

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
vertreten in der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
durch das Institut für Biologie der Universität zu Lübeck

Direktor Prof. Dr. Enno Hartmann

**Identifizierung und Charakterisierung von follikulärem
High Density Lipoprotein und Sphingosin 1-Phosphat als
neue Mediatoren der Corpus luteum Entstehung**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -

Vorgelegt von

Steffi Becker

aus Rostock

Lübeck, 2009

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. J. Prestin

I. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. K.U. Kalies

II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. K. Diedrich

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. rer. nat. N. Tautz

Tag der mündlichen Prüfung: 29.07.2009

Zum Druck genehmigt.

Lübeck, den 3.09.2009

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
1. EINLEITUNG	2
1.1. Das Ovar.....	2
1.1.1. Die Physiologie des Ovars.....	2
1.2. Der ovarielle Zyklus.....	3
1.2.1. Die Follikelphase.....	4
1.2.2. Die Lutealphase.....	6
1.2.2.1. Die Ovulation.....	6
1.2.2.2. Das Corpus luteum.....	6
1.3. Die ovarielle Angiogenese.....	8
1.3.1. Faktoren der ovariellen Angiogenese.....	9
1.3.1.1. Der Fibroblastenwachstumsfaktor.....	10
1.3.1.2. Der Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor.....	10
1.4. Bedeutung der Follikelflüssigkeit für den ovariellen Zyklus.....	11
2. ZIELSETZUNG	14
3. ERGEBNISSE	15
3.1. Identifizierung eines angiogenen Faktors der Follikelflüssigkeit am Modell von HUVEC Zellen.....	15
3.1.1. Immunzytochemische Identifizierung von HUVEC Zellen.....	15
3.1.2. Stimulation angiogener Prozesse mit FF.....	16
3.1.2.1. Dosis- und zeitabhängige Stimulation der Proliferation mit nativer FF.....	16
3.1.2.2. Stimulation der Tubulusformation mit nativer FF.....	18
3.1.3. Stimulation der Proliferation und Tubulusformation mit hitzebehandelter FF.....	19
3.1.4. Bedeutung von VEGF ₁₆₅ und bFGF für angiogene Prozesse.....	21
3.1.4.1. Stimulation der Proliferation und Tubulusformation mit rh bFGF.....	22
3.1.4.2. Stimulation der Proliferation und Tubulusformation mit rh VEGF ₁₆₅	23
3.1.4.3. Ausschluß synergistischer Effekte von rh VEGF ₁₆₅ und rh bFGF.....	25
3.1.4.4. Stimulation der Proliferation und Tubulusformation mit FF nach Immunodepletion von bFGF und VEGF.....	26
3.1.5. Identifizierung und Charakterisierung von FHDL als Mito- und Angiogen hitzebehandelter FF.....	28
3.1.5.1. Identifizierung eines proteinreichen Pools als Mitogen hitzebehandelter FF	28

3.1.5.2. Identifizierung von Apolipoprotein A-I und A-IV als Bestandteile des mitogenen Pools	29
3.1.5.3. Stimulation der Proliferation und Tubulusformation mit FHDL.....	29
3.1.6. Charakterisierung der mitogenen Aktivität von FHDL.....	31
3.1.6.1. Cholesterolreiches α -HDL als mitogene Fraktion von FHDL	31
3.1.6.2. Stimulation der Proliferation und Tubulusformation mit hitzebehandeltem FHDL	31
3.1.6.3. Identifizierung der Lipidfraktion als Mitogen von FHDL	33
3.1.6.4. Quantifizierung von Sphingosin 1-Phosphat in FF und FHDL.....	34
3.1.6.5. Inaktivierung von FHDL mit Alkalischer Phosphatase.....	34
3.1.7. Stimulation der Proliferation und Tubulusformation mit S1P	35
3.1.7.1. Inaktivierung von S1P mit Alkalischer Phosphatase.....	36
3.1.8. Untersuchungen zur Signaltransduktion.....	38
3.1.8.1. Beteiligung der PI3-Kinase, Proteinkinase C und ERK an der FF-, FHDL- und S1P-stimulierten Proliferation	38
3.1.8.2. Nachweis von Proteinphosphorylierungen involvierter Kinasen	39
3.2. Untersuchungen zur Migration und Progesteronsynthese humaner Granulosaluteinzellen	43
3.2.1. Zellkultur von humanen, primären Granulosaluteinzellen	43
3.2.2. Stimulation der Migration mit FF.....	44
3.2.2.1. Stimulation der Migration mit hitzebehandelter FF	45
3.2.3. Stimulation der Migration mit FHDL.....	46
3.2.4. Stimulation der Migration mit hitzebehandeltem FHDL	47
3.2.5. Stimulation der Migration mit S1P.....	48
3.2.5.1. Stimulation der Migration mit hitze- und AK-behandeltem S1P	49
3.2.6. Expression von S1P-Rezeptoren in Granulosaluteinzellen	50
3.2.7. Rezeptoridentität der FHDL- und S1P-stimulierten Migration.....	51
3.2.7.1. S1PR 3 als migrationsfördernder Rezeptor der FHDL- stimulierten Migration	51
3.2.7.2. S1PR 3 als migrationsfördernder Rezeptor der S1P-stimulierten Migration .	53
3.2.8. Untersuchungen zur Signaltransduktion.....	55
3.2.8.1. Beteiligung der AKT-Kinase und ERK1/2 an der FF-stimulierten Migration	55
3.2.8.2. Beteiligung der AKT-Kinase und ERK an der FHDL- stimulierten Migration	58

3.2.8.3. Beteiligung der AKT-Kinase und ERK an der S1P-stimulierten Migration..	59
3.2.9. Stimulation der Proliferation mit FF	61
3.2.10. Untersuchungen zur Aktinpolymerisierung.....	62
3.2.10.1. Stimulation der Aktinpolymerisierung mit FHDL	62
3.2.10.2. Stimulation der Aktinpolymerisierung mit S1P	64
3.2.11. Beteiligung von Rho-GTPasen an der FHDL- und S1P-stimulierten Migration	65
3.2.11.1. Beteiligung von RAC und CDC42 an der FHDL-stimulierten Migration ...	66
3.2.11.2. Beteiligung von RAC und CDC42 an der S1P-stimulierten Migration	67
3.2.12. Untersuchungen zur Progesteronsynthese	68
3.2.12.1. Stimulation der Progesteronsynthese mit FHDL.....	68
3.2.12.2. Einfluß der SRB-I Rezeptor-vermittelten Cholesterolesteraufnahme	70
3.2.12.3. Einfluß von S1P auf die Progesteronsynthese.....	71
4. DISKUSSION	72
4.1. FHDL und S1P sind Mediatoren der ovariellen Angiogenese	72
4.2. FHDL und S1P stimulieren die Migration von Granulosaluteinzellen	79
4.3. FHDL stimuliert die Progesteronsynthese von Granulosaluteinzellen	84
4.4. FHDL und S1P in der Reproduktionsmedizin.....	87
5. MATERIAL UND METHODEN.....	90
5.1. Materialien.....	90
5.1.1. Geräte.....	90
5.1.2. Chemikalien.....	90
5.1.3. Biologisches Material	91
5.1.3.1. Patientenkollektiv	91
5.1.3.2. Zelllinien.....	92
5.1.4. Zellkulturzubehör	92
5.1.5. Reagenzien.....	93
5.1.6. Fertigkits und ELISA-Zubehör.....	94
5.1.7. Allgemeine Labormaterialien	94
5.1.8. Antikörper.....	95
5.1.8.1 Primärantikörper	95
5.1.8.2. Sekundärantikörper.....	96
5.1.9. Primer	96
5.1.10. Puffer und Lösungen	96
5.2. Methoden	97

5.2.1. Zellbiologische Methoden	97
5.2.1.1. Isolierung von humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen	97
5.2.1.2. Isolierung von Follikelflüssigkeit und humanen Granulosaluteinzellen	98
5.2.1.3. Kultivierung von HGL5-Zellen	98
5.2.1.4. Subkultivierung von Zellen	98
5.2.1.5. Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauerzählkammer	99
5.2.1.6. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	99
5.2.1.7. MTT-Test zur Bestimmung der Zellproliferation	100
5.2.1.8. Untersuchungen zur Tubulusformation mit Matrigel TM	100
5.2.1.9. Migration von Granulosaluteinzellen	101
5.2.1.10. Zellkultur zur Untersuchung von Proteinphosphorylierungen	102
5.2.2. Proteinbiochemischen Methoden	102
5.2.2.1. Immunzytochemische Identifizierung von HUVEC Zellen	102
5.2.2.2. Quantifizierung von VEGF ₁₆₅ und bFGF in FF	103
5.2.2.3. Immunodepletion von VEGF ₁₆₅ und bFGF in FF	104
5.2.2.4. Progesteron ELISA	104
5.2.2.5. Zellyse und Proteinisolierung	105
5.2.2.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	106
5.2.2.7. Probenvorbereitung	107
5.2.2.8. Western Blot	107
5.2.2.9. NBD Phalloidin Färbung von polymerisierten Aktinfilamenten	109
5.2.3. Herstellen einer Sphingosin 1-Phosphat Lösung	110
5.2.4. Quantifizierung der Proteinkonzentration	111
5.2.5. Biochemische Modifikationen	111
5.2.5.1. Gelfiltration	111
5.2.5.2. Hitzebehandlung	111
5.2.5.3. Behandlung mit Alkalischer Phosphatase	112
5.2.5.4. Behandlung mit Aktivkohle	112
5.2.6. Molekularbiologische Methoden	112
5.2.6.1. RNA-Isolierung	112
5.2.6.2. Quantifizierung der RNA-Konzentration	113
5.2.6.3. DNase-Behandlung	113
5.2.6.4. Reverse Transkription (cDNA Synthese)	114
5.2.6.5. PCR zum Nachweis der Genexpression von S1P-Rezeptoren	114

5.2.6.6. Agarosegelelektrophorese	116
5.2.7. Statistik	116
6. LITERATURVERZEICHNIS	117
7. ANHANG	141
7.1. Abkürzungsverzeichnis	141
7.2. Quellenverzeichnis	141
Danksagung	143
Lebenslauf	144
Publikationen, Drittmittel	146

Zusammenfassung

Die Entstehung eines intakten Corpus luteum ist für eine erfolgreiche Schwangerschaft und damit für die weibliche Reproduktion essentiell. Darin eingebunden sind die Angiogenese von Endothelzellen sowie die Migration und Progesteronsynthese von Granulosaluteinzellen. Diese Prozesse werden von hypothalamo-hypophysär sekretierten Gonadotropinen und lokalen, ovariellen Faktoren reguliert.

Follikuläres HDL (FHDL), 1985 als einzige Lipoproteinklasse in präovulatorischer Follikelflüssigkeit beschrieben, wurde in der vorliegenden Arbeit durch Untersuchungen zur Proliferation und Tubulusformation am Modell von HUVEC Zellen als neues ovarielles Angiogen identifiziert und charakterisiert. Das FHDL-assoziierte Lysosphingolipid Sphingosin 1-Phosphat ist wesentlich an den angiogenen Effekten von FHDL beteiligt und wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals in Follikelflüssigkeit und FHDL nachgewiesen. FHDL und Sphingosin 1-Phosphat stimulieren die Proliferation und Tubulusformation von HUVEC Zellen in den Konzentrationen, die in Follikelflüssigkeit gemessen wurden und induzieren die PI3-Kinase-abhängigen Signalwege AKT-Kinase/ERK/PKC, die im Zusammenhang mit plasmatischem HDL eingehend dokumentiert sind.

FHDL und Sphingosin 1-Phosphat stimulieren die Migration von primären, humanen Granulosalutein- und HGL5-Zellen über den S1P-Rezeptor 3. Die Signaltransduktionswege der FHDL- und S1P-induzierten Migration konnten nicht eindeutig geklärt werden. Inhibitorstudien weisen jedoch auf eine AKT-Kinase/ERK-unabhängige Beteiligung der Rho-GTPasen RAC und CDC42 hin. Abschließende Untersuchungen zur Progesteronsynthese bestätigten die Bedeutung von FHDL für die Funktionalität des Corpus luteum. FHDL stimuliert zeit- und dosisabhängig die Progesteronsynthese von primären Granulosalutein- und HGL5-Zellen. Dieser Effekt ist vermutlich unabhängig von der selektiven, SRB-I-vermittelten Aufnahme von Cholesterolestern.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind für das Verständnis der Regulation der humanen Lutealfunktion von Bedeutung, eröffnen neue potentielle Therapieansätze zur Behandlung der weiblichen Infertilität und können zur Verbesserung von Methoden der assistierten Reproduktion durch die Modulation des ovariellen Lipidmetabolismus beitragen.

1. Einleitung

In Deutschland sind ca. 15 % der Paare ungewollt kinderlos (infertil). Infertilität bedeutet nach den Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (WHO), daß eine Schwangerschaft trotz regelmäßigen, ungeschützten Geschlechtsverkehrs nach 24 Monaten nicht eingetreten ist. Die meist multifaktoriellen Ursachen für Infertilität reichen von genetischen Faktoren über Fehlbildungen bis hin zu endokrinologischen Störungen, die zu einer fehlerhaften Regulation des ovariellen Zyklus bei der Frau bzw. Spermatogenese beim Mann führen. Obwohl bislang eine Reihe von molekularen und hormonellen Prozessen eingehend untersucht und in ihren Grundzügen verstanden sind, bleiben viele Fragen der weiblichen Infertilität unbeantwortet.

Im Rahmen der Kinderwunschbehandlung wird durch eine gezielte, aber individuell abgestimmte Hormonbehandlung (kontrollierte ovarielle Hyperstimulation) in den weiblichen Zyklus eingegriffen, um möglichst viele befruchtungsfähige Eizellen (Oozyten) zu gewinnen (Smitz et al., 1992). Je nach Ursache der Infertilität kommen bei der hormonellen Stimulation unterschiedliche Behandlungsprotokolle zur Anwendung (Felberbaum et al., 1996). Der Erfolg der Kinderwunschbehandlung hängt nicht nur von der Gewinnung, Reifung und Befruchtung der Oozyten ab, die Bildung eines intakten Gelbkörpers (Corpus luteum) ist ebenso wichtig für eine erfolgreiche Schwangerschaft. Die Aufklärung molekularer Mechanismen bei der Entstehung des Corpus luteum trägt wesentlich zum Verständnis der weiblichen Reproduktion bei und ist Grundlage für mögliche therapeutische Ansätze bei Therapieformen von Kinderwunschpatientinnen bilden.

1.1. Das Ovar

Das Ovar ist ein komplexes und endokrinologisch aktives Organ, das seine Funktionen in den verschiedenen Lebensphasen einer Frau verändert. Während die ovarielle Funktion vor der Pubertät weitgehend ruht, kommt sie in der reproduktiven Phase zur vollen Entfaltung, um mit dem Einsetzen der Menopause schrittweise ihre Funktion einzustellen.

1.1.1. Die Physiologie des Ovars

Zum weiblichen Reproduktionstrakt, der in Abbildung 1 dargestellt ist, gehören neben der Gebärmutter (Uterus) mit dem Muttermund (Cervix) und dem Gebärmutterhals (Cervix uteri), die paarigen Eileiter (Tuben) und die Eierstöcke (Ovarien). Die reifen, paarig

angelegten Ovarien sind flach-ovale Organe mit einer Größe von ca. 3x2x1 cm, deren Funktion während der Geschlechtsreife in der Bereitstellung von befruchtungsfähigen (fertilisierbaren) Oozyten und in der Produktion von Geschlechtshormonen besteht. Das einzelne Ovar besteht aus einer Markzone (Medulla ovarii) (Abb. 1 F) und einer Rindenzone (Cortex ovarii) (Abb. 1 G). Die Medulla ovarii durchziehen im lockeren Bindegewebe Blut- und Lymphgefäße, über welche die nutritive Versorgung des Ovars gewährleistet wird. Der Cortex ovarii enthält Follikel (lat. folliculus, Hülle) in verschiedenen Reifestadien mit den Oozyten, die funktionalen Einheiten des Ovars (Abb. 1 G).

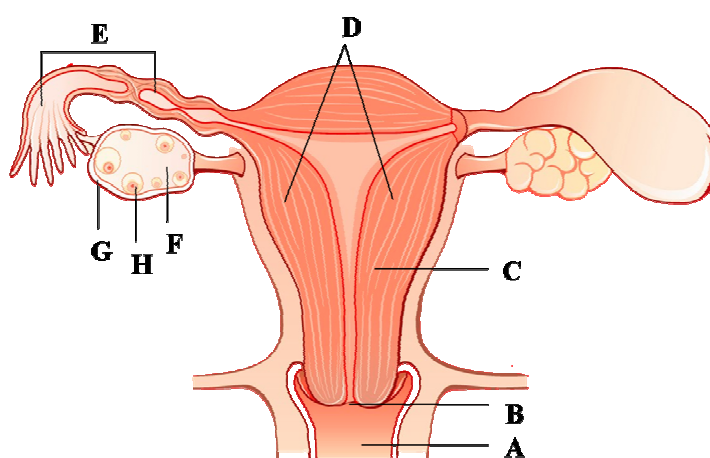


Abbildung 1: Schematische Übersicht des weiblichen Reproduktionstraktes. Dargestellt sind Scheide (Vagina) (A), Muttermund (Cervix) (B), Gebärmutterhals (Cervix uteri) (C) und Gebärmutter (Uterus) mit der Gebärmutterschleimhaut (Endometrium) (D). Die Fimbrientrichter der Eileiter (Tuba uterina) grenzen an die paarig angelegten Ovarien, die aus Markzone (Medulla ovarii) (F) und Rindenzone (Cortex ovarii) (G) bestehen. Im Cortex ovarii sind in den Follikeln die Oozyten lokalisiert (H).

1.2. Der ovarielle Zyklus

Das wesentliche Ziel des weiblichen Zyklus ist die Rekrutierung und periodische Freisetzung (Ovulation) einer fertilisierbaren Oozyte, der Aufbau des Endometriums im Uterus für die Einnistung (Implantation) einer befruchteten Oozyte und die Bereitstellung von Progesteron durch das Corpus luteum. Dieses Hormon ist für eine erfolgreiche Schwangerschaft essentiell. Der Menstruationszyklus (ovarieller Zyklus) dauert ca. 28 Tage und ist biphasisch in die Follikel- und Lutealphase unterteilt. Die Regulation des weiblichen Zyklus erfolgt durch ein sensitiv reguliertes Wechselspiel hypothalamo-hypophysärer Gonadotropine, Neurotransmitter, Hormone und lokal im Follikel gebildeter

Faktoren. Fehlregulationen dieses streng aufeinander abgestimmten Netzwerkes können u. a. zum Ausbleiben der Menstruation (Amenorrhö), einer Corpus luteum Insuffizienz oder dem Polyzystischen Ovarialsyndrom (PCOS) führen. Diese pathologischen Veränderungen sind nicht selten Ursache ungewollter Kinderlosigkeit.

1.2.1. Die Follikelphase

Mit dem Einsetzen der Menstruation beginnt die Follikelphase. Dies ist ein dynamischer Prozeß, der von Proliferation und Differenzierung geprägt ist und in drei separaten Stadien abläuft: die Rekrutierung, Selektion und Dominanzentwicklung des präovulatorischen Follikels. Zuvor entwickeln sich aus Primordialfollikeln in der präantralen Entwicklungsphase über einen Zeitraum von ca. 150 Tagen Primärfollikel (Abb. 2 A).

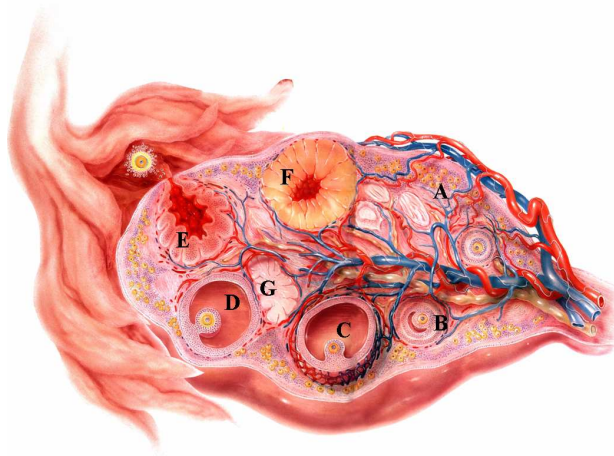


Abbildung 2: Der Ovarialzyklus. Dargestellt sind die einzelnen Stadien der Follikelreifung und der Lutealphase (A-G).

Aus dieser Follikelkohorte geht später der dominante Follikel hervor. Darauf folgt die zyklische Rekrutierung der proliferierenden Follikelkohorte zu Sekundärfollikeln. Im fortgeschrittenen Entwicklungsstadium dieser Phase erreicht der präantrale Follikel eine Größe von ca. 180 μm (Abb. 2 B). Überleben die Sekundärfollikel, wachsen und entwickeln sie sich zu antralen Tertiärfollikeln weiter (Abb. 2 C). In diesem Stadium der Follikelreifung setzt durch die Sekretion des Follikel-stimulierenden Hormons (FSH) aus der Adenohypophyse die Östrogensynthese der Granulosazellen ein (Abb. 3) (Palermo, 2007). Die Funktion dieser wandständig im Follikel lokalisierter Zellen ist die folliculäre Hormonsynthese. Im Uterus erfolgt unter dem Einfluß von Östrogen der Aufbau des Endometriums. Mit Erreichen eines individuellen Schwellenwertes von FSH im Serum kommt es zur Rekrutierung der Follikelkohorte (McGee und Hsueh, 2000). Dabei wird aus 3-11 pro Ovar und Zyklus heranwachsenden antralen Follikeln der präovulatorische Tertiärfollikel rekrutiert (Abb. 2 D) (Pache et al., 1990). In den darauf folgenden vier Tagen erfolgt die Selektion des dominanten Follikels (Greenwald und Terranova, 1988).

Bei einer Östradiol Konzentration von ca. 200 pg/ml im Serum wird die hypophysäre FSH Sekretion über einen negativen Feedback Regulationsmechanismus gehemmt (Abb. 3) (Pollow, 1990). Durch den entstandenen FSH Mangel und das androgene Milieu werden alle subordinaten Follikel mit Ausnahme des dominanten Follikels, der als Graaf-Follikel bezeichnet wird, atretisch und sterben ab (Abb. 2 D).

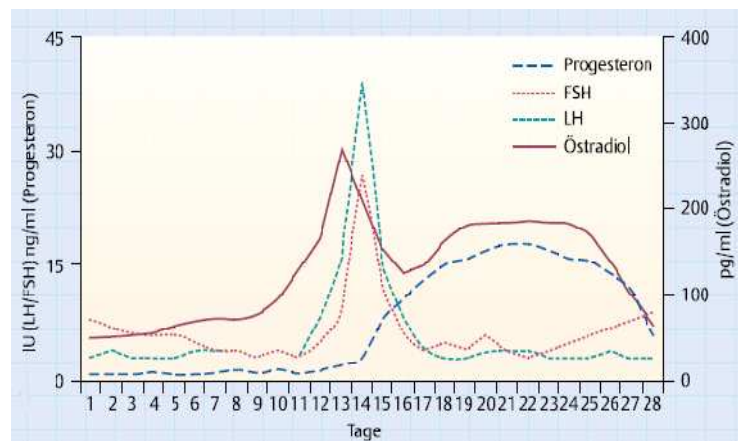


Abbildung 3: Hormoneller Verlauf des Ovarialzyklus. Die Serumkonzentrationen von FSH, Östradiol, des Luteinisierenden Hormons (LH) und von Progesteron während des weiblichen Menstruationszyklus sind vereinfacht zueinander dargestellt. Das Schema geht von einem optimalen Zyklus mit einem LH Peak am Tag 14 und der Ovulation am Tag 15 aus.

Der Graaf-Follikel ist gekennzeichnet durch einen mit Follikelflüssigkeit gefüllten Hohlraum (Antrum folliculi) (Hunter, 2003). Die Oozyte ist wandständig in einem Verband mit spezialisierten Granulosazellen, den Cumuluszellen, im Graaf-Follikel lokalisiert. Dieser Verband wird als Cumulus oophorus bezeichnet (Abb. 4 E und F). Ein mehrschichtiges Epithel aus Granulosazellen grenzt den Graaf-Follikel zur Basalmembran hin ab, an die sich die zweigeteilte Thekazellschicht anschließt (Abb. 4 A und B).

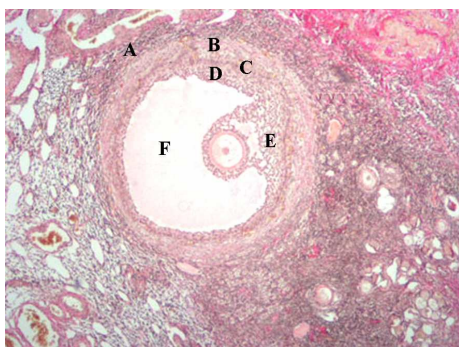


Abbildung 4: Querschnitt eines antralen Tertiärfollikels. Dargestellt sind die Theka externa (A) und Theka interna (B), die an die Basalmembran des Follikels (C) grenzt. Ein mehrschichtiges Epithel muraler Granulosazellen (D) kleidet den Follikel aus, der Cumulus oophorus Komplex aus Oozyte und Cumuluszellen (E) befindet sich antral in dem mit Follikelflüssigkeit (F) gefüllten Follikel. Vergrößerung: 40x.

Diese wird von einem netzartigen kapillaren Gefäßsystem durchzogen, das der Basalmembran aufliegt (Abb. 4 C). Es versorgt den dominanten Graaf-Follikel nicht nur mit Nährstoffen, sondern beeinflusst maßgeblich die Zusammensetzung der Follikelflüssigkeit und damit die weitere Reifung des Follikels bis zur Ovulation.

1.2.2. Die Lutealphase

Die Lutealphase beginnt ca. 12-16 Tage vor der nächsten Menstruation. Sie ist durch den initialen, sprunghaften Anstieg des Luteinisierenden Hormons (LH) im Serum gekennzeichnet (Abb. 3). Diese Phase des Ovarialzyklus ist in die Ovulation und die nachfolgende Umstrukturierung der verbliebenen Follikelhöhle zum Corpus luteum unterteilt.

1.2.2.1. Die Ovulation

Mit dem LH Peak durch den latent hohen Östrogenspiegel wird um den 11.-14. Zyklustag (Abb. 4) die Ovulation des Graaf-Follikels initiiert, die mit der nukleären und zytoplasmatischen Reifung der Oozyte beginnt. Die im Cumulus oophorus assoziierten Granulosazellen sezernieren große Mengen Hyaluronsäure, die zur Dissoziation des Cumulus oophorus Komplexes von der Follikelwand führen, bis dieser Komplex frei in der Follikelhöhle flotiert. Die Granulosazellen exprimieren verstärkt LH-Rezeptoren und differenzieren zu Progesteron synthetisierenden Granulosaluteinzellen. Mit fortschreitender Reifung der Oozyte finden intra- und extrafollikuläre Prozesse statt, die von Inflammation, Nekrose, Koagulation und Lyse geprägt sind. Einen besonderen Einfluß auf diese Prozesse haben das Plasminogenaktivatorsystem (Liu, 2004; Ny et al., 1997; Liu et al., 2004) und Prostaglandine (Duffy et al., 2005). Es bilden sich mikrovaskuläre Thromben, Ödeme und ischämische Regionen, die zur Nekrose des ovariellen Stromas und der Follikelwand führen. Mit der finalen Autolyse der Follikelwand an der Spitze des Follikels, kommt es 36 h nach dem LH Anstieg, unter dem Einfluß von vasokonstruktiven Substanzen, zum Ausschwemmen von Follikelflüssigkeit in den Fimbrientrichter des Eileiters (Abb. 1 E) (Shimizu et al., 2007). Auf dem Weg über den Eileiter in den Uterus kann die Oozyte fertilisiert werden und sich dort einnisten.

1.2.2.2. Das Corpus luteum

Nach Ovulation strömt Blut in die verbleibende Follikelhöhle ein und das Corpus rubrum entsteht (Abb. 3 E). Obwohl die Follikelflüssigkeit zum großen Teil durch die

Kontraktionen des ovariellen Stromas bei der Ovulation in den Fimbrientrichter des Eileiters bzw. in den Bauchraum gelangt, verbleibt ein Rest in der Kavität des kollabierten Antrum folliculi (residuale Follikelflüssigkeit). Dort vermischen sich Follikelflüssigkeit und Bestandteile des Blutes und bilden Koagel. Bedingt durch den hohen Gehalt an Wachstumsfaktoren, beeinflusst die Follikelflüssigkeit in der Lutealphase die Entwicklung und Funktion der umgebenden Granulosaluteinzellen und der invadierenden Endothelzellen (Hunter, 2003). In den darauf folgenden 2-3 Tagen finden eine Vielzahl struktureller, endokrinologischer und biochemischer Veränderungen statt, die zur Umwandlung des Corpus rubrum in das Corpus luteum, eine temporäre, endokrine Drüse, führen (Abb. 2 F). Das Corpus luteum besteht zu ca. 60 % aus Endothelzellen, den großen Granulosaluteinzellen und den peripher lokalisierten, kleineren Thekaluteinzellen (Abb. 5).

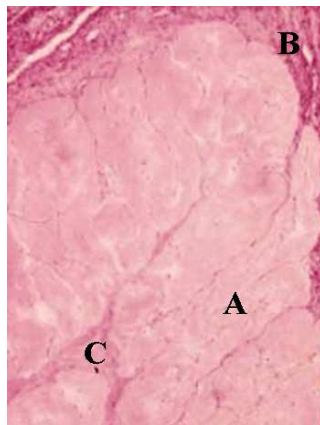


Abbildung 5: Querschnitt eines Corpus luteum. Die faltige Oberflächenkontur des Corpus luteum ist mit den großen Granulosaluteinzellen (A), kleinen peripher angeordneten Thekaluteinzellen (B) und der kollabierten Follikelhöhle (C) dargestellt. Vergrößerung: 40x.

Wichtigstes Produkt des Corpus luteum ist das von Granulosaluteinzellen synthetisierte und sekretierte Progesteron. Die Synthese des Hormons wird nicht nur von Gonadotropinen, sondern auch von lokalen, ovariellen Faktoren reguliert. Die Effekte von Progesteron beschränken sich jedoch nicht allein auf das Ovar (Wang et al., 2006; De Geyter et al., 2007; Chabrolle et al., 2008; Ben-Ami et al., 2008). Ein hoher Progesteronspiegel bewirkt im Endometrium die Differenzierung des Stratum functionale und leitet die Sekretionsphase ein. Die Drüsenzellen speichern Glykogen, Lipide und Proteine als Nahrung für den sich möglicherweise einnistenden Embryo und schwellen zu epithelialen Zellen an, die Teilen des Mutterkuchens, der Plazenta, ähneln. Im Drüsenlumen sammelt sich Sekret an. Etwa am 21. Zyklustag, in der späten Sekretionsphase, hat das Endometrium den optimalen Zustand für eine mögliche Implantation erreicht. Außerdem bewirkt Progesteron eine Verengung der Cervix, verändert den Cervixschleim und verhindert weitere Ovulationen (Lüllmann-Rauch, 2003).

Im Zusammenspiel mit Östrogen fördert Progesteron die Proliferations- und Sekretionsbereitschaft der Alveolen in den Brustdrüsen. Diese physiologischen Veränderungen sind für eine erfolgreiche Implantation und Schwangerschaft wichtig und setzen ein intaktes Corpus luteum voraus.

Die Bildung eines funktionsfähigen Corpus luteum kann nur durch eine streng regulierte Umstrukturierung der verbliebenen Follikelhöhle gewährleistet werden. Darin eingebunden sind als wesentliche zelluläre Prozesse die Proliferation, Migration und die Vaskularisierung von Luteal- und invadierenden Endothelzellen in die ehemals zentrale Kavität des Follikels (Sugino, 2005; Rolaki et al., 2007). Die Lebensdauer eines Corpus luteum beträgt ca. 14 Tage, wenn keine Fertilisierung der Oozyte erfolgt ist (Corpus luteum menstruationis). Durch die einsetzende Luteolyse, die Regression des Corpus luteum, sinkt der Progesteronspiegel (Abb. 3). Das führt zu Gewebsnekrosen und Blutungen des Stratum functionale, das mit der einsetzenden Menstruation abgestoßen wird. Das Corpus luteum menstruationis degeneriert danach über einen Zeitraum von sechs Wochen zu einem vernarbten, fibrösen Rest, dem Corpus albicans (Abb. 2 G). Tritt eine Schwangerschaft ein, wächst das Corpus luteum graviditatis unter dem Einfluß des Choriongonadotropins (hCG) auf das Doppelte seiner ursprünglichen Größe bis zum Ende der ersten drei Schwangerschaftsmonate und hält die Progesteronsynthese bis zur eigenständigen Hormonsynthese der Plazenta aufrecht.

1.3. Die ovarielle Angiogenese

Unter Angiogenese wird die Bildung von neuen, kapillarartigen Gefäßen, ausgelöst durch einen angiogenen Stimulus, verstanden. Dabei handelt es sich um einen kaskadenartig ablaufenden Prozeß, der mit der Degradation der extrazellulären Matrix eines lokalen Gefäßes durch proteolytische Enzyme, die zum Plasminogen-Aktivatorsystem und den Matrix-Metalloproteinasen gehören, beginnt (Mignatti und Rifkin, 1996). Anschließend migrieren Endothelzellen in Richtung des angiogenen Stimulus. Hinter der Front der migrierenden Zellen setzt eine massive Proliferation der Endothelzellen ein, die zu einer Verlängerung des endothelialen Stranges führt. Nach der Entstehung von neuen, kleinen Gefäßsprossen (Tubuli) aus mehreren Endothelzellen, bilden sich durch erneute Degradation der extrazellulären Matrix und invadierender Endothelzellen Netzwerke dieser kapillarähnlichen Strukturen. Nach der Ausbildung des Lumens innerhalb des endothelialen Kapillarsprosses werden die neu entstandenen Gefäße durch die Anlagerung von Perizyten stabilisiert (Folkman, 1979; Zetter, 1980; Risau, 1997).

Pathologisch ist die Angiogenese ein wesentlicher Prozeß bei der Tumorprogression (Bergers und Benjamin, 2003; Veeravagu et al., 2007; Bluff et al., 2008) und vielen Autoimmunerkrankungen (Koch und Dietler, 2007, Rotondi et al., 2007; Carvalho et al., 2007). Unter normalen physiologischen Bedingungen finden angiogene Prozesse im menschlichen Körper nur limitiert statt, z. B. im Rahmen der Wundheilung (Eming et al., 2007; Breen, 2007). Der weibliche Reproduktionstrakt stellt jedoch eine Ausnahme dar. Bedingt durch die hormonell regulierten Phasen des weiblichen Zyklus finden sich periodisch auftretende angiogene Prozesse beim Aufbau des Endometriums, der Implantation des Embryos, sowie bei der Follikelreifung und der Bildung des Corpus luteum, eines der am meisten vaskularisierten Gewebe im menschlichen Organismus. Um die nutritive Versorgung der Granulosaluteinzellen, die Bereitstellung von Cholesterol als Substrat für die Progesteronsynthese und den Transport des Hormons zu den Zielorganen gewährleisten zu können, sind angiogene Prozesse für die Entwicklung eines funktionsfähigen Corpus luteum von großer Bedeutung (Redmer und Reynolds, 1996; Fraser et al., 2000; Augustin, 2000; Zygmunt et al., 2003; Fraser und Duncan, 2005; Jabbour et al., 2006). Die ovarielle Angiogenese bedarf hoch sensitiver, auf einander abgestimmter Regulationsmechanismen. Daher sind regulatorische Defekte der ovariellen Angiogenese oft mit Fertilitätsstörungen, wie dem Ausbleiben der Ovulation (Anovulation), dem ovariellen Hyperstimulationssyndrom (OHSS) und Infertilität durch vorzeitigen Schwangerschaftsabbruch infolge einer Corpus luteum Insuffizienz, assoziiert (Neulen et al., 1995 Abulafia und Sherer, 2000; Geva und Jaffe 2000).

1.3.1. Faktoren der ovariellen Angiogenese

In den letzten Jahrzehnten sind viele Faktoren der ovariellen Angiogenese identifiziert und auf ihre Regulation hin untersucht worden. Neben den wichtigsten proangiogenen Faktoren, dem Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und dem Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF), fördern eine Reihe anderer Wachstumsfaktoren, z. B. die Transformierenden Wachstumsfaktoren α und β (Transforming Growth Factors, TGF), der Epidermale Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor, EGF) und Zytokine, wie Interleukin 8, die ovarielle Angiogenese (Atanackovic et al., 2008). Die löslichen Rezeptoren von FGF und VEGF, sowie Thrombospondin und Angiostatin wirken der ovariellen Angiogenese entgegen (God et al., 1991; DiPietro, 1997; Bergers und Coussens 2000; Pozzi et al., 2000; Artini et al., 2007; Gutman et al., 2008). Für eine erfolgreiche Schwangerschaft ist nicht nur die Bildung, sondern auch die Stabilisierung von neu

gebildeten Gefäßen notwendig. In diesem Zusammenhang wurden die Angiopoietine 1 und 2 beschrieben, die mit VEGF bei der Angiogenese, Gefäßstabilisation und Regression interagieren (Suri et al., 1996; Hanahan, 1997; Maisonpierre et al., 1997; Thurston et al., 2000; Yancopoulos et al., 2000).

1.3.1.1. Der Fibroblastenwachstumsfaktor

FGF wurde als erster angiogener Faktor im Ovar beschrieben (Gospodarowicz et al., 1985). Von FGF sind zwei Formen bekannt, der basische (bFGF) und der saure Fibroblastenwachstumsfaktor (aFGF), die im Ovar detektiert wurden (Du Gros et al., 1993). Aus *in vitro* Studien mit neutralisierenden Antikörpern an Luteinzellen aus dem Tiermodell ist bekannt, daß bFGF eine höhere angiogene Aktivität im Corpus luteum als der saure FGF aufweist. Im humanen Ovar ist bFGF positiv mit der Follikelreifung assoziiert und wird sowohl von Theka- als auch von Granulosazellen mit zunehmender Reifung des Follikels verstärkt exprimiert. In der Lutealphase erfolgt die Synthese des Wachstumsfaktors differentiell. Im Gegensatz zur bFGF Expression in den Thekaluteinzellen, steigt die bFGF Synthese der Granulosaluteinzellen bis in die periovulatorische Lutealphase und sinkt in der späten Lutealphase drastisch (Yamamoto et al., 1997). Neben seinen angiogenen Eigenschaften stimuliert bFGF die Proliferation von Endothelzellen und wirkt protektiv auf die induzierte Apoptose in Granulosaluteinzellen und andere Zelltypen (Tilly et al., 1992; Bikfalvi et al., 1998).

1.3.1.2. Der Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor

VEGF ist der am besten beschriebene angiogene Faktor. Die VEGF-Familie wird in sechs Gruppen unterteilt: VEGFA-E und den Plazentalen Wachstumsfaktor (Veikkola und Alitalo, 1999). Die kodierende Sequenz des *vegfa* Gens besteht aus acht Exons. Durch alternatives Spleißen entstehen fünf verschiedene Isoformen der VEGFA mRNA, die aufgrund der Aminosäureanzahl der resultierenden Proteine mit VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ bezeichnet werden (Ferrara et al., 1991; Tischer et al., 1991; Charnock-Jones et al., 1993). Die biologisch aktivste und vorherrschende Form ist VEGF₁₆₅. Die Effekte von VEGF werden durch die Bindung des Wachstumsfaktors an zwei Transmembran-Tyrosinkinase-Rezeptoren vermittelt, FLT-1 und FLT-1/KDR (VEGFR-1 und VEGFR-2) (De Vries et al., 1992; Terman et al., 1991). Beide Rezeptoren werden wie VEGF hauptsächlich durch Hypoxie reguliert (Waltenberger et al. 1994; Detmer et al., 1997). Die Bedeutung von VEGF bei angiogenen Prozessen wurde erstmals

in Studien mit genetisch veränderten Mäusen gezeigt. Die Deletion eines oder beider VEGF Allele führte durch eine gestörte Angiogenese während der embryonalen Entwicklung zur Letalität der Mäuse. Die Überexpression von VEGF hatte durch die Hypervaskularisierung und vergrößerte Gewebe ebenfalls letale Folgen (Stouffer et al., 2001). VEGF wird während des weiblichen Zyklus differentiell exprimiert. In der Follikelphase wird VEGF von Thekazellen sezerniert und begünstigt die Ausbildung eines kapillaren Netzwerkes durch Stimulation der endothelialen Angiogenese und Proliferation um den Follikel (Cavender und Murdoch, 1988). In dieser Zyklusphase exprimieren Granulosazellen kaum nachweisbare VEGF Mengen. Mit der Luteinisierung und dem abnehmenden Sauerstoffpartialdruck im Follikel steigt die VEGF Expression in den Granulosa- und Thekaluteinzellen, die eine zunehmende intra- und extrafollikuläre Vaskularisierung und Permeabilisierung bedingt und die Ovulation begünstigt (Yan, et al., 1993; Kamat et al., 1995; Laitinen et al., 1997; Bianco et al., 2005). Zusätzlich wird die VEGF Expression durch den Einfluß von Gonadotropinen und Prostaglandinen gefördert (Laitinen et al., 1997). Die Bedeutung von VEGF bei der Bildung des Corpus luteum zeigten erstmals Studien am Modell der Ratte. Nach hormonell induzierter Ovulation führte die Behandlung mit dem löslichen rekombinanten VEGFR-1 zu einer Inhibition der postvariellen Angiogenese. Dies hatte eine gestörte Entwicklung des Endometriums mit auftretenden Ischämien und die Entstehung eines dysfunktionalen Corpus luteum mit einer verminderten Progesteronsynthese zur Folge (Otani et al., 1999). VEGF ist nicht nur ein Mediator der prä- und postvariellen Angiogenese, der Wachstumsfaktor hat auch protektive Effekte auf das Überleben und die Migration von Granulosazellen (Ferrara et al., 1998; Rolaki et al., 2007).

1.4. Bedeutung der Follikelflüssigkeit für den ovariellen Zyklus

Follikelflüssigkeit (FF) ist ein Gemisch aus Sekretionsprodukten von Granulosa- und Thekazellen, der Oozyte und Transsudaten des Blutplasmas, die über die Basalmembran in den avaskulären Follikel gelangen. Aufgrund der porösen Struktur der Membran dringen Proteine, etc. mit einer maximalen Größe von 300 kDa aus dem Blut in den Follikel ein (Le Goff, 1994). Die Zusammensetzung der FF ist für jede Oozyte individuell, variiert mit der Reifung des Follikels und beeinflusst somit die Prozesse während der Follikelreifung und der Lutealphase. Humane FF enthält viele Substanzen, die biologisch aktiv sind. Dazu zählen Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren, die nicht nur die intrafollikuläre Hormonsynthese und Zellproliferation beeinflussen, sondern auch auf die

Dominanzentwicklung des Follikels und die Eizellreifung (Oozytenmaturation) einwirken (Edwards et al., 1980; Seibel et al., 1989, Pangads, 2007). Deshalb werden einige intrafollikuläre Proteine, z. B. Inhibin B, als Marker für die follikuläre Reifung angesehen (Nayudu et al., 1989; Miro et al., 2004). Neben den bereits bekannten Substanzen, z. B. die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (Insulin-Like Growth Factors, IGF (Eden et al., 1988), TGF α , TGF β (Eden et al., 1990) und Transferrin (Entman et al., 1987), werden aus FF immer wieder neue, bisher unbekannte Komponenten isoliert und charakterisiert. So konnten kleine Peptide in humaner FF nachgewiesen werden, welche die Bindung von FSH an den FSH Rezeptor blockierten und dadurch die Apoptose von Granulosazellen auslösten (Chitnis et al., 2008).

Im Zusammenhang mit der ovariellen Angiogenese sind viele Effekte der FF dokumentiert. Es wurde gezeigt, daß humane FF angiogene Faktoren wie bFGF (Seli et al., 1998), Angiogenin (Kogar et al., 2000) und VEGF (Krasnow et al., 1996) enthält und Angiogenese induzieren kann (Frederick et al., 1984). Zusätzlich stimuliert FF die Proliferation von Endothelzellen und hemmt die Produktion des VEGF Antagonisten FLT-1 in Granulosaluteinzellen (Grümmer et al., 2005). In anderen Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß humane FF die Expression Angiogenese-modulierender Gene in Endothelzellen induziert (Grümmer et al., 2005). Neueren Untersuchungen zu Folge stimuliert FF die Proliferation von Zellen des ovariellen Oberflächenepithels. Dieser Effekt war unabhängig von Östrogen und Progesteron und läßt auf weitere angiogen wirksamen Substanzen in der FF schließen (Doyle und Donadeu, 2008).

Wichtige Prozesse während des ovariellen Zyklus werden nicht nur von follikulären Proteinen beeinflusst. In präovulatorischer FF wurden follikuläre Lipoproteine hoher Dichte (Follikuläres High Density Lipoprotein, FHDL) als einzige Lipoproteinklasse nachgewiesen (Perret et al., 1985). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, daß FHDL die Progesteronsynthese stimuliert (Roy und Belanger, 1992). Darüber hinaus fördert das Lipoprotein den Cholesterinefflux und die Spermienkapazitation, die Fähigkeit der Spermien zur Fertilisierung (Langlais et al., 1988; Thérien et al., 2001). Der Ursprung von FHDL liegt vermutlich im plasmatischen HDL begründet. HDL sind eine heterogene Klasse von Lipoproteinen, die im peripheren Kreislauf Cholesterin aus den Geweben zurück in die Leber transportieren (reverser Cholesteroltransport) (Assmann und Nofer, 2003). Im Gegensatz zu großen, lipidreichen HDL-Partikeln, können kleine, lipidarme Subklassen von plasmatischem HDL durch die poröse Basalmembran in den Follikel gelangen (Le Goff, 1994; Perret et al., 1985). Der Nachweis großer lipidreicher HDL-

Partikel und der höhere Gehalt lipidarmer prä- β -HDL in FF deuten darauf hin, daß FHDL intrafollikulär durch lipidmetabolisierende Enzyme umstrukturiert wird (Le Goff, 1994). FHDL unterscheidet sich in seinen physikochemischen Eigenschaften von plasmatischem HDL. FHDL enthält weniger freies und verestertes Cholesterol und mehr Phospholipide. Damit einhergehend konnte gezeigt werden, daß der Gehalt von Apolipoprotein A-I (ApoA-I), das ca. 90 % des Proteingehaltes von HDL entspricht, mit ca. 1 g/l ApoA-I im Vergleich zu plasmatischem HDL (1,6 g/l) deutlich reduziert ist (Jaspard et al 1997). Dieses Protein ist als wichtiger Kofaktor entscheidend für die Funktion von HDL beim reversen Cholesteroltransport (Assmann und Nofer, 2003).

Die Bedeutung von FHDL im Ovar ist bislang nicht eindeutig geklärt. Es ist jedoch bekannt, daß FHDL in gleicher Weise den Cholesterolefflux, ein wesentlicher Prozeß des reversen Cholesteroltransportes, *in vitro* stimuliert wie plasmatisches HDL (Jaspard et al., 1997). Studien an Granulosazellen von Mäusen, Ratten und Wiederkäuern zeigen, daß plasmatisches HDL-Cholesterol als Substrat für die Progesteronsynthese genutzt wird (O' Shaughnessy et al., 1990; Endresen et al., 1990; Volpe et al., 1991; Roy, Bélanger, 1992). Über die Bedeutung von FHDL-Cholesterol für die humane Progesteronsynthese gibt es bisher keine eindeutigen Daten. Eine Beteiligung von FHDL an der humanen, ovariellen Steroidsynthese wird jedoch vermutet (Carr et al., 1981; Tureck et al., 1983; Soto et al., 1984; Volpe et al., 1991). Neben der klassischen Funktion beim reversen Cholesteroltransport verfügt plasmatisches HDL über eine Vielzahl gefäßprotektiver Eigenschaften. Es hemmt u. a. apoptotische Prozesse und die Chemotaxis von Monozyten und stimuliert die Proliferation und Angiogenese von Endothelzellen (Nofer et al., 2001; Sumi et al. 2007, Rader et al., 2008). Ob FHDL ähnliche Effekte hat, ist bislang nicht untersucht.

Die Zusammensetzung der Follikelflüssigkeit beeinflusst folglich vor allem in der letzten Phase des ovariellen Zyklus wichtige Prozesse und wirkt sich entscheidend auf die Funktionalität des Corpus luteum und damit auf die weibliche Fertilität aus. Die Identifizierung und Charakterisierung von bislang unbekanntem Faktoren in der Follikelflüssigkeit trägt nicht nur zum besseren Verständnis der weiblichen Reproduktion bei, sie bietet auch die Möglichkeit für die Entwicklung neuer Therapieformen zur Behandlung der weiblichen Infertilität.

2. Zielsetzung

Die Entstehung eines intakten Corpus luteum in der Lutealphase des weiblichen Zyklus ist eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreich verlaufende Schwangerschaft. Darin sind angiogene Prozesse eingebunden, zu denen die Migration, die morphologische Tubulusformation und Proliferation von Endothelzellen zählen. Diese Mechanismen werden nicht über die Wirkung von Gonadotropinen, sondern auch durch ovarielle Faktoren reguliert.

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, daß VEGF in der Konzentration, die in Follikelflüssigkeit gemessen wurde, die Proliferation von humanen Endothelzellen (Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) zwar stimuliert, der mitogene Effekt von Follikelflüssigkeit jedoch weitaus höher war (von Otte et al., 2003). Daraus wurde geschlußfolgert, daß Follikelflüssigkeit neben den bekannten, angiogenen Faktoren, weitere, bisher nicht charakterisierte Substanzen enthält, die das Wachstum von Endothelzellen stimulieren können. Publizierten Studien zufolge enthält Follikelflüssigkeit thermostabile, biologisch aktive Substanzen. Deshalb war im ersten Teil der Arbeit von Interesse, ob die mitogene Aktivität von Follikelflüssigkeit auf thermostabile Komponenten zurückzuführen ist. Anschließend sollte die unbekannte, mitogene Aktivität der Follikelflüssigkeit aufgereinigt, identifiziert und charakterisiert werden. Nachfolgend war zu klären, welchen Einfluß der identifizierte Faktor auf die Proliferation, die morphologische Tubulusformation und die darin involvierten Signaltransduktionswege hat. Zusätzlich galt es zu prüfen, inwieweit die Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF an der mitogenen Aktivität der Follikelflüssigkeit beteiligt sind.

Im Gegensatz zur ovariellen Angiogenese ist die Migration von Granulosaluteinzellen bei der Entstehung des Corpus luteum weitgehend ungeklärt. Im zweiten Teil der Arbeit wurde deshalb untersucht, ob der mitogene Faktor die Migration von humanen Granulosaluteinzellen beeinflußt und welche Rezeptoren und Signaltransduktionswege die beobachteten Effekte involviert sind. Abschließende Untersuchungen zur Progesteronsynthese der Granulosaluteinzellen sollten klären, welche Bedeutung der mitogene Faktor für die Funktionalität des Corpus luteum hat.

3. Ergebnisse

3.1. Identifizierung eines angiogenen Faktors der Follikelflüssigkeit am Modell von HUVEC Zellen

3.1.1. Immunzytochemische Identifizierung von HUVEC Zellen

Die Studien zur Identifizierung und Charakterisierung der mito- und angiogenen Aktivität von Follikelflüssigkeit (FF) wurden an makrovaskulären Endothelzellen durchgeführt, die aus Nabelschnurvenen (HUVEC Zellen) isoliert werden können. Diese Zellen eignen sich aufgrund ihrer Fähigkeit zur Neoangiogenese besonders gut für die Untersuchungen zur Proliferation und Tubulusformation und sind als Modell in der Arterioskleroserecherche etabliert (Favot et al., 2003; Ruis et al., 2006). Um die Reinheit der Zellpopulation nach jeder Isolierung zu bestimmen, wurden HUVEC Zellen der ersten Zellkulturpassage mit dem Endothelzellmarker CD31 immunzytochemisch gefärbt, gezählt und parallel von den Kooperationspartnern in Münster im FACScan analysiert (Müller et al., 2002). Die Abbildungen 6 A und B zeigen exemplarisch einen Bildausschnitt einer Immunfluoreszenzfärbung von HUVEC Zellen.

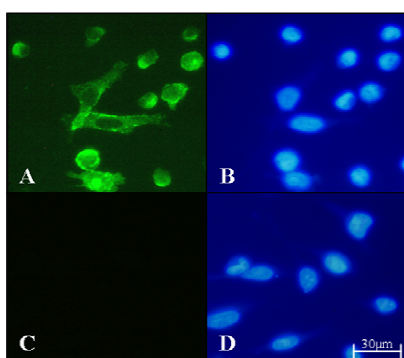


Abbildung 6: Immunfluoreszenzfärbung von HUVEC Zellen (Zellkulturpassage 2) mit dem Endothelzell-spezifischen Oberflächenmarker CD31. Die Zellen wurden mit einem FITC-markierten CD31 Antikörper gefärbt (A, grün). Die Darstellung der Zellkerne erfolgte durch Färbung mit DAPI (B, blau). Als Negativkontrolle wurden HGL5-Zellen mit dem CD31 Antikörper markiert (C) und mit DAPI (D) gefärbt. Vergrößerung 400x.

Als Negativkontrollen wurden HUVEC Zellen nur mit dem Sekundärantikörper markiert und die Färbung mit HGL5-Zellen, einer luteinisierten Granulosazelllinie, durchgeführt (Abb. 6 C und D). Diese Zellen sind mesodermalen Ursprungs und für den Oberflächenmarker CD31 negativ. Um eine gleichbleibende Qualität dieser Zellpopulation über mehrere Zellkulturpassagen gewährleisten zu können, wurden die Färbungen über fünf Zellkulturpassagen begleitend durchgeführt. Mehr als 95 % der kultivierten Zellen waren für diesen Oberflächenmarker nach Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop und im FACScan bis zur Passage 3 positiv. Danach wurden die Zellen in ihrer

Morphologie zunehmend heterogener, so daß diese für weitere Untersuchungen nicht eingesetzt wurden.

3.1.2. Stimulation angiogener Prozesse mit FF

Zunächst wurde der Einfluß von gepoolter, nativer FF auf die Proliferation der isolierten HUVEC Zellen untersucht. Diese Pools wurden aus Follikelaspiraten von 3-5 Patientinnen isoliert, die sich im Rahmen der Kinderwunschbehandlung einer kontrollierten ovariellen Hyperstimulation unterzogen haben. Vor Beginn der Zellkulturexperimente wurde die Proteinkonzentrationen von fünf verschiedenen Follikelflüssigkeit-Pools (FF-Pools) bestimmt, die in Tabelle 1 gezeigt sind. Im Durchschnitt wurde eine Proteinkonzentration von $45,9 \pm 2,5$ mg/ml gemessen.

Follikelflüssigkeit Pool	Proteinkonzentration (mg/ml)
1	$44,4 \pm 0,02$
2	$43,4 \pm 0,03$
3	$43,7 \pm 0,05$
4	$49,1 \pm 0,02$
5	$48,7 \pm 0,01$

Tabelle 1: Proteingehalt von Follikelflüssigkeit. Dargestellt sind die durchschnittlichen Proteinkonzentrationen von fünf verschiedenen Follikelflüssigkeit-Pools.

3.1.2.1. Dosis- und zeitabhängige Stimulation der Proliferation mit nativer FF

Zuerst wurde untersucht, welchen Einfluß verschiedene FF-Pools auf das Wachstum von HUVEC Zellen haben. Dafür wurde ein kolorimetrisches Testsystem verwendet, daß auf Messung der Stoffwechselaktivität von Zellen beruht (Mosman, 1983). Endogen appliziertes Methylthiazolyldiphenyl-Tetrazolium (MTT) wird durch die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase zum violetten MTT-Formazan reduziert, das photometrisch gemessen werden kann. Die optische Dichte ist dabei direkt proportional zu der Anzahl der vitalen Zellen. Dieses Testsystem zeichnet sich durch seine hohe Sensitivität aus, ist schnell durchzuführen und ermöglicht aufgrund des Mikrotiterplattenformates einen hohen Probendurchsatz. Als Stimulationsmedium wurden verschiedene FF-Pools in unterschiedlichen Anteilen (%) mit Zellkulturmedium ohne weitere Wachstumszusätze gemischt und HUVEC Zellen mit je 100 µl Stimulationsmedium pro Kavität einer 96-Lochplatte inkubiert. Nach 24 h wurde die optische Dichte der MTT-Formazan Färbung gemessen. Die Quantifizierung der Zellproliferation erfolgte durch die Bestimmung des prozentualen Anteils der gemessenen optischen Dichte ($OD_{560\text{ nm}}$) der behandelten Zellen relativ zu unbehandelten Zellen.

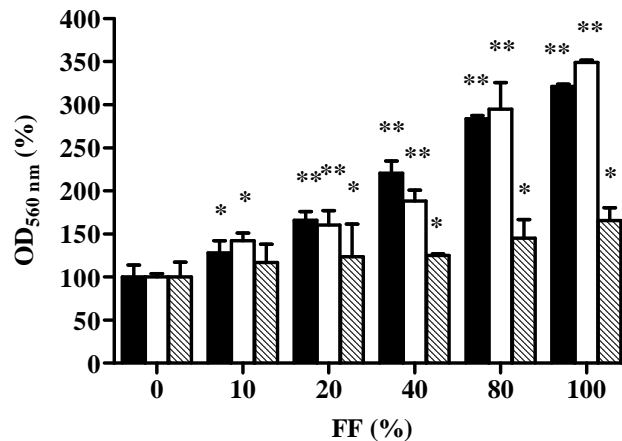


Abbildung 7: Dosisabhängig stimulierte Proliferation von HUVEC Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichem FF Gehalt. Die OD_{560 nm} ±SD (%) der Zellen, die mit drei verschiedenen FF-Pools (Pool 1 ■, Pool 2 □, Pool 3, ▨) behandelt wurden, ist relativ zu unbehandelten Zellen als Kontrolle dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zur unbehandelten Zellen ermittelt. *p<0,05; **p<0,01.

Abbildung 7 zeigt, daß jeder FF-Pool die Proliferation der Endothelzellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen dosisabhängig mit einem Maximum bei 100 % FF stimulierte. Dabei stieg die Zellproliferation nach Inkubation mit dem Pool 1 von 128,2 ±14,1 % mit 10 % FF bis auf 321,6 ±2,1 % mit 100 % FF im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Ähnliche Ergebnisse zeigten die Experimente mit dem zweiten FF-Pool. Die Zellproliferation war bei einem Anteil von 10 % FF auf 142,1 ±9,1 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen erhöht. Die Inkubation der Zellen mit dem dritten FF-Pool führte zu einem geringeren Anstieg des Zellwachstums von 117,0 ±21,0 bei 10 % FF bis 165,9 ±14,7 % bei 100 % FF. Signifikante Veränderungen der Proliferation wurden mit diesem Pool bei 20 % FF gemessen.

Um zu prüfen, wie sich der mitogene Effekt der FF auf die Proliferation der Zellen über einen längeren Zeitraum auswirkt, wurden HHUVEC Zellen nachfolgend mit einem FF-Pool für 24 h, 48 h und 72 h behandelt. Die Ergebnisse in Abbildung 8 zeigen, daß das Zellwachstum mit der Inkubationszeit anstieg. Auffällig war jedoch, daß bei dem verwendeten FF-Pool kein dosisabhängiger Effekt zwischen 10 % FF und 20 % FF über den untersuchten Zeitraum gemessen werden konnte.

Die Stärke der Induktion der Zellproliferation war somit von drei Parametern abhängig: erstens vom verwendeten FF Pool, zweitens von der Inkubationszeit und drittens vom Gehalt der FF im Inkubationsmedium.

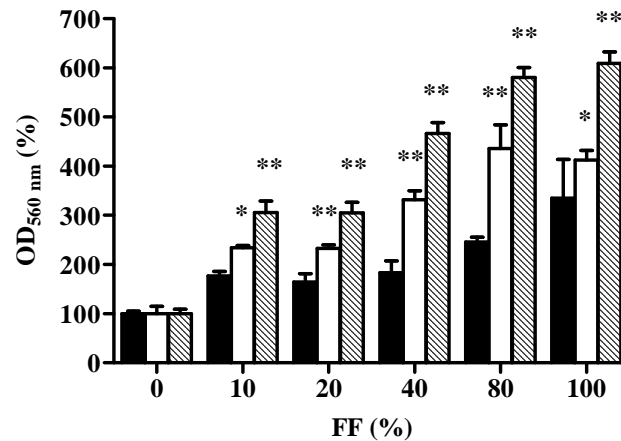


Abbildung 8: Dosis- und zeitabhängige Stimulation der Proliferation von HUVEC Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichem FF Gehalt. Die OD_{560 nm} ±SD (%) mit FF behandelte Zellen ist relativ zu unbehandelten Zellen als Kontrolle nach 24 h (■), 48 h (□) und 72 h (▨) dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zu den Zellen ermittelt, die für 24 h mit FF behandelt wurden. *p<0,05; **p<0,01.

3.1.2.2. Stimulation der Tubulusformation mit nativer FF

Nach der Proliferation von Endothelzellen ist die Differenzierung der Zellen zu kleinen, kapillarähnlichen Strukturen (Tubuli) ein entscheidendes Ereignis für die Entstehung neuer Gefäße. Deshalb war von Interesse zu untersuchen, ob FF die Tubulusformation und damit die Fähigkeit zur Gefäßneubildung (Neoangiogenese) von HUVEC Zellen stimulieren kann. Diese Untersuchungen wurden mit wachstumsfaktorreduziertem Matrigel™ durchgeführt. Diese Gel-Matrix eignet sich aufgrund der geringen Konzentration von Wachstumsfaktoren gut zur Charakterisierung angiogen wirksamer Substanzen. Weitere Vorteile dieses Systems sind der hohe Probendurchsatz und die rapide Induktion der Tubulusformation von HUVEC Zellen innerhalb von 24 h. Die Zellen wurden mit unterschiedlichem FF Gehalt (%) auf dem Matrigel™ ausgesät und die Tubulusformation nach 24 h ausgewertet. Eine quantitative Auswertung dieser Experimente, z. B. durch direkte Messung der Tubuluslänge war aufgrund der fehlenden technischen Ausstattung nicht möglich. Deshalb wurde die Zu- oder Abnahme der gebildeten Tubuli der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Zellen als Kontrolle anhand mikroskopischer Bildausschnitte visuell beurteilt. Die Ergebnisse sind exemplarisch in Abbildung 9 dargestellt. In Abhängigkeit von der Zellcharge wurde eine geringfügig ausgeprägte, basale Tubulusbildung der Zellen beobachtet. Die Inkubation der Zellen mit 10 % FF führte zu einer massiven Ausbildung und Vernetzung neu gebildeter Tubuli (Abb. 9 B). Dieser Effekt nahm bis zu einer Behandlung mit 40 % FF so zu, daß das Tubulnetz nahezu konfluent war (Abb. nicht gezeigt).

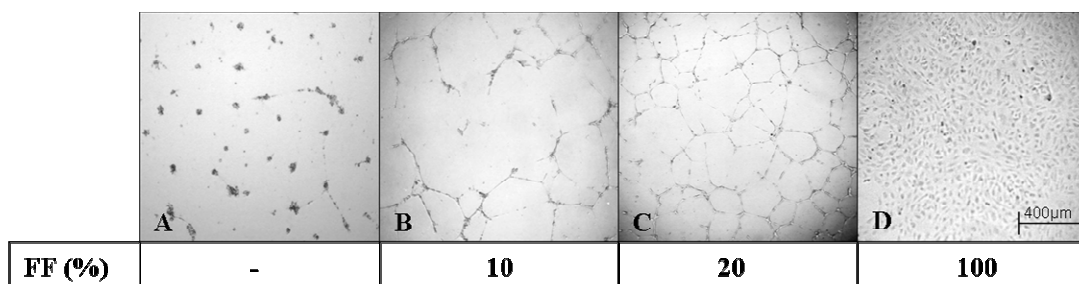


Abbildung 9: Dosisabhängige Stimulation der Tubulusformation von HUVEC Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichem FF Gehalt (B-D). Die mikroskopischen Bildausschnitte von Stichproben sind im Vergleich zu unbehandelten Zellen (A) dargestellt. Vergrößerung 40x.

In Korrelation zu den Proliferationsexperimenten ließ sich eine Zunahme der Zellzahl beobachten, die zu einer konfluenten Zellschicht bei ausbleibender Tubulusformation nach Inkubation mit 100 % FF führte (Abb. 9 D). Aufgrund der temporären Stabilität der Tubuli konnten Langzeitexperimente mit dem verwendeten Matrigel™ System nicht durchgeführt werden. Für weitere Untersuchungen zu den mito- und angiogenen Effekten von FF wurden HUVEC Zellen in den Proliferationsexperimenten mit 80 % FF und für die Untersuchungen zur Tubulusformation mit 20 % FF inkubiert. Da beide zelluläre Prozesse gemeinsam untersucht werden sollten, wurde als Zeitpunkt für nachfolgende Experimente 24 h ausgewählt.

3.1.3. Stimulation der Proliferation und Tubulusformation mit hitzebehandelter FF

FF ist ein Gemisch aus Proteinen, Steroidhormonen, Glucosaminen, Fetten u. a. Substanzen, die mito- und angiogen wirken können und sich aufgrund ihrer temperaturabhängigen Wirksamkeit unterscheiden (Nadu et al., 1989; Ocal et al., 2004; Doyle und Donadeu, 2008; Kavano et al. 2004; Mc Clure et al., 1993). Für die weiterführende Differenzierung der oben beschriebenen Effekte auf die Proliferation und Tubulusformation induzierenden Substanzen, wurde FF zunächst für 30 min bei 90 °C erhitzt und die Proteinkonzentration vor und nach Hitzebehandlung gemessen. Die Resultate sind in Tabelle 2 gezeigt. Durch Erhitzen der FF werden Proteine denaturiert, die durch anschließendes Zentrifugieren entfernt wurden. Dies führte zu einer Reduktion des Proteingehaltes um durchschnittlich 94,0 % von $45,9 \pm 2,5$ mg/ml auf $2,8 \pm 0,3$ mg/ml.

Folikelflüssigkeit Pool	Proteinkonzentration (mg/ml) nativ	Proteinkonzentration (mg/ml) (90 °C)
1	44,4 ±0,02	2,7 ±0,01
2	43,4 ±0,03	2,4 ±0,03
3	43,7 ±0,05	2,6 ±0,03
4	49,1 ±0,02	3,2 ±0,01
5	48,7 ±0,01	2,9 ±0,04

Tabelle 2: Proteingehalt in verschiedenen Follikelflüssigkeit-Pools vor und nach Hitzebehandlung. Die durchschnittlichen Proteinkonzentrationen sind von fünf verschiedenen Pools dargestellt.

Um zu testen, ob die mito- und angiogene Aktivität der FF auf thermolabile oder -stabile Faktoren zurückzuführen ist, wurde FF 30 min bei verschiedenen Temperaturen erhitzt und die Proliferation der Zellen nach Inkubation mit 80 % hitzebehandelter FF im Vergleich zu 80 % nativer FF gemessen. In Abbildung 10 ist gezeigt, daß eine Erhöhung der Temperatur zu einem Anstieg des Zellwachstums auf 149,9 ±8,9 % bei 90 °C im Vergleich zu FF, die bei RT inkubiert wurde, führt. Nach Erhitzen der FF auf 100 °C war die Zellproliferation auf 122,5 ±7,8 % reduziert.

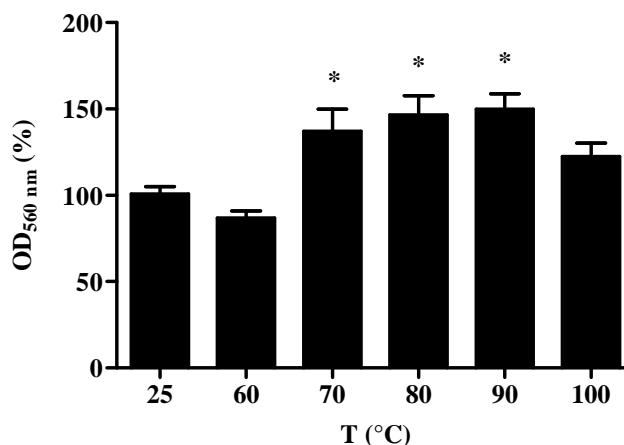


Abbildung 10: Stimulation der Proliferation von HUVEC Zellen nach Inkubation mit hitzebehandelter FF. Die OD_{560 nm} ±SD (%) der mit Zellen, die mit 80 % hitzebehandelter FF inkubierten wurden, ist relativ zu mit nativer FF behandelten Zellen dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zum Effekt unbehandelte FF ermittelt. *p<0,05.

Diese Daten geben Hinweise darauf, daß FF neben thermosensitiven auch thermostabile, mitogene Faktoren enthält. Der Anstieg der mitogenen Aktivität hitzebehandelter FF im Vergleich zu unbehandelte FF läßt die Vermutung zu, daß durch die Hitzebehandlung potentiell proliferationsinhibierende Substanzen zerstört werden und die FF thermostabile,

mitogene Komponenten enthält. Aufgrund dieser Daten war naheliegend, daß die thermostabilen, mitogenen Komponenten der FF auch die Fähigkeit der HUVEC Zellen zur Tubulusformation beeinflussen könnten. Deshalb wurden die Zellen mit dem Überstand hitzebehandelter FF auf einer Matrigel™ Matrix inkubiert.

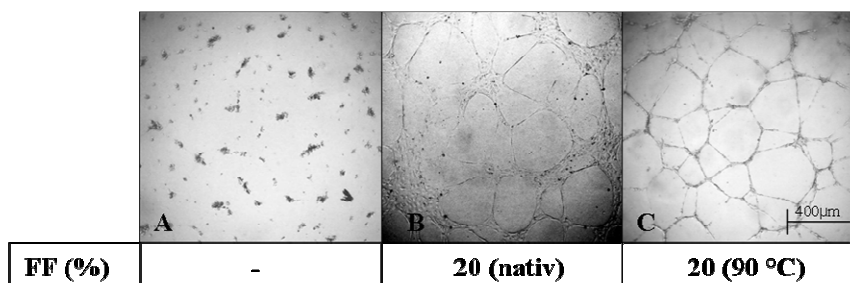


Abbildung 11: Stimulation der Tubulusformation von HUVEC Zellen nach Inkubation mit nativer (B) und hitzebehandelter FF (C). Die mikroskopischen Bildausschnitte von Stichproben sind im Vergleich zu unbehandelten Zellen (A) dargestellt. Vergrößerung 40x.

Abbildung 11 zeigt, daß die Behandlung der HUVEC Zellen mit 20 % hitzebehandelter FF (Abb. 11 C) die Tubulusformation im Vergleich mit nativer FF (Abb. 11 B) nur geringfügig reduzierte. Hitzebehandelte FF hat damit nicht nur mito- sondern auch angiogene Effekte auf HUVEC Zellen, die auf thermostabile Komponenten der FF zurückzuführen sein könnten.

3.1.4. Bedeutung von VEGF₁₆₅ und bFGF für angiogene Prozesse

Publizierte Daten anderer Arbeitsgruppen zeigen den Nachweis der Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF in FF und deren zentrale Bedeutung für die peri- und postovarielle Angiogenese (Reynolds und Redmer, 1998; Stouffer et al., 2001; Gutmann et al., 2008). Im Gegensatz zu bFGF ist VEGF aufgrund seiner biochemischen Struktur mit 16 Cysteinresten und den sich daraus ergebenden Disulfidbrücken, welche die VEGF Monomere verbinden, hitzestabil und muß daher als mito- und angiogene Komponente der hitzebehandelten FF in Betracht gezogen werden. VEGF kommt in fünf verschiedenen Isoformen vor, von denen VEGF₁₆₅ die biologisch aktivste Form ist (Ferrara et al., 1992). Deshalb wurden mittels ELISA die Konzentrationen von VEGF₁₆₅ und bFGF in nativen und von hitzebehandelten (90 °C) FF-Pools bestimmt, die in Tabelle 3 gezeigt sind. In nativer FF wurden durchschnittlich $3,6 \pm 0,9$ ng/ml VEGF₁₆₅ und $0,15 \pm 0,02$ ng/ml bFGF gemessen.

Folikelflüssigkeit Pool	VEGF ₁₆₅ (ng/ml) nativ	VEGF ₁₆₅ (ng/ml) 90 °C	bFGF (ng/ml) Nativ	bFGF (pg/ml) 90 °C
1	3,5 ±0,06	1,3 ±0,05	0,13 ±0,01	< 3
2	4,6 ±0,09	3,5 ±0,03	0,16 ±0,01	< 3
3	2,6 ±0,05	1,8 ±0,06	0,17 ±0,01	< 3

Tabelle 3: Konzentrationsbestimmung von VEGF₁₆₅ und bFGF in nativer und hitzebehandelter FF. Die Quantifizierung der Wachstumsfaktoren erfolgte mit einem Quantikine® ELISA von drei nativen und hitzebehandelten Follikelflüssigkeit-Pools. Die Nachweisgrenzen sind vom Hersteller für VEGF₁₆₅ mit < 5 pg/ml und bFGF mit < 3 pg/ml angegeben.

Nach Erhitzen der FF für 30 min bei 90 °C war die VEGF₁₆₅ Konzentration um 61,1 % auf durchschnittlich 2,2 ±0,9 ng/ml reduziert, während bFGF nach Hitzebehandlung nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Die im ELISA erhobenen Daten weisen darauf hin, daß bFGF nicht der mitogene Faktor in hitzebehandelter FF ist, VEGF₁₆₅ aufgrund der Thermostabilität als Mito- und Angiogen aber berücksichtigt werden muß.

3.1.4.1. Stimulation der Proliferation und Tubulusformation mit rh bFGF

Nachfolgend wurde zunächst der Einfluß von bFGF auf die Proliferation und Tubulusformation der HUVEC Zellen untersucht. Dafür wurden die Zellen mit rekombinant humanem (rh) bFGF behandelt. Von besonderem Interesse waren bei diesen Untersuchungen die in FF gemessenen Konzentrationen des Wachstumsfaktors. Abbildung 12 zeigt, daß die Inkubation der Zellen mit 0,1 ng/ml rh bFGF bzw. 0,2 ng/ml rh bFGF im Vergleich zur unbehandelten Kontrollen nicht zu einem signifikanten Anstieg der Proliferation führte. Eine maximale Stimulation des Zellwachstums wurde bei 0,5 ng/ml rh bFGF mit 129,7 ±9,9 % detektiert. Der Einsatz von 10 ng/ml rh bFGF hatte keine weitere Zunahme der Proliferation zur Folge. Als Positivkontrolle wurden HUVEC Zellen mit 80 % FF inkubiert. Das entspricht, bezogen auf die in FF gemessene bFGF Konzentration, ca. 0,12 ng/ml bFGF. Die Proliferation nach Behandlung der Zellen mit 80 % FF war mit 241,3 ±10,5 % jedoch deutlich höher, als mit der entsprechenden rh bFGF Konzentration. Hitzebehandeltes rh bFGF hatte keinen Einfluß auf das Zellwachstum.

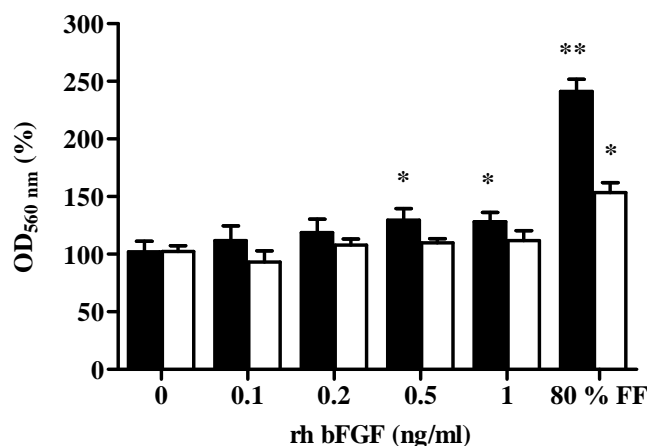


Abbildung 12: Stimulation der Proliferation von HUVEC Zellen nach Inkubation mit rh bFGF vor (■) und nach (□) Hitzebehandlung. Die OD_{560 nm} ±SD (%) von rh bFGF behandelten Zellen ist relativ zu unbehandelten Zellen als Kontrolle dargestellt. Als Positivkontrolle wurde FF eingesetzt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt. *p<0,05.

Die Untersuchungen zur Tubulusformation nach Stimulation mit rh bFGF bestätigten die Resultate aus den Proliferationsexperimenten und des ELISA.

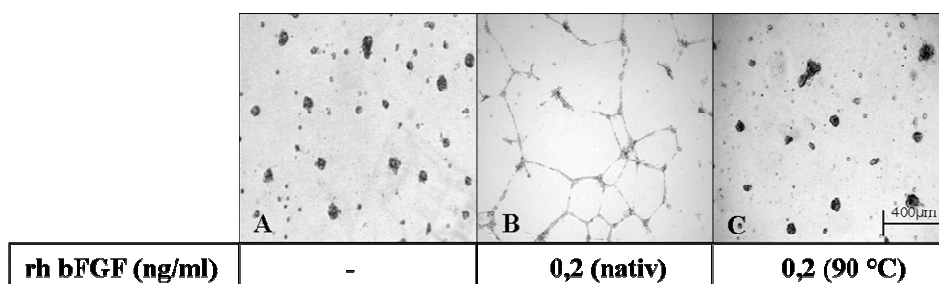


Abbildung 13: Tubulusformation von HUVEC Zellen nach Inkubation mit nativem (B) und hitzebehandeltem rh bFGF (C). Die mikroskopischen Bildausschnitte von Stichproben sind im Vergleich zu unbehandelten Zellen (A) dargestellt. Vergrößerung 40x.

Abbildung 13 zeigt, daß die Inkubation der HUVEC Zellen mit 0,2 ng/ml rh bFGF die Bildung neuer Tubuli induzierte (Abb. 13 B). Mit 0,2 ng/ml hitzebehandeltem rh bFGF war dieser Effekt nicht zu beobachten (Abb. 13 C). Diese Ergebnisse zeigen, daß bFGF als Bestandteil nativer FF zwar angiogen wirksam ist, vermutlich aber nur zu einem geringen Anteil an der starken angiogenen Aktivität der FF beteiligt ist. Der Wachstumsfaktor hat jedoch keine Relevanz für die angiogene Aktivität hitzebehandelter FF.

3.1.4.2. Stimulation der Proliferation und Tubulusformation mit rh VEGF₁₆₅

Aufgrund der Hitzestabilität von VEGF wurde anschließend geprüft, welchen Einfluß hitzebehandeltes rh VEGF₁₆₅ im Vergleich zu unbehandeltem rh VEGF₁₆₅ auf das

Wachstum und die Tubulusformation der HUVEC Zellen hat. Abbildung 14 zeigt, daß die Behandlung der Zellen mit 4 ng/ml rh VEGF₁₆₅ das Zellwachstum im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf 135,1 ±11,8 % stimulierte. Mit steigenden rh VEGF₁₆₅ Konzentrationen wurde keine weitere Zunahme der Proliferation erzielt.

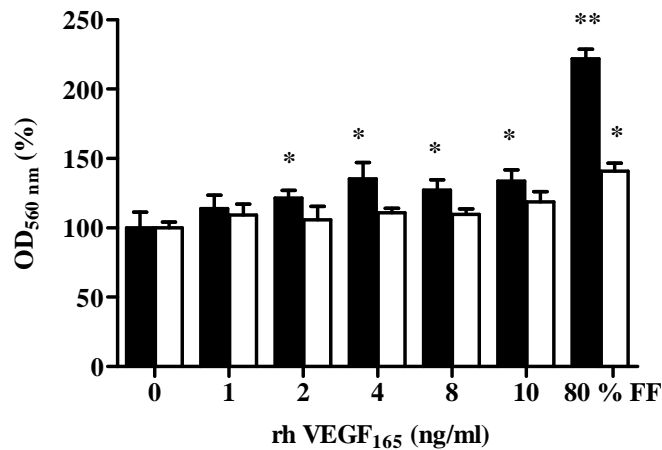


Abbildung 14: Proliferation von HUVEC Zellen nach Inkubation mit rh VEGF₁₆₅ vor (■) und nach (□) Hitzebehandlung. Die OD_{560 nm} ±SD (%) von rh VEGF₁₆₅ behandelten Zellen ist relativ zu unbehandelten Zellen dargestellt. Als Positivkontrolle wurden native und hitzebehandelte FF eingesetzt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt. *p<0,05.

Der stimulatorische Effekt von 80 % nativer FF, die ca. 2,9 ng/ml VEGF₁₆₅ enthält, war mit 222,0 ±6,9 % deutlich höher als mit 2 ng/ml VEGF₁₆₅ bzw. 4 ng/ml rh VEGF₁₆₅. Die Inkubation der HUVEC Zellen mit hitzebehandeltem rh VEGF₁₆₅ hatte keine signifikant stimulatorischen Effekte auf das Zellwachstum.

In Analogie zu den Experimenten mit rh bFGF, wurde der Effekt von rh VEGF₁₆₅ vor und nach Hitzebehandlung auf die Tubulusformation von HUVEC Zellen untersucht. Abbildung 15 zeigt, daß 2 ng/ml rh VEGF₁₆₅ die Tubulusbildung stimuliert (Abb. 15 B).

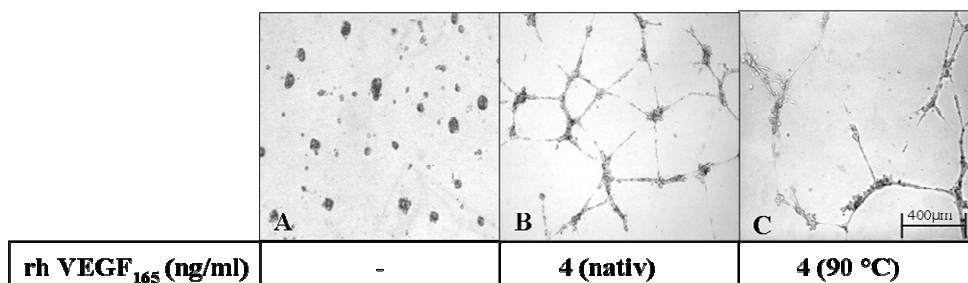


Abbildung 15: Stimulation der Tubulusformation von HUVEC Zellen nach Inkubation mit nativen (B) und hitzebehandeltem rh VEGF₁₆₅ (C). Die mikroskopischen Bildausschnitte von Stichproben sind im Vergleich zu unbehandelten Zellen (A) dargestellt. Vergrößerung 40x.

Dieser Effekt war nach Hitzebehandlung des Wachstumsfaktors deutlich reduziert (Abb.

15 C). Aus diesen Resultaten läßt sich schlußfolgern, daß VEGF₁₆₅ aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften zwar thermostabil ist, die biologische Aktivität des Wachstumsfaktors nach Hitzebehandlung den mitogenen Effekt hitzebehandelter FF jedoch nicht ausreichend erklärt.

3.1.4.3. Ausschluß synergistischer Effekte von rh VEGF₁₆₅ und rh bFGF

Neben den stimulatorischen Eigenschaften auf das Wachstum und die Tubulusformation von HUVEC Zellen jedes einzelnen Wachstumsfaktors, werden in der Literatur synergistische Effekte von VEGF und bFGF beschrieben (Pepper et al., 1998; Mason et al., 2002; Sun et al., 2004). Deshalb wurden die Zellen einzeln und im Gemisch mit den rh bFGF und rh VEGF₁₆₅ Konzentrationen inkubiert, die in den Vorversuchen zu einem maximalen Anstieg der Zellproliferation führten.

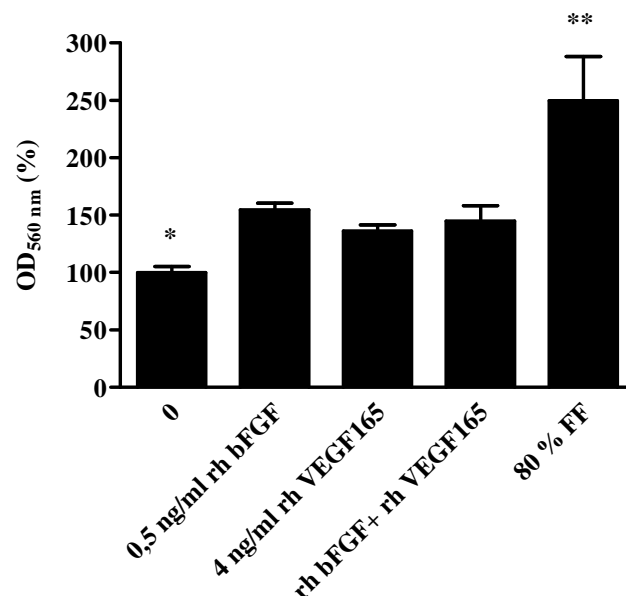


Abbildung 16: Proliferation von HUVEC Zellen nach Kostimulation mit rh bFGF und rh VEGF₁₆₅. Die OD_{560 nm} ±SD (%) der mit den rh Wachstumsfaktoren einzeln und im Gemisch behandelten Zellen ist relativ zu unbehandelten Zellen als Kontrolle dargestellt. Als Positivkontrolle wurde FF eingesetzt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zu mit beiden rh Wachstumsfaktoren behandelten Zellen ermittelt. *p<0,05; **p<0,01.

Abbildung 16 zeigt, daß 0,5 ng/ml rh bFGF die Proliferation der HUVEC Zellen auf 154,7 ±5,6 % und 4 ng/ml rh VEGF₁₆₅ auf 136,0 ±5,5 % im Vergleich zur Kontrolle stimulieren. Die Zunahme des Zellwachstums nach Inkubation der Zellen mit dem Gemisch beider rh Wachstumsfaktoren war mit 144,9 ±13,2 % nicht signifikant erhöht. Diese Ergebnisse zeigten auch die Untersuchungen zur Tubulusformation, die in Abbildung 17 dargestellt sind. Nach Kostimulation der Zellen mit beiden rh Wachstumsfaktoren wurde keine Veränderung der Tubulusbildung im Vergleich mit den einzelnen Wachstumsfaktoren

behandelten Zellen detektiert (Abb. 17 B). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß bFGF und VEGF₁₆₅ für die FF-stimulierte Tubulusformation möglicherweise von untergeordneter Bedeutung sind.

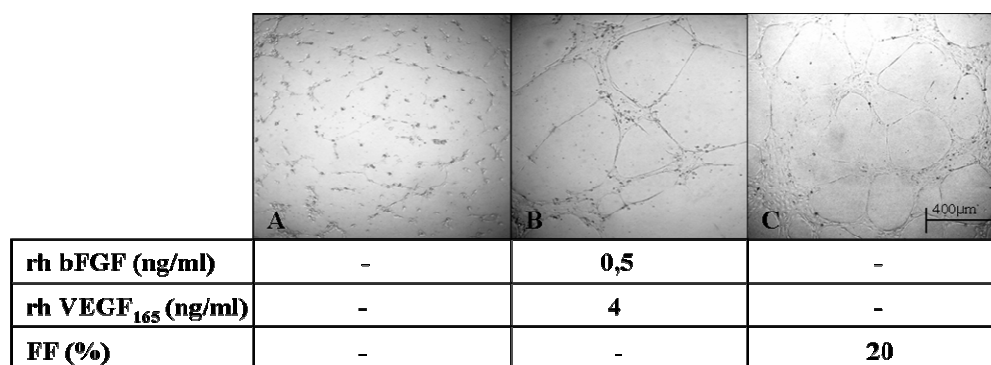


Abbildung 17: Tubulusformation von HUVEC Zellen nach Kostimulation mit rh bFGF und rh VEGF₁₆₅ (B). Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit FF inkubiert (C). Die mikroskopischen Bildausschnitte von Stichproben sind im Vergleich zu unbehandelten Zellen (A) dargestellt. Vergrößerung 40x.

3.1.4.4. Stimulation der Proliferation und Tubulusformation mit FF nach Immunodepletion von bFGF und VEGF

Zur weiteren Abklärung einer möglichen Beteiligung von bFGF und VEGF an der mitogen- und angiogenen Aktivität von FF wurden beide Wachstumsfaktoren durch den Einsatz von Antikörpern aus FF entfernt (Immunodepletion). Dafür wurde 300 µl FF, die im Durchschnitt 45 pg bFGF und 150 pg VEGF₁₆₅ enthält, mit Antikörpern gegen bFGF und VEGF im Überschuß inkubiert. Die an die Antikörper gebundenen Wachstumsfaktoren wurden nachfolgend durch die Bindung des Antikörpers an Protein A Sepharose aus der FF entfernt und die behandelte FF in die Proliferationsexperimente eingesetzt. Als Kontrollen wurden gleiche Zellkulturansätze mit FF, rh bFGF bzw. rh VEGF₁₆₅ ohne Antikörper mit den Konzentrationen inkubiert, bei denen zuvor eine maximale Stimulation der Zellproliferation gemessen wurde. Zusätzlich wurden isotypspezifische, jedoch für das Epitop nicht relevante Antikörper eingesetzt, um antikörperbedingte, unspezifische Effekte ausschließen zu können. Diese Ansätze hatten keinen Einfluß auf die mit 80 % FF stimulierte Proliferation der HUVEC Zellen (Abb. nicht gezeigt). Parallel dazu wurden die bFGF und VEGF₁₆₅ Konzentrationen aus Aliquots (100µl) der FF nach Immunodepletion mittels ELISA bestimmt, um zu überprüfen, ob Immunodepletion erfolgreich war. In Abbildung 18 ist gezeigt, daß die FF-stimulierte Proliferation der HUVEC Zellen durch Zugabe der Antikörper gegen die Wachstumsfaktoren nur geringfügig reduziert wurde. Dieser Effekt war nur nach Behandlung der FF mit dem bFGF Antikörper signifikant. Das

Zellwachstum wurde nach bFGF Immunodepletion von $248,3 \pm 18,9$ % auf $224,6 \pm 21,7$ % reduziert. Die Behandlung der Zellen mit 0,5 ng/ml rh bFGF und 4 ng/ml rhVEGF₁₆₅ nach Immunodepletion hatte keinen stimulatorischen Effekt auf die Proliferation.

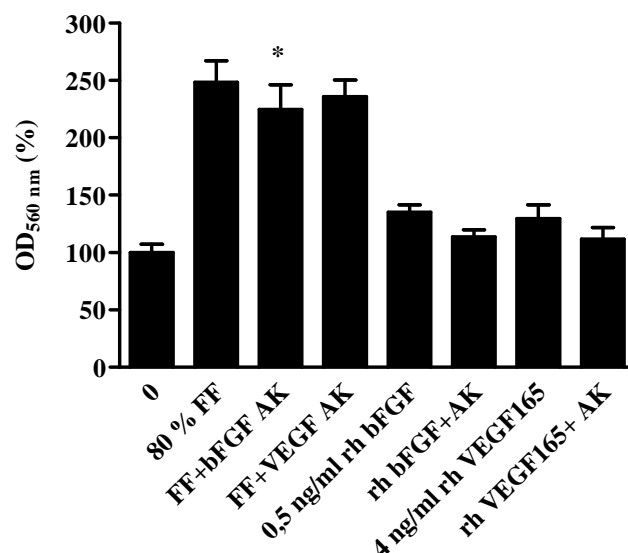


Abbildung 18: Stimulation der Proliferation von HUVEC Zellen mit FF nach Immunodepletion von bFGF und VEGF. Die OD_{560 nm} ± SD (%) der Zellen nach Immunodepletion mit spezifischen Antikörpern (AK) ist relativ zu unbehandelten Zellen dargestellt. Als Kontrolle wurden rh bFGF und rh VEGF₁₆₅, die wie FF behandelt wurden und native FF eingesetzt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zu unbehandelter FF, rh bFGF und rh VEGF₁₆₅ ermittelt. *p<0,05.

Ähnliche Ergebnisse lieferten die Experimenten zur Tubulusformation. In Abbildung 19 ist gezeigt, daß die Ausbildung der Tubuli durch die Immunodepletion nur geringfügig beeinflusst wurde (19 C und D).

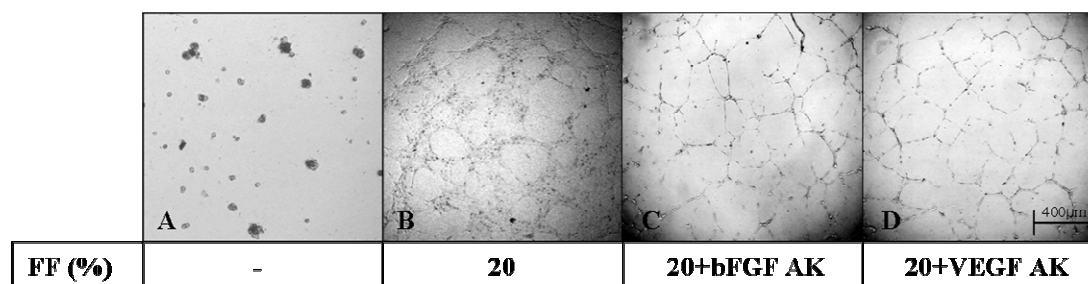


Abbildung 19: Stimulation der Tubulusformation von HUVEC Zellen mit FF nach Immunodepletion von rh bFGF (C) und rh VEGF₁₆₅ (D). Die mikroskopischen Bildausschnitte von Stichproben sind im Vergleich zu unbehandelten (A) und mit nativer FF behandelten Zellen (B) dargestellt. Vergrößerung 40x.

Mit der anschließenden Quantifizierung von bFGF und VEGF₁₆₅ im ELISA konnte keiner der Wachstumsfaktoren in der behandelten FF innerhalb der angegebenen

Detektionsgrenzen (VEGF₁₆₅ <5 pg/ml; bFGF <3 pg/ml) nachgewiesen werden.

3.1.5. Identifizierung und Charakterisierung von FHDL als Mito- und Angiogen hitzebehandelter FF

3.1.5.1. Identifizierung eines proteinreichen Pools als Mitogen hitzebehandelter FF

Die weitere Aufreinigung der mitogenen Aktivität aus hitzebehandelter FF wurde von den Kooperationspartnern, Dr. Paletta und Prof. Dr. Nofer, vom Institut für Arterioskleroseforschung und vom Institut für Trauma-, Hand-, und Wiederherstellungschirurgie der Universität Münster, durchgeführt. Durch Ionen-Austausch-Chromatographie auf einer DEAE-Sepharose-Säule wurden über einen linearen NaCl-Gradienten verschiedene Fraktionen hitzebehandelter FF isoliert, die von den Kooperationspartnern auf ihre mitogene Aktivität untersucht wurden. Es zeigte sich, daß drei proteinreiche Fraktionen der hitzebehandelten FF die Proliferation der HUVEC Zellen stimulierten (Abb. nicht gezeigt). Diese Fraktionen wurden gepoolt, entsalzt und die mitogene Aktivität des Pools im Vergleich zu hitzebehandelter FF abschließend an HUVEC Zellen getestet. Abbildung 20 zeigt, daß die Proliferation der Zellen nach Inkubation mit der gepoolten proteinreichen DEAE-Fraktion im Vergleich zu hitzebehandelter FF auf $643,7 \pm 88,5$ % erhöht war.

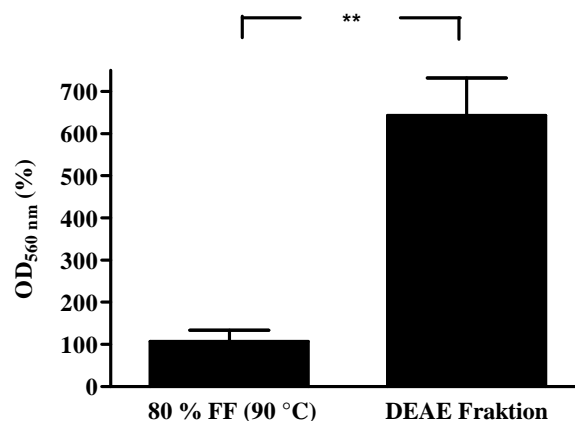


Abbildung 20: Stimulation der Proliferation von HUVEC Zellen nach Inkubation mit der DEAE-Fraktion hitzebehandelter FF. Die OD_{560 nm} ± SD (%) der Zellen nach Behandlung mit der proteinreichen DEAE-Fraktionen ist relativ zum mitogenen Effekt von hitzebehandelter FF dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zur Behandlung mit hitzebehandelter FF ermittelt. **p<0,001.

Dieser Anstieg resultierte wahrscheinlich aus einer Anreicherung der mitogenen Aktivität in dem Pool der proteinreichen Fraktion.

3.1.5.2. Identifizierung von Apolipoprotein A-I und A-IV als Bestandteile des mitogenen Pools

Die weitere Charakterisierung des mitogenen Proteinpools der hitzebehandelten FF wurde von den Kooperationspartnern in Münster durchgeführt. Nach einer SDS-Gelelektrophorese und anschließender Färbung des Gels mit Serva Blue R zeigte sich, daß der mitogene Pool in fünf Banden mit einem Molekulargewicht von 14 kDA, 28 kDA, 43 kDA, 47 kDA und 50 kDa aufgetrennt wurde. Diese Banden wurden ausgeschnitten, in Peptidfragmente gespalten und die gereinigten Peptide mit einer MALDI TOF Massenspektrometrie analysiert (Shevchenko et al., 1996). Nach Abgleich der erhaltenen Peptidsequenzen mit SwissProt Datenbanken wurden die Apolipoproteine ApoA-I und ApoA-IV als Hauptbestandteile der Proteinbanden bei 28 kDA und 43 kDA identifiziert. Aussagen über die Identität der Banden mit einer Größe von 47 kDA und 50 kDA konnten nicht getroffen werden. Zusätzlich wurde eine Vielzahl schwach gefärbter Banden mit geringerem Molekulargewicht und Modifikationen verschiedener Aminosäurereste der Apolipoproteine nachgewiesen. Für die weiteren Untersuchungen wurde auf diese Komponenten des proteinreichen, mitogenen Pools von hitzebehandelter FF nicht näher eingegangen. Die Apolipoproteine ApoA-I und ApoA-IV sind die am häufigsten vorkommenden Proteine auf HDL-Partikeln. Daher wurde aus diesen Ergebnissen die Hypothese abgeleitet, daß die mitogene Aktivität von hitzebehandelter FF auf follikuläres HDL (FHDL) zurückzuführen sein könnte.

3.1.5.3. Stimulation der Proliferation und Tubulusformation mit FHDL

Nachfolgend wurde geprüft, ob FHDL die Proliferation und Tubulusformation von HUVEC Zellen beeinflusst. Dafür wurde aus FF-Pools mittels Dichte-Gradienten-Zentrifugation (Havel et al., 1955) von den Kooperationspartnern in Münster FHDL isoliert, die Proteinkonzentration bestimmt und HUVEC Zellen mit unterschiedlichen FHDL Konzentrationen behandelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 und 22 dargestellt. Abbildung 21 zeigt, daß FHDL das Wachstum der Zellen dosisabhängig bis zu einem maximalen Anstieg auf $222,6 \pm 38,8$ % bei 0,4 mg/ml FHDL stimuliert. Die Inkubation der Zellen mit höheren FHDL Konzentrationen reduzierte die Zellproliferation auf $191,7 \pm 46,3$ % bis 2 mg/ml FHDL. Dieser Effekt war nicht abhängig von der Inkubationszeit, d. h. eine Steigerung der Zellproliferation nach 48 h bzw. 72 h wurde nicht detektiert (Abb. nicht gezeigt).

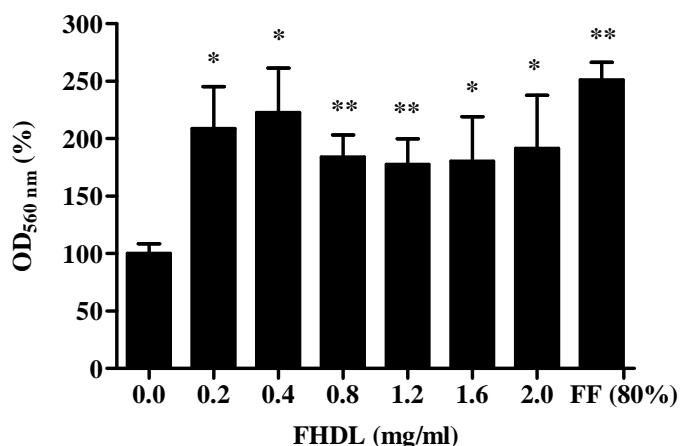


Abbildung 21: Stimulation der Proliferation von HUVEC Zellen nach Behandlung mit FHDL. Die OD_{560 nm} ± SD (%) der Zellen nach Behandlung mit FHDL ist relativ zu unbehandelten Zellen als Kontrolle dargestellt. Als Positivkontrolle wurde FF eingesetzt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zur unbehandelten Zellen ermittelt. *p<0,05; **p<0,01.

Um zu klären, ob FHDL auch die Tubulusformation der HUVEC Zellen beeinflusst, wurden die Zellen auf einer Matrigel™ Matrix mit den FHDL Konzentrationen inkubiert, die in den vorangegangenen Untersuchungen die Zellproliferation maximal stimulierten. In Abbildung 22 ist gezeigt, daß 0,2 mg/ml FHDL (Abb. 22 B) und 0,4 mg/ml FHDL (Abb. 22 C) die Tubulusformation dosisabhängig stimulierten.

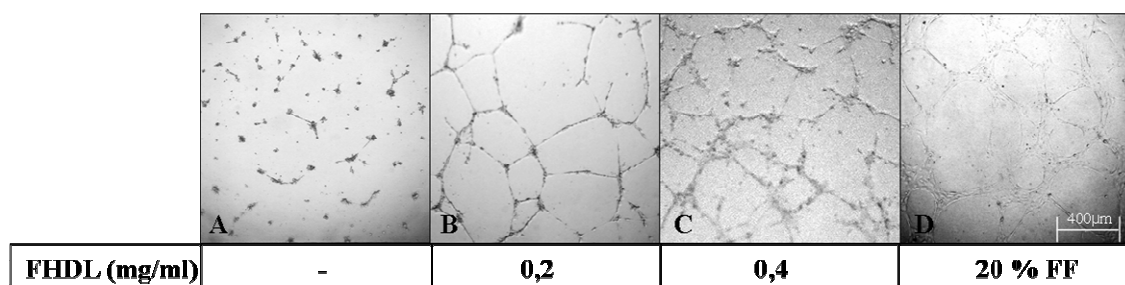


Abbildung 22: Dosisabhängige Stimulation der Tubulusformation von HUVEC Zellen nach Inkubation mit FHDL (B und C). Die mikroskopischen Bildausschnitte von Stichproben sind im Vergleich zu unbehandelten Zellen (A) und FF als Positivkontrolle dargestellt (D). Vergrößerung 40x.

Weitere Hinweise für den mito- und angiogenen Effekt von FHDL lieferten Untersuchungen mit FHDL-depletierter FF. Nach Isolierung von FHDL wurde die verbliebene FF entsalzt und in die Proliferationsexperimente eingesetzt. Abbildung 23 zeigt, daß FHDL-depletierete FF die Proliferation der Zellen auf $133,3 \pm 4,5$ % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle stimulierte. Dieser Effekt war deutlich geringer als mit nativer FF ($362,5 \pm 41,5$ %).

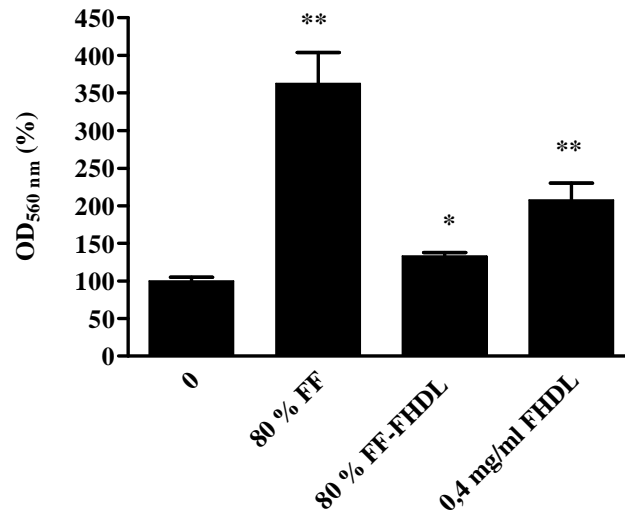


Abbildung 23: Reduktion der Proliferation von HUVEC Zellen nach Behandlung mit FHDL-depletierter Follikelflüssigkeit (FF-HDL). Die OD_{560 nm} ± SD (%) der Zellen nach Behandlung mit FF, FF-HDL und FHDL ist relativ zu unbehandelten Zellen als Kontrolle dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt. *p<0,05; **p<0,01.

Die Behandlung der Zellen mit 0,4 mg/ml FHDL steigerte das Zellwachstum auf 207,5 ±22,4 %. Aufgrund dieser Daten war anzunehmen, daß FHDL maßgeblich an der mito- und angiogenen Aktivität von FF beteiligt ist.

3.1.6. Charakterisierung der mitogenen Aktivität von FHDL

3.1.6.1. Cholesterolreiches α -HDL als mitogene Fraktion von FHDL

Weiterführende Untersuchungen der Arbeitsgruppe des Kooperationspartners Prof. Dr. Nofer haben gezeigt, daß der ApoA-I Gehalt der verbliebenen Follikelflüssigkeit nach FHDL-Isolierung von 23,20 ±0,01 mg/dl auf 4,80 ±0,01 mg/dl (n=4) reduziert war. Ebenso sank der Gehalt von HDL-Cholesterol von 12,20 ±2,40 auf 2,25±1,50 mg/dl. Mit einer 2-Dimensionalen Gelelektrophorese konnte eine deutliche Reduktion der Phospholipide, der cholesterolreichen α - und eine geringe Reduktion der prä- β -HDL-Fraktion nach Ultrazentrifugation nachgewiesen werden (Abb. nicht gezeigt). Diese können aufgrund ihrer geringen Größe nicht in die zu isolierende FHDL-Fraktion während der Ultrazentrifugation flotieren. Das deutet darauf hin, daß überwiegend die cholesterolreiche α - im isolierten FHDL vorhanden und mitogen ist.

3.1.6.2. Stimulation der Proliferation und Tubulusformation mit hitzebehandeltem FHDL

Um Aufschluß darüber zu erhalten, welche Komponenten an der mito- und angiogenen

Aktivität von FHDL beteiligt sind, wurde zunächst natives FHDL in Analogie zur FF bei 90 °C erhitzt und mit Aktivkohle (AK) behandelt. Mit dieser Methode werden assoziierte Komponenten z. B. Hormone und Steroide entfernt. Anschließend wurde die Proliferation und Tubulusformation der Zellen im Vergleich zu nativem, unbehandeltem FHDL untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 und 25 gezeigt.

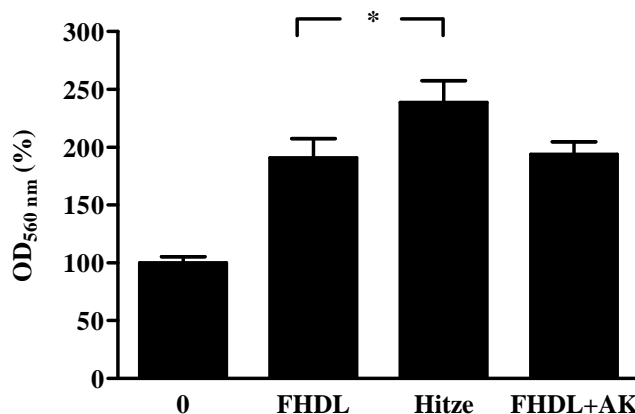


Abbildung 24: Stimulation der Proliferation von HUVEC Zellen nach Inkubation mit hitze- und AK-behandeltem FHDL. Die OD_{560 nm} ± SD (%) der Zellen nach Behandlung mit modifiziertem und nativem FHDL ist relativ zu unbehandelten Zellen als Kontrolle dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zu nativem, unbehandeltem FHDL ermittelt. *p<0,05.

In Abbildung 24 ist gezeigt, daß hitzebehandeltes FHDL das Zellwachstum mit 238,8 ± 18,8 % stärker stimulierte als unbehandeltes FHDL (190,7 ± 16,7 %). Die AK-Behandlung von FHDL hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Proliferation. Bei den Untersuchungen zur Tubulusformation zeigten sich ähnliche Ergebnisse (Abb. 25)

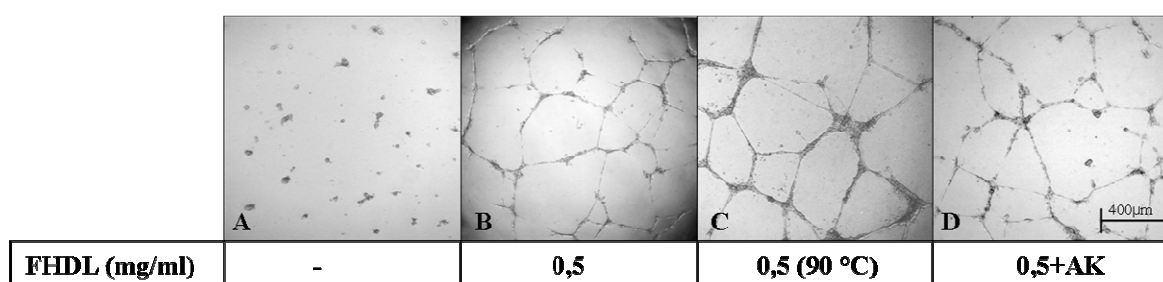


Abbildung 25: Stimulation der Tubulusformation von HUVEC Zellen nach Inkubation mit hitze- (C) und AK-behandeltem FHDL (D). Die mikroskopischen Bildausschnitte von Stichproben sind im Vergleich zu unbehandelten (A) und mit nativem FHDL behandelte Zellen (B) dargestellt. Vergrößerung 40x.

Die Hitzebehandlung hatte im Vergleich zu unbehandeltem FHDL keinen wesentlichen Effekt auf die Tubulusformation (Abb. 25 C). Nach Behandlung mit AK wurde eine geringfügig schwächere Ausbildung der Tubuli beobachtet (Abb. 25 D). Diese Daten

weisen darauf hin, daß die mito- und angiogene Aktivität von FHDL thermostabil ist und möglicherweise auf eine FHDL-assoziierte Komponente zurückzuführen ist.

3.1.6.3. Identifizierung der Lipidfraktion als Mitogen von FHDL

Um weitere Aufschlüsse darüber zu erhalten, welche FHDL-Bestandteile an der mito- und angiogenen Aktivität des Lipoproteines beteiligt sind, wurden FHDL-assoziierte Lipidfraktionen und Proteine in physiologisch wirksamen Konzentrationen in die Untersuchungen zur Zellproliferation mit einbezogen. Die dafür notwendigen Substanzen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Nofer zur Verfügung gestellt. Aus Abbildung 26 ist ersichtlich, daß nur die Behandlung der HUVEC Zellen mit der Lipidfraktion von FHDL, entsprechend 0,5 mg/ml FHDL, die Proliferation der Zellen mit $195,8 \pm 17,6$ % ähnlich stimulierte, wie FHDL. Gereinigtes ApoA-I, ApoA-IV, und Phosphatidylcholin Vesikel mit und ohne ApoA-I hatten keinen wachstumsfördernden Effekt.

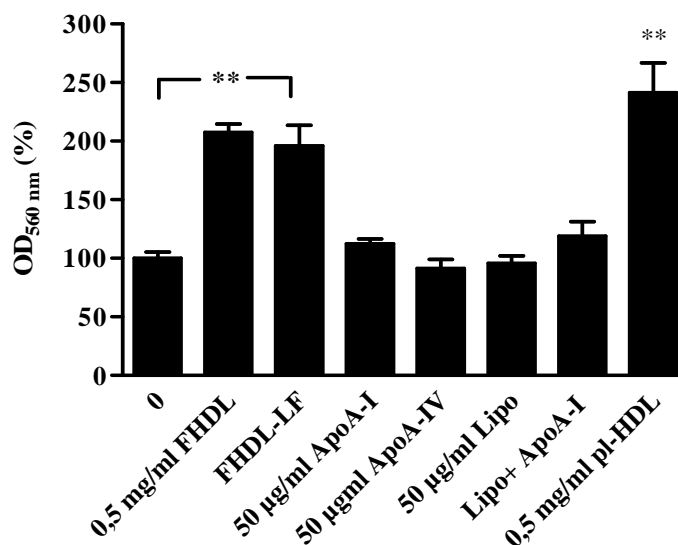


Abbildung 26: Stimulation der Proliferation von HUVEC Zellen nach Behandlung mit einer FHDL-Lipidfraktion (HDL-LF) äquivalent zu 0,5 mg/ml FHDL. Die Zellen wurden zusätzlich mit gereinigtem ApoA-I, ApoA-IV, Phosphatidylcholin Vesikeln (Lipo: 50 µg/ml Phospholipid), und ApoA-I-Phosphatidylcholin (LipoA-I mit 20 µg/ml Protein, 50 µg/ml Phospholipid) inkubiert. Als Positivkontrolle wurde plasmatisches HDL (pl-HDL) eingesetzt. Die OD_{560 nm} ± SD (%) der Zellen nach Behandlung mit den FHDL-Komponenten und pl-HDL ist relativ zu unbehandelten Zellen als Kontrolle dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt. **p<0,01.

Diese Ergebnisse zeigen, daß ein lipidärer, hitzstabiler Bestandteil des FHDL in die mitogene Aktivität des follikulären Lipoproteins involviert ist.

3.1.6.4. Quantifizierung von Sphingosin 1-Phosphat in FF und FHDL

Plasmatisches HDL enthält unterschiedliche, mitogen wirksame Lysophospholipide. Dazu gehören u. a. Lysophosphatidsäure (LPA) und Sphingosin 1-Phosphat (S1P) (Murata et al., 2000; Arai et al., 2004; Rivera und Chun 2008). Aus der Arterioskleroseforschung ist bekannt, daß vor allem das HDL-assoziierte S1P ist an den mito- und angiogenen Effekten des Lipoproteins beteiligt ist (Sattler und Levkau, 2009; Argraves et al., 2008). Deshalb wurde von den Kooperationspartnern in Münster mit Hilfe der HPLC Methode nach einer 2-Schritt Lipidextraktion untersucht, ob S1P in FF und FHDL im Vergleich zu plasmatischem HDL nachzuweisen ist. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl FF als auch FHDL S1P enthalten. In drei verschiedenen FF Pools wurden durchschnittlich 0,17 $\mu\text{mol/l}$ S1P gemessen. Zusätzlich wurde mit dieser Methode festgestellt, daß der S1P Gehalt in FF nach FHDL-Isolierung deutlich reduziert war. Das weist darauf hin, daß S1P in FF hauptsächlich mit FHDL assoziiert ist (Abb. nicht gezeigt).

3.1.6.5. Inaktivierung von FHDL mit Alkalischer Phosphatase

S1P ist ein Produkt aus dem Sphingomyelin-Stoffwechsel, das nur durch Phosphorylierung des Sphingosins über die Sphingosinkinase biologisch aktiv ist (Hannun und Obeid, 2008; Bartke und Hannun, 2008). Deshalb wurde überprüft, ob FHDL-assoziiertes S1P an den mito- und angiogenen Effekten von FHDL beteiligt sein könnte. Dafür wurde FHDL mit Alkalischer Phosphatase (AP) behandelt und das Zellwachstum im Vergleich zu FHDL gemessen, das der gleichen Behandlung, nur ohne Zugabe des Enzyms, unterzogen wurde.

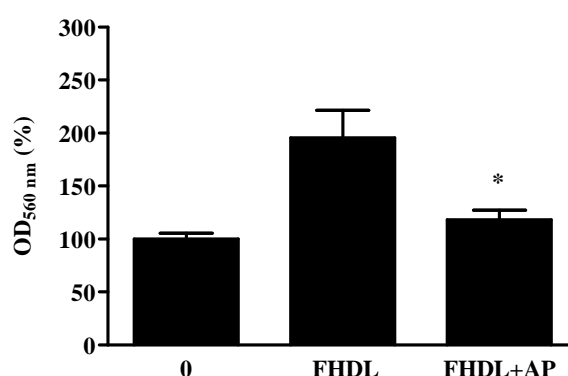


Abbildung 27: Reduzierte Proliferation von HUVEC Zellen nach Inkubation mit AP-behandeltem FHDL. Die OD_{560 nm} \pm SD (%) der Zellen nach Inkubation mit 0,5 mg/ml AP-behandeltem und unbehandeltem FHDL ist relativ zu unbehandelten Zellen als Kontrolle dargestellt. Die Signifikanz wurde im Vergleich zum mitogenen Effekt unbehandelter FF ermittelt. **p<0,01. *p<0,05

Abbildung 27 zeigt, daß die Stimulation der HUVEC Zellen mit 0,5 mg/ml AP-

behandeltem FHDL zu einer deutlichen Reduktion des FHDL stimulierten Zellwachstums von $195,6 \pm 26,0$ % auf $118,2 \pm 8,8$ % führte.

Die Untersuchungen zur Tubulusformation von HUVEC Zellen mit gleichen Versuchsansätzen bestätigten die Ergebnisse der Proliferationsexperimente. In Abbildung 28 ist gezeigt, daß die AP-Behandlung von FHDL im Vergleich zu unbehandeltem FHDL nur eine geringfügige Tubulusbildung induzierte (Abb. 28 C).

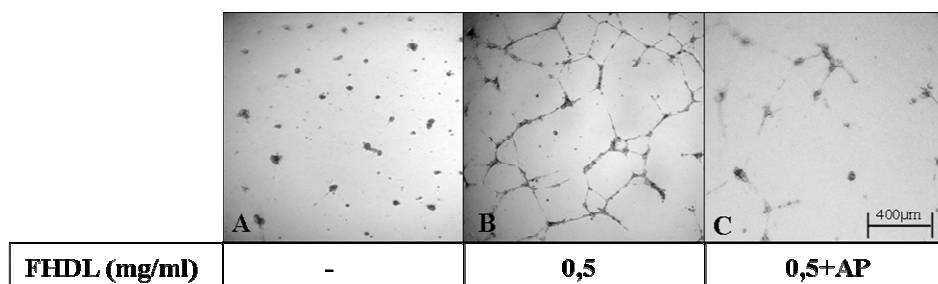


Abbildung 28: Reduzierte Tubulusformation von HUVEC Zellen nach Inkubation mit AP-behandeltem FHDL (C). Die mikroskopischen Bildausschnitte von Stichproben sind im Vergleich zu unbehandelten Zellen (A) und mit unbehandeltem FHDL inkubierten Zellen (B) dargestellt. Vergrößerung 40x.

Diese Daten lieferten deutliche Hinweise auf eine Beteiligung von S1P an der mito- und angiogenen Aktivität von FHDL. Dafür sprechen zusätzlich Analysen der Kooperationspartner mit modifiziertem FHDL. Nach AP-Behandlung war S1P im FHDL nicht mehr nachweisbar, während die Hitzebehandlung keinen Einfluß auf den S1P Gehalt hatte. Die Behandlung mit Aktivkohle reduzierte die S1P Menge von FHDL geringfügig (Abb. nicht gezeigt).

3.1.7. Stimulation der Proliferation und Tubulusformation mit S1P

Um zu zeigen, in wieweit S1P als FHDL-assoziiertes Lysosphingolipid an der mito- und angiogenen Aktivität von FHDL beteiligt ist, wurden HUVEC Zellen mit kommerziell erhältlichem S1P mit den Konzentrationen, die in FF gemessen wurden, behandelt und die Proliferation und Tubulusformation untersucht. Die Ergebnisse der Proliferationsexperimente sind in Abbildung 29 dargestellt. Die Stimulation der Zellen mit $0,15 \mu\text{mol/l}$ S1P führte zu einem maximalen Proliferationsanstieg auf $169,8 \pm 8,5$ % im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Dieser Effekt war geringer ausgeprägt als mit $0,5 \text{ mg/ml}$ FHDL und 80 % FF. Mit zunehmenden S1P Konzentrationen wurde keine weitere Steigerung des Zellwachstums erzielt. Bis $5 \mu\text{mol/l}$ S1P wurde die Proliferation auf $133,8 \pm 14,9$ % reduziert, $10 \mu\text{mol/l}$ S1P stimulierten das Zellwachstum nicht.

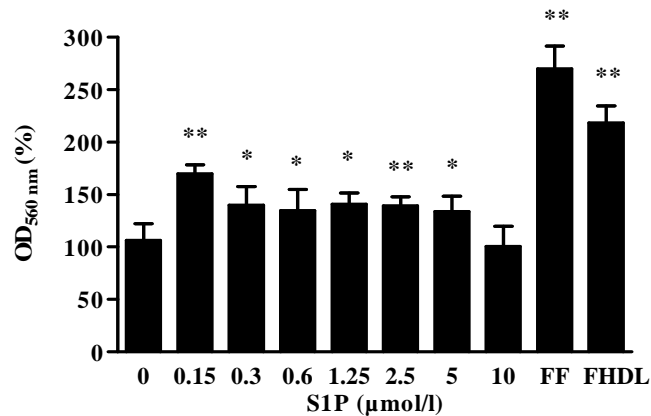


Abbildung 29: Stimulation der Proliferation von HUVEC Zellen nach Behandlung mit S1P. Die Zellen wurden mit S1P sowie mit 80 % FF und 0,5 mg/ml FHDL als Positivkontrollen behandelt. Die OD_{560 nm} ± SD (%) der Zellen nach Inkubation mit S1P, FF und FHDL ist relativ zu unbehandelten Zellen als Kontrolle dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt. *p<0,05; **p<0,01.

Die Ergebnisse zur Tubulusformation mit S1P, die in Abbildung 30 dargestellt sind, zeigten, daß die Ausbildung der Tubuli mit 0,15 µmol/l S1P am stärksten induziert wurde (Abb. 30 B). Ein Konzentrationsanstieg auf 0,3 µmol/l S1P führte zu einer geringeren Tubulusformation (Abb. 30 C), die bis 1 µmol/l S1P ein identisches Bild mit den Kontrollen zeigten (Abb. nicht gezeigt).

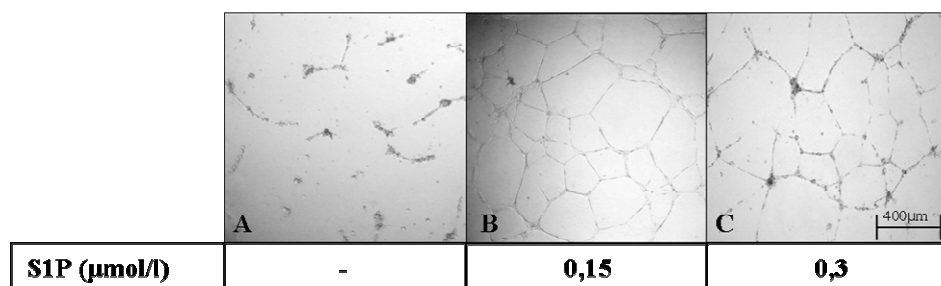


Abbildung 30: Stimulation der Tubulusformation von HUVEC Zellen nach Behandlung mit S1P (B und C). Die mikroskopischen Bildausschnitte von Stichproben sind im Vergleich zu unbehandelten Zellen (A) dargestellt. Vergrößerung 40x.

Diese Ergebnisse zeigen, daß S1P in den Konzentrationen, die in FF gemessen wurden, das Wachstum und Tubulusformation von HUVEC Zellen maximal stimuliert.

3.1.7.1. Inaktivierung von S1P mit Alkalischer Phosphatase

Weitere Hinweise darauf, daß S1P an der mito- und angiogenen Aktivität von FHDL beteiligt ist, sollten Untersuchungen zur Proliferation und Tubulusformation liefern, bei denen S1P in Analogie zu den Experimenten mit FHDL mit AP behandelt wurde.

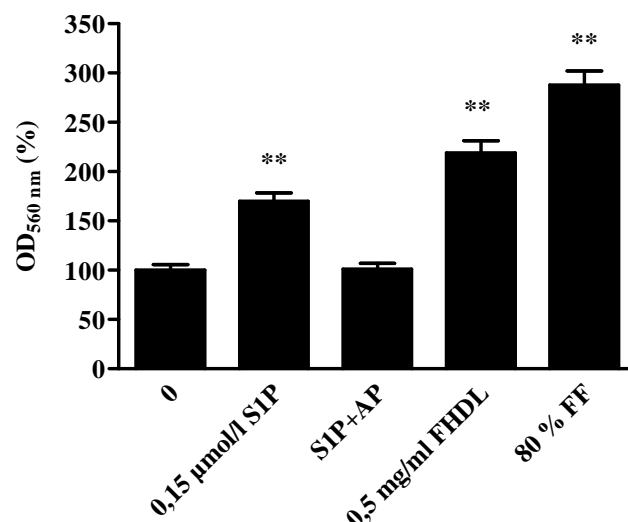


Abbildung 34: Reduktion der Proliferation von HUVEC Zellen nach Inkubation mit AP-behandeltem S1P. Die OD_{560 nm} ± SD (%) der Zellen nach Inkubation mit AP-behandeltem und unbehandeltem S1P ist relativ zu unbehandelten Zellen als Kontrolle dargestellt. Als Positivkontrollen wurden FHDl und FF eingesetzt. Die Signifikanzen wurden zu unbehandelten Zellen ermittelt ** p<0,01.

Die Ergebnisse in Abbildung 34 und 35 zeigen, daß die Proliferation und die Tubulusformation durch die AP-Behandlung im Vergleich zu unbehandeltem S1P auf Werte der Kontrolle reduziert waren (Abb. 35 C).

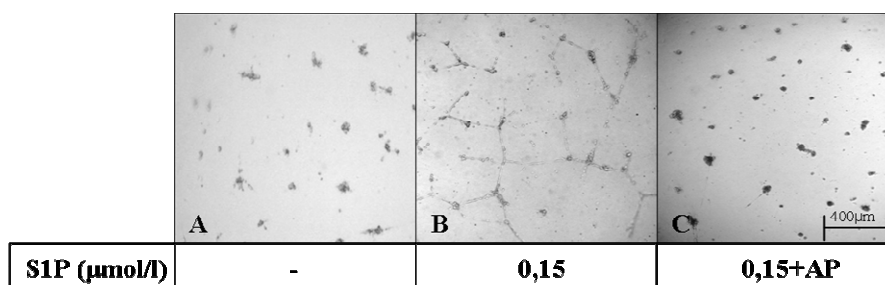


Abbildung 35: Reduzierte Tubulusformation von HUVEC Zellen nach Stimulation mit AP-behandeltem S1P (C). Die mikroskopischen Bildausschnitte von Stichproben sind im Vergleich zu unbehandelten Zellen (A) und mit unbehandeltem S1P inkubierte Zellen (B) dargestellt. Vergrößerung 40x.

Diese Resultate weisen darauf hin, daß S1P ein mito- und angiogener Faktor von FHDl ist.

3.1.8. Untersuchungen zur Signaltransduktion

3.1.8.1. Beteiligung der PI3-Kinase, Proteinkinase C und ERK an der FF-, FHDL- und S1P-stimulierten Proliferation

Aus Studien über die mitogene Aktivität von plasmatischem HDL und S1P an HUVEC Zellen ist bekannt, daß die Effekte von HDL und S1P über gemeinsame Signaltransduktionswege vermittelt werden (Mineo et al., 2003; von Eckardstein et al., 2005; Fieber et al., 2006; Sumi et al., 2007; Wang et al., 2008). Ein zentraler Mediator für Proliferation und Angiogenese von HUVEC Zellen durch plasmatisches HDL ist die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase). Ob diese und andere Kinasen für die mito- und angiogenen Effekte von FF, FHDL und S1P von Bedeutung sind, sollte mit pharmakologischen Inhibitoren der für die Proliferation und Tubulusformation relevanten Kinasen untersucht werden (Mendez, et al., 1991; Möllers et al., 1995; Garver et al., 1997; Kimura, et al., 2001; Kimura, et al., 2006). Dafür wurden die Zellen 30 min mit 25 $\mu\text{mol/l}$ Ly29004, einem PI3-Kinase Inhibitor, 12,5 $\mu\text{mol/l}$ H7, einem Proteinkinase C (PCK) Hemmer und 25 $\mu\text{mol/l}$ PD98059, einem Inhibitor der MEK-1 Kinase vermittelten ERK1/2 Aktivierung, vorbehandelt. Anschließend wurden Zellen in Anwesenheit der Inhibitoren mit FF, FHDL und S1P inkubiert und das Zellwachstum im Vergleich zu nicht mit den Inhibitoren vorbehandelten und unbehandelten Zellen gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 36 dargestellt.

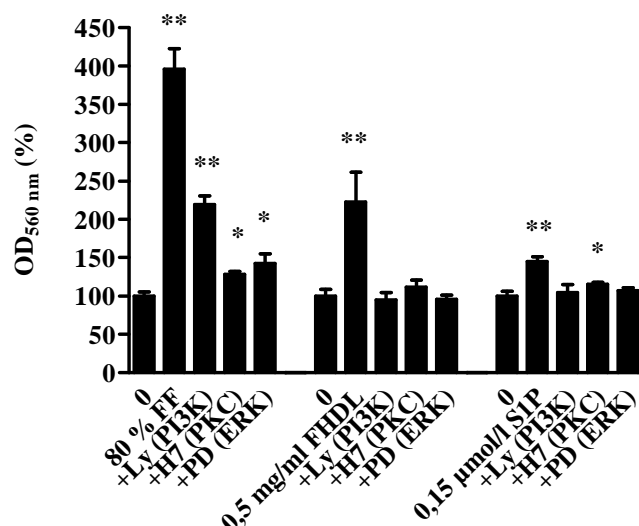


Abbildung 36: Proliferation von HUVEC Zellen nach Behandlung mit Kinase-Inhibitoren sowie FF, FHDL und S1P. Die OD_{560 nm} \pm SD (%) der behandelten Zellen ist relativ zu den mit den Lösungsmitteln der Inhibitoren behandelte Zellen als Kontrolle dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ermittelt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Die Vorbehandlung der Zellen mit Ly29004 reduzierte die mit 80 % FF stimulierte Proliferation teilweise von $395,7 \pm 26,7$ % auf $219,4 \pm 11$ %. Im Gegensatz dazu konnte nach Inkubation der Zellen mit 0,5 mg/ml FHDL und 0,15 $\mu\text{mol/l}$ S1P mit diesem Inhibitor im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle keine signifikant veränderte Proliferation nachgewiesen werden. Als nachgeschaltete Kinasen der PI3-Kinase sind u. a. Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinasen (MAP-Kinasen), Extrazellulär-Regulierte-Kinasen (ERK) und die Proteinkinase C (PKC) beschrieben (Kawasaki et al., 2003; Mineo et al., 2003; Schmidt et al., 2006). Deshalb wurden Inhibitoren für diese Kinasen in die Untersuchungen einbezogen. Die Vorbehandlung der Zellen mit dem PKC Inhibitor H7 reduzierte das Zellwachstum nach Inkubation mit 80 % FF deutlich auf $127,9 \pm 4,1$ %. Die gemessenen Werte waren jedoch signifikant zur Lösungsmittelkontrolle erhöht. Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem Inhibitor, FHDL und S1P gemessen. Nach Vorbehandlung der Zellen mit H7 wurde nur durch Inkubation mit 0,15 $\mu\text{mol/l}$ S1P mit $115,2 \pm 2,7$ % ein zur Lösungsmittelkontrolle signifikant erhöhtes Zellwachstum detektiert. Die FHDL-stimulierte Proliferation wurde durch den Inhibitor vollständig gehemmt. Die Hemmung der ERK-Aktivierung mit PD98059 und die anschließende Inkubation der Zellen mit FF induzierten mit $142, \pm 12,5$ % ein deutlich geringeres Wachstum als ohne den Inhibitor ($395,7 \pm 26,7$ %). Die FHDL- und S1P-stimulierte Proliferation wurde mit PD98059 vollständig auf Werte der Lösungsmittelkontrolle reduziert.

Diese Ergebnisse zeigen die zentrale Beteiligung der PI3-Kinase, ERK und der PKC an den mito- und angiogenen Effekten von FHDL und S1P. Für das FF-stimulierte Zellwachstum von HUVEC Zellen scheinen diese Kinasen jedoch nur bedingt relevant zu sein.

3.1.8.2. Nachweis von Proteinphosphorylierungen involvierter Kinasen

3.1.8.2.1. Stimulation der Phosphorylierung von AKT-Kinase und ERK1/2 mit FF

Die Aktivierung von Kinasen wird durch die Phosphorylierung an speziellen Aminosäuren induziert und stellt damit einen wesentlichen Prozeß für die Signaltransduktion dar. Deshalb wurde untersucht, ob FF, FHDL und S1P die Aktivierung der PI3-Kinase nachgeschalteten AKT-Kinase induzieren. Diese Kinase wird durch viele Wachstumsfaktoren PI3-Kinase abhängig an Ser437 und Thr308 phosphoryliert und ist ein zentrales Schlüsselenzym bei mito- und angiogenen Prozessen (Dimmeler und Zeiher, 2000; Morales-Ruiz et al., 2001; Fieber et al., 2006; Yan et al., 2008). Aufgrund der Ergebnisse aus den Proliferationsexperimenten wurde zusätzlich die Aktivierung von

ERK1/2 untersucht. Dafür wurden HUVEC Zellen zuerst mit 80 % FF inkubiert und nach 0 min, 10 min und 30 min geerntet. Mit phosphoprotein-spezifischen Antikörpern wurde im Western Blot anschließend die Proteinphosphorylierung im Vergleich zum Gesamtprotein der jeweiligen Kinase untersucht, das von einem zweiten Antikörper detektiert wird. Die Quantifizierung erfolgte semiquantitativ, indem die Signale der Phosphoantikörper relativ zum Gesamtprotein densitometrisch ausgewertet wurden. Da nur Aussagen über eine Zu- bzw. Abnahme der phosphorylierten Kinasen getroffen werden sollten, wurde auf die grafische Darstellung verzichtet. Die Abbildung 37 zeigt, daß die Inkubation der HUVEC Zellen mit FF nach 10 min zu einem Anstieg der phosphorylierten AKT-Kinase (Ser473) führte (Abb. 37 A, Spur 2). Die Gesamtproteinmenge nahm nach 10 min geringfügig zu (Abb. 37 A, Spur 5). Dieser Effekt war beim phosphorylierten Protein deutlich stärker ausgeprägt und blieb bei 30 min erhalten (Abb. 37 A, Spur 3). Die Untersuchungen zur Phosphorylierung von ERK1/2 (Tyr204) zeigten ähnliche Ergebnisse. Im Vergleich zum Gesamtprotein stieg die Menge von phosphoryliertem ERK1/2 nach 10 min an (Abb. 37 B, Spur 2). Nach 30 min wurde mit der geringen Reduktion von phosphoryliertem ERK1/2 eine geringfügige Zunahme des Gesamtproteins detektiert (Abb. 37 B, Spur 3 und 6). Diese Resultate zeigen, daß FF die Aktivierung von AKT-Kinase und ERK1/2 induziert und spricht für eine Beteiligung dieser Kinasen an den mito- und angiogenen Effekt von FF.

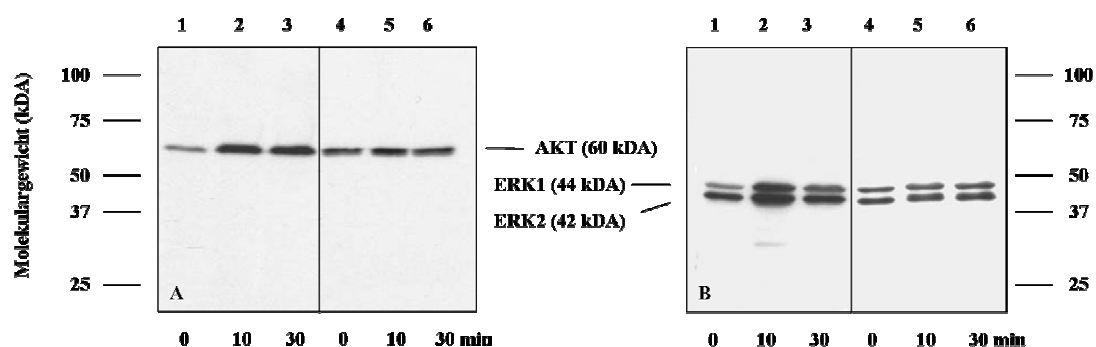


Abbildung 37: AKT-Kinase- und ERK1/2-Phosphorylierung bei HUVEC Zellen nach Stimulation mit FF. Die Zellen wurden mit 80 % FF inkubiert, zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und 40 µg Proteinlysate im Western Blot analysiert. Dargestellt sind repräsentative Western Blots, die die Phosphorylierung der AKT-Kinase (Ser473) (A, Spur 1-3) und ERK1/2 (Tyr204) (B, Spur 1-3) im Vergleich zum Gesamtprotein (A und B, Spur 4-6) zeigen.

Nachfolgende Experimente mit FHDL-depletierter FF sollten zeigen, ob das Entfernen von FHDL aus FF Auswirkungen auf die FF stimulierte Phosphorylierung der untersuchten Kinasen hat.

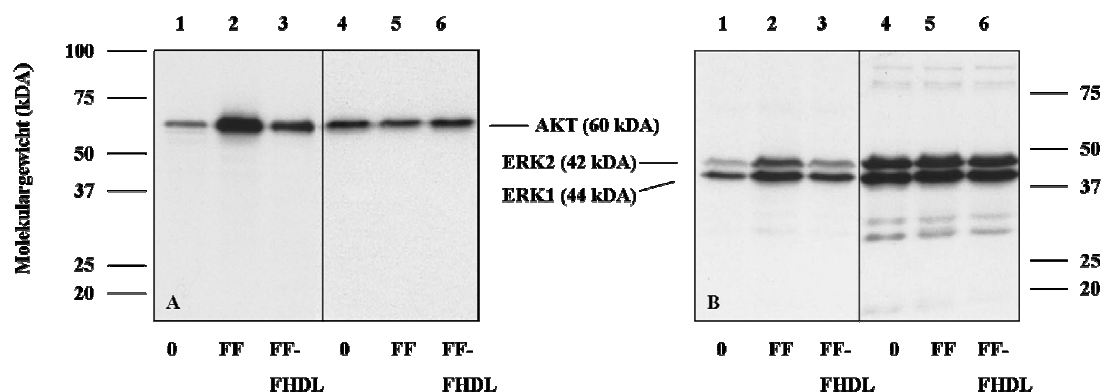


Abbildung 38: AKT-Kinase- und ERK1/2-Phosphorylierung nach Inkubation von HUVEC Zellen mit nativer FF und FHDL-depletierter Follikelflüssigkeit (FF-FHDL). Die Zellen wurden mit 80 % FF und FF-FHDL inkubiert, zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und 40 µg Proteinlysate im Western Blot analysiert. Dargestellt sind repräsentative Western Blots, die die Phosphorylierung der AKT-Kinase (Ser473) (A, Spur 1-3) und ERK1/2 (Tyr204) (B, Spur 1-3) im Vergleich zum Gesamtprotein (A und B, Spur 4-6) zeigen.

Abbildung 38 zeigt, daß FHDL-depletierete FF die Phosphorylierung der AKT-Kinase zwar induziert (Abb. 41 A, Spur 3), dieser Effekt aber deutlich schwächer ausgeprägt ist als mit nativer FF (Abb. 38 A, Spur 2). Das konnte auch für die Phosphorylierung von ERK1/2 (Tyr204) gezeigt werden (Abb. 38 B, Spur 3 und 2). Diese Daten weisen darauf hin, daß FF nach FHDL-Isolierung noch weitere Faktoren enthält, die zu einer Phosphorylierung von AKT-Kinase und ERK1/2 führen. Aufgrund der reduzierten Signalstärke von FHDL-depletierter FF läßt sich jedoch schlußfolgern, daß die Stimulation der Zellen mit FHDL als Bestandteil der FF zu einer Aktivierung der AKT-Kinase und ERK führen könnten.

3.1.8.2.2. Stimulation der Phosphorylierung von AKT-Kinase und ERK1/2 mit FHDL

Anschließend wurde geprüft, ob FHDL die AKT-Kinase und ERK1/2 phosphoryliert. Dafür wurden die Zellen mit der FHDL Konzentration (0,5 mg/ml FHDL) inkubiert, die das Zellwachstum maximal stimulierte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 dargestellt. Wie bei den Untersuchungen mit FF, wurde eine Zunahme der AKT-Kinase Phosphorylierung (Abb. 39 A, Spur 2) im Vergleich zum Gesamtprotein 10 min detektiert (Abb. 39 A, Spur 5). Ein Anstieg der ERK1/2 (Tyr204) Phosphorylierung wurde bei diesen Experimenten erst nach 30 min beobachtet. Dieser Effekt war deutlich geringer ausgeprägt als bei der Phosphorylierung der AKT-Kinase. Diese Ergebnisse zeigen, daß FHDL die AKT-Kinase und ERK1/2 Phosphorylierung induziert, die Stärke der Induktion aber geringer als mit FF war.

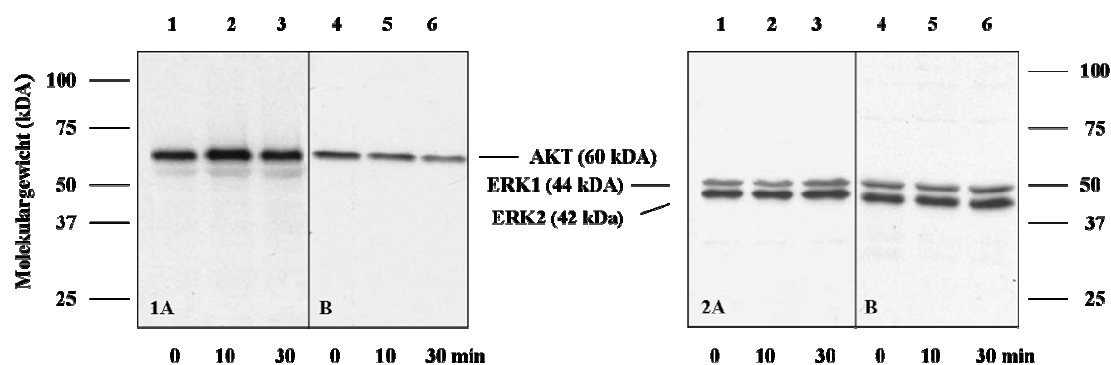


Abbildung 39: AKT-Kinase- und ERK1/2-Phosphorylierung nach Stimulation von HUVEC Zellen mit FHDL. Die Zellen wurden mit 0,5 mg/ml FHDL inkubiert zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und 40 μ g Proteinlysate im Western Blot analysiert. Dargestellt sind repräsentative Western Blots, die die Phosphorylierung der AKT-Kinase (Ser473) (A, Spur 1-3) und ERK1/2 (Tyr204) (B, Spur 1-3) im Vergleich zum Gesamtprotein (A und B, Spur 4-6) zeigen.

3.1.8.2.3. Stimulation der Phosphorylierung von AKT-Kinase und ERK1/2 mit S1P

Abschließend sollte der Effekt von S1P auf die Phosphorylierung der AKT-Kinase und ERK1/2 untersucht werden. Dafür wurden die Zellen mit 0,15 μ mol/l S1P inkubiert. Diese Konzentration stimulierte die Proliferation der Zellen in den vorangegangenen Experimenten maximal. Abbildung 40 zeigt, daß die Proteinmenge der phosphorylierten AKT-Kinase (Abb. 40 A, Spur 2) im Vergleich zum Gesamtprotein nach 10 min deutlich anstieg (Abb. 40 A, Spur 5). Nach 30 min wurde keine weitere Zunahme der Phosphorylierung detektiert (Abb. 40 A, Spur 3). Diese Ergebnisse zeigten auch die Untersuchungen zur ERK1/2 Phosphorylierung (Abb. 40 B, Spur 2). Nach 30 min nahm die Menge der phosphorylierten ERK1/2 jedoch weiter zu (Abb. 40 B, Spur 3).

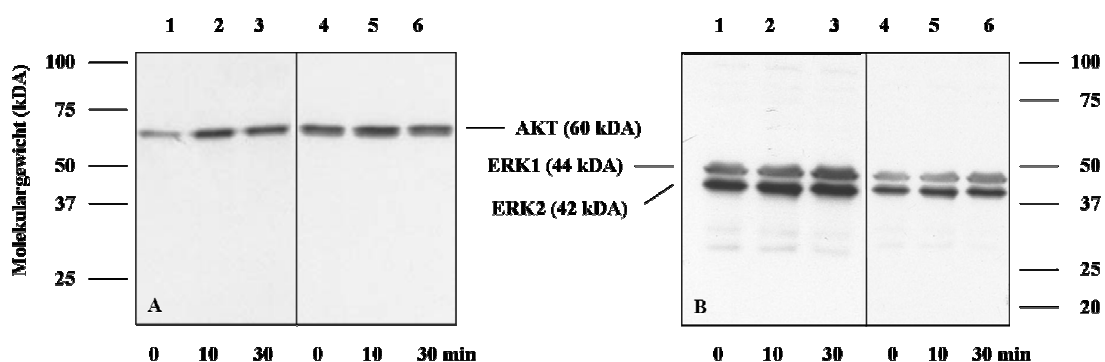


Abbildung 40: AKT- und ERK1/2-Phosphorylierung nach Stimulation von HUVEC Zellen mit S1P. Die Zellen wurden mit 0,15 μ mol/l S1P inkubiert, zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und 40 μ g Proteinlysate im Western Blot analysiert. Dargestellt sind repräsentative Western Blots, die die Phosphorylierung der AKT-Kinase (Ser473) (A, Spur 1-3) und ERK1/2 (Tyr204) (B, Spur 1-3) im Vergleich zum Gesamtprotein (A und B, Spur 4-6) zeigen.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, daß S1P wie FF und FHDL die Phosphorylierung

der AKT-Kinase und ER1/2 induzieren.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden FHDL und S1P als Mito- und Angiogene der FF identifiziert und die stimulatorischen Effekte der in FF vorkommenden FHDL und S1P Konzentrationen auf die Proliferation und Tubulusformation von HUVEC Zellen gezeigt. In diese Effekte sind die PI3-Kinase, die Proteinkinase C und ERK involviert. Zusätzlich wurde die Induktion der AKT-Kinase- und ERK1/2-Phosphorylierung durch FF, FHDL und S1P nachgewiesen.

3.2. Untersuchungen zur Migration und Progesteronsynthese humaner Granulosaluteinzellen

Die Entstehung des Corpus luteum ist nicht durch die massive Vaskularisierung und Proliferation von Endothelzellen geprägt. Die Migration von Granulosaluteinzellen in die zentrale Kavität des kollabierten Follikels und die Synthese des Gelbkörperhormons Progesteron sind ebenso wichtige zellbiologische Prozesse für die Entwicklung und Funktionalität eines Corpus luteum. Deshalb war im zweiten Teil der Arbeit zu klären, welchen Einfluß FF auf diese Prozesse ausübt.

3.2.1. Zellkultur von humanen, primären Granulosaluteinzellen

Für die Untersuchungen zur Migration und Progesteronsynthese eignen sich humane Granulosaluteinzellen, die aus Follikelaspирaten von Patientinnen isoliert wurden. Diese haben sich im Rahmen der Kinderwunschbehandlung einer Hormonbehandlung unterzogen. Nach Separation über einen Ficoll-Gradienten wurden die Zellen zur Depletion von Erythrozyten mit Hämolysepuffer behandelt und Zellkulturen angelegt. In Abbildung 41 ist ein Beispiel für eine Zellkultur von primären Granulosaluteinzellen dargestellt.

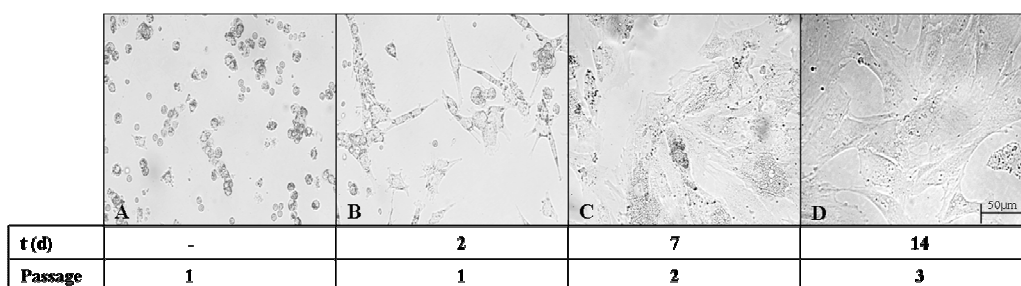


Abbildung 41: Zellkultur humaner, primärer Granulosaluteinzellen. Die Entwicklung der Zellkultur vom Tag der Isolierung aus Follikelaspирaten (A) ist über 14 Tage bis zur Passage 3 (D) dargestellt. Vergrößerung 200x.

Direkt nach Isolierung aus den Follikel aspiraten zeigten die Zellen eine heterogene Morphologie (Abb. 41 A und B), die möglicherweise in dem Vorhandensein verschiedener Zelltypen (kleine Thekaluteinzellen, Leukozyten) begründet liegt. Aufgrund des Fehlens eines eindeutigen Granulosazellmarkers in diesem Stadium der Lutealphase war eine Identifizierung der Granulosaluteinzellen nicht möglich. Granulosaluteinzellen sind jedoch aufgrund ihrer Morphologie und Größe sowie den großen Mengen von gespeichertem Cholesterolestern in Vesikeln nach Adhärenz gut von anderen Zellen, z. B. den kleineren Thekaluteinzellen, zu unterscheiden. Der geschätzte Anteil dieser Zellen lag unter 10 % der in einer Zellkulturflasche kultivierter Zellen (Abb. 41 C und D). Zellkulturen mit einer morphologisch ausgeprägten Heterogenität wurden verworfen. Für die durchgeführten Experimente zur Migration wurden primäre Granulosaluteinzellen bis zur Zellkulturpassage 3 und HGL5-Zellen, eine immortalisierte Granulosaluteinzelllinie, die als *in vitro* Modell in der reproduktionsmedizinischen Forschung etabliert ist, verwendet (Sonntag et al., 2005; Copland et al., 2002).

3.2.2. Stimulation der Migration mit FF

Zunächst wurde untersucht, ob FF die Migration von primären Granulosalutein- und HGL5-Zellen beeinflusst. Für diese Untersuchungen wurde ein Boyden-Kammer-System verwendet, bei dem die Zellen durch eine poröse Membran in Richtung der FF im unteren Teil der Kammer migrieren. Die migrierten Granulosaluteinzellen wurden nach 20 h mit Kristallviolett gefärbt und die optische Dichte der Färbung bei 560 nm photometrisch gemessen. Die Quantifizierung der Migration erfolgte durch die Bestimmung des prozentualen Anteils der gemessenen optischen Dichte der stimulierten Zellen relativ zu unbehandelten Zellen als Kontrolle (100 %). Die Ergebnisse sind in Abbildung 42 dargestellt. FF stimuliert die Migration von primären Granulosalutein- und HGL5-Zellen dosisabhängig. Während 80 % FF bei primären Granulosaluteinzellen zu einem maximalen Anstieg der Migration auf $903,4 \pm 1,69$ % im Vergleich zu unbehandelten Zellen führte, wurde bei HGL5-Zellen eine maximale Stimulation auf $610,4 \pm 6,7$ % mit 40 % FF gemessen. Nach Erreichen dieser Maxima war die Migration der primären Granulosaluteinzellen bei 100 % FF auf $794,2 \pm 36,4$ % und bei HGL5-Zellen auf $266,8 \pm 6,0$ % reduziert. Obwohl die Induktionsstärke der Migration bei primären Granulosaluteinzellen mit der Zellcharge variierte, wurde die maximale Migration immer bei 80 % FF gemessen. Diese Daten zeigen, daß FF migrationsfördernde Substanzen enthält.

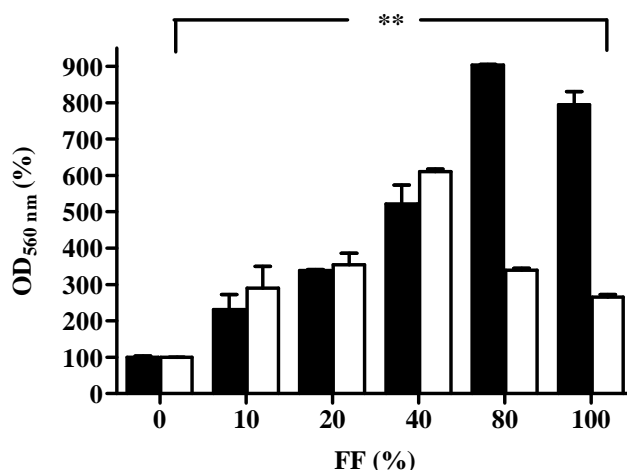


Abbildung 42: Dosisabhängige Stimulation der Migration von Granulosaluteinzellen nach Stimulation mit unterschiedlichem FF Gehalt. Die OD \pm SD (%) der mit FF behandelten primären Granulosaluteinzellen (■) und HGL5-Zellen (□) sind relativ zu unbehandelten Zellen als Kontrolle dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich mit unbehandelten Zellen ermittelt. ** $p < 0,01$.

3.2.2.1. Stimulation der Migration mit hitzebehandelter FF

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen sollte die migrationsfördernde Aktivität der FF näher charakterisiert werden. Um zu prüfen, ob thermostabile Substanzen an dem stimulatorischen Effekt der FF beteiligt sind, wurde FF in Analogie zu den Experimenten mit humanen Endothelzellen bei 90 °C erhitzt und die Überstände anschließend in die Migrationsexperimente eingesetzt. In Abbildung 43 ist gezeigt, daß hitzebehandelte FF die Migration von primären Granulosaluteinzellen von $363,0 \pm 39,1$ % auf $210,4 \pm 11,3$ % reduzierte. Ähnliche Ergebnisse wurden bei HGL5-Zellen gemessen. Nach Hitzebehandlung sank die mit 40 % nativer FF stimulierte Migration von $261, \pm 4,8$ % auf $180,9 \pm 14,9$ %. Diese Daten zeigen, daß neben thermolabilen Substanzen thermostabile, migrationsfördernde Bestandteile in FF enthalten sind. Aufgrund der Ergebnisse aus dem ersten Teil Arbeit war es naheliegend, FHDL-depletierte FF in die Migrationsexperimente einzubeziehen. 80 % FHDL-depletierte FF induzierte die Migration primärer Granulosaluteinzellen auf $169,8 \pm 7,1$ % im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Migration der Zellen war, verglichen mit dem Effekt von nativer FF, um 53,2 % gesenkt. Bei HGL5-Zellen wurde im Vergleich zu 40 % nativer FF eine Reduktion der Migration um 18,3 % auf $213,9 \pm 5,3$ % gemessen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß FHDL als Bestandteil der FF die Migration von Granulosaluteinzellen stimulieren könnte.

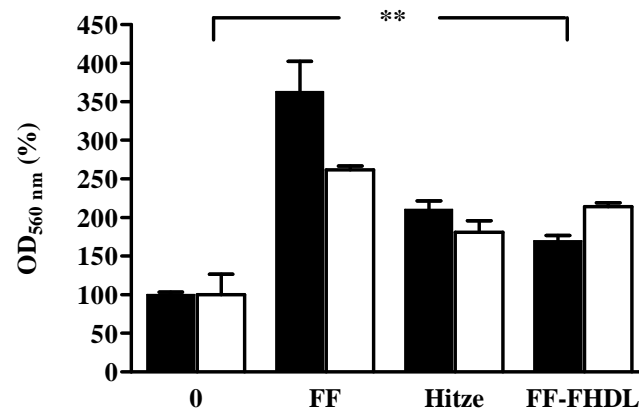


Abbildung 43: Stimulation der Migration von Granulosaluteinzellen nach Inkubation mit hitzebehandelter FF und FHDL-depletierter FF (FF-FHDL). Die OD_{560 nm} ±SD von primären Granulosaluteinzellen (■) und HGL5-Zellen (□) nach Behandlung mit 80 % FF bzw. 40 % nativer, hitzebehandelter FF und FHDL-depletierter FF sind relativ zu unbehandelten Zellen als Kontrolle dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zur Kontrolle ermittelt. **p<0,01.

3.2.3. Stimulation der Migration mit FHDL

Um zu prüfen, ob FHDL die Migration der Granulosaluteinzellen direkt beeinflusst, wurden die Zellen mit verschiedenen FHDL Konzentrationen behandelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 44 dargestellt. FHDL stimulierte die Migration von primären Granulosaluteinzellen maximal bei 1,2 mg/ml FHDL auf 226,1 ±3,1 % und von HGL5-Zellen auf 289,0 ±2,9 % bei 0,8 mg/ml FHDL im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

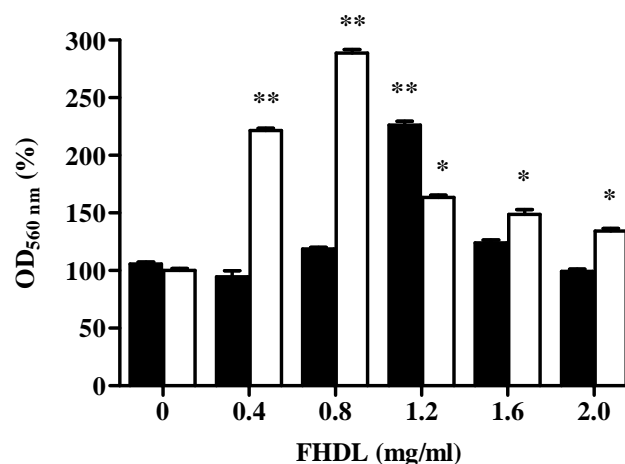


Abbildung 44: Stimulation der Migration von Granulosaluteinzellen nach Behandlung mit FHDL. Die OD ±SD (%) der mit FHDL behandelten primären Granulosaluteinzellen (■) und HGL5-Zellen (□) ist relativ zu unbehandelten Zellen als Kontrolle dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt. *p<0,05; **p<0,01.

Mit steigenden FHDL Konzentrationen wurde bei primären Granulosaluteinzellen bis 2 mg/ml FHDL eine Reduktion der Migration auf Werte un behandelter Zellen gemessen. Die

Migration der HGL5-Zellen nach Behandlung mit 2 mg/ml FHDL war mit $134,3 \pm 2,0$ % signifikant zur Kontrolle erhöht. Das deutet darauf hin, daß physiologische FHDL Konzentrationen in FF die Migration von Granulosaluteinzellen stimulieren können.

3.2.4. Stimulation der Migration mit hitzebehandeltem FHDL

Für die nähere Charakterisierung der migrationsfördernden Aktivität wurde FHDL verschiedenen Modifikationen unterzogen. Die Hitzebehandlung sollte zeigen, ob thermostabile Bestandteile an der migrationsfördernden Aktivität von FHDL beteiligt sind, während die Behandlung mit Aktivkohle (AK) Aufschlüsse über die stimulatorischen Effekte von FHDL-assoziierten Steroiden und Hormonen liefern sollte. Anschließend wurden die Zellen mit den FHDL Konzentrationen inkubiert, die die Migration maximal stimulierten, d. h. primäre Granulosaluteinzellen mit 1,2 mg/ml FHDL und HGL5-Zellen mit 0,8 mg/ml FHDL. Abbildung 45 zeigt, daß die Hitzebehandlung die Migration der primären Granulosaluteinzellen im Vergleich zu nativem FHDL von $247,3 \pm 15,7$ % auf $268,7 \pm 1,8$ % steigerte. Bei HGL5-Zellen war die Migration nach Inkubation mit hitzebehandeltem FHDL im Vergleich zu unbehandeltem FHDL geringfügig, aber nicht signifikant, von $282,7 \pm 3,1$ % auf $269,3 \pm 3,8$ % reduziert.

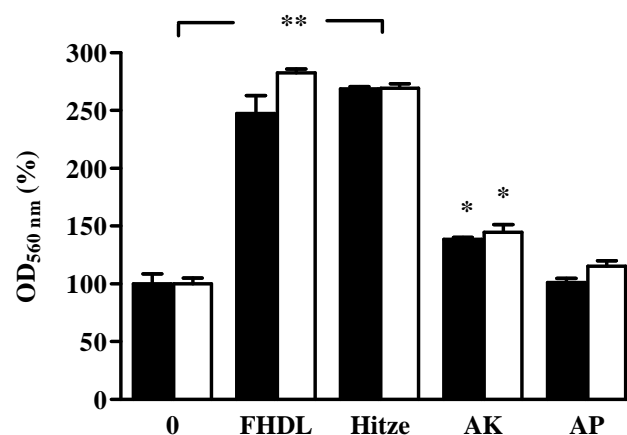


Abbildung 45: Stimulation der Migration von Granulosaluteinzellen nach Inkubation mit hitze- und AK-behandeltem FHDL. Die Zellen wurden zusätzlich mit 0,8 mg/ml nativen FHDL bzw. 0,4 mg/ml nativem FHDL und mit AP-behandeltem FHDL inkubiert. Die OD \pm SD (%) der mit nativem und modifiziertem FHDL behandelten primären Granulosaluteinzellen (■) und HGL5-Zellen (□) ist relativ zu unbehandelten Zellen als Kontrolle dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Nach AK-Behandlung induzierte FHDL mit $138,7 \pm 1,3$ % einen geringeren Anstieg der Migration primärer Granulosaluteinzellen als mit unbehandeltem FHDL zur Folge. Diese Resultate bestätigten die Untersuchungen an HGL5 Zellen. Diese Ergebnisse ließen die Vermutung zu, daß die migrationsfördernden Effekte des Lipoproteins möglicherweise auf

thermostabile FHDL-assoziierte Komponenten zurückzuführen sein könnten. Aufgrund der Ergebnisse aus dem ersten Teil der Arbeit und den bereits publizierten Effekten von HDL-assoziiertem S1P, wurde FHDL nachfolgend mit Alkalischer Phosphatase (AP) behandelt. Sowohl die Migration von primären Granulosaluteinzellen als auch von HGL5-Zellen wurde durch AP-behandeltes FHDL im Vergleich zur Kontrolle nicht stimuliert. Diese Daten weisen darauf hin, daß eine phosphorylierte FHDL-assoziierte Komponente an den migrationsfördernden Eigenschaften des Lipoproteins beteiligt ist.

3.2.5. Stimulation der Migration mit S1P

Aufgrund dieser Resultate lag nahe zu prüfen, ob S1P als FHDL-assoziiertes Lysosphingolipid die Migration von Granulosaluteinzellen stimulieren kann. Dafür wurden primäre Granulosalutein- und HGL5-Zellen mit verschiedenen S1P Konzentrationen stimuliert. Das Hauptaugenmerk sollte bei diesen Untersuchungen auf die in FF gemessenen S1P Konzentrationen gerichtet werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 46 dargestellt. Die Migration von primären Granulosaluteinzellen wurde mit 0,2 $\mu\text{mol/l}$ S1P maximal auf $150,9 \pm 6,0$ % stimuliert. Bei HGL5-Zellen wurde ein maximaler Anstieg der Migration bis $145,3 \pm 5,6$ % nach Inkubation mit 0,1 $\mu\text{mol/l}$ S1P im Vergleich zu unbehandelten Zellen gemessen.

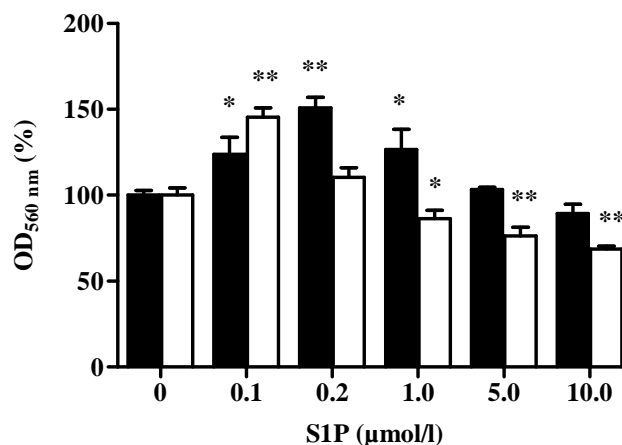


Abbildung 46: Stimulation der Migration von Granulosaluteinzellen nach Inkubation mit S1P. Die OD \pm SD (%) der mit S1P behandelten primären Granulosaluteinzellen (■) und HGL5-Zellen (□) ist relativ zu unbehandelten Zellen als Kontrolle dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Höhere S1P Konzentrationen hemmten sowohl die Migration der primären Granulosaluteinzellen ($89,4 \pm 5,5$ %) und HGL5-Zellen ($68,8 \pm 1,7$ %) dosisabhängig bis 10 $\mu\text{mol/l}$ S1P. Zusammenfassend läßt sich aus diesen Daten schlußfolgern, daß

physiologische S1P Konzentrationen in der FF die Migration von Granulosaluteinzellen stimulieren.

3.2.5.1. Stimulation der Migration mit hitze- und AK-behandeltem S1P

Im Anschluß sollte geprüft werden, ob sich die migrationsfördernden Effekte von S1P in Experimenten mit modifiziertem S1P bestätigen lassen. Dazu wurde S1P in Analogie zu FHDL mit Hitze, AK und AP behandelt und in den Konzentrationen in die Experimente eingesetzt, die maximal stimulatorische Effekte auf die Migration hatten.

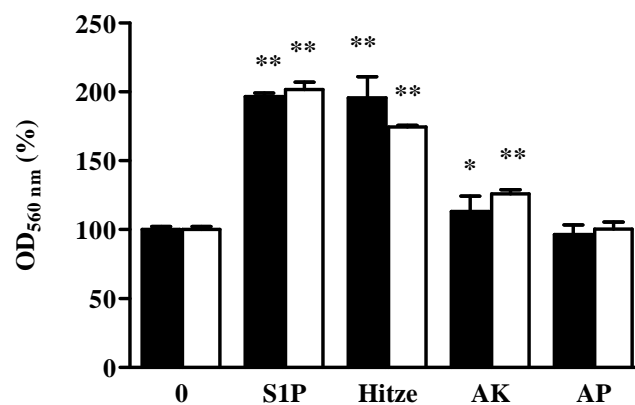


Abbildung 47: Stimulation der Migration von Granulosaluteinzellen nach Inkubation mit hitze-, AP- und AK-behandeltem S1P. Die OD \pm SD (%) der mit 0,2 μ mol/l bzw. 0,1 μ mol/l modifiziertem S1P behandelten primären Granulosaluteinzellen (■) und HGL5-Zellen (□) ist relativ zu unbehandelten Zellen als Kontrolle dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zur Kontrolle ermittelt. * p <0,05; ** p <0,01.

Abbildung 47 zeigt, daß nach Hitzebehandlung von S1P bei HGL5-Zellen mit $174,5 \pm 1,3$ % eine niedrigere Migration gemessen wurde, als mit 0,1 μ mol/l unbehandeltem S1P ($201,7 \pm 5,2$ %). Bei primären Granulosaluteinzellen wurde mit 0,2 μ mol/l hitzebehandeltem S1P keine signifikant veränderte Migration im Vergleich zu unbehandeltem S1P gemessen. Der Einsatz von AK-behandeltem S1P reduzierte die S1P-stimulierte Migration der primären Granulosaluteinzellen und HGL5-Zellen deutlich. Dieser Effekt war jedoch im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant erhöht. Die Inaktivierung von S1P mit AP hatte keinen Effekt auf die Migration von primären Granulosaluteinzellen und HGL5-Zellen im Vergleich zur Kontrolle, die nicht mit dem Enzym behandelt wurde. Mit diesen Daten konnte nicht nur die Thermostabilität von S1P gezeigt werden, die Resultate mit AK- und AP-behandeltem S1P bestätigten den migrationsfördernden Effekt des Lysosphingolipids.

3.2.6. Expression von S1P-Rezeptoren in Granulosaluteinzellen

Aus Studien an HUVEC Zellen ist bekannt, daß die mitogenen und zellprotektiven Effekte von S1P über die Bindung des Lysosphingolipids an spezifische Rezeptoren vermittelt werden (Pyne, Pyne, 2000; Kluk, Hla, 2002; LaMontagne et al., 2006; Schmid et al., 2007). Deshalb wurde im Western Blot untersucht, ob Granulosaluteinzellen die Proteine dieser S1P-Rezeptoren (S1PR) exprimieren. Dafür war eine differenzielle Aufarbeitung der Proteinlysate notwendig. Für den Nachweis der S1P-Rezeptoren 1, 2 und 5 wurden je nach Lokalisation des durch die Antikörper zu erkennenden Epitops zytoplasmatische oder Membranproteine mit Hilfe von verschiedenen Hochsalzpuffern isoliert. Der Nachweis der S1P-Rezeptors 3 wurde mit RIPA-Lysaten durchgeführt. Die Ergebnisse sind Abbildung 48 dargestellt. Bei den S1P-Rezeptoren 1, 2, 3 und 5 wurden mehrere, unterschiedlich stark ausgeprägte Proteinbanden verschiedener Größen detektiert.

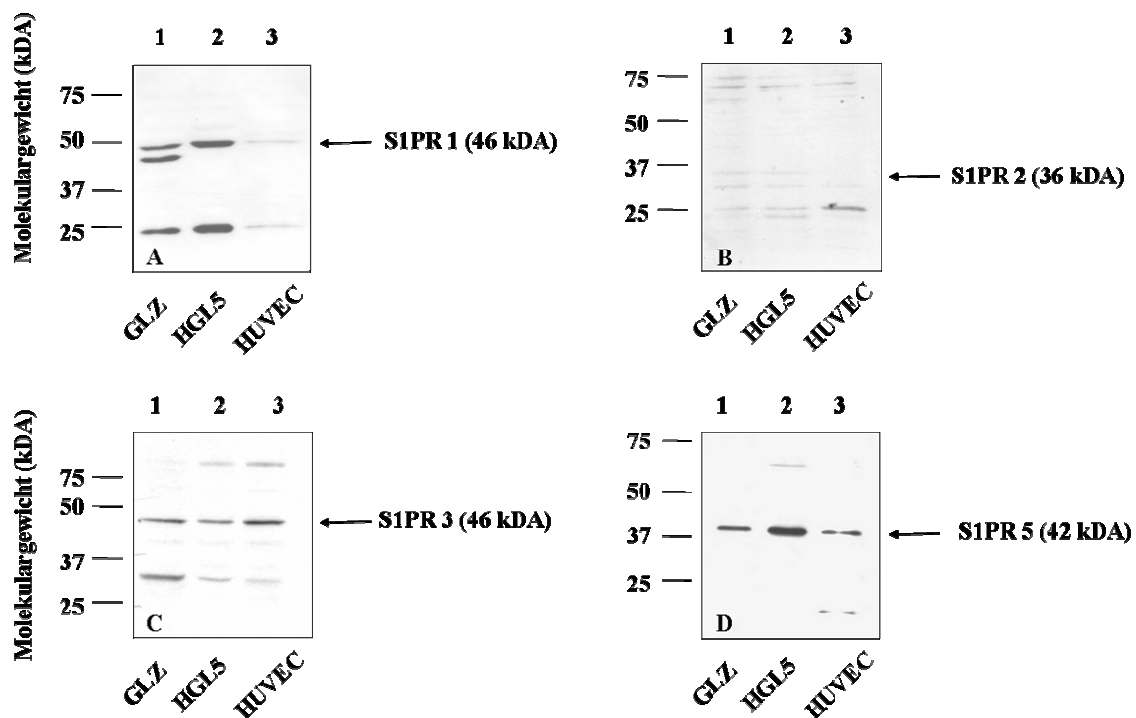


Abbildung 48: Nachweis der Proteinexpression der S1P-Rezeptoren 1, 2, 3 und 5 in Granulosaluteinzellen. Für die Detektion der S1P-Rezeptoren 1 und 2 wurden 15 µg Membranproteine bzw. 40 µg zytoplasmatische Proteine (A und B) eingesetzt. Der Nachweis des S1P Rezeptors 3 erfolgte mit 40 µg RIPA-Lysat (C), der S1P-Rezeptor 5 wurde mit 10 µg zytoplasmatischen Proteinen detektiert. Nach Auftrennung in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel wurden die geblotteten Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen die humanen S1P-Rezeptoren markiert. Als Positivkontrolle wurden Proteinlysate von HUVEC Zellen verwendet.

Es konnten dennoch Signale bei den von den Herstellern der Antikörper angegebenen Proteingrößen (Molekulargewicht) der S1P-Rezeptoren bei Granulosalutein-, HGL5- und

HUVEC Zellen, die als Positivkontrolle eingesetzt wurden, detektiert werden (Abb. 48 A bis D). Um die Spezifität der detektierten Banden näher erklären zu können, wurden als Kontrollen Membranen nur mit dem Sekundärantikörper und ohne aufgetrennte Proteine mit Primär- und Sekundärantikörpern markiert. Beide Kontrollen zeigten ein negatives Ergebnis, d. h. es wurden keine Proteinbanden nachgewiesen (Abb. nicht gezeigt). Der S1P Rezeptor 4 konnte nicht nachgewiesen werden. Als Kontrolle der im Western Blot detektierten S1P-Rezeptoren wurde mittels PCR mit spezifischen Primern überprüft, ob die mRNA der Rezeptoren exprimiert wird. In allen untersuchten Zelltypen wurden spezifische PCR Produkte für die S1P-Rezeptoren 1, 2, 3 und 5 nachgewiesen. Der S1P-Rezeptor 4 konnte mit dieser Methode ebenfalls nicht detektiert werden (Abb. nicht gezeigt). Die PCR bestätigt somit die Untersuchungen im Western Blot.

3.2.7. Rezeptoridentität der FHDL- und S1P-stimulierten Migration

3.2.7.1. S1PR 3 als migrationsfördernder Rezeptor der FHDL-stimulierten Migration

Da bislang nicht geklärt war, über welchen Rezeptor bzw. welche Rezeptoren die migrationsfördernden Effekte von FHDL und S1P bei Granulosaluteinzellen vermittelt werden, sollte zunächst mit spezifischen S1P-Rezeptoragonisten und -antagonisten die Rezeptoridentität der FHDL-stimulierten Migration geklärt werden. Für diese Untersuchungen wurden die Zellen mit den S1P-Rezeptoragonisten FTY720, VPC24191 und SEW2871 behandelt und die Migration im Vergleich zu FHDL-stimulierten Migration gemessen. Dafür wurden die FHDL Konzentrationen verwendet, die maximal stimulatorische Effekte auf die Migration hatten. Abbildung 49 zeigt, daß die Behandlung von primären Granulosaluteinzellen und HGL5 Zellen mit 1 nM FTY720, einem Agonist für die S1P-Rezeptoren 1, 3, 4 und 5 die Migration in gleichem Maße stimulierte wie 1,2 mg/ml FHDL bzw. 0,8 mg/ml FHDL. Damit konnte der S1P-Rezeptor 2 als migrationsfördernder Rezeptor der FHDL-stimulierten Migration ausgeschlossen werden. 1 μ mol/l VPC24191, ein Agonist für die S1P-Rezeptoren 1 und 3, hatte ähnliche Effekte auf die Migration von primären Granulosaluteinzellen wie FTY720. Im Vergleich zur FHDL-stimulierten Migration war der Effekt von VPC24191 mit $199,8 \pm 9,9$ % jedoch signifikant reduziert. Bei HGL5-Zellen war der stimulatorische Effekt dieses S1P-Rezeptoragonisten deutlicher ausgeprägt. VPC24191 stimulierte die Migration der Zellen auf $172,4 \pm 6,9$ %, während mit FHDL eine Migration von $208,8 \pm 12,9$ % im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle gemessen wurde. Die Inkubation der Zellen mit 1 μ mol/l

SEW2871, einem Agonisten für den S1P-Rezeptor 1, induzierte mit $131,0 \pm 2,1$ % eine deutlich geringere Migration als FHDL.

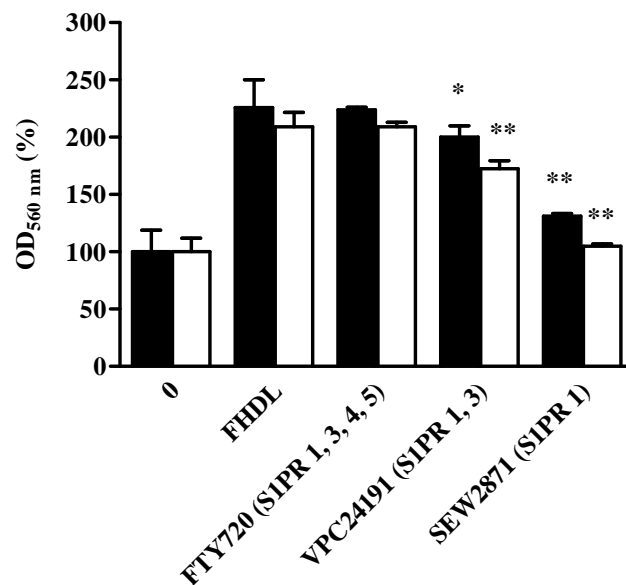


Abbildung 49: Stimulation der Migration von Granulosaluteinzellen nach Behandlung mit FHDL und S1P-Rezeptoragonisten. Die OD \pm SD (%) der mit 1,2 mg/ml FHDL bzw. 0,8 mg/ml FHDL und mit den Rezeptoragonisten behandelten primären Granulosaluteinzellen (■) und HGL5-Zellen (□) ist relativ zu mit den Lösungsmitteln der Agonisten behandelten Zellen dargestellt. Die Signifikanzen der mit Rezeptoragonisten stimulierten Migration wurde im Vergleich zur FHDL-stimulierten Migration ermittelt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Mit SEW287 wurde bei HGL5-Zellen kein signifikanter Unterschied zur Lösungsmittelkontrolle gemessen. Diese Daten geben erste Hinweise darauf, daß FHDL-assoziiertes S1P die Migration von HGL5-Zellen über die Bindung an den S1P-Rezeptor 3 stimuliert. Eine eindeutige Aussage zur Rezeptoridentität bei primären Granulosaluteinzellen konnte nicht getroffen werden. Aufgrund der Daten ist eine Beteiligung der S1P-Rezeptoren 1 und 3 wahrscheinlich.

Die Verwendung von S1P-Rezeptorantagonisten sollte weitere Aufschlüsse über die beteiligten S1P-Rezeptoren an der FHDL-stimulierten Migration liefern. Dafür wurde in Vorversuchen zunächst überprüft, ob die Inkubation der Zellen mit den verwendeten S1P-Rezeptorantagonisten Cay1044 und Suramin bzw. dem Inhibitor Pertussis Toxin (PTX) ohne einen Stimulus, Einfluß auf die Migration haben. Da keine Unterschiede zu den mit den Lösungsmittelkontrollen behandelte Zellen meßbar waren, konnten solche Effekte ausgeschlossen werden (Abb. nicht gezeigt). Anschließend wurden die Zellen 30 min mit den Substanzen vorbehandelt und nachfolgend mit FHDL und PTX, Cay1044 und Suramin inkubiert. Abbildung 50 zeigt, daß die Vorbehandlung der primärer Granulosaluteinzellen

und HGL5-Zellen mit 100 ng/ml PTX, das $G\alpha_i$ - und $G\alpha_o$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren, zu denen die S1P-Rezeptoren 1 und 3 gehören, inhibiert und die Stimulation mit 1,2 mg/ml FHDL bzw. 0,8 mg/ml FHDL keinen signifikanten Anstieg der Migration im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle induzierte. Dieser Effekt wurde auch mit 1 μ mol/l Cay1044, einem selektiven Antagonisten für den S1P-Rezeptor 3 und FHDL gemessen.

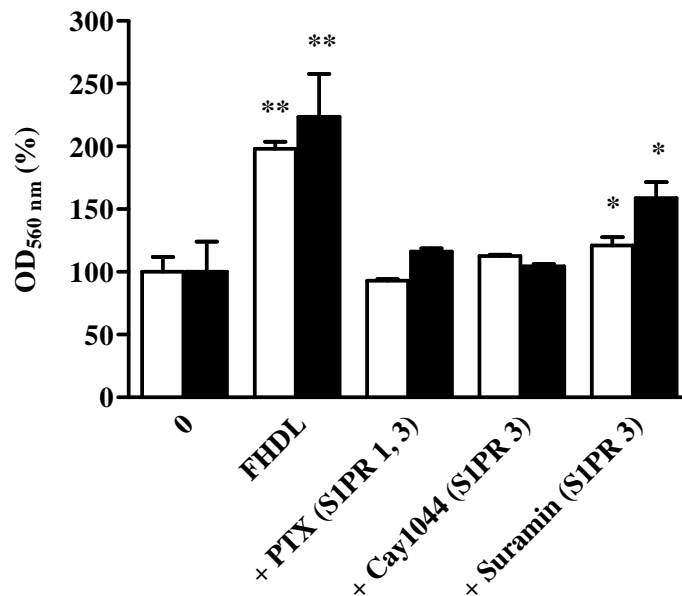


Abbildung 50: Hemmung der FHDL-stimulierten Migration von Granulosaluteinzellen nach Behandlung mit Rezeptorantagonisten für den S1P-Rezeptor 3. Die OD \pm SD (%) der mit 1,2 mg/ml FHDL bzw. 0,8 mg/ml FHDL und mit den Rezeptorantagonisten behandelten primären Granulosaluteinzellen (■) und HGL5-Zellen (□) ist relativ zu mit den Lösungsmitteln der Antagonisten behandelte Zellen als Kontrolle dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ermittelt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Die Vorbehandlung der Zellen mit 100 μ mol/l Suramin, einem nicht selektiven Antagonisten für den S1P-Rezeptor 3, und FHDL stimulierten die Migration der primären Granulosaluteinzellen auf $121,2 \pm 6,5$ % und bei HGL5-Zellen auf $158,9 \pm 12,8$ % signifikant zur Lösungsmittelkontrolle. Zusätzlich zu den Ergebnissen mit den S1P-Rezeptoragonisten weisen diese Resultate auf eine Beteiligung des $G\alpha_i$ - und $G\alpha_o$ -Protein-gekoppelten S1P-Rezeptors 3 an der FHDL-stimulierten Migration hin.

3.2.7.2. S1PR 3 als migrationsfördernder Rezeptor der S1P-stimulierten Migration

Nachfolgend sollte untersucht werden, welche S1P-Rezeptoren in die migrationsfördernden Effekte von S1P involviert sind. Diese Experimente wurden genauso durchgeführt wie mit FHDL und die S1P Konzentrationen verwendet, die maximal stimulatorische Effekte auf die Migration hatten. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen

51 und 52 dargestellt. Die Inkubation von primären Granulosaluteinzellen mit 1 nM FTY720 induzierte mit $245,6 \pm 1,6$ % eine signifikant höhere Migration als S1P ($188,7 \pm 3,2$ %). Bei HGL5-Zellen war der Effekt von FTY720 nicht signifikant zur S1P-stimulierten Migration. Diese Ergebnisse lieferten auch die Experimente mit 1 $\mu\text{mol/l}$ VPC24191. Es wurden bei sowohl bei HGL5-Zellen als auch bei primären Granulosaluteinzellen keine Unterschiede zur S1P-stimulierten Migration gemessen.

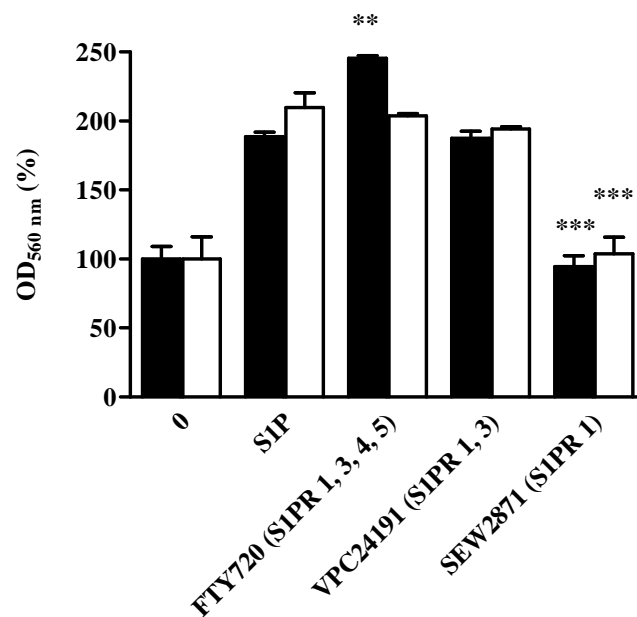


Abbildung 51: Stimulation der Migration von Granulosaluteinzellen nach Behandlung mit S1P und S1P-Rezeptoragonisten. Die OD \pm SD (%) der mit 0,2 $\mu\text{mol/l}$ S1P bzw. 0,1 $\mu\text{mol/l}$ S1P und mit den Rezeptoragonisten behandelten primären Granulosaluteinzellen (■) und HGL5-Zellen (□) ist relativ zu mit den Lösungsmitteln der Agonisten behandelten Zellen dargestellt. Die Signifikanzen der mit Rezeptoragonisten stimulierten Migration wurde im Vergleich zur S1P-stimulierten Migration ermittelt. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

SEW2871 hatte keine stimulatorischen Effekte auf die Migration der Zellen. Aufgrund dieser Ergebnisse war denkbar, daß die Migration von primären Granulosalutein- und HGL5-Zellen über die Bindung von S1P an den S1P-Rezeptor 3 stimuliert wird.

Die Verwendung von Antagonisten bzw. Inhibitoren für den S1P-Rezeptor 3 bestätigten die Untersuchungen mit den S1P-Rezeptagonisten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 52 dargestellt. Die Behandlung der Zellen mit 100 ng/ml PTX, das die an $G\alpha_i$ - und $G\alpha_o$ -Proteine-gekoppelten S1P-Rezeptoren 1 und 3 hemmt, reduzierte die S1P-stimulierte Migration von primären Granulosaluteinzellen und HGL5-Zellen auf Werte der Lösungsmittelkontrolle. Dieser Effekt wurde auch mit dem selektiven Antagonisten für den S1P Rezeptor 3, Cay1044 detektiert. Die Verwendung von 100 $\mu\text{mol/l}$ Suramin reduzierte die S1P-stimulierte Migration nicht vollständig.

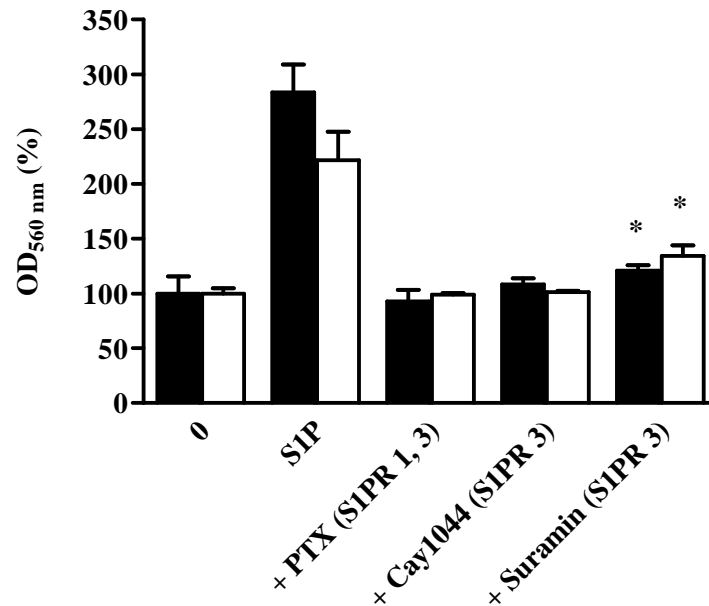


Abbildung 52: Hemmung der S1P-stimulierten Migration von Granulosaluteinzellen nach Behandlung mit S1P-Rezeptorantagonisten. Die OD \pm SD (%) der mit 0,2 μ mol/l S1P bzw. 0,1 μ mol/l S1P und mit den Rezeptorantagonisten behandelten primären Granulosaluteinzellen (■) und HGL5-Zellen (□) ist relativ zu mit den Lösungsmitteln der Antagonisten behandelte Zellen dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ermittelt. * $p < 0,05$

Die S1P-stimulierte Migration von primären Granulosaluteinzellen war mit Suramin auf $120,9 \pm 5,0$ % und bei HGL5-Zellen auf $134,2 \pm 10,0$ % reduziert. Die gemessenen Werte waren signifikant zur Lösungsmittelkontrolle erhöht.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, daß sowohl die FHDL- als auch S1P-stimulierte Migration über den $G\alpha_i$ - und $G\alpha_o$ -Protein-gekoppelten S1P-Rezeptor 3 vermittelt wird.

3.2.8. Untersuchungen zur Signaltransduktion

3.2.8.1. Beteiligung der AKT-Kinase und ERK1/2 an der FF-stimulierten Migration

Im Folgenden sollte untersucht werden, welche Signaltransduktionswege in die FF-stimulierte Migration von Granulosaluteinzellen involviert sind. Dafür die Zellen mit Inhibitoren für verschiedene Kinasen vorbehandelt und anschließend die Migration nach Inkubation mit FF und den Kinase-Inhibitoren gemessen. Die Abbildung 53 zeigt, daß der Einsatz von 25 μ mol/l Ly29004, dem Inhibitor der PI3-Kinase, die mit 80 % FF stimulierte Migration von primären Granulosaluteinzellen von $1141,4 \pm 19,5$ % auf $582,2 \pm 43,8$ % reduzierte. Bei HGL5-Zellen sank die mit 40 % FF induzierte Migration von $734,1 \pm 4,1$ % auf $267,5 \pm 10,4$ %. Ähnliche Ergebnisse lieferten die Untersuchungen mit dem Inhibitor der p38MAP-Kinase, SB203580.

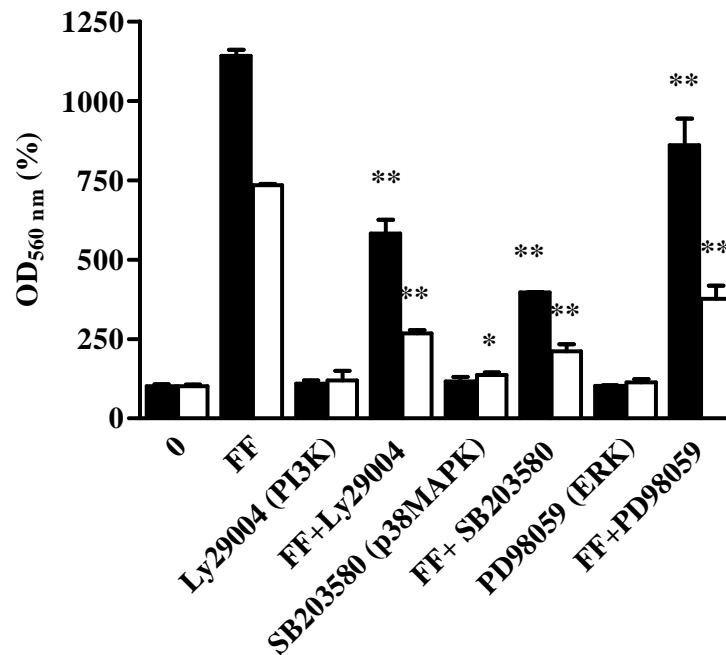


Abbildung 53: Hemmung der FF-stimulierten Migration von Granulosaluteinzellen nach Behandlung mit Kinase-Inhibitoren. Die OD_{560 nm} ±SD (%) mit 80 % FF bzw. 40 % FF und den Inhibitoren behandelten primären Granulosaluteinzellen (■) und HGL5-Zellen (□) ist relativ zu mit den Lösungsmitteln der Inhibitoren behandelte Zellen als Kontrolle dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ermittelt. *p<0,05; **p<0,01.

Interessant war, daß die Inkubation von HGL5-Zellen mit 1 µmol/l SB203580 ohne FF zu einem signifikanten Anstieg der Zellmigration auf 135,5 ±9,0 % im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle führte. Die Vorbehandlung mit 25 µmol/l PD98059, dem Inhibitor der MEK-1 vermittelten ERK-Aktivierung, reduzierte die FF-stimulierte Migration ebenfalls nur teilweise. Der inhibitorische Effekt war jedoch nicht so groß wie mit Ly29004 oder SB203580. Diese Daten weisen darauf hin, daß die PI3-Kinase, die p38MAP-Kinase und die MEK-1 vermittelte ERK Aktivierung nur teilweise an der FF-stimulierten Migration von Granulosaluteinzellen partizipieren.

Anschließend wurde mit phosphoprotein-spezifischen Antikörpern überprüft, ob FF die Aktivierung der in den Migrationsexperimenten untersuchten Kinasen induziert. Dafür wurden die Zellen mit 80 % FF bzw. 40 % FF inkubiert, geerntet und die Proteinlysate im Western Blot in Analogie zu den Untersuchungen an HUVEC Zellen, analysiert. Die Ergebnisse in Abbildung 54 zeigen, daß die Behandlung der Zellen mit FF nach 10 min zu einem deutlichen Anstieg der phosphorylierten AKT-Kinase (Ser473) führte (Abb. 54, A und B, Spur 2). Über den untersuchten Zeitraum von 60 min wurde bei primären Granulosaluteinzellen keine weitere Zunahme der Menge an phosphoryliertem Protein detektiert (Abb. 54 A, Spur 3 und 4).

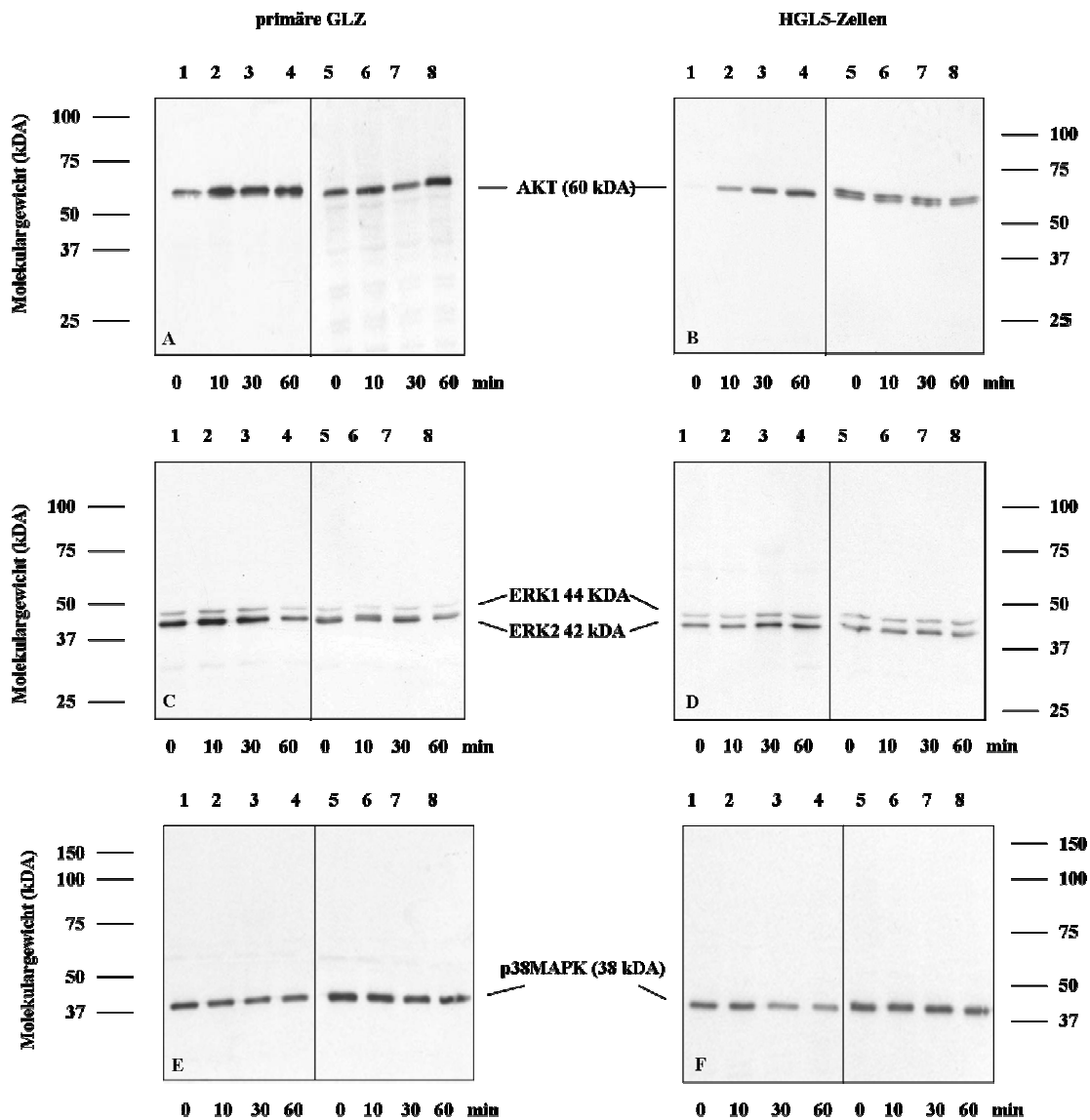


Abbildung 54: AKT-, p38MAPK-Kinase- und ERK1/2-Phosphorylierung bei Granulosalutein-zellen nach Stimulation mit FF. Die Zellen wurden 60 min mit 80 % FF bzw. 40 % FF inkubiert, zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und 20 µg Proteinlysate im Western Blot analysiert. Dargestellt sind repräsentative Western Blots, die die Phosphorylierung der AKT-Kinase (Ser473) (A und B, Spur 1-3), ERK1/2 (Tyr204) (C und D, Spur 1-3) und der p38MAPK-Kinase (Tyr180/Tr108) (E und F) im Vergleich zum Gesamtprotein (A-F, Spur 4-6) zeigen.

Bei HGL5-Zellen führte die Inkubation mit 40 % FF zu einer stetigen Zunahme der phosphorylierten AKT-Kinase (Ser473) bis 60 min (Abb. 54 B, Spur 3 und 4) im Vergleich zum Gesamtprotein (Abb. 59 B, Spur 5-8). Die Untersuchungen zur Phosphorylierung von ERK1/2 (Tyr204) zeigten bei primären Granulosaluteinzellen ebenfalls einen Anstieg der phosphorylierten ERK1/2 nach 10 min (Abb. 54 C, Spur 2). Nach 60 min wurde die Menge der phosphorylierten Kinasen und des Gesamtproteins unter die der unbehandelten Kontrollen (0 min) reduziert (Abb. 54 C, Spur 4 und 8). Bei HGL5-Zellen nahm die Menge

der phosphorylierten ERK1/2 nach 30 min zu (Abb. 54 D, Spur 3). Dieser Effekt blieb bis 60 min erhalten. Die Menge des Gesamtproteins änderte sich nur marginal (Abb. 54, D, Spur 4 bis 8). Die Untersuchungen zum Effekt von FF auf die Phosphorylierung der p38MAP-Kinase zeigten bei primären Granulosalutein- und HGL5-Zellen unterschiedliche Ergebnisse (Abb. 54, E und F). Während die Menge der phosphorylierten p38MAP-Kinase (Tyr180/Tr108) im Vergleich zum Gesamtprotein bei primären Granulosaluteinzellen nach Stimulation mit 80 % FF über einen Zeitraum von 60 min nahezu unverändert blieb (Abb. 54, E, Spur 1 bis 4), wurde bei HGL5-Zellen eine kontinuierliche Reduktion des phosphorylierten Proteins bis 60 min detektiert (Abb. 54 F, Spur 1-4). Die Menge des Gesamtproteins der p38MAP-Kinase blieb über den untersuchten Zeitraum konstant (Abb. 54 F, Spur 5 bis 8). Damit war gezeigt, daß FF die Phosphorylierung der AKT-Kinase und ERK1/2 in den Konzentrationen stimulierte, die maximal stimulatorische Effekte auf die Migration von Granulosaluteinzellen zeigten. Sie hat jedoch keinen bzw. negative Effekte auf die Aktivierung der p38MAP-Kinase.

3.2.8.2. Beteiligung der AKT-Kinase und ERK an der FHDL-stimulierten Migration

Nachfolgend wurde untersucht, welche Signaltransduktionswege in die FHDL-stimulierte Migration von Granulosaluteinzellen involviert sind. Dafür wurden FHDL Konzentrationen eingesetzt, die zu einer maximalen Stimulation der Zellmigration führten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 55 dargestellt. Die Behandlung von primären Granulosaluteinzellen mit 25 $\mu\text{mol/l}$ Ly29004 reduzierte die FHDL-stimulierte Migration von $233,5 \pm 23,2$ % auf $133,7 \pm 12,2$ %. Die gemessene Migration war signifikant zur Lösungsmittelkontrolle erhöht. Diese partielle Reduktion wurde auch bei HGL5-Zellen und Ly29004 beobachtet. Die Untersuchungen mit SB203580 zeigten bei beiden Zelltypen unterschiedliche Ergebnisse. Während bei primären Granulosaluteinzellen die mit 1,2 mg/ml FHDL stimulierte Migration mit dem Inhibitor nur teilweise gehemmt wurde ($152,5 \pm 13,4$ %), wurde nach Behandlung der HGL5-Zellen mit Ly29004 und FHDL eine vollständige Inhibition der Migration auf Werte der Lösungsmittelkontrolle gemessen. Die Behandlung mit SB203580 ohne FHDL stimulierte die Migration der Zellen auf $146,7 \pm 7,2$ % signifikant zur Lösungsmittelkontrolle. Dieser Effekt wurde bei primären Granulosaluteinzellen nicht beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde bei primären Granulosaluteinzellen die Migration nach Behandlung mit 25 $\mu\text{mol/l}$ PD98059 ohne FHDL auf $136,9 \pm 12,3$ %) stimuliert, jedoch nicht bei HGL5-Zellen. Mit FHDL und PD98059 wurde bei primären Granulosaluteinzellen eine partielle Hemmung gemessen.

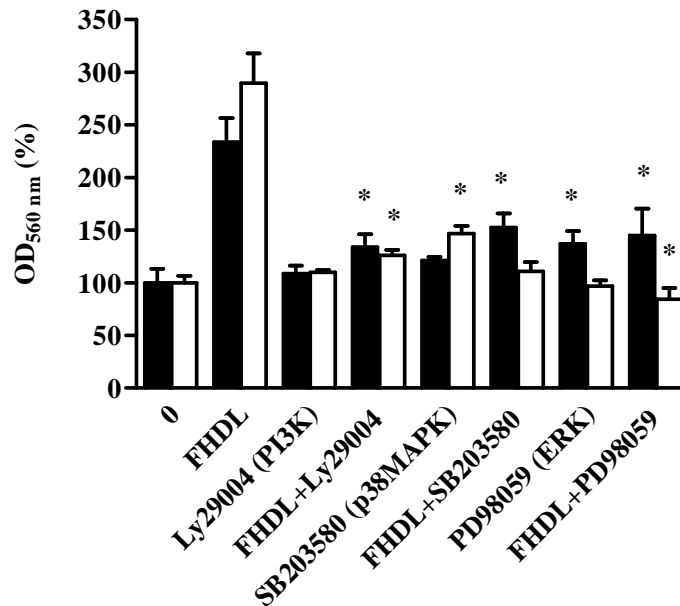


Abbildung 55: Hemmung der FHDL-stimulierten Migration von Granulosaluteinzellen nach Behandlung mit Kinase-Inhibitoren. Die OD_{560 nm} ±SD (%) der mit 1,2 mg/ml FHDL bzw. 0,8 mg/ml FHDL und den Inhibitoren behandelten primären Granulosaluteinzellen (■) und HGL5-Zellen (□) ist relativ zu mit den Lösungsmitteln der Inhibitoren behandelte Zellen als Kontrolle dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ermittelt. *p<0,05

Bei HGL5-Zellen wurden die Migration auf Werte unter der Lösungsmittelkontrollen (84,3 ±10,6 %) reduziert. Diese Daten weisen auf eine partielle Beteiligung der PI3-, p38MAP-Kinase und ERK an der FHDL-stimulierten Migration bei primären Granulosaluteinzellen hin. Bei HGL5-Zellen konnte gezeigt werden, daß die p38MAP-Kinase und ERK in die FHDL-induzierte Migration involviert sind.

3.2.8.3. Beteiligung der AKT-Kinase und ERK an der S1P-stimulierten Migration

Anschließend sollte geprüft werden, inwieweit die PI3-, die p38MAP-Kinase und ERK am migrationsfördernden Effekt von S1P beteiligt sind. In Abbildung 56 ist gezeigt, daß Ly29004 die mit 0,2 µmol/l S1P stimulierte von 267,9 ±2,7 % auf 177,8 ±30,4 % reduzierte. Bei HGL5-Zellen wurden nach Behandlung mit Ly29004 und S1P keine zur Lösungsmittelkontrolle signifikanten Effekte gemessen. Der Einsatz von 1 µmol/l SB203580 ohne S1P hatte einen geringfügigen Anstieg der Migration bei primären Granulosaluteinzellen zur Folge. Dieser Effekt wurde auch bei HGL5-Zellen beobachtet. Die Induktion der Migration war mit 171,5 ±3,9 % deutlich größer als bei primären Granulosaluteinzellen. SB203580 hemmte jedoch in Anwesenheit von S1P die Migration der Zellen vollständig, während die Migration der primären Granulosaluteinzellen nur zum Teil inhibiert wurde. PD98059 ohne S1P hatte keinen Einfluß auf die Migration der Zellen.

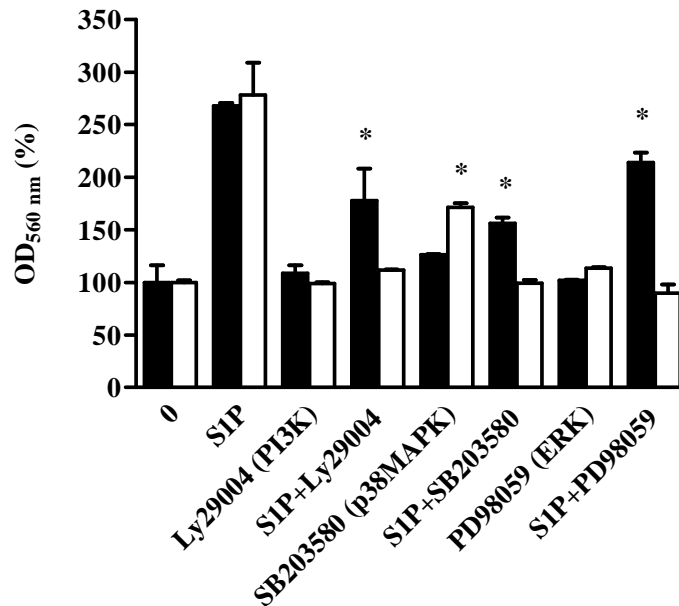


Abbildung 56: Hemmung der S1P-stimulierten Migration von Granulosaluteinzellen nach Behandlung mit Kinase-Inhibitoren. Die OD_{560 nm} ±SD (%) der mit 0,2 µmol/l bzw. 0,1 µmol/l S1P und den Inhibitoren behandelten primären Granulosaluteinzellen (■) und HGL5-Zellen (□) ist relativ zu mit den Lösungsmitteln der Inhibitoren behandelte Zellen als Kontrolle dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ermittelt. *p<0,05.

Nach Behandlung der HGL5-Zellen mit diesem Inhibitor und 0,1 µmol/l S1P wurde keine signifikant zur Lösungsmittelkontrolle veränderte Migration gemessen. Bei primären Granulosaluteinzellen reduzierte PD98059 die S1P-stimulierte Migration um 20, 13 %. Diese Resultate zeigen eine differenzielle Beteiligung der untersuchten Kinasen bei primären Granulosalutein- und HGL5-Zellen. Vor allem die PI3-Kinase und ERK scheinen für die S1P-stimulierte Migration von primären Granulosaluteinzellen im Gegensatz zu HGL5-Zellen von untergeordneter Bedeutung zu sein. Zusammenfassend lassen diese Daten eine unterschiedliche Bedeutung der PI3-, p38 MAP-Kinase und ERK bei der FHDL- und S1P-stimulierten Migration von primären Granulosalutein- und HGL5-Zellen vermuten.

Abschließend sollte geklärt werden, ob FHDL und S1P die p38MAP-Kinase, ERK und die der PI3-Kinase nachgeschalteten AKT-Kinase phosphorylieren. Dafür wurden die Zellen 60 min mit den FHDL und S1P Konzentrationen behandelt, bei denen eine maximale Induktion der Migration gemessen wurde und die geernteten Proteine im Western Blot analysiert. Als Positivkontrolle wurden primären Granulosaluteinzellen 30 min mit 80 % FF und HGL5-Zellen mit 40 % FF inkubiert. Sowohl die Stimulation der Zellen mit FHDL als auch mit S1P führte nicht zu einem Anstieg der Proteinphosphorylierung bei den untersuchten Kinasen. Bei den Untersuchungen zur Phosphorylierung von ERK1/2 und der

p38MAP-Kinase wurde eine geringfügige Abnahme der phosphorylierten Proteine bei primären Granulosaluteinzellen detektiert. Bei HGL5-Zellen änderte sich die Menge aller untersuchten phosphorylierten Kinasen nach Behandlung mit FHDL und S1P nicht. Bei den Positivkontrollen wurde eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung der AKT-, p38MAP-Kinase und ERK1/2 detektiert (Abb. nicht gezeigt). Zur Kontrolle wurden nachfolgend Experimente mit den S1P-Rezeptoragonisten FTY720 und VPC24191 durchgeführt. Nach Inkubation mit 1 nM FTY720 und 1 $\mu\text{mol/l}$ VPC24191 konnte kein Anstieg der Phosphorylierung der untersuchten Kinasen bei primären Granulosalutein- und HGL5-Zellen nachgewiesen werden (Abb. nicht gezeigt). Diese Daten weisen darauf hin, daß die Induktion der Migration durch FHDL und S1P im untersuchten Zeitraum von 60 min möglicherweise unabhängig von AKT-, p38MAP-Kinase und ERK1/2 ist.

3.2.9. Stimulation der Proliferation mit FF

Die Ergebnisse zur Beteiligung der AKT-, p38MAP-Kinase und ERK warfen die Frage auf, wie die Diskrepanz zwischen den Migrationsexperimenten mit den Inhibitoren und dem Aktivierungsnachweis der untersuchten Kinasen zu erklären sein könnte. In den vorangegangenen Experimenten an HUVEC Zellen in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die AKT-Kinase und ERK1/2 in mitogene Prozesse involviert sind. Deshalb wurde überprüft, ob FF, FHDL und S1P die Proliferation der Granulosaluteinzellen beeinflussen. Dafür wurden die Zellen über den Zeitraum mit FF, FHDL und S1P inkubiert, in dem die Migrationsexperimente durchgeführt wurden (20 h). Die Zellen wurden mit den Konzentrationen inkubiert, die eine maximale Zellmigration induzierten und die Proliferation der Zellen mit dem MTT Test gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 57 dargestellt. S1P und FHDL zeigten geringfügige, aber nicht signifikant stimulatorische Effekte auf das Wachstum der Granulosaluteinzellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Inkubation der primären Granulosaluteinzellen mit 80 % FF führte zu einem Anstieg der Proliferation auf $186,3 \pm 33,2$ %. Bei HGL5-Zellen wurden ähnliche Effekte gemessen. Das Zellwachstum wurde durch Behandlung mit 40 % FF auf $174,3 \pm 27,3$ % erhöht. Als zusätzliche Kontrolle wurden die Proliferation von primären Granulosalutein- und HGL5-Zellen nach Inkubation mit 1 nM FTY720 und 1 $\mu\text{mol/l}$ VPC2419 gemessen. Beide S1P-Rezeptoragonisten hatten keine stimulatorischen Effekte auf das Zellwachstum (Abb. nicht gezeigt).

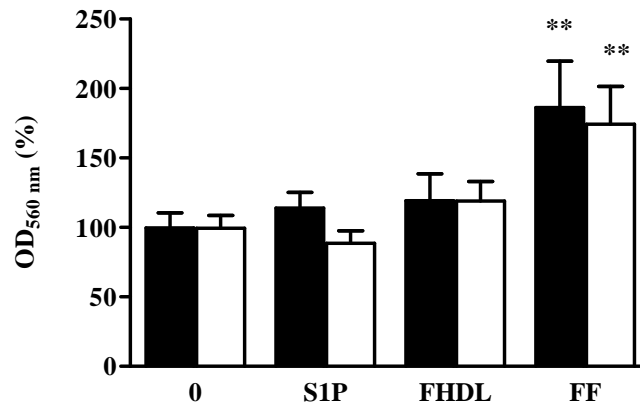


Abbildung 57: Stimulation der Proliferation von Granulosaluteinzellen nach Behandlung mit FF. Die OD_{560 nm} ± SD (%) von primären Granulosaluteinzellen (■) und HGL5-Zellen (□) nach Inkubation mit S1P, FHDL und FF ist relativ zu unbehandelten Zellen als Kontrolle dargestellt. Die Signifikanz wurde im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt. **p<0,01.

Das deutet darauf hin, daß die mit FF-induzierte Proteinphosphorylierung der untersuchten Kinasen möglicherweise auf mitogene Effekte der FF bei Granulosaluteinzellen zurückzuführen sind.

3.2.10. Untersuchungen zur Aktinpolymerisierung

Für die Migration von Zellen müssen intrazelluläre Umstrukturierungen des Zytoskeletts stattfinden, die zur Polymerisierung von monomerem G-Aktin zu filamentösem F-Aktin führen. Die Aktinfilamente werden für die Bildung von Lamello- und Filopodien sowie Stressfasern benötigt, um die Chemotaxis in Richtung eines Stimulus ermöglichen. Die Zunahme der Aktinpolymerisierung auf einen Stimulus kann mit fluoreszenzmarkiertem NBD Phalloidin sichtbar gemacht und gemessen werden.

3.2.10.1. Stimulation der Aktinpolymerisierung mit FHDL

Im nächsten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob FHDL die Aktinpolymerisierung von Granulosaluteinzellen beeinflusst. Dafür wurde zunächst in Vorversuchen geprüft, ob die NBD Phalloidin Färbung für die Untersuchungen mit Granulosaluteinzellen geeignet ist. Primäre Granulosalutein- und HGL5-Zellen wurden nach Serumentzug mit 1 % FBS supplementiertem Zellkulturmedium mit 1,2 mg/ml FHDL bzw. 0,8 mg/ml FHDL 60 min behandelt, mit NBD Phalloidin gefärbt und die Färbungen mikroskopisch beurteilt. Abbildung 58 zeigt ein Beispiel für die NBD Phalloidin Färbung der Zellen nach Inkubation mit FHDL. Es konnte nicht nur gezeigt werden, daß sich Granulosaluteinzellen mit NBD Phalloidin gut anfärben lassen, die Färbungen lieferten auch Hinweise auf die FHDL-induzierte Veränderung der Zellmorphologie und die Bildung von Lamellopodien

bei primären Granulosalutein- und HGL5-Zellen (Abb. 58 B und D). Die Inkubation mit serumfreiem Medium wurden solche Veränderungen nicht beobachtet. Diese Zellen zeigten eine kompaktere Morphologie und waren schmäler als die mit FHDL behandelten Zellen.

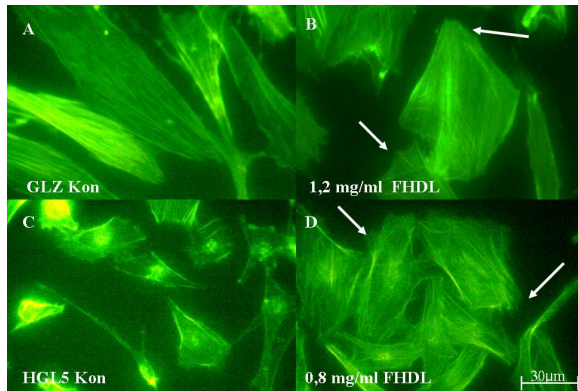


Abbildung 58: Aktinpolymerisierung von Granulosalutein- und HGL5-Zellen nach Stimulation mit FHDL. Primäre Granulosalutein- und HGL5-Zellen wurden 60 min mit FHDL inkubiert und mit fluoreszenzmarkiertem NBD Phalloidin gefärbt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen gefärbt. Die Pfeile kennzeichnen gebildete Lamellopodien (B, D). Vergrößerung 400x.

Deshalb sollte geklärt werden, in welchem Maße FHDL die Aktinpolymerisierung stimuliert und ob dieser Effekt abhängig von der Inkubationszeit ist. Dafür wurden die Zellen mit FHDL behandelt und über einen Zeitraum von 120 min gefärbt. Anschließend wurden der an polymerisiertem Aktin gebundene Fluoreszenzfarbstoff mit Methanol aus den Zellen herausgelöst und im Fluorimeter gemessen. Da die Zunahme der Aktinpolymerisierung positiv mit der gemessenen Fluoreszenzintensität korreliert, erfolgte die Quantifizierung der Effekte von FHDL auf die Aktinpolymerisierung relativ zu unbehandelten Zellen (100 %). Die Ergebnisse sind in Abbildung 59 gezeigt.

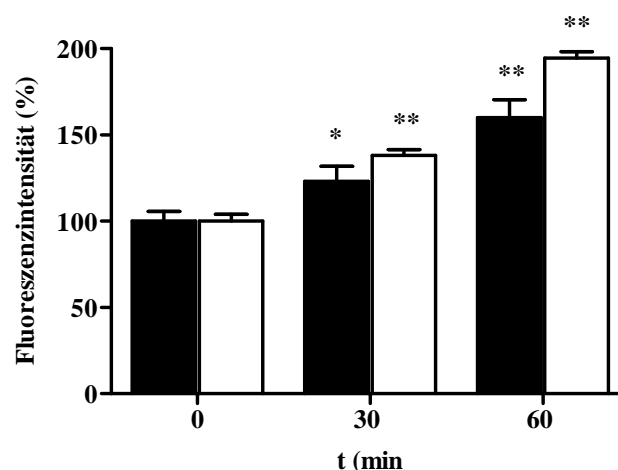


Abbildung 59: Stimulation der Aktinpolymerisierung von Granulosalutein- und HGL5-Zellen nach Behandlung mit FHDL. Die gemessene Fluoreszenzintensität von primären Granulosalutein- und HGL5-Zellen (■) und HGL5-Zellen (□) ist relativ zu unbehandelten Zellen als Kontrolle dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Die Behandlung der Zellen mit FHDL über 10 min zeigte keine Effekte auf die Aktinpolymerisierung (Abb. nicht gezeigt). Bei primären Granulosaluteinzellen führte die Inkubation mit 1,2 mg/ml FHDL zu einem zeitabhängigen Anstieg der Aktinpolymerisierung bis auf $160,1 \pm 10,4$ % im Vergleich zu unbehandelten Zellen bei 60 min. Der stimulatorische Effekt von FHDL wurde auch bei HGL5 Zellen nachgewiesen. Hier nahm die Aktinpolymerisierung bis 60 min mit 0,8 mg/ml FHDL auf $194,6 \pm 3,7$ % zu. Längere Inkubationszeiten hatten keine weitere Stimulation der Aktinpolymerisierung zur Folge. Bis 120 min änderte sich die gemessene Fluoreszenzintensität nicht signifikant (Abb. nicht gezeigt)

FHDL stimuliert die Aktinpolymerisierung von Granulosaluteinzellen somit in den Konzentrationen, bei denen maximal stimulatorische Effekte auf die Migration gemessen wurden.

3.2.10.2. Stimulation der Aktinpolymerisierung mit S1P

Anschließend wurde untersucht, ob S1P als FHDL-assoziiertes Lysosphingolipid Einfluß auf die Aktinpolymerisierung hat. Dafür wurden die Zellen mit den S1P Konzentrationen für 60 min inkubiert, bei denen die Migration der Zellen maximal stimuliert wurde und gefärbt. Erste Hinweise auf den Effekt von S1P lieferte die visuelle Auswertung der gefärbten Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop. Ein Beispiel für die NBD Phalloidin Färbung nach Behandlung mit S1P ist in Abb. 60 dargestellt.

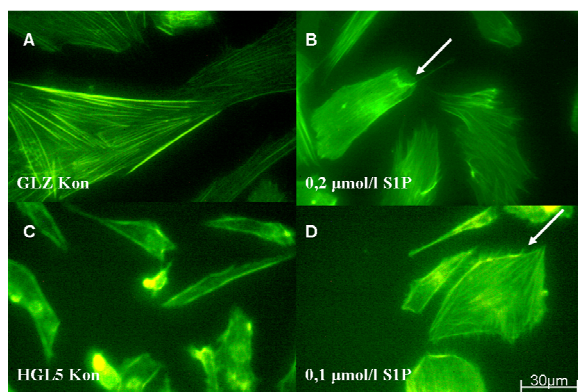


Abbildung 60: Aktinpolymerisierung von Granulosaluteinzellen nach Inkubation mit S1P. Primäre Granulosaluteinzellen und HGL5-Zellen wurden 60 min mit S1P inkubiert und mit fluoreszenzmarkiertem NBD Phalloidin gefärbt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen gefärbt. Die Pfeile kennzeichnen gebildete Lamellopodien (B) und Filopodien (D). Vergrößerung 400x.

Nach Behandlung mit S1P konnten im Gegensatz zu unbehandelten Zellen sowohl Lamellopodien (Abb. 60 B) als auch Filopodien (Abb. 60 D) detektiert werden. Dies ließ vermuten, daß S1P die Aktinpolymerisierung stimuliert.

Deshalb wurden die Zellen nachfolgend über einen Zeitraum von 120 min mit S1P

behandelt und die Fluoreszenzintensität gemessen. Abbildung 61 zeigt, daß die Inkubation der primären Granulosaluteinzellen mit 0,2 $\mu\text{mol/l}$ S1P nach 30 min zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität und damit der Aktinpolymerisierung auf $179,6 \pm 7,3 \%$ führte. Nach 60 min wurde keine weitere Zunahme detektiert. Bei HGL5-Zellen zeigten sich mit 0,1 $\mu\text{mol/l}$ S1P ähnliche Effekte wie bei primären Granulosazellen. Im Vergleich zur Behandlung über 30 min stieg die Aktinpolymerisierung auf $178,4 \pm 5,9 \%$.

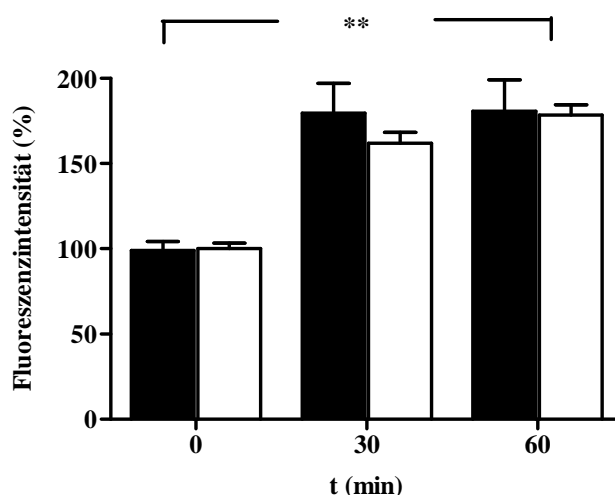


Abbildung 61: Stimulation der Aktinpolymerisierung von Granulosaluteinzellen nach Behandlung mit S1P. Die gemessene Fluoreszenzintensität von primären Granulosaluteinzellen (■) und HGL5-Zellen (□) ist relativ zu unbehandelten Zellen als Kontrolle dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt. ** $p < 0,01$

0,1 $\mu\text{mol/l}$ S1P stimulierten die Aktinpolymerisierung bei HGL5-Zellen in gleichem Maße wie 0,2 $\mu\text{mol/l}$ S1P bei primären Granulosaluteinzellen. Bis 120 min veränderte sich die gemessene Fluoreszenzintensität nicht signifikant (Abb. nicht gezeigt).

Mit diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß S1P und FHDL die Aktinpolymerisierung induzieren und die Stärke der Induktion der durch das Lysosphingolipids größer ist als mit FHDL.

3.2.11. Beteiligung von Rho-GTPasen an der FHDL- und S1P-stimulierten Migration

Es ist bekannt, daß kleine GTPasen der Rho-Familie in die Regulation der Aktinorganisation und damit in die Zellmigration involviert sind. Diese Rho-GTPasen, zu denen die RAC Proteine (Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1), CDC42 (Cell Division Cycle 42 GTP-binding Protein) und Rho Proteine gehören, haben unterschiedliche Effekte auf das Aktinzytoskelett. Während Rho die Bildung von Stressfasern und die fokale Adhäsion vermittelt, sind RAC und CDC42 an der Aktinpolymerisierung, die für die Ausbildung von Lamellopodien und Filopodien nötig ist,

beteiligt (Hall, 1998; Evers et al., 2000).

3.2.11.1. Beteiligung von RAC und CDC42 an der FHDL-stimulierten Migration

Welche Rho-GTPasen in die FHDL-stimulierte Migration von Granulosaluteinzellen involviert sind, sollten Untersuchungen mit Inhibitoren für die Rho-GTPasen zeigen. Dafür wurden die Zellen für 30 min mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Y-27632, einem Inhibitor von ROCK (Rho-associated, Coiled-coil Containing Protein Kinase) der Effektor Kinase zur Aktivierung von Rho und 50 ng/ml Toxin B aus *Clostridium difficile* vorbehandelt, das die Aktivierung von Rho, RAC und CDC42 hemmt. Anschließend wurde die FHDL-stimulierte Migration der Granulosaluteinzellen mit und ohne Inhibitoren gemessen. Abbildung 62 zeigt, daß die FHDL-stimulierte Migration der primären Granulosaluteinzellen nach Vorbehandlung mit Y-27632 um 23 % von $299,8 \pm 2,3$ % bis auf $231,4 \pm 4,0$ % reduziert wurde.

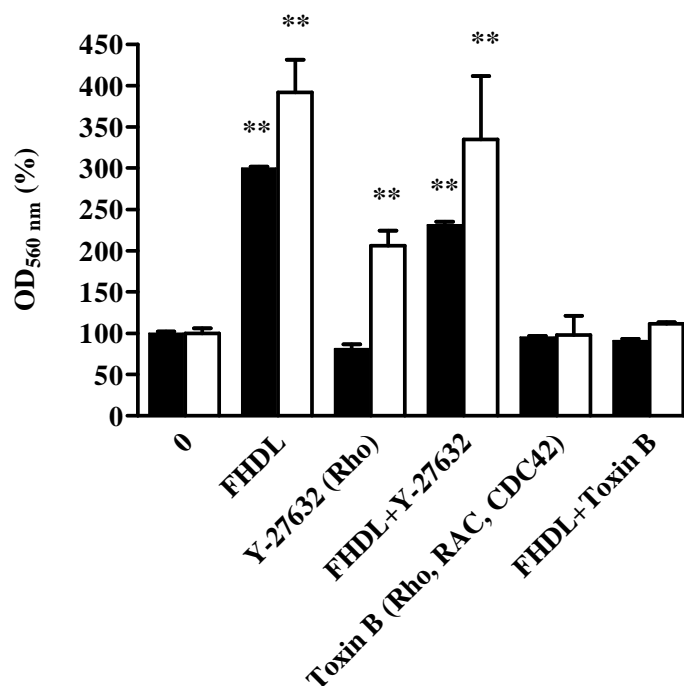


Abbildung 62: Migration von Granulosaluteinzellen nach Inkubation mit Inhibitoren der Rho-GTPasen und FHDL. Die OD_{560 nm} \pm SD der mit den Inhibitoren und mit 1,2 mg/ml FHDL bzw. 0,8 mg/ml FHDL behandelten primären Granulosaluteinzellen (■) und HGL5-Zellen (□) ist relativ zu mit den Lösungsmitteln der Inhibitoren behandelte Zellen als Kontrolle dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ermittelt. **p<0,01

Eine ähnliche Reduktion wurde bei HGL5-Zellen mit 0,8 mg/ml FHDL und diesem Inhibitor gemessen. Interessant war, daß die Behandlung der Zellen mit Y-27632 ohne FHDL zu einer Steigerung der Migration im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle auf $334,6 \pm 77,0$ % führte. Bei primären Granulosaluteinzellen wurde dieser Effekt nicht

beobachtet. Nach Verwendung von 50 ng/ml Toxin B und FHDL wurde keine Induktion der Zellmigration gemessen. Die FHDL-stimulierte Migration wurde mit Toxin B vollständig auf die Werte der Lösungsmittelkontrollen gehemmt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Rho-GTPasen RAC und CDC42 an der FHDL-stimulierten Migration beteiligt sein könnten und daß die Hemmung der Rho-Aktivierung bei HGL5-Zellen zu einer verstärkten Migration der Zellen führt.

3.2.11.2. Beteiligung von RAC und CDC42 an der S1P-stimulierten Migration

Nachfolgend war zu klären, welche GTPasen an der S1P-stimulierten Migration beteiligt sind. Die Ergebnisse zeigt die Abbildung 63.

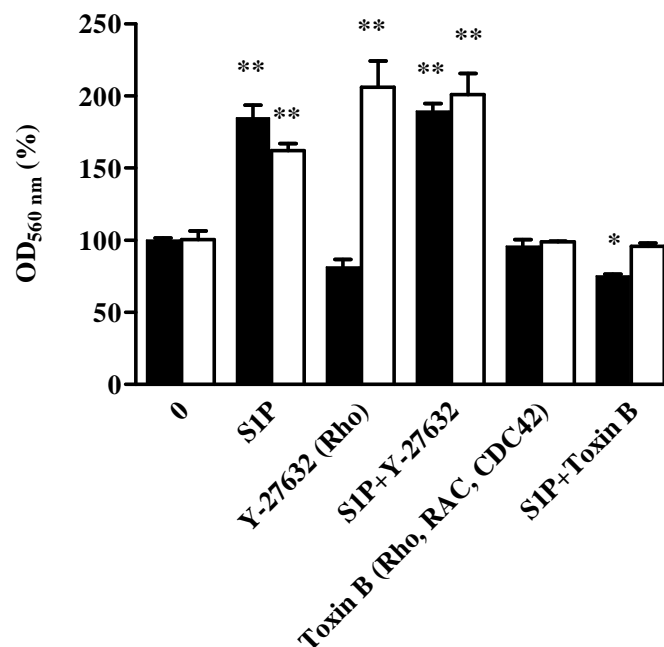


Abbildung 63: Migration von Granulosaluteinzellen nach Inkubation mit Inhibitoren der Rho-GTPasen und S1P. Die OD_{560 nm} ±SD mit den Inhibitoren und 0,2 µmol/l S1P bzw. 0,1 µmol/l S1P behandelte primäre Granulosaluteinzellen (■) und HGL5-Zellen (□) ist relativ zu mit den Lösungsmitteln der Inhibitoren behandelte Zellen als Kontrolle dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ermittelt. *p<0,05; **p<0,01.

Die Verwendung von Y-27632 hatte keinen signifikanten Einfluß auf die S1P-stimulierte Migration von primären Granulosaluteinzellen. Anders als bei diesen Zellen, wurde die Migration von HGL5-Zellen nach Behandlung mit diesem Inhibitor und S1P von 162,2 ±4,8 % auf 200,9 ±14,9 % gesteigert. Dieser Effekt wurde bei HGL5-Zellen auch ohne S1P mit Y-27632 beobachtet. Toxin B reduzierte die S1P-stimulierte Migration von HGL5-Zellen vollständig auf Werte der Lösungsmittelkontrolle. Bei primären Granulosaluteinzellen wurde die S1P-stimulierte Migration mit Toxin B signifikant auf

75,1 ±1,5 % reduzierte. Diese Daten zeigen, daß die Rho-GTPasen RAC und CDC42 wichtig für die S1P-stimulierte Migration sind.

Zusammenfassend läßt sich aus den Resultaten der Experimente mit den GTPase-Inhibitoren schlußfolgern, daß RAC und CDC42 wesentlich an der FHDL- und S1P-stimulierte Migration beteiligt sind.

3.2.12. Untersuchungen zur Progesteronsynthese

3.2.12.1. Stimulation der Progesteronsynthese mit FHDL

Die luteale Progesteronsynthese ist für die Implantation des Embryos und eine erfolgreich verlaufende Schwangerschaft essentiell. Deshalb sollte abschließend untersucht werden, ob FHDL für die Progesteronsynthese von Granulosaluteinzellen von Bedeutung ist. Für diese Untersuchungen wurden primäre Granulosalutein- und HGL5-Zellen mit serumfreiem Zellkulturmedium vorbehandelt und anschließend mit FHDL in verschiedenen Konzentrationen über einen Zeitraum von 72 h inkubiert. Die Progesteronkonzentrationen der Zellkulturüberstände wurden nachfolgend im ELISA gemessen. Die Quantifizierung erfolgte doppelt logarithmisch gegen eine Standardreihe. In Abbildung 64 sind die Ergebnisse der primären Granulosaluteinzellen dargestellt.

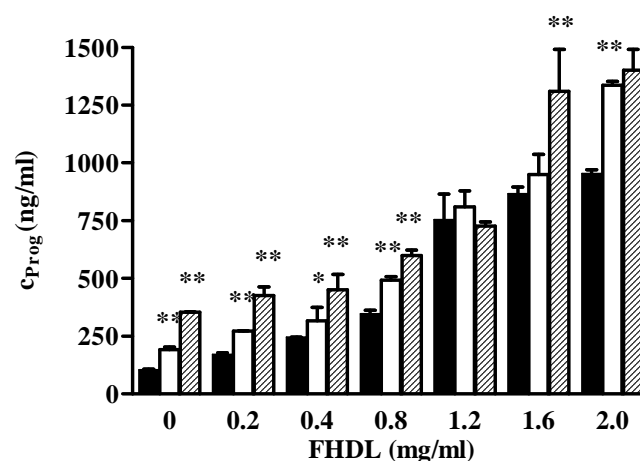


Abbildung 64: Zeit- und dosisabhängige Stimulation der Progesteronsynthese von primären Granulosaluteinzellen mit FHDL. Die Progesteronkonzentrationen in den Zellkulturüberständen sind nach 24 h (■), 48 h (□) und 72 h (▨) Behandlung mit FHDL dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zur Progesteronkonzentration nach 24 h ermittelt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Es konnte gezeigt werden, daß FHDL die Progesteronsynthese der Zellen nahezu linear dosis- und zeitabhängig steigert. Die Progesteronkonzentration im Zellkulturüberstand erhöhte sich im Vergleich zur basalen Progesteronkonzentration unbehandelter Zellen von

104,9 ±3,1 ng/ml nach Stimulation mit 2 mg/ml FHDL auf 954,4 ±15,9 ng/ml nach 24 h. Der stimulatorische Effekt von FHDL setzte sich über 48 h und 72 h fort. Maximale Anstiege der Progesteronkonzentration wurden zwischen 0,8 mg/ml FHDL und 1,2 mg/ml FHDL nach 24 h und 48 h sowie zwischen 1,2 mg/ml FHDL und 2 mg/ml FHDL nach 72 h gemessen. Der größte Anstieg der Progesteronkonzentration wurde nach 24 h gemessen. So stieg die Progesteronkonzentration nach 24 h zwischen 0,8 mg/ml FHDL und 1,2 mg/ml FHDL um 217,7 % von 346,5 ±17,0 ng/ml auf 754,2 ng/ml. Auffällig war, daß mit 1,2 mg/ml FHDL kein zeitabhängiger Effekt von 24 h bis 72 h detektiert werden konnte und die Progesteronkonzentration sich nicht signifikant änderte. Das zeigten auch die Messungen nach Behandlung mit 1,6 mg/ml FHDL zwischen 24 h und 48 h sowie 2 mg/ml FHDL zwischen 48 h und 72 h. Die Untersuchungen an HGL5-Zellen sind in Abbildung 65 dargestellt und zeigen ähnliche zeit- und dosisabhängige Effekte von FHDL auf die Progesteronsynthese.

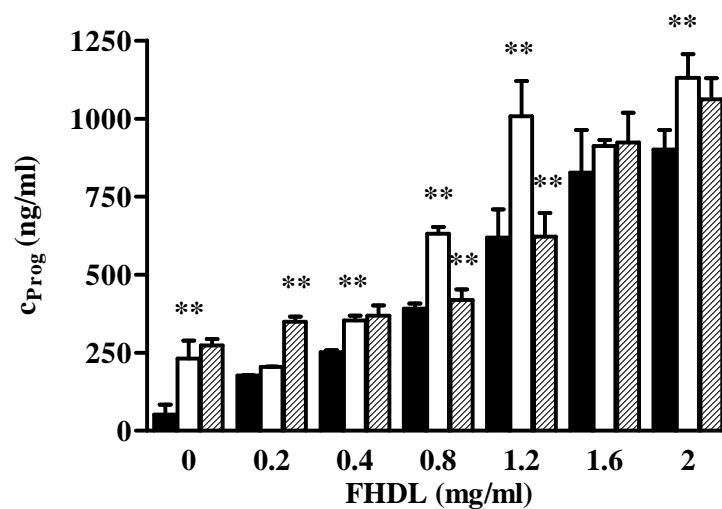


Abbildung 65: Zeit- und dosisabhängige Stimulation der Progesteronsynthese von HGL5-Zellen mit FHDL. Die Progesteronkonzentrationen in den Zellkulturüberständen sind nach 24 h (■), 48 h (□) und 72 h (▨) Behandlung mit FHDL dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zur Progesteronkonzentration nach 24 h ermittelt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Die stärkste Zunahme wurde nach 24 h zwischen 0,8 mg/ml FHDL und 1,2 mg/ml FHDL gemessen. Nach Inkubation der HGL5-Zellen mit 0,8 mg/ml FHDL nach 24 h wurde ein Anstieg der Progesteronkonzentration in den Zellkulturüberständen von 391,4 ±16,8 ng/ml auf 619,4 ±89,6 ng/ml bei 1,2 mg/ml FHDL gemessen. Das entspricht einer Zunahme von 158,2 %. Interessant war, daß die Progesteronkonzentrationen nach 72 h bei 0,8 mg/ml FHDL und 1,2 mg/ml FHDL auf die 24 h Werte reduziert waren. Eine Veränderung der Progesteronkonzentration zwischen 24 h und 72 h wurde bei 1,6 mg/ml FHDL nicht

detektiert. Dieser Effekt wurde auch bei 0,2 mg/ml FHDL zwischen 24 h und 48 h sowie 0,4 mg/ml FHDL zwischen 48 h und 72 h beobachtet. Zusammenfassend zeigen diese Daten, daß FHDL dosisabhängig die Progesteronsynthese von Granulosaluteinzellen stimuliert und vor allem die FHDL Konzentrationen die größten stimulatorischen Effekte hatten, die zu einem maximalen Anstieg der Migration führten.

3.2.12.2. Einfluß der SRB-I Rezeptor-vermittelten Cholesterolesteraufnahme

Nachfolgend wurde geprüft, ob FHDL die Progesteronsynthese der Granulosaluteinzellen über die SRB-I-Rezeptor vermittelte, selektive Aufnahme von Cholesterolestern stimuliert. Für diese Untersuchungen wurden die Zellen mit 10 µmol/l BLT-1, einem Inhibitor der SRB-I-Rezeptor-vermittelten Aufnahme von Cholesterolestern, vorbehandelt und anschließend mit FHDL und BLT-1 inkubiert. Die Ergebnisse zeigt die Abbildung 66.

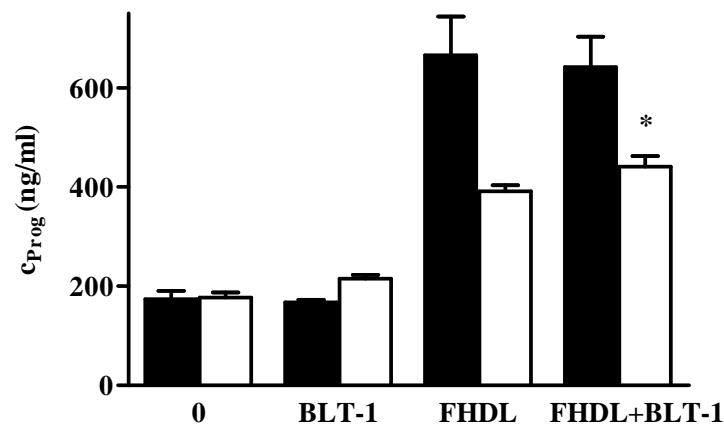


Abbildung 66: Stimulation der Progesteronsynthese von Granulosaluteinzellen nach Behandlung mit dem Inhibitor des SRB-I Rezeptors BLT-1 und FHDL. Die Progesteronkonzentrationen in den Zellkulturüberständen von primären Granulosaluteinzellen (■) und HGL5-Zellen (□) sind nach Behandlung mit BLT-1 und 0,8 mg/ml FHDL dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zur FHDL-stimulierten Progesteronsynthese ermittelt. * $p < 0,05$

BLT-1 hatte keinen signifikanten Einfluß auf die mit 0,8 mg/ml FHDL stimulierte Progesteronsynthese bei primären Granulosaluteinzellen hat. Bei HGL5-Zellen wurde ein Anstieg der die Progesteronkonzentration mit BLT-1 und 0,8 mg/ml FHDL von $391,4 \pm 11,8$ ng/ml auf $441,0 \pm 23,4$ ng/ml gemessen. Dieser Unterschied war signifikant zur FHDL-stimulierten Progesteronkonzentration. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß FHDL die Progesteronsynthese der Granulosaluteinzellen nicht über die SRB-I-Rezeptor vermittelte Aufnahme von Cholesterolestern stimuliert.

3.2.12.3. Einfluß von S1P auf die Progesteronsynthese

Aus publizierten Studien war bekannt, daß S1P die adrenale Aldosteronsynthese und die Transkription des *cyp17* Gens, das für adrenale und gonadale Steroidsynthese wichtig ist, stimuliert (Ozbay et al., 2004; Brizuela et al., 2007). Deshalb wurde abschließend untersucht, ob das Lysosphingolipid die Progesteronsynthese von Granulosaluteinzellen beeinflusst. Die Ergebnisse zeigt die Abbildung 67.

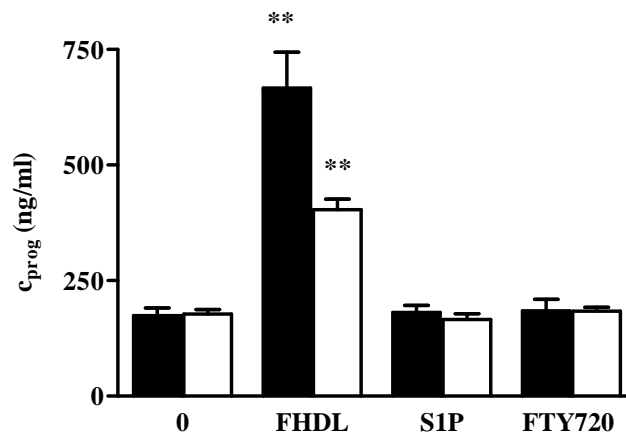


Abbildung 67: Effekt von S1P auf die Progesteronsynthese von Granulosaluteinzellen. Die Progesteronkonzentration in den Zellkulturüberständen von primären Granulosaluteinzellen (■) und HGL5-Zellen (□) sind nach Behandlung mit 0,1 $\mu\text{mol/l}$ S1P bzw. 0,2 $\mu\text{mol/l}$ S1P, 1 nM FTY720 und 0,8 mg/ml FHDL als Positivkontrolle dargestellt. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ermittelt. ** $p < 0,01$.

Die Stimulation der primären Granulosalutein- und HGL5-Zellen mit 0,1 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 0,2 $\mu\text{mol/l}$ S1P hatte keinen stimulatorischen Effekt auf die Progesteronsynthese. Die gemessenen Progesteronkonzentrationen waren nicht signifikant zu mit der Lösungsmittelkontrolle behandelten Zellen. Dieser Effekt bestätigte sich nach weiteren Untersuchungen mit S1P Konzentrationen bis 10 $\mu\text{mol/l}$ S1P (Abb. nicht gezeigt). Zusätzlich zeigten Experimente mit dem S1P-Rezeptoragonisten FTY720 (1 nM) keinen stimulatorischen Effekt auf die Progesteronsynthese. Damit konnte nachgewiesen werden, daß S1P keine Bedeutung für die Progesteronsynthese von humanen Granulosaluteinzellen hat.

Die Ergebnisse aus dem zweiten Teil der Arbeit, daß FHDL und S1P die Migration von Granulosaluteinzellen über den S1P-Rezeptor 3 und die für chemotaktische Prozesse wichtige Aktinpolymerisierung stimulieren. Daran sind möglicherweise RAC und CDC42 beteiligt. Die Signaltransduktionswege der FHDL- und S1P-stimulierten Migration in Bezug auf die AKT-, p38MAP-Kinase und ERK konnten nicht aufgeklärt werden. FHDL stimuliert die Progesteronsynthese von Granulosaluteinzellen.

4. Diskussion

4.1. FHDL und S1P sind Mediatoren der ovariellen Angiogenese

Das Corpus luteum ist eines der am meisten vaskularisierten Gewebe im menschlichen Organismus. Es besteht zu ca. 60 % aus Endothelzellen, die nach Invasion in das kollabierte Antrum folliculi ein dichtes Netzwerk neuer Gefäße bilden. Dadurch wird die Versorgung der Progesteron synthetisierenden Granulosaaluteinzellen und der Transport des Hormons zu den Zielorganen gewährleistet (Stouffer et al., 2001). Die im Rahmen der Corpus luteum Formation stattfindenden mito- und angiogenen Prozesse werden von Faktoren initiiert und reguliert, die sowohl lokal gebildet, als auch von Zellen des einströmenden Blutes sezerniert werden und Bestandteil der residualen FF sind. Obwohl bisher einige biologisch aktive Faktoren, z. B. Melatonin, EGF und IGF-1 in der FF identifiziert und charakterisiert wurden, ist davon auszugehen, daß viele Komponenten derzeit unbekannt sind (Woo et al., 2001; Coticchio et al., 2004; Choi et al., 2008). Darüber hinaus weisen publizierte Daten darauf hin, daß FF thermostabile Substanzen enthält, die meiotische Prozesse während der Oozytenmaturation und die Spermienmotilität günstig beeinflussen (Frederick et al., 1984; Bryant et al., 1988; Chao et al., 1992; Voznesenskaia et al., 2001). FF fördert nicht nur die Fertilisierbarkeit der Oocyte und das Follikelwachstum, sondern ist auch in die Entstehung des Corpus luteum involviert (Nayudu et al., 1989; McClure et al., 1993; Kawano et al., 2004; Ocal et al., 2004; Doyle, Danadeu, 2008). Deshalb war im ersten Teil der vorliegenden Arbeit von Interesse, ob FF die Proliferation und Tubulusformation von HUVEC Zellen beeinflusst und ob die angiogene Aktivität auf thermostabile Substanzen in der FF zurückzuführen ist. Es konnte gezeigt werden, daß FF zeit- und dosisabhängig die Proliferation von HUVEC Zellen stimulierte. Obwohl die Quantifizierung der Tubulusformation, z. B. durch Messung der Tubuluslänge, aufgrund fehlender technischer Ausstattung nicht möglich war und nur visuell beurteilt werden konnte, wurde abhängig von der eingesetzten FF Menge eine deutliche Zunahme der Tubuli detektiert werden. Bei der verwendeten MatrigelTM Matrix wirkte sich jedoch nachteilig aus, daß die Tubuli nach 24 h instabil wurden und keine Langzeitexperimente wie bei den Untersuchungen zur Proliferation durchgeführt werden konnten. Deshalb lassen sich keine Aussagen über mögliche Langzeiteffekte von FF und auf die Tubulusformation treffen, die möglicherweise wichtig für die Corpus luteum Entstehung sind (Gefäßstabilisierung, etc.).

Die Wachstumssteigerung und der Erhalt der angiogenen Aktivität nach Behandlung der HUVEC Zellen mit hitzebehandelter im Vergleich zu unbehandelter FF wiesen auf das Vorhandensein eines thermostabilen, angiogen wirksamen Faktors hin. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt lieferte eine Studie, in der ein von Granulosaluteinzellen sezernierter, thermostabiler Faktor in FF identifiziert wurde. Dieser ist in die Regulation der Bioverfügbarkeit von VEGF eingebunden und beeinflusst die Proliferation von HUVEC Zellen (Grümmer et al., 2005). Die Bedeutung des thermostabilen Wachstumsfaktors VEGF für die luteale Angiogenese wurde eingehend beschrieben (van den Driesche et al., 2004; Fraser und Duncan, 2005; Phan et al., 2006; Tropea et al., 2006; Taylor et al., 2007). VEGF wird verstärkt unter dem Einfluß von Hypoxie und Gonadotropinen, wie hCG, exprimiert und fördert als chemotaktischer Faktor die Neoangiogenese und das Wachstum von Endothelzellen (van den Driesche et al., 2004; Herr et al., 2007). Je nach verwendetem Testsystem zeigten die Untersuchungen, daß VEGF die Proliferation von HUVEC Zellen 1,2- bis 2fach stimulierte (Ali et al., 2005; Erdogan et al., 2005; Mader et al., 2006; Belloni et al., 2007). Die Inkubation der HUVEC Zellen mit der VEGF₁₆₅ Konzentration, die durchschnittlich in FF gemessen wurde (4 ng/ml VEGF₁₆₅), stimulierte das Zellwachstum auf das 1,35 fache. Die Behandlung mit 20 % FF und damit einem Fünftel der in FF physiologischen VEGF₁₆₅ Konzentration (ca. 0,7 ng/ml), hatte jedoch einem höheren Anstieg der Proliferation zur Folge. Das bestätigten die durchgeführten Experimente zur Tubulusformation. Diese war mit 4 ng/ml rh VEGF₁₆₅ geringer ausgeprägt als mit 20 % FF. In dieser Arbeit wurde die Proliferation der Zellen mit dem MTT-Test detektiert. Dieser Test erlaubt durch die Messung der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase nur indirekte Rückschlüsse auf die Zellzahl. Da die Anzahl der Mitochondrien mit Energiebedarf der Zelle korreliert, könnten gemessene stimulatorische Effekte auch auf eine erhöhte Anzahl von Mitochondrien zurückzuführen sein. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß der gemessene Anstieg auf eine erhöhte Stoffwechselaktivität der Zellen zurückzuführen ist. Eine zusätzliche Validierung der Daten durch die Bestimmung der Zellzahl oder die Zunahme der DNA, z. B. mit einem BrDU ELISA, könnten dies klären. Darüber hinaus zeigen die Experimente zur Tubulusformation eine Zunahme der Zellzahl, die zwar nicht quantifiziert werden konnte aber einem Anstieg im MTT-Test durch alleinige Steigerung der Stoffwechselaktivität widersprechen würden. Deshalb im Folgenden die gemessene Steigerung im MTT-Test weiterhin als Proliferationssteigerung bezeichnet wird.

Die beobachteten Effekte des Wachstumsfaktors wurden durch die Hitzebehandlung

beeinflusst, woraus ein stark reduziertes Zellwachstum und eine eingeschränkte Tubulusformation resultierten. Damit war gezeigt, daß der mito- und angiogene Effekt hitzbehandelter FF nicht auf VEGF alleine zurückzuführen ist. Ähnliche Aussagen konnten für bFGF in Bezug auf die mito- und angiogenen Effekte nativer FF getroffen werden. Dieser thermolabile Wachstumsfaktor wurde als erstes ovarielles Angiogen beschrieben (Gospodarowicz, 1991; Tamanini et al., 2004; Rajesh et al., 2006). In FF wurden ca. 0,2 ng/ml bFGF gemessen. Experimente mit rh bFGF in dieser Konzentration induzierten zwar die Bildung neuer Tubuli, die geringe Wachstumssteigerung war jedoch nicht signifikant. Maximal stimulatorische Effekte auf die Zellproliferation wurden erst bei 0,5 ng/ml rh bFGF detektiert. Diese Resultate könnten jedoch auch auf eine geringere Aktivität von rh VEGF₁₆₅ und rh bFGF im Vergleich zu den nativen Wachstumsfaktoren in FF zurückzuführen sein. Die Aktivität der verwendeten rh Proteine und der nativen Wachstumsfaktoren in FF konnte nicht gemessen und miteinander verglichen werden. Deshalb läßt die Korrelation der Proteinkonzentrationen von rh VEGF₁₆₅ und rh bFGF mit den in FF gemessenen Konzentrationen nur bedingt Rückschlüsse auf die angiogene Wirkung der Wachstumsfaktoren im Zusammenhang mit den gemessenen Effekten von FF zu. Zusätzliche Experimente, bei denen beide Wachstumsfaktoren mittels Immunodepletion aus FF entfernt wurden, lieferten weitere Hinweise auf die vermutlich untergeordnete Bedeutung von VEGF und bFGF für die humane, luteale Angiogenese. Die Depletion von VEGF aus FF hatte keinen signifikanten Einfluß auf die FF-stimulierte Proliferation und Tubulusformation der HUVEC Zellen und bestätigt Untersuchungen zur lutealen Angiogenese bei Affen (Yamashita et al., 2008). Der nach Immunodepletion durchgeführte ELISA zeigt eine deutliche Reduktion beider Wachstumsfaktoren unter die Nachweisgrenze von 5 pg/ml VEGF₁₆₅ bzw. 3 pg/ml bFGF. Obwohl die Detektionsgrenze der zur Immunodepletion verwendeten Antikörper der Wachstumsfaktoren nicht bekannt ist, zeigen Kontrollexperimente mit rh VEGF₁₆₅ und rh bFGF keine Stimulation des Zellwachstums nach Immunodepletion. Nach Behandlung der FF mit bFGF Antikörpern war das Zellwachstum im Vergleich zur Inkubation mit unbehandelter FF signifikant um 9,3 % reduziert. Studien zur mitogenen Aktivität konditionierter Medien von lutealen Zellen aus Schafen konnten ebenfalls die untergeordnete Bedeutung von bFGF für die luteale Angiogenese nachweisen (Grazul-Bilska et al., 1995b). Andere Veröffentlichungen im Tiermodell zeigen jedoch konträre Daten. In Extrakten von bovinen und ovinen Corpora lutea supprimierte die Applikation von bFGF Antikörpern die mitogene Aktivität um 85 %. Bei *in vivo* Untersuchungen mit ähnlichen Versuchsansätzen wurde lediglich

eine Reduktion um 25 % dokumentiert (Stouffer et al., 2001). Obgleich über synergistische *in vitro* Effekte von bFGF und VEGF auf die Proliferation und Angiogenese von Endothelzellen unterschiedliche Daten publiziert wurden, konnten solche Effekte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden und bestätigen bereits publizierte Studien an HUVEC Zellen (Pepper et al., 1998; Sun et al., 2004; Mason et al., 2002; Yoshida et al., 1996). Aufgrund der vorliegenden Resultate konnte deshalb geschlußfolgert werden, daß VEGF und bFGF zwar angiogen wirksam sind, die Effekte von FF auf die Proliferation und Tubulusformation jedoch nur zu einem geringen Teil auf beide Wachstumsfaktoren zurückzuführen sind. Folglich ließen diese Ergebnisse Rückschlüsse auf bisher nicht identifizierte, angiogene Faktoren in FF zu.

Die chromatographische Aufreinigung der hitzebehandelten FF zeigte, daß die mitogene Aktivität auf eine proteinreiche Fraktion zurückzuführen ist, deren Bestandteile als ApoA-I und ApoA-IV identifiziert wurden. Da diese Proteine ausschließlich auf HDL-Partikeln vorkommen, die als einzige Lipoproteinklasse in FF beschrieben wurde (Perret et al., 1985), war zu vermuten, daß FHDL am mito- und angiogenen Effekt der FF beteiligt sein könnte. FHDL stimulierte die Proliferation und Tubulusformation von HUVEC Zellen maximal bei den Konzentrationen, die in FF vorkommen (ca. 1 mg/ml ApoA-I) (Jaspard et al., 1997). Darüber hinaus hatte FHDL-depletierte FF ein weitaus geringeres Potential, das Wachstum und die Tubulusformation von HUVEC Zellen zu induzieren als native FF und spricht ebenfalls für die Beteiligung von FHDL an der humanen, lutealen Angiogenese. Im Gegensatz zu plasmatischem HDL, das hauptsächlich aus α -HDL-Partikeln besteht, enthält FHDL zu gleichen Anteilen kleinere, discoide *prä* β -HDL- und sphäroide α -HDL-Partikel. Durch den Nachweis der *prä* β -HDL-Fraktion in FHDL-depletierter FF war anzunehmen, daß die mito- und angiogene Aktivität von FHDL auf die größeren, lipidreichen α -HDL-Partikel zurückzuführen ist. Obwohl die Bedeutung von FHDL im Follikel noch weitgehend ungeklärt ist, sind ähnliche angiogene Effekte von plasmatischem HDL dokumentiert (Tamagaki et al., 1996). Neben der klassischen, antiatherogenen Funktion, die im peripheren Blutkreislauf im reversen Cholesteroltransport begründet liegt, ist plasmatisches HDL als autonomer gefäßprotektiver Faktor beschrieben worden (Nofer et al., 2002; Assmann und Nofer, 2003; Rader et al., 2008). HDL stimuliert u. a. die Proliferation und Migration von Endothelzellen, hemmt die Bindung und Chemotaxis von Monozyten, die atherogen wirkende Oxidation von Lipoproteinen niedriger Dichte (Low Density Lipoproteins) und

die Apoptose von Endothelzellen (Nofer et al., 2001; O'Connell et al., 2001; Miura et al., 2003; Sumi et al., 2007). Darüber hinaus induziert das Lipoprotein die intrazelluläre Calciummobilisation (Nofer et al., 2000; Vekshina, 2004) und aktiviert neben der endothelialen Nitridoxidsynthase (eNOS), andere vasodilatatorische Substanzen (Noor et al., 2007; de Goma et al., 2008; Feig et al., 2008). Viele der gefäßprotektiven Eigenschaften von plasmatischem HDL sind auf bioaktive Lysophospholipide zurückzuführen, für die das Lipoprotein als Träger fungiert. Dazu gehören S1P, Sphingosinphosphorylcholin (SPC), Lysophosphatid (LSF) und Lysophosphatidsäure (LPA) (Nofer et al., 2000; Kimura et al., 2001). In den durchgeführten Untersuchungen zeigte ausschließlich die lipidäre FHDL-Fraktion mitogene Aktivität und deutete somit auf eine mögliche Beteiligung FHDL-assoziiierter Lysophospholipide hin. Nachfolgende Analysen der Kooperationspartner in Münster wiesen erstmals S1P in FF nach und zeigten, daß follikuläres S1P hauptsächlich mit FHDL assoziiert ist. In einem ähnlich durchgeführten Versuchsansatz wurde an HUVEC Zellen gezeigt, daß nur die S1P-reiche Fraktion und chromatographisch aus plasmatischem HDL aufgereinigtes S1P die Zellmigration und das Überleben der Zellen stimulierte (Kimura et al., 2003). Obwohl die S1P Konzentration in FF mit ca. 170 nmol/l deutlich geringer als im Plasma (ca. 900 nmol/l) ist (Okajima, 2002), stimulierte das Lysosphingolipid in dieser Konzentration die Proliferation und Tubulusformation der HUVEC Zellen maximal. Weiterführende Untersuchungen mit modifiziertem FHDL bestätigten, daß S1P in die mito- und angiogenen Effekte von FHDL involviert ist. Den proliferationssteigernden Effekt von hitzebehandeltem im Vergleich zu nativem FHDL erklären unveröffentlichte Daten der Kooperationspartner, die zeigen, daß S1P thermostabil ist. Dies konnte auch aus den Ergebnissen dieser Arbeit zur Migration von Granulosaluteinzellen geschlußfolgert werden. Dafür spricht zusätzlich die gute Nachweisbarkeit von S1P in hitzebehandeltem FHDL mit der HPLC Methode. Nach Aktivkohle-Behandlung wurde eine verringerte S1P Konzentration in FHDL gemessen. Obwohl keine genauen Konzentrationsangaben vorlagen, wurde dies anhand des geringeren Peaks im HPLC-Chromatogramm deutlich (Abb. nicht gezeigt). Damit einhergehend wurde ein reduziertes Zellwachstum im Vergleich zu unbehandeltem FHDL detektiert. Zusätzlich führte die Behandlung von FHDL mit Alkalischer Phosphatase zu einer deutlichen Reduktion der mito- und angiogenen Aktivität des Lipoproteins. Daß dieser Effekt signifikant zur Kontrolle erhöht war, ist möglicherweise auf das Vorhandensein anderer FHDL-assoziiierter Lysophospholipide zurückzuführen, für die im Zusammenhang mit plasmatischem HDL

ähnliche Effekte beschrieben wurden (Boguslawski et al., 2000; Nofer et al., 2003; Murch et al., 2008). Das würde ebenso erklären, warum S1P den stimulatorischen Effekt von FHDL nicht vollständig imitieren konnte. Der Nachweis dieser Lysophospholipide und deren Einfluß auf die Proliferation und Angiogenese von HUVEC Zellen war nicht Ziel dieser Arbeit, sollte jedoch Gegenstand weiterer Untersuchungen auf diesem Gebiet sein. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen und eine Reihe von Studien sprechen jedoch für die Beteiligung von S1P an den mito- und angiogenen Effekten von FHDL. So sind die Effekte von S1P auf die Proliferation, Angiogenese und Migration im Zusammenhang mit plasmatischem HDL gut dokumentiert. (Kimura et al., 2001; 2003; Miura et al., 2003; Oyama et al., 2008; Yan et al., 2008). Das Wachstum und die Migration von HUVEC Zellen wurde mit 0,1 µmol/l S1P deutlich stärker stimuliert, als mit SPC, LSF und LPA in dieser Konzentration, die ungefähr der durchschnittlich gemessenen S1P Konzentration in FF entspricht (Kimura et al., 2003).

Weitere Hinweise für die Bedeutung von FHDL und S1P für die luteale Angiogenese lieferten die Experimente zur Signaltransduktion. Die Behandlung der HUVEC Zellen mit dem PI3-Kinase Inhibitor Ly29004 und PD98059, der die MEK-1-Kinase vermittelte ERK1/2 Aktivierung hemmt sowie dem Inhibitor der Proteinkinase C, H7, reduzierten das FHDL- und S1P-stimulierte Zellwachstum deutlich. Diese Resultate lieferten auch die Untersuchungen zur Tubulusformation, die im Rahmen der Bachelorarbeit von Sarah Quiering in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden. Dabei waren die Effekte der Inhibitoren bei der Behandlung der Zellen mit FHDL und S1P stärker ausgeprägt als mit FF. Darüber hinaus konnte mit phosphoprotein-spezifischen Antikörpern im Western Blot gezeigt werden, daß ERK1/2 und die der PI3-Kinase nachgeschalteten AKT-Kinase am FHDL- und S1P-stimulierten Zellwachstum beteiligt sind. Untersuchungen der Kooperationspartner wiesen zusätzlich die Phosphorylierung der Konsensus-Sequenz (R/K)X(S)Hyd(R/K) eines PKC-Substrates durch FF, FHDL und S1P nach. Das bestätigen bereits publizierte Studien mit plasmatischem HDL und S1P, in denen die Bedeutung dieser Kinasen für mitogene und angiogene Prozesse von Endothelzellen dokumentiert wurde (Dimmeler und Zeiher, 2000; Secchiero et al., 2003; Fieber et al., 2006; Sumi et al., 2007; Wang et al., 2008). Überdies spricht die Abnahme der Signalstärke der phosphorylierten Kinasen nach Stimulation der Zellen mit FHDL-depletierter FF im Vergleich zu unbehandelter FF für FHDL und S1P als ovarielle Angiogene. Die Auswertung der Western Blots erfolgte bei diesen Untersuchungen semiquantitativ durch die Relativierung der erhaltenen Signale zum Gesamtprotein der Kinase. Aufgrund der

detektierten Signalstärke nach Stimulation der Zellen mit FF und S1P war diese Quantifizierung ausreichend, um eine Aussage über den Einfluß von FF und S1P treffen zu können. Als zusätzliche Kontrolle, vor allem für die Untersuchungen mit FHDL, hätten die Proteinlysate der stimulierten Zellen mit einer Phosphatase behandelt und im Western Blot mit den phosphospezifischen Antikörpern analysiert werden können. Alternativ zum Western Blot bietet die Industrie sehr sensitive ELISAs für die Detektion von phosphorylierten Proteinen an.

Aufgrund der Ergebnisse mit FF-stimulierten HUVEC Zellen kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß FF andere angiogene Faktoren enthält, die nicht nur diese, sondern auch AKT-Kinase- und ERK1/2-unabhängige Signalwege induzieren und infolgedessen die Proliferation und Tubulusformation der Zellen beeinflussen könnten. Darauf weisen die durchgeführten Inhibitorstudien mit FF hin, in denen die FF-stimulierte Zellproliferation und Tubulusformation nur teilweise durch die verwendeten Inhibitoren gehemmt wurden. Die gefäßprotektiven Effekte von S1P und HDL werden über spezifische zum Teil Pertussis Toxin (PTX) sensitive G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt, an die S1P mit unterschiedlicher Affinität bindet (Kluk und Hla, 2002; Pyne und, Pyne, 2000). Die Dissoziationskonstanten von S1P für diese Rezeptoren liegen zwischen 2 nM und 30 nM (Lee et al., 1998; Kon et al., 1999; Im et al., 2000; Yamazaki et al., 2000). Das bedeutet, daß für die Aktivierung dieser Rezeptoren weit weniger S1P benötigt wird, als im Plasma oder Serum vorhanden ist. Die Bedeutung der PTX-sensitiven S1P-Rezeptoren 1 und 3 für die mito- und angiogenen Effekte von HDL und S1P bei HUVEC Zellen ist gut dokumentiert (Waeber et al., 2004; LaMontagne et al., 2006; Schmid et al., 2007). Auf weitere Untersuchungen zur Identifizierung des Rezeptoridentität der FHDL- und S1P-stimulierten Proliferation und Tubulusformation wurde deshalb verzichtet.

Die Herkunft von intrafollikulärem S1P ist bis dato ungeklärt. Es ist nicht bekannt, ob Granulosaluteinzellen die zur S1P Synthese wichtigen Sphingosinkinasen exprimieren oder ob S1P zusammen mit HDL als Transsudat des Blutes in den Follikel gelangt. S1P wird in hohen Konzentrationen in Thrombo- und Erythrozyten gespeichert (Hänel et al., 2007; Pappu et al., 2007), die nach Ovulation in das entstehende Corpus luteum einströmen, wobei Thrombozyten nach deren Aktivierung S1P und viele andere Wachstumsfaktoren sezernieren (Yatomi et al., 1997). Deshalb ist denkbar, daß nicht nur FHDL-assoziiertes S1P peri- und postovulatorisch, sondern auch S1P aus aktivierten Thrombozyten, eine wichtige Bedeutung für angiogene Prozesse während der Lutealphase haben könnte.

4.2. FHDL und S1P stimulieren die Migration von Granulosaluteinzellen

Die Migration von luteinisierten Granulosazellen ist neben der postovariellen Angiogenese ein zentraler Prozeß bei der Entstehung des Corpus luteum. Im Kontext der residualen Follikelflüssigkeit im sich entwickelnden Corpus luteum, zeigten die Ergebnisse aus dem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit, daß native und hitzebehandelte FF die Migration von primären Granulosalutein- und HGL5-Zellen dosisabhängig stimulierte. Im Gegensatz zu den untersuchten Primärzellen, deren Migration mit 80 % FF maximal stimuliert wurde, konnten maximale Effekte bei HGL5-Zellen bereits mit 40 % FF detektiert werden. Möglicherweise sind die Ursachen für diese Diskrepanzen in der Heterogenität der Zellpopulation im Vergleich zu der homogenen HGL5-Zelllinie begründet. Anzunehmen ist, daß der Gehalt von Thekalutein- und Granulosaluteinzellen mit der Pathologie der Patientinnen, ihrem Hormonstatus, der Follikelpunktion und der Zellisolierung und damit auch die Responsivität der Zellen variiert. Aufgrund des Fehlens eines eindeutigen Granulosazellmarkers war eine Trennung der Granulosaluteinzellen von anderen nach Isolierung noch vorhanden Zelltypen und die Bestimmung der Reinheit der Zellpopulation nicht möglich. Andererseits ist nicht bekannt, aus welchem Stadium der Lutealphase HGL5-Zellen ursprünglich isoliert wurden. Die erhobenen Daten weisen jedoch darauf hin, daß bereits geringe Mengen FF für die Induktion der Migration von Granulosaluteinzellen ausreichend sind und sprechen für das Vorhandensein von migrationsfördernden Faktoren in humaner FF. Aufgrund der Thermostabilität des migrationsfördernden Faktors in FF und der Resultate aus dem ersten Teil der Arbeit, war die Beteiligung von FHDL an der lutealen Migration naheliegend. Diese Hypothese wurde durch die deutlich reduzierte Migration mit FHDL-depletierter FF und dem Migrationsanstieg nach Inkubation der Zellen mit physiologischen FHDL Konzentrationen der FF bestätigt. In weiterführenden Untersuchungen konnte bewiesen werden, daß FHDL-assoziiertes S1P wesentlich am migrationsfördernden Effekt von FHDL beteiligt ist. So hatte mit Aktivkohle- und AP-behandeltes FHDL eine geringere, migratorische Aktivität als natives FHDL, während nach Hitzebehandlung eine ähnliche Migrationsinduktion gemessen wurde. Durch die Aktivkohle-Behandlung wurde der S1P Gehalt in FHDL reduziert und erklärt den geringeren, stimulatorischen Effekt von Aktivkohle-behandeltem FHDL. Zusätzlich spricht für S1P als migrationsfördernden Faktor von FHDL, das keine Migrationsinduktion nach Behandlung von S1P mit AP detektiert werden konnte. Die dosisabhängige Stimulation der Zellmigration mit kommerziell erhältlichem S1P und die Untersuchungen mit modifiziertem S1P zeigten letztlich eindeutig die migrationsfördernde Aktivität des

Lysosphingolipids in den für FF physiologischen S1P Konzentrationen. Aus Untersuchungen in der Arterioskleroseforschung ist bekannt, daß die Migration von Endothelzellen nach Stimulation mit plasmatischem HDL auf S1P zurückzuführen ist und spricht zusätzlich für die erhobenen Daten (Kimura et al., 2000, 2001, 2003).

Vier der fünf bekannten S1P-Rezeptoren wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals in primären Granulosalutein- und HGL5-Zellen detektiert. Der fehlende Nachweis des S1P-Rezeptors 4 kann dadurch erklärt werden, daß dieser Rezeptor überwiegend von Leukozyten exprimiert wird und dort Effekte von S1P auf die Proliferation und Zytokinsekretion der Immunzellen vermittelt (Wang et al., 2005). Im Gegensatz zur PCR erwies sich der Proteinnachweis der Rezeptoren als schwierig. Das zeigte sich im Auftreten von mehreren Banden mit unterschiedlicher Intensität im Western Blot. Die mehrfache Optimierung der Western Blot-Bedingungen (Proteinisolierung, Antikörperinkubationen, Modifikation der Verdünnungen etc.) sowie die differentielle Aufarbeitung der Proteinlysate beeinflussten die Qualität der Ergebnisse kaum. Der Einsatz von Blockingpeptiden könnten zusätzliche Aufschlüsse über die Bandenidentitäten liefern. Eine weitere, mögliche Begründung für das Auftreten mehrerer Proteinbanden ist in dem Vorhandensein von unterschiedlichen Phosphorylierungs- und Glykosylierungsstellen, Genvarianten und der gewebespezifischen Expression der S1P-Rezeptoren zu suchen (Niedernberg et al., 2002). Die Genvarianten sind derzeit wenig untersucht und Informationen darüber überwiegend in Proteindatenbanken zu finden (s. Quellennachweis). Experimente mit S1P-Rezeptoragonisten und -antagonisten zeigten, daß die FHDL- und S1P-stimulierte Migration von Granulosaluteinzellen über die Bindung an den $G\alpha_i$ - und $G\alpha_o$ -Protein-gekoppelten S1P-Rezeptor 3 induziert wird. Diese Ergebnisse werden durch publizierte Studien zur HDL- und S1P-stimulierten Migration bei HUVEC Zellen bestätigt. So resultierte die Verwendung von antisense Oligonukleotide gegen die S1P-Rezeptoren 1 und 3 in einer deutlichen Reduktion der Migration. Dafür spricht, daß das Lysosphingolipid mit einer hohen Affinität an beide Rezeptoren binden kann (Kimura et al., 2000, 2003). Interessant ist, daß Dihydro-S1P, ein ausschließlich extrazellulär wirksamer S1P-Rezeptoragonist, den Effekt von S1P zu 100 % imitieren konnte. Das schließt eine Beteiligung von intrazellulär gebildetem S1P am migrationsfördernden Effekt aus. Das Lysosphingolipid kann je nach vorhandenem Rezeptorstatus und Zelltyp unterschiedliche Effekte auf die Migration ausüben. So zeigen Untersuchungen an Fibroblasten, daß der S1P-Rezeptor 2 die Zellmotilität negativ reguliert (Goparaju et al., 2005). In anderen Studien inhibierte dieser Rezeptorsubtyp die Migration von Melanom-

und Glioblastomazellen (Arikawa et al., 2003; Lepley et al., 2005). HDL und S1P induzieren in Endothel- und kanzerogenen Zellen vor allem nach Bindung an die S1P-Rezeptoren 1 und 3 verschiedene PI3- und AKT-Kinase abhängige Signalwege (Igarashi et al., 2001; Morales-Ruiz et al., 2001; Balthasaret al., 2006). Die durchgeführten Experimente mit dem PI3-Kinase Inhibitor Ly29004 konnten die Abhängigkeit der Zellmigration von der PI3-Kinase nur zum Teil bestätigen. Die partielle Hemmung der FF-stimulierten Migration läßt auf die Beteiligung von PI3-Kinase unabhängigen Signalwegen bei primären Granulosalutein- und HGL5-Zellen schließen. Obwohl der Effekt von Ly29004 auf die FHDL-stimulierte Migration deutlicher ausgeprägt war, wurde keine vollständige Inhibition in Anwesenheit des Inhibitors gemessen. Bei den Studien zur S1P-stimulierten Migration zeigten sich Unterschiede zwischen den primären Zellen und der immortalisierten Zelllinie. Ly29004 hemmte bei primären Granulosaluteinzellen die S1P-stimulierte Migration teilweise und bei HGL5-Zellen nahezu vollständig. Zusätzlich konnte die Phosphorylierung der PI3-Kinase nachgeschalteten AKT-Kinase nur bei Behandlung der Zellen mit FF gezeigt werden. Ähnliche Resultate lieferten die Untersuchungen mit dem p38MAP-Kinase Hemmer SB203580 und dem Inhibitor der MEK-1 vermittelten ERK Aktivierung, PD98059. Die FHDL- und S1P-stimulierte Migration von HGL5-Zellen wurde, im Gegensatz zu primären Granulosaluteinzellen, mit beiden Inhibitoren vollständig inhibiert. Eine Zunahme der Phosphorylierung von ERK1/2 und der p38MAP-Kinase über 60 min konnte jedoch nicht detektiert werden. Demzufolge lieferten die Inhibitorstudien keine eindeutigen Aussagen über die Beteiligung der untersuchten Kinasen. Die Diskrepanz zwischen den Experimenten könnte in den gewählten Zeitpunkten für die Untersuchungen zur Proteinphosphorylierung liegen. Obwohl Signalwege auf einen Stimulus rapide induziert werden, wie an HUVEC Zellen in dieser Arbeit gezeigt wurde, gibt es bei Granulosaluteinzellen keine gesicherten Daten dazu. Denkbar wäre ebenfalls, daß die Effekte der Inhibitoren entweder unspezifisch oder auf mitogene Ereignisse zurückzuführen sind, die über einen Untersuchungszeitraum von 20 h im Boyden-Kammer-System möglicherweise einbezogen werden müssen. Es zeigte sich, daß nur FF proliferationssteigernde Effekte auf die Granulosaluteinzellen hatte. Dafür spricht, daß PI3-/AKT-Kinase-abhängige Signalwege häufig mit mitogenen Prozessen assoziiert sind (Dimmeler und Zeiher, 2000; Morales-Ruiz et al., 2001; Fieber et al., 2006; Yan et al., 2008). Im Falle von FHDL können zusätzlich Wechselwirkungen bzw. Effekte von anderen FHDL-assoziierten Lysophospholipiden auf die Migration nicht ausgeschlossen werden. Diese wurden nicht näher untersucht. Letztendlich muß in

Betrachtet gezogen werden, daß die AKT-, p38MAP-Kinase und ERK1/2 nicht in die Migration von Granulosaluteinzellen involviert sind. Weiterführende Experimente mit den S1P-Rezeptoragonisten FTY720 und VPC24191 induzierten ebenfalls keine Zunahme der Phosphorylierung bei den untersuchten Kinasen. Warum die Inhibitoren dennoch Effekte zeigten, bleibt unklar. Es gibt Hinweise, daß für die S1P-induzierte Chemotaxis von HUVEC Zellen eine Aktivierung von ERK und der p38MAP-Kinase nicht erforderlich ist und die induzierten Signalwege vom jeweiligen Stimulus abhängig sind (Lee et al., 1999). In einer anderen publizierten Studie ist dokumentiert, daß die S1P-induzierte Migration mit PD98059 nicht hemmbar gewesen ist, während die HDL- und S1P-stimulierte Migration jedoch p38MAP-Kinase abhängig waren (Kimura et al., 2003). Zusätzlich konnte die Phosphorylierung der AKT-Kinase durch S1P und HDL gezeigt werden, die in keinem Zusammenhang mit der Beteiligung der p38MAP-Kinase-abhängigen Migration stand. In den Untersuchungen von Kimura et al. und Baudhuin et al. wurde 1 µmol/l S1P und plasmatisches HDL verwendet, daß vergleichbar mit FHDL mehr S1P enthält (Kimura et al., 2003; Baudhuin et al., 2004). Dies entspricht dem 5-10 fachen S1P Gehalt, der in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde. Die Migration der Zellen war bei diesen Konzentrationen deutlich reduziert. Möglicherweise werden, sofern es sich hier um unspezifische Effekte der verwendeten Inhibitoren handelt, andere Signalwege in Granulosaluteinzellen durch FHDL und S1P stimuliert. Darüber hinaus ist bekannt, daß die Aktivierung der AKT-Kinasen von der Bindung des Lysosphingolipids an den S1P-Rezeptor 1 abhängig zu sein scheint (Igarashi et al., 2001; Lee et al., 2001; Argraves et al., 2008; Greenspon et al., 2008). In den vorliegenden Untersuchungen wurde jedoch der S1P-Rezeptor 3 als Mediator der FHDL- und S1P-stimulierten Migration identifiziert und könnte die ausbleibende Aktivierung der Kinase erklären.

Für die gerichtete Chemotaxis sind dynamische Umstrukturierungen des Aktinzytoskeletts nötig, die zu einer Polymerisierung von monomerem G- zu F-Aktin führen (Cooper und Schafer, 2000; Carlier et al., 2003). Die Resultate in dieser Arbeit zeigten, daß FHDL und S1P die Aktinpolymerisierung von Granulosaluteinzellen stimulieren, wobei mit S1P größere Effekte als mit FHDL im Vergleich zu den Lösungsmittelkontrollen erzielt wurden. Ursache dafür sind möglicherweise antagonistische Effekte von FHDL-assoziierten Lysophospholipide, die z. B. für SPC beschrieben wurden (Mathieson und Nixon, 2006). Veränderungen des Aktinzytoskeletts werden durch ein fein abgestimmtes System kleiner Rho-GTPasen (Rho, CDC42, RAC) induziert und reguliert (BurrIDGE und Wennerberg, 2004). Während die Aktivierung von Rho Proteinen zur Bildung von.

Stressfasern führt und die fokale Adhäsion verstärkt, ist die RAC Aktivierung mit der Ausbildung und Verlängerung von Lamellopodien und dem sogenannten Membranruffling assoziiert (van Nieuw Amerongen et al., 2001; Etienne-Manneville, Hall, 2002). Die CDC42 Induktion ermöglicht durch die Generation von nadelartigen Filopodien, die als Sensoren für Umwelteinflüsse und extrazelluläre Stimuli fungieren, eine gerichtete Bewegung (Small et al., 2002; Svitkina et al., 2003). Deshalb ist eine bimodale Aktivierung von CDC42 und RAC auf einen Stimulus denkbar (Lee et al., 2006; Matsuyuki et al., 2006). Der Zusammenhang zwischen der S1P-stimulierten Migration und den Rho-GTPasen ist Gegenstand vieler Studien (Gonzalez et al., 2006; Lee et al., 2006; Tan et al., 2008; Wang et al., 2008). Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente mit Toxin B aus *Clostridium difficile* haben gezeigt, daß RAC und CDC42 an der FHDL- und S1P-stimulierten Migration von Granulosaluteinzellen beteiligt sind. Die partielle Hemmung der FHDL-stimulierten Migration durch den ROCK Inhibitor Y-27632 schließt eine Beteiligung von Rho jedoch nicht gänzlich aus. Bei den Untersuchungen zur S1P-stimulierten Migration hatte dieser Inhibitor keinen Effekt. Hinweise auf die Beteiligung von RAC und CDC42 geben auch die Aufnahmen der NBD Phalloidin Färbung S1P-stimulierter Zellen. So zeigt die Abbildung 63 B die Ausbildung von Lamellopodien durch S1P und läßt auf eine mögliche RAC-Aktivierung schließen. Konträre Daten aus anderen Studien zeigen, daß die PI3- und Rho-Kinase in die S1P-stimulierte endotheliale Migration involviert sind (Liu et al., 2001; Paik et al., 2001). Aus den bisher veröffentlichten Arbeiten wird deutlich, daß das Netzwerk der G-Protein-gekoppelten Aktivierung von Rho-GTPasen mit vor und nachgeschalteten Kinasen wenig verstanden und aufgeklärt ist. Es kristallisiert sich jedoch heraus, daß eine S1P-Rezeptor 1 vermittelte Aktivierung von RAC AKT-Kinase abhängig ist und die PI3-Kinase eine wesentliche Bedeutung für die S1P-stimulierte RAC-Aktivierung hat (Banno et al., 2001; Lee et al., 2001; Gonzalez et al., 2006). Die Beziehung zwischen den Rho-GTPasen und der AKT-Kinase bleibt jedoch vorerst kontrovers. Abhängig vom Studiendesign, aktiviertem G-Protein-gekoppeltem Rezeptor und verwendetem Zelltyp existieren unterschiedliche Daten (Banno et al., 2001; Lee et al., 2001; Liu et al., 2001; Paik et al., 2001; Waeber et al., 2004; Gonzalez et al., 2006). In dieser Arbeit wurde ein Zusammenhang zwischen der PI3-Kinase und der RAC-Aktivierung nicht untersucht. Daher bleibt nur zu spekulieren, daß in Granulosaluteinzellen, AKT-Kinase-unabhängig, aber PI3-Kinase-abhängig RAC und/oder CDC42 durch S1P und FHDL aktiviert werden. Daß RAC1 die Schlüssel-GTPase für die Bildung aktinreicher Lamellopodien Protrusionen ist, die hauptsächlich an der Zellmotilität

beteiligt sind, bestätigt eine Knockout-Studie, bei der *rac1* inaktiviert wurde. Der Verlust des Gens in Mäusen hatte *in vivo* letale Folgen. *In vitro* zeigten primäre Endothelzellen dieser Mäuse eine reduzierte Migration, Tubulusformation, eine gestörte Adhäsion und Barriere-Funktion in Antwort auf S1P und VEGF (Tan et al., 2008). Dies könnte für die Corpus luteum Entstehung und die luteale Angiogenese durchaus relevant sein. Granulosaluteinzellen sind in der Lage, kapillarähnliche, endotheliale Strukturen zu bilden, deren Funktion ist bis heute unbekannt ist. Die Autoren vermuten eine Beteiligung der Zellen an der Vaskularisierung bzw. eine zusätzliche Förderung und Stabilisierung angiogener Prozesse im Rahmen der Corpus luteum Formation (Antczak et al., 2000). In diesem Zusammenhang ist auch Wechselwirkungen von Endothel- und Lutealzellen von Bedeutung. Dafür stehen derzeit weiter entwickelte 3-D Modelle zur Verfügung, die eine Kokultivierung von Endothel- und Lutealzellen erlauben und somit die Ereignisse *in vivo* realistischer nachstellen können (Robinson et al., 2008).

Die vorliegenden Untersuchungen richteten sich ausschließlich auf die Bedeutung von FHDL und exogenem S1P für wesentliche, zelluläre Prozesse bei der Corpus luteum Entstehung. Inwieweit intrazellulär gebildetes S1P, das als second messenger fungieren kann oder andere FHDL-assoziierte Lysophospholipide, unter Berücksichtigung der entsprechenden Rezeptoren, für die Corpus luteum Entstehung wichtig sind, sollte Gegenstand für weitere Untersuchungen sein. Des Weiteren ist zu klären, ob das Lysosphingolipid für die Luteolyse oder das Überleben von Lutealzellen während der ersten Schwangerschaftswochen von Bedeutung ist.

4.3. FHDL stimuliert die Progesteronsynthese von Granulosaluteinzellen

Die Progesteronsynthese ist für die Funktionalität des Corpus luteum, die Implantation des Embryos und den Erhalt der Schwangerschaft im ersten Trimester essentiell.

Das für die Steroidsynthese benötigte Cholesterol können Granulosaluteinzellen *de novo* durch die 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), dem limitierenden Enzym der Cholesterolsynthese synthetisieren. Aufgrund niedriger HMG-CoA-Reduktase Spiegel und dem Fehlen weiterer Enzyme für den Cholesterolmetabolismus in Lutealzellen, spielt die *de novo* Synthese von Cholesterol aber nur eine untergeordnete Rolle für die Progesteronsynthese (Gwynne, Strauss, 1982; Wu et al., 2003; Kraemer, 2007). Deshalb wird vermutet, daß die Hydrolyse von gespeicherten Cholesterolestern bzw. Lipoproteine als Cholesterolquelle genutzt werden (Azhar, Raven, 2002; Miranda-Jiménez et al. 2007; Cherian-Shaw et al., 2009). Die Aufnahme von

Cholesterolestern aus HDL- und LDL-Partikeln erfolgt über LDL- bzw. SRB-I-Rezeptoren, wobei HDL-Cholesterolester ausschließlich über den SRB-I-Rezeptor internalisiert werden können. Dieser Rezeptor ist jedoch nicht spezifisch für HDL. Es ist bekannt, daß Cholesterolester, vor allem aus acetyliertem und oxidiertem LDL, über diesen Weg in die Zelle gelangen (Krieger M, 1999; Stangl et al., 1999). Bis heute ist nicht eindeutig geklärt, welches Lipoprotein als Cholesterollieferant für die luteale Steroidsynthese fungiert. Eine Vielzahl kontroverser Studien zeigt nicht nur speziesspezifische Unterschiede auf, die Aussagen über die Cholesterolquelle divergieren auch innerhalb einzelner Spezies (Murata et al., 1998; Ragoobir et al., 2002; Miranda-Jiménez et al. 2007; Cherian-Shaw et al., 2009).

Die Bedeutung von FHDL für die humane Progesteronsynthese ist bislang wenig untersucht. Die durchgeführten Experimente haben gezeigt, daß FHDL dosis- und zeitabhängig die Progesteronsynthese von primären Granulosalutein- und HGL5-Zellen stimuliert. Zusätzlich weisen die Inhibitorstudien mit BLT-1 darauf hin, daß dieser Effekt nicht durch die Aufnahme von FHDL-Cholesterolestern über den SRB-I-Rezeptor vermittelt wird. Die stimulatorischen Effekte von plasmatischem HDL auf die Progesteronsynthese sind bereits an humanen Granulosaluteinzellen dokumentiert. Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen, konnte in dieser Studie die SRB-I-Rezeptor vermittelte Aufnahme von HDL-Cholesterolestern nachgewiesen werden (Azhar et al., 1998). Andere Untersuchungen zeigen jedoch, daß auch LDL die Progesteronsynthese stimulieren kann. Obwohl plasmatisches LDL 4-mal mehr Cholesterol als HDL enthält, induzierte plasmatisches HDL bei gleicher Cholesterolmenge und gleichem Proteingehalt die Progesteronsynthese effizienter als LDL (Ragoobir et al., 2002). Aufgrund dieser Resultate diskutieren die Autoren einen cholesterolunabhängigen Effekt als möglichen Mechanismus der HDL-stimulierten Progesteronsynthese, der auch für FHDL denkbar ist, weil FHDL ein schlechterer Cholesteroldonor im Vergleich zu plasmatischem HDL ist und trotzdem die Progesteronsynthese stimuliert (Jaspard et al., 1997). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob S1P an der FHDL-stimulierten Progesteronsynthese beteiligt ist. Es ist bekannt, daß das Lysosphingolipid die Aldosteronsynthese in der Nebenniere und die Transkription des *cyp17* Gens, einem wichtigen Enzym für die adrenale und gonadale Steroidogenese, induzieren kann (Ozbay et al., 2004; Brizuela et al., 2007). Zusätzlich weisen Untersuchungen darauf hin, daß der Steroidogene Faktor 1, ein nukleärer Transkriptionsfaktor, ein Sphingolipid-Bindeprotein ist (Urs et al., 2007). Nach Stimulation der Granulosaluteinzellen mit den S1P Konzentrationen, die in FF gemessen

wurden und dem S1P-Rezeptoragonist FTY720, konnte eine Beteiligung von S1P an der FHDL-stimulierten Progesteronsynthese ausgeschlossen werden. Eine mögliche Erklärung für den stimulatorischen Effekt von FHDL liefert der Nachweis von Pregnonolmetaboliten in humaner und boviner FF (Roy et al., 1989; Glomset, 1968; Roy, Belanger, 1991). Diese Intermediate der Progesteronsynthese entstehen aus Cholesterol durch das P450 side chain cleavage Enzym und werden mit dem mikrosomalen 3β -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase-System zu Progesteron umgewandelt. In FF sind Pregnonolfettsäureester hauptsächlich in FHDL gespeichert und können von Granulosaluteinzellen als Substrat für die Progesteronsynthese genutzt werden (Glomset, 1968; Roy und Belanger, 1991; 1992). Die Autoren zeigten, daß FHDL 200-mal mehr Pregnonolfettsäureester enthält als plasmatisches HDL. Zusätzlich konnte mit FHDL die Progesteronsynthese von Granulosaluteinzellen aus Schweinen nach Hemmung der intrazellulären Pregnonolsynthese mit Ketoconazol aufrechterhalten werden. Dieser Effekt war mit plasmatischem HDL nicht nachweisbar. Jedoch muß auch für die Herstellung dieser Metabolite Cholesterol, dessen Quelle bis heute nicht identifiziert wurde, als Substrat zur Verfügung stehen. Somit würden die FHDL-assoziierten Pregnonolmetabolite lediglich einen alternativen Mechanismus für die Progesteronsynthese darstellen. Granulosaluteinzellen enthalten große Mengen lipidreicher Vesikel, die bezeichnend für das Corpus luteum als Gelbkörper sind. Vermutlich werden diese lipidären Einschlüsse im Laufe der Follikelreifungen aus noch unbekanntem Ressourcen angelegt. Der exakte Mechanismus, wie FHDL die Progesteronsynthese von humanen Granulosaluteinzellen stimuliert und welche Bedeutung die Pregnonolfettsäureester haben, bleibt somit vorerst ungeklärt. Wenn nachgewiesen werden kann, daß die Pregnonolmetabolite für die humane Progesteronsynthese wichtig sind, sollten weiterführende Studien aufklären, ob diese Intermediate z. B. unter pathologischen Bedingungen (Corpus luteum Insuffizienz) für die humane Progesteronsynthese von Bedeutung sind und ob diese Form der Progesteronsynthese parallel neben einem cholesterolabhängigen Mechanismus stattfindet oder einen alternativen Mechanismus darstellt.

Für die Nutzung intrafollikulärer Ressourcen in Form von gespeicherten Cholesterolestern oder Pregnonolfettsäureestern aus FHDL als Substrat für die Progesteronsynthese in der periovulatorischen und frühen Lutealphase sprechen Untersuchungsergebnisse von Kurzzeitkulturen von Lutealzellen aus Makaken. Diese Zellen waren 12 h, 24 h und 36 h nach dem LH Peak nicht responsiv für exogen zugeführtes LDL und Cholesterol (Chaffin et al., 1999).

Mit zunehmender Vaskularisierung des entstehenden Corpus luteum und dem Anschluß an den peripheren Blutkreislauf liefern vermutlich beide Lipoproteine, plasmatisches LDL und HDL, Substrat für die luteale Steroidogenese in Form von Cholesterolestern. Welches Lipoprotein genutzt wird, liegt wahrscheinlich nicht nur in den speziesspezifischen Unterschieden begründet, sondern auch in welchem Abschnitt der Lutealphase die Progesteronsynthese untersucht wird. Dies würde möglicherweise die Diskrepanzen in den Untersuchungen zur prädominanten Cholesterolquelle erklären (Brannian, Stouffer, 1993; Reaven et al., 1999; Azhar, Raven, 2002; Cherian-Shaw et al., 2009). Zusammenfassend aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und der bisher veröffentlichten Studien, ist die Bedeutung von FHDL für die humane Progesteronsynthese eher in der periovulatorischen und frühen Lutealphase zu suchen.

4.4. FHDL und S1P in der Reproduktionsmedizin

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß FHDL und S1P die für die Entstehung eines funktionsfähigen Corpus luteum wichtigen Prozesse (Proliferation, Angiogenese, Migration, Progesteronsynthese) positiv beeinflussen. Diese Eigenschaften könnten sich günstig auf die weibliche Reproduktion auswirken und lassen sich möglicherweise für neue therapeutische Ansätze bei der Kinderwunschbehandlung nutzen.

Plasmatisches HDL wird nicht nur wegen seiner Funktion im reversen Cholesteroltransport, sondern auch aufgrund seiner gefäßprotektiven Eigenschaften als „gutes“ Cholesterin bezeichnet. Nicht selten sind starkes Übergewicht, Diabetes und ein erhöhter inflammatorischer Status durch chronische Erkrankungen mit einer eingeschränkten Fertilität und atherogen wirkenden Dyslipidämien (verringertes HDL-Cholesterol, Hypertriglyceridämie, Hypercholesterämie) assoziiert (Amaral et al., 2008; Kyrou und Tsigos, 2008; Zain und Norman, 2008; Robker et al., 2009). Andererseits gehen ovarielle Pathologien, wie das Polyzystische Ovarialsyndrom, von dem 5-10 % der Frauen im reproduktionsfähigen Alter betroffen sind, mit einem atherogenen Lipidprofil einher (Lithell et al., 1987; Knauff et al., 2008; Valkenburg et al., 2008). Eine gesunde Lebensweise, Gewichtsreduktion oder die medikamentöse Behandlung mit Statinen, Metformin oder Glitazonen bei pathologischen, ovariellen Befunden können entscheidend zur Verbesserung der Fertilität beitragen und korrelieren zusätzlich mit dem Anstieg von HDL-Cholesterol (Koo et al., 2007; Kodamon und Duleba, 2008).

Da der Ursprung von FHDL vermutlich im plasmatischen HDL begründet ist, wäre denkbar, daß FHDL ähnliche Effekte auf Granulosalutein- und HUVEC Zellen wie

plasmatisches HDL bei Endothelzellen hat. So wirkt sich der Anstieg von plasmatischem HDL möglicherweise günstig auf die intrafollikuläre HDL Konzentration und somit auf die weibliche Fertilität aus.

Im Rahmen der Reproduktionsmedizin limitieren die Zerstörung von Oozyten, die Fragmentierung von Embryonen, die mit einer reduzierten Blastozysten-Bildung und der Apoptose von Granulosazellen einhergehen, den Erfolg der Kinderwunschbehandlung (Stone et al., 2005; Bencomo et al., 2006; della Ragione et al., 2007). So beeinflusst z. B. die intrafollikuläre Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) die Qualität von Oozyten negativ, die das weibliche Reproduktionspotenzial über die genetische und cytoplasmatische Integrität der Oocyte definiert (Wiener-Megnazi et al., 2004; Das et al., 2006). In diesem Zusammenhang könnten die antioxidativen und antiinflammatorischen Effekte von HDL und S1P neue Strategien zur Verbesserung der Oozyten- und Embryonenqualität darstellen. Die Identifizierung der antioxidativen Enzyme Paraoxonase 1 und 3 in FF sowie die negative Korrelation von FHDL, plasmatischem HDL und ApoA-I mit der Embryonenfragmentation, liefern erste viel versprechende Ergebnisse auf diesem Gebiet (Browne, et al., 2008). Weitere Untersuchungen an Granulosazellen sollten klären, inwieweit die zellprotektiven Eigenschaften von HDL und S1P für die Reproduktionsmedizin relevant sind, da diese bisher nur im Rahmen der Arterioskleroseforschung dokumentiert wurden (Nofer et al., 2004; Napoli et al., 2006, Tölle et al., 2007). Vor allem in Bezug auf die Hemmung von inflammatorischen Prozessen, könnten HDL und S1P für die Reproduktionsmedizin interessant sein. Bei den Techniken der assistierten Reproduktion werden unreife und befruchtete Oozyten im Brutschrank kultiviert. Möglichweise könnten HDL und S1P als Zusatz im Inkubationsmedium die Bildung von ROS hemmen bzw. einschränken und positive Effekte auf Oozytenmaturation und die Embryoqualität ausüben. Der Einsatz beim Auftauen von kryokonservierten Oozyten bzw. Embryonen wäre ebenfalls denkbar. Viele Effekte von HDL von S1P werden über spezifische S1P-Rezeptoren vermittelt. Insofern könnte auch die Verwendung von S1P-Rezeptoragonisten in diese potentiellen Anwendungen einbezogen werden. Die antiapoptotischen Eigenschaften rücken S1P in den Interessensfokus als Therapieform für die Ovarprotektion bei Krebspatientinnen nach Chemo- oder Strahlentherapie. Diese führen durch apoptotische Prozesse zur Zerstörung des postnatalen Oozyten-Pools und damit zur irreversiblen Infertilität (Perez et al., 1997; Briggs et al., 1999). Untersuchungen an Mäusen haben gezeigt, daß S1P Oozyten vor der Doxorubicin- und strahlungsinduzierten Apoptose schützt (Morita et al., 2000).

Nachfolgende Langzeitstudien bestätigten diese Ergebnisse (Paris et al., 2002). Ähnliche Untersuchungen mit männlichen Mäusen sprechen ebenfalls für den protektiven Effekt von S1P. Die Applikation von S1P führte dosisabhängig zu einem geringeren Verlust von primären Spermatozoen und Spermatiden nach ionisierender Strahlung als bei unbehandelten Tieren (Ojala et al., 2004). Dadurch könnte das Lysosphingolipid auch für die Andrologie interessant sein.

Aufgrund der vielfältigen positiven Effekte von HDL und S1P sollten weitere Untersuchungen in Bezug auf die humane Fertilität Gegenstand neuer Forschungsprojekte sein.

5. Material und Methoden

5.1. Materialien

5.1.1. Geräte

Schüttler TITRA MAX	Heidolph Instruments, Schwabach
Kühlzentrifuge MIKRO R22	Hassa Laborbedarf, Lübeck
Mikrozentrifuge Biofuge® Pico	Heraeus, Hanau
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Uetze
Feinwaage Kern 770	Hassa Laborbedarf, Lübeck
Laborwaage Kern 440 N	Hassa Laborbedarf, Lübeck
Universal 32R Zentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
BIO-RAD Power Pac Basic	BIO-RAD, München
Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau
IR Sensor Sanyo CO ₂ Inkubator	Sanyo, München
Thermostat Plus 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Schüttler	DPC Biermann, Bad Nauheim
Photometer Helios γ	Unicam, Niederlande
PCR Maschine PTC-200	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
UV Transilluminator	MWG-Biotech, Ebersberg
Mikrotiter Platten Photometer MRX	DPC Biermann, Bad Nauheim
Gelelektrophorese Blotapparat	BIO-RAD, München
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135 M	Carl Zeiss, Jena
Versafloor™ Fluorimeter	BIO-RAD, München
Über-Kopf-Schüttler	Labortechnik Fröbel, Lindau

5.1.2. Chemikalien

Methanol	Merck, Darmstadt
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Formaldehyd, 37 %	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumsulfat (APS)	BIO-RAD, München
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	BIO-RAD, München
Glycin	Sigma Aldrich, Taufkirchen

2-Propanol	Fisher Scientific, Schwerte
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Tween 20	Sigma Aldrich, München
Glycerol	Merck, Darmstadt
N,N Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	BIO-RAD, München
Chlorwasserstoffsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	BIO-RAD, München
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxidlösung (NaOH, 1 N)	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ x 6H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Norit A [™]	Serva Elektrophoresis, Heidelberg
Kaliumbicarbonat (KHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck, Darmstadt

5.1.3. Biologisches Material

5.1.3.1. Patientenkollektiv

Humane Granulosaluteinzellen und Follikelflüssigkeit wurden aus Follikelaspiraten von Patientinnen im Alter zwischen 23 und 39 Jahren gewonnen, die sich im Rahmen der Kinderwunschbehandlung einer hormonellen Stimulation der Ovarien unterzogen haben. Zuvor wurde ein Basisscreening mit einer perimenstruellen Vaginalsonografie durchgeführt und die endokrinen Parameter LH, Estradiol und Progesteron im Serum an den Zyklustagen 1-3 kontrolliert. Ausschlusskriterien vom nachfolgenden Stimulationszyklus waren: der Nachweis einer ovarieller Raumforderungen über 10 mm Durchmesser, endometriale Auffälligkeiten, z. B. eine Endometriumhöhe > 4 mm und intrakavitäre Pathologien, wie Polypen. Zu den Einschlusskriterien der Patientinnen zählte das Vorliegen einer Indikation zur assistierten Reproduktion, wie die schwere Beeinträchtigung des Spermioграмms (Oligo-Asthenoteratozoospermie-Syndrom), das in ca. 70 % der Fälle Hauptursache der Infertilität der Paare war. Patientinnen mit ideopathischer Sterilität bzw. einem tubaren Faktor wurden ebenfalls in das

Patientenkollektiv aufgenommen.

Nach Desensibilisierung der hypophysären gonadalen Achse mit Nafarelin (Synarela[®], Pharmacia, Freiburg) wurden den Patientinnen zur Induktion der Follikelreifung 150-300 U rekombinantes Follikel-stimulierendes Hormon (GonalF[®], Merck Serono, Darmstadt) über etwa 10-14 Tage appliziert. Ab dem 6. Stimulationstag wurde zusätzlich subkutan eine Injektion Cetrotide[®] (Cetrorelix, Merck-Serono, Darmstadt) bis zum Erreichen der Ovulationsinduktionskriterien verabreicht. Die Ovulation herangereifter Follikel wurde bei einem Follikeldurchmesser von mindestens 17 mm und 3 Follikeln durch Gabe von 10000 U humanem Choriongonadotropin (Choragon[®], Ferring, Kiel) ausgelöst. Nach 36 h wurden die Oozyten und Follikelflüssigkeit transvaginal aspiriert.

Ein genehmigter Ethikantrag der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät des UKSH, Campus Lübeck (Aktenzeichen 04-120 und 06-167) zur Gewinnung und Prozessierung der Follikelaspirate liegt vor.

5.1.3.2. Zelllinien

HGL5-Zellen, eine luteinisierte Granulosazelllinie, wurden freundlicherweise von Frau Dr. Sonntag von der Universitätsfrauenklinik Münster zur Verfügung gestellt.

5.1.4. Zellkulturzubehör

Endotheliales Wachstumsmedium	Promocell, Heidelberg
RPMI 1640, 25 mM HEPES, L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Ultrosor G	PALL Life Sciences, Dreieich
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Fötale Bovines Serum (FBS)	PAA Laboratories GmbH
Accutase	PAA Laboratories GmbH
Trypanblau, 0,4 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Collagenase	Biochrom-KG, Berlin
Neubauerzählkammer	Roth, Karlsruhe
Ficoll-Plaque [™] Plus	Amersham Biosciences, Freiburg
Methylthiazolyldiphenyl-Tetrazolium (MTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Matrigel [™]	BD Biosciences, Heidelberg

5.1.5. Reagenzien

Aprotinin, 10 mg/ml	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Precision Plus Protein, Dual Color Standard	BIO-RAD, München
Hyperfilm™ ECL High Performance Chemiluminescence Film	GE Healthcare, München
ECL Western Blot Detektionsreagenz	GE Healthcare, München
Polaroid Film 667 ISO 3000/DIN 36	PMA Bode GmbH, Hamburg
Magermilchpulver (Blotting Grade)	BIO-RAD, München
Agarose Ultra Pure	Invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromid Lösung, 10 mg/ml	Sigma Aldrich, Taufkirchen
50 bp DNA Marker	Invitrogen, Karlsruhe
Nuklease-freies Wasser	Sigma Aldrich, Taufkirchen
PD-10 Säulen	GE Healthcare, München
Protein A Sepharose	Biomol, Hamburg
SEW2871	Biomol, Hamburg
Cay1044	Biozol, München
Pertussis Toxin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ly29004	Calbiochem, Bad Soden
SB203580	Calbiochem, Bad Soden
PD98059	Calbiochem, Bad Soden
FTY720	Calbiochem, Bad Soden
H7	Calbiochem, Bad Soden
VPC24191	Otto Nordwald GmbH, Hamburg
Toxin B, <i>Clostridium difficile</i>	Calbiochem, Bad Soden
Complete™ Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
rh VEGF ₁₆₅	Biomol, Hamburg
rh bFGF	Abcam, Cambridge, England
Sphingosin 1-Phosphat	Biomol, Hamburg
NBD Phalloidin	Invitrogen, Karlsruhe
BLT-1	Chembridge, San Diego, USA
Re-Blot Plus Lösung	Chemicon, Hofheim
Alkalische Phosphatase	Sigma Aldrich, Taufkirchen

Dextran T70	Pharmacia Biotech, Freiburg
Kristallviolett	Roth, Karlsruhe
VECTA Shield	Biozol, München
30 % Acrylamid/Bisacrylamid Lösung, 37,5:1	BIO-RAD, München
Optitran® Nitrocellulose Membran	Schleicher Schüll, Dassel
Polyvenyldenfluorid (PVDF) Membran	Schleicher Schüll, Dassel
RNase Out	Invitrogen, Karlsruhe
Oligo dT Primer	Qiagen, Hilden
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HotStar TaqPlus DNA Polymerase	Qiagen, Hilden

5.1.6. Fertigkits und ELISA-Zubehör

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RT Omniscript Kit	Qiagen, Hilden
RNase-free DNase Kit	Qiagen, Hilden
QProteome Cell Compartment Kit	Qiagen, Hilden
BCA™ Assay	ThermoFischer, Scientific Braunschweig
Quantikine® Human FGF basic Immunoassay	R&D Systems, Wiesbaden
Quantikine® Human VEGF Immunoassay	R&D Systems, Wiesbaden
Progesteron Correlate EIA™ Kit	Biomol, Hamburg

5.1.7. Allgemeine Labormaterialien

Kryoröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Solingen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktiongefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Einmal-Plastikröhrchen (50 ml, 15 ml)	Greiner Bio-One, Solingen
Einmal-Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One, Solingen
Deckgläser (Durchmesser 12 mm)	Assistent Glaswarenfabrik, Sondheim
Objektträger Superfost	Menzel Gläser, Braunschweig
24 und 96 Loch-Platten	Greiner Bio-One, Solingen
Boyden Migrationskammern	Corning, Wiesbaden
96 Loch Real time PCR Platten	Sarstedt, Nümbrecht

5.1.8. Antikörper

5.1.8.1 Primärantikörper

Name	Katalog Nr.	Hersteller	Herkunftsorganismus	Spezifität
CD31, Klon 9G11	BBA7	R&D Systems, Wiesbaden	Maus, monoklonal	anti- human
VEGF ₁₆₅ , Klon EP1176Y	1909-1	Biomol, Hamburg	Maus, monoklonal	anti- human
β Aktin, Klon AC-15	A5441	Sigma Aldrich, Taufkirchen	Maus, monoklonal	anti- human
Phospho-ERK (Tyr204)	sc-7383	Santa Cruz, Heidelberg	Maus, monoklonal	anti- human
bFGF	DP3506S	Acris Antibodies, Himmelreich	Kaninchen, polyklonal	anti- human
S1P-Rezeptor 1	CAY- 10005228-1	Biozol, München	Kaninchen, polyklonal	anti- human
S1P-Rezeptor 2	IMG-6135A	Biomol, Hamburg	Kaninchen, polyklonal	anti- human
S1P-Rezeptor 3	CAY- 10006373-1	Biozol, München	Kaninchen, polyklonal	anti- human
S1P-Rezeptor 5	PAB-10633	Biozol, München	Kaninchen, polyklonal	anti- human
Phospho-AKT (Ser473)	9271	New England Biolabs, Frankfurt (Main)	Kaninchen, polyklonal	anti- human
AKT	9272	New England Biolabs, Frankfurt (Main)	Kaninchen, polyklonal	anti- human
Phospho-p38MAP- Kinase (Tyr180/Tr108)	9211	New England Biolabs, Frankfurt (Main)	Kaninchen, polyklonal	anti- human
p38MAP-Kinase	9212	New England Biolabs, Frankfurt (Main)	Kaninchen, polyklonal	anti- human
ERK	sc-94	Santa Cruz, Heidelberg	Kaninchen, polyklonal	anti- human

5.1.8.2. Sekundärantikörper

Name	Katalog Nr.	Firma	Herkunftsorganismus	Spezifität
ECL™ IgG-HRP-gekoppelt	NA931	GE Healthcare, München	Schaf	anti-Maus
IgG-HRP-gekoppelt	7074	New England Biolabs, Frankfurt (Main)	Ziege	anti-Kaninchen
IgG-FITC-gekoppelt	F0257	Sigma Aldrich, Taufkirchen	Ziege	anti-Maus

5.1.9. Primer

Name	Katalog. Nr.	Firma
Hs_EDG5_1_SG QuantitTect Primer Assay	QT00230846	Qiagen, Hilden
Hs_EDG3_1_SG QuantitTect Primer Assay	QT00244251	Qiagen, Hilden
Hs_EDG6_1_SG QuantitTect Primer Assay	QT1192744	Qiagen, Hilden
Hs_EDG8_1_SG QuantitTect Primer Assay	QT00234178	Qiagen, Hilden

Sequenz der S1P-Rezeptor 1 Primer

S1P-1R forward 5'-CTCCACAACGGGAGCAATAAC-3' (Nukleotid-Position 815-835)

S1P1R reverse 5'-CAGCGCACTGATGCAGTT-3' (Nukleotid-Position 911-928)

5.1.10. Puffer und Lösungen

0,1 % BSA	S1P-Puffer	5 % NEB Antikörper-Verdünnungspuffer
- 1 mg BSA	- 0,4 mg BSA	- 2,5 mg BSA
in 1000 ml 1x PBS gelöst	in 100 ml 1x PBS gelöst	in 50 ml 1x TBST gelöst
Lämmli-Puffer	1x TBE	Alkalische Phosphatase-Puffer
- 125 mM Tris	- 89 mM Tris-Borat	- 2 mol/l Glycin
- 8 % SDS	- 2 mM EDTA	- 200 mmol/l Tris-Cl
- 30 % Glycerin	- 1 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O	- 75 mmol/l MgCl ₂

MTT-Lösung	MTT-Stoppuffer	Hämolysepuffer
- 5 mg MTT	- 10 % SDS	- 155 mmol/l NH ₄ Cl
in 1 ml 1x PBS gelöst	- 50 % N, N Dimethylformamid	- 1 mmol/l EDTA pH 7,2
		- 10 mmol/l KHCO ₃
RIPA-Puffer	0,1 % Kristallviolettlösung	1x TE Puffer
- 1 % Nonidet P-40	- 1 mg Kristallviolett	- 10 mM Tris-HCl, pH 7,4
- 0,5 % Natriumdeoxycholat	in 1 ml 96 % Ethanol gelöst	- 1 mM EDTA, pH 8,0
- 0,1 % SDS	- 1:100 mit A. bidest verdünnt	
supplementiert mit		
- 100 µg/ml PMSF		
- 1 mM Na ₃ VO ₄		
- 30 µg/ml Aprotinin		
in 1x PBS gelöst		

5.2. Methoden

5.2.1. Zellbiologische Methoden

5.2.1.1. Isolierung von humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen

Im Kreißsaal gewonnene, fetale Nabelschnüre wurden unmittelbar nach dem Abnabeln des Kindes in sterilen Gefäßen mit 1x PBS und 2 % Kanamycin bei 4 °C gelagert und innerhalb von 48 h aufgearbeitet. Vor Beginn der Isolierung der Endothelzellen (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC) wurden die Nabelschnüre mit 70 % Ethanol desinfiziert. Um verbliebenes Blut zu entfernen, wurden die Nabelschnurvenen so lange mit 1x PBS gewaschen, bis klare Spüllösung aus den Venen trat. Anschließend wurden die Venen auf einer Seite mit Gefäßklemmen verschlossen und über die offene Seite mit einer Spritze mit 1 mg/ml Collagenase befüllt. Nachfolgend wurden die Nabelschnüre vollständig verschlossen und für 15 min bei RT in einer mit 1x PBS gefüllten Gewebekulturschale inkubiert. Um ein besseres Ablösen der Zellen zu ermöglichen, wurden die Nabelschnüre leicht massiert und nach Ende der Inkubationszeit erneut mit 1x PBS gewaschen. Der Durchfluß mit den Endothelzellen wurde in einer sterilen Gewebekulturschale aufgefangen und die Collagenase Behandlung mit einer Inkubationszeit von 5 min wiederholt. Im Anschluß wurde die Zellsuspension in ein 50 ml steriles Plastikröhrchen überführt und für 5 min bei 1500 U/min, RT zentrifugiert. Der

Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 20 ml 1x PBS suspendiert und die Zellsuspension zweimal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 15 ml Endotheliale WachstumsmEDIUM supplementiert mit 0,4 % Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin, 2 % FBS, 0,1 ng/ml EGF, 1 µg/ml Hydrocortison, 1 ng/ml bFGF, 50 ng/ml Amphotericin B, 50 µg/ml Gentamycin suspendiert und die Zellsuspension in eine T75 Zellkulturflasche überführt. Nach vollständiger Adhärenz der Zellen erfolgte ein Mediumwechsel.

5.2.1.2. Isolierung von Follikelflüssigkeit und humanen Granulosaluteinzellen

Die aspirierten Follikelpunktate wurden für die Gewinnung der Follikelflüssigkeit 10 min bei 1500 U/min, RT zentrifugiert. Die Überstände einzelner Punktate von 3-5 Patientinnen wurden gemischt und bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren. Die verbliebenen Zellpellets wurden zweimal mit 0,1 % BSA-PBS gewaschen, in 1x PBS suspendiert, anschließend über einen Ficoll-Gradienten geschichtet und zur Phasentrennung bei 1200 U/min für 20 min bei RT zentrifugiert. Die Interphase mit den Granulosaluteinzellen wurde in ein steriles Plastikröhrchen überführt und zweimal mit 10 ml 0,1 % BSA-PBS gewaschen. Zum Entfernen von Erythrozyten wurde die Zellsuspension 5 min mit Hämolysepuffer bei RT inkubiert und anschließend zweimal mit 0,1 % BSA-PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in RPMI 1640 supplementiert mit 25 mM HEPES, L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin, 2 % Ultrosor G und 10 % FBS suspendiert und bei 37 °C, 5 % CO₂ unter Standardkulturbedingungen im Brutschrank kultiviert. Nach vollständiger Adhärenz der Zellen erfolgte ein Mediumwechsel. Die isolierten Granulosaluteinzellen wurden nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase von 3-5 Patientinnen gemischt und für die Experimente bis zur Passage 3 verwendet.

5.2.1.3. Kultivierung von HGL5-Zellen

HGL5-Zellen wurden in RPMI 1640 mit 25 mM HEPES, L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FBS unter Standardkulturbedingungen kultiviert.

5.2.1.4. Subkultivierung von Zellen

Die Zellen wurden je nach Konfluenz (80-90 %) zwei- bis dreimal wöchentlich passagiert. Dafür wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und nach Zugabe von 3 ml Accutase bis zum vollständigen Ablösen der Zellen im Brutschrank inkubiert. Nach Zugabe von WachstumsmEDIUM wurden die Zellen durch vorsichtiges Suspendieren

vereinzelt und durch Zentrifugation bei 1000 U/min für 5 min bei RT pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 10 ml Wachstumsmedium aufgenommen und je nach Kultivierungsdauer in einem Verhältnis von 1:3 bzw. 1:4 passagiert. Die Zellen wurden mit je 15 ml Wachstumsmedium unter Standardkulturbedingungen im Brutschrank kultiviert.

5.2.1.5. Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauerzählkammer

Die Bestimmung der vitalen Gesamtzellzahl einer Kultur ermöglicht neben der Prüfung von Kulturbedingungen, das Einsetzen definierter Zellzahlen für die Standardisierung und Vergleichbarkeit von *in vitro* Experimenten. Dafür wurde die geerntete Zellsuspension 1:2 mit 0,4 % Trypanblau verdünnt und in die Neubauer Zählkammer pipettiert. Die Färbung der Zellen mit Trypanblau erlaubt die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Aufgrund des geladenen Membranpotentials einer intakten Zelle ist die Aufnahme von großen Molekülen beschränkt. Dadurch kann Trypanblau nur in die Zelle eindringen, wenn die Membran zerstört ist. Somit werden vitale Zellen nicht gefärbt. Lichtmikroskopisch wurden ungefärbte Zellen in vier Großquadranten ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Da alle Teilfelder des Gesamtzählfeldes die gleiche Größe haben, entsteht ein genau definierter Raum aus 0,1 mm Tiefe, 0,1 µl Volumen und 1 mm² Fläche. Daraus wurde die Zellzahl/ml wie folgt berechnet:

Mittelwert x 10⁴ x Verdünnungsfaktor der Zellsuspension = Zellzahl/ml

Die Gesamtzellzahl errechnet sich aus der Zellzahl/ml x Volumen der vorhandenen Zellsuspension.

5.2.1.6. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur langfristigen Lagerung von Zellen wurden subkonfluente Zellkulturen zweimal mit 1x PBS gewaschen und wie beim Passagieren geerntet. Die erhaltene Zellsuspension wurde bei 1000 U/min für 5 min bei RT pelletiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet in Zellkulturmedium mit 10 % FBS, 10 % DMSO suspendiert. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen überführt und bei -196 °C in flüssigem Stickstoff konserviert.

Das Auftauen der Zellen erfolgte zügig durch Erwärmen des Kryoröhrchens im Wasserbad bei 37 °C. Die Zellsuspension wurde unmittelbar danach in eine T75 Zellkulturflasche mit Wachstumsmedium überführt. Das zytotoxische DMSO wurde nach vollständiger Adhärenz der Zellen durch Waschen der Zellen mit 1x PBS entfernt. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel.

5.2.1.7. MTT-Test zur Bestimmung der Zellproliferation

Neben der direkten Bestimmung der Zellproliferation, die auf Zählung von Zellen beruht, gibt es eine Reihe photometrischer Verfahren, die auf Umsetzung oder Bindungen von Farbstoffen basieren und kolorimetrisch gemessen werden können. Für die Untersuchungen zur Proliferation von HUVEC- und Granulosaluteinzellen wurde ein System verwendet, bei dem MTT durch die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase in lebenden Zellen zum wasserunlöslichen, violetten MTT-Formazan reduziert wird, das bei 560 nm sein Absorptionsmaximum hat. Diese Reaktion gilt als ein Maß für den Redoxstatus und korreliert mit der Viabilität, der metabolischen Aktivität und der Zellzahl einer Zellpopulation.

Für die Untersuchungen zum Einfluß verschiedener Substanzen auf die Proliferation von HUVEC Zellen wurden 1×10^4 Zellen in die Kavitäten einer 96 Loch-Platte eingesät und ü. N. unter Standardbedingungen kultiviert. Nach Dekantieren des Kulturmediums wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit 1 % FBS supplementiertem Zellkulturmedium ohne weitere Wachstumszusätze für weitere 24 h kultiviert. Die Stimulation der Zellen erfolgte nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS. Dafür wurden die Zellen mit 100 µl Zellkulturmedium, das den jeweiligen Stimulus in verschiedenen Konzentrationen enthielt, behandelt. Danach wurden die Ansätze über 24 h bzw. 48 h und 72 h kultiviert. 4 h vor Ende der Inkubationszeit wurden 10 µl MTT in die Kavitäten pipettiert und die Zellen für 4 h im Brutschrank inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, wurden 100 µl MTT-Stopppuffer zugegeben und die Ansätze für 10 h-20 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Messung der optischen Dichte des MTT-Formazans erfolgte im Photometer bei 560 nm. Der Einfluß der verwendeten Substanzen auf die Proliferation der Zellen wurde anschließend relativ zur Lösungsmittelkontrolle bzw. zu unbehandelten Zellen ermittelt.

5.2.1.8. Untersuchungen zur Tubulusformation mit Matrigel™

Für die Untersuchungen zu Angiogenese von humanen Endothelzellen eignen sich 2-Dimensionale Modelle, bei denen die Zellen in Zellkulturgefäßen ausgesät werden, die mit einer Gel-Matrix aus Kollagen, Fibrin oder Matrigel™ beschichtet sein können (Lawley, Kubota 1989; Vernon et al., 1995; Hall et al. 2001). Auf diesen Gelen bilden sich planar zur Oberfläche des Zellkulturgefäßes nach Stimulation der Zellen kapillarähnliche Strukturen (Tubuli). Für die vorliegenden Untersuchungen wurde ein wachstumsfaktor-reduziertes Matrigel™ verwendet, auf dem sich innerhalb von 24 h Tubuli bilden (Donovan et al., 2001). Die Matrix wurde ü. N. bei 4 °C aufgetaut und auf vorgekühlte 96 Loch-

Platten je 60 μl MatrigelTM pro Kavität senkrecht in die Kavitäten pipettiert. Anschließend wurden die 96 Loch-Platten zur Polymerisation des MatrigelsTM 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden 24 h vor Versuchsbeginn zweimal mit 1x PBS gewaschen und ü. N. mit 1 % FBS supplementiertem Zellkulturmedium vorbehandelt. Danach wurden die Zellen geerntet, gezählt und je 1×10^4 Zellen in 100 μl Zellsuspension mit dem jeweiligen Stimulus auf die MatrigelTM Matrix gegeben. Als Kontrolle wurden HUVEC Zellen mit wachstumsfaktorfreiem bzw. mit den entsprechenden Volumina des der Lösungsmittel von Inhibitoren und Stimuli inkubiert. Diese Ansätze wurden nach 24 h mikroskopisch beurteilt und fotografiert.

5.2.1.9. Migration von Granulosaluteinzellen

Die Untersuchungen zur Chemotaxis humaner Granulosaluteinzellen wurden mit dem Boyden-Kammer-System durchgeführt, das in Abbildung 68 gezeigt ist. Der obere und untere Teil der Boyden Kammer sind durch eine poröse Polycarbonat Membran voneinander getrennt. Wird ein Stimulus in den unteren Teil der Kammer gegeben, migrieren die Zellen durch die Poren von der oberen auf die untere Seite der Membran. Die migrierten Zellen auf der Membranunterseite wurden mit Kristallviolett gefärbt und die optische Dichte der Färbung photometrisch gemessen.

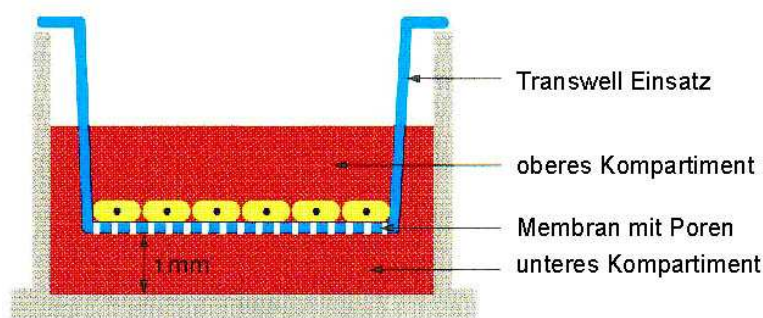


Abbildung 68: Schematische Darstellung eines Boyden-Kammer Systems. In den porösen Transwell-Einsatz werden Zellen mit Zellkulturmedium ohne Wachstums-Zusätze eingesät, die in Richtung Stimulus im unteren Kompartiment des Boyden Kammer Systems migrieren.

Für die Untersuchungen zur Migration von Granulosaluteinzellen wurden die Transwell-Einsätze 2 h in serumfreiem Zellkulturmedium bei 37 °C im Brutschrank äquilibriert. Anschließend wurden 1×10^5 Granulosalutelin- und HGL5-Zellen in 100 μl serumfreiem Zellkulturmedium aufgenommen und in das obere Kompartiment der Kammer pipettiert. Diese Einsätze wurden in 24 Loch-Platten gestellt, in die zuvor 600 μl Medium mit FF, FHDL und S1P in unterschiedlichen Konzentrationen pipettiert wurde. Die Ansätze wurden für 20 h unter Standardkulturbedingungen im Brutschrank inkubiert. Anschließend

wurde das Medium im oberen Kompartiment der Kammer dekantiert und die nicht migrierten Zellen mit einem Wattestäbchen vorsichtig vom oberen Teil der Membran entfernt. Die migrierten Zellen auf der Membranunterseite wurden nachfolgend für 1 h mit Methanol (abs.) bei 4 °C fixiert und die Membranen durch Inkubation bei RT unter dem Abzug getrocknet. Die Membranen der Transwell-Einsätze wurden 2 h bei RT mit 0,1 % Kristallviolettlösung gefärbt und überschüssiges Kristallviolett anschließend durch mehrfaches Waschen der Transwell-Einsätze entfernt. Anschließend wurden die Membranen ü. N. getrocknet und das Kristallviolett nachfolgend mit 200 µl einer 10 %igen SDS Lösung durch langsames Schütteln aus den Zellen herausgelöst. Die optische Dichte der Kristallviolettlösung wurde abschließend im Photometer bei 560 nm gemessen und die Migration relativ zu unbehandelten bzw. mit dem Lösungsmittel des jeweiligen Stimulus behandelten Zellen berechnet. Für die Experimente zur Signaltransduktion und Rezeptoridentifizierung wurden die Zellen 30 min vor Zugabe von FF, FHDL bzw. S1P mit den jeweiligen Inhibitoren bzw. Rezeptoragonisten und –antagonisten vorbehandelt.

5.2.1.10. Zellkultur zur Untersuchung von Proteinphosphorylierungen

1×10^6 HUVEC-, primäre Granulosalutein- und HGL5-Zellen wurden in T75 Zellkulturflaschen eingesät und 48 h unter Standardkulturbedingungen kultiviert. Danach wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und für weitere 24 h mit 1 % FBS supplementierten Zellkulturmedien unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit FF, FHDL und S1P behandelt. Die Inkubation der HUVEC Zellen wurde über einen Zeitraum von 30 min, die der Granulosaluteinzellen über 60 min durchgeführt und die Zellen nach 10 min, 30 min und 60 min sowie unbehandelte Zellen (0 min) geerntet.

5.2.2. Proteinbiochemischen Methoden

5.2.2.1. Immunzytochemische Identifizierung von HUVEC Zellen

Aus Nabelschnüren isolierte Endothelzellen können durch Markierung mit Endothelzell-spezifischen Antikörpern mittels Durchflusszytometrie (FACS) oder Immunfluoreszenz identifiziert werden. Diese sind direkt an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt oder werden mit einem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper markiert, der selektiv an den Primärantikörper bindet. Diese Methode erlaubt die Überprüfung der Reinheit der isolierten Zellpopulation. Dafür wurden 1×10^5 Zellen der Zellkulturpassage 1 bis 5 auf Deckgläsern in einer 6 Loch-Platte ausgesät und 24 h unter Standardbedingungen

kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit eiskaltem Methanol (abs.) für 15 min bei -20°C fixiert und permeabilisiert. Nach mehrfachem Waschen mit 1x PBS erfolgte die Blockierung von unspezifischen Bindungen durch Inkubation der Zellen mit 3 % Ziegen Serum für 30 min bei RT. Anschließend wurden die Zellen mit 25 $\mu\text{g/ml}$ anti-human CD31 Antikörper 1 h in einer Feuchtkammer bei RT inkubiert. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Deckgläser dreimal 5 min mit 1x PBS gewaschen und für 1 h bei RT mit einem FITC-gekoppelten Ziege-anti-Maus-IgG Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 in 0,1 % BSA-PBS im Dunkeln inkubiert. Nachfolgend wurden die Deckgläser dreimal 5 min mit 1x PBS gewaschen und die Zellkerne abschließend für 10 min bei RT mit 1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI gefärbt, die Deckgläser dreimal 5 min mit A. bidest gewaschen, getrocknet und für die Fluoreszenzmikroskopie mit VECTAShield luftblasenfrei eingedeckt. Die Auswertung erfolgte durch Zählen von 200 Zellen pro Deckglas, von denen jeweils CD31 positive Zellen (grün) im Vergleich zu DAPI-gefärbten Zellkernen (blau) erfaßt wurden. Daraus wurde der Anteil von HUVEC Zellen und somit die Reinheit der isolierten Zellpopulation ermittelt.

5.2.2.2. Quantifizierung von VEGF₁₆₅ und bFGF in FF

Die Messungen der VEGF₁₆₅ und bFGF Konzentrationen in FF erfolgte mit der ELISA Technologie und wurde exakt nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode ist die quantitative „Sandwich Enzym Immunoassay“ Technik, bei der ein für humanes VEGF₁₆₅ bzw. bFGF spezifischer monoklonaler Antikörper an eine Mikrotiterplatte gebunden ist. Wenn VEGF₁₆₅ bzw. bFGF in den zu untersuchenden Proben enthalten ist, bindet der Wachstumsfaktor an den immobilisierten Antikörper. Nachdem durch mehrere Waschschrte nicht gebundene Substanzen entfernt werden, bindet ein Enzym-gekoppelter polyklonaler Antikörper an diesen Komplex. Durch die Zugabe einer Substratlösung entwickelt sich ein Farbumschlag, der je nach VEGF₁₆₅ bzw. bFGF Menge in der Ausgangssubstanz an Intensität zu- oder abnimmt. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopplösung beendet und kann im Photometer bei 450 nm gegen eine Wellenlängen Korrektur bei 560 nm gemessen werden. Die Berechnung der VEGF₁₆₅ bzw. bFGF Konzentration in Follikelflüssigkeit erfolgte gegen eine Standardreihe mit dem jeweiligen Wachstumsfaktor und wurde nach Herstellerangaben mit linearer Regression ausgewertet

5.2.2.3. Immunodepletion von VEGF₁₆₅ und bFGF in FF

Die Technik der Immunodepletion ermöglicht das Entfernen von Proteinen mit Antikörpern aus biologischen Gemischen, wie Zelllysaten oder Serum. Dabei bindet der spezifische Antikörper an das zu entfernende Antigen. Dieser Komplex wird durch Zugabe von Protein A, das an Sepharose oder magnetische Partikel gekoppelt ist, gebunden. Protein A ist ein Zellwandbestandteil von *Staphylococcus aureus*, daß die meisten Säugerimmungoglobuline an die Fc Region des Antikörpers bindet. Dieser Komplex kann durch Zentrifugation aus dem Serum etc. entfernt und nach mehreren Waschschrinen weiter analysiert werden. Um VEGF₁₆₅ und bFGF aus Follikelflüssigkeit zu entfernen, wurden 300 µl unverdünnte, native FF für VEGF₁₆₅ und bFGF 1:50 mit anti-human VEGF₁₆₅ bzw. anti-human bFGF Antikörpern verdünnt und ü. N. bei 4 °C auf einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Zu diesen Ansätzen wurden je 25 µl Protein A Sepharose pipettiert und für weitere 2 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 30 s bei 10000 U/min, 4 °C zentrifugiert und die Überstände in separate Reaktionsgefäße überführt. Von diesen Überständen wurden die Konzentrationen der Wachstumsfaktoren im Vergleich zu unbehandelter FF mittels ELISA bestimmt.

5.2.2.4. Progesteron ELISA

5.2.2.4.1. Zellkultur, Stimulation und Ernte

1x10⁵ primäre Granulosaalutein- und HGL5-Zellen wurden in 24 Loch-Platten eingesät und in Wachstumsmedium ü. N. unter Standardkulturbedingungen kultiviert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit 1x PBS gewaschen und für weitere 24 h unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen erneut gewaschen und mit verschiedenen FHDL Konzentrationen in 0,5 ml serumfreiem Zellkulturmedium für 24 h bzw. 48 h und 72 h behandelt. Die Zellkulturüberstände wurden in Reaktionsgefäße überführt, für 3 min bei 10000 U/min, 4 °C zum Entfernen von Zellresten zentrifugiert, anschließend 450 µl des Überstandes in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

5.2.2.4.2. Quantifizierung der Progesteronkonzentration in Zellkulturüberständen

Die quantitative Bestimmung von Progesteron in Zellkulturüberständen wurde mit einem Progesteron ELISA durchgeführt. Dabei bindet ein polyklonaler Antikörper kompetitiv an Progesteron in den zu untersuchenden biologischen Flüssigkeiten (Serum, FF, Zellkultur-

überstände) oder kovalent an ein Alkalisches Phosphatase Molekül. Überschüssige Reagenzien werden nach Inkubation der Ansätze in Mikrotiterplatten bei RT durch mehrfaches Waschen entfernt und das Substrat dazu gegeben. Nach einer kurzen Inkubationszeit wird die enzymatische Reaktion gestoppt und die entstandene gelbe Färbung im Photometer bei 405 nm gegen eine Hintergrundkorrektur bei 560 nm gemessen. Die Intensität der gelben Farbe ist umgekehrt proportional zur Progesteronkonzentration in den Standards oder den zu untersuchenden Proben. Da der überwiegende Teil des sezernierten Progesterons gebunden im zirkulierenden Plasma bzw. in Zellkulturüberständen vorkommt, wurden die Zellkulturüberstände vor Durchführung des ELISA 1:100 mit dem vom Hersteller empfohlenen Steroid Displacement Reagenz verdünnt und für 10 min bei RT inkubiert. Dadurch wird an Serumproteine gebundenes Progesteron gelöst. Der ELISA wurde exakt nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei alle Proben und Standardverdünnungen in Duplikaten gemessen wurden. Die Auswertung erfolgte nach Herstellerangaben doppelt logarithmisch. Die Konzentration des Progesterons in den Zellkulturüberständen wurde durch Interpolation berechnet.

5.2.2.5. Zellyse und Proteinisolierung

Die Zellen wurden zweimal mit 1x PBS gewaschen, mit Accutase vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, in 1 % FBS supplementiertem Zellkulturmedium suspendiert und durch Zentrifugation bei 1000 U/min für 5 min bei RT pelletiert. Die Zellpellets wurden anschließend zweimal mit 1x PBS gewaschen und in Lämmli-Puffer, der mit einem Proteaseinhibitorcocktail (Complete™ Mini) supplementiert war, lysiert. Nachfolgend wurden die Lysate 5 min bei 95 °C im Heizblock erhitzt, auf Eis abgekühlt und für 15 min bei 13000 U/min bei 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zu Verwendung bei -80 °C gelagert.

5.2.2.5.1. Zellyse für den S1P-Rezeptor Nachweis

Der Nachweis von S1P-Rezeptoren in Granulosaluteinzellen erforderte eine differentielle Aufarbeitung der geernteten Zellen. Für den Nachweis der S1P-Rezeptoren 1, 2 und 5 im Western Blot wurden 5×10^6 primäre Granulosalutein-, HGL5- und HUVEC Zellen zweimal durch Suspendieren der Zellen in eiskaltem 1x PBS und Zentrifugation bei 1000 U/min für 5 min bei 4 °C gewaschen und die Zellpellets anschließend mit dem QProteome Cell Compartment Kit nach Herstellerangaben aufgearbeitet. Diese Methode erlaubt durch die Zugabe verschiedener Extraktionspuffer, die selektive Isolierung von Proteinen aus

unterschiedlichen zellulären Kompartimenten (Zytoplasma, Membranen, Zellkern, Zytoskelett). Anschließend wurden die Proteine mit einer Acetonfällung konzentriert und entsalzt. Dafür wurden den 1 ml Fraktionen der zytoplasmatischen- und Membranproteine 4 Volumen eiskaltes Aceton zugesetzt und die Ansätze für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 13000 U/min für 10 min bei 4 °C, wurde das Aceton dekantiert und die Proteine in Lämmli-Puffer mit Complete™ Mini aufgenommen. Nachfolgend wurden die Lysate 5 min im Heizblock bei 95 °C denaturiert, auf RT abgekühlt und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Für den Proteinnachweis des S1P Rezeptors 3 wurden 5×10^6 Zellen zweimal durch Suspendieren der Zellen in eiskaltem 1x PBS und Zentrifugation bei 1000 U/min für 5 min bei 4 °C gewaschen, die Zellpellets in RIPA-Puffer für 30 min auf Eis inkubiert und durch mehrmaliges, langsames Aufziehen durch eine Kanüle lysiert. Die Lysate wurden bei 13000 U/min für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und die klaren Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt. Bis zur Verwendung wurden die Lysate bei -80 °C gelagert.

5.2.2.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode, bei der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden (Lämmli, 1970). Bei dem verwendeten System handelte es sich um ein diskontinuierliches System aus Trenn- und Sammelgel, die sich im Hinblick auf Ionenstärke, pH Wert und Porengröße unterschieden. Zur Herstellung eines 10 %igen Trenngels wurden zunächst folgende Komponenten pipettiert.

- 1,67 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37, 5:1)
- 1,25 ml 4x Trenngelpuffer (1,5 M Tris-Cl, pH 8,8)
- 1,97 ml A. bidest
- 50 µl 10 % SDS
- 30 µl 10 % APS
- 10 µl TEMED

Nach Mischen der Substanzen und Befüllen der Minigel-Apparatur wurde das Gel mit 2-Propanol überschichtet, das nach Polymerisation des Gels durch Absaugen mit Filterpapier wieder entfernt wurde. Anschließend wurden für ein 4 %iges Sammelgel folgende Komponenten pipettiert.

- 270 µl 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
- 0,5 ml 4x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-Cl, pH 6,8)
- 1,19 ml A. bidest.
- 20 µl 10 % SDS
- 10 µl 10 % APS
- 5 µl TEMED

Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen und mit einem Kamm versehen. Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels, wurde das Gel in die Blotapparatur eingespannt, die Gelkammer mit 1x Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3) befüllt und der Kamm entfernt.

5.2.2.7. Probenvorbereitung

Die Proteinlysate von HUVEC-, HGL5- und Granulosaluteinzellen wurden mit 4x Ladepuffer (125 mM Tris, 30 % Glycerin, 8 % SDS, 10 % β -Mercapthoethanol, 0,001 % Bromphenolblau) gemischt und zur Denaturierung für 5 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert. Nach Abkühlen der Proben auf RT wurden die Proteine im 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel bei 150 V aufgetrennt.

5.2.2.8. Western Blot

5.2.2.8.1. Western Blot zum Nachweis phosphorylierter Proteine

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulose Membran bei 300 mA für 2 h mit 1x Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol) in einem Tank Blot System geblottet. Anschließend wurden die Membranen 5 min mit 1x TBS (150 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 7,5) gewaschen und nachfolgend 1 h bei RT mit 5 % Blockierungslösung (5 % Magermilchpulver in 1x TBS, 0,1 % Tween-20) zur Blockierung freier Bindungsstellen bei leichtem Schütteln inkubiert. Die Membranen wurden dreimal 5 min mit 1x TBST (1x TBS, 0,1 % Tween-20) gewaschen. Die Inkubation der Nitrocellulose Membranen mit den Primärantikörpern in den angegebenen Verdünnungen (Tabelle 4) erfolgte bei 4 °C ü. N. unter leichtem Schütteln. Die Verdünnungen der Primärantikörper der Firma NEB wurden nach Herstellerangaben in 5 % NEB Antikörper-Verdünnungspuffer angesetzt.

Primärantikörper	HUVEC Zellen	primäre Granulosa-luteinzellen	HGL5-Zellen
Phospho AKT (Ser473)	1:500	1:500	1:500
AKT	1:20000	1:20000	1:20000
Phospho p38 MAP-Kinase (Tyr180/Tr108)	nicht verwendet	1:2500	1:4000
p38MAP-Kinase	nicht verwendet	1:2500	1:2500
Phospho ERK (Tyr204)	1:500	1:500	1:500
ERK	1:20000	1:10000	1:10000

Tabelle 4: Übersicht verwendeter Primärantikörper und deren Verdünnungen zum Nachweis phosphorylierter Kinasen.

Alle anderen Antikörper wurden in 5 % Blockierungslösung verdünnt. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Membranen dreimal 5 min bei RT mit 1x TBST gewaschen und für 1 h bei RT unter vorsichtigem Schütteln mit den angegebenen Verdünnungen der entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert (Tabelle 5).

Sekundärantikörper	Phospho-AKT (Ser473)/AKT	Phospho-ERK (Tyr204)	ERK	Phospho-p38 (Tyr180/Tr108)/p38 MAP-Kinase
anti-Kaninchen IgG HRP-gekoppelt, Ziege	1:1000/1:20000	nicht verwendet	1:20000	1:5000
ECL™ anti-Maus IgG HRP gekoppelt	nicht verwendet	1:1000	nicht verwendet	nicht verwendet

Tabelle 5: Übersicht verwendeter Sekundärantikörper und deren Verdünnungen zum Nachweis phosphorylierter Kinasen.

Abschließend wurden alle Membranen fünfmal 5 min mit 1x TBST gewaschen, die Banden mit einem ECL Chemilumineszenz Detektionsreagenz auf Hyperfilm™ ECL High Performance Chemiluminescence Filmen sichtbar gemacht und die Filme digitalisiert.

5.2.2.8.2. Western Blot zum Nachweis von S1P-Rezeptoren

Der S1P-Rezeptor Nachweis wurde im Wesentlichen so durchgeführt, wie unter 5.2.2.8.1. beschrieben (SDS-PAGE, Transfer, Inkubation der Antikörper). Deshalb sind nachfolgend die Unterschiede zu dem Nachweis der Proteinphosphorylierung aufgezeigt.

Für die Detektion des SP-Rezeptors 1 wurden 15 µg Membranprotein von primären

Granulosalutein- und HGL5-Zellen aufgetrennt und auf eine PVDF Membran mit 1x Transferpuffer ohne Methanol geblottet. Vor Verwendung wurde die Membran 30 s in Methanol (abs.) mobilisiert, anschließend 2 min in A. bidest. gewaschen und 10 min in Transferpuffer ohne Methanol äquilibriert. Der Nachweis des S1P-Rezeptors 3 erfolgte mit 40 µg RIPA-Lysat, für den S1P-Rezeptor 5 wurden 15 µg und für den S1P-Rezeptor 2 40 µg zytoplasmatische Proteine eingesetzt. Diese Proteine wurden auf eine Nitrocellulose Membran geblottet. Als Positivkontrollen wurden Proteinlysate von HUVEC Zellen verwendet. Die Primärantikörper wurden, wie in Tabelle 6 angegeben, in 5 % Blockierungslösung verdünnt. Der Sekundärantikörper (anti-Kaninchen IgG-HRP-gekoppelt) wurde bei allen S1P-Rezeptorantikörpern in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt.

Primärantikörper S1P-Rezeptor	Verdünnung
1	1:500
2	1:500
3	1:600
5	1:1000

Tabelle 6: Übersicht verwendeter Primärantikörper und deren Verdünnungen zum Nachweis von S1P-Rezeptoren.

5.2.2.9. NBD Phalloidin Färbung von polymerisierten Aktinfilamenten

Chemotaktische Prozesse sind eng mit Veränderungen des Zytoskeletts, bei denen Aktinfilamente polymerisieren, assoziiert (Van Nieuw Amerongen et al., 2001; Small et al., 2002). Für die Messung bzw. das Sichtbarmachen der Aktinpolymerisierung auf einen Stimulus wurde NBD Phalloidin verwendet. Es gehört zu den Phalloidinen, den Giftstoffen des Knollenblätterpilzes, die sich an das Aktinzytoskelett der Zellen anlagern. Durch die Markierung von Phalloidin an einen Fluoreszenzfarbstoff kann die Aktinpolymerisierung nach Stimulation der Zellen sichtbar gemacht bzw. gemessen werden. Um zu prüfen, ob FF, FHDL und S1P die Aktinpolymerisierung von primären Granulosalutein- und HGL5-Zellen stimulieren, wurden 5×10^4 primäre Granulosalutein- und HGL5-Zellen auf runde Deckgläser mit einem Durchmesser von 12 mm in einer 24 Loch-Platte ausgesät und unter Standardkulturbedingungen ü. N. kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und für weitere 24 h mit 1 % FBS supplementiertem Zellkulturmedium inkubiert. Vor Stimulation wurden die Zellen erneut mit 1x PBS gewaschen und nachfolgend für 30 min, 60 min und 90 min mit FF, FHDL und S1P inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS

gewaschen, 10 min bei RT mit 3,7 % Formaldehyd in 1x PBS fixiert und erneut gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellen wurde mit 0,1 % Triton X-100 in 1x PBS für 5 min bei RT durchgeführt und die Waschschrirte anschließend wiederholt. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die Zellen für 30 min mit 1 % BSA-PBS bei RT unter vorsichtigem Schütteln inkubiert und nachfolgend 1 h bei RT mit 1 U NBD Phalloidin in 1 % BSA-PBS pro Deckglas gefärbt. Zur Entfernung von nicht gebundenem NBD Phalloidin wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen, anschließend bei RT getrocknet und der gebundene Farbstoff mit 200 µl Methanol (abs.) unter starkem Schütteln 2 h bei RT herausgelöst. Die Kontrolle, ob der Fluoreszenzfarbstoff vollständig aus den Zellen herausgelöst war, wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Der Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und zum Entfernen von Zellresten bei 10000 U/min für 3 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden 140 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die Messungen der Fluoreszenzintensität mit dem VersafloorTM Fluorimeter wurde das Fluorochrom bei einer Wellenlänge von 470 nm angeregt und das emittierte Licht bei 530 nm gemessen. Die Fluoreszenzintensität wurde relativ zu unbehandelten bzw. mit den Lösungsmitteln des jeweiligen Stimulus behandelten Zellen berechnet. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurden die Zellkerne für 5 min mit 1 µg/ml DAPI bei RT im Dunkeln gefärbt, dreimal 5 min mit A. bidest gewaschen, getrocknet und mit VectaShield für die Fluoreszenzmikroskopie eingedeckt.

5.2.3. Herstellen einer Sphingosin 1-Phosphat Lösung

Sphingosin 1-Phosphat (S1P) wurde nach Herstellerangaben in einer Konzentration von 0,5 mg/ml in Methanol (abs.) gelöst. Dabei war ein Erhitzen der Lösung auf 65 °C mit zusätzlichem Schütteln notwendig, um das Lysophospholipid vollständig zu lösen. Aliquots zu je 25 µl wurden anschließend unter Stickstoff verdampft und bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert. Für das Herstellen einer gebrauchsfertigen Lösung (125 µmol/l S1P) wurde das verbliebene Pellet für 30 min bei 37 °C im Heizblock in 250 µl S1P-Puffer unter Schütteln gelöst. Aus dieser Stammlösung wurden Vorverdünnungen mit S1P-Puffer angesetzt und so mit Zellkulturmedium weiter verdünnt, daß alle Ansätze die gleiche Menge Lösungsmittel enthielten.

5.2.4. Quantifizierung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen von FF und Zelllysaten wurden basierend auf der Biuret Methode mit dem BCA[™] Assay quantifiziert. Dabei wird Cu²⁺ durch Proteine in einem alkalischen Medium zu Cu¹⁺ reduziert und kann durch ein Bichinonsäure-haltiges Reagenz hoch sensitiv und selektiv kolorimetrisch detektiert werden. Durch die Bildung von Chelaten aus zwei Molekülen Bichinonsäure und einem Kupferion entsteht ein violett gefärbtes, wasserlösliches Produkt, deren Menge mit steigender Proteinkonzentration linear zunimmt. Den Herstellerangaben folgend, wurde eine Standardreihe in einem Bereich von 20 µg/ml-2000 µg/ml aus einer BSA-Stammlösung (2 mg/ml BSA) mit A. bidest hergestellt. Je 25 µl der Standardverdünnungen und der 1:10 mit A. bidest verdünnten Proteinlysate wurden in die Kavitäten einer 96 Loch-Platte pipettiert. Dazu wurden 200 µl des Arbeitsreagenz (BCA[™] Reagenz A und BCA[™] Reagenz B im Verhältnis 50:1 gemischt) pipettiert, kurz gemischt und die Platte für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Ansätze 10 min bei RT äquilibriert und die optische Dichte der Proben und Standards bei 560 nm gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentration der Proben erfolgt durch lineare Regression der Standardreihe.

5.2.5. Biochemische Modifikationen

5.2.5.1. Gelfiltration

Da die verbliebene FF nach Ultrazentrifugation noch Salze enthielt, die sich störend auf die Proliferations- und Migrationsexperimente auswirken können, wurde die FF durch Gelfiltration entsalzt. Dafür wurden PD-10 Säulen mit 25 ml 1x PBS äquilibriert und 2,5 ml der zu entsalzenden FF auf die Säule gegeben. Der Durchfluß wurde verworfen und die Elution der entsalzten FF mit 3,5 ml 1x PBS vorgenommen. Die gewonnenen Eluate wurden aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

5.2.5.2. Hitzebehandlung

Zur Aufreinigung der mitogenen Aktivität wurde FF bei 60 min, 70 min, 80 min, 90 min und 100 °C für 30 min im Heizblock inkubiert, auf Eis abgekühlt und für 20 min bei 4000 U/min, 4 °C zentrifugiert. Von den gewonnenen Überständen wurden je 80 µl FF/100 µl Zellkulturmedium ohne Wachstumszusätze in die Proliferationsexperimente eingesetzt. Nachfolgende Hitzebehandlungen von FF wurden bei 90 °C durchgeführt und 20 µl FF/100 µl Zellkulturmedium ohne Wachstumszusätze in die Untersuchungen zur

Tubulusformation eingesetzt. In Analogie zur Hitzebehandlung von FF bei 90 °C, wurde mit FHDL und S1P verfahren. Anschließend wurden äquimolare Mengen zu den Konzentrationen der Stimuli eingesetzt, bei denen die Proliferation und Migration der Zellen untersucht wurde.

5.2.5.3. Behandlung mit Alkalischer Phosphatase

Die Behandlung von FHDL und S1P mit Alkalischer Phosphatase wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (Ruwisch et al., 2001). 50 U des Enzyms wurden mit 450 µl Puffer gemischt. Nach Zugabe von FHDL und S1P wurden die Ansätze für 30 min bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde durch Verschiebung des pH Wertes in den sauren pH Bereich, d. h. durch Zugabe von 100 µl 37 % HCl gestoppt. Diese Lösung wurde mit 10 µl 5N NaOH neutralisiert und für die Untersuchungen zur Migration und Proliferation auf die eingesetzten FHDL- und S1P-Konzentrationen mit Zellkulturmedium ohne Zusätze von anderen Wachstumsfaktoren verdünnt. Als Negativkontrolle wurden gleich behandelte Ansätze ohne Zugabe des Enzyms verwendet.

5.2.5.4. Behandlung mit Aktivkohle

Die Behandlung von FHDL und S1P mit Aktivkohle erfolgte durch die Zugabe von 0,5 % Norit A und 0,05 % Dextran T70 zu FHDL und S1P. Die Ansätze wurden über Nacht bei 4 °C auf einem Über-Kopf-Schüttler inkubiert, anschließend filtriert und 20 min bei 2300 U/min, 4 °C zentrifugiert. Die Filtration und Zentrifugation wurden so oft wiederholt, bis mikroskopisch keine Schwebteile mehr in der Lösung zu erkennen waren. Für die Proliferations- und Migrationsexperimente wurden mit Aktivkohle-behandeltes FHDL und S1P in äquimolare Mengen zu den entsprechenden Konzentrationen von unbehandeltem FHDL und S1P eingesetzt. Die Ansätze wurden unmittelbar nach Aufarbeitung ohne weitere Lagerung in die Experimente eingesetzt.

5.2.6. Molekularbiologische Methoden

5.2.6.1. RNA-Isolierung

2×10^6 primäre Granulosalutein-, HGL5- und HUVEC Zellen wurden in T75 Zellkulturflaschen ausgesät und unter Standardkulturbedingungen kultiviert. Nachfolgend wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und wie zur Subkultivierung geerntet. Die Zellsuspensionen wurden durch Zentrifugation bei 1000 U/min für 5 min bei RT

pelletiert und die RNA anschließend mit dem RNeasy Mini Kit exakt nach Herstellerangaben isoliert. Das Prinzip der RNA-Isolierung beruht bei diesem Kit auf Bindung von RNA nach Lyse der Zellen mit einem hoch denaturierenden Puffer, der Guanidin-Isothiocyanat enthält, an eine Silica Membran. Aufgrund dieser Bindung können Kontaminationen, z. B. Zellreste, durch einfaches Waschen mit ethanolischen Puffern entfernt und die RNA mit Nuklease-freiem Wasser eluiert werden.

5.2.6.2. Quantifizierung der RNA-Konzentration

Die Quantifizierung der isolierten RNA erfolgte spektrophotometrisch. Dafür wurde RNA 1:50 mit TE-Puffer, pH 8 verdünnt und die optische Dichte bei 260 nm und 280 nm in einer Messküvette gegen den Leerwert (TE-Puffer, pH 8) gemessen. Die RNA Konzentration wurde wie folgt berechnet:

$OD_{260\text{ nm}} \times 40 \text{ (Faktor für RNA)} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{RNA Konzentration in } \mu\text{g/ml}$

Die Qualität der RNA wurde durch die Ratio der OD von 260 nm und 280 nm bestimmt. Für die anschließenden Experimente wurde nur RNA mit einer Ratio von 1,8-2 verwendet.

5.2.6.3. DNase-Behandlung

Die Kontamination der isolierten RNA mit genomischer DNA kann zu falsch positiven Ergebnissen in der nachfolgenden Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) führen. Um dies auszuschließen, wurden 5 µg total RNA mit dem „RNase-Free DNase Set“ behandelt.

Für einen 100 µl Ansatz wurden folgende Komponenten auf Eis in ein Reaktionsgefäß pipettiert:

- 5 µg RNA
- ad 87,5 µl Nuklease-freies Wasser
- 10 µl 10x RDD Puffer
- 2,5 µl (7 U) DNase

Dieser Ansatz wurde 10 min bei RT inkubiert und die DNase behandelte RNA abschließend nach dem „PCR-Cleanup“ Protokoll des Herstellers aufgereinigt, um Puffer und DNase zu entfernen. Die gereinigte RNA wurde in 50 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert.

5.2.6.4. Reverse Transkription (cDNA Synthese)

Die cDNA Synthese aus der isolierten RNA wurde mit dem RT Omniscript Kit durchgeführt. Dafür wurde je Probe folgenden Ansätze auf Eis in Reaktionsgefäße pipettiert:

- 2 µl 10x Puffer
- 2 µl 5 mM dNTP Mix
- 2 µl 10 µM Oligo dT Primer
- 10 U RNase Out
- 4 U Reverse Transkriptase
- 1 µg DNase behandelte RNA
- ad 20 µl Nuklease-freies Wasser

Je Probe wurde zusätzlich ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase (RT- Reaktion) pipettiert. Dieser dient als Kontrolle für den Erfolg der DNase-Behandlung. Alle Ansätze wurden für 1 h bei 37 °C im Thermocycler inkubiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

5.2.6.5. PCR zum Nachweis der Genexpression von S1P-Rezeptoren

Für den spezifischen Expressionsnachweis der mRNA der S1P-Rezeptoren in Granulosaluteinzellen wurde die PCR Methode verwendet, bei der *in vitro* Abschnitte eines Gens amplifiziert werden. Bei diesem Verfahren verlängern DNA-Polymerasen in Anwesenheit von dNTPs an einzelsträngige DNA, angelagerte Oligonukelotide (Primer) und vervielfältigen so den Abschnitt des nachzuweisenden Gens.

5.2.6.5.1 Primersynthese

Die Primer für den humanen S1P-Rezeptor 1 wurden basierend auf der kodierenden Gensequenz (Gene ID:1901) mit der Primer3 Software erstellt. Dabei war darauf zu achten, daß der GC Gehalt 40-70 % beträgt, die Primer eine Länge von 18-22 bp haben und eine Schmelztemperatur zwischen 58 °C und 62 °C aufweisen. Die entworfenen Primer wurden bei der Firma Metabion, Martinsried in Auftrag gegeben.

5.2.6.5.2. PCR

Eine PCR besteht aus 3 unterschiedlichen Schritten: Doppelsträngige DNA wird bei 95 °C in Einzelstränge aufgeschmolzen (Denaturierung), an die sich nachfolgend Primer

komplementär zu ihrer Zielsequenz bei einer Temperatur von ca. 60 °C, abhängig von der Schmelztemperatur, anlagern (Annealing). Abschließend verlängert die DNA-Polymerase bei 72 °C das freie 3'OH Ende mit dNTPs (Elongation). Durch mehrfache Wiederholung dieser Abfolge wird das entstandene PCR Produkt mit zunehmender Zyklusanzahl exponentiell amplifiziert.

Lösen der QuantiTect Primer

Der QuantiTect Primer Assay besteht aus einem lyophilisierten Gemisch aus Forward und Reverse Primern für ein spezifisches Gen. Die Primer für den Nachweis der S1P-Rezeptoren 2-5 wurden in 1,1 ml TE-Puffer, pH 8,0, nach Angaben des Herstellers so gelöst, daß man eine 10x Primer-Lösung erhält, die anschließend in der PCR Reaktion eingesetzt wird.

5.2.6.5.3. Herstellen der PCR-Ansätze und PCR-Bedingungen

Für den Nachweis der S1P-Rezeptorexpression wurden folgende Ansätze pipettiert:

- 2,5 µl 10x PCR Puffer
- 0,5 µl 10 mM dNTP Gemisch
- 2,5 µl 10x QuantiTect Primer Assay
- 2 µl cDNA (1:5 verdünnt mit Nuklease-freiem Wasser)
- 1 U HotStar TaqPlus DNA-Polymerase
- ad 25 µl Gesamtvolumen mit Nuklease-freiem Wasser

Bei Verwendung der selbst entworfenen Primer für den S1P-Rezeptor 1 wurden abweichend zu den QuantiTect Primer Assays je 1 µl 10 µM Forward und Reverse Primer eingesetzt und die Ansätze entsprechend auf 25 µl Gesamtvolumen mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt. Um mögliche Kontaminationen mit genomischer DNA ausschließen zu können, wurden zuvor die RT- Reaktionen aus der cDNA Synthese und sog. no template controls in die PCR eingesetzt. In Tabelle 7 sind die PCR Bedingungen für den S1P-Rezeptornachweis dargestellt.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1. Aktivierung der Taq-Polymerase	95 °C	5 min	
2. Denaturierung	94 °C	30 s	
3. Annealing	58 °C	20 s	
4. Extension	72 °C	20 s	35x (Schritt 2-4)
5. abschließende Extension	72 °C	10 min	

Tabelle 7: Übersicht der PCR Bedingungen für den Nachweis der S1P-Rezeptoren.

5.2.6.6. Agarosegelelektrophorese

Die Überprüfung der PCR erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte gegen einen Größenstandard im 1,5 %igen Agarosegel mit 1x TBE Puffer. Durch Anfärben des Agarosegels mit Ethidiumbromid, das mit Nukleinsäuren interkaliert, wurden die entstandenen PCR-Fragmente sichtbar gemacht und die Gele abschließend fotografiert.

5.2.7. Statistik

Alle Experimente wurden, soweit nicht anders angegeben, in Triplikaten durchgeführt und dreimal wiederholt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Graph Pad Prism Software, Version 4 mit dem Student's t-test bzw. ANOVA. Die statistischen Signifikanzen sind mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,0001$ angegeben.

6. Literaturverzeichnis

- Abulafia, O., Sherer, D.M. (2000) Angiogenesis of the ovary *Am J Obstet Gynecol* **182**, 240-246.
- Ali, N., Yoshizumi, M., Fujita, Y., Izawa, Y., Kanematsu, Y., Ishizawa, K., Tsuchiya K., Yano, S., Sone, S., Tamaki, T. (2005) A novel Src kinase inhibitor, M475271, inhibits VEGF-induced human umbilical vein endothelial cell proliferation and migration *J Pharmacol Sci.* **98(2)**, 130-141.
- Amaral, S., Oliveira, P.J., Ramalho-Santos, J. (2008) Diabetes and the impairment of reproductive function: possible role of mitochondria and reactive oxygen species *Curr Diabetes Rev* **4(1)**, 46-54.
- Antczak, M., Van Blerkom, J.V. (2000) The vascular character of ovarian follicular granulosa cell: phenotypic and functional evidence for an endothelial-like cell population *Hum Reprod* **15(11)**, 2306-2318.
- Arai, K., Yoshida, S., Nakatani, M., Fujiwara, S., Yubisui, T., Kawamura, K. (2004) Phospholipids and their derivatives as mitogen and motogen of budding tunicates *J Biochem.* **135(1)**, 71-78.
- Argraves, K.M., Gazzolo, P.J., Groh, E.M., Wilkerson, B.A., Matsuura, B.S., Twal, W.O., Hammad, S.M., Argraves, W.S. (2008) High density lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate promotes endothelial barrier function *J Biol Chem.* **283(36)**, 25074-25081.
- Artini, P.G., Ruggiero, M., Monteleone, P., Carpi, A., Cristello, F., Cela, V., Genazzani, A.R. (2007) Vascular endothelial growth factor and its soluble receptor in benign and malignant ovarian tumors *Biomed Pharmacother.* **62(6)**, 373-377.
- Assmann, G., Nofer, J.R. (2003) Atheroprotective effects of high-density lipoproteins *Annu Rev Med.* **54**, 21-41.
- Atanackovic, D., Cao, Y., Kim, J.W., Brandl, S., Thom, I., Faltz, C., Hildebrandt, Y., Bartels, K., de Weerth, A., Hegewisch-Becker, S., Hossfeld, D.K., Bokemeyer, C. (2008) The coccal cytokine and chemokine milieu within malignant effusions *Tumour Biol.* **29(2)**, 93-104.
- Augustin, H.G. (2000) Vascular morphogenesis in the ovary *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* **14**, 867-882.
- Azahr, S., Tsai, L., Medicherla, S., Chandrasekher, Y., Giudice, L., Reaven, E. (1998) Human granulosa cells use High Density Lipoprotein Cholesterol for steroidogenesis *J*

Clin Endo Metab. **89 (3)**, 983-991.

Azhar, S., Reaven, E. (2002) Scavenger receptor class BI and selective cholesteryl ester uptake: partners in the regulation of steroidogenesis *Mol Cell Endocrinol.* **195(1-2)**, 1-26.

Banno, Y., Takuwa, Y., Akao, Y., Okamoto, H., Osawa, Y., Naganawa, T., Nakashima, S., Suh, P.G., Nozawa, Y. (2001) Involvement of phospholipase D in sphingosine 1-phosphate-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt in Chinese hamster ovary cells overexpressing EDG3 *J Biol Chem.* **276(38)**, 35622-35628.

Balthasar, S., Samulin, J., Ahlgren, H., Bergelin, N., Lundqvist, M., Toescu, E.C., Eggo, M.C., Törnquist K. (2006) Sphingosine 1-phosphate receptor expression profile and regulation of migration in human thyroid cancer cells *Biochem J.* **398**, 547-556.

Baudhuin, L.M., Jiang, Y., Zaslavsky, A., Ishii, I., Chun J., Xu, Y. (2004) S1P₃-mediated Akt activation and cross talk with platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) *FASEB J.* **18(2)**, 341-343.

Belloni, D., Scabini, S., Foglieni, C., Meschini, L., Giazzon, A., Colombo, B., Fulgenti, A., Helle, K.B., Ferrero, M.E., Corti, A., Ferrero, E. (2007) The vasostatin-I fragment of chromogranin A inhibits VEGF-induced endothelial cell proliferation and migration *FASEB J.* **21(12)**, 3052-3062.

Bencomo, E., Perez, R., Arteaga, M.F., Acosta, E., Pena, O., Lopez, L., Avila, J., Palumbo, A. (2006) Apoptosis of cultured granulosa-lutein cells is reduced by insulin-like growth factor I and may correlate with embryo fragmentation and pregnancy rate *Fertil Steril.* **85**, 474-480.

Bergers, G., Benjamin, L.E. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch *Nat Rev Cancer.* **3(6)**, 401-410.

Bergers, G., Coussens, L.M. (2000) Extrinsic regulators of epithelial tumor progression: metalloproteinases *Curr Opin Genet Dev.* **10(1)**, 120-127.

Bianco, F., Basinim, G., Santini, S., Grasselli, F. (2005) Angiogenic activity of swine granulosa cells: effects of hypoxia and the role of VEGF *Vet Res Commun.* **29 Suppl 2**, 157-159.

Bluff, J.E., Brown, N.J., Reed, M.W., Staton, C.A. (2008) Tissue factor, angiogenesis and tumour progression *Breast Cancer Res.* **10(2)**, 204.

Brannian, J., Stouffer, R. (1993) Native and modified (acetylated) low density lipoprotein-supported steroidogenesis by macaque granulosa cells collected before and after the ovulatory stimulus: correlation with fluorescent lipoprotein uptake *Endocrinology* **132**, 591-597.

- Breen, E.C. (2007) VEGF in biological control *J Cell Biochem.* **102(6)**, 1358-1367.
- Briggs, D. Miller, D., Gosden, R.G. (1999) Molecular biology of female gametogenesis, in: Fauser, B.C.J.M. (Ed.), *Molecular Biology in Reproductive Medicine*, Parthenon, New York, 251-269.
- Brizuela, L., Rábano, M., Gangoiti, P., Narbona, N., Macarulla, J.M., Trueba, M., Gómez-Muñoz, A. (2007) Sphingosine-1-phosphate stimulates aldosterone secretion through a mechanism involving the PI3K/PKB and MEK/ERK 1/2 pathways *J Lipid Res.* **48 (10)**, 2264-2274.
- Browne, R.W., Shelly, W.B., Bloom, M.S., Ocque, A.J., Sandler, J.R., Huddleston, H.G., Fujimoto, V.Y. (2008) Distribution of high density lipoprotein particle components in human follicular fluid and sera and their associations with embryo morphology parameters during IVF *Hum Reprod* **23(8)**, 1884-1894.
- Bryant, S.M., Gale, J.A., Yanagihara, D.L., Campeau, J.D., diZerega, G.S. (1988) Angiogenic, mitogenic, and chemotactic activity of human follicular fluid *Am. J. Obstet. Gynecol.* **158**, 1207-1214.
- Boguslawski, G., Lyons, D., Harvey, K.A., Kovala, A.T., English, D. (2000) Sphingosylphosphorylcholine induces endothelial cell migration and morphogenesis *Biochem Biophys Res Commun.* **272(2)**, 603-609.
- Burridge, K., Wennerberg, K. (2004) Rho and Rac take center stage *Cell* **116**, 167-179.
- Carr, B. R., Sadler, R.K., Rochelle, D.B., Stalmach, M.A., MacDonald, P.C., Simpson, E.R. (1981) Plasma lipoprotein regulation of progesterone biosynthesis by human corpus luteum tissue in organ culture *Clin. Endocrinol. Metab.*, **52**, 875-881.
- Carvalho, J.F., Blank, M., Shoenfeld, Y. (2007) Vascular endothelial growth factor (VEGF) in autoimmune diseases *J Clin Immunol.* **27(3)**, 246-256.
- Cavender, J.L., Murdoch, W.J. (1988) Morphological studies of the microcirculatory system of periovulatory ovine follicles *Biol Reprod.* **39**, 989-997.
- Chaffin, C.L., Hess, D.L., Stouffer, R.L. (1999) Dynamics of periovulatory steroidogenesis in the rhesus monkey follicle after ovarian stimulation *Hum Reprod* **14**, 642-649.
- Chao, H.T., Ng, H.T., Tsai, K.L., Hong, C.Y., Wei, Y.H. (1992) Human follicular fluid stimulates motility and velocity of washed human sperm in vitro *Andrologia.* **1**, 47-51.
- Carlier, M.F., Wiesner, S., Le Clainche, C., Pantaloni, D. (2003) Actin-based motility as a self-organized system: mechanism and reconstitution in vitro *C R Biol.* **326(2)**, 161-170.
- Charnock-Jones, D.S., Sharkey, A.M., Rajput-Williams, J., Burch, D., Schofield, J.P., Fountain, S.A., Boocock, C.A., Smith, S.K. (1993) Identification and localization of

- alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines *Biol Reprod.* **48(5)**, 1120-1128.
- Cherian-Shaw, M., Puttabyatappa, M., Greason, E., Rodriguez, A., VandeVoort, C.A., Chaffin, C.L. (2009) Expression of SR-BI and LDL receptor and differential use of lipoproteins to support early steroidogenesis in luteinizing macaque granulosa cells *Endocrinology* **150(2)**, 957-965.
- Chitnis, S.S., Navlakhe, R.M., Shinde, G.C., Barve, S.J., D'Souza, S., Mahale, S.D., Nandedkar, T.D. (2008) Granulosa cell apoptosis induced by a novel FSH binding inhibitory peptide from human ovarian follicular fluid *J Histochem Cytochem.* **56(11)**, 961-968.
- Choi, J., Lee, B., Lee, E., Yoon, B.K., Choi, D. (2008) Effect of activin A and insulin-like growth factor-I on in vitro development of preantral follicles isolated from cryopreserved ovarian tissues in the mouse *Cryobiology.* **57(3)**, 209-215.
- Cooper, J.A., Schafer, D.A. (2000) Control of actin assembly and disassembly at filament ends *Curr Opin Cell Biol.* **12(1)**, 97-103.
- Copland, J.A., Zlatnik, M.G., Ives, K.L., Soloff, M.S. (2002) Oxytocin receptor regulation and action in a human granulosa-lutein cell line *Biol Reprod.* **66(5)**, 1230-1236.
- Coppola, F., Ferrari, B., Barusi, L., Caccavari, V., Salvarani, M.C., Piantelli, G. (2005) Follicular fluid levels of vascular endothelial growth factor and early corpus luteum function during assisted reproductive technology cycles *J Exp Clin Assist Reprod.* **30**, 2-13.
- Coticchio, G., Rossi, G., Borini, A., Grondahl, C., Macchiarelli, G., Flamigni, C., Fleming, S., Cecconi, S. (2004) Mouse oocyte meiotic resumption and polar body extrusion in vitro are differentially influenced by FSH, epidermal growth factor and meiosis activating sterol *Hum Reprod.* **19(12)**, 2913-2918.
- Das, S., Chattopadhyay, R., Ghosh, S., Goswami, S.K., Chakravarty, B.N., Chaudhury, K. (2006) Reactive oxygen species level in follicular fluid—embryo quality marker in IVF? *Hum Reprod* **21**, 2403-2407.
- De Goma, E.M., de Goma, R.L., Rader, D.J. (2008) Beyond high-density lipoprotein cholesterol levels evaluating high-density lipoprotein function as influenced by novel therapeutic approaches *J Am Coll Cardiol.* **51(23)**, 2199-2211.
- Della Ragione, T., Verheyen, G., Papanikolaou, E.G., Van Landuyt, L., Devroey, P., Van Steirteghem, A. (2007) Developmental stage on day-5 and fragmentation rate on day-3 can influence the implantation potential of top-quality blastocysts in IVF cycles with single

embryo transfer *Reprod Biol Endocrinol* **5**, 2-9.

Detmer, M., Brown, L.F., Berse, B.F., Jackman, R.W., Elicker, B.M., Dvorak, H.F., Claffey, K.P. (1997) Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin *J Invest Dermatol* **108**, 263-226.

De Vries, C., Escobedo, J.A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N., Williams L.T. (1992) The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor *Science* **255**, 989-991.

DiPietro, L.A. (1997) Thrombospondin as a regulator of angiogenesis. In: *Regulation of angiogenesis*. Rosen, E., Goldberg, I. (Eds). Springer, Berlin Heidelberg, New York, 295-315.

Dimmeler, S., Zeiher, A.M. (2000) Akt takes center stage in angiogenesis signaling *Circ Res.* **86**, 4-5.

Donovan, D., Brown, N.J., Bishop, E.T., Lewis, C.E. (2001) Comparison of three in vitro human 'angiogenesis' assays with capillaries formed in vivo *Angiogenesis.* **4(2)**, 113-121.

Doyle, L.K., Donadeu, F.X. (2008) Regulation of the proliferative activity of ovarian surface epithelial cells by follicular fluid *Anim Reprod Sci.* Epub ahead of print.

Duffy, D.M., Seachord, C.L., Dozier, B.L. (2005) An ovulatory gonadotropin stimulus increases cytosolic phospholipase A2 expression and activity in granulosa cells of primate periovulatory follicles *J Clin Endocrinol Metab.* **90(10)**, 5858-5865.

Eden, J.A., Carter, G.D., Alagband-Zadeh, J. (1988) A comparison of follicular fluid levels of insulin-like growth factor-1 in normal dominant and cohort follicles, polycystic and multicystic ovaries *Clin Endocrinol (Oxf)*. **29(3)**, 327-336.

Eden, J.A., Carter, G.D., Alagband-Zadeh, J. (1990) Follicular fluid concentrations of insulin-like growth factor 1, epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and sex-steroids in volume matched normal and polycystic human follicles *Clin Endocrinol (Oxf)*. **32(4)**, 395-405.

Edwards, R.G. Steptoe, P.C., Fowler, R.E., Baillie, J. (1980) Observations on preovulatory human ovarian follicles and their aspirates *Br J Obstet Gynaecol.* **87(9)**, 769-779.

Endresen, M.J., Haug, E., Abyholm, T., Henriksen, T. (1990) The source of cholesterol for progesterone synthesis in cultured preovulatory human granulosa cells *Acta Endocrinol (Copenh)*. **123(3)**, 359-364.

Entman, S.S., Maxson, W.S., Bradley, C.A., Osteen, K., Webster, B.W., Vaughn, W.K., Wentz, A.C. (1987) Follicular fluid transferrin levels in preovulatory human follicles *J In*

Vitro Fert Embryo Transf. **4(2)**, 98-102.

Eming, S.A., Brachvogel, B., Odorisio, T., Koch, M. (2007) Regulation of angiogenesis: wound healing as a model *Prog Histochem Cytochem.* **42(3)**, 115-170.

Erdogan, A., Schaefer, C.A., Schaefer, M., Luedders, D.W., Stockhausen, F., Abdallah, Y., Schaefer, C., Most, A.K., Tillmanns, H., Piper, H.M., Kuhlmann, C.R. (2005) Margatoxin inhibits VEGF-induced hyperpolarization, proliferation and nitric oxide production of human endothelial cells *J Vasc Res.* **42(5)**, 368-376.

Etienne-Manneville, S., Hall, A. (2002) Rho GTPases in cell biology *Nature* **420**, 629-635.

Evers, E.E., Zondag, G.C., Malliri, A., Price, L.S., ten Klooster, J.P., van der Kammen, R.A., Collard, J.G. (2000) Rho family proteins in cell adhesion and cell migration *Eur J Cancer.* **36**, 1269-1274.

Favot, L., Keravis, T., Holl, V., Le Bec, A., Lugnier, C. (2003) VEGF-induced HUVEC migration and proliferation are decreased by PDE2 and PDE4 inhibitors *Thromb Haemost.* **90(2)**, 334-343.

Feig, J.E., Shamir, R., Fisher, E.A. (2008) Atheroprotective effects of HDL: beyond reverse cholesterol transport *Curr Drug Targets.* **9(3)**, 196-203.

Felberbaum, R., Reissmann, T., K pker, W., Al-Hasani, S. Bauer, O., Schill, T., Zoll, C., Diedrich, C., Diedrich, K. (1996). Hormone profiles under ovarian hyperstimulation with human menopausal gonatropin (hMG) and concomitant administration of the gonadotropin releasing hormone (GnRH)-antagonist Cetrorelix at different dosages. *J Assist Reprod Genet* **13(3)**, 216-222.

Ferrara, N., Houck, K.A., Jakeman, L.B., Winer, J., Leung, D.W. (1991) The vascular endothelial growth factor of polypeptides *J Cell Biochem* **47**, 211-218.

Ferrara, N., Houck, K., Jakeman, L., Leung, D.W. (1992) Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins *Endocrine Rev.* **13(1)**, 18-32.

Ferrara, N., Chen, H., Davis-Smyth, T., Gerber, H.P., Nguyen, T.N., Peers, D., Chisholm, V., Hillan, K.J., Schwall, R.H. (1998) Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis *Nat Med.* **4**, 336-340.

Fieber, C.B., Eldridge, J., Taha, T.A., Obeid, L.M., Muise-Helmericks, R.C. (2006) Modulation of total Akt kinase by increased expression of a single isoform: requirement of the sphingosine-1-phosphate receptor, Edg3/S1P3, for the VEGF-dependent expression of Akt3 in primary endothelial cells *Exp Cell Res.* **312(7)**, 1164-1173.

- Folkman, J., Haudenschild, C.C., Zetter, B.R. (1979) Long-term culture of capillary endothelial cells *Proc Nat Acad Sci USA* **76**, 5217.
- Fraser, H.M., Duncan, W.C. (2005) Vascular morphogenesis in the primate ovary *Angiogenesis* **8** (2), 101-116.
- Fraser, H.M., Dickson, S.E., Lunn, S.F., Wulff, C., Morris, K.D., Carroll, V.A., Bicknell, R. (2000) Suppression of luteal angiogenesis in the primate after neutralization of vascular endothelial growth factor *Endocrinology* **141**, 995-1000.
- Frederick, J. L., Shimanuki, T., diZerega, G. S. (1984) Initiation of angiogenesis by human follicular fluid *Science* **224**, 389-390.
- Gale, N.W., Yancopoulos, G.D. (1999) Growth factor acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins and ephrins in vascular development *Genes Dev* **13**, 1055-1066.
- Garver, W.S., Deeg, M.A., Bowen, R.F., Culala, M.M., Bierman, E.L., Oram, J.F. (1997) Phosphoproteins regulated by the interaction of high-density lipoprotein with human skin fibroblasts *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **11**, 2698-2706.
- Geva, E., Jaffe, R.B. (2000) Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology *Fertil Steril.* **4**(3), 429-438.
- Glomset, I.A. (1968) The plasma lecithin:cholesterol acyltransferase reaction *J Lipid Res* **9**, 155-167.
- God, D., Polverini, P., Rastinejad, F., Beau, M., Lemons, R., Frazier, W., Bouck, N. (1991) A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically indistinguishable from a fragment of thrombospondin *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 6624-6628.
- Gonzalez, E., Kou, R., Michel, T. (2006) Rac1 modulates Sphingosine 1-phosphate-mediated activation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathways in vascular endothelial cells *J Biol Chem.* **281**(6), 3210-3216.
- Goparaju, S.K., Jolly, P.S., Watterson, K.R., Bektas, M., Alvarez, S., Sarkar, S., Mel, L., Ishii, I., Chun, J., Milsten, S., Spiegel, S. (2005) The S1P₂ receptor negatively regulates platelet-derived growth factor-induced motility and proliferation *Mol Cell Biol* **25**(10), 4237-4249.
- Gospodarowicz, D., Cheng, J., Lui, G.M. (1985) Corpus luteum angiogenic factor is related to fibroblast growth factor *Endocrinology* **117**, 2383-2389.
- Gospodarowicz, D. (1991) Biological activities of fibroblast growth factors *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **638**, 1-8.

- Grazul-Bilska, A.T., Redmer, D.A., Zheng, J., Killilea, S.D., Reynolds, L.P. (1995). Initial characterization of mitogenic activity of ovine corpora lutea from early pregnancy *Growth Factors* **12**, 131-144.
- Greenwald, G.S., Terranova, P.F. (1988) Follicular selection and its control. In: *The Physiology of Reproduction*. E Knobil, E., Neill, J. (Eds) New York: Raven Press, **1**, 38.
- Greenspon, J., Li, R., Xiao, L., Rao, J.N., Marasa, B.S., Strauch, E.D., Wang, J.Y., Turner, D.J. (2008) Sphingosine-1-phosphate protects intestinal epithelial cells from apoptosis through the Akt signaling pathway *Dig Dis Sci.* **54(3)**, 499-510.
- Gruemmer, R., Klein-Hitpass, L., Neulen J. (2005) Regulation of gene expression in endothelial cells: the role of human follicular fluid *J Mol Endocrinol.* **34(1)**, 37-46.
- Gruemmer, R., Motejlek, K., Berghaus, D., Weich, H.A., Neulen, J. (2005) Regulation of soluble vascular endothelial growth factor receptor (sFlt-1/sVEGFR-1) expression and release in endothelial cells by human follicular fluid and granulosa cells *Reprod Biol Endocrinol.* **3**, 57.
- Gutman, G., Barak, V., Maslovitz, S., Amit, A., Lessing, J.B., Geva E. (2008) Regulation of vascular endothelial growth factor-A and its soluble receptor sFlt-1 by luteinizing hormone in vivo: implication for ovarian follicle angiogenesis *Fertil Steril.* **89(4)**, 922-926.
- Gwynne, J.T. Strauss, J.F. (1982) The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands *Endocr Rev* **3**, 299-329.
- Hänel, P., Andréani, P., Gräler, M.H. (2007) Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood *FASEB J.* **21(4)**, 1202-1209.
- Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton *Science* **279**, 509-514.
- Hall, H., Baechi, T, Hubbell, J.A. (2001) Molecular properties of fibrin-based matrices for promotion of angiogenesis in vitro *Microvasc Res.* **62(3)**, 315-326.
- Hanahan, D. (1997) Signaling vascular morphogenesis and maintenance *Science* **277**, 48-50.
- Hannun, Y.A., Obeid, L.M. (2008) Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids *Nat Rev Mol Cell Biol.* **283**, 139-150.
- Havel, R.J., Eder, H.A., Bragdon, J.H. (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest.* **34(9)**, 1345-1353.
- Herr, F., Baal, N., Reisinger, K., Lorenz, A., McKinnon, T., Preissner, K.T., Zygmunt, M. (2007) HCG in the regulation of placental angiogenesis. Results of an in vitro study *Placenta.* **28 Suppl A**, 85-93.

- Hunter, R.H.F. (2003) Physiology of the Graafian Follicle and Ovulation Cambridge University Press, **42-48**, 106-122.
- Igarashi, J, Bernier, S.G., Michel, T (2001) Sphingosine 1-phosphate and activation of endothelial nitric-oxide synthase. Differential regulation of Akt and MAP kinase pathways by EDG and bradykinin receptors in vascular endothelial cells *J Biol Chem.* **276(15)**, 12420-12426.
- Im, D. S., Heise, C. E., Ancellin, N., O'Dowd, B. F., Shei, G., Heavens, R. P., Rigby, M. R., Hla, T., Mandala, S., McAllister, G., George S.R., Lynch, K.R. (2000) Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, edg-8 *J Biol Chem* **275**, 14281-4286.
- Jabbour, H.N., Kelly, R.W., Fraser, H.M., Critchley, H.O. (2006) Endocrine regulation of menstruation *Endocr Rev.* **27(1)**, 17-46.
- Jaspard, B., Fournier, N., Vieitez, G., Atger, V., Barbaras, R., Vieu, C., Manent, J., Chap, H., Perret, B., Collet, X. (1997) Structural and functional comparison of HDL from homologous plasma and follicular fluid *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **17**, 1605-1613.
- Kamat, B.R., Brown, L.F., Manseau, E.J., Senger, D.R., Dvorak, H.F. (1995) Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development *Am J Pathol.* **146(1)**, 157-165.
- Kawano, Y., Fukuda, J., Nasu, K., Nishida, M., Narahara, H., Miyakawa, I. (2004) Production of macrophage inflammatory protein in human follicular fluid and cultured granulosa cells *Fertil Steril.* **82**, 1206-1211.
- Kawasaki, K., Smith, R.S. Jr., Hsieh, C.M., Sun, J., Chao, J., Liao, J.K. (2003) Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis *Mol Cell Biol.* **16**, 5726-5737.
- Kimura, T., Watanabe, T., Sato, K., Kon, J., Tomura, H., Tamama, K., Kuwabara, A., Kanda, T., Kobayashi, I., Ohata, H., Ui, M., Oajima, F. (2000) Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3 *Biochem J* **348**, 71-76.
- Kimura, T., Sato, K., Kuwabara, A., Tomura, H., Ishiwara, M., Kobayashi, I., Ui, M., Okajima, F. (2001) Sphingosine 1-phosphate may be a major component of plasma lipoproteins responsible for the cytoprotective actions in human umbilical vein endothelial cells *J Biol Chem.* **276(34)**, 31780-31785.
- Kimura, T., Sato, K., Malchinhuu, E., Tomura, H., Tamama, K., Kuwabara, A., Murakami, M., Oajima, F. (2003) High density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*

23, 1283-1288.

Kimura, T., Tomura, H., Mogi, C., Kuwabara, A., Damirin, A., Ishizuka, T., Sekiguchi, A., Ishiwara, M., Im, D.S., Sato, K., Murakami, M., Okajima, F. (2006) Role of scavenger receptor class B type I and sphingosine 1-phosphate receptors in high density lipoprotein-induced inhibition of adhesion molecule expression in endothelial cells *J Biol Chem.* **281(49)**, 37457-37467.

Koch, A.E., Distler, O. (2007) Vasculopathy and disordered angiogenesis in selected rheumatic diseases: rheumatoid arthritis and systemic sclerosis *Arthritis Res Ther.* **9 Suppl 2**, 3.

Koga, K., Osuga, Y., Tsutsumi, O., Momoeda, M., Suenaga, A., Kugu, K., Fujiwara, T., Takai, Y., Yano, T., Taketani, Y. (2000) Evidence for the Presence of Angiogenin in Human Follicular Fluid and the Up-Regulation of Its Production by Human Chorionic Gonadotropin and Hypoxia *J Clin Endocrinol Metab.* **85**, 3335-3352.

Kluk, M.J., Hla, T. (2002) Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors *Biochim Biophys Acta* **1582**, 72-80.

Knauff, E.A., Westerveld, H.E., Goverde, A.J., Eijkemans, M.J., Valkenburg, O., van Santbrink, E.J., Fauser, B.C., van der Schouw, Y.T. (2008) Lipid profile of women with premature ovarian failure *Menopause.* **15(5)**, 919-923.

Kodamon, P.H., Duleba, A.J. (2008) Statins in the treatment of polycystic ovary syndrome *Semin Reprod Med* **26(1)**, 127-138.

Koo YA, Shin SY, Yoon BK, Choi D. (2007) Pioglitazone for treating polycystic ovary syndrome in non-obese women of reproductive age with different clinical presentations *Gynecol Endocrinol.* **2**, 1-7.

Kraemer, F.B. (2007) Adrenal cholesterol utilization *Mol Cell Endocrinol* **265-266**, 42-45.

Krasnow, J.S., Berga, S.L., Guzick D.S., Zeleznik, A.J., Yeo, K.T. (1996) Vascular permeability factor and vascular endothelial growth factor in ovarian hyperstimulation syndrome: a preliminary report *Fertil Steril.* **65**, 552-555.

Krieger, M. (1999) Charting the fate of the good cholesterol: Identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI *Annu Rev Biochem* **68**, 523-558.

Kyrou, I., Tsigos, C. (2008) Chronic stress, visceral obesity and gonadal dysfunction *Hormones (Athens.)* **7(4)**, 287-293.

Lämmlli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* **227**, 680-685.

- LaMontagne, K., Littlewood-Evans, A., Schnell, C., O'Reilly, T., Wyder, L., Sanchez, T., Probst, B., Butler, J., Wood, A., Liau, G., Billy, E., Theuer, A., Hla, T., Wood, J. (2006) Antagonism of sphingosine-1-phosphate receptors by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization *Cancer Res.* **66(1)**, 221-231.
- Langlais, J., Kan, F.W., Granger, L., Raymond, L., Bleau, G., Roberts, K.D. (1988) Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation *Gamete Res.* **20(2)**, 185-201.
- Laitinen, M., Ristimäki, A., Honkasalo, M., Narko, K., Paavonen, K., Ritvos, O. (1997) Differential hormonal regulation of vascular endothelial growth factors VEGF, VEGF-B and VEGF-C messenger ribonucleic acid levels in cultured human granulosa-luteal cells *Endocrinology* **138**, 4748-4756.
- Lawley, T.J., Kubota, Y. (1989) Induction of morphologic differentiation of endothelial cells in culture *J Invest Dermatol.* **93(2 Suppl)**, 59-61.
- Lee, O.H., Kim, Y.M., Lee, Y.M., Moon, E.J., Lee, D.J., Kim, J.H., Kim, K.W., Kwon, Y.G. (1999) Sphingosine 1-Phosphate induces angiogenesis: Its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical vein endothelial cell *Biochem Biophys Res Commun.* **264**, 743-750.
- Lee, J.F., Ozaki, H., Zhan, X., Wang, E., Hla, T., Lee, M.J. (2006) Sphingosine-1-phosphate signaling regulates lamellipodia localization of cortactin complexes in endothelial cells *Histochem Cell Biol.* **126(3)**, 297-304.
- Lee, M.J., Thangada, S., Paik, J.H., Sapkota, G.P., Ancellin, N., Chae, S.S., Wu, M., Morales-Ruiz, M., Sessa, W.C., Alessi, D.R., Hla T. (2001) Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required for endothelial cell chemotaxis *Mol Cell* **8**, 693-704.
- Le Goff, D. (1994) Follicular fluid in the mare: evaluation of HDL transfer from plasma to follicular fluid *Biochim Biophys Acta.* **1210**, 226-232.
- Lepley, D., Pai, J.H., Hla, T., Ferrer, F. (2005) The G protein-coupled receptor S1P₂ regulates Rho/Rho inase pathway to inhibit tumor cell migration *Cancer Res* **65(9)**, 3788-3795.
- Lithell, H., Nilsson, S.J., Bergh, T., Selinus, I. (1987) Metabolic profile in obese women with the polycystic ovary syndrome *Int J Obes* **11(1)**, 1-8.
- Liu, F., Verin, A.D., Wang, P., Day, R., Wersto, R.P., Chrest, F.J., English, D.K., Garcia, J.G. (2001) Differential regulation of sphingosine-1-phosphate- and VEGF-induced endothelial cell chemotaxis. Involvement of G(α₂)-linked Rho kinase activity *Am J*

Respir Cell Mol Biol **24(6)**, 711-719.

Liu, Y.X., Liu, K., Feng, Q., Hu, Z.Y., Liu H.Z., Fu, G.Q., Li, Y.C., Zou, R.J., Ny, T. (2004) Tissue-type plasminogen activator and its inhibitor plasminogen activator inhibitor type 1 are coordinately expressed during ovulation in the rhesus monkey *Endocrinology*. **145(4)**, 1767-1775.

Liu, Y.X. (2004). Plasminogen activator/plasminogen activator inhibitors in ovarian physiology *Front Biosci*. **9**, 3356-3373.

Ludwig, M., Binder, H., Beckmann, M.W., Schulte, H.M. (2004) Refresher Hyperandrogenämie - Teil I. *Geb Fra*. 64.

Lüllmann-Rauch, R.: Histologie. 2. Aufl. Stuttgart-New York, Thieme Verlag, 2003, 434-437.

Gross, J.L., Moscatelli, D., Rifkin, D.B. (1983) Increased capillary endothelial cell protease activity in response to angiogenic stimuli *Proc Nat Acad Sci. USA* **80**, 2623.

Mader, J.S., Smyth, D., Marshall, J., Hoskin, D.W. (2006) Bovine lactoferricin inhibits basic fibroblast growth factor- and vascular endothelial growth factor165-induced angiogenesis by competing for heparin-like binding sites on endothelial cells *Am J Pathol*. **169(5)**, 1753-1766.

Mignatti, P., Rifkin, D.B. (1996) Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis *Enzyme Protein*. **49(1-3)**, 117-137.

Maisonpierre, P.C., Suri, C., Jones, P.C., Jones, P.F., Bartunkava, S., Wiegand, S.J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T.H., Papadopoulos, N., Daly, T.J., Davis, S., Sato, T.N., Yancopoulos, G.D. (1997) Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts *in vivo* angiogenesis *Science* **277**, 55-60.

Mason, J.C., Lidington, E.A., Ahmad, S.R., Haskard, D.O. (2002) bFGF and VEGF synergistically enhance endothelial cytoprotection via decay-accelerating factor induction *Am J Physiol Cell Physiol*. **282(3)**, C578-587.

Mathieson, F.A., Nixon, G.F. (2006) Sphingolipids differentially regulate mitogen-activated protein kinases and intracellular Ca²⁺ in vascular smooth muscle: effects on CREB activation *Br J Pharmacol*. **147(4)**, 351-349.

Matsuyuki, H., Maeda, Y., Yano, K., Sugahara, K., Chiba, K., Kohno, T., Igarashi, Y. (2006) Involvement of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor type 1 and type 4 in migratory response of mouse T cells toward S1P *Cell Mol Immunol*. **3(6)**, 429-437.

McClure, N., Macpherson, A.M., Abberton, K.M., Healy, D.L., Rogers, P.A. (1993) Human follicular fluid maturity and endothelial cell mitogenesis *Hum Reprod*. **10**, 1564-

1569.

McGee, E.A., Hsueh, A.J. (2000) Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles *Endocr. Rev.* **21**(2), 200-214.

Mendez, A.J., Oram, J.F., Bierman, E.L. (1991) Protein kinase C as a mediator of high density lipoprotein receptor-dependent efflux of intracellular cholesterol *J Biol Chem.* **266**(16), 10104-10111.

Mineo, C., Yuhanna, I.S., Quon, M.J., Shaul, P.W. (2003) High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases *J Biol Chem.* **78**(11), 9142-91429.

Miranda-Jiménez, L., Murphy, B.D. (2007) Lipoprotein receptor expression during luteinization of the ovarian follicle *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **293**(4), 1053-1061.

Miro, F., Parker, S.W., Aspinall, L.J., Coley, J., Perry, P.W., Ellis, J.E. (2004) Relationship between follicle-stimulating hormone levels at the beginning of the human menstrual cycle, length of the follicular phase and excreted estrogens: the FREEDOM study *J Clin Endocrinol Metab.* **89**(7), 3270-3275.

Miura, S., Fujino, M., Matsuo, Y., Kawamura, A., Tanigawa, H., Nishikawa, H., Saku, K. (2003) High density lipoprotein-induced angiogenesis requires the activation of Ras/MAP kinase in human coronary artery endothelial cells *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 802-808.

Morales-Ruiz, M., Lee, M.J., Zollner, S., Gratton, J.P., Scotland, R., Shiojima, I., Walsh, K., Hla, T., Sessa, W.C. (2001) Sphingosine 1-phosphate activates Akt, nitric oxide production and chemotaxis through a Gi protein/phosphoinositide 3-kinase pathway in endothelial cells *J Biol Chem.* **276**, 19672-19677.

Morita, Y., Perez, G.I., Paris, F., Miranda, S., Ehleiter, D., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., Xie, Z., Reed, J.C., Schuchman, E.H., Kolesnick, R.N., Tilly, J.L. (2000) Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy *Nat. Med.* **6**, 1109-1114.

Möllers, C., Drobnik, W., Resink, T., Schmitz G. (1995) High-density lipoprotein and low-density lipoprotein-mediated signal transduction in cultured human skin fibroblasts *Cell Signal.* **7**, 695-707.

Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays *J Immunol Methods* **65**, 55-63.

Müller, A.M., Hermanns, M.I., Skrzynski, C., Nesslinger, M., Müller, K.M., Kirkpatrick, C.J. (2002) Expression of the endothelial markers PECAM-1, vWf and CD34 in vivo and

in vitro *Exp.Mol Patholg.* **2(3)**, 221-229.

Murata, M., Tamura, A., Kodama, H., Hirano, H., Takahashi, O., Tanaka, T. (1998) Possible involvement of very low density lipoproteins in steroidogenesis in the human ovary *Mol Hum Reprod.* **4**, 797-801.

Murata, N., Sato, K., Kon, J., Tomura, H., Yanagita M., Kuwabara A., Ui M., Okajima F. (2000) Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions *Biochem J.* **352**, 809-815.

Murch, O., Abdelrahman, M., Collino, M., Gallicchio, M., Benetti, E., Mazzon, E., Fantozzi, R., Cuzzocrea, S., Thiernemann, C. (2008) Sphingosylphosphorylcholine reduces the organ injury/dysfunction inflammation caused by endotoxemia in rat *Crit Care Med.* **36(2)**, 550-559.

Napoli, C., de Nigris, F., Williams-Ignarro S., Pignalosa O., Sica, V., Ignarro, L.J. (2006) Nitric oxid and atherosclerosis: an update *Nitric Oxide* **15**, 265-279.

Nayudu, P.L., Lopata, A., Jones, G.M., Gook, D.A., Bourne, H.M., Sheather, S.J., Brown, T.C., Johnston, W.I. (1989) Analysis of human oocytes and follicles from stimulated cycles: oocyte morphology and associated follicular fluid characteristics *Hum Reprod.* **4**, 558-567.

Neulen, J., Yan, Z., Raczek, S., Weindel, K., Keck, C., Weich, H.A., Marme, D., Breckwoldt, M. (1995) Human chorionic gonadotropin-dependent expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in human granulosa cells: importance in ovarian hyperstimulation syndrome *J Clin Endocrinol Metab.* **80**, 1967-1971.

Niedernberg, A., Scherer, C.R., Busch, A.E., Kostenis, E. (2002) Comparative analysis of human and rat S1P₅ (edg8): differential expression profiles and sensitivities to antagonists *Biochem Pharmacol* **64(8)**, 1243-1250.

Niswender, G.D. (2002) Molecular control of luteal secretion of progesterone *Reproduction* **123**, 333-339.

Nofer, J.R., Junker, R., Pulawski, E., Fobker, M., Levkau, B., von Eckardstein, A., Seedorf, U., Assmann, G., Walter, M. (2001) High density lipoproteins induce cell cycle entry in vascular smooth muscle cells via mitogen activated protein kinase-dependent pathway *Thromb. Haemost.* **85**, 730-735.

Nofer, J.R., Levkau, B., Wolinska, I., Junker, R., Fobker, M., von Eckardstein, A., Seedorf, U., Assmann, G. (2001) Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids *J Biol Chem.* **276**, 34480–

34485.

- Nofer, J.R., Kehrel, B., Fobker, M., Levkau, B., Assmann, G., von Eckardstein, A. (2002) HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* **161**, 1-16.
- Nofer, J.R., Fobker, M., Höbbel, G., Voss, R., Wolinska, I., Tepel, M., Zidek, W., Junker, R., Seedorf, U., von Eckardstein, A., Assmann, G., Walter, M. (2000) Activation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C by HDL-associated lysosphingolipid. Involvement in mitogenesis but not in cholesterol efflux *Biochemistry* **39(49)**, 15199-15207.
- Nofer, J.R., Geigenmüller, S., Göpfert, C., Assmann, G., Buddecke, E., Schmidt, A. (2003) High density lipoprotein-associated lysosphingolipids reduce E-selectin expression in human endothelial cells *Biochem Biophys Res Commun.* **310(1)**, 98-103.
- Nofer, J.R., van der Giet, M., Tolle, M., Wolinska, I., von Wnuck Lipinski, K., Baba, H.A., Tietge, U.J., Godecke, A., Ishii, I., Kleuser, B., Schafers, M., Fobker, M., Zidek, W., Assmann, G., Chun, J., Levkau, B. (2004) HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3 *J. Clin. Invest.* **113**, 569-581.
- Noor, R., Shuaib, U., Wang, C.X., Todd, K., Ghani, U., Schwindt, B., Shuaib, A. (2007) High-density lipoprotein cholesterol regulates endothelial progenitor cells by increasing eNOS and preventing apoptosis *Atherosclerosis* **192(1)**, 92-99.
- Ny, A., Nordström, L., Carmeliet, P., Ny, T. (1997) Studies of mice lacking plasminogen activator gene function suggest that plasmin production prior to ovulation exceeds the amount needed for optimal ovulation efficiency *Eur J Biochem* **244(2)**, 487-493.
- Ocal, P., Aydin, S., Cepni, I., Idil, S., Idil, M., Uzun, H., Benian, A. (2004) Follicular fluid concentrations of vascular endothelial growth factor, Inhibin A and inhibin B in IVF cycles: are they markers for ovarian response and pregnancy outcome? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* **115**, 194-199.
- O'Connell, B.J., Genest, J. Jr. (2001) High-density lipoproteins and endothelial function *Circulation* **104(16)**, 1978-1983.
- Okajima, F. (2002) Plasma lipoproteins behave as carriers of extracellular sphingosine 1-phosphate: is this an atherogenic mediator or an anti-atherogenic mediator? *Biochim Biophys Acta.* **1582(1-3)**, 132-137.
- O' Shaughnessy, P.J., Pearce, S., Mannan, M.A. (1990) Effect of high-density lipoprotein on bovine granulosa cells: progesterone production in newly isolated cells and during cell culture *J Endocrinol.* **124(2)**, 255-260.

- Otala, M., Suomolainen, L., Pentikäinen, M.O., Kovanen, P., Tenhunen, M., Erkkilä, K., Toppari, J., Dunkel, L. (2004) Protection from radiation-induced male germ cell loss by sphingosine 1-phosphate *Biol Reprod.* **70(3)**, 759-767.
- Otani, N., Minami, S., Yamoto, M., Shikone, T., Otani, H., Nishiyama, R., Otani, T., Nakano, R. (1999) The vascular endothelial growth factor/ fms-like tyrosine kinase system in human ovary during the menstrual cycle and early pregnancy *J Clin Endocrinol Metabol.* **84**, 3845-3851.
- Oyama, O., Sugimoto, N., Qi, X., Takuwa, N., Mizugishi, K., Koizumi, J., Takuwa, Y. (2008) The lysophospholipid mediator sphingosine-1-phosphate promotes angiogenesis in vivo in ischaemic hindlimbs of mice *Cardiovasc Res.* **78(2)**, 301-307.
- Ozbay, T., Merrill, A.H. Jr., Sewer, M.B. (2004) ACTH regulates steroidogenic gene expression and cortisol biosynthesis in the human adrenal cortex via sphingolipid metabolism *Endocr Res.* **30(4)**, 787-794.
- Pache, T.D., Wladimiroff, J.W., de Jong, F.H., Hopp, W.C, Fauser, B.C. (1990) Growth pattern of nondominant ovarian follicles during the normal menstrual cycle *Fertil Steril.* **54**, 638-642.
- Paik, J.H., Chae, S., Lee, M.J., Thangada, S., Hla, T. (2001) Sphingosine 1-phosphate induced endothelial cell migration requires the expression of EDG-1 and EDG-3 receptors and Rho-dependent activation of $\nu\beta 3$ - and $\beta 1$ -containing integrins *J Biol Chem.* **276**, 11830–11837.
- Palermo, R. (2007) Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis *Reprod Biomed Online.* **15(3)**, 326-337.
- Pangas, S.A. (2007) Growth factors in ovarian development *Semin Reprod Med.* **25(4)**, 225-234.
- Paris, F., Perez, G.I., Haimovitz-Friedman, A., Nguyen, H., Fuks, Z., Bose, M., Ilagan, A., Hunt, P.A., Morgan, W.F., Tilly, J.L., Kolesnick, R. (2002) Sphingosine-1-phosphate preserves fertility in irradiated female mice without propagating genomic damage in offspring *Nat. Med.* **8**, 901-902.
- Pappu, R., Schwab, S.R., Cormelissen, I., Pereira, J.P., Xu, Y., Camerer, E., Zheng, Y.W., Huang, Y., Cyster, J.G., Coughlin, S.R. (2007) Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate *Science* **316**, 295-289.
- Pepper, M.S., Mandriota, S.J., Jeltsch, M., Kumar, V., Alitalo, K. (1998) Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C synergizes with basic fibroblast growth factor and VEGF in the induction of angiogenesis in vitro and alters endothelial cell extracellular

- proteolytic activity *J Cell Physiol.* **177(3)**, 439-452.
- Perret, B.P., Parinaud, J., Ribbes, H., Moatti, J.P., Pontonnier, G., Chap, H., Douste-Blazy, L. (1985) Lipoprotein and phospholipid distribution in human follicular fluids *Fertil. Steril.* **43**, 405-409.
- Perez, G.I., Knudson, C.M., Leykin, L., Korsmeyer, S.J., Tilly, J.L. (1997) Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction *Nat. Med.* **3**, 1228-1232.
- Phan, B., Rakenius, A., Pietrowski, D., Bettendorf, H., Keck, C., Herr, D. (2006) HCG-dependent regulation of angiogenic factors in human granulosa lutein cells *Mol Reprod Dev.* **73(7)**, 878-884.
- Pollow, K. (1990) Leitfaden der Reproduktions-Endokrinologie, Normwerte und Funktionsteste. **1**, 55-57.
- Pozzi, A., Moberg, P.E., Miles, L.A., Wagner, S., Soloway, P., Gardner, H. (2000) Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor vascularization *Proc Natl Acad Sci U S A* **97(5)**, 2202-2207.
- Pyne, S., Pyne, N. (2000) Sphingosine 1-phosphate signalling via the endothelial differentiation gene family of G-protein-coupled receptors *Pharmacol Ther* **88**, 115-131.
- Ragoobir, J., Abayasekara, D.R.E., Bruckdorfer, K.R., Michael, A.E. (2002) Stimulation of progesterone production in human granulosa-lutein cells by lipoproteins: evidence for cholesterol-independent actions of high-density lipoproteins *J Endocrinol* **173**, 103-111.
- Rajesh, M., Mukhopadhyay, P., Godlewski, G., Bãtkai, S., Hasko, G., Liauder, L., Pacher, P. (2006) Poly (ADP-ribose) polymerase inhibition decreases angiogenesis *Biochem Biophys Res Commun* **350(4)**, 1056-1062.
- Reaven, E., Lua, Y., Nomoto, A., Temel, R., Williams, D.L., van der Westhuyzen, D.R., Azhar, S. (1999) The selective pathway and a high-density lipoprotein receptor (SR-BI) in ovarian granulosa cells of the mouse *Biochim Biophys Acta* **1436**, 565-576.
- Redmer, D.A., Reynolds, L.P. (1996) Angiogenesis in the ovary *Rev Reprod.* **1**, 182-192.
- Reynolds, L.P., Redmer, D.A. (1998) Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular growth factor in the ovary *J. Anim. Sci.* **76**, 1671-1681.
- Risau, W. (1997) Mechanisms of angiogenesis *Nature* **386(6626)**, 671-674.
- Rivera, R., Chun, J. (2008) Biological effects of lysophospholipids *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* **160**, 25-46.
- Rius, J., Martínez-González, J., Crespo, J., Badimon, L. (2006) NOR-1 is involved in VEGF-induced endothelial cell growth *Atherosclerosis.* **184(2)**, 276-82.

- Robinson, R.S., Hammond, A.J., Mann, G.E., Hunter, M.G. (2008) A novel physiological culture system that mimics luteal angiogenesis *Reproduction* **135(3)**, 405-413.
- Rochu, D., Chabrière, E., Renault, F., Elias, M., Cléry-Barraud, C., Masson, P. (2007) Stabilization of the active form(s) of human paraoxonase by human phosphate-binding protein *Biochem Soc Trans.* **35(Pt 6)**, 1616-1620.
- Robker, R. L., Akison, I. K., Bennett, B.D., Thrupp, P.N., Russel, D.L., Lane, M., Norman, R.J. (2009) Obese Woman exhibit differences in ovarian metabolites, hormones and gene expression compared to moderate weight women *J Clin Endocrinol Metab* Epub ahead of print.
- Rolaki, A., Coukos, G., Loutradis, D., DeLisser, H.M., Coutifaris, C., Makrigiannakis, A. (2007) Luteogenic hormones act through a vascular endothelial growth factor-dependent mechanism to up-regulate $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins, promoting the migration and survival of human luteinized granulosa cells *Am J Pathol.* **170(5)**, 1561-1572.
- Rotondi, M., Chiovato, L., Romagnani, S., Serio, M., Romagnani, P. (2007) Role of chemokines in endocrine autoimmune diseases *Endocr Rev.* **28(5)**, 492-520.
- Roy, R., Belanger, A. (1991) Lipoprotein-incorporated pregnenolone fatty acid esters act as substrate for ovarian progesterin synthesis *Biochem Biophys Res Commun* **179**, 1576-1581.
- Roy, R., Belanger, A. (1992) Elevated Levels of Endogenous Pregnenolone fatty acid esters in follicular fluid High Density Lipoproteins support progesterone synthesis in porcine granulosa cells *Endocrinology.* **131(3)**, 1390-1396.
- Ruwisch, L., Schafer Korting, M., Kleuser B. (2001) An improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of sphingosine-1-phosphate in complex biological materials *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* **363**, 358-363.
- Sattler K., Levkau B. (2009) Sphingosine-1-phosphate as a mediator of high density lipoprotein effects in cardiovascular protection *Cardiovasc Res.* Epub ahead of print.
- Schmidt, A., Geigenmüller, S., Völker, W., Buddecke, E. (2006) The antiatherogenic and antiinflammatory effect of HDL-associated lysosphingolipids operates via Akt \rightarrow NF-kappaB signalling pathways in human vascular endothelial cells *Basic Res Cardiol.* **2**, 109-116.
- Schmid, G., Guba, M., Ischenko, I., Papyan, A., Joka, M., Schrepfer, S., Bruns, C.J., Jauch, K.W., Heeschen, C., Graeb, C. (2007) The immunosuppressant FTY720 inhibits tumor angiogenesis via the sphingosine 1-phosphate receptor 1 *J Cell Biochem.* **101(1)**, 259-270.
- Secchiero, P., Monelli, A., Carnevale, E., Milani, D., Pandolfi, A., Zella, D., Zauli, G.

- (2003) TRAIL promotes the survival and proliferation of primary human vascular endothelial cells by activating the Akt and ERK pathways *Circulation* **107**(17), 2250-2256.
- Seibel, M.M., Smith, D., Dlugi AM, Levesque L. (1989) Perioovulatory follicular fluid hormone levels in spontaneous human cycles *J Clin Endocrinol Metab.* **68**(6), 1073-2007.
- Seli, E., Zeyneloglu, H.B., Senturk, L.M., Bahtiyar, O.M., Olive, D.L., Arici, A. (1998) Basic fibroblast growth factor: peritoneal and follicular fluid levels and its effect on early embryonic development *Fertil Steril.* **69**,1145-1148.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels *Anal. Chem.* **68**, 850–858.
- Shimizu, T., Berisha, B., Schams, D., Miyamoto, A. (2007) Changes in the messenger RNA expressions of the endothelin-1 and angiotensin systems in mature follicles of the superovulated bovine ovary *J Reprod Dev.* **53**(3), 655-662.
- Siegenthaler, W., Blum, H.E.: Klinische Pathophysiologie 9. Aufl. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2006, 369-376.
- Small, J. V., Stradal, T., Vignal, E., Rottner, K. (2002) The lamellipodium: where motility begins *Trends Cell Biol.* **12**, 112–120.
- Smitz, J., Ron-El, R., Tarlatzis, B.C. (1992) The use of gonadotropin releasing agonists for in-vitro fertilization and other assisted procreation techniques. Experience from three centers *Hum Reprod.* **2**, 309-315.
- Sonntag, B., Götte, M., Wülfing, P., Schüring, A.N., Kiesel, L., Greb, R.R. (2005) Metformin alters insulin signaling and viability of human granulosa cells *Fertil Steril.* **84 Suppl 2**, 1173-1179.
- Soto, E., Silavin, S.L., Tureck, R.W., Strauss, J.F. (1984) Stimulation of progesterone synthesis in luteinized human granulosa cells by human chorionic gonadotropin and 8-bromo-adenosine 3',5'-monophosphate: the effect of low- density lipoprotein *J Clin Endocrinol Metab.* **58**, 831-837.
- Stangl, H., Hyatt, M., Hobbs, H.H. (1999) Transport of lipids from High and Low Density Lipoproteins via Scavenger Receptor-BI *J. Biol. Chem.* **274**, 32692-32698.
- Stone, B.A., Greene, J., Vargyas, J.M., Ringler, G.E., Marrs, R.P. Embryo fragmentation as a determinant of blastocyst development in vitro and pregnancy outcomes following embryo transfer *Am J Obstet Gynecol* **192**, 2014–2019.
- Stouffer, R.L., Martinez-Chequer, J.C., Molskness, T.A., Xu, F., Hazzard, T.M. (2001) Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary *Arch Med Res.* **32**, 567-575.

- Sumi, M., Sata, M., Miura, S., Rye, K.A., Toya, N., Kanaoka, Y., Yanaga, K., Ohki, T., Saku, K., Nagai, R. (2007) Reconstituted high-density lipoprotein stimulates differentiation of endothelial progenitor cells and enhances ischemia-induced angiogenesis *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **27(4)**, 813-818.
- Sun, X.T., Ding, Y.T., Yan, X.G., Wu, L.Y., Li, Q., Cheng, N., Qiu, Y.D., Zhang, M.Y. (2004) Angiogenic synergistic effect of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in an in vitro quantitative microcarrier-based three-dimensional fibrin angiogenesis system *World J Gastroenterol.* **10(17)**, 2524-2528.
- Suri, C., Jones, P.F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P.C., Davis, S., Sato, T.N., Yancopoulos, G.D. (1996) Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis *Cell* **87**, 1171-1180.
- Svitkina, T. M., Bulanova, E. A., Chaga, O. Y., Vignjevic, D. M., Kojima, S., Vasiliev, J. M., Borisy, G. G. (2003). Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network *J. Cell Biol.* **160**, 409-421.
- Tamagaki, T., Sawada, S., Imamura, H., Tada, Y., Yamasaki, S., Toratani, A., Sato, T., Komatsu, S., Akamatsu, N., Yamagami, M., Kobayashi, K., Kato, K., Yamamoto, K., Shirai, K., Yamada, K., Higaki, T., Nakagawa, K., Tsuji, H., Nakagawa, M. (1996) Effects of high-density lipoproteins on intracellular pH and proliferation of human vascular endothelial cells *Atherosclerosis* **123**, 73-82.
- Tamanini, C., De Ambrogi, M. (2004) Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum *Reprod Domest. Anim.* **39(4)**, 206-216.
- Tan, W., Palmby, T.R., Gavard, J., Amornphimoltham, P., Zheng, Y., Gutkind, J.S. (2008) An essential role for Rac1 in endothelial cell function and vascular development *FASEB J.* **22(6)**, 1829-1838.
- Taylor, P.D., Wilson, H., Hillier, S.G., Wiegand, S.J., Fraser, H.M. (2007) Effects of inhibition of vascular endothelial growth factor at time of selection on follicular angiogenesis, expansion, development and atresia in the marmoset *Mol Hum Reprod.* **10**, 729-736.
- Terman, B.I., Carrion, M.E., Kovacs, E., Rasmussen, B.A., Eddy, R.L., Show, T.B. (1991) Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase *Oncogene* **6**, 1677-1683.
- Thérien, I., Bousquet, D., Manjunath, P. (2001) Effect of seminal phospholipid-binding proteins and follicular fluid on bovine sperm capacitation *Biol Reprod.* **65(1)**, 41-51.

- Thurston, G., Rudge, J.S., Ioffe, E., Zhou, H., Ross, L., Croll, S.D., Glazer, N., Holash, J., McDonald, D.M., Yancopoulos, G.D. (2000) Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage *Nat Med.* **6**, 460-463.
- Tilly, J.L., Billig, H., Kowalski, K.I., Hasuhe, A.J. (1992) Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism *Mol Endocrinol.* **6(11)**, 1942-1950.
- Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J.C., Abraham, J.A. (1991) The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing *J Biol Chem.* **266(18)**, 11947-11954.
- Tölle, M., Levkau, B., Kleuser, B., van der Giet, M. (2007) Sphingosine 1-phosphate and FTY720 as anti-atherosclerotic lipid compounds *Eur J Clin Invest* **37(3)**, 171-179.
- Tropea, A., Miceli, F., Minici, F., Tiberi, F., Orlando, M., Vangale, M.F., Romani, F., Catino, S., Mancuso, S., Navarra, P., Lanzone, A., Apa, R. (2006) Regulation of vascular endothelial growth factor synthesis and release by human luteal cells in vitro *J Clin Endocrinol Metab.* **91(6)**, 2303-2309.
- Tureck, R.W., Wilburn, A.B., Gwynne, J.T., Paavola, L.G., Strauss, J.F.D. (1983) The role of lipoproteins in steroidogenesis by human luteinized granulosa cells in culture *J Steroid Biochem.* **19**, 1033-1038.
- Urs, A.N., Dammer, E., Kelly, S., Wang, E., Merrill, A.H. Jr., Sewer, M.B. (2007) Steroidogenic factor-1 is a sphingolipid binding protein *Mol Cell Endocrinol.* **265-266**, 174-178.
- Valkenburg, O., Steegers-Theunissen, R.P., Smedts, H.P., Dallinga-Thie, G.M., Fauser, B.C., Westerveld, E.H., Laven, J.S. (2008) A more atherogenic serum lipoprotein profile is present in women with polycystic ovary syndrome: a case-control study *J Clin Endocrinol Metab.* **93(2)**, 470-476.
- Van den Driesche, S.M., Neyers, M., Gay, E.M., Thong, K.J., Duncan, W.C. (2008) HCG up regulates hypoxia inducible factor -1 alpha in luteinized granulosa cells: implications for the hormonal regulation of vascular endothelial growth factor A in the human corpus luteum *Mol Hum Reprod.* **14(8)**, 455-464.
- Van Nieuw Amerongen, G.P., van Hinsbergh, V.W. (2001) Cytoskeletal effects of rho-like small guanine nucleotide-binding proteins in the vascular system *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **21**, 300-311.

- Veeravagu, A., Hsu, A.R., Cai, W., Hou, L.C., Tse, V.C., Chen, X. (2007) Vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor inhibitors as anti-angiogenic agents in cancer therapy *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* **2(1)**, 59-71.
- Veikkola, T., Alitalo, K. (1999) VEGFs, receptors and angiogenesis *Semin Cancer Biol.* **9(3)**, 211-220.
- Vekshina, M. (2004) The role of sphingosine and its derivatives in the regulation of Ca²⁺ homeostasis *Membr Cell Biol* **14**, 429-461.
- Vernon, R.B., Lara, S.L., Drake, C.J., Iruela-Arispe, M.L., Angello, J.C., Little, C.D., Wight, T.N., Sage, E.H. (1995) Organized type I collagen influences endothelial patterns during "spontaneous angiogenesis in vitro": planar cultures as models of vascular development *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* **31(2)**, 120-131.
- Volpe, A., Coukos, G., Uccelli, E., Droghini, F., Adamo, R., Artini, P.G. (1991) Follicular fluid lipoproteins in preovulatory period and their relationship with follicular maturation and progesterone production by human granulosa-luteal cells in vivo and in vitro *J Endocrinol Invest.* **14(9)**, 737-742.
- von Eckardstein, A., Hersberger, M., Rohrer, L. (2005) Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* **8(2)**, 147-152.
- von Otte, S., Paletta, J.R., Burghus, B., Rickert-Föhring, M., Nordhoff, V., Kiesel, L., Greb, R.R. (2003) Angiogenic constituents and proliferative activity of follicular fluid on endothelial cells *Hum. Reprod.* **18**, 125-126.
- Voznesenskaia, TIu, Blashkiv, T.V., Portnichenko, A.G. (2001) Effect of cumulus and granulosa cells on meiosis resumption in murine oocytes in vitro *Tsitologiya.* **43(3)**, 250-253.
- Waeber, C., Blondeau, N., Salomone, S. (2004) Vascular sphingosine-1-phosphate S1P1 and S1P3 receptors *Drug News Perspect.* **17(6)**, 365-382.
- Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., Heldin, C.H. (1994) Different signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptors for vascular endothelial cell growth factor *J Biol Chem* **269**, 26988-26995.
- Wang, W., Graeler, M.H., Goetzl, E.J. (2005) Type 4 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor (S1P4) transduces S1P effects on T cell proliferation and cytokine secretion without signaling migration *FASEB J.* **19**, 1731-1733.
- Wang, L., Lee, J.F., Lin, C.Y., Lee, M.J. (2008) Rho GTPases mediated integrin alpha v beta 3 activation in sphingosine-1-phosphate stimulated chemotaxis of endothelial cells

Histochem Cell Biol. **129(5)**, 579-588.

Wang, Y.D., Hu, Y., Zhang, L., Sun, C.Y. (2008) Brain derived neurotrophic factor induces endothelial cells angiogenesis through AKT and ERK1/2 signal pathway *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* **16(1)**, 175-80.

Wiener-Megnazi, Z., Vardi, L., Lissak, A., Shnizer, S., Zeev Reznick, A., Ishai, D., Lahav-Baratz, S., Shiloh, H., Koifman, M., Dirnfeld, M. (2004) Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermochemiluminescence assay correlate with outcome parameters in in vitro fertilization *Fertil Steril.* **82**,1171-1176.

Woo, M.M., Tai, C.J., Kang, S.K., Nathwani, P.S., Pang, S.F., Leung, P.C. (2001) Direct action of melatonin in human granulosa cells *J Clin Endocrinol Metab* **86(10)**, 4789-4797.

Wu, Q., Sucheta, S., Azhar, S., Menon, K.M.J. (2003) Lipoprotein enhancement of ovarian Theca-interstitial cell seroidogenesis: Relative contribution of Scavenger Receptor Class B (Type I) and Adenosine 5'-Triphosphate- Binding Cassette (Type A1) Transporter in High-Density Lipoprotein-Cholesterol Transport and androgen synthesis *Endocrinology* **144**, 2437-2445.

Yamashita, H., Kamada, D., Shirasuna, K., Matsui, M., Shimizu, T., Kida, K., Berisha, B., Schams, D., Miyamoto, A. (2008) Effect of local neutralization of basic fibroblast growth factor or vascular endothelial growth factor by a specific antibody on the development of the corpus luteum in the cow *Mol Reprod Dev.* **75(9)**, 1449-1456.

Yan, G., Chen, S., You, B., Sun, J. (2008) Activation of sphingosine kinase-1 mediates induction of endothelial cell proliferation and angiogenesis by epoxyeicosatrienoic acids *Cardiovasc Res.* **78(2)**, 308-314.

Yan, Z., Weich, H.A., Bernart, W., Breckwoldt, M., Neulen, J. (1993) Vascular endothelial growth factor (VEGF) messenger ribonucleic acid (mRNA) expression in luteinized human granulosa cells in vitro *J Clin Endocrinol Metabol.* **77**, 1723-1725.

Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., Holash, J. (2000) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation *Nature* **407**, 242-248.

Yatomi, Y., Igarashi, Y., Yang, L., Hisano, N., Qi, R., Asazuma, N., Satoh, K., Ozaki, Y., Kume, S. (1997) Sphingosine-1-phosphate, a bioactive lysophospholipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. *J Biochem* **121**, 969-973.

Yoshida, A., Anand-Apte, B., Zetter, B.R. (1996) Differential endothelial migration and proliferation to basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor *Growth Factors* **13(1-2)**, 57-64.

Zain, M.M., Norman, R.J. (2008) Impact of obesity on female fertility and fertility

treatment *Womens Health (Lond Engl)* **4(2)**, 183-194.

Zetter, B. (1980) Migration of capillary endothelial cells is stimulated by tumour-derived factors *Nature* **285(5759)**, 41-43.

Zygmunt, M., Herr, F., Münstedt, K., Lang, U., Liang, O.D. (2003) Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* **110 Suppl 1**, 10-18.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
bp	Basenpaare
DEAE-Sepharose	Diethylaminoethyl-Sepharose
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ELISA	Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-thansulfonsäure
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatografie
HRP	Horse Raddish Peroxidase
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
MALDI TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight
pH	pondus Hydrogenii, Stärke des Wasserstoffs
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
U	Units
ü. N.	über Nacht

7.2. Quellenverzeichnis

Abb. 1: Kinderwunsch-Info Ferring Präsentation zur Patienteninformationsveranstaltung

Abb. 2: Aus: Breckwoldt, M./Neumann, F./Bräuer H. (Hrsg): Exempla Endocrinologica.
Band 2. Berlin: Schering AG, 1991.

Abb. 3: Aus: Siegenthaler, W./Blum, H.E.: Klinische Pathophysiologie 9. Aufl. Stuttgart:
Georg Thieme Verlag, 2006.

Abb. 4: http://www.solunetti.fi/fi/histologia/graafin_follikkeli/1/Hämatoxilin-Eosin
Färbung.

Abb. 5: [www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/biochemie/endokrin/
popup_endokrin/ovarzyklus.php](http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/biochemie/endokrin/popup_endokrin/ovarzyklus.php)

Primer 3 Software: (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3> -

SWISS Prot: <http://www.expasy.ch/sprot/>

S1P-Rezeptor Genvarianten

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&c=Gene&l=EDG1>

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&c=gene&a=fiche
&l=EDG5andDNMT1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&c=gene&a=fiche&l=EDG5andDNMT1)

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&c=gene&q=EDG
3andDNMT1&a=fgene&h=1&vr=v67a](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&c=gene&q=EDG3andDNMT1&a=fgene&h=1&vr=v67a)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&term=EDG8>

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Klaus Diedrich, Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, für die Überlassung des Promotionsthemas und die Bereitstellung der technischen und räumlichen Möglichkeiten seiner Forschungslabore, ohne die ein Anfertigen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Sören von Otte, der mir stets motivierend und beratend zur Seite stand, für die tolle Betreuung der Arbeit und die vielen konstruktiven Diskussionen, die maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Herrn PD Dr. Kalies und Prof. Dr. Hartmann vom Institut für Biologie, die es mir ermöglicht haben, an der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät zu promovieren und für die Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Jerzy Roch Nofer vom Institut für Klinische Medizin und Laboratoriumsmedizin der Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster danke ich für die unermüdliche FHDL-Isolierung, sowie der biochemischen Charakterisierung von FHDL, die S1P Messungen und die vielen konstruktiven Gespräche und Anregungen.

Herrn Dr. Jürgen Paletta vom Institut für Trauma-, Hand-, und Wiederherstellungschirurgie der Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster danke ich für die Aufreinigung der Follikelflüssigkeit.

Den Mitarbeitern der Molekularen Medizin unter der Leitung von Prof. Dr. Sczakiel danke ich für die Bereitstellung des Fluorimeters.

Ein herzliches Dankeschön gilt allen Mitarbeitern der Forschungslabore der Frauenklinik, besonders Frau Christiane Schulz.

Frau PD. Dr. Christina Zechel und Frau Edith Pawlak von der Klinik für Neurochirurgie danke ich für die freundliche und hilfsbereite Unterstützung.

Meinen Verwandten danke ich für die Geduld, das Verständnis und die Unterstützung, die sie mir in der Zeit entgegen gebracht haben.

Abschließend gilt mein besonderer Dank Markus Seifert, der mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat und durch seine Geduld, sein Verständnis und seine Liebe, die wichtigste Stütze in der Promotionszeit gewesen ist.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Steffi Becker
Geburtsdatum: 30.06.1976
Geburtsort: Rostock
Familienstand: ledig



Schulbildung

Sept. 1983-Aug.1990 Polytechnische Oberschule Groß Wokern
Sept. 1995-Juli 1990 Abitur am Gymnasium Teterow

Ausbildung

Okt.1995-Juli 2001 Diplomstudium im Fach Biologie, Universität Rostock
Ausbildungsschwerpunkte: Mikrobiologie, Immunologie,
Molekularbiologie
Okt. 2000-Juli 2001 Diplomarbeit zum Thema „Untersuchungen zur
Calciummobilisation und Apoptoseinduktion in
Mausthymozyten durch Galectin-1“ am Institut für
Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
26. Juli 2001 Diplom der Biologie (Gesamtnote: gut)

Beruflicher Werdegang

Okt. 2001- Jan. 2002 Forschungsstipendium an der Klinik für Anästhesiologie,
Charité, Berlin
Thema: „Calciummobilisation von Neuronen“
Mai 2002- Febr. 2003 wiss. Mitarbeiter am Institut für Pharmakologie und
Toxikologie, Charité, Berlin,
Thema: „Differenzierung von embryonalen
Mausstammzellen zu neuronalen Vorläuferzellen“
März 2003-März 2005 wiss. Mitarbeiter an der Klinik für Hepatologie und
Gastroenterologie, Charité, Berlin

Thema: „Regulation des Apolipoproteins A-V bei
Inflammation“

seit April 2005

wiss. Mitarbeiter und naturwissenschaftliche Doktorandin an
der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des
Universitätsklinikums Schleswig Holstein, Campus Lübeck
wiss. Betreuung der Themen „Vitamin D- und
Prostaglandinstoffwechsel in gynäkologischen Tumoren“ und
„Follikuläres HDL und Sphingosin 1-Phosphat als
Mediatoren der Corpus luteum Formation“

Publikationen, Drittmittel

Becker, S., Nofer, J.R., Diedrich, K., von Otte, S. Follicular fluid High density lipoprotein (FHDL) and Sphingosin 1-phosphate (S1P) act as novel mediators of human granulosa lutein cell migration and contribute to corpus luteum formation. (in preparation)

Becker, S., Cordes, T., Diesing, D., Diedrich, K., Friedrich, M. (2007) Expression of 25 hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in human endometrial tissue *J Steroid Biochem Mol Biol.* **103(3-5)**, 771-775.

Becker, S., Schomburg, L., Renko, K., Tolle, M., van der Giet, M., Tietge, U.J. (2006) Altered apolipoprotein A-V expression during the acute phase response is independent of plasma triglyceride levels in mice and humans *Biochem Biophys Res Commun.* **339(3)**, 833-839.

Gautier, T., **Becker, S.**, Drouineaud, V., Ménétrier, F., Nofer, J.R., von Otte, S., Masson, D., Tietge, U.J.F. (2009) Human granulosa cells secrete apoB100-containing lipoproteins *J Clin Endocrinol Metab.* (submitted).

von Otte, S., Paletta, J.R., **Becker, S.**, König, S., Fobker, M., Greb, R.R., Kiesel, L., Assmann, G., Diedrich, K., Nofer, J.R. (2006) Follicular Fluid High Density-Lipoprotein-associated Sphingosine 1-phosphate is a novel mediator of ovarian angiogenesis *J Biol Chem.* **281(9)**, 5398-5405.

Cordes, T., Till, M., **Becker, S.**, Diedrich, K., Friedrich, M., Fischer, D. (2009) Expression of vitamin D-24 hydroxylase (cyp24) in benign and malignant breast tissues and cell lines. (*Anticancer Research*, accepted)

Fischer, D., Cordes, T., **Becker, S.**, Dütting, M., Diedrich, K., Friedrich, M., Thill, M. (2009) Detection of splice variants and examination of 1 α -OHASE-expression in malignant and benign ovarian cell lines and tissues (*Anticancer Research*, accepted)

Thill, M., **Becker, S.**, Fischer, D., Cordes, T., Dittmer, C., Diedrich, D., Friedrich, M. (2009) Prostaglandin metabolising enzymes in correlation with vitamin D receptor in benign and malignant breast cell lines. (*AnticancerResearch*, accepted)

Fischer, D., Seifert, M., **Becker, S.**, Ludders, D., Cordes, T., Reichrath, J., Friedrich, M. (2007) 25-Hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase splice variants in breast cell lines MCF-7 and MCF-10 *Cancer Genomics Proteomics.* **4(4)**, 295-300.

Cordes, T., Diesing, D., **Becker, S.**, Fischer, D., Diedrich, K., Friedrich, M. (2007) Expression of splice variants of 1alpha-hydroxylase in mcf-7 breast cancer cells *J Steroid Biochem Mol Biol.* **103(3-5)**, 326-329.

Cordes, T., Diesing, D., **Becker, S.**, Diedrich, K., Reichrath, J., Friedrich, M. (2006) Modulation of MAPK, ERK1 and ERK2 in VDR-positive and -negative breast cancer cell lines *Anticancer Res.* **26(4A)**, 2749-2753.

Friedrich, M., Diesing, D., Cordes, T., Fischer, D., **Becker, S.**, Chen, T.C., Flanagan, J.N., Tangpricha, V., Gherson, I., Holick, M.F., Reichrath, J. (2006) Analysis of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in normal and malignant breast tissue *Anticancer Res.* **26(4A)**, 2615-2620.

Eingeworbene Drittmittel

Juniorantrag zum Thema „Regulation des autochthonen Lipoproteinmetabolismus in Granulosazellen und seine Bedeutung für das Polyzystische Ovarsyndrom“, universitäre Forschungsförderung 2007, 18 000 EUR

Preise

Vortragspreis zum Thema „Follikuläres HDL und Sphingosin 1-Phosphat als neue Mediatoren der Corpus luteum Formation“ der Firma Serono auf dem Workshop für junge Reproduktionsmediziner der DGGEF, Oktober 2005 in Düsseldorf.