

E. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird eine Primärzellkultur von bovinen endometrialen Epithelzellen als Modellsystem für die Untersuchung des Oxytocin-Rezeptor beschrieben und erste Untersuchungen in Bezug auf die Regulation des Oxytocin-Rezeptors durchgeführt.

Endometriale Epithelzellen wurden enzymatisch aus den Uteri kommerziell geschlachteter Rinder isoliert und in Kultur genommen. Die Kultur bestand zu mehr als 90 % aus Epithelzellen, was mittels Immunfluoreszenzfärbung mit gegen Cytokeratin gerichteten Antikörpern festgestellt wurde.

Der Oxytocin-Rezeptor wurde auf der Ebene der Genexpression mittels des RNase-Protection-Assays und auf Proteinebene mittels eines Radiorezeptorassay untersucht. Sowohl auf der Genexpressions- als auch auf der Proteinebene wurde der Oxytocin-Rezeptor spontan aufreguliert und erreichte nach ca. einer Woche in Kultur seinen maximalen Wert. Dabei war die Dichte der gebildeten Rezeptoren unabhängig von der Dichte der Oxytocin-Rezeptoren im Endometrium vor der Zellisolierung.

Die kompetitive Bindung verschiedener Liganden zum Oxytocin-Rezeptor, ermittelt in einem Radiorezeptorassay, legte nahe, daß der Oxytocin-Rezeptor *in vitro* unverändert war. Die Funktionsfähigkeit des Oxytocin-Rezeptors wurde an Hand der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Sekretion mit einem ELISA gemessen. Durch die Zugabe von Oxytocin konnte die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Sekretion gesteigert werden. Die Menge an sezerniertem $\text{PGF}_{2\alpha}$ war abhängig von der Menge an stimulierendem Oxytocin.

Die Steroidhormone Östradiol 17β und Progesteron, die dem Zellkulturmedium für mehrere Tage, einzeln oder in Kombination, darunter auch Progesteron-Entzug, zugesetzt wurden, hatten *in vitro* keinen Einfluß auf die Dichte des Oxytocin-Rezeptors oder auf seine Genexpression, obwohl die mRNA der spezifischen Steroid-Rezeptoren *in vitro* mittels PCR nachgewiesen wurde.

Nur das von der Blastozyste in der frühen Phase der Gravidität produzierte IFN- γ , das *in vivo* die Expression des Oxytocin-Rezeptors hemmt, hatte auch *in vitro* eine hemmende Wirkung sowohl auf die Dichte des Oxytocin-Rezeptors als auch auf die Expression seiner mRNA.

Da die Epithelzellen *in vitro* einen Oxytocin-Rezeptor ausbilden, der funktionsfähig und identisch zu dem Oxytocin-Rezeptor *in vivo* ist, wurde dieses endometriale Zellkultursystem als Modell für die Untersuchung der Oxytocin-Rezeptor Regulation etabliert.

F. Summary

Susanne Horn

Characterization of a bovine endometrial epithelial cell culture as a model system to study oxytocin receptor regulation

In this study primary cell cultures of bovine endometrial epithelial cells were established as a model system to study oxytocin receptor regulation. In addition preliminary experiments to investigate oxytocin receptor regulation have been performed.

Epithelial cells were isolated from the endometrium of cows obtained from the local abattoir by enzymatic digestion and taken into culture. Immunofluorescent staining of the cultured cells showed that they consisted of more than 90 % epithelial cells.

The expression of the oxytocin receptor was investigated at the level of gene expression using an RNase Protection Assay and a radioreceptorassay was used to investigate it at the protein level. Both experimental approaches showed that the receptor was upregulated in culture, reaching a steady state level after about one week. There was no connection between the oxytocin receptor concentration in the cells and their concentration in the original endometrium.

Competition binding studies indicated the receptors were identical with those expressed in the bovine endometrium *in vivo*. The functionality of the oxytocin receptor *in vitro* was shown by stimulation of PGF_{2α}-secretion. After stimulation with oxytocin the cells secreted PGF_{2α} in a dose-dependent manner, as measured by ELISA.

Unlike *in vivo* studies the sex steroids, estradiol and progesterone, applied alone or in combination or in a progesterone withdrawal regime showed no effect either on the expression of the oxytocin receptor gene nor on the density of the receptor. Although the cells have been shown to express the specific steroid receptors.

Only interferon τ , which is produced by the blastocyst during early pregnancy and down-regulates the oxytocin receptor *in vivo*, showed an effect *in vitro*, down-regulating both oxytocin receptor protein and its transcript in the cultured endometrial cells.

Therefore an endometrial cell culture system was established, the epithelial cells expressing a functional oxytocin receptor which is identical with oxytocin receptors *in vivo*.