

Meinen Eltern  
und  
meinem Bruder



**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für  
Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität  
München**

**Kaliumkanäle im menschlichen Ovar und in humanen  
Granulosalutealzellen: Charakterisierung des ATP-abhängigen  
Kaliumkanals**

Johanna Sophia Richter  
aus  
Freiburg im Breisgau

2006

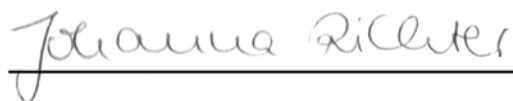
## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. A. Mayerhofer betreut und von Herrn Prof. Dr. M. Biel vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

## Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 17.09.2006

A handwritten signature in cursive script that reads "Johanna Richter". The signature is written in dark ink and is positioned above a solid horizontal line.

Johanna Richter

Dissertation eingereicht am:	21.09.2006
1. Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. A. Mayerhofer
2. Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. M. Biel
Mündliche Prüfung am:	29.11.2006

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1 Allgemein</b> .....	<b>10</b>
1.1.1 Ovarfunktion.....	11
1.1.2 Aufbau des Ovars .....	11
1.1.3 Ovarieller Zyklus .....	11
1.1.4 Lutealphase, Corpus luteum (CL, Gelbkörper) und Luteolyse .....	13
1.1.5 Hypothalamus/Hypophyse .....	14
1.1.6 Synthese von Steroidhormonen.....	14
<b>1.2 Polyzystisches Ovar-Syndrom</b> .....	<b>16</b>
<b>1.3 Zellmodell</b> .....	<b>17</b>
<b>1.4 ATP-abhängige Kaliumkanäle (<math>K_{ATP}</math>)</b> .....	<b>17</b>
<b>1.5 Struktur und Funktion von <math>K_{ATP}</math>-Kanälen</b> .....	<b>18</b>
<b>1.6 Wichtige Beispiele von <math>K_{ATP}</math>-Kanälen</b> .....	<b>22</b>
<b>1.7 <math>K_{ATP}</math>-Öffner und -Inhibitoren</b> .....	<b>23</b>
<b>1.8 Ionenkanäle im Ovar</b> .....	<b>25</b>
<b>1.9 Zielsetzung</b> .....	<b>26</b>
<b>2. Material</b> .....	<b>28</b>
<b>2.1 Herstellerverzeichnis</b> .....	<b>28</b>
<b>2.2 Verwendete Lösungen</b> .....	<b>29</b>
<b>3. Methoden</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1 Zellkultur</b> .....	<b>31</b>
3.1.1 Vorbereitung der Kulturschalen.....	31
3.1.2 Präparation/Isolierung.....	31
3.1.3 Behandlung der Zellen mit Testsubstanzen.....	32
<b>3.2 Molekularbiologie</b> .....	<b>33</b>
3.2.1 RNA-Extraktion aus kultivierten humanen GZ .....	33
3.2.2 Reverse Transkription (RT).....	33
3.2.2.1 Reverse Transkription mit Oligo-dT <sub>15</sub> -Primern .....	33
3.2.2.2 Reverse Transkription mit Hexamer-Primern .....	34

---

3.2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	35
3.2.3	DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	38
<b>3.3</b>	<b>Proteingewinnung/SDS-PAGE/Western Blot .....</b>	<b>39</b>
<b>3.4</b>	<b>Immunhistochemie.....</b>	<b>41</b>
<b>3.5</b>	<b>Immunzytochemie/Immunfluoreszenz.....</b>	<b>43</b>
<b>3.6</b>	<b>Immungoldfärbung und Elektronenmikroskopie.....</b>	<b>44</b>
<b>3.7</b>	<b>Elektronenmikroskopie und Zellmorphologie .....</b>	<b>45</b>
<b>3.8</b>	<b>cDNA-Array .....</b>	<b>46</b>
<b>3.9</b>	<b>Steroidhormonbestimmung .....</b>	<b>46</b>
3.9.1	Progesteron.....	46
3.9.2	Testosteron und Östradiol.....	47
3.9.3	Bestimmung der Testosteronumsetzung durch das Enzym Aromatase .....	48
<b>3.10</b>	<b>Proliferationsassay .....</b>	<b>48</b>
<b>3.11</b>	<b>Färbung von Lipiden mit dem Farbstoff Nilrot .....</b>	<b>48</b>
<b>3.12</b>	<b>Fluoreszenzmikroskopische Messung des Membranpotentials .....</b>	<b>49</b>
<b>3.13</b>	<b>Fluoreszenzmikroskopische Messung des mitochondrialen     Membranpotentials .....</b>	<b>50</b>
<b>3.14</b>	<b>Elektrophysiologie .....</b>	<b>51</b>
3.14.1	Aufbau des Messplatzes .....	51
3.14.2	Perfusionssystem.....	51
3.14.3	Elektroden .....	52
3.14.4	Patch-Pipetten.....	52
3.14.5	Messung .....	53
3.14.6	Messprotokolle .....	54
3.14.7	Software und Auswertung .....	55
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>56</b>
<b>4.1</b>	<b>Molekularbiologische Charakterisierung .....</b>	<b>56</b>
4.1.1	Identifikation des $K_{ATP}$ in humanen GZ und im humanen Ovar .....	56
4.1.2	Identifikation des $K_{ATP}$ im CL und Ovar des Rhesusaffen .....	58

---

4.1.3	Nachweis und Lokalisation der $K_{ATP}$ -Untereinheiten auf Proteinebene.....	60
4.1.3.1	Western Blot.....	60
4.1.3.2	Immunzytochemie.....	60
4.1.3.3	Immunhistochemie.....	62
4.1.4	Identifikation des $K_{ATP}$ in GZ von Patientinnen mit PCOS.....	65
<b>4.2</b>	<b>Untersuchung einer möglichen intrazellulären Lokalisation des <math>K_{ATP}</math>.....</b>	<b>65</b>
4.2.1	Immungoldfärbungen.....	65
4.2.2	Funktionelle Untersuchungen einer möglichen intrazellulären Lokalisation des $K_{ATP}$ .....	66
<b>4.3</b>	<b>Funktioneller Nachweis.....</b>	<b>67</b>
4.3.1	Charakterisierung des $K_{ATP}$ durch Einzelkanalmessungen.....	67
4.3.2	Einfluss des $K_{ATP}$ auf das Membranpotential.....	69
4.3.3	Fluoreszenzmikroskopische Messungen von Membranpotentialänderungen in humanen GZ.....	70
<b>4.4</b>	<b>Physiologische Rolle des <math>K_{ATP}</math> in humanen GZ.....</b>	<b>71</b>
4.4.1	Beeinflussung der Genexpression.....	71
4.4.2	Beeinflussung der Progesteronproduktion humaner GZ.....	75
4.4.3	Prüfung auf Toxizität.....	75
4.4.4	Weitere Untersuchung möglicher Mechanismen des Einflusses von Glibenclamid auf die hCG-induzierte Progesteronproduktion...	77
4.4.4.1	Mögliche Beeinflussung wichtiger Enzyme in der Progesteronsynthese.....	77
4.4.4.2	Mögliche Beeinflussung der Steroidspeicherung und der Zellmorphologie.....	79
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>81</b>
<b>5.1</b>	<b>Molekulare Identifikation der Kir 6.1- und der SUR 2B-Untereinheit im humanen Ovar und in humanen GZ sowie im Rhesusaffen.....</b>	<b>81</b>
<b>5.2</b>	<b>Lokalisation des <math>K_{ATP}</math> in der Plasmamembran humaner GZ.....</b>	<b>84</b>
<b>5.3</b>	<b>Charakterisierung des <math>K_{ATP}</math> in humanen GZ.....</b>	<b>85</b>
5.3.1	Charakterisierung von $K_{ATP}$ -Einzelkanälen in humanen GZ.....	85

---

5.3.2	ADP/ATP-Abhängigkeit.....	85
<b>5.4</b>	<b>Beteiligung des <math>K_{ATP}</math> an der Regulation des Membranpotentials in humanen GZ.....</b>	<b>86</b>
<b>5.5</b>	<b>Einfluss der <math>K_{ATP}</math>-Kanalaktivität auf die Zellfunktion und die zelluläre Morphologie .....</b>	<b>88</b>
5.5.1	Östrogen .....	88
5.5.2	Progesteron.....	89
5.5.3	Zusammenhang zwischen Membranpotential und Steroidhormon- produktion in GZ?.....	91
5.5.4	Mechanistische Untersuchungen der Rolle des $K_{ATP}$ bei hCG- induzierter Progesteronproduktion.....	92
<b>5.6</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>94</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>96</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>98</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>107</b>
8.1	Zeitschriftenartikel .....	107
8.2	Auszeichnungen.....	107
8.3	Kongressbeiträge.....	107
8.4	Danksagung.....	108
8.5	Lebenslauf .....	109



---

## Abkürzungsverzeichnis

3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase
A <sub>x</sub>	Absorption einer Lösung bei einer Wellenlänge von x nm
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
ATP	Adenosintriphosphat
BK <sub>Ca</sub>	Ca <sup>2+</sup> -Activated Large Conductance Potassium Channel
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCCP	Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon
CL	Corpus luteum (Gelbkörper)
cDNA	complementary DNA
CYP	Cytochrom P450 19 A 1 (Aromatase)
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat (Diethyldicarbonat)
DiBAC <sub>4</sub> (3)	Bis-(1,3-dibutylbarbitursäure)-trimethinoxonol
DME	Dulbecco's Modified Eagle's
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol (1,4-Dimercapto-2,3-butandiol)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZ	Extrazellulär
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin-Releasinghormon
GZ	Granulosazellen
hCG	humanes Choriongonadotropin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure

I	Strom
IU	International Units (Internationale Einheiten)
I/V-	Strom-Spannungs-(Kennlinie)
IVF	In-vitro-Fertilisation
IZ	Intrazellulär
K <sub>ATP</sub>	ATP-abhängiger Kaliumkanal
K <sub>ir</sub>	Potassium Inward Rectifier
KPBS	Potassium Phosphate Buffered Solution
K <sub>v</sub>	spannungsabhängiger Kaliumkanal
LDL	Low Density Lipoprotein
LH	Luteinisierendes Hormon
M	Molar
MMLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
M <sub>r</sub>	relative molare Masse
mRNA	messenger RNA
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)2H-tetrazol
NPE	Natriumchlorid/PIPES/EDTA
NDP	Nukleosiddiphosphat
NTP	Nukleosidtriphosphat
P	Wahrscheinlichkeit für einen irrtümlich gefundenen Unterschied zweier Beobachtungsgruppen für die vorliegende Stichprobe
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Solution
PCOS	Polycystic Ovary Syndrome (Polyzystisches Ovar-Syndrom)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
RNA	Ribonucleinsäure
R.T.	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
pS	picoSiemens
SCC	Side Chain Cleavage Enzyme (Cholesterol-Monooxygenase)
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)

SDS	Natrium[Sodium]dodecylsulfat
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory Protein
SUR	Sulfonylurea Receptor (Sulfonylharnstoffrezeptor)
TBE	Tris/Borat/EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U/Min.	Umdrehungen pro Minute
VIP	Vasoaktives Intestinales Polypeptid

## 1. Einleitung

### 1.1 Allgemein

Bei 18-20 % der Partnerschaften in Deutschland kommt ungewollte Kinderlosigkeit vor. Die Ursachen dafür liegen in etwa gleich häufig bei Mann und Frau, sind aber im Einzelnen in vielen Fällen unbekannt. Um Fertilitätsstörungen bei Frauen behandeln zu können, müssen daher die einzelnen Vorgänge im weiblichen Reproduktionszyklus genauer verstanden werden. Eine zentrale Rolle spielt hierbei das Ovar, das die weibliche Gamete, die Eizelle, reifen lässt und in endokrinen Zellen Steroidhormone produziert, deren Hauptaufgabe die Vorbereitung der Gebärmutterschleimhaut auf den Embryo ist. Eine wichtige Funktion in der Steroidhormonproduktion kommt dem Corpus luteum (CL, Gelbkörper) zu. Das CL ist ein Organ, das nach der Freisetzung der Eizelle aufgebaut wird und kurzzeitig metabolisch hoch aktiv ist, um dann wieder abgebaut zu werden (Luteolyse). Wichtig im CL sind die Granulosalutealzellen, die hauptsächlich Progesteron aber auch Östradiol produzieren. Fehlfunktionen dieser Zellen können daher eventuell die Ursache für Unregelmäßigkeiten in der Funktion des Ovars und damit für Infertilität sein. Daher ist es besonders wichtig, diese Zellen und ihre endokrine Funktion genauer zu verstehen.

In verschiedenen Spezies sind Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Ionenkanälen und der wichtigsten Funktion der Granulosazellen, der Steroidhormonsynthese, gezeigt worden (Kusaka et al., 1993; Li et al., 2003; Manikkam et al., 2002; Mason et al., 2002). Vor Kurzem wurde die mRNA der Untereinheiten eines ATP-abhängigen Kaliumkanals ( $K_{ATP}$ ) in endokrinen Zellen des Ovars der Ratte nachgewiesen (Chien et al., 1999).

Hauptsächlich ist der  $K_{ATP}$  aus anderen endokrinen Zellen, nämlich den Beta-Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas, bekannt, wo er an der Insulinsekretion beteiligt ist. Eine Hemmung des  $K_{ATP}$  durch orale Antidiabetika wird in der Therapie des Diabetes mellitus Typ II ausgenutzt.

Da es sich beim  $K_{ATP}$  um einen Ionenkanal handelt, der durch den metabolischen Zustand der Zelle reguliert wird und das CL ein metabolisch hoch aktives Organ ist, stellt sich die Frage, ob der  $K_{ATP}$  auch in diesem endokrinen Gewebe des Menschen von Bedeutung sein könnte.

Im Folgenden sollen die erwähnten Prozesse im Ovar genauer betrachtet werden.

### **1.1.1 Ovarfunktion**

Die Aufgabe des Ovars als endokrines Organ ist, wie bereits erwähnt, die Synthese von Steroidhormonen (Östradiol, Progesteron und Androgene), aber auch von Peptidhormonen (Relaxin, Inhibin u.a.) (Richards und Hedin, 1988). Neben seiner endokrinen Funktion ist das Ovar für die Reifung und Freisetzung der Oozyten (Eizellen) zuständig.

### **1.1.2 Aufbau des Ovars**

Bei den paarig angeordneten Ovarien handelt es sich um plattovale, pflaumengroße Organe, die im Bauchraum beidseits am jeweils oberen seitlichen Rand des kleinen Beckens liegen. Sie sind mit dem Mesovarium (Bauchfellduplikatur) an der Dorsalseite des Ligamentum latum uteri befestigt.

Das Ovar besteht aus der äußeren Rinde, der inneren Medulla und dem Hilum, welcher als Eintrittspunkt für Nerven und Blutgefäße dient und den Übergang zum Mesovarium bildet. Die äußere Rinde wird von einem einschichtigen Epithel umgeben. Dort befinden sich Follikel, die in ruhende (präantral), wachsende sowie atretische eingeteilt werden. Präantrale und antrale Follikel bestehen aus einer Eizelle und dem sie umgebenden Follikelepithel. In den Follikeln umgeben die Granulosazellen (GZ) direkt die Eizelle. Den GZ liegt nach außen hin die Basallamina auf, welche sie von den umgebenden Thekazellen trennt. Die Follikel sind in das Stroma eingebettet, das sich aus unterstützendem Bindegewebe, interstitiellen sekretorischen Zellen und neurovaskulären Elementen zusammensetzt. Die Medulla besteht aus einer Mischung verschiedener Zellen.

### **1.1.3 Ovarieller Zyklus**

Zunächst kommt es im Ovar unabhängig vom Einfluss des Follikel-stimulierenden Hormons (FSH) und des Luteinisierenden Hormons (LH) aus der großen Zahl primärer Follikel zur selektiven Weiterentwicklung einiger Primordialfollikel. Die Auslöser dieser Entwicklung sind bislang unbekannt. Die Oozyten sind zunächst von einer Schicht flacher Epithelzellen umgeben, die durch die Basallamina vom umgebenden Gewebe abgegrenzt sind und sich später zu den GZ weiterentwickeln. Anschließend kommt es unter dem Einfluss von FSH zur Reifung mehrerer Follikel, die durch die Aktivierung des Enzyms Aromatase

(CYP 19 A 1) Östrogene, insbesondere Östradiol, produzieren. Durch die Östrogenproduktion kommt es zur vermehrten Ausbildung von FSH-Rezeptoren auf der Oberfläche der GZ. Die Bindung von FSH an diese Rezeptoren fördert wiederum die Follikelreifung. Im Anschluss an dieses Stadium nehmen die flachen Zellen eine kubische Form an, teilen sich und bilden nun mehrere Schichten um die Oozyte herum. Der Follikel wird nun zum Primärfollikel. Die Oozyte sezerniert eine muköse, glykoproteinhaltige Substanz, die eine trennende Schicht (Zona pellucida) zwischen GZ und Oozyte bildet. Daraufhin verändern sich die Zellen aus dem Stroma, die direkt neben der Basallamina liegen und bilden follikuläre Thekazellen, die konzentrisch um die Granulosazellen herum angeordnet sind. Dabei unterscheiden sich die Thekazellen der Theca interna, die direkt auf der Basallamina liegen und endokrine Funktion annehmen, und der Theca externa, die bindegewebigen Charakter haben und nicht direkt auf der Basallamina liegen. Zwischen den GZ bildet sich zunehmend ein Raum (Antrum), der mit einer Flüssigkeit gefüllt ist, die Steroide und lokale Wachstumsfaktoren enthält. Der antrale Follikel entsteht, wenn Granulosazellen FSH-Rezeptoren ausgebildet haben und FSH, das von der Hypophyse bereitgestellt wird, binden. Der Follikel mit den meisten FSH-Rezeptoren entwickelt sich nun weiter zum Graaf'schen Follikel (Abbildung 1.1) und unterdrückt durch die Ausschüttung von Östrogenen und Inhibin, einem Glykoprotein, das die hypophysäre FSH-Produktion hemmt, die Weiterbildung der konkurrierenden Follikel. Wenn die Follikelreifung abgeschlossen ist, nimmt die Östrogenkonzentration stark zu, was die Hypophyse dazu veranlasst, schlagartig große Mengen an LH abzugeben. Dieser Anstieg in der Mitte des Zyklus löst die Ovulation aus. LH, das in der Zyklusmitte seine maximale Ausschüttung erreicht, führt zur Bildung des CL, das in der zweiten Zyklushälfte für die Progesteronproduktion verantwortlich ist. Der Östradiolspiegel fällt und durch negative Rückkopplung sinken die LH- und FSH-Werte wieder auf das Ausgangsniveau ab (Abbildung 1.2).

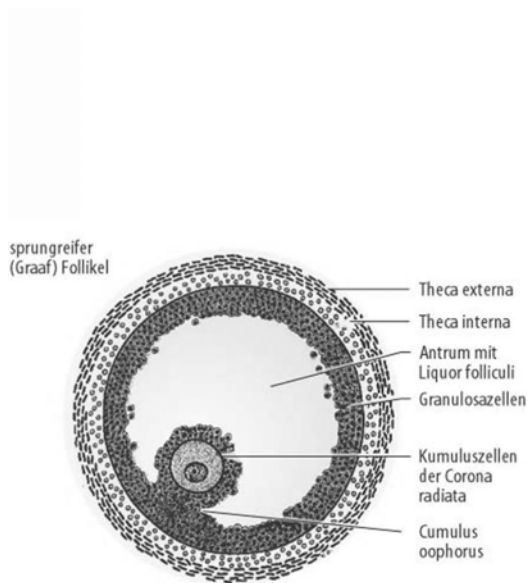


Abbildung 1.1: Schema eines antralen Follikels, modifiziert nach Junqueira et al., 2004.

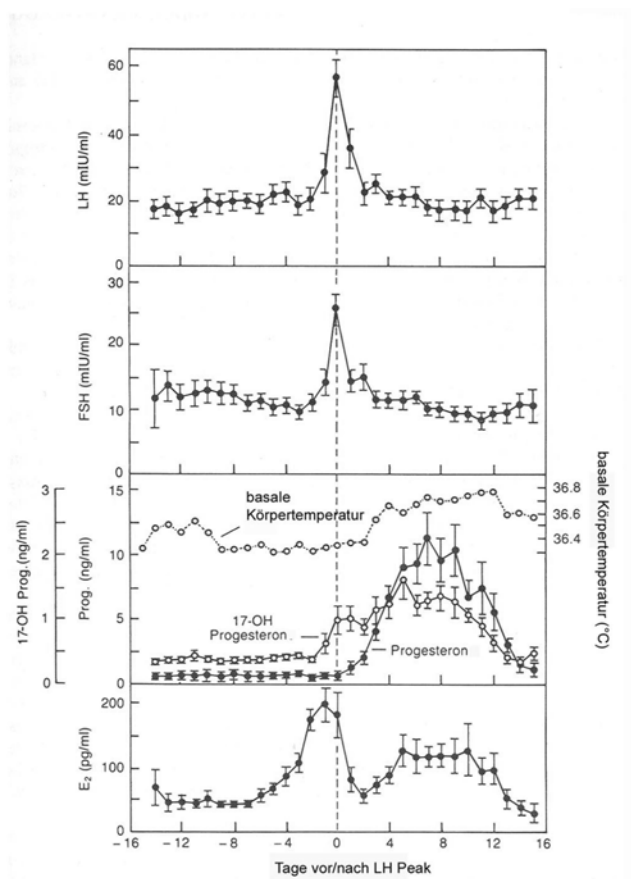


Abbildung 1.2: Plasmaspiegel von LH, FSH, Östradiol ( $E_2$ ), Progesteron und  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron während eines normalen Zyklus. Außerdem ist die basale Körpertemperatur angegeben; modifiziert nach Griffin und Ojeda, 2004.

#### 1.1.4 Lutealphase, Corpus luteum (CL, Gelbkörper) und Luteolyse

Nach der Ovulation wird der Follikel zum CL umgebaut. Das aktive CL besteht aus luteinisierten Granulosazellen sowie Thekazellen, Fibroblasten und neugebildeten Blutgefäßen. Die Luteinisierung der Zellen zu Granulosalutealzellen findet unter dem Einfluss von LH statt und ist durch die Bildung von Lipidtröpfchen und Hypertrophierung des Endoplasmatischen Retikulums in GZ sowie die Auflösung der Basallamina gekennzeichnet. Die Thekazellen luteinisieren ebenfalls und bilden den äußeren Rand des CL. Die Basallamina bildet sich zurück. Findet keine Befruchtung statt, kommt es nach vierzehn Tagen zur funktionellen Luteolyse. Das bedeutet, dass die Lutealzellen kein Progesteron mehr produzieren und

Makrophagen und später Fibroblasten in das CL einwandern. Schließlich nimmt das CL die Struktur einer bindegewebigen Narbe an (Corpus albicans) (strukturelle Luteolyse).

### 1.1.5 Hypothalamus/Hypophyse

Das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) wird pulsatil aus dem Hypothalamus freigesetzt und gelangt über das hypophysäre Pfortadersystem zum Hypophysenvorderlappen, wo es die Ausschüttung der beiden Gonadotropine FSH und LH bewirkt (Abbildung 1.3). Diese pulsatile Freisetzung ist eine wesentliche Voraussetzung für die Ausschüttung der Gonadotropine. Während der Follikelreifungsphase kommt es ungefähr alle 90 Minuten zur Ausschüttung von FSH und LH. In der Lutealphase verlängern sich diese Intervalle unter dem Einfluss von Progesteron auf 2 bis 3 Stunden. Komplementär zur Ausschüttung von LH greift während der Schwangerschaft in der Plazenta produziertes humanes Choriongonadotropin (hCG) am LH-Rezeptor an und stimuliert das CL.

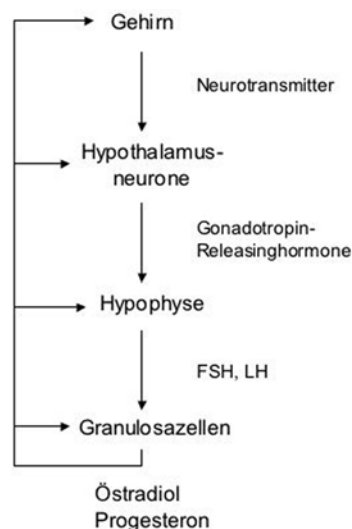


Abbildung 1.3: Steuerung der Ovarfunktion über die Hypophysenhormone FSH und LH. Eine Rückkopplung erfolgt über die Steroidhormone Östradiol und Progesteron; modifiziert nach Griffin und Ojeda, 2004.

### 1.1.6 Synthese von Steroidhormonen

Die beiden wichtigsten Steroidhormone, die im Ovar gebildet werden, sind das Östrogen Östradiol (17 $\beta$ -Östradiol) und das Gestagen Progesteron. Östradiol stellt



das Hauptprodukt der Granulosazellen im Follikel dar, wohingegen Progesteron das Hauptprodukt der Granulosaluteal- und Thekalutealzellen im CL ist. Die Aufgaben der Östrogene sind vielfältig, z.B. Förderung des Wachstums der weiblichen Sexualorgane, Prägung der weiblichen Geschlechtsmerkmale, Veränderung der Uterusschleimhaut (Endometrium) in der ersten Zyklushälfte, Veränderung des Zervikalsekrets, Beeinflussung der Stoffwechselfvorgänge in der Leber, Hemmung von Wachstum und Talgproduktion der Talgdrüsen und Senkung des peripheren Gefäßwiderstandes. Die Aufgaben der Gestagene sind essentiell für die Vorbereitung und Erhaltung der Schwangerschaft. Das physiologisch aktive Gestagen Progesteron führt zur Sekretion aus den Drüsen der Uterusschleimhaut, erhöht die Viskosität des Zervixschleims, unterdrückt die LH-Ausschüttung der Hypophyse und bewirkt eine Erhöhung der Körpertemperatur um etwa 0,5 °C.

Das C27-Grundgerüst des Cholesterols ist der Ausgangspunkt für die Synthese der ovariellen Steroide. Cholesterol, das im Blut in Form von Low-Density-Lipoproteinen (LDL) gebunden vorliegt, gelangt über LDL-Rezeptoren in endokrine Zellen des Ovars, wo es nach der Hydrolyse in Lysosomen für die Steroidhormonsynthese freigegeben wird. Überschüssiges Cholesterol wird verestert und in Lipidtröpfchen für den späteren Gebrauch gespeichert. Zunächst wird Cholesterol durch das Enzym Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) (Stocco und Clark, 1996) im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zur inneren Mitochondrienmembran transportiert, wo die Cholesterol-Monooxygenase (Cholesterol Side Chain Cleavage Enzyme, SCC) die Bildung des C21-Körpers Pregnenolon katalysiert. Die Cholesterol-Monooxygenase fehlt in GZ des wachsenden Follikels und tritt erst in luteinisierten GZ bzw. in folliculären und luteinisierten Thekazellen auf. Die Granulosazellen des antralen und präantralen Follikels haben keine Cholesterol-Monooxygenase und können daher nur aus den Vorstufen, die durch Granulosa- und Thekazellen des CL und durch folliculäre Thekazellen bereitgestellt werden, Östrogen produzieren. Pregnenolon wird anschließend im ER durch das Enzym 3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 $\beta$ -HSD) in Progesteron oder durch das Enzym 17 $\alpha$ -Hydroxylase in 17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon umgewandelt. Sowohl Progesteron als auch 17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon können zu 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron umgebaut werden. Letzteres wird durch die C17,20-Lyase in Androstendion (C19) umgewandelt. 17 $\alpha$ -

Hydroxypregnenolon wird durch die C17,20-Lyase zu Dehydroepiandrosteron, das durch die 3 $\beta$ -HSD in Androstendion umgewandelt wird. Androstendion (19C) wird durch die 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase in Testosteron umgewandelt. Sowohl Androstendion als auch Testosteron können in die Granulosazellen diffundieren. Diese enthalten das für die Östrogensynthese erforderliche Enzym Aromatase (Cytochrom P450 19 A 1), das schließlich Androstendion in Östron und Testosteron in Östradiol umwandelt. Das Zusammenwirken von Granulosa- und Thekazellen ist daher für die Östrogensynthese von entscheidender Bedeutung (Abbildung 1.4). Neben dieser Interaktion gelangen die Androgene über die Vaskularisierung der Thekazellen in die Blutbahn.

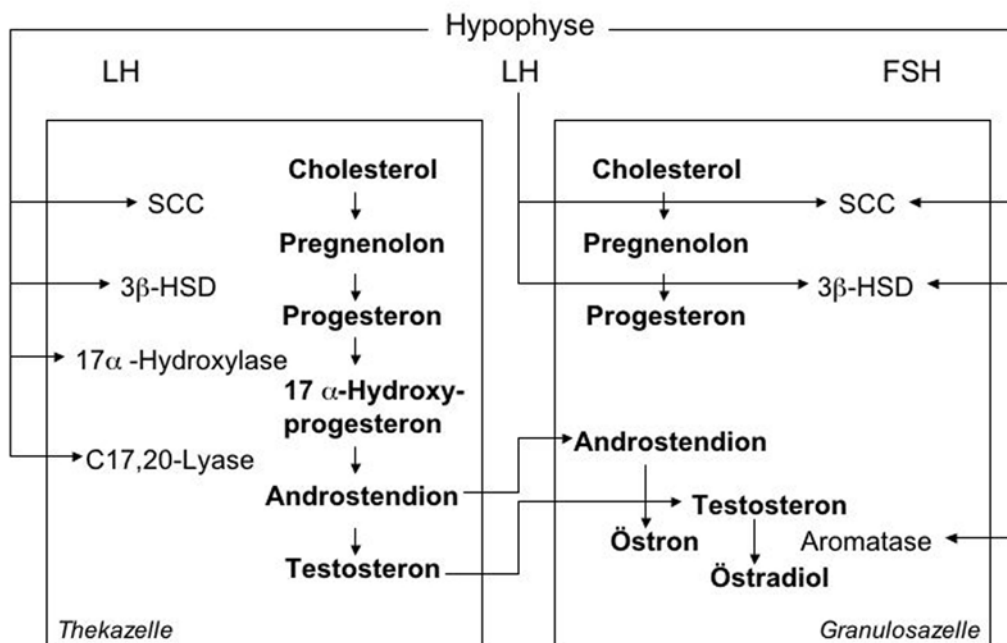


Abbildung 1.4: Steroidhormonproduktion in endokrinen Zellen des Ovars; modifiziert nach Griffin und Ojeda, 2004. In Thekazellen wird durch LH die Synthese von Androgenen angeregt. Diese diffundieren zu den Granulosazellen und werden dort durch das Enzym Aromatase zu Östrogenen umgewandelt. Dieser Prozess wird durch FSH stimuliert. In der Lutealphase führt LH in Granulosazellen zur Produktion von Progesteron.

## 1.2 Polyzystisches Ovar-Syndrom

Bei etwa 10 % der IVF-Patientinnen ist die Hormonbalance gestört und es tritt eine ovarielle Dysfunktion unbekannter Genese, das Polyzystische Ovar-Syndrom (PCOS), auf. Nach den sogenannten Kriterien von Rotterdam (Rotterdam Workgroup, 2004) liegt ein PCOS vor, wenn bei der Patientin zwei der folgenden

Kriterien zutreffen: Oligo- und/oder Anovulation, klinische und/oder biochemische Zeichen von Hyperandrogenismus sowie polyzystische Ovarien. Weitere klinische Kennzeichen des PCOS sind Hirsutismus, metabolisches Syndrom (Hyperinsulinismus, Hypertonie, Hyperlipoproteinämie, Adipositas) und ein erhöhtes Risiko für Diabetes mellitus Typ II (Reyss et al., 2006). Da andere Ursachen von Androgenüberschuss, wie z.B. androgenfreisetzende Tumore, ähnliche klinische und biochemische Veränderungen hervorrufen können, ist das PCOS eine Ausschlussdiagnose. Meist wird diese Erkrankung erst bei unerfülltem Kinderwunsch diagnostiziert, da es durch die ovarielle Dysfunktion häufig zu Infertilität kommt. Die gängige Therapie ist in diesem Fall die IVF.

### 1.3 Zellmodell

Granulosazellen aus präovulatorischen Follikeln stimulierter Zyklen in IVF-Patientinnen stellen ein Zellmodell dar, an dem Eigenschaften von diesen endokrinen Zellen des Ovars untersucht werden können. Die humanen GZ befinden sich, wenn sie in Kultur genommen werden, in einem Stadium zwischen Ovulation und Luteinisierung. Aus der erhöhten Progesteronproduktion der Zellen kann geschlossen werden, dass sie sich in der Phase der Luteinisierung befinden. Durch Behandlung mit hCG, das in seiner Wirkung LH entspricht, kann die basale Progesteronproduktion humaner GZ erhöht und der Luteinisierungsprozess gefördert werden. In den nachfolgend beschriebenen Versuchen wurden die Zellen sowohl unbehandelt als auch nach hCG-Behandlung untersucht, um mögliche Unterschiede durch den Luteinisierungsprozess zu erkennen. Diese könnten Hinweise auf Veränderungen im Laufe der Entwicklung der GZ geben. Die humanen GZ wurden in zwei Gruppen unterteilt. „Normale“ GZ stammten von Patientinnen, bei denen kein PCOS diagnostiziert worden war; „PCOS“ GZ stammten von Patientinnen mit PCOS.

### 1.4 ATP-abhängige Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ )

ATP-abhängige Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ ) kommen in vielen verschiedenen Geweben und Zellarten vor und erfüllen dort unterschiedliche Aufgaben. Ihre Aktivität hängt vom intrazellulären ATP/ADP-Verhältnis ab und sie verknüpfen den metabolischen Zustand der Zelle mit dem elektrischen Zustand der Plasmamembran. Man nimmt daher an, dass  $K_{ATP}$ -Kanäle eine wichtige Rolle in zellulären

Signaltransduktionswegen verschiedener Gewebe unter veränderten metabolischen Umständen spielen, wie z.B. bei Hyperglykämie, Hypoglykämie, Ischämie und Hypoxie (Miki und Seino, 2005). Außerdem sind sie, z.B. in Glattmuskelzellen des Kolons, an der Regulation des Ruhemembranpotentials beteiligt (Koh et al., 1998).

### 1.5 Struktur und Funktion von $K_{ATP}$ -Kanälen

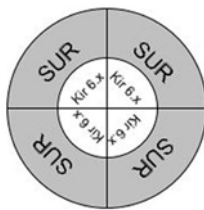


Abbildung 1.5: Aufbau des  $K_{ATP}$  aus einem Oktamer von vier Kir 6.x- und vier SUR-Untereinheiten; modifiziert nach Ashcroft, F. und Gribble, 1998.

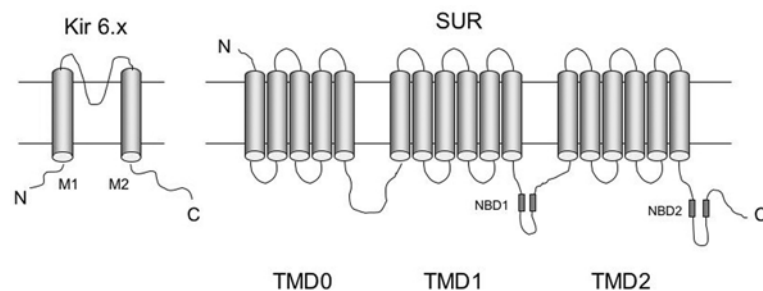


Abbildung 1.6: Struktur der Kir 6.x- und SUR-Untereinheit; modifiziert nach Seino und Miki, 2003. Man nimmt an, dass die Kir 6.x-Untereinheit aus zwei transmembranären Domänen (TMD) besteht und die SUR-Untereinheit aus einer Domäne mit fünf transmembranären Segmenten und zwei Domänen mit sechs transmembranären Segmenten. NBD: Nucleotidbindungsdomäne.

Aufbau und Struktur von  $K_{ATP}$ -Kanälen wurden in den letzten Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Die Ergebnisse sind in einigen Übersichtsartikeln zusammengefasst (Aguilar-Bryan und Bryan, 1999; Aguilar-Bryan et al., 1998; Babenko et al., 1998; Bryan et al., 2004; Inagaki und Seino, 1998; Nichols, 2006; Seino, 1999; Seino und Miki, 2003).  $K_{ATP}$ -Kanäle setzen sich aus zwei Untereinheiten zusammen, der Kir 6.x-Untereinheit (Potassium Inward Rectifier) (Nichols und Lopatin, 1997; Reimann und Ashcroft, F., 1999) und der SUR-Untereinheit (Sulfonylurea Receptor) (Ashcroft, S. und Ashcroft, F., 1992; Bryan und Aguilar-Bryan, 1999). Ein Tetramer der Kir 6.x-Untereinheit bildet die Pore von  $K_{ATP}$ -Kanälen, die von einem Tetramer aus SUR-Untereinheiten umgeben wird (Abbildung 1.5). Die zwei Untereinheiten bilden somit ein Oktamer und ergeben in dieser Kombination einen funktionellen  $K_{ATP}$ -Kanal (Shyng und Nichols, 1997).

Die Kir 6.x-Untereinheit ist für die  $K^+$ -Selektivität, die Leitfähigkeitseigenschaften, die Bindung von Nukleotiden und die einwärts gleichrichtende Eigenschaft von  $K_{ATP}$ -Kanälen verantwortlich. Einwärtsgleichrichtung bedeutet, dass die Leitfähigkeit des Kanals bei Hyperpolarisation höher und bei Depolarisation geringer ist (jeweils relativ zum  $K^+$ -Umkehrpotential).  $K_{ATP}$ -Kanäle weisen allerdings nur eine schwache Gleichrichtung im Vergleich zu anderen Kanälen der Kir-Familie auf (Nichols und Lopatin, 1997; Reimann und Ashcroft, F., 1999). Der Grad der Gleichrichtung hängt von den in der Pore vorhandenen Aminosäuren ab (Loussouarn et al., 2002; Nichols und Lopatin, 1997). Weitere Faktoren, die zu dieser Gleichrichtung beitragen, sind Magnesium und Polyamine bei Potentialen oberhalb des Umkehrpotentials (Nichols und Lopatin, 1997). Es gibt zwei Isoformen der Kir 6.x-Untereinheit, die sich in ihrer Leitfähigkeit unterscheiden. Während ein  $K_{ATP}$ -Kanal mit einer Kir 6.1-Untereinheit eine Leitfähigkeit von nur etwa 35 pS aufweist, hat ein  $K_{ATP}$ -Kanal mit einer Kir 6.2-Untereinheit eine Leitfähigkeit von etwa 80 pS (Babenko et al., 1998; Gribble et al., 1997; Inagaki et al., 1995a; Seino und Miki, 2003). Auch bezüglich der Nukleotidbindungseigenschaften unterscheiden sich die beiden Kir 6.x-Untereinheiten (siehe unten). Für die Kir 6.x-Untereinheit sind zwei Gene identifiziert worden. Das Kir 6.1-Gen besteht aus 3 Exons und befindet sich auf dem Chromosom 12p11.23. Das entsprechende Protein besteht aus 424 Aminosäuren ( $M_r \approx 48$  kDa) (Inagaki et al., 1995b). Das Kir 6.2-Gen besteht aus einem einzigen Exon und befindet sich auf Chromosom 11p15.1. Das entsprechende Protein besteht aus 390 Aminosäuren ( $M_r \approx 43,5$  kDa) (Ashcroft, S., 2000). Die Struktur der Kir-Untereinheit weist zwei transmembranäre Domänen M1 und M2 auf, die eine „Porenschleife“ mit einer charakteristischen, für die  $K^+$ -Selektivität verantwortlichen -GlyPheGly-Sequenz umgeben.

Die SUR-Untereinheit (Ashcroft, S. und Ashcroft, F., 1992; Bryan und Aguilar-Bryan, 1999; Inagaki et al., 1996) gehört zur Großfamilie der ABC (ATP-binding-cassette)-Transportsysteme, die eine stark konservierte ATP-Bindungsstelle besitzen. Innerhalb dieser ABC-Familie hat die SUR-Untereinheit am meisten Ähnlichkeit zum MRP (Multidrug Resistance-Associated Protein)-Typ. Die größten Ähnlichkeiten zwischen den SUR-Untereinheiten und anderen Proteinen der ABC-Familie bestehen in den Nukleotidbindungsdomänen (NBD). Der SUR besteht aus 17 transmembranären Segmenten, die in eine Domäne mit fünf Segmenten

(TMD0) und zwei Domänen mit sechs Segmenten (TMD1 und TMD2) aufgeteilt sind, sowie aus zwei großen intrazellulären Schleifen, welche die Nukleotidbindungsdomänen beinhalten (Abbildung 1.6). Die SUR-Untereinheit bildet den Angriffspunkt für Nukleotide und für Pharmaka (Inagaki et al., 1996). Es wurden drei Isoformen der SUR-Untereinheit beschrieben: SUR 1, SUR 2A und SUR 2B. SUR 1 hat eine hohe Bindungsaffinität und wurde in Pankreaszellen, im Gehirn und anderen neuroendokrinen Zellen beschrieben. SUR 2A und SUR 2B sind zwei Rezeptoren mit niedriger Bindungsaffinität, die  $K_{ATP}$ -Kanäle in Kardiomyozyten, im Skelettmuskel und im glatten Muskel bilden. Das humane SUR 1-Gen, das 39 Exons umfasst, wurde auf Chromosom 11, bei 11p15.1, lokalisiert. Das entsprechende SUR 1-Protein besteht aus 1582 Aminosäuren ( $M_r \approx 176$  kDa) (Ashcroft, S., 2000). Das humane SUR 2-Gen besteht aus 38 Exons und wurde auf Chromosom 12, bei 12p11.12 lokalisiert. Das SUR 2A-Gen unterscheidet sich vom SUR 2B-Gen in Exon 38, welches die jeweils letzten 45 Aminosäuren kodiert. Das SUR 2-Protein besteht aus 1549 Aminosäuren ( $M_r \approx 174$  kDa) (Shi et al., 2005).

Das Kir 6.2/SUR 1-Paar und das Kir 6.1/SUR 2-Paar sind auf den Chromosomen in enger Nachbarschaft lokalisiert. Dies legt eine Duplikation der Genpaare und anschließende Weiterentwicklung im Laufe der Evolution nahe (Aguilar-Bryan et al., 1998).

Nukleosiddiphosphate und Nukleosidtriphosphate (NDP und NTP) interagieren mit  $K_{ATP}$ -Kanälen auf unterschiedliche Weise und können sie entweder aktivieren, blockieren oder in einen aktivierbaren Zustand versetzen. Im Allgemeinen werden  $K_{ATP}$ -Kanäle durch intrazelluläre ATP-Konzentrationen von 100  $\mu$ M gehemmt und durch NDP aktiviert. Bei Fehlen von zytoplasmatischem ATP öffnet der  $K_{ATP}$ -Kanal zwar, es kommt jedoch zu einer schnellen Inaktivierung des Kanals. Dieser Funktionsverlust ist reversibel und  $K_{ATP}$ -Kanäle können durch MgATP wieder in einen aktivierbaren Zustand versetzt werden (Aguilar-Bryan und Bryan, 1999; Ashcroft, F. und Gribble, 1998; Babenko et al., 1998; Matsuo et al., 2005; Nichols und Lederer, 1991). Somit ist das intrazelluläre ATP/ADP-Verhältnis entscheidend für die Aktivität von  $K_{ATP}$ -Kanälen.

Eine Ausnahme bildet die Kombination von Kir 6.1 und SUR 2B im glatten Muskel in Gefäßen (Arterien oder Pfortader) (Beech et al., 1993; Cole und Clement-Chomienne, 2003; Cui et al., 2002; Zhang und Bolton, 1996). ATP in niedrigen

Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ ) aktiviert diesen Subtyp und erst hohe Konzentrationen (1 mM) hemmen ihn. Für unterschiedliche Zellen und Expressionssysteme liegen zu den zu einer Hemmung führenden ATP-Konzentrationen jedoch sehr unterschiedliche Angaben (1-5 mM) vor (Teramoto, 2006). Durch NDP wird dieser Subtyp stets aktiviert. Die Kombination von Kir 6.1 und SUR 2B wird aufgrund seiner SUR-Untereinheit zu den  $K_{\text{ATP}}$ -Kanälen gezählt und da dieser Subtyp unterschiedlich auf verschiedene ATP-Konzentrationen anspricht, aber stets durch NDP aktiviert wird, wird auch der Name  $K_{\text{NDP}}$  verwendet (Beech et al., 1993; Cole und Clement-Chomienne, 2003; Kamouchi und Kitamura, 1994; Teramoto, 2006; Yamada et al., 1997; Zhang und Bolton, 1996).

Außer Nukleotiden gibt es weitere endogene Signalsubstanzen, z.B. Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) oder Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP), die den  $K_{\text{ATP}}$  in glatten Muskelzellen von Kaninchenarterien und Schweineherzarterien aktivieren (Brayden, 2002). Auch die Proteinkinase A stimuliert die Aktivität von  $K_{\text{ATP}}$ -Kanälen in verschiedenen nativen Geweben (Seino und Miki, 2003). Dabei erhöht die Phosphorylierung der Kir 6.2-Untereinheit die Kanalaktivität. Quinn et al. (2004) zeigten, dass die Phosphorylierung der Kir 6.1- und SUR 2B-Untereinheiten des  $K_{\text{ATP}}$  durch die Proteinkinase A an mehreren Stellen zur Aktivierung des Kanals führt. Phosphoinositoldiphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) senkt die ATP-Sensitivität von  $K_{\text{ATP}}$ -Kanälen. Ergebnisse von Seino und Miki (2003) deuten darauf hin, dass die Angriffsstelle die Kir 6.2-Untereinheit sein könnte. Hanna et al. (2005) zeigten, dass Acetylcholin einen stimulierenden Effekt auf die Kir 6.1-Untereinheit von  $K_{\text{ATP}}$ -Kanälen hat.

## 1.6 Wichtige Beispiele von $K_{ATP}$ -Kanälen

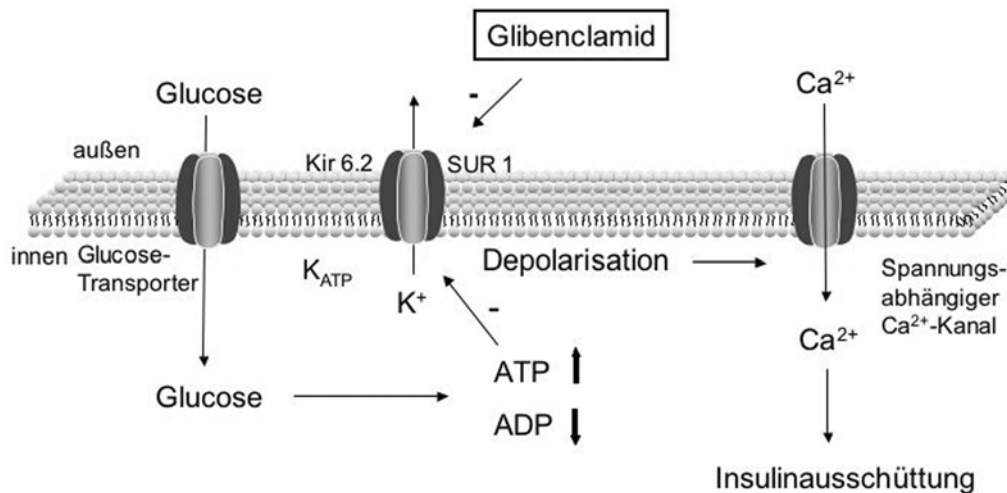


Abbildung 1.7: Mechanismus der Insulinausschüttung in der Beta-Zelle der Langerhansschen Inseln im Pankreas, modifiziert nach Ashcroft, S., 2000. Die Hemmung des  $K_{ATP}$  führt zur Depolarisation der Plasmamembran. Dadurch öffnen sich spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle und es kommt zum  $Ca^{2+}$ -Einstrom. Die erhöhte intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration führt zur vermehrten Insulinausschüttung.

Über den  $K_{ATP}$ , der in Beta-Zellen des Pankreas vorkommt, ist heute am meisten bekannt (Ashcroft, S., 2000; Ashcroft, F. und Rorsman, 2004; Yokoshiki et al., 1998). Er besteht aus der Kir 6.2- und der SUR 1-Untereinheit. Sein Schließen durch eine intrazellulär ansteigende ATP-Konzentration bewirkt eine Depolarisation der Plasmamembran und einen Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Infolgedessen kommt es zur Freisetzung von Insulin aus den Vesikeln der Beta-Zellen. Mutationen in den Untereinheiten dieses  $K_{ATP}$ -Typs verursachen familiären Hyperinsulinismus (Aguilar-Bryan und Bryan, 1999; Seino und Miki, 2003). Durch den hierdurch verursachten Verlust der  $K^+$ -Kanalaktivität stellt sich das Membranpotential auf einen positiveren Wert ein, der in einem Bereich liegt, in dem  $Ca^{2+}$ -Kanäle (L-Typ) aktiviert werden. Es kommt somit zu einem stetigen  $Ca^{2+}$ -Einstrom, der zu einer erhöhten intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration führt und die Insulinsekretion verstärkt.

Ein weiterer wichtiger Subtyp des  $K_{ATP}$  besteht aus den Untereinheiten Kir 6.1 und SUR 2B und kommt im glatten Muskel in Gefäßen vor. Ein Öffnen dieses Kanals durch  $K_{ATP}$ -Öffner (siehe Abschnitt 1.7) führt zu einer Hyperpolarisation der Plasmamembran, einer verringerten intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration und



letztlich zur Vasodilatation.  $K^+$ -Kanalöffner, wie z. B. Diazoxid, werden daher in der akuten Therapie der Hypertonie, aber auch der Hypoglykämie eingesetzt (Brayden, 2002; Cole und Clement-Chomienne, 2003; Nelson und Quayle, 1995; Teramoto, 2006; Yamada et al., 1997; Zhang und Bolton, 1996).

Die Kombination einer Kir 6.2- mit einer SUR 2B-Untereinheit kommt im glatten Muskel (z.B. im Kolon) vor (Koh et al., 1998; Isomoto et al., 1996; Seino und Miki, 2003; Teramoto, 2006). Für einige Glattemuskulgewebe werden auch Kombinationen der Kir 6.1-, Kir 6.2- und SUR 2B-Untereinheit beschrieben (Teramoto, 2006).

Ein weiterer Typ des  $K_{ATP}$  besteht aus der Kir 6.2- und der SUR 2A-Untereinheit und kommt im Herzen und im Skelettmuskel vor. In Herzmuskelzellen wurde der  $K_{ATP}$  zum ersten Mal beschrieben (Noma, 1983). Im Herzen ist der  $K_{ATP}$  am erhöhten  $K^+$ -Ausstrom und der Verkürzung des Aktionspotentials beteiligt (Gross und Fryer, 1999; Kane et al., 2005).

Ein  $K_{ATP}$  vom Beta-Zell-Typ (Kir 6.2/SUR 1) wurde auch im Gehirn, vor allem in Neuronen der Substantia nigra, nachgewiesen. Sein Öffnen unter metabolischem Stress hat eine neuroprotektive Wirkung (Ballanyi, 2004; Yamada und Inagaki, 2005).

Es wird ebenfalls ein mitochondrialer  $K_{ATP}$  (mito $K_{ATP}$ ) beschrieben, der in Kardiomyozyten vorkommt (Garlid et al., 1996; Garlid et al., 2003; Gross und Fryer, 1999; Liu et al., 1998; Mannhold, 2003). Die Zusammensetzung des mito $K_{ATP}$  ist noch unklar, jedoch wurden von Cuong et al. (2005) die Proteine der Kir 6.1, Kir 6.2- und der SUR 2-Untereinheiten nachgewiesen. Das Öffnen des mito $K_{ATP}$  ist am Schutz vor Ischämie beteiligt und trägt daher zur Kardioprotektion bei.

### 1.7 $K_{ATP}$ -Öffner und -Inhibitoren

Die SUR-Untereinheit stellt eine Angriffsstelle für viele Pharmaka dar (Gribble und Reimann, 2002; Gribble und Reimann, 2003; Mannhold, 2004; Moreau et al., 2005). Die Sensitivität von  $K_{ATP}$ -Kanälen gegenüber diesen hängt dabei sowohl von der exprimierten SUR-Untereinheit als auch von der coexprimierten Kir 6.x-Untereinheit ab.  $K_{ATP}$ -Kanäle werden durch Sulfonylharnstoffe wie Glibenclamid gehemmt, was zu einem verminderten  $K^+$ -Ausstrom und dadurch zu einer Depolarisation der Plasmamembran führt. In dieser Arbeit wurde Glibenclamid

eingesetzt, da es  $K_{ATP}$ -Kanäle mit SUR 1- und SUR 2A/B-Untereinheiten gleichermaßen inhibiert (Gribble und Reimann, 2002).  $K_{ATP}$ -Öffner wie Diazoxid führen über einen verstärkten  $K^+$ -Ausstrom zu einer Hyperpolarisation der Plasmamembran und damit zu einer verringerten zellulären Erregbarkeit, z.B. der glatten Muskelzellen. Diese Substanzen werden daher als Antihypertensiva in der akuten Therapie eingesetzt.  $K_{ATP}$ -Öffner sind eine strukturell heterogene Gruppe und können chemisch in verschiedene Klassen eingeteilt werden, wie z.B. Benzothiadiazine (Diazoxid) und Pyrimidinderivate (Minoxidil) (Tabelle 1.1). Sie unterscheiden sich in ihrer Affinität zum SUR. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich Diazoxid eingesetzt, weil Diazoxid mit ähnlicher Affinität an SUR 1 und SUR 2B bindet (Gribble und Reimann, 2002; Mannhold, 2004; Moreau et al., 2005; Seino und Miki, 2003).

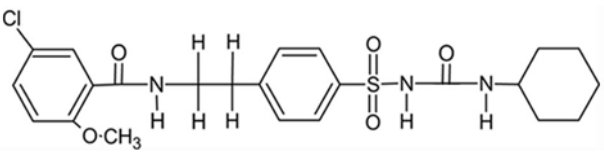
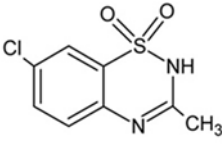
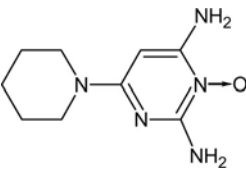
Substanzklasse	Substanz	Anwendungsgebiet (Handelsname)
<b>A. <math>K_{ATP}</math>-Inhibitoren</b>		
Sulfonylharnstoffe	Glibenclamid 	Orales Antidiabetikum (Euglucon N®)
<b>B. <math>K_{ATP}</math>-Öffner</b>		
Benzothiadiazine	Diazoxid 	Antihypertensivum und Antihypoglykämikum (Hypertonalum®, Proglidem®)
Pyrimidinderivate	Minoxidil 	Antihypertensivum (Lonolox®)

Tabelle 1.1: Strukturformeln und Handelspräparate des  $K_{ATP}$ -Inhibitors Glibenclamid und der  $K_{ATP}$ -Öffner Diazoxid und Minoxidil.

## 1.8 Ionenkanäle im Ovar

Über die Funktion von Ionenkanälen in endokrinen Zellen des Ovars ist bislang wenig bekannt. In letzter Zeit gibt es aber immer mehr Hinweise dafür, dass Ionenkanäle ( $K^+$ -,  $Na^+$ - und  $Cl^-$ -Kanäle) in endokrinen Zellen des Ovars von Ratte, Schwein und Mensch eine wichtige Rolle spielen, vor allem im Zusammenhang mit der dort stattfindenden Steroidhormonsynthese (Mayerhofer und Kunz, 2006).

In GZ des CL der Ratte wurde vor Kurzem durch RT-PCR-Versuche und In-situ-Hybridisierung mRNA des  $K_{ATP}$  (Kir 6.1- und SUR 2B-Untereinheit) nachgewiesen (Chien et al., 1999).

Mason et al. (2002) wiesen in isolierten GZ aus dem Schwein zwei  $K^+$ -Ströme nach. Manikkam et al. (2002) zeigten einen Zusammenhang zwischen diesen  $K^+$ -Strömen und der Progesteronproduktion in diesen GZ. Dort verändert die pharmakologische Beeinflussung der  $K^+$ -Ströme die Progesteronproduktion.

Auch für zwei  $K^+$ - und einen  $Ca^{2+}$ -Kanal (T-Typ) ist in GZ aus dem Schwein ein Zusammenhang mit der Progesteronproduktion nachgewiesen worden (Kusaka et al., 1993). LH führt hier durch Blockade des  $K^+$ -Stroms zu einer Depolarisation und damit zu einer Erhöhung der Progesteronproduktion.

Mattioli et al. (1993) beschrieben in GZ aus dem Schwein zwei verschiedene  $K^+$ -Ströme. Die Aktivität eines dieser  $K^+$ -Ströme nimmt im Laufe der Kulturzeit der Zellen zu und man nimmt an, dass sein Auftreten mit der Luteinisierung der GZ zusammenhängt.

Li et al. (2003) zeigten, dass der  $K^+$ -Kanal-Inhibitor 4-Aminopyridin sowohl die basale als auch die FSH-induzierte Progesteronproduktion in GZ aus dem Schwein verringert. Dabei bewirkt 4-Aminopyridin eine verringerte cAMP-Produktion, StAR-Expression und Östradiolsynthese. Diese Veränderungen kommen wahrscheinlich durch den Einfluss von 4-Aminopyridin auf das Membranpotential zustande.

In humanen GZ wurden die Bedeutung von  $K^+$ -Kanälen und ihr Einfluss auf die ovarielle Steroidhormonproduktion von Kunz et al. (2002) bereits für den  $BK_{Ca}$  beschrieben. Es wurde gezeigt, dass die Blockade des  $BK_{Ca}$  durch den

spezifischen Blocker Iberiotoxin die hCG-induzierte Progesteronproduktion verringerte.

Kunz et al. (2006a) wiesen im humanen Ovar und in humanen GZ außerdem einen  $K_v4.2$ -Kanal auf mRNA- und Proteinebene nach. Dieser lässt sich von verschiedenen ovariellen Steroiden (Progesteron, Östradiol, Testosteron) teilweise blockieren. Außerdem konnte durch eine Blockade des  $K_v4.2$  und anderer Komponenten des ovariellen A-Typ-Stroms durch Chinidin die hCG-induzierte Progesteronproduktion signifikant gesenkt werden.

Bulling et al. (2000) zeigten, dass im humanen Ovar und in humanen GZ ein endokriner spannungsaktivierter Natriumkanal (eNaCh/ $Na_v1.7$ ) vorkommt, der am physiologischen Abbauprozess des vorübergehend endokrin aktiven CL beteiligt ist. Agoston et al. (2004) konnten im humanen Ovar und in humanen GZ einen  $Ca^{2+}$ -Kanal vom T-Typ und einen vom L-Typ nachweisen, die beide an endokrinen Funktionen der Zelle beteiligt sind. Auch Platano et al. (2005) beschrieben diese  $Ca^{2+}$ -Kanäle in humanen GZ.

## 1.9 Zielsetzung

Ionenkanäle spielen im humanen Ovar und bei der dort stattfindenden Steroidhormonsynthese eine wichtige Rolle. ATP-abhängige Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ ) verknüpfen in vielen Zelltypen den metabolischen Zustand der Zelle mit dem Membranpotential. Da dieser Kanaltyp vor Kurzem in GZ des CL der Ratte auf mRNA-Ebene beschrieben wurde, war die Annahme naheliegend, dass der  $K_{ATP}$  auch im metabolisch hoch aktiven CL des Menschen eine Rolle spielen könnte. Die vorliegende Arbeit sollte daher untersuchen, ob im humanen Ovar und in humanen GZ ein  $K_{ATP}$  vorhanden ist und wie er gegebenenfalls zusammengesetzt ist. Als Zellmodell dienten humane GZ von IVF-Patientinnen. Neben dem molekularbiologischen Nachweis der Kanaluntereinheiten sollte einerseits die intrazelluläre Lokalisation des  $K_{ATP}$  in humanen GZ und andererseits die Lokalisation im Ovar untersucht werden. Außerdem sollte der  $K_{ATP}$  in humanen GZ durch elektrophysiologische und fluoreszenzmikroskopische Methoden funktionell charakterisiert werden. Humane GZ von IVF-Patientinnen und von Patientinnen mit PCOS wurden getrennt voneinander untersucht, um mögliche Unterschiede in Aufbau und Funktionalität des  $K_{ATP}$  erkennen zu können. Da GZ Steroidhormone produzieren, sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen dem  $K_{ATP}$  und dieser

wichtigsten physiologischen Funktion dieser Zellen betrachtet werden.  $K_{ATP}$ -Öffner- und Inhibitoren dienten der Untersuchung der Einflüsse auf das Membranpotential und der Steroidhormonproduktion. Der  $K_{ATP}$ -Inhibitor Glibenclamid ist ein häufig verwendetes Pharmakon bei der Behandlung des Diabetes mellitus Typ II; Diazoxid, ein Vertreter der  $K_{ATP}$ -Öffner, wird im akuten Fall der Hypertonie eingesetzt. Vor diesem Hintergrund sollte untersucht werden, ob derartige Substanzklassen auch am ovariellen  $K_{ATP}$  wirken und die ovarielle Funktion, wie z.B. die Steroidhormonsynthese, beeinflussen.

## 2. Material

### 2.1 Herstellerverzeichnis

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Kits und Geräte stammen von folgenden Firmen:

Agowa GmbH, Berlin

Alomone Labs, Jerusalem, Israel

Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

BD Biosciences Clontech, Heidelberg

Beckman Coulter GmbH, Krefeld

Biomol GmbH, Hamburg

Bioprotechs Inc., Butler, USA

Biorad Laboratories GmbH Life Science, München

Biozym Diagnostic GmbH, Hess. Oldendorf

BMG Labtech, Offenburg

Chemicon International Inc., Temecula, USA

Dianova GmbH, Hamburg

DRG Instruments GmbH, Marburg

Eppendorf AG, Hamburg

Fermentas GmbH, St.-Leon-Rot

GL Biochem Ltd., Shanghai, China

Heka Elektronik Dr.-Ing. P. Schulze GmbH, Karlsruhe

Heraeus Holding GmbH, Hanau

Dr. Hielscher GmbH, Stahnsdorf

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Kindler GmbH, Freiburg

Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Lorenz Meßgerätebau, Katlenburg-Lindau

MJ Research, Watertown, USA

Newport GmbH, Darmstadt

Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden

Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Pierce, Weiskirchen

Promega GmbH, Mannheim

Qiagen GmbH, Hilden  
Science Products GmbH, Hofheim  
Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen  
Stratagene, Heidelberg  
TSE Technical & Scientific Equipment GmbH, Bad Homburg  
Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA  
Zeiss Jena GmbH, München  
Zeitz, Augsburg

## 2.2 Verwendete Lösungen

Es wurde stets zweifach destilliertes Wasser (H<sub>2</sub>O bidest.) verwendet. Alle Prozentangaben sind in Gewichtsprozent angegeben.

PBS (10 mM, 1 l): 0,386 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O; 1,023 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; 8,776 g NaCl; in H<sub>2</sub>O bidest.; pH 7,4

Extrazelluläre (EZ) Lösung (1 l): 8,2 g NaCl (140 mM), 0,22 g KCl (3 mM), 0,15 g CaCl<sub>2</sub> (1 mM), 0,20 g MgCl<sub>2</sub> (1 mM), 2,38 g HEPES (10 mM), 1,8 g Glucose (10 mM); in H<sub>2</sub>O bidest.; pH 7,4

Intrazelluläre (IZ) Lösung (1 l): 0,20 g MgCl<sub>2</sub> (1 mM), 0,15 g CaCl<sub>2</sub> (1 mM), 2,38 g HEPES (10 mM), 0,76 g EGTA (2 mM), 30,45 g Kaliumgluconat (130 mM), 0,29 g NaCl (5 mM); in H<sub>2</sub>O bidest.; pH 7,4

Probenpuffer (1 x, 100 ml): 0,75 g Tris (62,5 mM), 2 g SDS, 10 g Saccharose; in H<sub>2</sub>O bidest.; pH 6,8

NPE-Puffer (100 ml): 0,877 g NaCl (150 mM), 0,302 g Pipes (10 mM), 0,038 g EDTA-Dinatriumsalz (1 mM); in H<sub>2</sub>O bidest.; pH 7,2

DEPC-H<sub>2</sub>O: 500 µl DEPC in 1 l H<sub>2</sub>O über Nacht rühren lassen und anschließend autoklavieren

Elektrophoresepuffer (10 x, 1 l): 30,28 g Tris; 144,12 g Glycin, 10 g SDS; in H<sub>2</sub>O bidest.; pH 8,3; zum Gebrauch 1:9 mit H<sub>2</sub>O bidest. verdünnen

Natriumcacodylat-Puffer I, pH 7,4: 16,05 g Natriumcacodylat in 900 ml H<sub>2</sub>O bidest.; pH 7,4

Ponceau S (10 x): 1 g Ponceau S auf 500 ml 3 % Trichloressigsäure (für Gebrauch 1:9 mit H<sub>2</sub>O bidest. verdünnen)

TBE-Puffer (5 x, 1 l): 54 g Tris, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA, in H<sub>2</sub>O bidest.; pH 8,0

TBS-Puffer (10 x, 1 l): 60,55 g Tris, 87,66 g NaCl, in H<sub>2</sub>O bidest.; pH 7,6

TBS-Tween (1 l): 100 ml TBS (10 x), 900 ml H<sub>2</sub>O bidest., 500 µl Tween 20 (= 0.05 %)

Trenngelpuffer (100 ml): 18,15 g Tris (1,5 M); 0,4 g SDS (0,4 %), in H<sub>2</sub>O bidest.; pH 8,8

Sammelgelpuffer (100 ml): 6 g Tris (0,5 M), 0,4 g SDS (0,4 %), in H<sub>2</sub>O bidest.; pH 6,8

Transferpuffer (5 l): 72,1 g Glycin (192 mM), 15,14 g Tris (25 mM), 1 l Methanol, in H<sub>2</sub>O bidest.

PFA (4 %, 100 ml): 4 g Paraformaldehyd, 1 ml 1 N NaOH, 0,57 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 0,93 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, in H<sub>2</sub>O bidest.; pH 6,8

KPBS 0,12 M (500 ml): 1,47 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,59 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 27 g NaCl, in DEPC-H<sub>2</sub>O; pH 7,4

KPBS 0,02 M: 20 ml 0,12 M KPBS + 100 ml DEPC-H<sub>2</sub>O

KPBS (Normalserum/Triton): 48,85 ml 0,02 M KPBS, 1 ml Normalserum des Zweitantikörpers, 150 µl Triton X-100

F+-Marker (100-3000 bp): 40 µl 0,5 µg/µl Gene Ruler 100 bp DNA Marker Plus (Fermentas), 50 µl Farbstoff (6 x), 110 µl H<sub>2</sub>O bidest.

Ethidiumbromid: 10 mg/ml; für Gebrauch 1:10 verdünnen



## **3. Methoden**

### **3.1 Zellkultur**

Die für die Experimente eingesetzten humanen GZ wurden aus Follikelflüssigkeit gewonnen, die aus Punktionen des Labors für In-vitro-Fertilisation (Assisted Reproductive Technologies, A.R.T. Bogenhausen, München, Prof. Dr. Frank D. Berg, Dr. U. Berg) stammte. Die Patientinnen wurden dabei in die Untergruppen „normal“ und „PCOS“ eingeteilt (siehe Abschnitt 1.3). Die Ethikkommission der Universität München hat sowohl die Kultivierung als auch das weitere experimentelle Arbeiten an diesen humanen GZ genehmigt. Die Patientinnen wurden über die beabsichtigte Verwendung der Zellen aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis.

Drei solcher Punktionen ergaben etwa 100 ml Flüssigkeit und wurden sofort aufgearbeitet oder andernfalls noch für maximal zwei bis fünf Stunden bei 37 °C gelagert. Die humanen GZ wurden anschließend je nach Verwendungszweck aufgearbeitet und bei 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> (Brutschrank, Heraeus BBD 6220) in Kultur gehalten.

#### **3.1.1 Vorbereitung der Kulturschalen**

Für Patch-Clamp- und fluoreszenzmikroskopische Experimente war eine Adhäsion der Zellen an Deckgläschen und das Wachstum als Einzelzellschicht notwendig. Ein optimales Wachstum wurde auf unbeschichteten Deckgläschen (K, Ø 12 mm, Nr.1, Kindler GmbH) erreicht. Zuvor wurden diese in Isopropanol (70 %) getaucht, über dem Bunsenbrenner abgeflammt und anschließend in verschlossenen Petrischalen bis zur Verwendung steril aufbewahrt.

#### **3.1.2 Präparation/Isolierung**

Die einzelnen Punktate wurden zunächst gemäß der Gruppierung „normal“ und „PCOS“ eingeteilt und gemischt. Die nach den Gruppierungen aufgeteilten und gemischten Zellen der Punktionen eines Tages wurden als eine Zellcharge bezeichnet. Die humanen GZ wurden anschließend mechanisch durch Aufziehen und Entleeren einer 10 ml-Spritze mit Kanüle (20 G) vereinzelt. Die Flüssigkeit wurde zu je 6 ml auf 13 ml-Röhrchen verteilt und mit je 5 ml F12/DME-Medium (Ham's F12 und Dulbecco's Modified Eagle's Medium im Verhältnis 1:1) ohne

FKS (fötales Kälberserum) (= F12/DME (-)-Medium) gemischt. Anschließend wurde für drei Minuten bei 800 U/Min. (Labofuge 400e, Heraeus) zentrifugiert und der Überstand bis auf etwa 1 ml abgesaugt. Dann wurden pro Röhrchen 10 ml vorgewärmtes F12/DME (-)-Medium zugegeben und nochmals drei Minuten bei 800 U/Min. zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand wieder bis auf etwa 1 ml abgesaugt. Die Pellets wurden zusammengegeben, gemischt und mit vorgewärmtem F12/DME (+)-Medium (mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin) versetzt. Dann wurden die aufbereiteten Zellen je nach Verwendungszweck auf Petrischalen (Ø 60 mm oder 35 mm), auf 24-Well-Platten (Nunclon Surface, Nunc) oder auf Deckgläschen in Petrischalen (je fünf pro Schale mit Ø 60 mm) verteilt. Die so präparierten humanen GZ wurden im Brutschrank (37 °C/5 % CO<sub>2</sub>) kultiviert. Der Tag der Präparation war definitionsgemäß Tag 0.

Am nächsten Tag (Tag 1) wurde das Medium abgesaugt und die humanen GZ mit vorgewärmtem F12/DME (-)-Medium gespült. Dabei wurde das noch vorhandene Blut möglichst vollständig entfernt, damit es das Wachstum der Zellen nicht behinderte. Anschließend wurden die Zellen wieder mit vorgewärmtem F12/DME (+)-Medium (4 ml für Petrischalen mit Ø 60 mm bzw. 2 ml für Petrischalen mit Ø 35 mm) versetzt und weiter im Brutschrank kultiviert (Mayerhofer et al., 1999b).

### **3.1.3 Behandlung der Zellen mit Testsubstanzen**

Um mögliche Veränderungen der Expression des K<sub>ATP</sub> zu untersuchen, wurden humane GZ unterschiedlichen Alters (Tag 3 bis Tag 6) für 20-24 h mit hCG (10 IU/ml; entspricht 10 µl hCG (1000 IU/ml) pro 1 ml Medium) behandelt. Dafür wurde das Medium von den Kulturschalen abgesaugt und die Zellen anschließend mit F12/DME (+)-Medium, dem hCG (10 IU/ml) oder die entsprechende Menge H<sub>2</sub>O bidest. (Kontrollbehandlung) zugesetzt war, versetzt und dann weiter im Brutschrank inkubiert. Nach 20-24 h wurde das Medium abgenommen und die mRNA oder das Protein gewonnen (siehe Abschnitt 3.2 und 3.3).

Außerdem wurden humane GZ mit Pharmaka wie Diazoxid und Glibenclamid behandelt, die aktivierend bzw. hemmend am K<sub>ATP</sub> wirken. Diese lagen in DMSO gelöst vor. Die Stocklösungen (Diazoxid: 100 mM), Glibenclamid: 10 mM) wurden für die Versuche um den Faktor 1:1000 verdünnt, so dass eine DMSO-Endkonzentration von 0,1 % im Medium vorlag. Entsprechend wurden zur

Kontrolle in allen Versuchen humane GZ eingesetzt, die mit DMSO (0,1 %) behandelt worden waren.

## **3.2 Molekularbiologie**

### **3.2.1 RNA-Extraktion aus kultivierten humanen GZ**

Die zelluläre RNA humaner GZ wurde mit Hilfe des RNeasy Plus Mini Kits (Qiagen) gewonnen. Dabei wurden die Zellen zunächst mit dem RLT-Lyse-Puffer (Guanidinisothiocyanat mit  $\beta$ -Mercaptoethanol (1 %)) auf die vorgesehene Säule zur Entfernung genomischer DNA gegeben und zentrifugiert. Der Durchfluss wurde auf eine neue Säule gegeben und nochmals zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit RW1 und RPE/70 % Ethanol gewaschen. Alle Arbeitsschritte wurden bei R.T. durchgeführt. Die im Protokoll vorgeschriebenen Zentrifugationsschritte wurden mit einer Biofuge pico (Heraeus) bei R.T. durchgeführt. Die dabei gewonnene RNA wurde mit 30-50  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O von der Säule eluiert und anschließend bei -80 °C gelagert.

Um die Qualität der RNA zu prüfen, wurde ein Agarosegel (2 %) angefertigt (Chemikalien und Geräte siehe Abschnitt 3.2.3). Es wurde jeweils 1  $\mu$ l der RNA auf das mit Ethidiumbromid (0,1  $\mu$ g/ml) versetzte Gel aufgetragen. Bei intakter RNA ist das Verhältnis der Intensitäten von ribosomaler 28S zu 18S RNA ca. 2:1. Der RNA-Gehalt wurde mittels Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm (Biophotometer, Eppendorf) bestimmt. Außerdem wurde das Verhältnis der Absorptionen bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessen. Ein Wert des Verhältnisses  $A_{260}/A_{280}$  von 1,5 deutet auf eine Proteinverunreinigung, ein Wert von mehr als 2,0 auf eine Phenolverunreinigung hin. Die Bestimmung des RNA-Gehalts war wichtig, um in der anschließenden reversen Transkription jeweils die gleiche Ausgangsmenge an RNA zu verwenden, was vor allem für die semiquantitative Auswertung der PCR-Ergebnisse von Bedeutung war.

### **3.2.2 Reverse Transkription (RT)**

#### **3.2.2.1 Reverse Transkription mit Oligo-dT<sub>15</sub>-Primern**

Für die RT zellulärer mRNA in cDNA wurden Oligo-dT<sub>15</sub>-Primer in einem Reaktionsansatz von 20  $\mu$ l verwendet (Mayerhofer et al., 1997). Dabei wurde zunächst eine 200 ng mRNA entsprechende Menge mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf ein

Gesamtvolumen von 11,8 µl aufgefüllt, mit 1,0 µl RQ1 RNase free DNase (Promega, 1 U/µl pro 1 µg DNA), 1,0 µl First Strand Buffer (Stratagene, 10 x, 30 mM MgCl<sub>2</sub>) und 0,2 µl RNase Block Ribonuclease Inhibitor (Promega, 40 U/µl) versetzt (Gesamtvolumen 14 µl) und für 20 Minuten bei 37 °C für den DNase-Verdau erwärmt. Anschließend wurde der Ansatz mit 1,0 µl EDTA (84 mM) und 1,0 µl Oligo-dT<sub>15</sub>-Primern (Promega) für 15 Minuten bei 70 °C zur DNase-Hitzeinaktivierung und zum Primer-Annealing erwärmt. Am Ende der Inkubationszeit wurde der Ansatz auf Eis gekühlt und anschließend 1,0 µl First Strand Buffer (10 x), 1,0 µl dNTP (25 mM), 1,0 µl MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, Stratagene, 20 U/µl) und 1,0 µl MgCl<sub>2</sub> (180 mM) hinzugesetzt. Dann wurde folgendes RT-Programm ausgeführt:

- 23 °C für 10 Minuten
- 37 °C für 60 Minuten
- 90 °C für 5 Minuten
- 4 °C für 10 Minuten

Die gewonnene cDNA wurde bei –20 °C eingefroren oder direkt im Anschluss in einer PCR weiterverarbeitet.

Die von Kunz et al. (2006b) nachgewiesenen RT-PCR-Produkte wurden anhand dieses Protokolls hergestellt. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten RT-PCR-Produkte wurden jedoch später nach einem veränderten Protokoll durchgeführt, das im Folgenden dargestellt wird.

### **3.2.2.2 Reverse Transkription mit Hexamer-Primern**

Zur Verbesserung des RT-Verfahrens wurden anstatt der Oligo-dT<sub>15</sub>-Primer sogenannte Hexamer-Primer verwendet. Außerdem wurde die Reverse Transkriptase Superscript II (Invitrogen) eingesetzt. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Zunächst wurde eine 200 ng mRNA entsprechende Menge mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 10,7 µl aufgefüllt und mit 0,8 µl Hexamer-Primern versetzt. Die Proben wurden für 10 Minuten auf 70 °C und anschließend für 5 Minuten auf 25 °C erwärmt (Primer-Annealing). Daraufhin wurden 4 µl First Strand Buffer (5 x, Invitrogen), 2 µl DTT (0,1 M, Invitrogen), 1 µl dNTP (10 mM) und 0,5 µl RNasin

(RNase Block Ribonuclease Inhibitor, Promega) hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 10 Minuten auf 25 °C und anschließend für 2 Minuten auf 42 °C erwärmt. Dann wurde je 1 µl Superscript II zu jedem Ansatz hinzugegeben und folgendes RT-PCR-Programm durchgeführt:

- 42 °C für 50 Minuten
- 70 °C für 15 Minuten
- 4 °C für 10 Minuten

Diese Art der RT mit anschließender PCR ergab für humane GZ eine ausreichende Menge der PCR-Produkte, so dass auf eine anschließende nested-PCR für die SUR-Untereinheiten verzichtet werden konnte.

Die cDNA aus dem CL des Rhesusaffen wurde freundlicherweise von Richard L. Stouffer, Oregon National Primate Research Center, Beaverton, USA, zur Verfügung gestellt.

### **3.2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Für den Nachweis der Untereinheiten des  $K_{ATP}$  wurden PCR-Versuche durchgeführt. Dabei wurden jeweils entsprechende Primer für die Kir 6.1-Untereinheit (Harvard-Primerbank; <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank>), die Kir 6.2-Untereinheit (Cui et al., 2002) und die SUR 1/2A/2B-Untereinheiten (Cui et al., 2002) verwendet. Nested-Primer für die SUR 1/2A/2B-Untereinheiten wurden mit Hilfe des Programms PrimerSelect (Lasergene Navigator, DNASTar, Inc.) ausgewählt. Die Primer für die PCR zur Untersuchung des Enzyms Aromatase stammten ebenfalls aus der Harvard-Primerbank. Die Primer für die Cholesterol-Monooxygenase (Side Chain Cleavage Enzyme, SCC), das Enzym 3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 $\beta$ -HSD) und das Steroidogenic Acute Regulatory Protein wurden mit Hilfe des Programms PrimerSelect ausgewählt. Zusätzlich wurden bei allen PCR-Experimenten  $\beta$ -Aktin-Primer verwendet (PrimerSelect). Diese dienten einerseits der qualitativen Überprüfung der PCR (Größe der Bande ohne Intron: 193 bp, Größe der Bande mit Intron: 313 bp) und andererseits der Normierung der semiquantitativen PCR. Die Primersequenzen sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Die Primersequenzen wurden intronspannend gewählt, um die etwaige Amplifizierung genomischer DNA zu erkennen. Das galt nicht für die Primersequenz von Kir 6.2, da das Kir 6.2-Gen intronlos ist. Alle Primer wurden gereinigt und lyophilisiert von der Firma Metabion bezogen.

Bezeichnung		Sequenz (5´-3´)	GenBank Accession-Nummern	Bereich	Fragment
Kir 6.1	F	CTGCTCTTCGCTATCATGTGG	NM_004982	591-772	182 bp
Kir 6.1	R	CCTCCAAACCCAATGGTAACTTG			
Kir 6.2	F	TGTCCCGCAAGGGCATCATCCCCG	NM_000525	573-959	387 bp
Kir 6.2	R	TAGTCACTTGGACCTCAATGGAG			
SUR 1	F	CGATGCCATCATCACAGAAG	NM_000352	4536-4826	291 bp
SUR 1	R	CTGAGCAGCTTCTCTGGCTT			
SUR 2A	F	ATATGGTCAAATCTCTACCTGGAGG	NM_005691	4306-4664	359 bp
SUR 2A	R	GTTGGTCATCACCAAAGTGGAAAAG			
SUR 2B	F	ATATGGTCAAATCTCTACCTGGAGG	NM_020297	4306-4667	362 bp
SUR 2B	R	CATGTCTGCGCGAACAAGAAAGC			
SUR 1 n	F	ATCATCACAGAAGGCGGGGAGAAT	NM_000352	4543-4704	162 bp
SUR 1 n	R	GGCTGTCATCACCACTTTTG			
SUR 2A n	F	ATTGACATGGCCACAGAGAA	NM_005691	4455-4626	172 bp
SUR 2A n	R	GGGCGAACAATTTGGGACAGTAT			
SUR 2B n	F	CCGGACCGTGGTGACAATG	NM_020297	4511-4660	150 bp
SUR 2B n	R	GCGCGAACAAGAAAGCAAATACT			
CYP 19 A 1	F	GCTACCCAGTGAAAAAGGGGA	NM_000103	1295-1434	140 bp
CYP 19 A 1	R	GCCAAATGGCTGAAAGTACCTAT			
StAR	F	TGGAGAGGCTCTATGAAGAGC	NM_000349	653-988	336 bp
StAR	R	GCCACGTAAGTTTGGTCTTAG			
SCC	F	TCGGCAGCCTGGAAGAAAGACC	NM_000781	474-699	226 bp
SCC	R	GGCGCTCCCCAAAATGACG			
3 $\beta$ -HSD	F	GTAGCCGGGCCCAACTCCT	NM_000862	513-721	209 bp
3 $\beta$ -HSD	R	AATCGGCTTCCTTCCCATAGA			
$\beta$ -Aktin	F	GGATGCAGAAGGAGATCA	NM_001101	1008-1202	193 bp
$\beta$ -Aktin	R	CTAGAAGCATTGCGGTG			

Tabelle 3.1: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Primer (F: forward, R: reverse) und ihre Zuordnung zu bekannten Sequenzen (GenBank Accession-Nummer)

Für die PCR wurden jeweils RT-Produkte humaner GZ und cDNA aus humanen Geweben (BD Biosciences Clontech) verwendet. Die PCR wurde mit dem in

Tabelle 3.2 aufgeführten PCR-Mix und dem in Tabelle 3.3 aufgeführten Reaktionsansatz in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$  durchgeführt. Als Negativkontrolle (N) der PCR wurde die entsprechende Menge  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. anstatt der cDNA verwendet.

Reagenz	Volumen
Puffer (10 x) (Promega)	5 $\mu\text{l}$
$\text{MgCl}_2$ (25 mM)	3 $\mu\text{l}$
dNTP (2 mM)	5 $\mu\text{l}$
$\text{H}_2\text{O}$ bidest.	28 $\mu\text{l}$
Gesamtvolumen	41 $\mu\text{l}$

*Tabelle 3.2: Reaktionsansatz PCR-Mix*

Reagenz	Volumen
PCR-Mix	41 $\mu\text{l}$
Primer F (50 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$
Primer R (50 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$
$\text{H}_2\text{O}$ bidest.	4,5 $\mu\text{l}$
Taq-Polymerase (Promega)	0,5 $\mu\text{l}$
cDNA	2 $\mu\text{l}$
Gesamtvolumen	50 $\mu\text{l}$

*Tabelle 3.3: PCR-Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$*

Mit einem veränderten Protokoll wurde die PCR später mit der GoTaq-Polymerase (Promega) und dem in Tabelle 3.4 aufgeführten PCR-Mix und in Tabelle 3.5 aufgeführten Reaktionsansatz in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$  durchgeführt. Als Negativkontrolle (N) der PCR wurde die entsprechende Menge  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. anstatt der cDNA verwendet.

Reagenz	Volumen
GoTaq-Puffer (5 x) (Promega)	5 $\mu\text{l}$
$\text{MgCl}_2$ (25 mM)	3 $\mu\text{l}$
dNTP (2 mM)	5 $\mu\text{l}$
$\text{H}_2\text{O}$ bidest.	28 $\mu\text{l}$
Gesamtvolumen	41 $\mu\text{l}$

*Tabelle 3.4: Reaktionsansatz PCR-Mix, GoTaq-Polymerase*

Reagenz	Volumen
PCR-Mix	41 µl
Primer F (50 µM)	1 µl
Primer R (50 µM)	1 µl
GoTaq-Polymerase (Promega)	0,25 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	4,75-6,25 µl
cDNA	0,5-2 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 3.5: PCR-Reaktionsansatz mit GoTaq-Polymerase mit einem Gesamtvolumen von 50 µl

Die PCR-Versuche wurden mit dem PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) mit folgenden Programmen (Tabelle 3.6) durchgeführt:

	Kir 6.x/SUR			Kir 6.x/SUR (GoTaq)		
Denaturierung	94 °C	180 s		94 °C	180 s	
Denaturierung	94 °C	60 s	Zyklen: 35 nested- PCR: 30	94 °C	60 s	Zyklen: 35
Primer-Annealing	55 °C	120 s		55 °C	30 s	
Elongation	72 °C	180 s		72 °C	60 s	
Elongation	72 °C	600 s		72 °C	600 s	

	Aromatase			StAR, SCC, 3β-HSD		
Denaturierung	94 °C	180 s		94 °C	180 s	
Denaturierung	94 °C	30 s	Zyklen: 30	94 °C	30 s	Zyklen: 27-30
Primer-Annealing	55 °C	30 s		55 °C	30 s	
Elongation	72 °C	60 s		72 °C	60 s	
Elongation	72 °C	600 s		72 °C	600 s	

Tabelle 3.6: PCR-Bedingungen

Nach Beendigung der PCR wurde eine Temperatur von 4 °C eingestellt. Die cDNA wurde im Anschluss elektrophoretisch aufgetrennt oder bei -20 °C eingefroren.

### 3.2.3 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden auf ein mit Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) versetztes Agarosegel aufgetragen. Dabei wurde ein Gel (2 %) aus Peqgold-Agarose (Peqlab) oder ein Gel (2,5 %) aus Metaphor-Agarose (Biozym) verwendet. Mit letzterer konnten Fragmente, die weniger als 200 bp groß waren, wie z.B. bei der



nested-PCR, besser aufgetrennt werden. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde gleichzeitig ein 100 bp DNA-Molekulargewichtsmarker (F+, Fermentas) aufgetragen. Die Elektrophorese (Power PAC 300, Biorad) erfolgte für 40 Minuten bei 100 V (Peqgold-Agarose) oder für 60 Minuten bei 80 V (Metaphor-Agarose). Anschließend wurden die Fragmente mittels UV-Licht sichtbar gemacht und fotografisch festgehalten.

Zur Identifikation wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des Qiaquick PCR Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt und von der Firma Agowa mit Hilfe eines oder beider Primer sequenziert.

Die densitometrische Auswertung der Intensität der PCR-Banden erfolgte mit Hilfe des Programms ImageJ (Image J 1.36b, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA), wie es bereits von Fritz et al. (2002) gezeigt wurde. Die Intensitäten der jeweiligen PCR-Produkte wurden auf die des entsprechenden  $\beta$ -Aktin-Produkts bezogen und anschließend mit dem sich auf diese Weise ergebenden Kontrollwert verglichen.

Die PCR-Versuche mit den Kir 6.x- und SUR-Primern wurden ebenfalls für ovarielle cDNA und cDNA des CL des Rhesusaffen durchgeführt. Es wurde dasselbe PCR-Protokoll verwendet. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden ebenfalls von der Firma Agowa sequenziert.

### **3.3 Proteingewinnung/SDS-PAGE/Western Blot**

Humane GZ in Petrischalen ( $\varnothing$  60 mm) wurden zweimal mit PBS gespült und bei  $-20$  °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

Zur Gewinnung des Proteins wurden die humanen GZ mit 1,5 ml NPE-Puffer mit einem Schaber von den Petrischalen abgelöst und anschließend bei 4 °C und 10000 U/Min. für drei Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1,5 ml PBS (1 x) resuspendiert und wieder abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in Probenpuffer (1 x) + Inhibitormischung (Phenylmethylsulfonylfluorid, Aprotinin, Leupeptin und Natriumvanadat) aufgenommen und die Zellen durch Ultraschall (UP 50H, Dr. Hielscher GmbH) aufgeschlossen.

Um die Proteinkonzentration der Proben zu bestimmen, wurde der DC Protein Assay (Biorad) verwendet, der auf der Bradford-Methode basiert. Die Absorption einer Standardreihe von Lösungen mit definierter Proteinkonzentration und der

Proben wurden bei 650-750 nm in einem Elisa-Reader (Dynex Technologies) gemessen.

Anschließend wurden die Proben mit 10 %  $\beta$ -Mercaptoethanol und 1  $\mu$ l Bromphenolblau pro 100  $\mu$ l Probe versetzt und für 5 Minuten auf 95 °C erwärmt, um Disulfidbrücken der Proteine zu trennen.

Für die Auftrennung und anschließende Sichtbarmachung der Proteine (Kir 6.1, SUR 2B, Aromatase, StAR) wurde zunächst eine SDS-PAGE durchgeführt. Für eine optimale Auftrennung der Proteinbanden wurden Gele unterschiedlichen Acrylamidgehalts (12,5 % bzw. 15 %) verwendet (Tabelle 3.7). Zunächst wurde die Trenngelmischung zwischen zwei Glasplatten gegeben. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel (4 %) darübergeschichtet (Tabelle 3.7).

	Trenngel		Sammelgel
Acrylamidgehalt	12,5 %	15 %	4 %
Acrylamid (30 %)	1,6 ml	2 ml	270 $\mu$ l
Trenngelpuffer pH 8,8	1,25 ml	1,25 ml	-
Sammelgelpuffer pH 6,8	-	-	625 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O bidest.	2,1 ml	1,6 ml	1500 $\mu$ l
Ammoniumpersulfat (10 %)	75 $\mu$ l	75 $\mu$ l	19 $\mu$ l
Natriumdodecylsulfat (10 %)	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	25 $\mu$ l
TEMED (100 %)	12,5 $\mu$ l	12,5 $\mu$ l	3,25 $\mu$ l

*Tabelle 3.7: Western-Blot-Trenn- und Sammelgel*

Nach 30 Minuten Polymerisation wurde das Gel im Elektrophoresepuffer (1 x) mit gleichen Mengen der Proteinproben beladen. Die Trennung erfolgte bei 160 V und 400 mA für etwa 90 Minuten.

Im Anschluss an die Auftrennung der Proteine wurden diese durch Transferblotting auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond-C Extra, Amersham Biosciences) überführt. Dafür wurde ein Wet-Blot-System in einer Mini Trans-Blot-Kammer (Biorad) verwendet. Das Transferblotting verlief bei 100 V und 400 mA für 60 Minuten im Transferpuffer (1 x).

Zur Sichtbarmachung der Banden wurde der Blot nach dem Transferblotting mit Ponceau S (1 x) angefärbt. Die Banden wurden markiert und der Blot anschließend für etwa 30 Minuten mit Milchpulver (5 %)/TBS-Tween inkubiert, um

unspezifische Bindungen zu blockieren. Anschließend wurde der Blot mit dem Erstantikörper (Anti-Kir 6.1 (1:200, Alomone), Anti-SUR 2B (1:500, Chemicon), Anti-Aromatase (1:500, Cordian Beyer, Aachen) oder Anti-StAR (1:500, D.M. Stocco, Texas Tech University, Lubbock, USA)) in Milchpulver (0,5 %)/TBS-Tween über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Blot nochmals für 1 h bei R.T. geschüttelt und anschließend dreimal für 5 Minuten mit TBS-Tween gewaschen. Dann wurde der Blot für 1 h mit dem peroxidasemarkierten Zweitantikörper (gegen Spezies gerichtet, in welcher der Erstantikörper produziert wurde, 1:5000-1:7000 in Milchpulver (0,5 %)/TBS-Tween) inkubiert. Danach wurde der Blot dreimal für 5 Minuten mit TBS-Tween gewaschen. Der Blot wurde dann mit dem Pico- oder Femto-Set (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate oder SuperSignal® West Femto Maximum Substrate, Pierce) zur Chemilumineszenz (ECL)-Detektion versetzt und mit Hilfe des Chemilumineszenzsystems Chemi-Smart 5000 (Pierce, Vilber Lourmat) und des Programms ChemiCapt belichtet.

Anschließend wurde der Western Blot zur semiquantitativen Auswertung mit einem  $\beta$ -Aktin-Antikörper (1:5000, Sigma-Aldrich) inkubiert (gleiches Verfahren wie oben beschrieben). Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageJ (siehe Abschnitt 3.2.3), wobei die Intensitäten der einzelnen Proteinbanden jeweils auf die der entsprechenden  $\beta$ -Aktin-Bande bezogen wurden. Anschließend erfolgte Vergleich mit dem sich auf diese Weise ergebenden Kontrollwert.

### 3.4 Immunhistochemie

Die in den immunhistochemischen Versuchen verwendeten Paraffinschnitte von humanen Ovargewebeproben prämenopausaler Frauen stammten aus dem Archiv des Anatomischen Instituts (Mayerhofer et al., 1999a).

Die Gewebeproben (Ovar und Uterus) aus dem Rhesusaffen wurden freundlicherweise von Richard L. Stouffer, Oregon National Primate Research Center, Beaverton, USA, zur Verfügung gestellt.

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden Schnitte (5  $\mu$ m) hergestellt.

Es wurden zwei verschiedene gegen die Kir 6.1-Untereinheit gerichtete Antikörper verwendet. Der eine wurde freundlicherweise von William Coetzee, USA, zur Verfügung gestellt (Pountney et al., 2001; Yoshida et al., 2004). Ein Peptid mit derselben Sequenz, wie sie für die Immunisierung verwendet worden war, wurde

von der Firma Metabion bezogen. Zusätzlich wurde ein kommerziell erhältlicher Antikörper gegen die Kir 6.1-Untereinheit (einschließlich des zur Immunisierung verwendeten Peptids) von der Firma Alomone bezogen, ebenso ein Antikörper (und Peptid) gegen die Kir 6.2-Untereinheit. Für die SUR 2B-Untereinheit wurde von der Firma Chemicon ein Antiserum hergestellt. Das entsprechende Peptid (Sequenz: SLLAQENGVFASFVRADM) für die Immunisierung im Kaninchen wurde von der Firma GL Biochem LTD (Shanghai, China) hergestellt und zur Immunisierung an KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) konjugiert.

Immunhistochemische Versuche dienten der Lokalisation des Proteins der Kir 6.1- und SUR 2B-Untereinheiten auf Schnitten (5 µm) von Ovarien und Uteri des Menschen bzw. Affen. Es wurde wie folgt vorgegangen:

- 4 x 3 Minuten Xylol zum Entparaffinieren der Schnitte
- 2 x 3 Minuten 100 % Isopropanol, jeweils 1 x 3 Minuten 96 %, 90 %, 80 %, 70 % Isopropanol
- 3 x 5 Minuten PBS
- 20 Minuten blockieren der endogenen Peroxidase mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 %) in Methanol
- 3 x 5 Minuten PBS
- 30 Minuten Mikrowellenvorbehandlung
- 3 x 5 Minuten PBS
- Inkubation der Schnitte über Nacht bei 4 °C mit dem Erstantikörper. Alle Verdünnungen wurden mit folgender Lösung hergestellt: Normalserum des Zweitantikörpers (Ziege, 5 %, zuvor für 30 Minuten bei 56 °C inkubiert), BSA (0,5 %), 0,05 % NaN<sub>3</sub> (0,05 %) in PBS (10 mM), pH 7,4. Folgende Erstantikörper bzw. Kontrollen wurden eingesetzt:
  - a) Kir 6.1 (1:2000)
  - b) Kir 6.2 (1:1000)
  - c) SUR 2B (1:5000)
  - d) Kontrollen
    - 1) Kein Erstantikörper
    - 2) Normalserum des Erstantikörpers (Kaninchen)
    - 3) Kir 6.1 + Peptid (1:10), dann verdünnt (1:1000)
    - 4) SUR 2B + Peptid (1:1), dann verdünnt (1:5000)
- 3 x 5 Minuten PBS

- 2 h R.T. Zweitantikörper (gegen Kaninchen gerichtet), 1:500
- 3 x 5 Minuten PBS
- 1 h R.T. ABC Elite Komplex
- 3 x 5 Minuten PBS
- 1 x 5 Minuten Tris-HCl
- 5 Minuten Diaminobenzidin (DAB)-Reaktion (Vectastain Elite Kit, Vector Laboratories; Mayerhofer et al., 1999a; Fritz et al., 2001b)
- 1 x 5 Minuten PBS
- Aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 %)
- Eindeckelung

Um die Spezifität der Antigen-Antikörper-Reaktion zu überprüfen, wurde der Erstantikörper entweder durch das Peptid, das zur Immunisierung verwendet worden war, präadsorbiert, durch Normalserum des Erstantikörpers (Kaninchen, 1:5000) ersetzt oder ganz weggelassen. Zur Präadsorption wurde der Antikörper für 2 h bei R.T. mit einem zehnfachen oder hundertfachen Überschuss an Peptid (Volumenprozent, empirisch herausgefunden) inkubiert und anschließend bei 10000 U/Min. für 5 Minuten mit der Biofuge pico (Heraeus) abzentrifugiert. Der Überstand wurde wie der entsprechende Antikörper verdünnt.

### 3.5 Immunzytochemie/Immunfluoreszenz

- Deckgläschen mit humanen GZ (Tag 3) 2 x mit PBS (4 °C) spülen.
- 30 Minuten fixieren mit PFA (4 % in 0,01 M PBS, pH 6,8)
- 3 x 5 Minuten PBS, pH 7,4
- 3 x 10 Minuten KPBS (0,02 M)
- 1 x 10 Minuten inkubieren mit KPBS (Normalserum/Triton)
- Über Nacht bei 4 °C inkubieren mit Erstantikörper gelöst in KPBS (Normalserum/Triton) (Kir 6.1: 1:500, SUR 2B: 1:5000). Außerdem Kontrolle durch Präadsorption des Erstantikörpers durch das Peptid, das zur Immunisierung verwendet worden war (siehe Abschnitt 3.4). Der Überstand wurde mit KPBS (Normalserum/Triton) verdünnt (Kir 6.1: 1:1000; SUR 2B: 1:5000).
- 3 x 10 Minuten KPBS (0,02 M)
- 1 x 10 Minuten inkubieren mit KPBS (Normalserum/Triton)

- 1 h bei R.T. im Dunkeln inkubieren mit FITC-markiertem Zweitantikörper (1:200 gelöst in KPBS (Normalserum/Triton); Dianova)
- 3 x 10 Minuten KPBS (0,02 M) im Dunkeln
- 1 x 5 Minuten H<sub>2</sub>O bidest. im Dunkeln
- Eindecken mit Prolong Antifade Kit (Molecular Probes) im Dunkeln

Anschließend erfolgte Fluoreszenz Imaging der Deckgläschen am konfokalen Mikroskop TCS SP2 (Leica Microsystems) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und Emissionswellenlänge von 530 nm.

### 3.6 Immungoldfärbung und Elektronenmikroskopie

An humanen GZ wurde für die Kir 6.1- und SUR 2B-Untereinheit eine Immungoldfärbung mit anschließender elektronenmikroskopischer Betrachtung durchgeführt. Die Durchführung erfolgte wie bei Höhne-Zell et al. (1996) beschrieben.

Humane GZ wurden mit PFA (2 %)/Glutaraldehyd (0,5 %) in PBS für 1 h fixiert und in Lowicryl (K4M, Polysciences Europe) eingebettet. Es wurden Ultradünnschnitte von etwa 50-100 nm für die Betrachtung im Elektronenmikroskop hergestellt und diese auf Nickel-Trägernetze (Grids) aufgezogen.

- Inaktivierung unspezifischer Aldehydgruppen mit Glycin (50 mM) in PBS für 15 Minuten
- Blockierung: 30 Minuten in BSA (5 %) und Normalserum (1 %) (Spezies des Zweitantikörpers)
- 3 x 5 Minuten BSA-C-Puffer (Aurion) (0,1 %) in PBS pH 7,4
- Inkubation mit dem Erstantikörper (Kir 6.1: 1:500-1:1000, SUR 2B: 1:1000) in BSA-C-Puffer über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Zusätzlich Kontrolle durch Präadsorption des Erstantikörpers durch das zur Immunisierung verwendete Peptid (siehe Abschnitt 3.4) (Kir 6.1: 1:10 und 1:100; SUR 2B: 1:2)
- 6 x 5 Minuten BSA-C-Puffer
- Inkubation mit Auro-Probe (Aurion) IgG-Au (10 nm) 1:20 in BSA-C-Puffer für 2-4 h bei R.T.
- 6 x 5 Minuten BSA-C-Puffer

- 3 x 5 Minuten PBS
- 5-10 Minuten Nachfixierung mit Glutaraldehyd (2 %) in PBS
- 1 x 5 Minuten PBS
- 5 x 2 Minuten H<sub>2</sub>O bidest.
- Die Schnitte wurden für 5 Minuten mit Uranylacetat (2 %) und für 3 Minuten mit Bleicitrat (2,7 %) kontrastiert (Reynolds, 1963).

Die so präparierten Zellen wurden im Elektronenmikroskop EM 10 (Carl Zeiss) betrachtet, fotografiert und die Bilder digitalisiert.

### 3.7 Elektronenmikroskopie und Zellmorphologie

Humane GZ wurden auf Petrischalen (Ø 35 mm) für fünf Tage kultiviert, wobei sie an Tag 4 mit folgenden Reagenzien behandelt wurden: H<sub>2</sub>O bidest. (Kontrolle), hCG (10 IU/ml), DMSO (0,1 %), hCG (10 IU/ml)/DMSO (0,1 %), Glibenclamid (10 µM), hCG (10 IU/ml)/Glibenclamid (10 µM) und Diazoxid (100 µM). Anschließend wurden die Zellen mit Glutaraldehyd (2,5 %) in Natrium-Cacodylat-Puffer I für 1 h fixiert. Dann wurden die Zellen 2 x 5 Minuten in PBS (10 mM) gewaschen. Die Postfixierung erfolgte für 1 h in einer Mischung aus Osmiumtetroxid (0,04 M) und Kaliumhexacyanoferrat (II) (0,1 M). Anschließend wurden die Zellen nochmals 2 x 5 Minuten in PBS (10 mM) gewaschen. Dann wurden die Präparate je 10 Minuten mit Ethanol (50 %, 70 %, 80 %, 95 %) und 3 x 10 Minuten mit Ethanol (100 %) versetzt, um sie zu entwässern. Anschließend wurden sie 10 Minuten in Epon (Merck)/Ethanol 1:1, 20 Minuten in Epon/Ethanol 2:1, 2 x 20 Minuten in Epon (100 %) und über Nacht in Epon (100 %) bei R.T. inkubiert, um den Ethanol zu entfernen.

Anschließend erfolgte die Polymerisation des Epon-Harzes für 16 bis 24 h bei 60 °C. Die erhärtete Scheibe wurde in flüssigen Stickstoff getaucht, um die Petrischale leichter ablösen zu können. Aus dieser Scheibe wurden Stücke herausgesägt und auf Halterungen geklebt. Dann wurden Ultradünnschnitte (50-100 nm) der Probenstücke hergestellt und mit Uranylacetat (2 %)/Bleicitrat (2,7 %) kontrastiert (Reynolds, 1963). Diese wurden im Elektronenmikroskop EM 10 (Carl Zeiss) betrachtet, fotografiert und die Bilder digitalisiert.

Von denselben Probenstücken wurden Semidünnschnitte (1 µm) hergestellt, die mit Azur II/Methylenblau gefärbt und im Lichtmikroskop (Axioplan, Zeiss) betrachtet und fotografiert wurden, um eine Aussage zu morphologischen Veränderungen der Zellen durch die Behandlung machen zu können.

### **3.8 cDNA-Array**

Zur Untersuchung der Genexpression in humanen GZ wurde der Human G Protein-coupled Receptors Signaling Pathway Finder Gene Array (Super Array) verwendet. Zur Gewinnung von mRNA als Ausgangsmaterial für cDNA wurden humane GZ an Tag 3 für 24 h jeweils mit DMSO (0,1 %), Diazoxid (100 µM), Glibenclamid (10 µM) oder H<sub>2</sub>O bidest. (Kontrolle) behandelt. Zellen mehrerer Zellchargen wurden gemischt. Anschließend wurden die Zellen abgenommen und die mRNA wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben präpariert. Dann wurde die mRNA mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt, mit 10 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,5) und 275 µl Ethanol (100 %) versetzt und bei -20 °C über Nacht ausgefällt. Am nächsten Tag wurde für 60 Minuten zentrifugiert (10000 U/Min.). Das dabei entstehende Pellet wurde mit Ethanol (70 %) resuspendiert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet getrocknet, bis der Ethanol entfernt war. Die gewonnene mRNA wurde in 10 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Es erfolgte RT (siehe Abschnitt 3.2.2.1) mit jeweils 3,5 µg mRNA und Biotin-dUTP. Anschließend wurde der Array mit Prähybridisierungslösung versetzt. Über Nacht erfolgte Hybridisierung der biotinylierten cDNA-Proben mit den auf der Membran des Arrays befindlichen Genproben. Für die Chemilumineszenzdetektion des Gene Arrays wurde der GEArray Chemiluminescent Detection Kit verwendet. Anschließend erfolgte die Belichtung des Gene Arrays mit Hilfe des Chemilumineszenzsystems Chemi-Smart 5000 (Pepqab, Vilber Lourmat) und des Programms ChemiCapt (Mayerhofer et al., 1997).

### **3.9 Steroidhormonbestimmung**

#### **3.9.1 Progesteron**

Humane GZ wurden an Tag 3 für 24 h mit H<sub>2</sub>O bidest. (Kontrolle), hCG (10 IU/ml), DMSO (0,1 %), hCG (10 IU/ml)/DMSO (0,1 %), Glibenclamid (10 µM) und hCG (10 IU/ml)/Glibenclamid (10 µM) behandelt. Um die Progesteronkonzentration im



Kulturmedium der so behandelten humanen GZ zu bestimmen, wurde der Progesteron Assay EIA-1561 (DRG Instruments) verwendet. Dafür wurden die Überstände der Kulturschalen unbehandelter und unterschiedlich behandelter humaner GZ 1:500 verdünnt. Standards und Proben wurden in Mikrotiterstrips, die mit Progesteronantiserum beschichtet waren, pipettiert. Anschließend wurde eine definierte Menge an Enzymkonjugat (Progesteron-Meerrettichperoxidase-Konjugat) hinzugegeben. Hierbei wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Mikrotiterplatten wurden für 1 h bei R.T. inkubiert und anschließend dreimal mit einem Waschpuffer gewaschen. Während der Inkubation konkurriert das Progesteron des Standards oder der Probe mit dem Progesteronenzymkonjugat um die freien Bindungsstellen auf der festen Phase. Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend wurde das Chromogen (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) hinzugegeben und 15 Minuten bei R.T. inkubiert. Dann wurde die Mikrotiterplatte mit Stopplösung versetzt, um die Farbentwicklung zu beenden, und die Extinktion bei 450 nm gemessen (Fluostar Optima, BMG Labtech). Die Menge an gebundenem Enzymkonjugat ist umgekehrt proportional zur Progesteronkonzentration in der Probe. Aus den Progesteronstandards (0; 0,25; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 ng/ml, Zweifachbestimmung) konnte nun eine Eichkurve erstellt werden, aus der die Progesteronkonzentrationen der Proben abgelesen werden konnten. Anschließend wurde der Mittelwert aus den Dreifachbestimmungen gebildet.

### **3.9.2 Testosteron und Östradiol**

Humane GZ wurden für 3 h bzw. 24 h mit H<sub>2</sub>O bidest. (Kontrolle), DMSO (0,1 %), Diazoxid (100 µM) und Glibenclamid (10 µM) behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen für 3 h oder 6 h mit Testosteron (10 nM) versetzt. Die Überstände wurden abgenommen und die Testosteron- und Östradiolkonzentrationen bestimmt (Dreifachbestimmungen).

Für die Bestimmung der Testosteronkonzentrationen wurde der Testosteron Assay EIA-1559 (DRG Instruments) verwendet. Diesem liegt das gleiche Messverfahren wie dem der Progesteronbestimmung zugrunde. Die Proben wurden jedoch unverdünnt gemessen.

Für die Bestimmung der Östradiolkonzentrationen wurde der Östradiol Assay EIA-2693 (DRG Instruments) verwendet. Auch hier war das Verfahren dasselbe wie bei der Progesteronbestimmung. Die Proben wurden in diesem Fall unverdünnt bzw. 1:5 verdünnt gemessen.

### **3.9.3 Bestimmung der Testosteronumsetzung durch das Enzym Aromatase**

Humane GZ wurden für 1 h mit Formestan (200 ng/ml (0,66  $\mu$ M), 1  $\mu$ g/ml (3,3  $\mu$ M), 2,5  $\mu$ g/ml (8,3  $\mu$ M)) und Testosteron (10 nM) versetzt. Die Überstände wurden abgenommen und es erfolgte die Bestimmung der Testosteronmenge wie in Abschnitt 3.9.2 beschrieben (Dreifachbestimmungen).

### **3.10 Proliferationsassay**

Um das proliferative Verhalten der humanen GZ zu untersuchen, wurde der Cell Titer 96 Aqueous Assay (Promega) verwendet. Dazu wurden humane GZ in einer 24-Well-Platte (Nunc) ausgesät und von Tag 1 bis Tag 3 mit H<sub>2</sub>O bidest. (Kontrolle), DMSO (0,1 %), Diazoxid (100  $\mu$ M) und Glibenclamid (10  $\mu$ M) behandelt. An Tag 3 wurden die humanen GZ mit 500  $\mu$ l EZ-Lösung, die 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazol (MTS) (317  $\mu$ g/ml bzw. 0,65 mM) enthielt, versetzt und etwa 20 Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 490 nm gemessen (Fluostar Optima, BMG Labtech). Der Hintergrund (EZ-Lösung+MTS) wurde abgezogen. Dem Proliferationsassay liegt folgendes Prinzip zugrunde: MTS wird durch mitochondriale Aktivität der Zellen zu farbigem Formazan umgesetzt, das im Kulturmedium löslich ist. Man nimmt an, dass diese Reaktion in metabolisch aktiven Zellen durch NADPH oder NADH katalysiert wird, das durch Dehydrogenasen produziert wird (Berridge und Tan, 1993). Aus der mitochondrialen Aktivität kann man auf die Anzahl an lebenden Zellen in Kultur und damit auf eine Proliferation der Zellen schließen. Dieser Zusammenhang beruht auf der Annahme, dass die aktiven Zellen in etwa gleich groß sind und eine gleiche Mitochondrienaktivität und -dichte aufweisen.

### **3.11 Färbung von Lipiden mit dem Farbstoff Nilrot**

Nilrot (Invitrogen) ist ein Farbstoff, mit dem sich Lipide, vor allem neutrale Lipidtröpfchen, in Zellen anfärben lassen. Nilrot fluoresziert in polaren

Lösungsmitteln wesentlich schwächer als in unpolaren Umgebungen wie Membranen oder Lipidtröpfchen.

Um die Verteilung von Lipiden in humanen GZ zu untersuchen, wurden diese für 24 h auf Deckgläschen mit H<sub>2</sub>O bidest. (Kontrolle), DMSO (0,1 %), hCG (10 IU/ml), DMSO (0,1 %) und hCG (10 IU/ml), Glibenclamid (10 µM) und hCG (10 IU/ml) behandelt. Dann wurden die Deckgläschen mit PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten mit 1 ml farblosem F12/DME (+)-Medium (1 µM Nilrot/0,01 % DMSO) inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen nochmals mit PBS gespült und in der Badkammer (Delta T Dish, 0,17 mm, Bioprotechs Inc.) mit 500 µl farblosem F12/DME (+)-Medium versetzt. Die Messung erfolgte am konfokalen Mikroskop TCS SP2 (Leica Microsystems) bei Anregungs- und Emissionswellenlängen von 540 nm und 590 nm. Zur Auswertung wurde die Fluoreszenzintensität pro Zellfläche bestimmt (Leica Confocal Software, Version 2.61, Leica Microsystems).

### **3.12 Fluoreszenzmikroskopische Messung des Membranpotentials**

Änderungen des Membranpotentials können anhand der Verteilung eines Fluoreszenzfarbstoffs über die Plasmamembran beobachtet werden. Bei Depolarisation dringt der anionische Farbstoff DiBAC<sub>4</sub>(3) leichter in die Zelle ein und tritt mit intrazellulären Proteinen und Lipiden in Wechselwirkung. Dadurch nimmt die Fluoreszenzintensität zu. Bei Hyperpolarisation wird die Konzentration des Farbstoffs in der Zelle geringer, die Fluoreszenzintensität nimmt ab. Beim anionischen Fluoreszenzfarbstoff DiBAC<sub>4</sub>(3) (Bis-(1,3-dibutylbarbitursäure)-trimethinoxonol) (Molecular Probes) (Baczko et al., 2004; Langheinrich und Daut, 1997; Yamada et al., 2001) handelt es sich um einen Farbstoff, der im Vergleich zu anderen anionischen Fluoreszenzfarbstoffen eine sehr hohe Sensitivität aufweist (1 %/mV, Angaben des Herstellers), was für die Messung der relativ kleinen Änderungen des Membranpotentials humaner GZ notwendig war. DiBAC<sub>4</sub>(3) verteilt sich jedoch nur relativ langsam durch die Membran (zeitliche Auflösung etwa 30 s).

Für den Versuch wurden humane GZ, die 5 bis 10 Tage auf Deckgläschen kultiviert worden waren, mit EZ-Lösung mit DiBAC<sub>4</sub>(3) (500 nM) in der Badkammer (Delta T Dish, 0,17 mm, Bioprotechs Inc.) inkubiert und mit dieser Lösung auch permanent umspült, bis eine gleichmäßige Verteilung des Farbstoffs und damit ein

stabiles Fluoreszenzsignal erreicht war. Somit sollten spätere mechanische Effekte durch das Anströmen der Lösungen vermieden werden. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität

- bei Zugabe von EZ-Lösung (mit DiBAC<sub>4</sub>(3))
- bei Zugabe von Diazoxid (100 µM) bzw. Minoxidil (1 µM) gelöst in EZ-Lösung mit DiBAC<sub>4</sub>(3)
- bei Zugabe von Glibenclamid (10 µM) gelöst in EZ-Lösung mit DiBAC<sub>4</sub>(3)

gemessen. Die Änderungen der Fluoreszenzintensität wurden mit dem konfokalen Mikroskop TCS SP2 und der Leica Confocal Software (Version 2.61, Leica Microsystems) für 30 Minuten alle 5 s bei Anregungs- und Emissionswellenlängen von 488 nm und  $520 \pm 20$  nm gemessen.

### **3.13 Fluoreszenzmikroskopische Messung des mitochondrialen Membranpotentials**

DePsipher (5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin; R&D Systems) ist ein lipophiles Kation, das für Messungen des mitochondrialen Membranpotentials benutzt wird. Das Kation aggregiert bei Hyperpolarisation der mitochondrialen Membran und zeigt dabei orange-rote Fluoreszenz. Die Aggregate lassen sich an der punktförmigen Verteilung erkennen. Wenn das mitochondriale Membranpotential zusammenbricht, liegen weniger Aggregate des Farbstoffs im Mitochondrium vor und mehr Monomere. Die Monomere zeigen grüne Fluoreszenz und sind gleichmäßig verteilt. Die Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm wurde am konfokalen Mikroskop TCS SP2 (Leica Microsystems) in zeitlichen Abständen von 10 s bestimmt. Dabei wurde in einem Kanal die orange-rote Fluoreszenz ( $605 \pm 15$  nm) der Farbstoffaggregate und im anderen Kanal die grüne Fluoreszenz der Monomere ( $530 \pm 15$  nm) gemessen (Ishida et al., 2004). Die Werte wurden über mehrere Einzelzellen gemittelt. Als Maß für Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials wurde das Verhältnis der grünen zur roten Fluoreszenzintensität ( $I_{530}/I_{605}$ ) verwendet (Leica Confocal Software, Version 2.61, Leica Microsystems).

Humane GZ auf Deckgläschen (zwischen Tag 5 und Tag 6) wurden mit DePsipher (10 µg/ml) in Kulturmedium für 30 Minuten bei 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> beladen. Anschließend wurde das Deckgläschen mit EZ-Lösung gewaschen und in eine

Badkammer (Delta T Dish, 0,17 mm, Bioprotechs Inc.) mit EZ-Lösung überführt. Zunächst wurde der  $K_{ATP}$ -Öffner Diazoxid (100  $\mu$ M) und anschließend der  $K_{ATP}$ -Inhibitor Glibenclamid (10  $\mu$ M) appliziert. Danach wurde der Protonophor und Entkoppler CCCP (Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon, Sigma-Aldrich) (2  $\mu$ M) appliziert.

### **3.14 Elektrophysiologie**

#### **3.14.1 Aufbau des Messplatzes**

Damit die Patch-Clamp-Experimente erfolgreich durchgeführt werden konnten, musste der Messplatz gegen mechanische Schwingungen gedämpft sein. Daher war die Patch-Apparatur an der Außenwand des Gebäudes auf dem schwingungsgedämpften Tisch VH-3848-OPT-3 (Newport) aufgestellt. Der Arbeitstisch bestand aus zwei Stahlplatten, die über eine Druckluftregelung in der Horizontalen ausbalanciert wurden. Auf dem Arbeitstisch befand sich das inverse Mikroskop Axiovert 135 TV (Zeiss). Der Mikromanipulator Patchman (Eppendorf) erlaubte Bewegungen von 157 nm-Schritten in alle Richtungen. Der Messplatz war von einem Faradaykäfig umgeben, um ihn gegen Einstreuungen elektromagnetischer Wechselfelder abzuschirmen. Alle Kabel und Schläuche, die vom Messplatz nach außen führten, wurden auf der Arbeitsplatte fixiert, um das Auftreten mechanischer Schwingungen zu reduzieren. Um elektrisches Rauschen zu minimieren, war die gesamte Apparatur ausgehend vom Erdungsanschluss des Patch-Clamp-Verstärkers EPC 9 (Heka) mit Kupfergewebeband geerdet. Die Rauschamplitude betrug etwa 1-2 pA.

#### **3.14.2 Perfusionssystem**

Für die Messungen wurden Deckgläschen mit Zellen, die wie oben beschrieben präpariert worden waren, in eine als Badkammer verwendete Petrischale ( $\varnothing$  35 mm) gelegt. Die Deckgläschen wurden durch kurzes Andrücken mit einer Pinzette fixiert, um ein Verrutschen während der Messung zu vermeiden. Der Zu- und Ablauf verschiedener Lösungen erfolgte mit einem doppelt angelegten Perfusionssystem. Die Applikations- und Absaugkanülen wurden manuell in unmittelbarer Nähe der zu untersuchenden Zellen positioniert. Für Inside-Out-Messungen wurden die Zu- und Abläufe etwas oberhalb der Zellen positioniert.

Testlösungen wurden mit Hilfe der Mehrkanalapplikationsnadel und des Substanzzulaufsystems ValveLink8 (AutoMate Scientific/Science Products) zugegeben. Durch das Drucksteuergerät MPCU-3 (Lorenz) konnte die Zulaufgeschwindigkeit der Testlösungen reguliert werden. Auf der gegenüberliegenden Seite gab es eine Kanüle zum Absaugen der Testlösungen. Die Geschwindigkeit der Absaugung wurde über die Spritzenpumpe 540120 (TSE) eingestellt. Um den Flüssigkeitsspiegel in der Badkammer stets konstant zu halten und somit eine Störung der Messung zu vermeiden, wurde ebenfalls über die Spritzenpumpe mit einer zweiten Applikationskanüle, die tiefer in die Badlösung tauchte, ständig frische EZ-Lösung pulsfrei zugeführt. Vor Beginn einer Messung wurde überschüssige Badlösung an der Oberfläche mit einer Membranpumpe N86KN.18 (Roth) abgesaugt. Dadurch konnten gleichzeitig Staubteilchen entfernt werden, welche die Spitze der Patchpipette beim Eintauchen in die Lösung eventuell kontaminiert und die Messung behindert hätten.

### **3.14.3 Elektroden**

Um Ströme über die Zellmembranen zu messen, wurden Ag/AgCl-Elektroden verwendet. Die Messelektrode sollte gleichmäßig chloriert sein und musste, wenn der Überzug nicht mehr durchgängig war, neu chloriert werden, um systematische Messfehler auszuschließen. Dazu wurde ein Silberdraht ( $\varnothing$  0,5 mm) zunächst mit  $\text{NH}_3$  (25 %) gereinigt und anschließend dessen Oberfläche mit Salpetersäure (30 %) angeätzt. Danach wurde er in Salzsäure (0,1 M) getaucht. Die zu chlorierende Elektrode wurde mit dem Pluspol (Anode, Oxidation), ein Hilfsdraht mit dem Minuspol (Kathode) verbunden. Bei 4 V Gleichspannung wurde ein Strom von 10 mA für etwa 10 Minuten angelegt, bis sich auf der Oberfläche erst ein schwarzer und kurz darauf ein mattgrauer Belag bildete.

Als Referenzelektrode diente eine gesinterte Ag/AgCl-Elektrode (Science Products). Die Referenzelektrode tauchte in EZ-Lösung und stand über eine Agarbrücke (2 % Peggold-Agarose in KCl-Lösung (150 mM)) mit der Badlösung in Verbindung.

### **3.14.4 Patch-Pipetten**

Um einen Gigaseal, d.h. eine optimale Abdichtung zwischen Zellmembran und Messpipette, erreichen zu können, mussten Pipettenspitzen mit entsprechend

kleinem Durchmesser hergestellt werden. Dazu wurden Glaskapillaren aus Borosilikatglas GB150-8P (Science Products) verwendet, die auf dem Universalpuller DMZ (Zeitz, Augsburg) in drei Arbeitsschritten ausgezogen wurden. Um einen geringen Pipettenwiderstand zu erzielen, wurde der Puller so eingestellt, dass relativ konstant Pipettenspitzen mit einem Durchmesser von etwa 1  $\mu\text{m}$  hergestellt werden konnten. Im Anschluss an das Ziehen der Pipetten wurde die Spitze durch den Puller hitzepoliert, um scharfe Kanten, die durch das Auseinanderbrechen der Kapillare entstanden sein konnten, glatt zu schmelzen.

Die Pipetten wurden anschließend mit intrazellulärer Lösung befüllt. Dazu wurde die Spitze in filtrierte Lösung eingetaucht und es wurde über eine Spritze mit angelegtem Schlauch ein Unterdruck erzeugt. Anschließend wurde die Pipette mit Hilfe einer Befüllnadel etwa bis zur Hälfte befüllt und in den Pipettenhalter eingesetzt, so dass die Ag/AgCl-Elektrode schließlich gerade in die Lösung eintauchte. Ein zu hohes Füllvolumen wurde vermieden, um zu verhindern, dass die IZ-Lösung im Pipettenhalter überlaufen und dadurch möglicherweise Kriechströme hervorrufen konnte.

#### **3.14.5 Messung**

Um ein Verstopfen der Pipette mit eventuell vorhandenen Staubteilchen in der EZ-Lösung zu vermeiden, wurde durch ein Druckregelsystem vor dem Eintauchen in die Badlösung ein Überdruck von 3 bis 8 cm Wassersäule am hinteren Pipettenende angelegt. Durch einen automatisch angelegten Spannungspuls wurden bis zur Herstellung der Whole-Cell-Konfiguration die elektrischen Parameter der Pipette und der Zelle mitverfolgt. Beim Eintauchen in die EZ-Lösung der Badkammer sollte sich ein Pipettenwiderstand von 2 bis 5  $\text{M}\Omega$  ergeben. Der Widerstand sollte auch noch in diesem Bereich liegen, wenn sich die Pipette nach optisch kontrollierter Annäherung in unmittelbarer Nähe der Zelle befand. In dieser Position wurden Offset-Potentiale korrigiert. Nun erfolgte die Annäherung der Pipette an die Zellmembran im Stepmodus. Hierbei wurde die Audiomonitorfunktion zu Hilfe genommen, um die leichte Zunahme des Widerstands akustisch verfolgen zu können. Dies war hilfreich, um bei den sehr flachen humanen GZ die Pipette rechtzeitig anhalten zu können. Wenn sich der Widerstand um etwa 1  $\text{M}\Omega$  erhöht hatte, wurde der Überdruck verringert bzw. ein Unterdruck von 15 bis 20 cm Wassersäule angelegt, was nach kurzer Zeit zu

einem sprunghaften Anstieg des Widerstandes auf mehrere  $G\Omega$  (sog. Gigaseal) führte. Nach kurzem Abwarten konnte die Zelle im On-Cell-Modus gemessen werden oder sofort in den Whole-Cell-Modus übergegangen werden. Um die Whole-Cell-Konfiguration zu erreichen, wurde ein kurzer Spannungspuls (700-1000 mV für 100  $\mu$ s) angelegt und gleichzeitig mit Hilfe einer Spritze (100  $\mu$ l) ein kurzer und schneller Unterdruck erzeugt, der zum Durchbrechen der Membran führte, was an einer Zunahme des transienten kapazitiven Stroms erkennbar war. Für die Inside-Out-Messungen wurde als Badlösung EZ-Lösung und als Pipettenlösung IZ-Lösung verwendet. Zum Erreichen der Inside-Out-Konfiguration wurde zunächst wie oben beschrieben ein On-Cell-Patch hergestellt. Wenn der Gigaseal stabil war, wurde die Pipette durch den Mikromanipulator rasch von der Zelle weg nach oben bewegt. Dabei bildete sich ein kleines Vesikel. Nach kurzem Abwarten in der Lösung wurde der Patch aus der Lösung hinausbewegt und nach etwa 3 s wieder in die Lösung eingetaucht, wodurch eine Seite der Vesikelmembran durchriss. Die Innenseite des intakten Membranstücks war nun zur Badlösung und die Außenseite zur Pipettenlösung gewandt. Der Gigaseal blieb erhalten und die Zelle konnte nun im Inside-Out-Modus gemessen werden.

### 3.14.6 Messprotokolle

Für die dargestellten elektrophysiologischen Messungen wurden verschiedene Spannungssequenzen zur elektrischen Stimulation der Zellen verwendet. Im Whole-Cell- und im Inside-Out-Modus wurden Potentiale von  $-80$  mV bis  $+80$  mV mit einer Schrittweite von 10 mV und einer Pulsdauer von jeweils 200 ms angelegt (Abbildung 3.1).

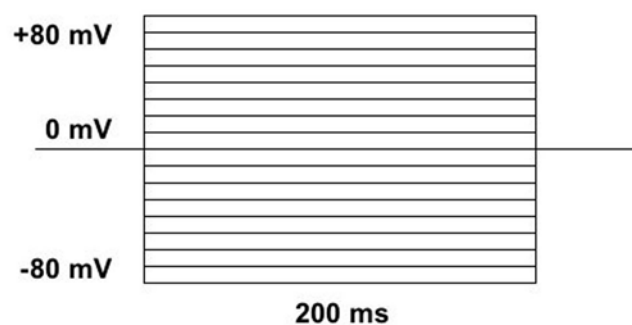


Abbildung 3.1: Pulsprotokoll für Whole-Cell- und Inside-Out-Messungen. Potentiale von  $-80$  mV bis  $+80$  mV mit einer Schrittweite von 10 mV und einer Pulsdauer von jeweils 200 ms.



### **3.14.7 Software und Auswertung**

Zur Aufnahme und Auswertung der elektrophysiologischen Messungen wurde das Programm Pulse (Heka) verwendet. Zur Auswertung der Daten diente das Programm Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Zur Auswertung der Inside-Out-Messungen wurden aus den aufgenommenen Stromspuren die Einzelkanalamplituden abgelesen und gegen die angelegte Spannung aufgetragen. Die angelegten Spannungen wurden um den Wert des Liquid Junction Potentials (+16 mV; Kunz et al., 2006a) korrigiert. Das Anlegen einer Ausgleichsgeraden durch diese Punkte und Ermittlung der Steigung lieferte die Einzelkanalleitfähigkeit in Siemens [S].

Zur Auswertung der Whole-Cell-Messungen wurden die registrierten Ströme gegen die angelegten Spannungen aufgetragen. Den sich daraus ergebenden Punkten wurde ein Ausgleichspolynom 3. Grades (I/V-Kennlinie) angepasst. Aus dem Nulldurchgang ( $I = 0$  A) dieser I/V-Kennlinie ergab sich das Membranpotential der Zelle.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Molekularbiologische Charakterisierung

#### 4.1.1 Identifikation des $K_{ATP}$ in humanen GZ und im humanen Ovar

Zur Untersuchung der molekularen Identität der Untereinheiten des  $K_{ATP}$  wurden zunächst RT-PCR-Versuche durchgeführt. Die mRNA wurde dabei aus der Gruppe „normaler“ humaner GZ gewonnen, die vier Tage in Kultur waren. Nach der RT erfolgte eine PCR mit spezifischen Primern für die Kir 6.x- und SUR-Untereinheiten. Um die Primer und die PCR-Bedingungen zu überprüfen, wurden PCR-Versuche mit cDNA aus kommerziell erhältlichen Proben unterschiedlicher Gewebe durchgeführt, in denen die verschiedenen Untereinheiten des  $K_{ATP}$  beschrieben sind. Dabei konnten die Kir 6.1- und die SUR 2B-Untereinheit in cDNA vom glatten Muskel im Dünndarm (Abbildung 4.1 und 4.5), die Kir 6.2- und die SUR 1-Untereinheit in cDNA vom Pankreas (Abbildung 4.2 und 4.3) und die SUR 2A-Untereinheit in cDNA vom Herzen (Abbildung 4.4) nachgewiesen werden. In cDNA des Ovars ließen sich die Untereinheiten Kir 6.1 und SUR 2B, in geringer Menge auch Kir 6.2 und SUR 1, nicht jedoch SUR 2A nachweisen. In humanen GZ ließ sich stets mRNA der Kir 6.1- Untereinheit (Abbildung 4.1) ( $n = 5$  Zellchargen) (Kunz et al., 2006b) nachweisen. Von den drei möglichen SUR-Untereinheiten enthielten alle Proben humaner GZ mRNA der SUR 2B-Untereinheit (Abbildung 4.5) ( $n = 5$  Zellchargen) (Kunz et al., 2006b). Messenger RNA der SUR 1- und der SUR 2A-Untereinheit ließ sich in humanen GZ nicht nachweisen. Für die Kir 6.2-Untereinheit ließ sich in RT-PCR-Versuchen an humanen GZ eine schwache Bande erkennen. Um die Identität der PCR-Proben zu bestätigen, wurden diese aufgereinigt und mit Hilfe der entsprechenden Primer sequenziert (jeweils 5 x durchgeführt). Sowohl bei den Kir 6.x- als auch bei den SUR-Untereinheiten war die Sequenz im amplifizierten Bereich mit der in der GenBank angegebenen identisch.

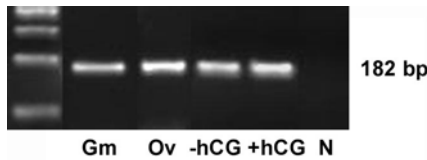


Abbildung 4.1: Amplifizierung der  $K_{ATP}$ -Untereinheit Kir 6.1 aus humaner cDNA des Glattmuskels (Gm) und des Ovars (Ov) und aus mRNA kultivierter humaner GZ ohne (-hCG) oder mit hCG-Behandlung (+hCG) (10 IU/ml, Tag 3 für 24 h). Negativkontrolle,  $H_2O$  (N).

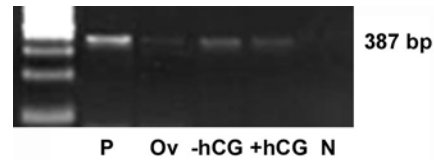


Abbildung 4.2: Amplifizierung der  $K_{ATP}$ -Untereinheit Kir 6.2 aus humaner cDNA des Pankreas (P) und des Ovars (Ov) und aus mRNA kultivierter humaner GZ ohne (-hCG) oder mit hCG-Behandlung (+hCG) (10 IU/ml, Tag 3 für 24 h). Negativkontrolle,  $H_2O$  (N).

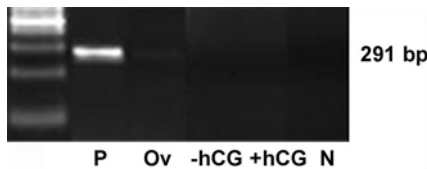


Abbildung 4.3: Amplifizierung der  $K_{ATP}$ -Untereinheit SUR 1 aus humaner cDNA des Pankreas (P) und des Ovars (Ov) und aus mRNA kultivierter humaner GZ ohne (-hCG) oder mit hCG-Behandlung (+hCG) (10 IU/ml, Tag 3 für 24 h). Negativkontrolle,  $H_2O$  (N).

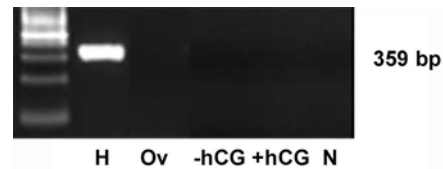


Abbildung 4.4: Amplifizierung der  $K_{ATP}$ -Untereinheit SUR 2A aus humaner cDNA des Herzens (H) und des Ovars (Ov) und aus mRNA kultivierter humaner GZ ohne (-hCG) oder mit hCG-Behandlung (+hCG) (10 IU/ml, Tag 3 für 24 h). Negativkontrolle,  $H_2O$  (N).

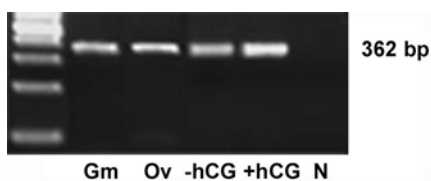


Abbildung 4.5: Amplifizierung der  $K_{ATP}$ -Untereinheit SUR 2B aus humaner cDNA des Glattmuskels (Gm) und des Ovars (Ov) und aus mRNA kultivierter humaner GZ ohne (-hCG) oder mit hCG-Behandlung (+hCG) (10 IU/ml, Tag 3 für 24 h). Negativkontrolle,  $H_2O$  (N).

Die humanen GZ wurden an Tag 3 für 24 h mit oder ohne hCG (10 IU/ml) behandelt. Es sollte untersucht werden, ob diese Behandlung eine Veränderung

der mRNA-Menge zur Folge hat. Mit Hilfe einer semiquantitativen densitometrischen Auswertung wurde die Menge der PCR-Produkte der  $K_{ATP}$ -Untereinheiten auf die von  $\beta$ -Aktin derselben Probe bezogen. Es konnten keine signifikanten Veränderungen in der mRNA-Menge von Kir 6.1 und SUR 2B zwischen unbehandelten und mit hCG behandelten humanen GZ festgestellt werden (Abbildung 4.6) ( $n = 5$  Zellchargen).

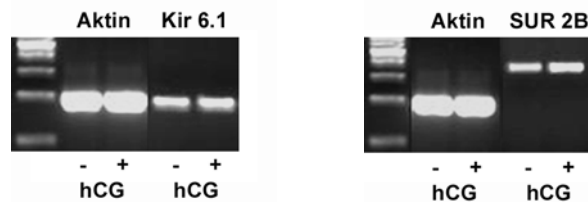


Abbildung 4.6: Nachweis der Kir 6.1- und SUR 2B-Untereinheit (ohne oder mit hCG-Behandlung (10 IU/ml) (-hCG, +hCG)) und semiquantitativer Vergleich mit  $\beta$ -Aktin (ohne oder mit hCG-Behandlung (10 IU/ml) (-hCG, +hCG)).

#### 4.1.2 Identifikation des $K_{ATP}$ im CL und Ovar des Rhesusaffen

Es wurden RT-PCR-Experimente mit cDNA-Material aus dem CL des Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) durchgeführt. In diesen Proben wurde mit Hilfe der humanen Primer die mRNA der Kir 6.1- und der SUR 2B-Untereinheit (Abbildung 4.7) nachgewiesen ( $n = 4$  cDNA-Proben).

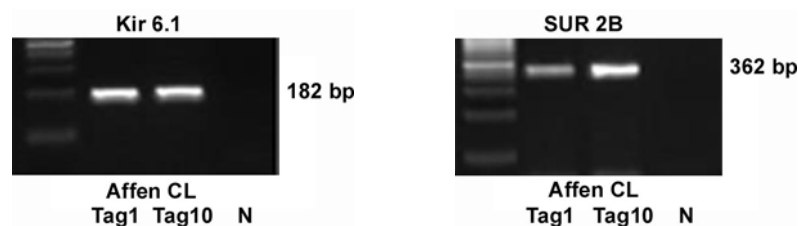


Abbildung 4.7: Nachweis der Kir 6.1- und SUR 2B-Untereinheit in cDNA-Material des CL des Rhesusaffen an Tag 1 und Tag 10 nach der Ovulation. Negativkontrolle,  $H_2O$  (N).

Vier PCR-Proben wurden jeweils sequenziert. Die Sequenzen der Kir 6.1- und SUR 2B-Untereinheiten des Rhesusaffen wurden in der GenBank unter folgenden Accession-Nummern veröffentlicht: Kir 6.1: DQ869083, SUR 2B: DQ866819. In dem sequenzierten Genabschnitt konnten im Vergleich zu den humanen Sequenzen der Kir 6.1- und SUR 2B-Untereinheiten (NM\_004982 und NM\_020297) mehrere Basenaustausche festgestellt werden. Wie aus



### 4.1.3 Nachweis und Lokalisation der $K_{ATP}$ -Untereinheiten auf Proteinebene

#### 4.1.3.1 Western Blot

Mit Hilfe von Western Blot-Experimenten wurden die  $K_{ATP}$ -Untereinheiten Kir 6.1 und SUR 2B in humanen GZ auf Proteinebene nachgewiesen (Abbildung 4.9) (Kir 6.1: n = 4 Zellchargen; SUR 2B: n = 3 Zellchargen). Das Protein wurde dafür aus humanen GZ gewonnen, die an Tag 3 für 24 h mit oder ohne hCG (10 IU/ml) behandelt worden waren. Sowohl für die Kir 6.1- als auch für die SUR 2B-Untereinheit wurden jeweils mehrere Banden detektiert. Für Kir 6.1 (erwartete Größe der Bande  $\approx$  48 kDa) waren vier Banden zu erkennen, die etwa 75 kDa, 65-70 kDa, 45-50 kDa und 20 kDa groß waren. Für SUR 2B (erwartete Größe der Bande  $\approx$  174 kDa) waren vier Banden mit den Größen von etwa 100 kDa, 75 kDa, 55 kDa und etwa 45 kDa zu erkennen. Die Färbungen sind als spezifisch zu betrachten, da sie mit dem Peptid, mit dem die Immunisierung durchgeführt worden war, blockiert werden konnten (Präadsorption). In der semiquantitativen Auswertung (siehe Abschnitt 3.3) konnte keine Veränderung in der Proteinmenge der Kir 6.1- und SUR 2B-Untereinheiten erkannt werden, wenn die Zellen mit hCG behandelt worden waren (Kir 6.1: n = 4 Zellchargen; SUR 2B: n = 3 Zellchargen).

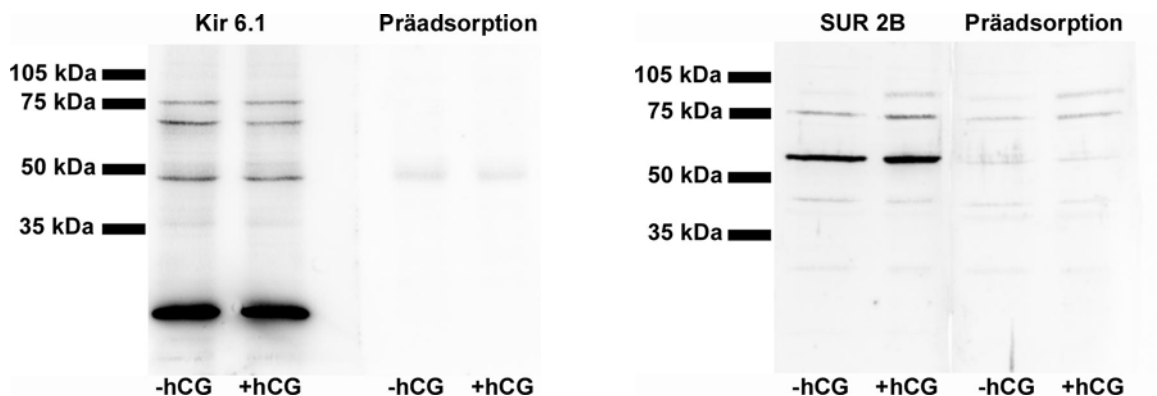


Abbildung 4.9: Nachweis der Kir 6.1- und der SUR 2B-Untereinheit in humanen GZ ohne oder mit hCG-Behandlung (10 IU/ml, Tag 3 für 24 h) (-hCG, +hCG). Jeweils rechts daneben Kontrolle nach Präadsorption des Antikörpers mit Peptid, ebenfalls ohne oder mit hCG-Behandlung (10 IU/ml, Tag 3 für 24 h) (-hCG, +hCG).

#### 4.1.3.2 Immunzytochemie

In immunzytochemischen Versuchen an kultivierten humanen GZ wurden die Kir 6.1- (Abbildung 4.10) und die SUR 2B-Untereinheit (Abbildung 4.11)

nachgewiesen (n = jeweils 2 Zellchargen). Wie anhand des Vergleichs mit dem entsprechenden Durchlichtbild zu erkennen ist, waren alle humanen GZ gefärbt. Humane GZ, die ohne Erstantikörper (Kontrolle) und solche, die mit Normalserum (Spezies des Erstantikörpers, Kaninchen) behandelt worden waren, zeigten keine Färbung. Die Spezifität der Reaktion wurde außerdem durch Präadsorption der Antikörper mit dem für die Immunisierung benutzten Peptid gezeigt.

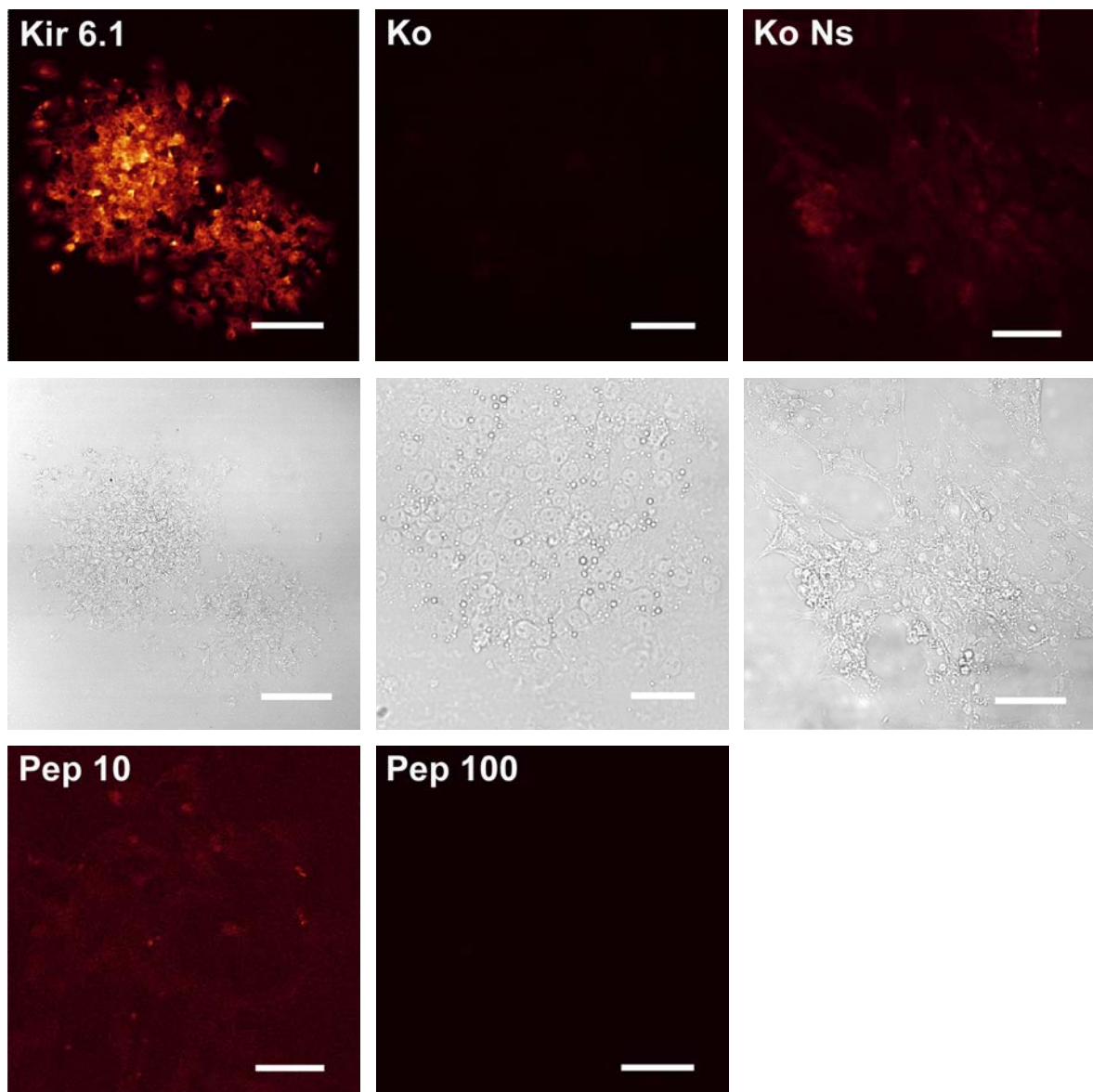


Abbildung 4.10: Nachweis der Kir 6.1-Untereinheit in immunzytochemischen Versuchen in humanen GZ. Experiment mit Erstantikörper (1:500) (Kir 6.1, Skalierungsbalken: 150  $\mu\text{m}$ , darunter Durchlichtbild). Kontrollexperiment ohne Erstantikörper (Ko); Skalierungsbalken: 50  $\mu\text{m}$ , darunter Durchlichtbild), Kontrollexperiment Normalserum Kaninchen (Ko Ns, Skalierungsbalken: 75  $\mu\text{m}$ , darunter Durchlichtbild), Kontrollexperiment nach Präadsorption des Antikörpers mit Peptid 1:10 (Pep 10, Skalierungsbalken: 75  $\mu\text{m}$ ) und Kontrollexperiment nach Präadsorption des Antikörpers mit Peptid 1:100 (Pep 100, Skalierungsbalken: 75  $\mu\text{m}$ ).

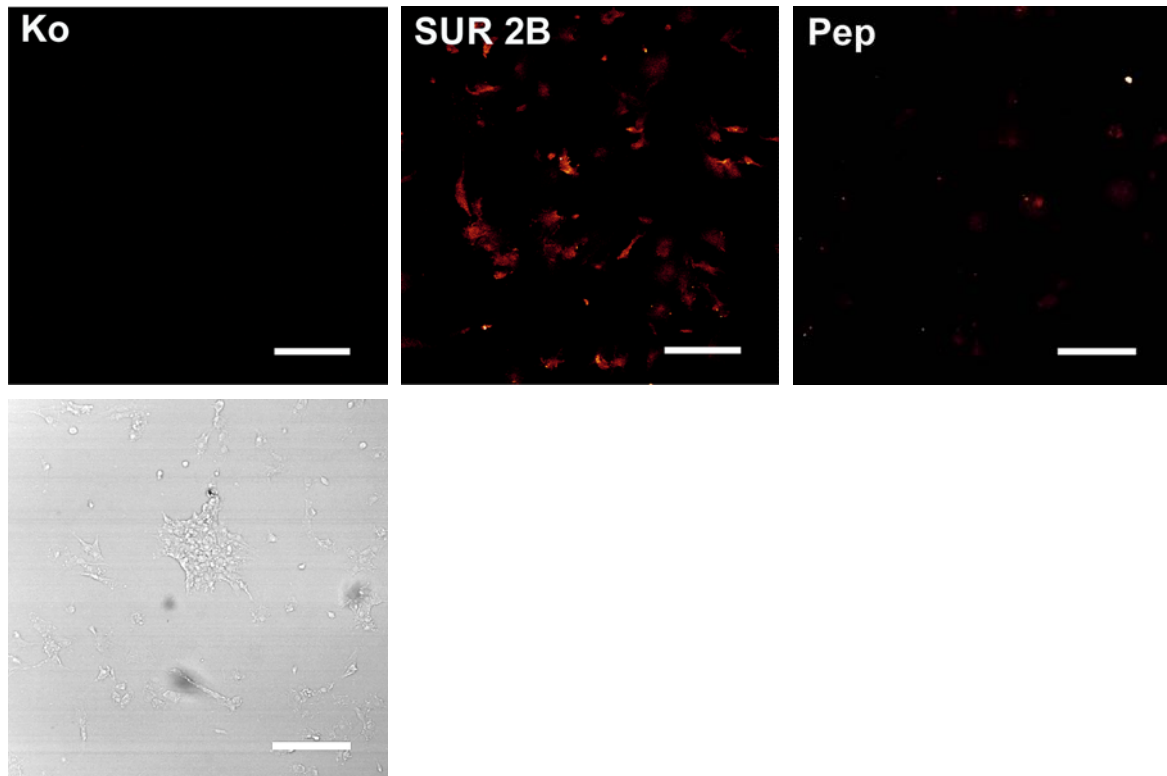


Abbildung 4.11: Nachweis der SUR 2B-Untereinheit in immunzytochemischen Versuchen an humanen GZ. Kontrollexperiment ohne Erstantikörper (Ko, darunter Durchlichtbild), Erstantikörper (1:5000) (SUR 2B). Kontrollexperiment nach Präadsorption des Antikörpers mit Peptid (Pep). Skalierungsbalken: 150  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.3.3 Immunhistochemie

Die Kir 6.1- und die SUR 2B-Untereinheit konnten in GZ in frühen Entwicklungsstadien des Follikels und in Graaf'schen Follikeln ebenso wie im CL in den dort befindlichen Lutealzellen nachgewiesen werden (Abbildung 4.12 und 4.13). Dies galt für Affe und Mensch. Die Glattmuskelzellen im Affenuterus und die Glattmuskelzellen in Gefäßen im humanen Ovar waren ebenfalls spezifisch gefärbt, wie es für den  $K_{\text{ATP}}$  in Glattmuskelzellen beschrieben wurde (Teramoto, 2006), und dienten somit als Positivkontrolle. Die Spezifität der Antikörper wurde durch Präadsorption mit dem Peptid, das für die Immunisierung verwendet worden war, gezeigt. Färbungen mit einem Antikörper, der gegen das Kir 6.2-Protein gerichtet war, ergaben in Glattmuskelzellen in Gefäßen keine spezifische Reaktion.



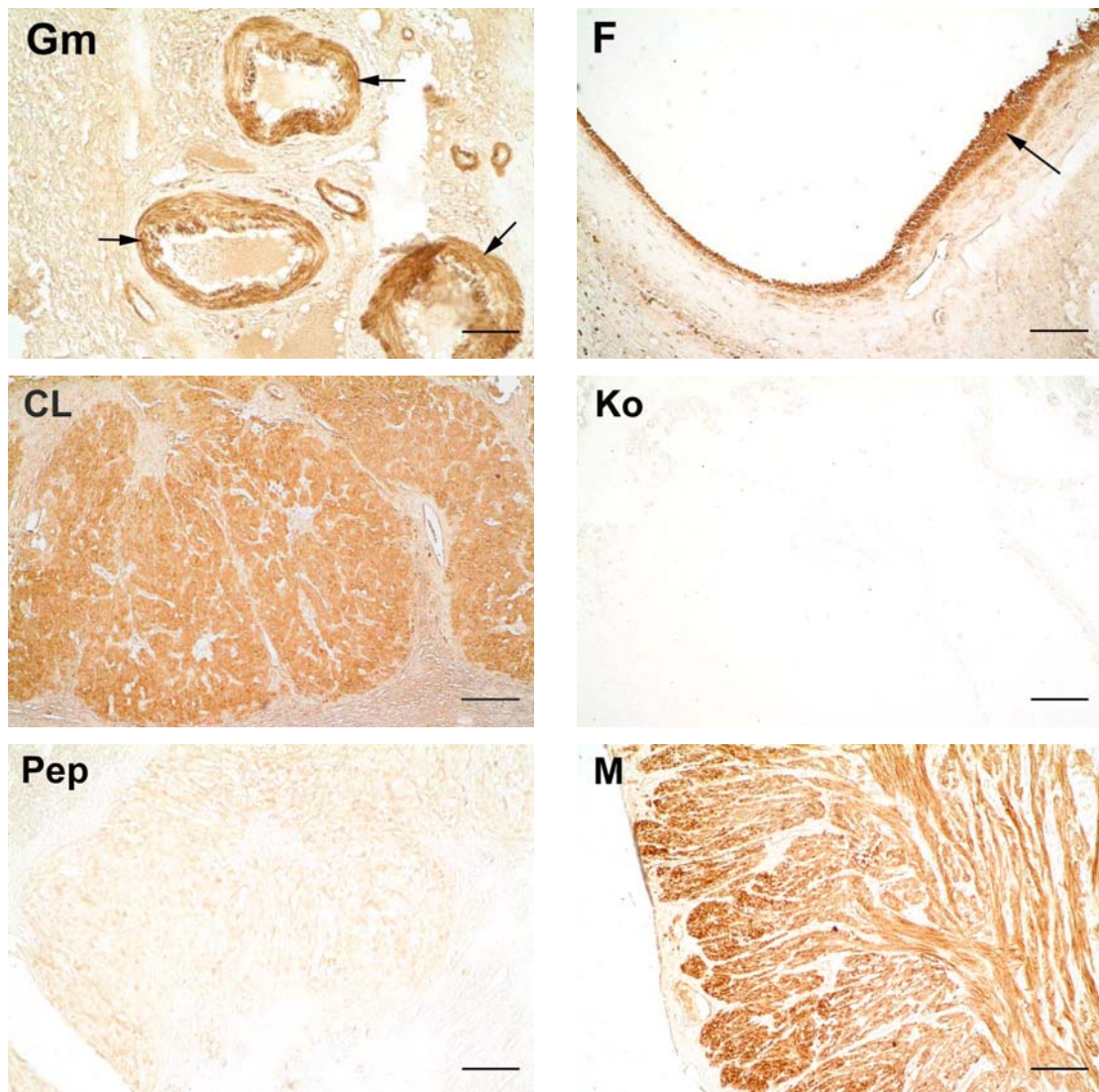


Abbildung 4.12: Immunhistochemischer Nachweis der Kir 6.1-Untereinheit an Schnitten aus dem Ovar des Menschen. Darin sind der Glattmuskel in Gefäßen (Pfeile) (Gm, Skalierungsbalken: 100  $\mu$ m), Granulosazellen des antralen Follikels (Pfeil) (F, Skalierungsbalken: 200  $\mu$ m) und Lutealzellen des CL zu erkennen (CL, Skalierungsbalken: 200  $\mu$ m). Kontrollfärbung im CL ohne Erstantikörper (Ko, Skalierungsbalken: 100  $\mu$ m). Kontrollfärbung im CL nach Präadsorption des Antikörpers mit Peptid (Pep, Skalierungsbalken: 100  $\mu$ m). Immunhistochemischer Nachweis der Kir 6.1-Untereinheit an einem Schnitt aus dem Uterus des Rhesusaffen. Zu erkennen sind Glattmuskelzellen des Myometriums (M, Skalierungsbalken: 100  $\mu$ m).

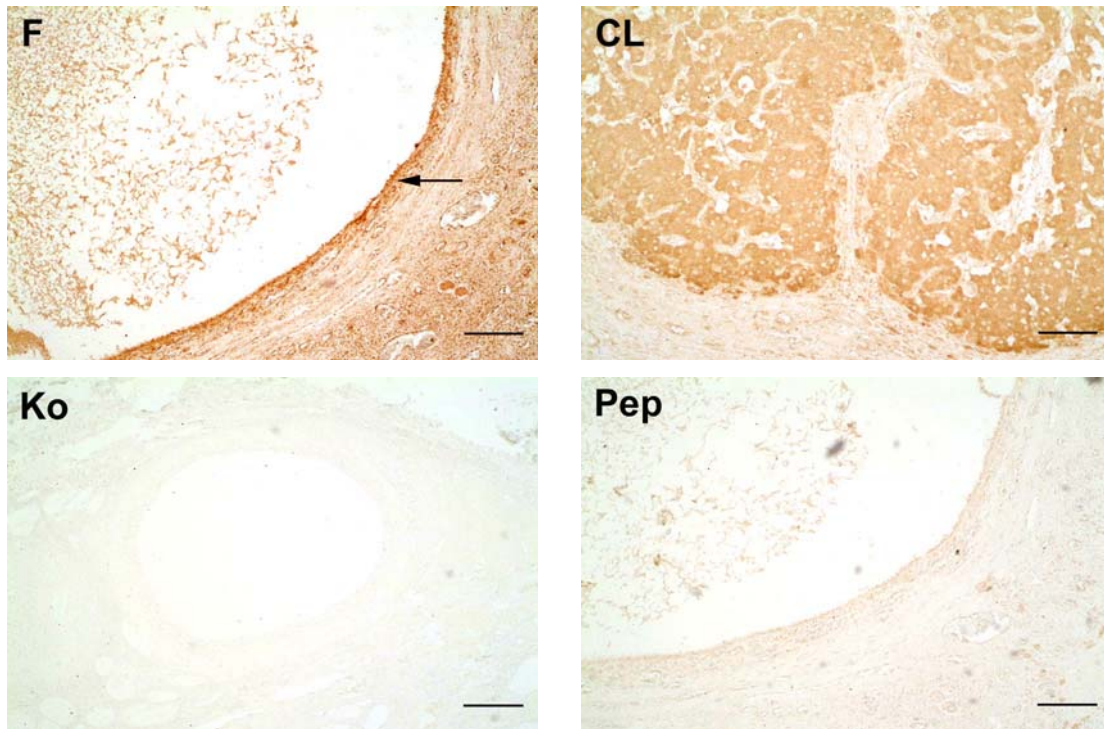


Abbildung 4.13: Immunhistochemischer Nachweis der SUR 2B-Untereinheit an Schnitten aus dem Ovar des Menschen. Darin sind Granulosazellen des antralen Follikels (Pfeil) (F, Skalierungsbalken: 200  $\mu$ m) und Lutealzellen des CL zu erkennen (CL, Skalierungsbalken: 100  $\mu$ m). Kontrollfärbung ohne Erstantikörper (Ko, Skalierungsbalken: 200  $\mu$ m), Kontrollfärbung nach Präadsorption des Antikörpers mit Peptid (Pep, Skalierungsbalken: 200  $\mu$ m).

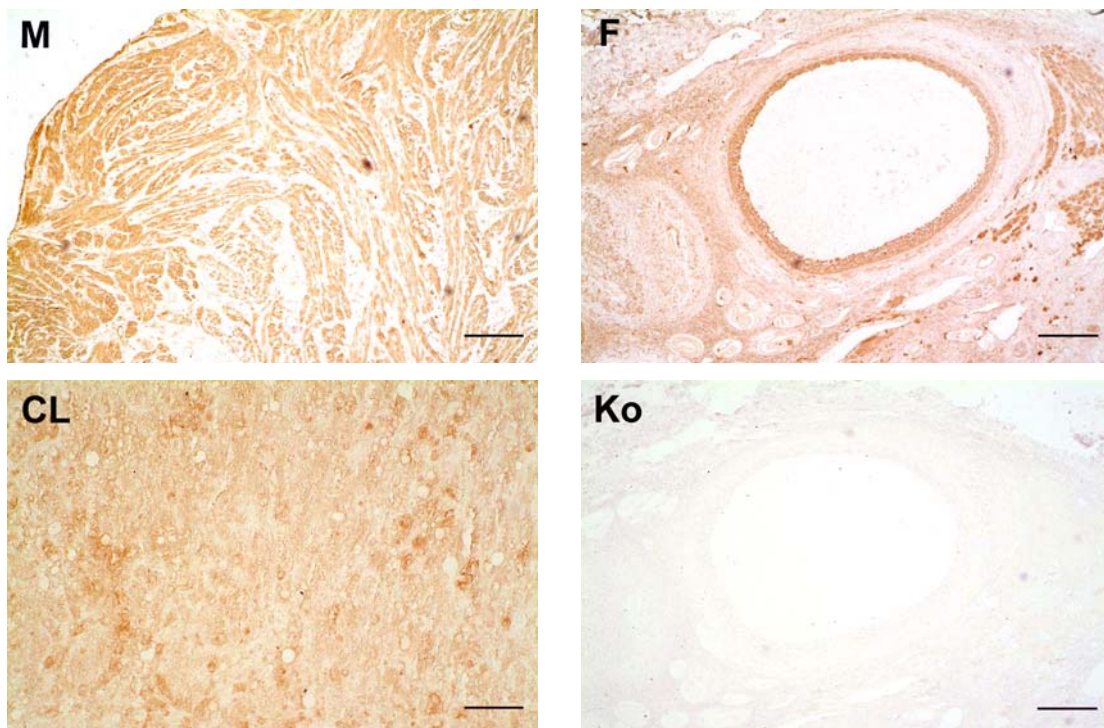






Abbildung 4.14: Immunhistochemischer Nachweis der SUR 2B-Untereinheit an Schnitten aus dem Uterus des Rhesusaffen. Zu erkennen sind Glattmuskelzellen des Myometriums (M, Skalierungsbalken: 200  $\mu\text{m}$ ). Nachweis der SUR 2B-Untereinheit in Granulosazellen des Follikels (F, Skalierungsbalken: 200  $\mu\text{m}$ ) und in Lutealzellen des CL im Affenovar (CL, Skalierungsbalken: 50  $\mu\text{m}$ ). Kontrollfärbung ohne Erstantikörper (Ko, Skalierungsbalken: 200  $\mu\text{m}$ ), Kontrollfärbung nach Präadsorption des Antikörpers mit Peptid (Pep, Skalierungsbalken: 200  $\mu\text{m}$ ).

#### 4.1.4 Identifikation des $K_{\text{ATP}}$ in GZ von Patientinnen mit PCOS

In humanen GZ von Patientinnen mit PCOS wurde ebenfalls die mRNA der Kir 6.1- und der SUR 2B-Untereinheit nachgewiesen (Abbildung 4.15), womit der  $K_{\text{ATP}}$  in diesen Zellen die gleiche Zusammensetzung hat wie in GZ „normaler“ Patientinnen (n = 5 Zellchargen). Die Behandlung humaner GZ mit hCG führte zu keiner signifikanten Veränderung der mRNA-Menge der Untereinheiten in Zellen von Patientinnen mit PCOS.

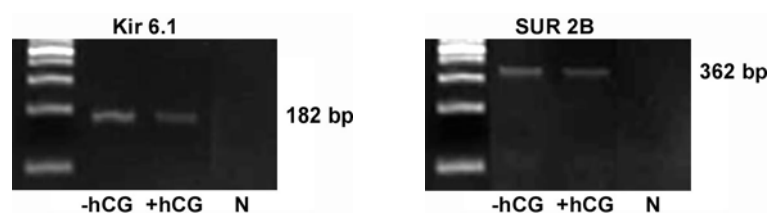


Abbildung 4.15: Nachweis der Kir 6.1- und SUR 2B-Untereinheit aus mRNA kultivierter humaner GZ von Patientinnen mit PCOS, jeweils ohne oder mit hCG-Behandlung (10 IU/ml, Tag 3 für 24 h (-hCG, +hCG)). Negativkontrolle,  $\text{H}_2\text{O}$  (N).

## 4.2 Untersuchung einer möglichen intrazellulären Lokalisation des $K_{\text{ATP}}$

### 4.2.1 Immungoldfärbungen

In Kardiomyozyten wurde ein intrazellulärer  $K_{\text{ATP}}$  in der mitochondrialen Membran (mito $K_{\text{ATP}}$ ), beschrieben (Garlid et al., 1996; Garlid et al., 2003; Gross und Fryer,

1999; Liu et al., 1998). Um diese mögliche Lokalisation des  $K_{ATP}$  in humanen GZ zu untersuchen, wurden zunächst Immungoldfärbungen an Ultradünnschnitten humaner GZ mit anschließender Betrachtung im Elektronenmikroskop durchgeführt. Hierbei wurden die Kir 6.1- und die SUR 2B-Untereinheit nachgewiesen. Die Lokalisation des  $K_{ATP}$  in humanen GZ beschränkte sich auf die Zellmembran (Abbildung 4.16). Durch Präadsorption mit dem zur Immunisierung verwendeten Peptid ließ sich die Spezifität des Antikörpers zeigen (nicht dargestellt). Gelegentliche Markierungen des Zytoplasmas und der Zellorganellen waren unspezifisch und traten in gleichem Maße auch bei Kontrollen (kein Erstantikörper bzw. Präadsorption) auf.

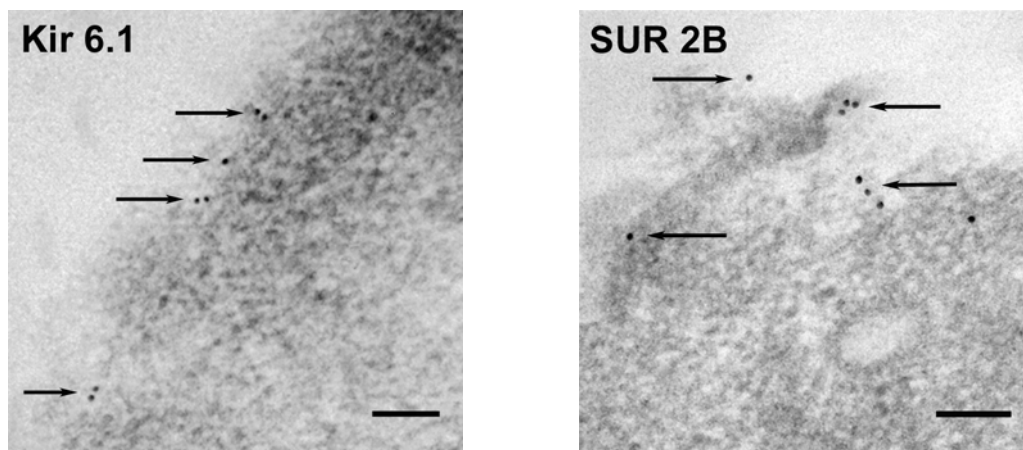


Abbildung 4.16: Nachweis der Kir 6.1- und der SUR 2B-Untereinheit in der Plasmamembran humaner GZ mit Hilfe von Immungoldfärbung. Skalierungsbalken: 100 nm.

#### **4.2.2 Funktionelle Untersuchungen einer möglichen intrazellulären Lokalisation des $K_{ATP}$**

Um die Ergebnisse der Immungoldfärbungen auch auf funktioneller Ebene zu überprüfen, wurden Änderungen des Membranpotentials der Mitochondrien durch Applikation von  $K_{ATP}$ -Modulatoren mit Hilfe des Fluoreszenzreagenzes DePsipher gemessen. Das Öffnen des mitochondrialen  $K_{ATP}$  würde zu einem  $K^+$ -Einstrom aus dem Zytoplasma in die Mitochondrien und dadurch zu einer Depolarisation der inneren mitochondrialen Membran führen, was sich an einem Anstieg des Verhältnisses der Grün/Rot-Fluoreszenzintensität zeigen würde. Die Applikation von Glibenclamid oder Diazoxid hatte jedoch keinen Einfluss auf das Verhältnis der Grün/Rot-Fluoreszenzintensität, was bedeutete, dass sich das mitochondriale

Membranpotential nicht änderte. Die Entkopplung des mitochondrialen Membranpotentials durch den Protonophor CCCP am Ende des Experiments führte zu einem steilen Anstieg des Verhältnisses der Grün/Rot-Fluoreszenzintensität, was den Anstieg der Zahl an depolarisierten Mitochondrien anzeigte (Abbildung 4.17 und 4.18) ( $n = 4$  Zellchargen).

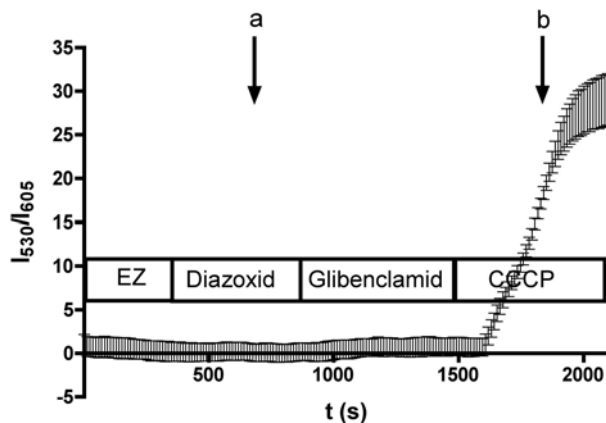


Abbildung 4.17: Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials nach Gabe von EZ-Lösung, Diazoxid ( $100 \mu\text{M}$ ), Glibenclamid ( $10 \mu\text{M}$ ) und CCCP ( $2 \mu\text{M}$ ). Dargestellt ist das Verhältnis der Grün/Rot-Fluoreszenzintensität ( $I_{530}/I_{605}$ ) in Abhängigkeit von der Zeit ( $t$ ). Exemplarisch ist die Messung einer Zellcharge gezeigt (über sechs Zellen gemittelt).

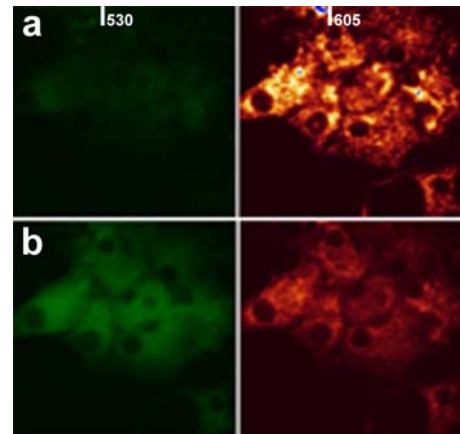


Abbildung 4.18: Veränderung der Fluoreszenzintensität in humanen GZ vor (a) und nach (b) der Gabe des Entkopplers CCCP bei einer Wellenlänge von  $530 \text{ nm}$  ( $I_{530}$ ) und  $605 \text{ nm}$  ( $I_{605}$ ) gemessen.

Zusammen mit den Immungoldversuchen lässt sich ein mitochondrialer  $K_{\text{ATP}}$  sowohl auf funktioneller als auch auf Proteinebene ausschließen. Der  $K_{\text{ATP}}$  ist somit in humanen GZ ausschließlich in der Plasmamembran lokalisiert.

### 4.3 Funktioneller Nachweis

#### 4.3.1 Charakterisierung des $K_{\text{ATP}}$ durch Einzelkanalmessungen

Es wurden Einzelkanalmessungen in der Inside-Out-Konfiguration bei symmetrischer, hoher  $\text{K}^+$ -Konzentration ( $130 \text{ mM K}^+$ ) und angelegten Potentialen von  $-80 \text{ mV}$  bis  $+80 \text{ mV}$  bei einer Pulsdauer von  $200 \text{ ms}$  durchgeführt (siehe Abbildung 3.1). Die entsprechenden resultierenden Ströme sind in Abbildung 4.19 dargestellt. Da in der IZ-Lösung eine hohe  $\text{K}^+$ -Konzentration und eine niedrige  $\text{Cl}^-$ -

Konzentration vorlag, musste es sich bei dem gemessenen Strom um einen  $K^+$ -Strom handeln. Wurden die Stromamplituden gegen die entsprechende Spannung aufgetragen, so ergab sich aus der Steigung dieser Geraden die Einzelkanalleitfähigkeit (Abbildung 4.20). Für negative Potentiale lag eine Einzelkanalleitfähigkeit von  $43,5 \pm 16,0$  pS (SD) ( $n = 5$  Zellen,  $n = 8$  Messspuren) vor. Die Stromamplitude war bei negativen Potentialen größer als bei den entsprechend positiven Potentialen (Abbildung 4.19). Dieses Phänomen wird als Einwärtsgleichrichtung bezeichnet.

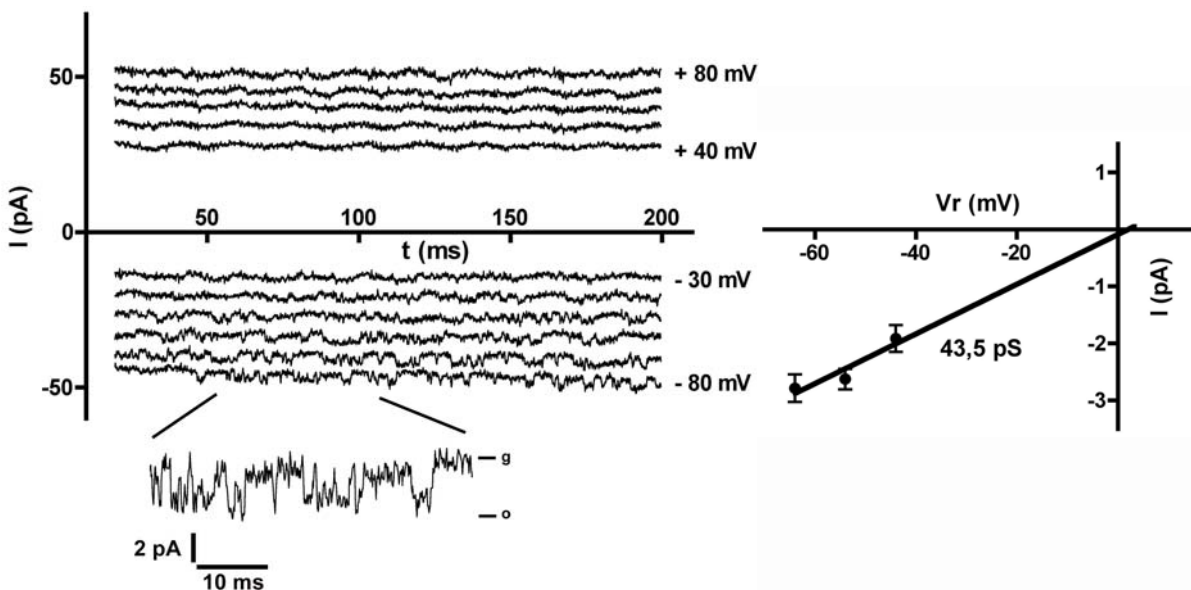


Abbildung 4.19: Stromspuren am Beispiel einer Messung in der Inside-Out-Konfiguration bei symmetrischer, hoher  $K^+$ -Konzentration ( $130$  mM  $K^+$ ) und angelegten Spannungen von  $-80$  mV -  $+80$  mV (nicht alle Spuren sind gezeigt). Darunter: Vergrößerung einer einzelnen Stromspur mit geschlossenem (g) und offenem (o) Zustand des Kanals.

Abbildung 4.20: I/V-Kennlinie des  $K_{ATP}$  bei symmetrischer, hoher  $K^+$ -Konzentration ( $130$  mM  $K^+$ ). Aus der Steigung der I/V-Kennlinie ergibt sich eine Einzelkanalleitfähigkeit von  $43,5 \pm 16,0$  pS.

Außerdem wurde die Auswirkung von ATP und ADP auf den  $K_{ATP}$  in humanen GZ untersucht. Hierbei wurden die Zellen ebenfalls in der Inside-Out-Konfiguration gemessen. Es wurde nacheinander IZ-Lösung, ATP ( $1$  mM) und ADP ( $3$  mM) appliziert. Die freie  $Mg^{2+}$ -Konzentration in der IZ-Lösung wurde nach Föhr et al. (1993) berechnet und betrug etwa  $300$   $\mu$ M. Bei zwei Patches konnte bei Zugabe von IZ-Lösung ein einzelner  $K^+$ -Kanal mit einer Einzelkanalleitfähigkeit des  $K_{ATP}$

gemessen werden. Bei Applikation von ATP konnte beobachtet werden, dass die Aktivität dieses Kanals signifikant reduziert war. In einem dieser Versuche konnte bei der anschließenden Applikation von ADP wieder eine erhöhte Kanalaktivität beobachtet werden (Abbildung 4.21).

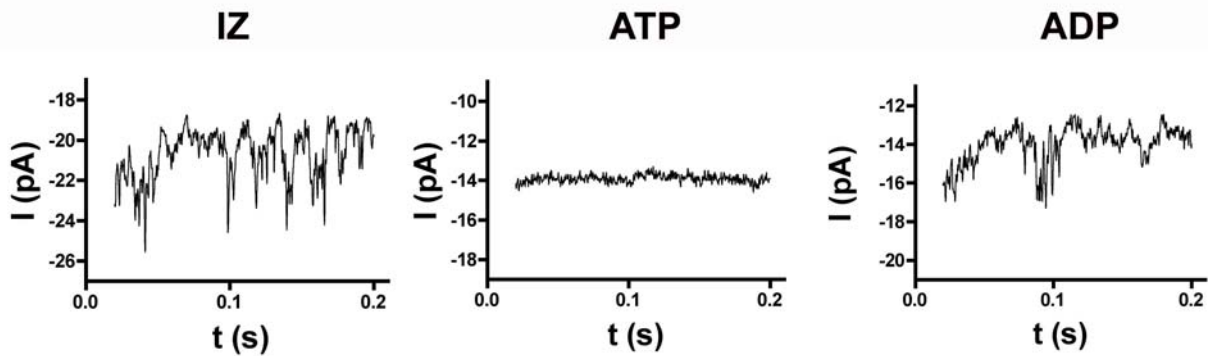


Abbildung 4.21: Beispiel einer Stromspur in der Inside-Out-Konfiguration bei Applikation von IZ-Lösung, ATP (1 mM) und ADP (3 mM) und angelegter Spannung von  $-80$  mV. Zu erkennen ist eine verringerte Kanalaktivität bei Applikation von ATP im Vergleich zu IZ und ADP.

#### 4.3.2 Einfluss des $K_{ATP}$ auf das Membranpotential

Um die Funktionalität des  $K_{ATP}$  und seinen Einfluss auf die Regulation des Membranpotentials zu untersuchen, wurden elektrophysiologische Untersuchungen in der Whole-Cell-Konfiguration durchgeführt. Die mittlere Kapazität der Zellen lag bei  $48 \pm 19$  pF (SD) ( $n = 10$  Zellen). Die gemessenen Zellen waren zwischen 2 und 10 Tagen in Kultur.

Für Messungen in der Whole-Cell-Konfiguration wurden isolierte Zellen verwendet, um mögliche Störungen durch benachbarte Zellen zu vermeiden. Dies war notwendig, weil humane GZ untereinander intensiv über Gap Junctions elektrisch gekoppelt sind.

Die Wirkung spezifischer Pharmaka auf das Membranpotential wurde durch Applikation von EZ-Lösung, Diazoxid ( $100 \mu\text{M}$ ) und Glibenclamid ( $10 \mu\text{M}$ ) untersucht. Durch die Applikation des  $K_{ATP}$ -Öffners Diazoxid konnte keine Veränderung des Membranpotentials beobachtet werden. Durch anschließende Gabe des  $K_{ATP}$ -Inhibitors Glibenclamid kam es zur Depolarisation der Plasmamembran um  $9,0 \pm 1,9$  mV (SD) in etwa 10 % der gemessenen humanen GZ (Abbildung 4.22) ( $n = 6$  Messungen an 6 Zellen;  $P$  (Student t-Test)  $< 0,0001$ ).

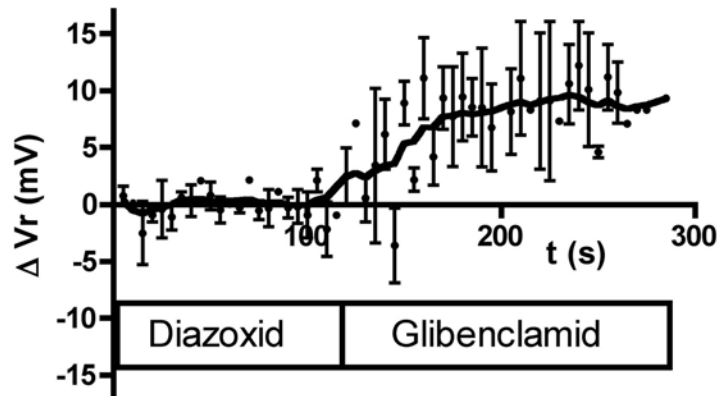


Abbildung 4.22: Aufzeichnung der Änderung des Membranpotentials humaner GZ nach Gabe von Diazoxid ( $100 \mu\text{M}$ ) und Glibenclamid ( $10 \mu\text{M}$ ). Glibenclamid führte zu einer Depolarisation von  $9,0 \pm 1,9 \text{ mV}$  (SD). Das Membranpotential  $V_r$  wurde in Whole-Cell-Messungen aus dem Umkehrpotential der  $I/V$ -Kennlinie (siehe Abschnitt 3.14.7) ermittelt. Das Membranpotential zum Zeitpunkt der Zugabe von Glibenclamid wurde gleich Null gesetzt. Die Messungen von 6 Zellen wurden gemittelt.  $P$  (Student  $t$ -Test)  $< 0,0001$ , wobei die Abschnitte von 0 bis 120 s (Diazoxid) und 200-285 s (Glibenclamid) verglichen wurden.

In ersten Versuchen wurde eine Hyperpolarisation der Plasmamembran durch Diazoxid nach der Gabe von Glibenclamid gemessen ( $n = 2$ , nicht gezeigt).

#### 4.3.3 Fluoreszenzmikroskopische Messungen von Membranpotentialänderungen in humanen GZ

Um auch Aussagen zum Verhalten der Gesamtheit der humanen GZ machen zu können, wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an kultivierten humanen GZ in Kulturschalen mit dem potentialsensitiven Farbstoff DiBAC<sub>4</sub>(3) durchgeführt. Änderungen des Membranpotentials wurden gemessen, indem die Zellen auf die Änderungen ihrer Fluoreszenzintensität hin untersucht wurden. Dabei konnten Änderungen des zellulären Membranpotentials (Depolarisation) aufgrund einer Hemmung von funktionellen  $K_{\text{ATP}}$ -Kanälen in etwa 95 % der GZ im Gesichtsfeld gezeigt werden. Die Applikation von Glibenclamid führte zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität um  $10,0 \pm 3,3 \%$  (SD) ( $n = 4$  Messungen an 4 Zellchargen;  $P$  (One Sample  $t$ -Test) = 0,0103) (Abbildung 4.23), was einer Erhöhung des Membranpotentials um etwa 10 mV entspricht (Yamada et al., 2001). Diazoxid führte zu keiner signifikanten Veränderung des Membranpotentials.



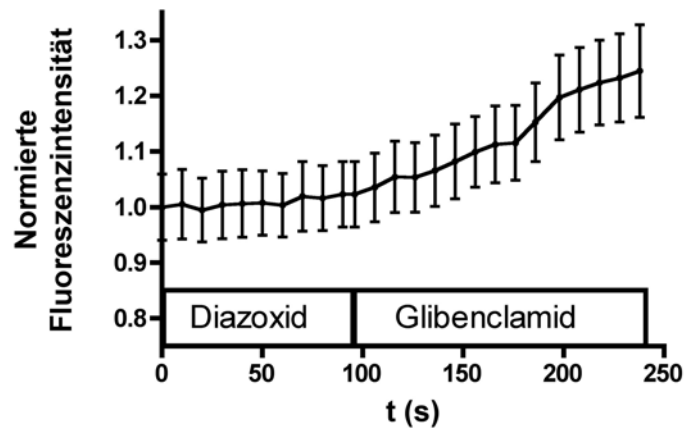


Abbildung 4.23: Aufzeichnung der Änderung des Membranpotentials humaner GZ nach Gabe von Diazoxid ( $100 \mu\text{M}$ ) und Glibenclamid ( $10 \mu\text{M}$ ). Dargestellt ist die Veränderung der Fluoreszenzintensität bezogen auf die Fluoreszenzintensität bei Diazoxid-Gabe in Abhängigkeit von der Zeit ( $t$ ) anhand der Messung einer Zellcharge (über 10 Zellen gemittelt).

#### 4.4 Physiologische Rolle des $K_{\text{ATP}}$ in humanen GZ

Die Regulation des Membranpotentials ist für Zellen von entscheidender Bedeutung. Da der  $K_{\text{ATP}}$  an der Regulation des Membranpotentials beteiligt ist, stellt sich die Frage, welche physiologische Bedeutung dem  $K_{\text{ATP}}$  in humanen GZ und im Ovar zukommt und wie sich seine Beeinflussung auf physiologische Prozesse humaner GZ auswirkt. Daher wurde der Einfluss von  $K_{\text{ATP}}$ -Öffnern und -Inhibitoren auf die wichtigsten Aufgaben der GZ, nämlich die Östradiol- und die Progesteronproduktion untersucht.

##### 4.4.1 Beeinflussung der Genexpression

Im Zusammenhang mit möglichen Signaltransduktionswegen wurde initial ein kommerzieller Gene Array genutzt, um Einblick in mögliche Veränderungen der Expression wichtiger Gene durch eine Blockade oder Aktivierung des  $K_{\text{ATP}}$  während einer Inkubationsdauer von 90 Minuten zu gewinnen. Dazu wurden humane GZ unterschiedlich behandelt ( $\text{H}_2\text{O}$  bidest. (Kontrolle), DMSO (0,1 %), Diazoxid ( $100 \mu\text{M}$ ) und Glibenclamid ( $10 \mu\text{M}$ )). Auf diese Weise wurde unter anderem die Expression des Enzyms  $3\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase ( $3\beta$ -HSD) und des Luteinisierenden Hormon/Choriongonadotropin-Rezeptors gezeigt. Ihre Expression wurde durch die Stimulantien während des Inkubationszeitraumes von

90 Minuten nicht nachweisbar beeinflusst. Hinweise auf eine Veränderung des Genexpressionslevels durch die Behandlung um mehr als den Faktor 2 ergaben sich nur für das Enzym Aromatase (CYP 19 A 1) (Tabelle 4.1), welches durch Glibenclamid vermehrt nachzuweisen war.

Gen	Abkürzung	Regulation
3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase	3 $\beta$ -HSD	Nein
Luteinisierendes Hormon/Choriongonadotropin-Rezeptor	LHCGR	Nein
Aromatase (Cytochrom P450, Subfamily 19 A 1)	CYP 19 A 1	Ja

*Tabelle 4.1: Genexpression in humanen GZ, detektiert mit einem Gene Array*

Um diese Veränderungen zu überprüfen, wurden RT-PCR- und Western Blot-Versuche mit Inkubationsdauern von 3 h und 24 h durchgeführt. Für RT-PCR-Versuche mit spezifischen Primern für die Aromatase wurde mRNA aus humanen GZ, die mit H<sub>2</sub>O bidest. (Kontrolle), DMSO (0,1 %), Diazoxid (100  $\mu$ M) und Glibenclamid (10  $\mu$ M) für 3 h oder 24 h inkubiert worden waren, gewonnen. Die Menge der PCR-Proben wurde nach densitometrischer Auswertung (ImageJ, siehe Abschnitt 3.2.3) auf die jeweilige Menge des  $\beta$ -Aktins bezogen und anschließend mit dem sich auf diese Weise für die Kontrolle ergebenden Wert verglichen (Werte nicht dargestellt). Bei dieser semiquantitativen Auswertung zeigte sich, dass bei den so behandelten GZ zu beiden Zeitpunkten mRNA der Aromatase vorhanden war, jedoch unterschiedliche Behandlung offensichtlich zu keiner Veränderung der Menge führte (n = 6 Zellchargen pro Inkubationsdauer) (Abbildung 4.24).

Weiterhin wurden auf Proteinebene Western Blot-Experimente mit einem gegen die Aromatase gerichteten Antikörper durchgeführt. Humane GZ wurden an Tag 3 für 24 h mit H<sub>2</sub>O bidest. (Kontrolle), DMSO (0,1 %), Diazoxid (100  $\mu$ M) und Glibenclamid (10  $\mu$ M) behandelt. Die Bande des Aromataseproteins liegt bei 50 kDa. Die Menge des Aromataseproteins wurde nach densitometrischer Auswertung (ImageJ; siehe Abschnitt 3.3) auf die jeweilige Proteinmenge des  $\beta$ -Aktins (40 kDa) bezogen und anschließend mit dem sich auf diese Weise für die Kontrolle ergebenden Wert verglichen (Werte nicht dargestellt). Bei dieser semiquantitativen Auswertung konnte keine signifikante Veränderung der Proteinmenge der Aromatase bei unterschiedlicher Behandlung beobachtet werden (n = 2 Zellchargen) (Abbildung 4.25).

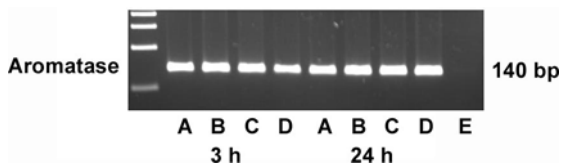


Abbildung 4.24: PCR mit spezifischen Primern für das Enzym Aromatase. Behandlung humaner GZ mit  $H_2O$  bidest. (A), DMSO (0,1 %) (B), Diazoxid (100  $\mu M$ ) (C) und Glibenclamid (10  $\mu M$ ) (D). Negativkontrolle der PCR (E). Die Aromatase (140 bp) ist nach Inkubationsdauer von 3 h und 24 h nachweisbar.

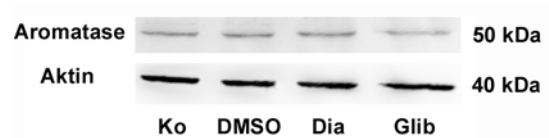


Abbildung 4.25: Durch Behandlung mit  $H_2O$  bidest. (Ko), DMSO (0,1 %), Diazoxid (100  $\mu M$ ) (Dia) und Glibenclamid (10  $\mu M$ ) (Glib) für 24 h kommt es zu keiner nachweisbaren Veränderung der Menge des Aromataseproteins (50 kDa).

Um zu überprüfen, ob das Enzym Aromatase in kultivierten humanen GZ aktiv ist, wurde zunächst ein Versuch durchgeführt, in dem der Umsatz von Testosteron in Östradiol durch die Aromatase gemessen wurde. Daraus ergab sich, dass in humanen GZ Testosteron zu Östradiol umgewandelt wird und die Aromatase somit in Kultur aktiv ist. Außerdem wurde überprüft, ob die Aromatase in humanen GZ mit dem kommerziell erhältlichen Aromatasehemmer Formestan inhibiert werden kann. Dabei wurden humane GZ an Tag 3 für 1 h mit unterschiedlichen Formestankonzentrationen und Testosteron (10 nM) versetzt. Die Überstände wurden abgenommen und die Testosteron- und Östradiolkonzentrationen gemessen. Es ergab sich eine verminderte Umsetzung von Testosteron zu Östradiol in Abhängigkeit von der Formestankonzentration ( $n = 1$ ) (Abbildung 4.26). Sowohl die verminderte Umsetzung von Testosteron ( $P$  (ANOVA) = 0,0004) als auch die verminderte Bildung von Östradiol ( $P$  (ANOVA) = 0,0008) durch Formestan waren statistisch signifikant. Dies zeigte, dass das Enzym Aromatase in kultivierten humanen GZ aktiv ist und durch spezifische Substanzen beeinflusst werden kann.

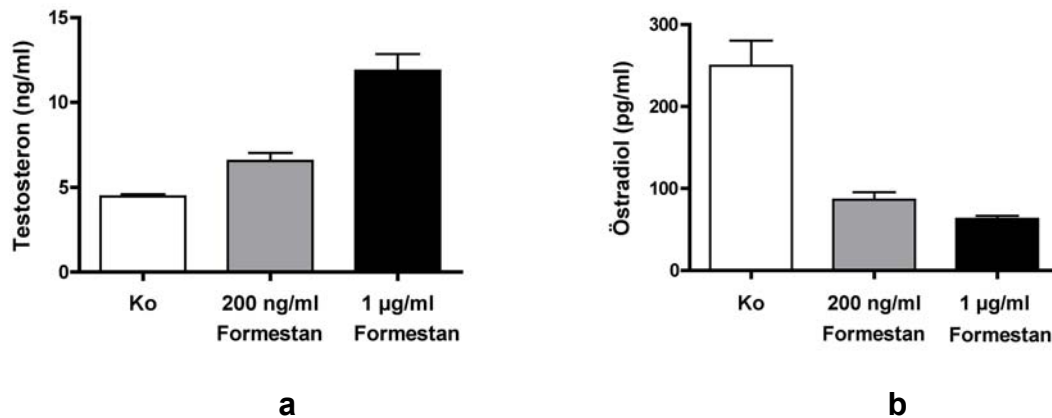


Abbildung 4.26: Die Umsetzung von Testosteron (10 nM) durch die Aromatase lässt sich durch verschiedene Konzentrationen an Formestan (200 ng/ml (0,66 µM) und 1 µg/ml (3,3 µM) signifikant hemmen ( $P$  (ANOVA) = 0,0004) (a). Negativkontrolle  $H_2O$  bidest. (Ko). Entsprechend wird die Bildung von Östradiol im Überstand humaner GZ nach Vorgabe von Testosteron (10 nM) bei Inkubation mit Formestan (200 ng/ml (0,66 µM) und 1 µg/ml (3,3 µM) signifikant vermindert ( $P$  (ANOVA) = 0,0008) (b). Negativkontrolle  $H_2O$  bidest. (Ko). Messung an einer Zellcharge.

Um den Einfluss der  $K_{ATP}$ -Öffner und -Inhibitoren auf den Umsatz einer vorgegebenen Menge an Testosteron zu untersuchen, wurden humane GZ an Tag 3 für 3 h mit  $H_2O$  bidest. (Kontrolle), DMSO (0,1 %), Diazoxid (100 µM) und Glibenclamid (10 µM) behandelt und anschließend mit Testosteron (10 nM) inkubiert. Die Stimulantien und Testosteron wurden getrennt voneinander appliziert, um sicherzustellen, dass ein möglicher Einfluss der Pharmaka auf die Expression der Aromatase vor Beginn der Testosteronumsetzung stattfindet und die Pharmaka die Testosteronmessung nicht beeinträchtigen. Nach 1 h wurden die Testosteron- und Östradiolkonzentrationen in den Überständen bestimmt. Dabei ergab sich, dass die mit Diazoxid behandelten humanen GZ weniger Testosteron umgesetzt hatten als unbehandelte GZ ( $n = 3$  Zellchargen;  $P$  (ANOVA) = 0,02;  $P$  (Newman-Keuls) < 0,05) (nicht gezeigt). Messungen der Östradiolkonzentration ergaben jedoch keine verringerte Menge an Östradiol, die als Folge des verringerten Testosteronumsatzes zu erwarten gewesen wäre. In Wiederholungsversuchen mit längeren Behandlungszeiten (24 h) und Inkubationszeiten mit Testosteron (6 h) wurden keine signifikanten Veränderungen der Testosteronumsetzung gemessen (nicht gezeigt).

#### 4.4.2 Beeinflussung der Progesteronproduktion humaner GZ

Die Zugabe von hCG (10 IU/ml)/DMSO (0,1 %) steigert die Progesteronproduktion humaner GZ im Vergleich zur alleinigen Gabe von DMSO (0,1 %) (Kontrollwert). Die Zugabe des Lösungsmittels scheint sich also nicht auf die durch hCG induzierbare Progesteronproduktion auszuwirken. Die Steigerung der Progesteronproduktion durch hCG über basale Werte wurde durch Zugabe des  $K_{ATP}$ -Inhibitors Glibenclamid signifikant verringert ( $n = 6$  Zellchargen;  $P$  (repeated ANOVA)  $< 0,0001$ ;  $P$  (Newman-Keuls)  $< 0,05$ ) (Abbildung 4.27). Die alleinige Zugabe von Glibenclamid veränderte die basale Progesteronproduktion im Vergleich zu DMSO (0,1 %) jedoch nicht ( $P$  (Newman-Keuls)  $> 0,05$ ). Die Reduktion der hCG-induzierten Progesteronproduktion muss somit der Hemmung des  $K_{ATP}$  durch Glibenclamid zugeschrieben werden.

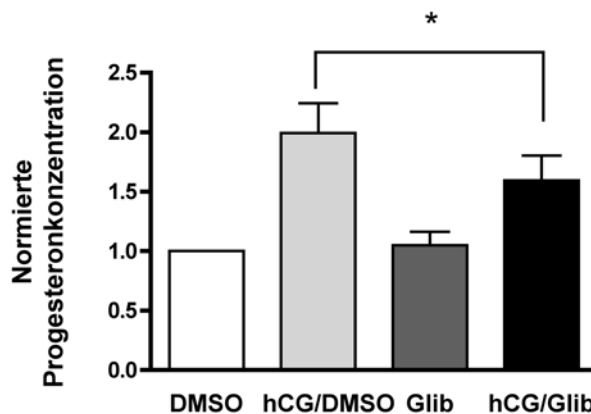


Abbildung 4.27: Progesteronkonzentrationen im Überstand nach unterschiedlicher Behandlung humaner GZ für 24 h in Kultur bezogen auf die Progesteronkonzentration der mit DMSO behandelten humanen GZ. Die Erhöhung der Progesteronproduktion durch hCG (10 IU/ml) wurde durch die Gabe von Glibenclamid (10  $\mu$ M) signifikant vermindert (\*,  $P$  (Newman-Keuls)  $< 0,05$ ). Die alleinige Gabe von Glibenclamid (10  $\mu$ M) löste jedoch keine Veränderung der Progesteronproduktion humaner GZ im Vergleich zu DMSO aus ( $P$  (Newman-Keuls)  $> 0,05$ );  $n = 6$  Zellchargen.

#### 4.4.3 Prüfung auf Toxizität

Um toxische Effekte der Pharmaka und des Lösungsmittels oder Einflüsse auf das Zellwachstum humaner GZ ausschließen zu können, wurden diese für 24 h mit DMSO (0,1 %), hCG (10 IU/ml)/DMSO (0,1 %), Glibenclamid (10  $\mu$ M), hCG (10 IU/ml)/Glibenclamid (10  $\mu$ M),  $H_2O$  bidest, (Kontrolle) und Diazoxid (100  $\mu$ M) inkubiert. Nach Fixierung und Einbettung wurden Semidünnschnitte (1  $\mu$ m)

hergestellt, die gefärbt (Azur II/Methylenblau) und anschließend lichtmikroskopisch untersucht wurden (Abbildung 4.28). Es konnten keine offensichtlichen toxischen Veränderungen der Zellen, wie Zellnekrosen, im Vergleich zu Kontrollzellen festgestellt werden.

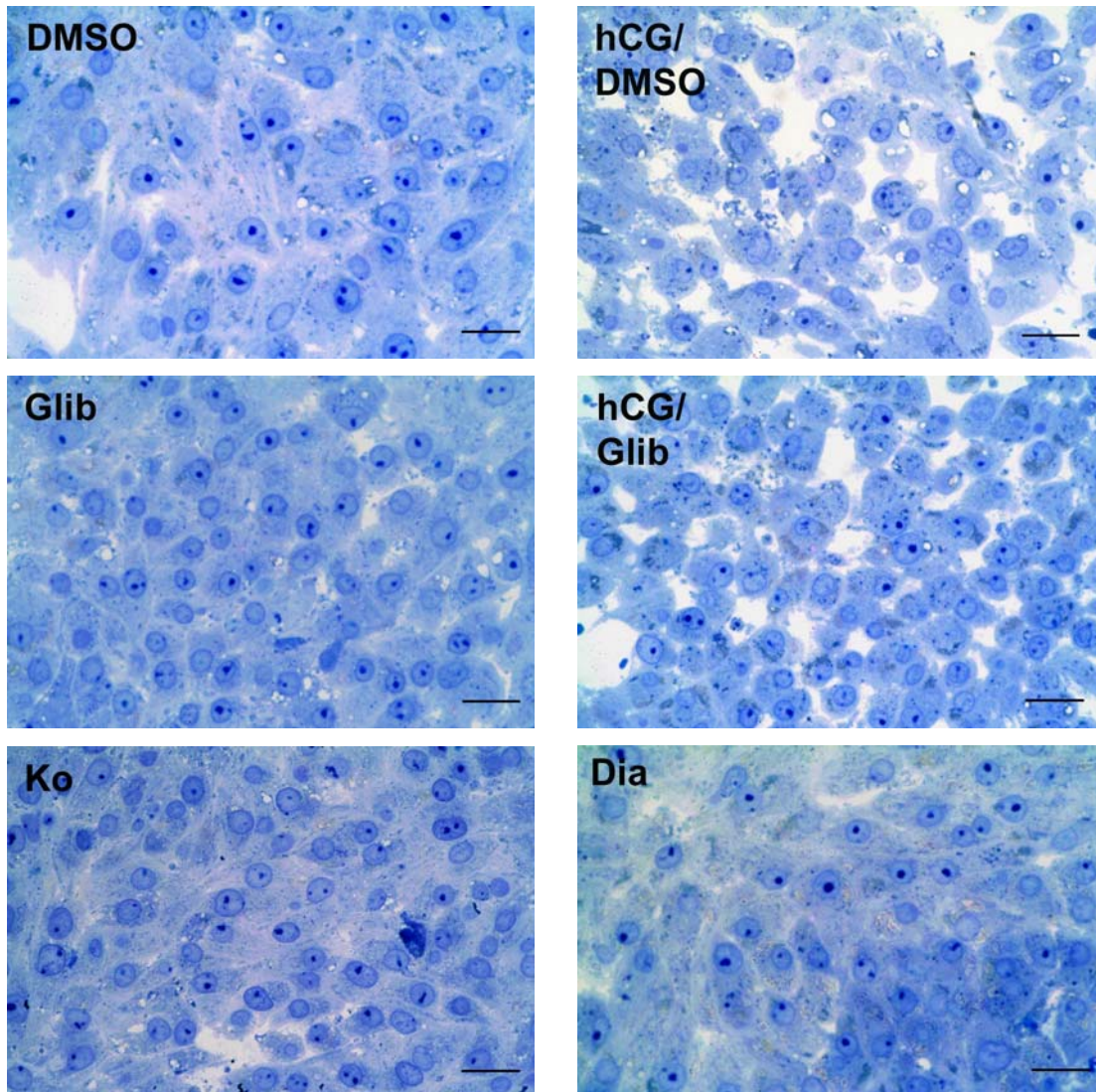


Abbildung 4.28: Semidünnschnitte humaner GZ nach Behandlung mit DMSO (0,1%), hCG (10 IU/ml)/DMSO (0,1%) (hCG/DMSO), Glibenclamid (10 µM) (Glib), hCG (10 IU/ml)/Glibenclamid (10 µM) (hCG/Glib), H<sub>2</sub>O bidest. (Ko) und Diazoxid (100 µM) (Dia) für 24 h. Skalierungsbalken: 25 µm.

Um außerdem sicherzugehen, dass die verringerte Progesteronproduktion nicht auf eine veränderte Zellproliferation zurückzuführen ist, wurden Effekte der Pharmaka und des Lösungsmittels auf die Zellzahl mit Hilfe des Tetrazoliumsalzes MTS untersucht. Die Inkubation mit den Pharmaka und dem Lösungsmittel allein führte zu keinen nachweisbaren Veränderungen des proliferativen Verhaltens

humaner GZ (n = 2 Zellchargen). Es war tendenziell eher eine vermehrte Proliferation bei Behandlung mit hCG (10 IU/ml)/Glibenclamid (10  $\mu$ M) im Vergleich zu hCG (10 IU/ml)/DMSO (0,1 %) zu erkennen (statistisch nicht signifikant). Somit haben die Pharmaka und das Lösungsmittel offensichtlich geringfügige proliferative, aber keine zytotoxischen Effekte (nicht gezeigt).

#### **4.4.4 Weitere Untersuchung möglicher Mechanismen des Einflusses von Glibenclamid auf die hCG-induzierte Progesteronproduktion**

##### **4.4.4.1 Mögliche Beeinflussung wichtiger Enzyme in der Progesteronsynthese**

Als weitere mögliche Ursachen der reduzierten hCG-induzierten Progesteronproduktion durch Glibenclamid wurden die für die Progesteronsynthese wichtigen Enzyme StAR, SCC und 3 $\beta$ -HSD untersucht. Dazu wurden humane GZ an Tag 3 für 24 h mit H<sub>2</sub>O bidest. (Kontrolle), hCG (10 IU/ml), DMSO (0,1 %), hCG (10 IU/ml)/DMSO (0,1%), Diazoxid (100  $\mu$ M), hCG (10 IU/ml)/Diazoxid (100  $\mu$ M), Glibenclamid (10  $\mu$ M) und hCG (10 IU/ml)/Glibenclamid (10  $\mu$ M) behandelt. Der mögliche Einfluss des K<sub>ATP</sub>-Inhibitors Glibenclamid auf die mRNA- und Proteinmenge der Enzyme wurde anhand von RT-PCR- und Western Blot-Experimenten untersucht. In RT-PCR-Experimenten erfolgte nach densitometrischer Auswertung (ImageJ, siehe Abschnitt 3.2.3) Bezug der Mengen der PCR-Proben von StAR auf die jeweilige Menge der  $\beta$ -Aktin-Probe und Vergleich mit dem sich auf diese Weise für die Kontrolle ergebenden Wert (n = 2 Zellchargen; Werte nicht dargestellt) (Abbildung 4.29). Bei dieser semiquantitativen Auswertung konnte eine Erhöhung der mRNA-Menge von StAR durch hCG gezeigt werden, wie sie bereits beschrieben wurde (Ronen-Fuhrmann et al., 1997). Es konnte jedoch kein nachweisbarer Einfluss von Glibenclamid auf die durch hCG erhöhte mRNA-Menge des Enzyms verzeichnet werden. In Western Blot-Experimenten erfolgte nach densitometrischer Auswertung (ImageJ, siehe Abschnitt 3.3) Bezug der Proteinmengen von StAR auf die jeweilige Menge der  $\beta$ -Aktin-Probe und Vergleich mit dem sich auf diese Weise für die mit DMSO behandelte Probe ergebenden Wert. Bei dieser semiquantitativen Auswertung zeigte sich ebenfalls nur die beschriebene Erhöhung der Proteinmenge von StAR durch hCG (DMSO: 1,0; hCG/DMSO: 1,30; Glibenclamid: 0,94; hCG/Glibenclamid: 1,35) (Fritz et al.,

2001a). Glibenclamid führte zu keiner nachweisbaren Veränderung der durch hCG erhöhten Proteinmenge von StAR (30 kDa) ( $n = 4$  Zellchargen) (Abbildung 4.30).

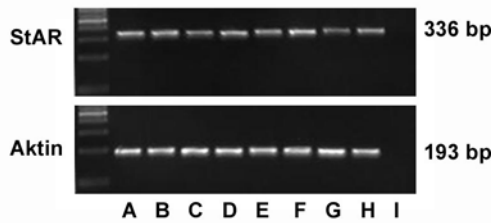


Abbildung 4.29: Semiquantitative RT-PCR mit humanen GZ mit spezifischen Primern für das Enzym StAR. Eine nachweisbare Veränderung der mRNA-Menge ließ sich nur für jeweils mit hCG behandelte GZ erkennen. Jeweils 24 h Inkubation mit  $H_2O$  bidest. (A), hCG (10 IU/ml) (B), DMSO (0,1 %) (C), hCG (10 IU/ml)/DMSO(0,1 %) (D), Diazoxid (100  $\mu$ M) (E), hCG (10 IU/ml)/Diazoxid (100  $\mu$ M) (F), Glibenclamid (10  $\mu$ M) (G), hCG (10 IU/ml)/Glibenclamid (10  $\mu$ M) (H), PCR-Negativkontrolle (I).

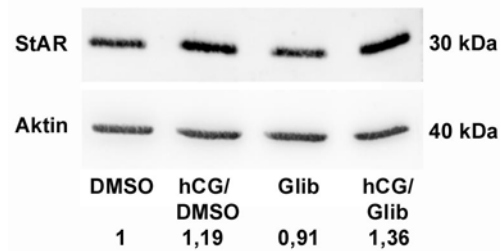


Abbildung 4.30: Beispiel eines Western Blots mit einem gegen das Enzym StAR gerichteten Antikörper. Die spezifische Bande ist bei 30 kDa zu erkennen. Humane GZ waren mit DMSO (0,1 %), hCG (10 IU/ml)/DMSO (0,1 %), Glibenclamid (10  $\mu$ M) und hCG (10 IU/ml)/Glibenclamid (100  $\mu$ M) inkubiert worden. Die Proteinmenge der Aromatase wurde jeweils auf die des  $\beta$ -Aktinproteins (40 kDa) bezogen. Anschließend wurden die sich daraus ergebenden Werte auf die mit DMSO behandelte Proteinprobe bezogen, wie dargestellt.

HCG erhöhte die mRNA-Menge der Enzyme SCC (Richards und Hedin, 1988) und  $3\beta$ -HSD während der Inkubationsdauer von 24 h nicht nachweisbar. Die Inkubation der humanen GZ mit den Pharmaka Diazoxid und Glibenclamid hatte keinen nachweisbaren Einfluss auf die mRNA-Menge der Enzyme SCC und  $3\beta$ -HSD (Abbildung 4.31). Nach densitometrischer Auswertung (ImageJ, siehe Abschnitt 3.2.3) war Bezug der Mengen der PCR-Proben von  $3\beta$ -HSD bzw. SCC auf die jeweilige Menge der  $\beta$ -Aktin-Probe und Vergleich mit dem sich auf diese Weise für die Kontrolle ergebenden Wert erfolgt (Werte nicht dargestellt).





Abbildung 4.31: Semiquantitative RT-PCR an humanen GZ mit spezifischen Primern für die Enzyme SCC und 3 $\beta$ -HSD. Eine nachweisbare Veränderung der mRNA-Menge ließ sich für beide Enzyme weder für die Pharmaka- noch für die hCG-Behandlung erkennen. Jeweils 24 h Inkubation mit H<sub>2</sub>O bidest. (A), hCG (10 IU/ml) (B), DMSO (0,1 %) (C), hCG (10 IU/ml)/DMSO(0,1 %) (D), Diazoxid (100  $\mu$ M) (E), hCG (10 IU/ml)/Diazoxid (100  $\mu$ M) (F), Glibenclamid (10  $\mu$ M) (G), hCG (10 IU/ml)/Glibenclamid (10  $\mu$ M) (H), PCR-Negativkontrolle (I).

#### 4.4.4.2 Mögliche Beeinflussung der Steroidspeicherung und der Zellmorphologie

Da Glibenclamid die Steroidhormonsynthese weder durch offensichtliche Veränderungen der Proliferation noch der mRNA- oder Proteinmenge der relevanten Enzyme beeinflusste, wurde anschließend der Ausgangsstoff der Steroidhormonsynthese untersucht, nämlich Cholesterin. Cholesterin wird nach der Aufnahme in die Zelle über LDL-Rezeptoren entweder direkt weiterverarbeitet oder in Form von Cholesterolestern in Lipidtröpfchen gespeichert. Um mögliche Veränderungen der Cholesterinspeicherung in Lipidtröpfchen und nachfolgende Auswirkungen auf die Steroidhormonsynthese zu untersuchen, wurden diese Lipidtröpfchen in humanen GZ im Elektronenmikroskop und außerdem durch Fluoreszenz Imaging mit dem Farbstoff Nilrot untersucht.

Einzelne humane GZ wurden im Elektronenmikroskop betrachtet. Dazu wurden humane GZ mit DMSO (0,1 %), hCG (10 IU/ml), hCG (10 IU/ml)/DMSO (0,1 %) und hCG (10 IU/ml)/Glibenclamid (10  $\mu$ M) inkubiert und anschließend eingebettet. Bei Behandlung mit hCG (10 IU/ml)/DMSO (0,1 %) fielen bei einer von zwei Zellchargen vermehrt Lipidtröpfchen auf, die von Glykogen umgeben waren (Abbildung 4.32 A). Bei humanen GZ, die mit hCG (10 IU/ml)/Glibenclamid (10  $\mu$ M) behandelt worden waren, traten weniger von diesen Lipidtröpfchen auf. Neben den veränderten Lipidtröpfchen fielen bei Behandlung humaner GZ mit hCG (10 IU/ml)/Glibenclamid (10  $\mu$ M) im Elektronenmikroskop außerdem vermehrt Mitosen und sekundäre Lysosomen auf, wie in Abbildung 4.32 B und C zu erkennen ist.

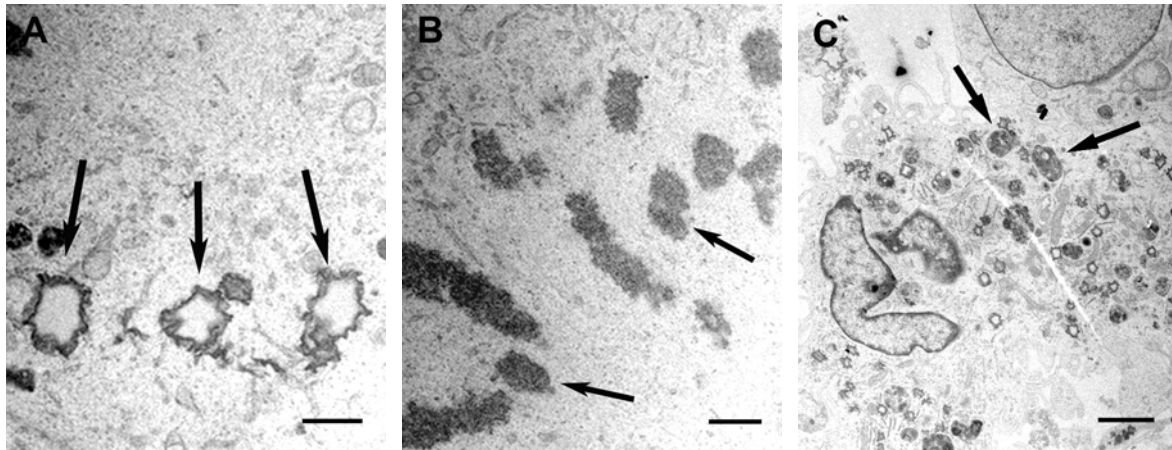


Abbildung 4.32: Ultradünnschnitte humaner GZ, die an Tag 3 für 24 h mit hCG (10 IU/ml)/Glibenclamid (10  $\mu$ M) behandelt worden waren: zu erkennen sind Fett (Pfeile) (A, Skalierungsbalken: 1  $\mu$ m), Mitose (Pfeile markieren kondensierte Chromosomen) (B, Skalierungsbalken: 1  $\mu$ m) und Lysosomen (Pfeile) (C, Skalierungsbalken: 2,5  $\mu$ m).

Um das Vorkommen der Lipidtröpfchen näher zu untersuchen, wurde Fluoreszenzimagining mit dem Farbstoff Nilrot durchgeführt (Abbildung 4.32). Dazu wurden humane GZ auf Deckgläschen für 24 h mit DMSO (0,1 %), hCG (10 IU/ml), hCG (10 IU/ml)/DMSO (0,1 %) und hCG (10 IU/ml)/Glibenclamid (10  $\mu$ M) behandelt und im Anschluss daran mit Nilrot gefärbt. Anhand der Fluoreszenzintensität pro Zellfläche wurde eine mögliche Veränderung in der Lipidmenge beurteilt. Bei dieser Methode wurde die Gesamtheit der Zellen im Gesichtsfeld betrachtet und ein Mittelwert gebildet. Es konnte keine offensichtliche Veränderung der Lipidmenge durch hCG (10 IU/ml)/Glibenclamid (10  $\mu$ M) im Vergleich zur Behandlung mit hCG (10 IU/ml)/DMSO (0,1 %) festgestellt werden (n = 3 Zellchargen).

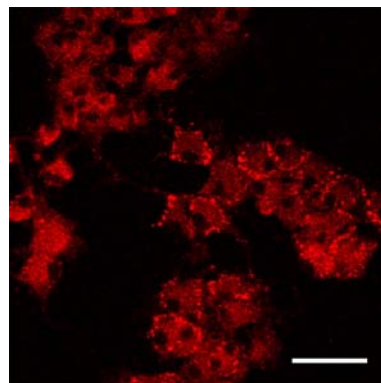


Abbildung 4.32: Beispiel des Nilrot-Fluoreszenzimagings: zu erkennen sind die mit Nilrot angefarbten Lipidtröpfchen und Zellmembranen humaner GZ. Skalierungsbalken: 75  $\mu$ m.

## 5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden isolierte humane GZ in Primärkultur untersucht, die bei der Gewinnung von Oozyten aus präovulatorischen Follikeln bei der IVF anfallen. Dies ermöglichte es, GZ unter bestimmten, genau definierten Kulturbedingungen anhand von zell- und molekularbiologischen sowie elektrophysiologischen Methoden funktionell zu untersuchen. GZ in Kultur entsprechen GZ der präovulatorischen Follikel und Lutealzellen im CL. Daher wurden vergleichende, deskriptive Untersuchungen an Follikel- und CL-Proben von Mensch und Affe durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass humane GZ und Lutealzellen in der Plasmamembran funktionelle  $K_{ATP}$ -Kanäle einer bestimmten Zusammensetzung besitzen, die an der Regulation des Membranpotentials mitwirken. Außerdem wurde gezeigt, dass der  $K_{ATP}$  an der wichtigsten physiologischen Funktion des CL bzw. des Ovars, der Progesteronproduktion, beteiligt ist.

### 5.1 Molekulare Identifikation der Kir 6.1- und der SUR 2B-Untereinheit im humanen Ovar und in humanen GZ sowie im Rhesusaffen

$K_{ATP}$ -Kanäle sind Ionenkanäle, die aus zwei verschiedenen Untereinheiten aufgebaut sind, nämlich Kir 6.x und SUR. Sie verknüpfen den metabolischen Zustand der Zelle mit dem elektrischen Zustand der Plasmamembran. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass ein  $K_{ATP}$  in endokrinen Zellen des humanen Ovars, den humanen GZ, vorkommt und sich aus den Untereinheiten Kir 6.1 und SUR 2B zusammensetzt. Dieser Nachweis der Untereinheiten erfolgte auf mRNA-Ebene durch RT-PCR-Versuche. Durch PCR-Versuche wurden die Untereinheiten Kir 6.1 und SUR 2B ebenfalls in cDNA des humanen Ovars nachgewiesen.

In seiner Zusammensetzung gleicht der  $K_{ATP}$  in endokrinen Zellen des humanen Ovars dem  $K_{ATP}$  im Ovar der Ratte, der von Chien et al. (1999) beschrieben wurde. Bei diesem Subtyp des  $K_{ATP}$  handelt es sich um denjenigen, der in glatten Muskeln in Gefäßen vorkommt (Brayden, 2002; Cole und Clement-Chomienne, 2003; Nelson und Quayle, 1995; Teramoto, 2006; Yamada et al., 1997). Die Untereinheiten des  $K_{ATP}$  in humanen GZ von IVF-Patientinnen mit und ohne PCOS waren identisch. Damit ergab sich kein Hinweis auf eine veränderte Expression des  $K_{ATP}$  im Zusammenhang mit PCOS.

Der Nachweis des Kir 6.1- und des SUR 2B-Proteins in humanen GZ erfolgte durch spezifische Antikörper in Western Blot-Versuchen. Der Hersteller (Alomone) gibt für die Kir 6.1-Untereinheit unterschiedliche Bandenmuster in zwei Geweben an (Rattenherz und Rattenkortex). Im Vergleich mit den Banden des Rattenherzens liegt in unserem Fall ein ähnliches Muster der Banden für die Kir 6.1-Untereinheit vor, wenn auch die Größen etwas abweichen. Eine Bande weist jedoch eine Größe von etwa 50 kDa auf, was der Größe des Kir 6.1-Proteins (48 kDa) etwa entspricht. Das SUR 2B-Protein hat etwa eine Größe von 174 kDa, doch sowohl für SUR 2B als auch für Kir 6.1 waren mehrere Banden zu erkennen. Für Membranproteine ist dies nicht ungewöhnlich, da diese besonders der Proteolyse ausgesetzt sind. Da sich die Färbung der Banden für beide Untereinheiten durch Präadsorption mit dem für die Immunisierung verwendeten Peptid ganz oder teilweise reduzieren ließ, kann man jedoch davon ausgehen, dass die Reaktion spezifisch war.

Immunzytochemische Versuche zeigten, dass die Kir 6.1- und die SUR 2B-Untereinheit in humanen GZ exprimiert werden.

Neben dem Nachweis in humanen GZ wurde das Vorkommen des  $K_{ATP}$  im Ovar des Menschen und des Rhesusaffen untersucht. In immunhistochemischen Versuchen an Gewebeschnitten des Ovars des Menschen und des Rhesusaffen konnten die Kir 6.1- und die SUR 2B-Untereinheit in GZ großer Follikel und in Granulosalutealzellen des aktiven CL nachgewiesen werden. Letztere entsprechen isolierten humanen GZ in Kultur (Mayerhofer et al., 1999b). Somit konnte gezeigt werden, dass der  $K_{ATP}$  in endokrinen Zellen des Ovars vorkommt.

Im CL des Rhesusaffen konnte durch RT-PCR-Versuche mRNA der  $K_{ATP}$ -Untereinheiten Kir 6.1 und SUR 2B nachgewiesen werden. Dabei ergaben sich jedoch an einigen Stellen Basenaustausche im Vergleich zur humanen Sequenz. Im Fall der Kir 6.1-Untereinheit würde dies zu einem Aminosäureaustausch von Glycin im Menschen zu Serin im Affen führen. Der Ort des Aminosäureaustausches liegt zwischen den transmembranären Segmenten M1 und M2, in der Nähe der Pore, welche die  $K_{ATP}$ -Kanaleigenschaften bestimmt. Bei den beiden Aminosäuren, die im SUR 2B-Protein des Rhesusaffen verschieden wären, handelt es sich um Arginin (statt Glutamin im Menschen) und Aspartat (statt Asparagin im Menschen). Die Aminosäuren beim Affen entsprechen in

beiden Fällen den Aminosäuren des humanen SUR 1-Proteins an der jeweiligen Stelle. Man geht davon aus, dass es ursprünglich nur ein Kir 6.x/SUR-Gen gab, das sich duplizierte und dann differenzierte (Aguilar-Bryan et al., 1998). Die Beobachtung der unterschiedlichen Basen beim Rhesusaffen im Vergleich zum Menschen und die Ähnlichkeit zum SUR 1-Protein könnten dadurch erklärt werden.

In cDNA des humanen Ovars und in humanen GZ wurde außerdem mRNA der Kir 6.2-Untereinheit nachgewiesen. Da das Kir 6.2-Gen jedoch intronlos ist, kann trotz des DNase-Verdau eine Amplifizierung genomischer DNA in humanen GZ in diesem Fall nicht ausgeschlossen werden. Es wäre jedoch auch möglich, dass die Kir 6.2-Untereinheit aus Verunreinigungen humaner GZ-Kulturen mit Monozyten stammt, die in einem geringen Prozentsatz in den Punktionen vorkommen und die möglicherweise einen  $K_{ATP}$ -Kanal aufweisen (Löhrke et al., 1997). Dies ist wahrscheinlich, da sich in immunhistochemischen Versuchen für die Kir 6.2-Untereinheit keine spezifische Färbung ergab. Auch die elektrophysiologischen Untersuchungen wiesen nicht auf eine Kir 6.2-Untereinheit hin (siehe Abschnitt 4.3.1 und 5.3.1), weshalb das mögliche Vorkommen dieser Untereinheit auf mRNA-Ebene nicht weiter untersucht wurde und das PCR-Produkt der Kir 6.2-Untereinheit in cDNA des humanen Ovars wahrscheinlich aus anderen, nicht endokrinen Zellen stammte. Die SUR 1-Untereinheit konnte in cDNA des humanen Ovars nachgewiesen werden, nicht jedoch in humanen GZ, und scheint somit für diese endokrinen Zellen des Ovars nicht spezifisch zu sein. Die SUR 2A-Untereinheit wurde weder in cDNA des humanen Ovars noch in humanen GZ nachgewiesen werden.

Humane GZ wurden in Kultur mit dem Schwangerschaftshormon hCG stimuliert, um mögliche Unterschiede, die durch den Luteinisierungsprozess auftreten können, zu untersuchen. Mögliche Veränderungen der Expression des  $K_{ATP}$  durch diese Behandlung sollten daraufhin betrachtet werden.

Die Behandlung humaner GZ mit hCG führte zu keiner nachweisbaren Veränderung der mRNA-Menge der Kir 6.1- und der SUR 2B-Untereinheit im Vergleich zu unbehandelten GZ. Der Einfluss von hCG auf die Proteinmenge der  $K_{ATP}$ -Untereinheiten wurde in Western Blot-Experimenten untersucht. Die

Proteinmenge der Kir 6.1- und der SUR 2B-Untereinheit wurde durch Behandlung mit hCG ebenfalls nicht nachweisbar verändert.

Die unterschiedlich lange Behandlung der GZ mit hCG ahmt unterschiedliche Entwicklungsstadien im Luteinisierungsprozess nach. Um diese Entwicklungsstadien im Ovar nachvollziehen zu können, wurde die Expression der mRNA der Kir 6.1- und der SUR 2B-Untereinheit aus dem CL des Rhesusaffen an Tag 1 und Tag 10 nach der Ovulation in RT-PCR-Versuchen untersucht. Es konnte keine nachweisbare Veränderung der mRNA-Menge der  $K_{ATP}$ -Untereinheiten zwischen diesen beiden Zeitpunkten beobachtet werden. In immunhistochemischen Versuchen am CL des Rhesusaffen zeigte sich für beide Untereinheiten sowohl eine Färbung von GZ als auch von Lutealzellen. Aus diesen Ergebnissen folgt, dass sich die mRNA- und Proteinmenge des  $K_{ATP}$  im Entwicklungsprozess der Granulosazellen im Ovar offensichtlich nicht verändert.

Da die molekularbiologischen Untersuchungen keine Anhaltspunkte für Veränderungen der mRNA- oder Proteinmenge der  $K_{ATP}$ -Untereinheiten ergaben, wurden die funktionellen Versuche an humanen GZ ohne vorherige hCG-Behandlung durchgeführt.

## **5.2 Lokalisation des $K_{ATP}$ in der Plasmamembran humaner GZ**

Immungoldfärbung mit anschließender Untersuchung der humanen GZ im Elektronenmikroskop sollte über die Lokalisation des  $K_{ATP}$  in humanen GZ Aufschluss geben. Dies war um so mehr von Bedeutung, da in anderen Zellen, wie z.B. Kardiomyozyten, mitochondriale  $K_{ATP}$ -Kanäle (mito $K_{ATP}$ ) beschrieben wurden (Garlid et al., 1996; Garlid et al., 2003; Gross und Fryer, 1999; Liu et al., 1998).

Durch Immungoldfärbung wurden die Kir 6.1- und die SUR 2B-Untereinheit in der Plasmamembran humaner GZ nachgewiesen, nicht jedoch in den Mitochondrien. Um eine mitochondriale Lokalisation auch funktionell auszuschließen, wurde eine Fluoreszenzmethode eingesetzt (Ishida et al., 2003) und es wurde gezeigt, dass weder Diazoxid noch Glibenclamid einen Einfluss auf das mitochondriale Membranpotential humaner GZ hatten. Die Zellen reagierten nur auf den Protonophor CCCP, der zu einer Depolarisation der mitochondrialen Membran führte. Zusammen mit den Immungoldfärbungen zeigten diese Ergebnisse, dass

sich der  $K_{ATP}$  in humanen GZ in der Plasmamembran und nicht in der mitochondrialen Membran befindet.

### **5.3 Charakterisierung des $K_{ATP}$ in humanen GZ**

#### **5.3.1 Charakterisierung von $K_{ATP}$ -Einzelkanälen in humanen GZ**

Um die Funktionalität des  $K_{ATP}$  in humanen GZ zu untersuchen, wurden in Patch-Clamp-Versuchen Einzelkanalmessungen in der Inside-Out-Konfiguration durchgeführt. Die Leitfähigkeitsmerkmale des  $K_{ATP}$  hängen von der die Pore formenden Kir 6.x-Untereinheit ab. Kir 6.1 weist bei symmetrischer, hoher  $K^+$ -Konzentration eine Einzelkanalleitfähigkeit von etwa 35 pS auf, Kir 6.2 von etwa 80 pS (Aguilar-Bryan et al., 1998; Babenko et al., 1998; Gribble et al., 1997; Inagaki et al., 1995a; Seino und Miki, 2003). Bei diesen Angaben handelt es sich um Mittelwerte aus unterschiedlichen Zellarten und Expressionssystemen. Die Einzelkanalleitfähigkeit von etwa 44 pS und die Einwärtsgleichrichtung bei symmetrischer, hoher  $K^+$ -Konzentration sprechen für Kir 6.1 als porenformende Untereinheit des in humanen GZ aktiven  $K_{ATP}$ .

#### **5.3.2 ADP/ATP-Abhängigkeit**

Die in humanen GZ vermutlich aktive Kombination der Untereinheiten Kir 6.1 und SUR 2B stellt einen Sonderfall der  $K_{ATP}$ -Kanäle dar und wird auch  $K_{NDP}$  genannt (Beech et al., 1993; Cole und Clement-Chomienne, 2003; Kamouchi und Kitamura, 1994; Nelson und Quayle, 1995; Teramoto, 2006; Yamada et al., 1997; Zhang und Bolton, 1996). Normalerweise werden  $K_{ATP}$ -Kanäle durch ATP (100  $\mu$ M) gehemmt und durch NDP aktiviert. Der sogenannte  $K_{NDP}$  wird durch NDP aktiviert, jedoch nur durch hohe ATP-Konzentrationen (1 mM) gehemmt. Durch niedrige ATP-Konzentrationen (100  $\mu$ M) wird er aktiviert. Zur Nukleotidabhängigkeit gibt es jedoch für unterschiedliche Zellarten, Zelllinien, Kulturbedingungen, Nukleotide, Messbedingungen und Messzeitpunkte stark variierende Angaben (Teramoto, 2006).

Um die Nukleotidabhängigkeit in humanen GZ zu bestimmen, wurden in Inside-Out-Messungen ATP und ADP appliziert. In ersten Messungen führte ATP (1 mM) zu einer Hemmung und ADP (3 mM) zu einer Aktivierung des  $K_{ATP}$  in humanen GZ. Das Ansprechen auf Nukleosiddiphosphate und Nukleosidtriphosphate war

allerdings unter anderem wegen der Überlagerung durch den  $BK_{Ca}$ , der sehr häufig in humanen GZ vorkommt, schwierig zu messen. Daher konnten nur wenige Daten zur Nukleotidabhängigkeit ausgewertet werden. Aus ihnen ergaben sich jedoch klare Anhaltspunkte dafür, dass der  $K_{ATP}$  in humanen GZ durch hohe Konzentrationen an ATP (1 mM) gehemmt und durch ADP aktiviert wird. Es sind jedoch weitere Messungen, z.B. bei niedrigen ATP-Konzentrationen (100  $\mu$ M) oder Applikation anderer Nukleotide, notwendig, um die Nukleotidabhängigkeit genauer zu charakterisieren.

Neben der Regulation durch Nukleotide können  $K_{ATP}$ -Kanäle auch durch andere endogene Substanzen (z.B. Acetylcholin oder VIP) moduliert werden, wie es aus verschiedenen Zelltypen bekannt ist (Brayden, 2002; Hanna und Wang, 2005; Quinn et al., 2004; Seino und Miki, 2003). Acetylcholin (Fritz et al., 2001b) und VIP kommen im Ovar vor und erfordern als mögliche Modulatoren des  $K_{ATP}$  in humanen GZ weitere Untersuchungen.

#### **5.4 Beteiligung des $K_{ATP}$ an der Regulation des Membranpotentials in humanen GZ**

Um die Funktionalität des  $K_{ATP}$  in humanen GZ zu untersuchen, wurden Messungen in der Whole-Cell-Konfiguration durchgeführt, in denen der  $K_{ATP}$ -Öffner (Diazoxid)- und der  $K_{ATP}$ -Inhibitor (Glibenclamid) appliziert wurden. Glibenclamid führte zu einer Depolarisation der Plasmamembran um etwa 9 mV. Diazoxid führte nicht zur Hyperpolarisation der Plasmamembran, was ein Hinweis dafür war, dass  $K_{ATP}$ -Kanäle in humanen GZ im Normalzustand geöffnet sind und daher durch den  $K_{ATP}$ -Öffner nicht weiter aktiviert werden können. Somit ist der  $K_{ATP}$  offensichtlich an der Regulation des Membranpotentials humaner GZ beteiligt. Für Glattmuskelzellen des Kolons in der Maus wurde bereits gezeigt, dass der  $K_{ATP}$  normalerweise geöffnet ist und zur Einstellung des Ruhemembranpotentials beiträgt und seine Blockierung zur Depolarisation der Plasmamembran um etwa 10 mV führt (Koh et al., 1998).

In ersten Versuchen ergaben sich auch Hinweise für eine Hyperpolarisation der Plasmamembran bei der Applikation von Diazoxid nach einer Depolarisation durch Glibenclamid. Dies bedarf weiterer experimenteller Abklärung. Diese Hinweise würden jedoch die These stützen, dass sich  $K_{ATP}$ -Kanäle in humanen GZ



normalerweise im geöffneten Zustand befinden und durch  $K_{ATP}$ -Öffner nicht weiter aktiviert werden können, aber nach einer Hemmung durch  $K_{ATP}$ -Inhibitoren und daraus folgender Depolarisation auch auf  $K_{ATP}$ -Öffner ansprechen.

In Whole-Cell-Messungen konnte nur in etwa 10 % der Zellen die Aktivität des  $K_{ATP}$  gemessen werden, weil es bei vielen Messungen durch schlechte „Sealbildung“ zu Leckströmen kam und dadurch die durch Glibenclamid hervorgerufenen Änderungen der Leitfähigkeit maskiert wurden.

Aufgrund dieser methodischen Probleme wurde zusätzlich eine fluoreszenzmikroskopische Methode angewandt, bei der nicht einzelne Zellen untersucht wurden, sondern die Änderung des Membranpotentials der Gesamtheit einer Zellpopulation nach Applikation spezifischer Pharmaka beobachtet werden konnte. Die Versuche wurden mit dem anionischen Farbstoff DiBAC<sub>3</sub>(4) durchgeführt. Die Applikation des  $K_{ATP}$ -Inhibitors Glibenclamid führte zu einer Depolarisation der Plasmamembran um etwa 10 mV. Die alleinige Gabe von Diazoxid führte zu keiner Änderung des Membranpotentials. Bei vermehrter Öffnung von  $K_{ATP}$ -Kanälen wäre hierbei eine Hyperpolarisation zu erwarten gewesen. Daraus folgt, dass der  $K_{ATP}$  gehemmt werden kann und die meisten  $K_{ATP}$ -Kanäle geöffnet vorliegen müssen. Damit wird das Ergebnis aus Whole-Cell-Messungen mit der Patch-Clamp-Methode bestätigt.

Aus der Kombination der beiden Methoden Whole-Cell-Patch-Clamp (einzelne Zellen, hohe Zeitauflösung) und Fluoreszenzmikroskopie (viele Zellen, geringe Zeitauflösung) lässt sich sowohl für einzelne humane GZ als auch für die Gesamtheit der humanen GZ feststellen, dass alle untersuchten Zellen funktionelle  $K_{ATP}$ -Kanäle besitzen, dass Glibenclamid zu einer Hemmung des  $K_{ATP}$  und damit zu einer Depolarisation der Plasmamembran in fast allen humanen GZ führt und dass der  $K_{ATP}$  an der Regulation des Membranpotentials in humanen GZ beteiligt ist, so wie es für den  $K_{ATP}$  in anderen Zellen schon beschrieben wurde (Mannhold, 2004; Koh et al., 1998).

## 5.5 Einfluss der $K_{ATP}$ -Kanalaktivität auf die Zellfunktion und die zelluläre Morphologie

Hinweise auf die Rolle von Ionenkanälen in der Steroidhormonproduktion ergaben sich in Tierexperimenten und für andere Ionenkanäle in humanen GZ (Agoston et al., 2004; Bulling et al., 2000; Kunz et al., 2002; Kunz et al., 2006a; Li et al., 2003; Manikkam et al., 2002; Platano et al., 2005). Daher stellte sich die Frage, ob eine Beeinflussung des  $K_{ATP}$  zu Veränderungen der wichtigen physiologischen Aufgaben humaner GZ, der Östradiol- und Progesteronproduktion (siehe Abbildung 1.4), führt.

### 5.5.1 Östrogen

Die Aromatase ist das Enzym, das die Bildung von Östradiol aus Testosteron und von Östron aus Androstendion katalysiert. Durch Messung der Testosteronumsetzung in humanen GZ wurde gezeigt, dass die Aromatase unter den gegebenen Kulturbedingungen aktiv war, durch den Aromatasehemmer Formestan gehemmt werden konnte und dass die Testosteronumsetzung und die Menge des entstehenden Östradiols durch Formestan signifikant reduziert werden konnte.

Anhand eines Gene Arrays ergaben sich Hinweise darauf, dass Glibenclamid die mRNA-Menge des Enzyms Aromatase nach 90 Minuten Inkubation erhöhte. In RT-PCR- und Western Blot-Versuchen konnte jedoch keine signifikante Veränderung der mRNA-Menge der Aromatase und des Aromataseproteins gefunden werden. Da der Einfluss von Glibenclamid auf das wichtige Enzym Aromatase jedoch entscheidend für die Östrogenproduktion sein konnte, wurde weiter untersucht, ob sich die veränderte mRNA-Menge der Aromatase durch Glibenclamid auf die Umsetzung von Testosteron zu Östradiol auswirkte. Dazu wurden Messungen der Testosteronumsetzung humaner GZ durchgeführt. Dabei wurde eine verringerte Testosteronumsetzung in humanen GZ, die mit Diazoxid behandelt worden waren, im Gegensatz zu unbehandelten humanen GZ festgestellt. Wenn man davon ausgeht, dass Diazoxid einen Glibenclamid entgegengesetzten Effekt zur Folge hat, also eine reduzierte Aromataseexpression, so würde dies die Beobachtungen erklären. Allerdings verringerte sich die Östradiolkonzentration nicht bei gleichzeitig verringerter Testosteronumsetzung, wie zu erwarten gewesen wäre. In

Wiederholungsversuchen bei längerer Behandlungszeit (24 h) und Inkubationszeit mit Testosteron (6 h) ergaben sich widersprüchliche Ergebnisse für die Testosteronumsetzung.

Die Beobachtung, dass sich die veränderte Testosteronkonzentration nicht in einer veränderten Östradiolkonzentration widerspiegelte, könnte an einer Verschiebung der Reaktionsgleichgewichte zwischen Testosteron, Östradiol, Androstendion und Östron liegen. Allerdings wirkte sich die Applikation des Aromatasehemmers Formestan sowohl auf die Testosteron- als auch auf die Östradiolkonzentration aus, so dass man davon ausgehen muss, dass eine Verschiebung der Reaktionsgleichgewichte keine entscheidende Rolle spielt. Die Tatsache, dass die Veränderung der Testosteronumsetzung bei verlängerten Zeiten nicht wiederholt werden konnte, mag auch daran liegen, dass es vermutlich nur zu einer vorübergehenden Veränderung der mRNA-Menge der Aromatase durch Glibenclamid kommt und sich dadurch die unterschiedliche Testosteronumsetzung über längere Zeit nicht mehr beobachten lässt. Außerdem bleibt zu bedenken, dass bei kultivierten humanen GZ aufgrund der unterschiedlichen Spenderinnen eine starke Heterogenität der Zellen vorliegt.

Da die Ergebnisse letztlich nur auf mRNA-Ebene im Gene Array zu einem bestimmten Zeitpunkt (90 Minuten) zu sehen waren, wurde der mögliche Einfluss von Glibenclamid auf die mRNA-Menge der Aromatase experimentell nicht weiter untersucht. Sollte das Ergebnis des Gene Arrays jedoch kein Artefakt sein, so würde das bedeuten, dass die Behandlung mit Glibenclamid zu erniedrigten Testosteron- und erhöhten Östradiolspiegeln führen würde, was sich wiederum auf die Fertilität auswirken könnte. Für Glibenclamid sind bislang keine Auswirkungen auf die Fertilität beschrieben, was aber daran liegen dürfte, dass es sich bei Typ II-Diabetikern um eine Patientengruppe handelt, die sich meist nicht mehr im reproduktiven Alter befindet.

### **5.5.2 Progesteron**

Das wichtigste Hormon, das von lutealen Granulosazellen produziert wird, ist Progesteron. Kusaka et al. (1993) zeigten in Schweinegranulosazellen, dass eine hohe extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration zu einer Depolarisation der Plasmamembran

und einer Erhöhung der Progesteronproduktion der ovariellen lutealen Zellen führt. Dies zeigte erstmals einen Zusammenhang zwischen  $K^+$ -Kanälen, Veränderungen des Membranpotentials und einer Regulation der Steroidhormonbildung/-freisetzung. Allerdings ist die hohe äußere  $K^+$ -Konzentration ein sehr massiver Eingriff in die Physiologie der Zelle und eine sehr unspezifische Maßnahme zur Veränderung des Membranpotentials (Gore und Behrman, 1984; Higuchi et al., 1976).

HCG steigert die Progesteronproduktion humaner GZ während einer Inkubationsdauer von 24 h. Während der  $K_{ATP}$ -Inhibitor Glibenclamid die basale Progesteronproduktion humaner GZ nicht veränderte, zeigte sich, dass die hCG-induzierte Steigerung der Progesteronproduktion durch die zusätzliche Gabe von Glibenclamid signifikant verringert wurde (Kunz et al., 2006b). Die Aktivität des  $K_{ATP}$  in humanen GZ steht somit offensichtlich im direkten oder indirekten Zusammenhang mit der Progesteronfreisetzung.

Als mögliche Gründe für diese Reduktion der hCG-induzierten Progesteronproduktion durch Glibenclamid kamen eine Toxizität des Pharmakons bzw. des Lösungsmittels oder ein Einfluss auf die Zellproliferation in Frage, zumal für Hepatozyten ein Einfluss des  $K_{ATP}$ -Inhibitors Glibenclamid auf die Proliferation gezeigt worden ist (Malhi et al., 2000). Die Proliferation der Hepatozyten wird durch den Hepatocyte Growth Factor gesteigert und kann durch die zusätzliche Gabe von Glibenclamid signifikant verringert werden. In humanen GZ wurde ebenfalls ein möglicher Einfluss der Pharmaka auf die Proliferation der Zellen untersucht. Dabei ergab sich, dass die Behandlung mit Diazoxid, Glibenclamid und dem Lösungsmittel DMSO keine nachweisbare Veränderung der Proliferation im Vergleich zu Kontrollzellen ( $H_2O$  bidest.) bewirkte. Tendenziell war sogar ein leicht proliferativer Effekt von hCG/Glibenclamid im Vergleich zu hCG/DMSO zu verzeichnen (statistisch nicht signifikant). Da keine negative Auswirkung auf das proliferative Verhalten zu erkennen war, kann man davon ausgehen, dass die Reduktion der hCG-induzierten Progesteronproduktion durch Glibenclamid nicht auf eine verringerte Zellzahl zurückzuführen ist, sondern auf eine verringerte Progesteronproduktion der einzelnen Zellen.

Die mit den Pharmaka und dem Lösungsmittel DMSO behandelten humanen GZ wurden in Semidünnschnitten lichtmikroskopisch untersucht. Dabei war die in diesen Schnitten auflösbare Zellmorphologie nicht erkennbar verändert. Daraus ist

zu schließen, dass die Behandlung humaner GZ mit Diazoxid, Glibenclamid und dem Lösungsmittel DMSO offensichtlich keine toxischen Auswirkungen auf die Zellen hatte.

### **5.5.3 Zusammenhang zwischen Membranpotential und Steroidhormonproduktion in GZ?**

Durch die in Abschnitt 5.5.2 dargestellten Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass die  $K_{ATP}$ -Modulatoren weder toxisch sind noch das Zellwachstum beeinflussen. Als weiterer Ansatzpunkt zur Erklärung des Effektes von Glibenclamid auf die hCG-induzierte Progesteronproduktion kommt ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Membranpotential und der Steroidhormonproduktion humaner GZ in Frage. Der Einfluss eines anderen  $K^+$ -Kanals ( $BK_{Ca}$ ) auf die Steroidhormonproduktion in humanen GZ wurde bereits beschrieben (Kunz et al., 2002). Die Funktion des  $BK_{Ca}$  ist jedoch nicht über das Membranpotential an die Hormonproduktion gekoppelt, sondern über die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Das lässt den Schluss zu, dass  $BK_{Ca}$ -Kanäle im Laufe der Steroidhormonbildung öffnen müssen. Außerdem wurde gezeigt, dass Oxytocin und Acetylcholin (und der cholinerge Agonist Carbachol) die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration erhöhen und somit  $BK_{Ca}$ -Ströme auslösen können. Die Blockade des  $BK_{Ca}$  verringert die hCG-induzierte Progesteronproduktion humaner GZ.

Auch die Blockade des A-Typ-Stroms ( $I_A$ ) in humanen GZ durch Chinidin senkt die hCG-induzierte Progesteronproduktion. Der  $I_A$  wird wiederum durch Hyperpolarisation der Plasmamembran aktiviert. Acetylcholin und Oxytocin erhöhen also die  $Ca^{2+}$ -Konzentration und aktivieren damit den  $BK_{Ca}$ , was zu einer Hyperpolarisation und damit zu einer Aktivierung des  $I_A$  führt (Kunz et al., 2006a).

4-Aminopyridin reduziert die basale und FSH-stimulierte Progesteronproduktion in Schweinegranulosazellen durch Beeinflussung des Membranpotentials und Veränderung der  $K^+$ - und  $Cl^-$ -Konzentration (Li et al., 2003). LH verringert den  $I_A$  und führt dadurch in Schweinegranulosazellen zu einer Depolarisation der Plasmamembran und zu einer Erhöhung der Progesteronproduktion (Kusaka et al., 1993). Auch die Beeinflussung weiterer  $K^+$ -Ströme führt zur Veränderung der Progesteronproduktion (Manikkam et al., 2002).

K<sup>+</sup>-Kanäle sind somit enger als bisher vermutet mit der Steroidhormonproduktion in Granulosazellen verknüpft (Mayerhofer und Kunz, 2006). Der Einfluss des K<sub>ATP</sub> auf die Regulation des Membranpotentials spielt offensichtlich eine wichtige Rolle. Es bleibt jedoch offen, wie die Verknüpfung zwischen Veränderung des Membranpotentials und der Veränderung der Steroidhormonproduktion zustandekommt. Möglicherweise wird die Aktivität anderer, spannungsabhängiger K<sup>+</sup>-Kanäle (z.B. K<sub>v</sub>4.2; Kunz et al., 2006a) durch den K<sub>ATP</sub> reguliert.

#### ***5.5.4 Mechanistische Untersuchungen der Rolle des K<sub>ATP</sub> bei hCG-induzierter Progesteronproduktion***

Es wurde versucht, mögliche Gründe für die Reduktion der hCG-induzierten Progesteronproduktion durch Glibenclamid zu finden. Dazu wurden die für die Steroidhormonsynthese wichtigen Enzyme StAR, 3β-HSD und SCC (siehe Abschnitt 1.1.6) in Bezug auf Änderungen der mRNA- und Proteinmenge untersucht. Dieser Ansatz lag nahe, da in anderen steroidhormonbildenden Zellen (Leydig-Zellen) eine Reduktion der hCG-induzierten Hormonproduktion mit einer verringerten mRNA-Menge einiger dieser Enzyme korreliert war (Frungeri et al, 2006). Für das Enzym StAR, konnte in humanen GZ die bekannte Erhöhung sowohl der mRNA- als auch der Proteinmenge durch hCG beobachtet werden (Fritz et al., 2001a; Ronen-Fuhrmann et al., 1997). Eine Veränderung der hCG-induzierten Erhöhung der mRNA- und Proteinmenge durch Glibenclamid konnte jedoch bei der hier gewählten Versuchsdauer von 24 h nicht beobachtet werden. Die Versuchsdauer war gewählt worden, weil die Reduktion der hCG-induzierten Progesteronproduktion durch Glibenclamid während dieses Inkubationsintervalls beobachtet worden war. Die gemessene mRNA-Menge der Enzyme 3β-HSD und SCC wurde weder durch hCG noch durch die Stimulantien nachweisbar verändert.

Semiquantitative Messungen der mRNA- bzw. der Proteinmenge der Enzyme sind zwar mit der Funktion korreliert, können alleine aber keine vollständige Aussage zur Funktion geben. Daher müssten in Zukunft Untersuchungen der Aktivität der genannten Enzyme durchgeführt werden, um die dargelegten Ergebnisse zu ergänzen.

Aus den beschriebenen Ergebnissen folgt, dass die wichtigen Enzyme der Steroidhormonsynthese auf mRNA-Ebene offensichtlich nicht beeinflusst werden. In ersten Versuchen sollten daher weitere mögliche Ansatzpunkte zur Erklärung der Reduktion der hCG-induzierten Progesteronproduktion durch Glibenclamid untersucht werden. Unter anderem wurde der Ausgangsstoff der Steroidhormonsynthese in humanen GZ, das Cholesterin, betrachtet. Gespeichertes Cholesterin befindet sich in Form von Estern in Lipidtröpfchen und wird bei Bedarf für die Steroidhormonsynthese bereitgestellt. Durch veränderte Fett- oder Lipidspeicherung in den Lipidtröpfchen kann es zu einer Veränderung der Steroidhormonsynthese kommen.

Bei Betrachtung von Ultradünnschnitten der Zellen im Elektronenmikroskop fiel eine erhöhte Menge an Lipidtröpfchen in mit hCG/DMSO behandelten humanen GZ auf. Diese Lipidtröpfchen waren bei mit hCG/Glibenclamid behandelten humanen GZ in geringerem Ausmaß vorhanden. Dies konnte lediglich bei einer von zwei Zellchargen beobachtet werden, könnte jedoch ein Hinweis darauf sein, dass die Reduktion der hCG-induzierten Progesteronproduktion humaner GZ durch Glibenclamid durch eine Beeinflussung der Cholesterinspeicherung in Lipidtröpfchen zustandekommt.

Die entsprechenden fluoreszenzmikroskopischen Versuche mit dem Farbstoff Nilrot ergaben keine offensichtlichen Veränderungen in der Lipidmenge in mit hCG/Glibenclamid behandelten Zellen im Vergleich zu mit hCG/DMSO behandelten Zellen. Ein Einfluss von Glibenclamid auf die Anzahl der Lipidtröpfchen kann trotzdem nicht vollständig ausgeschlossen werden, da Nilrot auch Membranen färbt und es möglich ist, dass Nilrot eine zu geringe Sensitivität für diese Messung aufweist, weil die möglichen Änderungen in der Cholesterinmenge zu gering sind.

Bei Betrachtung von Ultradünnschnitten humaner GZ anderer Zellchargen, die mit hCG/Glibenclamid behandelt worden waren, waren im Vergleich zu solchen, die mit hCG/DMSO behandelt worden waren, vermehrt Mitosen, Apoptosen und sekundäre Lysosomen (Bulling et al., 2000) zu erkennen. Im Gegensatz zu anderen Methoden handelt es sich bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Zellen jeweils um Stichproben einzelner Zellen, die jeweils eine leicht unterschiedliche Reaktion auf dieselbe Behandlung zeigen können.

Will man auf die durch Glibenclamid reduzierte Progesteronproduktion schließen, muss dies aus der Summe aller Beobachtungen geschehen. Da es sich bei den verwendeten humanen GZ-Kulturen um eine Mischung von Zellen verschiedener Patientinnen handelt, deren einzelne Gründe für die IVF nicht bekannt sind, ist es schwierig, mechanistische Schlüsse für alle diese Zellen zu ziehen. Einige Methoden lassen nur eine begrenzte Anzahl an Messungen zu (z.B. Elektronenmikroskopie) und sind daher nur bedingt repräsentativ. Bei anderen Methoden (z.B. Steroidhormonbestimmung im Überstand) ergibt sich ein Mittelwert, der die Variabilität der Zellen möglicherweise nicht berücksichtigt. Die Untersuchung einzelner Zellen von individuellen Patientinnen wird daher in Zukunft ein Weg sein, diese Fragen detaillierter anzugehen.

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass die mRNA- und die Proteinmenge der  $K_{ATP}$ -Untereinheiten selbst nicht direkt durch hCG beeinflusst wird. Die mRNA- und Proteinmenge der wichtigen Enzyme StAR, SCC,  $3\beta$ -HSD und Aromatase in der Steroidhormonsynthese wird offensichtlich nicht durch Pharmaka beeinflusst, die am  $K_{ATP}$  in humanen GZ wirken. Eine mögliche Veränderung in der Cholesterolspeicherung ist nicht auszuschließen und bedarf der weiteren Abklärung.

## 5.6 Ausblick

Kultivierte humane GZ stellen ein Zellmodell dar, anhand dessen vor allem Vorgänge der Luteinisierung im entstehenden CL des humanen Ovars untersucht werden können. Es stellt sich aber stets die Frage, ob die in Zellkultur gemessenen Veränderungen der Hormonkonzentrationen tatsächlich zu Veränderungen der Plasmaspiegel im Organismus führen würden, da dort Rückkopplungsmechanismen der Hormonproduktion greifen. Die klinische Bedeutung der vorliegenden Ergebnisse ist daher schwer abzuschätzen.

Als Modell für die Auswirkungen einer veränderten Aktivität des  $K_{ATP}$  im Organismus könnte eine Kir 6.1-Knockout-Maus dienen. Miki et al. (2002) beschrieben eine Kir 6.1-Knockout Maus und untersuchten an ihr vor allem die Prinzmetal Angina, da die Kir 6.1-Untereinheit vor allem im glatten Muskel in Gefäßen exprimiert wird (Miki et al., 2002; Seino und Miki, 2004). Die Kir 6.1-Knockout-Maus wäre in Bezug auf die Fertilität und eventuelle Auswirkungen auf



das Ovar interessant. Da Kir 6.1-Knockout-Mäuse jedoch schon nach 4-6 Wochen sterben, ist keine sinnvolle Aussage zur Fertilität möglich.

Die Tatsache, dass ein  $K_{ATP}$  in endokrinen Zellen des humanen Ovars vorkommt, ist auch aus pharmakologischer Sicht interessant, da der  $K_{ATP}$  im Ovar eventuell ein Angriffspunkt für Pharmaka sein könnte, die am  $K_{ATP}$  anderer Gewebe wirken. Diese Möglichkeit sollte noch untersucht werden und ist insofern interessant, da bisher nicht beschriebene Wirkungen dieser Pharmaka an endokrinen Zellen des Ovars ausgelöst und auf diese Weise erklärt werden könnten. Für Glibenclamid gibt es in diesem Zusammenhang keine publizierten Erfahrungen, da sich die typische Patientengruppe der Typ II-Diabetiker nicht mehr im reproduktiven Alter befindet. Nimmt man jedoch an, dass Glibenclamid die Progesteronproduktion tatsächlich reduziert, könnten  $K_{ATP}$ -Inhibitoren durch eine gestagenhemmende Wirkung eine Möglichkeit für eine Fertilitätskontrolle darstellen. Für Diazoxid und Minoxidil sind bislang ebenfalls keine Wirkungen an endokrinen Zellen des Ovars publiziert worden. Für sie ergeben sich jedoch eventuell neue Therapieansätze, sollten sie die Progesteronproduktion endokriner Zellen im Ovar im gegenteiligen Sinn wie Glibenclamid beeinflussen und somit zu einer erhöhten Progesteronproduktion führen. Sie könnten damit ein möglicher Therapieansatz für Patientinnen mit Gelbkörperschwäche (CL-Insuffizienz) sein, bei der eine Störung der CL-Funktion zu einer verminderten Progesteronproduktion und damit zu einer verminderten Wahrscheinlichkeit für eine Schwangerschaft führt.

## 6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Identifikation und Lokalisation eines ATP-abhängigen Kaliumkanals ( $K_{ATP}$ ) in isolierten humanen Granulosazellen und im humanen Ovar. In RT-PCR- und Western Blot-Experimenten zeigte sich, dass dieser in humanen GZ von IVF-Patientinnen ohne und mit PCOS aus den Untereinheiten Kir 6.1 und SUR 2B besteht. Die Proteine der  $K_{ATP}$ -Untereinheiten in kultivierten humanen GZ ließen sich in immunzytochemischen Färbungen mit Antikörpern, die gegen die Kir 6.1- und die SUR 2B-Untereinheit gerichtet waren, nachweisen. Immungoldfärbungen mit anschließender elektronenmikroskopischer Betrachtung zeigten, dass sich der  $K_{ATP}$  in der Plasmamembran humaner GZ befindet, nicht jedoch in Mitochondrien. Dies ergab sich auch in funktionellen Untersuchungen, in denen Diazoxid und Glibenclamid keine Wirkung auf das mitochondriale Membranpotential hatten. Der  $K_{ATP}$ , der aus den Untereinheiten Kir 6.1 und SUR 2B zusammengesetzt ist, entspricht dem Subtyp des  $K_{ATP}$ -Kanals, der typischerweise im glatten Muskel in Gefäßen vorkommt.

Die elektrophysiologischen Eigenschaften des  $K_{ATP}$  wurden durch Einzelkanalmessungen untersucht und ergaben, dass der beschriebene Kanal alle charakteristischen Merkmale eines  $K_{ATP}$  aufweist, nämlich eine Leitfähigkeit von etwa 44 pS, Einwärtsgleichrichtung und eine Regulation durch Nukleotide. Neben der Charakterisierung des  $K_{ATP}$  auf Einzelkanalebene wurde auch das Ansprechen des Kanals auf  $K_{ATP}$ -Öffner und -Inhibitoren in Whole-Cell-Messungen und durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Der  $K_{ATP}$  spricht auf den  $K_{ATP}$ -Inhibitor Glibenclamid an, was zu einer Depolarisation der Plasmamembran führt. Somit ist der  $K_{ATP}$  der erste Kanaltyp in humanen GZ, für den eine Rolle bei der Regulation des Membranpotentials gezeigt werden konnte.

Es ergaben sich Hinweise darauf, dass der  $K_{ATP}$ -Inhibitor Glibenclamid Auswirkungen auf die Expression des für die Östradiolsynthese wichtigen Enzyms Aromatase hat. Des Weiteren führte das Schließen des  $K_{ATP}$  durch Glibenclamid zu einer Senkung der hCG-induzierten Progesteronproduktion, der Hauptaufgabe der Granulosalutealzellen. Zur Klärung des zugrundeliegenden Mechanismus wurde der Einfluss des  $K_{ATP}$  auf verschiedene Syntheseschritte der Progesteronproduktion und die daran beteiligten Enzyme untersucht. Es konnte jedoch weder für das Enzym StAR noch für die Enzyme SCC und  $3\beta$ -HSD eine

Veränderung der Expression durch die Behandlung humaner GZ mit den  $K_{ATP}$ -Modulatoren Diazoxid und Glibenclamid nachgewiesen werden.

Bei der Betrachtung von Ultradünnschnitten im Elektronenmikroskop zeigten sich in humanen GZ, die mit hCG und Glibenclamid behandelt worden waren, weniger Lipidtröpfchen als nach der Behandlung mit hCG und DMSO. Zudem traten unter hCG und Glibenclamid vermehrt Mitosen und Apoptose auf, aber es bleibt unklar, wie sich dies auf die Progesteronproduktion auswirkt.

Diese Effekte von Glibenclamid auf den  $K_{ATP}$  bzw. das Membranpotential einerseits und auf die hCG-induzierte Progesteronproduktion in humanen GZ andererseits legt einen Zusammenhang zwischen der  $K_{ATP}$ -Aktivität und der Steroidhormonsynthese in humanen GZ nahe. Der Mechanismus dieses Effekts bleibt aber noch zu klären.

Da der  $K_{ATP}$  in humanen GZ vorkommt und einen potentiellen Angriffspunkt für pharmakologische Wirkstoffe darstellt, sollte er als möglicher Auslöser eventuell noch nicht berücksichtigter Wirkungen im Ovar weiter untersucht werden.

## 7. Literaturverzeichnis

- Agoston, A., L. Kunz, A. Krieger und A. Mayerhofer (2004). "Two types of calcium channels in human ovarian endocrine cells: involvement in steroidogenesis." J Clin Endocrinol Metab **89**(9): 4503-12.
- Aguilar-Bryan, L., J. P. t. Clement, G. Gonzalez, K. Kunjilwar, A. Babenko und J. Bryan (1998). "Toward understanding the assembly and structure of KATP channels." Physiol Rev **78**(1): 227-45.
- Aguilar-Bryan, L. und J. Bryan (1999). "Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels." Endocr Rev **20**(2): 101-35.
- Ashcroft, F. und P. Rorsman (2004). "Type 2 diabetes mellitus: not quite exciting enough?" Hum Mol Genet **13 Spec No 1**: R21-31.
- Ashcroft, F. M. und F. M. Gribble (1998). "Correlating structure and function in ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels." Trends Neurosci **21**(7): 288-94.
- Ashcroft, S. J. und F. M. Ashcroft (1992). "The sulfonylurea receptor." Biochim Biophys Acta **1175**(1): 45-59.
- Ashcroft, S. J. (2000). "The beta-cell K(ATP) channel." J Membr Biol **176**(3): 187-206.
- Babenko, A. P., L. Aguilar-Bryan und J. Bryan (1998). "A view of sur/KIR6.X, KATP channels." Annu Rev Physiol **60**: 667-87.
- Baczko, I., W. R. Giles und P. E. Light (2004). "Pharmacological activation of plasma-membrane KATP channels reduces reoxygenation-induced Ca(2+) overload in cardiac myocytes via modulation of the diastolic membrane potential." Br J Pharmacol **141**(6): 1059-67.
- Ballanyi, K. (2004). "Protective role of neuronal KATP channels in brain hypoxia." J Exp Biol **207**(Pt 18): 3201-12.
- Beech, D. J., H. Zhang, K. Nakao und T. B. Bolton (1993). "K channel activation by nucleotide diphosphates and its inhibition by glibenclamide in vascular smooth muscle cells." Br J Pharmacol **110**(2): 573-82.
- Berridge, M. V. und A. S. Tan (1993). "Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction." Arch Biochem Biophys **303**(2): 474-82.

- Brayden, J. E. (2002). "Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle." Clin Exp Pharmacol Physiol **29**(4): 312-6.
- Bryan, J. und L. Aguilar-Bryan (1999). "Sulfonylurea receptors: ABC transporters that regulate ATP-sensitive K(+) channels." Biochim Biophys Acta **1461**(2): 285-303.
- Bryan, J., W. H. Vila-Carriles, G. Zhao, A. P. Babenko und L. Aguilar-Bryan (2004). "Toward linking structure with function in ATP-sensitive K+ channels." Diabetes **53 Suppl 3**: S104-12.
- Bulling, A., F. D. Berg, U. Berg, D. M. Duffy, R. L. Stouffer, S. R. Ojeda, M. Gratzl und A. Mayerhofer (2000). "Identification of an ovarian voltage-activated Na+-channel type: hints to involvement in luteolysis." Mol Endocrinol **14**(7): 1064-74.
- Chien, E. K., Y. Zhang, H. Furuta und M. Hara (1999). "Expression of adenosine triphosphate-sensitive potassium channel subunits in female rat reproductive tissues: overlapping distribution of messenger ribonucleic acid for weak inwardly rectifying potassium channel subunit 6.1 and sulfonylurea-binding regulatory subunit 2." Am J Obstet Gynecol **180**(5): 1121-6.
- Cole, W. C. und O. Clement-Chomienne (2003). "ATP-sensitive K+ channels of vascular smooth muscle cells." J Cardiovasc Electrophysiol **14**(1): 94-103.
- Cui, Y., S. Tran, A. Tinker und L. H. Clapp (2002). "The molecular composition of K(ATP) channels in human pulmonary artery smooth muscle cells and their modulation by growth." Am J Respir Cell Mol Biol **26**(1): 135-43.
- Cuong, D. V., N. Kim, H. Joo, J. B. Youm, J. Y. Chung, Y. Lee, W. S. Park, E. Kim, Y. S. Park und J. Han (2005). "Subunit composition of ATP-sensitive potassium channels in mitochondria of rat hearts." Mitochondrion **5**(2): 121-33.
- Föhr, K. J., W. Warchol und M. Gratzl (1993). "Calculation and control of free divalent cations in solutions used for membrane fusion studies." Methods Enzymol **221**: 149-57.
- Fritz, S., R. Grunert, D. M. Stocco, D. B. Hales und A. Mayerhofer (2001a). "StAR protein is increased by muscarinic receptor activation in human luteinized granulosa cells." Mol Cell Endocrinol **171**(1-2): 49-51.

- Fritz, S., I. Wessler, R. Breitling, W. Rossmann, S. R. Ojeda, G. A. Dissen, A. Amsterdam und A. Mayerhofer (2001b). "Expression of muscarinic receptor types in the primate ovary and evidence for nonneuronal acetylcholine synthesis." J Clin Endocrinol Metab **86**(1): 349-54.
- Fritz, S., L. Kunz, N. Dimitrijevic, R. Grunert, C. Heiss und A. Mayerhofer (2002). "Muscarinic receptors in human luteinized granulosa cells: activation blocks gap junctions and induces the transcription factor early growth response factor-1." J Clin Endocrinol Metab **87**(3): 1362-7.
- Frungieri, M. B., S. I. Gonzalez-Calvar, F. Parborell, M. Albrecht, A. Mayerhofer und R. S. Calandra (2006). "Cyclooxygenase-2 and prostaglandin F2 alpha in Syrian hamster Leydig cells: Inhibitory role on luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin-stimulated testosterone production." Endocrinology **147**(9): 4476-85.
- Garlid, K. D., P. Paucek, V. Yarov-Yarovoy, X. Sun und P. A. Schindler (1996). "The mitochondrial KATP channel as a receptor for potassium channel openers." J Biol Chem **271**(15): 8796-9.
- Garlid, K. D., P. Dos Santos, Z. J. Xie, A. D. Costa und P. Paucek (2003). "Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel in cardiac function and cardioprotection." Biochim Biophys Acta **1606**(1-3): 1-21.
- Gore, S. D. und H. R. Behrman (1984). "Alteration of transmembrane sodium and potassium gradients inhibits the action of luteinizing hormone in the luteal cell." Endocrinology **114**(6): 2020-31.
- Gribble, F. M., R. Ashfield, C. Ammala und F. M. Ashcroft (1997). "Properties of cloned ATP-sensitive K+ currents expressed in Xenopus oocytes." J Physiol **498 ( Pt 1)**: 87-98.
- Gribble, F. M. und F. Reimann (2002). "Pharmacological modulation of K(ATP) channels." Biochem Soc Trans **30**(2): 333-9.
- Gribble, F. M. und F. Reimann (2003). "Sulphonylurea action revisited: the post-cloning era." Diabetologia **46**(7): 875-91.
- Griffin, J. E. und S. R. Ojeda (2004). *Textbook of Endocrine Physiology*. Oxford University Press.

- Gross, G. J. und R. M. Fryer (1999). "Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and myocardial preconditioning." Circ Res **84**(9): 973-9.
- Hanna, S. T., K. Cao und R. Wang (2005). "Interaction of acetylcholine with Kir6.1 channels heterologously expressed in human embryonic kidney cells." Eur J Pharmacol **515**(1-3): 34-42.
- Higuchi, T., A. Kaneko, J. H. Abel, Jr. und G. D. Niswender (1976). "Relationship between membrane potential and progesterone release in ovine corpora lutea." Endocrinology **99**(4): 1023-32.
- Höhne-Zell, B. und M. Gratzl (1996). "Adrenal chromaffin cells contain functionally different SNAP-25 monomers and SNAP-25/syntaxin heterodimers." FEBS Lett **394**(2): 109-16.
- Inagaki, N., T. Gono, J. P. t. Clement, N. Namba, J. Inazawa, G. Gonzalez, L. Aguilar-Bryan, S. Seino und J. Bryan (1995a). "Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor." Science **270**(5239): 1166-70.
- Inagaki, N., J. Inazawa und S. Seino (1995b). "cDNA sequence, gene structure, and chromosomal localization of the human ATP-sensitive potassium channel, uKATP-1, gene (KCNJ8)." Genomics **30**(1): 102-4.
- Inagaki, N., T. Gono, J. P. Clement, C. Z. Wang, L. Aguilar-Bryan, J. Bryan und S. Seino (1996). "A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels." Neuron **16**(5): 1011-7.
- Inagaki, N. und S. Seino (1998). "ATP-sensitive potassium channels: structures, functions, and pathophysiology." Jpn J Physiol **48**(6): 397-412.
- Ishida, H., N. Higashijima, Y. Hirota, C. Genka, H. Nakazawa, H. Nakaya und T. Sato (2004). "Nicorandil attenuates the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload with accompanying depolarization of the mitochondrial membrane in the heart." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **369**(2): 192-7.
- Isomoto, S., C. Kondo, M. Yamada, S. Matsumoto, O. Higashiguchi, Y. Horio, Y. Matsuzawa und Y. Kurachi (1996). "A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel." J Biol Chem **271**(40): 24321-4.
- Junqueira, L. C. U., J. Carneiro und M. Gratzl (Hrsg.) (2005). *Histologie*. Springer.

- Kamouchi, M. und K. Kitamura (1994). "Regulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by ATP and nucleotide diphosphate in rabbit portal vein." Am J Physiol **266**(5 Pt 2): H1687-98.
- Kane, G. C., X. K. Liu, S. Yamada, T. M. Olson und A. Terzic (2005). "Cardiac KATP channels in health and disease." J Mol Cell Cardiol **38**(6): 937-43.
- Koh, S. D., K. K. Bradley, M. G. Rae, K. D. Keef, B. Horowitz und K. M. Sanders (1998). "Basal activation of ATP-sensitive potassium channels in murine colonic smooth muscle cell." Biophys J **75**(4): 1793-800.
- Kunz, L., A. Thalhammer, F. D. Berg, U. Berg, D. M. Duffy, R. L. Stouffer, G. A. Dissen, S. R. Ojeda und A. Mayerhofer (2002). "Ca<sup>2+</sup>-activated, large conductance K<sup>+</sup> channel in the ovary: identification, characterization, and functional involvement in steroidogenesis." J Clin Endocrinol Metab **87**(12): 5566-74.
- Kunz, L., R. Ramsch, A. Krieger, K. A. Young, G. A. Dissen, R. L. Stouffer, S. R. Ojeda und A. Mayerhofer (2006a). "Voltage-dependent K<sup>+</sup> channel acts as sex steroid sensor in endocrine cells of the human ovary." J Cell Physiol **206**(1): 167-74.
- Kunz, L., J. S. Richter und A. Mayerhofer (2006b). "The adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channel in endocrine cells of the human ovary: role in membrane potential generation and steroidogenesis." J Clin Endocrinol Metab **91**(5): 1950-5.
- Kusaka, M., N. Tohse, H. Nakaya, T. Tanaka, M. Kanno und S. Fujimoto (1993). "Membrane currents of porcine granulosa cells in primary culture: characterization and effects of luteinizing hormone." Biol Reprod **49**(1): 95-103.
- Langheinrich, U. und J. Daut (1997). "Hyperpolarization of isolated capillaries from guinea-pig heart induced by K<sup>+</sup> channel openers and glucose deprivation." J Physiol **502** ( Pt 2): 397-408.
- Li, Y., S. Ganta, F. B. von Stein, D. E. Mason, B. M. Mitchell und L. C. Freeman (2003). "4-aminopyridine decreases progesterone production by porcine granulosa cells." Reprod Biol Endocrinol **1**: 31.
- Liu, Y., T. Sato, B. O'Rourke und E. Marban (1998). "Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection?" Circulation **97**(24): 2463-9.



- Löhrke, B., M. Derno, B. Kruger, T. Viergutz, H. Matthes und W. Jentsch (1997). "Expression of sulphonylurea receptors in bovine monocytes from animals with a different metabolic rate." Pflugers Arch **434**(6): 712-20.
- Loussouarn, G., T. Rose und C. G. Nichols (2002). "Structural basis of inward rectifying potassium channel gating." Trends Cardiovasc Med **12**(6): 253-8.
- Malhi, H., A. N. Irani, P. Rajvanshi, S. O. Suadcani, D. C. Spray, T. V. McDonald und S. Gupta (2000). "KATP channels regulate mitogenically induced proliferation in primary rat hepatocytes and human liver cell lines. Implications for liver growth control and potential therapeutic targeting." J Biol Chem **275**(34): 26050-7.
- Manikkam, M., Y. Li, B. M. Mitchell, D. E. Mason und L. C. Freeman (2002). "Potassium channel antagonists influence porcine granulosa cell proliferation, differentiation, and apoptosis." Biol Reprod **67**(1): 88-98.
- Mannhold, R. (2004). "KATP channel openers: structure-activity relationships and therapeutic potential." Med Res Rev **24**(2): 213-66.
- Mason, D. E., K. E. Mitchell, Y. Li, M. R. Finley und L. C. Freeman (2002). "Molecular basis of voltage-dependent potassium currents in porcine granulosa cells." Mol Pharmacol **61**(1): 201-13.
- Matsuo, M., Y. Kimura und K. Ueda (2005). "KATP channel interaction with adenine nucleotides." J Mol Cell Cardiol **38**(6): 907-16.
- Mattioli, M., B. Barboni und L. J. DeFelice (1993). "Calcium and potassium currents in porcine granulosa cells maintained in follicular or monolayer tissue culture." J Membr Biol **134**(1): 75-83.
- Mayerhofer, A., G. A. Dissen, M. E. Costa und S. R. Ojeda (1997). "A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary." Endocrinology **138**(8): 3320-9.
- Mayerhofer, A., M. B. Frungieri, A. Bulling und S. Fritz (1999a). "Sources and function of neuronal signalling molecules in the gonads." Medicina (B Aires) **59**(5 Pt 2): 542-5.
- Mayerhofer, A., H. C. Hemmings, Jr., G. L. Snyder, P. Greengard, S. Boddien, U. Berg und C. Brucker (1999b). "Functional dopamine-1 receptors and DARPP-32 are expressed in human ovary and granulosa luteal cells in vitro." J Clin Endocrinol Metab **84**(1): 257-64.

- Mayerhofer, A. und L. Kunz (2006). "Ion channels of primate ovarian endocrine cells: identification and functional significance." Expert Rev Endocrinol Metab **1**(4): 549-555.
- Miki, T., M. Suzuki, T. Shibasaki, H. Uemura, T. Sato, K. Yamaguchi, H. Koseki, T. Iwanaga, H. Nakaya und S. Seino (2002). "Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1." Nat Med **8**(5): 466-72.
- Miki, T. und S. Seino (2005). "Roles of KATP channels as metabolic sensors in acute metabolic changes." J Mol Cell Cardiol **38**(6): 917-25.
- Moreau, C., A. L. Prost, R. Derand und M. Vivaudou (2005). "SUR, ABC proteins targeted by KATP channel openers." J Mol Cell Cardiol **38**(6): 951-63.
- Nelson, M. T. und J. M. Quayle (1995). "Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle." Am J Physiol **268**(4 Pt 1): C799-822.
- Nichols, C. G. und W. J. Lederer (1991). "The mechanism of KATP channel inhibition by ATP." J Gen Physiol **97**(5): 1095-8.
- Nichols, C. G. und A. N. Lopatin (1997). "Inward rectifier potassium channels." Annu Rev Physiol **59**: 171-91.
- Nichols, C. G. (2006). "KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism." Nature **440**(7083): 470-6.
- Noma, A. (1983). "ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle." Nature **305**(5930): 147-8.
- Platano, D., M. C. Magli, A. P. Ferraretti, L. Gianaroli und G. Aicardi (2005). "L- and T-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in human granulosa cells: functional characterization and cholinergic regulation." J Clin Endocrinol Metab **90**(4): 2192-7.
- Pountney, D. J., Z. Q. Sun, L. M. Porter, M. N. Nitabach, T. Y. Nakamura, D. Holmes, E. Rosner, M. Kaneko, T. Manaris, T. C. Holmes und W. A. Coetzee (2001). "Is the molecular composition of K(ATP) channels more complex than originally thought?" J Mol Cell Cardiol **33**(8): 1541-6.
- Quinn, K. V., J. P. Giblin und A. Tinker (2004). "Multisite phosphorylation mechanism for protein kinase A activation of the smooth muscle ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel." Circ Res **94**(10): 1359-66.
- Reimann, F. und F. M. Ashcroft (1999). "Inwardly rectifying potassium channels." Curr Opin Cell Biol **11**(4): 503-8.

- Reynolds, E. S. (1963). "The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy." J Cell Biol **17**: 208-12.
- Reyss, A. C., C. Proust-Richard, S. Catteau-Jonard und D. Dewailly (2006). "[Rotterdam consensus in adolescent girls: which investigations and how to interpret them to make the diagnosis of PCOS?]." Gynecol Obstet Fertil **34**(4): 341-6.
- Richards, J. S. und L. Hedin (1988). "Molecular aspects of hormone action in ovarian follicular development, ovulation, and luteinization." Annu Rev Physiol **50**: 441-63.
- Ronen-Fuhrmann, T., R. Timberg, S. R. King, K. H. Hales, D. B. Hales, D. M. Stocco und J. Orly (1998). "Spatio-temporal expression patterns of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) during follicular development in the rat ovary." Endocrinology **139**(1): 303-15.
- Rotterdam-Workgroup (2004). "Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS)." Hum Reprod **19**(1): 41-7.
- Seino, S. (1999). "ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies." Annu Rev Physiol **61**: 337-62.
- Seino, S. und T. Miki (2003). "Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels." Prog Biophys Mol Biol **81**(2): 133-76.
- Seino, S. und T. Miki (2004). "Gene targeting approach to clarification of ion channel function: studies of Kir6.x null mice." J Physiol **554**(Pt 2): 295-300.
- Shi, N. Q., B. Ye und J. C. Makielski (2005). "Function and distribution of the SUR isoforms and splice variants." J Mol Cell Cardiol **39**(1): 51-60.
- Shyng, S. und C. G. Nichols (1997). "Octameric stoichiometry of the KATP channel complex." J Gen Physiol **110**(6): 655-64.
- Stocco, D. M. und B. J. Clark (1996). "Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells." Endocr Rev **17**(3): 221-44.
- Teramoto, N. (2006). "Physiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in smooth muscle." J Physiol **572**(Pt 3): 617-24.
- Yamada, A., N. Gaja, S. Ohya, K. Muraki, H. Narita, T. Ohwada und Y. Imaizumi (2001). "Usefulness and limitation of DiBAC4(3), a voltage-sensitive fluorescent dye, for the measurement of membrane potentials regulated by

- recombinant large conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels in HEK293 cells." Jpn J Pharmacol **86**(3): 342-50.
- Yamada, K. und N. Inagaki (2005). "Neuroprotection by  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels." J Mol Cell Cardiol **38**(6): 945-9.
- Yamada, M., S. Isomoto, S. Matsumoto, C. Kondo, T. Shindo, Y. Horio und Y. Kurachi (1997). "Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive  $\text{K}^{+}$  channel." J Physiol **499** ( Pt **3**): 715-20.
- Yokoshiki, H., M. Sunagawa, T. Seki und N. Sperelakis (1998). "ATP-sensitive  $\text{K}^{+}$  channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells." Am J Physiol **274**(1 Pt 1): C25-37.
- Yoshida, H., J. E. Feig, A. Morrissey, I. A. Ghu, M. Artman und W. A. Coetzee (2004). "K ATP channels of primary human coronary artery endothelial cells consist of a heteromultimeric complex of Kir6.1, Kir6.2, and SUR2B subunits." J Mol Cell Cardiol **37**(4): 857-69.
- Zhang, H. L. und T. B. Bolton (1996). "Two types of ATP-sensitive potassium channels in rat portal vein smooth muscle cells." Br J Pharmacol **118**(1): 105-14.

## 8. Anhang

### 8.1 Zeitschriftenartikel

Kunz, L., J. S. Richter, A. Mayerhofer (2006). "The adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channel in endocrine cells of the human ovary: role in membrane potential generation and steroidogenesis." J Clin Endocrinol Metab **91**(5):1950-5.

In Vorbereitung: Richter, J. S., A. Mayerhofer und L. Kunz. „Functional characterization of the  $K_{ATP}$  in endocrine cells of the human ovary“

### 8.2 Auszeichnungen

Richter, J. S.: Novartis-Preis „Junge Endokrinologie“ 2005, vergeben von der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie für die Arbeit mit dem Titel: „Identification of an ATP-dependent potassium channel in endocrine cells of the human ovary: Role in steroidogenesis.“

### 8.3 Kongressbeiträge

Richter, J. S., L. Kunz und A. Mayerhofer (2004). „ATP-sensitive potassium channels in the human ovary.“ Young Active Research Meeting der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Münster.

Richter, J. S., L. Kunz, R. Rämisch, A. Krieger und A. Mayerhofer (2005). „ $K_{ATP}$  in human endocrine ovarian cells composed of Kir 6.1 and SUR 2B.“ Annual Meeting of the Biophysical Society, Long Beach, USA.

Kunz L., A. Bulling, M. Traut, J. Richter, F. Berg, U. Berg und A. Mayerhofer (2005), „Physiologische Rolle von Ionenkanälen in humanen Granulosazellen von IVF-Patientinnen.“ 1. Kongress des Dachverbands für Reproduktionsbiologie und -medizin, Münster.

Richter, J. S., L. Kunz und A. Mayerhofer (2006). „Insights into the physiological role of the  $K_{ATP}$  channel in human endocrine ovarian cells – a target for drugs.“ Exp Clin Endocrinol Diabetes **114**:S1-S84.

#### 8.4 Danksagung

Diese Arbeit entstand im Rahmen des Graduiertenkollegs 333 „Biologie menschlicher Erkrankungen“ am Anatomischen Institut am Biederstein der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Betreuung durch Herrn Professor Dr. Artur Mayerhofer und Herrn Dr. Lars Kunz.

Herrn Prof. Dr. Artur Mayerhofer danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, viele anregende Diskussionen und die Begutachtung meiner Arbeit.

Herrn Dr. Lars Kunz danke ich dafür, dass er ganz entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, indem er mich mit viel Geduld und Begeisterung in die Thematik einführte und jederzeit für Fragen und hilfreiche und motivierende Diskussionen zur Verfügung stand.

Herrn Prof. Dr. Martin Biel danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und für die Vertretung dieser Dissertation vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie.

Für weitere kritische Diskussionen und Durchsicht dieser Arbeit danke ich Herrn Dr. Andreas Bulling.

Herrn Professor Dr. Manfred Gratzl und Frau Dr. Karen Schmidt-Bäse gilt mein aufrichtiger Dank für die Betreuung und Förderung der Arbeit im Rahmen des Graduiertenkollegs 333 „Biologie menschlicher Erkrankungen“ in München.

Für die gute Zusammenarbeit und die ausgesprochen freundliche Arbeitsatmosphäre danke ich PD Dr. Martin Albrecht, Thomas Braun, Annette Krieger, Andreas Mauermayer, Christine Mayer, Karin Metzrath, Gerhard Prechtner, Romi Rämsch, Marlies Rauchfuß, Sebastian Reindl, Dr. Axel Reinhardt, Christine Roggors, Christoph Schell, Gabriele Terfloth, Astrid Tiefenbacher, Matthias Traut, Prof. Dr. Laurenz Wurzinger und Barbara Zschesche.

Herrn Prof. Dr. Dieter Berg, Frau Dr. Ulrike Berg und ihren Mitarbeitern im IVF-Labor A.R.T. Bogenhausen, München, danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Bereitstellung der Mittel.

Nicht zuletzt möchte ich mich sehr herzlich bei meinen Eltern und meinem Bruder bedanken, die mich stets unterstützt und motiviert haben und die mir mein Studium und diese wissenschaftliche Arbeit überhaupt ermöglicht haben.

## 8.5 Lebenslauf

Name	Johanna Sophia Richter
Geburtsdatum	22.02.1979
Geburtsort	Freiburg im Breisgau
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	Ledig
Eltern	Dr.-Ing. Herbert Richter, Diplom-Physiker Dr. rer. nat. Gabriele Schroeter, geb. Wachsmuth, Diplom-Chemikerin
Schulbildung	Grundschule Vörstetten (1985-1988) Grundschule Köngen (1988-1989) Robert-Bosch-Gymnasium Wendlingen (a.N.) (1989-1998) Abitur (1998)
Studium	Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians- Universität, München (1998-2002) 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung (2001) 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung (2002) 1. Hälfte des Praktischen Jahres in der St. Anna- Apotheke, München (November 2002-April 2003) 2. Hälfte des Praktischen Jahres bei MSD (Merck, Sharp & Dohme), Haar (Mai 2003- Oktober 2003) 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung (2003)
Promotion	<i>„Kaliumkanäle im menschlichen Ovar und in humanen Granulosalutealzellen: Charakterisierung des ATP- abhängigen Kaliumkanals“</i> (seit Januar 2004)
Förderung	Die Promotion wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs 333 „Biologie menschlicher Erkrankungen“ gefördert.