetzte Homo- und Heteropentamere. Toxin-insensitive nAChR sind aus zwei $\alpha 2-6$ und drei $\beta 2-4$ Untereinheiten zusammengesetzte Heteropentamere (McGehee & Role 1995). Aus den Untereinheiten $\alpha 7, 8, 9$ und 10 zusammengesetzte nAChR haben außerdem eine größere Calciumpermeabilität als aus α - und β -Untereinheiten zusammengesetzte Rezeptoren. Die $\alpha 7$ - (Couturier et al. 1990) und die $\alpha 9$ -Untereinheiten (Elgoyhen et al. 1994) können funktionelle Homomere bilden. Außerdem können die $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -Untereinheiten, welche in mechanosensorischen

Haarzellen der Cochlea vorkommen, zusammen funktionelle Heteromere bilden (Elgoyhen et al. 2001). Für die Zusammensetzung der Toxin-insensitiven Kanäle aus α 2-6 und β 2-4 wurden bereits viele verschiedene funktionelle Kombinationsmöglichkeiten beschrieben, z.B. α 4 β 2 (Ramirez-Latorre et al. 1996; Fenster et al. 1999) und α 3(α 5) β 4 bzw. β 2 (Wang et al. 1996). Weitere mögliche Kombinationen werden z.B. bei Millar (2003) und McGehee und Role (1995) zusammengefasst, wobei die Untereinheiten α 5 und β 3 nur zusammen mit anderen α - und β -Untereinheiten funktionelle Kanäle bilden können (Ramirez-Latorre et al. 1996; Lindstrom 2000; Kuryatov et al. 2008). Neben der hohen funktionellen Variabilität durch die Zusammensetzung aus verschiedenen Untereinheiten können auch unklassische Liganden, wie z.B. Lynx1 aus der Ly6-Superfamilie, binden und die nAChR Reaktionen modulieren (Miwa et al. 1999) und damit die Variabilität noch weiter erhöhen. Diese unklassischen Liganden gehören damit zu derselben Superfamilie wie α BTX und Conotoxin (α CTX, Gift mariner Kegelschnecken). Verschiedene α CTX blockieren außerdem sehr spezifisch verschiedene nAChR-Untereinheiten (McIntosh et al. 1999; Arias 2000). Weiterhin ist eine direkte Interaktion mit anderen Rezeptoren möglich, wie sie z.B. für P2X-Rezeptoren und α 4 β 2-nAChR nachgewiesen wurde (Khakh et al. 2005).

1.2.3.2 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren

MR sind metabotrope Rezeptoren der Familie der GPCR. Sie besitzen sieben hydrophobe Transmembranhelices, welche durch je drei ex- und interne hydrophile Schleifen verbunden sind. Basierend auf Daten von kristallisiertem Rhodopsin (Schertler et al. 1993; Palczewski et al. 2000), einem anderen GPCR, wird angenommen, dass diese auch bei muskarinischen Rezeptoren kreisförmig angeordnet sind und in der Mitte eine Liganden-Bindungstasche bilden. Mittels Computerprogrammen konnte die 3D-Struktur von humanem M1 (Peng et al. 2006) und M3 (Ostopovici et al. 2007) vorhergesagt werden. Die Bindungsstelle von ACh konnte mittels Mutagenesedaten (zusammengefasst in Wess 1993) und Remodeling mittels Computerprogrammen (Peng et al. 2006) den Transmembranhelices 3, 6 und 7 zugeordnet werden. Das Coupling der verschiedenen G-Proteine erfolgt über die zytoplasmatischen Schleifen des Rezeptors, hauptsächlich der Schleife i3 (zusammengefasst in Wess 1993). Ein G-Protein ist ein Komplex aus den drei Untereinheiten α , β und γ . Im inaktiven Zustand bindet dieses Heterotrimer GDP und

kann so an einen Rezeptor binden. Wenn dieser Rezeptor aktiviert wird, wird GDP gegen GTP ausgetauscht und das Heterotrimer verliert seine Stabilität. Das G-Protein zerfällt in GTP und die α -Untereinheit sowie die $\beta\gamma$ -Untereinheit. Die α -Untereinheit hydrolysiert daraufhin GTP wieder zu GDP und interagiert mit dem Effektorprotein, woraufhin z.B. die Bildung oder Freisetzung von nachgeschalteten „second messengern“ stimuliert oder inhibiert wird. Mittlerweile weiß man, dass die nachgeschalteten Signalwege nicht nur von der α -Untereinheit, sondern auch von der $\beta\gamma$ -Untereinheit abhängen (als Zusammenfassung z.B. bei Clapham & Neer 1997).

Die 5 Subtypen (M1-M5; Hall et al. 1993) wurden ursprünglich über ihre unterschiedlichen Affinitäten zu verschiedenen Agonisten/Antagonisten charakterisiert (als Zusammenfassung siehe Hall et al. 1993; Eglén et al. 1996). Ihre Gene sind in der kodierenden Region intronlos und weisen starke Homologien zueinander auf (Hall et al. 1993). Die größten Sequenzunterschiede sind im N- und C-Terminus sowie in der bereits erwähnten zytoplasmatischen Schleife i3 zu finden (Hulme et al. 1990). Diese Subtypen können nach ihrem bevorzugt verwendeten Signalweg in zwei Gruppen eingeteilt werden. M1, 3 und 5 verwenden Pertussistoxin (PTX) insensitive G-Proteine der Familie $G_{\alpha_q}/G_{\alpha_{11}}$, welche die Phospholipase C aktivieren (Smrcka et al. 1991; Berstein et al. 1992). Dies führt zur Bildung von Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) was wiederum intrazelluläre Ca^{2+} -Lager öffnet und die Proteinkinase C (PKC) aktiviert (Caulfield & Birdsall 1998). M2 und M4 verwenden bevorzugt PTX-sensitive G-Proteine der Familie $G_{\alpha_i}/G_{\alpha_0}$, um die Adenylatcyclase zu inhibieren (Parker et al. 1991). Neben diesen bevorzugten Signalwegen gibt es weitere mögliche Signalwege. So kann M3 neben der Phospholipase C auch die Phospholipase D (Mamoon et al. 1999) und Tyrosinkinasen (Inoue et al. 1994) aktivieren (siehe auch Felder 1995), außerdem die Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK; Larocca & Almazan 1997) und rho-Kinasen (Schmidt et al. 1999). Die Subtypen M2 und M4 können die ATP-induzierte Arachidonsäurefreisetzung steigern (Felder et al. 1991). Außerdem kann auch M2 mit MAP-Kinasen interagieren (Cook et al. 2000). All diese Signalwege werden z.B. bei Caulfield (1993), Felder (1995) und van Koppen und Kaiser (2003) zusammengefasst. Muskarinische Rezeptoren können außerdem spannungsabhängige Ionenkanäle in erregbaren Zellen regulieren (zusammengefasst bei Caulfield 1993), Dimere bilden, desensibilisieren und, um ihre

Anzahl auf der Zellmembran zu verringern, internalisiert werden (zusammengefasst bei van Koppen & Kaiser 2003).

Für MR ist nicht nur diese große Bandbreite an möglichen Signalwegen bekannt, sondern MR sind auch in praktisch allen neuronalen und non-neuronalen Geweben zu finden (siehe z.B. Eglén et al. 1996; Eglén 2006).

1.3 Ziel der Arbeit

ACh ist nicht nur einer der wichtigsten Neurotransmitter des zentralen und peripheren Nervensystems, sondern dient auch als para- und autokrines Signalmolekül in vielen non-neuronalen Zellen. Es ist an der Regulation grundlegender Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung, Sekretion und der ziliären Aktivität beteiligt (Wessler et al. 1998). ACh kann mit zwei verschiedenen Klassen von Rezeptoren interagieren, den G-Protein gekoppelten MR und den ionotropen nAChR. In verschiedenen Organen des weiblichen Reproduktionstrakts, wie z.B. der Plazenta (Rama Sastry et al. 1976) und dem Ovar (Mayerhofer et al. 2003), konnte der Nachweis für das Vorhandensein eines non-neuronalen cholinergen Systems bereits erbracht werden. Außerdem konnten Steffl et al. (2006) im Epithel des Eileiters des Schweins eine zyklusabhängige Expression des ACh-Syntheseenzym ChAT nachweisen (Steffl et al. 2006). Trotz der bekannten, eher schwach ausgeprägten cholinergen Innervation der Tuba uterina (Garcia-Pascual et al. 1996) löst die Stimulation mit ACh im Ovidukt des Kaninchens (Heilman & Reo 1977; Rajkumar & Sharma 1981) und des Menschen (Sandberg et al. 1960; Jankovic et al. 2004a; 2004b) Kontraktionen aus. Diese lassen sich durch Atropin blockieren (Heilman & Reo 1977). Jankovic et al. führen sie auf Interaktion mit dem M3 zurück (Jankovic et al. 2004a; 2004b). Nicht nur MR, sondern auch nAChR haben einen Einfluss auf die Funktion der Tuba uterina. So ist z.B. bekannt, dass rauchende Frauen ein erhöhtes Risiko für Eileiterschwangerschaften und andere Komplikationen während der Schwangerschaft haben (Ankum et al. 1996; Castles et al. 1999). Viele Untersuchungen zum Einfluss des Rauchens auf die Schwangerschaft und Reproduktion im Allgemeinen zeigen, dass Rauchen Einfluss auf jedes Stadium der Reproduktion, u.a. Follikulogenese, Embryoentwicklung, Embryotransport und Implantation, hat (Dechanet et al. 2011). Da Zigarettenrauch ein Gemisch aus vielen tausend Komponenten und Giftstoffen ist, ist klar, dass nicht all diese Effekte durch Nikotin hervorgerufen werden. So konnte gezeigt werden,

dass bereits sehr geringe Dosen von Pyrazinen (Riveles et al. 2004) und Phenolen (Riveles et al. 2005) Einfluss auf die Oozyten-Aufnahmerate, Zilienschlagfrequenz und Kontraktionen der glatten Muskulatur der Fimbrie des Hamsters haben. Allerdings konnte schon 1979 gezeigt werden, dass die Gabe von Nikotin die Implantation der Eizelle verzögert (Yoshinaga et al. 1979). Außerdem hat Nikotin Einfluss auf die Motilität der Tuba uterina (Neri & Marcus 1972), ihre Blutversorgung und die Entwicklung des Embryos (Mitchell & Hammer 1985). Hohe Nikotinspiegel wurden z.B. in der Uterusflüssigkeit (McLachlan et al. 1976), dem zervikalen Mukus (McCann et al. 1992) und der Follikelflüssigkeit (Weiss & Eckert 1989) von Raucherinnen detektiert. Außerdem steigert Cotinin, ein Nikotinmetabolit, in der Tuba uterina die Expression von PROKR1 mittels der nAChR Untereinheit $\alpha 7$ (Shaw et al. 2010). All dies sind Hinweise auf ein endogenes cholinerges System in der Tuba uterina, dessen zelluläre und molekulare Komponenten bisher noch nicht genauer untersucht wurden. So sollte diese Studie Einblick in die grundlegenden Eigenschaften des cholinergen Systems im Eileiter der Maus geben. Expression und Lokalisation der verschiedenen Komponenten des cholinergen Systems sollten unter Berücksichtigung des Zyklusstandes bzw. der Trächtigkeit der Tiere untersucht werden. Dies wurde mittels eines Wildtypstammes (WT, C57Bl6) und zwei verschiedener transgener Mausstämme (Tabac-Maus, Frahm et al. 2011; ChAT-eGFP-transgene Maus, Tallini et al. 2006) untersucht. ACh-Messungen wurden mittels HPLC in Proben von Ampulla bzw. Isthmus und mittels DESI (Desorption electrospray ionisation) auf der Oberfläche des Epithels durchgeführt. Zusätzlich wurden Calcium-Imaging-Experimente an isolierten Zellen von WT-, M1KO- (Fisahn et al. 2002) und M3KO-Mäusen (Yamada et al. 2001) durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden spezifiziert pathogenfreie weibliche Mäuse (zwischen 10 und 35 Wochen alt) der Zuchtlinie C57Bl6 verwendet, die sowohl vom Zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität Gießen als auch von den Charles River Laboratorien (Sulzfeld) bezogen wurden. Außerdem wurden Linien von Knockout- bzw. transgenen Tieren verwendet. Bei den Knockouttieren handelte es sich um weibliche Muskarin-Rezeptor M1- (Fisahn et al. 2002), M3- (Yamada et al. 2001), bzw. M2 und M3-Doppelknockouttiere (Struckmann et al. 2003), die im Zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität Gießen gehalten wurden (Wildtyp jeweils C57Bl6). Desweiteren wurden transgene Mäuse, welche eGFP unter der Kontrolle des Promotors für den nikotinischen Rezeptor $\alpha 3$ (Tabac-Maus, transgene $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ -Gencluster-Maus, Wildtyp: FVB; Frahm et al. 2011; Krasteva et al. 2011) und transgene Mäuse, welche eGFP unter der Kontrolle des Promotors der Cholineacetyltransferase (ChAT(Bac)-eGFP-Maus, Wildtyp: C57Bl6; Tallini et al. 2006) exprimieren, verwendet. Alle Tiere wurden in Käfigen mit einer ad libitum Wasser- und Futtersversorgung, sowie einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h gehalten. Alle Versuche wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt.

2.1.2 Chemikalien/Pharmaka

Pharmaka	Quelle	Konzentration
Acetylcholinchloride	Sigma-Aldrich, Steinheim	10^{-5} M
Adenosin 5'-triphosphat	Sigma-Aldrich	10^{-5} M
Atropinsulfat	Sigma-Aldrich	10^{-6} M
Mecamylamin	Sigma-Aldrich	10^{-5} M
Muskarinchlorid	Sigma-Aldrich	10^{-5} M
Nikotintartrat	Sigma-Aldrich	10^{-4} M
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim	

Tab. 2.1: Liste der verwendeten Pharmaka

2.1.3 Antikörper

Antigen	Code/ Klon	Wirt	Fixierung	Blocklösung	Verdünnung	Quelle
CD5	YTS 121.5.2	Ratte monoklonal	PFA	Histoblock 5% Mausserum	1:20	AbD Serotec Düsseldorf
CD19	6D5	Ratte monoklonal	PFA	Histoblock 5% Mausserum	1:120	AbD Serotec
CGRP	BT17-2090-07	Ziege polyklonal	PFA	Histoblock	1:4000	Biotrend Köln
CGRP	T-4032	Kaninchen polyklonal	PFA Zamboni	Histoblock	1:3200	Peninsula San Carlos CA, USA
CHT1		Kaninchen polyklonal	PFA	Histoblock	1:2000	Dr. J. Pineda Antikörper- Services Berlin
eGFP	NB100-1614	Huhn polyklonal	PFA	Histoblock	1:8000	Novus Biol. Littleton, CO USA
M2-Rezeptor	M2-2-B3	Ratte monoklonal	Aceton	Histoblock	1:600	Millipore Billierica MA, USA
Neurofilament light	AB9568	Kaninchen polyklonal	PFA	Histoblock	1:500	Millipore
NPY	85061	Schaf polyklonal	Zamboni	Histoblock	1:1000	Blessing et al. 1986
NPY	N9528	Kaninchen polyklonal	PFA	Histoblock	1:2500	Sigma Saint Louis MI, USA
OCT2	OCT21-A	Kaninchen polyklonal	Aceton	50% Pferdeserum	1:200	αDiagnostics San Antonio TX, USA
OCT3	OCT31-A	Kaninchen polyklonal	Aceton	50% Schweine serum	1:200	αDiagnostics
hOCT3		Kaninchen polyklonal	Aceton	50% Pferdeserum	1:500	Lips et al. 2005
PGP 9.5	7863-0507	Kaninchen polyklonal	PFA	Histoblock	1:5000	Biotrend
SMA	1A4	Maus monoklonal	PFA Zamboni	Histoblock	1:500	Sigma
SP	NC1/34HL	Ratte monoklonal	PFA	Histoblock	1:400	Böhringer Ingelheim Ingelheim
TH	TZ1010	Kaninchen polyklonal	PFA Zamboni	Histoblock	1:400	Biotrend
VACHT	BT1007	Ziege polyklonal	PFA	Histoblock	1:4000	Biotrend
VIP	B-34	Kaninchen polyklonal	PFA	Histoblock	1:200	MiLab Malmö Schweden

Tab. 2.2: Liste der verwendeten Primärantikörper und der jeweiligen für die Immunhistochemie verwendeten Fixierungs- und Vorinkubationslösungen („Blocklösung“). PFA (Paraformaldehyd) und Zamboni: Mäuse wurden wie in 2.2.1.3 beschrieben mit 4% PFA bzw. Zamboni perfundiert. Aceton: Gewebe wurde wie unter 2.2.1.2 beschrieben frisch entnommen, schockgefroren und nach dem Schneiden mittels Aceton auf dem Objektträger fixiert; siehe auch 2.2.3 Histoblock: 10% normales Pferdeserum, 0,5% Tween 20, 0,1% BSA in PBS mit doppelter Salzkonzentration

Antigen	Wirtsspezies	Konjugat	Verdünnung	Bezugsquelle
Huhn-IgG	Esel	FITC	1:400	Dianova, Hamburg
Huhn-IgG	Esel	Cy3	1:2000	Dianova
Kaninchen-IgG	Esel	Cy3	1:2000	Chemicon
Kaninchen-IgG	Esel	FITC	1:100	Dianova
Ratten-IgG	Esel	Cy3	1:1000	Dianova
Ratten-IgG	Esel	FITC	1:400	Dianova
Schaf-IgG	Esel	Cy3	1:2000	Dianova
Ziegen-IgG	Esel	Cy3	1:800	Chemicon

Tab. 2.3: Liste der verwendeten Sekundärantikörper

2.1.4 Oligonukleotide

Für die qualitative und quantitative RT-PCR wurden bevorzugt intronspannende Oligonukleotide als Primer ausgewählt. Ausnahmen waren die Oligonukleotide für VACHT, die muskarinischen Acetylcholinrezeptorsubtypen, mit Ausnahme der mit „i“ gekennzeichneten Oligonukleotide, und das Oligonukleotidpaar für β 2-Microglobulin (β MG) mit 177 bp Produktlänge. In den folgenden Tabellen sind alle Angaben zu den Oligonukleotiden und PCR-Bedingungen zusammengefasst. Alle Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert. Diese Primer wurden wie unten angegeben von verschiedenen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe entworfen und auch bereits für verschiedene Veröffentlichungen verwendet (Lips et al. 2007; Zarghooni et al. 2007).

Gen	Sequenz [5'→3']	Produktlänge [bp]	Acc.Nr.	Annealing [°C]	MgCl ₂ [mM]
AChE For	atc tat ggg ggt ggt ttc tac a	150	NM_009559.3	59	2
AChE Rev	ggc ttc tct gct tcc tgg ta				
CarAT For	cta acc tcc aac cac cga aa	188	NM_007760.3	59	2
CarAT Rev	cca cca cca tgt agc atc tg				
ChAT For	cct gcc agt caa ctg tag cc	183	NM_009891	60	2
ChAT Rev	ata cag aga ggc tgc cct ga				
CHT1 For	cat cct cag cca cct atg ct	134	NM_022025	60	2
CHT1 Rev	tgg ata ccc gta ggc agt ct				
OCT1 For	gta agc tct gcc tcc tgg tg	187	NM_009202	61	2
OCT1 Rev	gta agc tct gcc tcc tgg tg				
OCT2 For	tac cgg agt ctc caa gat gg	170	NM_013667	59	2
OCT2 Rev	gac caa gtc cag gaa cga ag				
OCT3 For	cct cct cta tta ctg ggt ggt	165	NM_011395.2	59	2
OCT3 Rev	ggg tta ctg act tct tca tct gt				
VACHT For	ttg atc gca tga gct acg ac	188	NM_021712	60	2
VACHT Rev	agg ctg ctc ggg ata ctt gt				

Tab. 2.4: Liste der verwendeten Oligonukleotide für die qualitative RT-PCR zum Nachweis cholinergischer Marker und organischer Kationentransporter. Diese Primer wurden von Katrin Lips und Petra Hartmann (ChAT, VACHT) aus unserer Arbeitsgruppe entworfen.

Material und Methoden

Gen	Sequenz [5'→3']	Produktlänge [bp]	Acc.Nr.	Annealing [°C]	MgCl ₂ [mM]
M1 For	cag tcc caa cat cac cgt ctt	441	NM_007698	60	2
M1 Rev	gag aac gaa gga aac caa cca c				
M1i For	gag aag cac tga agc tga gga c	237	NM_007698	58	1,5
M1i Rev	tca ctg tag cca gag aca gga g	324	NM_001112697		
M2 For	tgt ctc cca gtc tag tgc aag g	369	NM_203491	60	2
M2 Rev	cat tct gac ctg acg atc caa c				
M3 For	gta caa cct cgc ctt tgt ttc c	245	NM_033269	60	2
M3 Rev	gac aag gat gtt gcc gat gat g				
M3i For	cgt tct gac caa gtg acc aag c	186	NM_033269.4	60	1,5
M3i Rev	acc cag gaa gag ctg atg ttg g				
M4 For	cat cct ggt gat gct gtc ca	110	NM_007699	60	2
M4 Rev	tgc ctg agc tgg act cat tg				
M5 For	cag cgt ccc atg agg atg ta	216	NM_205783	60	2
M5 Rev	cca tgg act gtg gga agt ca				

Tab. 2.5: Liste der verwendeten Oligonukleotide für die qualitative RT-PCR zum Nachweis der muskarinischen Acetylcholinrezeptorsubtypen (M1-M5). Das Oligonukleotidpaar M1i erkennt zwei Splicevarianten von M1 mit 237 (NM_007698) bzw. 324 bp (NM_001112697) Länge. i: intronspannend. Diese Primer wurden, außer M1i und M3i, von Silke Wiegand (M1, M2, M3, M5) und Petra Hartmann (M4) aus unserer Arbeitsgruppe entworfen.

Gen	Sequenz [5'→3']	Produktlänge [bp]	Acc.Nr.	Annealing [°C]	MgCl ₂ [mM]
nAChR α2 For	ctc cca tcc tgc ttt cca g	116	NM_144803	59	2
nAChR α2 Rev	gtt tga aca ggc ggt cct c				
nAChR α3 For	cgc ctg ttc cag tac ctg tt	196	NM_145129	59	2
nAChR α3 Rev	cag agg gtt tcc att tca gc				
nAChR α4 For	ctc aga tgt ggt cct tgt cc	239	NM_015730	59	2
nAChR α4 Rev	ggt ggg tga ctg caa agt tc				
nAChR α5 For	cca gct aat gac cac caa cg	218	NM_176844	59	2
nAChR α5 Rev	gct gcg tcc aag tga cag t				
nAChR α6 For	cct gca ctg cgg ttt atg tc	232	NM_021369	59	2
nAChR α6 Rev	cag cca cag att ggt ctc ca				
nAChR α7 For	aca ata ctt cgc cag cac ca	144	NM_007390	59	2
nAChR α7 Rev	aaa cca tgc aca cca gtt ca				
nAChR α9 For	caa tgc tct gcg tcc agt ag	209	NM_001081104	59	2
nAChR α9 Rev	aca cca gat cgc tgg gaa tc				
nAChR α10 For	tct gct cct gct ctt tct cc	208	NM_001081424	59	2
nAChR α10 Rev	cca cag gta caa ggt cag ca				
nAChR β2 For	cgaagtgaagatgatgaccaga	107	NM_009602	58	2
nAChR β2 Rev	cgaagtgaagatgatgaccaga				
nAChR β3 For	cgatggaacggagagtaagg	217	ay574268	59	2
nAChR β3 Rev	agaggaagatgcggtaaga				
nAChR β4 For	atcagtgtgaatgagcgaac	152	NM_148944	58	1
nAChR β4 Rev	acgatgacaggcaaccagac				

Tab. 2.6: Liste der verwendeten Oligonukleotide für die qualitative RT-PCR zum Nachweis der nikotinischen Acetylcholinrezeptoruntereinheiten α und β. Diese Primer, außer β2 und 4, wurden von Katrin Lips aus unserer Arbeitsgruppe entworfen.

Material und Methoden

Gen	Sequenz [5' → 3']	Produktlänge [bp]	Acc.Nr.	Annealing [°C]	MgCl ₂ [mM]
βMGi 160 For	tggtgctgtctcactgacc	160	NM_009735	59	2
βMGi 160 Rev	ccgtcttcagcattggat				
βMG 177 For	atgggaagccgaacatactg	177	NM_009735	59	2
βMG 177 Rev	cagtctcagtgggggtgaat				
βMGi 150 For	accctggctttctgtgtct	150	NM_009735	59	2
βMGi 150 Rev	aatgtgaggcgggtggaa				

Tab. 2.7: Liste der verwendeten Oligonukleotide zum Nachweis des housekeeping-Gens β2-Microglobulin für die qualitative RT-PCR. Das Oligonukleotidpaar mit einer Produktlänge von 177 bp ist nicht intronspannend. Diese Primer wurden von Petra Hartmann aus unserer Arbeitsgruppe entworfen.

2.1.5 Molekularbiologische Kits

Folgende molekularbiologische Kits wurden nach Herstellerangaben verwendet:

- Qiaquick Gel Extraktion Kit (Qiagen, Hilden)
- Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen)
- RNeasy Micro Kit (Qiagen)
- RNeasy Mini Kit (Qiagen)
- RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen)

2.2 Methoden

2.2.1 Probengewinnung

Die Tiere wurden durch Inhalation einer Überdosis Isofluran (Baxter Deutschland GmbH) getötet.

2.2.1.1 Erstellung eines Vaginalabstrichs

Bei jedem Tier wurde aus der eröffneten Vagina ein Vaginalabstrich mit einem Q-Tip (Velveira, Düren) durchgeführt und die Zellen auf einem Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) ausgestrichen. Die Abstriche wurden getrocknet, 10 min in Methanol (Carl Roth, Karlsruhe) fixiert und anschließend 45 min mit einer Giemsa-Lösung (0,3 ml Giemsa (Fluka, Steinheim) in 10 ml Aqua dest.) gefärbt. Anschließend wurden sie mit Aqua dest. gespült, getrocknet und mit Eukitt Quick hardening Medium (Fluka) eingedeckelt. Anhand der unterschiedlich vorkommenden Zelltypen (Tab. 2.8, Abb. 2.1) und des Vorkommens von Schleim wurde folgende Zuordnung in Zyklusstadien vorgenommen:

Zyklusstand	Charakteristik
Proöstrus	Intermediärzellen, Parabasalzellen, Oberflächenzellen,
Östrus	Schollen
Metöstrus	Leukozyten, vereinzelt Schollen Oberflächenzellen und Intermediärzellen, Schleim
Diöstrus	viel Schleim, regenerierte Zellen, Leukozyten

Tab. 2.8: Übersicht über das Vorkommen zyklusabhängiger Zelltypen im Vaginalabstrich der Maus (nach Nelson et al. 1982).

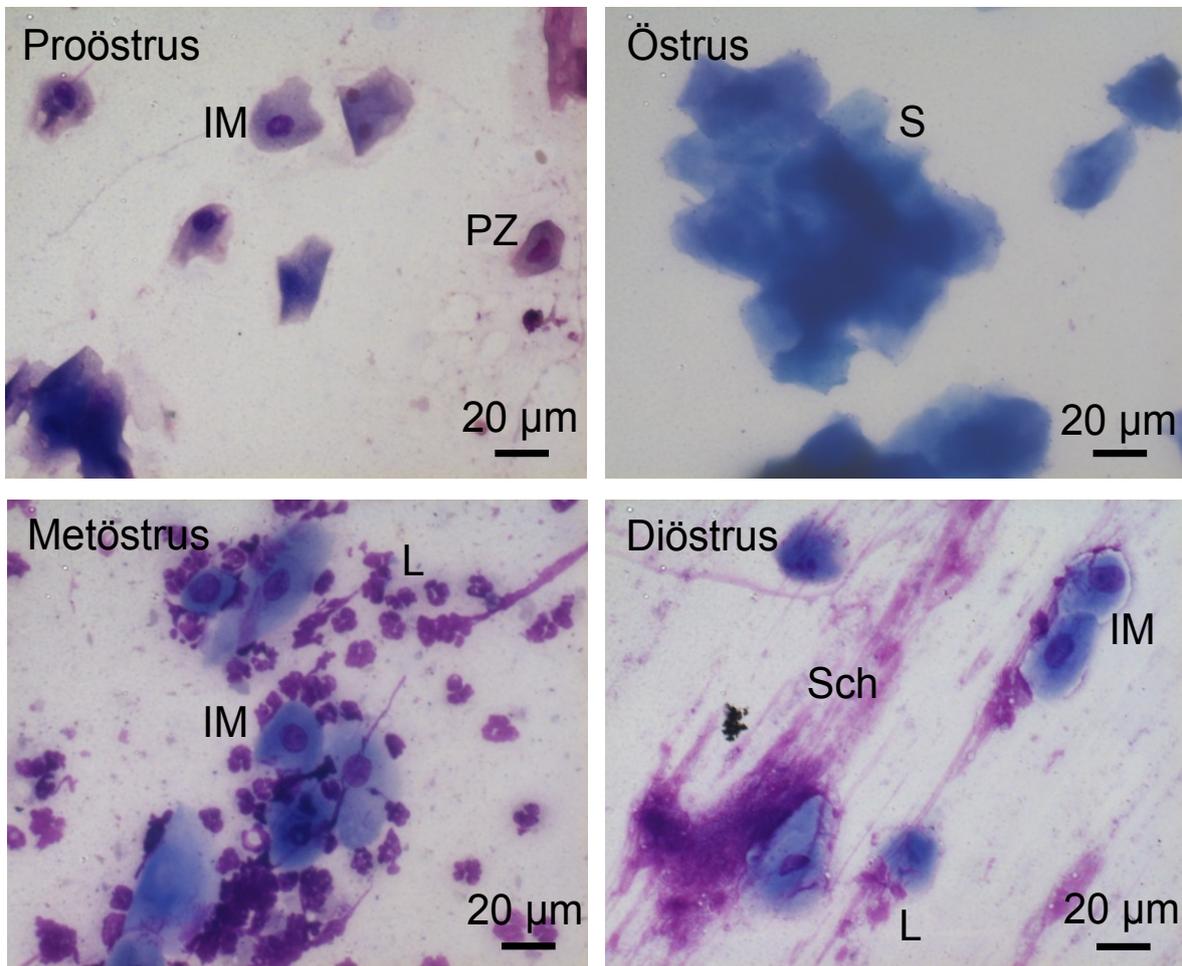


Abb. 2.1: Darstellung zyklusabhängig vorkommender Zelltypen im Vaginalabstrich der Maus mittels Giemsa-Färbung. (IM) Intermediärzellen, (L) Leukozyten, (PZ) Parabasalzellen, (S) Schollen, (Sch) Schleim.

2.2.1.2 Gewinnung von nativem Gewebe

Für die Immunhistochemie wurde der Eileiter in seinem natürlichen, eng gewundenen Zustand belassen. Es wurde die Bursamembran eröffnet, Fettgewebe, das Ovar und der Uterus entfernt und das Gewebe in schmelzendem Isopentan in Einbettmedium (O.C.T.-Compound, Sakura, Zoeterwoude, Holland) schockgefroren und bei -80°C gelagert. Als Positivkontrolle wurde je nach Experiment Trachea, Lunge oder Colon entnommen und auf dieselbe Art eingefroren.

2.2.1.3 Perfusionsfixierung

Der Thorax wurde eröffnet und das Herz freigelegt. Das rechte Herzohr wurde eingeschnitten, der linke Ventrikel kanüliert und das Blut mit einer Vorspüllösung (25 g/l Polyvinylpyrrolidon MG 40000, 9 g/l NaCl, 5 g/l Procainhydrochlorid in Wasser, 2 ml/l Heparin in Wasser (5000 I. E. /ml; Ratiopharm, Ulm), pH 7,4) aus dem Kreislauf gewaschen. Anschließend wurde das Tier durch die liegende Kanüle mit dem Fixans (4% Paraformaldehyd (PFA) in 0,1 M Phosphatpuffer (PP), pH 7,4 bzw. Zambonifixans: 2% Formaldehyd, 15% Pikrinsäure in 0,1 M PP) perfundiert, die Gewebe entnommen und für 1 h in dem Fixans nachfixiert. Dann wurde das Gewebe über mehrere Stunden in 0,1 M PP (pH 7,4) gewaschen, um Reste des Fixationsmittels zu entfernen. Zur Kryoprotektion wurden die Proben über Nacht im Kühlschrank in 18% Saccharose in PP gelagert. Am folgenden Tag wurden sie in Einbettmedium (O.C.T.-Compound, Sakura) schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.4 Gewinnung von Proben für die Reverse Transcriptase-Polymerasekettenreaktion

Für die RNA-Isolation wurde der Eileiter mit Ovar und einem Teil Uterus entnommen und in eine mit Sylgardgel (9 Teile Sylgard 184 Base (Dow Corning GmbH, Wiesbaden); 1 Teil Sylgard 184 Härter (Dow Corning GmbH)) beschichtete Schale überführt. Dort wurde das Gewebe mit etwas HEPES-Ringer Puffer (KCl 5,6 mM, NaCl 136,4 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,2 mM, Glucose 11 mM, HEPES 10 mM; alle Reagenzien von Sigma-Aldrich; eingestellt auf pH 7,4 mit 1 M NaOH (Merck)) befeuchtet und das Ovar mit einer Minutie (Fiebig Lehrmittel, Berlin) befestigt. Während der Uterus mit einer Pinzette gehalten wurde, konnte die Bursamembran eröffnet, die Mesosalpinx entfernt und so der Eileiter vorsichtig entwunden werden. Nach dem Entwinden ist der Eileiter etwa 1 cm lang und die unterschiedlichen Segmente sind makroskopisch unterscheidbar. Der Eileiter wurde dann in Ampulla, Isthmus und uterotubaren Übergang (intramuraler Teil) unterteilt

und in RNAlater® (Qiagen) überführt. Die Proben wurden, je nach Länge der Lagerung, im Kühlschrank beziehungsweise bei -20°C gelagert. Zur Entnahme der Proben von trächtigen Tieren wurden zuerst jeweils zwei weibliche Tiere mit einem Männchen verpaart. Die weiblichen Tiere wurden daraufhin morgens und abends auf Vorhandensein eines Vaginalplugs untersucht, um festzustellen, ob eine Begattung stattgefunden hatte. Positive Tiere wurden, wie schon beschrieben, getötet, beide Eileiter entnommen und vorsichtig entwunden. Der Eileiter wurden in einen mit Sylgardgel beschichteten Delta T-Dish (0,17 mm, klar, Biotech Inc., Butler, USA) befestigt und mit Hilfe des Olympus BX61WI Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg) auf Anwesenheit von Embryonen untersucht. Lokalisation und Furchungsstadium der Embryonen wurden festgestellt.

2.2.2 Reverse Transcriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

2.2.2.1 Primerdesign

Es wurden für fünf Gene - muskarinischer Acetylcholinrezeptor M1 und M3, nikotinische Acetylcholinrezeptoruntereinheit $\beta 2$ und $\beta 4$ und Organischer Kationentransporter 3 - neue Primer entworfen. Dazu wurden Sequenzinformationen aus der pubmed genebank herangezogen und mit Hilfe des Programms Primer 3 geeignete Primer ausgewählt (Tab. 2.9). Jeder der ausgewählten Oligonukleotide überspannt mindestens ein Intron. Die PCR-Bedingungen dieser Oligonukleotide sind in den Tabellen 2.4, 2.5 und 2.6 angegeben. PCR-Produkte aller neu angefertigten Primer wurden wie im Abschnitt 2.2.2.3 beschrieben sequenziert, um ihre Spezifität zu überprüfen.

Gen	Genbank Acc. Nr.	Produktgröße (bp)	Position auf der mRNA	Anzahl der Introns
M1	NM_007698.3	237	406...645	1
	NM_001112697.1	324	406...737	2
M3	NM_033269.4	186	658...846	2
nAChR $\beta 2$	NM_009602	107	1491...1597	1
nAChR $\beta 4$	NM_148944	152	242...393	2
OCT3	NM_011395.2	165	1208...1350	2

Tab. 2.9: Für diese Arbeit neu entworfene Oligonukleotide für die PCR.

2.2.2.2 Qualitative RT-PCR

RNA-Extraktion

Die Proben wurden in Lysispuffer (RLT-Puffer, Qiagen) mit β -Mercaptoethanol überführt und 3 min in der Kugelmühle (MM 300, Retsch, Haan) zerkleinert. Die Gesamt-RNA wurde nach Herstellerangaben mit dem RNeasy Microkit (Qiagen) extrahiert, die Konzentration photometrisch bestimmt und die Proben bei -80°C eingefroren.

DNase-Verdau und reverse Transkription

Um Kontaminationen mit genomischer DNA zu entfernen, wurde 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNA einer Probe 20 min bei 37°C mit 1 μl DNase-I (1 U/ μl , Invitrogen), 1 μl 10 x DNase I Reaction Buffer (Invitrogen) und 8 μl Wasser (1 U/ μl , Invitrogen) inkubiert und das Enzym anschließend mit 1 μl Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, 25 mM, pH 8, Invitrogen) für 10 min bei 65°C inaktiviert. Der RNA wurde zuerst 1 μl dNTPs (jeweils 10 mM, Qiagen) und 1 μl oligo-dTs (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Eurofins MWG Operon) zugegeben. Dieser Ansatz wurde 5 min auf 65°C erhitzt, gefolgt von einem kurzen Abkühlen auf Eis. Daraufhin wurden 4 μl 5x First-Strand Buffer, 2 μl Dithiothreitol (DTT, 0,1 M) zugegeben und 2 min bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe der Reversen Transkriptase Superscript II (200 U/ μl , alle Reagenzien: Invitrogen) wurde die RNA 50 min bei 42°C in cDNA übersetzt. Anschließend wurde das Enzym 15 min bei 70°C inaktiviert und die cDNA bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Um Kontaminationen mit genomischer DNA detektieren zu können, wurde von jeder Probe eine Kontrollreaktion ohne reverse Transkriptase angefertigt.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Diese cDNAs wurden mit genspezifischen Primern (Tab. 2.4-7, Eurofins MWG Operon) für die verschiedenen Komponenten des cholinergen Systems amplifiziert. Wenn möglich, wurden zur Amplifikation intronspannende Primer verwendet, um mögliche Kontaminationen der Probe mit genomischer DNA erkennen zu können. Dies war für die muskarinischen Rezeptoren M1-M5 nur eingeschränkt möglich, da die kodierende Sequenz dieser Gene kein Intron beinhaltet (Eglen et al. 1996). Für die muskarinischen Rezeptoren M1 und M3 sind allerdings Introns im nicht kodierenden Bereich bekannt (M1: Carninci et al. 2005; M3: Gomeza & Wess 2008), Sequenz direkt veröffentlicht bei EMBL und genbank, Acc.Nr.: AF264050). Für diese

Gene konnten also intronspannende Primer (M1i, M3i) angefertigt werden. Aufgrund der hohen Variabilität der nicht kodierenden Regionen wurden mit Hilfe dieser Primerpaare jedoch jeweils zwei Isoformen detektiert. Diese Primerpaare eigneten sich deshalb nur für die qualitative PCR. Oligonukleotidpaar M1i erkennt zwei Splicevarianten von M1 mit 237 (NM_007698) bzw. 324 bp (NM_001112697) Länge. Das Oligonukleotidpaar M3i erkennt zwei 186 bzw. etwa 110 bp große Varianten (NM_033269.4).

Für die PCR wurde 1 µl cDNA, 2,5 µl Puffer II, 2 µl bzw. 1,5 µl MgCl₂ (bzw. 25 mM), 0,5 µl dNTP (10 mM), 0,5 µl einer Mischung aus Forward- und Reverseprimer (20 pM) und 0,1 µl AmpliTaq gold Polymerase (5 U/µl, alle verwendeten Reagenzien von Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) mit H₂O auf ein Endvolumen von 25 µl aufgefüllt. Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler (Mastergradient Personal, Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf) nach dem nachfolgend beschriebenen Protokoll. Zuerst 10 min Denaturierung der DNA bei 95°C, danach 40 Zyklen mit drei aufeinanderfolgenden Schritten: 30 s Denaturierung bei 95°C, 20 s zur Primeranlagerung bei 58°C - 61°C je nach Primer, 30 s Amplifikation des PCR-Produkts bei 73°C, gefolgt von einer abschließenden Amplifikation bei 73°C für 7 min. Die genauen PCR-Bedingungen der einzelnen Primerpaare sind den Tabellen 2.4 bis 2.7 zu entnehmen. Für jede Probe wurden folgende Kontrollen mitgeführt: (a) Proben ohne reverse Transkription (-RT) um Kontaminationen mit genomischer DNA zu detektieren, (b) ohne Template (H₂O), (c) Primer für βMG als Positivkontrolle für die Effizienz von RNA-Isolation und cDNA-Synthese.

Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden mittels Elektrophorese in einem 2% TRIS-Azetat-EDTA Agarose-Gel (20 g/l Agarose (Biozym LE Agarose, Biozym Scientific, hess. Oldendorf), 4,84 g/l TRIS (USB, Cleveland, USA), 1,142 ml/l Eisessig (Merck, Darmstadt), 2 ml/l 0,5 M EDTA (Invitrogen), ad 1 l H₂O), pH 8,0, mit einem Zusatz von 8 µl/l Ethidiumbromid (1%; Roth GmbH, Karlsruhe) ihrer Größe nach aufgetrennt. Ein Volumen von 25 µl der PCR-Produkte wurden mit 5 µl Ladepuffer (0,1 g Orange G dye (Sigma), 50% Glycerol (Sigma), 50 mM TRIS-HCL-Puffer (pH 8,0), 50 mM EDTA-Lösung (pH 8,0; Sigma), ad 10 ml H₂O) gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die PCR-Produkte wurden durch eine horizontale Elektrophorese in einer Peqlab Kammer, Modell 40-1410 (Peqlab, Erlangen), aufgetrennt. Als Marker

wurde 10 µl 100 bp DNA-Ladder (Invitrogen) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte mit einer Spannung von 140 V über etwa 45 min. Die PCR-Fragmente wurden im Gel unter UV-Licht mit dem Transilluminator (Phase, Lübeck) detektiert und dokumentiert.

Auswertung

Die Proben wurden in die nachfolgend beschriebenen Gruppen unterteilt. Nicht trächtige Tiere wurden wie in 2.2.1.1 beschrieben dem entsprechenden Zyklusstand (Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus) zugeordnet und das Gewebe in Ampulla, Isthmus und uterotubarer Übergang geteilt. Bei trächtigen Tieren wurde festgestellt, in welchem Eileiter sich der Embryo befand (ipsilateral, kontralateral oder in beiden Eileitern) und welchem Furchungsstadium er zuzuordnen war (Einzell- oder Zweizellstadium). Auch dieses Gewebe wurde in Ampulla und Isthmus unterteilt.

Es sollte untersucht werden, ob einer der oben aufgezählten Parameter Einfluss auf die Expression der verschiedenen Gene hat. Dazu wurde die absolute Anzahl positiver und negativer Ergebnisse der RT-PCR festgestellt. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Gruppen wurden zuerst mittels Freeman-Halton-Test (Bonferroni korrigiert) auf Signifikanz überprüft. Daraufhin wurden die Daten nach den oben aufgezählten Parametern jeweils paarweise mittels Vierfelder Chi²-Test mit Bonferroni-Korrektur für multiples Testen miteinander verglichen. Genaue Angaben zur Berechnung des Freeman-Halton-, Vierfelder Chi²-Test und der Bonferroni-Korrektur wurden Bortz und Lienert (2008) entnommen.

2.2.2.3 Gelaufreinigung und Sequenzierung von PCR-Produkten

Um die Spezifität neuer Primer zu überprüfen, wurde eine PCR mit dem doppelten oder vierfachen Standardvolumen durchgeführt. Die zu bestimmenden Banden wurden aus dem TAE-Agarose-Gel unter UV-Licht ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der PCR-Produkte erfolgte dann mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Der DNA-Gehalt wurde mit Hilfe des Low DNA Mass Ladders (Invitrogen) abgeschätzt und mindestens 30 ng (2 ng/µl) DNA sequenziert. Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt.

2.2.2.4 Laser-assistierte Mikrodissektion

Probengewinnung

Es wurden Proben von Eileiter und Trachea von 6 weiblichen C57Bl6 Mäusen wie unter 2.2.1.2 beschrieben entnommen und sofort weiterverwendet. Von den Proben wurden 10 µm dicke Kryoschnitte angefertigt und auf mit einer Polyethylen-naphthalat (PEN)-Membran beschichtete Objektträger (Carl Zeiss, München) aufgezogen. Die PEN beschichteten Objektträger wurden zuvor 30 min lang mit 254 nm UV-Licht aktiviert, um die Membran hydrophiler zu machen und dadurch das Gewebe während des Katapultierens auf der Membran zu stabilisieren. Die Schnitte wurden für 45 s in Hämalaun gefärbt, 2 min unter fließendem Leitungswasser gebläut, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 96% und 100%) gewaschen und schnellstmöglich weiterverwendet. Die Mikrodissektion des Gewebes wurde mit dem PALM MicroBeam System (Carl Zeiss) durchgeführt. Das Gewebe wurde dabei mit einem Laser ausgeschnitten und mit Hilfe eines Laserpulses direkt in den Deckel eines 0,5 ml Reaktionsgefäßes katapultiert. Die Innenseite des Deckels wurde zuvor mit 2,5 µl Mineralöl beschichtet, damit die Gewebestücke dort besser haften blieben. Für jede Probe wurden 60 Stücke Epithel bzw. glatte Muskulatur von etwa 75 µm Länge gepoolt. Die Dauer der Mikrodissektion des Gewebes durfte je Objektträger eine Stunde nicht überschreiten. Nach der Mikrodissektion wurden 350 µl mit β-Mercaptoethanol versetzter Lysispuffer (RLT-Puffer, Qiagen) zur Probe gegeben, die Proben abzentrifugiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum nächsten Tag bei -80°C gelagert.

RNA-Extraktion und cDNA-Synthese

Nach Zugabe von 5 µl Carrier-RNA (4 ng/µl) wurde die Gesamt-RNA nach Herstellerangaben mit dem RNeasy Microkit (Qiagen) extrahiert. Kontaminationen mit genomischer DNA wurden durch einen fünfminütigen Verdau bei Raumtemperatur mit DNase I (RNase-free DNase Set, Qiagen) entfernt. Daraufhin wurden 15 µl RNA zuerst für 5 min auf Eis und danach in einem Thermocycler 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde nach einer zweiten Inkubation auf Eis für 2 min ein RT-Mix, bestehend aus 3 µl 10 x PCR Puffer II (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3), 6 µl MgCl₂ (25 mM), 1,5 µl dNTPs (10 mM), 1,5 µl Random Hexamers (50 mM), 0,75 µl RNase Inhibitor (20 U/µl), 1,5 µl Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MuLV, 50 U/µl) und 0,75 µl H₂O (alle Reagenzien von Applied

Biosystems), zugegeben. Die RNA wurde 75 min bei 43°C umgeschrieben. Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase wurde der Ansatz für 5 min bei 99°C erhitzt, auf 4°C abgekühlt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Um Kontaminationen mit genomischer DNA detektieren zu können, wurde eine Kontrollreaktion ohne reverse Transkriptase angefertigt.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die cDNAs wurden mit genspezifischen Primern für M1-3, α 3, α 7 und β MG amplifiziert. Für die darauffolgende PCR wurden 4 μ l cDNA, 2,5 μ l Puffer II, 2 μ l $MgCl_2$ (25 mM), 0,5 μ l dNTP (10 mM), 0,25 μ l jedes Primers (20 pM) und 0,2 μ l AmpliTaq Gold Polymerase (Gen Amp 5 U/ μ l; alle Reagenzien von Applied Biosystems) mit Wasser auf ein Endvolumen von 25 μ l aufgefüllt. Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: 10 min Denaturierung bei 95°C, 50 Zyklen mit je 30 s bei 95°C, 20 s Primeranlagerung bei 59-60°C, 30 s Elongation bei 73°C, und eine abschließende Extension für 7 Min bei 73°C. Es wurden dieselben Kontrollen wie bei der qualitativen RT-PCR verwendet.

2.2.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Die zu untersuchenden Gewebe wurden wie unter 2.2.1.2 bzw. 2.2.1.3 beschrieben entnommen und eingefroren. Es wurden Kryoschnitte mit einer Dicke von 10 µm angefertigt (Microm HM 560, MICROM International GmbH, Walldorf bzw. CM 1900, Leica Microsystems, Wetzlar) und auf Objektträger SuperFrost Plus (Menzel-Gläser) aufgezogen. Je nach Antikörper wurde entweder natives oder mit PFA beziehungsweise Zamboni fixiertes Gewebe verwendet. Die jeweiligen Fixationsbedingungen sind in Tab. 2.2 aufgeführt. Natives Gewebe wurde nach dem Schneiden für 10 min in auf -20°C gekühltem Aceton fixiert und danach eine Stunde getrocknet. Schnitte von perfundiertem Gewebe mussten nicht noch einmal fixiert werden, sondern wurden sofort getrocknet. Alle folgenden Schritte wurden, um eine Austrocknung zu verhindern, in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen erfolgte für eine Stunde mit einer der folgenden Blocklösungen: Aceton-behandelte Schnitte mit 50% Pferdeserum (Schlachthof, Marburg) bzw. 50% normales Schweineserum (Schlachthof, Giessen) beides in PBS + S (0,005 M PP plus 4,48 g/l NaCl; pH 7,4), für fixiertes Gewebe mit 10% normalem hitzeinaktiviertem Pferdeserum, 0,5% Tween 20, 0,1% BSA in PBS mit doppelter Salzkonzentration („Histoblock“). Um mit Hilfe der monoklonalen Ratten-Antikörper gegen CD5 und CD19 ein spezifisches Signal zu erhalten, wurde die „Histoblock“-Lösung zusätzlich mit 5% Mausserum (Dianova) versetzt. Die primären Antikörper (siehe Tab. 2.2) wurden in PBS mit doppelter Salzkonzentration in der Gebrauchsverdünnung angesetzt (CD5 und CD19 plus 1% Mausserum) und die Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimal 10 min Waschen mit PBS wurden die entsprechenden sekundären Antikörper in PBS+NaN₃+NaCl für eine Stunde auf die Schnitte aufgetragen. Daraufhin wurde wieder zweimal 10 min mit PBS gewaschen und die Schnitte für weitere 10 min in 4% PFA nachfixiert, um die Bindung zwischen dem primären und dem sekundären Antikörpern zu fixieren. Nach abschließendem zweimaligem Waschen wurden die Objektträger mit karbonatgepuffertem Glycerol (pH 8,6) eingedeckelt und bei 4°C dunkel gelagert. Zur gleichzeitigen Markierung zweier Antigene (Tab. 2.10) wurden Mischungen von Primär- beziehungsweise Sekundärantikörpern in den angegebenen Endverdünnungen (Tab. 2.2, Tab. 2.3) verwendet.

Material und Methoden

Kolokalisationen	1. Antigen	2. Antigen
CGRP/SP	Kaninchen-anti-CGRP (polyklonal) Esel-anti-Kaninchen-IgG Cy3-konjugiert	Ratte-anti-SP (monoklonal) Esel-anti-Ratte-IgG FITC-konjugiert
CGRP/SMA	Kaninchen-anti-CGRP (polyklonal) Esel-anti-Kaninchen-IgG Cy3-konjugiert	Maus-anti-SMA (monoklonal) direkt mit FITC konjugiert
CGRP/NPY	Kaninchen-anti-CGRP (polyklonal) Esel-anti-Kaninchen-IgG FITC-konjugiert	Schaf-anti-NPY (polyklonal) Esel-anti-Schaf-IgG Cy3-konjugiert
NPY/SMA	Schaf-anti-NPY (polyklonal) Esel-anti-Schaf-IgG Cy3-konjugiert	Maus-anti-SMA (monoklonal) direkt mit FITC konjugiert
NPY/TH	Schaf-anti-NPY (polyklonal) Esel-anti-Schaf-IgG Cy3-konjugiert	Kaninchen-anti-TH (polyklonal) Esel-anti-Kaninchen-IgG FITC-konjugiert

Tab. 2.10: Verwendete Kombinationen von Primär- und Sekundärantikörpern zur gleichzeitigen Markierung zweier Antigene.

Kolokalisationsexperimente wurden auch an ChAT-eGFP transgenen Tieren durchgeführt. In diesem Fall wurde die eGFP-Fluoreszenz mit einem Huhn-anti-eGFP-Antikörper verstärkt und mit einem FITC-konjugierten Esel-anti-Huhn-IgG-Antikörper detektiert. Das zweite Antigen wurde mit einem der im Folgenden angegebenen Antikörper markiert und mit dem entsprechenden Cy3-konjugierten Sekundärantikörper nachgewiesen (Tab. 2.11).

Kolokalisationen	Antigen 1	Antigen 2
ChAT/CD5	Huhn-anti-eGFP (polyklonal) Esel-anti-Huhn-IgG FITC-konjugiert	Ratte-anti-CD5 (monoklonal) Esel-anti-Ratte-IgG Cy3-konjugiert
ChAT/CD19	s.o. s.o.	Ratte-anti-CD19 (monoklonal) Esel-anti-Ratte-IgG Cy3-konjugiert
ChAT/CHT1	s.o. s.o.	Kaninchen-anti-CHT1 (polyklonal) Esel-anti-Kaninchen-IgG Cy3-konjugiert
ChAT/CGRP	s.o. s.o.	Kaninchen-anti-CGRP (polyklonal) Esel-anti-Kaninchen-IgG Cy3-konjugiert
ChAT/NPY	s.o. s.o.	Kaninchen-anti-NPY (polyklonal) Esel-anti-Schaf-IgG Cy3-konjugiert
ChAT/PGP 9.5	s.o. s.o.	Kaninchen-anti-PGP 9.5 (polyklonal) Esel-anti-Kaninchen-IgG Cy3-konjugiert

Tab. 2.11: Verwendete Kombinationen von Primär- und Sekundärantikörpern zur Markierung von eGFP und einem weiteren Antigen. Die ChAT-eGFP Fluoreszenz von ChAT-eGFP transgenen Tieren wurde mittels eines Antikörpers gegen eGFP verstärkt, um dann die Kolokalisation mit den oben genannten Markern für Immunzell- und Nervenfasertypen zu überprüfen.

Auszählung bei Kolokalisation zweier Marker in Immunzellen

Um das Ausmaß der Kolokalisation von ChAT-eGFP mit CD5 bzw. CD19 in Immunzellen zu bestimmen, wurde von 4 verschiedenen ChAT-eGFP transgenen Tieren Gewebe entnommen. Es wurden jeweils 4 (Probe 170/10a) bzw. 6 (100/10a, 107/10a, 166/10a) Cryoschnitte angefertigt und mit einer Kombination der Antikörper gegen CD5 und eGFP bzw. CD19 und eGFP inkubiert. Für die Kombinationen, bei denen Kolokalisationen zu beobachten waren, wurden dann alle Schnitte ausgezählt und die entsprechenden Anteile in % errechnet.

Präabsorbtion

Um die Spezifität der Antikörper zu testen, wurden Präabsorbtionen durchgeführt. Dazu wird der, wie gewohnt, verdünnte Antikörper mit einer entsprechenden Menge des korrespondierenden Peptids für einige Zeit vorinkubiert. Die Menge des Peptids, genauso wie Dauer und Temperatur der Präinkubation, wurde für jeden Antikörper individuell angepasst. Während dieser Zeit gehen Antikörper und Peptid eine Bindung ein und der Antikörper kann später nicht mehr an die im Gewebe vorhandenen Antigene binden. Die korrespondierenden Peptide zu CHT1 und CGRP wurden in einer Konzentration von 20 µg/ml bei 4°C über Nacht vorinkubiert, wohingegen die Peptide für rOCT2, rOCT3 und VACHT auf 40 µg/ml bzw. hOCT3 auf 20 µg/ml verdünnt und eine Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert wurden. Mit dieser Peptid/Antikörper-Mischung und mit einer normalen Antikörperverdünnung als Kontrolle wurde dann, wie gewohnt, die Immunfluoreszenz durchgeführt. Als spezifisch angesehen wurden Markierungen, die nur mit der Antikörperverdünnung, nicht aber mit der Peptid/Antikörper-Mischung erzielt wurden.

Peptid	Länge [AS]	Aminosäuresequenz	Lokalisation	Referenz	Hersteller
rCHT1	13	CTKNSGNAEERSE	29-40	Lips et al. 2002	Auftrags immunisierung* Acris
rCGRP	37	NTATCVTHRLAGLLSRSGG VVKDNFVPTNVGSEAF	C-terminal	Rosenfeld et al. 1983	
rOCT2	21		große intraz. Schleife	Gorboulev et al. 1997	αDiagnostics
rOCT3	18		große intraz. Schleife	Lips et al. 2005	αDiagnostics
hOCT3	17	TRKKGDKALQILRRIAK	297-313	Lips et al. 2005	Auftrags immunisierung* Biotrend
VACHT	14	FDGCEDDYNYYSRS	526-539		

Tab. 2.12: Liste der zur Präabsorbtion verwendeten Peptide mit Angaben zur Länge des Peptids in Aminosäuren [AS], der Aminosäuresequenz und der Lokalisation der Peptidsequenz im Gesamtprotein. *Auftragsimmunisierung durchgeführt von Dr. J. Pineda Antikörperservices

2.2.3.1 Diaminobenzidin (DAB)-basierte Preembedding-Immunhistochemie und Transmissionselektronenmikroskopie

Für die Diaminobenzidin-basierte Elektronmikroskopie wurde Gewebe von mit PFA perfundierten $\alpha 3$ -eGFP Mäusen (N=3) und einer FVB-Wildtypmaus verwendet. Es wurden 40 μm dicke Schnitte der Eileiterproben am Kryostaten (Microm HM 560) angefertigt und daran frei flottierend in einem Blockschälchen die Immunhistochemie durchgeführt. Dazu wurde zuerst, um unspezifische Bindungen abzusättigen, für eine Stunde mit 10% normalem Schweineserum (Schlachthof, Giessen) blockiert. Daraufhin wurden die Gewebe mit dem Huhn-anti-eGFP Antikörper in einer Gebrauchsverdünnung von 1:8000 über Nacht in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächster Schritt wurden die Gewebe 3 x für 5 min in PBS gewaschen und mit einem mit Peroxidase konjugierten Esel-anti-Huhn-IgG Sekundärantikörper (Dianova, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:1600 für eine Stunde inkubiert. Nach weiteren Waschschritten (1 x 5 min PBS, 2 x 5 min Tris-HCl pH 7,6) wurde die nickelverstärkte (1,5%) DAB-Reaktion durchgeführt. Dazu wurden 15 mg/ml Nickelammoniumsulfat in 20 ml Tris-HCl gelöst und 250 μl DAB-Stammlösung (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugegeben. Mit 4 ml dieser Lösung wurden die Gewebe 10 min vorinkubiert. Zum Rest der Lösung wurden 1,2 μl H_2O_2 (30%) gegeben und damit die Gewebe weitere 45 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 0,05 M Tris-HCl, pH 7,6, erfolgte die Osmierung für 20 min in 1% OsO_4 in destilliertem Wasser unter dem Abzug. Danach wurden die Gewebe für 3 x 5 min in 0,05 M Maleatpuffer, pH 5,2, gewaschen. Anschließend erfolgte die En-bloc-Kontrastierung in 1% Uranylacetat in 0,05 M Maleatpuffer, pH 6,0, für 1 h im Dunkeln. Nach weiteren Waschungen in Maleatpuffer folgte die Entwässerung für jeweils 5 min in aufsteigender Alkoholreihe. Um das Gewebe mit Epon (480 g/kg Epoxyresin (Agar Scientific, Essex, England), 320 g/kg Dodecenyln Succinic Anhydride (DDSA; Agar Scientific), 200 g/kg Methyl Nadic Anhydride (MNA; Agar Scientific) und 3% N-Benzyl dimethylamine (BDMA, Agar Scientific)) zu infiltrieren, folgten weitere Schritte mit 100% Ethanol und Propylenoxid 1 plus 1 gemischt, Propylenoxid pur und 30 Minuten in Propylenoxid und Epon 1 plus 1 gemischt. Zur abschließenden Polymerisation in Epon wurden die Gewebe zwischen zwei mit Folie bedeckte Objektträger gelegt und diese mit Gewichten beschwert. Die Polymerisation erfolgte in Epon pur über Nacht. Am nächsten Tag wurde das Epon gewechselt und ein weiteres Mal bei 60°C über Nacht auspolymerisiert. Nach der erfolgten Aushärtung wurden die Gewebe unter dem Lichtmikroskop ausgewertet, geeignete Stellen

markiert und mit der Rasierklinge ausgeschnitten. Diese Stellen wurden mit Epon auf Eponblindblöckchen über Nacht bei 60°C aufgeblockt. Am darauf folgenden Tag wurden die Blöckchen mit Rasierklingen unter der Stereolupe zugetrimmt und mit dem Reichert Ultracut E (Leica, Bensheim) Semidünnschnitte (0,5 -1 µm) angefertigt. Geeignete Regionen wurden mit dem Durchlichtmikroskop ausgewählt. Von diesen Stellen wurden Ultradünnschnitte von 80 nm angefertigt und auf 300 Mesh Nickel-Netzchen aufgezogen. Zuletzt wurden die Schnitte noch einmal mit gesättigtem wässrigen Uranylacetat und Bleicitrat nach Reynolds (26,6 mg/ml Bleicitrat, 35,2 mg/ml Trinatrium-citrat, mit NaOH auf pH 12 eingestellt) kontrastiert. Daraufhin wurden die Schnitte mit dem Transmissionselektronmikroskop EM 902 (Zeiss, Jena) ausgewertet und fotografiert.

2.2.4 Histochemie

2.2.4.1 Acetylcholinesterase (AChE)-Histochemie

Die AChE-Histochemie dient zum Nachweis cholinergischer Nervenfasern. Zur Detektion der Nervenfasern werden drei verschiedene Färbelösungen benötigt. Färbelösung A (10 µl/ml Triton X 100 (Sigma), 3,28 mg/ml Natriumacetat (Merck), 136 µl/ml Eisessig (Merck), 1,468 mg/ml Trinatrium-citrat dihydrat (Fluka), 0,506 mg/ml Kupfersulfat (Merck), 0,1717 mg/ml iso-OMPA (Sigma), pH 5,3-5,4) ist bei 4°C ein Jahr haltbar. Stammlösung B ist eine Lösung des Substrats Acetylthiocholin-Iodid (50 mg/ml; Sigma) in destilliertem Wasser und ist bei 4°C einen Monat haltbar. Gesättigtes Kaliumferricyanid (Kaliumhexacyanoferrat III, Sigma) in destilliertem Wasser ist Stammlösung C und eine Woche bei 4°C haltbar. Es wurden 20 µm dicke Kryostatschnitte von mit 4% PFA fixiertem Gewebe angefertigt, getrocknet, 10 min in PBS und zweimal 5 min in 0,05 M Natriumacetatpuffer, pH 5,2, gewaschen. Anschließend wurde eine Mischung von 10 ml Stammlösung A, 100 µl Stammlösung B und 100 µl Stammlösung C angefertigt. Als Kontrolle wurde eine weitere Mischung ohne die das Substrat Acetylthiocholin-Iodid enthaltende Stammlösung B angefertigt. Die Schnitte wurden mit diesen Ansätzen für 120 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend für 10 min in destilliertem Wasser gestoppt. Nach zwei weiteren Waschungen in PBS wurden die Schnitte mit einer 1 plus 3 PBS/Glycerol-Mischung eingedeckelt und mikroskopiert.

2.2.4.2 Butyrylcholinesterase (BChE)-Histochemie

Wie für die AChE-Histochemie wurden 20 µm dicke Kryostatschnitte von mit 4% PFA fixiertem Gewebe angefertigt. Die vor jedem Versuch frisch angesetzte Färbelösung bestand aus 50 mg S-Butyrylthiocholin-Iodid (BTC, Sigma) in 32,5 ml Tris-Maleat-Puffer pH 6,0 (12,2 g/l Tris (Roth, Karlsruhe), 11,6 g/l Maleinsäure (Merck)) und 2,5 ml Trinatrium-citrat (0,1 M, Fluka), 5 ml Kupfersulfat (30 mM, Merck), 5 ml Kaliumferricyanit (5 mM, Sigma) 4,75 ml aqua dest. und 250 µl 1,5 bis (4-allyldimethylammoniumphenyl)pentan-3-one-dibromid (BW284c51; 5,66 mg/ml, Sigma). Als Kontrolle wurde eine weitere Lösung ohne das Substrat BTC verwendet. BW284c51 inhibiert die Acetylcholinesterase. Nach einer Stunde Trocknung wurden die Schnitte zweimal für 10 min in Tris-Maleat-Puffer gewaschen, 40 min bei 37°C mit der Färbelösung inkubiert und zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden danach mit Kaiser's Glyceringelatine eingedeckelt.

2.2.5 Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Beide Eileiter einer Maus wurden entnommen, in Ampulla und Isthmus geteilt und überschüssige Flüssigkeit wurde entfernt. Das Gewebe wurde weiter zerkleinert und in jeweils 1 ml eiskalte Ameisensäure-Aceton-Mischung (15% v/v) gegeben. Für jede der 4 Ampulla- und Isthmus-Proben wurde Gewebe von 5 Mäusen gepoolt. Außerdem wurden auch Proben der gesamten Tuba uterina (N=3) erstellt. Dazu wurden jeweils beide Eileiter von 5 Mäusen in 500 µl eiskaltem Ameisensäure-Aceton-Gemisch (15% v/v) zerkleinert und gepoolt. Die Proben wurden 30 min auf Eis stehen gelassen, bei -20°C gelagert und auf Trockeneis verschickt. In der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Ignaz Wessler, Institut für Pathologie der Universität Mainz, wurden die Acetylcholin-Messungen durchgeführt. Dazu wurden die Proben nochmals für 15 min auf Eis gestellt, abzentrifugiert (10 min, 4.000 rpm) und der Überstand mit Hilfe von Stickstoff bis zur vollständigen Trockenheit verdunstet. Die getrockneten Proben wurden in 1000 µl der mobilen Phase des HPLC-Systems resuspendiert und 20 µl davon injiziert. Acetylcholin wurde mittels kationischer Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC), kombiniert mit Bioreaktoren und elektrochemischer Detektion, gemessen (Reinheimer et al. 1996; Klapproth et al. 1997). Zur Detektion wurde das BAS 481 Microbore system von Bioanalytical Systems Inc. (West Lafayette, USA) verwendet. Acetylcholin und Cholin wurden mit Hilfe der mobilen Phase (45 mM Phosphatpuffer mit 0,3 mM EDTA, pH 8,5) auf einer analytischen SepStik Säule (1 x 530m; BAS, Axel Semrau,

Sprockhövel) aufgetrennt. Um die Spezifität des detektierten Acetylcholinpeaks zu überprüfen, wurde eine mit 40 U AChE bepackte Säule verwendet. Durch die AChE wird der Acetylcholinpeak spezifisch eliminiert und es bleibt nur der Cholinpeak zurück (Klapproth et al. 1997). Das Detektionslimit lag bei 20 fmol ACh pro 20 µl Injektion.

2.2.6 Desorptions-Elektrospray-Ionisierung (DESI)

Am Tag der Messung wurden drei Mäuse wie bereits beschrieben getötet und beide Eileiter und die Trachea schnellstmöglich entnommen. Beide Eileiter wurden entwunden und mit einer sehr feinen Federschere vorsichtig von der Ampulla her eröffnet. Da der Eileiter kaum vollständig eröffnet werden kann, wurde nur ein Teil, meist die Ampulla, eröffnet, aufgeklappt, auf einem Objektträger platziert und dort sofort mit Hilfe von Trockeneis festgefroren. Auch die Trachea, welche als Positivkontrolle diente, wurde eröffnet, aufgeklappt und auf einem Objektträger festgefroren. Im Labor von Dr. Zoltan Takats, Institut für anorganische und analytische Chemie der JLU Giessen, wurden die Proben vor der Spraykapillare platziert. Das Lösungsmittel wurde mit einer definierten Durchflussrate unter dem Einfluss einer hohen Spannung (4 kV) auf die Probe gesprüht. Aufgrund elektrostatischer und pneumatischer Kräfte wurden Ionen von der Probe abgelöst und mittels einer unter atmosphärischem Druck stehenden Ionentransferleitung zum Massenspektrometer (Finnigan LTQ Orbitrap Discovery, Thermo Fisher Scientific) geleitet und dort analysiert (Takats et al. 2004; 2005). Die Spektren wurden mittels der Programme LTQ Tune und Xcalibur aufgenommen und ausgewertet.

2.2.7 Calcium-Imaging an isolierten Zellen des Eileiters

Die benötigten Deckgläschen wurden mit 1 mg/ml Concanavalin A (Sigma) beschichtet und in eine 24-well Platte überführt. Beide Eileiter wurden entnommen, sauber präpariert, sehr klein geschnitten und anschließend 30 min in 1 ml Tyrode 1 (ohne Calciumchlorid; 140 mM Natriumchlorid, 5 mM Kaliumchlorid, 1 mM Magnesiumchlorid, 10 mM HEPES, 10 mM Glukose und 1 mM Natriumpyruvat) mit 27 μ l Papain (Sigma) und 10 μ l L-Cystein (Sigma) im Wasserbad verdaut. Um den Verdau zu stoppen, wurde 1 ml Tyrode 2 (1 mM Calciumchlorid; 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, 1 mM Pyruvat/Brenztraubensäure) mit 2 μ l Leupeptin (5 mg/ml, Sigma) zugegeben und das Gewebe durch vorsichtiges Trituieren mit der Pasteurpipette weiter zerteilt. Der Überstand ohne Gewebereste wurde in ein neues 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in der entsprechenden Menge Tyrode 2 Puffer, d.h. je 50 μ l Puffer pro Deckglas, aufgenommen und auf den Deckgläschen ausgesät. Die Zellen wurden für mindesten 2 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit HEPES-Ringer Puffer mit 8 mM $CaCl_2$ (pH 7,4) gewaschen und mit dem Calciumindikator Fura-2 Acetoxymethyl (AM) Ester (Invitrogen) beladen. Der Calciumindikator Fura-2 AM Ester wird mit DMSO auf 1 mM verdünnt und eine 4 μ M Gebrauchsverdünnung in 8 mM $CaCl_2$ HEPES-Ringer Puffer angesetzt. Mit dieser Gebrauchsverdünnung werden die Zellen 30 min bei 37°C inkubiert und mit 8 mM $CaCl_2$ HEPES-Ringer gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen mit den Zellen für das Experiment in einen mit 2 ml einer 8 mM $CaCl_2$ -HEPES-Ringer Puffer gefüllten Delta-T-dish überführt und mit einem hufeisenförmigen Gewicht fixiert. Während des ganzen Experiments wurde der vorgewärmte 8 mM $CaCl_2$ HEPES-Ringer-Puffer mit einer Gilson minipuls 2 Pumpe (Gilson, Limburg-Offheim, Deutschland) ausgetauscht. Die Messungen wurden in 8 mM $CaCl_2$ HEPES-Ringer Puffer einer Temperatur von etwa 30°C durchgeführt. Nach jeder Pharmakazugabe wurde ein zweiminütiger Waschschrift durchgeführt. Dieser war notwendig, um eine vollständige Entfernung des im vorigen Schritt zugegebenen Pharmakons und damit einen vollständigen Rückgang der Reaktion der Zellen auf diesen Stimulus vor der Zugabe eines neuen Stimulus, sicherzustellen. Pharmaka wurden entweder in destilliertem Wasser oder in 8 mM $CaCl_2$ HEPES-Ringer Puffer angesetzt. Die Konzentrationsangaben sind in Tab. 2.1, Abschnitt 2.1.2 angegeben.

Fura-2 wurde bei 340 und 380 nm Wellenlänge (λ) angeregt und die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von >420 nm aufgenommen. Jede Zelle wurde unabhängig aufgenommen und das Verhältnis der Fluoreszenzintensität von 340:380 nm gemessen. Vor dem Experiment wurden alle Zellen mit sichtbarem Zilienschlag auf einem Foto markiert. Nach dem Experiment wurden tote Zellen zusätzlich durch Trypanblau-Färbung ausgeschlossen. Die Zellen konnten so für die Auswertung in zwei Gruppen eingeteilt werden:

- aktiv schlagende, lebende zilientragende Zellen
- lebende andere Zellen

Zellen, die auf keinen der verwendeten Stimuli reagierten, wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Eine Reaktion wurde als mehr als 5% Zunahme der freien Calciumkonzentration in der Zelle definiert. Zellen, die auf Zugabe des Vehikels HEPES reagierten, wurden ausgeschlossen, außer diese Reaktion betrug weniger als 1/5 der Reaktion auf einen anderen Stimulus.

Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte an einem Olympus BX50WI Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) mit einem 20er Wasserimmersionsobjektiv (Olympus). An dem Mikroskop war zusätzlich ein Thermostat (Biopetech Inc., Butler, USA) angeschlossen. Weiterhin befand sich oberhalb des Okulars ein slow-scan charged-coupled device Kamerasystem mit einem schnellen Monochromator (Kamera IMAGO, TiLL Photonics, Gräfelfing, Deutschland), welches Bilder vom optischen System in bestimmten Frequenzen aufnimmt und an den angeschlossenen Computer überträgt. Für die Aufnahme und Auswertung wurden die Imaginganalysesoftware „TiLLVision“ (TiLL Photonics) sowie Microsoft Office 2003 Excel verwendet.

Es wurden pro Experiment insgesamt 11 Filme von jeweils 2 min Länge aufgenommen, jeweils sechs „Waschfilme“ (vor und nach dem Experiment und zwischen den Pharmakazugaben; 120 s, 12 Bilder) und fünf Filme mit den Pharmaka- bzw. HEPES-Zugaben bei Bild 30 bzw. $t=60$ (120 s, 60 Bilder).

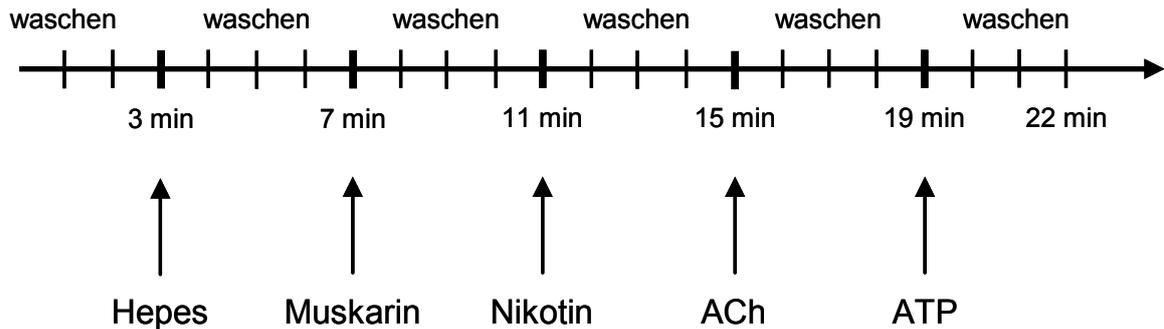


Abb. 2.2: Zeitleiste über den Ablauf der Calcium-Imaging-Experimente. Auf einen 2-minütigen Waschschritt (Film: 120 s, 12 Bilder) folgte jeweils ein 2-minütiger Schritt mit der Pharmakonzugabe nach einer Minute (Film: 120 s, 60 Bilder). Darauf folgte wieder ein 2-minütiger Waschschritt, gefolgt von der nächsten Pharmakonzugabe. Pharmakonzugaben erfolgten also nach 3 (Hepes), 7 (Muskarin), 11 (Nikotin), 15 (ACh) und 19 (ATP) Minuten. Jedes Experiment dauerte 22 Minuten.

Weiterhin wurden Versuche mit Antagonisten von nAChR bzw. MR durchgeführt. Es wurden der nicht-kompetitive nAChR Antagonist Mecamylamin (Sigma) und der kompetitive, nicht-selektive MR Antagonist Atropinsulfat (Sigma) verwendet. Dazu wurde bei ansonsten identischem Versuchsablauf der Blocker statt Hepes und bei jeder Pharmakonzugabe eine Mischung aus Pharmakon und Antagonist zugegeben. Den Blocker bei jedem Pharmakon mit zuzugeben war notwendig, da während der Experimente konstant gewaschen wurde.

Statistik

Die Daten sind als Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Zur statistischen Analyse wurde die maximale Differenz vor und nach Pharmakonzugabe der verschiedenen Gruppen mit dem globalen Kruskal-Wallis Rang-Summen-Test verglichen. Bei einem errechneten p-Wert kleiner als 0,05 wurden die Werte daraufhin paarweise mit dem Mann-Whitney-Test verglichen. Die errechneten p-Werte sind im Ergebnisteil angegeben. Verbundene Stichproben wurden mit dem Wilcoxon-Test auf statistische Signifikanz geprüft. Außerdem wurde die absolute Zahl reagierender Zellen der verschiedenen Gruppen jeweils paarweise mit dem Chi²-Test miteinander verglichen.

3. Ergebnisse

3.1. Expression und Lokalisation von Komponenten des cholinergen Systems in der Tuba uterina der Maus

3.1.1 Vergleich der Expression von Komponenten des cholinergen Systems mittels qualitativer RT-PCR bei tragenden und nicht-tragenden Mäusen

Die Abhängigkeit der Expression der Komponenten des cholinergen Systems von folgenden Parametern wurde untersucht:

- Zyklusstand (Proöstrus, Östrus, Metöstrus, Diöstrus)
- Segment der Tuba uterina (Ampulla, Isthmus, evtl. uterotubarer Übergang)
- Trächtigkeit (ipsi- oder kontralateraler Eileiter, 1-Zell- oder 2-Zell-Stadium des Embryos)

3.1.1.1 Syntheseenzyme und Transporter

Die klassischen cholinergen Marker ChAT, VAcHT und ChT1 waren in der Tuba uterina nicht bzw. nur in etwa 30% der Proben (ChT1) nachweisbar (Abb. 3.1). ACh könnte allerdings nicht nur von ChAT, sondern auch von der ubiquitär vorkommenden Carnitintransferase (CarAT) synthetisiert werden. Diese wurde, genauso wie schwache Banden von mRNA von AChE, nachgewiesen (Abb. 3.1). Transkripte der drei verschiedenen organischen Kationentransporter (OCT1-3) waren in fast allen Proben detektierbar (Abb. 3.1). Weder bei cholinergen Markern, noch bei den organischen Kationentransportern waren Veränderungen der Expressionshäufigkeit in Abhängigkeit der verschiedenen untersuchten Parameter feststellbar.

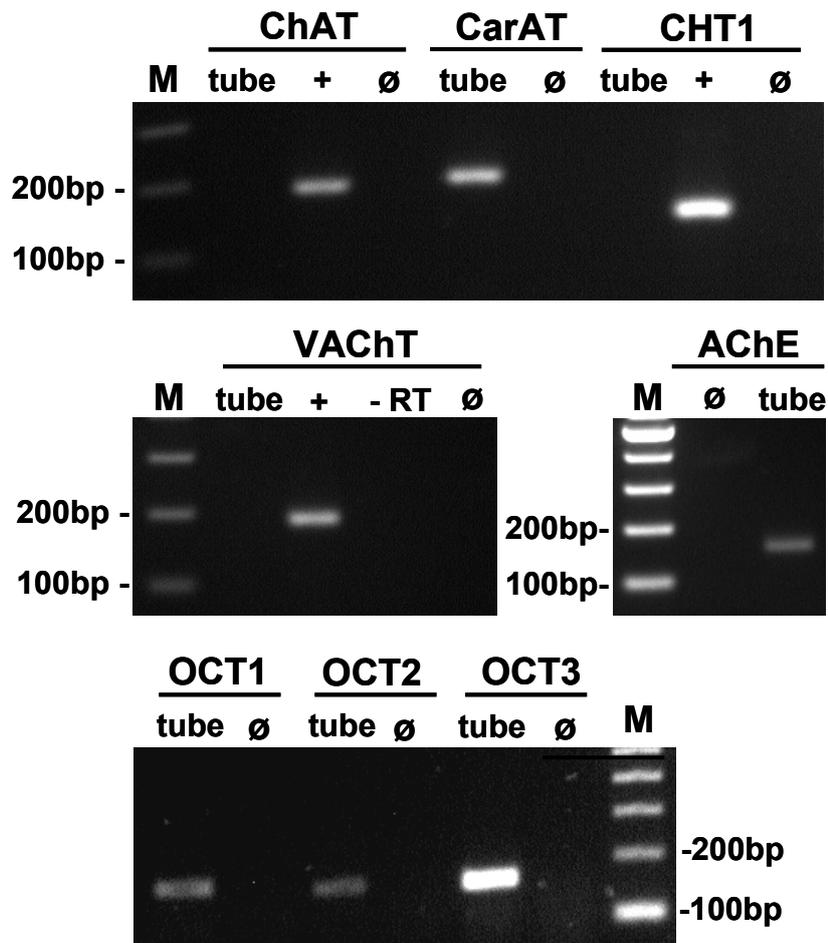


Abb. 3.1: RT-PCR, repräsentatives Gel zur Expression cholinergischer Marker (ChAT, CHT1, VAcHT, AChE) und OCTs in der Tuba uterina der Maus. Das Synthesenzym ChAT war im Gegensatz zu der CarAT nicht nachweisbar. CHT1 und VAcHT waren weitestgehend nicht nachweisbar. Transkripte von AChE und OCTs waren dagegen nachweisbar. +: Positivkontrolle (Gehirn) Ø: Wasserkontrolle, -RT: -RT-Kontrolle, M: Marker)

3.1.1.2 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren

Die Gene der muskarinischen Rezeptoren bestehen aus nur einem Exon und nur für zwei der fünf Rezeptorsubtypen sind bisher weitere Informationen im nicht-kodierenden Bereich (NCR = non-coding region) der Gene bekannt. Es handelt sich hierbei um die Subtypen M1 und M3. Im NCR von M1 sind zwei Introns und im NCR von M3 sind vier Introns bekannt. Für diese beiden Rezeptoren war es daher möglich, intronspannende Primer zu entwerfen. Die Elektrophorese nach der mit diesen intronspannenden Primern durchgeführten RT-PCR zeigte jeweils zwei Banden. Nach Gelextraktion dieser Banden und Sequenzierung der PCR-Produkte konnten für das Oligonukleotidpaar für M1 zwei bereits bekannte Transkriptvarianten (NM_007698.3; NM_001112697.1) auch im Eileiter nachgewiesen werden. Das

PCR-Produkt der Transkriptvariante 2 (NM_007698.3), welche ein Intron beinhaltet, war 237 bp lang. Transkriptvariante 1 (NM_001112697.1) beinhaltet zwei Introns und führte zu einem 324 bp langen PCR-Produkt. Die Sequenzierung des 186 bp langen PCR-Produktes des intronspannenden M3-Primers bestätigte die korrekte Amplifikation des Gens für M3 (NM_033269.4). In diesem Fall ist bisher keine weitere Transkriptvariante bekannt und es war aufgrund der zu geringen Konzentration des PCR-Produkts nicht möglich, die zweite Bande von etwa 110 bp Länge zu sequenzieren. In den Proben der Eileiter der Maus wurden sowohl gleichzeitig beide Transkriptvarianten, jeweils nur eine, als auch gar keine Transkripte von M1 und M3 nachgewiesen. Die Auszählung von 38 Proben ergab, dass für M1 meist beide Transkriptvarianten nachweisbar waren (63,2%). In 7,9% (TV1) bzw. 10,5% (TV2) der Fälle war jeweils nur eine der Varianten nachweisbar. Für M3 (37 Proben) waren die Unterschiede geringer: In 29,7% der Fälle war nur Bande 1 (186 bp), in 23,3% der Fälle nur Bande 2 und in 37,8% der Fälle waren beide Banden vorhanden.

In Proben von Ampulla, Isthmus und uterotubarem Übergang des Eileiters der nicht-tragenden Maus wurde mit Hilfe der RT-PCR mRNA von allen 5 muskarinischen Rezeptorsubtypen nachgewiesen (Abb. 3.2). Am häufigsten nachgewiesen wurden die Subtypen M1, M3 und M4. Sie waren in etwa 80% der Proben detektierbar. Im Gegensatz dazu waren M2 und M5 nur in etwa einem Drittel der Proben nachweisbar. Die Expression war in allen drei Tubenabschnitten (siehe Abb. 3.2) und auch in den verschiedenen Zyklusständen vergleichbar. Die Expressionshäufigkeiten wurden paarweise mittels Chi²-Test mit Bonferroni-Korrektur für multiples Testen miteinander verglichen. Auch der Unterschied zwischen den Proben der trächtigen und nicht-trächtigen Tiere war nicht statistisch signifikant (Tab. 3.1).

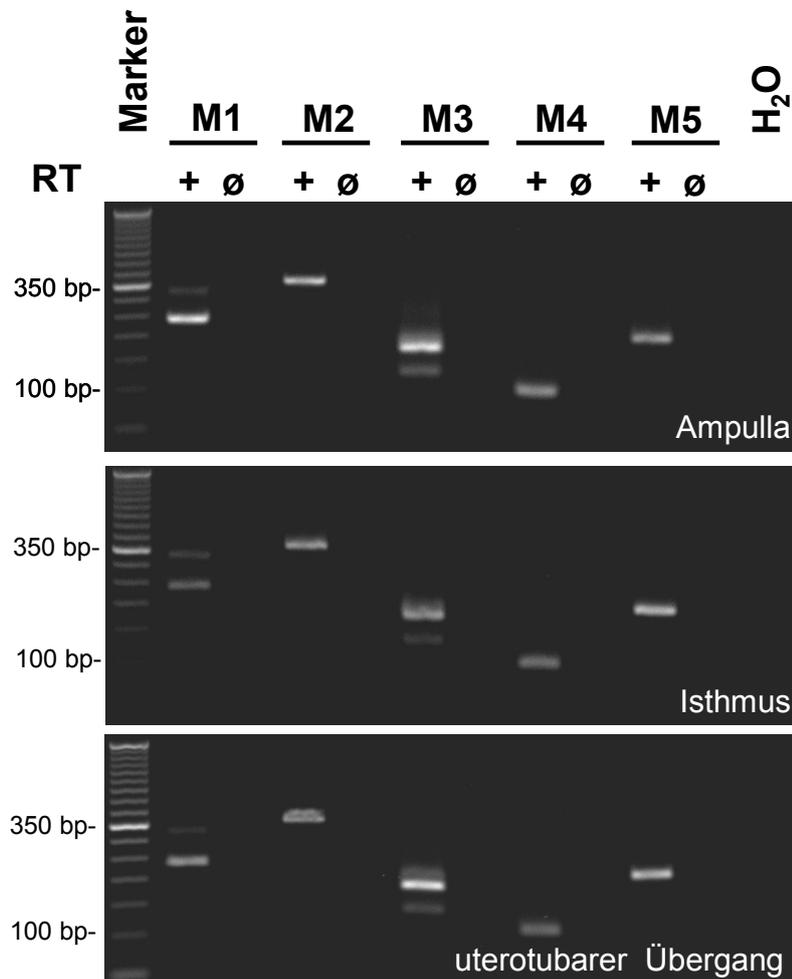


Abb. 3.2: RT-PCR, Nachweis der Expression der fünf muskarinischen Rezeptoren in Ampulla, Isthmus und uterotubarem Übergang mittels RT-PCR. Die Expression ist unabhängig vom untersuchten Tubensegment und den anderen untersuchten Parametern. Zyklusstand der untersuchten Maus: Östrus, +: cDNA, Ø: -RT- Kontrolle

	nicht trächtige Tiere		trächtige Tiere	
	positive Proben	Gesamtzahl der Proben	positive Proben	Gesamtzahl der Proben
M1	28	35	30	36
M2	19	34	10	42
M3	30	34	27	36
M4	24	34	33	39
M5	17	34	14	40

Tab. 3.1: Absolute Ergebnisse der qualitativen RT-PCR zum Nachweis von muskarinischen Rezeptoren M1-5 bei trächtigen und nicht-trächtigen Tieren. Unterschiede in der Expressionshäufigkeit wurden mittels Chi²-Test (für multiples Testen mittels Bonferroni-Korrektur korrigiert) auf Signifikanz überprüft. Keiner der hier zu beobachtenden Unterschiede ist statistisch signifikant.

3.1.1.3 Nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR)

Auch fast alle nikotinischen α - und β -Untereinheiten konnten mittels RT-PCR nachgewiesen werden (Abb. 3.3a). In Abb. 3.3b ist dargestellt, in welchem Prozentsatz der Proben die verschiedenen nAChR-Untereinheiten nachgewiesen wurden. Fast nie nachgewiesen wurden die nAChR-Untereinheiten α_6 , α_9 und β_3 (Abb. 3.3). Am häufigsten exprimiert wurden die Untereinheiten α_2 , α_4 , α_5 , α_7 und β_4 . Die Untereinheit α_7 war in einem signifikant geringeren Anteil ($p \leq 0,05$) der Proben von trächtigen Tieren als von nicht-trächtigen Tieren nachweisbar. Außerdem war die Untereinheit α_4 signifikant häufiger in der Ampulla als im Isthmus nachweisbar. Bei keinem anderen Parameter gab es signifikante Unterschiede in der Expressionshäufigkeit der verschiedenen Untereinheiten.

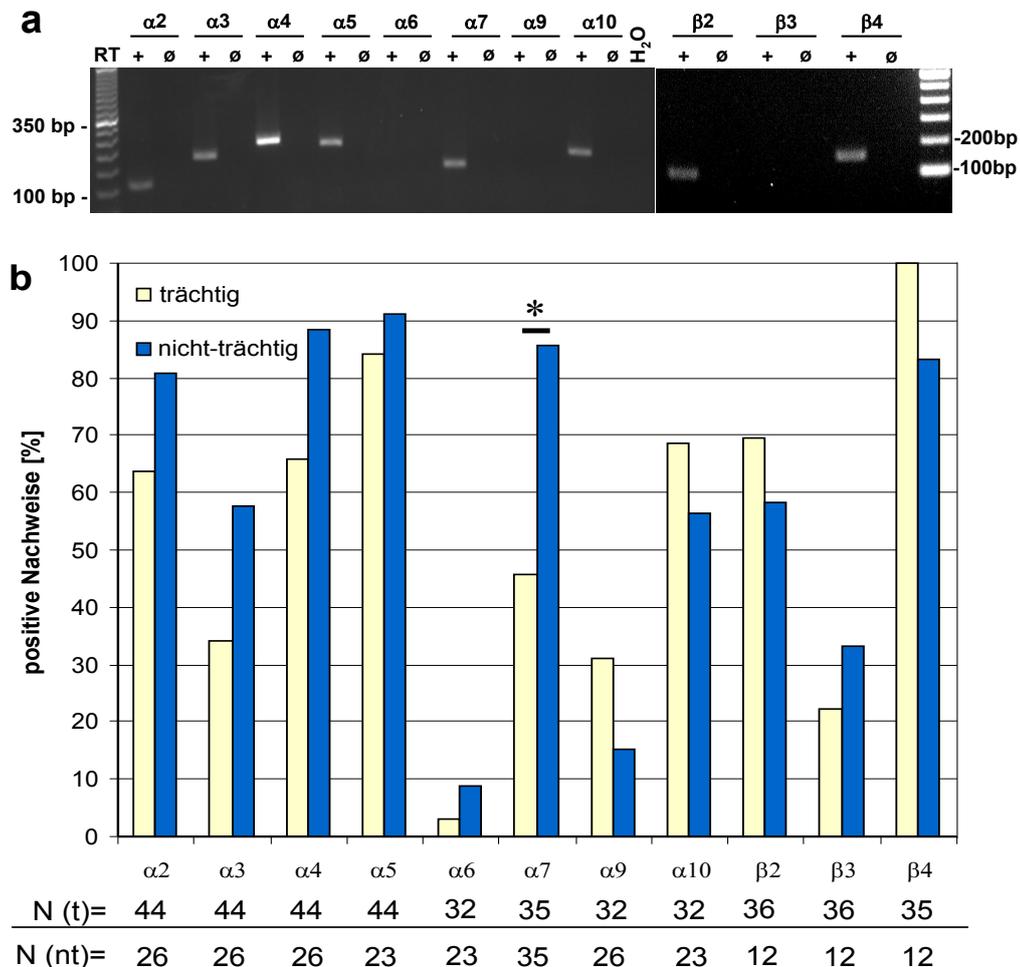


Abb. 3.3: qualitative RT-PCR a) Expression von α - und β - nAChR-Untereinheiten im Ovidukt der Maus. +: cDNA, \emptyset : Kontrolle ohne Reverse Transkription. Selten gefunden wurde mRNA der nAChR α_6 , α_9 und β_3 . b) Expression der nAChR Untereinheiten bei trächtigen und nicht trächtigen Mäusen. Die positiven Nachweise der verschiedenen untersuchten Gene wurde mittels Chi²-Test mit Bonferroni-Korrektur für multiples Testen miteinander verglichen. *: die Untereinheit α_7 ist in trächtigen Tieren signifikant seltener exprimiert als in nicht trächtigen Tieren. N=Anzahl der untersuchten Proben, (t): trächtige Tiere, (nt): nicht-trächtige Tiere

3.1.2 Lokalisation von Komponenten des cholinergen Systems

3.1.2.1 Cholinacetyltransferase (ChAT), VAcHT und CHT1

Cholinacetyltransferase (ChAT)

Zum Nachweis ChAT exprimierender Zellen in der Tuba uterina wurden Proben von eGFP unter der Kontrolle des ChAT-Promotors exprimierenden Mäusen verwendet. Obwohl mittels qualitativer RT-PCR keine Transkripte von ChAT nachweisbar waren, konnten mit Hilfe dieser transgenen Mäuse ChAT in drei verschiedenen Zelltypen beobachtet werden: Nervenfasern, Immunzellen und selten in einzelnen eGFP-exprimierenden Muskelzellen. Cholinerge Nervenfasern wurden selten gefunden. Meist wurden sie in der Mesosalpinx, der Subserosa und in der Nähe von Blutgefäßen beobachtet (Abb. 3.4).

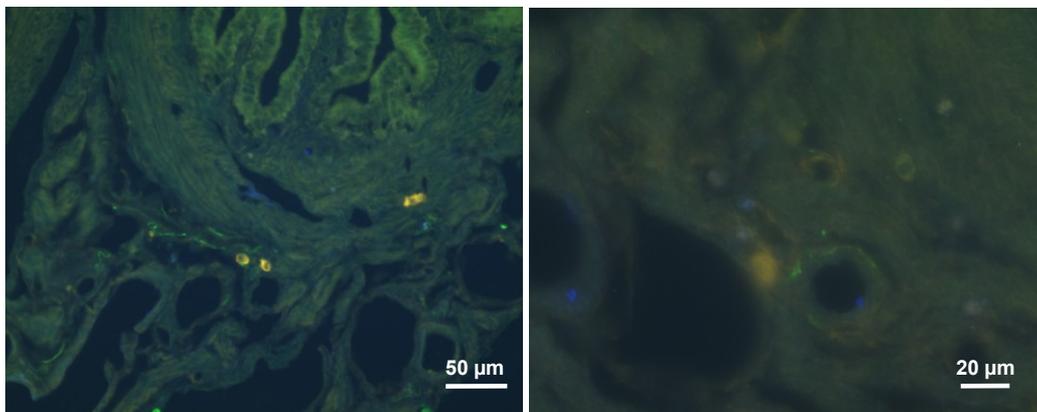


Abb. 3.4: Nachweis cholinergischer Nervenfasern mittels eGFP-Immunhistochemie an Proben ChAT-eGFP-transgener Mäuse. Cholinerge Nervenfasern waren generell selten zu beobachten. Meist waren sie in der Mesosalpinx, der Subserosa und in der Nähe von Blutgefäßen anzutreffen.

In den Anschnitten der Tuba uterina wurden außerdem in geringer Anzahl ChAT-eGFP-positive Immunzellen gefunden. Um herauszufinden, um welche Art Immunzellen es sich handelte, wurden immunhistochemische Doppelmarkierungen mit Antikörpern gegen T- und B-Lymphozyten durchgeführt. Zur Identifizierung von T-Lymphozyten wurde ein Antikörper gegen CD5 verwendet. Zwischen ChAT-eGFP und CD5 war keinerlei Kolo-kalisation zu beobachten (Abb. 3.5). Im Gegensatz dazu waren zwischen ChAT-eGFP-positiven Immunzellen und dem B-Lymphozytenmarker CD19 Kolo-kalisationen zu beobachten. Es waren 27 von 1289 CD19-positiven Zellen auch positiv für ChAT-eGFP, das entspricht einem Anteil von 2,1%. Weitere 24 Zellen waren ChAT-eGFP-, aber nicht CD19-positiv, somit sind 52,9% aller eGFP-positiven Zellen CD19 positiv. Es wurden für die Kombination CD19/ChAT-eGFP und

CD5/ChAT-eGFP gleich viele Proben (N=4) und Schnitte (Probe 1: 4 Schnitte, Probe 2-4: 6 Schnitte) ausgewertet.

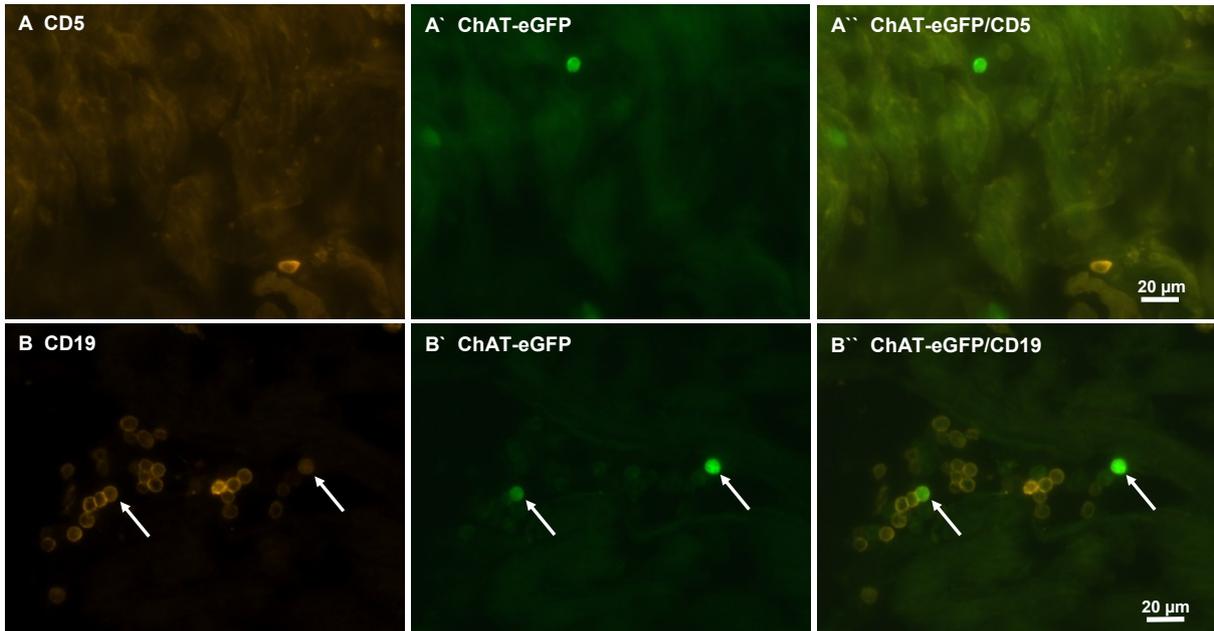


Abb. 3.5: CD5 bzw. CD19 und ChAT-eGFP Doppelimmunfluoreszenz, Tuba uterina der ChAT-eGFP-transgenen Maus. Die ChAT-eGFP-Fluoreszenz wurde mittels Huhn-anti-eGFP-Antikörper und FITC-markiertem Esel-anti-Huhn Ig-Sekundärantikörper verstärkt. A-A'') CD5/ChAT-eGFP Doppelimmunfluoreszenz in der Mesosalpinx der Tuba uterina. Kolokalisation von ChAT-eGFP mit dem T-Zellmarker CD5 ist nicht zu beobachten (A''). B-B'') CD19/ChAT-eGFP Doppelimmunfluoreszenz in der Ampulla der Tuba uterina. Die CD19-positiven Immunzellen befinden sich im Zwischenraum zwischen zwei Tubenquerschnitten. Zwei Prozent der CD19-positiven Immunzellen (B-Lymphozyten) sind ChAT-eGFP-positiv (B'', Pfeile).

Sehr selten kamen außerdem einzelne ChAT-eGFP exprimierende Zellen, vielleicht Muskelzellen, meist in der Mesosalpinx oder der Subserosa vor (Abb. 3.6.A und B). Ein einziges Mal wurde auch eine ChAT-eGFP positive Epithelzelle im Infundibulum gefunden (Abb. 3.6.C).

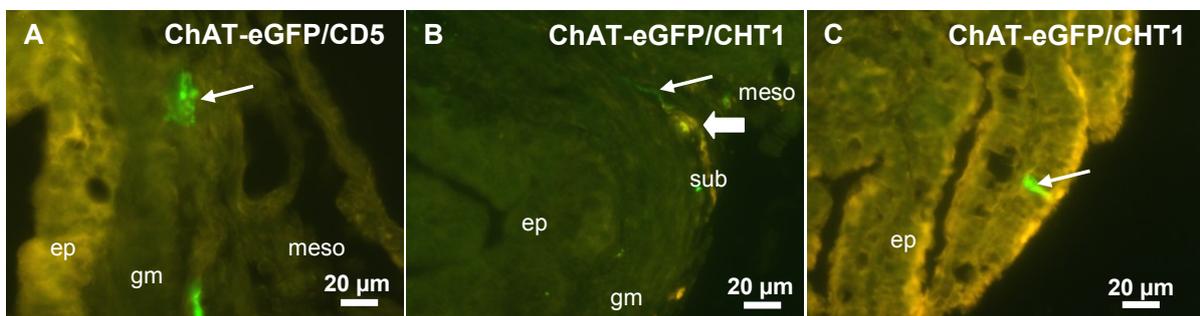


Abb. 3.6: ChAT-eGFP-CD5/CHT1-(Cy3)-Immunfluoreszenz, ChAT-eGFP-positive Zellen in der Tuba uterina der Maus. Die ChAT-eGFP-Fluoreszenz wurde mittels Huhn-anti-eGFP-Antikörper und FITC-markiertem Esel-anti-Huhn Ig-Sekundärantikörper verstärkt. Selten sind einzelne, ChAT-eGFP-positive Zellen, eventuell Muskelzellen, in der Mesosalpinx, der glatten Muskulatur und der Subserosa nachweisbar (A, B, Pfeil). Eine einzelne ChAT-eGFP exprimierende Zelle wurde auch im Epithel des Infundibulums gefunden (C, Pfeil). Blockpfeil: CHT1-positive Zelle in der Subserosa. ep: Epithel, gm: glatte Muskulatur, meso: Mesosalpinx, sub: Subserosa

Vesikulärer Acetylcholintransporter (VACHT)

Mittels Immunhistochemie war praktisch kein VACHT in der Tuba uterina nachweisbar. In sehr seltenen Fällen waren punktförmige Markierungen vorhanden, welche tatsächlich VACHT darstellen könnten, da VACHT in Vesikeln vorkommt (Abb. 3.7). Ähnliches konnte in den Präabsorbtionen nicht gefunden werden (Abb. 3.7). Die ebenfalls vorhandene apikale Färbung mancher Epithelzellen konnte nicht präabsorbiert werden und ist demnach nicht spezifisch. Aufgrund der extrem geringen Markierung wurde als Positivkontrolle Schnitte vom Darm eingesetzt. Hier waren eindeutig VACHT-positive Nervenfasern nachweisbar (Abb. 3.7). Diese Markierung war mit dem korrespondierenden Peptid vollständig präabsorbierbar (Abb. 3.7).

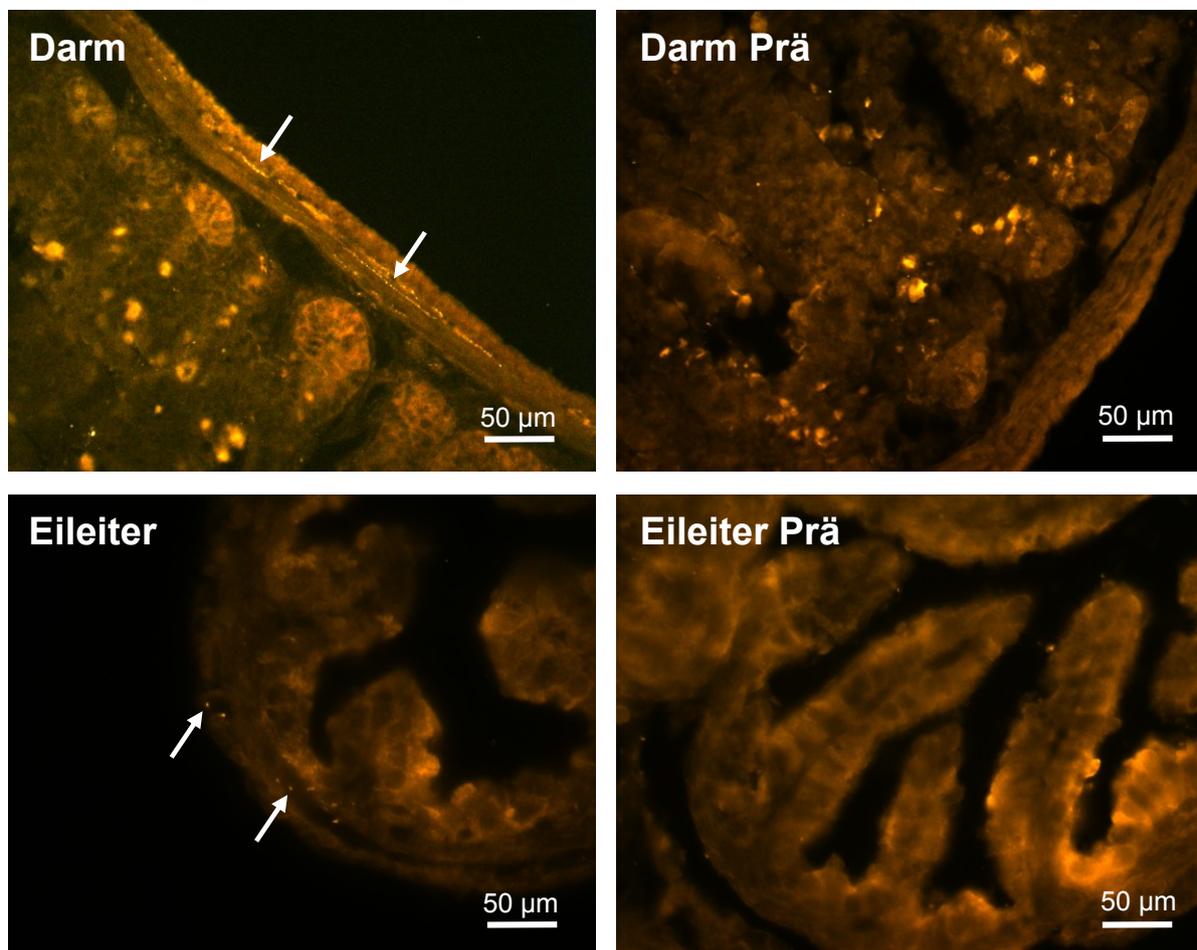


Abb. 3.7: VACHT-Immunhistochemie, Tuba uterina und Darm der Maus. VACHT-positive Nervenfasern sind in der Muskulatur des Darms nachweisbar (Pfeile). Diese Markierung lässt sich mit dem korrespondierenden Peptid vollständig präabsorbieren. Im Gegensatz dazu ist das Signal der VACHT-positiven Zellen in den Darmzotten nicht präabsorbierbar. Im Eileiter ist praktisch kein VACHT nachweisbar. Hier abgebildet ist eine der seltenen möglichen Markierungen. Die apikale Färbung einiger tubarer Epithelzellen ist nicht präabsorbierbar.

Hochaffiner Cholintransporter 1 (CHT1)

Mittels Immunhistochemie konnten CHT1 exprimierende Zellen in der Tuba uterina nachgewiesen werden. Es handelte sich dabei um einzelne Zellen in der Mesosalpinx und seltener in der subserösen Adventitia um die Tubenquerschnitte (Abb. 3.8). Das Signal konnte durch Präabsorbition mit dem korrespondierenden Peptid vollständig blockiert werden (Abb. 3.8). CHT1-positive Zellen waren nicht ChAT-eGFP positiv. Mit Blick auf die Ergebnisse bei der RT-PCR, dort wurde nur in etwa 30% der Proben CHT1 mRNA nachgewiesen, wurde verhältnismäßig viel CHT1-Protein in der Tuba uterina mittels Immunhistochemie nachgewiesen. CHT1-positive Nervenfasern waren nicht vorhanden.

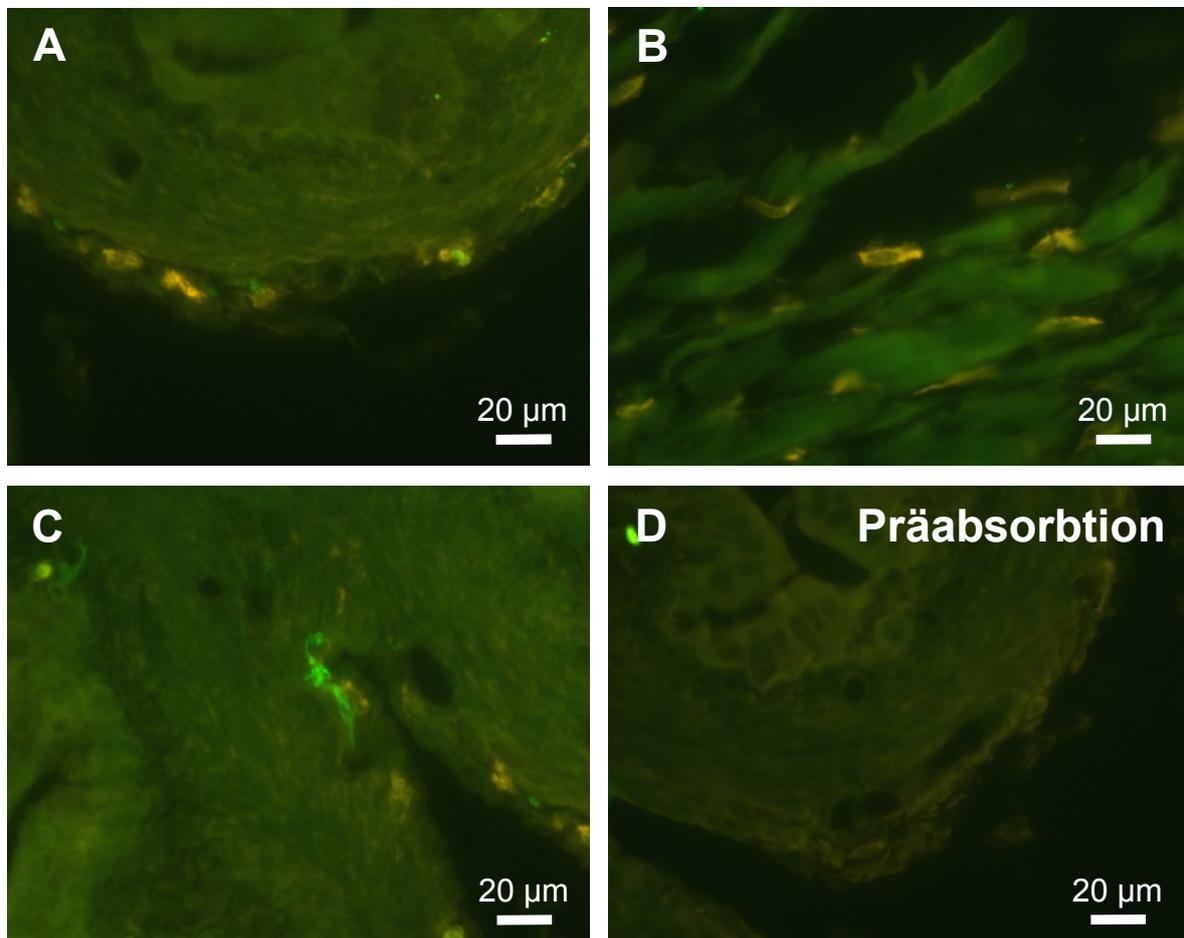


Abb. 3.8: CHT1-Immunhistochemie, Tuba uterina der ChAT-eGFP-transgenen Maus. CHT1 immunreaktive Zellen sind in der Subserosa (A) und in der Mesosalpinx (B) nachweisbar. CHT1-positive Zellen exprimieren kein ChAT-eGFP (C). Die CHT1-Markierung ist mit dem korrespondierenden Peptid vollständig präabsorbierbar (D).

3.1.2.2 Organische Kationentransporter 1-3

Für den immunhistochemischen Nachweis der OCTs 2 und 3 wurden drei verschiedene Antikörper verwendet. Zum Nachweis von OCT1 konnte leider kein spezifischer Antikörper gefunden werden. Der organische Kationentransporter 2 konnte im apikalen Bereich der zilientragenden Zellen detektiert werden. Das Signal ließ sich mit dem korrespondierenden Peptid vollständig präabsorbieren (Abb. 3.9). Die Verwendung der zwei verschiedenen Antikörper gegen das Ratten- (rOCT) bzw. humane (hOCT) Ortholog von OCT3 führte zu geringfügig unterschiedlichen Markierungen. Der Antikörper gegen rOCT3 erkennt eine Peptidsequenz, die eine vollständige Homologie zu seinem murinen Ortholog aufweist. Dieser Antikörper färbte hauptsächlich den apikalen Bereich der zilientragenden Zellen des Epithels. Dagegen färbte der Antikörper gegen das humane Ortholog, welches 82% Sequenzhomologie zu dem murinen OCT3 aufweist, die glatte Muskulatur und schwach den apikalen Bereich der zilientragenden Zellen. Auch diese Markierung konnte durch Präabsorption mit den korrespondierenden Peptiden verhindert werden (Abb. 3.9).

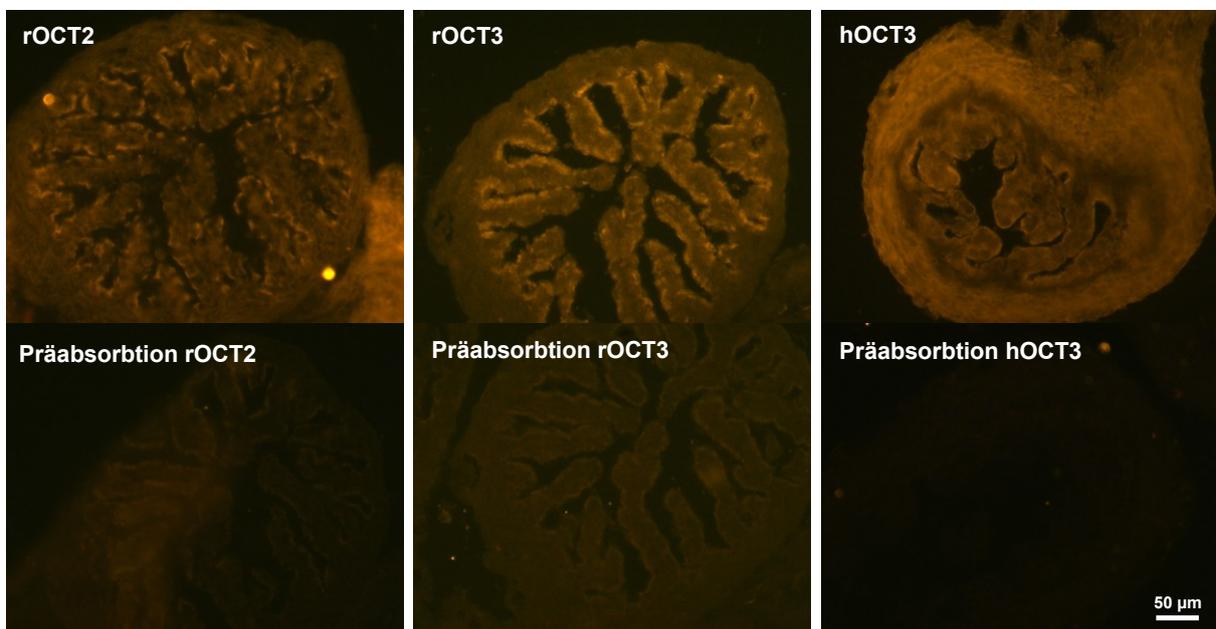


Abb. 3.9: Immunhistochemie zum Nachweis der organischen Kationentransporter (OCT) 2 und 3. Der Antikörper gegen rOCT2 färbt den apikalen Bereich der zilientragenden Zellen. Zu sehen ist hier ein Bereich der Ampulla. Die Spezifität der Markierung konnte mittels Präabsorption mit dem korrespondierenden Peptid gezeigt werden. Die Antikörper gegen das Ratten- und humane OCT3 färbten den apikalen Bereich der zilientragenden Zellen (rOCT3) bzw. leicht den apikalen Bereich der zilientragenden Zellen und die glatte Muskulatur (hOCT3). Auch diese Markierung lässt sich durch Präabsorption mit den korrespondierenden Peptiden verhindern.

3.1.2.3 Muskarinische Rezeptoren

Immunhistochemie

Es ist bekannt, dass momentan nur für den Nachweis des M2-Rezeptors ein spezifischer Antikörper vorhanden ist. Dabei handelt es sich um einen monoklonalen Rattenantikörper (mAB367) von Chemicon (Billierica, USA). Seine Spezifität wurde in unserer Arbeitsgruppe mittels M2/3 Rezeptor-defizienten Mäusen bestätigt (Jositsch et al. 2009). Dieser Antikörper markiert im Bronchus spezifisch glatte Muskulatur (Abb. 3.10a, Bilder mit freundlicher Genehmigung von G. Jositsch) und Kardiomyocyten der Pulmonalvene (Jositsch et al. 2009). Im Fall der Tuba uterina verursacht derselbe Antikörper eine falsch positive Färbung im apikalen Bereich der zilientragenden Zellen sowohl im Isthmus, als auch in der Ampulla (Abb. 3.10b). Die glatte Muskulatur ist nicht gefärbt. Alle hier abgebildeten Bilder sind unter identischen Bedingungen mit Gewebe desselben gendefizienten Tieres erstellt wurden.

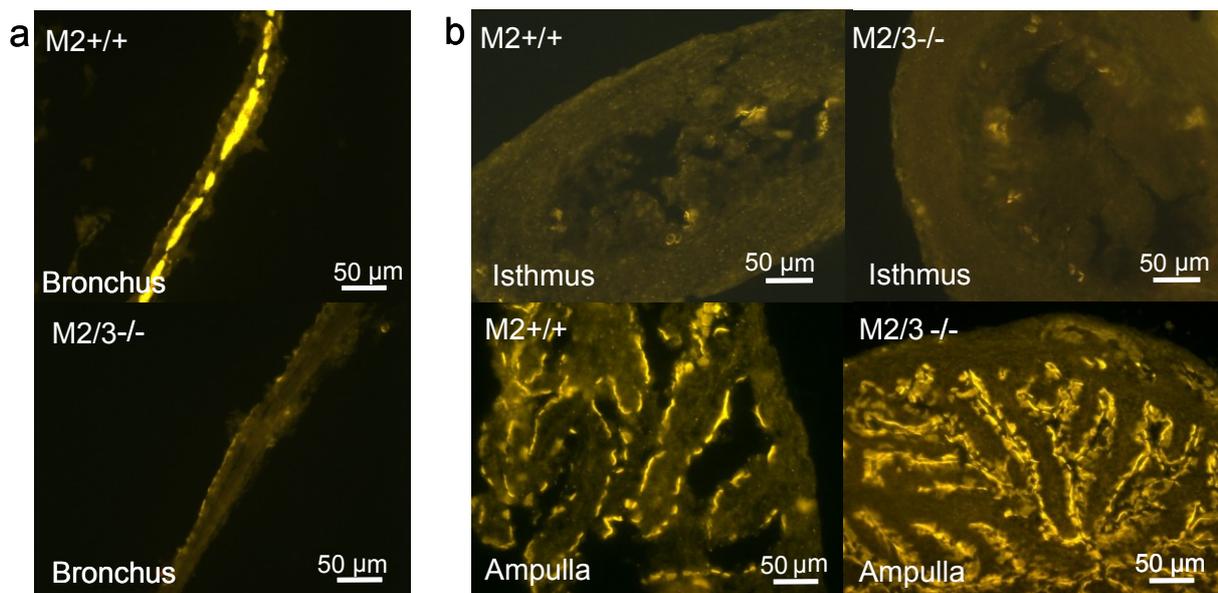


Abb. 3.10: Immunhistochemischer Nachweis des M2-Rezeptors mit dem monoklonalen Ratten Antikörper 367 (Chemicon) a) Nachweis des M2-Rezeptors in der glatten Muskulatur des Bronchus einer Wildtypmaus (M2+/+). Zum Nachweis der Spezifität des Antikörpers diente eine M2/3-KO-Maus b) Unspezifische Färbungen des apikalen Bereichs der zilientragenden Zellen in Ampulla und Isthmus der Maus bei Wildtyp- und KO-Mäusen

Laser-assistierte Mikrodissektion

Aufgrund der oben erwähnten Unspezifität der vorhandenen Antikörper gegen muskarinische Rezeptoren (Jositsch et al. 2009; Pradidarcheep et al. 2009) wurde Laser-assistierte Mikrodissektion zur Lokalisation der Rezeptoren durchgeführt. Es wurde die Expression der Rezeptoren M1, M2 und M3 in Epithel und glatter Muskulatur untersucht. Abbildung 3.11 zeigt repräsentative Bilder der Laser-assistierten Mikrodissektion von Epithel und glatter Muskulatur. Im Epithel konnte mRNA der Rezeptoren M1 (4 von 6 Proben) und M3 (4 von 6 Proben) nachgewiesen werden. In Proben der glatten Muskulatur war keine Expression von muskarinischen Rezeptoren nachweisbar (Abb. 3.12). Ohne reverse Transkription konnten keine Amplifikationsprodukte nachgewiesen werden.

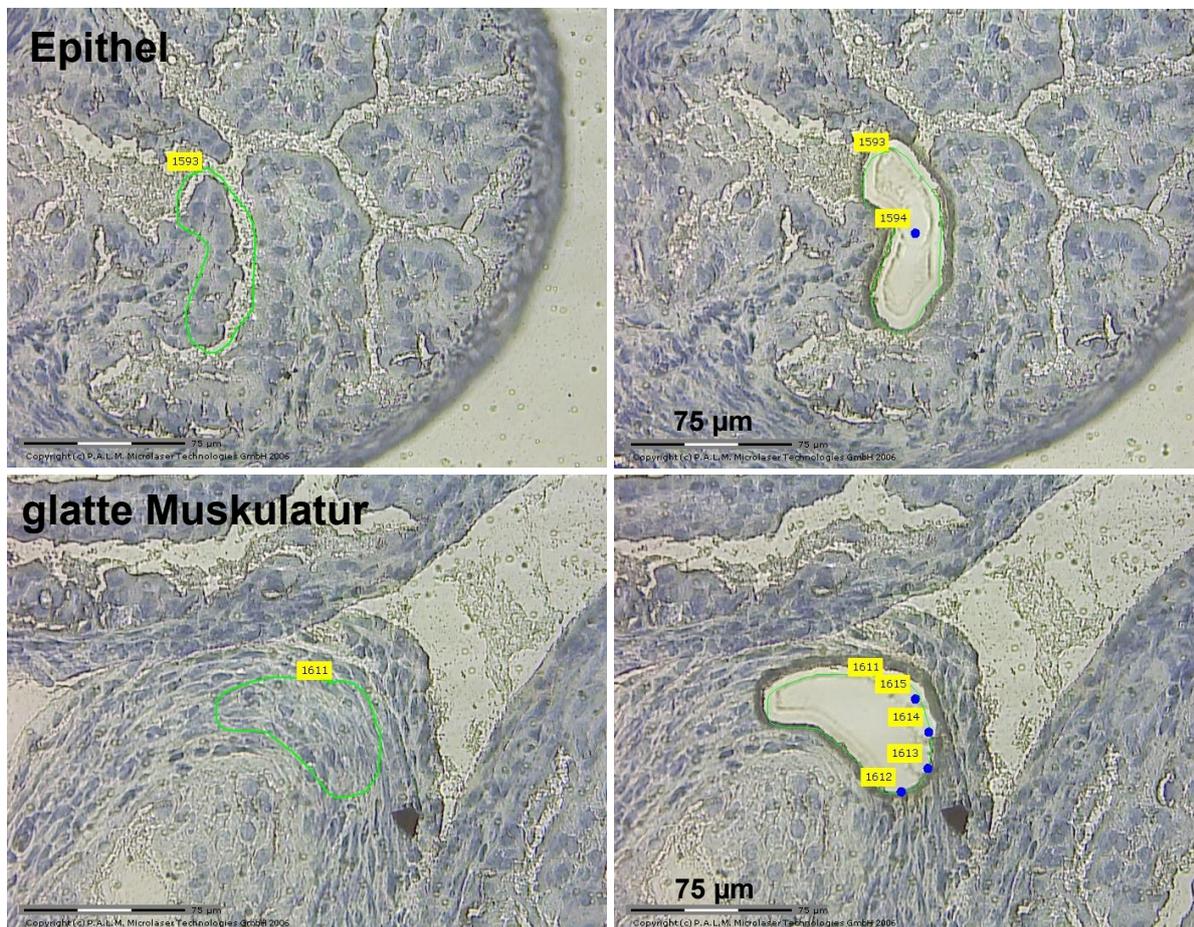


Abb. 3.11: Repräsentative Bilder von Hämalaun-gefärbten Kryoschnitten des Eileiters. Es wurden mit Hilfe eines Lasers Proben von Epithel und Muskulatur entnommen. Für jede Probe wurden 60 Gewebeprofile gepoolt. Grün dargestellt sind die verwendeten Laserlinien.

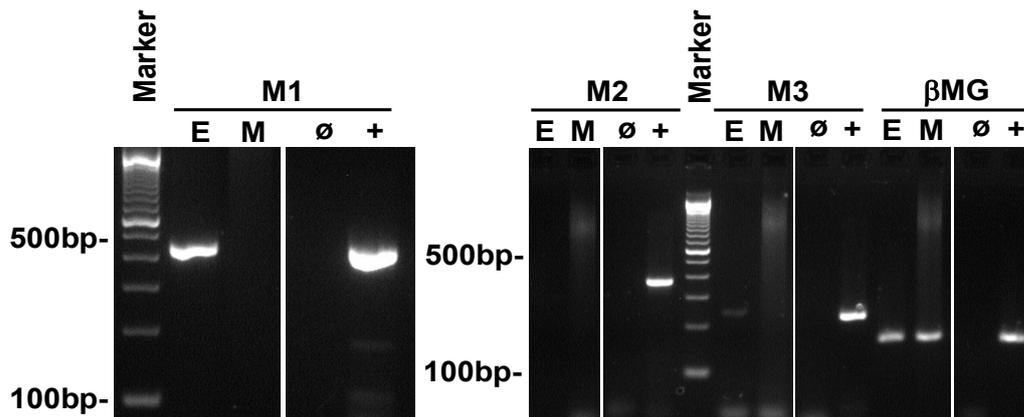


Abb. 3.12: Agarosegele nach erfolgter RT-PCR mit den Primern M1, M2, M3 und dem Housekeeping-Gen β -MG in Proben von Epithel (E) und glatter Muskulatur (M). \emptyset : Kontrolle ohne Reverse Transkription, +: Positivkontrolle Gehirn; N(E)=6; N(M)=5

3.1.2.4 Nikotinische Rezeptoruntereinheiten

Laser-assistierte Mikrodissektion

Auch die Unspezifität der vorhandenen Antikörper gegen nikotinische Rezeptoruntereinheiten ist beschrieben (Moser et al. 2007). Deshalb wurde auch in diesem Fall auf die Laser-assistierte Mikrodissektion zurückgegriffen. Es wurde die Expression der nAChR-Untereinheiten α 3 und α 7 sowohl in Epithel als auch in glatter Muskulatur überprüft. Die mRNA von α 7 war im Epithel in 3 von 6 Proben und in glatter Muskulatur in 2 von 5 Proben nachweisbar, wohingegen mRNA von nAChR α 3 nicht gefunden wurde (Abb. 3.13).

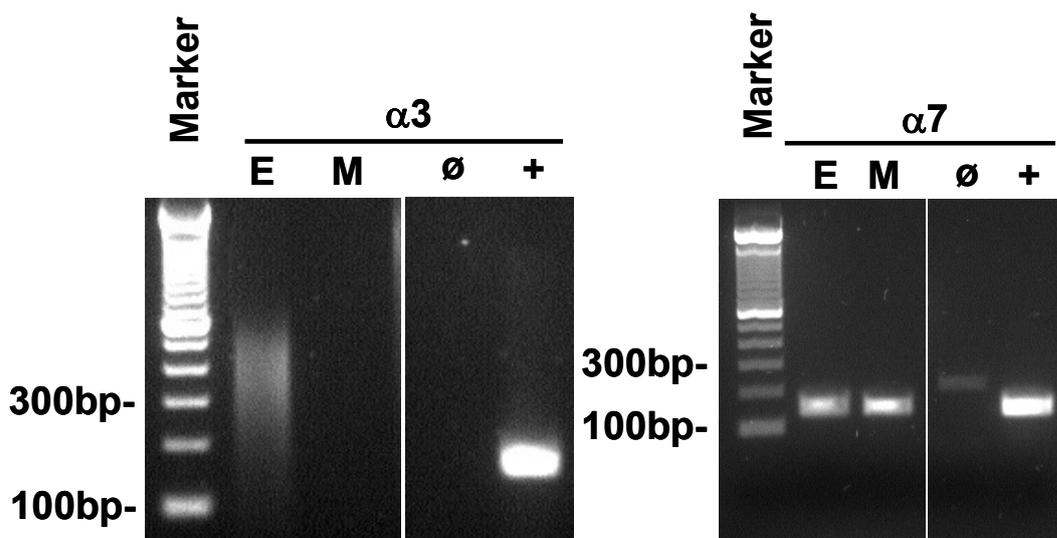


Abb. 3.13: Agarosegele nach erfolgter RT-PCR mit den Primern α 3 und α 7 in Proben von Epithel (E) und glatter Muskulatur (M). \emptyset : Kontrolle ohne Reverse Transkription, +: Positivkontrolle Gehirn; N(α 3)=4; N(α 7,E)=6; N(α 7,M)=5

DAB-basierte Immunhistochemie und Transmissionselektronenmikroskopie des Eileiters einer transgenen Maus, welche eGFP unter der Kontrolle des $\alpha 3$ -Promotors exprimiert

Obwohl mittels Laser-assistierter Mikrodissektion keine mRNA der nAChR $\alpha 3$ -Untereinheit nachweisbar war, konnte mit Hilfe einer eGFP unter dem $\alpha 3$ -Promotor exprimierenden Maus (Frahm et al. 2011) die Anwesenheit der $\alpha 3$ -Untereinheit in einzelnen zilientragenden Zellen im Epithel der Eileiter der Maus nachgewiesen werden. Die $\alpha 3$ -eGFP transgenen Mäuse zeigen grüne eGFP-Fluoreszenz in Nervenfasern (Abb. 3.14a). Nach immunhistochemischer Verstärkung mittels eines polyklonalen Huhn-anti-eGFP Antikörpers waren zusätzliche Nervenfasern und einzelne positive Zellen im Epithel der Ampulla, aber nicht im Isthmus, nachweisbar (Abb. 3.14b).

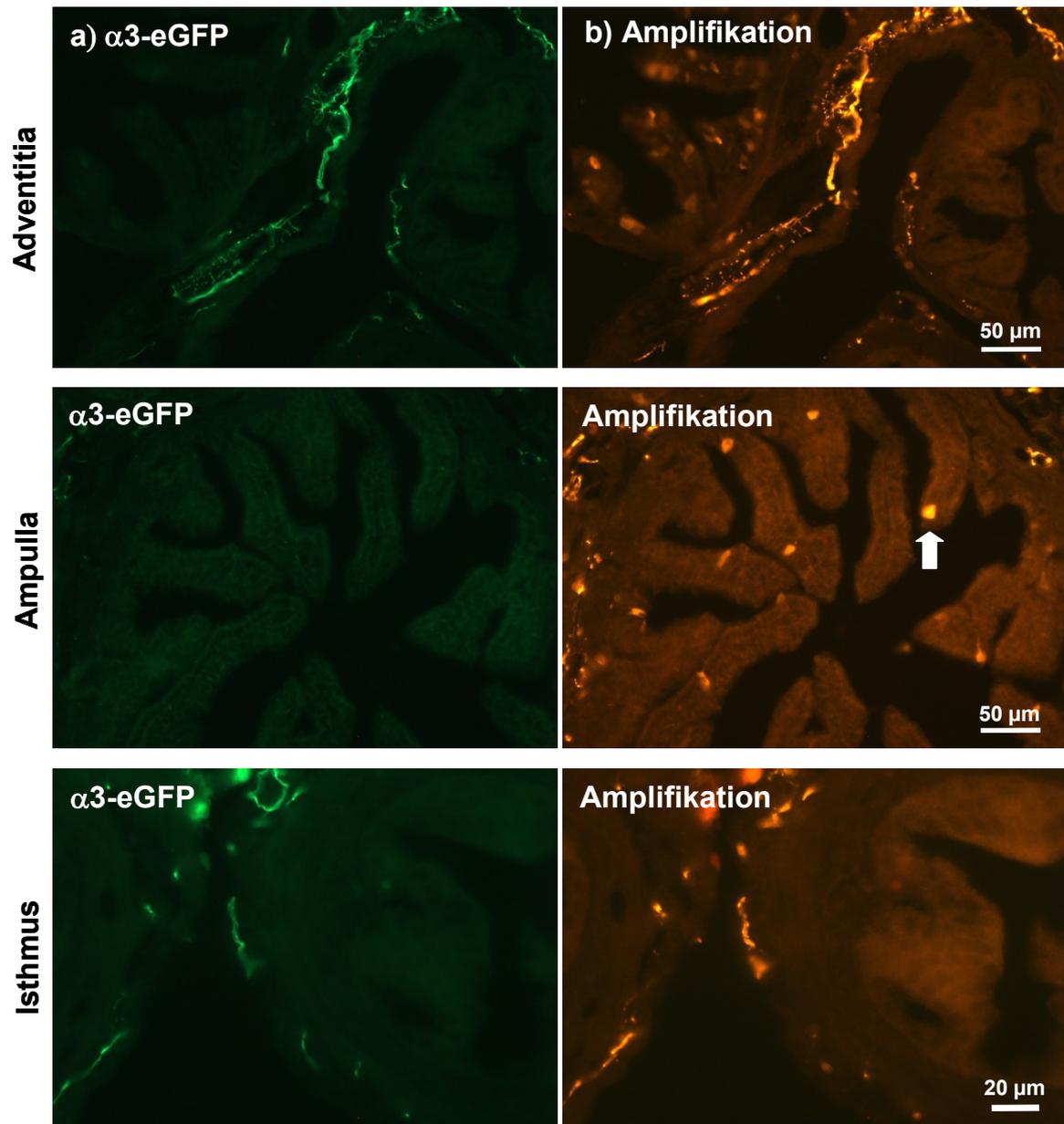


Abb. 3.14: eGFP-Fluoreszenz in der nAChR $\alpha 3$ -eGFP-transgenen Maus (Frahm et al. 2011). a) Direkte $\alpha 3$ -eGFP-Fluoreszenz ohne Antikörperverstärkung. EGFP-positiv sind hauptsächlich Nervenfasern um Blutgefäße in der Adventitia und der Subserosa. b) Die Verstärkung der Fluoreszenz mit Hilfe eines anti-eGFP-Antikörpers aus dem Huhn zeigt zusätzliche Nervenfasern (siehe Bild Ampulla) und positive Epithelzellen (Blockpfeil) in der Ampulla, aber nicht im Isthmus.

Um den Zelltyp der $\alpha 3$ -eGFP exprimierenden Zellen bestimmen zu können, wurde eine DAB-basierte Immunhistochemie durchgeführt und am Transmissionselektronenmikroskop ausgewertet. Diese Auswertung zeigte, dass die eGFP-positive Epithelzellen zilientragende Zellen sind.

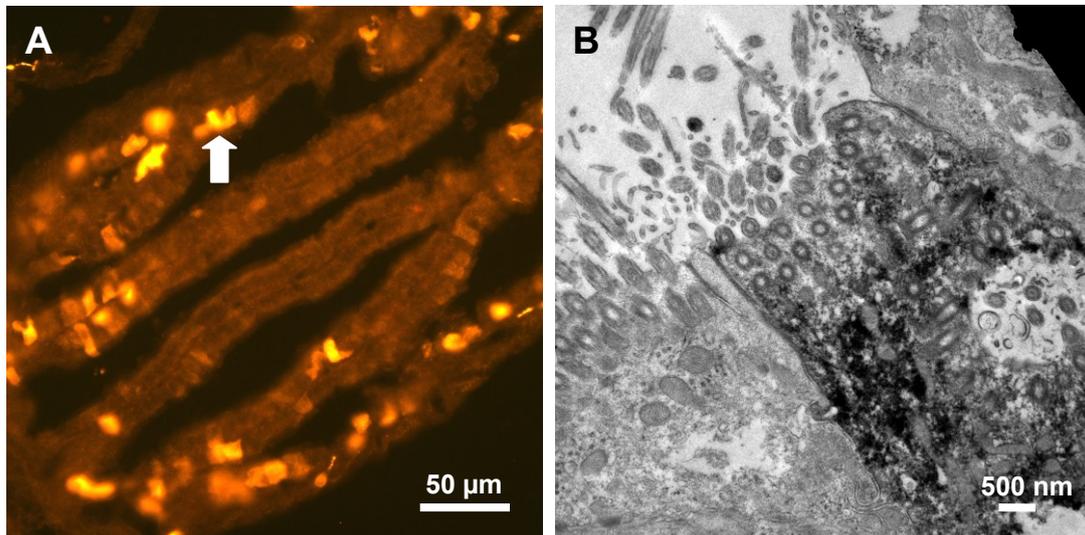


Abb. 3.15: A) Amplifikation des eGFP-Signals mittels anti-eGFP Immunfluoreszenz in der nAChR- $\alpha 3$ -eGFP-transgenen Maus (Frahm et al. 2011). Eine Subpopulation von Epithelzellen der Ampulla ist nAChR- $\alpha 3$ positiv. B) DAB-basierte Immunhistochemie an nAChR $\alpha 3$ -eGFP exprimierenden transgenen Mäusen (Frahm et al. 2011). Die Auswertung mit dem Transmissionselektronenmikroskop zeigt, dass die $\alpha 3$ -eGFP-positiven Epithelzellen zilientragende Zellen sind.

3.1.2.4 Acetylcholinesterase- (AChE) und Butyrylcholinesterase- (BChE) Histochemie

Die AChE-Histochemie dient zum Nachweis cholinergischer Nervenfasern. Im Eileiter der Maus wurden generell nur sehr wenige cholinerge Nervenfasern nachgewiesen. Diese wenigen Nervenfasern befanden sich hauptsächlich in der Mesosalpinx, dem Mesovar bzw. in weiteren bindegewebigen, serösen und subserösen Strukturen, welche den eng gewundenen Eileiter zusammenhalten und direkt umschließen. Häufig befanden sich diese Nervenfasern in der unmittelbaren Nähe von Blutgefäßen.

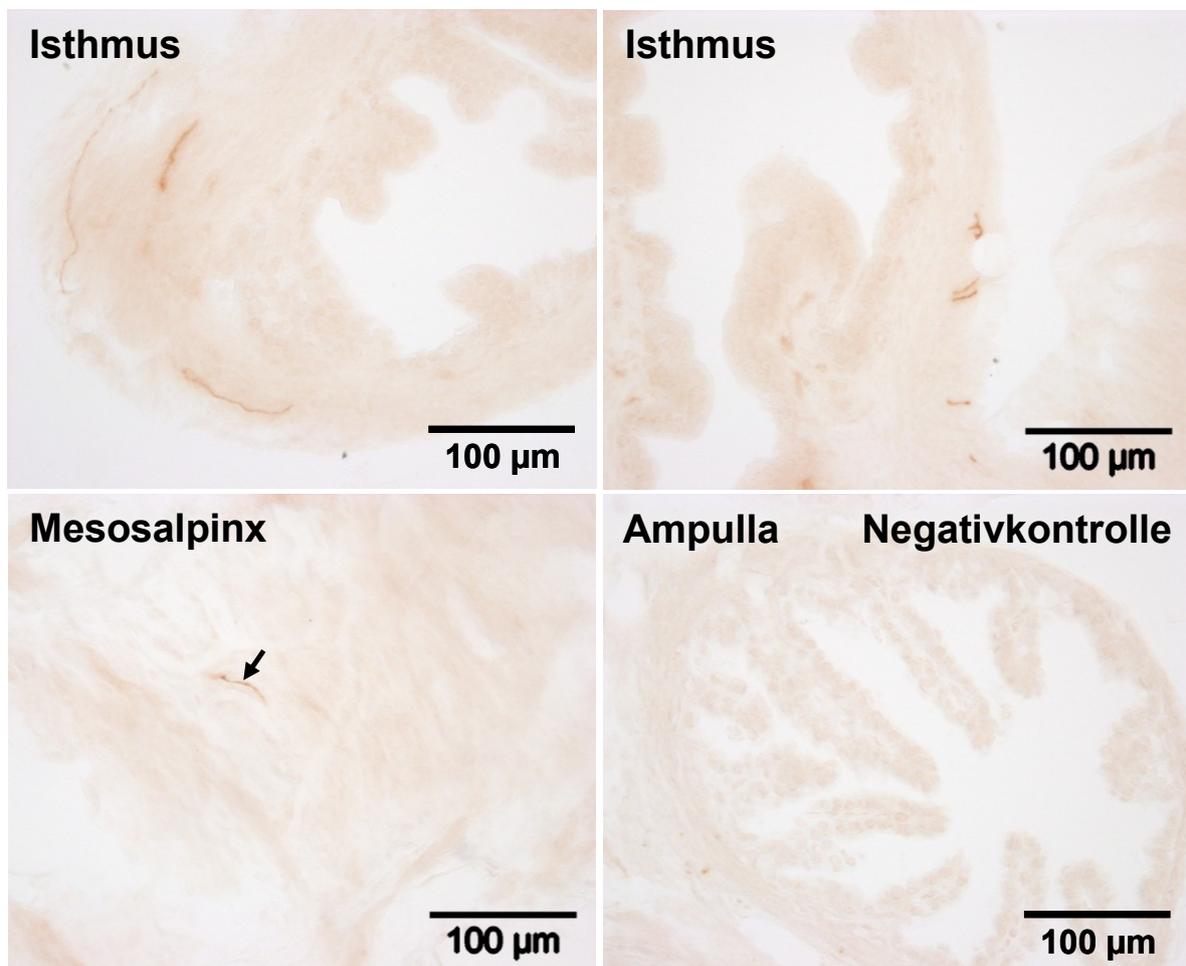


Abb. 3.16: AChE-Histochemie am Eileiter der Maus. Cholinerge Nervenfasern (Pfeil) waren generell selten vorhanden. Meist befanden sie sich in der Mesosalpinx, der serösen und subserösen Adventitia um die Tubenquerschnitte der Maus herum und in der Nähe von Blutgefäßen. In der Negativkontrolle ohne das Substrat Acetylthiocholin-Iodid sind keine cholinergen Nervenfasern zu sehen.

Auch zum Nachweis der Lokalisation der Butyrylcholinesterase im Eileiter der Maus wurden histochemische Untersuchungen durchgeführt. Die BChE wurde in der Tuba uterina hauptsächlich im Epithel und den äußeren Lagen der glatten Muskulatur des Isthmus nachgewiesen. In der Ampulla war manchmal eine schwache Färbung der glatten Muskulatur zu beobachten. Die Stärke der Färbung variierte von Probe zu Probe. Als Positivkontrolle wurden Schnitte der Leber verwendet. Als Negativkontrolle wurden Schnitte ohne das Substrat S-Butyrylthiocholin-Iodid inkubiert.

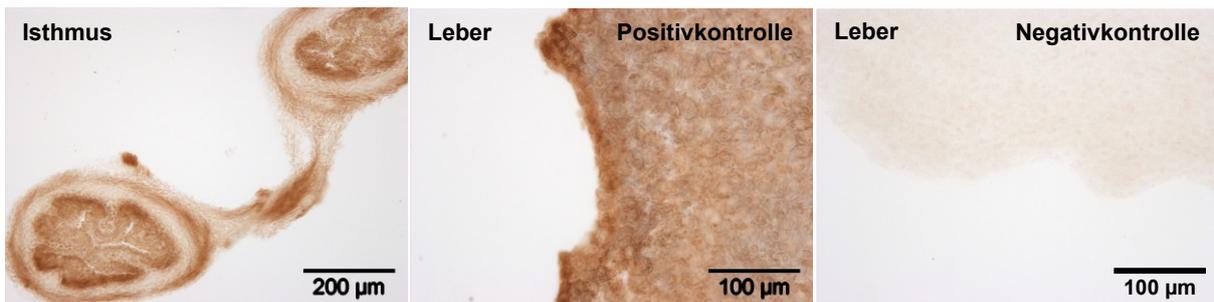


Abb. 3.17: BChE-Histochemie am Eileiter der Maus. Die BChE wurde im Epithel und den äußeren Muskelschichten des Isthmus nachgewiesen. Als Positivkontrolle dienten Schnitte aus der Leber. Schnitte, die ohne das Substrat S-Butyrylthiocholin-Iodid inkubiert wurden, dienten als Negativkontrolle.

3.1.3 Acetylcholin-Messungen

Mittels HPLC konnten geringe Mengen von ACh in der Tuba uterina der Maus nachgewiesen werden. In der Ampulla wurden durchschnittlich $0,38 \pm 0,12$ pmol/mg und im Isthmus $0,27 \pm 0,10$ pmol/mg ACh nachgewiesen (N=4). In Proben der Gesamttube (N=3) waren durchschnittlich $0,87 \pm 0,10$ pmol/mg nachweisbar. Hier war allerdings nach der Kontrollreaktion mit der Esterasetrennsäule und erneuter Messung kein ACh-Peak mehr sichtbar. In den Proben der Gesamttube war also kein eindeutiger ACh-Nachweis möglich.

Mittels DESI-Messung konnte kein ACh auf der Oberfläche des Epithels der Tuba uterina (N=3) nachgewiesen werden. Auf dem Epithel der Trachea, welches als Positivkontrolle diente, war ACh nachweisbar (N=2).

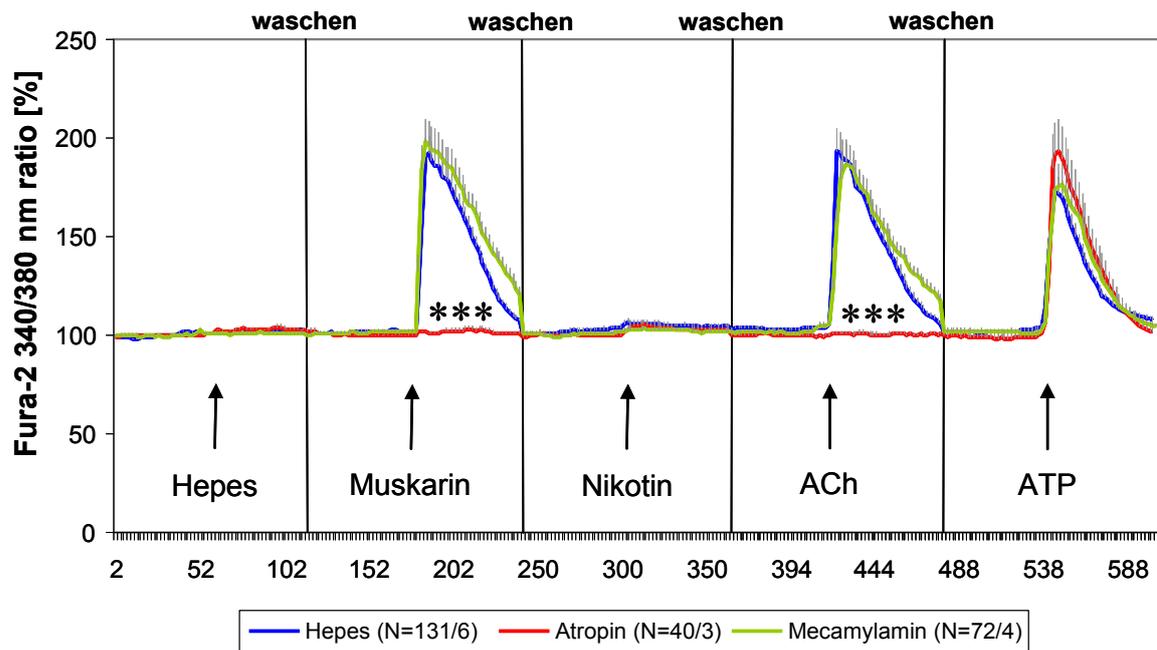
3.2 Funktionelle Untersuchungen des cholinergen Systems im Eileiter der Maus mittels Calcium-Imaging

3.2.1 Nicht-zilientragende Zellen

Etwa 30% aller nicht-zilientragenden Zellen, die aus dem Ovidukt von WT-Mäusen isoliert wurden, reagierten mit einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ von etwa 100% auf Zugabe von Muskarin, ACh und ATP (Abb. 3.18, 20). Außerdem reagierten einzelne (14 von 356) Zellen auch auf Zugabe von Nikotin (Abb. 3.19). Als lebend wurden alle nicht-zilientragenden Zellen klassifiziert, welche sich nach dem Experiment nicht mit Trypanblau anfärben ließen.

3.2.1.1 Einfluss der cholinergen Blocker Atropinsulfat und Mecamylamin auf die Reaktion nicht-zilientragender Zellen auf cholinerge Agonisten.

Bei Zugabe von Atropinsulfat wurde die Reaktion auf die cholinergen Agonisten Muskarin und ACh vollständig blockiert (Abb. 3.18, $p=0,000$). Die Zugabe von Mecamylamin führt zu einer signifikanten Reduktion der Reaktion auf Nikotin ($p=0,000$). Dies ist allerdings aufgrund der wenigen auf Nikotin reagierenden Zellen in Abbildung 3.18 nicht sichtbar. Die Reaktion auf ATP wurde durch keinen der beiden Blocker beeinflusst.



nicht-zilientragende Zellen	Reaktion auf Muskarin	Reaktion auf Nikotin	Reaktion auf ACh	Reaktion auf ATP
Kontrolle vs. Atropin	*** p=0.000	p=0.132	*** p=0.000	p=0.136
Kontrolle vs. Mecamylamin	p=0.375	*** p=0.000	p=0.272	p=0.772

Abb. 3.18: Calcium-Imaging-Experimente an oviduktalen nicht-zilientragenden Zellen, dargestellt als Fura-2 Fluoreszenz-Intensität (340:380 nm, Mittelwert±SEM). Die Zellen wurden nacheinander mit Hepes als Vehikelkontrolle, Muskarin (10^{-5} M), Nikotin (10^{-4} M), ACh (10^{-5} M) und ATP (10^{-5} M) inkubiert. Nach jeder Pharmakongabe wurde 2 min gewaschen. Der muskarinische Blocker Atropinsulfat (10^{-6} M) und der nikotinische Antagonist Mecamylamin (10^{-5} M) wurden jeweils statt Hepes als Vehikelkontrolle und als Mischung mit dem jeweiligen Pharmakon gegeben. Die Gruppen wurden mittels Kruskal-Wallis Rangsummen-Test, gefolgt vom Mann-Whitney-Test für gepaarte Stichproben verglichen. In der Tabelle sind die resultierenden p-Werte des Mann-Whitney Tests angegeben. Die Reaktion auf die Zugabe von Muskarin und ACh ist vollständig durch Atropinsulfat blockierbar. Bei Gabe von Mecamylamin ist die Reaktion auf Nikotin signifikant reduziert (Mann-Whitney-Test). Dies ist aufgrund der geringen Anzahl reagierender Zellen hier nicht sichtbar. N=reagierende Zellen/Anzahl Experimente

Der Anteil reagierender nicht-zilientragender Zellen auf cholinerge Agonisten ließ sich durch die Zugabe sowohl des muskarinischen Blockers Atropinsulfat als auch durch die Zugabe des nikotinischen Antagonisten Mecamylamin beeinflussen. Signifikant weniger Zellen reagierte nach Zugabe von Atropinsulfat auf Muskarin und ACh. Außerdem reagierten signifikant mehr Zellen nach Zugabe von Mecamylamin auf Zugabe von Muskarin, ACh und ATP (Abb. 3.19).

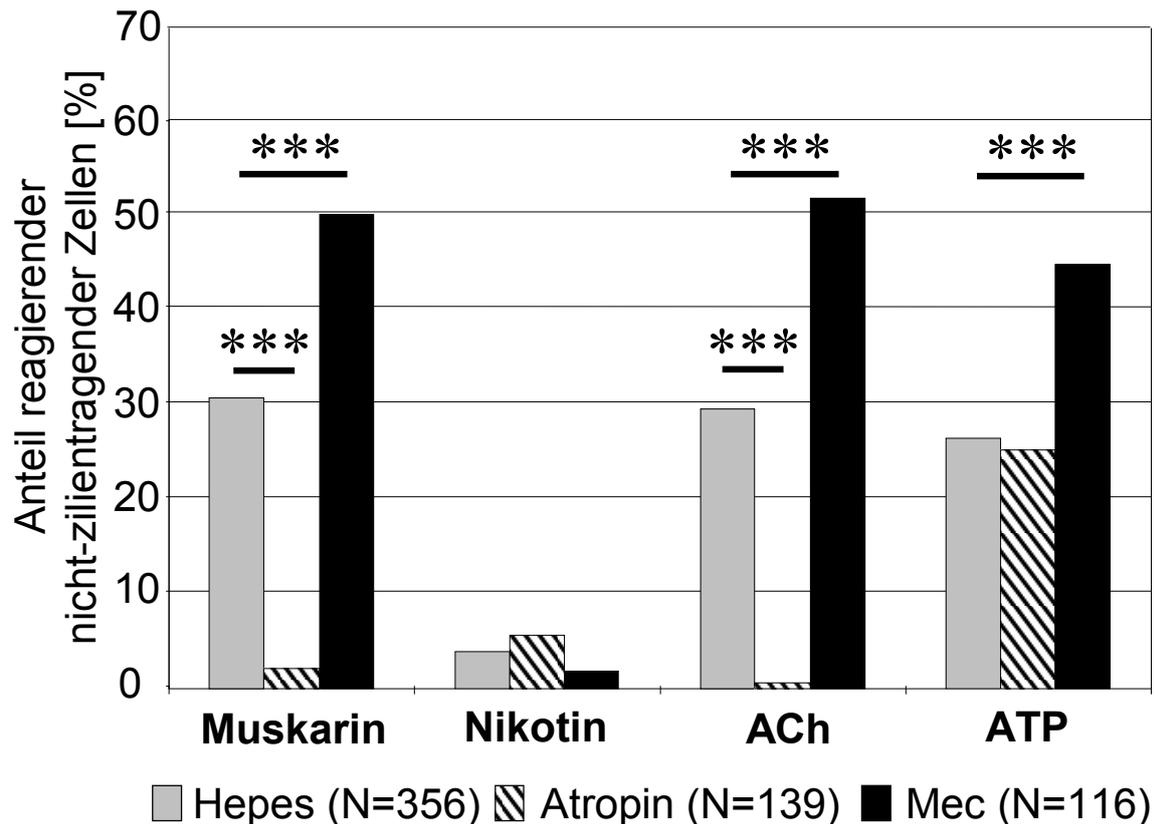


Abb. 3.19: Anzahl reagierender nicht-zilientragender Zellen. Bei Gabe von Atropin reagieren signifikant weniger Zellen auf Muskarin und ACh als ohne Blocker. Im Gegensatz dazu reagieren bei Gabe von Mecamylamin signifikant mehr Zellen auf die Gabe von Muskarin, ACh und ATP. Aufgrund der geringen Anzahl auf Nikotin reagierender Zellen (unter 5%) sind diese Veränderungen nicht auswertbar. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, Chi²-Test. N=Anzahl lebender Zellen

3.2.1.2 Reaktionen oviduktaler nicht-zilientragender Zellen von WT-, M1KO- und M3KO-Mäusen auf cholinerge Agonisten.

Signifikant weniger aus den beiden KO-Linien isolierte nicht-zilientragende Zellen reagierten auf Muskarin, ACh und ATP. Bei aus M1KO-Mäusen isolierten nicht-zilientragenden Zellen reagierten ca. 1/3 weniger Zellen nach Zugabe von Muskarin, ACh und auch ATP. Bei aus M3KO-Tieren isolierten Zellen reagierten im Vergleich zu den WT-Tieren nur noch etwa 25% der Zellen auf Muskarin und etwa 13% Prozent auf ACh. Es reagierten also wesentlich weniger aus M3KO-Tieren isolierte nicht-zilientragende Zellen auf Zugabe der Pharmaka Muskarin und ACh als aus M1KO-Tieren isolierte Zellen. Dieser Unterschied ist signifikant. Bei Zugabe von ATP reagierten dagegen bei beiden KO-Stämmen etwa 30% weniger Zellen als bei den WT-Mäusen. Da weniger als 5% der Zellen auf Nikotin reagierten, konnten die Unterschiede zwischen den drei Gruppen im Bezug auf Nikotin nicht ausgewertet werden (Abb. 3.20).

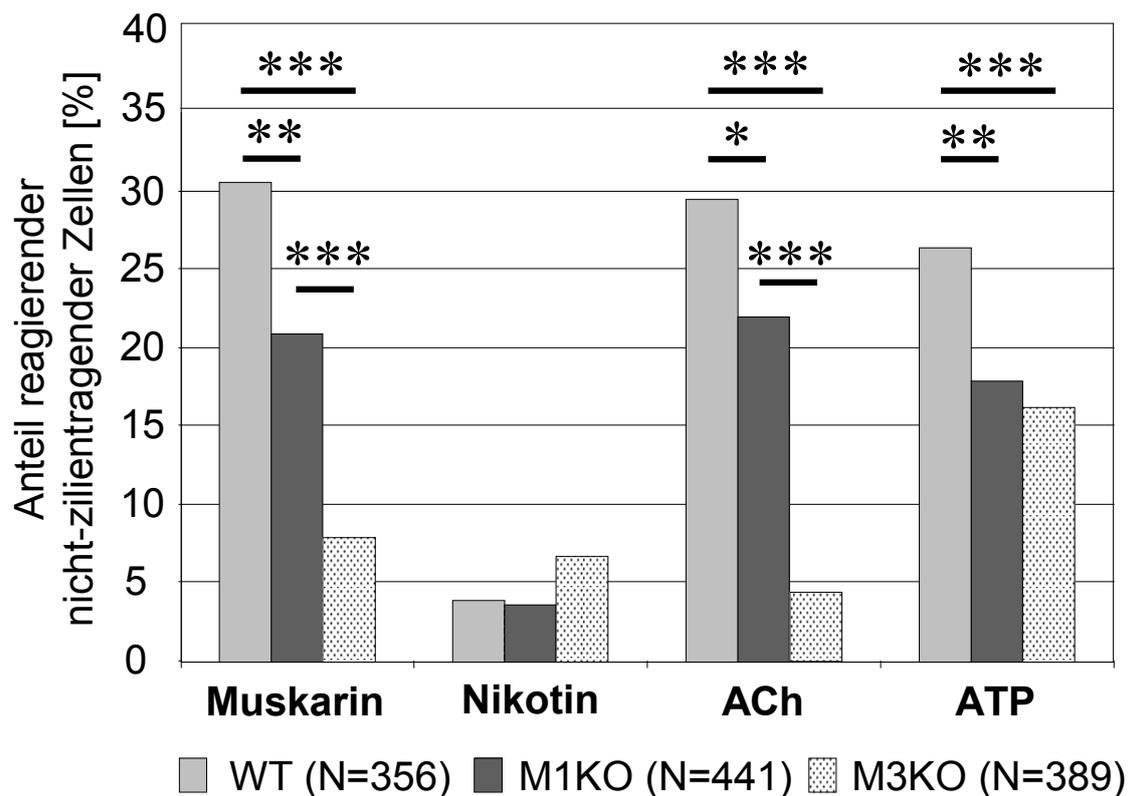


Abb. 3.20: Anzahl aus WT-, M1KO- und M3KO-Tieren isolierter, reagierender nicht-zilientragender Zellen. Es reagieren signifikant weniger aus M1KO- und M3KO-Tieren isolierte Zellen auf Gabe von Muskarin, ACh und ATP. Auch die Unterschiede zwischen den beiden KO-Stämmen auf Muskarin und ACh sind signifikant. Die Veränderungen bei der Gabe von Nikotin sind aufgrund der geringen Anzahl reagierender Zellen, statistisch nicht auswertbar. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, χ^2 -Test. N=Anzahl lebender Zellen

Ergebnisse

Der Vergleich der Stärke der Reaktionen nicht-zilientragender Zellen, welche aus WT- und M1KO-Tieren isoliert wurden, zeigte keine signifikanten Unterschiede. Die Stärke der Reaktion von aus M3KO isolierten nicht-zilientragenden Zellen auf Muskarin und ACh war im Vergleich zu WT-Mäusen signifikant reduziert. Im Gegensatz dazu war die Reaktion auf Nikotin signifikant verstärkt und die auf ATP unverändert (Abb. 3. 21).

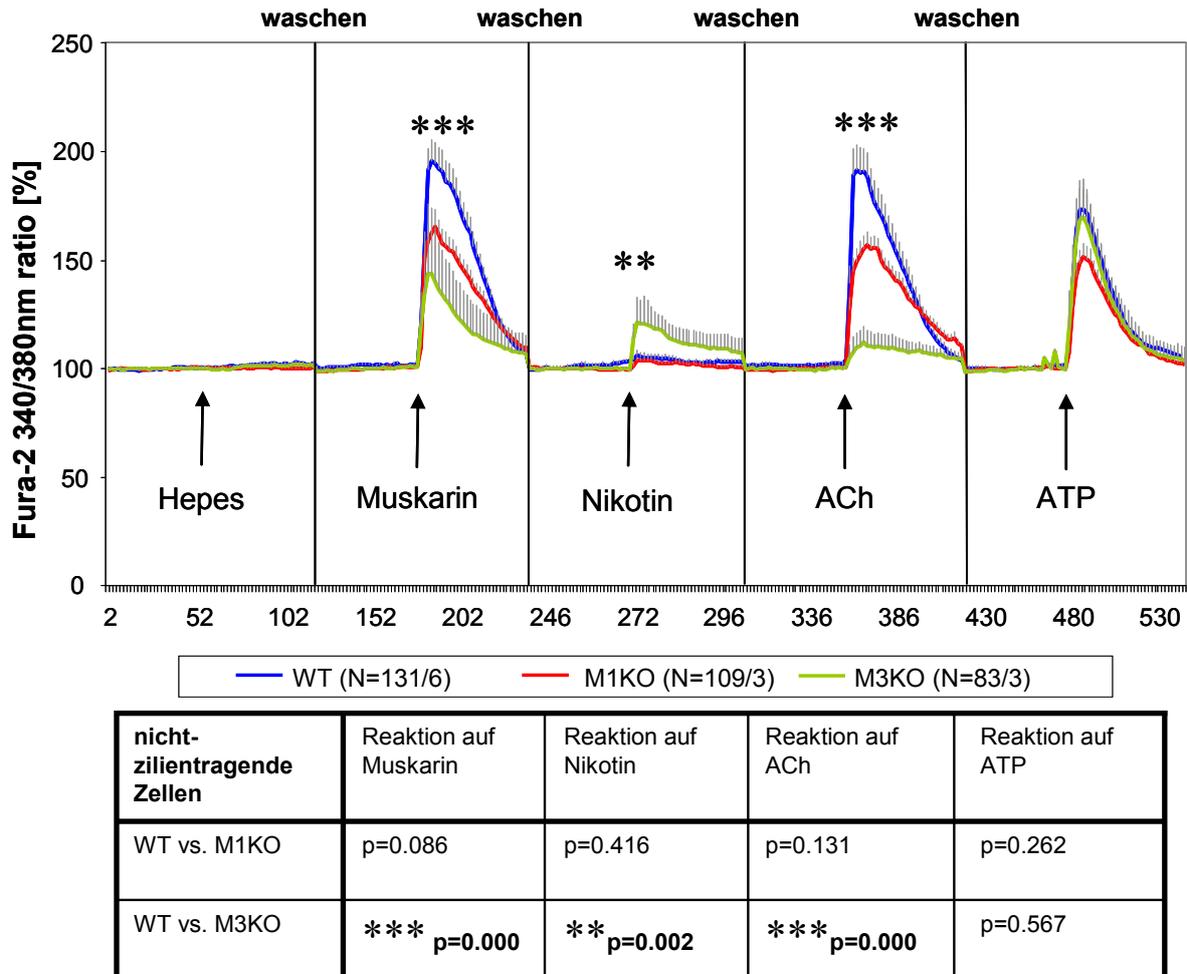


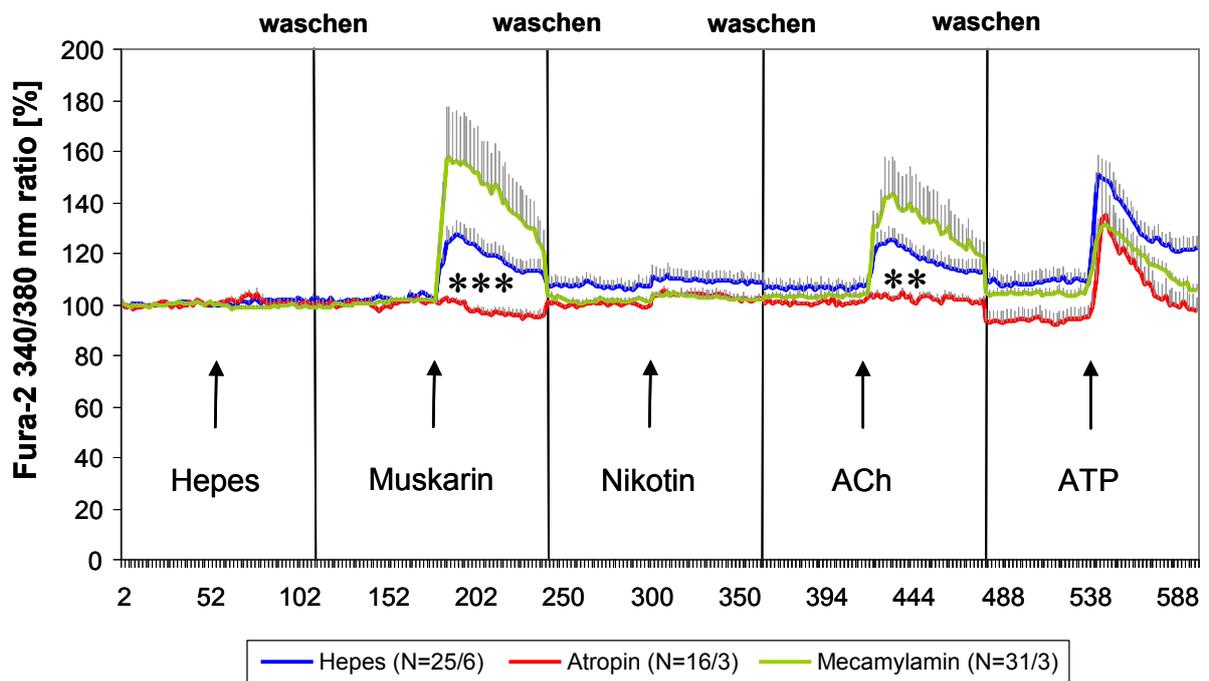
Abb. 3.21: Calcium-Imaging-Experimente an oviduktalen nicht-zilientragenden Zellen isoliert aus WT-, M1KO- und M3KO-Tieren. Der Vergleich der Reaktionen von WT- und M1KO-Tieren zeigt keine signifikanten Unterschiede. Im Gegensatz dazu ist bei M3KO-Tieren die Reaktion auf Muskarin und ACh signifikant schwächer und auf Nikotin signifikant stärker als in WT-Tieren (Mann-Whitney-Test). N=reagierende Zellen/Anzahl Experimente

3.2.2. Zilientragende Zellen

Etwa 10% aller isolierten lebenden zilientragenden Zellen des murinen Ovidukts reagierten auf Zugabe von Muskarin, ACh, und ATP mit einem $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg (Abb. 3.22, 24). Einzelne (2 von 173) zilientragende Zellen reagierten auch auf Zugabe von Nikotin mit einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 3.23). Die Zellen reagierten auf Muskarin und ACh mit einem Anstieg um etwa 25% und auf Zugabe von ATP mit einem Anstieg von etwa 40% (Abb. 3.22). Sie reagierten damit wesentlich schwächer auf Zugabe der Pharmaka als nicht-zilientragende Zellen, welche einen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg um etwa 100% zeigten (vergleiche 3.2.1). In diesen Experimenten wurden alle zilientragenden Zellen als lebend klassifiziert, welche vor und nach dem Experiment mit den Zilien schlugen und außerdem nach dem Experiment nicht mit Trypanblau anfärbbar waren.

3.2.2.1 Einfluss der cholinergen Blocker Atropinsulfat und Mecamylamin auf die Reaktion zilientragender Zellen auf cholinerge Agonisten.

Bei Zugabe von Atropinsulfat wurde die Reaktion auf die cholinergen Agonisten Muskarin und ACh vollständig blockiert (Abb. 3.22). Die Zugabe des nikotinischen Antagonisten Mecamylamin führte dagegen zu keiner signifikanten Veränderung der Reaktion auf Nikotin und ACh (Abb. 3.22). Die Reaktion auf ATP wurde durch keinen der beiden Blocker beeinflusst.



zilientragende Zellen	Reaktion auf Muskarin	Reaktion auf Nikotin	Reaktion auf ACh	Reaktion auf ATP
Kontrolle vs. Atropin	*** p=0.000	p=0.407	** p=0.002	p=0.917
Kontrolle vs. Mecamylamin	p=0.138	p=0.394	p=0.340	p=0.189

Abb. 3.22 Calcium-Imaging-Experimente an isolierten zilientragenden Zellen des murinen Ovidukts. Zilientragende Zellen reagieren mit einem $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg auf Zugabe von Muskarin, ACh und ATP. Einzelne Zellen reagieren auch auf Nikotin. Reaktionen auf Muskarin und ACh sind nach Zugabe von Atropinsulfat vollständig verschwunden. Die Zugabe von Mecamylamin führt zu keiner signifikanten Veränderung. Die Reaktion auf ATP wird durch Gabe der Blocker nicht beeinflusst (Mann-Whitney-Test). N=reagierende Zellen/Anzahl Experimente.

Allerdings reagierte nach Zugabe von Mecamylamin keine der 86 gemessenen Zellen auf Nikotin (Abb. 3.23). Die Zugabe von Mecamylamin führte außerdem zu einer verstärkten Reagibilität der zilientragenden Zellen auf Muskarin und ACh und auch auf die Positivkontrolle ATP. In allen drei Fällen reagierten nach Zugabe etwa 25% der Zellen auf Muskarin und ACh, im Vergleich zu etwa 10% reagierender Zellen ohne Zugabe des Blockers. Dieser Anstieg ist signifikant (Abb. 3.23, $p=0,000$; Chi²-Test). Nach Zugabe von Atropin reagierte keine der gemessenen Zellen auf Muskarin und nur noch etwa 3% der Zellen auf ACh (Abb. 3.23). Die Reduktion nach Zugabe von Muskarin ist signifikant. Die Veränderungen nach Gabe von Nikotin wurden aufgrund der zu geringen Anzahl reagierender Zellen nicht statistisch ausgewertet.

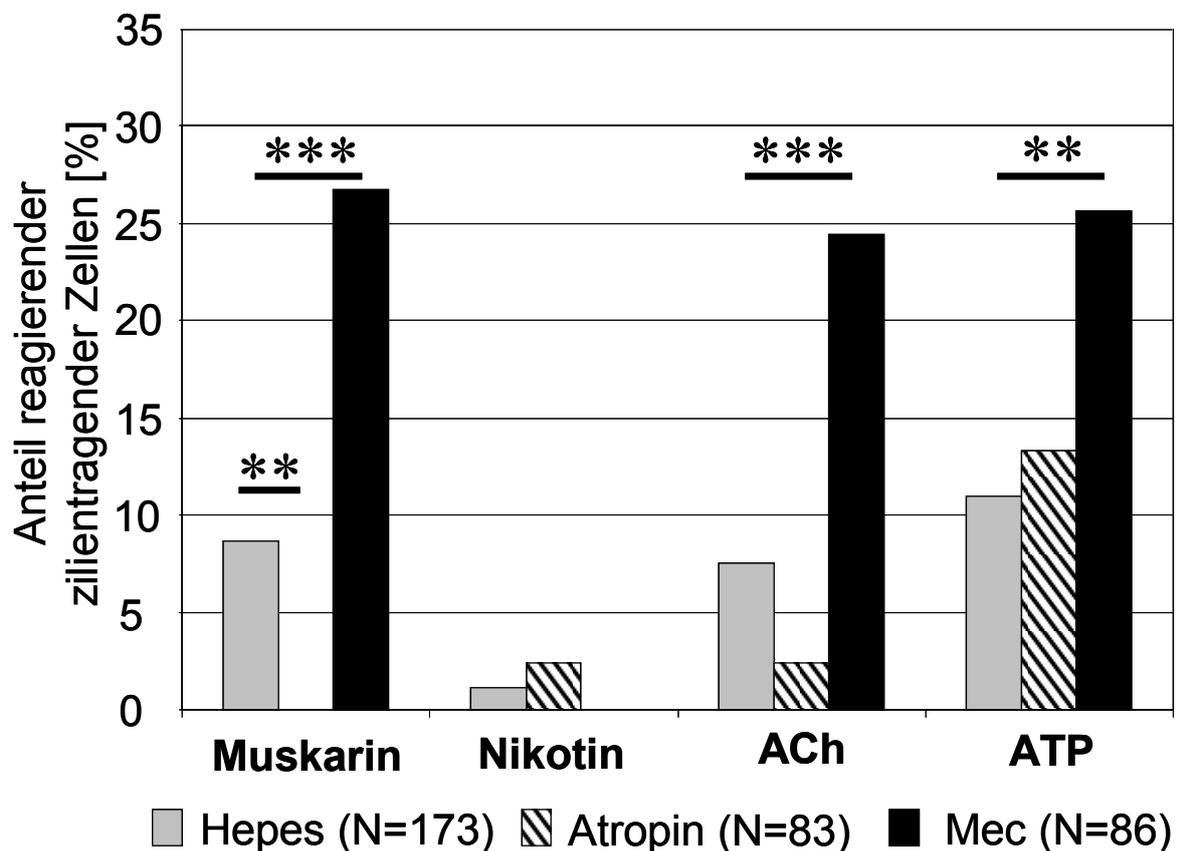


Abb. 3.23: Anzahl reagierender zilientragender Zellen ohne Gabe von Blockern und bei Gabe von Atropin und Mecamylamin. Die Veränderungen bei den Atropinversuchen sind nur bei Gabe von Muskarin signifikant unterschiedlich zu denen ohne Blocker. Bei Gabe von Mecamylamin reagieren signifikant mehr zilientragende Zellen auf Muskarin, ACh und ATP als ohne Blocker. Aufgrund der geringen Anzahl auf Nikotin reagierender Zellen sind diese Veränderungen nicht auswertbar. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, Chi²-test. N=Anzahl lebender Zellen

3.2.2.2 Reaktionen oviduktaler zilientragender Zellen von WT-, M1KO- und M3KO-Mäusen auf cholinerge Agonisten.

Wie bei den nicht-zilientragenden Zellen reagierten auch in der Gruppe der zilientragenden Zellen weniger aus M1KO- und M3KO-Tieren isolierte Zellen auf Muskarin, ACh und ATP. Diese Veränderungen sind allerdings nur bei Zugabe von ACh (WT-M3KO und M1KO-M3KO) und ATP (WT-M1KO) signifikant (Abb. 3.24). Aufgrund des zu geringen Anteils reagierender zilientragender Zellen auf Nikotin konnten diese Daten, wie bereits zuvor, nicht ausgewertet werden.

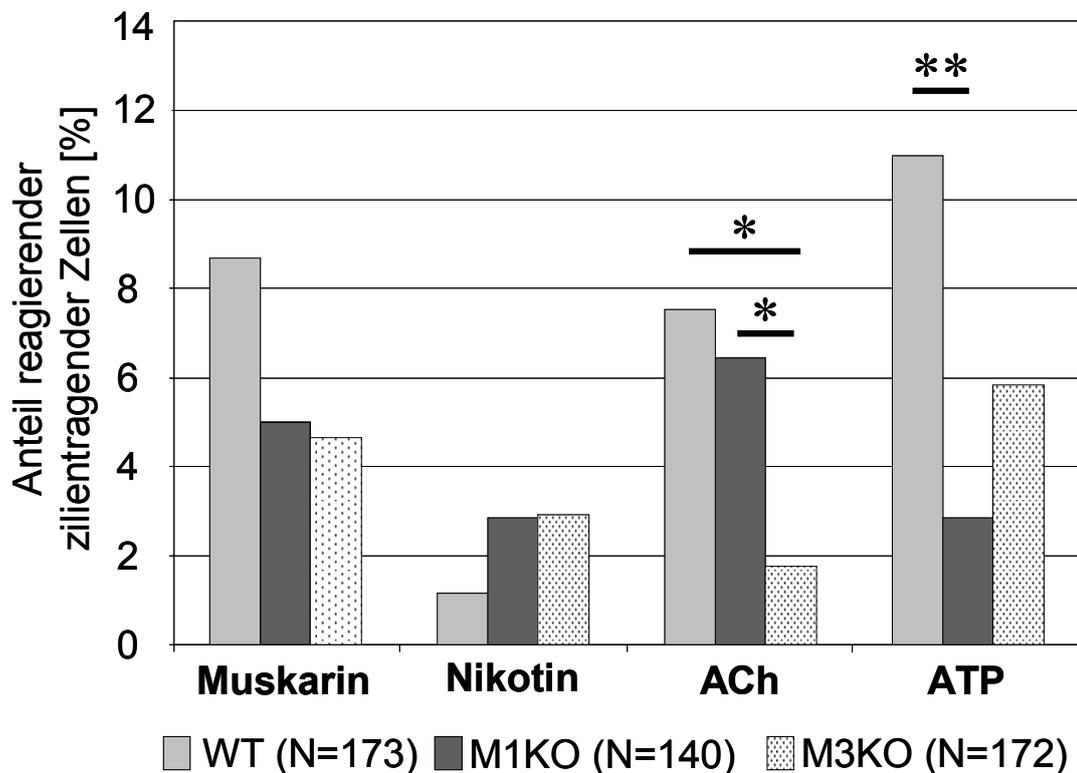
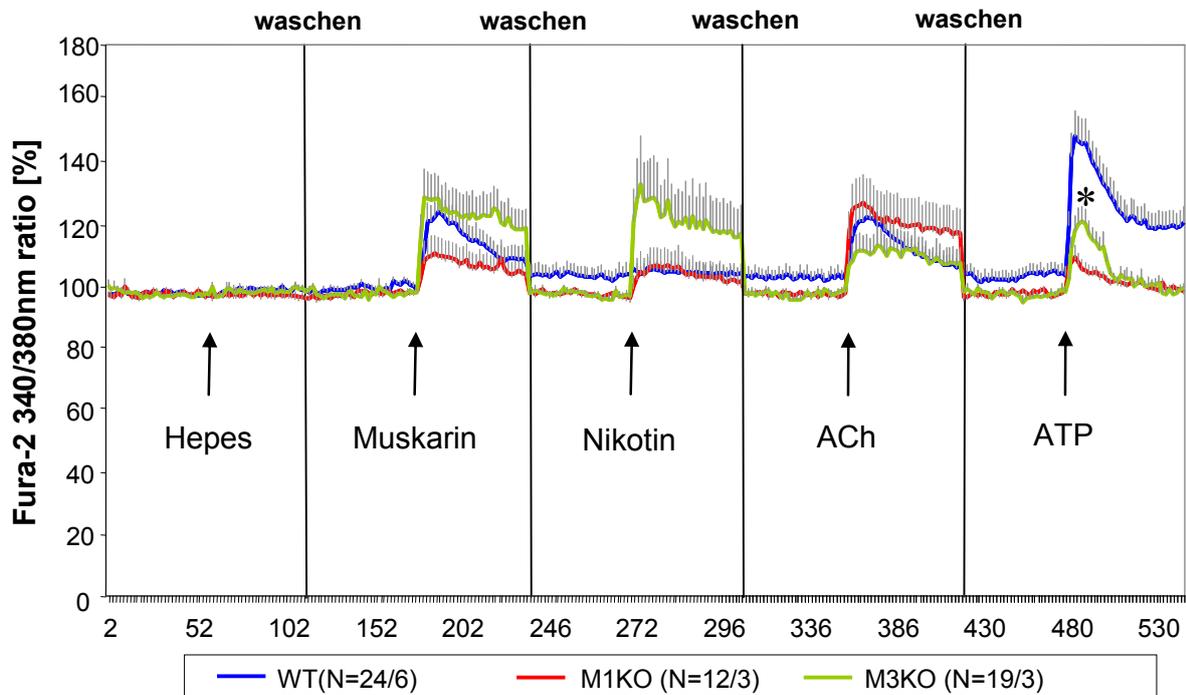


Abb. 3.24: Anzahl aus WT-, M1KO- und M3KO-Tieren isolierter, reagierender zilientragender Zellen. Es reagieren signifikant weniger aus M3KO-Tieren isolierte Zellen auf Gabe von ACh, als aus WT- bzw. M1KO-Tieren isolierte Zellen. Außerdem reagierten signifikant weniger aus M1KO-Tieren isolierte Zellen auf ATP. Alle anderen Veränderungen sind nicht signifikant unterschiedlich oder können statistisch nicht ausgewertet werden (Nikotin). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, χ^2 -Test. N=Anzahl lebender Zellen

Ergebnisse

Die Reaktionen reagierender zilienträger Zellen, welche aus dem Ovidukt von M1- bzw. M3KO-Tieren isoliert wurden, auf cholinerge Agonisten und Antagonisten sind nicht signifikant unterschiedlich zu denen, die aus WT-Tieren isoliert wurden (Abb. 3.25). Aus M1KO-Tieren isolierte Zellen reagierten aber signifikant schwächer auf Zugabe von ATP (Abb. 3.25).



zilienträgende Zellen	Reaktion auf Muskarin	Reaktion auf Nikotin	Reaktion auf ACh	Reaktion auf ATP
WT vs. M1KO	p=0.269	p=0.332	p=0.349	* p=0.016
WT vs. M3KO	p=0.512	p=0.185	p=0.241	p=0.358

Abb. 3.25: Calcium-Imaging-Experimente an zilienträgenden Zellen isoliert aus WT-, M1KO- und M3KO-Tieren. Die Reaktion auf die Zugabe cholinerg Agonisten ist in Isolationen von allen drei Tierstämmen vergleichbar. Einzig die Reaktion auf ATP ist in M1KO-Mäusen signifikant verringert (Mann-Whitney-Test). N=reagierende Zellen/Anzahl Experimente

3.3 Innervation der Tuba uterina der Maus

3.3.1 Immunhistochemische Einfachinkubationen

3.3.1.1 Protein gene product 9.5 (PGP 9.5)

Das Protein gene product 9.5 (PGP 9.5), auch bekannt als Ubiquitin carboxy terminale Hydrolase L1 (UCH L1), ist ein Marker für Nervenfasern, neuroendokrine Zellen und deren Tumore. In der Tuba uterina der Maus ist mit einem PGP 9.5-Antikörper eine dichte Innervation, besonders der Mesosalpinx, der serösen und subserösen Adventitia um die Tubenquerschnitte herum und in der Nähe von Blutgefäßen festzustellen (Abb. 3.26).

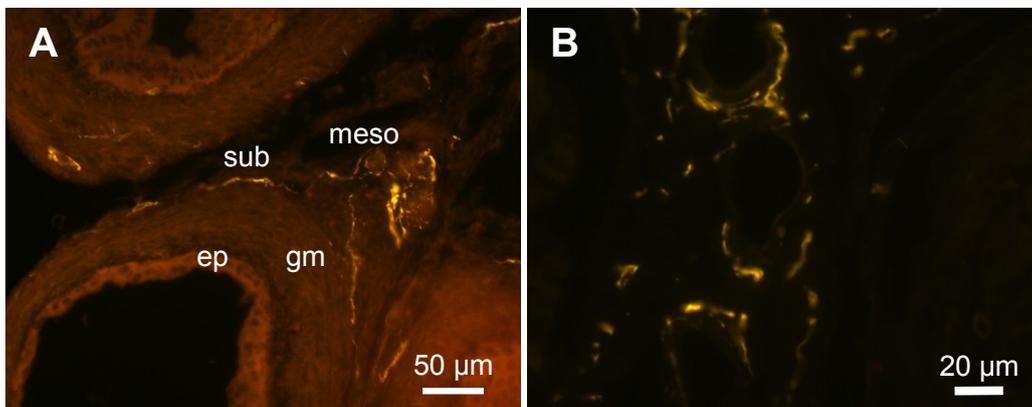


Abb. 3.26: PGP 9.5-Immunfluoreszenz, A) Isthmus B) Mesosalpinx. In der Tuba uterina sind Nervenfasern hauptsächlich in der Mesosalpinx, der Subserosa und in der Nähe von Blutgefäßen (B) zu finden. ep: Epithel, gm: glatte Muskulatur, meso: Mesosalpinx, sub: Subserosa

Außerdem sind PGP 9.5-positive Epithelzellen, hauptsächlich in der Ampulla (Abb. 3.27) und im Infundibulum, nachweisbar. Bei diesen Zellen handelt es sich vermutlich aber nicht um neuroendokrine Zellen. Keine dieser Zellen ist ChAT-eGFP positiv.

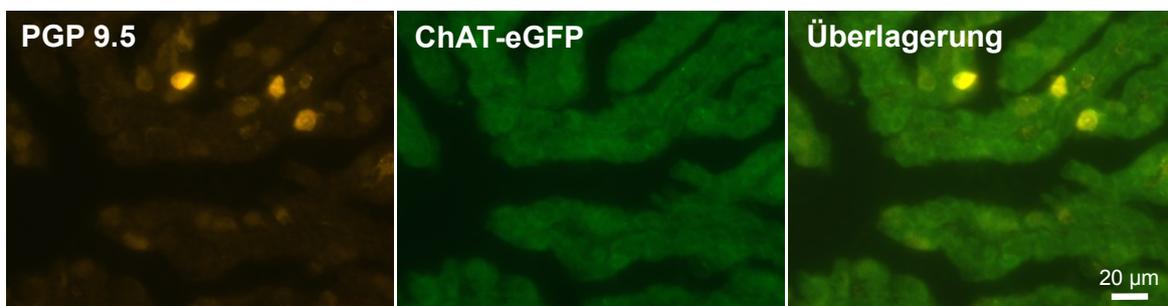


Abb. 3.27: Immunhistochemischer Nachweis von PGP 9.5 im Epithel der Tuba uterina der ChAT-eGFP transgenen Maus. Im Epithel hauptsächlich von Ampulla und Infundibulum markiert der PGP 9.5-Antikörper einzelne, nicht ChAT-eGFP positive Zellen.

3.3.1.2 Calcitonin gene-related peptide (CGRP)

Die Tuba uterina der Maus weist eine sehr dichte CGRP-positive Innervation auf. Die Innervation ist hauptsächlich in der Nähe von Blutgefäßen der Mesosalpinx und der subserösen und serösen Adventitia um die Tubenquerschnitte vorhanden (Abb. 3.28A). Auffällig ist, dass im Bereich des Infundibulums praktisch keine Innervation vorhanden ist. Insgesamt nimmt die Dichte der Innervation Richtung Ovar ab. Mittels Präabsorbtion mit dem korrespondierenden Peptid konnte gezeigt werden, dass diese Markierungen spezifisch sind (Abb. 3.28B). Außerdem zeigten Epithelzellen sowohl im Infundibulum als auch in der Ampulla eine CGRP-Immunreaktivität (Abb. 3.28C). Auch diese Markierung war präabsorbierbar (Abb. 3.28D).

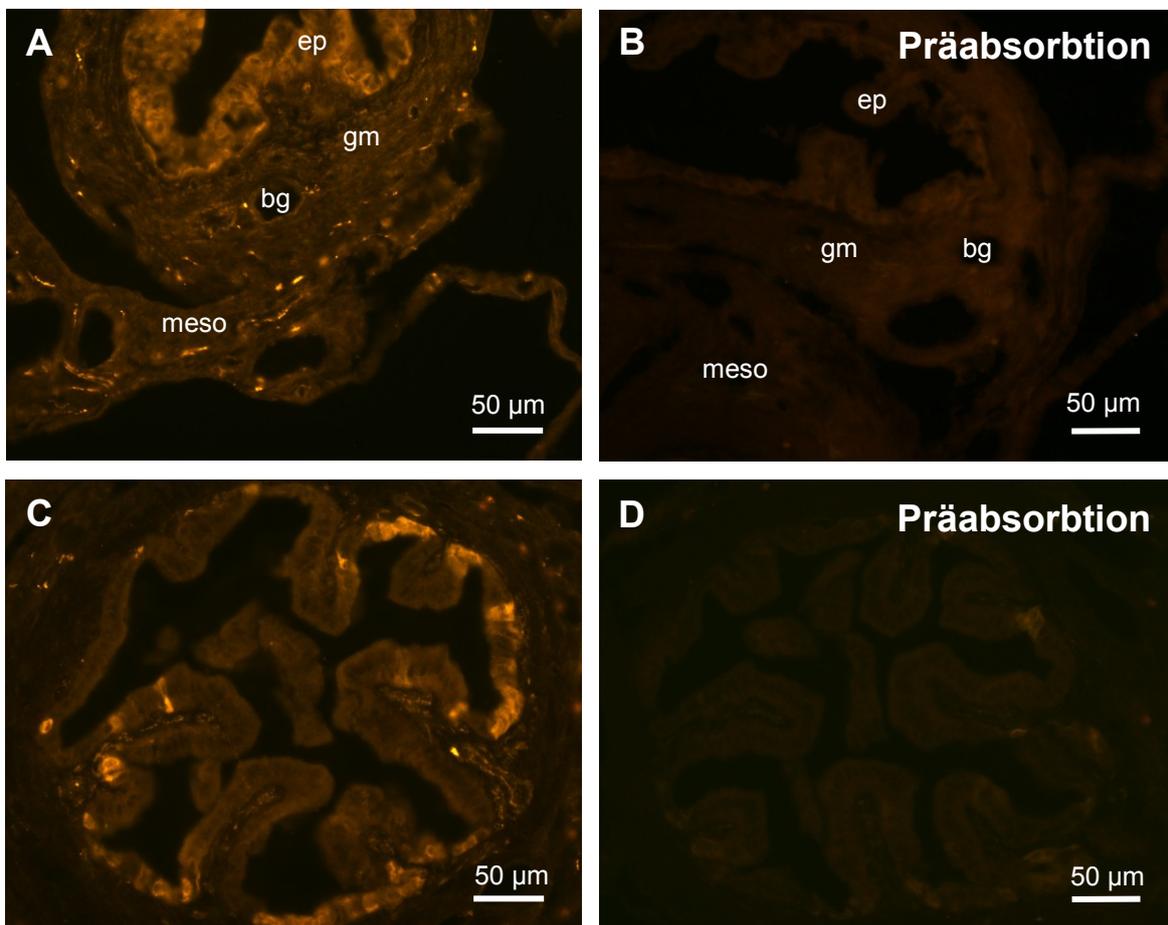


Abb. 3.28: CGRP-Immunfluoreszenz, Tuba uterina der Maus. Die Tuba uterina zeichnet sich durch eine dichte CGRP-positive Innervation der Mesosalpinx, der subserösen Adventitia um die Tubenquerschnitte und der Blutgefäße aus (A). Diese Markierung ist mit dem korrespondierenden Peptid vollständig preabsorbierbar (B). Einige Epithelzellen, besonders im Bereich der Ampulla (C) und des Infundibulums zeigen CGRP-positive Markierungen. Auch diese Markierungen sind vollständig preabsorbierbar (D).

Doppelimmunfluoreszenzdarstellung mit einem Marker für glatte Muskelzellen (Anti-smooth muscle actin, SMA) zeigte, dass CGRP-positive Nervenfasern meist zwischen den Muskelfaserbündeln der Mesosalpinx entlanglaufen (Abb. 3.29A, B). Außerdem sind Nervenfasern meist blutgefäßnah in der Adventitia um die Tubenquerschnitte zu finden (Abb. 3.29C). Zusätzlich sind relativ wenige Nervenfasern auch in den zirkulären, oviduktalen Muskelschichten zu finden (Abb. 3.29D).

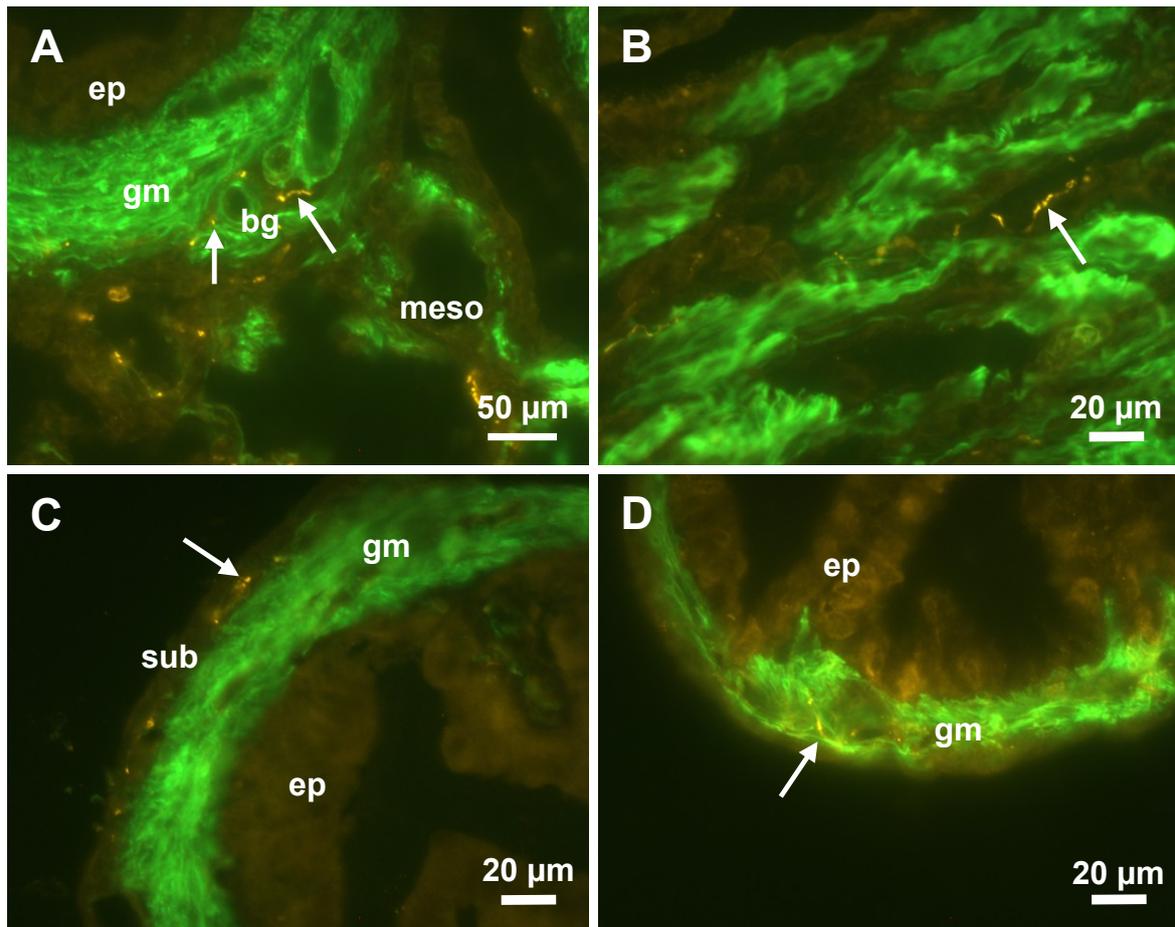


Abb. 3.29: CGRP (Cy3)-, SMA (FITC)-Doppelimmunfluoreszenz, Tuba uterina der Maus. CGRP-positive Nervenfasern sind meist zwischen den Muskelfaserbündeln der Mesosalpinx (A, B), häufig in der Nähe von Blutgefäßen (A) und in der subserösen Adventitia um die Tubenquerschnitte (C) zu finden. Seltener sind Nervenfasern in den zirkulären, oviduktalen Muskelschichten zu finden (Pfeil, D). bg: Blutgefäß, ep: Epithel, gm: glatte Muskulatur, meso: Mesosalpinx, sub: Subserosa, Pfeil: CGRP-positive Nervenfasern

3.3.1.3 Neuropeptid Tyrosin (NPY)

NPY-positive Nervenfasern weisen in der Tuba uterina ein etwas anderes Verteilungsmuster auf als CGRP-positive Nervenfasern. Ihre Lokalisation ist weniger in der Adventitia um die Tubenquerschnitte, sondern hauptsächlich blutgefäßnah in der Mesosalpinx (Abb. 3.30).

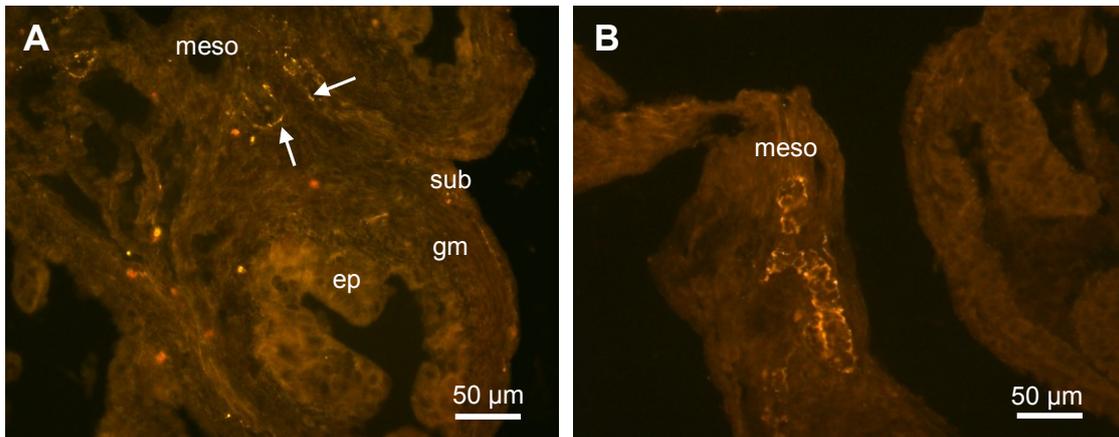


Abb. 3.30: NPY-Immunfluoreszenz, Tuba uterina der Maus. NPY-positive Nervenfasern sind hauptsächlich in der Mesosalpinx, welche das Knäuel der Tuba uterina zusammenhält, und in der Nähe von Blutgefäßen vorhanden (A, B). Häufig bilden sie ein dichtes Netz um die Blutgefäße (B).

Doppelimmunfluoreszenzen mit SMA zeigen häufig eine direkte Assoziation von NPY mit der glatten Muskulatur der Blutgefäße (Abb. 3.31A). Außerdem sind einige Nervenfasern blutgefäßnah in der Adventitia um die Tubenquerschnitte zu finden (Abb. 3.31B). Eher selten sind Nervenfasern außerdem auch in den Muskelschichten anzutreffen.

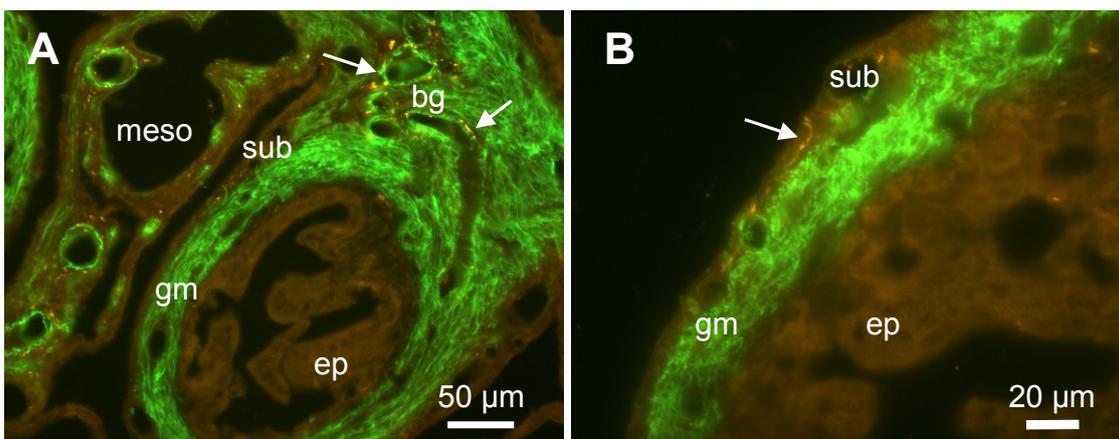


Abb. 3.31: NPY (Cy3)- und SMA (FITC)-Doppelimmunfluoreszenzen, Tuba uterina. NPY-positive Nervenfasern sind meist in der Mesosalpinx (A) und der Adventitia um die Tubenquerschnitte (B) zu finden. Häufig weisen sie eine direkte Assoziation mit der glatten Muskulatur der Blutgefäße auf (A, Pfeile). bg: Blutgefäß, ep: Epithel, gm: glatte Muskulatur, meso: Mesosalpinx, sub: Subserosa.

3.3.1.4 Vasoaktives intestinales Peptid (VIP)

Nervenfaser, die positiv für das vasoaktive intestinale Peptid (VIP) sind, sind im Ovidukt der Maus kaum vorhanden. Abbildung 3.32 zeigt eine sehr schwach VIP-positive Nervenfaser der Tuba uterina. Als Positivkontrolle wurden hier Gewebeschnitte des Darms verwendet (Abb. 3.32B).

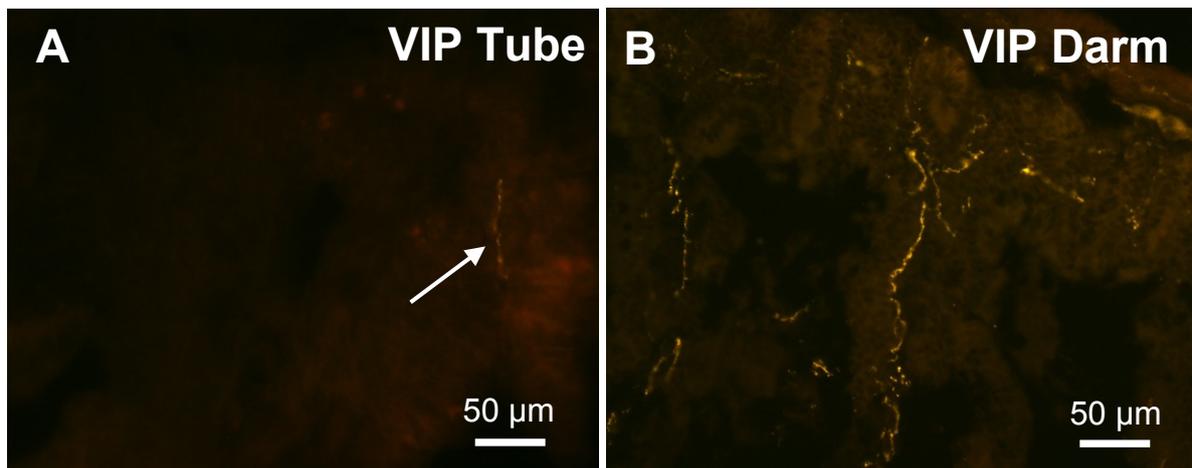


Abb. 3.32: VIP-Immunfluoreszenz, Tuba uterina der Maus. VIP-positive Nervenfaser sind in der Tuba uterina praktisch nicht vorhanden. Abb. A zeigt eine schwach markierte VIP-positive Nervenfaser. Als Positivkontrolle für den VIP-Antikörper wurde Gewebe aus dem Darm verwendet (B).

3.3.1.5 Neurofilament light (NFI)

Zum Nachweis myelinierter Axone wurde ein Antikörper gegen Neurofilament light (NFI) verwendet. In der Tuba uterina der Maus waren praktisch keine myelinisierten Axone nachweisbar. Abbildung 3.33 zeigt einen der seltenen Funde in der Mesosalpinx.

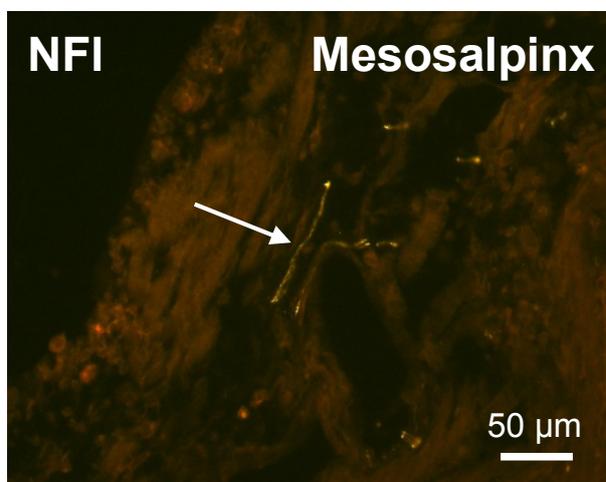


Abb. 3.33: Neurofilament light (NFI)-Immunfluoreszenz, Tuba uterina. In der Tuba uterina sind praktisch keine NFI-positiven Nervenfaser vorhanden. Eine Ausnahme bildet dieser Fund (Pfeil) in der Mesosalpinx.

3.3.3 Untersuchungen zur Kolokalisation verschiedener Neuropeptide

Nervenzellen enthalten häufig mehrere Neurotransmitter und Neuropeptide gleichzeitig. Dieser sogenannte neurochemische Code sollte für die Tuba uterina näher bestimmt werden. Wie in den vorigen Abschnitten bereits beschrieben sind die wichtigsten Neuropeptide der Tuba uterina CGRP (Abschnitt 3.3.1.2) und NPY (Abschnitt 3.3.1.3). CGRP kommt in sensiblen Neuronen häufig gemeinsam mit Substanz P vor, ist aber auch gemeinsam mit anderen Neuropeptiden, wie z.B. NPY anzutreffen. Um die neurochemische Kodierung der Nervenfasern genauer zu charakterisieren, wurden verschiedene Doppelimmunfluoreszenzen durchgeführt.

Vorkommen von CGRP und SP

Doppelimmunfluoreszenzen mit Antikörpern gegen CGRP und SP zeigten, dass beide Neuropeptide in denselben Nervenfasern vorkommen. Abbildung 3.34 zeigt Beispiele für die vollständige Kolokalisierung dieser beiden Neuropeptide in den verschiedenen Abschnitten der Tuba uterina der Maus. Sie zeigt eine sehr dichte CGRP- und SP-positive Innervation der Serosa und Subserosa (Abb. 3.34A, B) und häufig, aber nicht ausschließlich blutgefäßnah in der Mesosalpinx (Abb. 3.34C, D). Außerdem sind einzelne Nervenfasern in der Muskulatur und manchmal auch in der Lamina propia direkt unterhalb des Epithels (Abb. 3.34B, Pfeil) zu finden. Die Dichte der Innervation nimmt Richtung Infundibulum bzw. Ovar ab.

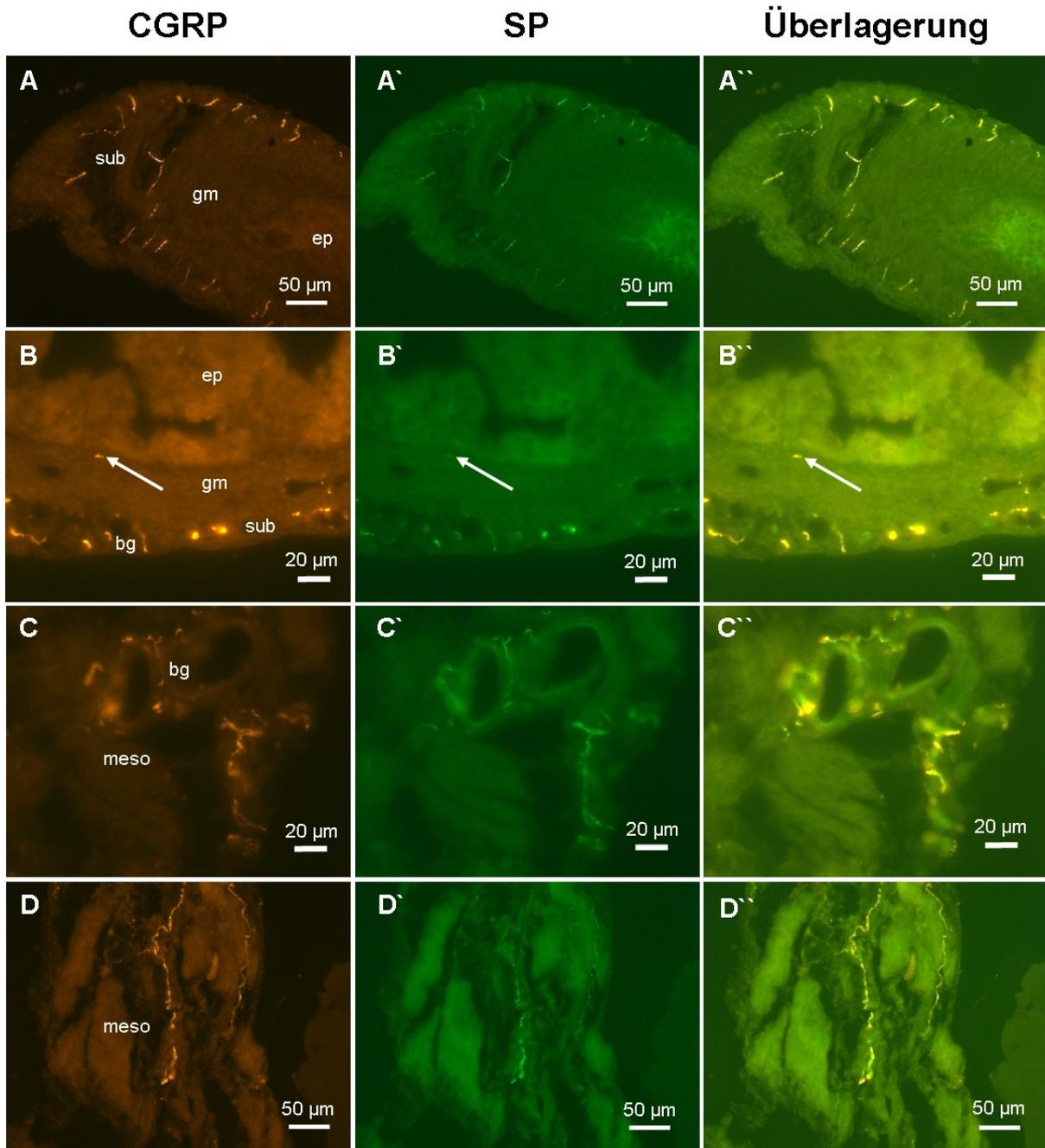


Abb. 3.34: CGRP (Cy3)-, SP (FITC)-Doppelimmunfluoreszenz, Tuba uterina der Maus. Nervenfasern der Tuba uterina enthalten sowohl CGRP als auch SP. Die Tuba uterina zeigt sowohl eine sehr dichte CGRP-positive als auch eine SP-positive Innervation. Diese beiden Neuropeptide sind vollständig kolokalisiert, sind also in denselben Nervenfasern vorhanden. Hier zu sehen als Übersicht an einem Querschnitt des Isthmus mit angrenzender Adventitia (A). Die stärkste Innervation befindet sich in der serösen und subserösen Adventitia um die Tubenquerschnitte (B), in direkter Nachbarschaft von Blutgefäßen (C) und in der Mesosalpinx (D), welche die verschiedenen Tubenabschnitte miteinander verbindet. Außerdem sind einzelne Nervenfasern in der Muskulatur und manchmal auch in der Lamina propria direkt unterhalb des Epithels (B, Pfeil) zu finden. bg: Blutgefäß, ep: Epithel, gm: glatte Muskulatur, meso: Mesosalpinx, sub: Subserosa.

Vorkommen von CGRP und NPY

Doppelimmunfluoreszenzen mit Antikörpern gegen die beiden häufigsten Neuropeptide der Tuba uterina zeigten, dass beide normalerweise nicht in denselben Nervenfasern vorkommen. Beide weisen zwar generell ein ähnliches Verteilungsmuster auf, d.h. ihr hauptsächliches Vorkommen ist in der Adventitia um die Tubenquerschnitte (Abb. 3.36A, B) und in der Mesosalpinx (Abb. 3.36C). Viele CGRP- und NPY-positive Nervenfasern verlaufen außerdem in der Nähe von Blutgefäßen (Abb. 3.36C). Allerdings ist die NPY-positive Innervation etwas weniger dicht und um die Tubenquerschnitte herum etwas weniger ausgeprägt als die CGRP-positive Innervation (Abb. 3.35). Außerdem sind einzelne CGRP- und NPY-positive Nervenfasern auch in der Muskulatur (Abb. 3.36D) und, seltener, in der Lamina propria direkt unterhalb des Epithels (Abb. 3.36E, Ausschnitt) zu finden. Generell ist die Innervation im isthmischen Teil der Tuba uterina dichter als in Ampulla bzw. Infundibulum (zum Vergleich: Abb. 3.36A, B [Isthmus] mit E [Infundibulum]).

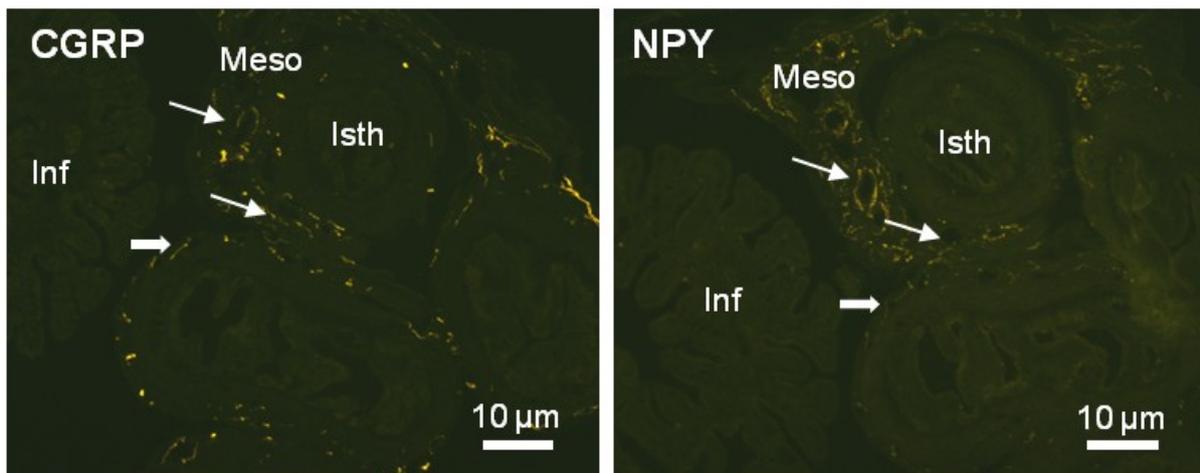


Abb. 3.35: Immunhistochemischer Nachweis CGRP- und NPY-positiver Nervenfasern in der Tuba uterina der Maus. Positive Nervenfasern sind hauptsächlich in der Mesosalpinx (Pfeil) und der subserösen und serösen Adventitia (Blockpfeil) um die Tubenquerschnitte vorhanden. Die Dichte der Innervation nimmt Richtung Ovar stark ab. Die NPY-positive Innervation ist im Bereich der Subserosa (Blockpfeil) weniger stark ausgeprägt als die CGRP-positive Innervation. Inf: Infundibulum, Isth: Isthmus, Meso: Mesosalpinx.

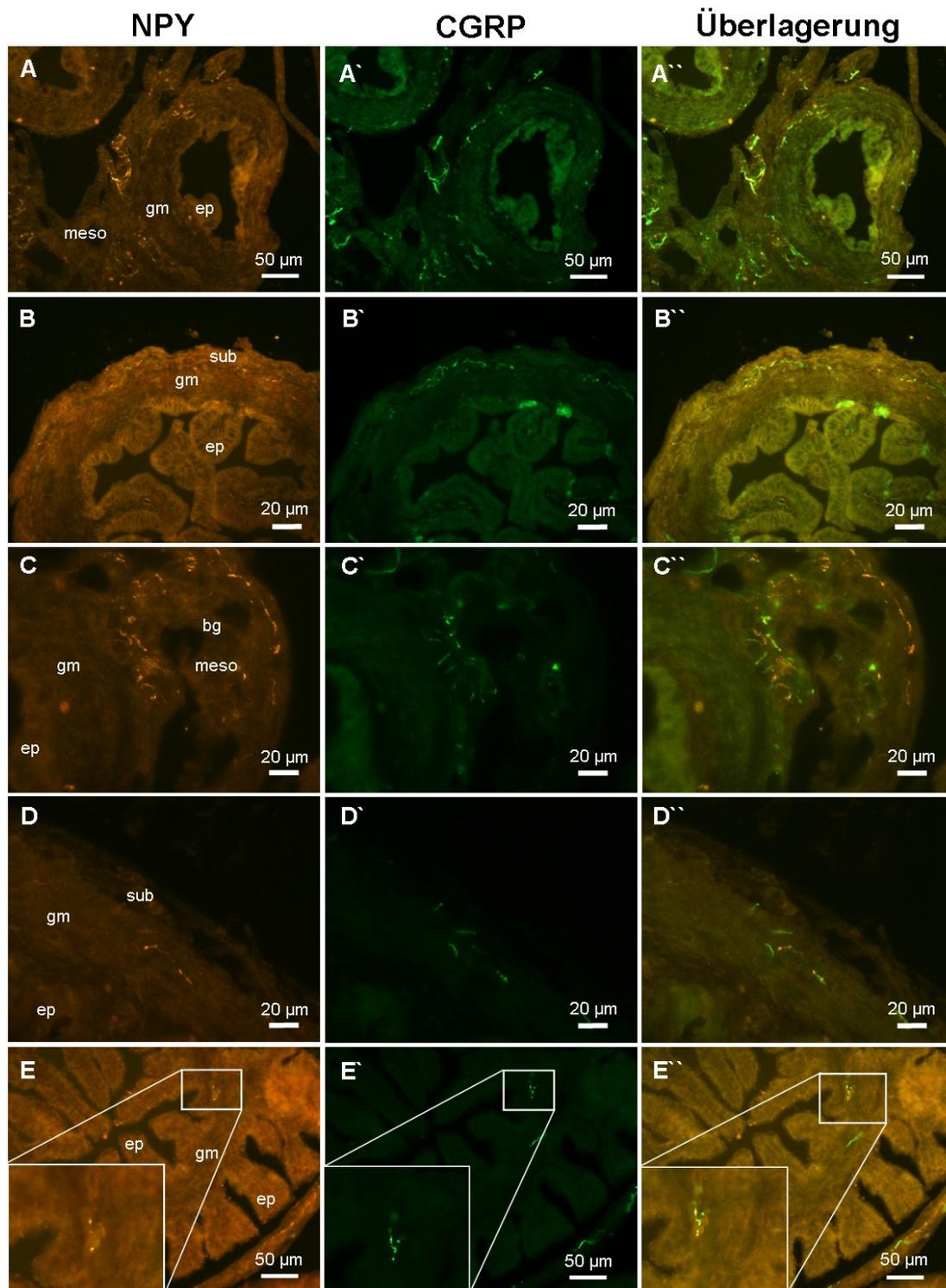


Abb. 3.36: NPY (Cy3)-, CGRP (FITC)-Doppelimmunfluoreszenz, Tuba uterina der Maus. Die Tuba uterina weist eine etwas dichtere CGRP-positive als NPY-positive Innervation auf. CGRP und NPY sind in Nervenfasern meist nicht kolokalisiert, hier zu sehen als Übersicht an einem Querschnitt des Isthmus mit angrenzender Adventitia (A). Die stärkste Innervation befindet sich in der Adventitia um die Tubenquerschnitte (B), der Mesosalpinx und in direkter Nachbarschaft von Blutgefäßen (C). Außerdem sind einzelne CGRP- und NPY-positive Nervenfasern auch in der Muskulatur (D) und selten in der Lamina propria direkt unterhalb des Epithel (Ausschnitt E) zu finden. Generell ist die Innervation im isthmischen Teil der Tuba uterina dichter als in Ampulla bzw. Infundibulum (zum Vergleich: A, B [Isthmus] mit E [Infundibulum]). bg: Blutgefäß, ep: Epithel, gm: glatte Muskulatur, meso: Mesosalpinx, sub: Subserosa.

Katecholamin-haltige Nervenfasern und NPY

Die Tyrosinhydroxylase (TH) katalysiert den ersten Schritt der Katecholaminbiosynthese, die Umwandlung der Aminosäure L-Tyrosin zu L-Dopa (Dihydroxyphenylalanin). Zu den Katecholaminen gehören unter anderem Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin. TH kann also als Marker für noradrenerge Nerven verwendet werden. Ein klassischer Ko-Transmitter noradrenerger Nerven ist NPY. Doppelimmunfluoreszenzen mit Antikörpern gegen NPY und TH zeigten, dass noradrenerge Nerven in der Tuba uterina der Maus meist auch das Neuropeptid NPY enthalten. Die dichteste Innervation ist in der Nähe von Blutgefäßen in der Mesosalpinx (Abb. 3.37A, C, D) zu finden. Außerdem sind TH- und NPY-positive Nervenfasern in der serösen und subserösen Adventitia, auch hier häufig blutgefäßnah, zu finden (Abb. 3.37B). Wie besonders in Abbildung 3.37D zu sehen liegt teilweise wegen der unterschiedlichen intrazellulären Lokalisation von TH und NPY in der Nervenfasern keine vollständige Kollokalisierung vor. NPY ist hauptsächlich in den Vesikeln der Varikositäten (Abb. 3.37D, Pfeile) zu finden, wohingegen TH axoplasmatisch vorkommt (Abb. 3.37D, Blockpfeil).

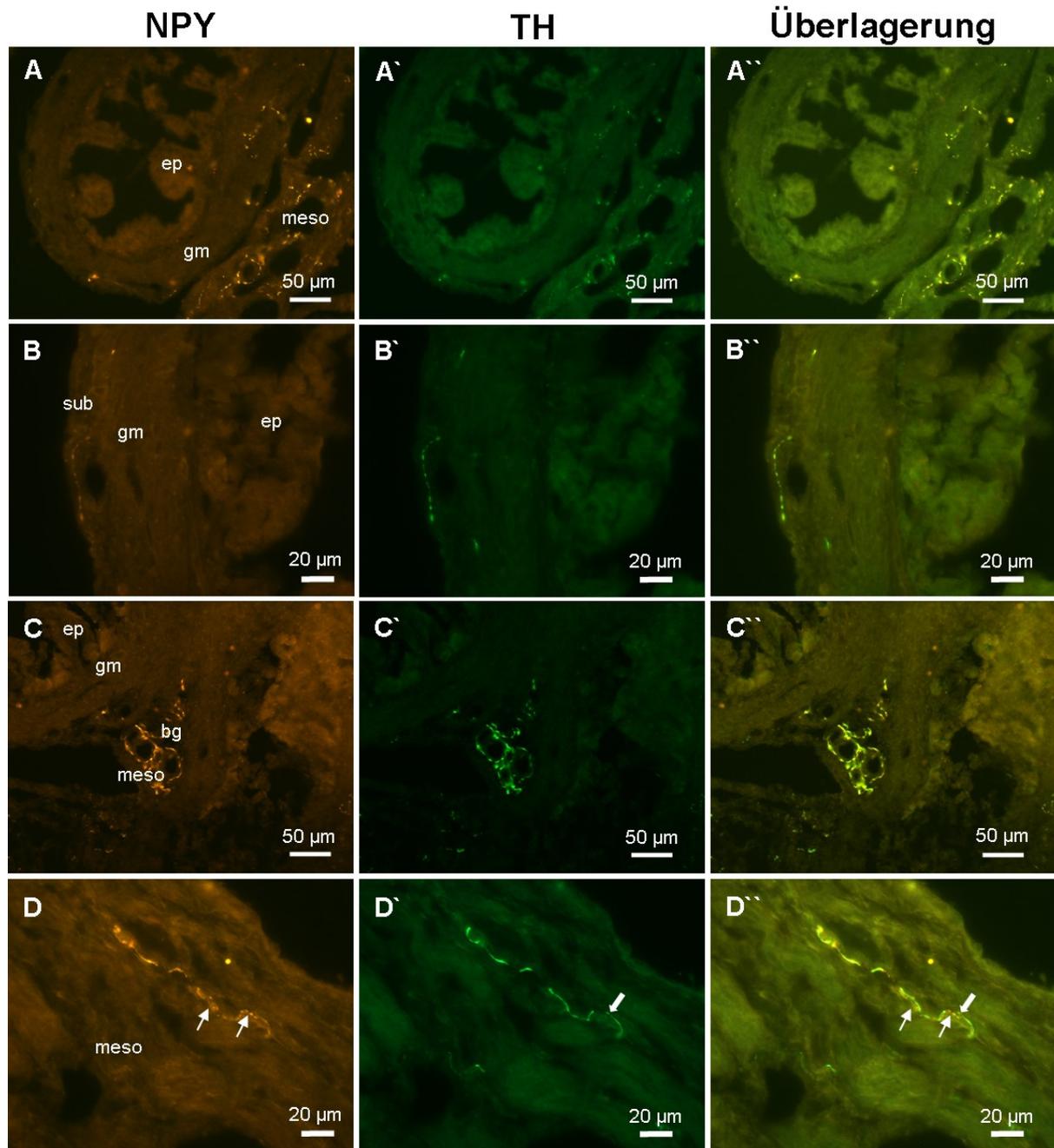


Abb. 3.37: NPY (Cy3)- und TH (FITC)-Doppelimmunfluoreszenz, Tuba uterina der Maus. TH und NPY sind in Nervenfasern meist kolokalisiert, hier zu sehen als Übersicht an einem Querschnitt der Ampulla mit angrenzender Adventitia (A). Die stärkste Innervation befindet sich in der serösen und subserösen Adventitia um die Tubenquerschnitte (B), der Mesosalpinx und in direkter Nachbarschaft von Blutgefäßen (C). Teilweise liegt aufgrund des axoplasmatischen Vorkommens von TH (Blockpfeil) und der Lokalisation von NPY in Varikositäten (Pfeile) keine vollständige Kolokalisation vor (D). bg: Blutgefäß, ep: Epithel, gm: glatte Muskulatur, meso: Mesosalpinx, sub: Subserosa.

3.3.4 Vorkommen verschiedener Neuropeptide in cholinergen Nervenfasern

Wie bereits in den Abschnitten 3.1.2.1, Lokalisation von ChAT mittels einer eGFP unter dem ChAT-Promotor exprimierenden Maus, und 3.1.2.4, AChE-Histochemie zum Nachweis cholinergischer Nervenfasern, gezeigt wurde, kommen in der Tuba uterina der Maus nur sehr selten cholinerge Nervenfasern vor. Meist sind sie in der Subserosa, der Mesosalpinx und in der Nähe von Blutgefäßen zu finden. In der ChAT-eGFP-transgenen Maus sind diese Nervenfasern meist nur nach einer Verstärkung mittels eines Huhn-anti-eGFP Antikörpers schwach erkennbar. Diese Nervenfasern wurden mittels immunhistochemischer Kolo-kalisationsexperimente mit Antikörpern gegen die beiden am häufigsten vorkommenden Neuropeptiden der Tuba uterina, CGRP und NPY, näher charakterisiert. Es zeigte sich, dass cholinerge Nervenfasern meist zusätzlich das Neuropeptid CGRP (Abb. 3.38A), aber nicht NPY (Abb. 3.38B) enthalten.

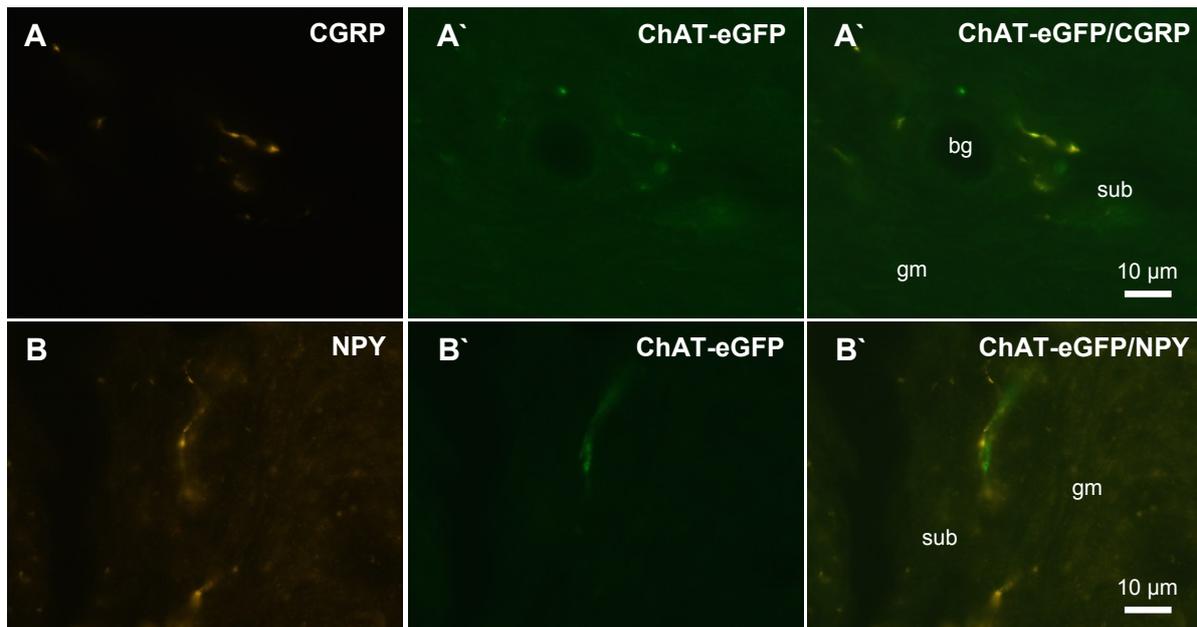


Abb. 3.38: Immunhistochemischer Nachweis von CGRP und NPY in der Tuba uterina der ChAT-eGFP-transgenen Maus. ChAT-eGFP-positive Nervenfasern exprimieren häufig CGRP (A), aber kein NPY (B). bg: Blutgefäß, gm: glatte Muskulatur, sub: Subserosa.

4. Diskussion

4.1 Vorkommen von Komponenten des cholinergen Systems in der Tuba uterina der Maus

Bisher liegen nur wenige Daten über das Vorkommen von Komponenten des cholinergen Systems im Eileiter vor. Lediglich Steffl et al. berichteten 2006 von einer zyklusabhängigen Expression von ChAT im Epithel der Tuba uterina des Schweines und konnten außerdem ACh mittels HPLC nachweisen (Steffl et al. 2006). Diese Befunde konnten von uns, vermutlich aufgrund speziesspezifischer Unterschiede, am Eileiter der Maus nur teilweise bestätigt werden. Mittels RT-PCR konnte ChAT in keinem der drei Segmente der Tuba uterina detektiert werden. Trotzdem war es in einigen, aber nicht allen Proben möglich, geringe Mengen von ACh mittels HPLC nachzuweisen. Da Transkripte der CarAT nachgewiesen werden konnten, könnte dies einen alternativen Syntheseweg für ACh darstellen (Tucek 1982). Unter Zuhilfenahme einer transgenen Maus, welche eGFP unter Kontrolle des ChAT-Promotors exprimiert, und mittels Amplifikation dieses Signals mit einem anti-eGFP-Antikörper konnten in seltenen Fällen ChAT-eGFP-positive Zellen detektiert werden. Drei verschiedene ChAT-eGFP positive Zelltypen waren vorhanden: cholinerge Nervenfasern, Immunzellen und einzelne längliche, unregelmäßig geformte Zellen, vermutlich glatte Muskelzellen. Außerdem wurde einmal eine flaschenförmige ChAT-eGFP-positive Epithelzelle in der Ampulla nachgewiesen.

Cholinerge Nervenfasern waren nur selten zu finden und kamen meist in der Nähe von Blutgefäßen in der Mesosalpinx oder seltener der Subserosa vor. Entsprechende Ergebnisse konnten auch mittels AChE-Histochemie erzielt werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der RT-PCR für ChAT war mRNA von AChE schwach nachweisbar. Da in Nervenfasern fast keine mRNA enthalten ist, lässt sich der scheinbare Widerspruch zwischen Abwesenheit von ChAT-mRNA in den RT-PCR-Proben und den trotzdem, wenn auch selten, nachgewiesenen cholinergen Nervenfasern leicht erklären. Der immunhistochemische Nachweis von VACHT war nur in Ausnahmefällen erfolgreich, vermutlich weil VACHT nicht wie ChAT und auch AChE im gesamten Axon, sondern nur in Vesikeln der Varikositäten zu finden ist. Entsprechend der Ergebnisse der Immunhistochemie konnten auch keine Transkripte für VACHT in Proben der Tuba uterina nachgewiesen werden.

Die ChAT-eGFP-positiven Immunzellen konnten mittels Doppelimmunfluoreszenzen mit Antikörpern gegen die Immunzellmarker für T-Lymphozyten (CD5, Cobbold et al. 1984) und B-Lymphozyten (CD19, Krop et al. 1996) weitergehend charakterisiert werden. Überraschenderweise waren etwa 50% der eGFP-positiven Immunzellen B-Lymphozyten (27/51 Zellen von 4 Tieren). T-Lymphozyten waren dagegen nicht eGFP positiv. Insgesamt exprimierte eine Subpopulation von etwa 2% der B-Lymphozyten ChAT-eGFP (27/1289 Zellen von 4 Tieren). Bisher konnte nur in einer Arbeit ChAT in B-Lymphozyten nachgewiesen werden (Tayebati et al. 2002). Allerdings gibt es verschiedene Arbeiten zur Expression von nAChR auf B-Lymphozyten. Die nAChR $\alpha 7$ soll inhibitorisch auf die CD40-vermittelte B-Zellproliferation wirken (Koval et al. 2009; 2011). Andere Untereinheiten wie $\alpha 4(\alpha 5)\beta 2$ wurden hauptsächlich in unreifen, neu gebildeten B-Lymphozyten des Knochenmarks nachgewiesen (Skok et al. 2007). Im Laufe der B-Zellreifung in der Milz nimmt dann der Anteil von $\alpha 7(\alpha 5\beta 4)$ nAChR zu (Skok et al. 2007). nAChR scheinen also in die B-Zellreifung und Aktivierung involviert zu sein (Skok et al. 2005; 2007). Skok et al. spekulierten, dass B-Lymphozyten in der Peripherie auf von aktivierten T-Lymphozyten synthetisiertes ACh (Kawashima & Fujii 2000) reagieren würden. Die Daten von Tayebati et al. und auch unsere Daten legen nun nahe, dass B-Lymphozyten in der Lage sind, dieses Signal selbst zu generieren (Tayebati et al. 2002).

Das in dieser Arbeit beobachtete Vorkommen von ChAT in einzelnen glatten Muskelzellen der Tuba uterina wurde bislang nicht beschrieben. Allerdings wurden entsprechende Befunde in anderen Organen, z.B. der Trachea (Wessler & Kirkpatrick 2001) mit derselben Methodik, erhoben. Da diese Zellen nicht in Proben von allen Tieren und manchmal auch gehäuft in einem bestimmten Bereich vorkommen, könnte man spekulieren, dass die ChAT-Synthese eine Reaktion auf einen bisher nicht näher untersuchten Reiz, z.B. eine Irritation oder Infektion darstellt. Dies könnte z.B. auch zu einer parakrinen Aktivierung von Immunzellen führen.

CHT1 konnte mittels RT-PCR in etwa 30% der Proben nachgewiesen werden. Immunhistochemisch konnten geringfügig gestreckte CHT1-positive Zellen im Bindegewebe der Mesosalpinx und in der Subserosa detektiert werden. Dieses Signal war präabsorbierbar. Keine der CHT1-positiven Zellen exprimierte zusätzlich ChAT. In den ACh synthetisierenden Zellen der Tuba uterina der Maus ist also weder der klassische Cholin-Aufnahmeweg über CHT1, noch der klassische

Ausschleusungsweg über VACHT vorhanden. Sowohl Aufnahme als auch Ausschleusung wird vermutlich über organische Kationentransporter (OCT1-3) vermittelt, deren Transkripte in allen Segmenten, in allen Zyklusständen und auch während der Trächtigkeit vorkommen. Lips et al. konnten 2005 mittels 2-Elektroden-Voltage-clamp-Experimenten zeigen, dass OCT1 und 2 in der Lage sind, ACh über eine Membran zu transportieren (Lips et al. 2005). Immunhistochemisch war die Lokalisation von OCT1 nicht möglich, da kein spezifischer Antikörper gefunden werden konnte. OCT 2 und 3 wurden apikal in zilientragenden Zellen des Epithels (Antikörper gegen rOCT 2, rOCT3 und hOCT3) und in der glatten Muskulatur (hOCT3) detektiert. Man würde also annehmen, dass ACh ins Lumen ausgeschleust wird, oder aber aus der Eileiterflüssigkeit in die Epithelzellen aufgenommen wird. Mittels DESI konnte kein ACh auf dem Epithel der Tuba uterina gefunden werden. ACh scheint also entweder nicht ins Lumen ausgeschleust zu werden, oder die ausgeschleuste Menge ist unter der Nachweisgrenze. Außerdem ist einschränkend hinzuzufügen, dass der apikale Bereich zilientragender Zellen der Tuba uterina, wie z.B. bei der Immunhistochemie gegen den M2-Rezeptor zu sehen, relativ häufig unspezifisch markiert wird. Prinzipiell wäre es also denkbar, dass OCT 2 und 3 nicht dort lokalisiert sind, sondern dass es sich um eine unspezifische Markierung handelt. Wie die organischen Kationentransporter sind auch Acetylcholinrezeptoren, im Gegensatz zu den anderen, oben beschriebenen Komponenten des cholinergen Systems, in der Tuba uterina sehr verbreitet. Unabhängig von Zyklusstand, Segment oder Trächtigkeit waren die Subtypen M1, 3 und 4 in etwa 80% der Proben nachweisbar. Die Subtypen M2 und M5 waren in etwa einem Drittel der Proben nachweisbar. Auch eine große Bandbreite verschiedener nAChR-Untereinheiten war detektierbar. Hier waren die Untereinheiten α 2, 4, 5, 7 und β 4 am häufigsten. Fast nie detektiert wurden α 6 und α 9. Als einzige statistisch signifikante Veränderung unter den verschiedenen untersuchten hormonellen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass die Untereinheit α 7 in trächtigen Tieren signifikant seltener vorkommt als in nicht-trächtigen Tieren. Außerdem kommt die Untereinheit α 4 signifikant häufiger in der Ampulla als im Isthmus vor. Da die Untersuchungen zu den Unterschieden der hormonell bedingten und segmentalen Expressionshäufigkeiten aller Komponenten des cholinergen Systems mittels qualitativer RT-PCR durchgeführt wurde, muss darauf hingewiesen werden, dass schwächer ausgeprägte

Regulationen mit dieser Methode übersehen werden könnten. Unsere Herangehensweise legt nahe, dass die Expression aller untersuchter Gene, mit Ausnahme von nAChR $\alpha 7$ und $\alpha 4$, keiner segmentalen und/oder hormonellen Regulation unterworfen ist.

Da die vorhandenen Antikörper gegen MR (Jositsch et al. 2009; Pradidarcheep et al. 2009) und nAChR (Moser et al. 2007), mit Ausnahme eines Antikörpers gegen M2 (Jositsch et al. 2009), unspezifisch sind, wurde zur Lokalisation der Subtypen M1-3 und Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 7$ die Laser-assistierte Mikrodissektion gewählt. Auf diese Weise konnten M1 und M3 im Epithel, aber nicht in der Muskulatur nachgewiesen werden. Der immunhistochemische Nachweis von M2 zeigte eine unspezifische Färbung im apikalen Bereich der zilienträgenden Zellen, sowohl in WT- als auch in KO-Tieren. In der glatten Muskulatur war keine Färbung zu sehen. Dies entspricht den Ergebnissen der Laser-assistierten Mikrodissektion: Auch auf diese Weise konnte M2 weder im Epithel noch in der Muskulatur nachgewiesen werden. Allerdings wurde M2 wie bereits beschrieben mittels RT-PCR in etwa einem Drittel aller Proben des Gesamthomogenats nachgewiesen. Die Untereinheit $\alpha 7$ war mittels Laser-assistierter Mikrodissektion sowohl im Epithel als auch in der Muskulatur vorhanden. Im Gegensatz dazu konnte die $\alpha 3$ -Untereinheit auf diese Weise in keinem der beiden Gewebe nachgewiesen werden, obwohl sie mittels RT-PCR in der Ampulla (55% der Proben) und im Isthmus (20% der Proben) nachweisbar war. Dieser Unterschied in der Häufigkeit des Nachweises in den verschiedenen Tubensegmenten ist statistisch nicht signifikant. Allerdings konnte ihr Vorhandensein in zilienträgenden Zellen des Epithels der Ampulla mit Hilfe einer eGFP unter dem $\alpha 3$ -Promotor exprimierenden transgenen Maus (Tabac-Maus; Frahm et al. 2011) und nach Amplifikation dieses Signals mittels anti-eGFP-Antikörper nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass die Laser-assistierte Mikrodissektion nicht sensitiv genug ist, um sehr geringe Transkriptmengen, wie vermutlich auch im Fall von M2, nachzuweisen.

Zur Termination des ACh-Signals könnte entweder in der Nähe von cholinergen Nervenendigungen AChE, oder wie mittels BChE-Histochemie gezeigt, im Epithel und den äußeren Muskelschichten bzw. der Subserosa BChE dienen.

4.2 Untersuchungen zur Funktionalität der vorhandenen ACh-Rezeptoren mittels Calcium-Imaging-Experimenten

Mittels Calcium-Imaging-Experimenten konnte gezeigt werden, dass in der Tuba uterina der Maus voll funktionsfähige MR vorhanden sind. Sowohl in zilientragenden als auch in nicht-zilientragenden Zellen war die Reaktion der Zellen auf Muskarin und ACh durch Atropin vollständig blockierbar. Die Reaktion auf ATP wurde durch Atropin nicht beeinträchtigt. Wurden die Reaktionen der beiden Gruppen miteinander verglichen, konnte festgestellt werden, dass sowohl wesentlich weniger zilientragende Zellen auf die Pharmaka reagierten (10% der Zellen zu 30%), als auch dass diese Reaktion wesentlich schwächer ausfiel (25% Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels zu 100% Anstieg) als in der Gruppe der nicht-zilientragenden Zellen. Vermutlich ist ein Teil dieses Unterschieds u.a. dadurch zu erklären, dass sich zilientragende Zellen im Vergleich zu nicht-zilientragenden eher schlecht mit dem Calciumindikator Fura-2 beladen lassen.

In beiden Gruppen reagierten trotz der großen Anzahl nachgewiesener nAChR-Untereinheiten sehr wenige einzelne Zellen auch auf Zugabe von Nikotin. Dies ist aufgrund des Vorhandenseins vieler verschiedener nAChR-Untereinheiten, besonders der calcium-permeablen Ionenkanäle bildenden nAChR $\alpha 7$ und 10 , überraschend. Im Gegensatz zu diesen Homomere bildenden Untereinheiten sind die Ionenkanäle der Heteromere bildenden Untereinheiten $\alpha 2-6$ und $\beta 2-4$ hauptsächlich natrium- und kalium-permeabel. Eine Reaktion von Zellen mit Ionenkanälen aus diesen nAChR-Untereinheiten würde also nicht unbedingt zu einem messbaren Anstieg der Calciumkonzentration in der Zelle führen. Mittels RT-PCR wurden hauptsächlich Transkripte der Untereinheiten $\alpha 2$, 4 , 5 , allerdings auch $\alpha 7$ und $\beta 4$ nachgewiesen. Die geringe Reaktion der Zellen auf Zugabe von Nikotin legt also die Überlegung nahe, dass entweder hauptsächlich wenig calcium-permeable nAChR auf oviduktalen Zellen vorhanden sind, dass keine oder nur wenige funktionelle calcium-permeable nAChR gebildet werden, auch wenn Transkripte der entsprechenden Untereinheiten nachgewiesen wurden, oder aber, dass die vorhandenen nAChR keine klassischen Ionenkanäle bilden, wie es z.B. auch für Monozyten und Makrophagen diskutiert wird (Hecker et al. 2009; Mikulski et al. 2010). Auch in B-Lymphozyten, welche nAChR $\alpha 7$ exprimieren, wurde z.B. beschrieben, dass Nikotin die Proliferation fördert, ohne dass eine Ionenkanalaktivität

messbar war (Skok et al. 2003). Außerdem ist bekannt, dass Nikotin nicht für alle verschiedenen nAChR-Kombinationen ein gleich guter Agonist ist (Xiao et al. 1998; Kurzen et al. 2007). Ionenkanäle aus einer Kombination der Untereinheiten $\alpha 9$ und $\alpha 10$ sind z.B. überhaupt nicht durch Nikotin aktivierbar (Verbitsky et al. 2000; Baker et al. 2004; Kurzen et al. 2007). Nikotin wirkt hier sogar als Blocker (Verbitsky et al. 2000; Baker et al. 2004; Kurzen et al. 2007).

Die Zugabe von Mecamylamin führte in diesen Experimenten überraschenderweise zu einer signifikant verstärkten Reagibilität der Zellen auf Muskarin, ACh und ATP. Mecamylamin ist ein nicht-kompetitiver nAChR-Antagonist, welcher relativ unspezifisch viele nAChR, aber bevorzugt $\alpha 3\beta 4$ (Papke et al. 2001) blockieren kann. Bei humanen nAChR ist außerdem bekannt, dass Mecamylamin $\alpha 2\beta 4$ und $\alpha 4\beta 4$ potenter als $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$ und $\alpha 7$ inhibiert (Chavez-Noriega et al. 1997). Mecamylamin könnte in unserem Experiment also vorhandene wenig calcium-permeable Kanäle blockieren. Ohne Mecamylamin reagierten etwa 10%, nach Zugabe des nAChR-Blockers etwa 25% der ziliotragenden Zellen auf Muskarin, ACh und ATP. Ähnliche Effekte waren auch bei den nicht-ziliotragenden Zellen zu beobachten: Hier reagierten ohne Mecamylamin etwa 30% und mit Mecamylamin etwa 50% der Zellen auf die Zugabe der Pharmaka Muskarin, ACh und ATP. Durch die Blockade der vorhandenen nAChR scheint also deren normalerweise inhibierender Effekt blockiert zu werden, was zu einer verstärkten Reaktion der Zellen auf die anderen Agonisten führt. Dies spricht für eine duale Modulation des cholinergen Systems in der Tuba uterina durch MR und nAChR. Eine ähnliche biphasische Modulation ist z.B. für die neuromuskuläre Endplatte (Wessler et al. 1986; Wessler 1989), in Keratinozyten (Grando 1997) und bei der Nozizeption (Bernardini et al. 2001a; 2001b; Dussor et al. 2003; 2004) bekannt. An der neuromuskulären Endplatte kommt es zuerst mittels nAChR zu einer Exzitation gefolgt von einer Inhibierung mittels MR (Wessler et al. 1986; Wessler 1989). Ähnliches wurde auch am Zungenmuskel der Ratte beobachtet (Liu et al. 2005). Bei der Nozizeption wird über nAChR die CGRP-Ausschüttung leicht verstärkt und über MR inhibiert (Bernardini et al. 2001a; 2001b; Dussor et al. 2003; 2004). Grando fasste 1997 zusammen, dass in Keratinozyten Proliferation und Differenzierung durch nAChR ausgelöst und durch MR inhibiert werden, die Migration allerdings genau entgegengesetzt reguliert wird (Grando 1997).

Razani-Boroujerdi et al. berichteten 2007, dass die relativ spezifischen nAChR $\alpha 7$ -Blocker α -Bungarotoxin und Methylycacontinin in T-Zellen den durch Nikotin induzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nicht blockieren konnten, sondern im Gegenteil sogar zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ führten (Razani-Boroujerdi et al. 2007). Dieser nikotin-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ benötigte kein extrazelluläres Calcium, dafür aber, wie auch der T-Zell-Rezeptor (TZR)-abhängige Anstieg in der $[Ca^{2+}]_i$, eine Aktivierung von Protein-Tyrosinkinasen, einen funktionellen TZR/CD3-Komplex und eine Leukozyten-spezifische Tyrosinkinase (Razani-Boroujerdi et al. 2007). Sie schlossen daraus, dass in T-Zellen $\alpha 7$ -nAChR vorhanden sind, welche selbst keine funktionellen Ca^{2+} -Kanäle bilden, sondern T-Zell-Rezeptoren (TZR) in ihrer Funktion modulieren.

Bisher wurden Beobachtungen über atypische nAChR wie von Razani-Boroujerdi et al. (2007), Hecker et al. (2009) und Skok et al. (2003) meist in Immunzellen gemacht. Immunzellen sind in der Lage, Informationen, die durch die Bindung eines Antigens an T- bzw. B-Zellrezeptoren und die dadurch hervorgerufenen Konformationsänderungen an Signalmoleküle übertragen werden, weiterzugeben und entsprechende Signalwege zu aktivieren. Maryna Skok spekulierte 2009, dass ähnlich auch die Bindung von Agonisten und Antagonisten an nAChR und die dadurch hervorgerufene Konformationsänderung nahegelegene $P2X_7$ -Rezeptoren (Hecker et al. 2009) oder TZR (Razani-Boroujerdi et al. 2007) beeinflussen könnten (Skok 2009). Eine direkte Interaktion von $P2X_2$ -Rezeptoren und $\alpha 4\beta 2$ -nAChR konnte 2005 mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) gezeigt werden (Khakh et al. 2005). Entsprechend könnte die Bindung von Mecamylamin an atypische nAChR im Ovidukt zwar zu keinem direkten Calciumeinstrom, aber zu einer Konformationsänderung der nAChR führen und dadurch zu einer Aktivierung von MR und purinergen Rezeptoren, oder aber zu einer Aktivierung von Signalwegen, welche MR und purinergen Rezeptoren gemeinsam sind und diese gleichzeitig aktivieren, führen.

Wie im vorherigen Kapitel bereits beschrieben wurden die Subtypen M1 und M3 mittels Laser-assistierter Mikrodissektion im Epithel, aber nicht in der Muskulatur nachgewiesen. Calcium-Imaging-Experimente mit den entsprechenden KO-Mäusen zeigten, dass in zillientragenden Zellen dieser Mäuse der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nach Gabe von Muskarin, Nikotin und ACh unverändert ist. Einzig in M1KO-Mäusen waren

signifikante Unterschiede zu WT- und auch zu M3KO-Mäusen feststellbar. Diese Unterschiede bezogen sich aber nicht auf die Stärke der Reaktion nach Gabe der cholinergen Agonisten, sondern nach Gabe des Kontrollstimulus ATP. In M1KO-Mäusen war die Stärke der Reaktion hierauf signifikant verringert und es reagierten außerdem signifikant weniger zilienträgende Zellen auf ATP. Dies könnte ein Indiz für eine unspezifische Reduktion der Reagibilität der Zellen sein. Dafür spricht, dass in der Gruppe der nicht-zilienträgenden Zellen ein ähnlicher Effekt zu beobachten war. Aufgrund der größeren Anzahl reagierender Zellen in dieser Gruppe (WT: 131 von 356, M1KO: 109 von 441, M3KO: 83 von 389) sind Aussagen, welche aus diesen Experimenten gezogen werden können, aussagekräftiger. Hier ist die Stärke des ATP-induzierten Calciumeinstroms in allen drei Mäusestämmen identisch. Allerdings ist der Anteil der auf ATP reagierenden Zellen in den KO-Stämmen im Vergleich zu dem WT-Stamm um 10% geringer. Vergleicht man den Anteil reagierender Zellen nach Zugabe der anderen Pharmaka, fällt auf, dass bei aus M1KO-Mäusen isolierten Zellen auch etwa 10% weniger Zellen auf die Gabe von Muskarin und ACh reagieren. Die Reduktion der Reagibilität ist also in M1KO-Mäusen nach Gabe aller drei Pharmaka etwa gleich.

Im Gegensatz dazu reagieren etwa 22% weniger aus M3KO- als aus WT-Mäusen isolierte Zellen auf die Zugabe von Muskarin und ACh im Vergleich zu etwa 10% weniger reagierender Zellen nach Zugabe von ATP. Auch die Stärke der Reaktionen auf Muskarin und ACh ist in M3KO-Mäusen signifikant reduziert. Daraus lässt sich schließen, dass es bei Abwesenheit eines MR-Subtyps, in diesem Fall M1 bzw. M3, zu einer unspezifischen Reduktion der Reagibilität der Zellen auf die untersuchten Agonisten kommt. Der dahinter stehende Mechanismus ist bisher unklar. Möglich wäre neben anderen Veränderungen eine Veränderung des Rezeptorrepertoires schon während der Entwicklung. So ist z.B. bekannt, dass MR wichtig für die Epithelentwicklung sind. ACh fördert im Trachealepithel über MR die Proliferation (Metzen et al. 2003) und in der Epidermis unter anderem das Wachstum der Keratinozyten (Grando et al. 1993; Grando 1997). Zusätzlich zu dieser unspezifischen Reduktion kann in der M3KO-Maus eine spezifische, also tatsächlich M3-abhängige Reduktion des Calciumeinstroms nach Zugabe von Muskarin und ACh und außerdem eine signifikant verminderte Reagibilität der Zellen auf Muskarin und ACh beobachtet werden. Diese ist sowohl im Vergleich zu WT- als auch zu M1KO-Mäusen zu beobachten. In nicht-zilienträgenden Zellen der Tuba uterina

scheint also der M3- und nicht der M1-Rezeptor eine entscheidende Rolle zu spielen. Dies entspricht den Ergebnissen von Jankovic et al. (2004), die zeigten, dass durch ACh ausgelöste Kontraktionen isolierter Segmente der humanen Ampulla durch Atropin und den M3-Rezeptorblocker *p*-Fluoro-hexahydro-sila-difenidol (pFHHSiD) blockiert werden können (Jankovic et al. 2004b). Dies war mit den M1- und M2-selektiven Blockern Pirenzepin und Methoctramine und dem Blocker nikotinischer Rezeptoren Mecamylamin nicht möglich (Jankovic et al. 2004b).

Weiterhin wurde in unseren Calcium-Imaging-Experimenten ein signifikant stärkerer Anstieg des Nikotin-induzierten Calciumeinstroms in Zellen von M3KO-Tieren beobachtet. Dies könnte, entsprechend der vorher diskutierten dualen Modulation, auf einen reflektorischen Effekt zum Ausgleich der nicht vorhandenen M3-Aktivität hindeuten. Da allerdings nur sehr wenige Zellen, meist weniger als 5%, überhaupt auf Nikotin reagieren, ist ein Artefakt nicht auszuschließen. Aufgrund dieser geringen Anzahl reagierender Zellen konnte mittels Chi²-Test der Anteil reagierender Zellen nach Nikotingabe unter den verschiedenen Bedingungen (mit und ohne Blocker, WT-KO) nicht statistisch ausgewertet werden.

In der Gruppe der zilientragenden Zellen ist eine so klare Aussage, wie oben beschrieben, leider nicht möglich. Betrachtet man hier den Anteil reagierender Zellen nach der ACh-Gabe, zeigt sich, dass signifikant weniger aus M3KO- als aus WT- und M1KO-Tieren isolierte Zellen auf ACh reagieren. Zu erwarten wäre, wenn tatsächlich M3 der verantwortliche Rezeptor auch in zilientragenden Zellen ist, eine entsprechend verminderte Anzahl reagierender Zellen auch nach Gabe von Muskarin. Dies ist nicht der Fall. Der Anteil reagierender Zellen ist im Vergleich zum WT zwar vermindert, allerdings nicht signifikant. Hier wäre eine klarere Aussage nur durch weitere Experimente möglich. Da nur ein sehr geringer Anteil zilientragender Zellen und diese auch nur relativ schwach auf Zugabe cholinergischer Agonisten reagieren, ist allerdings nicht von einer hohen Relevanz der MR in den zilientragenden Zellen der Tuba uterina der Maus auszugehen. Zumindest scheint durch sie keine Beeinflussung der ziliären Aktivität gegeben zu sein, da während der gesamten Experimente keinerlei Veränderung dieser festzustellen war. Passend zu unseren Beobachtungen konnten Noreikat (2009) keinen Einfluss von Muskarin und ACh, muskarinischen Blockern oder von MR-Gendefizienz auf die Zilienschlagfrequenz (ZSF) und die Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG) in der Tuba uterina der Maus feststellen (Noreikat 2009). Im Gegensatz zur Trachea war

sowohl basale PTG als auch ZSF sehr hoch und nicht durch cholinerge Agonisten oder Antagonisten beeinflussbar. Zusätzlich waren sie auch unabhängig vom hormonellen Status des Tieres (Noreikat 2009). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die ziliäre Aktivität der Tuba uterina unabhängig vom vorhandenen cholinergen System ist und vermutlich der Entfernung von Abfallprodukten dient (Noreikat 2009). Sowohl in zilientragenden als auch in nicht-zilientragenden Zellen ist der durch Muskarin und ACh induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg hauptsächlich auf M3 zurückzuführen. Mittels Laser-assistierter Mikrodisektion wurden Transkripte von M1 und M3 im Epithel, aber nicht in der Muskulatur nachgewiesen. Bei den Calcium-Imaging-Experimenten konnte eine stärkere Reaktion auf Muskarin und ACh allerdings in nicht-zilientragenden Zellen beobachtet werden. Zu dieser Gruppe gehören hauptsächlich glatte Muskelzellen, aber auch sekretorische Zellen des Epithels, Endothelzellen und andere Zelltypen aus der Subserosa und Adventitia. Prinzipiell könnten also sekretorische Zellen diese Rezeptoren exprimieren. Möglich ist allerdings auch, dass wie bei nAChR $\alpha 3$ (und vermutlich M2) in der Ampulla auch in diesem Fall die Laser-assistierte Mikrodisektion nicht sensitiv genug ist um nur kleine Transkriptmengen, in diesem Fall in der Muskulatur, zu detektieren. Außerdem sind vermutlich zusätzlich andere MR, eventuell M5 beteiligt, deren Anwesenheit mittels Laser-assistierter Mikrodisektion nicht untersucht worden war. Da weder in aus M1KO- noch in aus M3KO-Tieren isolierten Zellen, der Muskarin induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg vollständig verschwunden ist.

4.3 Die Innervation der Tuba uterina der Maus

Die Tuba uterina der Maus weist eine dichte Innervation besonders in der Nähe von Blutgefäßen in der Mesosalpinx und etwas schwächer auch in der Subserosa auf. Wenige Nervenfasern ziehen zwischen den Lagen der zirkulären glatten Muskulatur entlang und erreichen die Lamina propria. Ein ähnliches Innervationsmuster ist auch für den Ovidukt anderer Spezies, unter anderem des Rinds (Lakomy et al. 1994) bekannt. Generell nimmt die Dichte der Innervation vom Uterus in Richtung zum Infundibulum hin ab. Im Infundibulum sind praktisch keine Nervenfasern zu finden. Diese Tatsache beschrieben bereits Owman und Sternquist 1988. Mittels retrogradem Tracing konnte gezeigt werden, dass 78,6% der aus parazervikalen

Ganglien entspringenden Nerven zum Isthmus und nur 21,4 % zur Ampulla ziehen (Czaja et al. 2001b).

Das am häufigsten vorkommende Neuropeptid im Ovidukt der Maus ist CGRP. CGRP-positive Nervenfasern bilden ein dichtes Netzwerk in der Subserosa um die Tubenquerschnitte, teilweise assoziiert mit Blutgefäßen, und ziehen in dicken Nervenbündeln durch die Mesosalpinx entlang von Muskelfaserbündeln und auch Blutgefäßen. Mittels Doppelimmunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass die Neuropeptide CGRP und SP in denselben Nervenfasern vorkommen. Somit ist die Situation in der Maus ähnlich der in der Ratte, wo SP-positive Nervenfasern ein dichtes Geflecht um die Tuba uterina bilden (Papka et al. 1985). Auch im Schwein ist die größte Population der sensorischen Neurone CGRP- und SP-positiv (Czaja 2000).

Die Tuba uterina der Maus weist außerdem eine dichte noradrenerge Innervation auf. Diese ist allerdings besonders in der Subserosa weniger stark ausgeprägt als die sensorische Innervation und kommt hauptsächlich assoziiert mit Blutgefäßen vor. Owman et al. berichteten, dass noradrenerge Nerven im Isthmus des Kaninchens hauptsächlich in der Muskulatur und in der Ampulla eher perivaskulär vorkommen (Owman & Sjöberg 1966; Owman & Stjernquist 1988). Eine dichte noradrenerge Innervation der Muskulatur konnte von uns nicht bestätigt werden, auch wenn dort einzelne TH-positive Nervenfasern nachgewiesen wurden. Vermutlich gibt es in diesem Bereich speziesspezifische Unterschiede (siehe auch Owman & Stjernquist 1988). Doppelimmunfluoreszenzen konnten zeigen, dass noradrenerge Nervenfasern häufig auch NPY enthalten. Da TH in Nervenfasern axoplasmatisch, NPY aber vesikulär vorkommt, ist in den Doppelimmunfluoreszenzpräparaten nicht immer eindeutig zu entscheiden, ob es sich exakt um dieselben Nervenfasern handelt. NPY-positive Nervenfasern kommen generell in allen Spezies vor. In der Ratte und im Rind wurde z.B. eine eher mäßig ausgeprägte Innervation in der inneren zirkulären Muskulatur, assoziiert mit Blutgefäßen und subepithelial gefunden (Papka et al. 1985; Lakomy et al. 1994). Im Mensch und im Schwein wurde dagegen von einer dichten NPY-positiven Innervation berichtet (Reinecke et al. 1989; Happola et al. 1991). Mittels retrogradem Tracing konnten Czaja et al. 2001 zeigen, dass im Schwein 70% aller aus PZG entspringenden Axone noradrenerg sind (Czaja et al. 2001b). Die restlichen Nervenfasern enthielten meist die Neuropeptide CGRP und SP (Czaja et al. 2001b).

Die beiden wichtigsten Nervenpopulationen in der Tuba uterina der Maus sind also sensorische C-Fasern, welche hauptsächlich die Neuropeptide CGRP und SP enthalten, und efferente, noradrenerge Nerven aus parazervikalen Ganglien oder dem Plexus mesentericus, welche zusätzlich NPY enthalten. Diese beiden Hauptpopulationen konnten noch genauer charakterisiert werden. So gibt es auch eine schwach ausgeprägte cholinerge Innervation, welche zumindest bei der Maus zusätzlich das Neuropeptid CGRP enthält und theoretisch sowohl sensorisch als auch parasymphatisch sein könnten. Auch in anderen Spezies wird nur von einer schwach ausgeprägten cholinergen Innervation berichtet (Czaja et al. 1993). VIP-positive Nervenfasern sind in den meisten Spezies, wie auch in der Maus, ausgesprochen selten (Papka et al. 1985; Lakomy et al. 1994; Majewski et al. 1995). Myelinisierte Nervenfasern sind nur in Ausnahmefällen nachzuweisen.

4.4 Möglicher Einfluss des cholinergen Systems auf die Kontraktilität der Tuba uterina

Die Tuba uterina zeigt spontane, vermutlich myogene Kontraktionen, welche im Verlauf des Zykluses variieren (Sandberg et al. 1960; Murcott & Carpenter 1977). Durch elektrische Feldstimulation (EFS) werden Neurotransmitter aus Nervenendigungen freigesetzt, welche dann eine Kontraktion oder Relaxation der Muskulatur hervorrufen. In der Tuba uterina führt EFS zu einer spezifischen Antwort, wobei der kontraktile Anteil dieser Antwort mittels Tetrodotoxin und auch Atropin blockiert werden kann (Murcott & Carpenter 1977). Auch Stimulation mit ACh kann Kontraktionen auslösen (Sandberg et al. 1960; Heilman & Reo 1977; Murcott & Carpenter 1977; Rajkumar & Sharma 1981; Jankovic et al. 2004a; 2004b), welche durch Atropin blockiert werden können (Heilman & Reo 1977; Murcott & Carpenter 1977). Jankovic et al. 2004 führen dies auf den M3-Rezeptor zurück (Jankovic et al. 2004a; 2004b). Der kontraktile Anteil scheint also durch cholinerge Nerven vermittelt zu werden (Murcott & Carpenter 1977). Im Gegensatz dazu ist der inhibitorische Anteil nicht durch Atropin blockierbar (Murcott & Carpenter 1977). Die spontane Aktivität der Tuba uterina ist laut Murcott und Carpenter dagegen nicht durch Tetrodotoxin oder Atropin blockierbar (Murcott & Carpenter 1977). Diese myogenen Kontraktionen werden vermutlich ähnlich wie im Darm von Schrittmacherzellen, den sogenannten ICLCs hervorgerufen (Popescu et al. 2005; 2007; Dixon et al. 2009). Im

Magen konnte gezeigt werden, dass die so erzeugten langsamen elektrischen Wellen über M3 reguliert werden (Kim et al. 2003). Ob die myogenen Kontraktionen in der Tuba uterina nun durch MR reguliert werden oder nicht, müsste noch weiter untersucht werden. Die Ergebnisse unserer Calcium-Imaging-Experimente könnten aber darauf hindeuten, dass dies auch in der Tuba uterina der Fall ist. Auch andere Signalmoleküle, z.B. Adrenalin (Sporrong et al. 1982) und CGRP (Samuelson et al. 1985), haben Einfluss auf die Kontraktilität der Tuba uterina. So kann CGRP sowohl spontane als auch SP-induzierte Kontraktionen inhibieren (Samuelson et al. 1985). Adrenomedullin (ADM) senkt den basalen Tonus der Tuba uterina, was wiederum mit dem ADM-Rezeptorblocker hADM₂₂₋₅₂ und teilweise auch mit dem CGRP-Rezeptorblocker hCGRP₈₋₃₇ rückgängig gemacht werden kann (Liao et al. 2011). Im Gegensatz zur Wirkung auf die Kontraktilität steigert ADM die Zilienschlagfrequenz (Liao et al. 2011). Dieser Effekt ist durch hCGRP₈₋₃₇, aber nicht hADM₂₂₋₅₂ blockierbar (Liao et al. 2011).

4.5 Modulation der CGRP-Freisetzung durch MR

4.5.1 Möglicher Einfluss auf die Nozizeption

Cholinerge Komponenten nehmen Einfluss auf die Nozizeption und die neurogene Inflammation. So wurde z.B. gezeigt, dass MR auf peripheren Nervenendigungen einen modulierenden Effekt auf die Nozizeption in der Haut der Ratte haben (Bernardini et al. 2001a; 2001b; 2002). Noxische Hitze führt zu einer Ausschüttung von CGRP aus sensorischen Nervenfasern. Diese Hitze-induzierte CGRP-Freisetzung kann durch Muskarin und Arecaidin, einen M2-Agonisten inhibiert werden (Bernardini et al. 2001a). In M2KO-, aber nicht in M4KO-Mäusen, war dieser Effekt verschwunden (Bernardini et al. 2002). Im Gegensatz zu den MR haben nAChR einen schwachen exzitatorischen Effekt auf die CGRP-Freisetzung (Bernardini et al. 2001b). Auf diesem Weg kann es also zu einer biphasischen Modulation der Nozizeption kommen. Entsprechende Ergebnisse wurden auch *in vivo* in einem orofazialen Schmerzmodell der Ratte erzielt (Dussor et al. 2003; 2004). Muskarinische Rezeptoren könnten also auch modulierend auf die Nozizeption in der Tuba uterina einwirken. Die dichte CGRP- und SP-positive Innervation legt nahe, dass hier ein wie auch immer gearteter Warnmechanismus vorhanden ist, um vor eventuell gefährlichen Verletzungen, Infektionen oder auch z.B. der Einnistung eines

Embryos in der Tuba uterina zu warnen und rechtzeitig eine geeignete Reaktion des Immunsystems einzuleiten. Eine Modulation dieser Schmerzreaktion mittels MR oder nAChR wäre entweder über die wenigen cholinergen Nervenfasern, welche gleichzeitig das Neuropeptid CGRP enthalten, oder auch parakrin über ACh synthetisierende nicht-neuronale Zellen, wie z.B. glatte Muskelzellen oder Immunzellen möglich. Auch wenn eine genaue Lokalisation des M2-Rezeptors in dieser Arbeit nicht gelungen ist, konnte jedoch gezeigt werden, dass er im Ovidukt vorhanden ist. Prinzipiell wäre also eine Modulation der Nozizeption über den M2-Rezeptor in der Tuba uterina der Maus denkbar. Die Nozizeption könnte allerdings auch über einen anderen MR-Subtyp moduliert werden.

4.5.2 Möglicher Einfluss auf die neurogene Inflammation/B-Zelldifferenzierung

CGRP hat außerdem eine inhibierende Wirkung auf die frühe B-Zell-Differenzierung (McGillis et al. 1995). Physiologische Konzentrationen von CGRP inhibieren die Antwort von Vorläuferzellen der B-Lymphozyten auf Interleukin 7 (IL-7, Fernandez et al. 2000). Dieser Effekt ist durch den CGRP-Antagonisten CGRP₈₋₃₇ blockierbar (Fernandez et al. 2000). ADM, SP und Calcitonin haben keinen Einfluss auf die durch IL-7 induzierte Proliferation früher B-Zellen (Fernandez et al. 2000). In der in-vivo-Situation konnte gezeigt werden, dass die Gabe von CGRP die Anzahl IL-7 responsiver B-Lymphozytenvorläufer im Knochenmark verringert (Schlomer et al. 2007).

Es könnte also eine Art Rückkopplung zwischen der durch SP- und CGRP-modulierten Nozizeption, der Kontraktilität der Tuba uterina und der B-Lymphozytenentwicklung existieren. Die Nozizeption wird über non-neuronales von glatten Muskelzellen, Immunzellen oder der CarAT synthetisiertes ACh moduliert. Diese Modulation könnte auch direkt in den CGRP- und ACh-positiven Nervenfasern stattfinden. CGRP wiederum könnte daraufhin inhibierend auf die Kontraktilität der Tuba uterina einwirken und so die durch ACh hervorgerufenen Kontraktionen abschwächen. Außerdem wirken sowohl CGRP als auch ACh inhibierend auf die B-Zellreifung. CGRP wirkt inhibierend auf die IL-7 vermittelte Proliferation von B-Zellvorläufern (McGillis et al. 1995; Fernandez et al. 2000; Schlomer et al. 2007) und ACh über nAChR $\alpha 7$ auf die CD40-vermittelte B-Zellaktivierung (Skok et al. 2005; 2007; Koval et al. 2009; 2011).

4.6 Schlussfolgerung

In der Tuba uterina der Maus ist ein funktionsfähiges, aber nicht-kanonisches cholinerges System vorhanden. Das bedeutet, dass die klassischen cholinergen Marker wie ChAT, VAChT oder CHT1 nicht, oder nur sehr wenig vorhanden sind. ChAT beschränkt sich auf die wenigen cholinergen Nervenfasern, eine Subpopulation von B-Lymphozyten und einzelne glatte Muskelzellen. ACh ist dementsprechend auch nur in sehr geringen Konzentrationen im Ovidukt vorhanden. Es könnte außer von ChAT auch noch von der in der RT-PCR regelmäßig nachweisbaren CarAT synthetisiert werden. Der Transport von ACh über die Zellmembran wird wahrscheinlich von OCTs geleistet. Trotz der geringen messbaren Konzentrationen von ACh sind sehr viele verschiedene nAChR und MR mittels RT-PCR nachweisbar. Mittels Calcium-Imaging-Experimenten konnte gezeigt werden, dass voll funktionsfähige MR in zilientragenden und nicht-zilientragenden Zellen vorhanden sind. Relevant für die Funktion scheint insbesondere, aber nicht ausschließlich M3 zu sein. Insgesamt sind MR kaum für die Regulation der $[Ca^{2+}]_i$ in zilientragenden Zellen, sondern hauptsächlich für die in nicht-zilientragenden Zellen wichtig. Möglicherweise spielt M3, wie im Magen (Kim et al. 2003), eine Rolle bei der Modulation der myogenen durch ICLCs hervorgerufenen Kontraktionen (Popescu et al. 2005; 2007; Dixon et al. 2009). Eine genaue Aussage hierzu würde aber weitere Untersuchungen erfordern. Die nAChR der Tuba uterina bilden vermutlich hauptsächlich wenig calcium-permeable oder eventuell sogenannte atypische Kanäle. Inhibierung der nAChR mittels Mecamylamin führt überraschenderweise dazu, dass mehr Zellen auf Muskarin, ACh und auch ATP reagieren. Dieses ungewöhnliche Ergebnis deutet auf eine biphasische Regulation der Funktion der Tuba uterina durch MR und nAChR hin. Durch Inhibierung der nAChR wird vermutlich deren normalerweise inhibierender Effekt auf MR und auch purinerge Rezeptoren aufgehoben. Auch hier wären weitere Untersuchungen zur Aufklärung des Mechanismus dieses Effektes nötig.

Neben einer sehr ausgeprägten sensorischen Innervation weist die Tuba uterina außerdem eine weniger dichte efferente, noradrenerge Innervation auf. Die wenigen cholinergen Nervenfasern enthalten zusätzlich CGRP und könnten sowohl sensorisch als auch parasympathisch sein. Die dichte sensorische Innervation legt nahe, dass in der Tuba uterina eine Art Warnmechanismus vorhanden ist, welcher

z.B. vor Verletzungen, Infektionen oder tubaren Graviditäten warnen könnte. Dieser Warnmechanismus könnte über die vorhandenen cholinergen Nervenfasern oder parakrin über von nicht-neuronalen Zellen, z.B. B-Lymphozyten oder den einzelnen ChAT-positiven glatten Muskelzellen synthetisiertes ACh moduliert werden. Eine Modulation von Schmerzreaktionen über eine Modulation der CGRP-Freisetzung mittels MR und nAChR wurde z.B. schon in einem orofazialen Schmerzmodell gezeigt. Außerdem könnte ACh über MR über eine Modulation der CGRP-Freisetzung und über nAChR $\alpha 7$ modulierend auf die B-Zellentwicklung einwirken (Dussor et al. 2003; 2004). Dieses Modell der Modulation der Schmerzreaktion durch das non-neuronale cholinerge System im Eileiter der Maus könnte eventuell die scheinbare Diskrepanz zwischen Abwesenheit cholinergischer Marker und Anwesenheit vieler verschiedener MR und nAChR erklären. ACh würde in diesem Fall nur im Bedarfsfall synthetisiert werden und dann mit den vorhandenen Rezeptoren interagieren.

5. Zusammenfassung

Die genaue zeitliche Koordination von Eizell-, Embryo- und Spermientransport in der Tuba uterina ist essenziell für eine erfolgreiche Implantation des Embryos im Uterus und damit für eine erfolgreiche Schwangerschaft bzw. Trächtigkeit. Die genauen Regulationsmechanismen sind allerdings noch immer nicht vollständig verstanden. Es gibt Hinweise darauf, dass das cholinerge System in diese Regulation involviert ist. So ist zwar bekannt, dass die Tuba uterina nur eine schwach ausgeprägte cholinerge Innervation aufweist (Garcia-Pascual et al. 1996), trotzdem löst ACh, vermutlich über den muskarinischen Rezeptorsubtyp M3 (Jankovic et al. 2004), Kontraktionen der Tuba uterina aus, welche mit Atropin blockierbar sind (Heilman & Reo 1977). Auch für die Beteiligung von nAChR gibt es Hinweise. So führt Nikotingabe zur Verzögerung der Eizellimplantation (Yoshinaga et al. 1979), Veränderungen der Motilität (Neri & Marcus 1972) und der Blutversorgung der Tuba uterina und zu Veränderungen in der Entwicklung des Embryos (Mitchell & Hammer 1985). Somit könnten nAChR eventuell für das erhöhte Risiko rauchender Frauen für ektopische Schwangerschaften mitverantwortlich sein (Ankum et al. 1996, Castles et al. 1999). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass der Nikotinmetabolit Cotinin über nAChR $\alpha 7$ die Expression des Prokinectinrezeptors 1 reguliert (Shaw et al. 2010). Auch Prokinectinen wird eine Beteiligung an der Regulation der Implantation zugesprochen (Maldonado-Perez et al. 2007). Um einen genaueren Einblick in die mögliche Beteiligung des cholinergen Systems in oviduktale Funktionen zu bekommen, wurde das Vorkommen von Komponenten des cholinergen Systems mittels RT-PCR und Immunhistochemie in Abhängigkeit von Zyklusstand, Trächtigkeit und Segment der Tuba uterina untersucht. Diese Untersuchungen zeigten, dass eine große Anzahl MR und nAChR, abgesehen von nAChR $\alpha 7$ unabhängig vom Zyklusstand des Tieres, vorhanden sind. M1, M3, nAChR $\alpha 3$ und $\alpha 7$ konnten im Epithel nachgewiesen werden. Um die Beteiligung dieser Rezeptoren an der Regulation der intrazellulären Calcium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) zu untersuchen, wurden Calcium-Imaging-Untersuchungen mit aus WT-, M1KO- und M3KO-Tieren isolierten oviduktalen zilientragenden und nicht-zilientragende Zellen durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigten, dass hauptsächlich der M3-Rezeptor, besonders in nicht-zilientragenden Zellen, an dieser Regulation beteiligt ist. Obwohl Nikotin fast

keine Reaktion der Zellen bewirkte, führte die zusätzliche Gabe des nAChR-Inhibitors Mecamylamin zur einer Verstärkung der Reaktionen auf Muskarin, ACh und auch ATP. Die vorhandenen, vermutlich wenig calciumpermeablen oder atypischen nAChR scheinen also eine inhibierende Wirkung auf muskarinische und purinerge Rezeptoren zu haben. Die Regulation der $[Ca^{2+}]_i$ scheint also von MR und nAChR gegenläufig reguliert zu werden. Überraschenderweise waren im Gegensatz zur großen Anzahl nachgewiesener ACh-Rezeptoren die typischen cholinergen Marker ChAT, VAChT, AChE und CHT1 nicht oder nur sehr selten nachzuweisen und auch ACh war mittels HPLC nur unregelmäßig nachweisbar. Die unspezifischen Synthese- bzw. Abbauenzyme CarAT und BChE waren allerdings immer nachweisbar. Der Transport von ACh über die Zellmembran wird wahrscheinlich von den regelmäßig nachweisbaren OCTs übernommen. In der Tuba uterina ist also ein nicht-kanonisches cholinerges System vorhanden. Mittels einer ChAT-eGFP exprimierenden transgenen Maus (Tallini et al. 2006) konnte ChAT außer in den ausgesprochen seltenen cholinergen Nervenfasern, in einzelnen glatten Muskelzellen und B-Lymphozyten nachgewiesen werden. Die Tuba uterina weist neben einer sehr ausgeprägten sensorischen Innervation auch eine dichte efferente noradrenerge Innervation auf. Die wenigen vorhandenen cholinergen Nervenfasern enthalten meist zusätzlich das Neuropeptid CGRP. Aufgrund all dieser Daten wäre es denkbar, dass ACh im Eileiter der Maus als eine Art Warnsignal dient und im Bedarfsfall, z.B. bei Verletzung, synthetisiert wird, um mit den ubiquitär vorhandenen ACh-Rezeptoren zu interagieren und eine geeignete Reaktion auf diese Bedrohung auszulösen.

6. Summary

The exact temporal coordination of transport of ova, embryo and sperm in the oviduct is essential for the successful implantation of the embryo in the uterus and therewith for a successful pregnancy. Until now, the exact regulation mechanisms of this transport are not fully understood. There are indications that the cholinergic system is involved in this regulation. It is known, that in spite of its scanty cholinergic innervation (for review see Garcia-Pascual et al. 1996) ACh induces contractions of the tuba uterina, probably via the muscarinic receptor subtype M3 (Jancovic et al. 2004), which can be blocked by atropine (Heilman & Reo 1977). Administration of nicotine leads to delayed implantation of the embryo (Yoshinaga et al. 1977), to changes of the motility (Neri & Marcus 1972), of the blood supply and of the development of the embryo (Mitchell & Hammer 1985). Thus, nAChR could at least in part be responsible for the increased risk of ectopic pregnancies in smoking women (Ankum et al. 1985; Castels et al. 1999). Recently, it was shown that the nicotine metabolite cotinine regulates expression of prokinectin receptor 1 via nAChR $\alpha 7$ (Shaw et al. 2010). Prokinectins are probably also involved in the regulation of the implantation (Maldonado-Perez et al. 2007). To get deeper insights in the potential involvement of the cholinergic system in oviductal functions, the presence of the components of the cholinergic system was evaluated by means of RT-PCR and immunohistochemistry with regard to segment of the oviduct, state of estrous cycle and pregnancy of the animal. These evaluations showed a broad variety of MR and nAChR, except for nAChR $\alpha 7$, independent of the hormonal status of the animal. M1, M3, nAChR $\alpha 3$ and $\alpha 7$ were present in the epithelium. To get insights in functional coupling of ACh-receptors to $[Ca^{2+}]_i$ calcium imaging experiments using ciliated and non-ciliated cells isolated from WT-, M1KO- and M3KO-mice were performed. These experiments showed that especially in non-ciliated cells M3 is the mayor regulator of $[Ca^{2+}]_i$. Although administration of nicotine resulted in nearly no reaction of cells, administration of the nAChR-inhibitor mecamylamine surprisingly resulted in increased reactions of the cells to muscarine, ACh and also ATP. This shows that nAChR probably have an inhibitory effect on muscarinic and purinergic receptors in the oviduct and that these receptors form mainly weakly calcium permeable or atypical receptors. The regulation of $[Ca^{2+}]_i$ seems to be inversely linked by nAChR

and MR. In contrast to the broad variety of ACh-receptors present in the oviduct, the classical cholinergic markers, ChAT, VAcHT, CHT1 and AChE were not or only seldomly detected, and ACh was only irregularly detected by HPLC. The nonspecific synthesizing- and catabolizing enzymes CarAT and BChE were detected constantly. Transport of ACh across the cell membrane is probably facilitated by OCTs, which were regularly detected. Thus, in the murine tuba uterina a non-canonical cholinergic system is present. Using a transgenic mouse expressing eGFP under the control of the ChAT-promoter (Tallini et al. 2006), ChAT was not only detected in the very infrequent cholinergic nerve fibres, but also in single smooth muscle cells and B-lymphocytes. In general, the oviduct shows a sensory as well as an efferent, noradrenergic innervation. The few additional cholinergic nerve fibres also contain the the neuropeptide CGRP. Collectively, these data suggest that ACh is used as some kind of danger signal in the oviduct, synthesized for example after some kind of trauma to interact with the multiply present ACh receptors and to trigger an appropriate defense mechanism.

7. Literaturverzeichnis

1995. Current trends ectopic pregnancies- US, 1990-1992, CDC (Center of disease control)
- Abe H, Oikawa T. 1992. Examination by scanning electron microscopy of oviductal epithelium of the prolific Chinese Meishan pig at follicular and luteal phases. *Anat Rec* 233:399-408
- Abe H, Oikawa T. 1993a. Effects of estradiol and progesterone on the cytodifferentiation of epithelial cells in the oviduct of the newborn golden hamster. *Anat Rec* 235:390-8
- Abe H, Oikawa T. 1993b. 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. 1993. Scanning electron microscopy of goat oviductal epithelial cells at the follicular and luteal phases of the oestrus cycle. *J Anat* 183 (Pt 2):415-21
- 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):515-21
- Adler M, Petrali JP, Moore DH, Filbert MG. 1991. Function and distribution of acetyl- and butyrylcholinesterase in canine tracheal smooth muscle. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 312:126-39
- Adriaensen D, Brouns I, Van Genechten J, Timmermans JP. 2003. Functional morphology of pulmonary neuroepithelial bodies: extremely complex airway receptors. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 270:25-40
- Afzelius BA, Camner P, Mossberg B. 1978. On the function of cilia in the female reproductive tract. *Fertil Steril* 29:72-4
- Alles GA, Hawes RC. 1940. Cholinesterases in the blood of man. *Journal of Biological Chemistry* 133:375
- Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES, Evans RM. 1982. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 298:240-4
- Amara SG, Arriza JL, Leff SE, Swanson LW, Evans RM, Rosenfeld MG. 1985. Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science* 229:1094-7
- Anderson DC, King SC, Parsons SM. 1983. Pharmacological characterization of the acetylcholine transport system in purified Torpedo electric organ synaptic vesicles. *Mol Pharmacol* 24:48-54
- Ankum WM, Mol BW, Van der Veen F, Bossuyt PM. 1996. Risk factors for ectopic pregnancy: a meta-analysis. *Fertil Steril* 65:1093-9
- Ardon F, Helms D, Sahin E, Bollwein H, Topfer-Petersen E, Waberski D. 2008. Chromatin-unstable boar spermatozoa have little chance of reaching oocytes in vivo. *Reproduction* 135:461-70
- Arias HR. 2000. Localization of agonist and competitive antagonist binding sites on nicotinic acetylcholine receptors. *Neurochem Int* 36:595-645
- Augustinsson KB, Nachmansohn D. 1949. Distinction between Acetylcholine-Esterase and Other Choline Ester-splitting Enzymes. *Science* 110:98-9

- Baker ER, Zwart R, Sher E, Millar NS. 2004. Pharmacological properties of alpha 9 alpha 10 nicotinic acetylcholine receptors revealed by heterologous expression of subunit chimeras. *Mol Pharmacol* 65:453-60
- Ballesta J, Bloom SR, Polak JM. 1985. Distribution and localization of regulatory peptides. *Crit Rev Clin Lab Sci* 22:185-218
- Barajas-Lopez C, Berezin I, Daniel EE, Huizinga JD. 1989. Pacemaker activity recorded in interstitial cells of Cajal of the gastrointestinal tract. *Am J Physiol* 257:C830-5
- Bernardini N, Reeh PW, Sauer SK. 2001a. Muscarinic M2 receptors inhibit heat-induced CGRP release from isolated rat skin. *Neuroreport* 12:2457-60
- Bernardini N, Sauer SK, Haberberger R, Fischer MJ, Reeh PW. 2001b. Excitatory nicotinic and desensitizing muscarinic (M2) effects on C-nociceptors in isolated rat skin. *J Neurosci* 21:3295-302
- Bernardini N, Roza C, Sauer SK, Gomeza J, Wess J, Reeh PW. 2002. Muscarinic M2 receptors on peripheral nerve endings: a molecular target of antinociception. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 22:RC229
- Berstein G, Blank J, Smrcka A, Higashijima T, Sternweis P, et al. 1992. Reconstitution of agonist-stimulated phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate hydrolysis using purified m1 muscarinic receptor, Gq/11, and phospholipase C-beta 1. *Journal of Biological Chemistry* 267:8081
- Bishop MR, Sastry BV, Schmidt DE, Harbison RD. 1976. Occurrence of choline acetyltransferase and acetylcholine and other quaternary ammonium compounds in mammalian spermatozoa. *Biochem Pharmacol* 25:1617-22
- Bongso A, Soon-Chye N, Sathananthan H, Lian NP, Rauff M, Ratnam S. 1989. Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cells. *Hum Reprod* 4:706-13
- Bortz J, Lienert J. 2008. *Kurzgefasst Statistik für die klinische Forschung*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag
- Boufous S, Quartararo M, Mohsin M, Parker J. 2001. Trends in the incidence of ectopic pregnancy in New South Wales between 1990-1998. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 41:436-8
- Bouyer J, Coste J, Fernandez H, Pouly JL, Job-Spira N. 2002. Sites of ectopic pregnancy: a 10 year population-based study of 1800 cases. *Hum Reprod* 17:3224-30
- Bozic CR, Lu B, Hopken UE, Gerard C, Gerard NP. 1996. Neurogenic amplification of immune complex inflammation. *Science* 273:1722-5
- Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. 1985. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature* 313:54-6
- Brejck K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van Der Oost J, et al. 2001. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* 411:269-76
- Buhlmann N, Leuthauser K, Muff R, Fischer JA, Born W. 1999. A receptor activity modifying protein (RAMP)2-dependent adrenomedullin receptor is a calcitonin gene-related peptide receptor when coexpressed with human RAMP1. *Endocrinology* 140:2883-90
- Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, et al. 2005. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309:1559-63
- Castles A, Adams EK, Melvin CL, Kelsch C, Boulton ML. 1999. Effects of smoking during pregnancy. Five meta-analyses. *Am J Prev Med* 16:208-15

- Caulfield MP. 1993. Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* 58:319-79
- Caulfield MP, Birdsall NJ. 1998. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 50:279-90
- Changeux JP, Kasai M, Lee CY. 1970. Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 67:1241-7
- Changeux JP, Edelstein SJ. 1998. Allosteric receptors after 30 years. *Neuron* 21:959-80
- Chavez-Noriega LE, Crona JH, Washburn MS, Urrutia A, Elliott KJ, Johnson EC. 1997. Pharmacological characterization of recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors h alpha 2 beta 2, h alpha 2 beta 4, h alpha 3 beta 2, h alpha 3 beta 4, h alpha 4 beta 2, h alpha 4 beta 4 and h alpha 7 expressed in *Xenopus oocytes*. *J Pharmacol Exp Ther* 280:346-56
- Chess-Williams R. 2002. Muscarinic receptors of the urinary bladder: detrusor, urothelial and prejunctional. *Auton Autacoid Pharmacol* 22:133-45
- Clapham DE, Neer EJ. 1997. G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:167-203
- Cobbold S, Jayasuriya A, Nash A, Prospero T, Waldmann H. 1984. Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T-cell subsets in vivo. *Nature* 312:548-51
- Cohen JB, Weber M, Huchet M, Changeux JP. 1972. Purification from *Torpedo marmorata* electric tissue of membrane fragments particularly rich in cholinergic receptor protein. *FEBS Lett* 26:43-7
- Comline RS. 1946. Synthesis of acetylcholine by non-nervous tissue. *J Physiol* 105:6
- Cook AK, Carty M, Singer CA, Yamboliev IA, Gerthoffer WT. 2000. Coupling of M(2) muscarinic receptors to ERK MAP kinases and caldesmon phosphorylation in colonic smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278:G429-37
- Couturier S, Bertrand D, Matter JM, Hernandez MC, Bertrand S, et al. 1990. A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (alpha 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX. *Neuron* 5:847-56
- Covernton PJ, Kojima H, Sivilotti LG, Gibb AJ, Colquhoun D. 1994. Comparison of neuronal nicotinic receptors in rat sympathetic neurones with subunit pairs expressed in *Xenopus oocytes*. *J Physiol* 481 (Pt 1):27-34
- Cretoiu SM, Cretoiu D, Suciuc L, Popescu LM. 2009. Interstitial Cajal-like cells of human Fallopian tube express estrogen and progesterone receptors. *J Mol Histol* 40:387-94
- Croxatto HB. 2002. Physiology of gamete and embryo transport through the fallopian tube. *Reprod Biomed Online* 4:160-9
- Czaja K. 2000. Distribution of primary afferent neurons innervating the porcine oviduct and their immunohistochemical characterization. *Cells Tissues Organs* 166:275-82
- Czaja K, Majewski M, Klinkosz B, Kaleczyc J. 1993. Adrenergic and acetylcholinesterase-positive innervation of the bovine oviduct. *Folia Morphol (Warsz)* 52:151-9
- Czaja K, Kaleczyc J, Pidsudko Z, Franke-Radowiecka A, Lakomy M. 2001a. Distribution of efferent neurones innervating the oviduct in the pig. *Folia Morphol (Warsz)* 60:243-8

- Czaja K, Wasowicz K, Klimczuk M, Podlasz P, Lakomy M. 2001b. Distribution and immunohistochemical characterisation of paracervical neurons innervating the oviduct in the pig. *Folia Morphol (Warsz)* 60:205-11
- Dechanet C, Anahory T, Mathieu Daude JC, Quantin X, Reyftmann L, et al. 2011. Effects of cigarette smoking on reproduction. *Hum Reprod Update* 17:76-95
- Demott RP, Suarez SS. 1992. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol Reprod* 46:779-85
- Dixon RE, Hwang SJ, Hennig GW, Ramsey KH, Schripsema JH, et al. 2009. Chlamydia infection causes loss of pacemaker cells and inhibits oocyte transport in the mouse oviduct. *Biol Reprod* 80:665-73
- Dixon RE, Britton FC, Baker SA, Hennig GW, Rollings CM, et al. 2011a. Electrical slow waves in the mouse oviduct are dependent upon extracellular and intracellular calcium sources. *Am J Physiol Cell Physiol*
- Dixon RE, Hennig GW, Baker SA, Britton FC, Harfe BD, et al. 2011b. Electrical Slow Waves in the Mouse Oviduct Are Dependent upon a Calcium Activated Chloride Conductance Encoded by Tmem16a. *Biol Reprod*
- Doran JF, Jackson P, Kynoch PA, Thompson RJ. 1983. Isolation of PGP 9.5, a new human neurone-specific protein detected by high-resolution two-dimensional electrophoresis. *J Neurochem* 40:1542-7
- Dussor GO, Leong AS, Gracia NB, Kilo S, Price TJ, et al. 2003. Potentiation of evoked calcitonin gene-related peptide release from oral mucosa: a potential basis for the pro-inflammatory effects of nicotine. *Eur J Neurosci* 18:2515-26
- Dussor GO, Helesic G, Hargreaves KM, Flores CM. 2004. Cholinergic modulation of nociceptive responses in vivo and neuropeptide release in vitro at the level of the primary sensory neuron. *Pain* 107:22-32
- Eddy CA, Pauerstein CJ. 1980. Anatomy and physiology of the fallopian tube. *Clin Obstet Gynecol* 23:1177-93
- Eglen RM, Hegde SS, Watson N. 1996. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacol Rev* 48:531-65
- Eglen RM. 2006. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Auton Autacoid Pharmacol* 26:219-33
- Elgoyhen AB, Johnson DS, Boulter J, Vetter DE, Heinemann S. 1994. Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 79:705-15
- Elgoyhen AB, Vetter DE, Katz E, Rothlin CV, Heinemann SF, Boulter J. 2001. alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3501-6
- Ellington JE, Ignatz GG, Ball BA, Meyers-Wallen VN, Currie WB. 1993. De novo protein synthesis by bovine uterine tube (oviduct) epithelial cells changes during co-culture with bull spermatozoa. *Biol Reprod* 48:851-6
- Ellington JE, Evenson DP, Wright RW, Jr., Jones AE, Schneider CS, et al. 1999. Higher-quality human sperm in a sample selectively attach to oviduct (fallopian tube) epithelial cells in vitro. *Fertil Steril* 71:924-9
- Erickson JD, Varoqui H, Schafer MK, Modi W, Diebler MF, et al. 1994. Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus. *J Biol Chem* 269:21929-32
- Faussone-Pellegrini MS, Bani G. 1990. The muscle coat morphology of the mouse oviduct during the estrous cycle. *Arch Histol Cytol* 53:167-78

- Faussone-Pellegrini MS, Bani G, Bianchi S. 1991. Ultrastructural modifications of the muscle coat of the infundibulum and ampulla of the mouse oviduct during pregnancy and post-partum. *Arch Histol Cytol* 54:289-98
- Faussone-Pellegrini MS, Matini P, Bani G. 1995. Morphological changes in the smooth muscle cells of the mouse lower oviduct during pregnancy and post-partum. *Arch Histol Cytol* 58:293-301
- Fazeli A, Affara NA, Hubank M, Holt WV. 2004. Sperm-induced modification of the oviductal gene expression profile after natural insemination in mice. *Biol Reprod* 71:60-5
- Felder CC, Williams HL, Axelrod J. 1991. A transduction pathway associated with receptors coupled to the inhibitory guanine nucleotide binding protein Gi that amplifies ATP-mediated arachidonic acid release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6477-80
- Felder CC. 1995. Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J* 9:619-25
- Fenster CP, Whitworth TL, Sheffield EB, Quick MW, Lester RA. 1999. Upregulation of surface alpha4beta2 nicotinic receptors is initiated by receptor desensitization after chronic exposure to nicotine. *J Neurosci* 19:4804-14
- Fernandez-Busnadiego R, Zuber B, Maurer UE, Cyrklaff M, Baumeister W, Lucic V. 2010. Quantitative analysis of the native presynaptic cytomatrix by cryoelectron tomography. *J Cell Biol* 188:145-56
- Fernandez S, Knopf MA, McGillis JP. 2000. Calcitonin-gene related peptide (CGRP) inhibits interleukin-7-induced pre-B cell colony formation. *J Leukoc Biol* 67:669-76
- Fisahn A, Yamada M, Duttaroy A, Gan JW, Deng CX, et al. 2002. Muscarinic induction of hippocampal gamma oscillations requires coupling of the M1 receptor to two mixed cation currents. *Neuron* 33 (4):615-24
- Frahm S, Slimak MA, Ferrarese L, Santos-Torres J, Antolin-Fontes B, et al. 2011. Aversion to Nicotine Is Regulated by the Balanced Activity of beta4 and alpha5 Nicotinic Receptor Subunits in the Medial Habenula. *Neuron* 70:522-35
- Fujii T, Tsuchiya T, Yamada S, Fujimoto K, Suzuki T, et al. 1996. Localization and synthesis of acetylcholine in human leukemic T cell lines. *J Neurosci Res* 44:66-72
- Fujii T, Yamada S, Watanabe Y, Misawa H, Tajima S, et al. 1998. Induction of choline acetyltransferase mRNA in human mononuclear leukocytes stimulated by phytohemagglutinin, a T-cell activator. *J Neuroimmunol* 82:101-7
- Furchgott RF, Zawadzki JV. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-6
- Galzi JL, Changeux JP. 1995. Neuronal nicotinic receptors: molecular organization and regulations. *Neuropharmacology* 34:563-82
- Galzi JL, Edelstein SJ, Changeux J. 1996. The multiple phenotypes of allosteric receptor mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1853-8
- Garcia-Pascual A, Labadia A, Triguero D, Costa G. 1996. Local regulation of oviductal blood flow. *Gen Pharmacol* 27:1303-10
- Georgiou AS, Sostaric E, Wong CH, Snijders AP, Wright PC, et al. 2005. Gametes alter the oviductal secretory proteome. *Mol Cell Proteomics* 4:1785-96
- Georgiou AS, Snijders AP, Sostaric E, Aflatoonian R, Vazquez JL, et al. 2007. Modulation of the oviductal environment by gametes. *J Proteome Res* 6:4656-66

- Gieseke C, Talbot P. 2005. Cigarette smoke inhibits hamster oocyte pickup by increasing adhesion between the oocyte cumulus complex and oviductal cilia. *Biol Reprod* 73:443-51
- Goldberg JM, Friedman CI. 1995. Effect of hormonal manipulation on human fallopian tubal epithelium in vitro. *J Assist Reprod Genet* 12:132-5
- Gomez J, Wess J. 2008. Isolation, sequence and functional expression of mouse muscarinic acetylcholine receptor genes. genbank
- Gorboulev V, Ulzheimer JC, Akhoundova A, Ulzheimer-Teuber I, Karbach U, et al. 1997. Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol* 16:871-81
- Grando SA, Crosby AM, Zelickson BD, Dahl MV. 1993. Agarose gel keratinocyte outgrowth system as a model of skin re-epithelization: requirement of endogenous acetylcholine for outgrowth initiation. *J Invest Dermatol* 101:804-10
- Grando SA. 1997. Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2:41-8
- Gualtieri R, Talevi R. 2003. Selection of highly fertilization-competent bovine spermatozoa through adhesion to the Fallopian tube epithelium in vitro. *Reproduction* 125:251-8
- Haberberger RV, Pfeil U, Lips KS, Kummer W. 2002. Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the neuronal and non-neuronal cholinergic system of human and rat skin. *J Invest Dermatol* 119:943-8
- Haga T, Noda H. 1973. Choline uptake systems of rat brain synaptosomes. *Biochim Biophys Acta* 291:564-75
- Halbert SA, Tam PY, Blandau RJ. 1976. Egg transport in the rabbit oviduct: the role of cilia and muscle. *Science* 191 (4231):1052-3
- Hall JM, Caulfield MP, Watson SP, Guard S. 1993. Receptor subtypes or species homologues: relevance to drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 14:376-83
- Happola O, Lakomy M, Majewski M, Yanaihara N. 1991. Distribution of somatostatin- and neuropeptide Y-immunoreactive nerve fibers in the porcine female reproductive system. *Neurosci Lett* 122:273-6
- Harper MJ. 1973. Relationship between sperm transport and penetration of eggs in the rabbit oviduct. *Biol Reprod* 8:441-50
- Hecker A, Mikulski Z, Lips KS, Pfeil U, Zakrzewicz A, et al. 2009. Pivotal Advance: Up-regulation of acetylcholine synthesis and paracrine cholinergic signaling in intravascular transplant leukocytes during rejection of rat renal allografts. *J Leukoc Biol* 86:13-22
- Heilman R, Reo R. 1977. A characterization of the effects of acetylcholine on the rabbit oviduct. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie* 226:246
- Hokfelt T, Kellerth JO, Nilsson G, Pernow B. 1975. Experimental immunohistochemical studies on the localization and distribution of substance P in cat primary sensory neurons. *Brain Res* 100:235-52
- Holton P. 1949. Noradrenaline in adrenal medullary tumours. *Nature* 163:217
- Hourcade JD, Perez-Crespo M, Fernandez-Gonzalez R, Pintado B, Gutierrez-Adan A. 2010. Selection against spermatozoa with fragmented DNA after postovulatory mating depends on the type of damage. *Reprod Biol Endocrinol* 8:9
- Hulme EC, Birdsall NJ, Buckley NJ. 1990. Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30:633-73

- Hunter RH. 1973. Polyspermic fertilization in pigs after tubal deposition of excessive numbers of spermatozoa. *J Exp Zool* 183:57-63
- Hunter RH, Nichol R. 1983. Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus. *J Exp Zool* 228:121-8
- Hunter RH, Nichol R. 1988. Capacitation potential of the fallopian tube: a study involving surgical insemination and the subsequent incidence of polyspermy. *Gamete Res* 21:255-66
- Inoue R, Waniishi Y, Yamada K, Ito Y. 1994. A possible role of tyrosine kinases in the regulation of muscarinic receptor-activated cation channels in guinea-pig ileum. *Biochemical and biophysical research communications* 203:1392-7
- Israel M, Morel N, Lesbats B, Birman S, Manaranche R. 1986. Purification of a presynaptic membrane protein that mediates a calcium-dependent translocation of acetylcholine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:9226-30
- Itoh N, Obata K, Yanaihara N, Okamoto H. 1983. Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. *Nature* 304:547-9
- Jackson MB. 1989. Perfection of a synaptic receptor: kinetics and energetics of the acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2199-203
- Jankovic S, Protic B, Jankovic S. 2004a. Contractile effect of acetylcholine on isolated isthmus segment of fallopian tubes. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* 26:87-92
- Jankovic SM, Protic BA, Jankovic SV. 2004b. Contractile effect of acetylcholine on isolated ampullar segment of fallopian tubes. *Pharmacological research* 49:31-5
- Johns A, Chlumecky J, Paton DM. 1974. Letter: Role of adrenergic nerves in ovulation and ovum transport. *Lancet* 2:1079
- Johns A, Chlumecky J, Cottle MK, Paton DM. 1975. Effect of chemical sympathectomy and adrenergic agonists on the fertility of mice. *Contraception* 11:563-70
- Jositsch G, Papadakis T, Haberberger RV, Wolff M, Wess J, Kummer W. 2009. Suitability of muscarinic acetylcholine receptor antibodies for immunohistochemistry evaluated on tissue sections of receptor gene-deficient mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379:389-95
- Karlin A, Holtzman E, Yodanis C, Lobel P, Wall J, Hainfeld J. 1983. The arrangement of the subunits of the acetylcholine receptor of *Torpedo californica*. *J Biol Chem* 258:6678-81
- Karlin A, Akabas MH. 1995. Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron* 15:1231-44
- Katz B, Thesleff S. 1957. A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J Physiol* 138:63-80
- Kawashima K, Fujii T, Watanabe Y, Misawa H. 1998. Acetylcholine synthesis and muscarinic receptor subtype mRNA expression in T-lymphocytes. *Life Sci* 62:1701-5
- Kawashima K, Fujii T. 2000. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther* 86:29-48
- Khakh BS, Fisher JA, Nashmi R, Bowser DN, Lester HA. 2005. An angstrom scale interaction between plasma membrane ATP-gated P2X2 and alpha4beta2 nicotinic channels measured with fluorescence resonance energy transfer and total internal reflection fluorescence microscopy. *J Neurosci* 25:6911-20

- Kim TW, Koh SD, Ordog T, Ward SM, Sanders KM. 2003. Muscarinic regulation of pacemaker frequency in murine gastric interstitial cells of Cajal. *J Physiol* 546:415-25
- Klapproth H, Reinheimer T, Metzen J, Munch M, Bittinger F, et al. 1997. Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 355:515-23
- Knoll M, Shaoulian R, Magers T, Talbot P. 1995. Ciliary beat frequency of hamster oviducts is decreased in vitro by exposure to solutions of mainstream and sidestream cigarette smoke. *Biol Reprod* 53:29-37
- Koepsell H, Schmitt BM, Gorboulev V. 2003. Organic cation transporters. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 150:36-90
- Koval LM, Yu Lykhmus O, Omelchenko DM, Komisarenko SV, Skok MV. 2009. The role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in B lymphocyte activation. *Ukr Biokhim Zh* 81:5-11
- Koval L, Lykhmus O, Zhmak M, Khruschov A, Tsetlin V, et al. 2011. Differential involvement of alpha4beta2, alpha7 and alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptors in B lymphocyte activation in vitro. *Int J Biochem Cell Biol* 43:516-24
- Krasteva G, Canning BJ, Hartmann P, Veres TZ, Papadakis T, et al. 2011. Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:9478-83
- Kraus V, Gombos A, Dusek N. 1991. [Cholinergic innervation of the oviduct in rabbits]. *Vet Med (Praha)* 36:297-302
- Krop I, De Fougerolles AR, Hardy RR, Allison M, Schlissel MS, Fearon DT. 1996. Self renewal of B 1 lymphocytes is dependent on CD19. *European journal of immunology* 26:238-42
- Kuryatov A, Onksen J, Lindstrom J. 2008. Roles of accessory subunits in alpha4 beta2* nicotinic receptors. *Molecular pharmacology* 74:132
- Kurzen H, Wessler I, Kirkpatrick CJ, Kawashima K, Grando SA. 2007. The non-neuronal cholinergic system of human skin. *Horm Metab Res* 39:125-35
- Lakomy M, Majewski M, Kaleczyc J, Sienkiewicz W. 1994. Peptidergic innervation of the bovine oviduct. *Acta. Med. Vet.* 40:75-85
- Langley JN. 1907. On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of "receptive" substances: Part I. *J Physiol* 36:347-84
- Larocca JN, Almazan G. 1997. Acetylcholine agonists stimulate mitogen activated protein kinase in oligodendrocyte progenitors by muscarinic receptors. *Journal of neuroscience research* 50:743-54
- Lee MK, Cleveland DW. 1996. Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci* 19:187-217
- Lewis G, ed. 2007. *The Confidential Enquiry into Maternal and Child Health (CEMACH). Saving Mothers' Lives: reviewing maternal deaths to make motherhood safer - 2003-2005. The Seventh Report on Confidential Enquiries into Maternal Deaths in the United Kingdom.* London: CEMACH
- Liao SB, Ho JC, Tang F, O WS. 2011. Adrenomedullin increases ciliary beat frequency and decreases muscular contraction in the rat oviduct. *Reproduction* 141:367-72
- Lindblom B, Hamberger L, Wiqvist N. 1978. Differentiated contractile effects of prostaglandins E and F on the isolated circular and longitudinal smooth muscle of the human oviduct. *Fertil Steril* 30:553-9
- Lindblom B, Hamberger L, Ljung B. 1980. Contractile patterns of isolated oviductal smooth muscle under different hormonal conditions. *Fertil Steril* 33:283-7

- Lindstrom J. 2000. The structure of nAChRs. In *Handbook of experimental pharmacology, neuronal nicotinic receptors*, ed. FD Clementi F., Gotti C., pp. 101-62. Berlin: Springer
- Lips KS, Pfeil U, Haberberger RV, Kummer W. 2002. Localisation of the high-affinity choline transporter-1 in the rat skeletal motor unit. *Cell Tissue Res* 307:275-80
- Lips KS, Pfeil U, Reiners K, Rimasch C, Kuchelmeister K, et al. 2003. Expression of the high-affinity choline transporter CHT1 in rat and human arteries. *J Histochem Cytochem* 51:1645-54
- Lips KS, Volk C, Schmitt BM, Pfeil U, Arndt P, et al. 2005. Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33:79-88
- Lips KS, Luhrmann A, Tschernig T, Stoeger T, Alessandrini F, et al. 2007. Down-regulation of the non-neuronal acetylcholine synthesis and release machinery in acute allergic airway inflammation of rat and mouse. *Life Sci* 80:2263-9
- Liu X, Sood S, Liu H, Horner RL. 2005. Opposing muscarinic and nicotinic modulation of hypoglossal motor output to genioglossus muscle in rats in vivo. *J Physiol* 565:965-80
- Luetje CW, Patrick J. 1991. Both alpha- and beta-subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* 11:837-45
- Lukas RJ, Changeux JP, Le Novere N, Albuquerque EX, Balfour DJ, et al. 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, Saridogan E, Djahanbakhch O. 2006. The effect of ovarian follicular fluid and peritoneal fluid on Fallopian tube ciliary beat frequency. *Hum Reprod* 21:52-6
- 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* 13:2991-4
- Majewski M, Sienkiewicz W, Kaleczyc J, Mayer B, Czaja K, Lakomy M. 1995. The distribution and co-localization of immunoreactivity to nitric oxide synthase, vasoactive intestinal polypeptide and substance P within nerve fibres supplying bovine and porcine female genital organs. *Cell Tissue Res* 281:445-64
- Maldonado-Perez D, Evans J, Denison F, Millar RP, Jabbour HN. 2007. Potential roles of the prokineticins in reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 18:66-72
- Mamoon A, Smith J, Baker R, Farley J. 1999. Activation of muscarinic receptors in porcine airway smooth muscle elicits a transient increase in phospholipase D activity. *Journal of biomedical science* 6:97-105
- Mayerhofer A, Dimitrijevic N, Kunz L. 2003. The expression and biological role of the non-neuronal cholinergic system in the ovary. *Life Sci* 72:2039-45
- McCann MF, Irwin DE, Walton LA, Hulka BS, Morton JL, Axelrad CM. 1992. Nicotine and cotinine in the cervical mucus of smokers, passive smokers, and nonsmokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1:125-9
- McComb PF, Halbert SA, Gomel V. 1980. Pregnancy, ciliary transport, and the reversed ampullary segment of the rabbit fallopian tube. *Fertil Steril* 34:386-90
- McComb P, Langley L, Villalon M, Verdugo P. 1986. The oviductal cilia and Kartagener's syndrome. *Fertil Steril* 46:412-6
- McGehee DS, Role LW. 1995. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu Rev Physiol* 57:521-46

- McGillis JP, Rangnekar V, Ciallella JR. 1995. A role for calcitonin gene related peptide (CGRP) in the regulation of early B lymphocyte differentiation. *Can J Physiol Pharmacol* 73:1057-64
- McIntosh JM, Santos AD, Olivera BM. 1999. Conus peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Annu Rev Biochem* 68:59-88
- McLachlan JA, Dames NM, Sieber SM, Fabro S. 1976. Accumulation of nicotine in the uterine fluid of the six-day pregnant rabbit. *Fertil Steril* 27:1204-13
- McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, et al. 1998. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393:333-9
- Meiri U, Meiri H, Marshall JM. 1978. Effects of ovarian steroids on spontaneous and nerve-induced electrical activity of the oviduct and its attached membranes in the rabbit. *Biol Reprod* 19:183-93
- Metzen J, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Kilbinger H, Wessler I. 2003. Proliferative effect of acetylcholine on rat trachea epithelial cells is mediated by nicotinic receptors and muscarinic receptors of the M1-subtype. *Life Sci* 72:2075-80
- Michel MC, Beck-Sickinger A, Cox H, Doods HN, Herzog H, et al. 1998. XVI. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol Rev* 50:143-50
- Mikulski Z, Hartmann P, Jositsch G, Zaslona Z, Lips KS, et al. 2010. Nicotinic receptors on rat alveolar macrophages dampen ATP-induced increase in cytosolic calcium concentration. *Respir Res* 11:133
- Millar N. 2003. Assembly and subunit diversity of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Society Transactions* 31:869-74
- Mintz CD, Bloom SR, Polak JM, Dixon JE. 1984. Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:4577-81
- Mishina M, Takai T, Imoto K, Noda M, Takahashi T, et al. 1986. Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 321:406-11
- Mitchell JA, Hammer RE. 1985. Effects of nicotine on oviducal blood flow and embryo development in the rat. *J Reprod Fertil* 74:71-6
- Miwa JM, Ibaez-Tallon I, Crabtree GW, Sánchez R. 1999. lynx1, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS. *Neuron* 23:105-14
- Monod J, Wyman J, Changeux JP. 1965. On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J Mol Biol* 12:88-118
- Morel N. 2003. Neurotransmitter release: the dark side of the vacuolar-H+ATPase. *Biol Cell* 95:453-7
- Morita M, Miyamoto H, Sugimoto M, Sugimoto N, Manabe N. 1997a. Alterations in Cell Proliferation and Morphology of Ampullar Epithelium of the Mouse Oviduct during the Estrous Cycle. *J. Reprod. Dev.* 43:235-41
- Morita M, Sugimoto M, Miyamoto H, Manabe N. 1997b. Ultrastructural features of secretion by murine oviductal epithelium. *J. Mamm. Ova Res.* 14:72-8
- Moser N, Mechawar N, Jones I, Gochberg-Sarver A, Orr-Urtreger A, et al. 2007. Evaluating the suitability of nicotinic acetylcholine receptor antibodies for standard immunodetection procedures. *J Neurochem* 102:479-92
- Murcott CA, Carpenter JR. 1977. Inhibition in the rat oviduct mediated by an unidentified transmitter [proceedings]. *Br J Pharmacol* 61:498P

- Nachmansohn D, Machado A. 1943. The formation of acetylcholine. A new enzyme: "Choline acetylase". *Journal of neurophysiology* 6:397
- Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S. 1964. Tyrosine Hydroxylase. The Initial Step in Norepinephrine Biosynthesis. *J Biol Chem* 239:2910-7
- Nawa H, Doteuchi M, Igano K, Inouye K, Nakanishi S. 1984. Substance K: a novel mammalian tachykinin that differs from substance P in its pharmacological profile. *Life Sci* 34:1153-60
- Nelson JF, Felicio LS, Randall PK, Sims C, Finch CE. 1982. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biol Reprod* 27:327-39
- Neri A, Marcus SL. 1972. Effect of nicotine on the motility of the oviducts in the rhesus monkey: a preliminary report. *J Reprod Fertil* 31:91-7
- Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Kikyotani S, et al. 1983. Structural homology of Torpedo californica acetylcholine receptor subunits. *Nature* 302:528-32
- Noreikat K. 2009. *Morphologische Charakterisierung und ex vivo Funktionsuntersuchungen zum Einfluss des cholinergen Systems auf den ziliären Transport im Eileiter der Maus*. Justus-Liebig Universität Giessen, Giessen
- Norel X, Angrisani M, Labat C, Gorenne I, Dulmet E, et al. 1993. Degradation of acetylcholine in human airways: role of butyrylcholinesterase. *Br J Pharmacol* 108:914-9
- Novak E, Everett HS. 1928. Cyclical and other variations in the tubal epithelium. *Am J Obstet Gynecol* 16:499-505
- Odor DL, Blandau RJ. 1973. EGG transport over the fimbrial surface of the rabbit oviduct under experimental conditions. *Fertil Steril* 24:292-300
- Okuda T, Haga T. 2000. Functional characterization of the human high-affinity choline transporter. *FEBS Lett* 484:92-7
- Oliphant G, ed. 1986. *Biochemistry and immunology of oviductal fluid*: Mount Kisco, NY: Futura Publishing Company. pp. 129-45 pp.
- Ortells MO, Lunt GG. 1995. Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci* 18:121-7
- Ortiz ME, Bedregal P, Carvajal MI, Croxatto HB. 1986. Fertilized and unfertilized ova are transported at different rates by the hamster oviduct. *Biol Reprod* 34:777-81
- Ortiz ME, Lladós C, Croxatto HB. 1989. Embryos of different ages transferred to the rat oviduct enter the uterus at different times. *Biol Reprod* 41:381-4
- Ostopovici L, Rad R, Mracec M. 2007. The Building, Refining and Validation of 3D Structure of the Muscarinic M3 Receptor Obtained by Homology Modelling. *REVISTA DE CHIMIE-BUCHAREST-ORIGINAL EDITION*- 58:273
- Owman C, Sjöberg NO. 1966. Adrenergic nerves in the female genital tract of the rabbit. With remarks on cholinesterase-containing structures. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 74:182-97
- Owman C, Stjernquist M. 1988. Male and female reproductive system. In *Handbook of chemical Neuroanatomy*, ed. A Björklund, Hökfelt T and Owman C., pp. 469-544: Elsevier sciences Publishers B.V.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, et al. 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289:739-45

- Paltieli Y, Eibschitz I, Ziskind G, Ohel G, Silbermann M, Weichselbaum A. 2000. High progesterone levels and ciliary dysfunction--a possible cause of ectopic pregnancy. *J Assist Reprod Genet* 17:103-6
- Papka RE, Cotton JP, Traurig HH. 1985. Comparative distribution of neuropeptide tyrosine-, vasoactive intestinal polypeptide-, substance P-immunoreactive, acetylcholinesterase-positive and noradrenergic nerves in the reproductive tract of the female rat. *Cell Tissue Res* 242:475-90
- Papke RL, Sanberg PR, Shytle RD. 2001. Analysis of mecamylamine stereoisomers on human nicotinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 297:646-56
- Parker EM, Kameyama K, Higashijima T, Ross EM. 1991. Reconstitutively active G protein-coupled receptors purified from baculovirus-infected insect cells. *Journal of Biological Chemistry* 266:519
- Parnavelas JG, Kelly W, Burnstock G. 1985. Ultrastructural localization of choline acetyltransferase in vascular endothelial cells in rat brain. *Nature* 316:724-5
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. 1989a. Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol Reprod* 41:683-99
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM, First NL. 1989b. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol Reprod* 40:1020-5
- Peng JY, Vaidehi N, Hall SE, Goddard WA, 3rd. 2006. The predicted 3D structures of the human M1 muscarinic acetylcholine receptor with agonist or antagonist bound. *ChemMedChem* 1:878-90
- 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* 28:473-7
- Phillips WD, Maimone MM, Merlie JP. 1991. Mutagenesis of the 43-kD postsynaptic protein defines domains involved in plasma membrane targeting and AChR clustering. *J Cell Biol* 115:1713-23
- Pollard JW, Plante C, King WA, Hansen PJ, Betteridge KJ, Suarez SS. 1991. Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding of oviductal epithelial cells. *Biol Reprod* 44:102-7
- Popescu LM, Ciontea SM, Cretoiu D, Hinescu ME, Radu E, et al. 2005. Novel type of interstitial cell (Cajal-like) in human fallopian tube. *J Cell Mol Med* 9:479-523
- Popescu LM, Ciontea SM, Cretoiu D. 2007. Interstitial Cajal-like cells in human uterus and fallopian tube. *Ann N Y Acad Sci* 1101:139-65
- Pradidarcheep W, Stallen J, Labruyere WT, Dabhoiwala NF, Michel MC, Lamers WH. 2009. Lack of specificity of commercially available antisera against muscarinic and adrenergic receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379:397-402
- Rafferty MA, Hunkapiller MW, Strader CD, Hood LE. 1980. Acetylcholine receptor: complex of homologous subunits. *Science* 208:1454-6
- Rajkumar K, Sharma P. 1981. Effect of ovulation on the response of the rabbit oviduct to acetylcholine in vitro. *International journal of fertility* 26:57
- Rama Sastry BV, Olubadewo J, Harbison RD, Schmidt DE. 1976. Human placental cholinergic system. Occurrence, distribution and variation with gestational age of acetylcholine in human placenta. *Biochem Pharmacol* 25:425-31
- Rama Sastry BV, Sadavongvivad C. 1979. Cholinergic systems in non-nervous tissues. *pharm rev* 30:65-132

- Ramirez-Latorre J, Yu CR, Qu X, Perin F, Karlin A, Role L. 1996. Functional contributions of alpha5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature* 380:347-51
- Razani-Boroujerdi S, Boyd RT, Davila-Garcia MI, Nandi JS, Mishra NC, et al. 2007. T cells express alpha7-nicotinic acetylcholine receptor subunits that require a functional TCR and leukocyte-specific protein tyrosine kinase for nicotine-induced Ca²⁺ response. *J Immunol* 179:2889-98
- Reinecke M, Gauwerky JF, Schneider K. 1989. [Peptidergic (NPY, NT, VIP, SP, CGRP) innervation of the functional systems of the uterus and fallopian tube in the human]. *Arch Gynecol Obstet* 245:399-401
- Reinheimer T, Bernedo P, Klapproth H, Oelert H, Zeiske B, et al. 1996. Acetylcholine in isolated airways of rat, guinea pig, and human: species differences in role of airway mucosa. *Am J Physiol* 270:L722-8
- Ribeiro FM, Alves-Silva J, Volkandt W, Martins-Silva C, Mahmud H, et al. 2003. The hemicholinium-3 sensitive high affinity choline transporter is internalized by clathrin-mediated endocytosis and is present in endosomes and synaptic vesicles. *Journal of Neurochemistry* 87:136-46
- Riveles K, Roza R, Arey J, Talbot P. 2004. Pyrazine derivatives in cigarette smoke inhibit hamster oviductal functioning. *Reprod Biol Endocrinol* 2:23
- Riveles K, Roza R, Talbot P. 2005. Phenols, quinolines, indoles, benzene, and 2-cyclopenten-1-ones are oviductal toxicants in cigarette smoke. *Toxicol Sci* 86:141-51
- Riveles K, Tran V, Roza R, Kwan D, Talbot P. 2007. Smoke from traditional commercial, harm reduction and research brand cigarettes impairs oviductal functioning in hamsters (*Mesocricetus auratus*) in vitro. *Hum Reprod* 22:346-55
- Rode J, Dhillon AP, Doran JF, Jackson P, Thompson RJ. 1985. PGP 9.5, a new marker for human neuroendocrine tumours. *Histopathology* 9:147-58
- Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, et al. 1983. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* 304:129-35
- Rossier J. 1977. Acetyl-coenzyme A and coenzyme A analogues. Their effects on rat brain choline acetyltransferase. *Biochem J* 165:321-6
- Samuelson UE, Dalsgaard CJ, Lundberg JM, Hokfelt T. 1985. Calcitonin gene-related peptide inhibits spontaneous contractions in human uterus and fallopian tube. *Neurosci Lett* 62:225-30
- Samuelson UE, Sjostrand NO. 1986. Myogenic and neurogenic control of electrical and mechanical activity in human oviductal smooth muscle. *Acta Physiol Scand* 126:355-63
- Sandberg F, Ingelman Sundberg A, Lindgren L, Ryden G. 1960. In vitro studies of the motility of the human fallopian tube. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 39:506-16
- Schertler GF, Villa C, Henderson R. 1993. Projection structure of rhodopsin. *Nature* 362:770-2
- Schlomer JJ, Storey BB, Ciornei RT, McGillis JP. 2007. Calcitonin gene-related peptide inhibits early B cell development in vivo. *J Leukoc Biol* 81:802-8
- Schmidt M, Voss M, Weernink PA, Wetzel J, Amano M, et al. 1999. A role for rho-kinase in rho-controlled phospholipase D stimulation by the m3 muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 274:14648-54

- Sealock R, Wray BE, Froehner SC. 1984. Ultrastructural localization of the Mr 43,000 protein and the acetylcholine receptor in Torpedo postsynaptic membranes using monoclonal antibodies. *J Cell Biol* 98:2239-44
- Shaw JL, Oliver E, Lee KF, Entrican G, Jabbour HN, et al. 2010. Cotinine exposure increases Fallopian tube PROKR1 expression via nicotinic AChR α -7: a potential mechanism explaining the link between smoking and tubal ectopic pregnancy. *Am J Pathol* 177:2509-15
- Silva AP, Cavadas C, Grouzmann E. 2002. Neuropeptide Y and its receptors as potential therapeutic drug targets. *Clin Chim Acta* 326:3-25
- Skok M, Grailhe R, Changeux JP. 2005. Nicotinic receptors regulate B lymphocyte activation and immune response. *Eur J Pharmacol* 517:246-51
- Skok MV, Kalashnik EN, Koval LN, Tsetlin VI, Utkin YN, et al. 2003. Functional nicotinic acetylcholine receptors are expressed in B lymphocyte-derived cell lines. *Mol Pharmacol* 64:885-9
- Skok MV, Grailhe R, Agenes F, Changeux JP. 2007. The role of nicotinic receptors in B-lymphocyte development and activation. *Life Sci* 80:2334-6
- Skok MV. 2009. Editorial: To channel or not to channel? Functioning of nicotinic acetylcholine receptors in leukocytes. *J Leukoc Biol* 86:1-3
- Small RC, Good DM, Dixon JS, Kennedy I. 1990. The effects of epithelium removal on the actions of cholinomimetic drugs in opened segments and perfused tubular preparations of guinea-pig trachea. *Br J Pharmacol* 100:516-22
- Smith TT, Yanagimachi R. 1990. The viability of hamster spermatozoa stored in the isthmus of the oviduct: the importance of sperm-epithelium contact for sperm survival. *Biol Reprod* 42:450-7
- Smith TT, Yanagimachi R. 1991. Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *J Reprod Fertil* 91:567-73
- Smrcka AV, Hepler JR, Brown KO, Sternweis PC. 1991. Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science* 251:804-7
- Song P, Sekhon HS, Jia Y, Keller JA, Blusztajn JK, et al. 2003a. Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 63:214-21
- Song P, Sekhon HS, Proskocil B, Blusztajn JK, Mark GP, Spindel ER. 2003b. Synthesis of acetylcholine by lung cancer. *Life Sci* 72:2159-68
- Sostaric E, Dieleman SJ, van de Lest CHA, Colenbrander B, Vos PLAM, et al. 2008. Sperm binding properties and secretory activity of the bovine oviduct immediately before and after ovulation. *Molecular Reproduction and Development* 75:60-74
- Sporrong B, Helm G, Owman C, Sjoberg NO, Walles B. 1982. Electron microscopic and pharmacologic evidence for a functional adrenergic innervation of the smooth musculature in the human fallopian tube. *Brain Res Bull* 9:695-9
- Stauss CR, Votta TJ, Suarez SS. 1995. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biol Reprod* 53:1280-5
- 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)* 211:685-90
- Steinhauer 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* 39:110-9

- Struckmann N, Schwering S, Wiegand S, Gschnell A, Yamada M, et al. 2003. Role of muscarinic receptor subtypes in the constriction of peripheral airways: studies on receptor-deficient mice. *Mol Pharmacol* 64:1444-51
- Suarez S, Redfern K, Raynor P, Martin F, Phillips DM. 1991. Attachment of boar sperm to mucosal explants of oviduct in vitro: possible role in formation of a sperm reservoir. *Biol Reprod* 44:998-1004
- Suarez SS. 1987. Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observations in situ. *Biol Reprod* 36:203-10
- Takai T, Noda M, Mishina M, Shimizu S, Furutani Y, et al. 1985. Cloning, sequencing and expression of cDNA for a novel subunit of acetylcholine receptor from calf muscle. *Nature* 315:761-4
- Takats Z, Wiseman JM, Gologan B, Cooks RG. 2004. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science* 306:471-3
- Takats Z, Wiseman JM, Cooks RG. 2005. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. *J Mass Spectrom* 40:1261-75
- Talevi R, Gualtieri R. 2001. Sulfated glycoconjugates are powerful modulators of bovine sperm adhesion and release from the oviductal epithelium in vitro. *Biol Reprod* 64:491-8
- Tallini YN, Shui B, Greene KS, Deng KY, Doran R, et al. 2006. BAC transgenic mice express enhanced green fluorescent protein in central and peripheral cholinergic neurons. *Physiol Genomics* 27:391-7
- Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V. 1982. Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 296:659-60
- Tayebati SK, El-Assouad D, Ricci A, Amenta F. 2002. Immunochemical and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. *J Neuroimmunol* 132:147-55
- Taylor P, Brown JH. 2006. Acetylcholine. In *Basic Neurochemistry*, ed. GJ Siegel, Albers R.W., Brady S.T., Price D.L., pp. 185-209. Boston: Elsevier
- Thompson RJ, Doran JF, Jackson P, Dhillon AP, Rode J. 1983. PGP 9.5--a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. *Brain Res* 278:224-8
- Tucek S. 1982. The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. *J Physiol* 322:53-69
- van Koppen CJ, Kaiser B. 2003. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol Ther* 98:197-220
- Vasquez G, Winston RM, Brosens IA. 1983. Tubal mucosa and ectopic pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 90:468-74
- Velasquez LA, Aguilera JG, Croxatto HB. 1995. Possible role of platelet-activating factor in embryonic signaling during oviductal transport in the hamster. *Biol Reprod* 52:1302-6
- Verbitsky M, Rothlin CV, Katz E, Elgoyhen AB. 2000. Mixed nicotinic-muscarinic properties of the alpha9 nicotinic cholinergic receptor. *Neuropharmacology* 39:2515-24
- Verhage HG, Bareither ML, Jaffe RC, Akbar M. 1979. Cyclic changes in ciliation, secretion and cell height of the oviductal epithelium in women. *Am J Anat* 156:505-21
- Vlad M, Walker D, Kennedy RC. 1996. Nuclei number in human embryos co-cultured with human ampullary cells. *Hum Reprod* 11:1678-86

- Von Euler US. 1946. A Specific Sympathomimetic Ergone in Adrenergic Nerve Fibres (Sympathin) and its Relations to Adrenaline and Nor-Adrenaline. *Acta Physiologica Scandinavica* 12:73-97
- Von Euler US, Hamberg U. 1949. 1-Noradrenaline in the suprarenal medulla. *Nature* 163:642
- Wang F, Gerzanich V, Wells GB, Anand R, Peng X, et al. 1996. Assembly of human neuronal nicotinic receptor alpha5 subunits with alpha3, beta2, and beta4 subunits. *J Biol Chem* 271:17656-65
- Wang H, Guo Y, Wang D, Kingsley PJ, Marnett LJ, et al. 2004. Aberrant cannabinoid signaling impairs oviductal transport of embryos. *Nat Med* 10:1074-80
- Wanggren K, Lalitkumar PG, Stavreus-Evers A, Stabi B, Gemzell-Danielsson K. 2006. Prostaglandin E2 and F2alpha receptors in the human Fallopian tube before and after mifepristone treatment. *Mol Hum Reprod* 12:577-85
- Wanggren K, Stavreus-Evers A, Olsson C, Andersson E, Gemzell-Danielsson K. 2008. Regulation of muscular contractions in the human Fallopian tube through prostaglandins and progestagens. *Hum Reprod* 23:2359-68
- Ward SM, Burns AJ, Torihashi S, Sanders KM. 1994. Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *J Physiol* 480 (Pt 1):91-7
- Weiss T, Eckert A. 1989. Cotinine levels in follicular fluid and serum of IVF patients: effect on granulosa-luteal cell function in vitro. *Hum Reprod* 4:482-5
- Wen GY, Chen J. 2004. Scanning electron microscopy of the infundibulum, ampulla, and eggs of mice. *Comp Med* 54:543-8
- Wess J. 1993. Mutational analysis of muscarinic acetylcholine receptors: structural basis of ligand/receptor/G protein interactions. *Life Sci* 53:1447-63
- Wessler I, Halank M, Rasbach J, Kilbinger H. 1986. Presynaptic nicotine receptors mediating a positive feed-back on transmitter release from the rat phrenic nerve. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 334:365-72
- Wessler I. 1989. Control of transmitter release from the motor nerve by presynaptic nicotinic and muscarinic autoreceptors. *Trends Pharmacol Sci* 10:110-4
- 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
- Wessler I, Roth E, Schwarze S, Weikel W, Bittinger F, et al. 2001. Release of non-neuronal acetylcholine from the human placenta: difference to neuronal acetylcholine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 364:205-12
- Wessler IK, Kirkpatrick CJ. 2001. The Non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulm Pharmacol Ther* 14:423-34
- White HL, Wu JC. 1973. Choline and carnitine acetyltransferases of heart. *Biochemistry* 12:841-6
- Whittaker VP, Michaelson IA, Kirkland RJ. 1963. The separation of synaptic vesicles from disrupted nervending particles. *Biochem Pharmacol* 12:300-2
- Wiemer KE, Hoffman DI, Maxson WS, Eager S, Muhlberger B, et al. 1993. Embryonic morphology and rate of implantation of human embryos following co-culture on bovine oviductal epithelial cells. *Hum Reprod* 8:97-101

- Wiemer KE, Cohen J, Tucker MJ, Godke RA. 1998. The application of co-culture in assisted reproduction: 10 years of experience with human embryos. *Hum Reprod* 13 Suppl 4:226-38
- Wiesenfeld-Hallin Z, Hokfelt T, Lundberg JM, Forssmann WG, Reinecke M, et al. 1984. Immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P coexist in sensory neurons to the spinal cord and interact in spinal behavioral responses of the rat. *Neurosci Lett* 52:199-204
- Williams JD, Cooper JR. 1965. Acetylcholine in bovine corneal epithelium. *Biochem Pharmacol* 14:1286-9
- Xiao Y, Meyer EL, Thompson JM, Surin A, Wroblewski J, Kellar KJ. 1998. Rat alpha3/beta4 subtype of neuronal nicotinic acetylcholine receptor stably expressed in a transfected cell line: pharmacology of ligand binding and function. *Mol Pharmacol* 54:322-33
- Yamada M, Miyakawa T, Duttaroy A, Yamanaka A, Moriguchi T, et al. 2001. Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. *Nature* 410 (6825):207-12
- Yanagimachi R, Chang MC. 1963. Sperm Ascent through the Oviduct of the Hamster and Rabbit in Relation to the Time of Ovulation. *J Reprod Fertil* 6:413-20
- Yaniz JL, Lopez-Gatius F, Santolaria P, Mullins KJ. 2000. Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. *Anat Rec* 260:268-78
- Yeung WS, Ho PC, Lau EY, Chan ST. 1992. Improved development of human embryos in vitro by a human oviductal cell co-culture system. *Hum Reprod* 7:1144-9
- Yeung WS, Lau EY, Chan ST, Ho PC. 1996. Coculture with homologous oviductal cells improved the implantation of human embryos--a prospective randomized control trial. *J Assist Reprod Genet* 13:762-7
- Yoshinaga K, Rice C, Krenn J, Pilot RL. 1979. Effects of nicotine on early pregnancy in the rat. *Biol Reprod* 20:294-303
- Zarghooni S, Wunsch J, Bodenbenner M, Bruggmann D, Grando SA, et al. 2007. Expression of muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the mouse urothelium. *Life Sci* 80:2308-13

8. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus 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.

Giessen,

Miriam Wolff

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

Originalarbeiten:

Wolff M, Noreikat K, Ibanez-Tallon I, Lips KS, Kölle S, Kummer W (2012)
Cholinergic receptors in the murine oviduct: inventory and coupling to intracellular calcium concentration.

Life sciences, proceedings of the 3rd international symposium on non-neuronal acetylcholine, 24. - 26. August 2011; LSF-D-11-01002
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2012.03.016>

Wolff M, Noreikat K, Wessler I, Takats Z, Gerbig S, Kotlikoff M, Kölle S, Kummer W (in Vorbereitung)

Innervation and non-neuronal cholinergic system of the murine oviduct.
Histochemistry and Cell Biology

Probst S, Löttsch E, Wolff M, Stubenrauch F, Iftner T (eingereicht)

A recombinant Cottontail rabbit papillomavirus genome for ectopic expression of genes in virus infected cells in vivo.
Journal of virological methodes

Hollenhorst M, Lips K, Wolff M, Wess J, Gerbig S, Takats Z, Kummer W, Fronius M (2012)

Luminal cholinergic signalling in airway lining fluid: a novel mechanism for activating chloride secretion via Ca²⁺ dependent Cl⁻ and K⁺ channels.
British Journal of Pharmacology, 2011-BJP-0929-RP

Noreikat K, Wolff M, Kummer W, Kölle S (2012)

Ciliary Activity in the Oviduct of Cycling, Pregnant and Muscarinic Receptor Knockout Mice
Biology of Reproduction 2012 Feb1, [Epub ahead of print]

Jositsch G, Papadakis T, Haberberger RV, Wolff M, Wess J, Kummer W (2009)

Suitability of muscarinic acetylcholine receptor antibodies for immunohistochemistry evaluated on tissue sections of receptor gene-deficient mice.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2009 Apr; 379(4):389-95

Rafalzik S, Pehl U, Ott D, Strotmann J, Wolff M, Gerstberger R (2008)

Cholinergic signal transduction in the mouse sphenopalatine ganglion
Brain Research 2008 Nov 19; 1241:42-55

Tagungsbeiträge:

Wolff M, Noreikat K, Lips KS, Wess J, Wessler I, Ibanez-Tallon, Kölle S, Kummer W (2011)

The non-neuronal cholinergic system of the murine oviduct. (Vortrag)
Third International Symposium on Non-neuronal Acetylcholine, August 24-26, 2011,
Groningen, Niederlande

Wolff M, Lips KS, Kölle S, Papadakis T, Kummer W (2010)

Involvement of acetylcholine receptors in murine oviductal function. (Poster)
27. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, 29.09.-01.10.2010, Würzburg

Wolff M, Lips KS, Kölle S, Wessler I, Kummer W (2009)

The cholinergic system in the mouse oviduct. (Poster)
Second GGL-Conference on Life sciences, 30.9-1.10 2009, Giessen

Wolff M, Lips KS, Kölle S, Wessler I, Kummer W (2009)

The cholinergic system in the mouse oviduct. (Poster)
Anatomische Gesellschaft-Nederlandse Anatomen Vereniging, Joint Meeting 104th
Annual Meeting of the Anatomische Gesellschaft, 27-30 March 2009, Antwerpen,
Belgien

Wolff M, Lips KS, Kölle S, Wessler I, Kummer W (2009)

The cholinergic system in the mouse oviduct/Das cholinerge System im Eileiter der
Maus. (Poster)
Reproduction in domestic animals, Vol.44, Supp.1, Feb 2009 1-42
42. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, gleichzeitig 34.
Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, 26-27 Februar 2009, Leipzig

Wolff M, Lips KS, Kölle S, Kummer W (2008)

The cholinergic system in the mouse oviduct. (Vortrag)
First GGL-Conference on Life sciences, 30.9-1.10 2008, Giessen

Wolff M, Lips KS, Kölle S, Kummer W (2008)

Muscarinic and nicotinic acetylcholine receptore subtypes in the mouse oviduct.
(Poster)
Anatomische Gesellschaft, 103rd Annual Meeting, 14-17 March 2008, Innsbruck,
Österreich

10. Danksagung

Zuallererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kummer für die Überlassung des Themas und die wirklich außerordentlich gute, immer freundliche, hilfreiche und trotz der großen Arbeitsbelastung engagierte Betreuung danken. Außerdem danke ich unserer Kooperationspartnerin und Hauptantragstellerin Frau Prof. Sabine Kölle und meiner Mitdotorandin Katharina Noreikat für all ihre Unterstützung.

Herrn Prof. Lakes-Harlan danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens und den immer freundlichen Kontakt.

PD Dr. Katrin Lips danke ich für ihre theoretische und praktische Einführung in das Thema und all ihre Anregungen.

Allen Laborkollegen danke ich für ihre Hilfe bei so vielen Dingen und für die gute Zeit die wir zusammen hatten. Im Speziellen danken möchte ich den Folgenden:

Petra Hartmann möchte ich für ihre praktische und auch theoretische Hilfe besonders beim Calcium-Imaging danken. Martin Bodenbenner danke ich dafür, dass er immer bereit war bei kleineren oder größeren Problemen zu helfen. Tamara Papadakis danke ich für ihre Hilfe bei der Immunhistochemie und ganz besonders für ihre Hilfe bei der DAB-basierten-Preembedding-Immunhistochemie. Silke Wiegand danke ich für ihre Hilfe bei der RT-PCR, beim Calcium-Imaging und ganz besonders im Umgang mit SPSS. Ohne sie hätte ich die Tiefen dieses Programms wohl nicht verstanden. Patrizia Berger danke ich für ihre Hilfe bei allen bürokratischen Ding.

Ganz besonders danken möchte ich natürlich auch meinen Mitdotoranden Gitte Jositsch, Sylvia Schirmer, Heike Schlenz, Andrea Grosz und Amir Rafiq für eine gute Zeit, seelisch-moralische, praktische und theoretische Hilfe und auch manchmal Ablenkung. Nicht vergessen werden sollen natürlich auch Gabriela Krasteva und Zbigniew Mikulski.

Zu guter Letzt möchte ich mich natürlich auch noch ganz besonders bei Christian, meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Ich danke euch für eure, in diesem Fall moralische Unterstützung und das ihr immer daran geglaubt habt, dass ich das hinkriege.