

**Etablierung eines Expressions- und Testsystems für Membranrezeptoren  
an Oozyten von *Xenopus laevis*.  
Anwendbarkeit für membranständige Steroidrezeptoren?**

**Jörg Reichert**

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie  
der Universität München,  
Leiter: Prof. Dr. Stefan Endres

**Etablierung eines Expressions- und Testsystems für Membranrezeptoren  
an Oozyten von *Xenopus laevis*.  
Anwendbarkeit für membranständige Steroidrezeptoren?**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Jörg Reichert**

aus

**München**

im Jahre

**2003**

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

**Berichterstatter:** Prof. Dr. M. Wehling

**Mitberichterstatter:** Priv. Doz. Dr. St. Zahler

**Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:** Dr. rer. nat. C. Eisen

**Dekan:** Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

**Tag der mündlichen Prüfung:** 05.06.2003

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

J. Reichert, C. Eisen, O.E. Janßen, M. Wehling

Fluoreszenzmessung von intrazellulärem Kalzium als Nachweissystem der funktionellen Expression von Membranrezeptoren in *Xenopus* Oozyten

H.-G. Klein und D. Seidel (Hrsg.); Research Festival '96; ISBN 3-8208-1299-7,

MMV Medizin Verlag München

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>4</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
<b>2. METHODEN</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Überblick über den Ablauf der Methodik</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Expression in <i>Xenopus</i> Oozyten</b>	<b>19</b>
2.2.1 Gewinnung der Oozyten	19
2.2.2 Separation der Oozyten von <i>Xenopus laevis</i>	20
2.2.3 Selektion der Oozyten	20
2.2.4 Mikroinjektion in die Oozyten	21
2.2.5 Kultivierung der Oozyten bzw. Inkubation	22
<b>2.3 Reifungsversuche</b>	<b>22</b>
<b>2.4 Messung von intrazellulärem Calcium</b>	<b>22</b>
2.4.1 <i>Calcium Imaging</i> mit Fura-2	22
2.4.2 Durchführung der Messung	23
2.4.3 Quenchen des Farbstoffes	24
2.4.4 Auswertung der Calciummessungen	24
<b>2.5 Präparation der zu injizierenden Kernsäuren</b>	<b>26</b>
2.5.1 Isolierung von total RNA aus Zellkultur	26
2.5.2 Isolierung von mRNA	27
2.5.3 <i>In-vitro</i> Transkription	27
2.5.4 Eukaryontischer Expressionsvektor	28
<b>2.6 Nachweise über die Qualität und Stabilität der RNA</b>	<b>28</b>
2.6.1 DNA für den GnRH-Rezeptor	28
2.6.2 DNA für den Thrombin-Rezeptor	29
2.6.3 Präparations Gelelektrophorese	29
2.6.4 Herstellung der DIG-markierten Sonden	29
2.6.5 Denaturierende Agarose-Formaldehyd-Gelelektrophorese	30
2.6.6 Transfer auf die Nylon-Membran (Northern Blot)	30
2.6.7 Fixieren der RNA an die Membran	31
2.6.8 Hybridisieren der Membran	31
2.6.9 Waschen der hybridisierten Membran	31
2.6.10 Immunologische Detektion mit Anti-DIG-AP-Konjugaten	31
<b>2.7 Puffer und Lösungen</b>	<b>32</b>

<b>2.8 Geräte und Verbrauchsmaterial</b>	<b>35</b>
2.8.1 Verbrauchsmaterial	35
2.8.2 Geräte für die <i>Xenopus</i> -Oozyten	35
2.8.3 <i>Calcium-Imaging</i> System	35
2.8.4 Ultrazentrifugen	35
2.8.5 Sonstige Geräte	36
2.8.6 Software	36
<b>2.9 Zellen und Versuchstiere</b>	<b>36</b>
2.9.1 Herkunft der <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	36
2.9.2 Herkunft der Schweineleber	36
2.9.3 Herkunft der glatten Gefäßmuskelzellen	36
2.9.4 Herkunft der transformationskompetenten <i>E. coli</i> JM109 Zellen	36
<b>2.10 Reagentien</b>	<b>37</b>
2.10.1 Reagentien für die Präparation der Oozyten und Durchführung der Fluoreszenzmessung	37
2.10.2 Agentien zur funktionellen Calciummessung	37
2.10.3 Reagentien für die Molekularbiologie	37
2.10.4 Erworbene DNA und RNA	38
2.10.5 Sonstige Reagentien	38
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Calciummessungen an endogenen Rezeptoren</b>	<b>39</b>
3.1.1 Progesteron	39
3.1.2 Lysophosphatidylsäure (LPA)	42
3.1.3 Angiotensin II	44
3.1.4 Acetylcholin	46
<b>3.2 Expression des GnRH-Rezeptors</b>	<b>48</b>
3.2.1 Änderungen der zugegebenen GnRH-Konzentration	49
3.2.2 Änderungen der injizierten GnRH-R-RNA-Menge	52
3.2.3 Beimengungen von GnRH-R-RNA zu anderer RNA	55
3.2.4 Funktionelle Expression des GnRH-R-Rezeptors durch einen eukaryontischen Expressionsvektor	56
3.2.5 Interaktion von GnRH und LPA-Reaktionen	58
3.2.6 Untersuchung der Stabilität der injizierten GnRH-R-RNA in den Oozyten	61
<b>3.3 Anwendung auf schnelle Steroideffekte an RNA-injizierten Oozyten</b>	<b>62</b>
3.3.1 Aldosteron	62
3.3.2 Expression des membranständigen Progesteron-bindenden Proteins (mPR)	63
<b>3.4 Calciummessungen an weiteren exprimierten, exogenen Rezeptoren</b>	<b>64</b>
3.4.1 Thrombin	64

3.4.2 Angiotensin II	66
<b>3.5 Untersuchungen der Qualität der injizierten RNA</b>	<b>69</b>
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>71</b>
<b>4.1 Etablierung des Testsystems durch Untersuchung endogener Rezeptoren an Oozyten von <i>Xenopus laevis</i></b>	<b>71</b>
4.1.1 Angiotensin II (AII)	71
4.1.2 Acetylcholin (ACh)	73
4.1.3 Lysophosphatidylsäure (LPA)	74
<b>4.2 Nicht-genomische Steroideffekte an Oozyten von <i>Xenopus laevis</i></b>	<b>75</b>
4.2.1 Oozytenreifung	75
4.2.2 Nicht-genomische Reaktionen von Progesteron zur Fortsetzung der Reifeteilung	77
4.2.3 Calcium	81
<b>4.3 Anwendung des Testsystems zur Untersuchung nicht-genomischer Progesteroneffekte an Oozyten von <i>Xenopus laevis</i></b>	<b>84</b>
<b>4.4 Anwendung des Expressions- und Testsystems auf den Thrombin-Rezeptor</b>	<b>87</b>
<b>4.5 Etablierung des Expressions- und Testsystems am GnRH-Rezeptor</b>	<b>88</b>
4.5.1 <i>In-vitro</i> transkribierte RNA, die für den GnRH-Rezeptor kodiert	88
4.5.2 GnRH-R codierender eukaryontischer Expressionsvektor	91
4.5.3 Interaktionen zwischen exogenem GnRH-Rezeptor und endogenen LPA-Signalwegen	91
<b>4.6 Nicht-genomische Steroideffekte in anderen Geweben</b>	<b>92</b>
<b>4.7 Anwendung des Expressions- und Testsystems zur Untersuchung nicht-genomischer Steroideffekte durch Injektion von RNA in die Oozyten</b>	<b>96</b>
4.7.1 putativer membranständiger Progesteron-Rezeptor	96
4.7.2 putativer Aldosteron-Membran-Rezeptor durch total- und mRNA aus VSMC	99
<b>4.8 Vorzüge, weitere Anwendbarkeit und kritische Betrachtung des vorgestellten Expressions- und Testsystems an Oozyten von <i>Xenopus laevis</i></b>	<b>101</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>104</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>105</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>121</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>122</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -DP	17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one
ACh	Acetylcholin
ACTH	adrenocorticotrophes Hormon
ALDO	Aldosteron
Ang	Angiotensin II
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine)
bzw.	beziehungsweise
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre freie Calcium Konzentration
cAMP	3',5'-cyclo Adenosinmonophosphat
CHO-Zellen	Chinesische Hamster Ovar Zellen
d	Tage
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dT	Desoxythymidin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylenglycol bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin Releasing-Hormon, (= LH-RH)
GnRH-R	GnRH-Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
GTP- $\gamma$ S	Guanosin-5'-O-3-thiotriphosphat
GVBD	Auflösung des Zellkerns bei der Reifeteilung (germinal vesicle break down)
hCG	humanes Choriongonadotropin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HPCD	2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextran
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trisphosphat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LH	Luteinisierendes Hormon
LH-RH	Luteinisierendes Hormon Releasing-Hormon, (= GnRH)
LPA	L- $\alpha$ -Lysophosphatidylsäure (1-oleyl-2-hydroxy- <i>sn</i> -glycero-3-phosphat)
MAP-Kinase	Mitogen-Activated Protein Kinase



MIH	Zellreifung auslösendes Hormon (Maturing Inducing Hormone)
MIS	Zellreifung auslösende Substanz (Maturing Inducing Substance)
MPF	Zellreifung fördernder Faktor (Maturing Promoting Factor)
mPR	membranständiges Progesteron-bindendes Protein
mRNA	Poly (A) <sup>+</sup> RNA, messenger RNA
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PKA	Phosphokinase A
PKC	Phosphokinase C
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PME	Phosphatidylmonomethylethanolamid
PROG	Progesteron
PTX	Pertussis Toxin
R5020	17,21-dimethyl-19-norpregnen-4,8-dien-3,20-dion
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
ROI	Region of interest; (zur Auswertung gewählter Bereich der Oozyte)
RT	bei Raumtemperatur
SA-PMP	Streptavidin paramagnetische Partikel
SHBG	Sexualhormon-bindendes Globulin
SM	Sphingomyelin
THR	Thrombin Rezeptor
TMB-8	8-(N,N-diethylamino) octyl-3,4,5-trimethoxybenzoat
tRNA	transfer RNA
VEC	Endothelzellen von Scherineaorta (vascular endothel cells)
VSMC	glatte Gefäßmuskelzellen (vascular smooth muscle cells)
VT	Vortexen der Probe
WP	Waschpuffer
WT	Wildtyp-(Oozyte)
<i>X. l.</i>	<i>Xenopus laevis</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1. EINLEITUNG

Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* finden in der Wissenschaft breite Anwendungsmöglichkeiten.

So beschäftigten sich Entwicklungsbiologen schon seit langem mit Zellreifungsexperimenten. Das Steroidhormon Progesteron in Konzentrationen unter  $1\mu\text{M}$  im Medium (Baulieu et al., 1978), aber auch eine Reihe weiterer Stoffe lösen die Fortsetzung der Zellreifung, der in der Prophase der 1. Meiotischen Teilung stehen gebliebenen Oozyten aus.

Die Entdeckung von Gurdon et al. (1971), daß Oozyten von *Xenopus laevis* fremde, ins Zytoplasma injizierte mRNA, translatieren und das dem Gen entsprechende Protein synthetisieren können, zeigte der Molekularbiologie eine neue Methode zur Expression von Proteinen und machte sie zu einem beliebten „Werkzeug“ in der Molekularbiologie. Wegen der enormen Zellgröße von 1,2mm lassen sich Nukleinsäuren relativ einfach in die Oozyten injizieren.

Da *Xenopus* Oozyten 200.000 mal mehr Ribosomen und 10.000 mal mehr transfer RNA (tRNA) besitzen, als somatische Zellen, wird in der Regel eine hohe Transkriptionseffizienz erreicht.

Als eukaryontische Zellen besitzen sie die Möglichkeit, die gebildeten exogenen Proteine posttranslational zu modifizieren und damit in der richtigen Tertiärstruktur zu bilden. Schritte wie Phosphorylierungen, Glycosilierungen, Spaltung von Vorläuferproteinen und sogar das Zusammenfügen von Proteinen, die aus mehreren Untereinheiten bestehen, nach Injektion eines mRNA-Gemisches, sind möglich.

In der Regel werden die exprimierten Proteine darüberhinaus im erwarteten Zellkompartiment angeordnet. Ein Membranprotein kann in die Zellemban eingebaut werden. Insbesondere zur Expression von Membranproteinen finden *Xenopus* Oozyten daher Verwendung, vorallem bei G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren und ligandengebundenen Ionenkanälen.

*Xenopus* Oozyten besitzen selbst eine große Vielzahl von eigenen, endogenen Hormon- und Neurotransmitterrezeptoren. Eine genauere Untersuchung dieser ist unter dem Gesichtspunkt, in den Oozyten fremde Rezeptoren zu exprimieren und zu untersuchen, von Bedeutung.

Rezeptoren, deren Signalweg über Phospholipase C abläuft, führen bei ihrer Aktivierung in *Xenopus* Oozyten zu einer Ansammlung von Inositol 1,4,5-Trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ), zu einer Erhöhung von intrazellulären freiem Calcium  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , und der Öffnung von Calcium-abhängigen Chlorid-Kanälen in der Zellmembran, was eine kurzzeitige Depolarisierung hervorruft.

Gewöhnlich wird die erfolgreiche Expression von Membranrezeptoren über Immunoprecipitation mit Anti-Rezeptor-Antikörpern oder über Ligandenbindung nachgewiesen.

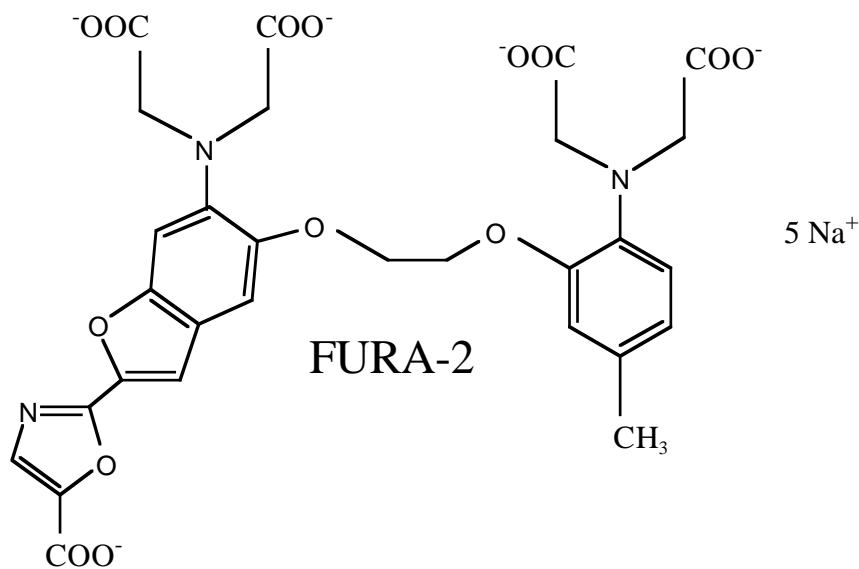
Sind Antikörper nicht verfügbar, oder sollen die Funktionalität des Rezeptors oder nachfolgende Signalwege analysiert werden, besteht die Möglichkeit elektro-physiologischer Untersuchungen mit der sog. *patch clamp*-Methode. Dabei werden mit Hilfe von Mikroelektroden Kurzschluß-Ströme an der Zellmembran zwischen intrazellulär und extrazellulär gemessen, die von einer erhöhten Leitfähigkeit durch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Chloridkanäle herrühren.

Alternativ ist der direkte Nachweis einer Erhöhung der intrazellulären freien Calciumkonzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  möglich; dafür stehen verschiedene Methoden zur Verfügung: Die Erfassung des Ausstroms radioaktiver  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, intrazelluläre Beladung mit dem Chemolumineszenzprotein Aequorin und Messung der abgesonderten Lumineszenzemissionen an einem Photomultiplier. Mit dieser Methode haben Wasserman et al. (1980) eine schnelle Calciumerhöhung an Albino-Oozyten 40-60 Sekunden nach Progesteronzugabe gemessen.

Mittlerweile stehen hochspezifische Calciumindikatoren zur Verfügung: Fura-2 und Quin-2 werden durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt; Fluo-3, Rhod-2 und Calcium green können durch sichtbares Licht angeregt werden (Haugland, 1997). Durch Messung ihrer Emissionen erhält man Aufschluß über Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration.

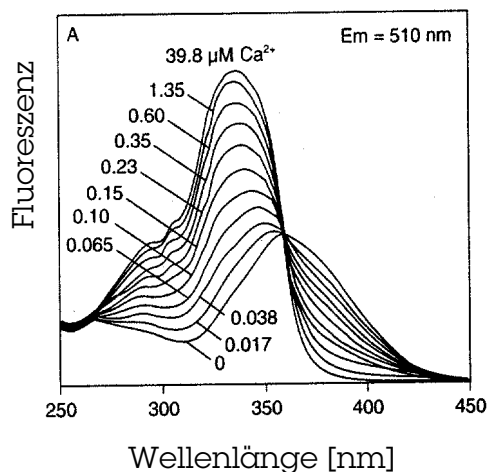
In der hier vorgestellten Arbeit dient die Calciumfluoreszenzmessung mit dem Calcium-Indikatorfarbstoff Fura-2 als optisches Nachweissystem für die funktionelle Expression.

Dieser wird durch Mikroinjektion in das Zytoplasma der Oozyte eingebracht und ändert seine Absorptionseigenschaften in Abhängigkeit von intrazellulärer Calciumkonzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , ein für die aktuelle Zellfunktion wesentlicher Parameter. Die an Calcium gebundene, Calcium-komplexierte Form von Fura-2 läßt sich am besten durch UV-Licht bei  $\lambda=340\text{nm}$  anregen, freies Fura-2 bei  $\lambda=380\text{nm}$ . Die daraufhin vom angeregten Farbstoff abgegebenen Licht-Emissionen bei  $510\text{nm}$  geben Auskunft über das aktuelle Konzentrationsverhältnis von komplexiertem Fura-2 und seiner freien Form. Da dieses Verhältnis von der aktuellen intrazellulären Calciumkonzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  abhängig ist, läßt sich diese nach der Formel von Grynkiewicz et al. (1985), die sich aus dem Massenwirkungsgesetz ableitet, errechnen.



**Abb. 1.1: Strukturformel des Calciumindikatorfarbstoffes FURA-2 (nach Grynkiewicz et al. (1985))**

Durch die Messung bei zwei verschiedenen Wellenlängen läßt sich  $[Ca^{2+}]_i$  unabhängig von der Farbstoffkonzentration (im Laufe des Experiments bleicht dieser langsam aus) und von der absoluten Empfindlichkeit des Meßgerätes bestimmen. Lediglich die Autofluoreszenz der Zelle muß vor der Auswertung berücksichtigt werden.

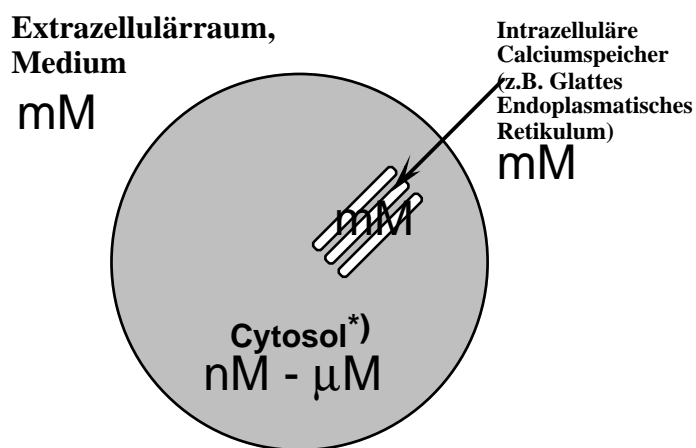


**Abb. 1.2: Excitationsspektrum von FURA-2 in Abhängigkeit von der freien Calciumkonzentration. (aus Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, 6. Auflage, S. 507)**

Bei einer Reihe von Membranrezeptoren führt ihre Aktivierung zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Calcium kann dabei als Second messenger

direkt in die Signalkette einbezogen sein oder erst später freigesetzt werden. Die Zelle hält ihren Spiegel an Calciumionen mit einer Reihe komplizierter und effektiver Proteine und Pumpen unabhängig von der extrazellulären Konzentration, die um einen 10.000-20.000 fachen Konzentrationsgradienten höher liegt, normalerweise strikt unter 100nM. Auch nach voller hormoneller Aktivierung steigt diese kaum über 10µM. Dazu stehen ihr eine Anzahl calciumbindender (z.B. Calmodulin) und hochspezialisierter calciumregulierender Proteine, sowie die Calcium-ATPase und der  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$  Ionenaustauscher an der Zellmembran zur Verfügung.

## Zelluläre Calcium Konzentrationen



\*) nur 2-3% des Calciums liegt in freier Form vor, der Rest ist an Proteine gebunden (z. B. Calmodulin).

**Abb. 1.3: Schematische Darstellung der zellulären Calciumkonzentrationen.**

Die Aktivierung einer Zelle durch die Aktion an einem Membranrezeptor kann intrazellulär eine Kaskade auslösen, bei der Calciumionen als Second messenger an der Signaltransduktion beteiligt sind oder in Folge zellulärer Aktivität aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden, bzw. aus dem Extrazellulärraum durch ligandengebundene Ionenkanäle ins Zellinnere diffundieren.

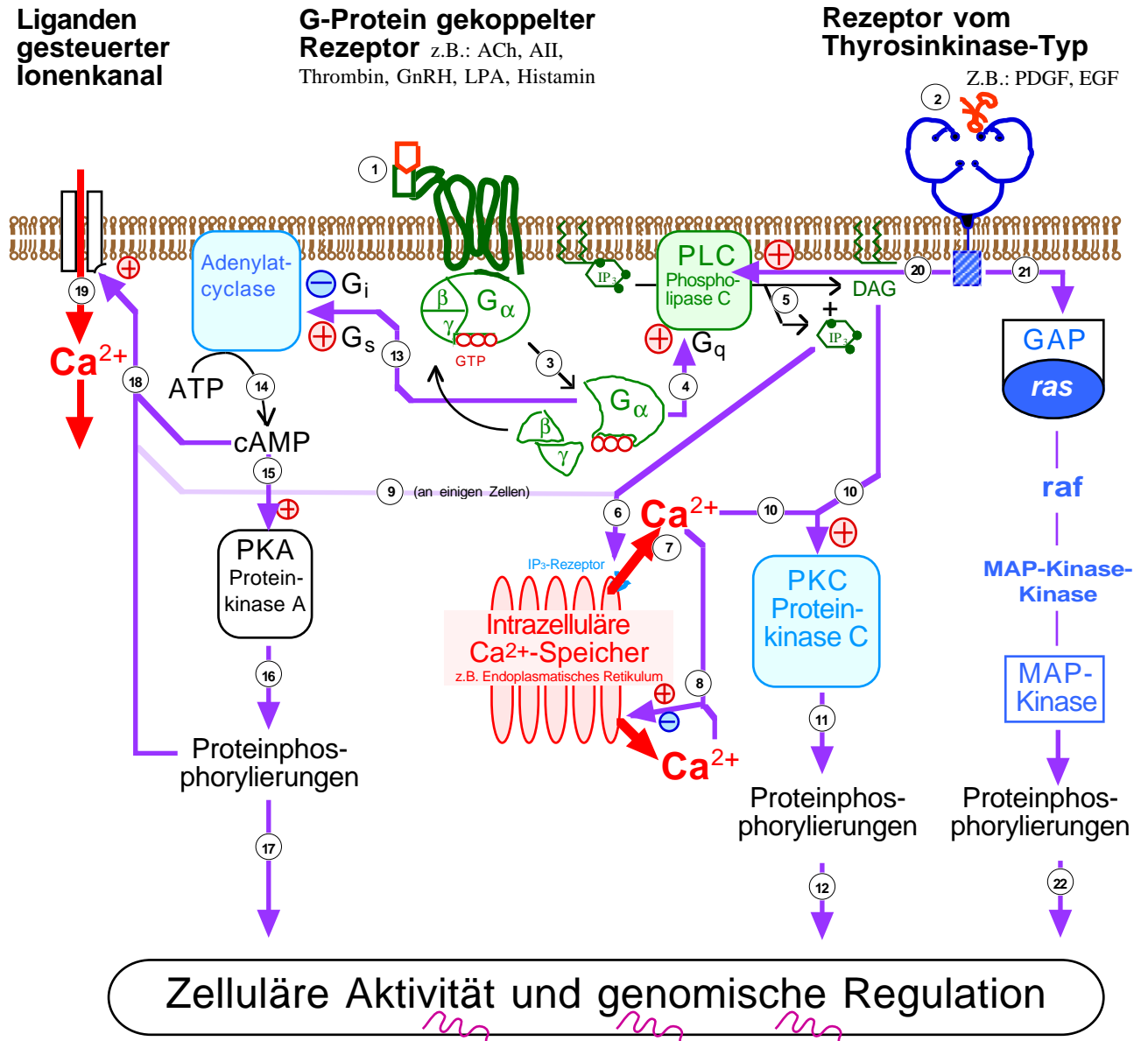
In den letzten 15 Jahren gab es enorme Fortschritte im Verständnis über die Rolle von Calcium bei der Regulation zellulärer Aktivität.

Im Folgenden werden die wichtigsten Schritte dargestellt, die zu einer intrazellulären Calciumerhöhung nach Rezeptoraktivierung führen können.

Inositol-Trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) hat als Second messenger eine Schlüsselrolle bei der Steuerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung aus intrazellulären Stores, als auch des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms.

In Abb. 1.4 sind die dabei beteiligten Komponenten und Enzyme sowie ihre Signalwege schematisch aufgezeigt. Die im Text vorkommenden Nummern (in Klammern), beziehen sich auf die Nummerierung in der Abbildung.

## Calcium bei der Signaltransduktion



**Abb. 1.4: Calcium bei der Signaltransduktion. (Zusammengestellt aus dem Review von Berridge (1993) mit Ergänzungen: Davis et al, 1992; Clapham 1995)**

Beide großen Signalwege, sowohl die Aktivierung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (1), als auch der Rezeptoren von Thyrosin-Kinase-Typ (2) vermitteln über die Aktivierung von Phospholipase C-Isoenzymen die Bildung von  $IP_3$ .

Bei ersterem Signalweg dissoziiert nach dessen Aktivierung ein GTP-bindendes Protein vom Rezeptor, das in seine Untereinheiten  $G_\alpha$  und  $G_\beta\gamma$  zerfällt (3).

Diese Untereinheiten können nun mit verschiedenen Isoenzymen der Phospholipase C (PLC) interagieren und diese aktivieren (4). PLC spaltet Phosphatidylinositol-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in die beiden wichtigen Signalmoleküle Inositol-Trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) (5).

IP<sub>3</sub> öffnet nun über noch nicht im einzelnen geklärte Mechanismen, vermutlich rezeptorgesteuert, Kanäle an intrazellulären Calciumstores (6).

Calcium kann von den intrazellulären Speichern in das Zytoplasma strömen (7).

Höchstwahrscheinlich reguliert Calcium selbst über bestimmte calciumbindende Proteine seinen weiteren Ausstrom (8).

Diese Calcium-induzierte Calciumfreisetzung ist für die zeitlichen und räumlichen Abläufe des Calciumsignals verantwortlich.

An einigen Zellen vermag IP<sub>3</sub> auch ligandengesteuerte Ionenkanäle an der Zellmembran öffnen (9).

Das freiwerdende Calcium, aber auch das durch die Spaltung von PIP<sub>2</sub> entstehende DAG (5) stimulieren die Proteinkinase C (PKC) (10), die nun über Proteinphosphorylierungen (11) die zelluläre Aktivität und genomische Regulation steuert (12).

Eine andere Funktion der durch die Rezeptoraktivierung (1) entstandenen G-Protein Untereinheiten (3) ist es, die Aktivität der Adenylatcyclase zu regulieren (13). Durch eine Aktivierung der Adenylatcyclase entsteht aus ATP das als Second messenger wirkende cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP) (14). Dieses vermag die Proteinkinase A zu aktivieren (15), die wiederum beeinflusst zelluläre Aktivität und genomische Abläufe (17) über Proteinphosphorylierungen (16), ist aber auch in der Lage, wie cAMP selbst, ligandengesteuerte Ionenkanäle zu öffnen (18), woraus der Einstrom von extrazellulärem Calcium ins Cytoplasma resultiert (19).

Auch die Aktivierung von Rezeptoren des Tyrosinkinase-Typs (2) führt durch Aktivierung der PLC (20) und der damit verbundenen Freisetzung von IP<sub>3</sub> (5) und DAG über die eben beschriebenen Wege (6 - 9) zur Freisetzung von intrazellulärem Calcium. Darüberhinaus werden über *GAP-ras* und MAP-Kinase Proteinphosphorylierungen gesteuert (21), die ebenfalls auf die Aktivität der Zelle und ihre genomischen Abläufe beeinflussen (22).

Ein Beispiel für einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, der über die eben Beschriebenen Mechanismen eine intrazelluläre Calciumerhöhung auslöst, ist der Rezeptor für Gonadotropin Releasing-Hormon (GnRH).

Das Dekapeptid Gonadotropin-Releasinghormon (GnRH), auch Luteinisierendes Hormon-Releasinghormon (LH-RH) genannt, spielt eine Schlüsselrolle in der

Reproduktion von Säugetieren. Es wird von hypothalamischen Neuronen stoßweise in intermittierenden Intervallen von ca. 90 min in den Kapillarplexus abgegeben und löst in den gonadotrophen Zellen des Hypophysenvorderlappens die Produktion und Sekretion der Gonadotropine Luteinisierendes Hormon (LH) und Follikel Stimulierendes Hormon (FSH) aus, welche wiederum die hormonelle Aktivität der Gonaden (Hoden und Ovar) kontrollieren.

GnRH spielt nach der Pubertät eine wichtige Rolle bei der hormonellen Steuerung im geschlechtsreifen Lebensabschnitt. Bei Frauen erhalten und kontrollieren Gonadotropine den Menstruationszyklus. Ihre Plasmaspiegel steigen in der ersten Hälfte der Follikelphase langsam, in der Ovulationsphase sprunghaft an. FSH bewirkt die Auswahl, das Heranreifen eines Follikels und schließlich seine Ovulation. Auch in der ersten Zeit nach der Menopause steigen die Plasma Gonadotropinkonzentrationen durch die mit der Ovarialinsuffizienz verbundenen niedrigen Östrogen-Spiegel und der damit verminderten sekretorischen Hemmung von Hypothalamus und Hypophyse an.

Bei Männern werden Leydig-Zellen durch LH zur Testosteronbiosynthese angeregt; FSH initiiert die Spermatogenese, Testosteron hält diesen Prozeß aufrecht.

Der hormonellen Steuerung liegen jeweils raffinierte Rückkopplungsmechanismen zum hypothalamisch-hypophysärem System zugrunde, die vorallem über Sexual-Steroide im Blutkreislauf ablaufen.

Obwohl der pulsierende Charakter der GnRH Ausschüttung bis ins höhere Lebensalter erhalten bleibt, nehmen die Amplituden ab. Die Hypophyse zeigt verminderte Reaktionen auf GnRH, das im höheren Lebensalter die FSH und LH Sekretion nicht mehr zu synchronisieren scheint (Genazzani et al., 1997b).

Wichtig für die physiologischen Reaktionen zu Beginn des hormonellen Regelkreises bleibt die pulsatile Ausschüttung von GnRH vom Hypothalamus, da sie Voraussetzung für die synthetische und sekretorische Funktion der Hypophyse ist: Bei kontinuierlicher Stimulierung über ein bis zwei Tage z.B. mit synthetischen GnRH-Analoga, die langsamer abgebaut werden können und damit eine höhere Halbwertszeit aufweisen, tritt eine paradoxe Hemmung der Gonadotropin-ausschüttung ein. Diesen Effekt macht man sich therapeutisch z. B. bei der Behandlung hormonabhängiger Erkrankungen, des Prostata- und Mammacarcinoms und bei Endometriose zunutze. Bei Pubertas præcox ist die Behandlung in klinischer Erprobung. Eine Kombinationstherapie von GnRH und niedrig dosierten oralen Contraceptiva bei Patientinnen mit polyzystischen Ovarien normalisiert die Plasmahormonspiegel und stellt normale ovulatorische Zyklen wieder her (Genazzani



et al, 1997a).

Auch in anderen Bereichen des ZNS, sowie im Brustdrüsengewebe bei Frauen und in der Plazenta kann GnRH in geringeren Konzentrationen nachgewiesen werden, dies läßt eine Reihe weiterer Funktionen in Zusammenhang mit der Reproduktion erwarten.

Der GnRH-Rezeptor (GnRH-R) findet sich vorallem im Gewebe des Hypophysenvorderlappens in den Gonadotrophen Zellen, eine Expression der Rezeptors in anderen Reproduktionsorganen wurde nachgewiesen. Z.B findet sich der Rezeptor beim Menschen in Plazenta (hier stimuliert GnRH lokal die Sekretion von humanen Corion Gonadotropin hCG), Mamma, in Ovarien, Prostata und Hoden. Ein Nachweis seiner Expression auch in nicht reproduktiven Organen, wie Herz, Leber, Skelettmuskel und Niere konnte mit spezifischen Primern und PCR nachgewiesen werden (Kakar und Jennes, 1995). Die hier lokalisierten Rezeptoren weisen jeweils die selbe Nukleotidsequenz wie der im Hypophysenvorderlappen exprimierte Rezeptor auf.

Daher wird GnRH über die Steuerung der Gonadotropinausschüttung in der Hypophyse hinaus eine wichtige Bedeutung bei der Regulation von Zellfunktionen: Zellwachstum und -proliferation zugesprochen (Kakar und Jennes, 1995). Bei der von Klijn und Foekens (1989) *in vivo* gezeigten tumorsuppressiven Wirkung von GnRH, die sie ausschließlich über Down-Regulation der hormonalen Achse Hypophyse-Gonaden erklären, kann möglicherweise auf darüber hinaus von Gonadotropinen unabhängige, direkte Effekte auf das Zellwachstum über den GnRH-Rezeptor zurückzuführen sein (Kakar und Jennes, 1995). Daher ist die Erforschung des GnRH-Rezeptors, seiner Eigenschaften und Struktur von immenser Bedeutung, da Veränderungen seiner Struktur oder Expression zu unkontrolliertem Zellwachstum und -proliferation führen könnten.

An der Ratte wurde überdies gezeigt, daß GnRH-Rezeptoren im Gehirn eine wichtige Rolle bei der Regulation verschiedener neuronaler Systeme spielen. Im Zentralnervensystem (ZNS) scheint GnRH als Neurotransmitter zu wirken, was einen direkten Zusammenhang zwischen neuroendokriner Regulation der Hypophyse und intracerebraler Abläufe führt, etwa der Entstehung sexueller Verhaltensweisen (Jennes und Conn, 1994).

mRNA, die für den GnRH-Rezeptor kodiert, ist an verschiedener Spezies bereits kloniert und sequenziert worden; zuerst an Maus (Tsutsumi et al., 1992), dann an Ratte (Kaiser et al., 1992; Eidne et al., 1992), Rind (Kakar et al., 1993), Schaf (Brooks et al., 1993) und Mensch (Kakar et al., 1992; Chi et al., 1993). Mittlerweile ist das Rezeptor-Gen entschlüsselt (Fan et al., 1994) und seine Stelle im menschlichen Genom lokalisiert

worden (Kakar und Neill, 1995).

Als im Hypothalamus gebildetes Hormon stellt GnRH den Beginn eines endokrinen Regelkreises dar, an dessen Ende schließlich die Ausschüttung und Regulierung der Sexualhormone steht. Diese gehören, wie auch die in der Nebennierenrinde gebildeten Hormone, der Gruppe der Steroidhormone an.

Aus diesen soll insbesondere die Bedeutung von Aldosteron und Progesteron im Folgenden etwas näher erläutert werden.

### **Steroidhormone**

Die Steroidhormone lassen sich von der chemischen Struktur her auf das Cyclopentano-perhydropentanthen-Gerüst ableiten. Die Synthese der Steroidhormone geht vom Cholesterin aus, als Zwischenstufen wird dabei immer das Progesteron durchlaufen.

Funktionell kennen wir Mineralocorticoide, deren vornehmliche Aufgabe die Regulation des Wasserhaushalts und damit auch die Blutdruckregulation ist, Glucocorticoide, die weitreichenden Einfluß auf Stoffwechsel und Immunregulation besitzen, sowie die Sexualhormone, die sich in Gestagene, Androgene und Östrogene unterteilen lassen.

Die physiologischen Wirkungen der in dieser Arbeit verwendeten Steroidhormone Aldosteron und Progesteron wird im weiteren näher erläutert.

### **Aldosteron**

Das Mineralocorticoid Aldosteron (ALDO) (4-Pregnen-11 $\beta$ ,21diol-3,18,20-trion, M = 360,4) wird in der *Zona glomerulosa* der Nebennierenrinde gebildet und ausgeschüttet. Es ist Bestandteil des Renin - Angiotensin - Aldosteron Systems und damit wesentlich an der Kontrolle des Wasserhaushaltes, des Blutdrucks und der Nierendurchblutung beteiligt.

Vor allem durch Angiotensin II aber auch durch Nebenstimuli, wie ACTH, Serotonin, Thyroxin, Ammoniak und Östrogene wird ALDO ausgeschüttet. Es fördert die Rückresorption von Na<sup>+</sup>-(und Cl<sup>-</sup>)-Ionen im distalen Tubulus der Nieren und die H<sup>+</sup>- sowie die K<sup>+</sup>-Ausscheidung.

Der Normalwert im Plasma liegt bei 0,03 $\mu$ g/dl (= 0,8nM).

Aus einem primären Hyperaldosteronismus (Conn-Syndrom) z. B. bei autonomer Mehrproduktion von ALDO durch ein Nebennierenrinden-Adenom, resultieren z. B. eine hypokalämische Alkalose, Hypertonie und nächtliche Polyurie.

## **Progesteron**

Das Gestagen Progesteron (PROG) (4-Pregnen-3,20-dion, MG: 314,5) wird vom Corpus luteum, der nach der Ovulation entsteht, gebildet. Nachdem die Follikelphase durch ein Estrogen vorbereitet wurde, erzeugt PROG am Endometrium die Sekretionsphase und dominiert diese. Daher sind die Plasmaspiegel mit 1,59-3,18nmol/l (0,5-1,0µg/l) in der Follikelphase und 31,8-63,6nmol/l (10-20µg/l) in Abhängigkeit vom Zyklus verschieden.

Das Hormon bereitet den Organismus auf eine Schwangerschaft vor und schafft wichtige Voraussetzungen für Konzeption, Implantation, sowie den Schutz der Frucht. Im Verlauf einer Schwangerschaft wird Progesteron von der Plazenta gebildet. Da die Bildung des Progesteronrezeptors durch Östrogene stimuliert wird, ist für die PROG-Wirkung ein vorheriger Östrogeneinfluß notwendig.

Durch Beeinflussung des Wärmezentrums steigt die basale Körpertemperatur der Frau um 0,4-0,6°C an. Am Muttermund erhöht PROG die Viskosität des Zervikalschleims, in der Milchdrüse wird die Ausbildung der Alveolen gefördert. PROG setzt den Tonus des Myometriums und der glatten Muskulatur herab.

Nach der klassischen Theorie der Steroidwirkung diffundieren die lipophilen Steroidhormone passiv in das Zellinnere und binden dort an ihren inaktiven spezifischen Rezeptorenkomplex, der durch Abspaltung eines hsp90-Dimers aktiviert wird, indem die DNA-bindende Region frei wird. Im Zellkern aktiviert dieser Komplex die Transkription bestimmter Gene durch Bindung an spezifische Stellen der DNA und initiiert damit die Synthese bestimmter Proteine. Da die einen Effekt zugrundeliegenden Proteine erst gebildet werden müssen, können die Wirkungen erst nach einer bis zu mehreren Stunden dauernden Latenzzeit auftreten.

Die ablaufenden Mechanismen sind mittlerweile detailliert bekannt, die Strukturen der cytosolischen Steroid-Rezeptoren und deren Gensequenzen konnten Mitte der achtziger Jahre aufgeklärt werden (z.B. für den Mineralocorticoidrezeptor: Arizza et al., 1987; für den Progesteronrezeptor: Loosfelt et al., 1986).

Eine Besonderheit zeigt sich beim cytosolischen Progesteronrezeptor des Menschen und vom Huhn, der im Gegensatz zu allen anderen beschriebenen Steroidrezeptoren aus zwei Steroidbindenden Untereinheiten besteht (Misrahi et al., 1987; Gronemeyer et al., 1987).

Wie eingangs erwähnt, löst Progesteron die Fortsetzung der Reifung von Oozyten von *Xenopus laevis* aus. Aus verschiedenen Gründen, insbesondere der schnellen Abläufe wegen und unzweifelhaft an der Zellmembran stattfindender Prozesse, sind die Abläufe mit der eben beschriebenen klassischen Theorie der Steroidwirkung nicht vereinbar.

Wasserman et al. (1980) beobachtet z.B. eine die Reifung begleitende, 30-60 Sekunden nach PROG-Zugabe auftretende Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration.

Innerhalb der letzten 15 Jahre hat sich gezeigt, daß nicht alle Effekte von Steroidhormonen über diese klassische Theorie mit dem cytosolischen Rezeptor erklärbar sind.

Neben Steroidbindungsstellen an der Zellmembran sind für so gut wie alle Steroid-Klassen mittlerweile auch schnelle Effekte beobachtet und nachgewiesen worden.

Die ersten Beobachtungen von nicht-genomischen Steroideffekten gehen auf eine Pionierarbeit von Hans Selye (1941) zurück, in der er die innerhalb weniger Minuten schnell einsetzende anästhetische Wirkung von Cortisol an Ratten beschreibt.

Spach und Streeten (1964) konnten Effekte von Aldosteron auf den Natriumaustausch von Hundeerythrozyten beobachten. Da Erythrozyten keinen Zellkern mehr besitzen, muß auch hier ein nicht-genomischer Mechanismus zugrunde liegen.

In menschlichen Lymphozyten ließ sich ein signifikanter Aktivitätsanstieg des Natrium-Protonen-Austauschers nachweisen, dieser Effekt läßt sich durch Canrenon, einem Antagonist des cytosolischen Rezeptors, nicht hemmen. (Wehling et al. 1991).

Auch schnelle Erhöhungen der intrazellulären Calciumkonzentration ließen sich durch ALDO an glatten Gefäßmuskelzellen (RSMC), an Aortenendothelzellen (EC) (Wehling et al., 1994; Schneider et al., 1997) und an distalem Colon von Ratten (Doolan, 1996) und Mensch zeigen (Maguire et al., 1999).

Mit der Technik des *Calcium-Imaging* an RSMC und EC lassen sich die Calciumsignale auch in ihrer räumlichen Ausbreitung erfassen. Während in RSMC die intrazelluläre Calciumerhöhung vor allem perinucleär zu beobachten ist, sieht man bei EC die Erhöhung vor allem zellmembrannah.

Der halbmaximale Effekt an RSMC war bei Aldosteronkonzentrationen von 0,1nM zu sehen (Wehling et al., 1994). Nach Christ et al. (1993) ist Phosphoinositol an der Signaltransduktion der schnellen Aldosteroneffekte in RSMC beteiligt.

Auch für Progesteron sind schnelle physiologische Effekte, die auf Membranebene ablaufen, gezeigt worden: Blackmore et al. (1990) beobachteten an humanen Spermatozoen auf Progesteronapplikation einen schnellen Einstrom von Calcium aus dem Extrazellulärraum und damit eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration innerhalb weniger Sekunden. Auch BSA-gekoppeltes Progesteron, das die Zellmembran nicht passieren kann, löst diese Reaktion aus. Antagonisten des klassischen Progesteronrezeptors (z.B. RU486) hemmten den Calciumeinstrom nicht.

In den Membranen zahlreicher Zellen lassen sich Bindungsstellen für Steroide

nachweisen. Z.B. finden sich in der Membran von *Xenopus* Oozyten, an menschlichem Sperma und in Mikrosomen von Rattenleber Bindungsstellen für Progesteron (Liu und Patiño, 1993; Blackmore und Lattanzio, 1991; Yamada und Miyajiri, 1982). Hochaffine Bindungsstellen für Aldosteron im physiologischen Bereich mit einer  $K_d$  von ca. 0,1nM können in humanen Monozyten gefunden werden. Für sogut wie alle Steroidklassen wurden mittlerweile hochaffine Membranbindungsstellen nachgewiesen. (Review von Nemere et al., 1993; Wehling, 1994)

Erst in den letzten Jahren ist mit dem Vorliegen empfindlicherer Meßmethoden und ausgereifter molekularbiologischer Techniken systematisch die Erforschung dieser nicht-genomischen Effekte begonnen worden.

Das Dogma einer ausschließlichen genominduzierten, „klassischen“ Steroidwirkung ist mittlerweile gestürzt und um zusätzliche nicht-genomische Steroideffekte ergänzt worden.

1993 stellten Wehling et al. das duale oder integrative Modell der Steroidwirkung vor, nach der die klassische Steroidwirkung über den cytosolischen Rezeptor um schnelle Wirkungen an einem Steroidmembranrezeptor erweitert wird.

Bei der klassischen Steroidwirkung wird der cytosolische Rezeptor nach Bindung an ALDO durch Abspalten des dsp90-Dimers aktiviert und reguliert die Transkription und Bildung von Aldosteron-induzierten-Proteinen wie z.B. der  $Na^+/K^+$ -ATPase nach Binden des transformierten Rezeptor-Komplexes an eine spezifische DNA-Region.

Bei den schnellen Steroideffekten wird nach Bindung von Aldosteron an einen vermuteten membranständigen Rezeptor die Phospholipase C aktiviert. Über Second-messenger-Systeme wie  $IP_3$  und DAG wird eine  $Ca^{2+}$ -Freisetzung vermittelt. Innerhalb kürzester Zeit (<10 Minuten) könnten so z.B.  $Na^+/K^+$ -ATPase und  $Na^+/H^+$ -Austauscher reguliert werden.

Kürzlich hat die Fachzeitschrift „Steroids“ in einer ganzen Ausgabe (Steroids 64, 1999) ausschließlich über nicht-genomische Steroideffekte berichtet. Das Wissen über nicht-genomische Steroidwirkungen ist mittlerweile auch in Standardwerke der medizinischen Lehrbücher eingegangen (Lüllmann und Mohr, 1999).

Effekte und Hinweise auf die Existenz spezifischer Steroid-Membranrezeptoren sind vielfältig und überzeugend. Trotzdem wurde noch kein Vertreter dieser Gruppe zweifelsfrei isoliert und funktionell dargestellt. Bei der Entdeckung eines membranständigen Progesteron-bindendes Proteins (mPR), das aus Membranen von Schweineleber isoliert wurde, könnte es sich nach dessen Charakterisierung um einen membranständigen Progesteronrezeptor handeln oder einem Teil davon (Meyer et

al., 1996, Falkenstein et al., 1996, Falkenstein et al., 1999).

So wird z.B. die zuvor an Spermien beschriebene intrazelluläre Calciumerhöhung auf Progesteron durch Einsetzen von spezifischen Antikörpern gegen das mPR deutlich reduziert (Falkenstein et al., 1999). Die durch Progesteron eingeleitete Akrosomenreaktion wird durch Einsetzen dieser Antikörper gegen mPR zu 62,1% gehemmt (Buddhikot et al., 1999).

Für die Expression von Proteinen in Oozyten von *Xenopus laevis* wird intakte mRNA benötigt, die entweder aus Zellen oder Gewebe isoliert wurde, oder von einem geeigneten cDNA- Klon *in-vitro* transkribiert ist. Für die Translation wird diese in das Cytosol der Oozyten mikroinjiziert.

Ebenso ist es möglich, die Gensequenz als doppelsträngige DNA in einen eukaryontischen Expressionsvektor zu klonieren, der direkt in den Oozytenkern injiziert wird.

Wenn funktionelle Tests auf die Expression folgen sollen, ist es wichtig, daß die mRNA oder cDNA die für den Rezeptor codierende Sequenz in voller Länge enthält.

Dies und die Qualität der RNA lassen sich indirekt überprüfen, indem durch Gelelektrophorese und anschließendem Northern Blot eine ausgewählte mRNA-Spezies markiert, und ihr Molekulargewicht im Vergleich zu einem definierten Marker gemessen wird. Soll die RNA für den vollständigen Rezeptor codieren und ebenso nicht durch Ribonuclease (RNase) verdaut worden sein, muß das Gewicht im erwarteten Bereich liegen.

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, die beiden Techniken, das *Calcium-Imaging* mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 und die Expression von Membranrezeptoren an *Xenopus* Oozyten zu kombinieren, und damit ein funktionelles Testsystem für Membranrezeptoren zu etablieren und dessen Anwendbarkeit auf membranständige Steroidrezeptoren zu überprüfen. Es sollte z.B. ermittelt werden, ob die von Wasserman et al. (1980) entdeckten schnellen intrazellulären Calciumerhöhungen auf PROG auch mit der Methode des *Calcium-Imagings* sichtbar sind, und ob sich die in RSMC nachweisbaren schnellen ALDO-Effekte durch RNA-Expression auch in *Xenopus* Oozyten nachweisen lassen.

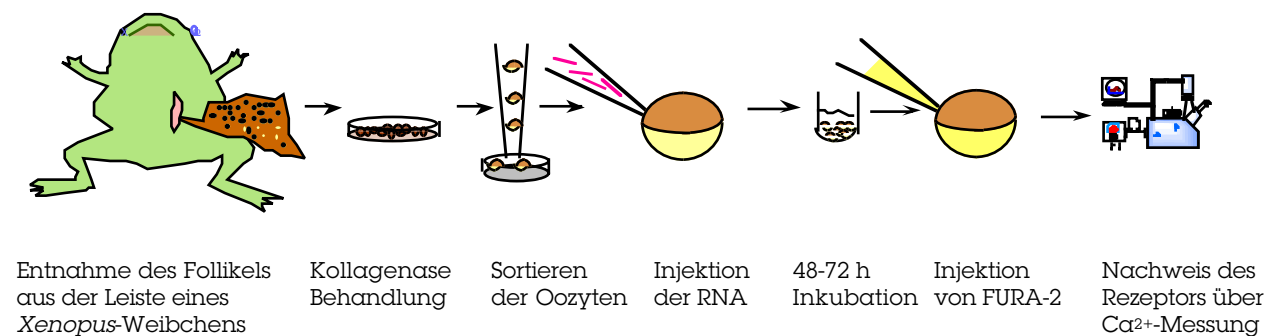
In weiteren Schritten könnte man in diesem Fall über eine Fraktionierung der injizierten RNA zur gesuchten, für den Steroidmembranrezeptor kodierenden Gensequenz gelangen.

Die erfolgreiche Klonierung einiger Rezeptoren und Ionenkanäle durch Expression in Oozyten von *Xenopus laevis* in Kombination mit elektrophysiologischen Untersuchungen ist beschrieben. (McIntosh und McIntosh, 1990; Yamashita et al., 1992; Dai et al., 1996)

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Überblick über den Ablauf der Methodik

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit wurde eine Methode zur Expression und funktionellen Testung von Membranrezeptoren etabliert. In der folgenden Abbildung sind die wesentlichen Arbeitsschritte der Methodik schematisch dargestellt. Zunächst werden die Oozyten durch Entnahme des Follikels aus der Leiste eines *Xenopus laevis* Weibchens und anschließender Separation gewonnen. Geeignete Oozyten werden ausgewählt, in die RNA in das Cytosol injiziert wird. Die betreffenden Rezeptoren werden im Verlauf von 2-3 Tagen exprimiert. Nach Injektion des Calcium-Indikatorfarbstoffes Fura-2 kann unter Verwendung eines *Calcium-Imaging-Systems* die aktuelle intrazelluläre freie Calciumkonzentration in der Oozyte gemessen werden. Durch Zugabe bestimmter Stimuli kann das Expressionsergebnis der entsprechenden Rezeptoren funktionell geprüft werden.



**Abb. 2.1 Schematischer Ablauf der Methodik: Gewinnung und Präparation der Oozyten, Expression der Rezeptoren und anschließende Calcium-Messung.**

Am Ende der Messung wird die Autofluoreszenz der Oozyte durch „Quenchen“ des Indikator-Farbstoffes bestimmt. In der anschließenden Versuchsauswertung wird diese berücksichtigt.

### 2.2 Expression in *Xenopus* Oozyten

#### 2.2.1 Gewinnung der Oozyten

Die Entnahme der Oozyten erfolgt nach Eidne (1994). Die *Xenopus laevis* Weibchen werden durch Hypothermie anaesthetisiert und während des Eingriffs auf Eis gelagert. Ca. 1cm lange Inzision im unteren Abdomen durch Haut und Muskel mit dem Skalpell. Herausziehen einiger Ovariallappen aus dem Schnitt mit einer stumpfen Pinzette. Ligation des Ovars an einer Stelle und Abtrennen des distal davon gelegenen Follikelgewebes (ca. 4/5 des Ovars). Dieses wird in OR I Medium

aufbewahrt. Die Ovariallappen werden vorsichtig ins Abdomen zurückgesetzt. Fortlaufende Muskelnaht, Hautnaht mit 3-4 Einzelknoten eines resorbierbaren Nahtmaterials (ETHICON CATGUT plain 1,5 metric 5-0). Das *Xenopus* Weibchen wird in ein 18°C temperiertes Aufwachbecken gelegt und einige Zeit beobachtet. Bis zur vollständigen Regeneration des Ovars werden bei jungen *Xenopus laevis* Weibchen etwa 6 Wochen benötigt.

Vor Entnahme der Oozyten wurde den Weibchen kein ovulationsauslösendes hCG injiziert.

### **2.2.2 Separation der Oozyten von *Xenopus laevis***

Nach der Entnahme werden die Eiersäckchen in Petrieschalen aufbewahrt und mit calciumfreiem OR I Medium gespült. Durch mechanische oder enzymatische Freipräparation werden die Oozyten aus dem umgebenden Follikelgewebe herausgelöst: Bei der enzymatischen Freipräparation mit Collagenase können endogene Rezeptoren an der Membran beschädigt werden. Daher werden alternativ dazu Oozyten aus dem Follikelverband mechanisch freipräpariert.

#### 2.2.2.1 Collagenase-Verdau

Die Eiersäcke werden in 25ml calciumfreie 0,4% Kollagenase-Lösung gelegt. Damit die Protease ihren Wirkort besser erreichen kann, werden die Follikelsäcke zu Beginn mit zwei Mikropipetten oder einem Skalpell vorsichtig eingerissen. Die Inkubation erfolgt zweimal für je ca. 1h unter leichtem Schwenken. Anschließendes Abpipettieren der aus dem Verband gelösten Oozyten mit einer 25ml Pipette, mehrmaliges Spülen mit (calciumhaltigem) OR II unterbricht die Proteaseaktivität. Aufbewahren in OR II bei 19°C.

#### 2.2.2.2 Mechanische Präparation

Dabei werden die Oozyten in OR I Medium unter dem Stereomikroskop mit Mikro-Instrumenten aus den Eiersäckchen herausgelöst: Vorsichtiges Einreißen der Säckchen mit zwei Mikropipetten, sodaß die Oozyten nur noch an einer Seite mit dem umgebenden Gewebe verbunden sind. Heraustrennen einzelner Oozyten mit einem quer-gewölbten Spatel unter Fixierung des Follikelgewebes mit der Pinzette.

### **2.2.3 Selektion der Oozyten**

Unter dem Stereomikroskop wurden bei 10 - 45-facher Vergrößerung makellose Eier der Stadien V-VI nach Dumont (1972) für die Injektion ausgewählt.



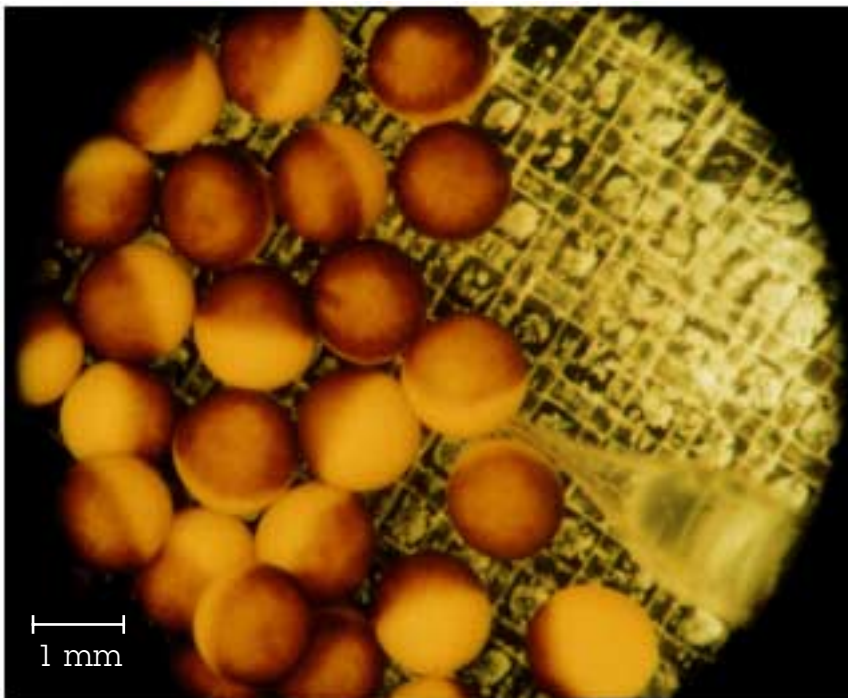
## 2.2.4 Mikroinjektion in die Oozyten

### 2.2.4.1 Mikroinjektion in das Cytoplasma

Mit Hilfe eines horizontalen Nadelausziehergerätes wurden die Injektionsnadeln aus 8"-Glaskapillaren gefertigt und die Spitzen unter mikroskopischer Sicht bei einem Durchmesser von ca. 20µm mit einer sterilen Mikropinzette abgebrochen. Die Nadeln wurden in einen Mikroinjektor eingespannt und mit RNase-freiem Mineralöl gefüllt. Auf diese Weise ließen sich bis zu 10µl RNA-Lösung luftblasenfrei aufziehen.

Auf dem Boden der Petrieschale war ein feinmaschiges Polyethylengitter befestigt, damit die Oozyten während der Injektion fixiert sind. Mit Hilfe eines 3-achsigen Mikromanipulators wurden 100nl einer bis zu 1µg/µl RNA-Lösung in einem Winkel von ca. 45° in Äquatornähe in die dunkel pigmentierte animalische Oozytenseite injiziert (siehe Abb. 2.2). Da bei den Albino-Oozyten ein Äquator optisch nicht zu erkennen ist, wurden Injektionsstellen bei diesen zufällig ausgewählt.

Die Oozyten wurden zur Förderung des Wundverschlusses für ca. 2-3h lichtgeschützt bei 4°C gelagert.



**Abb. 2.2 *Xenopus* Oozyten während der Mikroinjektion (ca. 15x Vergrößerung)**

### 2.2.4.2 Mikroinjektion eines eukaryontischen Expressionsvektors in den Zellkern

Für die Mikroinjektion in den Zellkern wurden noch spitzere Injektionsnadeln (<5µm) gefertigt. Der eukaryontische Expressionsvektor pcDNA III-GnRH-R wurde in OR I gelöst und in Konzentrationen von 0,5pg/nl, 2,5pg/nl, 5pg/nl und 10pg/nl eingesetzt.

Der Nucleus befindet sich auf der Polachse der Oozyten im oberen Drittel der animalischen Seite. Es wurden nach der Methode von Guddat und Pieler (1991)

jeweils 10-15nl dieser Expressionsvektor enthaltenden Lösung senkrecht in den animalischen Pol der Oozyte injiziert. In der Regel war durch das Verwenden dieser dünnen Nadeln keine Wunde an der Zellmembran zu sehen. Die Oozyten wurden anschließend lichtgeschützt für 2h bei 4°C gelagert.

#### 2.2.4.3 Mikroinjektion des Fluoreszenzfarbstoffes in das Cytosol der Oozyten

Nach einer Inkubationszeit von 48-72h wurden vor den Messungen mit dem *Calcium-Imaging* jeweils 50nl des Calciumindikatorfarbstoffs FURA-2 [2mM] in einem abgedunkelten Raum auf die soeben beschriebene Weise in das Cytosol der Oozyten injiziert (vgl. 2.2.4.1).

#### **2.2.5 Kultivierung der Oozyten bzw. Inkubation**

Nach der Injektion von RNA bzw. H<sub>2</sub>O wurden die Oozyten in Petrieschalen mit OR II oder OR III Medium lichtgeschützt bei 18°C-19°C unter täglichem Mediumwechsel kultiviert.

#### **2.3 Reifungsversuche**

Etwa 10 bis 20 Oozyten wurden in 30mm Petrieschalen, die mit 3ml OR II Medium gefüllt waren oder max. 10 Oozyten in Glasreagenzgläsern mit 1ml Medium, aufbewahrt. Substanzen, die die Reifung auslösen sollten wurden dem Medium zupipettiert (z.B. Progesteron final 3µM) und die Oozyten nach 8, 12 und 24 Stunden auf erfolgreiche Reifung untersucht. Kriterium war das Entstehen eines (runden) weißen Fleckes auf dem sonst dunkel pigmentierten animalischen Pol (Entstehung eines Polkörperchens).

#### **2.4 Messung von intrazellulärem Calcium an Oozyten**

Mit Hilfe von Indikatorfarbstoffen und der quantitativen Fluoreszenz-Mikroskopie lassen sich zelluläre Eigenschaften und intra- sowie interzelluläre Vorgänge optisch untersuchen. Damit können auch dynamische Prozesse in lebenden Zellen räumlich aufgelöst studiert werden.

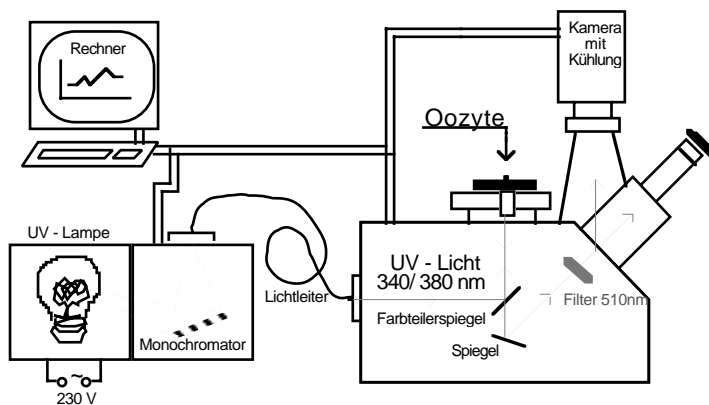
##### **2.4.1 Calcium Imaging mit Fura-2**

In der vorliegenden Arbeit wurde als Calciumindikator FURA-2 verwendet.

Die Absorptionseigenschaften dieses Fluoreszenzfarbstoffes ändern sich durch die Komplexbildung mit Calcium. Je nach Angebot von freiem Calcium liegt ein Gleichgewicht zwischen dem freien Farbstoff und seinem Calciumkomplex, der sein Absorptionsmaximum in kurzwelligeren UV-Licht Bereich hat.

Die Excitationswellenlängen von  $\lambda=380\text{nm}$  (freies Fura-2) und  $\lambda=340\text{nm}$  (für den Calciumkomplex) sind an Hand des Excitationsspektrums (vgl. Abb. 1.2) optimiert.

Durch Anregung bei zwei verschiedenen Wellenlängen lässt sich  $[Ca^{2+}]_i$  unabhängig von der Farbstoffkonzentration bestimmen. Hierdurch werden Meßfehler durch Ausbleichen des Farbstoffes oder Konzentrationsschwankungen eliminiert. Die Ergebnisse sind damit auch unabhängig von der absoluten Empfindlichkeit des Meßgerätes. Damit ist dieses Meßsystem bezüglich Genauigkeit anderen Methoden überlegen.



**Abb. 2.3 Aufbau des *Calcium Imaging* System**

Das für das *Calcium-Imaging* verwendete Meßsystem besteht im Prinzip aus drei Grundbausteinen: Der Lichtquelle (UV-Lampe), dem Mikroskop und einer Kamera. Die Steuerung der Einheiten wird von einem Rechner übernommen. Für die Anregung des Indikatorfarbstoffes wird monochromatisches Licht hoher Intensität benötigt. Da Laser teuer und unhandlich sind, und nur wenige Wellenlängen abdecken, wurde ein flexibles Monochromatorsystem von Till Photonics eingesetzt, das von einer Xenon Lichtquelle gespeist wird und erlaubt, rechnergesteuert innerhalb weniger Millisekunden zwischen zwei oder mehreren Anregungswellenlängen wechseln zu können.

Das UV-Licht wird während der Belichtungszeit über einen Glasfaser-Lichtleiter und einen Farbteiler-Spiegel auf die zu untersuchenden Fura-2-injizierten Oozyten geleitet. Gleichzeitig wird die Emission bei 510nm über ein UV-Luft-Objektiv mit einer gekühlten CCD *Slow Imaging* Kamera in 2-dimensionalen, hochaufgelösten Bildern der entsprechenden Excitationswellenlängen zugeordnet aufgenommen und über die Software Fucal auf dem Computer gespeichert.

In periodischen Abständen von in der Regel 10s lässt sich so die  $[Ca^{2+}]_i$  in den Oozyten auf bestimmte Stimuli über einen längeren Zeitraum messen.

#### **2.4.2 Durchführung der Messung**

Nach der Fura-2 Injektion werden die Oozyten für 2h bei +4°C gelagert und vor den Messungen wieder allmählich auf RT aufgewärmt.

Einzelne Oozyten werden ausgewählt und mit einer Pipette an den Untersuchungsort

auf dem Mikroskop gebracht. 1000µl OR II-Medium befinden sich in einem zylinderförmigen Stahlring, an dessen Unterseite ein UV-Licht durchlässiges rundes Quarzglasdeckgläschen befindet, das am Rand mit Silikongel abgedichtet ist. Die Oozyten werden auf das Deckgläschen in das Medium gelegt und von unten lichtexponiert bzw. gemessen. Bis zu drei Oozyten können gleichzeitig nebeneinander untersucht werden. Das Mikroskop wird auf die Oozyten mit dem Auge scharf gestellt und an Hand einiger Fluoreszenz-Bilder wird geprüft, ob die Farbstoffbeladung ausreicht.

Bei der Messung werden im Abstand von 10s jeweils unter Anregung bei 340nm für 100ms und bei 380nm für 60ms Emissionsbilder durch einen 510nm-Fluoreszenzfilter aufgenommen. Die jeweils in 10µl OR-II gelösten Stimuli werden vorsichtig dem Medium, in dem sich die Oozyten befinden, zugegeben. Die Ratio-Werte sind während des Experiments online sichtbar. Auf Stabilität der Baseline über 1 Minute wurde vor Stimuli-Zugabe geachtet.

Am Ende des Experimentes wird 1µM LPA dem Medium zugegeben um die Reagibilität der Oozyten zu überprüfen.

### **2.4.3 Quenchen des Farbstoffes**

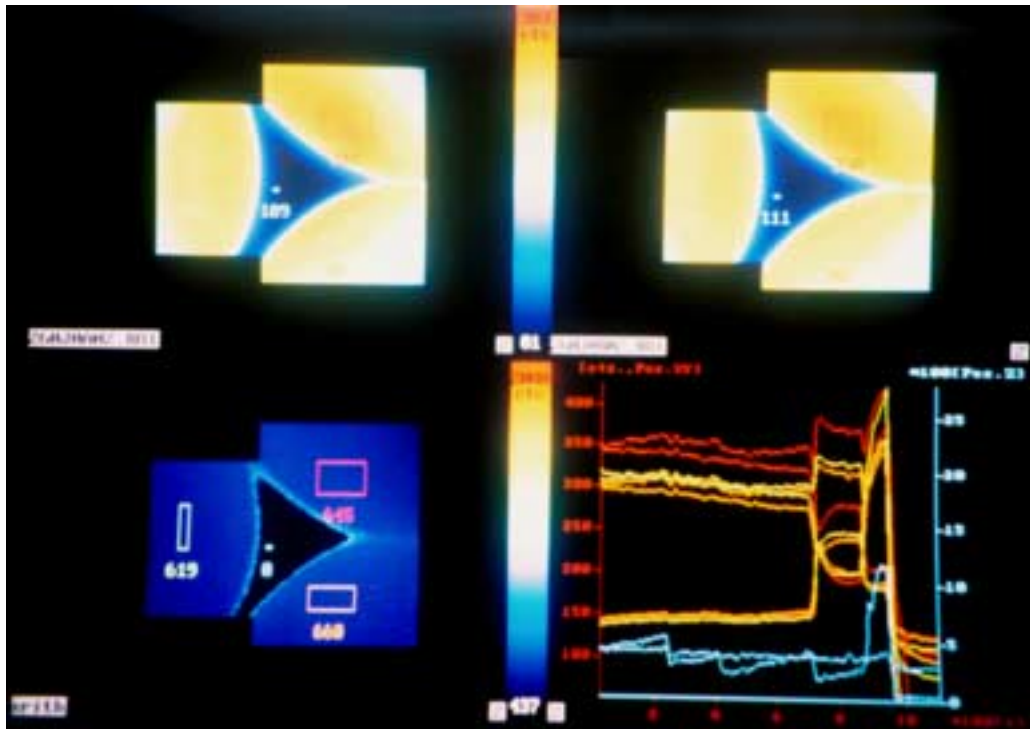
Die Bestimmung der Autofluoreszenzen der Oozyte ist notwendig, da diese in der Auswertung berücksichtigt werden müssen.

Dazu werden zunächst 30µl Digitonin 20mM dem Medium zupipettiert (final 600µM), wodurch die Zellmembran durchlässig wird. Wird in der Online-Messung ein maximales Ansteigen der intrazellulären Calciumkonzentration durch einströmende Calciumionen aus dem Extrazellulärraum ( $[Ca^{2+}]_e=1mM$ ) beobachtet, kann Fura-2 durch Zugabe von 10mM  $MnCl_2$  mit Mangan komplexiert werden. Da dieser Komplex bei den verwendeten Wellenlängen nicht fluoresziert, können so die Autofluoreszenzen der Oozyten bestimmt werden.

### **2.4.4 Auswertung der Calciummessungen**

Die bei der Messung entstandenen Bilder und Bilderfolgen werden als digitale Daten gespeichert. Ein oder mehrere representative Bereiche der Oozytenoberfläche werden gewählt (Region of interest, ROI), die Autofluoreszenzen dieses Bereiches im letzten Versuchsbildern nach Quenchen des Farbstoffes für jeweils beide gemessene Wellenlängen ermittelt. Zum Vergleich wird eine weitere ROI im Bereich außerhalb der Oozyten gewählt, die die Lichtintensitäten des Mediums wiedergeben.

Die Autofluoreszenzen werden bildweise jeweils für 340nm und 380nm mit Hilfe der Software FUCAL 5.12a subtrahiert und das von der Calciumkonzentration abhängige Verhältnis (Ratio) der bei 340nm und 380nm erhaltenen Lichtintensitäten bestimmt.



**Abb. 2.4** Bildschirmphotographie einer Messung an drei mit Fura-2 beladenen Oozyten: Ausgangslichtintensitäten bei 340nm (li. oben) bzw. bei 380nm (re. oben) und die errechnete Ratio (li. unten). Hier sind die für die Auswertung gewählten ROIs, jeweils an den Oozyten und in der Umgebung zu sehen. Rechts unten: Verlauf der Lichtintensitäten und Ratio in den ausgewählten ROIs bis zum Quenchen des Farbstoffes.

Für den Treshold sind 20cts gewählt. Da in den Bereichen sehr niedriger Lichtintensitäten (Randbereich) durch geringste Änderungen der gemessenen Lichtintensitäten rechnerisch große Unterschiede der Ratio entstehen, ist der *threshold* diejenige Anzahl von *counts*, unter der durch die Software keine Berechnung der Ratio erfolgt. Dadurch werden Störeinflüsse vermieden.

Die intrazellulären Calciumkonzentrationen werden ebenfalls mit der Software FUCAL 5.12a von Till Photonics errechnet. Den Berechnungen liegt eine vom Massenwirkungsgesetz abgeleitete Formel zu Grunde. Aus dem gemessenen Verhältnis der durch Emmission des bei  $\lambda=340\text{nm}$  oder  $\lambda=380\text{nm}$  angeregten Farbstoffes entstehenden Lichtintensitäten kann die aktuelle intrazelluläre  $[\text{Ca}^{2+}]$  errechnet werden (nach Grynkiewicz et al, 1985):

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \frac{S_{f2}}{S_{b2}}$$

$K_d$  steht für die effektive Dissotiationskonstante von Fura-2 bezüglich Calciumkomplexierung, R für „ratio“ - das Verhältnis der gemessenen Intensitäten bei

$\lambda=340\text{nm}$  (Fura-2- $\text{Ca}^{2+}$ -Komplex) und  $\lambda=380\text{nm}$  (freies Fura-2) nach Abzug der Autofluoreszenz.

$R_{\min}$  und  $R_{\max}$  sind die jeweils meßbaren Verhältnisse bei Abwesenheit von bzw. voller Sättigung mit Calcium.

$(S_{f2}/S_{b2})$  ist das durch Eichung an Calciumlösungen ermittelte Intensitätsverhältnis von freiem und gebundenem Fura-2 bei  $\lambda=380\text{nm}$ .

Der Verlauf der bei 510nm gemessenen Lichtintensitäten unter Belichtung von 340nm und 380nm, das daraus ermittelte Verhältnis der Werte (Ratio) nach Abzug der Autofluoreszenz, proportional der intrazellulären Calciumkonzentration wird graphisch gegenüber der Zeit dargestellt. Da relative Änderungen der Calciumkonzentration von Bedeutung sind, wurden für die weitere Darstellung die Ratio-Werte verwendet.

Die Beurteilung, ob eine Oozyte mit einem Calcium-Signal reagiert, erfolgt hauptsächlich aus dieser Darstellung. Insbesondere ist dabei nicht nur ein Anstieg der Ratio entscheidend, sondern zusätzlich eine gegenläufige Entwicklung der Lichtintensitäten von freiem und  $\text{Ca}^{2+}$ -komplexierendem FURA-2 (siehe z.B. Abb. 3.4).

Die errechneten Daten wurden als Files gespeichert und für die Darstellung in dieser Arbeit mit StatView Graphics™ auf Macintosh Computern eingelesen und durch KaleidaGraph™ zur Darstellung gebracht.

In den Box-Plot-Diagrammen wurden jeweils die Werte für die 10., 25., 50., 75. und 90. Perzentile graphisch dargestellt, sowie Einzelwerte, die über der 90. bzw. unter der 10. Perzentile lagen.

## **2.5 Präparation der zu injizierenden RNA**

### **2.5.1 Isolierung von total RNA aus Zellkultur**

Homogenisierung:  $450 \times 10^6$  Zellen VSMC (5. Passage) werden in 24ml TRIzol-Reagent lysiert, 5min RT; Phasenseparation: Zugabe von 0,2ml Chloroform pro ml TRIzol; 3min RT; für 15min bei 14tU/min zentrifugieren bei 4°C; RNA-Prezipitation: der Überstand wird in einem neuen Rkt-Gefäß mit 500µl pro ml urspr. für die Homogenisierung verwendeten TRIzol gemischt. 10min RT; für 10min bei 12tU/min zentrifugieren bei 4°C. Die isolierte RNA bildet ein Gel-artiges Pellet am Boden/Rand des Rkt-Gefäßes. Reinigen der RNA: Überstand entfernen; Zugabe von 1ml 70% EtOH pro ml urspr. Trizol; VT; für 6min bei 9tU/min zentrifugieren. Lösen der RNA: Antrocknen des Pellets; Lösen in 20µl DEPC-beh. Wasser pro ml urspr. verw. TRIzol. 10min 60°C.

## 2.5.2 Isolierung von mRNA

Zur Isolierung von mRNA aus der gewonnenen gesamt RNA wurde der PolyATtract mRNA Isolations-Kit von Promega verwendet. Dieser beruht auf der Hybridisierung der mRNA-Fraktion durch eine Biotin-gekoppelte desoxy-Thymidin-Sequenz (oligo(dT)), die durch Streptavidin markiert wird, das an paramagnetische Partikel gekoppelt ist und mit Hilfe eines Magnetfeldes spezifisch getrennt werden kann. Die Separation erfolgt nach Herstellerangaben: 0,1-1,0mg total RNA werden durch Zugabe von DEPC-behandeltem Wasser auf ein Volumen von 500µl gebracht, für 10min auf 65°C erwärmt. Es werden 3µl der biotinylierten-Oligo(dT) und 13µl 20x SSC zugegeben und die Probe auf RT abgekühlt. Die Streptavidin-paramagnetischen Partikel (SA-PMP) werden mehrmals sorgfältig mit 0,5x SSC gespült und in 100µl dieser Lösung resuspendiert. Darauf wird die zuvor abgekühlte Probe mit der biotinylierten Oligo(dT) und gesamt RNA gegeben und für 10min bei RT inkubiert. Die SA-PMPs werden durch ein Magnetfeld abgefällt und der Überstand entfernt. Die Partikel werden 4x mit je 0,3ml 0,1x SSC gewaschen. Die RNA wird durch Zugabe von 0,1ml DEPC-behandeltem Wasser von den Oligo-(dT)-SA-PMP abgetrennt und eluiert. Die mRNA erhaltende wäßrigen Phase wird nach erneutem Ausfällen der Partikel im Magnetfeld abpipettiert und in ein frisches Rkt-Gefäß gegeben. Durch eine anschließende Ethanol-fällung kann die mRNA vor Injektion in die Oozyten auf ca. 0,7µg/µl konzentriert werden.

## 2.5.3 In-vitro Transkription

### 2.5.3.1 Transformation kompetenter *Escherichia coli*-Zellen und Selektion Ampicillin-resistenter Transformanden

Kompetente *E. coli* Zellen werden rasch aufgetaut und in ein Rkt-Gefäß zu ca. 50ng DNA zugegeben. Inkubation auf Eis 30min. Es folgt ein Hitzeimpuls für 95s bei 42°C. Abkühlen und Zugabe von LB-Medium (37°C). Inkubation über 60min bei 37°C damit die Zellen die Plasmid-codierte β-Lactamase produzieren können.

Die Lösung wird in einer Petrischale auf Ampicillin-haltigem (100µg/ml) LB-Nährboden ausplattiert und für 12-16h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Mit einer so gewonnenen Einzelkolonie wird 3ml Ampicillin-haltiges (75µg/ml) LB-Medium beimpft und für 8-10h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. 400µl der so erhaltenen Lösung wird in einen Erlenmeyerkolben zu 400ml Ampicillin-haltigem (75µg/ml) LB-Medium gegeben und unter magnetrühren über Nacht inkubiert. Die Suspensionskultur erreicht eine Zelldichte von ca. 10<sup>9</sup>/ml.

### 2.5.3.2 Isolierung von Plasmid DNA

Zur Isolierung der Plasmid-DNA wird der Plasmid Maxi Kit von Quiagen nach Herstellerangaben verwendet. Nach Abernten der Bakterienzellen aus der Suspension

durch Zentrifugation werden diese in den Resuspensionspuffer (10mM EDTA; 100mg/ml RNase A; 50mM Tris-HCl, pH 8,0) gegeben und mit dem Lysepuffer (200mM NaOH, 1%SDS) vermischt. 5min auf Eis. Zugabe von 10ml des Neutralisationspuffers (3M Kaliumacetat, pH 5,5) zum Lysat, renaturieren die Plasmid-DNA, die gelöst wird, während Chromosomale DNA mit K<sup>+</sup>-SDS-Komplexen präzipitiert und die Proteine denaturiert bleiben. Der Überstand wird zweimal für 30 und 15min bei 20000g und 4°C zentrifugiert und in die mit QTB (750nM NaCl; 15% EtOH; 0,15% Triton X-100; 50mM MOPS; pH 7,0) equilibrierten Anionen-Austauschersäulen (QIAGEN-tip 500) chromatographiert, die eine hohe Bindungsaffinität für Nucleinsäuren aufweisen. Diese werden zweimal mit 30ml eines neutralen Puffers (1M NaCl; 15% EtOH; 50mM MOPS; pH 7,0) gewaschen und die DNA anschließend mit einem alkalischen Puffer eluiert (1,25M NaCl; 15% EtOH; 50mM Tris-HCl; pH 8,5).

Die erhaltene Plasmid-DNA wurde mit Isopropanol aus der Lösung gefällt, mit Ethanol gewaschen, in H<sub>2</sub>O gelöst und bei -80°C aufbewahrt.

Die Maxi-Präp DNA wird mit HindIII bei 37°C über Nacht linearisiert.

#### 2.5.3.3 Synthese der RNA durch *in-vitro* Transkription

Zur Synthese der *in-vitro* transkribierten RNA wurde der doppelte Ansatz des mMessage mMachine-Kit entsprechend den Benutzerempfehlungen verwendet. 8µl DEPC behandeltes Wasser, 4µl 10x Transkriptions-Puffer, 20µl 2x Ribonucleotid-Mix, 4µl linearisierte DNA (0,5µg/µl) und 4µl 10x Enzym-Mix werden durch vorsichtiges auf- und abpipettieren durchgemischt. Kurzes Abzentrifugieren. Inkubation 1h bei 37°C. Zugabe von 1µl RNase-freier DNase zur Beseitigung der DNA; erneute Inkubation bei 37°C für 15min. Die Reaktion wird durch Zugabe von 115µl DEPC-behandeltem Wasser und 15µl Ammoniumacetat-Stop-Lösung beendet. Die RNA wird durch Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) aufgereinigt und das Pellet in DEPC-behandeltem Wasser gelöst und in Oozyten injiziert bzw. zuvor bei -70°C aufbewahrt.

#### **2.5.4 Eukaryontischer Expressionsvektor**

Für den GnRH-Rezeptor codierende DNA wurde mit EcoR I und Xho I in den 5,4kb pcDNA3 Vektor integriert.

### **2.6 Nachweise über die Qualität und Stabilität der RNA**

#### **2.6.1 DNA für den GnRH-Rezeptor**

Zur Herstellung der Sonde für die RNA des GnRH-Rezeptors wird GnRH-R-DNA aus dem Bluescript prokaryontischen Expressionsvektor mit Eco R I und Xho I verdaut. In 40µl Verdau sind 5µg DNA, 4,0µl 10x Restriktionspuffer H und jeweils 10U Eco R I und Xho I



enthalten.

### **2.6.2 DNA für den Thrombin-Rezeptor**

Der erste Strang der DNA, die für den Thrombin-Rezeptor codiert, wird aus total RNA, die aus glatten Gefäßmuskelzellen von Ratten (VSMC) isoliert wurde, durch reverse Transkription synthetisiert. Dazu wird der ZAP cDNA-Kit von Stratagene nach Angaben des Herstellers verwendet. Nacheinander werden zu 24,3µl DEPC-behandeltem Wasser im Lösungsansatz folgende Reagentien zugegeben:

5µl 10x first strand buffer; 3µl Second strand methyl nucleotide mixture (10mM); 1,4µl Primer THR-L (2µg/µl); 1µl RNase Block Ribonuclease Inhibitor (40U/µl). Die Probe wird gevortext (VT); Zugabe von 5,3µl total RNA von VSMC (1,8µg/µl); VT; 10min RT; 2,5µl Reverse Transcriptase (StrataScript RNase H<sup>-</sup> reverse transcriptase; 100U/µl); VT; 60min bei 37°C.

Die DNA für den Thrombinrezeptor wird durch eine nachgeschaltete Polymerase Kettenreaktion (PCR) aus 5µl dieses Ansatzes selektiv vermehrt:

36µl Wasser (=> final 50µl); 5µl 10x Reaktionspuffer; 1µl dNTPs (10mM); 1µl Primer THR-L (0,25µg/µl); 1µl Primer THR-U (0,25µg/µl) werden gemischt und 5µl des Ansatzes aus der Reversen Transkriptase und 1µl Prime Polymerase (2U) zugegeben.

Es folgen 40 Zyklen einer PCR bei jeweils 30sec bei 94°C, 48°C und 72°C.

### **2.6.3 Präparations-Gelelektrophorese**

Die erhaltene GnRH-R-DNA aus dem Verdau und die Thrombin-R-DNA aus der PCR wird durch Auftragen auf ein Agarose-Gel überprüft. Die erwarteten Größen von etwa 1.200bp für den GnRH-R und 1.000bp für den Thrombin-R können beim Vergleich mit einer DNA-Leiter gefunden werden.

Das Resultat des Verdau bzw. der PCR wird auf ein Agarose-Präparationsgel (mit großen Gel-Taschen) aufgetragen. Die Banden, die die DNA für den jeweiligen Rezeptor enthalten werden mit einem Skalpell ausgeschnitten, die Agarose von der DNA durch Zentrifugation in einer Säule abgetrennt.

Die Thrombin-R-DNA wird durch eine erneute PCR angereichert.

### **2.6.4 Herstellung der DIG-markierten Sonden:**

Die Sonden werden unter Verwendung des CSPD-Kit hergestellt:

Folgende Mengen werden in einen PCR Ansatz (50µl) jeweils für GnRH-R und THR zugegeben:

	<b>GnRH-R</b>	<b>THR</b>
<i>Größe (bp)</i>	1200	1000
Wasser	35,5µl	34,5µl
10x Puffer	5,0µl	5,0µl
10x Markierungs Mix	5,0µl	5,0µl
Antisense Primer	GnRH-R-ER	THR-L
	1µl	1µl
DNA Probe	2,5µl	3,5µl
Polymerase (2U/µl)	1µl	1µl

Es folgen 40 Zyklen einer PCR bei jeweils 30sec 94°C => 48°C => 72°C.

### **2.6.5 Denaturierende Agarose-Formaldehyd-Gelelektrophorese**

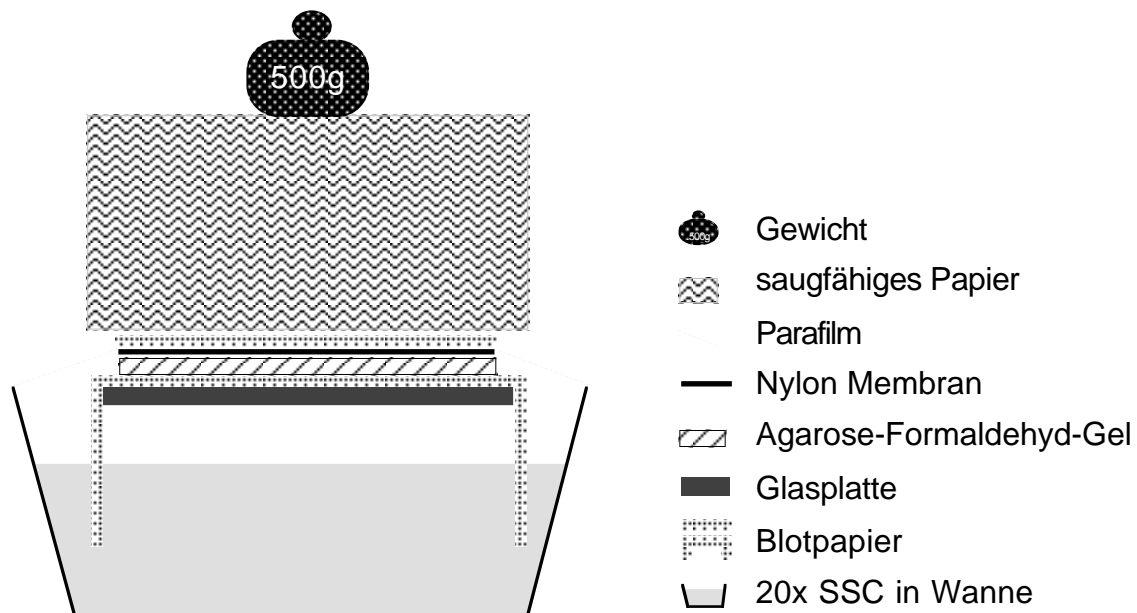
Formaldehyd-1,2% Agarose-Gele wird wie folgt hergestellt (60ml-Gel):

0,72g Agarose wird in 43,5ml DEPC-behandeltem Wasser unter mehrmaligem Erhitzen und kurzem Aufkochen in der Mikrowelle gelöst; Zugabe von 6ml 10x MOPS und 10,5ml Formaldehyd (37%); Gießen in eine Gelkammer.

Die RNA-Lösung wird mit dem vierfachen ihres Volumens mit RNA-Ladepuffer gemischt und für 10min bei 68°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Eis wird das Gel beladen. Laufpuffer: MOPS; Spannung 100V über 1-2h.

### **2.6.6 Transfer auf die Nylon-Membran (Northern Blot)**

Es wird nach der *Kapillarblot*-Technik geblottet. Auf einer Glasplatte werden 4 Lagen Blottpapier glattgerollt und so angeordnet, daß sie auf zwei Seiten in ein Reservoir mit 20x SSC eintauchen. Das Agarose-Formaldehyd-Gel wird vorsichtig darauf gelegt und auf dieses ein größengleiches Stück Nylonmembran, es folgt nochmals Blottpapier. Auf die nicht vom Gel bedeckten Stellen wird Parafilm gelegt, damit die Flüssigkeit nur durch das Gel gezogen wird und 20x SSC nicht verdunstet. Ein Stoß saugfähiges Papier wird darauf gesetzt und mit einem Gewicht von ca. 500g beschwert (vgl. Abb. 2.5).



**Abb. 2.5 Aufbau des Transfers (Northern Blot) nach der *Kapillarblot*-Technik**

Es wird für ca. 14-20h bei RT geblottet. Die durch die Kapillarkräfte nach oben wandernde Flüssigkeit transportiert die im Gel befindliche RNA mit nach oben. Da RNA die Membran nicht passieren kann, bleibt sie an dieser hängen. Auf der Membran entsteht eine dem Gel spiegelbildliche Anordnung der RNA.

### **2.6.7 Fixieren der RNA an die Membran**

Die Membran wird mit der RNA-Seite nach oben für 10min bei RT auf einem Blotpapier getrocknet, und dann mit  $2\text{J}/\text{cm}^2$  UV-Licht an die Membran fixiert.

### **2.6.8 Hybridisieren der Membran**

Die an der Luft getrocknete Nylon-Membran wird so in ein Hybridisierungsrohr gelegt, daß die RNA-Seite nach innen zeigt. Es wird für 4h bei  $42^\circ\text{C}$  mit 20ml Hybridisierungslösung vorhybridisiert und über Nacht mit einer 1:1000 Verdünnung der DIG-markierten Sonde in Hybridisierungspuffer hybridisiert.

### **2.6.9 Waschen der hybridisierten Membran**

2 Waschvorgänge über 5min bei RT mit jeweils mind. 50ml WP1 /  $100\text{cm}^2$  Filter.

2 Waschvorgänge über 5min bei  $68^\circ\text{C}$  mit jeweils mind. 50ml WP2 /  $100\text{cm}^2$  Filter.

Die gewaschene Membran wird durch ein wenig 1x Maleinsäure-Lösung abgekühlt und in reichlich Blocking-Puffer für 30 min geschüttelt.

3 Waschvorgänge über 10min bei RT in WP3.

### **2.6.10 Immunologische Detektion mit Anti-DIG-AP Konjugaten**

Die Membran wird für 30min in Maleinsäurepuffer inkubiert, dem  $75\text{mU}/\text{ml}$  anti-DIG-AP

Konjugate zugegeben werden. Es wird 2x 15min in Maleinsäurepuffer gewaschen, der zusätzlich 0,3% TWEEN 20 enthält. Die Membran wird nun mit Detektionspuffer für 5min equilibriert und zwischen zwei Folien gelegt. Mit einer Walze wird die restliche Flüssigkeit ausgestrichen. Die Folien werden an drei Seiten zusammenschweißt, sodaß sich die Membran in einer Tasche befindet, die nur noch an einer Seite geöffnet ist. 500µl CSPD-Luminiszenz-Lösung werden auf die Membran in der an drei Seiten zugeschweißten Folie gegeben. Die Flüssigkeit wird mit der Walze verteilt. Luftblasen und die überschüssige Flüssigkeit werden in Richtung der noch geöffneten Seite ausgestrichen. Die vierte Seite wird zugeschweißt, sodaß die Membran nun luft- und wasserdicht in der Folie versiegelt ist. Die Folie wird nun für 10min auf 37°C erwärmt, damit die Luminiszenzreaktion ausgelöst wird. Anschließend wird diese in einer Filmkammer auf einem Röntgenfilm fixiert, der über 30 Minuten bei RT exponiert wird. Es folgt die Entwicklung.

## **2.7 Puffer und Lösungen**

### **Blocking Puffer**

1,0x Maleinsäure-Puffer  
1,0 Blocking Reagent

### **Collagenase-Lösung (0,4%)**

200mg Collagenase  
50 ml OR I-Medium (calciumfrei)  
filtrieren (0,45µm Filter)

### **50x Denhardt's Lösung**

Ficoll 400	1,0g
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	1,0g
BSA Fraktion5	1,0g
ad DEPC beh. Wasser	100ml
sterilfiltriert	

### **DEPC-behandeltes Wasser**

0,1% DEPC in aqua dest.; 12h einwirken lassen; autoclavieren

**Hybridisierungs-Lösung (20ml)**

Formamid (deionisiert)	10,0ml
20x SSC	5,0ml
Na-P-Puffer 1M, ph 6,5	1,0ml
50x Denhart's Lösung	2,0ml
Hering Sperm DNA [10mg/ml]	0,4ml
DEPC-beh. Wasser	1,6ml

**LB-Medium**

10,0g Casein  
5,0g Hefeextrakt  
5,0g NaCl  
1000ml H<sub>2</sub>O; pH 7,5; autoklavieren

**10x MOPS**

200mM Morpholinopropansulfonsäure  
50mM Natriumacetat  
10mM EDTA

pH=7,0

**Maleinsäure-Puffer**

0,1M Maleinsäure  
0,15M NaCl  
pH=7,5 (mit NaOH eingestellt); autoclavieren

**OR I**

5,0mM HEPES acid  
82,5mM NaCl  
2,5mM KCl  
1,0mM MgCl<sub>2</sub>  
1,0mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

pH=7,6; sterilfiltrieren

## OR II

5,0mM HEPES acid  
82,5mM NaCl  
2,5mM KCl  
1,0mM MgCl<sub>2</sub>  
1,0mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,0mM CaCl<sub>2</sub>  
1,0mM Gentamycin

pH=7,6; sterilfiltrieren

## OR III

5,0mM HEPES acid  
82,5mM NaCl  
2,5mM KCl  
1,0mM MgCl<sub>2</sub>  
1,0mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,0mM CaCl<sub>2</sub>  
1,0mM Gentamycin  
1,0mM Na-Pyruvat

pH=7,6; sterilfiltrieren

## RNA-Ladepuffer

200µl Formamid  
83µl Formaldehyd (37%)  
50µl 10x MOPS  
8µl Bromphenolblau / Xylen-Cyanol-Lösung (je 0,5%)

## 20x SSC

3,0M NaCl  
0,3M tri-Natriumcitrat

pH=7,0; autoclavieren

## Waschpuffer

### WP 1

2,0x SSC  
0,1% SDS (w/v)

## **WP2**

0,1x SSC

0,1% SDS (w/v)

## **WP3**

1,0x Maleinsäure-Puffer

0,3% TWEEN 20

## **2.8 Geräte und Verbrauchsmaterial**

### **2.8.1 Verbrauchsmaterial**

Filteraufsätze zur Sterilfiltration (45µm Porengröße)	Millipore, Watford, U.K.
Glaskapillaren (8") für die Mikroinjektion	Drummond, Broomall, U.S.A.
Nylon-Membran	Boehringer, Mannheim
Pasteurpipetten 1ml	Brand, Wertheim
Petrischalen ø 30mm	Heræus, Hanau
Petrischalen ø 60mm	Heræus, Hanau
Petrischalen ø 90mm	Heræus, Hanau
Petrischalen ø 110mm	Greiner, Solingen
Reaktionsgefäße 1,5ml	Biozym, Hessisch Oldendorf
Falcon-Röhrchen 14ml	BD Biosciences, Bedford, U.S.A.
Sterilfilter (Poren 0,2µm)	Nalgene, Hereford, GB

### **2.8.2 Geräte für die *Xenopus* Oozyten**

Inkubator für die Oozyten, Typ ICE400	Memmert, Schwabach
Kaltlichtquelle KL 1500 electronic	Wild, Heerbrugg, CH.
Mikromanipulator M1 mit Stativ	Drummond Scientific, Broomall, U.S.A.
Stereomikroskop M3Z	Leica, Heerbrugg, CH

### **2.8.3 *Calcium Imaging* System**

Calcium Imaging	Till Photonics GmbH, Planegg
CCD Kamera, AE2000	General Scanning GmbH, Planegg
Inverses Fluoreszenzmikroskop, Auxiovert 35	Zeiss, Hanau

### **2.8.4 Ultrazentrifugen**

Optima-TLX 120 mit Rotor TLA 100.4	Beckmann, München
OTD-Combi mit Rotor T865.1	Du Pont, Bad Homburg

### **2.8.5 Sonstige Geräte**

Feinwaage R200D	Sartorius, Göttingen
pH-Meter, pH91	WTW, Weilheim
Photometer GeneQuant	Pharmacia, Freiburg
UV-Lampe; Fluolink	Vilber, Lourmat

Alle weiteren Geräte entsprechen dem üblichen Laborstandard.

### **2.8.6 Software**

Fucal 5.12a	Till Photonics, Planegg
KaleidaGraph 3.0.5	Abelbeck Software
Statview Graphics 4.51	Abacus Concepts Inc., Berkeley, U.S.A.

## **2.9 Zellen und Versuchstiere**

### **2.9.1 Herkunft der *Xenopus laevis* Oozyten**

Ausgewachsene *Xenopus laevis* Wildtyp-Weibchen wurden für Laborzwecke gezüchtet und von H. Kähler (Hamburg) bezogen. Die Albino-Weibchen waren ein großzügiges Geschenk von Herrn Professor Trendelenburg, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg.

### **2.9.2 Herkunft der Schweineleber**

Die Schweineleber für die RNA-Isolierung stammt vom Schlachtschweinen aus dem Schlachthof München. Organteile werden noch körperwarm zerkleinert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend bis zur Verwendung bei minus 80°C aufbewahrt.

### **2.9.3 Herkunft der glatten Gefäßmuskelzellen**

Die glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) für die RNA-Isolierung stammen von Sprague Dawley, werden enzymatisch gelöst (0,25mg/ml Elastase, 1mg/ml CLS-10,375mg/ml Trypsin-Inhibitor; 90 min bei 37°C), in Zellkultur (H-F12/WM-752 Medium 1:1; 5-10% BSA; 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre) gezüchtet und nach dem Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff bis zur Verwendung bei minus 80°C eingefroren.

### **2.9.4 Herkunft der transformationskompetenten *E. coli* JM109 Zellen**

Transformationskompetente *E. coli* Zellen werden von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulare Endokrinologie, München, nach der Methode von Hanahan (1983) aus *E. coli* JM109 Zellen von Promega/Serva, Heidelberg hergestellt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt.



## **2.10 Reagentien**

### **2.10.1 Reagentien für die Präparation der Oozyten und Durchführung der Fluoreszenzmessung**

Collagenase, C-9891	Sigma, Deisenhofen
Digitonin, Nr. 3004	Calbiochem, Bad Soden
EDTA, Nr. 11278	Serva, Heidelberg
EGTA, E-4378	Sigma, Deisenhofen
FURA-2 pentapotassium salt, 344900	Molecular Probes, Leiden, NL
GnRH-Analogon, L-6884	Sigma, Deisenhofen
HEPES, H-3375	Sigma, Deisenhofen
Manganchlorid	Sigma, Deisenhofen
Mineralöl, M-5904	Sigma, Deisenhofen
Natriumpyruvat, Nr. 15220	Serva, Heidelberg

### **2.10.2 Agentien zur funktionellen Calciummessung**

Acetylcholinchlorid, Nr. 420-150	Sigma Diagnostics, St. Louis, U.S.A.
Adenosin, A-7636	Sigma, Deisenhofen
Adenosintriphosphat (ATP), A-5394	Sigma, Deisenhofen
Aldosteron, Nr. 05521	Fluka, Neu-Ulm
Angiotensin II (Acetatsalz), A-9525	Sigma, Deisenhofen
Angiotensin II (human), Nr. 51285	Serva, Heidelberg
HPCD, C-0926	Sigma, Deisenhofen
Lysophosphatidylsäure, L-7260	Sigma, Deisenhofen
Natriumvanadat, S-6508	Sigma, Deisenhofen
Noradrenalin, Nr. 489350	Calbiochem, Bad Soden
Progesteron, Nr. P0130	Sigma, Deisenhofen
Progesteron, wasserlöslich, Nr. P-7556	Sigma, Deisenhofen
Thapsigargin, Nr. 586005	Calbiochem, Bad Soden
Thrombin, Nr. 605206	Calbiochem, Bad Soden
Vasopressin, V-9879	Sigma, Deisenhofen

### **2.10.3 Reagentien für die Molekularbiologie**

Chloroform, C-2432	Sigma, Deisenhofen
CSPD-Kit	Boehringer Mannheim
ECL-Lösung 1	Life Science, Amersham
ECL-Lösung 2	Life Science, Amersham
Eco R I	New England Biolabs, Beverly, U.S.A.
Formamid, F-75038	Sigma, Deisenhofen

Formamid, Nr. 12027  
Hering Sperm DNA, Nr. 223 646  
Hind III  
Isopropanol, I-9516  
Kpn I  
MessageMaker™ Reagent Assembly  
mMESSAGE mMACHINE  
Oligo(dT)-Cellulose  
pcDNA3  
Primer GnRH-R-ER (Antisense)  
Primer THR-L (Antisense), Nr. 03261E2  
Primer THR-U, Nr. 203260H1  
Restriktionspuffer H  
RNA Längenstandard I, Nr. 1062 611  
RNA Sample Loading Buffer, R-4268  
TRI Reagent™  
TRIzol-Reagent  
TWEEN 20, P-1379  
ZAP cDNA-Kit

Merck, Darmstadt  
Boehringer Mannheim  
New England Biolabs, Beverly, U.S.A.  
Sigma, Deisenhofen  
New England Biolabs, Beverly, U.S.A.  
Life Technologies, Berlin  
Ambion Inc, Austin, U.S.A.  
Sigma, Deisenhofen  
Invitrogen, San Diego, U.S.A.  
MIKROGEN, München  
MIKROGEN, München  
MIKROGEN, München  
Boehringer Mannheim  
Boehringer Mannheim  
Sigma, Deisenhofen  
Sigma, BIO Sciences  
GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe  
Bio-Rad, München  
Stratagene, Amsterdam, NL

#### **2.10.4 Erworbene DNA und RNA**

GnRH-R cDNA  
  
Mouse Testis Total RNA, 64045-1  
  
Mouse Testis Poly A+ RNA, 6612-1  
  
pBluescript® II SK (+/-) phagemid  
Rat Smooth Muscle Poly A+ RNA, 6726-1

ein freundliches Geschenk von Dr.  
Sealfon, U.S.A.  
Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto,  
U.S.A.  
Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto,  
U.S.A.  
Stratagene,  
Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto,  
U.S.A.

#### **2.10.5 Sonstige Reagentien**

Agarose, Nr. 15510-027

Life Technologies, Paisley, UK

### **3. ERGEBNISSE**

#### **3.1. Calciummessungen an endogenen Rezeptoren**

##### **3.1.1. Progesteron**

In der Oozytenmembran von *Xenopus laevis* sind eine Reihe endogener Rezeptoren beschrieben, deren Aktivierung mit einem Calciumsignal einhergeht. Auf besonderes Interesse für die Ziele der hier vorliegenden Arbeit stoßen die Ergebnisse von Wasserman et al., (1980) der an einzelnen mit dem Lumineszenzprotein Aequorin beladenen Albino-Oozyten eine Zunahme der Lichtemission 40-60s nach Progesteronapplikation beobachtete. Dies deutete auf eine schnelle, vorübergehende intrazelluläre Erhöhung der Calciumkonzentration durch die Steroidzugabe hin.

Es sollte ermittelt werden, ob sich diese Calciumerhöhung auch mit Hilfe des empfindlichen Calciumindikatorfarbstoffes FURA-2 und den Methoden des *Calcium-Imaging* zeigen läßt.

##### **3.1.1.1 Albino-Oozyten**

Wie von Wasserman et al., 1980 beschrieben, wurden Albino-Oozyten am Entnahmetag manuell aus ihren Follikeln herauspräpariert, durch Mikroinjektion mit Farbstoff beladen - hier jedoch mit FURA-2 - und nach einer Regenerationsphase von 3h wurde das Verhalten der intrazellulären Calciumkonzentration auf Progesteronzugabe 3µM über einen mehrere Minuten dauernden Zeitraum verfolgt.

Dabei zeigte keine von 23 Oozyten zwei verschiedener Albino-Weibchen ein Calcium-Signal. Ebenso wenig ließ sich einen Tag nach der Entnahme bei drei mechanisch präparierten Albino-Oozyten ein Signal erkennen.

Auch fünf Albino-Oozyten, die mit dem Enzym Kollagenase aus dem Follikel herausgelöst wurden, zeigten kein Calciumsignal auf 3µM Progesteron. Weder bei der Untersuchung am Entnahmetag (drei Oozyten), noch fünf Tage nach Entnahme (zwei Oozyten).

##### **3.1.1.2 Wildtyp-Oozyten**

Bei den Wildtyp-Oozyten konnten ebensowenig Calcium-Signale auf Progesteronapplikation 3µM gefunden werden. So reagierte keine von vier mechanisch präparierten Oozyten.

**Tab. 3.1: Reaktionen auf Progesteron [3µM]**

Rkt.	Typ	Präparation	Untersuchungstag
0 / 23	Albino	mechanisch	am Entnahmetag („Wasserman“)
0 / 3	Albino	Kollagenase	am Entnahmetag
0 / 3	Albino	mechanisch	1d nach Entnahme
0 / 2	Albino	Kollagenase	5d nach Entnahme
0 / 4	Wildtyp	mechanisch	2d nach Entnahme

Nach Baulieu et al. (1978) wird die meiotische Zellreifung durch eine Progesteronkonzentration von 1µM induziert. Das Verhalten von 21 Oozyten auf Progesteron in dieser Konzentration wurde mit dem *Calcium Imaging* untersucht. Dabei konnte ebenfalls keine intrazelluläre Calciumerhöhung im Anschluß auf Progesteronapplikation nachgewiesen werden.

**Tab. 3.2: Reaktionen auf Progesteron [1µM]**

Rkt.	Typ	Präparation	Untersuchungstag
0 / 5	Albino	Kollagenase	1d nach Entnahme
0 / 3	Albino	Kollagenase	5d nach Entnahme
0 / 12	Wildtyp	mechanisch	2d nach Entnahme
0 / 1	Wildtyp	Kollagenase	1d nach Entnahme

Die von Wasserman et al. (1980) gefundene Calciumerhöhung auf Progesteronzugabe konnte mit der hier verwendeten Methode des *Calcium-Imaging* unter FURA-2 nicht bestätigt werden.

An allen gemessenen Oozyten konnte zum Nachweis ihrer Intaktheit vor Versuchsende jeweils ein Calciumsignal auf Lysophosphatidylsäure (LPA) ausgelöst werden.

### 3.1.1.3 Reifungsversuche

Es wurde überprüft, ob sich die Oozytenreifung durch PROG überhaupt initiieren läßt. Anders als bei den von Wasserman et al. (1980) mit Aequorin untersuchten Oozyten, die sich im Anschluß an die Messung noch einzeln auf eine erfolgreiche Reifung überprüfen ließen, ist das nach der Calciummessung mit den hier verwendeten Methoden nicht möglich. Da die Autofluoreszenzwerte der Oozyten jeweils bei der

Auswertung der Meßergebnisse berücksichtigt werden müssen, ist es im *Calcium Imaging* notwendig, an der individuellen Zelle die Ionenpermeabilität der Zellmembran zu zerstören, da die Autofluoreszenz der Oozyten durch Quenchen des Farbstoffes mit  $Mn^{2+}$  bestimmt wird. Daher kann nach diesem Vorgang der Erfolg einer Reifung nicht mehr beobachtet oder nachgewiesen werden, die Reifungsfähigkeit der Oozyten wurde parallel zu den Untersuchungen überprüft. Auch der Einfluß der Injektion von Calciumindikatorfarbstoff Fura-2 wurde dabei berücksichtigt.

Von 40 mechanisch präparierten WT-Oozyten wurde in 20 Fura-2 injiziert.

Nach 2h Regenerationszeit wurde zu 10 der Fura-2 injizierten und 10 unbehandelten Oozyten in einer Petrischale jeweils  $3\mu M$  PROG zugegeben, 10 Fura-2 injizierte und 10 unbehandelte Oozyten erhielten ethanolversetzte Pufferlösung, sodaß die Ethanolkonzentration später in allen Lösungen gleich bei 0,03% lag.

Nach 8, 12h und 24h wurde an Hand des Auftretens eines typischen, kleinen weißen Flecks am animalischen Pol, ein äußerliches Kriterium für eine erfolgreiche Reifung, überprüft, ob Zeichen der Reifung sichtbar waren.

Dabei ergab sich folgendes Schema:

**Tab. 3.3: Durch PROG ausgelöste Reifung an unbehandelten und Fura-2 injizierten Oozyten**

	<b>PROG [<math>3\mu M</math>]</b>	<b>Kontrollpuffer</b>
<b>unbehandelt</b>	7 / 10	0 / 10
<b>Fura-2 injiziert</b>	4 / 10	0 / 10

Reifungen auf PROG [ $3\mu M$ ] waren an unbehandelten und an Fura-2 injizierten Oozyten zu beobachten, Letztere zeigten jedoch eine etwas geringere Effizienz. In keiner der Gruppen waren spontane Reifungen zu beobachten.

Im Weiteren werden die Ergebnisse einiger Experimente beschrieben, die die Reaktionsfähigkeit der Oozyten und ein funktionierendes Meßsystem nachweisen, wenn zuvor keine Reaktion auf Progesteron oder einen Stimulus für vermeintlich exprimierte Rezeptoren feststellbar waren.

Es wurde nach einer geeigneten Substanz für diese „Positivkontrolle“ gesucht. Auf Grund von Literaturangaben in denen jeweils spezifische Rezeptoren an der Oozytenmembran vermutet werden, wurde die Auslösbarkeit von Calciumsignalen durch Lysophosphatidylsäure (LPA), Angiotensin II (AII) und Acetylcholin (ACh) näher

untersucht.

### 3.1.2. Lysophosphatidylsäure (LPA)

Nach Durieux et al. (1992) sind mit Hilfe elektrophysiologischer Untersuchungen an *Xenopus* Oozyten spezifische, dosisabhängige und Pertussistoxin empfindliche calciumabhängige Chloridströme auf LPA nachweisbar. Es wird angenommen, daß für LPA ein spezifischer G-Protein gekoppelter Rezeptor in der Oozytenmembran existiert,

Mit Hilfe des *Calcium Imaging* ließ sich auf LPA eine vorübergehende Erhöhung der intrazellulären freien Calciumkonzentration zeigen. Dabei war die Zuverlässigkeit der Signale stark abhängig von der Art der Oozytenpräparation (mechanisch oder mit Kollagenase) und der Zeitdauer nach der Präparation. (1-2 oder mehr Tage).

Folgende Tabelle zeigt die Anzahl der jeweils auf 1µM LPA reagierenden Oozyten, aufgeschlüsselt nach Präparationsmethode (mechanisch, Kollagenase oder anschließend H<sub>2</sub>O-injizierte), nach Oozytentyp (Albino oder Wildtyp), und nach der Zeit nach Präparation (Entnahmetag = 0d; 1d und 2-6d).

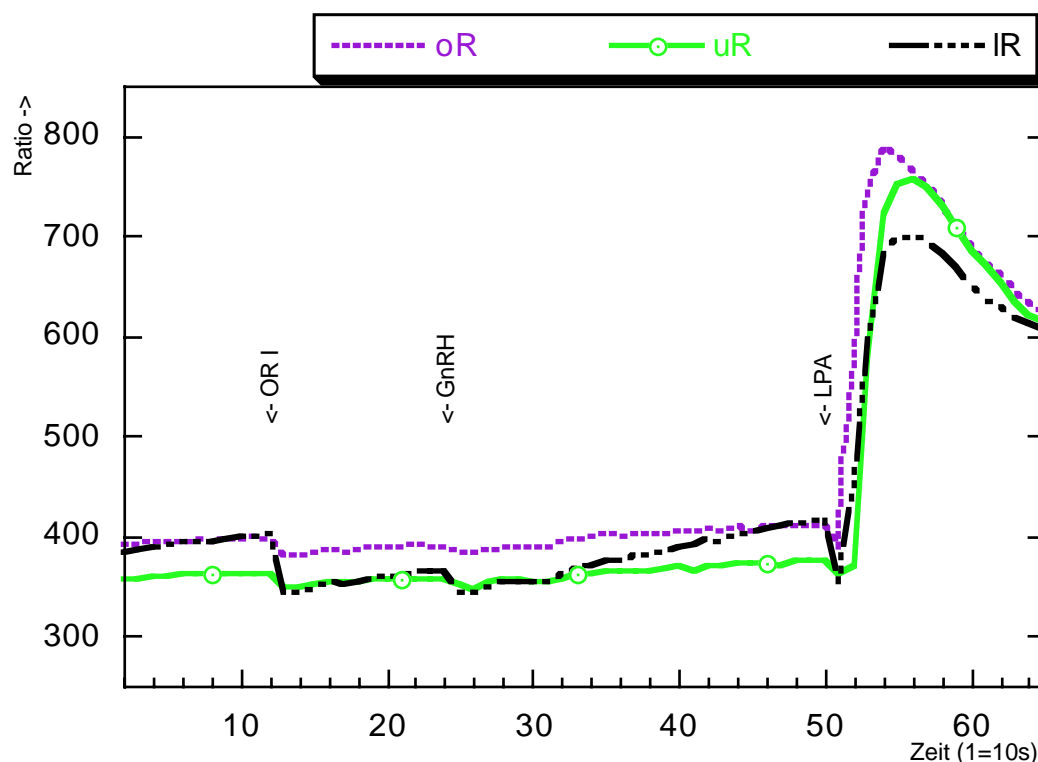
**Tab. 3. 3: Reaktionen auf Lysophosphatidylsäure (LPA) [1µM] an 77 Oozyten unterschiedlicher Präparation:**

Präp.	0d	1d	2 - 6d	Oozytentyp
mech.	6 / 20	0 / 3		Albino
mech.	0 / 3	3 / 3	5 / 6	Wildtyp
Kollag.	0 / 3	5 / 5	14 / 14	Albino
Kollag.			4 / 4	Wildtyp
Koll.+ Inj. H <sub>2</sub> O			16 / 16	Wildtyp

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, lassen sich Calciumsignale durch LPA ab dem 2. Tag nach Entnahme äußerst zuverlässig auslösen. Am Entnahme- und den darauffolgenden Tagen waren die Signale weniger zuverlässig auslösbar. Insgesamt hat sich LPA aber insbesondere für die Positivkontrolle bei RNA-injizierten Oozyten als sehr geeignet und zuverlässig erwiesen, da hier die Oozyten wegen der Expressionszeit erst einige Tage nach der RNA-Injektion gemessen und Kollagenase

behandelt werden.

So reagierten 125 von 129 (= 97%) RNA-injizierte, kollagenasebehandelte Wildtyp-Oozyten 2 - 6d nach Entnahme mit einem Calciumsignal auf LPA [ $1\mu\text{M}$ ].

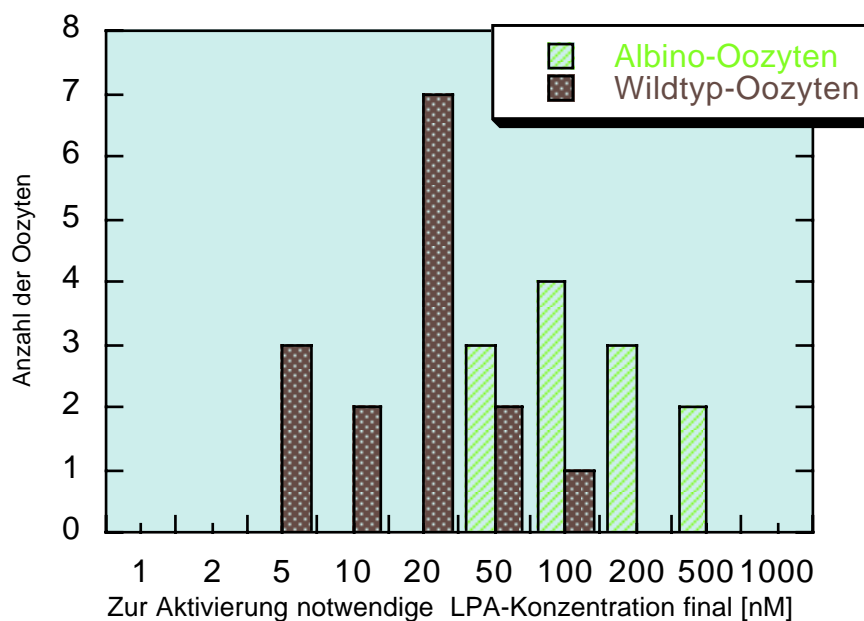


**Abb. 3.1: Ratioverlauf an drei Albino-Oozyten (oR, uR und IR) während Kontrollzugaben (Puffermedium (OR I) und GnRH [200nM]) und der Zugabe von LPA [ $1\mu\text{M}$ ]. An allen drei Oozyten ist eine deutliche, rasche Reaktion auf LPA sichtbar.**

An Hand des Beispiels LPA sollte untersucht werden, ab welchen LPA-Konzentrationen bereits Signale an den Oozyten auslösbar bzw. sichtbar sind, und ob sich hier Unterschiede zwischen Wildtyp- und Albino-Oozyten ergeben.

Diese Untersuchung war auch in Hinblick darauf wichtig, daß Wassermann et al. (1980) angeben, bei Albino-Oozyten, nicht aber bei Wildtyp-Oozyten die intrazelluläre Calciumerhöhung auf Progesteron zu beobachten. Sie sehen als mögliche Ursache, daß die Pigmentierung der Wildtyp-Oozyten die Lichtemissionen des Lumineszenzproteins Aequorin adsorbieren könnte.

Um die eine Reaktion auslösende Schwellenkonzentration von LPA zu ermitteln, wurde die intrazelluläre Calciumkonzentration von 15 Wildtyp und 12 Albino-Oozyten über einen längeren Zeitraum gemessen. Ins Medium der Oozyten wurde während der Messung nacheinander LPA in stufenweise ansteigender Konzentration zugegeben.



**Abb. 3.2: Unterschiede der Schwellenkonzentrationen auf LPA bei Albino- und Wildtyp-Oozyten.**

Entgegen der Erwartung zeigte sich, daß ein Großteil der Wildtyp-Oozyten bei vergleichbar geringeren LPA-Konzentrationen reagiert als Albino-Oozyten. Erste Reaktionen waren bei diesen schon durch Zugabe von 5nM LPA auslösbar, während Albino-Oozyten erst bei 10-fach höherer Konzentration reagierten.

Der Verdacht, daß an Wildtyp-Oozyten durch ihre Pigmentierung schwache Reaktionen erst später zu sehen sind, konnte durch dieses Ergebnis widerlegt werden.

Auf die Größe der durch LPA ausgelösten Signale wird im folgenden Kapitel 3.1.3. Angiotensin II näher eingegangen.

### 3.1.3. Angiotensin II

Woodward und Miledi (1991) und Sakuta et al. (1991) beschreiben calciumabhängige Chloridströme in Oozyten von *Xenopus laevis* auf Angiotensin II (AII). Im Gegensatz zu Reaktionen auf Adrenalin bleiben diese Reaktionen auch nach Entfernen der die Oozyte umgebenden Follikelzellen erhalten.

Die Signale lassen sich durch die Kollagenasebehandlung lediglich vorübergehend für 1. bis 2. Tage vermindern. Reaktionen auf Höhe des normalen Levels kehrten normalerweise am 3. oder 4. Tag nach Kollagenasebehandlung wieder zurück.

Aus ihren Untersuchungen schließen Sakuta et al. (1991), daß die Interaktion von AII mit seinem Rezeptor über ein Pertussistoxin empfindliches G-Protein die



Phosphorinositolhydrolyse aktiviert.

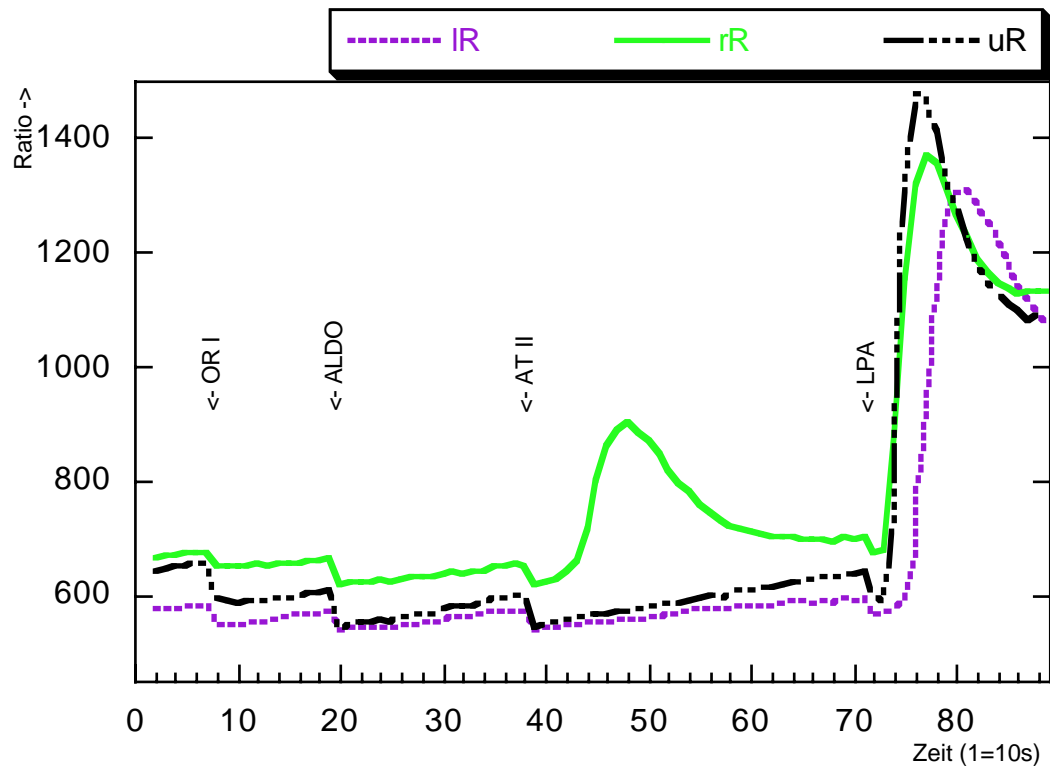
Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit sollte überprüft werden, ob die Reaktion der Oozyten auf AII auch mit der Methode des *Calcium-Imaging* sichtbar ist, und ob AII für eine Positivkontrolle geeignet ist. Die Ergebnisse werden in folgender Tabelle dargestellt, es wurden jeweils 200nM AII zugegeben:

**Tab. 3.4: Reaktionen auf Angiotensin II (AII) [200nM]**

<b>Rkt.</b>	<b>Typ</b>	<b>Präparation</b>	<b>Untersuchungstage</b>
0 / 6	Albino	mechanisch	0d = Entnahmetag
0 / 19	Albino	Kollagenase	0 - 5d nach Entnahme
0 / 6	Wildtyp	mechanisch	0 - 4d nach Entnahme
0 / 2	Wildtyp	Kollagenase	1 - 2d nach Entnahme
<b>3 / 7</b>	Wildtyp	Kollagenase	4 - 6d nach Entnahme

So zeigten 3 von insgesamt 40 Oozyten (7 Wildtyp- und 3 Albino Frösche) Reaktionen auf Angiotensin II. Die reagierenden Oozyten stammten von zwei verschiedenen Wildtypweibchen. Reaktionen waren nur bei kollagenasebehandelten Oozyten zwischen dem 4. und 6. Tag nach Entnahme meßbar. Auf Grund der geringen Anzahl der gemessenen Signale wurde Angiotensin II für eine Positivkontrolle nicht herangezogen.

Die folgende Graphik zeigt den Verlauf der Ratio an drei Wildtyp-Oozyten am 4. Tag nach Präparation. Eine dieser Oozyten zeigt ein deutliches Signal auf AII. Zu sehen ist auch, daß die Oozyte auf anschließend appliziertes LPA reagiert.



**Abb. 3.3:** Mit dem *Calcium Imaging* ermittelte Ratio dreier Oozyten (IR, rR und uR). Im Verlauf des Experiments erfolgten folgende Zugaben: Kontrollmedium (OR I), Aldosteron (ALDO) [10nM], Angiotensin II (AII) [200nM] und Lysophosphatidylsäure (LPA) [1 $\mu$ M]. Eine Oozyte zeigt ein Signal auf AII. Alle drei Oozyten reagieren auf anschließende LPA-Applikation.

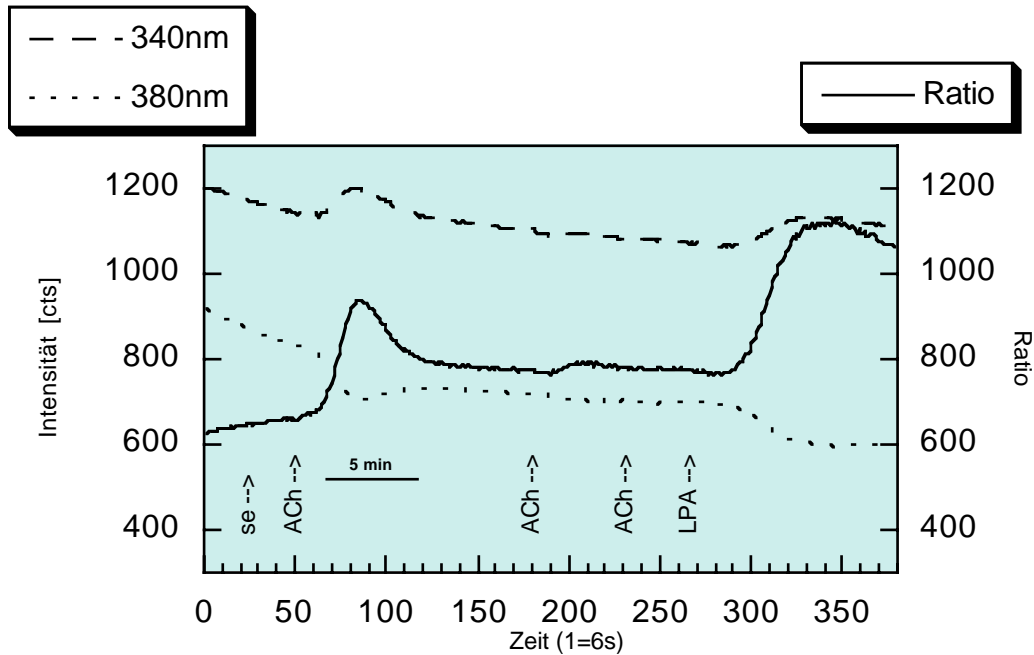
### 3.1.4. Acetylcholin

Auch Acetylcholin (ACh), für welches nach Literaturangaben ein endogener Rezeptor in der Oozytenmembran existiert (Kusano et al., 1977; Dascal et al., 1985; Brooker et al., 1990), wurde während der Messung der intrazellulären Calciumkonzentration dem Medium zugegeben. Dabei zeigte eine von 5 Wildtyp-Oozyten eine Reaktion. Die untersuchten Albino-Oozyten zeigten keine Reaktion auf ACh.

**Tab. 3.5: Reaktionen auf Acetylcholin (100 $\mu$ M)**

Rkt.	Typ	Präparation	Untersuchungstage
1 / 5	Wildtyp	mechanisch	0-4d nach Entnahme
0 / 5	Albino	Kollagenase	1d nach Entnahme

### Reaktion einer Wildtyp-Oozyte auf ACh-Zugabe (100µM final)



**Abb. 3.4:** Verlauf der gemessenen Lichtintensitäten bei 510nm durch Excitation bei 340nm bzw. 380nm und der ermittelten Ratio an einer Wildtyp-Oozyte. Zuerst Kontrollzugabe Serotonin (se) [1µM], dreimaliger ACh- [100µM] und LPA-Zugabe [1µM]. Die Oozyte reagiert auf Acetylcholin (ACh). Bei ACh-Zweitapplikation ist ein weiteres, sehr schwaches Signal erkennbar. Eine Reaktion auf LPA ist im Anschluß ebenfalls auslösbar. Neben dem Ratio-Anstiegen sind Veränderungen des Verhältnisses von freiem und komplexiertem FURA-2 jeweils an gegenläufigen Verläufen der Lichtintensitäten zu sehen.

### 3.2 Expression des GnRH-Rezeptors

Tsutsumi et al. (1992) haben den Mäuse GnRH-Rezeptor in *Xenopus laevis* Oozyten expimiert und ihn funktionell mit Hilfe elektrophysiologisch abgeleiteter Chloridströme nachgewiesen.

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit, sollte überprüft werden, ob die Expression des GnRH-Rezeptors (GnRH-R) sich auch mit Hilfe des *Calcium-Imaging* über eine sichtbare Steigerung der intrazellulären Calciumkonzentration funktionell nachweisen läßt.

Ferner sollten am Beispiel des GnRH-R Unterschiede in den Signalen zwischen Albino- und Wildtyp-Oozyten ermittelt werden.

In einer Verdünnungsreihe wurde überprüft, wieviel injizierte RNA notwendig ist, ein sicheres Signal auf GnRH zu erhalten, wie lange die injizierte RNA in den Oozyten nachweisbar bleibt, und ob GnRH-R-RNA, anderer zu injizierender RNA, die aus Geweben isoliert wurde, beigefügt werden kann, um so einen Nachweis über ein funktionelles Expressionssystem in einzelnen Oozyten zu erhalten.

27ng/Oozyte *in-vitro* transkribierte RNA, die für den GnRH-R codiert, wurde in das Zytoplasma der Oozyten injiziert.

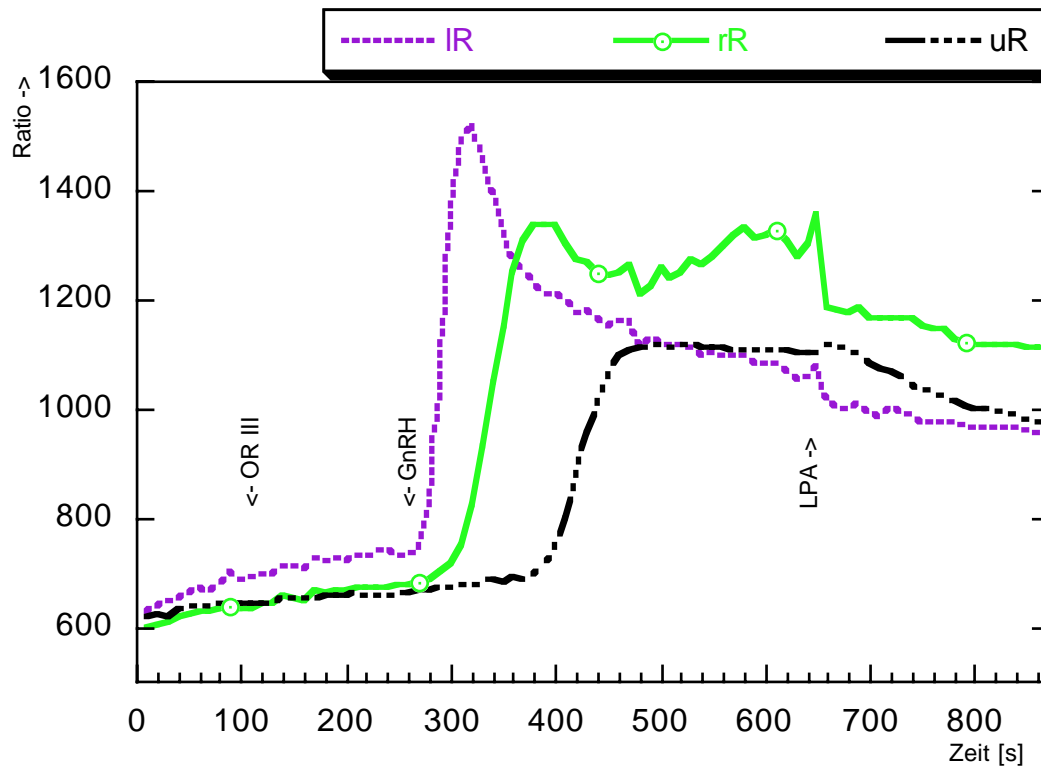
Es wurde untersucht, wieviele der Oozyten ein Calciumsignal auf 200nM GnRH 2-6d nach Injektion zeigen.

Der funktionelle Nachweis der Expression des GnRH-R ließ sich sowohl an WT, als auch an Albino-Oozyten zuverlässig erbringen.

**Tab. 3.6: Reaktionen auf GnRH [200nM] an 43 GnRH-R-RNA injizierten Oozyten und 42 Kontroll-Oozyten (unbehandelt oder H<sub>2</sub>O-Injektionen) 2-4d nach Injektion.**

	<b>GnRH-R-RNA</b>	<b>Kontrolle (ø od. H<sub>2</sub>O)</b>
Wildtyp:	16 / 22 (73%)	0 / 21 (0%)
Albino:	19 / 22 (86%)	0 / 21 (0%)

Folgende Abbildung zeigt einen repräsentativen Verlauf der Ratio an einer GnRH-injizierten WT-Oozyte bei Stimulation durch GnRH.



**Abb. 3.5: Verlauf der Ratio bei Reaktion auf GnRH [200nM] an 3 Oozyten, 4d nach Injektion von 27ng in vitro transkribierter RNA, die für den GnRH-R codiert. Zuvor Mediumzugabe (OR III), im Anschluß an die Reaktion LPA-Applikation [1µM], das keine erneute Calciumerhöhung hervorruft.**

### 3.2.1 Änderungen der zugegebenen GnRH-Konzentration

Es sollte beobachtet werden, ab welcher zugegebenen GnRH-Konzentration einzelne Oozyten bereits reagieren, und ob dabei Unterschiede zwischen Albino- und Wildtyp-Oozyten feststellbar sind.

Zu diesem Zweck wurde während der Calciummessung wiederholt GnRH in ansteigender Konzentration ins Medium gegeben: 0,5nM; 1nM; 2nM; 5nM; 10nM und 20nM.

Es wurde jeweils untersucht, bei welcher zugegebenen GnRH-Konzentration einzelne Oozyten durch sichtbares Ansteigen der  $[Ca^{2+}]_i$  reagiert haben.

Die Oozyten stammten von 2 Fröschen, 9 von einem Albino- und 11 von einem Wildtyp-Weibchen; sie wurden 2d zuvor mit 0,2ng GnRH-R-RNA injiziert.

Erste Reaktionen waren bei 1nM GnRH meßbar.

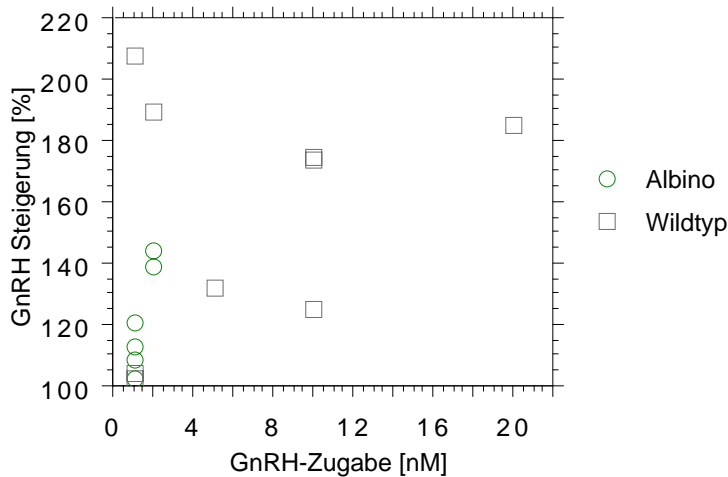
Der jeweiligen GnRH-Schwellen-Konzentration wird die Anzahl der dabei reagierenden Oozyten zugeordnet und in einer Tabelle dargestellt:

**Tab. 3.7: Schwellenkonzentration bei kumulativ zugegebenem GnRH in steigender Konzentration an 9 Albino- und 11 WT-Oozyten.**

Zugegebene GnRH-Konzentration [nM]	Anzahl der reagierenden Oozyten	
	davon Albino	davon Wildtyp
0,5	0	0
1	4	3
2	2	1
5		1
10		3
20		1
Rkt bei >200 od. keine Rkt. od nicht beurteilbar	3	2

Dabei hat jede Oozyte einer bestimmten Konzentration auf GnRH reagiert. Da sich die bereits reagiert habenden Oozyten auf anschließende GnRH-Zugaben nicht erneut reagierten, gab es von diesen keine weiteren Calciumsignale bei sich steigender GnRH-Konzentration. Jede Oozyte hat daher insgesamt nur ein Signal gezeigt, das jeweils einer bestimmten Schwellenkonzentration GnRH zugeordnet werden konnte.

Bei den 15 reagierenden Oozyten wurde jeweils die Ratio zu Versuchsbeginn, zum Zeitpunkt vor der Reaktion auslösenden GnRH-Zugabe und und beim Maximum der GnRH-Reaktion in Bezug gesetzt zu der GnRH-Konzentration, die die Reaktion ausgelöst hat. Es wurde überprüft, ob eine klassische Dosis-Wirkungs-Beziehung vorliegt.



**Abb. 3.6: Korrelation von relativer Ratio-Zunahme durch GnRH in Abhängigkeit von der, die Reaktion auslösenden GnRH-Schwellenkonzentration an 15 GnRH-R-RNA-injizierten Oozyten (2,7ng/Oozyte).**

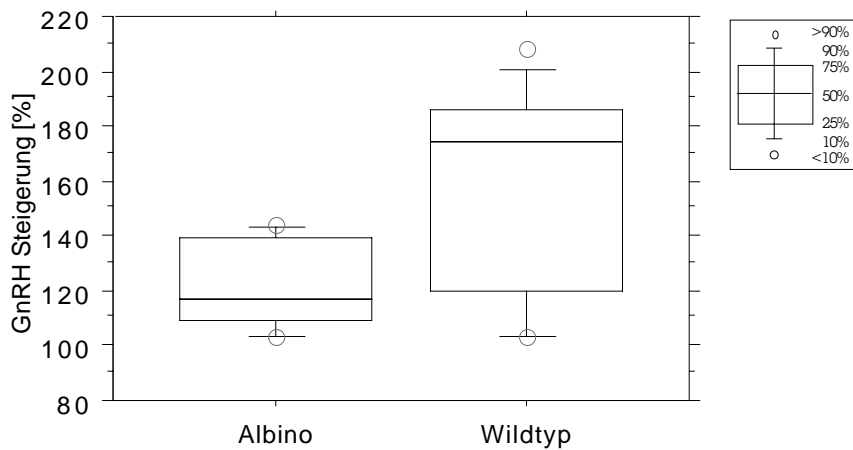
Die relative Stärke des Signals an den WT-Oozyten ist kaum Abhängig von der zugegebenen GnRH-Konzentration. Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung läßt sich nicht nachweisen.

Bei den Untersuchungen kann allerdings nicht von jeweils gleicher Rezeptoren-Konzentrationen an den Oozyten ausgegangen werden. Es spielen bei der Expression der Rezeptoren eine Reihe von Faktoren z.B. der Injektionsort eine Rolle, so daß nicht immer exakt gleiche Ausgangsbedingungen vorliegen.

Im Vergleich zu den Albino-Oozyten zeigten sich bei den WT-Oozyten relativ stärkere Signale. Da diese erst bei höheren Konzentrationen Reaktionen zeigten, lagen jeweils zur Auslösung des Signals auch höhere GnRH-Konzentrationen vor.

Vielleicht ist auch die Dichte endogener Rezeptoren an Albino-Oozyten verhältnismäßig geringer, sodaß die Expression in diesen „besser“ gelingt.

Da den Untersuchungen jeweils unterschiedliche Konzentrationen zugrunde liegen, geht ein Erklärungsversuch dieser ergänzenden Beobachtung über die bezüglich der Fragestellung des Experiments ableitbaren Ergebnisse hinaus.



**Abb. 3.7: Vergleich der Ratio-Steigerung durch GnRH an Albino- und WT-Oozyten.**

### 3.2.2 Änderungen der injizierten GnRH-R-RNA-Menge

Die injizierte Menge von GnRH-R-RNA wurde an einer Reihe von Oozyten variiert. Es wurde untersucht, inwieweit bei geringeren RNA-Mengen sich noch Reaktionen auf GnRH auslösen lassen und ob die Stärke des Signals dadurch verändert wird. Die zugegebene GnRH-Konzentration wurde jeweils bei [200nM] gleich belassen.

Das Reaktionsmuster von 110 GnRH-R-RNA injizierten und 13 H<sub>2</sub>O injizierten Oozyten ist aus folgender Tabelle ersichtlich:

**Tab. 3.8: Reaktionen auf GnRH [200nM-400nM] an 110 Oozyten, in welche GnRH-R-RNA verschiedener Konzentrationen injiziert wurde am 1. bis 4.Tag nach Injektion.**

verd. Fakt.	RNA [ng]	1d		2d		3d		4d		verd. Fakt.	RNA [ng]
		Rkt.	%	Rkt.	%	Rkt.	%	Rkt.	%		
1	27	0/2	(0%)	1/6	(17%)					1	27
10	2,7	0/1	(0%)	5/7	(71%)	3/3	(100%)	6/6	(100%)	10	2,7
20	1,35	0/1	(0%)	7/8	(88%)	6/6	(100%)			20	1,35
25	1,08			1/4	(25%)					25	1,08
30	0,90	0/1	(0%)	0/3	(0%)	6/6	(100%)	2/6	(33%)	30	0,90
40	0,68	0/1	(0%)	2/3	(67%)	3/3	(100%)	3/3	(100%)	40	0,68
50	0,54	0/1	(0%)	2/7	(29%)	6/6	(100%)	0/4	(0%)	50	0,54
60	0,45	0/1	(0%)	1/1	(100%)	2/3	(67%)	3/3	(100%)	60	0,45
80	0,34			0/1	(0%)	0/3	(0%)	2/2	(100%)	80	0,34
100	0,27			0/1	(0%)	0/1	(0%)	2/3	(67%)	100	0,27
120	0,23							4/5	(80%)	120	0,23
160	0,17							1/3	(33%)	160	0,17
200	0,14							1/3	(33%)	200	0,14
<b>Wasser 0</b>				0/2	(0%)	0/6	(0%)	0/5	(0%)	<b>Wasser 0</b>	

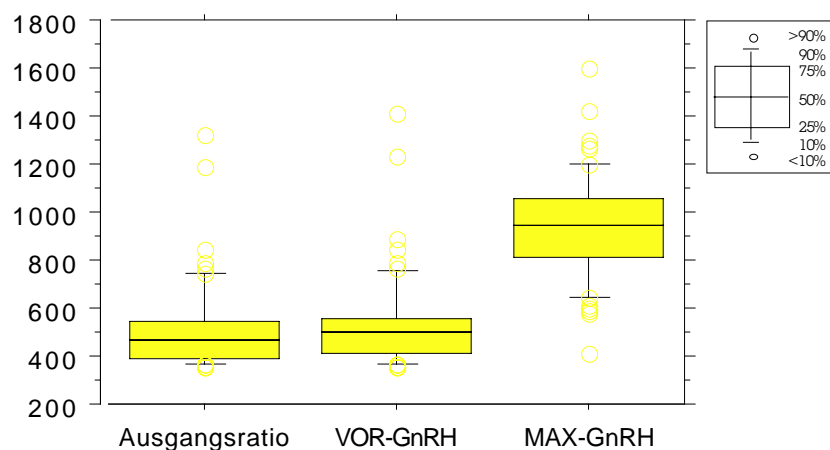


Dabei zeigt sich, daß am ersten Tag nach der RNA-Injektion noch keine Reaktionen auslösbar sind.

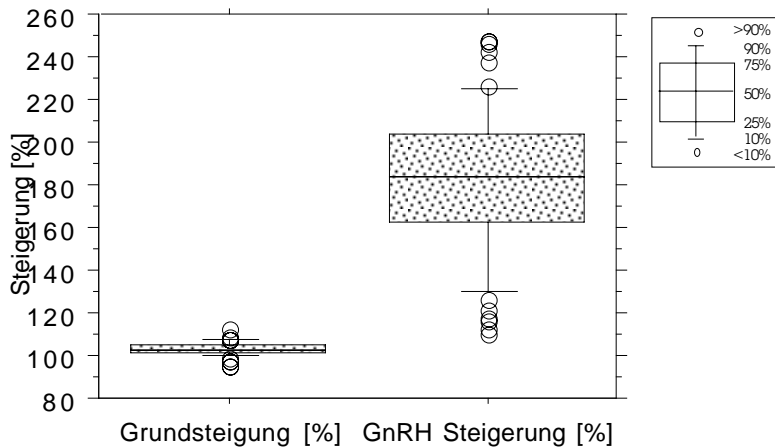
Insbesondere bei niedrigen injizierten RNA-Mengen nimmt die Reaktionsbereitschaft über 4 Tage hin zu. Auch Mengen unter 0,5ng injizierte GnRH-R-RNA reichten aus, um die Expression des GnRH-Rezeptors am zweiten Tag nach Injektion funktionell nachweisen zu können. Für den funktionellen Nachweis der Expression des GnRH-Rezeptors vier Tage nach RNA-Injektion reichen Mengen von nur 0,14ng injizierter GnRH-R-RNA aus.

In der Auswertung von 57 dieser auf 200nM GnRH reagierenden Oozyten (Die 11 Oozyten, die erst bei 400nM GnRH reagierten wurden nicht berücksichtigt) zeigte sich, daß die Steigerung der Ratio (und damit der Calciumkonzentration) durch GnRH nicht mit der Menge der zuvor injizierten GnRH-R-RNA korreliert.

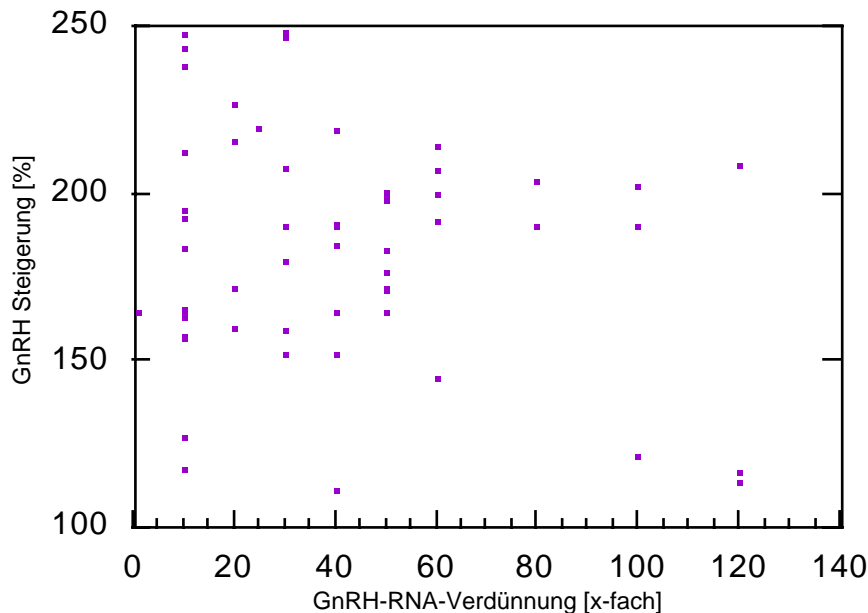
Die Reaktionen scheinen nach dem „Alles oder Nichts-Prinzip“ abzulaufen.



**Abb. 3.8α: Ratio der 57 auf GnRH reagierenden Oozyten in welche GnRH-R-RNA verschiedener Konzentrationen injiziert wurde, zu den Zeitpunkten: (1) Versuchsbeginn, (2) nach Kontrollpufferzugabe, unmittelbar vor GnRH-Zugabe und (3) nach GnRH-Zugabe.**



**Abb. 3.8b: Die an den 57 Oozyten errechnete prozentuale Zunahme der Ratio durch Puffer- bzw. GnRH-Zugabe.**



**Abb. 3.8c: Die Höhe der Ratio-Steigerung durch GnRH [200nM] an 57 Oozyten in Abhängigkeit vom Verdünnungsfaktor der injizierten RNA (Siehe Tab. 3.9).**

Die Prozentuale Steigerung der Ratio durch GnRH korreliert nicht mit der zuvor zugegebenen RNA-Menge im Bereich 0,23ng-27,0ng injizierter GnRH-R-RNA.

Unterhalb dieses Bereichs waren die Reaktionen nicht mehr zuverlässig auslösbar.

Insbesondere nach 4-tägiger Inkubationszeit ist nicht sicher davon auszugehen, daß die Rezeptordichte an der Oozytenoberfläche mit der injizierten RNA-Menge korreliert.

Die Reaktionen laufen eher nach dem „Alles-oder-Nichts“-Prinzip ab. Es läßt sich vermuten, daß ein Signal sich ab einer gewissen Größe selbst verstärkt.

### 3.2.3 Beimengungen von GnRH-R-RNA zu anderer RNA

Es wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die Intaktheit des Expressionsapparates der Oozyten nachzuweisen, in welche RNA aus Zellen injiziert wurde, an denen schnelle Calciumeffekte auf Steroide beschrieben sind.

Da auf ALDO- bzw. PROG-Applikation keine  $Ca^{2+}$ -Signale an Oozyten nachweisbar waren, in welche RNA aus glatten Gefäßmuskelzellen bzw. aus Mäusehodentestis injiziert wurde, sollte gezeigt werden, daß die Oozyten durchaus in der Lage waren, Rezeptoren zu exprimieren und auf deren Stimulierung mit einem Calciumsignal zu reagieren. Es wurde in jeweils vier Oozyten daher ein RNA-Gemisch aus VSMC-RNA bzw. mouse testis RNA und GnRH-R-RNA injiziert. Die beigefügte GnRH-R-RNA eröffnete die Möglichkeit im *Calcium Imaging* die Intaktheit der Oozyten durch ein Calciumsignal auf GnRH nachzuweisen, wenn zuvor kein Signal auf ALDO bzw. PROG erhalten wurde. Über ein GnRH-Signal konnte man folglich den Nachweis für eine erfolgreiche Expression zu erhalten.

Lediglich eine von 4 Oozyten reagierte auf GnRH, in welche zu der injizierten Menge von 37ng mRNA aus VSMC zusätzlich 10 ng GnRH-R-RNA injiziert wurde. Keine dieser vier Oozyten reagierte auf ALDO, Angiotensin II oder Thrombin.

Von vier Oozyten, in welche jeweils 75ng mouse testis total RNA und 10 ng GnRH-R-RNA injiziert wurde, reagierte 2d nach Injektion lediglich eine auf GnRH.

Die Tabelle verdeutlicht die Ergebnisse nochmals:

**Tab. 3.9: Reaktionen auf nacheinander appliziertes ALDO, Thrombin, Angiotensin II, GnRH und LPA, bzw. PROG, GnRH und LPA an 8 Oozyten, in welche 2d zuvor ein RNA Gemisch aus VSMC-RNA bzw. mouse Testis RNA und GnRH-R-RNA injiziert wurde.**

Reaktionen auf	Injiziertes RNA-Gemisch [pro Oozyte]	
	35ng VSMC-mRNA +10ng GnRH-R-RNA	75ng mouse testis total RNA +10ng GnRH-R-RNA
ALDO [10nM]	0 / 4	
PROG [1µM]		0 / 4
Thrombin [200U/l]	0 / 4	
Angiotensin II [200nM]	0 / 4	
GnRH [200nM]	1 / 4	2 / 4
LPA [1µM] bei nicht zuvor reagierenden	3 / 3	2 / 2

Es sollte dabei ebenso festgestellt werden, ob ab einer bestimmten injizierten RNA-Konzentration die Expression des GnRH-Rezeptors gehemmt wird.

Bei 23 untersuchten Oozyten wurde die jeweils injizierte GnRH-R-RNA konstant bei 2,7ng/Oozyte belassen und zusätzlich total RNA von VSMC in verschiedenen Konzentrationen injiziert. Es sollte überprüft werden, ob - und ab welcher Konzentration, die zusätzliche VSMC-RNA die Expression des GnRH-Rezeptors behindert oder hemmt.

Jeweils am 3d nach Injektion des RNA-Gemisches wurden 22 Oozyten eines Wildtyp-Weibchens auf GnRH-Signale untersucht.

**Tab. 3.10: Reaktionen auf GnRH [200nM] an Oozyten, in welche ein Gemisch von konstanter GnRH-R-RNA-Menge und variierender Menge von VSMC-RNA injiziert wurde.**

GnRH-R-RNA [ng / Oozyte]	VSMC-total RNA [ng / Oozyte]	Reaktionen auf GnRH am 3d
2,7	2,5	3 / 3
2,7	10	3 / 3
2,7	25	4 / 6
2,7	50	6 / 6
2,7	125	0 / 4
0	50	0 / 2

Es zeigte sich, daß bei höheren Fremd-RNA-Konzentrationen die Zuverlässigkeit des GnRH-Signals vermindert war; bei der Injektion von 125ng VSMC-total RNA zusätzlich zu 2,7ng GnRH-R-RNA ließen sich keine Reaktionen auf GnRH nachweisen.

### **3.2.4 Funktionelle Expression des GnRH-Rezeptors durch einen eukaryontischen Expressionsvektor**

Es sollte überprüft werden, ob sich der GnRH-R auch durch Injektion von cDNA eines eukaryontischen Expressionsvektors erfolgreich exprimieren läßt.

Dazu wurde DNA, welche für den GnRH-R codiert, in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3 integriert.

Diese GnRH-R-pcDNA3 wurde nach der von Guddat und Pieler (1991) beschriebenen Methode in verschiedenen Mengen von 5pg bis 100pg pro Oozyte in den Zellkern der Wildtyp-Oozyten injiziert.

2 Tage nach Injektion wurden die Oozyten mit dem *Calcium Imaging System* untersucht, ob die Oozyten auf GnRH reagieren.

War dabei kein Calciumsignal sichtbar, wurde überprüft, ob die Oozyten auf LPA-

Zugabe reagieren. Zeigte auch LPA keine Reaktion, wie es bei 2 Oozyten der Fall war, wurde davon ausgegangen, daß die generelle Reaktionsfähigkeit der Oozyte durch die Kerninjektion zu stark litt, und die Oozyten nicht adäquat reagieren konnten. Diese 2 Oozyten wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Folgende Tabelle zeigt das Reaktionsmuster der Oozyten.

**Tab. 3.11: Reaktionen auf GnRH [200nM] in Abhängigkeit von der injizierten Menge eines, für den GnRH-R codierenden eukaryontischen Expressionsvektors.**

In den Kern injizierte cDNA [pg / Oozyte]	Reaktionen auf GnRH am 2d.	gemessene Zuverlässigkeit [%]
100	0 / 4	0
50	3 / 5	60
25	1 / 4	25
5	2 / 3	67
<b>gesamt:</b>	6 / 16	38

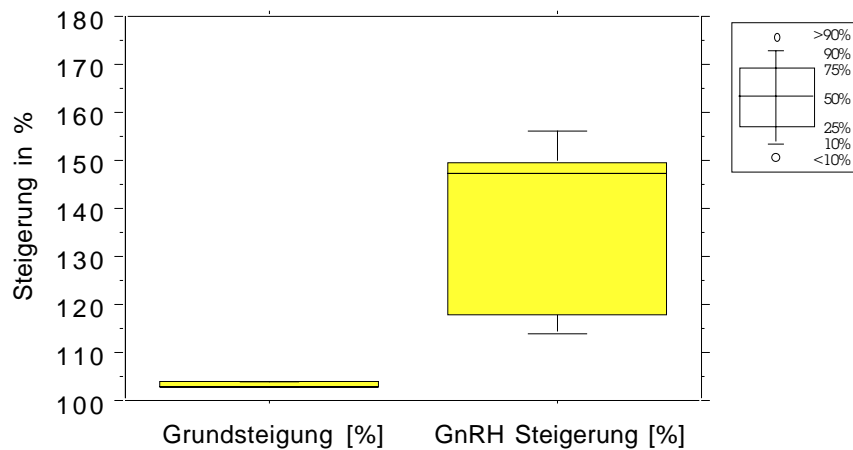
  

In das Cytosol injizierte cDNA [pg / Oozyte]	Reaktionen auf GnRH am 2d.	gemessene Zuverlässigkeit [%]
1000	0 / 2	0

Im Vergleich zur Injektion von *in-vitro* transkribierter RNA, die für den GnRH-R codiert, weist die Verwendung eines eukaryontischen Expressionsvektors eine etwas geringere Transkriptionseffizienz auf.

Die hier injizierte geringste Menge von 5pg pro Oozyte zeigte dabei die höchste Effizienz: 2 von 3 Oozyten reagierten mit einem Calciumsignal auf GnRH-Applikation von 200nM.

Die Veränderung der Ratio bei fünf dieser GnRH-Signale wurde in einem Diagramm aufgezeigt und mit der Grundsteigerung (Ratiosteigerung bis zur GnRH-Applikation) verglichen. Im Vergleich zu Oozyten, die nach Injektion von *in vitro*-transkribierter GnRH-R-RNA reagierten (vgl. Abb. 3.11) fallen die Signale etwas geringer aus.



**Abb 3.9 Prozentuale Steigerung der Ratio auf GnRH [200nM] an 5 Oozyten, in welche ein eukaryontischer Expressionsvektor, der für den GnRH-R codiert, in den Kern injiziert wurde, im Vergleich zur Grundsteigerung.**

### 3.2.5 Interaktion von GnRH und LPA-Reaktionen

Zu 17 Albino- und 67 Wildtyp-Oozyten, die den GnRH-R exprimieren und ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal auf GnRH zeigten, wurde anschließend LPA appliziert, um zu überprüfen, ob sich die Oozyte durch LPA erneut stimulieren läßt.

Bei den 17 GnRH-R-RNA injizierten Albino-Oozyten ließ sich in den folgenden Minuten nach GnRH-Reaktion kein weiteres Calciumsignal durch LPA auslösen.

Bei den Wildtyp-Oozyten gab es nur vereinzelt Erhöhungen der intrazellulären Calciumkonzentration auf LPA [200nM] nach einem Calciumsignal auf GnRH. Signale an 3 Oozyten waren z.B. 18 (2x) und 25 Minuten nach dem GnRH-Signal auslösbar.

In drei Fällen waren die LPA-Signale schon nach kürzerer Zeit auslösbar: 5,5min, 8min und 13min. In diesen Fällen waren die zuvor erhaltenen GnRH-Signale allerdings deutlich abgeschwächt.

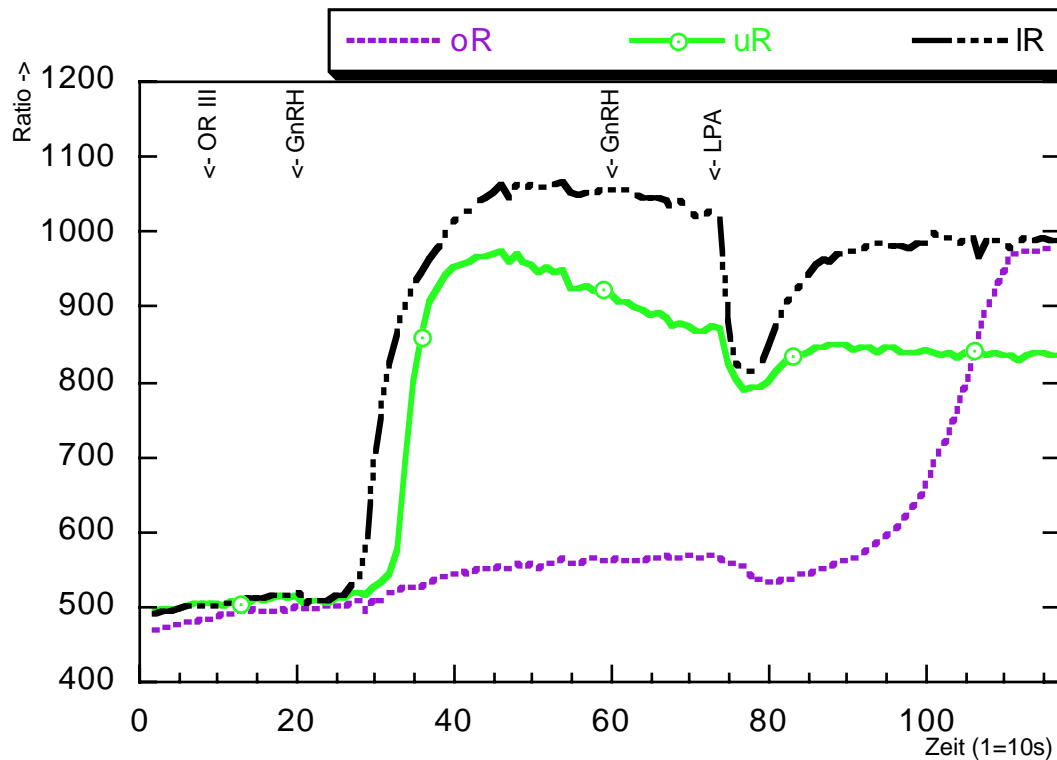
Diese relativ schnelle Unterbrechung der Desensibilisierung war nicht von der injizierten RNA-Menge abhängig, sondern von der Stärke des durch GnRH ausgelösten Signals, bei dem die injizierte RNA-Menge nur eine untergeordnete Rolle spielt. Diejenigen GnRH-R-RNA injizierten Oozyten, die kein Signal auf GnRH zeigten, ließen sich fast allesamt durch LPA stimulieren.

Es bleibt festzuhalten, daß der überwiegende Teil der Oozyten innerhalb von mindestens 15 Minuten nach erfolgreicher, reaktionsauslösender Applikation von GnRH weder auf wiederholtes GnRH, noch auf LPA, erneut Signale zeigen kann.

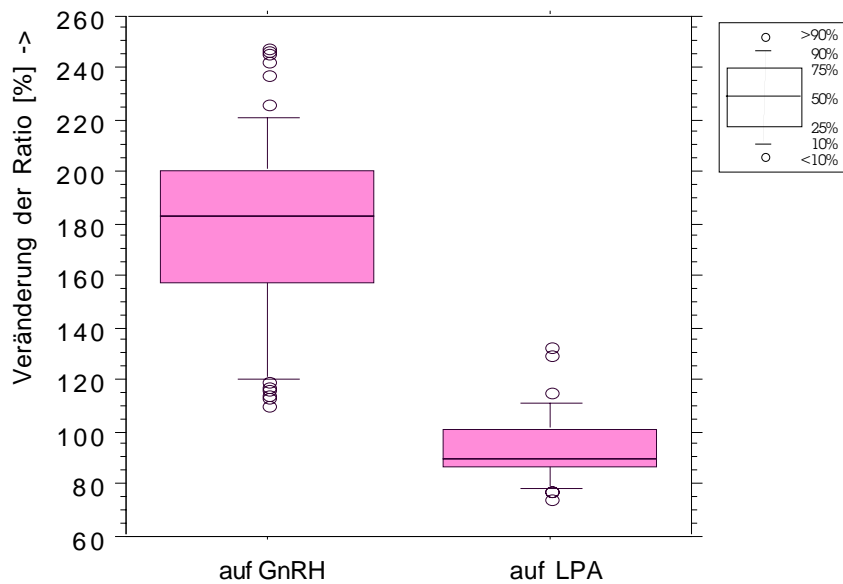
Die Injektion des eukaryontischen Expressionsvektors der die Sequenz für den GnRH-Rezeptor trägt in den Zellkern brachte ein ähnliches Ergebnis bezüglich der Desensibilisierung: Keine von 5 Oozyten, die auf GnRH reagierten, zeigten im Anschluß

Reaktionen auf zugegebenes LPA.

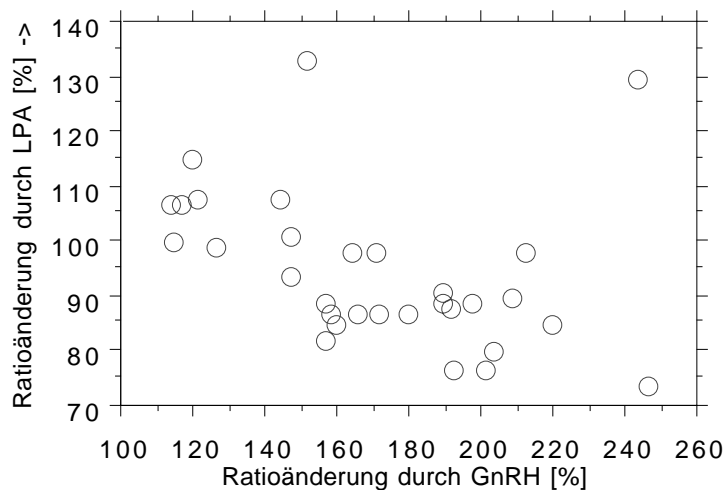
Im Gegenteil dazu ist an sehr vielen Oozyten, die ein Signal auf GnRH zeigten eine schnelle gewissermaßen gegenregulatorische Erniedrigung der intrazellulären Calciumkonzentration auf anschließend appliziertes LPA sichtbar. Exemplarisch ist das in Abb. 3.11 zu sehen.



**Abb. 3.10: Exemplarische Darstellung der gegenregulatorischen Erniedrigung der Calciumkonzentration auf LPA-Zugabe [ $1\mu\text{M}$ ] nach einem GnRH-Signal an zwei GnRH-R-RNA injizierten Oozyten (uR und IR) in einem repräsentativen Experiment. Die dritte Oozyte (oR) reagierte nicht auf zweimalige GnRH-Zugabe [ $200\text{nM}$ ], aber auf LPA.**



**Abb. 3.11: Vergleich der Ratio-Änderungen auf GnRH und anschließendes LPA an 31 Oozyten. Es wurden jeweils die Ratio-Werte unmittelbar vor Applikation mit den Ratio-Werten des Reaktionsmaximums verglichen.**



**Abb. 3.12: Abhängigkeit der Ratioänderungen auf LPA von der Stärke des zuvor auf GnRH erhaltenen Signals in einem Streudiagramm. (31 Oozyten).**

Je stärker das Signal auf GnRH war, umso eher fällt  $[Ca^{2+}]_i$  auf LPA-Applikation ab. Das LPA-Signal fällt umso geringer aus, je größer die Ratioänderungen auf GnRH waren. Eine generelle Abhängigkeit ist zu erkennen.



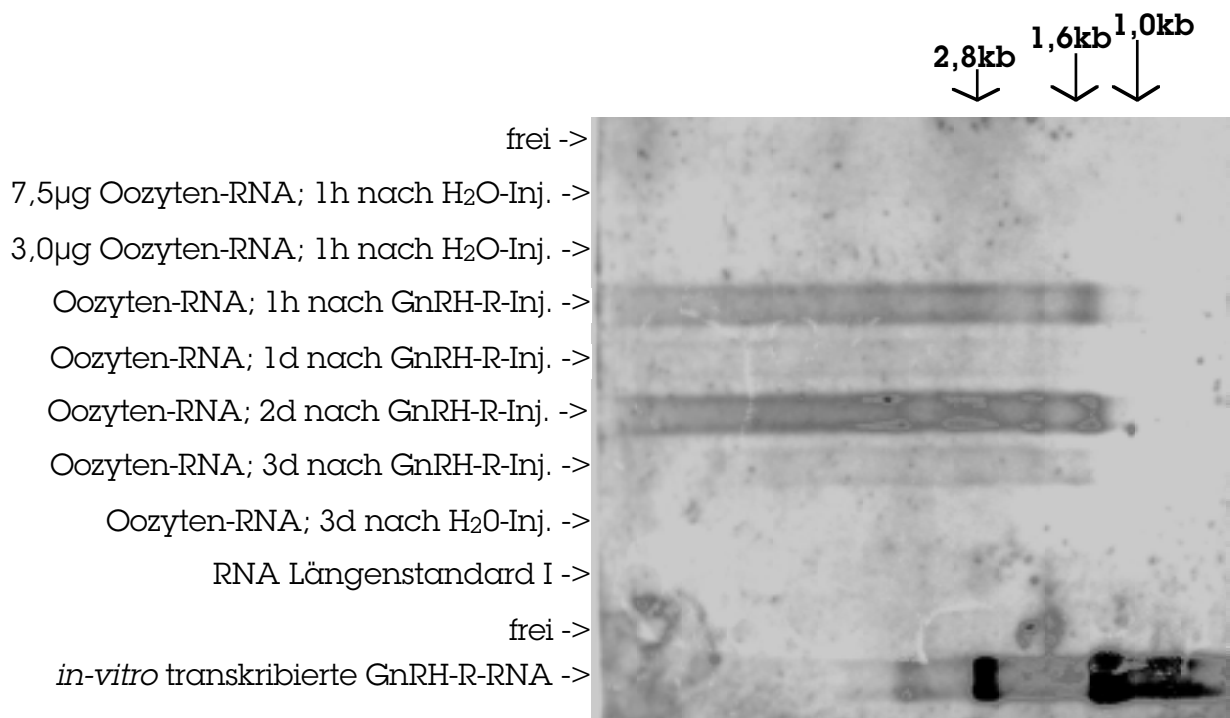
### 3.2.6 Untersuchung der Stabilität der injizierten GnRH-R-RNA in den Oozyten

Mit Hilfe der Methode des Northern Blot wurde die Stabilität der injizierten *in-vitro* transkribierten RNA in den Oozyten im Verlauf der ersten Stunde und über mehrere Tage überprüft.

Hierzu wurden 16 unbehandelte Oozyten in flüssigem Stickstoff schockefroren und bei -80°C gelagert, sowie jeweils 16 Oozyten, in welche GnRH-R-RNA injiziert wurde, zum Zeitpunkt 15 und 45 Minuten, sowie 1, 2 und 3 Tage nach der RNA-Injektion.

Die total RNA aus den jeweiligen Oozyten wurde isoliert und nebeneinander in einem Elektrolyt-Gel getrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und daraufhin die GnRH-R-RNA mit einer spezifischen DIG-markierten Sonde sichtbar gemacht.

Bis auf die Probe der unbehandelten Oozyten, ließen sich typische Banden bei 1,2kb nachweisen. An allen GnRH-injizierten Oozyten ließen sich Banden im Bereich 1,2kb sehen. Auch in größeren Mengen von RNA aus H<sub>2</sub>O-injizierten Oozyten war keine für den GnRH-R codierende RNA markierbar.



**Abb. 3.13: Stabilität injizierter GnRH-R-RNA in Oozyten über drei Tage. (Northern Blot)**

Dabei zeigte sich, daß die GnRH-R-RNA nicht in den unbehandelten, aber aus allen injizierten Oozyten isolieren und nachweisen ließ und über mindestens drei Tage stabil blieb.

### 3.3 Anwendung auf schnelle Steroideffekte an RNA-injizierten Oozyten

#### 3.3.1 Aldosteron

An glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) lassen sich schnelle Steroideffekte auf Aldosteron (ALDO) nachweisen (Wehling et al., 1994; Christ und Wehling, 1999). So zeigen glatte Gefäßmuskelzellen bereits 30 Sekunden nach Aldosteronapplikation eine intrazelluläre Calciumerhöhung, die sich nicht über eine Reaktion des klassischen Rezeptors erklären läßt. Die Existenz eines membranständigen Rezeptors wird angenommen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob diese schnelle intrazelluläre Calciumerhöhung auch an *X. laevis* Oozyten nachweisbar wird, wenn in diese zuvor aus VSMC isolierte total RNA oder mRNA injiziert wurde.

Dabei wurde überprüft, ob sich eine Expression des Rezeptors funktionell nachweisen läßt, und ob sich der in VSMC eventuell vorhandene membranständige ALDO-Rezeptor in Oozyten von *Xenopus laevis* funktionell exprimieren läßt. Dies sollte durch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration auf ALDO gezeigt werden.

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß die für den membranständigen Aldosteronrezeptor codierende mRNA durch die Präparation der mRNA zerstört wird, wurden neben der mRNA auch total RNA in die Oozyten injiziert.

Es wurden eine Reihe von Wildtyp-Oozyten untersucht, in welche einige Tage zuvor RNA verschiedener Gewebe injiziert wurde.

Die Ergebnisse werden in folgender Tabelle zusammengestellt:

**Tab. 3.12: Reaktionen auf Aldosteron [10nM] an 48 Oozyten in welche RNA verschiedener Gewebe injiziert wurde und an 8 unbehandelten Oozyten.**

Reaktionen	Injizierte RNA
0 / 8	Keine („Negativ-Kontrolle“)
0 / 12	VSMC mRNA
0 / 22	VSMC total RNA (mehrere Präparationen)
0 / 7	pig liver mRNA
0 / 2	pig liver total RNA
0 / 5	humane Lymphozyten total RNA

Eine Expression des membranständigen Aldosteronrezeptors in den hier untersuchten Oozyten ließ sich nicht nachweisen: keine der Oozyten zeigte ein Calciumsignal auf ALDO [10nM].

Die Funktionalität der Meßapparatur wurde anschließend jeweils durch den Erhalt eines Calciumsignals auf LPA bestätigt.

### 3.3.2 Expression des membranständigen Progesteron-bindenden Proteins (mPR)

Auf der Suche nach dem ersten Steroid Membranrezeptor wurde ein membranständiges Progesteron-bindendes Protein (mPR) charakterisiert und geklont (Meyer et al., 1996; Falkenstein et al., 1996). Unmarkiertes Progesteron verdrängt radioaktiv markiertes Progesteron bei einer Konzentration von 0,5µM halbmaximal aus seiner Bindung an diesem 28 und 56kDa schweren Protein.

Obwohl man davon ausgeht, daß der gesamte membranständige PROG-Rezeptor-Komplex, der dieses Protein enthält, insgesamt etwa 200kDa schwer ist, wurde überprüft, ob sich durch Expression dieses mPR in Oozyten von *Xenopus laevis* schnelle Calciumerhöhungen auf PROG mit Hilfe des *Calcium Imagings* messen lassen.

Dazu wurde *in vitro* transkribierte RNA, die für mPR codiert (mPR-RNA) in 22 Wildtyp- und 3 Albino-Oozyten injiziert und nach 3-4 Tagen die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration während PROG-Applikation beobachtet.

Als Negativkontrolle wurde in 17 Oozyten die antisense Sequenz dieser RNA injiziert.

**Tab. 3.13: Reaktionen auf Progesteron an 25 Oozyten in welche mPR-RNA injiziert wurde und an 17 Kontroll-Oozyten**

Reaktionen auf Progesteron	injizierte RNA	Oozytentyp
0/22	mPR-RNA	Wildtyp
0/3	mPR-RNA	Albino
0/11	antisense RNA	Wildtyp
0/6	antisense RNA	Albino

Alle Oozyten haben auf anschließende Zugabe von LPA [1µM] mit einem Ca<sup>2+</sup>-Signal reagiert.

Eine intrazelluläre Calciumerhöhung auf PROG ließ sich auch an den 25 mit *in vitro* transkribierter mPR-RNA injizierten Oozyten nicht nachweisen.

Blackmore und Lattanzio (1991) beschreiben als Wirkung von Progesteron einen schnellen Einstrom von Calcium in den Kopf menschlicher Spermien und eine daraus resultierende Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> und vermuten die Existenz eines nicht-genomischen Rezeptors in der Zellmembran.

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit, sollte überprüft werden, ob sich durch Injektion von aus Hoden gewonnener mRNA in die Oozyten, die für die Reaktion auf

PROG notwendigen Rezeptoren und Proteine funktionell in den Oozyten exprimieren lassen, da unbehandelte Oozyten mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden keine sichtbaren Calciumsignale auf PROG zeigten.

Drei bis vier Tage nach Injektion von 37,5ng mouse testis mRNA wurde mit der Methode des *Calcium Imagings* die Calciumkonzentration auf Progesteronapplikation an 17 Albino-Oozyten untersucht. An keiner dieser Oozyten konnten Calciumsignale festgestellt werden.

Darüberhinaus wurde mRNA aus Schweineleber in die Oozyten injiziert. Aus diesem Gewebe wurden das mRP isoliert und charakterisiert.

Auch durch Injektionen von gesamt-RNA und mRNA aus glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) konnte keine schnellen Progesteroneffekte auf die intrazelluläre Calciumkonzentration der Oozyten gefunden werden.

Die Ergebnisse werden in folgender Tabelle nocheinmal zusammengefaßt.

**Tab. 3.14: Reaktionen auf Progesteron [3µM] an Oozyten, die verschiedene RNA exprimieren.**

Reaktionen auf PROG	Injizierte RNA	Oozytentyp
0/17	Mouse Testis mRNA	Albino
0/6	Schweineleber mRNA	Wildtyp
0/2	VSMC mRNA	Wildtyp
0/9	VSMC total RNA	Wildtyp

Obwohl nicht-genomische Steroideffekte für alle Gruppen von Steroidhormonen aufgezeigt und charakterisiert sind, ist es bis jetzt noch nicht gelungen, den Vertreter eines membranständigen Steroidrezeptors funktionell nachzuweisen. Auch durch die hier verwendeten Methoden, der Kombination von Expression und Calciummessung an *Xenopus*-Oozyten, ließen sich schnelle Steroideffekte anderer Gewebe molekularbiologisch nicht auf die Oozyten übertragen.

Die von Wasserman et al. (1980) beobachtete Calciumerhöhung auf PROG an Albino-Oozyten konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

### **3.4. Calciummessungen an weiteren exprimierten, exogenen Rezeptoren**

#### **3.4.1 Thrombin**

Das Enzym Thrombin ist ein starker Stimulus für glatte Gefäßmuskelzellen. Physiologisch wandelt es in kurzer Zeit große Mengen Fibrinogen in Fibrin um und ist daher maßgeblich an der Blutgerinnung beteiligt. Sowohl die extravaskuläre, als

auch die Kaskade des intravaskulären Systems führen zur Bildung von Thrombin aus seiner im Blutplasma zirkulierenden, in der Leber gebildeten Vorstufe, dem Prothrombin (Faktor II). An glatten Gefäßmuskelzellen löst es über die Wechselwirkung mit einem spezifischen, für mehrere Spezies bereits klonierten G-Protein gekoppelten Rezeptor starke intrazelluläre Calciumerhöhungen aus.

Es sollte überprüft werden, ob Oozyten von *Xenopus laevis* diese Calciumerhöhung auf Thrombin ebenfalls zeigen und einen endogenen Rezeptor für Thrombin besitzen, oder ob diese Signale nach Injektion und Expression von RNA, die den Thrombin-Rezeptor enthält (z.B. RNA von VSMC) auslösbar sind.

Die zu injizierte VSMC-RNA wurde parallel zu den nachfolgend erwähnten Calciummessungen, mit Hilfe der Technik des „Northern blots“ und einer für den Thrombinrezeptor spezifischen DIG-markierten Sonde auf das Vorhandensein der für den Thrombinrezeptor codierenden Basensequenz im injizierten RNA-Gemisch hin untersucht. Dabei zeigte die VSMC-RNA bei den erwarteten 1,0kb eine Bande. Daraus läßt sich schließen, daß die RNA, die für den Thrombinrezeptor codiert in der injizierten RNA vorhanden ist und die injizierte RNA insgesamt unversehrt ist, da die Sequenzen noch in voller Länge vorhanden sind und damit Zeichen eines Abbaus nicht erkennbar sind.

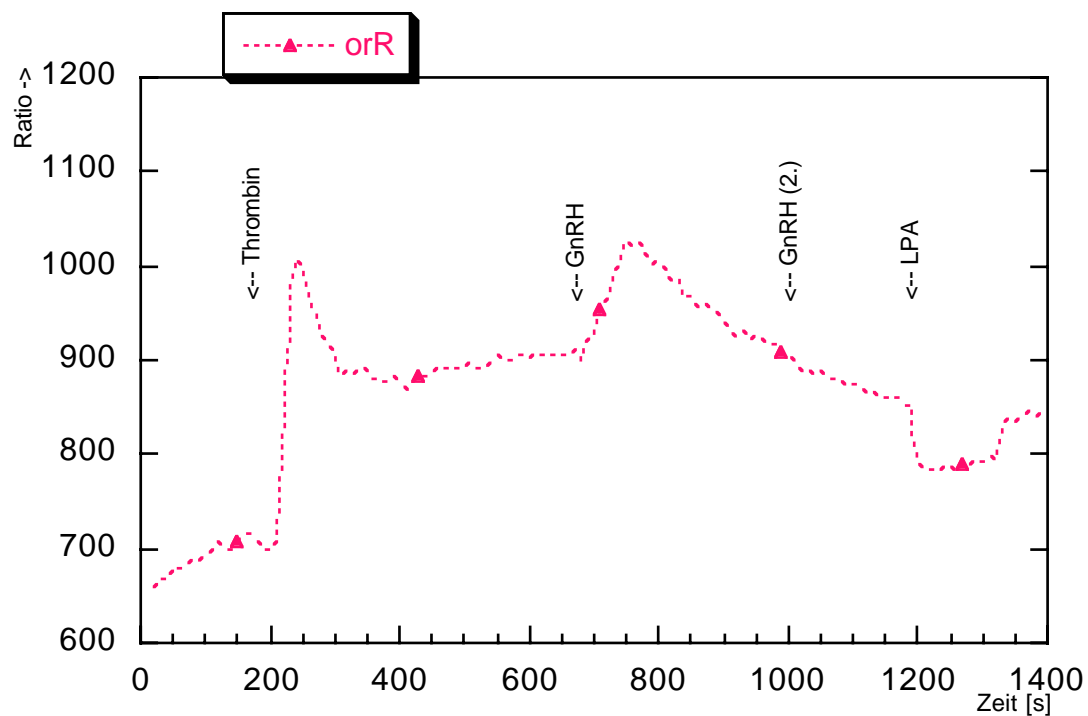
Mit dem *Calcium Imaging* wurde die intrazelluläre Calciumkonzentration an 76 Oozyten im Verlauf und nach Thrombinapplikation untersucht. In 44 Oozyten davon wurde einige Tage zuvor VSMC-RNA und in 12 andere RNA injiziert, 20 Oozyten erhielten keine RNA-Injektionen.

Folgende Tabelle stellt die Reaktionen auf Thrombin nach Oozytentyp und injizierter RNA aufgeschlüsselt dar:

**Tab. 3.15: Reaktionen auf Thrombin [10U/ml]**

Injizierte RNA	Wildtyp-Oozyten	Albino-Oozyten
∅	0 / 12	0 / 8
total RNA von VSMC	0 / 16	<b>3</b> / 17
mRNA von VSMC	0 / 11	
Protein 6.1-antisense RNA		0 / 6
GnRH-R-RNA		<b>3</b> / 3
mouse testis mRNA		0 / 3

Der Verlauf der Ratio einer auf Thrombin reagierenden GnRH-R-RNA-injizierten Oozyte wird exemplarisch gezeigt:



**Abb. 3.14: Reaktion auf Thrombin [10U/ml] und anschließendes GnRH [200nM] an einer GnRH-R-RNA-injizierten Albino-Oozyte. Keine Reaktion auf erneutes GnRH [200nM] und LPA [1µM].**

Zu sehen ist eine deutliche Ratio-Zunahme und damit ein Ansteigen der intrazellulären Calciumkonzentration auf Thrombin-Zugabe. Etwa acht Minuten nach Reaktionsauslösung ist die Oozyte bereit auf GnRH [200nM] zu reagieren. Die drei mit RNA aus VSMC injizierten Oozyten zeigten im Anschluß auf das Thrombin-Signal Reaktionen auf LPA [1µM]. Die Oozyten verhielten sich also - anders als Reaktionen auf GnRH - nicht refraktär.

Die sechs reagierenden Oozyten stammten von einem Albino-Weibchen und wurden am 4. Tag nach Entnahme und Kollagenasebehandlung bzw. am 3. Tag nach RNA Injektion untersucht.

### 3.4.2 Angiotensin II

Das Oktapeptid Angiotensin II (AII) wird beim Durchströmen durch die Lungen mit Hilfe von ACE (Angiotensin Converting Enzym) aus seiner Vorstufe, dem Angiotensin I gebildet.

Es ist durch seine vasokonstriktorische Wirkung und seine Beteiligung im Renin - Angiotensin - Aldosteron - System maßgeblich an der Blutdruckregulierung beteiligt. Dabei wirkt AII als stärkster Stimulus für die Aldosteron-Synthese und Ausschüttung aus der Nebennierenrinde.

An glatten Gefäßmuskelzellen läßt sich auf AII eine intrazelluläre Calciumerhöhung nachweisen (z.B. Wehling et al., 1994). Auch Oozyten von *X. laevis* sollen auf AII mit Chloridströmen an der Membran reagieren (Sakuta et al., 1991). Mit Hilfe des *Calcium-Imagings* ließen sich im Rahmen dieser Arbeit an nativen Oozyten nur äußerst selten Calciumerhöhungen durch AII nachweisen. (Siehe 3.1.3).

Es sollte überprüft werden, ob sich durch Injektion von RNA aus VSMC eventuell fehlende Komponenten für eine Signaltransduktion in den von uns verwendeten *X. laevis* Oozyten exprimieren lassen.

Dazu wurden 43 Wildtyp- und 47 Albino-Oozyten mit RNA verschiedener Gewebe, unter anderem VSMC, injiziert. Die intrazelluläre Calciumkonzentration der Oozyten wurden nach zu erwartender Expression im Anschluß auf AII-Applikation beobachtet. An einigen VSMC-RNA-injizierten Oozyten konnten Signale auf AII gemessen werden. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

**Tab. 3.16a: Reaktionen auf AII [200nM] an 90 RNA-injizierten Oozyten:**

Injizierte RNA	Wildtyp-Oozyten	Albino-Oozyten
total RNA von VSMC	10 / 30	3 / 33
mRNA von VSMC	2 / 16	
pig liver total RNA	0 / 2	
pig liver total RNA	0 / 2	
mouse testis mRNA		0 / 3
GnRH-R-RNA	0 / 3	0 / 11

Wie im Abschnitt 3.1.3 (Tab. 3.4) bereits beschrieben, zeigten auch unbehandelte Oozyten Reaktionen auf AII:

**Tab. 3.16b: Reaktionen auf AII [200nM] an 40 unbehandelten Oozyten:**

Injizierte RNA	Wildtyp-Oozyten	Albino-Oozyten
∅	3 / 15	0 / 25

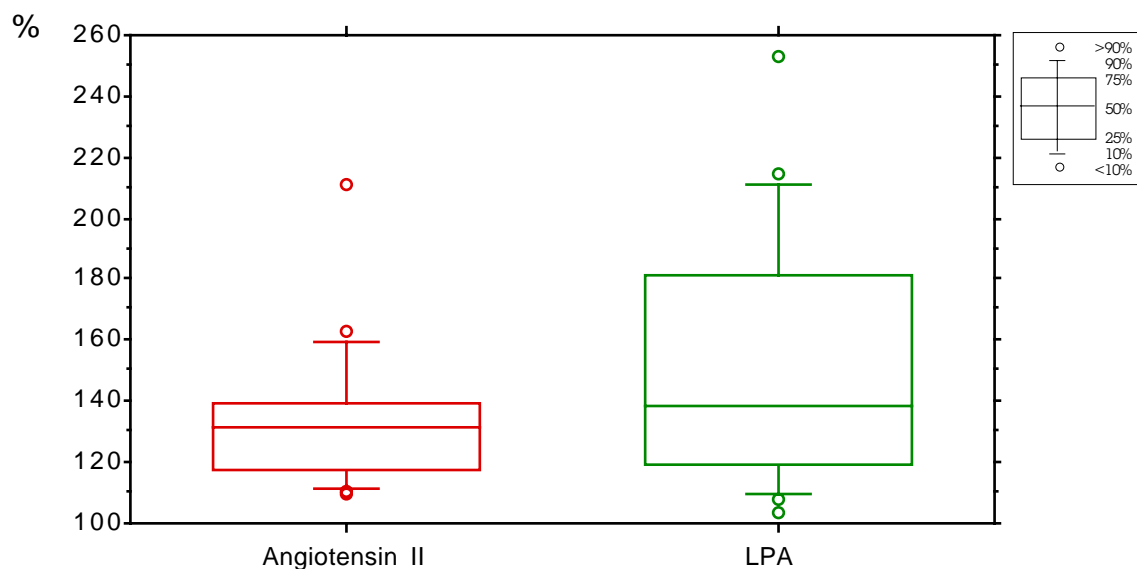
Auch hier ließen sich nach abgelaufener Reaktion auf AII, ähnlich den Thrombinreaktionen, erneute Signale auf LPA ermitteln. In einigen Oozyten konnten

auch zwei aufeinanderfolgende AII-Signale bei nochmaliger AII-Applikation beobachtet werden.

Die Oozyten verhielten sich nicht refraktär bezüglich der erneuten Auslösbarkeit von weiteren Calciumsignalen.

Die relative Veränderung der Ratio durch AII wurde mit der von LPA verglichen. Dabei wurden die Ratio-Werte der jeweils selben Oozyten herangezogen, die sowohl auf AII, als auch auf anschließende LPA-Applikation reagierten.

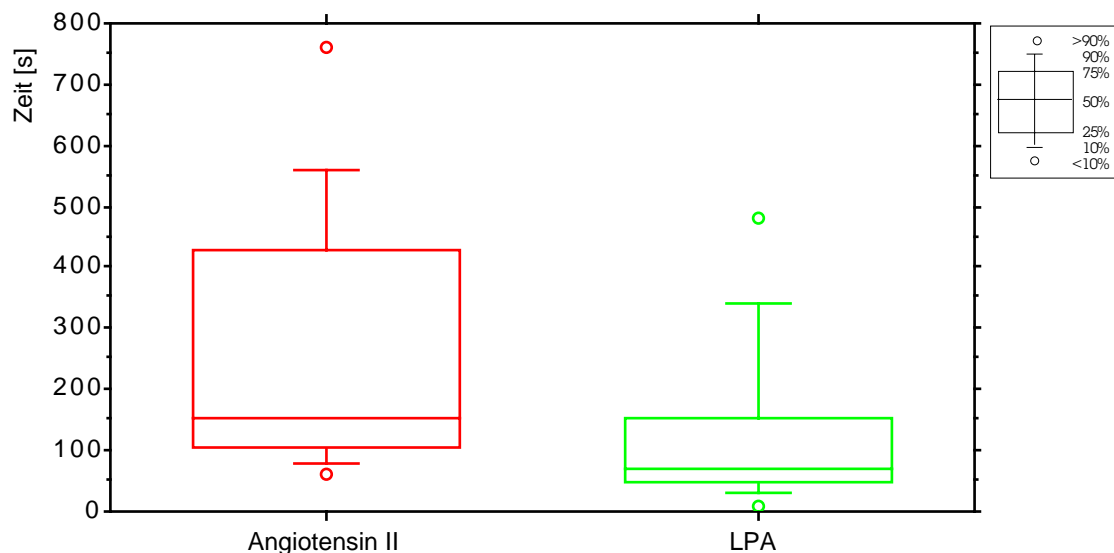
Im folgenden Box-Plot Diagramm sind die relativen Ratio-Steigerungen vor AII-Zugabe (Grundsteigerung), durch AII und durch LPA nebeneinander aufgezeigt.



**Abb. 3.15: Steigerung der Ratio [in %] an 18 Oozyten. 15 dieser Oozyten waren VSMC-RNA injiziert. Es werden die durch AII ausgelösten Reaktionen mit Reaktionen auf LPA verglichen. (Box-Plot 10/25/50/75/90 Percentile). Die meisten Oozyten zeigten deutlich stärkere Reaktionen auf LPA als auf AII.**

Auch wird das Maximum der Reaktion auf LPA durchschnittlich schneller erreicht, folgendes Box-Plot-Diagramm gibt die jeweiligen Zeiten bis zum Erreichen des Reaktionsmaximums wieder. Der Median liegt für AII bei 155s, für LPA bei 70s.





**Abb. 3.16: Unterschiedliche Dauer bis zum Erreichen des Reaktionsmaximums auf AII [200nM] und LPA [1µM].**

Ebenso ist in Abb. 3.2, welche die Ratio einer Oozyte im Verlaufe einer AII und LPA-Reaktion exemplarisch wiedergibt, die Beobachtung deutlich zu sehen, daß das Reaktionsmaximum bei LPA schneller erreicht wird.

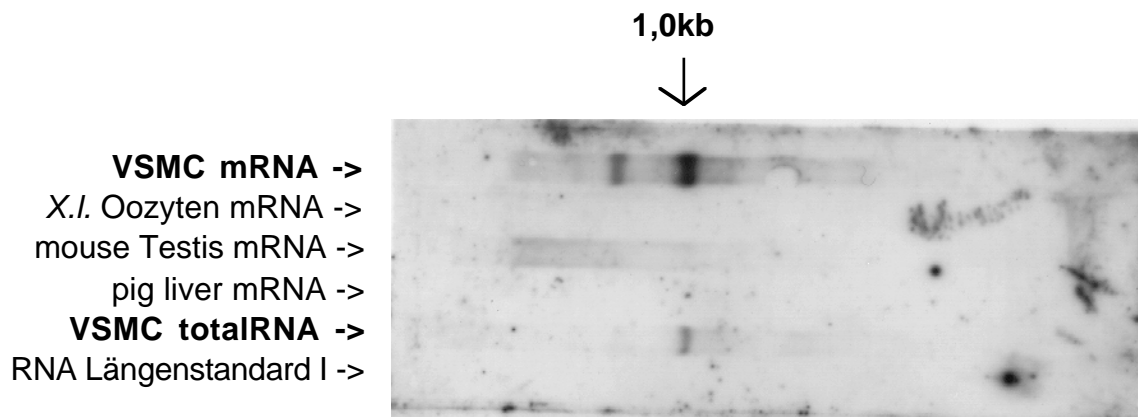
Signale von Angiotensin II und Acetylcholin ließen sich wesentlich seltener beobachten, als nach Literaturangaben zu erwarten gewesen wäre;

LPA hingegen zeigte sich als ein zuverlässiger Stimulus für Calciumsignale.

Die funktionelle Expression des G-Protein-gekoppelten GnRH-Rezeptors und die daran angeschlossenen Untersuchungen zeigten, daß das vorgestellte Meßsystem durch das Sichtbarmachen von Calcium-Signalen in lebenden, reagierenden Zellen, prinzipiell gut zur Untersuchung und Charakterisierung von Membranrezeptoren geeignet ist. Auch durch Verwendung eines eukaryontischen Expressionsvektors ließ sich der Nachweis einer Expression des GnRH-Rezeptors funktionell erbringen.

### **3.5 Untersuchungen der Qualität der injizierten RNA**

Mit Hilfe der Methode des Northern Blot wurde die Qualität der injizierten VSMC-RNA untersucht. Dabei wurde überprüft, ob die für den Thrombin-Rezeptor codierende RNA durch spezifische DIG-markierte Sonden inkakt ist und das erwartete Molekulargewicht aufweist. Andernfalls würde sie durch einen eventuellen Verdau in kleinere Stücke zerfallen sein, die in Bereichen mit niedrigerem Molekulargewicht unscharf darstellen würden.



**Abb. 3.17: Präsenz der für den Thrombin-Rezeptor codierenden RNA in aus VSMC isolierter RNA. (Nachweis durch spezifische DIG-markierte Sonde im Northern Blot).**

Die Banden bei 1,0kb sind jeweils scharf abzugrenzen. Das weist auf eine gute Qualität der injizierten RNA hin.

In den *Xenopus laevis* Oozyten selbst läßt sich keine Transkription bzw. Expression eines Thrombinrezeptors zeigen.

## 4. DISKUSSION

*Xenopus laevis* Oozyten haben sich durch die Möglichkeit, Proteine durch Injektion fremder RNA zu synthetisieren, posttranslational zu modifizieren, kompartimentieren und damit funktionell in die Zelle zu integrieren, insbesondere bei der Expression von membranständigen Proteinen sehr bewährt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in Kombination zu diesem Expressionssystem die intrazelluläre Calciumkonzentration auf Rezeptoraktivierung zu messen, damit als Testsystem für Membranrezeptoren zu etablieren, und dessen Anwendbarkeit auf membranständige Steroidrezeptoren zu prüfen.

### **4.1. Etablierung des Testsystems durch Untersuchung endogener Rezeptoren an Oozyten von *Xenopus laevis***

#### **4.1.1. Angiotensin II (AII)**

Wie aus dem Ergebnissen dieser Arbeit hervorgeht, ließen sich bei nur etwa 13% der 140 auf AII [200nM] untersuchten Oozyten Calciumsignale sehen, wobei der Prozentsatz bei dem mit VSMC-RNA injizierten Oozyten relativ gesehen deutlich höher lag.

Sakuta et al. (1991) konnten mit elektrophysiologischen Untersuchungen bei insgesamt 443 Oozyten, sowohl bei Follikel eingeschlossenen, als auch bei Kollagenasebehandelten Oozyten bei etwa 75% der Oozyten Reaktionen auf AII [200nM] feststellen. Diese Beobachtungen gab es das ganze Jahr über, ohne jahreszeitliche Schwankungen. Lediglich bei zwei von insgesamt 19 *Xenopus* Weibchen reagierten die Oozyten nicht auf AII [200nM und 2µM], unabhängig von der Präparationsmethode.

Die Signale auf AII fielen in den ersten beiden Tagen nach Kollagenasebehandlung etwas geringer aus. Auf Grund ihrer Studien nehmen sie an, daß der Angiotensin II-Rezeptor an den Oozyten, vermutlich in der Zellmembran, vorhanden ist, und über Pertussistoxin-abhängige G-Proteine die Phosphorinositolhydrolyse aktiviert. Dies führt schließlich über die Erhöhung der intrazellulären freien Calciumkonzentration zu ableitbaren Chloridströmen.

Auch Woodward und Miledi (1991) bestätigen, daß Oozyten von 85% der Frösche meßbare elektrische Signale auf AII zeigen. Dabei schwankt die Höhe der erhaltenen Signale aber stark, wenn man Oozyten verschiedener Frösche miteinander vergleicht. Etwa 11,4% der Frösche zeigen besonders starke Ströme (>500nA) auf AII [1µM]. Die Höhe der AII-Reaktionen variiert aber auch stark bei Oozyten, die von ein und dem selben Frosch stammen.

Wenn man davon ausgeht, daß die elektrophysiologische Messung sensitiver ist,

könnte das eine Erklärung dafür sein, daß mit Hilfe des *Calcium Imaging* Reaktionen nur an wenigen Oozyten sichtbar wurden, da mit dieser Methode eventuell nur Signale an den besonders stark reagierenden Oozyten sichtbar wurden.

Die 18 im *Calcium Imaging* reagierenden Oozyten stammen von 5 verschiedenen Fröschen. Da AII ein starker Stimulus für VSMC ist, ist es vorstellbar, daß Oozyten, die durch VSMC-RNA-Injektion den Signaltransduktionsapparat von VSMC oder Teile davon exprimieren, höhere Signale auf AII zeigen, und Reaktionen in der Calciummessung somit an diesen Oozyten relativ häufiger zu finden sind.

Woodward und Miledi (1991) gehen davon aus, daß sich der Angiotensin II-Rezeptor in der Oozyte selbst befindet, während frühere Untersuchungen gegenteilig dazu den Rezeptor ausschließlich im umgebenden Follikelgewebe vermuteten. Diesen Beobachtungen zufolge waren nach Entfernung des Follikelgewebes keine AII-Signale mehr an Oozyten auslösbar (Lacy et al., 1989). Auch Sandberg et al. (1990) gehen davon aus, daß die intrazelluläre Calciummobilisation in der Oozyte durch einen Signaltransfer über Gap junctions vom Follikelgewebe ausgelöst wird.

Möglicherweise sind derart unterschiedliche Beobachtungen auf Verwendung von Oozyten verschiedener Herkunft oder Oozyten-Typen zurückzuführen. Sandberg et al. (1990) und Ji et al. (1990) haben z.B. in ihren Untersuchungen Albino-Oozyten verwendet. Ebenso ist vorstellbar, dass die Wirkungsweise des AII-Rezeptors durch den Defollikulierungsprozeß beeinträchtigt wird.

Fluharty et al. (1991) haben mit Hilfe von Radioligandenuntersuchungen die AII-Bindungsstellen ausschließlich im umgebenden Follikelgewebe der Oozyte gefunden, nicht aber in der Oozytenmembran selbst. Sie exprimierten dann einen Säugetier AII-Rezeptor in *X. laevis* Oozyten aus mRNA von Ratten-Nebennierenrinde (Ji et al., 1990) und Neuroblastomzellen (Fluharty et al., 1991).

Der Amphibien AII-Rezeptor soll sich nicht funktionell, aber pharmakologisch von dem Säugetier-Rezeptor unterscheiden. So läßt sich der durch Injektion von aus Ratten-Nebennierenrinden isolierter mRNA exprimierte Säugetier-Rezeptor z.B. durch nicht-peptidische Antagonisten wie DuP-753 oder PD-123177 stärker hemmen, während der endogene Amphibien-Rezeptor sich durch peptidische Rezeptor-Antagonisten wie Saralasin oder CGP 42112 A stärker hemmen läßt (Ji et al, 1990). Die Rezeptoraktivierung wurde dabei jeweils über eine vermehrte Lichtemission des Chemoluminiszenzproteins Aequorin nachgewiesen, was auf eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration hindeutet.

Interessanter Weise hat bei diesen Experimenten die Injektion von aus Geweben isolierter mRNA ausgereicht, den Rezeptor funktionell zu exprimieren und mit Hilfe des Chemoluminiszenzproteins Aequorin eine Aktivierung nachzuweisen. Da die

Verwendung des Calcium-Fluoreszenzfarbstoffes FURA-2 in mancher Hinsicht dem Aequorin überlegen ist (Grynkiewicz et al, 1986) und VSMC starke Signale auf AII zeigen, besteht durchaus die Möglichkeit, daß einige der in diese Arbeit ermittelten AII-Signale durch Aktivierung des exprimierten Säugetierrezeptors erfolgte. Die höhere Rate an reagierenden Zellen unter den mit VSMC-RNA injizierten Oozyten würde dafür sprechen.

AII-Signale scheinen nicht mit den Signalwegen von LPA zu interagieren, da Reaktionen auf LPA im Anschluß auf Signale durch AII zuverlässig auslösbar sind. Im Vergleich zu AII reagieren die Oozyten auf LPA stärker und schneller.

Auch Sakuta et al. (1991) stellten mit Hilfe elektrophysiologischer Untersuchungen fest, daß Acetylcholin- und Adrenalin-Reaktionen nach AII-Signalen auslösbar sind und umgekehrt. Das Ausbleiben gegenseitiger Desensibilisierung von AII und Acetylcholin wird ebenso von McIntosh und McIntosh (1990) berichtet, die unterschiedliche Signalwege vermuten.

#### **4.1.2. Acetylcholin (ACh)**

Mit Hilfe des *Calcium Imaging* ließ sich von 10 untersuchten Oozyten nur an einer einzigen eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration auf ACh [100µM] zeigen. Reaktionen auf ACh lassen sich im Gegensatz dazu elektrophysiologisch relativ zuverlässig nachweisen. Chloridströme auf ACh sind schon vor über 20 Jahren abgeleitet worden (Kusano et al., 1977). Eine Erklärung für die unterschiedliche Beobachtungshäufigkeit könnte darin liegen, daß diese Effekte auf der vegetativen Oozytenseite bei den meisten Oozyten weniger ausgeprägt sind. Z.B. beschreiben Gillo et al. (1987) explizit, daß Chloridströme an der Oozytenmembran nur abgeleitet werden, wenn IP<sub>3</sub> an die Außenseite der pigmentierten animalischen Hemisphäre injiziert wird, nicht aber an die vegetative Polseite. Diese Chloridströme sind Folge einer intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung.

Ebenso zeigen Tigyi et al. (1990), daß Serum, welches in der Lage ist, Calcium abhängige Chloridströme in *X. l.* Oozyten auszulösen, an der vegetativen Polseite nur sehr schwache Signale auslöst, die 15 mal geringer ausfallen, als wenn Serum an die animalische Polseite pipettiert wird.

Nach Lupu-Meir et al. (1990) zeigen bei Oozyten von *Xenopus laevis* nur etwa 40% der Donorfrösche Reaktionen auf ACh.

Oron und Dascal (1987) stellten enttäuscht fest, daß mit dem Calciumindikatorfarbstoff quin-2 auf ACh nur unbedeutende Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration zu beobachten waren, diese blieb in einem Bereich um 100nM konstant. Sie vermuten, daß der Indikatorfarbstoff Calcium puffern könnte oder die Hauptveränderungen der Calciumkonzentration in einem

subzellulären Kompartiment stattfinden, das nur einen vernachlässigbaren Anteil des Cytosol beteiligt.

Reaktionen auf ACh ließen sich mit der Methode des *Calcium Imaging* zu selten zeigen, sodaß ACh als Kontrollzugabe nicht geeignet erschien.

#### **4.1.3. Lysophosphatidylsäure (LPA)**

Die durch das Serumphospholipid Lysophosphatidylsäure (LPA) verursachten Calcium-Effekte sind höchstwahrscheinlich durch einen an der Zellmembran befindlichen spezifischen G-Protein-gekoppelten Rezeptor vermittelt (Fernhout et al., 1992; Moolenaar, 1995). Als physiologische Wirkungen von LPA sind unter anderem das Auslösen der Thrombozytenaggregation, die Zellproliferation von Fibroblasten und eine Stimulierung des membranalen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Ionenaustauschers bekannt (Houchi et al., 1995). Neben der Fähigkeit, glatte Muskelzellen zur Kontraktion anzuregen, vermag LPA nach Tokumura et al. (1994) synergistisch zu Epidermal Growth Faktor (EGF) und Fibroblast Growth Faktor (FGF) in Zellkultur gezüchtete glatte Gefäßmuskelzellen von Rattenaorta (VSMC) zur Zellteilung anregen und unabhängig von der externen Calciumkonzentration einen schnellen intrazellulären Anstieg von freiem Calcium verursachen. Lysophosphatidylcholin (LPC), ein neutrales Lysophospholipid, zeigte keine mitogene Aktivität, war in höheren Konzentrationen zelltoxisch und der verursachte Calciumanstieg langsam und von  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  abhängig. Die verschiedenen Signaltransduktionswege für LPA sind mittlerweile detailliert untersucht. So werden nicht nur Phospholipase C stimuliert und Adenylatcyclase gehemmt, sondern auch über  $G_\beta$  und  $G_\gamma$  die kleinen G-Proteine *Ras* und *Rho* aktiviert (Moolenaar, 1995). Überdies ist eine Stimulation von Phospholipase  $A_2$  und die Aktivierung von Phospholipase D beschrieben, die Phosphatidylsäure (und Cholin) aus Phosphatidylcholin entstehen läßt.

Eine durch LPA ausgelöste direkte oder indirekte Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Stores ist mittlerweile an verschiedenen Zellen gezeigt worden, in nur wenigen Fällen wurde dabei eine gleichzeitige Bildung von  $\text{IP}_3$  gemessen.

In Oozyten von *Xenopus laevis* wurde gezeigt, daß extrazelluläre Applikation von LPA an die Zellmembran im nanomolaren Konzentrationsbereich eine sofortige Reaktion in Form von Chloridströmen verursacht (Fernhout et al., 1992). Das dadurch erhaltene Signal besteht, vergleichbar der Reaktion auf Acetylcholin (ACh) aus vier Komponenten: zu Beginn ein schneller Einwärtsstrom, dem ein länger andauernder, langsamer folgt. Dieser wird von Schwankungen überlagert und bei einigen Oozyten bildet ein langsamer, verzögerter, nun nach außen gerichteter Strom den Abschluß.

Starke Reaktionen auf LPA erhält man auch an solchen Oozyten, die auf zuvor appliziertes ACh nicht reagierten.

Keine Reaktionen lassen sich durch das alleinige Lösungsmedium (enthält 1% Bovine Serum Albumin (BSA)), durch intrazelluläre Applikation von LPA mit Hilfe von Mikroinjektion oder durch zuvor intrazelluläre Injektion von EGTA hervorrufen.

Interessanter Weise lassen sich die durch LPA verursachten Reaktionen nicht desensibilisieren und nach Fernhout et al. (1992) bei den meisten Oozyten ohne wesentliche Veränderung des Signals wiederholt auslösen, in einem Zeitraum, der kürzer ist als 5min bei jeweils 2minütiger LPA Umspülung. Mit dem *Calcium Imaging* zeigten die Oozyten nur selten hintereinander auslösbare LPA Reaktionen in Form einer  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung. Gegenteilig war es die Regel, daß  $[Ca^{2+}]_i$  bei erneuter LPA Applikation zum Medium eher abfiel. Der Unterschied mag darin bestehen, daß durch Fehlen einer konstanten Umspülung eine erneute Applikation mit einer zeitlich verzögerten Konzentrationssteigerung ohne LPA-freie Intervalle zu verstehen ist.

Wurden die Oozyten zuvor nicht mit Vorbehandlung durch Collagenase vom umgebenden Follikelgewebe befreit, sondern z. B. mechanisch präpariert, mußten 100-fach höhere LPA-Konzentrationen eingesetzt werden, um vergleichbare Signale zu erhalten.

Der Rezeptor für LPA gilt als der einzige an *Xenopus* Oozyten durchwegs vorhandene Rezeptor (Durieux et al., 1994). Daher schien LPA für eine Positiv-Kontrolle bei Kollagenase behandelten Oozyten sehr geeignet, bei mechanisch präparierten Oozyten nur eingeschränkt verwendbar. An diesen Oozyten zeigen allerdings auch alternative Stimuli wie z.B. Vanadationen nur deutlich abgeschwächte Signale.

## **4.2. Nicht-genomische Steroideffekte an Oozyten von *Xenopus laevis***

### **4.2.1. Oozytenreifung**

*Xenopus* Oozyten sind in der Prophase der ersten Reifeteilung stehen geblieben.

Bevor sie als Eizelle befruchtet werden können, muß die meiotische Zellreifung fortgesetzt werden.

Das physiologische Hormon, daß die Fortsetzung der Oozytenreifung an *Xenopus laevis* Fröschen auslöst, ist Progesteron (PROG). Auch *in vitro* können Oozyten durch Progesteronzugabe in das Medium zur Fortsetzung der Zellreifung angeregt werden.

Parallel zu den Calciummessungen wurde an einigen Oozyten überprüft, ob durch PROG die Reifung auslösbar ist. Der Anteil der auf PROG reifenden Oozyten schwankt nach Literaturangaben zwischen 50 und 85% (Hainaut et al., 1991) und liegt nach Stith et al. (1991) bei annähernd 100%.

Mit den Ergebnissen der Reifungsuntersuchungen konnte an Hand einer kleinen

Anzahl von Oozyten gezeigt werden, daß auch nach der Injektion von Fura-2, wenn auch mit etwas verminderter Effizienz, Reifungen auslösbar sind. Auch bei Wasserman et al. (1980) konnte nach Injektion von Aequorin die erfolgreiche Reifung an einem Großteil der Oozyten gezeigt werden. Das ist in Hinblick auf die in dieser Arbeit untersuchten, durch PROG ausgelösten initialen Schritte wichtig, die nur an reifenden Oozyten erwartet wurden, da Wasserman et al. (1980) die Calciumsignale ausschließlich an reifenden Oozyten sehen konnten. Die Kontrolle einer erfolgreichen Reifung auf PROG an den im *Calcium Imaging* untersuchten Oozyten ist auf Grund des Versuchsablaufes nicht mehr möglich. Daher wurden Oozyten parallel zu diesen Untersuchungen auf Reifungsfähigkeit überprüft.

Reifungen auf PROG [3µM] waren sowohl an unbehandelten Oozyten (70%), als auch an Fura-2 injizierten Oozyten zu beobachten. Letztere zeigten eine geringere Effizienz (40%).

Nicht nur Progesteron, sondern auch eine Reihe weiterer Reagentien kann *in vitro* die Reifung auslösen. Exemplarisch werden einige dieser Substanzen in nachfolgender Tabelle aufgelistet:

**Tab 4.1: Reifeteilung auslösende Substanzen an *Xenopus* Oozyten (Auszug: nach Baulieu et al., 1978; mit Ergänzungen: (Jakobelli et al., 1974; Stith und Maller, 1987; Hainaut et al., 1991; Dolfi et al., 1993)**

Reifung auslösende Substanzen:	antagonistisch oder ohne Wirkung sind:
Progesteron	Östradiol
R5020	Cholesterol
Testosteron	
Aldosteron	
Deoxycorticosteron	
Cortisol	
Insulin	Sotalol
Lidocain	Benzocain
Tetracain	Procain
Barbital	Phenobarbital
Allobarbital	Morphin



**Reifung auslösende Substanzen:**

Chlorpromazin  
 Imipramin

A23187 + Mg<sup>2+</sup>

La<sup>3+</sup>

VO<sub>4</sub><sup>3-</sup>

Verapamil

Injekton von *ras-p21*

(*Onkogen, eine kleine GTPase*)

12-*O*-Tetradecanoylphorbol, 13-Acetat

(*DAG-Analogon*)

**antagonistisch oder ohne Wirkung sind:**

Naloxon

Nikotin

Theophyllin

Haloperidol

A23187 ohne Mg<sup>2+</sup>

Mg<sup>2+</sup>

Amilorid

Die grundlegenden Mechanismen der meiotischen Zellteilung sind mittlerweile verstanden. Auch Forschungsarbeit an Oozyten von *Xenopus laevis* hat einen großen Beitrag dazu geleistet, die Prozesse aufzuklären, an deren Anfang die Oozyte und an deren Ende schließlich ein unbefruchtetes reifes Ei steht. Dennoch sind die molekularen Mechanismen, wie Progesteron die im Wartestadium der ersten Reifeteilung befindlichen Oozyten zur Fortsetzung des meiotischen Zellzyklus anregt, bisher noch nicht hinreichend geklärt. Schon fast drei Jahrzehnte weiß man, daß die Reaktionen durch Progesteron in der Oozyte schon auf Membranebene eingeleitet werden und nicht über die Interaktion mit dem klassischen cytosolischen Rezeptor durch genomische Prozesse ablaufen (Smith und Ecker, 1971).

**4.2.2. Nicht-genomische Reaktionen von Progesteron zur Fortsetzung der Reifeteilung**

Das Initiieren der Wiederaufnahme der meiotischen Teilung von Amphibien-Oozyten durch Progesteron über Interaktionen an der Plasmamembran ist mittlerweile zu einem prototypischen Beispiel für nicht-genomische Wirkungen von Steroidhormonen geworden (Baulieu und Robel, 1995).

Eine Reihe von Beobachtungen sprechen für eine nicht-genomische Interaktion von Progesteron bei der Auslösung der Oozytenreifung. Zum einen gibt es deutliche Hinweise für spezifische Progesteron-Membranbindungsstellen an der Oozytenmembran; trotzdem ist über die ersten Komponenten der Signaltransduktion bisher so gut wie „nichts“ bekannt (Andresson et al., 1996).

Sadler und Maller (1982) konnten für das synthetische Progesteron-Analogon R5020 über Photoaffinitätsmarkierung kovalente Bindungen an ein 110kDa-Protein finden,

das in der Plasmamembran von *X.l.* Oozyten lokalisiert ist.

Auch R5020 vermag bei einer Konzentration von  $1,4\mu\text{M}$  im Medium (Progesteron:  $700\text{nM}$ ) die Reifung von 50% der Oozyten auslösen.

Im Gegensatz dazu berichten Blondeau und Baulieu (1984) von einer  $30\text{kDa}$  schweren Peptidfraktion im Zentrifugations-Sediment von  $1.000\text{-}10.000\text{g}$ , die sich mit Hilfe von  $[^3\text{H}]\text{-R5020}$  markieren ließ.

R5020 konnte dabei von Progesteron aus seiner Bindung verdrängt werden.

Das Peptid konnte nicht im  $1.000\text{-}10.000\text{g}$ -Zentrifugat anderer subzellulärer Fraktionen, die nicht Plasmamembran enthalten, gefunden werden oder in einer vergleichbaren Fraktion von Leberzellen.

Liu und Patiño (1993) konnten mit radioaktiv markiertem Progesteron hochaffine Bindungsstellen für Progesteron in der Plasmamembran von *X. l.* Oozyten finden und charakterisieren. Die  $K_D$  von  $1\text{nM}$ , die im typischen Bereich für Hormonrezeptoren liegt, ist deutlich niedriger, als bei den zuvor beschriebenen Bindungsstellen, die indirekt durch R5020 nachgewiesen wurden. Dabei zeigen sowohl pigmentierte Wildtyp-Oozyten, als auch Albino-Oozyten vergleichbare Werte bezüglich Bindungskapazität und Affinität. Daraus läßt sich eine zuvor von Coffmann et al. (1979) angenommene artifizielle Bindung von Progesteron an Melanin oder Melantosomen ausschließen.

Neben dem Nachweis spezifischer Bindungsstellen für Progesteron in der Plasmamembran der Oozyten zeigen eine Reihe weiterer Beobachtungen, daß Progesteron beim Auslösen der Fortsetzung der Meiose nicht über die Aktivierung des klassischen Rezeptors, sondern auf Membranebene agiert:

Zum einen läßt sich ein zytosolischer Progesteronrezeptor in Oozyten von *X. l.* nicht finden (Sadler und Maller, 1982), zum anderen löst auch die Zugabe von Polymergebundenem Progesteron ins Medium, welches die Zellmembran nicht passieren kann, die Reifung aus; intrazelluläre Injektion von diesem oder von Progesteron ist dagegen ineffektiv (Baulieu et al., 1978).

Die Bildung neuer mRNA ist für die Reifung nicht notwendig, diese wird auch ausgelöst in Oozyten, deren Zellkern zuvor entfernt wurde. Ebenso verhindert eine Blockierung der RNA-Produktion z.B. durch Hemmung der RNA-Polymerase mit Actinomycin D, als auch die Anlagerung von Ethidiumbromid an die DNA nicht die Reifung (Baulieu et al., 1978)

Zudem laufen einige Prozesse nach der Initiation der Reifung sehr schnell ab, so daß diese über eine Aktivierung genomischer Mechanismen nur sehr schwer zu erklären wären. Zum Beispiel läßt sich schon 10 Minuten nach Progesteron-Applikation [ $1\mu\text{M}$ ] eine Verflachung der Oozytenmembran und eine Verdickung der Mikrovilli gegenüber Kontroll-Oozyten nachweisen (Dersch et al., 1991), die Harnstoffpermeabilität dagegen nimmt bei der Reifung von *Rana* Oozyten bei der Reifung erst

9 Stunden nach Progesteronapplikation zu - synchronisiert mit dem Auflösungsprozessen der Kernmembran (Lau et al., 1994).

Auch an Fisch-Oozyten wurde kürzlich die Existenz eines spezifischen für die Reifung verantwortlichen Steroid-Membranrezeptors für  $17\alpha,20\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one gezeigt. Den Ablauf der Reifung von Fisch-Oozyten stellt man sich wie folgt vor (nach Nagahama, 1997):

Die Follikelzellen werden durch hypophysäre Hormone, dem FSH und LH chemisch sowie biologisch ähnliche Fisch-Gonadotropine stimuliert. Dabei schütten die Thekazellen  $17\alpha$ -Hydroxy-Progesteron aus, das von den direkt die Oocyte umgebenden Granulosazellen in  $17\alpha,20\beta$ -DP umgewandelt wird. Dieses wirkt über einen spezifischen Membranrezeptor an der Oocyte. Dabei soll der intrazelluläre cAMP-Spiegel absinken. Inhibitoren der Phosphodiesterase z.B. Theophyllin sowie Aktivatoren der Adenylatcyclase z.B. Forskolin oder Choleratoxin verhindern die Reifung der Regenbogenforellen-Oocyte *in vitro*.

Die Signaltransduktion soll über eine Beteiligung eines durch Pertussistoxin abhängigen inhibitorischen  $G_i$ -Proteins wirken.

Wie bei den Amphibien-Oozyten, existiert auch bei Fischen ein Maturing Promoting Faktor (MPF), der als Hauptmediator der Reifungsprozesse wirkt. Die ersten Schritte der Signaltransduktion von  $17\alpha,20\beta$ -DP sind am Entstehen dieses MPF beteiligt, der aus dem Protein-Dimer von cdc2 Kinase und Cyclin B bestehen soll. Vermutlich wird die in ungerreifen Oozyten vorhandene mRNA für Cyclin B polyadenyliert, damit die Synthese von Cyclin B eingeleitet, das mit cdc2 Kinase nach zwei Phosphorylierungsschritten den aktivierten MPF ergibt.

Eine Proteinsynthese scheint für die späten Schritte der Reifung dennoch notwendig zu sein, da Cycloheximidin die Reifung verhindert.

Wegen der Bedeutung für diese Arbeit soll auf die Initiation der Zellreifung von *Xenopus laevis* Oozyten und die anschließenden Schritte etwas näher eingegangen werden: Obwohl insbesondere die ersten molekularen Mechanismen der Interaktion von Progesteron bisher noch nicht eindeutig geklärt sind, sollen die derzeitigen Vorstellungen über die Auslösung der Reifung und der nachfolgende Ablauf an dieser Stelle vorgestellt und diskutiert werden.

Erste physiologische Schritte sind die Ausschüttung von Gonadotropinen, die das Follikelgewebe veranlassen Progesteron zu bilden und zu einer erhöhten Rezeptordichte für Progesteron in der Oocyte führen (Liu und Patiño, 1993).

Bereits 15-30s nach PROG-Zugabe läßt sich die Aktivierung der Lipidmessenger-

Kaskade über einen signifikanten Anstieg von Phosphatidylmonomethylethanolamid (PME) und Sphingomyelin (SM) in der Präparation von isolierten Plasmamembranen aus *Rana pipiens* Oozyten nachweisen (Morrill et al., 1994).

Neben SM entsteht durch Aktivierung der SM-Synthetase aus Phosphatidylcholin auch 1,2-DAG.

Die Aktivierung der Lipidmessenger-Kaskade wird vermutlich über G-Proteine gesteuert, da Inkubation der Membranen mit einem nicht hydralysierbarem GTP (GTP- $\gamma$ -S) vergleichbare Ergebnisse wie PROG hervorbringt; Vorbehandlung der Plasmamembran mit GDP- $\beta$ -S hingegen hemmt die durch Progesteron ausgelöste Aktivierung der Lipidenzyme (Kostellow et al., 1993).

Nach Wasserman (1992) könnte dieser erste Anstieg von DAG auch artifiziell auf das in der Lösung befindliche Ethanol zurückzuführen sein und nicht Bestandteil des physiologischen Reifungsprozesses.

Etwas später, etwa 1-2min nach PROG-Aktivierung gibt es einen zweiten Anstieg von DAG, welches aus Phosphatidylcholin (PC) über eine Aktivierung einer PC-spezifischen PLC aus welcher DAG und Phosphorylcholin entsteht (Kostellow et al., 1993) oder mit Hilfe der Phospholipase D (PLD) und der Phosphatidylsäurephosphohydrolase über Phosphatidylsäure kann ebenso DAG entstehen (Kostellow et al., 1996).

5-8min nach Progesteron-Applikation entsteht über eine Aktivierung der PLC- $\beta$  ein drittes mal DAG und IP<sub>3</sub>, welches bekanntlich Ca<sup>2+</sup>-Kanäle an intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Stores öffnen kann.

Es folgt eine Kaskade unter Beteiligung verschiedener Fettsäuren, die eine Aktivierung der PKC aufrecht erhalten, unterstützend dazu sinkt die Konzentration von Ceramid, welches in einigen Zellsystemen die PKC hemmen vermag (Hannun, 1996). Schon innerhalb der ersten Minuten nach PROG-Exposition führt das zu Proteinphosphorylierungen.

Stith und Maller (1984) zeigten, daß das Einsetzen von 1nM Cholera toxin die durch PROG beobachtete pH-Erhöhung und die Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 sowie der GVBD ausbleiben läßt. Cholera toxin verhindert bei Auslösen der Reifung mit Insulin ebenfalls den GVBD, nicht aber die Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes und eine Phosphorylierung von S6.

Etwas in der halben Zeit zwischen Induktion der Reifung und Auflösung der Kernmembran entsteht ein die Reifung fördernder Faktor (Maturing Promoting Faktor, MPF), der Proteinkinase-Aktivität besitzt. Bei Injektion dieses Faktors in nicht stimulierte Oozyten, findet GVBD innerhalb von 2h statt. MPF vermag auch an kleinen, Stadium IV-Oozyten, bei denen eine Reifung normalerweise nicht auslösbar ist, zum

GVBD führen.

Das in die Oozyte injizierte Mitogen *mos* kann den MPF aktivieren und die Reifung effizient initiieren und schließlich zum GVBD führen. Für den Prozeß der zweiten meiotischen Teilung ist *mos* alleine allerdings nicht ausreichend, dazu wird die Produktion weiterer Proteine benötigt (Yew et al., 1992).

Auch die Rolle von cAMP wird im Zusammenhang mit der Reifung unterschiedlich diskutiert, und es ist unklar, ob diesem second messenger eine physiologische Bedeutung bei der Reifung zukommt. Nach Finidori-Lepicard (1981) hemmt Progesteron die Adenylatcyclaseaktivität, was zu einem Abfall von cAMP führt. cAMP hingegen hemmt die Meiose. Das läßt vermuten, daß der PROG-Rezeptor mit G-Proteinen gekoppelt ist, obwohl die Reifung durch PTX nicht gehemmt wird (Goodhart et al., 1984).

Nach etwa 5-8 Stunden löst sich die Kernmembran auf, die Ovulation folgt darauf und der Meiose-Prozeß läuft bis zur Metaphase der zweiten Reifeteilung weiter, und wird erst nach der Befruchtung abgeschlossen.

Wegen der großen Bedeutung der insbesondere durch PROG ausgelösten Calciumreaktionen wird im Folgenden darauf etwas detaillierter eingegangen:

#### **4.2.3. Calcium**

Die wohl deutlichsten Calcium-Rektionen auf PROG sehen Wasserman et al. (1980). Dabei stellten sie mit dem Calciumlumineszenzprotein Aequorin an Albino-Oozyten 40-60s nach PROG-Zugabe [3-15 $\mu$ M] 80-120s dauernde Lichtemmissionen fest, die vermutlich auf eine intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Erhöhung zurückzuführen ist. An Oozyten, die später nicht erfolgreich reiften, konnten keine solchen Lichtemmissionen ermittelt werden.

Trotzdem zeigten nicht alle reifenden Albino-Oozyten, diese Luminiszenz. Dafür geben Wasserman et al. (1980) zwei mögliche Gründe an: einerseits könnte das Calciumsignal auf einen räumlich eng begrenzten Bereich des Oozytenplasmas beschränkt sein, der möglicherweise auf der animalischen Seite der Oozyte lokalisiert ist. Da Seitenunterschiede an Albino-Oozyten von außen nicht erkennbar sind und sowohl Aequorin-Injektion, wie auch die Lichtemmissionsmessung daher an zufällig ausgewählten Stellen der Zellen vorgenommen wurden, könnte jeweils das Signal an einigen Messungen durch das Cytosol der Oozyte verdeckt sein.

Als zweite Möglichkeit könnten die ersten Schritte der Reifung an einzelnen Oozyten bereits vor dem Experiment stattgefunden haben, da für Albino-Oozyten bekannt ist,

daß diese gelegentlich spontan ovulieren.

Von den 30 untersuchten Oozyten zeigten 3 Oozyten starke, 4 mittlere und 4 sehr schwache Signale auf PROG. Zuvor zupipettierte Pufferlösung provozierte keine Reaktion. An pigmentierten WT-Oozyten konnten jedoch keine Lichtemissionen auf PROG beobachtet werden.

Moreau et al. (1980) fanden mit Aequorin einen mehrere Stunden andauernden Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration mit Beginn nach 1-2h auf PROG-Zugabe. Bei ihren Untersuchungen sowohl an Albino, als auch an WT-Oozyten fand an letzteren der Anstieg der Lichtemission etwas später statt. Die errechnete Steigerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration fand hier von 700nM auf 7 $\mu\text{M}$  statt.

Insgesamt ist die Rolle, die Calcium bei der durch Progesteron induzierten Fortsetzung der Reifung von Amphibien-Oozyten spielt unklar.

Auf der einen Seite vermögen eine Reihe von Calciumkanalblockern, wie  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , Verapamil und D600 die Reifung auslösen (Schorderet-Slatkine et al., 1977; Robinson, 1985); (vgl Tab. 4.1; S. 76f). Ebenso kann die elektrophoretische Injektion von Calcium die Reifung auslösen (Moreau et al., 1976) und auch das Calcium-Ionophore A23187 bei hohen extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (Wasserman und Masui, 1975).

Andererseits bringt die Injektion von  $\text{Ca}^{2+}$  ins Zytosol keine erfolgreiche Reifung mit sich.

Ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom in den ersten Minuten auf PROG ließ sich mit  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  nachweisen (O'Connor et al., 1977). In mehreren früheren Veröffentlichungen wurde der vorübergehende Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sogar als die Reifung auslösendes Signal diskutiert (Baulieu et al, 1978; Smith, 1981; Stith und Maller, 1985).

Wasserman et al. (1980) konnten in etwa der Hälfte der untersuchten reifenden Albino-Oozyten mit dem Calciumlumineszenzprotein Aequorin einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration 40-60s nach PROG-Zugabe [3-15 $\mu\text{M}$ ] beobachten.

Moreau (1980) fand mit Aequorin und selektiveven Calcium-Elektroden 2-5h nach PROG-Zugabe eine Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  während der Reifung. Diese Beobachtung wurde allerdings von Cork et al. (1987) angezweifelt.

Robinson et al. (1985) konnte keinerlei Veränderungen der Calciumkonzentration mit Calcium-empfindlichen Elektroden finden.

Nach Cork et al. (1987) sind durch Messung mit Aequorin starke Calciumveränderungen an nur etwa 6% der Albino-Oozyten zu sehen, die große Mehrheit der Oozyten reift allerdings ohne sichtbaren Veränderungen der Calciumkonzentration.

Das deutet darauf hin, daß diese Calciumfreisetzungen keinen notwendigen Schritt in

der Induktion der Wiederaufnahme der Reifeteilung darstellen und Calcium als second messenger in diesem Falle keine Rolle spielt.

Diese Beobachtung wäre auch konform zu den Abläufen der Eizellreifung an anderen Spezies; z.B. zeigen Picard und Doree (1983) an Seesternen, daß  $\text{Ca}^{2+}$  an der Oozytenreifung nicht beteiligt ist.

Darüberhinaus berichtet Wasserman (1992), daß die nach 5-30s ablaufende Freisetzung von *sn*-1,2-DAG auf PROG durch einen Alkohol-Artefakt verursacht wird, da dieser sich auch durch Ethanol alleine, in dem PROG gelöst wird, auslösen läßt. Es handelt sich hier folglich nicht um eine physiologische Reaktion auf PROG während der Reifung. Dieser Artefakt würde auch eine Reihe weiterer unterschiedlicher Beobachtungen der ersten Schritte bei der Induktion der Reifung zwischen PROG und Insulin, welches in wäßrigem Puffer gelöst wird, erklären.

Wasserman (1992) berichtet, daß Ethanol auch schon in sehr geringen Mengen von 0,4 Promille störend auf den Lipidmetabolismus der Oozyte Einfluß haben kann.

Es ist anzunehmen, daß  $\text{Ca}^{2+}$  bei den Prozessen der Reifung und deren Initiierung notwendig ist: Die Auslösung der Zellreifung von *Xenopus laevis* Oozyten durch Progesteron oder durch das Ionophore A23187 in Kombination mit extrazellulärem Calcium, das den  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  Transport durch die Zellmembran erleichtert, wird durch intrazelluläre EGTA-Injektion unterdrückt (Masui et al., 1977).

Injektionen von Calcium oder Calmodulin (Wasserman und Smith, 1981; Maller und Krebs, 1980; Cartaud et al., 1981), sowie Calciumiontophorese (Moreau et al., 1976) können Zellreifung auslösen.

Hohe extrazelluläre Calciumkonzentrationen können in Abwesenheit von Hormon oder Ionophore A23187 die Zellreifung auslösen (Baltus et al., 1977; Wasserman und Masui, 1975), ebenso eine Vielzahl von Calciumkanalblockern, wie  $\text{La}^{3+}$  (Schorderet-Slatkine et al., 1977).

Calcium-Ausstrom gleichzeitig mit einem Kalium-Ausstrom kurz nach Progesteronzugabe läßt eine Steigerung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  annehmen (O'Connor et al., 1977); keine Veränderungen, weder im Calcium Ein-, noch Ausstrom finden Marot et al. (1976) nach Progesteronzugabe.

Innerhalb der ersten 15min verursacht PROG nach Morill et al. (1980) eine verminderte  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme und einen gesteigerten Ausstrom von  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  in *Rana pipiens* Oozyten. Diese Beobachtung muß nicht unbedingt mit einer Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration zusammenhängen, da diese durch Calciumpools ausgeglichen werden könnte.

Calcium scheint bei der Initiation allerdings nicht als second messenger zu wirken, ein intrazellulärer Anstieg ist für die Reifung nicht unbedingt notwendig:

Die Blockierung der Calciumfreisetzung aus intrazellulären Stores durch TMB-8 beeinflusst die durch Progesteron ausgelöste Zellreifung nicht (Cork et al., 1987).

Es lassen sich zwar an einigen Albino-Oozyten nach Progesteronzugabe schnelle (40-60s), vorübergehende Änderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  mit Hilfe einer Photoelektrode und dem Chemoluminiszenzprotein Aequorin nachweisen (Wasserman et al., 1980; Cork et al., 1987), der Großteil der reifenden Oozyten zeigt aber keine (70%) oder nur geringe (24%) Calciumänderungen. (Cork et al., 1987; unter Einbeziehung der Daten von Wasserman et al., 1980).

Mit Aequorin lassen sich keine Veränderungen von  $[Ca^{2+}]_i$  an pigmentierten Wildtyp-Oozyten auf Progesteronzugabe messen. Ein Calciumanstieg durch das Ionophor A23187 läßt sich durch eine Steigerung des Lichtsignals messen (Belle et al., 1977).

Moreau et al. (1980) fanden mit Hilfe von Aequorin und calciumsensitiver Elektroden langsame  $[Ca^{2+}]_i$  Anstiege während der Zellreifung von  $0,7\mu M$  Normalzustand auf  $7\mu M$  mit einem Höhepunkt 2-5h nach Progesteron-Zugabe. Auch eine Überprüfung dieses Ergebnisses durch Robinson (1985) mit calciumsensitiven Elektroden erbrachte eine  $[Ca^{2+}]_i$ -Ruhekonzentration von  $0,14\pm 0,05\mu M$ , konnte aber keine Veränderungen der Calciumkonzentration an sechs untersuchten Oozyten während der Zellreifung feststellen.

Insgesamt zeigte sich, daß  $Ca^{2+}$ -Ionen für die Prozesse der Reifung notwendig sind, daß eine Reifung aber nicht notwendigerweise einen Anstieg der intrazellulären freien Calciumkonzentration erfordert. Es bleibt daher anzunehmen, daß  $Ca^{2+}$  nicht als notwendiger Second messenger wirkt, der die Reifung vermittelt, sondern bei den Reifeprozessen involviert wird; dennoch ist die Anwesenheit von Calciumionen eine notwendige Voraussetzung für die Reifung.

#### **4.3 Anwendung des Testsystems zur Untersuchung nicht-genomischer Progesteroneffekte an Oozyten von *Xenopus laevis***

Es wurde untersucht, ob die von Wasserman et al. (1980) beobachtete Steigerung der intrazellulären Calciumkonzentration 1-2 Minuten nach PROG-Applikation auch mit der Methode des *Calcium-Imaging* sichtbar ist.

Die insgesamt 56 im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Oozyten zeigten keine Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration in den ersten Minuten nach PROG-Zugabe.

Die Albino-Oozyten wurden mechanisch präpariert und, wie bei den Aequorin-untersuchungen von Wasserman et al. (1980), am Entnahmetag untersucht. Darüberhinaus erfolgten Untersuchungen an den Tagen darauf, sowie an Wildtyp-Oozyten verschiedener Präparation.



Bei keiner dieser Oozyten konnten sich von der Basiskonzentration abhebende Veränderungen der Calciumkonzentration auf PROG beobachtet werden.

Gonadotropin-Injektionen in die *Xenopus laevis* Weibchen vor der Entnahme der Oozyten wurden, wie bei den Untersuchungen von Wasserman et al. (1980) nicht vorgenommen.

Die Rezeptordichte an der Oozytenmembran steigt mit Fortschreiten der Entwicklung der Oozyte und durch Vorbehandlung der intakten Follikel mit Gonadotropinen (Liu und Patiño, 1993).

Eine Reihe weiterer Beobachtungen zeigt eine Beteiligung von Calcium-Ionen an den Reifungsprozessen: Vorinkubation mit TMB-8, einem lipidlöslichen Hemmstoff der intrazellulären Calciumfreisetzung zögerte die Reifung geringfügig, aber nicht signifikant hinaus; die durch PROG ausgelöste Reifung konnte also auch in Anwesenheit von TMB-8 ausgelöst werden (Cork et al., 1987).

Mit Calcium-spezifischen Mikroelektroden konnte Robinson (1985) keine Veränderungen der Calciumkonzentration auf PROG-Applikation im Vergleich zu Kontroll-Oozyten feststellen.

In der Diskussion gibt sie an, lediglich direkt an der Plasmamembran stattfindende, ganz auf die Membran begrenzte  $Ca^{2+}$ -Signale nicht messen zu können, da die Elektrode 50µm unterhalb der Oberfläche plaziert war, doch konnte sie mit ihrer Studie eine Steigerung der Calciumkonzentration im Zytoplasma ausschließen.

Diese Lücke - Untersuchungen direkt an der Plasmamembran - könnten Untersuchungen mit C18-gebundenem Fura füllen, dessen lipophile Kohlenwasserstoffkette sich direkt in die Membran eingliedert und dadurch die Calciumkonzentration direkt an der Membran bestimmt werden kann. Derartige Untersuchungen liegen bisher nicht vor.

Morill und Kostellow (1991) diskutieren, ob das Ausbleiben der Calciumsignale bei Robinson (1985) auf die Verwendung eines hypotonen Puffers bei pH 7,8 zurückzuführen sein könnte, da Alkalisierung von *Xenopus laevis* Oozyten partielle PROG-Effekte (z.B. S6-Phosphorylierung, aber nicht GVBD) auslösen kann und die Calciumfreisetzung vielleicht schon während der Follikelpräparation stattgefunden haben könnte.

Cork et al. (1987) wiederholten die Versuche von Wasserman et al. (1980) und konnten nur bei einer von 12 Oozyten innerhalb der ersten 5 Minuten nach PROG-Zugabe eine, wenn auch geringe Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  feststellen.

Im Untersuchungszeitraum zwischen 2 und 7h wurden hingegen keine Veränderungen der  $Ca^{2+}$ -Konzentration beobachtet im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Beobachtungen von Moreau et al. (1980).

Cork et al. (1987) schließen aus ihren Untersuchungen, daß Calcium zum Auslösen der

Reifung nicht notwendig ist und umgekehrt die gelegentlich beobachteten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale nicht an der Fortführung der durch PROG ausgelösten Signale beteiligt sind. Bei den innerhalb der ersten Minute nach PROG-Zugabe zu beobachtenden Calcium-Signalen könnte es sich auch um einen Ethanol-Artefakt handeln, da nicht nur das in Ethanol gelöste Progesteron, sondern auch geringe Mengen von Ethanol selbst in den Lipidstoffwechsel der Zelle an der Membran eingreifen kann und zu einem Ansteigen von DAG an der Plasmamembran führen, welches wiederum Calcium mobilisieren kann (Wasserman, 1992).

Die meisten strukturellen Veränderungen an der Oozytenmembran finden während der Reifung nach Dersch et al. (1991) auf der animalischen Hemisphäre der Oozyte statt. Es wird vermutet, daß diese dem Zellkern näher gelegene Seite auch für die Spermienpenetration besser vorbereitet wird, als die vegetative Seite. Auch das cortikale endoplasmatische Retikulum, dessen Aufgabe auch darin besteht, Calcium zu speichern und freizusetzen, ist auf der animalischen Oozytenseite wesentlich ausgeprägter vorhanden.

Ebenso bestehen in der Sensitivität gegenüber PROG deutliche Unterschiede: Progesteron kann bei Oozyten von *Rana pipiens* ledig auf der animalischen Polseite die Fortsetzung der Zellreifung (und damit GVBD) initiieren, Progesteron-Exposition an der vegetativen Polseite bleibt wirkungslos. (Cloud und Schuetz, 1977).

Auch die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen mit  $\text{Fura}_2$  und dem *Calcium Imaging* zeigen keine Veränderungen von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in den ersten Minuten nach PROG-Zugabe. Um einen Ethanol-Artefakt zu vermeiden, bzw. möglichst gering zu halten, wurde PROG hier in geringeren Konzentrationen von  $1\mu\text{M}$  oder  $3\mu\text{M}$  eingesetzt. Dabei lag die Ethanol-Konzentration an der Oozyte nur bei 0,01% bzw. 0,03%. Alternativ dazu wurde auch wasserlösliches Progesteron verwendet.

Wasserman et al. (1980) haben PROG bei ihren Versuchen in höheren Konzentrationen von  $3\mu\text{M}$  -  $15\mu\text{M}$  eingesetzt. Über die damit in Zusammenhang stehende Ethanol-Konzentration wird nichts explizit berichtet, es könnte sich aber nach Werten aus dem Nachbericht (1992) um 0,04% bzw 0,2% Ethanol gehandelt haben.

Cork et al. (1987) setzten im Medium Konzentrationen von  $6\mu\text{M}$  PROG und Ethanol 0,08% ein.

So bleibt die Möglichkeit bestehen, daß im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit nur deshalb keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Effekte auf PROG ermittelt werden konnten, weil ein Ethanol-Artefakt weitgehend vermieden wurde.

Eine Calciumbeteiligung an den durch PROG ausgelösten schnellen Steroid-Effekten ließ sich an einer großen Anzahl von untersuchten Oozyten nicht ermitteln.

Damit eröffnete sich der Weg eine Calciumbeteiligung nicht-genomischer Steroid-

Effekte durch Expression membranständiger Steroidrezeptoren zu untersuchen. Dabei wurde die Calciumkonzentration jeweils einige Tage nach der Injektion verschiedener RNA gemessen. Injiziert wurden:  
RNA, die für das membranständige Progesteron-Bindeprotein (mPR) kodiert;  
RNA von Testes, da eine intrazelluläre Calciumerhöhung an Spermien auf PROG beschrieben wurde und  
RNA von VSMC, welche auf ALDO schnelle, nicht-genomische Steroideffekte mit  $Ca^{2+}$ -Beteiligung zeigen.  
Zuvor wurde das Expressions- und Testsystem am Beispiel des Thrombin- und GnRH-Rezeptors untersucht und etabliert.

#### **4.4. Anwendung des Expressions- und Testsystems auf den Thrombin-Rezeptor**

Das Enzym Thrombin ist ein starker Stimulus für glatte Gefäßmuskelzellen, so wurde es bei Wehling et al. (1994) vor Versuchsende ins Medium von VSMC als Positivkontrolle zugegeben, seiner Fähigkeit wegen, einen starken intrazellulären Calciumanstieg auszulösen.

Die Reagibilität von *X. l.* Oozyten auf Thrombin wird unterschiedlich berichtet. Schultheiss et al. (1997) haben den Thrombinrezeptor von menschlichen Thrombozyten in *Xenopus* Oozyten funktionell exprimiert und dessen Interaktion mit G-Proteinen näher untersucht. Es handelt sich dabei um einen etwas ungewöhnlichen G-Protein gekoppelten Rezeptor, weil im Rahmen seiner Aktivierung das N-terminale extrazelluläre Ende proteolytisch abgespalten wird. In ihren Untersuchungen an unbehandelten Oozyten konnten sie keine Chloridströme durch Thrombin auslösen und nachweisen.

Auch Blackhart et al. (1996) untersuchten die Thrombinrezeptor-Spezifität durch Expression des Rezeptors in *X. l.* Oozyten.

Sicherlich wäre die Existenz eines endogenen Rezeptors in den Oozyten bei diesen Untersuchungen störend gewesen.

So ließen sich die drei in dieser Arbeit gezeigten Effekte auf Thrombin an VSMC-RNA injizierten Albino-Oozyten über die Expression des Rezeptors aus seiner RNA gut erklären. Der Nachweis, daß RNA, die für den Thrombinrezeptor kodiert, in der injizierten VSMC-RNA in ausreichender Menge und Qualität enthalten war, wurde durch Northern-blot und einer DIG-markierten Sonde nachgewiesen.

Weniger gut erklärbar als Resultat einer erfolgreichen funktionellen Expression sind die drei Calciumsignale auf Thrombin, die an GnRH-R-RNA-injizierten Oozyten erhalten wurden.

Da die injizierte *in-vitro* transkribierte GnRH-R-RNA keine RNA enthält, die für den Thrombinrezeptor (Thr-R) kodiert, ist in diesem Falle eine Thr-R-Expression ausgeschlossen. Es muß ein endogener Thr-R aktiviert worden sein.

Nguyen et al. (1996) berichten, Chloridströme an *X. laevis* Oozyten auf Thrombin ableiten zu können, die vermutlich über im Follikelgewebe ansässige Rezeptoren und einer Aktivierung der PKC vermittelt werden.

Diese Reaktion ist über einen Zeitraum von 10 Minuten refraktär und kann gelegentlich auch an Oozyten beobachtet werden, deren Follikelzellschicht entfernt wurde.

Alle drei Oozyten, in welche GnRH-R-RNA injiziert wurde, reagierten nach dem Signal auf Thrombin nach deutlich auf GnRH (vgl. Abb. 3.14).

Das läßt darauf schließen, daß Thrombin und GnRH durch verschiedene Signalwege agieren. Für Thrombin ist die Beteiligung der PKC, für GnRH eine Interaktion über G-Proteine beschrieben.

Es ist wahrscheinlich, daß die drei gemessenen Calciumsignale durch Aktivierung des endogenen Thr-R vermittelt wurden. Für die drei Signale an den VSMC-RNA-injizierten ist dies ebenso wahrscheinlich.

## **4.5 Etablierung des Expressions- und Testsystems am GnRH-Rezeptor**

### **4.5.1 *In-vitro* transkribierte RNA, die für den GnRH-Rezeptor kodiert**

Sealfon et al. (1990) zeigten, daß sich der GnRH-Rezeptor durch Injektion von RNA, die aus Rattenhypophysen oder aus einer gonadotropen Zell-Linie ( $\alpha$ -Ts) von Mäusen isoliert wurde in *X. laevis* Oozyten funktionell exprimieren ließ. Bei ihren elektrophysiologischen Untersuchungen erhielten sie 3-4d nach Injektion von 150-200ng RNA/Oozyte an 93% der gemessenen Oozyten ein Signal auf GnRH bzw. dessen Analogon Buserelin (D-Ser(But)<sub>6</sub>,Pro<sup>9</sup>-N-ethylamid-GnRH) (Koiter et al. 1988), das auch in dieser Arbeit verwendet wurde.

Der GnRH-R ist ein sieben Transmembrandomänen besitzender G-Protein gekoppelter Rezeptor, bei dem als Besonderheit unter den G-Protein gekoppelten Rezeptoren das cytoplasmatische C-terminale Ende fehlt.

Das läßt die Bedeutung anderer Regionen des Rezeptors für Signaltransduktion, Desensibilisierung und Regulation vermuten (Reinhart et al., 1992).

Er ist, wie auch der Thyreotropin-Releasinghormon-Rezeptor mit G-Proteinen der G<sub>q/11</sub>-Familie gekoppelt. Bei seiner Signaltransduktion sind nacheinander das G<sub>α</sub>-Protein, die Phospholipase C<sub>β1</sub>, IP<sub>3</sub> und die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Stores beteiligt (Kaiser et al., 1994; Neill et al., 1997).

Chi et al. (1993) exprimierten auch den humanen GnRH-R durch Injektion von 1-10ng

*in vitro*-transkribierter RNA und wiesen dies durch elektrophysiologische Messungen nach 72h auf 200nM GnRH bzw. Buserelin nach.

Mit den Ergebnissen der hier vorgestellten Arbeit konnte zum ersten mal gezeigt werden, daß Effekte des GnRH-R auch hervorragend mit Fura-2 dargestellt werden können.

Durch Injektion von 23ng RNA/Oozyte und Applikation von 200nM GnRH zeigten 79% von 44 Oozyten Signale. Die Effizienz ist etwas geringer, als bei den elektrophysiologischen Untersuchungen von Sealton et al. (1990). Die 6 Wildtyp-Oozyten, die dabei nicht reagierten, stammten allerdings von Untersuchungen, die schon am 2. Tag nach Injektion vorgenommen wurden, während die berichtete Ausbeute von 93% bei Sealtons Untersuchungen am 3. und 4. Tag nach Expressionsbeginn zustande kam, jedoch durch Injektion von aus Geweben isolierter RNA.

Auch Untersuchungen zur Optimierung der injizierten RNA-Menge zeigten deutlich, daß am 2. Tag nach Injektion noch mit ausbleibenden Reaktionen gerechnet werden muß.

Erste Reaktionen auf GnRH waren ab einer Konzentration von 1nM an Albino- und Wildtyp-Oozyten auslösbar, wobei der Anteil der Oozyten, die schon bei geringen Konzentrationen reagierten bei Albino-Oozyten größer war. Für diese läßt sich sogar eine Dosis abhängige Steigerung des Signals interpretieren, während bei den WT-Oozyten zwei Oozyten mit besonders starken Signalen auf geringe GnRH-Zugabe-Konzentration ganz aus einer Dosis-Wirkungsbeziehung herausfallen. Die Stärke des GnRH-Signals scheint von der zugegebenen GnRH-Konzentration unabhängig zu sein. Da bei der erfolgreichen Expression sehr viele Faktoren zusammenspielen müssen, kann man nicht unbedingt von gleichen Rezeptordichten an den untersuchten Oozyten ausgehen.

Im Ausgleich zur höheren Sensitivität bei den Albino-Oozyten fielen die Signale der WT-Oozyten auf GnRH dafür deutlich stärker aus, wie berichtet, kamen diese aber auch bei höheren Konzentrationen von GnRH zustande. Es besteht kein Anlaß anzunehmen, daß Albino-Oozyten durch Fehlen einer Pigmentation an der Membran bei der beschriebenen fluometrischen intrazellulären Calciummessung gegenüber Wildtyp-Oozyten geeigneter sind.

Zum Optimieren der injizierten RNA-Menge, und um zu sehen, bis zu welcher eingesetzten RNA-Menge die funktionelle Expression des GnRH-R noch erfolgreich bleibt, wurde die injizierte RNA in jeweils verschiedenen Mengen in die Oozyten injiziert und die Oozyten daraufhin 1-4 Tage später untersucht.

Am ersten Tag nach Injektion waren noch keine Signale auf GnRH-auslösbar, über den Zeitraum von 4 Tagen nahm die Reaktionsbereitschaft auf GnRH im Prinzip zu.

In Northern-blot Untersuchungen wurde die Stabilität der GnRH-RNA über mindestens drei Tage bestätigt: Aus Oozyten, in welche *in vitro*-transkribierte GnRH-R-RNA injiziert wurde, wurde ein, zwei und drei Tage später die gesamte RNA isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran übertragen. Mit einer DIG-markierten Sonde, die spezifisch GnRH-R-RNA bindet, konnten auch am dritten Tag nach Injektion noch klare Banden im Bereich der erwarteten 1,2kb gesehen werden.

Die ausgelösten GnRH-Signale scheinen nach dem „Alles-oder-nichts“-Prinzip abzulaufen. Die Höhe der erhaltenen Ratiosteigerungen war nicht von der Menge der injizierten GnRH-R-RNA abhängig. Der Zusammenhang zwischen exprimierter Rezeptordichte und injizierter RNA-Menge wurde nicht untersucht.

Mit der Etablierung des Expressions- und Testsystems des GnRH-R ließen sich nun Versuche anschließen, die in Hinblick auf die Anwendbarkeit für die Expression von vermuteten Steroid-Membranrezeptoren von Bedeutung waren. So wurde in Oozyten zusätzlich zu der GnRH-R-RNA weitere RNA verschiedener Konzentrationen injiziert, welche aus Geweben isoliert wurde, in denen schnelle Effekte auf Steroide beobachtet wurden.

Dabei konnte der GnRH-Rezeptor als Nachweis für einen intakten Expressionsapparat der Oozyte verwendet werden.

Bei den RNA-Gemengen von 35 ng VSMC mRNA bzw. 75ng gesamte RNA von mouse testis zu 10ng GnRH-R-RNA konnten am zweiten Tag allerdings nur bei einer von vier, bzw. bei zwei von vier Oozyten Signale gezeigt werden.

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, daß nach 2 Tagen die Signale auf GnRH noch nicht hinreichend zuverlässig sind.

Bei den folgenden Untersuchungen wurden die Oozyten daher erst ab dem 3. Tag nach Injektion untersucht.

Es wurde durch Beimengung, nicht für den GnRH-R kodierender, aus VSMC isolierter RNA ermittelt, ab welchen eingesetzten Mengen von VSMC-RNA bei gleichbleibender GnRH-R-RNA-Menge die Expression des GnRH-R gehemmt wird.

Bei der höchsten eingesetzten Menge von 125ng Fremd-RNA ließen sich keine Reaktionen mehr auf GnRH zeigen, während 50ng Fremd-RNA sich noch nicht nachteilig auswirkten.

Das könnte dafür sprechen, daß Mengen ab 100ng eingesetzte RNA pro Oozyte die Expression des GnRH-R bzw. dessen Nachweisbarkeit hemmen.

Daher wurde in den Versuchen zur Expression eines membranständigen Steroidrezeptors diese Menge injizierter RNA pro Oozyte nicht überschritten.

Sealfon et al. (1990) setzten dagegen in ihren Expressionsversuchen eine höhere RNA-

Menge von 150-200ng RNA pro Oozyte erfolgreich ein.

#### **4.5.2 GnRH-R codierender eukaryontischer Expressionsvektor**

Mit Hilfe des *Calcium-Imagings* konnte auch die erfolgreiche Expression des GnRH-R nach intranucleärer Injektion eines eukaryontischen Expressionsvektors funktionell nachgewiesen werden.

Für Messungen 48h nach Injektion ist die Erfolgsquote von 50% in den Gruppen an denen sich Effekte zeigten ein erstaunliches Ergebnis. Bei der Transfektion von Säugetierzellen wird eine Ausbeute von nur ca. 10% erreicht.

Unter Verwendung eines Oozytenexpressionsvektors fiel auch Pfaff et al. (1990) auf, daß schon überraschend kleine Injektionsmengen, die besten Ergebnisse bei der Proteinexpression ergeben. Sie zeigten, daß die gebildete Proteinmenge nach 2d etwa der durch Injektion von *in-vitro* transkribierter RNA entspricht und nach 3d diese um das 5-fache übersteigt.

Durch die Messungen mit dem *Calcium-Imaging* konnte gezeigt werden, daß die gebildeten Rezeptoren auch intakt sind und die Signaltransduktion adäquat auslösen.

#### **4.5.3 Interaktionen zwischen exogenem GnRH-Rezeptor und endogenen LPA-Signalwegen.**

Die Wirkung von GnRH wird über den exprimierten Rezeptor vermittelt, der mit PTX-unabhängigen G-Proteinen der  $G_{q/11}$ -Familie agiert, und schließlich zu einem vermehrten Umsatz von Phosphatidylinositol mit intrazellulärer Mobilisierung von Calcium und Aktivierung der Proteinkinase C führt; auch die Bildung von cAMP und die Freisetzung von Arachonidonsäure wird berichtet (Naor et al., 1990).

Die präzisen intrazellulären Signalwege, die beteiligt sind, die verschiedenen Effekte von GnRH zu vermitteln sind noch nicht ausreichend geklärt und charakterisiert (Kaiser et al., 1994).

Mehr oder weniger als Zufallsergebnis wurde bei den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit beobachtet, daß Oozyten, die soeben durch den exogenen GnRH-R stimuliert wurden, in der Regel durch Zugabe von LPA gegenregulatorische Mechanismen der Zelle aktivieren, und  $[Ca^{2+}]_i$  abfallen lassen, oder die LPA-Applikation völlig wirkungslos bleibt. Nur in wenigen Fällen führt LPA zu einer erneuten Freisetzung von intrazellulärem Calcium.

Nach Durieux et al. (1992) interagiert ein angenommener LPA-Rezeptor in Oozyten von *Xenopus laevis* mit PTX-abhängigen G-Proteinen, zumindest läßt sich die  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung durch PTX unterdrücken. Auch die Signalwege von LPA sind vielseitig: in Fibroblasten werden PLC und PLD stimuliert mit darauf folgender Calciumfreisetzung und Aktivierung der PKC, sowie einer Hemmung der Adenylatcyclase.

*ras-p21* und MAP-Kinase werden darüber hinaus durch PTX-unabhängige Mechanismen aktiviert (Moolenaar, 1995).

An chromaffinen Zellen verursacht LPA den Ausstrom von  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  durch Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers an der Plasmamembran (Houchi, 1995).

Über mögliche Angriffspunkte der Gegenregulation bzw. der Signaldesensibilisierung und Interaktion läßt sich nur spekulieren. Die Beteiligung unterschiedlicher G-Proteine bei der Signaltransduktion ist wahrscheinlich, da LPA-Signale in *X.l.* Oozyten von PTX abhängig sind, GnRH-Signale nicht.

Auch ein Calciumausstrom durch Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers an der Plasmamembran wäre möglich.

Deutlich zu erkennen ist, daß das Ausmaß der Gegenregulation tatsächlich von der Stärke des zuvor abgelaufenen GnRH-Signals abhängig ist. Auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung im Rahmen einer regulären LPA-Aktivierung wird im Ablauf des Signals wieder zurückgebildet. Auch daran könnte die Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers beteiligt sein.

Nachdem sich die Expression des GnRH-R mit dem *Calcium Imaging System* ausgezeichnet funktionell nachweisen ließ, sollte im Anschluß ermittelt werden, ob sich mit den eingesetzten Methoden auch membranständige Steroidrezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten exprimieren und funktionell nachweisen lassen.

#### **4.6 Nicht-genomische Steroideffekte in anderen Geweben**

Vor über 40 Jahren stellte man fest, daß Steroidhormone tiefgreifenden Einfluß auf die Proteinsynthese haben, was viele der spezifischen Hormonreaktionen verursachte. Mueller et al. (1958) fanden als erste heraus, daß Steroidhormone die Transkription von Genen regulieren.

Die Entdeckung von cytosolischen Rezeptoren und ihre Beteiligung an der genomischen Regulation der Proteinsynthese führten schließlich zur klassischen Theorie der Steroidwirkung.

Mit zunehmend empfindlicheren Meßmethoden ließ sich insbesondere in den letzten 10 Jahren zeigen, daß es neben der klassischen genomischen Wirkung noch andere Wege von Steroid-Aktionen gibt.

Nach dem Dualen Modell für Steroidwirkungen (Wehling, 1994) gibt es parallel zum klassischen Weg, der über die Beteiligung genomischer Mechanismen die Synthese von Proteinen mit einer Latenzzeit von 1-2h reguliert, auch einen Weg über die Beteiligung von Membranrezeptoren, die schnelle nach 1-2 Minuten ablaufende Veränderungen verursachen. Neben einer Beeinflussung von Elektrolyttransportsystemen, ist die Einbeziehung multipler Signaltransduktionswege für diese



Steroideffekte mittlerweile aufgezeigt.

Obwohl die ersten Beobachtungen nicht-genomischer Steroidwirkungen schon vor 60 Jahren in einer Pionierarbeit von Hans Selye vorgestellt wurden, in der das unmittelbare Einsetzen einer Narkose bei Ratten beschrieben wurde, die intraperitoneale Injektionen von PROG erhielten, wurden erst in neuerer Zeit, mit der Entwicklung sensitiverer Meßsysteme und molekularbiologischen Arbeitstechniken, schnelle Steroideffekte systematisch untersucht.

In einem Review von Schmidt et al. (1998) werden die Anfänge und neuere Entdeckungen der schnellen Wirkungen von ALDO zusammengefaßt.

Die ersten nicht-genomischen Effekte dieses Steroids war die Beobachtung eines verzögerten Natrium-Austausches an Hunde-Erythrozyten durch ALDO in physiologischen Konzentrationen (Spach und Streeten, 1964). Da Erythrozyten keinen Zellkern mehr besitzen, ist diese Beobachtung mit der Theorie der klassischen Steroidwirkung nicht vereinbar.

Um diese Zeit wurde auch in vivo festgestellt, daß Injektionen von ALDO (0,5mg) im Menschen schon nach 5 Minuten den peripheren Gefäßwiderstand und Blutdruck erhöhen, sowie das Herzschlagvolumen verringern. Auch hier werden wegen des schnellen Wirkungseintritts nicht-genomische Mechanismen vermutet.

Diese schnellen Effekte von ALDO am lebenden Menschen konnten auch in einer neueren Placebo-kontrollierten, randomisierten Studie durch Herzkatheteruntersuchungen an 17 Patienten mit vermuteter koronarer Herzkrankheit bestätigt werden (Wehling et al., 1998): Innerhalb von 10 Minuten zeigten sich auf ALDO (1mg) signifikante Veränderungen im Gefäßwiderstand, Herzauswurf und Herzindex.

Darüberhinaus gibt es eine Reihe sehr genauer Beobachtungen schneller in vitro ALDO-Effekte.

Eine Aktivierung des Natrium-Protonen-Austauschers durch ALDO ließ sich nach 1-2 Minuten an menschlichen Monozyten nachweisen. Obwohl Glucocorticoide eine hohe Affinität zum cytosolischen Mineralocorticoidrezeptor besitzen, konnten sie diese Effekte nur in äußerst hohen Konzentrationen hervorrufen. Der Einsatz von Canrenon, einem Antagonist des klassischen Rezeptors, hemmt diesen Effekt nicht (Wehling et al., 1991). Auch die Aktivierung der Phosphorinositolhydrolyse durch ALDO im nanomolaren Bereich und daraus resultierende Bildung von IP<sub>3</sub> innerhalb von 30 Sekunden nach ALDO-Applikation konnte an Moozyten und glatten Gefäßmuskelzellen gezeigt werden (Christ et al., 1993).

Hinsichtlich einer Beteiligung der Proteinkinase C wurden unterschiedliche Beobachtungen gemacht: Sato et al. (1997) stellten eine schnell verringerte Aktivität der PKC auf ALDO fest, während andere Arbeitsgruppen eine gesteigerte Aktivität zeigten (Christ et al., 1995; Doolan et al., 1996; Gekle et al., 1997).

Eine schnelle Freisetzung von  $Ca^{2+}$  auf ALDO konnte unter Verwendung des Indikatorfarbstoffes Fura-2 an VSMC, an Endothelzellen von Schweineaorta und an distalem Colon von Ratte und Mensch gezeigt werden (Wehling et al., 1994 u. 1995; Maguire et al., 1999; Doolan und Harvey, 1996).

Verglichen mit Calciumreaktionen, die durch Angiotensin II oder Thrombin ausgelöst werden, fallen die Signale auf ALDO schwächer aus. Die Effekte lassen sich jedoch im physiologischen Konzentrationsbereich von nur 0,1nM ALDO auslösen. Bei dieser Konzentration sind weder alle Rezeptoren aktiviert, noch fordert deren Aktivierung zu hohe Konzentrationen. Die Effekte könnten als physiologischer Mechanismus an der Feinabstimmung der Kreislaufregulation beteiligt sein.

An VSMC und Endothelzellen konnte an Hand des Calciumsignals gezeigt werden, daß dieses aus einer initialen Freisetzung aus intrazellulären Stores besteht, als auch aus einem darauf folgenden Calcium-Einstrom von extrazellulär.

Die Bedeutung der nicht-genomischen Reaktionen kann für verschiedene Zelltypen unterschiedlich sein. Während VSMC eine  $Ca^{2+}$ -Erhöhung vor allem im perinukleären Bereich zeigen und der Schwerpunkt auf der Freisetzung aus intrazellulären Stores lag, erhöht sich  $Ca^{2+}$  bei Endothelzellen vor allem im perimembranal Bereich (Wehling et al., 1994).

Diese vielfältigen Indizien und Beweise schneller Steroideffekte wurden mittlerweile durch eine weitere Beobachtung ergänzt, die über eine Interaktion des klassischen Aldosteronrezeptors nicht vereinbar ist: Es konnte auch an Mineralocorticoidrezeptor-Knockout (MR-KO) - Mäusen gezeigt werden, daß schnelle Veränderungen von cAMP und  $[Ca^{2+}]_i$  durch ALDO in MR-KO-Mäusen zu beobachten sind und verglichen mit WT-Mäusen an diesen sogar stärker ausfallen (Häseroth et al., 1999).

Es wurde damit der Nachweis erbracht, daß schnelle Steroidwirkungen ohne Beteiligung des zytosolischen Rezeptors ablaufen und die Membranbindungsstellen für Steroide nicht eine besondere Modifikation des zytosolischen Rezeptors darstellen.

Bisher konnten für einige Steroidhormone an den Membranen unterschiedlicher Gewebe spezifische Bindungsstellen gefunden werden, die Teil eines membranständigen Steroid-Rezeptors sein könnten. Hochaffine Bindungsstellen sind beschrieben z.B. für Cortisol ( $K_d$ : 1,5nM, Suyemitsu und Terayama, 1975;  $K_d$ : 5,1nM Guendouz et al., 1989), Progesteron ( $K_d$ : Haukkama, 1976;  $K_d$ : 25,2nM, Yamada und Miyaji, 1982), Östradiol ( $K_d$ : 1nM, Pietras und Szego, 1977) und Aldosteron ( $K_d$ : 0,1nM, Wehling et al., 1992).

Es konnte zwar noch nicht mit letzter Sicherheit geklärt werden, ob es sich bei diesen Bindungsstellen tatsächlich um Vertreter dieser Familie von

Steroidmembranrezeptoren handelt. Obwohl mittlerweile ein Progesteron-bindendes Membranprotein (mPR) isoliert und kloniert wurde (Meyer et al., 1996; Falkenstein et al., 1996), und indirekt über das Ausbleiben der Akrosomenreaktion an Spermien durch Blockierung dieser Bindestelle durch Antikörper der Nachweis einer physiologischen Bedeutung erbracht wurde (Buddhikot et al., 1999), gelang es bis jetzt noch nicht, einen solchen Rezeptor funktionell zu exprimieren. Mittlerweile weiß man, daß mPR aus 28kDa schweren identischen Untereinheiten besteht, die über Disulfidbrücken Dimere bilden können. (Falkenstein et al., 2001).

Trotzdem ist noch unklar, ob der PROG-Rezeptor an Spermien analog zu dem ist, der in *X.l.* Oozyten vermutet wird (Baulieu und Robel, 1995).

Nach Rosner et al. (1999) läuft der Signalweg der nicht-genomischen Steroidwirkung an der Zellmembran noch etwas komplizierter ab, als in den zuvor beschriebenen Überlegungen. Am Beispiel von Östrogenen beschreibt er die Beteiligung von Transportproteinen an diesem Prozeß. Seiner Theorie nach besitzen diese Sexualhormon-bindenden Globuline (SHBG) neben ihrer Steroidbindungsstelle noch eine weitere Bindungsstelle für einen spezifischen, in der Plasmamembran vorkommenden Rezeptor. Dieser kann die freie Form des SHBG binden, und wird dann aktiviert, wenn ein freies Globulin, daß gerade am Rezeptor hängt, von einem Steroid besetzt wird. Die Wirkung soll dann über G-Proteine vermittelt werden, die die Signalkette über Adenylatcyclase, cAMP, PKA aktivieren und über Proteinphosphorylierungen zu seinen spezifischen Wirkungen führen.

Steroid-gebundenes SHBG hingegen kann an den SHBG-Rezeptor nicht binden.

SHBG kommt darüberhinaus noch eine weitere Bedeutung zu, die Plasmahalbwertszeit der Steroide zu erhöhen, diese zu transportieren, zu speichern und bei Bedarf freizusetzen.

Zwar lassen sich mit dieser Theorie einige Fragen klären, wie die Ermittlung unterschiedlicher Affinitäten und Molekulargewichte der Membranbindungsstellen das Vorkommen in Lebermikrosomen. Nicht so gut erklären läßt sich allerdings damit, die *in vitro* Nachweisbarkeit schneller Steroideffekte, da in Zellkulturen etc. ein SHBG vermutlich nicht vorhanden ist.

So bleibt das Klonieren und Identifizieren eines Vertreters dieser schnellen membranständigen Steroidrezeptoren in der nächsten Zukunft ein Hauptziel bei der Erforschung nicht-genomischer Steroideffekte.

## **4.7 Anwendung des Expressions- und Testsystems zur Untersuchung nicht-genomischer Steroideffekte durch Injektion von RNA in die Oozyten**

Die Möglichkeit eines Klonierungsversuches bestand nun darin, die RNA aus Zellen, die die soeben beschriebenen schnellen Steroideffekte zeigen, zu isolieren und in *Xenopus* Oozyten zu exprimieren. Dort sollte die Expression funktionell, z.B. durch eine intrazelluläre Calciumerhöhung nachgewiesen werden.

In weiteren Schritten könnte eine stufenweise Fraktionierung der RNA folgen, bis schließlich ein betreffendes, den Effekt auslösendes Gen erhalten bleibt. Deshalb wurde RNA aus glatten Muskelzellen (VSMC), Schweineleber, Mäusehoden (Mouse testis) und *in-vitro* transkribierte RNA, die für das membranständige Progesteron-Binde-Protein codiert, in den Oozyten exprimiert.

### **4.7.1. putativer membranständiger Progesteron-Rezeptor**

Da sich die Ergebnisse von Wasserman et al. (1980) durch die hier vorgestellten Untersuchungen nicht bestätigen ließen und unter Vermeidung eines Ethanol-Artefaktes an den uns zur Verfügung stehenden Oozyten keine Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration zu beobachten waren, konnte versucht werden, einen solchen angenommenen membranständigen Progesteronrezeptor in den Oozyten zu exprimieren.

Es wurde *in-vitro* transkribierte RNA, die für mPR, einem membranständigem Progesteron-Binde-Protein codiert, RNA aus Schweineleber sowie aus Mäusehoden (Mouse testis) isolierte RNA untersucht.

#### **4.7.1.1. *in-vitro* transkribierte mPR-RNA**

1999 gelang es Falkenstein et al. das membranständige Progesteron-bindende Protein (mPR) in CHO-Zellen zu exprimieren. Dabei konnte in der Affinität zu verschiedenen Steroiden eine ähnliche Hierarchie wie an Schweinelebermikrosomen gezeigt werden, mit der stärksten Affinität zu Progesteron. Diese enge Korrelation zwischen rekombinantem und nativem mPR konnte bisher für kein anderes Protein gezeigt werden, das für ein mögliches Steroid bindendes Membranprotein gehalten wird.

Die *in-vitro* transkribierte RNA, die für das mPR kodiert (mPR-RNA) wurde in *X.l.* Oozyten injiziert. An 25 untersuchten Oozyten ließ sich kein  $Ca^{2+}$ -Signal durch PROG-Applikation nachweisen. Obwohl es bisher nicht gelang, eine Expression des mPR als ersten Vertreter eines membranständigen Steroidrezeptors funktionell nachzuweisen, erhärtet sich ständig der Verdacht, daß es sich bei dem mPR um den membranständigen Progesteronrezeptor handelt oder einem Teil davon.

So wird die durch Progesteron eingeleitete Akrosomenreaktion an Spermien zu 62,1%

gehemmt, wenn diese zuvor mit spezifischen Antikörpern gegen mPR inkubiert werden (Buddhikot et al., 1999). Die durch Ionomycin eingeleitete Akrosomenreaktion wurde durch diesen Vorgang nicht beeinflusst.

Es ist also plausibel, daß mPR bei der durch Progesteron ausgelösten schnellen Reaktion eine wichtige Rolle spielt. Die gegen mPR gerichteten Antikörper binden in den CHO-Zellen, die mPR exprimieren an 28 und 56kDa schwere Peptide.

Da vermutet wird, daß der angenommene membranständige Progesteronrezeptor-Komplex ein Molekulargewicht von 200kDa besitzt, aus mehreren Oligomeren zusammengesetzt ist und nur zum Teil aus 28 bzw. 56kDa Peptiden besteht, könnte es sich bei dem mPR um einen Teil dieses Rezeptorenkomplexes handeln. Das würde auch die verschiedenen Molekulargewichte erklären. Da die Affinität von mPR im physiologischen Bereich liegt, könnte es die Progesteron-Membran-Bindungsstelle des vermuteten Rezeptors repräsentieren.

Die durch Progesteron ausgelöste, in Einzelzellmessung ermittelte intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Erhöhung an Spermien wird durch mPR spezifische Antikörper signifikant vermindert (Falkenstein et al., 1999). Daraus läßt sich schließen, daß das an der Akrosomenreaktion der Spermatozoen beteiligte Progesteron-bindende Membranprotein sehr ähnlich oder sogar identisch zu mPR ist.

Im Unterschied zu den in dieser Arbeit unter 3.3 vorgestellten Experimenten, wurde von Falkenstein et al. (1999) eine bereits bekannte Reaktion, eines in den Zellen physiologisch vorkommenden Rezeptors gezielt gehemmt.

Daß sich eine Expression an *Xenopus laevis* Oozyten nicht funktionell nachweisen ließ, kann vielfältige Ursachen haben.

Ähnlich dem IL-6 Rezeptor besitzt mPR mindestens eine transmembranale Region und enthält eine sehr Prolin-reiche Stelle, die in die Interaktion mit anderen Proteinen miteinbezogen sein könnte. Z. B. ist eine solche Sequenz an Rezeptoren der Zytokin- und Wachstumshormon-Rezeptorenfamilie notwendig, für eine Assoziation mit der Thyrosinkinase Jak2. (Tanner et al., 1995). Diese Strukturanalogien könnten dafür sprechen, daß mPR einen Rezeptor des Thyrosinkinase-Typs darstellt. Obwohl an *Xenopus laevis* Oozyten auch diese erfolgreich funktionell exprimiert wurden, ist es unklar, ob die für die Signalweiterleitung des spezifischen Rezeptors notwendigen Strukturen und Proteine in den Oozyten vorhanden sind.

Rossato et al. (1999) identifizierten eine funktionelle Bindungsstelle für Progesteron an der Plasmamembran von Leydigzellen. Auf deren Aktivierung folgt die Depolarisierung der Zellmembran mit einem  $Na^{+}$ -Einstrom und daraufhin eine Aktivierung der Steroidsynthese. Die intrazelluläre Calciumkonzentration wurde jedoch, anders als bei den Progesteroneffekten an Spermien, nicht beeinflusst. Die Reaktionswege des aus Lebermikrosomen isolierten bzw. aus VSMC clonierten mPR

könnten über andere Signaltransduktionsmechanismen, ohne Calciumbeteiligung ablaufen, die mit den hier verwendeten Methoden nicht sichtbar geworden wären. Da Antikörper gegen mPR an Spermien die Auslösung des schnellen Calciumeinstroms verhindern (Falkenstein et al., 1999), ist ein genereller Reaktionsweg ohne Calciumbeteiligung unwahrscheinlich. Vorstellbar wäre aber die Existenz einer Steroidmembranrezeptor-Superfamilie mit Involvierung verschiedener second Messenger Systeme in unterschiedlichen Zellen.

Neben der Möglichkeit, daß sich das Protein in *X.l.* Oozyten auf diese Weise nicht oder in nur zu geringen Mengen exprimieren ließ, oder nicht in der benötigten Tertiärstruktur oder Kompartimentierung, ist es auch auf Grund des Molekulargewichts eher wahrscheinlich, daß mPR nur einen Teil des Rezeptorkomplexes repräsentiert, vermutlich die Progesteron Bindungsstelle. Da wichtige Kompartimente zur Aktivierung der Signalkette fehlen könnten, die schließlich zur Calciumfreisetzung führt, vermag auch eine erfolgreiche Bindung von PROG an in die Zellmembran integriertes mPR kein Calciumsignal auslösen, es bleibt daher aus. Darüberhinaus bleibt die Möglichkeit bestehen, daß sich die mit dem Rezeptor korrespondierenden Proteine der Signaltransduktion in den Amphibienzellen nicht, oder nur in anderer Form vorhanden sind, und die Weiterleitung des Signals an dieser Stelle zum Stocken kommt.

Das mPR ließ sich in CHO-Zellen exprimieren (Falkenstein et al., 1999) und weist ähnliche Bindungseigenschaften für verschiedene Steroide auf, wie das in den Lebermikrosomen nachgewiesene Protein. Dennoch konnte bisher aber noch kein Vertreter eines Steroidmembranrezeptors funktionell exprimiert werden.

Da sich mit der *in-vitro* transkribierten mPR-RNA voraussichtlich nur ein Teil des membranständigen Progesteron-Rezeptor Komplexes exprimieren ließ, wurde auch RNA aus Mäusehoden in die Oozyten injiziert und untersucht, ob sich auf diese Weise der membranständige Progesteron-Rezeptor-Komplex funktionell gebildet wird und sich ein Calcium-Signal auf Progesteron-Applikation in den Oozyten nachweisen läßt.

#### 4.7.1.2 mRNA aus Schweineleber

mPR wurde ursprünglich aus Mikrosomen von Schweineleber entdeckt und isoliert (Meyer et al., 1996). Bei einer geringen Anzahl von 6 Oozyten, in welche RNA aus Schweineleber injiziert wurde, ließen sich keine Effekte auf PROG zeigen. Da es sich aufgrund des Molekulargewichts von 28kDa beim mPR vermutlich nur um den Teil eines membranständigen Progesteron-Rezeptor-Komplexes handelt, hätte auf diese Weise die Möglichkeit bestanden, daß in der injizierten RNA auch die übrigen, für den Rezeptorkomplex und dessen Signaltransduktion notwendigen Proteine funktionell gebildet wurden. Andererseits lassen sich an Leberzellen keine  $Ca^{2+}$ -Effekte auf

Progesteron zeigen (Blackmore et al., 1990). Zudem ist die gezielte Expression mit *in-vitro* transkribierter RNA der Injektion eines RNA-Pools natürlich überlegen. Unveröffentlichten Untersuchungen von Meyer et al. zufolge gibt es Hinweise dafür, daß für mPR codierende mRNA nach der Isolierung aus total-RNA nicht mehr enthalten ist. Nachdem sich die Expression von mPR in *X.l.* Oozyten nicht funktionell nachweisen ließ, waren hier zu beobachtende Effekte kaum zu erwarten.

Anders sieht die Situation bei der Untersuchung von RNA aus Mäusehoden aus, da an Spermatozoen schnelle Calciumreaktionen auf PROG vielfach beobachtet wurden (z.B. Blackmore et al., 1990).

#### 4.7.1.3 RNA aus Mäusehoden (Mouse testis)

Der Bezug zwischen mPR und dem an der Akrosomenreaktion beteiligten PROG-bindenden Membranprotein an Spermatozoen ist unter 4.6.1.1 bereits hinreichend beschrieben. Blackmore et al. (1990) haben mit Hilfe von FURA-2 eine schnelle intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Erhöhung auf PROG (3nM-3 $\mu$ M) in humanen Spermatozoen beobachtet, die durch  $Ca^{2+}$ -Kanälblocker wie z.B.  $La^{3+}$  unterdrücken ließ.

PROG wurde auch hier in Ethanol gelöst, Ethanol alleine zeigte allerdings keine Effekte auf die intrazelluläre Calciumkonzentration.

1991 konnten Blackmore und Lattanzio den vermuteten Rezeptor bzw. die PROG-Bindungsstelle am Kopf der Spermatozoen lokalisieren.

Winstrom und Meizel (1993) fanden heraus, daß der angenommene PROG-Membran-Rezeptor an Spermien unter Involvierung eines GABA-/Chlorid-Kanals die Akrosomenreaktion auslöst.

Dies wurde durch eine Studie von Turner et al. (1994) jedoch gegenteilig gezeigt. Diese beschreiben ein unabhängiges Auslösen der Akrosomenreaktion von diesem Ionenkanal.

Schnelle Calciumeffekte an humanen Spermatozoen gehören mittlerweile zu gut dokumentierten Beweisen für nicht-genomische Steroideffekte.

Aus Mäusehoden (Mouse testis) isolierte mRNA wurde in Oozyten von *Xenopus laevis* injiziert. Dennoch ließ sich mit Hilfe des *Calcium Imaging* an keiner von 17 solcher untersuchten Oozyten eine Veränderung der freien intrazellulären Calciumkonzentration auf PROG nachweisen. Auch durch RNA aus Mäusehoden konnte die funktionelle Expression eines membranständigen Steroidrezeptors nicht gezeigt werden.

#### **4.7.2 putativer Aldosteron-Membran-Rezeptor durch total- und mRNA aus VSMC**

Wehling et al. (1994) konnten an VSMC durch Einzelzellmessung mit dem *Calcium-Imaging* an isolierten VSMC lokale intrazelluläre Calciumerhöhungen 30 Sekunden nach Zugabe von ALDO ins Medium beobachten. Konzentrationen von 0,01nM

reichten aus, eine kleine Reaktion im perinucleären Bereich der Zelle zu sehen, wo die Hauptreaktion zu beobachten ist. Deutlichere Reaktionen, auch im zellmembran-nahen Bereich, waren ab 1nM ALDO auslösbar.

Durch Injektion von aus VSMC isolierter total- oder mRNA in Oozyten ließen sich 48 Stunden später mit dem *Calcium-Imaging* keine Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration auf ALDO [10nM] zeigen (vgl. 3.3.1). An 22 VSMC-total-RNA und an 12 VSMC-mRNA injizierten Oozyten blieb die intrazelluläre Calciumkonzentration auf ALDO jeweils konstant. Die injizierte RNA wurde auf Intaktheit untersucht (vgl. 3.5). Durch auslösbare Signale auf LPA ließ sich eine regelrechte Farbstoffbeladung und Reagibilität der Oozyten sowie die Funktionalität des Meßsystems jeweils bestätigen. Für das Ausbleiben einer meßbaren Reaktion eines hypothetisch erfolgreich exprimierten Steroidmembranrezeptors kommen verschiedene Ursachen in Betracht. Durch das Fehlen einer für die Signalweiterleitung notwendigen Komponente in den Amphibien-Oozyten käme es zum Bruch der Signaltransduktionskette und ein Calcium-Signal würde ausbleiben. Die genauen Mechanismen über die Signaltransduktion diese Rezeptors sind noch nicht bekannt. Wehling et al. (1994) diskutieren, ob aufgrund der Signalsbeschaffenheit nicht mehrere nebeneinander ablaufende Signalwege involviert sind. Christ et al. (1995) zeigen, daß neben IP<sub>3</sub> und Calcium auch DAG und die PKC an schnellen Effekten auf ALDO beteiligt sind. So konnte ein Anstieg der DAG-Produktion innerhalb von 30 Sekunden auf das doppelte des Ruhelevels durch ALDO ab Konzentrationen von 1nM gezeigt werden.

Selbstverständlich kann bei der Expression aus der hier injizierten RNA auch die gebildete Rezeptorkonzentration an der Oozytenmembran zu gering sein, sodaß es bei Aktivierung nicht zu einer generalisierten Calciumerhöhung kommt. Dafür sprechen die enorme Verdünnung der putativen RNA für einen membranständigen ALDO-Rezeptor im Pool der injizierten Gesamt- bzw. mRNA.

Obwohl die Qualität der RNA durch den untersuchten Northern-blot an Hand der Thrombin-Rezeptor-RNA gut war, ließ sich durch Injektion dieser RNA an WT-Oozyten auch kein Effekt auf Thrombin zeigen. Die Calciumreaktionen von VSMC auf Thrombin fallen im Vergleich zu ALDO um ein Vielfaches stärker aus. ALDO zeigte an VSMC und EC im Vergleich dazu jeweils nur schwache Signale.

Da die beschriebenen Calciumerhöhungen an VSMC bei Wehling et al. (1994) der perinucleären Region zuzuordnen sind, ist auch möglich, daß kleinste lokale Veränderungen der Calciumkonzentration im Inneren der Zelle durch Fluoreszenzmessung des Gesamtpools an FURA-2 im Cytosol nicht sichtbar geworden sind.

Allerdings kann mit der Fluoreszenzmessung die durchschnittliche intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-



Konzentration nach Angaben von Larabell und Nuticelli (1992) bis zu einer Tiefe von 400µm gemessen werden, was die Äquatorebene noch nicht überschreitet, hinter der sich der Kern auf der animalischen Polseite befindet.

In den eben beschriebenen Möglichkeiten wurden Ursachen für das nicht-Erkennen eines hypothetisch funktionell gebildeten ALDO-Membranrezeptors diskutiert. Selbstverständlich können auch bei der Expression und den Prozessen der posttranslationalen Modifizierung in den Oozyten unterschiedlich ablaufen und z.B. das Zusammenfügen eines aus mehreren Untereinheiten bestehenden Rezeptorkomplexes nicht funktionieren oder der Transport bzw. sein Einfügen in die Zellmembran, sodaß der Rezeptor nicht funktionell gebildet wurde.

#### **4.8. Vorzüge, weitere Anwendbarkeit und kritische Betrachtung des vorgestellten Expressions- und Testsystems an Oozyten von *Xenopus laevis***

Wie sich durch die Ergebnisse der hier vorgestellten Arbeit gezeigt hat, ist die Methodik des Expressionssystems in *Xenopus laevis* Oozyten in Kombination mit der Messung der Konzentration von intrazellulärem freiem Calcium hervorragend auch für die Anwendung auf Untersuchungen von Membranrezeptoren geeignet.

So haben sich die Calciumsignale durch Stimulierung des exogenen GnRH-Rezeptors sehr zuverlässig auslösen lassen. Daraus abgeleitet können spezifische Untersuchungen zur pharmakologischen und biochemischen Charakterisierung anschließen. Agonisten, Analoga und kompetitive Antagonisten können funktionell getestet werden und der Rezeptor läßt sich z.B. durch Mutationen detaillierter charakterisieren. Ebenso lassen sich Interaktionen zwischen zwei oder mehreren Rezeptoren und Ionenkanälen und die zugehörigen Signaltransduktionswege in Kombination oder isoliert untersuchen.

Dabei liegen die Vorzüge darin, daß durch die Untersuchung ein funktioneller Nachweis über ein zusammenwirkendes System erbracht wird. Mit den *Xenopus* Oozyten haben wir es mit relativ großen Zellen zu tun, an denen die Expression relativ einfach und sehr effizient durchzuführen ist.

Die Untersuchungen sind wenig stör anfällig und können bei Raumtemperatur ohne CO<sub>2</sub>-Begasung durchgeführt werden.

Durch RNA-injizierte *X.l.* Oozyten und anschließende elektrophysiologische Untersuchungen wurde eine Reihe von Membranproteinen entdeckt, z.B. beschreiben Lipinsky et al. (1995), den Thyrotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor (TRH-R) durch Injektion von aus Hypophysengewebe isolierten total RNA exprimieren zu können. Sie verwenden dafür allerdings die Hypophysen-Tumor Zell-Linie GH<sub>3</sub>, in der der TRH-R

stärker exprimiert wird. Die Expression wird bei ihnen elektrophysiologisch über die Zellmembran abgeleitete Ströme auf TRH-Zugabe nachgewiesen. Auch Yamashita et al. (1992) injizierte mRNA aus einer spezifischen Calcitonin ausschüttenden Zelllinie.

Trotzdem hat sich das hier vorgestellte Meßsystem zur Expressionsklonierung nicht ausreichend bewährt.

Neben den erfolglosen Versuchen, die Expression eines schnellen Steroidrezeptors funktionell nachzuweisen, konnte weder der Thrombinrezeptor, noch z.B. der Angiotensin II-Rezeptor durch das *Calcium-Imaging* nach Expression hinreichend gut nachgewiesen werden, obwohl sich die spezifische Thr-R-RNA in der injizierten RNA nachweisen ließ.

Höchstwahrscheinlich sind bei geringen und geringsten Rezeptorkonzentrationen elektrophysiologische Untersuchungen oder der Nachweis spezifischer Bindungsstellen gegenüber funktionellen Nachweismethoden durch Messung der freien intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration bezüglich der Sensitivität überlegen.

Lipinsky et al. (1995) beschreiben, daß der elektrophysiologisch über die Zellmembran abgeleitete Nachweis von Chloridströmen wesentlich empfindlicher sei, da aus kleinsten Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration oft starke Chloridströme hervorgehen.

Auch Sakuta et al. (1994) die am Beispiel von Reaktionen auf Vanadat an *Xenopus laevis* Oozyten das *Calcium Imaging* mit FURA-2 und die Methode des „*patch clamp*“ miteinander vergleichen, können elektrophysiologisch Reaktionen auf Vanadat in über dreifach verdünnten Konzentrationen erkennen.

Die Methode des *Calcium Imaging* an *Xenopus* Oozyten ist also vorzüglich dazu geeignet, stärkere Signale zu erfassen und daraufhin detaillierter zu untersuchen; Signale im Bereich der Nachweisgrenze, werden dagegen elektrophysiologisch sicherer erfaßt.

Fura-2 weist gegenüber Aequorin eine Reihe von Vorteilen auf, wie z.B. die Genauigkeit bei der Bestimmung von  $[Ca^{2+}]_i$ , die von der Farbstoffkonzentration unabhängig ist. Dennoch bietet das ursprünglich aus Leuchtquallen und anderen Tiefseefischen isolierte, 22kDa schwere Lumineszenz-Protein Aequorin einige Vorteile gegenüber fluoreszierenden Calcium-Indikatorfarbstoffen. Um Aufschluß über Calcium-Signale zu erhalten, müssen die Zellen nicht beleuchtet werden, daher können Störungen durch die Autofluoreszenz vermieden werden. Diese muß also nicht ermittelt werden. Daher werden Maßnahmen wie das Quenchen des Farbstoffes überflüssig und die Zellen können nach dem Experiment noch beobachtet werden. Z.B. konnten Wasserman et al. (1980) im Anschluß an ihre Messungen noch beobachten, welche der Oozyten erfolgreich gereift sind.

Außerdem zeigt Aequorin, welches in Eizellen injiziert wurde, höhere Amplituden einer Calciumwelle, als mit Indikatoren auf Fluoreszenzbasis ermittelt wird. Möglicherweise kommt deren Eigenschaft als Calciumpuffer deutlicher zum tragen.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit von Aequorin würde sich im Expressionssystem *Xenopus laevis* Oozyte ergeben. Da auch für Aequorin eukaryontische Expressionsvektoren zur Verfügung stehen, könnten diese gemeinsam mit solchen für die zu untersuchenden Rezeptoren in den Kern injiziert werden. Reagieren die Oozyten nicht auf den Rezeptor, läßt sich mit der Verwendung von Standardstimuli wie z.B. LPA eine erfolgreiche Expression nachweisen, da durch Vorhandensein von Aequorin eine Expression stattfinden mußte.

Darüberhinaus eröffnet die Expression kombiniert mit Hilfe von subzellulärem „Targeting“ die Möglichkeit, das gebildete Aequorin in bestimmte Zellkompartimente zu plazieren und so Calcium auf subzellulärer Ebene z.B. im endoplasmatischen Retikulum, im Zellkern, Cytosol oder in Mitochondrien zu messen (Haughland, 1997; Molecular Probes, 1994).

Auch läßt sich eine größere Anzahl von Oozyten parallel nebeneinander messen. Diese könne damit auf mögliche Effekte hin „gescreent“ werden. Beim Calcium-Imaging ließen sich mit der verwendeten Apperatur die Oozyten nur einzeln oder höchstens in Kleinstgruppen bis zu drei Oozyten nebeneinander messen.

Sandberg et al. (1992) geben an, daß Untersuchungen mit Fura-2 sehr viel schwerfälliger seien, als solche mit Aequorin, es lassen sich pro Zeit deutlich weniger Oozyten untersuchen, und sie seien zudem nach deren Untersuchungen 15-mal weniger sensitiv.

Auch wenn sich das hier vorgestellte Testsystem für Membranrezeptoren nicht zum Expressionsklonieren von Steroidmembranrezeptoren geeignet hat, konnte eine geeignete und funktionelle Methode zur pharmakologischen Rezeptorcharakterisierung am Beispiel des GnRH-Rezeptors etabliert werden.

Das Isolieren einer spezifischen RNA für einen Vertreter eines schnellen Steroidrezeptors muß durch andere Methoden der Molekularbiologie erfolgen. Wäre diese allerdings gefunden, ließe sich die Anwendbarkeit dieses Meßsystems zu weiteren Untersuchungen an Steroid-Membranrezeptoren erneut prüfen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Entwicklungsbiologen haben vor über 25 Jahren festgestellt, daß Progesteron (PROG) die Fortsetzung der Reifeteilung an *Xenopus* Oozyten durch nicht-genomische Mechanismen an der Plasmamembran initiiert. Obwohl mehrere Publikationen dabei keine oder nur späte Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  beschreiben, konnten Wasserman et al. an einigen Oozyten  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhungen innerhalb der ersten Minute nach PROG-Zugabe beobachten.

Diese Versuche sollten mit der Methode des *Calcium Imaging* reproduziert werden, wobei der Verlauf von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Fluoreszenzmessung und dem  $Ca^{2+}$ -Indikatorfarbstoff Fura-2 gemessen wurde. Dabei konnten innerhalb der ersten Minuten nach PROG-Zugabe keine Veränderungen von  $[Ca^{2+}]_i$  gefunden werden.

Lysophosphatidylsäure (LPA) hingegen löste sehr zuverlässig Calcium-Signale aus. Durch Thrombin, Angiotensin II und Acetylcholin ausgelöste Effekte ließen sich, wenn auch seltener, ebenfalls zeigen.

*Xenopus* Oozyten sind molekularbiologisch als eukaryontisches Expressionssystem nutzbar. Zur Etablierung des Expressions- und Testsystems wurde RNA in die Oozyten injiziert, die für den GnRH-Rezeptor kodiert. Nach erfolgreicher Expression steigt  $[Ca^{2+}]_i$  1-3 Minuten nach der Rezeptorbindung über eine Aktivierung von Phospholipase  $C_\beta$  und das  $InsP_3$  System an. Auch bei Injektion von weniger als 0,5ng RNA pro Oozyte in das Zytosol konnte nach zwei Tagen, bei weniger als 0,15ng nach vier Tagen, ein schnelles  $Ca^{2+}$ -Signal auf GnRH-Zugabe gesehen werden.

Ebenso zeigten diese Effekte auch Oozyten, bei denen ein eukaryontischer GnRH-Rezeptor-Expressionsvektor in den Kern mikroinjiziert wurde, nicht aber unbehandelte Oozyten oder andere Negativkontrollen.

An glatten Gefäßmuskelzellen (RSMC) kann *in vitro* eine schnelle Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  auf Aldosteron (ALDO) und an Spermatozoen auf PROG gezeigt werden. Zur Anwendung des Expressionssystems auf schnelle nicht-genomische Steroideffekte wurde einerseits aus diesen Zellen isolierte RNA in den Oozyten exprimiert, als auch RNA, welche für ein membranständiges Progesteron-bindendes Protein (mPR) kodiert. Durch Expression von RSMC-RNA konnte an Oozyten allerdings keine Calciumreaktion auf ALDO beobachtet werden; ebensowenig auf PROG durch Expression von RNA aus Mäusehoden oder mPR-RNA.

Die hier vorgestellte Methode ist daher weniger geeignet zur Screening-Untersuchung bei der Expressionsklonierung zur Isolierung putativer Rezeptoren aus Genbanken oder Gesamt-RNA. Insgesamt handelt es sich jedoch um ein sehr gutes System, die Expression eines Rezeptors funktionell nachzuweisen; weitere Untersuchungen zur Rezeptoraktivierung, Signaltransduktion und topographischen Signalausbreitung lassen sich anschließen.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Andresson T., Brooks C. und Ruderman J. V. (1996) Searching for the frog oocyte membrane-associated progesterone receptor.  
Keystone Symposia, Abstract-Band: Signalling in Neuronal Development, Differentiation and Degeneration. Silverthorne, Colorado. Abstr. 203.
- Arriza J.L., Weinberger C., Cerelli G., Glaser T.M., Handelin B.L., Housman D.E. und Evans R.M. (1987) Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary cDNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor.  
*Science* **237**, 268-275
- Baltus E., Hanocq-Quertier J. und Brachert J. (1977) Ionic requirements for induction of maturation (meiosis) in full-grown and medium sized *Xenopus laevis* oocytes.  
*Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 3461-3465
- Baulieu E.-E., Godecau F., Schorderet M. und Schorderet-Slatkine S. (1978) Steroid-induced meiotic division in *Xenopus laevis* oocytes: surface and calcium.  
*Nature* **275**, 593-598
- Baulieu E. -E. und Robel P. (1995) Non-genomic mechanisms of action of steroid hormones.  
Ciba Found Symp 1991, 24-37
- Belle R., Ozon R. und Stinnakre J. (1977) Free calcium in full grown *Xenopus laevis* oocyte following treatment with ionophore A23187 or progesterone.  
*Moll Cell Endocrinol* **8**, 65-72
- Berridge M. J. (1993) Inositol triphosphate and calcium signalling.  
*Nature* **361**, 315-325
- Blackhart B.D., Emilsson K., Nguyen D., Teng W., Martelli A.J., Nystedt S., Sundelin J. und Scarborough R.M. (1996) Ligand cross-reactivity within the protease-activated receptor family.  
*J Biol Chem* **271 (28)**, 16466-16471
- Blackmore P. F., Beebe S. J., Danforth D. R. und Alexander N. (1990) Progesterone and 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm.  
*J Biol Chem* **265**, 1376-1380
- Blackmore P. F. und Lattanzio F. A. (1991) Cell surface localization of a novel non-genomic progesterone receptor on the head of human sperm.  
*Biochem Biophys Res Commun* **181**, 331-336

- Blondeau J.P. und Baulieu E.E. (1984) Progesterone receptor characterized by photoaffinity labelling in the plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem J* **219(3)**, 785-792
- Brooker G., Seki T., Croll D. und Wahlestedt C. (1990) Calcium wave evoked by activation of endogenous or exoenously expressed receptors in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2813-2817
- Brooks J., Taylor P.L., Saunders P. T. K., Eidne K. A., Struthers W. J. und McNeilly A. S. (1993) Cloning and sequencing of the sheep pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor and changes in expression of its mRNA during the estrous cycle. *Mol Cell Endocrinol* **94**, R23-R27
- Buddhikot M., Falkenstein E., Wehling M. und Meizel S. (in press) Recognition of a human sperm surface protein involved in the progesterone-initiated acrosome reaction by antisera against an endomembrane progesterone binding protein from porcine liver. *Mol Cell Endocrinol* **158**, 187-193
- Cartaud A., Huchon D., Marot J., Ozon R. und Demaille J.G. (1981) Calmodulin is involved in the first step of oocyte maturation: effects of the antipsychotic drug fluphenazine and of anticalmodulin antibodies on the progesterone-induced maturation of *xenopus laevis* oocyte. *Cell Differ* **10 (6)**, 357-63.
- Chi L., Zhou W., Prikhozhan A., Flanagan C., Davidson J. S., Golembo M., Illing N., Millar R. P. und Sealton S. C. (1993) Cloning and characterization of the human GnRH receptor. *Mol Cell Endocrinol* **91**: R1-R6
- Christ M., Eisen C., Aktas J., Theisen K. und Wehling M. (1993) The inositol-1,4,5-trisphosphate system is involved in rapid nongenomic effects of aldosterone in human mononuclear leukocytes. *J Clin Endocrinol Metab* **77**, 1452-1457
- Christ M., Eisen C., Meyer C., Theisen K. und Wehling M. (1995) Immediate effects of aldosterone on diacylglycerol production and protein kinase C translocation in vascular smooth muscle cells. *Biophys Res Comm* **213**, 123-129
- Christ M. und Wehling M. (1999) Rapid actions of aldosterone: lymphocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells.

*Steroids* **64**, 35-41

Clapham D. E. (1995) Calcium Signalling.  
*Cell* **80**, 259-268

Cloud und Schuetz (1977) Interaction of progesterone with all or isolated portions of the amphibian (*Rana pipiens*) oocyte surface. Physical and biological characteristics.  
*Dev Biol* **60**, 359-370

Coffman G.K., Keem K. und Smith L.D. (1979) The progesterone receptor-like properties of *Xenopus laevis* oocyte melanosomes are probably due to eumelanin.  
*J Exp Zool* **207**, 375-382

Cork R. J., Cicirelli M. F. und Robinson K. R. (1987) A Rise in Cytosolic Calcium Is Not Necessary for Maturation of *Xenopus laevis* Oocytes.  
*Dev Biol* **121**, 41-47

Dai G., Levy O. and Carrasco N. (1996) Cloning and characterisation of the thyroid iodide transporter.  
*Nature* **379**, 358-360

Dascal N., Gillo B. und Lass Y. (1985) Role of Calcium Mobilization in Mediation of Acetylcholine-evoked Chloride Currents in *Xenopus laevis* Oocytes.  
*J Physiol* **366**, 299-313

Davis J. R. E., Bidey S. P. und Tomlinson S. (1992) Signal transduction in endocrine tissues  
*Clin Endocrinol* **36**, 437-449

Dersch M. A., Bement W. M., Larabell C. A., Mecca M. D. und Capco D. G. (1991) Cortical membrane-trafficking during the meiotic resumption of *Xenopus laevis* oocytes.  
*Cell Tissue Res* **263**, 375-383

Dolfi F., Carnero A., Ramponi G. und Lascal C. (1993) Microinjection of acylphosphatase blocks *Xenopus laevis* oocytes maturation induced by ras-p21.  
*FEBS Lett* **326**, 167-170

Doolan C.M. und Harvey B.J. (1996) Modulation of cytosolic protein kinase C and calcium ion activity by steroid hormones in rat distal colon.  
*J Biol Chem* **271**, 8763-8767

- Dumont J.N. (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin): stages of oocyte development in laboratory maintained animals.  
*J Morphol* **136**, 153-180
- Durieux M.E., Salafranca M.N., Lynch K.R. and Moorman J.R. (1992) Lysohosphatidic acid induces a pertussis toxin-sensitive  $Ca^{2+}$ -activated  $Cl^-$  current in *Xenopus laevis* oocytes.  
*Am J Physiol* **263**, C896-C900
- Durieux M. E., Salafranca M. N. und Lynch K. R. (1994) Trypsin induces  $Ca^{2+}$ -activated  $Cl^-$  currents in *X. laevis* oocytes.  
*FEBS Lett* **337 (3)**, 235-238
- Eidne K. A. (1994) Expression of receptors in *Xenopus* oocytes.  
Gould G. W. Membran protein expression systems, Portland Press London, 1994.
- Falkenstein E., Meyer C., Eisen C., Scriba P.C. und Wehling M. (1996) Full-length cDNA sequence of a progesterone membrane binding protein from porcine vascular smooth muscle cells.  
*Biochem Biophys Res Com* **229**, 86-89
- Falkenstein E., Heck M., Gerdes D., Grube D., Christ M., Weigel M., Buddhikot M., Meizel S. und Wehling M. (1999) Specific Progesterone Binding To a Membrane Protein And Related Nongenomic Effects On  $Ca^{2+}$ -fluxes in Sperm.  
*Endocrinology* **140 (12)**, 5999-6002
- Falkenstein E. Christ M., Feuring M. und Wehling M. (2000) Specific nongenomic actions of aldosterone.  
*Kidney Int* **57 (4)**, 1390-1394
- Falkenstein E., Eisen C., Schmieding K., Krautkramer M., Stein C., Losel R. und Wehling M. (2001) Chemical modification and structural analysis of the progesterone membrane binding protein from porcine liver membranes.  
*Mol Cell Biochem* **218**, 71-79
- Fan N. C. Jeung E. B., Peng C., Olofsson J. I., Krisinger J. und Leung P. C. K. (1994) The human gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene: cloning, genomic organization and chromosomal assignment.  
*Mol Cell Endocrinol* **103**, R1-R6
- Fernhout B. J. H., Dijcks F. A., Moolenaar W. H. und Ruigt G. S. F. (1992) Lysophosphatidic acid induces inward currents in *Xenopus laevis* oocytes; evidence for an extracellular site of action.  
*Eur J Pharmacol* **213**, 313-315



- Finidori-Lepicard J., Schorderet-Slatkine S., Hannoune J. und Baulieu E.E. (1981) Progesterone inhibits membrane-bound adenylate cyclase in *Xenopus laevis* oocytes.  
*Nature* **292**, 255-256
- Fluharty S. J., Reagan L. P. und White M. M. (1991) Endogenous and Expressed Angiotensin II Receptors on *Xenopus* Oocytes.  
*J Neurochem* **56**, 1307-1311
- Gekle M., Silbernagl S. und Oberleithner H. (1997) The mineralocorticoid aldosterone activates a proton conductance in cultured kidney cells.  
*Am J Physiol* **273**, C1673-C1678
- Genazzani A. D., Gamba O., Petraglia F., Volpe A., Battaglia C. und Genazzani A. R. (1997a) A long term treatment with gonadotropin-releasing hormone agonist plus a low-dose oral contraceptive improves the recovery of the ovulatory function in patients with polycystic ovary syndrome.  
*Fertil Steril* **67**, 463-468
- Genazzani A. D., Petraglia F., Sgarbi L., Montanini V., Hartmann B., Surico N., Biolcati A., Volpe A. und Genazzani A. R. (1997b) Difference of LH and FSH secretory characteristics and degree of concordance between postmenopausal and aging women.  
*Maturitas* **26**, 133-138
- Gerdes D., Christ M., Haseroth K., Notzon A., Falkenstein E. und Wehling M. (2000) Nongenomic actions of steroids—from the laboratory to clinical implications.  
*J Pediatr Endocrinol Metab* **13 (7)**, 853-878
- Gillo B., Lass Y., Nadler E. und Oron Y. (1987) The involvement of inositol 1,4,5-triphosphate and calcium in the two-component response to acetylcholine in *Xenopus* oocytes.  
*J Physiol* **392**, 349-361
- Goodhart M., Ferry N., Buscaglia M., Baulieu E.E. und Hanoune J. (1984) Does the guanine regulatory protein Ni mediate the progesterone inhibition of *Xenopus* oocyte adenylate cyclase?  
*EMBO J* **3**, 2653-2657
- Gronemeyer H., Turcotte B., Quirin-Stricker C., Bocquel M.T., Meyer M.E., Krozowski Z., Jeltsch J.M., Lerouge T., Garnier J.M. und Chambon P. (1987) The chicken progesterone receptor: sequence, expression and functional analysis.  
*EMBO J* **6**, 3985-3994

Grynkiewicz G., Poenie M. und Tsien R. Y. (1985) A New Generation of Ca<sup>2+</sup> Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties.  
*J Biol Chem* **260**, 3340-3350

Guddat U. und Pieler T. (1991) „In-vivo Transkription in *Xenopus*-Oocyten“ in  
Bertram S. und Gassen H. G. GENTECHNISCHE METHODEN, S. 282-289  
Gustav Fischer Verlag - Stuttgart - New York - 1991

Guendouz F., Blanchardie P., Denis M., Orsonneau J.-L und Lustenberger P. (1989)  
Occurrence of glucocorticoid binding sites in solubilized microsomes from rat  
liver.  
*J Steroid Biochem* **34**, 325-330

Gurdon J. B., Lane C. D., Woodland H. R. und Marbaix G. (1971) Use of Frog Eggs and  
Oocytes for the Study of Messenger RNA and its Translation in Living Cells.  
*Nature* **233**, 177-182

Hainaut P., Giorgetti S., Kowalski A. and Van Obberghen E. (1991) Insuline-like effects  
of vanadate on glucose uptake and on maturation in *Xenopus laevis* oocytes.  
*Cell Regulation* **2**, 317-327

Hanahan D. (1983) Studies on transformation fo *Escherichia coli* with plasmids.  
*J Mol Biol* **166**, 557-580

Hannun YA. (1996) Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress.  
*Science* **274**, 1855-1859

Haseroth K., Gerdes D., Berger S., Feuring M., Gunther A., Herbst C., Christ M. und  
Wehling M. (1999) Rapid nongenomic effects of aldosterone in  
mineralocorticoid-receptor-knockout mice.  
*Biochem Biophys Res Commun* **266**, 257-261

Haugland R. P. (1997) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals,  
Chapter 22.  
Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, USA

Haukkama M. (1976) Progesterone-binding properties of microsomes from rat liver.  
*J Steroid Biochem* **7**, 345-348

Houchi H., Okuno M., Tokurura A., Yoshizumi M., Fukuzawa K. und Oka M. (1995)  
Lysophosphatidic acid as a stimulator fo Na<sup>+</sup> dependent Ca<sup>2+</sup> efflux from  
adrenal chromaffin cells.  
*Life Sci* **57 (15)**, PL 205-210

- Jacobelli S., Hanocq J., Baltus E. und Brachet J. (1974) Hormone-induced maturation of *Xenopus laevis* oocytes: effects of different steroids and study of the properties of a progesterone receptor.  
*Differentiation* **2 (3)**, 129-35.
- Jennes L. und Conn P.M. (1994) Gonadotropin-releasing hormone and its receptors in rat brain.  
*Front Neuroendocrinol* **15**, 51-77
- Ji H., Sandberg K. und Catt K. J. (1990) Novel Angiotensin II Antagonists Distinguish Amphibian from Mammalian Angiotensin II Receptors Expressed in *Xenopus laevis* Oocytes.  
*Mol Pharmacol* **39**, 120-123
- Kaiser U.B., Zhao D., Cardona G.R. und Chin W. (1992) Isolation and characterization of cDNAs encoding the rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor.  
*Biochem Biophys Res Commun* **189 (3)**, 1645-1652
- Kaiser U. B., Katzenellenbogen R. A., Conn P. M. und Conn M. P. (1994) Evidence That Signalling Pathways by Which Thyrotropin-Releasing Hormone Act Are Both Common and Distinct.  
*Mol Endocrinol* **8 (8)**, 1038-1048
- Kakar S. S., Musgrove L. C., Devor D. C., Sellers J. C. und Neill J. D. (1992) Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor.  
*Biochem Biophys Res Commun* **189**, 289-295
- Kakar S. S., Rahe C. H. und Neill J. D. (1993) Molecular cloning, sequencing, and characterizing the bovine receptor for gonadotropin releasing hormone (GnRH).  
*Domest Anim Endocrinol* **10**, 335-342
- Kakar S. S. und Jennes L. (1995) Expression of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptor mRNAs in various non-reproductive human tissues.  
*Cancer Lett* **98**, 57-62
- Kakar S. S. und Neill J. D. (1995) The human gonadotropin-releasing hormone receptor gene (GNRHR) maps to chromosome band 4q13.  
*Cytogenet Cell Genet* **70**, 211-214
- Klijn J. M. G. und Foekens J. A. (1989) Extrahypothalamic actions.  
Vickey und Lunenfel, Basic Aspects. GnRH Analogues in Cancer and Human

Reproduction, 71-84

Koiter T. R., Moes H. und Schuiling G. A. (1988) Commercially available analogues of GnRH and LH secretion.

*Acta Endocrinol (Copenh)* **119**, 345-352

Kostellow A. B. Ma G.-Y. und Morrill G. A. (1993) Steroid action at the plasma membrane: progesterone stimulation of phosphatidylcholine-specific phospholipase C following release of the prophase block in amphibian oocytes.

*Mol Cell Pharmacol* **92**, 33-44

Kostellow A.B., Ma G.-Y. und Morrill G.A. (1996) Progesterone triggers the rapid activation of phospholipase D in the amphibian oocyte plasma membrane when initiating the G2/M transition.

*Biochim Biophys Acta* **1304**, 263-271

Kuscno K., Miledi R. und Stinnakre J. (1977) Acetylcholine receptors in oocyte membranes.

*Nature* **270**, 739-741

Lacy M. P., McIntosh R. P. und McIntosh J. E. A. (1989) Angiotensin II Stimulates Endogenous Response in *Xenopus laevis* Ovarian Follicles.

*Biochem Biophys Res Commun* **159**, 658-663

Larabell C. und Nuccitelli R. (1992) Inositol Lipid Hydrolysis Contributes to the  $Ca^{2+}$  Wave in Activating Egg of *Xenopus laevis*.

*Dev Biol* **153**, 347-355

Lau Y.-T., Reynhout J. K., Horowitz S. B. (1994) Membrane permeability changes during *Rana* oocyte maturation.

*Experimentia* **50**, 606-609

Lipinsky D., Nussenzweig D. R., Gershengorn M. C. und Oron Y. (1995) Desensitization of the response to thyrotropin-releasing hormone in *Xenopus* oocytes is an amplified process that precedes calcium mobilization.

*Eur J Physiol* **429**, 419-425

Liu, Z. und Patiño R. (1993) High-Affinity Binding of Progesterone to the Plasma Membrane of *Xenopus* Oocytes: Characteristics of Binding and Hormonal and Developmental Control.

*Biol Reproduction* **49**, 980-988

Logsdon C. D., Williams J. A., Stuenkel E. und Rosewicz S. (1990) Expression of  $Ca^{2+}$  mobilizing receptors in *Xenopus* oocytes: a tool for receptor characterization.

- Loosfelt H., Atger M., Misrahi M., Guiochon-Mantel A., Meriel C., Logeat F., Benarous R. und Milgrom E. (1986) Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone-receptor complementary DNA.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9045-9049
- Lüllmann H. und Mohr K. (1999) *Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen.* 14. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- Lupu-Meiri M., Shapira H. und Oron Y. (1990) Two types of muscarinic responses in *Xenopus* Oocytes: Differences in Latencies and  $45\text{Ca}^{2+}$  efflux kinetics.  
*Pflügers Arch* **417**, 391-397
- Maguire D., MacNamara B., Cuffe J.E., Winter D., Doolan C.M., Urbach V., O'Sullivan G.C. und Harvey B.J. (1999) Rapid responses to aldosterone in human distal colon  
*Steroids* **64**, 51-63
- Maller J.L. und Krebs E.G. (1980) Regulation of oocyte maturation.  
*Curr Top Cell Regul* **16**, 271-311
- Marot J., Belle R. und Ozon R. (1976) Recherches sur la maturation de l'ovocyte de *Xenopus laevis*. Arguments en faveur du rôle des ions calcium.  
*C R Acad Sci Paris* **282**, 1301-1304
- Masui Y., Meyerhof P.G., Miller M. A. und Wasserman W. J. (1977) Roles of divalent cations in maturation and activation of vertebrate oocytes.  
*Differentiation* **9**, 49-57
- McIntosh R. P. und McIntosh J. E. A. (1990) Diversity in Responses from Endogenous and Expressed Mammalian Receptors Which Cause Chloride Ion Efflux from Ovarian Follicles of *Xenopus laevis*.  
*Arch Biochem Biophys* **283**, 135-140
- Meyer C., Schmid R., Scriba P.C. und Wehling M. (1996) Purification and partial sequencing of a putative progesterone-receptor from porcine liver membranes.  
*Eur J Biochem* **239**, 726-731
- Misrahi M., Atger M., d'Auriol L., Loosfelt H., Meriel C., Fridlansky F., Guiochon-Mantel A., Galibert F. und Milgrom E. (1987) Complete amino acid sequence of the human progesterone receptor deduced from cloned cDNA.  
*Biochem Biophys Res Comm* **143**, 740-748

- Molecular Probes, Inc (1994) FURA-2 and INDO-1 - RATIONABLE CALCIUM INDICATORS.  
Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, USA: MP 1200 05/17/94
- Moolenaar (1995) Lysophosphatidic acid signalling  
*Curr Opin Cell Biol* **7 (2)**, 203-210
- Moreau M. Doree M. und Guerrier P. (1976) Electrophoretic introduction of calcium ions into the cortex of *Xenopus laevis* oocytes triggers meiosis reinitiation.  
*J Exp Zool* **197**, 443-449
- Moreau M, Vilain J. P. und Guerrier P. (1980) Free Calcium changes Associated with Hormone Action in Amphibian Oocytes  
*Dev Biol* **78**, 201-214
- Morrill G. A., Ziegler D. H. und Kostellow A. B. (1980) Kinetics of Calcium Efflux and Exchange from *Rana pipiens* Oocytes immediately following Reinitiation of the First Meiotic Division: Comparison of various Meiotic Agonists and Antagonists.  
*Cell Calcium* **1**, 359-370
- Morrill G.A., Ma G.-Y. und Kostellow A.B. (1994) Progesterone-induced phospholipid N-methylation and sphingomyelin synthesis in the amphibian oocyte plasma membrane: a second source of the 1,2-diacylglycerol second messenger associated with the G2/M transition.  
*Biochim Biophys Acta* **1224**, 589-596
- Morrill G. A. and Kostellow A. B. (1991) Role of Ions in Oocyte Function and the Meiotic Divisions.  
Kinne RKH (ed): Oogenesis, Spermatogenesis and Reproduction. Comp Physiol. Basel, Karger, 1991, 10, 37-85
- Mueller G.G., Herranen A.M. und Jerrell K.F. (1958) Studies on the mechanism of action of estrogens.  
*Rec Prog Horm Res* **14**, 95-139
- Nagahama Y. (1997)  $17\alpha,20\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: Mechanisms of synthesis and action.  
*Steroids* **62**, 190-196
- Naor Z. (1990) Signal transduction mechanisms of  $Ca^{2+}$  mobilizing hormones: the case of gonadotropin-releasing hormone.  
*Endocr Rev* **11**, 326-353
- Neill J.D., Duck L.W., Sellers J.C., Musgrove L.C., Scheschonka A., Druey K.M. und Kehrl

- JH. (1997) Potential role for a regulator of G protein signaling (RGS3) in gonadotropin-releasing hormone (GnRH) stimulated desensitization. *Endocrinology* **138 (2)**, 843-846
- Nemere I, Zhou L.-X. und Norman A.W. (1993) Nontranscriptional effects of steroid hormones. *Receptor* **3**, 277-291
- Nguyen Q.T., Stinnakre J. und Miledi R. (1996) Thrombin-induced membrane currents in native *Xenopus* follicles. *Pflugers Arch* **431 (6 Suppl 2)**, R237-238
- Oron Y und Dascal N. (1987) Regulation of intracellular Activity in *Xenopus* Oocytes. *Methods in Enzymology* **207**, 381-390
- O'Connor C.M., Robinson K.R. und Smith L.D. (1977) Calcium, potassium, and sodium exchange in full-grown and maturing *Xenopus laevis* oocytes. *Dev Biol* **61**, 28-40
- Pfaff S. L., Tamkun M. M., Taylor W. L. (1990) pOEV: A *Xenopus* Oocyte Protein Expression Vector. *Analytical Biochemistry* **188**, 192-199
- Picard A. und Doree D. (1983) Is calcium the second messenger of 1-methyladenine in meiosis reinitiation of starfish oocytes. *Exp Cell Res* **145**, 325-337
- Pietras R.J. und Szego C.M. (1977) Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* **265**, 69-72
- Reinhart J., Mertz L.M. und Catt K.J. (1992) Molecular cloning and expression of cDNA encoding the murine gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem* **267 (30)**, 21281-21284.
- Robinson K. R. (1985) Maturation of *Xenopus* oocytes is not accompanied by electrode-detectable calcium changes. *Dev Biol* **109**, 504-508
- Rosner W., Hyrb D.J., Khan M.S., Nakhhlā A.M. und Romas N. (1999) Androgen and estrogen signaling at the cell membrane via G-proteins and cyclic adenosine monophosphate. *Steroids* **64**, 100-106

- Rossato M., Nogara A., Merico M., Ferlin A. und Foresta C. (1999) Identification of functional binding sites for progesterone in rat Leydig cell plasma membrane. *Steroids* **64**, 168-175
- Sadler S. E. and Maller J. L. (1990) Identification of a Steroid receptor on the Surface of *Xenopus* Oocytes by Photoaffinity Labeling. *J Biol Chem* **257**, 355-361
- Sakuta H. (1994) Vanadate-induced oscillatory inward Cl<sup>-</sup> currents in *Xenopus laevis* oocytes. *Eur J Pharmacol* **268**, 305-309
- Sakuta H., Sekiguchi M., Okamoto K., Sakai Y. (1991) Endogenous angiotensin II receptors in *Xenopus* oocytes and eggs. *Eur J Pharmacol* **208**, 31-39
- Sandberg K., Bor M., Ji H., Marwick A., Millan M. A., Catt K. J. (1990) Angiotensin II-Induced Calcium Mobilisation in Oocytes by Signal Transfer Through Gap Junctions. *Science* **249**, 298-301
- Sandberg K., Ji H., Iida T. und Catt K.J. (1992) Intercellular Communication between Follicular Angiotensin Receptors and *Xenopus laevis* Oocytes: Mediation by an Inositol 1,4,5-Trisphosphate-dependent Mechanism. *J Cell Biol* **116**, 157-167
- Sato A., Liu J.P. und Funder J.W. (1997) Aldosterone rapidly represses protein kinase C activity in neonatal rat cardiomyocytes in vitro. *Endocrinology* **138**, 3410-3416
- Schmidt B.M.W., Christ M., Falkenstein E. und Wehling M. (1998) Nongenomic steroid actions: Completing the puzzle. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **106**, 441-445
- Schmidt b.M., Georgens A.C., Martin N., Tillmann H.C. Feurig M., Christ M. und Wehling M. (2001) Interaction of rapid nongenomic cardiovascular aldosterone effects with the adrenergic system. *J Clin Endocrinol Metab* **86(2)**, 761-767
- Schneider M., Ulsenheimer A., Christ M., und Wehling M. (1997) Nongenomic effects of aldosterone on intracellular Ca<sup>2+</sup> in porcine endothelial cells. *Am J Physiol* **272**, 616-620
- Schorderet-Slatkine S., Schorderet M. und Baulieu E.-E. (1977) Progesterone-Induced



- Meiotic Reinitiation in vitro in *Xenopus laevis* Oocytes.  
*Differentiation* **9**, 67-76
- Schultheiss M., Neumcke B. und Richter H.P. (1997) Endogenous trypsin receptors in *Xenopus* oocytes: linkage to internal calcium stores.  
*Cell Mol Life Sci* **53**, 842-849
- Sealfon S. C., Gillo B., Mundamattom S., Mellon P. L., Windle J. J., Landau E. und Roberts J. L. (1990) Gonadotropin-releasing hormone receptor expression in *Xenopus* oocytes.  
*Mol Endocrinol* **4 (1)**, 119-124
- Selye H. (1941) Anesthetic effect of steroid hormones.  
*Proc Soc Exp Biol Med* **46**, 116-121
- Smith L.D. (1981) Frog oocytes and sea urchin eggs: Steroid hormone and sperm induce similar events.  
*Fortsch Zool* **26**, 35-47
- Smith L.D. und Ecker R.E. (1971) The interaction of steroids with *Rana pipiens* oocyte in the induction of maturation.  
*Develop Biol* **25**, 232-247
- Spach C., und Streeten D. H. (1964) Retardation of sodium exchange in dog erythrocytes by physiological concentrations of aldosterone, in vitro.  
*J Clin Invest* **43**, 217-227
- Stith B. J., Kirkwood A. J. und Wohnlich E. (1991) Insulin-Like Growth Factor 1, Insulin, and Progesterone Induce Early and Late Increases in *Xenopus* Oocyte sn-1,2-Diacylglycerol Levels before Meiotic Cell Division.  
*J Cell Physiol* **149**, 252-259
- Stith B. J. und Maller J. L. (1984) The Effect of Insulin on Intracellular pH and Ribosomal Protein S6 Phosphorylation in Oocytes of *Xenopus laevis*.  
*Dev Biol* **102**, 79-89
- Stith B. J. und Maller J. L. (1985) Increased intracellular pH is not necessary for ribosomal protein S6 phosphorylation, increased protein synthesis, or germinal vesicle breakdown in *Xenopus* oocytes.  
*Dev Biol* **107**, 460-469
- Stith B. J. und Maller J. L. (1987) Induction of Meiotic Maturation in *Xenopus* Oocytes by 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate.  
*Exp Cell Res* **169**, 514-523

- Suyemitsu T. und Terayama H. (1975) Specific binding sites for natural glucocorticoids in plasma membranes of rat liver.  
*Endocrinology* **96**, 252-259
- Tanner J.W., Chen W., Young R.L., Longmore G.D. und Shaw A.S. (1995) The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases  
*J Biol Chem* **270**, 6523-6530
- Tigyi G., Dyer D., Matute C. und Miledi R. (1990) A serum factor that activates the phosphatidylinositol phosphate signaling system in *Xenopus* oocytes.  
*Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 1521-1525
- Tokumura A., Imori M., Nishioka Y., Kithara M., Sakashita M. und Tanaka S. (1994) Lysophosphatidic acids induce proliferation of cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta.  
*Am J Physiol* **267**, C204-210
- Tsutsumi M., Zhou W., Millar R. P., Mellon P. L., Roberts J. L. Flanagan C. A. Dong K., Gillo B., Sealson S. C. (1992) Cloning and Functional Expression of a Mouse Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor.  
*Mol Endocrinol* **6**, 1163-1169
- Turner K.O., Garcia M.A. und Meizel S. (1994) Progesterone initiation of the human sperm acrosome reaction: the obligatory increase in intracellular calcium is independent of the chloride requirement.  
*Mol Cell Endocrinol* **101**, 221-225
- Wallace R. A., Jared D. W., Dumont J. N. und Segal M. W. (1973) Protein incorporation by isolated amphibian oocytes. III. Optimum isolation conditions.  
*J Exp Zool* **184**, 321-334
- Wasserman, W. J. (1992) The Rapid Transient Decrease of sn-1,2-Diacylglycerol in Progesterone-Stimulated *Xenopus laevis* Oocytes Is the Result of an Ethanol Artifact  
*Dev Biol* **154**, 223-225
- Wasserman W. J., Pinto L. H., O'Connor C. M. und Smith L. D. (1980) Progesterone induces a rapid increase in  $[Ca^{2+}]_{in}$  of *Xenopus laevis* oocytes.  
*Proc Natl Acad Sci USA* **77**, 1534-1536
- Wasserman W.J. und Masui Y. (1975) Initiation of meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes by the combination of divalent cations and ionophore A23187.  
*J Exp Zool* **193**, 369-375

- Wasserman W.J. und Masui Y. (1976) A cytoplasmatic factor promoting oocyte maturation: its extraction and preliminary characterization.  
*Science* **191**, 1266-1268
- Wasserman W.J. und Smith L.D. (1981) Calmodulin triggers the resumption of meiosis in amphibian oocytes.  
*J Cell Biol* **89 (3)**, 389-394.
- Wehling M. (1994) Nongenomic Actions of steroid Hormones  
*Trends Endocrinol Metab* **5**, 347-353
- Wehling M., Käsmayr J. und Theisen K. (1991) Membrane receptors for aldosterone: a novel pathway for mineralocorticoid action.  
*Am Physiol* **263**, E974-E979
- Wehling M., Eisen C. und Christ M. (1992) Aldosterone-specific membrane receptors and rapid non-genomic actions of mineralocorticoids.  
*Mol Cell Endocrinol* **90**, C5-9
- Wehling M, Eisen C. und Christ M. (1993) Membrane receptors for aldosterone: a new concept of nongenomic mineralocorticoid action.  
*News Physiol Sci* **8**, 241-244
- Wehling M., Ulsenheimer A., Schneider M., Neylon C. und Christ M. (1994) Rapid effects of aldosterone on free intracellular calcium in vascular smooth muscle and endothelial cells: subcellular localisation of calcium elevation by single cell imaging.  
*Biochem Biophys Res Commun* **204**, 475-481
- Wehling M., Neylon C.B., Fullerton M., Bobik A. und Funder J.W. (1995) Nongenomic effects of aldosterone on intracellular calcium in vascular smooth muscle cells.  
*Circ Res* **76**, 973-979
- Wehling M., Spes C.H., Win N., Janson C.P., Schmidt B.M.W., Theisen K. und Christ M. (1998) Rapid Cardiovascular Action of Aldosterone in Man.  
*J Clin Endocrinol Metab* **83**, 3517-2522
- Winstrom C. A. und Meinzel S. (1993) Evidence Suggesting Involvement of a Unique Human Sperm Steroid Receptor / Cl<sup>-</sup> Channel Complex in the Progesterone-Initiated Acrosome Reaction.  
*Dev Biol* **159**, 679-690
- Woodward R.M. und Miledi R. (1991) Angiotensin II receptors in *Xenopus* oocytes.

*Proc R Soc Lond B* **244**, 11-19

Yamada M. und Miyaji H. (1982) Binding of sex hormones by male rat liver microsomes.

*J Steroid Biochem* **16**, 437-446

Yamashita M., Schroeder J. I., Umbach J. A. und Gundersen C. B. (1992) Expression of  $Ca^{2+}$  receptors in *Xenopus* oocytes injected with poly(A)<sup>+</sup> mRNA from a rat calcitonin-secreting cell line.

*Biochem Biophys Res Commun* **184**, 1235-1240

Yew N., Mellini M.L. und Vande Woude G.F. (1992) Meiotic initiation by the *mos* protein in *Xenopus*.

*Nature* **355**, 649-652

## DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. M. Wehling danke ich für die Themenstellung und Bereitstellung der für diese Arbeit notwendigen Geräte und Reagentien und sein Interesse für den Fortgang der Arbeit.

Herrn Dr. C. Eisen danke ich für die liebevolle Betreuung der Arbeit, für die Hilfe bei der Einarbeitung in das Thema, die Arbeitstechniken und Methoden sowie für seine Unterstützung auch nach dem Verlassen der Arbeitsgruppe.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und das freundliche Arbeitsverhältnis, insbesondere Herrn Dr. Manfred Schneider, Herrn Dr. Axel Ulsenheimer, Herrn Dr. Johannes Manegold, Herrn Dr. Michael Christ, Frau Dr. Elisabeth Falkenstein, Frau Dr. Christiane Meyer, Frau Kathrin Sippel und Herrn Konstantinos Pæsestis.

Bei Herrn Dr. R. Lösel bedanke ich mich für die interessierte und aufmerksame Durchsicht des Manuskripts und seine wertvollen Hinweise.

Im Klinikum Innenstadt möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Herrn Dr. O. E. Janßen und Herrn Prof. Dr. S. Endres für die gute Zusammenarbeit bedanken, besonders Herrn Dr. H. Grasberger, Frau Dr. S. Wagner und Frau Dr. A. Krug.

Ich danke Herrn Dr. Klaus Baumann sowie Herrn Dr. Sealfon für das zur Verfügungstellen der cDNA für den GnRH-Rezeptor.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn PD Dr. St. Zahler danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern, Geschwistern und Freunden sowie meiner Ehefrau für die moralische Unterstützung und deren Verständnis und Geduld bedanken.

## LEBENS LAUF

### **Anschrift und persönliche Daten:**

Jörg Michael Thomas Eberhard R E I C H E R T,  
Lochhamer Str. 9, 82166 Gräfelfing,  
geboren am 25.04.1972 in München.  
verheiratet mit Aleksandra Reichert, geb. Leszkowicz.

### **Schulbildung:**

1978-82 Volksschule Lochham,  
1982-91 Feodor-Lynen-Gymnasium Planegg,  
(mathematisch-naturwissenschaftlich).

### **Studium:**

Nov. 1991: Beginn des Medizinstudiums an der Ludwigs-Maximilians-  
Universität München.  
Sep. 1993: Physikum.  
Aug. 1994: I. Abschnitt der ärztlichen Prüfung.  
Aug. 1997: II. Abschnitt der ärztlichen Prüfung.  
anschl: Praktisches Jahr:  
Frauenklinik, Klinikum Großhadern, München,  
Medizinischen Klinik, Klinikum Innenstadt, München,  
Childrens Hospital, Boston, MA, U.S.A.  
Nov. 1998: III. Abschnitt der ärztlichen Prüfung.

### **Beruflicher Werdegang:**

Jan. 1999: Arzt im Praktikum in der Abt. f. öffentliches  
Gesundheitswesen im Landratsamt München.  
Mär. 2000: Arzt im Praktikum im Stationsdienst für Innere Medizin  
in der Medizinischen Klinik, Klinikum Innenstadt der  
Ludwig-Maximilians-Universität, München.  
Feb. 2001: Erteilung der Approbation als Arzt  
Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik, Klinikum  
Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität, München.  
Jun. 2001: Assistenzarzt an Institut und Poliklinik für Arbeits- und Umwelt-  
medizin, Klinikum der Universität München - Innenstadt.