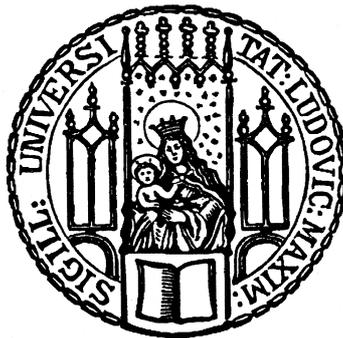


# ProNGF/NGF in humanen Granulosazellen

Sabine Ströbl

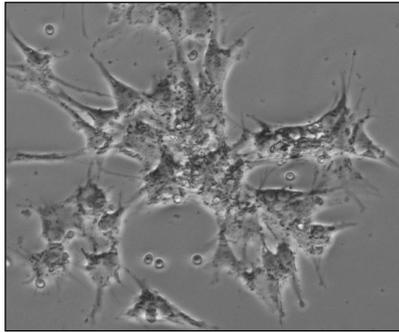


Dissertation der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

München 2013



## **ProNGF/NGF in humanen Granulosazellen**



von  
Sabine Ströbl

Diese Dissertation wurde angefertigt  
unter der Leitung von Prof. Dr. Artur Mayerhofer  
am Lehrstuhl Anatomie III – Zellbiologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstgutachter: PD Dr. Lars Kunz

Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Schleicher

Tag der Abgabe: 09.12.2013

Tag der mündlichen Prüfung: 03.04.2014

## ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist.

Die vorliegende Dissertation wurde weder ganz, noch in wesentlichen Teilen bei einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Ich habe noch zu keinem früheren Zeitpunkt versucht, eine Dissertation einzureichen oder an einer Doktorprüfung teilzunehmen.

München, den 09.12.2013

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>4</b>
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>6</b>
2.1 Neurotrophine im Ovar.....	6
2.1.1 Neurotrophine allgemein .....	6
2.1.2 Nerve Growth Factor .....	7
2.1.2.1 Struktur und Synthese des Nerve Growth Factor .....	7
2.1.2.2 Rezeptoren und Signalwege des Nerve Growth Factor.....	10
2.1.2.3 Die Rolle des Nerve Growth Factor in nicht neuronalem Gewebe .....	14
2.2 Das Ovar .....	15
2.3 Follikelreifung, ovarieller Zyklus und Atresie .....	16
2.4 Granulosazellen .....	21
2.5 Matrix-Metalloproteasen .....	21
2.5.1 Funktion von Matrix-Metalloproteasen .....	22
2.5.1.1 MMP7 .....	23
2.5.1.2 MMP9 .....	24
2.6 Polycystisches Ovarialsyndrom .....	25
2.7 <i>In vitro</i> Fertilisation.....	26
2.8 Ziele der Arbeit.....	27
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>28</b>
3.1 Nachweis der Komponenten des proNGF/NGF-Systems in humanen Granulosazellen .....	28
3.1.1 ProNGF und NGF.....	28
3.1.1.1 ProNGF und NGF werden in humanen Granulosazellen exprimiert.....	28
3.1.1.2 ProNGF ist ein Bestandteil der Follikelflüssigkeit.....	34
3.1.2 Die Rezeptoren von proNGF und NGF: TrkA, p75 <sup>NTR</sup> und Sortilin .....	36
3.1.3 Die Prozessierungsenzyme MMP7 und MMP9 sind im humanen und im Affenfollikel vorhanden:.....	41
3.1.4 Komponenten des proNGF/NGF-Systems sind im Gelbkörper nachweisbar.....	47
3.2 Funktionen des proNGF/NGF-Systems in humanen Granulosazellen.....	48
3.2.1 Einfluss von proNGF und NGF Stimulation auf die MAPK Phosphorylierung .....	48
3.2.2 Einfluss von proNGF und NGF auf die Vitalität der humanen Granulosazellen .....	50
3.2.2.1 ProNGF und NGF haben keinen nachweisbaren Effekt auf das Zellwachstum von humanen Granulosazellen.....	50
3.2.2.2 ProNGF und NGF haben keinen signifikanten Einfluss auf die Caspaseaktivität in humanen Granulosazellen.....	52
3.2.2.3 Das Wachstumsverhalten von humanen Granulosazellen wird von proNGF und NGF nicht beeinflusst .....	54
3.2.3 Die Regulation von Egr-1 wird durch NGF, aber nicht durch proNGF beeinflusst.....	55
3.2.4 ProNGF und NGF haben keinen Einfluss auf den intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Spiegel.....	58
3.3 Nebenprojekt: Decorin als Signalmolekül im Ovar .....	59
3.3.1 Decorin ist in den humanen Granulosazellen detektierbar .....	59
3.3.2 Decorin ist in der Follikelflüssigkeit nachweisbar .....	60
3.4.3 Einfluss von Decorin auf die Vitalität der humanen Granulosazellen .....	61

---

3.4.3.1 Decorin und EGF haben tendenziell antiapoptotische Effekte auf humane Granulosazellen.....	61
3.4.3.2 Decorin erhöht die intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Spiegel .....	63
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>64</b>
4.1 Die Komponenten des proNGF/NGF-Systems sind in den humanen Granulosazellen vorhanden .....	64
4.2 Wirkung von proNGF und NGF .....	67
4.3 Unterschiede in den mRNA Expressionslevel von Patientinnen ohne und mit PCOS.....	69
4.4 Decorin als Signalmolekül im Ovar.....	71
<b>5. Methoden.....</b>	<b>73</b>
5.1 Zellbiologische Methoden .....	73
5.1.1 Isolation von humanen Granulosazellen aus Follikelpunktat .....	73
5.1.2 Kultivierung und Stimulation der humanen Granulosazellen .....	74
5.1.3 CASY – automatische Zellzählung und Vitalitätsbestimmung .....	74
5.1.4 ATP-Assay .....	75
5.1.5 Caspase-Assay .....	75
5.1.6 Wachstumsverhalten.....	76
5.1.7 Ca <sup>2+</sup> -Messung .....	76
5.1.8 Immunhistochemie .....	76
5.2 Molekularbiologische Methoden .....	77
5.2.1 RNA-Isolation .....	77
5.2.2 cDNA-Synthese.....	78
5.2.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	78
5.2.4 quantitative real-time PCR (qPCR) .....	79
5.3 Proteinbiochemische Methoden .....	80
5.3.1 Proteinisolation.....	80
5.3.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	80
5.3.3 Western Blot.....	81
5.3.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	81
5.3.4.1 ProNGF ELISA .....	81
5.3.4.2 DCN ELISA.....	82
5.4 Statistik.....	82
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>83</b>
<b>7. Danksagung .....</b>	<b>98</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>99</b>
8.1 Abbildungsverzeichnis .....	99
8.2 Tabellenverzeichnis .....	101
8.3 Abkürzungsverzeichnis .....	102
8.4 Material .....	105
8.4.1 PCR Primer .....	105
8.4.2 Real-time PCR Primer.....	105
8.4.3 Primärantikörper.....	106
8.4.3.1 Für Western Blot.....	106

---

8.4.3.2 Für Immunhistochemie .....	107
8.4.4 Sekundärantikörper .....	107
8.4.5 Kontrollantigene .....	107
8.4.6 Chemikalien.....	108
8.4.7 Kits und Assays.....	109
8.4.8 Verbrauchsmaterialien .....	110
8.4.9 Geräte.....	111
8.4.10 Puffer und Lösungen.....	112
8.4.11 Stimulanzen.....	114
8.4.12 Medien.....	114
8.4.13 Zelllinien .....	114
8.4.14 RNA Proben .....	114
8.4.15 Gewebeproben.....	114
8.5 Publikationen .....	115

## 1. Zusammenfassung

Neurotrophine sind Wachstumsfaktoren und ihre Funktionen im zentralen und peripheren Nervensystem wurden in der Vergangenheit eingehend untersucht. Der bekannteste Vertreter dieser Signalproteine ist der Nerve Growth Factor (NGF). Die Wirkung von Neurotrophinen ist jedoch nicht nur im Nervensystem von Bedeutung, sondern auch in Zellen anderer Gewebe, wie z.B. dem Ovar. Im Rattenovar konnte kürzlich gezeigt werden, dass NGF die Entwicklung von präantralen Follikeln fördert und an der Regulation der Ovulation und der ovariellen Angiogenese beteiligt ist. Im Nervensystem wurde nachgewiesen, dass NGF das Überleben der Zellen fördert, seine Pro-Form – proNGF – hingegen führt zum Zelltod. Im Rahmen der Follikelatresie ist der Zelltod im humanen Ovar von großer Bedeutung. Daher stellte sich die Frage, ob proNGF neben NGF ebenfalls im Ovar vorkommt und ob proNGF eine ähnliche Rolle spielt wie im Nervensystem.

Diese Frage wurde in einem humanen Zellmodell für den Follikel überprüft. Für dieses Zellmodell wurden humane Granulosazellen (hGC) und Follikelflüssigkeiten (FF) von IVF-Patientinnen (*in vitro* Fertilisation, künstliche Befruchtung) verwendet. Ergänzend dazu wurden auch ovarielle Gewebeproben von Mensch und Affe als *in vivo* Modell für immunhistochemische Untersuchungen benutzt. Neben NGF konnte erstmals proNGF an unterschiedlichen Kultivierungstagen in den humanen Granulosazellen sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene detektiert werden. ProNGF konnte zudem auch in der Follikelflüssigkeit von IVF-Patientinnen auf Proteinebene nachgewiesen werden. Zusätzlich zu proNGF und NGF konnte auch die Expression ihrer Rezeptoren – TrkA, p75<sup>NTR</sup> und Sortilin – in den humanen Granulosazellen auf mRNA- und auf Proteinebene gezeigt werden, ebenso wie die Expression der proNGF und NGF prozessierenden Enzyme Matrix-Metalloprotease (MMP) 7 und MMP9. Damit übereinstimmend konnten im ovariellen Gewebe von Mensch und Rhesusaffe proNGF und NGF ebenfalls in der Follikelflüssigkeit und den Granulosazellen sowie auch in den Thekazellen (TC) immunhistochemisch verifiziert werden. Des Weiteren wurde MMP7 in diesen beiden Zelltypen und auch in der Follikelflüssigkeit exprimiert, TrkA dagegen nur in den Granulosa- und Thekazellen. Außerdem wurden proNGF, NGF, TrkA, MMP7 und MMP9 im Gelbkörper (*corpus luteum*) gefunden. Somit wurden alle wichtigen Komponenten des proNGF/NGF-Systems sowohl im *in vitro* Modell (humane Granulosazellen und Follikelflüssigkeit) als auch *in vivo* (Gewebeschnitte) nachgewiesen.

Das proNGF/NGF-System wurde nicht nur in humanen Granulosazellen aus IVF-Patientinnen untersucht, sondern auch in Granulosazellen aus IVF-Patientinnen mit PCOS (Polycystisches Ovarialsyndrom). Diese Proben waren jedoch nur in geringen Mengen verfügbar. Das PCOS ist die häufigste Ursache für anovulatorische Infertilität bei Frauen im geschlechtsreifen Alter und geht mit einem veränderten Follikelwachstum einher. Möglicherweise gibt es zwischen diesen beiden Patientengruppen – Frauen mit und ohne PCOS – Unterschiede im proNGF/NGF-System. Der Vergleich bestimmter Faktoren in den humanen Granulosazellen aus IVF-Patientinnen mit und ohne PCOS zeigte jedoch, dass es weder in den frischen, unkultivierten Zellen (Tag 0) noch in den drei Tage kultivierten Zellen große Unterschiede im mRNA Gehalt von proNGF/NGF, Sortilin und MMP9 gab. Nur an Versuchstag drei war die proNGF/NGF mRNA Menge in den Granulosazellen von PCOS Patientinnen signifikant geringer als bei den Patientinnen ohne PCOS.

Die an unterschiedlichen Kultivierungstagen durchgeführten Vitalitäts- und Caspase-Assays zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen der Behandlung mit proNGF und der Behandlung mit NGF. Dies deutet darauf hin, dass proNGF hier eine distinkt unterschiedliche Rolle zu seiner Wirkung im Nervensystem haben könnte und den Zelltod im Ovar nicht induziert. Außerdem zeigten diese Ergebnisse, dass die für NGF im Nervensystem postulierte proliferative Wirkung in den luteinisierten Granulosazellen nicht vorhanden ist.

Schließlich konnte nachgewiesen werden, dass nur durch NGF die Proteinmengen des Early growth response protein 1 (Egr-1), einem zentralen Transkriptionsfaktor des NGF-Signalwegs, in den zwei bzw. drei Tage kultivierten humanen Granulosazellen signifikant erhöht wurden. ProNGF dagegen hatte keinen Einfluss auf die verstärkte Bildung von Egr-1.

Ein weiterer Punkt von Interesse war die Wirkung von Decorin (DCN), einem kleinen Molekül der extrazellulären Matrix, auf die humanen Granulosazellen. In einem Antikörper-basierenden Assay konnte gezeigt werden, dass es durch Behandlung von humanen testikulären peritubulären Zellen (HTPC) mit Decorin zur Phosphorylierung von TrkA, dem Rezeptor von NGF, kommt (Dissertation Marion Adam). In den humanen Granulosazellen konnte Decorin sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene sowie in der Follikelflüssigkeit von IVF-Patientinnen erstmals nachgewiesen werden. Daher wurde seine Funktion untersucht. Decorin bewirkte zum einen in den humanen Granulosazellen eine Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegel. Zum anderen hatte Decorin keine apoptotische Wirkung auf die Granulosazellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle wichtigen Faktoren des proNGF/NGF-Systems in den humanen Granulosazellen vorhanden sind. ProNGF konnte zum ersten Mal in den humanen Granulosazellen und der Follikelflüssigkeit nachgewiesen werden. Unterschiede in der Wirkungsweise von proNGF und NGF auf die Zellen, wie sie im Nervensystem zu finden sind, konnten aber nicht festgestellt werden. So wirkte proNGF nicht apoptotisch und NGF nicht proliferativ auf die humanen Granulosazellen. ProNGF hat eher den Effekt einer inaktiven Pro-Form. Im Vergleich zum trophischen NGF konnte für proNGF keine spezifische Wirkung gefunden werden. Neben proNGF konnte auch Decorin als ein neuer Faktor in den humanen Granulosazellen identifiziert und erste Funktionen gezeigt werden. So könnte dieser bisher im Ovar noch uncharakterisierte Faktor an der Regulation wichtiger ovarieller Funktionen beteiligt sein.

## 2. Einleitung

### 2.1 Neurotrophine im Ovar

#### 2.1.1 Neurotrophine allgemein

Neurotrophine sind eine Familie von strukturell und funktionell verwandten Proteinen. Das erste identifizierte Neurotrophin war der Nerve Growth Factor (1952). Etwa 20 Jahre später konnte ein weiterer wachstumsfördernder Faktor, der Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), aus dem Schweinegehirn aufgereinigt werden. Die Wirkung dieses Faktors bezog sich auf verschiedene neuronale Zellpopulationen, auf die NGF keine Effekte hatte. Die strukturelle Ähnlichkeit der beiden Faktoren führte somit zum Begriff der Neurotrophin-Familie (Barde et al. 1982, Hofer und Barde 1988, Leibrock et al. 1989). Durch Analyse der Sequenzhomologie konnten weitere Proteine dieser Familie von Wachstumshormonen identifiziert werden. In Säugern zählen zu dieser Familie der Wachstumshormone NGF (Cohen und Levi-Montalcini 1956, Angeletti und Bradshaw 1971, Levi-Montalcini 1987), BDNF (Barde et al. 1982, Barde et al. 1987, Leibrock et al. 1989), Neurotrophin-3 (NT-3) (Ernfors et al. 1990a, Hohn et al. 1990, Jones und Reichardt 1990, Kaisho et al. 1990, Maisonpierre et al. 1990, Rosenthal et al. 1990) sowie Neurotrophin-4 (NT-4) (Hallböök et al. 1991, Ip et al. 1992), das auch als Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) (Berkemeier et al. 1991) bekannt ist. Die Bezeichnung NT-4/5 stammt daher, weil es unsicher war, ob das humane NT-5 (Berkemeier et al. 1991) ein Homologes zu NT-4 aus *Xenopus* (Hallböök et al. 1991) ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Unterschiede zwischen den beiden Faktoren NT-4 und NT-5 auf phylogenetische Variationen zurückzuführen sind (Ip et al. 1992, Ip et al. 1993). Diese vier Neurotrophine konnten in allen untersuchten Säugetieren nachgewiesen werden. Zusätzlich gehören zwei weitere Neurotrophine, nämlich Neurotrophin-6 (NT-6) (Götz et al. 1994) und Neurotrophin-7 (NT-7) (Lai et al. 1998, Nilsson et al. 1998) zu dieser Gruppe von Hormonen. NT-6 und NT-7 konnten bisher jedoch nur in Fischen (Platy und Karpfen) gefunden werden und haben in Säugern und Vögeln keine Orthologen (Götz et al. 1994, Nilsson et al. 1998). Dennoch scheinen sie mit denselben Rezeptoren zu interagieren wie die Wachstumsfaktoren aus Säugetieren.

Ursprünglich wurden die Neurotrophine als Überlebensfaktoren für sympathische und sensorische Neuronen identifiziert (Purves et al. 1988, Purves 1990, Oppenheim 1991). Sie wirken dabei als interzelluläre Überlebenssignale zwischen Zielgewebe und Neuronen, die diese in Form von Proteinen sezernieren. Neben ihrer ursprünglichen Funktion, das Überleben und die Differenzierung spezifischer neuronaler Bestandteile des peripheren und zentralen Nervensystems zu fördern (Levi-Montalcini 1987, Barde 1989, Barde 1994, Thoenen 1995, Huang und Reichardt 2001), konnte eine Beteiligung der Neurotrophine an weiteren Prozessen nachgewiesen werden. So sind diese Faktoren an vielen zytologischen/physiologischen Regelmechanismen der neuronalen Entwicklung beteiligt, wie beispielsweise an der Regulation der Neuroblastenproliferation, des Neuritenwachstums, der Modulation synaptischer Plastizität und der Synapsenformierung, der Erhaltung des Überlebens der Zelle sowie der Induktion der Apoptose (Lewin und Barde 1996, Bibel und Barde 2000, Kaplan und Miller 2000, Huang und Reichardt 2001, Shooter 2001, Dechant und Barde 2002, Chao 2003, Huang und Reichardt 2003, Lu et al. 2005).

Außer ihrer physiologischen Rolle werden Neurotrophine auch mit neurologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Beispielsweise sind Neurotrophine an der Alzheimererkrankung (Mufson et al. 1989, Phillips et al. 1991), an Morbus Parkinson (Hyman et al. 1991), der Epilepsie (Gall und Isackson 1989, Isackson et al. 1991) und an Krebserkrankungen des zentralen Nervensystems (Kogner et al. 1993, Segal et al. 1994, Ryden et al. 1996) beteiligt.

Neurotrophine aus der Familie der Wachstumsfaktoren sind in allen Vertebraten identifiziert worden, sind aber bei den Säugern am besten untersucht. Daneben konnten in den letzten Jahren Neurotrophine und ihre Rezeptoren auch in Invertebraten nachgewiesen werden (Bothwell 2006). Sequenziell sind sich die einzelnen Neurotrophine sehr ähnlich. So besteht bei Säugetieren zwischen NGF, BDNF, NT-3 und NT-4/5 eine etwa 50%ige Identität in der biologisch aktiven C-terminalen Region (Hohn et al. 1990, Maisonpierre et al. 1990, Rosenthal et al. 1990, Binder und Scharfman 2004). Ebenso ist die Pro-Domäne der einzelnen Neurotrophine bei Vertebraten hoch konserviert und erfüllt wichtige Funktionen (Suter et al. 1991) (siehe 2.1.2.1 Struktur und Synthese des Nerve Growth Factor).

### **2.1.2 Nerve Growth Factor**

Aus der Familie der Neurotrophine ist NGF der am besten untersuchte und charakterisierte Wachstumsfaktor und gilt als Prototyp der Neurotrophine. Rita Levi-Montalcini konnte im Jahr 1951 nachweisen, dass auf einen Hühnerembryo aufgebrachtes Sarcomergewebe eine diffundierbare Substanz freisetzt, die neben der Differenzierung der Nervenzellen auch das Neuritenwachstum fördert. Diese Substanz wurde NGF genannt (Levi-Montalcini 1952, Levi-Montalcini und Hamburger 1953, (Cohen et al. 1954). Für die biologische Charakterisierung von NGF verwendeten Rita Levi-Montalcini und Stanley Cohen NGF aus der Giftdrüse von Schlangen und NGF aus der submaxillaren Speicheldrüse von Mäusen, da dieser Faktor dort in sehr hohen Konzentrationen vorhanden ist (Cohen et al. 1954, Levi-Montalcini und Cohen 1956, Cohen 1959, Cohen 1960). 1986 erhielten Rita Levi-Montalcini und Stanley Cohen für ihre Entdeckung und Charakterisierung von NGF den Nobelpreis für Physiologie/Medizin.

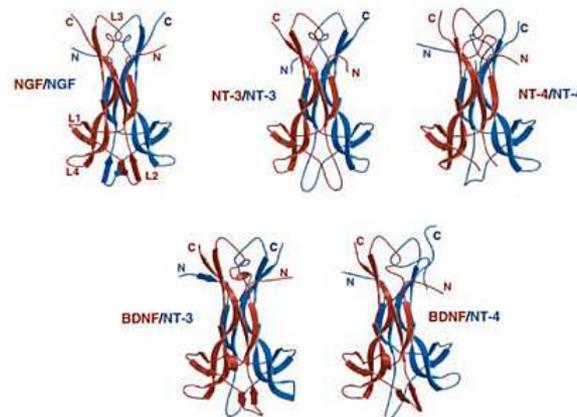
#### **2.1.2.1 Struktur und Synthese des Nerve Growth Factor**

Durch die Gewinnung von NGF in sehr großen Mengen aus den submaxillaren Speicheldrüsen von Mäusen hatte man die Möglichkeit, die Struktur von NGF, dessen Biosynthese und seine biologische Aktivität genauer zu untersuchen (Varon et al. 1967, Bocchini und Angeletti 1969). Daher ist dieses NGF auch das am meisten und am besten untersuchte.

Generell werden alle Neurotrophine als Pro-Formen (Pro-Neurotrophine) synthetisiert, die aus einer Signalsequenz, der Pro-Domäne mit einem glykosylierten N-Terminus sowie dem hoch konservierten C-Terminus bestehen. Das Molekulargewicht der Pro-Neurotrophine liegt etwa zwischen 30 kDa und

35 kDa. Die reifen, biologisch aktiven Formen der Neurotrophine (118 – 120 Aminosäuren bzw. 12 kDa – 14 kDa) entstehen durch Spaltung der dibasischen, hoch konservierten Schnittstellen in den Pro-Neurotrophinen (Angeletti und Bradshaw 1971, Leibrock et al. 1989, Maisonpierre et al. 1990, Seidah et al. 1996, Chao und Bothwell 2002).

Neben ihrer Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz besteht zwischen den einzelnen Neurotrophinen auch eine strukturelle Verwandtschaft. Die einzelnen Abschnitte mit sequenziellen Unterschieden oder sequenzieller Ähnlichkeit sind unter den einzelnen Neurotrophinen gebündelt, was auf mögliche Abschnitte struktureller und funktioneller Wichtigkeit hindeutet (Ibanez 1995). Die reifen Neurotrophine liegen als stabile, nicht kovalent verbundene Homodimere vor (McDonald et al. 1991, Holland et al. 1994, Robinson et al. 1995, Butte et al. 1998, Robinson et al. 1999, Wiesmann und Vos 2001) (Abbildung 1). Daneben konnten auch Heterodimere aus BDNF und NT-3 sowie BDNF und NT-4/5 nachgewiesen werden (McDonald et al. 1991, Holland et al. 1994, Robinson et al. 1995, Butte et al. 1998, Robinson et al. 1999) (Abbildung 1).

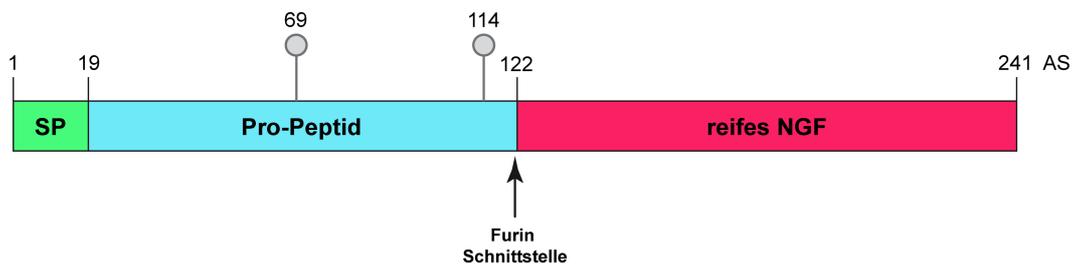


**Abbildung 1: Homodimer- und Heterodimerbildung einzelner Neurotrophine.**

NGF, NT-3 und NT-4 bilden jeweils Homodimere. BDNF kann zusätzlich auch mit NT-3 bzw. NT-4 Heterodimere bilden. C: C-Terminus. N: N-Terminus. Abbildung aus Wiesmann und Vos 2001.

*In vivo* wird NGF als Prä-Pro-Peptid exprimiert/translatiert (Berger und Shooter 1977, Ullrich et al. 1983), wobei in der Maus zwei unterschiedliche Transkripte von NGF nachgewiesen werden konnten, die durch alternatives Spleißing der mRNA entstehen. Die Abspaltung des 18 Aminosäuren umfassenden Signalpeptids erfolgt nach der Translokation in das endoplasmatische Retikulum (ER). Dabei entsteht die Pro-Form von NGF, die aus dem Pro-Peptid (103 Aminosäuren) und der Sequenz des reifen NGF (119 Aminosäuren) besteht (Abbildung 2 und Abbildung 3). Die beiden NGF Pro-Formen unterscheiden sich nur im N-Terminus und haben ein Molekulargewicht von 27 kDa bzw. von 34 kDa (Edwards et al. 1986, Selby et al. 1987, Edwards et al. 1988). Im ER erfolgt unter oxidativen Bedingungen die Ausbildung der Disulfidbrücken und die richtige Faltung des Proteins, wofür das Pro-Peptid verantwortlich ist (Jones und Reichardt 1990, Suter et al. 1991, Heymach und Shooter 1995,

Rattenholl et al. 2001). ProNGF besitzt drei potenzielle Glykosylierungsstellen. Zwei davon liegen im Pro-Peptid (Aminosäure 69 und 114), die dritte im reifen NGF (Ullrich et al. 1983) (Abbildung 2). Die Glykosylierung des reifen NGF konnte bisher kaum beobachtet werden. Dagegen scheint die N-Glykosylierung der Aminosäuren im Pro-Peptid, vor allem die an AS 114, für die richtige Faltung und den Austritt aus dem ER wichtig zu sein (Seidah et al. 1996). Im *trans-Golgi* Netzwerk erfolgt anschließend die weitere N- und C-terminale Prozessierung von proNGF durch Furin oder durch weniger verbreitete Prohormonkonvertasen wie PACE4 und PC5/6 (Bresnahan 1990, Seidah et al. 1996, Farhadi et al. 1997). Während der Prozessierung werden das N-terminale Pro-Peptid und die beiden C-terminalen Aminosäuren abgespalten. Dadurch entsteht das reife NGF (Darling et al. 1983).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Primärstruktur von Prä-Pro-NGF.**

Dargestellt sind in grün das Signalpeptid (SP) (AS 1-18), das Pro-Peptid in blau (AS 19-121) und das reife NGF in rosa (AS 122-241). Die AS 69 und 114 sind potenzielle Glykosylierungsstellen.



**Abbildung 3: Primärstruktur des humanen Prä-Pro-NGF.**

Die Prä-Sequenz umfasst die AS 1-18 (grün), die Pro-Sequenz die Aminosäuren 19-121 (blau). Die Sequenz des reifen NGF ist in rosa (AS 122-241) dargestellt. Der graue Pfeil kennzeichnet die Prozessierungsstelle der Signalpeptidase. Die Furinschnittstelle wird durch den schwarzen Pfeil dargestellt. *In vivo* können die letzten beiden AS (AS 240 und AS 241) durch Trypsin leicht abgespalten werden.

Außer den unterschiedlichen Spaltprodukten des Pro-Peptids konnte auch unprozessiertes proNGF als Sekretionsprodukt in unterschiedlichen Zelltypen wie z.B. männlichen Keimzellen und Haarfollikelzellen nachgewiesen werden (Darling et al. 1983, Chen et al. 1997, Yardley et al. 2000). Nachdem man lange angenommen hatte, dass proNGF nur die Vorstufe von NGF ist, konnte in einigen Geweben wie Prostata, Spermien oder Haarfollikeln gezeigt werden, dass hier proNGF und nicht NGF das Hauptsekretionsprodukt ist (Chen et al. 1997, Yardley et al. 2000). Man vermutete, dass in vielen neuronalen und nicht neuronalen Geweben die Sekretion von proNGF und NGF in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums erfolgt (Hasan et al. 2003, Lobos et al. 2005). Beispielsweise konnte im Gehirn von Alzheimer-Patienten eine Akkumulation von proNGF nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schließen, dass proNGF nicht nur die Pro-Form von NGF ist, sondern bei der Alzheimer-Erkrankung entweder auch eine eigene biologische Funktion hat oder dass die Menge an proNGF durch Störungen der posttranslationalen Prozessierung zu reifem NGF zunimmt (Fahnestock et al. 2001).

Da Pro-Neurotrophine wie proNGF von den Zellen sezerniert werden (Heymach und Shooter 1995, Fahnestock et al. 2001) und auch Schnittstellen für die Enzyme Plasmin oder Matrix-Metalloprotease 7 (MMP7) besitzen, wird vermutet, dass die Pro-Neurotrophine auch extrazellulär durch solche Proteasen gespalten werden können (Lee et al. 2001, Pang et al. 2004, Bruno und Cuello 2006, Teng et al. 2010).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Regulierung der Reifung von NGF sowie der anderen Neurotrophine ein wichtiger posttranskriptioneller Kontrollpunkt in Bezug auf die Spezifität ihrer Wirkung zu sein scheint, da gezeigt werden konnte, dass nicht nur die reifen Neurotrophine, sondern auch die Pro-Neurotrophine sezerniert werden und biologisch aktiv sind (Lee et al. 2001, Skaper et al. 2001) und beide Proteinformen oft entgegengesetzte Rollen haben (Lu et al. 2005).

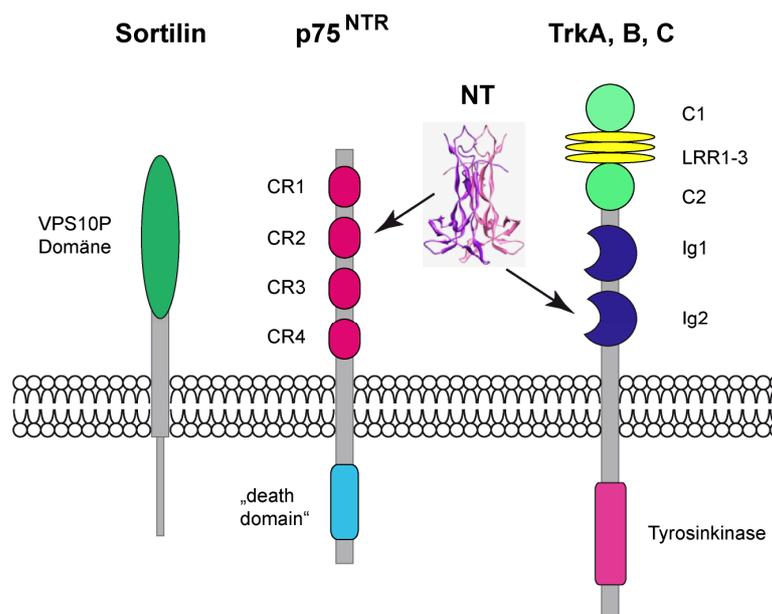
### 2.1.2.2 Rezeptoren und Signalwege des Nerve Growth Factor

Um ihre Wirkung auf die Zielzellen entfalten zu können, benötigen die Neurotrophine unterschiedliche Rezeptoren. Diese Rezeptoren sind in der Zellmembran verankert und lassen sich in zwei Klassen einteilen. Zum einen interagieren Neurotrophine mit dem p75 Neurotrophin-Rezeptor (p75<sup>NTR</sup>) und zum anderen mit den Rezeptoren der Tyrosinkinase (Trk) -Rezeptor-Familie (Kaplan und Miller 2000, Huang und Reichardt 2003, Segal 2003, Teng und Hempstead 2004, Reichardt 2006, Schecterson und Bothwell 2010).

Der erste identifizierte Rezeptor der Neurotrophin-Familie war der p75<sup>NTR</sup> Rezeptor, der mit der Tumor Necrosis Factor (TNF) –Rezeptorfamilie verwandt ist (Chao 1994, Bothwell 1995). Er ist ein 75 kDa schweres transmembran Glykoprotein, das NGF mit geringer Affinität binden kann (Radeke et al. 1987, Chao und Hempstead 1995). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass alle Neurotrophine mit sehr ähnlicher Affinität an diesen Rezeptor binden (Johnson et al. 1986, Radeke et al. 1987, Rodriguez-Tébar et al. 1990, Hallböök et al. 1991, Rodriguez-Tebar et al. 1991, Rodríguez-Tébar et al. 1992, Chao 1994, Philo et al. 1994, Bothwell 1995, Dechant und Barde 1997, Friedman 2000). Er besteht aus einer extrazellulären Domäne (Johnson et al. 1986, Radeke et al. 1987, Yan und Chao

1991) sowie einer Transmembrandomäne und einer einzigen cytoplasmatischen Domäne, die eine sogenannte „death“ Domäne beinhaltet (Liepinsh et al. 1997, He und Garcia 2004), welche als apoptotischer Faktor wirkt (Casaccia-Bonofil et al. 1996, Frade et al. 1996, Majdan et al. 1997) (Abbildung 4). Die Signalweiterleitung des p75<sup>NTR</sup> Rezeptors erfolgt über cytoplasmatische Interaktion.

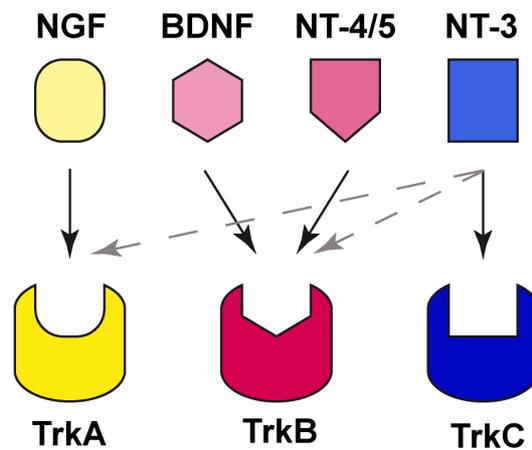
Die zweite Rezeptorgruppe, an die die Neurotrophine binden, sind die der Trk-Rezeptorfamilie, bestehend aus den drei Mitgliedern TrkA, TrkB und TrkC (Chao 2003, Huang und Reichardt 2003). Die Trk-Rezeptoren sind ebenfalls transmembran Glykoproteine mit einer Größe von etwa 140 kDa. Zwischen allen drei Trk-Rezeptoren besteht eine hohe strukturelle Ähnlichkeit (Barbacid 1995, Nakagawara et al. 1995), wobei die Tyrosinkinasedomäne stärker konserviert ist als die extrazelluläre Domäne, an die das jeweilige Neurotrophin spezifisch bindet (Bibel und Barde 2000). In ihrer Struktur bestehen die Trk-Rezeptoren aus einer extrazellulären Domäne, einem membranständigen Teil und einer cytoplasmatischen Tyrosinkinasedomäne für die Signaltransduktion (Schneider und Schweiger 1991, Huang und Reichardt 2003, Reichardt 2006, Skaper 2008) (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Neurotrophin-Rezeptoren.**

Sortilin und p75<sup>NTR</sup> dienen als Rezeptoren für die Pro-Neurotrophine, p75<sup>NTR</sup> und TrkA, TrkB bzw. TrkC sind die Rezeptoren für die reifen Neurotrophine NGF, BDNF und NT-4/5 sowie NT-3. CR1 bis CR4: Cysteinewiederholungen. C1 und C2: Cysteincluster. LRR1-3: leucinreiche Domänen. Ig1 und Ig2: immunglobulinähnliche Domänen. Angelehnt an und erweitert nach Dechant und Barde 1997.

Alle Neurotrophine binden an den  $p75^{\text{NTR}}$  Rezeptor, spezifisch jedoch nur an einen bestimmten Trk-Rezeptor. So bindet NGF an TrkA (Hempstead et al. 1991, Kaplan et al. 1991a, Kaplan et al. 1991b, Klein et al. 1991a, Barbacid 1994), BDNF und NT-4/5 an TrkB (Klein et al. 1991b, Soppet et al. 1991, Squinto et al. 1991, Barbacid 1994) und NT-3 an TrkC (Lamballe et al. 1991, Barbacid 1994). Neben seiner Interaktion mit TrkC kann NT-3 auch mit TrkA und TrkB interagieren, jedoch mit geringerer Affinität als mit TrkC (Cordon-Cardo et al. 1991, Soppet et al. 1991, Squinto et al. 1991, Ip et al. 1993). Die Aktivierung der Trk-Rezeptoren erfolgt nur durch die reifen Neurotrophine und nicht durch ihre Pro-Formen (Lee et al. 2001) (Abbildung 5).



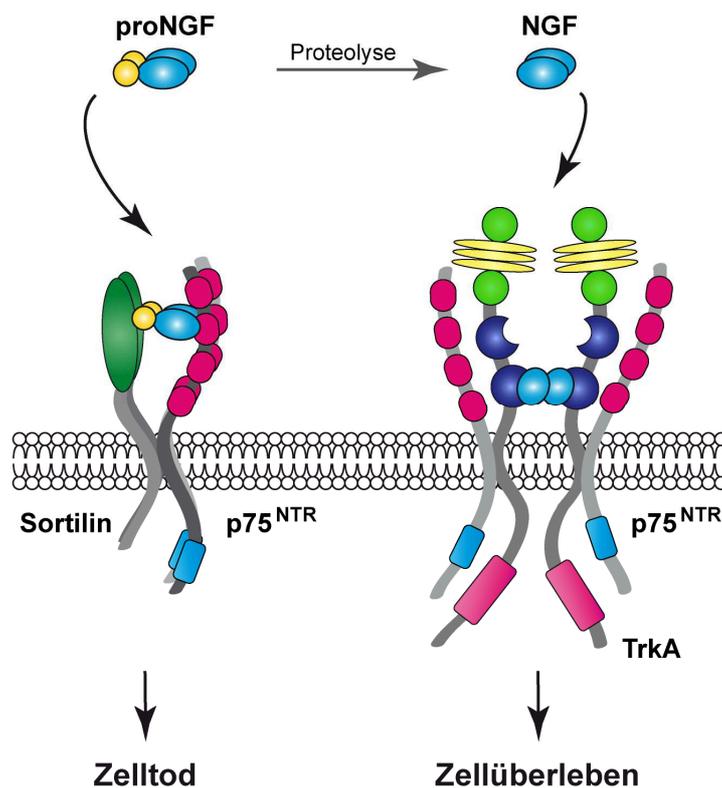
**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Ligand-Rezeptorspezifität der Neurotrophine.**

NGF bindet an TrkA, BDNF und NT-4/5 an TrkB und NT-3 an TrkC. NT-3 kann auch mit geringerer Affinität an TrkA und TrkB binden als es an TrkC bindet. Modifiziert nach Barbacid 1994.

Die biologische Aktivität von NGF wird durch TrkA und durch den  $p75^{\text{NTR}}$  Rezeptor vermittelt. Unabhängig voneinander induzieren beide Rezeptorklassen verschiedene Signalwege (Miller und Kaplan 2001). NGF aktiviert durch seine Bindung den TrkA Rezeptor. Dies führt zur Proliferation der Zellen (Huang und Reichardt 2001, Patapoutian und Reichardt 2001). Durch die Bindung des Liganden kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors und zur *trans*-Autophosphorylierung der Tyrosinreste der intramolekularen Rezeptordomäne. Dadurch wiederum binden intrazelluläre Signalmoleküle an die phosphorylierten Tyrosinreste und unterschiedliche Signalwege werden aktiviert (Kaplan und Miller 1997). Zum einen wird der PI3K (Phosphatidylinositol-3 Kinase) und Akt (Proteinkinase B) Signalweg aktiviert, zum anderen kommt es zur Aktivierung des kleinen G-Proteins Ras, das sein Signal auf die MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) weitergibt. Durch die Stimulierung der Signalkaskaden werden viele Transkriptionsfaktoren induziert, die den Zellzyklus, das Neuritenwachstum oder die synaptische Plastizität beeinflussen (Grewal et al. 1999, Kaplan und Miller 2000, Chao 2003). Neben dem TrkA Rezeptor kann NGF auch den  $p75^{\text{NTR}}$  Rezeptor aktivieren. Auf diesem Signalweg kommt es in den Neuronen zum programmierten Zelltod, der Apoptose (Casaccia-Bonnel et al. 1996, Frade et al. 1996, Bibel und Barde 2000, Hempstead 2002, Chao

2003). Durch die Bindung von NGF an den  $p75^{\text{NTR}}$  Rezeptor werden über die intrazelluläre Domäne NRIF (Neurotrophin Receptor Interacting Factor), JNK (Jun N-terminale Kinase), NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells), p53 und Ceramid aktiviert (Aloyz et al. 1998, Bamji et al. 1998, Le-Niculescu et al. 1999, Casademunt et al. 1999, Kaplan und Miller 2000, Brann et al. 2002, Chao 2003, Roux und Barker 2002, Linggi et al. 2005).

Stimuliert NGF gleichzeitig die TrkA und  $p75^{\text{NTR}}$  vermittelten Signalkaskaden, wird die Apoptose unterdrückt (Majdan et al. 2001). Außerdem konnte beobachtet werden, dass der  $p75^{\text{NTR}}$  Rezeptor auch als Korezeptor für TrkA fungieren kann, wodurch dessen Bindung an den TrkA Rezeptor verstärkt wird (Barker und Shooter 1994, Hantzopoulos et al. 1994, Mahadeo et al. 1994, Verdi et al. 1994) (Abbildung 6). In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit eines koexprimierten Trk-Rezeptors der Zelltod durch den  $p75^{\text{NTR}}$  Rezeptor induziert wird (Rabizadeh et al. 1993, Carter und Lewin 1997, Bamji et al. 1998). Welche weiteren Effekte durch den  $p75^{\text{NTR}}$  Rezeptor vermittelt werden, scheint davon abhängig zu sein, ob dieser zusammen mit einem Mitglied der Trk-Rezeptorfamilie koexprimiert wird.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Sortilin -  $p75^{\text{NTR}}$  und TrkA -  $p75^{\text{NTR}}$  Rezeptorkomplexe.**

ProNGF bindet an den Komplex aus Sortilin und  $p75^{\text{NTR}}$  und löst so Apoptose aus. Bei der Bindung von NGF an einen Komplex aus TrkA und  $p75^{\text{NTR}}$  wird Zelldifferenzierung und die Proliferation gefördert. Modifiziert nach Nykjaer et al. 2004.

In der Bindungsaffinität von NGF an TrkA und an den p75<sup>NTR</sup> Rezeptor gibt es deutliche Unterschiede (Kaplan und Miller 2000, Fahnstock et al. 2004). Die Affinität zu den einzelnen Rezeptoren wird dadurch bestimmt, ob NGF mit nur einem von beiden oder mit beiden Rezeptoren gleichzeitig interagiert. Bindet NGF sowohl an TrkA als auch an den p75<sup>NTR</sup> Rezeptor, wird dadurch die Zellantwort auf NGF beeinflusst (Dechant 2001). Es kommt zu einer Konformationsänderung von TrkA, wodurch die Ligandenspezifität und Ligandenaffinität verändert wird (Esposito et al. 2001). Dadurch wird die TrkA Signalkaskade verstärkt (Hempstead et al. 1991, Chao und Hempstead 1995, Ryden et al. 1997, Esposito et al. 2001) und die über den p75<sup>NTR</sup> Rezeptor induzierte Signalkaskade inhibiert (Yoon et al. 1998). Aufgrund dessen konnte ein höheres Neuritenwachstum beobachtet werden, wenn NGF sowohl an TrkA als auch an den p75<sup>NTR</sup> Rezeptor und nicht nur an TrkA bindet (Davey und Davies 1998, Bibel et al. 1999). Neben einer Verstärkung der Wirkung kann es aber auch zu einer antagonistischen Wirkung durch den p75<sup>NTR</sup> Rezeptor in Kombination mit TrkA kommen (Esposito et al. 2001).

Nicht nur reifes NGF, sondern auch proNGF kann biologisch aktiv sein. Es konnte gezeigt werden, dass proNGF und auch die anderen Pro-Neurotrophine an den p75<sup>NTR</sup> Rezeptor binden und Signalwege aktivieren, die die Apoptose in den Zielzellen fördern (Lee et al. 2001). In diesem Zusammenhang konnte Sortilin als weiterer Rezeptor des proNGF/NGF-Signalwegs identifiziert werden (Petersen et al. 1997). An diesen Rezeptor binden die Pro-Neurotrophine (z.B. proNGF) mit höherer Affinität als ihre reifen Formen (z.B. NGF). Die Interaktion erfolgt über die Pro-Domäne (Nykjaer et al. 2004, Teng et al. 2005). Sortilin kann zusammen mit dem p75<sup>NTR</sup> Rezeptor einen Komplex bilden und vermittelt dadurch die durch proNGF oder durch andere Pro-Neurotrophine induzierte Apoptose (Nykjaer et al. 2004, Teng et al. 2005, Jansen et al. 2007, Willnow et al. 2008) (Abbildung 6). Ob es zum Überleben der Zelle oder zum Zelltod kommt, scheint somit durch das Verhältnis von proNGF und NGF sowie durch das Vorhandensein der drei Rezeptoren TrkA, p75<sup>NTR</sup> und Sortilin bestimmt zu werden (Clewes et al. 2008).

### 2.1.2.3 Die Rolle des Nerve Growth Factor in nicht neuronalem Gewebe

Neben seiner Expression in den sympathischen Neuronen und dorsalen Ganglien des Nervensystems (Reinshagen et al. 2000, Fahnstock et al. 2004) entfaltet NGF seine Wirkung auch in anderen Geweben. Dazu zählen das Knochenmark (Labouyrie et al. 1999), Haarfollikelzellen (Yardley et al. 2000), die Leber (Kendall et al. 2009), die Harnblase (Girard et al. 2011), die Retina (Chakrabarti et al. 1990), die Prostata (Delsite und Djakiew 1999) und männliche Keimzellen (Chen et al. 1997). Außerdem konnte NGF auch in den Zellen des immun-hämatopoietischen Systems nachgewiesen werden. Über die Expression der entsprechenden Rezeptoren in den Organen des Immunsystems kann somit die Differenzierung der Zellen und die Immunantwort durch NGF reguliert werden (Aloe et al. 1997, Bonini et al. 1999, Aloe 2001). Des Weiteren wirkt NGF auf das Überleben, die Differenzierung und den Phänotyp von hämatopoietischen Stammzellen (Cattoretti et al. 1993, Chevalier et al. 1994a, Auffray et al. 1996, Bracci-Laudiero et al. 2003), Granulozyten (Boyle et al. 1985, Kannan et al. 1991, Bischoff und Dahinden 1992, Gibbs et al. 2005), Lymphozyten (Otten et al.

1989, Brodie und Gelfand 1992, Melamed et al. 1996) und Monozyten (Thorpe et al. 1987, La Sala et al. 2000, Caroleo et al. 2001) ein. Ein anderer Bereich, in den NGF und seine Wirkung einbezogen zu sein scheint, ist die Angiogenese (Cantarella et al. 2002, Emanuelli et al. 2002, Turrini et al. 2002).

In den letzten Jahrzehnten konnte NGF auch im Ovar nachgewiesen werden und es konnte gezeigt werden, dass Neurotrophine auch hier eine wichtige Rolle spielen (Dissen et al. 1991, Dissen et al. 2009a). So werden im Ovar von Nagetieren nicht nur die vier Neurotrophine NGF, BDNF, NT-3 und NT-4/5 (Ernfors et al. 1990b, Lara et al. 1990, Berkemeier et al. 1991, Hallböök et al. 1991, Dissen et al. 1995, Dissen et al. 1996) sondern auch deren Rezeptoren  $p75^{\text{NTR}}$ , TrkA, TrkB und TrkC exprimiert (Klein et al. 1989, Dissen et al. 1991, Lamballe et al. 1991, Dissen et al. 1995, Dissen et al. 1996, Paredes et al. 2004, Abir et al. 2005). Beim Menschen konnten NGF und seine Rezeptoren TrkA und  $p75^{\text{NTR}}$  in den Zellen des Ovars (Eizelle, Granulosazellen, Thekazellen und interstitielle Zellen) nachgewiesen werden (Spears et al. 2003, Salas et al. 2006). Die grundlegenden morphologischen Eigenschaften der Follikelreifung (Abbildung 7) sind weitreichend untersucht (siehe 2.3 Follikelreifung, ovarieller Zyklus und Atresie), jedoch ist die genaue Funktion von NGF im humanen Ovar noch weitgehend unaufgeklärt.

## 2.2 Das Ovar

Die Grundlage der weiblichen Fertilität ist die zyklische Reifung von Eizellen in einem Follikel. Diese reifen in den paarig angelegten Eierstöcken (Ovarien) heran. Nur die dominanten Follikel kommen zur Ovulation. Die Eierstöcke enthalten die Oozyten (Eizellen), die ab der Pubertät bis zur Menopause in regelmäßigen Zyklen bei der Ovulation freigesetzt werden. Das Ovar ist bei der geschlechtsreifen Frau ca. 4 x 2 x 1 cm groß und hat etwa die Form einer Pflaume. Mit dem Ende der Eireifung nach den Wechseljahren bildet sich die weibliche Keimdrüse zurück und hat dann oft nur noch die Größe einer Mandel.

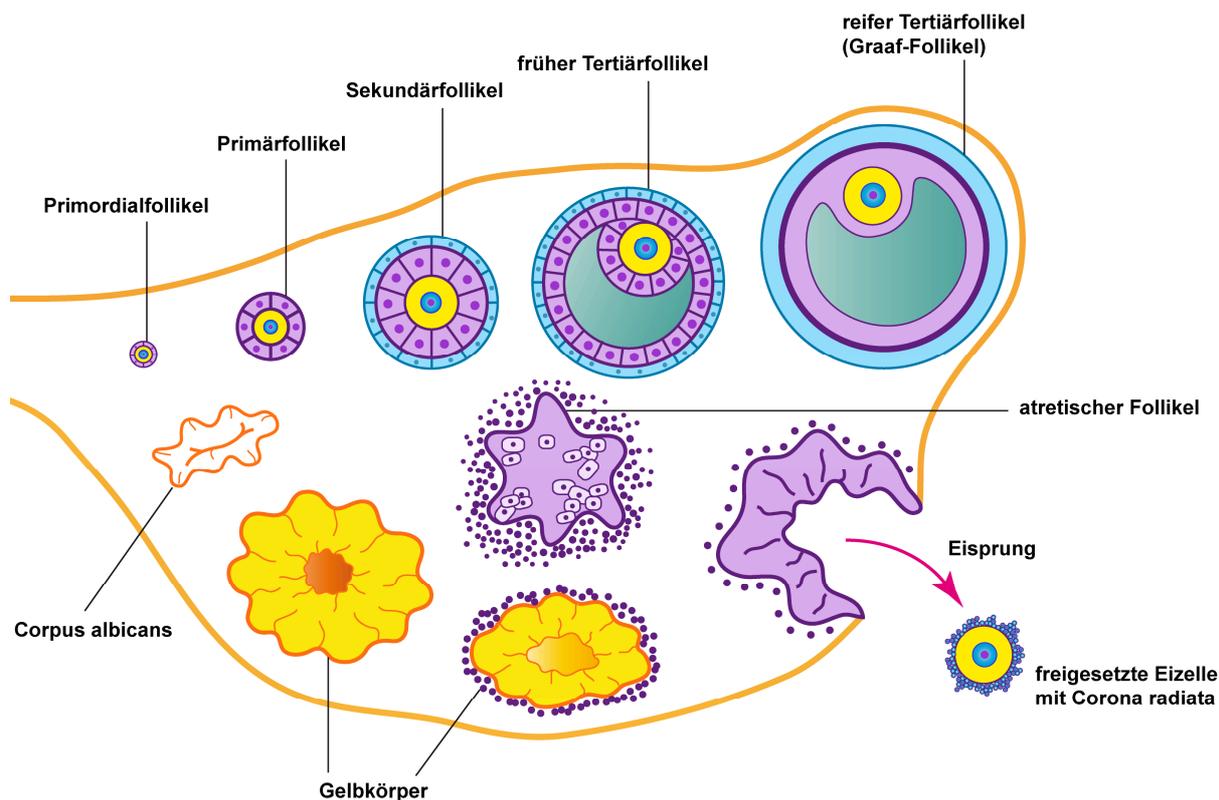
Das Ovar ist hoch organisiert und enthält in den Follikeln die Keimzellen (Eizellen/Oozyten) sowie die somatischen Zellen (Granulosazellen, Thekazellen und Stromazellen), deren Interaktion die Bildung der Follikel sowie deren Entwicklung, die Ovulation und die Bildung des Gelbkörpers reguliert (Richards und Pangas 2010). Seine Hauptaufgabe ist die Differenzierung der Eizellen und die anschließende Freisetzung der reifen Eizellen zur Befruchtung. Des Weiteren sind die Ovarien verantwortlich für die Produktion von Steroiden wie Östradiol, Progesteron und Androgenen sowie Peptiden wie Relaxin, Inhibin etc. (weibliche Geschlechtshormone), die für die Ausbildung der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale sorgen und den Verlauf einer Schwangerschaft unterstützen. (Lippert 2011)

### 2.3 Follikelreifung, ovarieller Zyklus und Atresie

Die ovarielle Follikelreifung (Abbildung 7) ist ein Prozess, der durch verschiedene endokrine, parakrine und autokrine Faktoren in einem Zusammenspiel von Hypophyse, Hypothalamus und Ovar reguliert wird. Im Laufe dieses Prozesses entwickeln sich die Primordialfollikel zum Graaf-Follikel, der entweder die Eizelle zur Befruchtung freisetzt oder durch Atresie zu Grunde geht. Bei Frauen dauert die Reifung vom Primordialfollikel bis zum ovulatorischen Stadium fast ein Jahr. Das Wachstum wird durch Zellproliferation und die Bildung der Follikelflüssigkeit erreicht, sowie durch Differenzierung der Zellen und des Gewebes im Ovar.

Follikel haben zwei Hauptfunktionen, zum einen die Beherbergung und die Förderung des Wachstums der Eizelle, damit diese befruchtet werden kann, und zum anderen die Produktion von Hormonen in den späten Tertiärfollikeln (Fortune 2003, Skinner 2005, Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012).

Die Bildung und Reifung der Oozyte zur befruchtungsfähigen Eizelle (Oogenese) beginnt schon während der Embryonalentwicklung. Im Laufe der ersten Reifeteilung (Meiose I) werden die Oozyten im Stadium der Prophase I arretiert (= primäre Oozyte) und anschließend von einer einzigen Schicht abgeflachter Granulosazellen (= Follikelzellen) umgeben. Dadurch entstehen die Primordialfollikel, deren Bildung bis zur Geburt abgeschlossen ist (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012). Somit wird die Anzahl der Follikel im Ovar schon in frühester Entwicklung festgelegt. Diese bereits vor der Geburt gebildeten Follikel (Edson et al. 2009) stellen einen ruhenden und begrenzten Pool an Eizellen dar, der somit schon vor und auch während der gesamten weiblichen Reproduktionsphase vorhanden ist (Eppig 2001, Matzuk et al. 2002). Der größte Teil dieser Follikel erreicht jedoch nie das präovulatorische Stadium sondern geht stattdessen durch Atresie, einem Prozess, der auf Apoptose beruht, zugrunde (Matsuda et al. 2012). Die übrigen Follikel entwickeln sich im Laufe der Reproduktionszeit (etwa 12 – 50 Jahre nach dem Beginn der Prophase I) zu einem dominanten Follikel, der seine Eizelle bei der Ovulation freisetzt (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Follikelentwicklung beim Menschen.**

Aus den Primordialfollikeln entwickeln sich die Primärfollikel, die zu Sekundär- und Tertiärfollikeln heranwachsen. Die Eizelle (gelb) ist umgeben von Granulosazellen (lila) und Thekazellen (hellblau). Zwischen den Granulosa- und den Thekazellen befindet sich im reifen Tertiärfollikel die Basalmembran (dunkellila). Beim Eisprung wird die Eizelle freigesetzt und die zurückbleibenden Granulosa- und Thekazellen werden in den Gelbkörper umgewandelt. Dieser bildet sich zum *corpus albicans* zurück, wenn es nicht zu einer Befruchtung der Eizelle kommt. (Frei nach Welsch: Lehrbuch Histologie)

Bei Säugern beginnt die Follikelreifung mit der Bildung der Primordialfollikel bereits vor oder gleich nach der Geburt (Edson et al. 2009). Ihre Reifung wird regelmäßig aktiviert und ist bis zur Bildung des Tertiärfollikels Gonadotropin-unabhängig (Fortune und Eppig 1979, Cortvrindt et al. 1997). Die Eizellen bleiben vorerst jedoch in der Prophase der Meiose I arretiert (Ruhestadium = Diktyotän) (Peters 1969, McGee und Hsueh 2000). Die aktivierten und rekrutierten Primordialfollikel entwickeln sich zu Primärfollikeln. Diese sind von einer einzigen Schicht kubischer Granulosazellen umgeben. Dabei wächst auch die Eizelle und bildet im Laufe des Wachstums Zellorganellen aus. Zwischen Epithel und Stroma beginnt sich die Basalmembran, zwischen Eizelle und Epithel die *Zona pellucida* zu bilden. Die die Eizelle umgebenden Granulosazellen werden proliferativ und aus den Primärfollikeln wiederum bilden sich die Sekundärfollikel (präantrale Follikel), die von mehreren Schichten Granulosazellen ohne Antrum umgeben sind. Um die Eizelle ist die *Zona pellucida* nun deutlich zu erkennen. Des Weiteren beginnen sich die Thekazellen zu bilden und formen eine Schicht (*Theca folliculi*) um die Granulosazellen (Young und McNeilly 2010). Die Sekundärfollikel entwickeln sich weiter zu Tertiärfollikeln (antralen Follikeln) mit einer reifen Thekazellschicht. Durch die Bildung des Antrums, einem flüssigkeitsgefüllten Hohlraum, werden die Granulosazellen in zwei räumlich und funktionell unterschiedliche Zellpopulationen unterteilt. Die Zellen, die sich näher bei der Eizelle befinden, werden Cumulus-Granulosazellen genannt, diejenigen, die sich an der Follikelwand

befinden, murale Granulosazellen. Auch die *Theca folliculi* lässt sich jetzt in die *Theca interna* und in die *Theca externa* unterteilen. Im Gegensatz zum Follikel epithel ist die *Theca interna* sehr gefäßreich und ernährt den Follikel zusammen mit den Follikelzellen und ist für die Bildung der Sexualsteroiden verantwortlich (Fortune und Armstrong 1977). Bis zum frühen antralen Follikel hat die Eizelle ihre endgültige Größe erreicht und ist von einer dicken Hülle aus Glykoproteinen (*Zona pellucida*) umgeben. Diese Glykoproteine werden hauptsächlich von der Oozyte gebildet. Die gesamte Entwicklung vom Primär- zum Tertiärfollikel dauert mehr als sechs Monate.

Die Tertiärfollikel werden als Kohorte rekrutiert und ihre weitere Entwicklung ist ein zyklischer Prozess, der sich etwa alle 28 Tage wiederholt (ovarieller Zyklus). Dieser zyklische Ablauf im Ovar entsteht durch ein Wechselspiel aus zentralen, gonadotropen und im Ovar gebildeten Hormonen. Von Bedeutung sind hier die Hormone GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone), FSH (Follikelstimulierendes Hormon), LH (Luteinisierendes Hormon), Inhibin, Progesteron und Östradiol (Webb et al. 2003). Die weitere Entwicklung der Tertiärfollikel ist Gonadotropin-abhängig (FSH, das vor allem auf die Granulosazellen wirkt). Aus der Kohorte entwickelt sich ein Follikel zum dominanten, sprungreifen Follikel (Graaf-Follikel), der für die Ovulation ausgewählt wird (Hirshfield 1991, Edson et al. 2009, Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012). Die antralen Follikel einer Zyklus Kohorte, vor allem aber der dominante Follikel, sind die Hauptquelle der zyklischen Sekretion von ovariellen Östrogenen (Fauser und van Heusden 1997). Durch die verstärkte Bildung von Östradiol und dessen ansteigendem Hormonspiegel sowie durch die Bildung von Inhibin wird die FSH-Sekretion aus der Hypophyse unterdrückt. Dadurch nimmt die FSH-Konzentration im Plasma ab (negative Rückkopplung) und das Heranreifen der konkurrierenden Kohortenfollikel wird unterbunden, sie werden atretisch (diZerega und Hodgen 1981).

Während der Reifung der präantralen Follikel zu den antralen Follikeln, somit kurz vor der Ovulation, setzt die Eizelle die Meiose I fort (Sorensen und Wassarman 1976, Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012) und epigenetische Modifikationen, die für die fetale Entwicklung wichtig sind, finden schrittweise statt (Kono et al. 1996). Die Fähigkeit der Eizelle, die Meiose fortzusetzen, ist mit der Reaktivierung des Zellzyklus verbunden (Chesnel und Eppig 1995) und beinhaltet sowohl Änderungen im Zytoskelett (Mikrotubulikonfiguration) als auch im Chromatin (Wickramasinghe et al. 1991). Änderungen in der Genexpression in den präovulatorischen Granulosazellen werden durch LH ausgelöst und stimulieren indirekt die meiotische Reifung der Eizelle (Richards et al. 2002). Für die Entwicklung der Keimzellen und ihrer somatischen Zellkompartimente ist bei der Follikelreifung von Anfang an ein Austausch zwischen der Eizelle und den sie umgebenden somatischen Zellen sehr wichtig (Eppig 2001).

Die steigenden Östrogenkonzentrationen führen zu einer Ausschüttung von FSH, vor allem aber von LH aus der Hypophyse (positive Rückkopplung). Dadurch wird die Ovulation ausgelöst. Bei der Ovulation wird die von einer Hülle aus Granulosazellen (*Corona radiata*) umgebene Eizelle freigesetzt und steht somit zur Befruchtung bereit (Siegenthaler 2006). Die bei der Freisetzung der Oozyte zurückbleibenden Granulosa- und Thekazellen werden in den Gelbkörper umgewandelt (Fauser und van Heusden 1997). Während der Ovulation beginnt auch die zweite Reifeteilung (Meiose II) der Eizelle, die jedoch nur bei ihrer Befruchtung abgeschlossen wird. Ist dies nicht der Fall, stirbt die Eizelle ab (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012). Wenn die Eizelle befruchtet wird, vergrößert sich der

Gelbkörper zum Schwangerschaftsgelbkörper und produziert etwa drei Monate lang die weiblichen Keimdrüsenhormone Progesteron und Östradiol. Kommt es nicht zur Befruchtung, bildet sich der Gelbkörper zum *Corpus albicans*, der keine bekannten Funktionen besitzt, zurück (Lippert 2011). In der Lutealphase sezernieren die Zellen des Gelbkörpers unter Einfluss von LH hauptsächlich Progesteron, aber auch Östradiol. Dadurch wird die LH- und FSH-Sekretion wieder auf die Ausgangswerte abgesenkt (negative Rückkopplung durch Progesteron). Durch die niedrigen LH-Konzentrationen beginnt das Ende der Gelbkörperphase. Die Hormonspiegel von Progesteron, Östradiol und Inhibin fallen ebenfalls ab. Hierdurch kommt es wieder zum Anstieg von FSH und damit verbunden zur Rekrutierung einer neuen Follikelkohorte und ein neuer Zyklus beginnt (Klinke et al. 2009).

Neben dem allgemein bekannten Wissen über die Regulation der Follikelreifung durch z.B. LH und FSH gibt es Hinweise, dass die Neurotrophine und ihre Rezeptoren an der Differenzierung der Follikel, beginnend mit den Primordialfollikeln bis hin zu den antralen Follikeln, beteiligt sind: So konnte in Studien mit Ratten gezeigt werden, dass die Nervenfasern im Ovar nicht nur mit den Blutgefäßen, sondern auch mit den Zellen der Primordialfollikel (Granulosazellen) verbunden sind (Malamed et al. 1992). Diese lokale Produktion von Neurotrophinen und die anfängliche Gonadotropin-Unabhängigkeit der sich entwickelnden Follikel lassen vermuten, dass die frühen Stadien der Follikelentwicklung teilweise durch Neurotrophine reguliert werden (Lara et al. 1991, Malamed et al. 1992). Damit übereinstimmend konnte die Expression der Neurotrophine und ihrer Rezeptoren schon vor den Gonadotropin-abhängigen Stadien der ovariellen Entwicklung bewiesen werden (Dissen et al. 1995, Dissen et al. 2009b). Des Weiteren konnte bei Ratten nachgewiesen werden, dass NGF das Wachstum der Primordialfollikel initiiert (Dissen et al. 1995, Dissen et al. 2001, Romero et al. 2002). NGF und TrkA sind im Ovar der Ratte von der Embryonalentwicklung bis zur Pubertät vorhanden. Im Speziellen konnte TrkA in den Thekazellen großer antraler Follikel nachgewiesen werden und es konnte gezeigt werden, dass es zusammen mit NGF proliferativ auf diese Zellen wirkt (Dissen et al. 1996, Dissen et al. 2000). Auch in den Gonadotropin-abhängigen Stadien der Follikelreifung (Kumar et al. 1997, Dierich et al. 1998) konnte eine Beteiligung von NGF belegt werden, denn in Abwesenheit von NGF nahm die Expression der FSH-Rezeptoren ab (Romero et al. 2002). Weitere Studien konnten darlegen, dass gleichzeitig mit LH auch die mRNA Mengen von TrkA ansteigen. Dies lässt vermuten, dass NGF auch bei der Ovulation eine Rolle spielt (Dissen et al. 1995, Dissen et al. 1996). Analog dazu sind im Schweineovar ebenfalls NGF und seine beiden Rezeptoren TrkA und p75<sup>NTR</sup> in den Granulosa- und Thekazellen während des Sexualzyklus vorhanden. NGF ist dabei hauptsächlich in den großen, antralen Follikeln zu finden. Dies lässt ebenso auf eine wichtige Rolle bei der Reifung der Eizelle schließen (Jana et al. 2011). Auch im Goldhamster werden NGF, TrkA und p75<sup>NTR</sup> in den Eizellen, den Granulosa- und den Thekazellen während der Follikelreifung sowie in den interstitiellen Zellen und den Lutealzellen exprimiert (Shi et al. 2004). Ebenso wird im Menschen NGF und TrkA in den Eizellen und auch in den Granulosazellen von präantralen und antralen Follikeln sowie in den Thekazellen antraler Follikel gebildet (Seifer et al. 2003, Abir et al. 2005, Salas et al. 2006). Im adulten Ovar beeinflusst NGF die Funktion der humanen

Granulosazellen, indem es die Östradiolproduktion erhöht und gleichzeitig die Progesteronkonzentration erniedrigt (Salas et al. 2006). Durch Behandlung der humanen Granulosazellen mit NGF wird auch hier die mRNA Menge des FSH-Rezeptors erhöht. Dieser Effekt konnte durch den Trk-Blocker K252a wieder aufgehoben werden. Des Weiteren führte die Vorbehandlung der humanen Granulosazellen mit NGF zu einer höheren Östradiolsekretion nach FSH-Stimulation im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen (Salas et al. 2006). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass NGF die antralen Follikel dadurch beeinflusst, dass es durch die Inhibition der Progesteronsekretion die frühe Luteinisierung unterdrückt. Dies wird durch eine gesteigerte Progesteronsekretion und eine vermehrte Expression der FSH Rezeptoren bewirkt. Dadurch reagiert auch der heranreifende Cumulus-Oozyten-Komplex sensitiver auf die Gonadotropine.

Die meisten Follikel sterben im Laufe ihrer Entwicklung durch Atresie ab. Das bedeutet, dass die Follikel (Oocyte und Granulosazellen) durch Apoptose zugrunde gehen noch bevor sie die SprunGREIFE erreicht haben. Dies geschieht in jedem Stadium der Follikelreifung. Follikelatresie tritt zu jeder Zeit ein, zu bestimmten Zeitpunkten jedoch gehäuft (fetal, postnatal und zu Beginn der Menarche). Die Atresie ist der wesentliche Grund für die Verminderung der Follikelzahl im Ovar. Zu Beginn der Pubertät hat sich die Follikelzahl von ca. ein bis zwei Millionen bei der Geburt auf etwa 400.000 verringert. Am Ende der reproduktiven Phase, also mit dem Eintritt in die Menopause, sind keine Follikel mehr im Ovar vorhanden. Bei der Atresie der Primordial-, Primär- und Sekundärfollikel ist die *Zona pellucida* zunächst noch sichtbar, dann aber bleiben keine Reststrukturen mehr zurück. Werden dagegen Tertiärfollikel aus einer Zyklus Kohorte atretisch, bleibt die *Theca interna* noch längere Zeit erhalten. In dieser Struktur sind nur Thekazellen und keine Granulosazellen enthalten, im Gegensatz zum Gelbkörper. Die Thekazellen vergrößern sich zu interstitiellen Zellen, nehmen in ihrer Zahl aber nicht zu, und sezernieren Androgene, die zu Östrogenen aromatisiert werden können. (Klinke et al. 2009, Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012).

Das Absterben der Follikel durch Atresie ist ein hormonell kontrollierter, apoptotischer Prozess (Schwartzman und Cidlowski 1993, Hsueh et al. 1994). Der Insulin-like Growth Factor (IGF) und Östradiol sowie auch andere Hormone und Wachstumsfaktoren, die unter anderem von den Granulosazellen sezerniert werden, sind für das Follikelwachstum bzw. die Follikelentwicklung wichtig (Hsueh et al. 1994). Fehlen diese Faktoren, verlieren die Granulosazellen ihre eigentlichen Funktionen und sterben ab (Matsuda et al. 2012). Da die Granulosazellen in den atretischen Follikeln vor der Eizelle und den Thekazellen durch Apoptose zugrunde gehen, scheinen sie der Initiator für die Follikelatresie zu sein (Inoue et al. 2011, Tilly et al. 1991, Jiang et al. 2003).

## 2.4 Granulosazellen

Im Ovar sind die Granulosazellen der vorherrschende Zelltyp. Diese Zellen dienen dazu, eine geeignete Umgebung für die Eizelle zu schaffen. Dabei stellen Granulosazellen nicht nur eine passende physikalische Umgebung zur Verfügung, sondern auch durch Sekretion ein entsprechendes biochemisches Milieu für die Entwicklung der Eizelle.

Die Granulosazellen sind ein heterogener Zelltyp, der sich im Laufe der Follikelentwicklung in unterschiedliche Populationen differenziert und die von den Thekazellen gebildeten Androgene zu Östrogenen umwandelt. Dies geschieht während der gesamten Follikelentwicklung, beginnend mit der Bildung der Primordialfollikel bis hin zur Ovulation und der Lutealphase. Für diese Differenzierungen werden viele Hormone und Wachstumsfaktoren benötigt. Die prä-Granulosazellen differenzieren sich zu den reifen Granulosazellen, die sich in Cumulus- und murale Granulosazellen unterteilen. Die Cumuluszellen haben bestimmte morphologische und physiologische Eigenschaften und stehen über Gap junctions in engem Kontakt mit der Eizelle (Buccione et al. 1990, Rabahi et al. 1991). Über diese Verbindungen stellen die Granulosazellen der Eizelle wichtige Komponenten für deren Entwicklung und Reifung bereit (Moor 1988). Nach der Ovulation differenzieren sich die Granulosazellen zu den Granulosaluteinzellen, die auch weiterhin die von den Thekaluteinzellen gebildeten Androgene aromatisieren. Zusammen mit den lutealen Thekazellen bilden die Granulosazellen den Gelbkörper.

Die Differenzierung der Granulosazellen in ihre Subtypen wird durch die Wirkung vieler Wachstumsfaktoren und Hormone bewirkt. Sowohl für die Gonadotropine FSH und LH (Richards und Midgley 1976) als auch für den Epidermal Growth Factor (EGF) (Vlodavsky et al. 1978, Wandji et al. 1992), für IGF (Adashi 1998) und für das anti-Müller Hormon (AMH) (Peng et al. 1996) konnten Rezeptoren auf den Granulosazellen nachgewiesen werden.

## 2.5 Matrix-Metalloproteasen

Der zeitlich regulierte Abbau der extrazellulären Matrix ist ein wichtiger Prozess in der embryonalen Entwicklung, der Morphogenese, der Reproduktion sowie beim Gewebeumbau (Nagase 1996, Fini et al. 1998). Diese Vorgänge sind unter normalen physiologischen Bedingungen genauestens reguliert. Sind diese Abläufe nicht exakt gesteuert, kommt es zu Krankheiten wie Arthritis, Nephritis, Krebs oder Fibrose (Shah 1997, Spinale 2002, Newby 2005). Verschiedene Arten von Proteasen sind am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt, hauptsächlich aber die MMP (Visse 2003). Interessanterweise konnten einige MMP mit dem proNGF/NGF-signaling direkt in Verbindung gebracht werden.

Das erste MMP, eine interstitielle Kollagenase (MMP1), wurde im Jahre 1962 entdeckt und besitzt die Fähigkeit, Kollagen abzubauen (Gross und Lapiere 1962). Bis heute sind 23 humane MMP sowie 23 MMP in der Maus bekannt. Diese werden bei Vertebraten, basierend auf dem Aufbau ihrer Domänen, ihrer Sequenzähnlichkeit sowie ihrer Substratspezifität, in sechs Gruppen eingeteilt: Kollagenasen (MMP1, MMP8, MMP13 und MMP18 (*Xenopus*)), Gelatinasen (MMP2 und MMP9), Stromelysine (MMP3, MMP10 und MMP11), Matrilysine (MMP7 und MMP26), Membran-Typ MMP (MMP14, MMP15, MMP16, MMP24, MMP17 und MMP25) und andere MMP (MMP12, MMP20, MMP27, MMP19, MMP21, MMP23 und MMP28) (Brummer et al. 2002, Marchenko et al. 2003, Visse 2003,

Nagase et al. 2006, Jackson et al. 2010). In dieser Arbeit sind vor allem MMP7 und MMP9 von Interesse, da diese beiden Proteasen an der Reifung und der Degradation von NGF beteiligt sind.

### 2.5.1 Funktion von Matrix-Metalloproteasen

MMP sind eine Gruppe sezernierter oder membranständiger Zink-Endopeptidasen, welche die Fähigkeit besitzen, die meisten Komponenten der extrazellulären Matrix wie z. B. Kollagen, Fibronectin, Laminin und Elastin sowie Membranglykoproteine abbauen zu können (Birkedal-Hansen et al. 1993, Stetler-Stevenson et al. 1993, Basset et al. 1994, Freije et al. 1994, Belaaouaj et al. 1995, Okada et al. 1995, Takino et al. 1995, Cauwe et al. 2007). Alle MMP bestehen aus homologen Sequenzen. Sie sind aus einer Signalsequenz, einer Pro-Domäne, einer katalytischen Domäne, einer Verbindungsdomäne und einer hemopexinähnlichen Domäne aufgebaut (Visse 2003, Nagase et al. 2006). Das Signalpeptid lenkt die Sekretion aus der Zelle und das Pro-Peptid sorgt dafür, dass die Pro-Form der MMP in dieser inaktiven Vorläuferform (Zymogen) erhalten bleibt. Die katalytische Domäne steuert die hydrolytische Spaltung der Zielpeptidbindung (Nagase und Woessner 1999, Brinckerhoff und Matrisian 2002). Die C-terminale hemopexinähnliche Domäne legt die Substrat- und Ligandenspezifität der MMP sowie ihre subzelluläre Lokalisation fest und vermittelt die Interaktion mit endogenen Inhibitoren (van Wart und Birkedal-Hansen 1990, Overall 2002, Piccard et al. 2007). Die Expression der MMP wird auf der Ebene der Transkription, der Sekretion, der Aktivierung und der Inhibition der aktivierten Enzyme durch lokal produzierte TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases) (TIMP1-4) reguliert (Brummer et al. 2002).

MMP prozessieren und bauen viele Komponenten der extrazellulären Matrix ab und scheinen für die Tumorausbreitung und die Angiogenese wichtig zu sein (Nagase und Woessner 1999, Overall 2002). Des Weiteren sind die MMP in sehr viele biochemische Prozesse einbezogen, wie z.B. in den Matrixumbau bei Säugetieren, von der Embryoimplantation bis hin zum Zelltod, oder der Nekrose (Alexander et al. 1996, Egeblad und Werb 2002, Currie et al. 2007). Ferner sind sie an der Zellmigration, der Zellproliferation und der Apoptose beteiligt (Vu und Werb 2000, Pepper 2001). Im Ovar scheinen die MMP und ihre TIMP eine wichtige Rolle beim Umbau der extrazellulären Matrix während der Follikelreifung zu spielen (García et al. 1997, Bagavandoss 1998, Baker et al. 1998, Cooke et al. 1999, McCaffery et al. 2000). Bei der Reifung der Primordialfollikel zu den großen, präovulatorischen Follikeln sind die Zellproliferation sowie ein ständiger und beträchtlicher Umbau der extrazellulären Matrix äußerst wichtig (Greenwald und Roy 1995, Monniaux et al. 1997). Man nimmt an, dass diese starken Veränderungen in der extrazellulären Matrix während der Follikelreifung durch die MMP ausgeführt werden. Die Muster der zellulären Lokalisation und die Expression der MMP verändern sich gleichzeitig mit den sich dynamisch ändernden ovariellen Strukturen, die mit dem Follikelwachstum verbunden sind. So kommt es auch bei der Ovulation zu solchen Strukturänderungen der Membran von Granulosazellen (Bjersing und Cajander 1974) und zur Zerteilung der extrazellulären Matrix der Follikelwand, damit die Eizelle freigesetzt werden kann (Morales et al. 1983, Murdoch und McCormick 1992, Curry und Osteen 2001, Curry et al. 2001).

In Ratten konnte anhand immunhistochemischer Färbungen gezeigt werden, dass MMP2 und MMP9 in den späten Stadien der Follikelreifung verstärkt exprimiert werden. In neugeborenen Ratten war MMP7 in den Granulosazellen und den Zellen des Oberflächenepithels während der frühen Follikelentwicklung detektierbar, MMP9 dagegen nicht (Bagavandoss 1998). In den letzten Stadien der Follikelreifung steigen die Mengen an MMP an. Dies deckt sich mit einer erhöhten mRNA Expression von MMP2 und MMP9 nach Zugabe von eCG (equines Choriongonadotropin), das ähnlich wie FSH und LH wirkt (Cooke et al. 1999). Während dieser Stadien konnte auch eine verstärkte Aktivität der Gelatinasen beobachtet werden. Somit werden die MMP durch die Gonadotropin-abhängigen Veränderungen während des Follikelwachstums reguliert (Cooke et al. 1999).

Über die Regulation der MMP im Ovar des Menschen ist wenig bekannt. Da aber in anderen Spezies die Lokalisation und Expression der MMP mit der Umgestaltung der Granulosa- und Thekazellschicht während des Follikelwachstums übereinstimmt, ist eine solche Rolle auch beim Menschen sehr wahrscheinlich.

### 2.5.1.1 MMP7

MMP7 gehört wie MMP26 zur Gruppe der Matrilysine. Charakteristisch für diese Gruppe der MMP ist, dass ihnen die hemopexinähnliche Domäne am C-Terminus fehlt. Außerdem haben sie ein geringeres Molekulargewicht (Ii et al. 2006). MMP7 wird als Pro-Enzym mit einer Größe von 28 kDa sezerniert und durch proteolytische Abspaltung der Pro-Domäne vom N-Terminus durch Endoproteasen, Plasmin oder Trypsin aktiviert (Wilson und Matrisian 1996, Wilson und Matrisian 1998, Nelson et al. 2000, Shiomi und Okada 2003) (Abbildung 8).



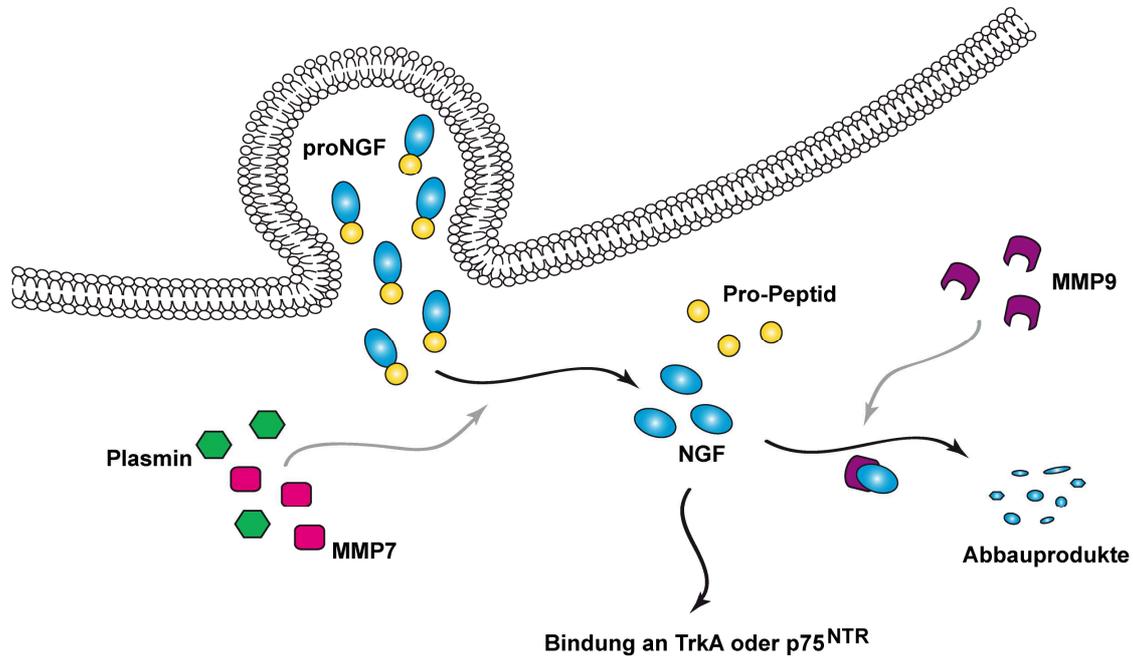
**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Primärstruktur von Prä-Pro-MMP7.**

Dargestellt sind das Signalpeptid (SP) (grün), das Pro-Peptid (blau, 77 AS) und das reife MMP7 (katalytische Domäne, rosa, 173 AS). Die hemopexinähnliche Domäne der anderen MMP fehlt bei MMP7.

MMP7 ist hauptsächlich an der Gewebeumgestaltung und der Wundheilung beteiligt (Parks und Shapiro 2001, Buhler et al. 2009). Außerdem konnte gezeigt werden, dass MMP7 für die Prozessierung von proNGF notwendig ist (Kendall et al. 2009). MMP7 hat somit dieselbe Wirkung wie Plasmin und spaltet proNGF extrazellulär (Smith et al. 1995, Lee et al. 2001, Bruno und Cuello 2006) (Abbildung 9). Wie auch die anderen MMP kann MMP7 die Tumoreinwanderung in Gewebe durch proteolytische Spaltung von Substraten der extrazellulären Matrix unterstützen. Dazu kann MMP7 andere MMP wie MMP2 oder MMP9 aktivieren (Wang et al. 2005, Wang et al. 2006).

Inhibiert wird die Aktivität von MMP7 durch TIMP1, das durch seine Bindung an das Pro-Peptid dessen Abspaltung blockiert (Gogly et al. 2009). Möglicherweise spielt die Regulation der enzymatischen Prozessierung von proNGF durch MMP7 eine wichtige Rolle für das Überleben der

Zelle und lässt einen neuen Mechanismus vermuten, durch den MMP7 bei Verwundungsprozessen eine Rolle spielt (Le und Friedman 2012).

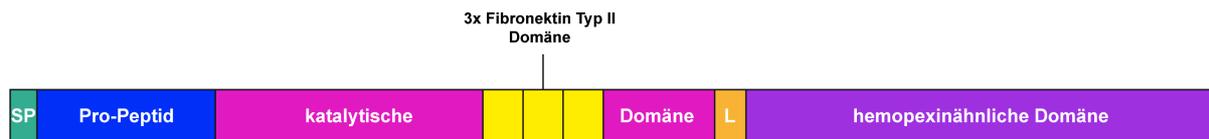


**Abbildung 9: Schematische Darstellung der extrazellulären Prozessierung von proNGF zu NGF.**

ProNGF wird von der Zelle sezerniert und anschließend extrazellulär durch MMP7 zu reifem NGF prozessiert. Das reife NGF kann dann über die Bindung an die entsprechenden Rezeptoren auf die Zielzellen wirken oder durch MMP9 abgebaut werden. Neben proNGF kann auch bereits intrazellulär gebildetes, reifes NGF sezerniert werden.

### 2.5.1.2 MMP9

MMP9 ist wie MMP2 eine Gelatinase und auch als 92 kDa Typ IV Kollagenase/Gelatinase B bekannt. Es ist ähnlich aufgebaut wie MMP7. In der katalytischen Domäne sind zusätzlich noch drei Fibronectin Typ II Domänen enthalten, die eine kompakte Kollagen-Bindedomäne bereitstellen (Folgueras et al. 2004) (Abbildung 10). Gelatinasen bauen eine große Anzahl von Komponenten der extrazellulären Matrix ab. Darunter befinden sich verschiedene Typen von Kollagen, Gelatin, Elastin, Proteoglykane oder Fibronectin (Murphy et al. 1991, Moon et al. 2003, Chung et al. 2004, Moon et al. 2004b, Moon et al. 2004a). Des Weiteren spielen sie eine wichtige Rolle beim Abbau und beim Umbau der extrazellulären Matrix in verschiedenen physiologischen Stadien, wie etwa bei der Wundheilung (Hashizume 2007). MMP9 kann Heparansulfat-Proteoglykane binden. Diese werden dadurch so positioniert, dass sie mit Zelloberflächenadhäsionsmolekülen oder Rezeptoren interagieren können und die Umsetzung dieser Moleküle regulieren (Robinson et al. 2001).



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der Primärstruktur von Prä-Pro-MMP9.**

Dargestellt sind das Signalpeptid (SP) (grün), das Propeptid (blau, ~80 AS), die katalytische Domäne (rosa, ~170 AS) mit drei Fibronektin Typ II Domänen (gelb), die Linkersequenz (L, orange) sowie die hemopexinähnliche Domäne (lila, ~210 AS). Die Fibronektin Typ II Domänen sind spezifisch für die Gelatinasen MMP2 und MMP9.

Neben seiner Funktion beim Umbau der extrazellulären Matrix, unter anderem bei der Follikelreifung im Ovar, konnte in Ratten nachgewiesen werden, dass MMP9 extrazellulär an der proteolytischen Degradation von NGF in den Neuronen beteiligt ist (Bruno und Cuello 2006) (Abbildung 9).

## 2.6 Polycystisches Ovarialsyndrom

1935 wurde das PCOS erstmals beschrieben (Stein und Leventhal 1935). Stein und Leventhal dokumentierten bei einer Gruppe von Frauen, die korpulent und infertil waren, Unregelmäßigkeiten bei der Monatsblutung und vergrößerte Ovarien mit Zysten (Stein und Leventhal 1935, Betts et al. 2001). Daher wurde das Auftreten dieser Symptome lange Zeit als „Stein-Leventhal-Syndrom“ bezeichnet. Später konnte nachgewiesen werden, dass Frauen mit PCOS auch erhöhte Testosteron und LH-Spiegel haben (Duncan 2001). Diese endokrinen Befunde wurden schließlich in die Definition des PCOS mit einbezogen.

Die Kriterien für das Vorliegen eines PCOS wurden 1999 vom NIH (National Institutes of Health) festgelegt und besagen, dass, nach Ausschluss anderer Ursachen, als Hauptmerkmale chronische Anovulation und klinische und/oder biochemische Zeichen der Hyperandrogenisierung vorliegen müssen. Zudem wurden bei der Konferenz der „European Society of Human Reproduction and Embryology“ (ESHRE) und der „American Society for Reproductive Medicine“ (ASRM) 2003 in Rotterdam die Kriterien erweitert: Ein PCOS liegt dann vor, wenn zwei der drei folgenden Kriterien vorliegen: Oligo- und/oder Anovulation, klinische und/oder biochemische Zeichen der Hyperandrogenämie sowie polyzystische Ovarien im Ultraschallbefund und Ausschluss anderer Ursachen (Kongenitale adrenale Hyperplasie, androgenproduzierende Tumoren, Morbus Cushing) (Azziz 2006, Teede et al. 2010, Rotterdam ESHRE/ASRM Workgroup 2004).

Häufige Symptome des PCOS sind eine chronische Anovulation, verbunden mit Zyklusstörungen (Amenorrhoe oder Oligomenorrhoe), Unfruchtbarkeit sowie eine erhöhte Androgenproduktion und eine gestörte Gonadotropinsekretion, die zu Akne und Hirsutismus führen. Des Weiteren kann auch eine Insulinresistenz festgestellt werden, die oft mit Adipositas, Diabetes Typ II und hohen Cholesterinspiegeln verbunden ist (Teede et al. 2010, A.D.A.M. Medical Encyclopedia). Das Auftreten polycystischer Ovarien im Ultraschall ist häufig, aber keine grundlegende Voraussetzung für die Diagnose des PCOS. Die Symptome und deren Schwere sind bei den einzelnen Patientinnen sehr unterschiedlich ausgeprägt.

Das PCOS ist die verbreitetste Ursache für anovulatorische Infertilität und Hirsutismus (Dunaif und Thomas 2001), (Franks 1995)). Ebenso ist das PCOS mit verschiedenen Störungen in der

Reproduktion, des Metabolismus und der allgemeinen Gesundheit verbunden. Dazu zählen ein erhöhtes Risiko von Fehlgeburten, Insulinresistenz, kardiovaskuläre Erkrankungen oder Krebserkrankung der Gebärmutter Schleimhaut (Bauer et al. 2000). Adipositas tritt auch häufig bei Frauen mit PCOS auf (Franks 1995).

Bei Frauen im geschlechtsreifen Alter (zwischen 12 und 45 Jahren) ist das PCOS eine der häufigsten Stoffwechselerkrankungen. Zwischen vier und zehn Prozent dieser Frauen sind davon betroffen (Carmina und Lobo 1999). Diese komplexe, heterogene Störung scheint eine der hauptsächlichen Ursachen für die weibliche Subfertilität (Azziz et al. 2004, Boomsma et al. 2008, Goldenberg und Glueck 2008) und die häufigste endokrine Problematik bei Frauen im gebärfähigen Alter (Teede et al. 2010) zu sein.

## 2.7 *In vitro* Fertilisation

Die *in vitro* Fertilisation ist eine Form der assistierten Reproduktionstechniken (ART). Diese Methode der künstlichen Befruchtung zur Kinderwunschtherapie ist gut geeignet für Frauen mit beschädigten Eileitern, bei schwerer Endometriose, bei ungeklärter Kinderlosigkeit, bei PCOS, für ältere, gebärfähige Frauen und bei male factor Infertilität (unzureichende Spermienzahl/Spermienqualität).

Die *in vitro* Fertilisation wurde in den 1960er und 1970er Jahren von dem Biologen/Physiologen Robert Edwards und dem Gynäkologen Patrick Steptoe entwickelt und wird seit 1978 erfolgreich eingesetzt (Steptoe und Edwards 1978). 2010 erhielt Robert Edwards dafür den Nobelpreis.

Der erste Schritt bei der IVF ist die Hormonbehandlung. Die Eigentätigkeit der Eierstöcke wird durch die Gabe von GnRH-Antagonisten gehemmt, um durch die anschließende hormonelle Stimulation mehr als eine Eizelle zum Wachstum anzuregen. Durch die GnRH-Antagonisten wird die körpereigene Produktion von FSH und LH unterdrückt, ebenso wie die Reifung der Eizellen und die Produktion von Östradiol. Nach dieser ovariellen Suppression erfolgt die Stimulation der Eierstöcke mit Gonadotropinen (FSH), wodurch mehrere Eizellen gleichzeitig in einem Zyklus heranreifen. Die Reifung der Eizellen wird durch Ultraschall- und Östradioluntersuchungen kontrolliert. Durch die Gabe des Hormons hCG (humanes Choriongonadotropin) wird die Ovulation ausgelöst. Im nächsten Schritt werden die Eizellen durch Follikelpunktion gewonnen und anschließend im Reagenzglas mit den Spermien zusammengebracht. Im Brutschrank in einer Nährlösung kommt es im Idealfall zur Befruchtung der Eizelle, wobei eine sogenannte Zygote entsteht. Bei geringer Aussicht auf Befruchtung wird ein Spermium direkt in die Eizelle injiziert (ICSI, Intracytoplasmic Sperm Injection). Der letzte Schritt ist der Embryotransfer. Dabei werden zwei bis drei der befruchteten Embryonen in die Gebärmutter eingesetzt. Die Einnistung des Embryos wird durch die Gabe von weiteren Hormonen gefördert. Etwa 14 Tage nach der Follikelpunktion kann eine sichere Aussage über den Erfolg der künstlichen Befruchtung gemacht werden. (van Voorhis 2007, <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/007279.htm>)

## 2.8 Ziele der Arbeit

Über die meisten molekularen Faktoren, welche die Follikelreifung und Atresie im humanen Ovar steuern, ist wenig bekannt. Möglicherweise sind Neurotrophine, z.B. NGF, an diesem Prozess beteiligt.

Daher war es das Ziel dieser Studie, die molekulare Zusammensetzung und die Funktion eines proNGF/NGF-Systems (Liganden und Rezeptoren) im humanen Ovar zu untersuchen. Der Fokus lag vor allem auf NGF und den Komponenten, die für dessen Wirkung in der Zelle nötig sind. Für die Experimente wurden zum einen Follikelflüssigkeiten und humane Granulosazellen als Modellsystem verwendet, das die Situation im menschlichen Ovar *in vitro* widerspiegeln sollte. Die Follikelflüssigkeiten sowie die Granulosazellen wurden aus Follikelpunktionen von Frauen gewonnen, die sich einer *in vitro* Fertilisation unterzogen. Zum anderen wurde zur Überprüfung der *in vitro* Ergebnisse ovarielles Gewebe von Mensch und Rhesusaffe für immunhistologische Studien verwendet, das die *in vivo* Situation widerspiegelt.

Es sollte zuerst überprüft werden, ob neben NGF auch dessen Pro-Form proNGF in den humanen Granulosazellen und der Follikelflüssigkeit vorhanden ist. Außerdem sollten die für die Wirkung von NGF und proNGF nötigen Rezeptoren TrkA, p75<sup>NTR</sup> und Sortilin in den Granulosazellen nachgewiesen werden. Da für die Prozessierung von proNGF zu NGF bzw. für den Abbau des reifen NGF Proteasen wie MMP7 und MMP9 nötig sind, sollte auch das Vorkommen dieser beiden Prozessierungsenzyme in den Granulosazellen und der Follikelflüssigkeit untersucht werden.

Im Vergleich zum Nervensystem sind die Signalwege von proNGF und NGF sowie deren Effekte im humanen Ovar weitgehend unbekannt. Daher sollten auch die Effekte von proNGF und NGF auf die kultivierten humanen Granulosazellen analysiert werden. Dabei standen die Zellproliferation und die Apoptose sowie die Wirkung dieser beiden Faktoren (proNGF und NGF) auf die MAPK und den Transkriptionsfaktor Egr-1 im Vordergrund.

NGF ist möglicherweise auch im humanen Ovar an der Follikelreifung beteiligt. Da diese bei PCOS Patientinnen jedoch in veränderter Weise abläuft, stellte sich die Frage, ob das untersuchte proNGF/NGF-System daran beteiligt sein kann. Dazu sollte der mRNA Gehalt einzelner Faktoren in den humanen Granulosazellen von Frauen aus beiden Patientengruppen (Patientinnen ohne und mit PCOS) an bestimmten Kultivierungstagen verglichen werden.

Ein weiteres wichtiges Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Wirkung von Decorin auf die humanen Granulosazellen. In einer früheren Arbeit mit HTPC (Dissertation Marion Adam) konnte gezeigt werden, dass Decorin die Phosphorylierung des NGF Rezeptors TrkA auslöst. Daher sollte zum einen überprüft werden, ob Decorin auch in den humanen Granulosazellen und der Follikelflüssigkeit exprimiert wird. Zum anderen sollte getestet werden, welchen Einfluss Decorin auf die Vitalität der Zellen hat und ob die intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegel durch Decorin verändert werden.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Nachweis der Komponenten des proNGF/NGF-Systems in humanen Granulosazellen

Um eine mögliche Beteiligung des proNGF/NGF-Systems im humanen Ovar an der Regulation der Follikelreifung zu untersuchen, wurde zunächst getestet, ob die einzelnen Komponenten dieses Signalwegs in den humanen Granulosazellen, die direkt aus Follikelpunktionen von IVF-Patientinnen gewonnen wurden, vorhanden sind. Dadurch sollte auch die humane Granulosazellpräparation als Modell für die Bedeutung von proNGF und NGF im humanen Ovar etabliert werden.

Die Zellen stammten sowohl von Patientinnen ohne PCOS (male factor oder andere Ursachen für die IVF) als auch von Patientinnen mit PCOS, die sich einer *in vitro* Fertilisation unterzogen haben. Dabei überwogen jedoch die Granulosazellen von Patientinnen ohne PCOS, da die Zellmenge von PCOS Patientinnen sehr limitiert war. Soweit es im Folgenden nicht anders angegeben ist, sind mit den humanen Granulosazellen immer die Zellen von IVF-Patientinnen ohne PCOS gemeint.

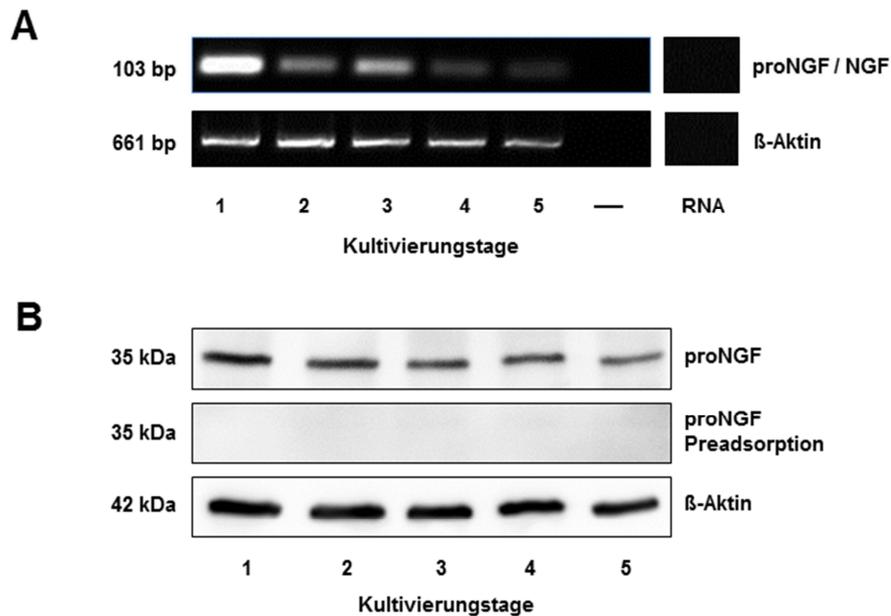
#### 3.1.1 ProNGF und NGF

##### 3.1.1.1 ProNGF und NGF werden in humanen Granulosazellen exprimiert

Zunächst wurde die Expression von proNGF und NGF in humanen Granulosazellen an unterschiedlichen Kultivierungstagen untersucht.

Die proNGF/NGF mRNA Level (RT-PCR) nahmen im Verlauf der Kultivierungsdauer von Tag 1 bis Tag 5 deutlich ab (Abbildung 11A). In der PCR-Reaktion wurde sowohl proNGF als auch NGF detektiert, da die mRNA für proNGF codiert, das posttranslational zu NGF prozessiert wird.

ProNGF konnte auch auf Proteinebene in humanen Granulosazellen mittels proNGF Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 11B). Die Menge an in den Zellen exprimiertem proNGF war an den einzelnen Tagen in etwa gleich groß, mit einer leichten Tendenz zur Abnahme während der Kultivierung. Die Identität der proNGF Bande wurde durch Präadsorption des Primäantikörpers (Inkubation des proNGF Antikörpers mit mehrfachem Überschuss an proNGF Peptid vor dem Western Blot) verifiziert (Abbildung 11B).



**Abbildung 11: ProNGF/NGF Expression wurde in hGC detektiert.**

**A:** An unterschiedlichen Kultivierungstagen wurde proNGF/NGF auf mRNA Ebene detektiert. Die Menge an mRNA nahm während der Dauer der Kultivierung stark ab. Als Kontrollen wurden DEPC Wasser (-) bzw. RNA anstelle von cDNA für die RT-PCR-Reaktion verwendet.  $\beta$ -Aktin diente als interner Standard. **B:** ProNGF war ebenfalls auf Proteinebene an unterschiedlichen Kultivierungstagen in hGC detektierbar. Die Präadsorption diente als Kontrolle,  $\beta$ -Aktin als interner Standard.

Des Weiteren konnte proNGF/NGF mRNA (RT-PCR) auch in cDNA Proben von ovariellen Gewebe aus Rhesusaffen (Abbildung 12) nachgewiesen werden.



**Abbildung 12: ProNGF/NGF mRNA Expression wurde im Affenovar nachgewiesen.**

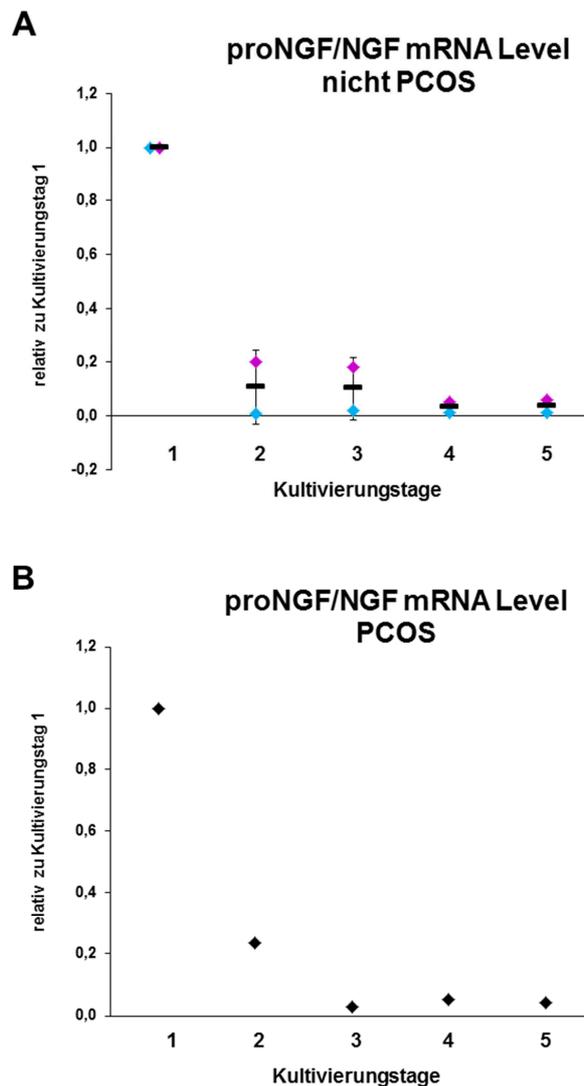
Ubiquitin diente als interner Standard.

Wie schon anhand der RT-PCR Ergebnisse (Abbildung 11A) zu sehen war, nahm die proNGF/NGF mRNA Menge im Laufe der Kultivierungstage 1 bis 5 sehr stark ab. Diese Abnahme wurde quantitativ anhand von qPCR Experimenten weiter bestätigt (Abbildung 13A). Die beiden unterschiedlichen Patientenpools zeigten ebenso eine deutliche Tendenz der Abnahme der mRNA Level von proNGF/NGF (Abbildung 13A) wie die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR (Abbildung 11A).

Um herauszufinden, ob sich die Expression von proNGF/NGF mRNA in den humanen Granulosazellen von PCOS Patientinnen unterschiedlich zu denen von Patientinnen ohne PCOS verhalten, wurden diese ebenso wie der mRNA Gehalt in den Zellen von Patientinnen ohne PCOS

quantitativ durch qPCR Experimente untersucht. Aufgrund der limitierten Probenmenge von Granulosazellen aus PCOS Patientinnen konnte das Expressionsmuster nur anhand einer einzelnen Probenreihe als Vorversuch getestet werden.

Im Verlauf der Kultivierung von bis zu fünf Tagen nahm die mRNA Menge von proNGF/NGF ebenso wie in den Zellen aus Patientinnen ohne PCOS deutlich ab (Abbildung 13B). Der proNGF/NGF Gehalt sank schon am zweiten Kultivierungstag auf weniger als die Hälfte der Ausgangswertes am Kultivierungstag 1 ab.



**Abbildung 13: Der proNGF/NGF mRNA Gehalt in hGC von Patientinnen ohne und mit PCOS nahm während der Kultivierung ab.**

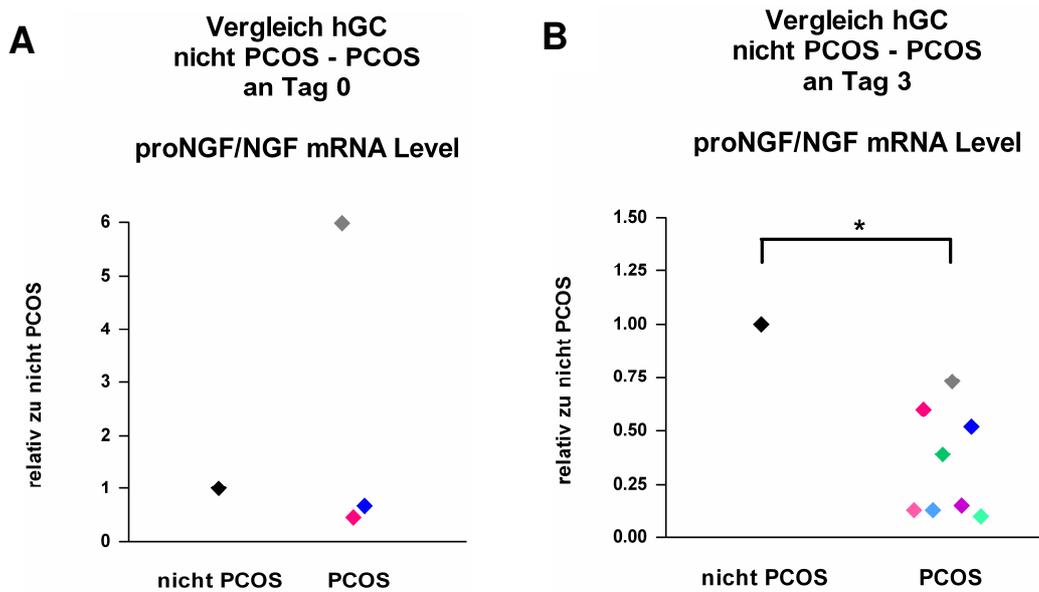
qPCR Experimente. **A:** Zwei unterschiedliche Probenreihen (n=2) von hGC aus Patientinnen ohne PCOS, die zwischen einem und fünf Tagen kultiviert wurden, zeigten eine deutliche Abnahme der proNGF/NGF mRNA Menge in den Zellen. Mittelwert  $\pm$ SD (schwarzer Balken). **B:** Anhand einer Probenreihe konnten Indizien gesammelt werden, dass die proNGF/NGF mRNA Level in hGC aus PCOS Patientinnen im Vergleich zu Tag 1 ebenso deutlich abnahmen wie in den Zellen aus Patientinnen ohne PCOS. Normierung der Werte jeweils auf Tag 1. GAPDH wurde als interner Standard verwendet.

Da für die Kultivierung der humanen Granulosazellen aus PCOS Patientinnen mit Probennahme an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen (jeweils von Zellen derselben Patientin) nicht genügend Material zur Verfügung stand, wurde der Vergleich des mRNA Gehalts bestimmter Faktoren (proNGF/NGF, Sortilin: siehe 4.1.2 und MMP9: siehe 4.1.3) in den humanen Granulosazellen aus Patientinnen mit und ohne PCOS auf bestimmte Kultivierungstage beschränkt. Für diesen Vergleich wurden zum einen frische, noch unkultivierte Zellen von Tag 0 ausgewählt. Zum anderen wurden Zellen von Kultivierungstag 3 verwendet, wie auch für die meisten anderen Experimente. Tag 3 wurde ausgewählt, da an diesem Versuchstag die proNGF/NGF Expression sehr gering war und somit hauptsächlich das exogen zugegebene proNGF bzw. NGF für die Wirkung dieser beiden Faktoren verantwortlich ist.

Für den quantitativen Vergleich der mRNA Level an Tag 0 standen drei Einzelproben von PCOS Patientinnen zur Verfügung. Um eine Zunahme oder Abnahme der mRNA Menge in den Granulosazellen von PCOS Patientinnen im Vergleich zu der in den Zellen von Patientinnen ohne PCOS zu zeigen, wurden die erhaltenen Werte jeweils auf einen Pool aus 11 Einzelpatientinnen ohne PCOS abgeglichen. An Kultivierungstag 3 wurden acht PCOS Proben verwendet, die jeweils auf einen Pool von 10 Einzelpatientinnen ohne PCOS abgeglichen wurden. Für die statistische Auswertung der wahrscheinlich nicht normalverteilten Werte wurde der Wilcoxon ranc sum Test verwendet.

In den frischen, unkultivierten Zellen (Tag 0) konnten keine signifikanten Änderungen ( $p = 1,25$ ) im mRNA Gehalt von proNGF/NGF bei den PCOS Patientinnen im Vergleich zu den Patientinnen ohne PCOS gefunden werden (Abbildung 14A). Die einzelnen Werte der PCOS Patientinnen streuten. Zwei der drei Proben lagen etwas unter der Menge bei den Patientinnen ohne PCOS, die dritte Probe dagegen deutlich über dem Vergleichswert.

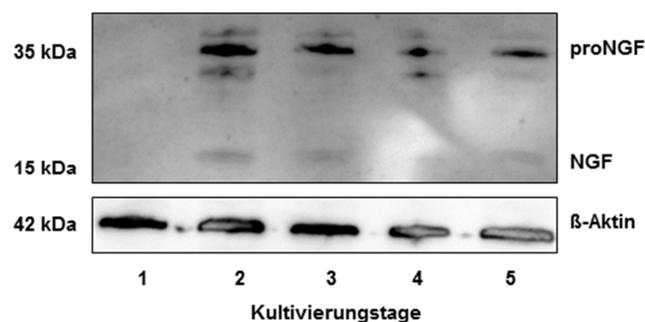
An Versuchstag 3 lagen alle acht Proben der PCOS Patientinnen unter der mRNA Menge von proNGF/NGF in den Granulosazellen der Patientinnen ohne PCOS. Auch diese Proben streuten sehr. Der Unterschied zwischen beiden Patientengruppen war dennoch signifikant ( $p = 0,0078$ ).



**Abbildung 14: Vergleich der proNGF/NGF mRNA Level in hGC von Patientinnen ohne und mit PCOS.**

qPCR Experimente. **A:** Der Vergleich der frischen, unkultivierten Zellen (Tag 0) beider Patientengruppen zeigte keinen signifikanten Effekt einer Zu- oder Abnahme der mRNA von proNGF/NGF bei den PCOS Patientinnen.  $p = 1,25$  (Wilcoxon rank sum Test). **B:** An Tag 3 ist eine signifikante Abnahme (\*) der proNGF/NGF Konzentrationen in den hGC aus PCOS Patientinnen zu erkennen.  $p = 0,0078$  (Wilcoxon rank sum Test).

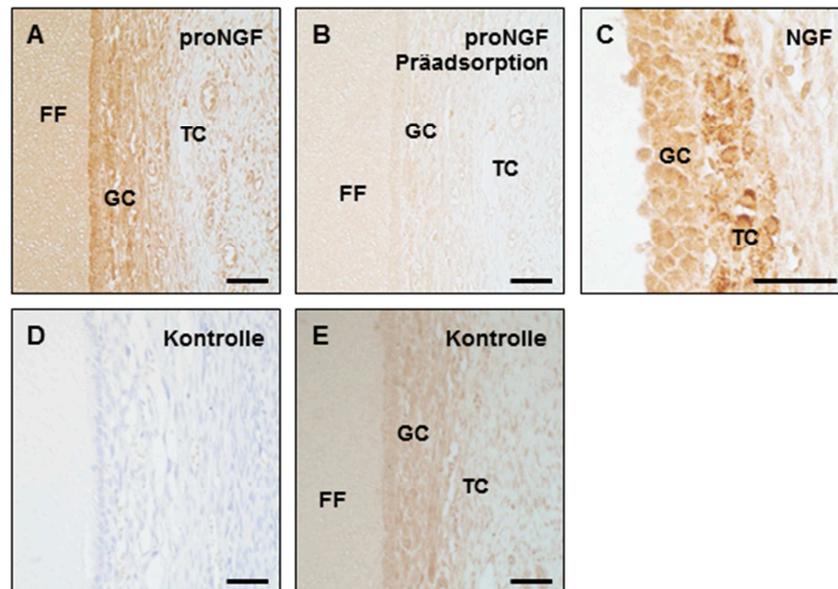
Zusätzlich zur Pro-Form proNGF wurde auch das reife NGF in den humanen Granulosazellen nachgewiesen (Abbildung 15). Mit dem NGF Antikörper ist es möglich, gleichzeitig neben NGF auch proNGF nachzuweisen, da das Epitop des Antikörpers auf der Sequenz des reifen NGF liegt. Da jeweils das gleiche Epitop erkannt wird, kann davon ausgegangen werden, dass das Signal für beide Proteine in gleichem Maße von der Proteinmenge abhängt und daraus eine relative proNGF/NGF Mengenbestimmung möglich ist. Das Verhältnis von proNGF zu NGF liegt bei den hier aufgetragenen Proben (Abbildung 15) zwischen 5/1 und 16/1 (proNGF/NGF).



**Abbildung 15: NGF wurde in hGC exprimiert.**

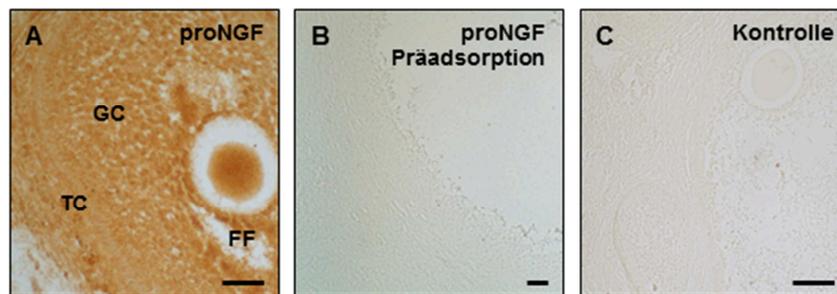
NGF konnte an unterschiedlichen Kultivierungstagen in hGC auf Proteinebene in geringen Mengen detektiert werden. Mit dem NGF Antikörper konnte gleichzeitig auch proNGF in den Zellen nachgewiesen werden. ProNGF schien in den hGC die mengenmäßig dominantere Form von beiden Proteinen zu sein.  $\beta$ -Aktin diene als interne Kontrolle. Das Verhältnis proNGF/NGF liegt hier zwischen 5/1 und 16/1.

Auch in ovariellen Gewebe, sowohl von Mensch als auch von Rhesusaffen, wurden proNGF und NGF nachgewiesen. So war im Gewebe aus humanen Ovarien proNGF in den Granulosazellen und den Thekazellen vorhanden (Abbildung 16A). Des Weiteren war proNGF auch in der Follikelflüssigkeit nachweisbar. NGF hingegen konnte nur in den Granulosa- und Thekazellen des humanen ovariellen Gewebes nachgewiesen werden (Abbildung 16C).



**Abbildung 16: ProNGF und NGF wurden im humanen Ovar nachgewiesen.** Immunhistochemische Färbungen von in Paraffin eingebettetem humanem ovariellen Gewebe. **A:** ProNGF konnte in der FF sowie den GC und den TC nachgewiesen werden. **B:** ProNGF Präadsorption als Kontrolle. **C:** GC und TC zeigten eine positive Färbung für NGF. **D:** Kontrolle mit dem Sekundäntikörper. **E:** Kontrolle mit Ratten Normalserum. Positive Färbung der Schnitte war braun. Teilweise wurden die Schnitte mit Hematoxylin gegengefärbt. Maßstabsleiste: ~100  $\mu\text{m}$ .

Wie im humanen Ovar wurde proNGF auch im Affenovar in den Granulosa- und Thekazellen sowie in der Follikelflüssigkeit nachgewiesen (Abbildung 17A).



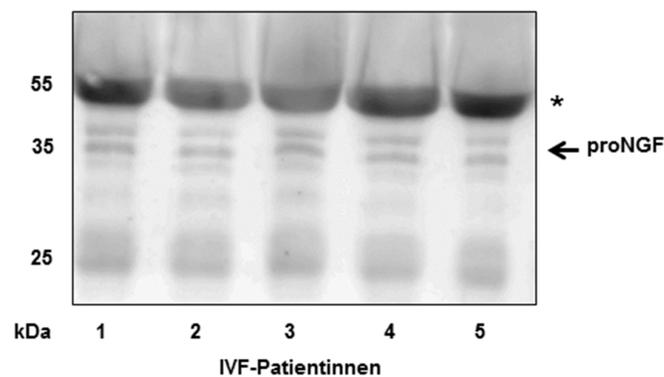
**Abbildung 17: ProNGF wurde im Affenovar nachgewiesen.**

Immunhistochemische Färbung von in Paraffin eingebettetem ovariellen Gewebe von Rhesusaffen. **A:** ProNGF war in der FF, den GC sowie den TC nachweisbar. **B:** ProNGF Präadsorption als Kontrolle. **C:** Kontrolle mit dem Sekundärantikörper. Positive Färbung der Schnitte war braun. Maßstabsleiste: ~100 µm.

### 3.1.1.2 ProNGF ist ein Bestandteil der Follikelflüssigkeit

Da proNGF sowohl in den Granulosazellen als auch in der Follikelflüssigkeit von Gewebeschnitten anhand immunhistochemischer Färbungen von ovariellen Gewebe aus Mensch und Rhesusaffe (Abbildung 16A und Abbildung 17A) nachgewiesen wurde, wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob die Follikelflüssigkeit von punktiertem Gewebe ebenfalls proNGF enthält.

Es konnte gezeigt werden, dass proNGF in der Follikelflüssigkeit von IVF-Patientinnen vorhanden war (Abbildung 18).



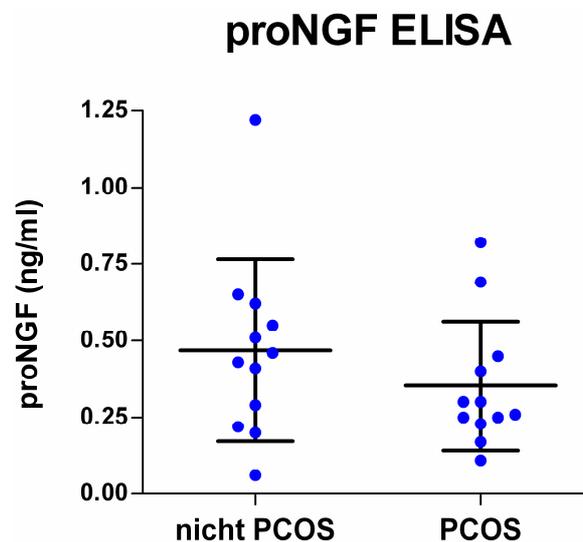
**Abbildung 18: ProNGF wurde in der FF gefunden.**

Western Blot: ProNGF (~ 35 kDa) konnte in der FF von fünf unterschiedlichen IVF-Patientinnen nachgewiesen werden. 30 µg Gesamtprotein wurden aufgetragen. Aufgrund der molekularen Masse ist vermutlich die untere Bande proNGF. \*: Albuminbande.

Um die im Western Blot erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen und um herauszufinden, in welcher Menge proNGF in der Follikelflüssigkeit vorhanden ist, wurden weitere Follikelflüssigkeiten von IVF-Patientinnen in einem proNGF ELISA getestet. Zudem wurden auch Follikelflüssigkeiten von IVF-Patientinnen mit PCOS getestet. Der Vergleich der Follikelflüssigkeiten von Patientinnen ohne und mit PCOS sollte zeigen, ob es auch hier zwischen diesen beiden Patientengruppen Unterschiede im

proNGF Gehalt gibt, ebenso wie es in den drei Tage kultivierten humanen Granulosazellen auf mRNA Ebene beobachtet wurde.

Mittels proNGF ELISA konnte proNGF in der Follikelflüssigkeit von jeweils 12 verschiedenen IVF-Patientinnen (sowohl Patientinnen mit PCOS als auch Patientinnen ohne PCOS) quantifiziert werden. Tendenziell lagen die proNGF Konzentrationen in den Proben der PCOS Patientinnen etwas unter denen der Patientinnen ohne PCOS, jedoch ohne signifikanten Unterschied ( $p = 0,312$ ; Mann Whitney Test) (Abbildung 19). Im Mittel waren in der Follikelflüssigkeit von Patientinnen ohne PCOS etwa 0,47 ng/ml proNGF enthalten, bei PCOS Patientinnen nur etwa 0,35 ng/ml proNGF. Eine sichere Aussage ließ sich jedoch nicht treffen, da sich die proNGF Mengen der einzelnen Patientinnen in beiden Gruppen sehr inhomogen verhielten. Die Konzentrationen von proNGF in der Follikelflüssigkeit von Patientinnen ohne PCOS variierte zwischen 0,06 ng/ml und 1,22 ng/ml, in der Follikelflüssigkeit von PCOS Patientinnen zwischen 0,11 ng/ml und 0,82 ng/ml.



**Abbildung 19: Die proNGF Mengen in der FF von PCOS Patientinnen waren tendenziell geringer als bei Patientinnen ohne PCOS.**

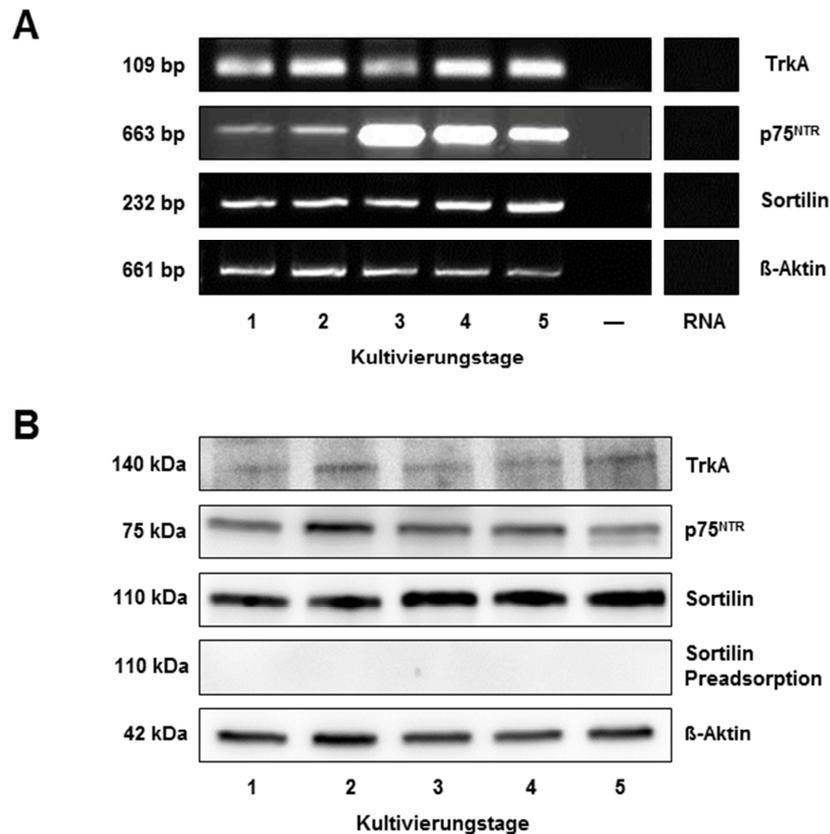
In der FF von PCOS Patientinnen war tendenziell weniger proNGF enthalten als in der FF von Patientinnen ohne PCOS. In beiden Patientengruppen streuten die einzelnen Messwerte jedoch so sehr, so dass nur von einer Tendenz ausgegangen werden konnte. Aufgetragen wurden jeweils die 12 Einzelmessungen mit dem Mittelwert (0,47 ng/ml bei nicht PCOS bzw. 0,35 ng/ml bei PCOS)  $\pm$ SD. Median: 0,45 ng/ml bei nicht PCOS bzw. 0,28 ng/ml bei PCOS.  $p = 0,312$ .

### 3.1.2 Die Rezeptoren von proNGF und NGF: TrkA, p75<sup>NTR</sup> und Sortilin

ProNGF und NGF wirken über unterschiedliche Signalwege. Dazu sind teilweise verschiedene Rezeptoren für diese beiden Proteine nötig. Die Signalweiterleitung von proNGF erfolgt über einen Komplex aus den Rezeptoren p75<sup>NTR</sup> und Sortilin. Die Wirkung von NGF hingegen wird über einen Rezeptorkomplex aus TrkA und ebenfalls p75<sup>NTR</sup> vermittelt. Ob diese Rezeptoren in den humanen Granulosazellen vorhanden sind und ob somit die Grundvoraussetzung für eine Signaltransduktion durch proNGF und NGF gegeben ist, wurde sowohl auf mRNA Ebene als auch auf Proteinebene an unterschiedlichen Kultivierungstagen untersucht.

Die mRNA Level (RT-PCR) von TrkA und Sortilin verhielten sich im Laufe der Kultivierungsdauer sehr ähnlich und zeigten eine leichte Zunahme an Kultivierungstagen 4 und Kultivierungstag 5 (Abbildung 20A). Die mRNA Menge von p75<sup>NTR</sup> (RT-PCR) nahm im Verlauf der Kultur stark zu, wobei die Expression an Tag 3 am höchsten war und dann wieder leicht abnahm (Abbildung 20A).

Die Proteinmenge der einzelnen Rezeptoren (Abbildung 20B) verhielten sich ähnlich zum mRNA Gehalt (Abbildung 20A). TrkA war auf Proteinebene an verschiedenen Tagen während der Kultivierung vorhanden und zeigte an den einzelnen Kultivierungstagen keine großen Schwankungen in seiner Expression. Bei dem p75<sup>NTR</sup> Rezeptor nahm die Proteinmenge an Tag 2 der Kultivierung zu und sank dann bis zum fünften Tag der Kultivierung wieder ab. Die Proteinmenge von Sortilin wurde im Verlauf der fünf Kultivierungstage deutlich mehr. Die Identität der Sortilin Bande wurde durch Präadsorption überprüft (Abbildung 20B).



**Abbildung 20: Die Rezeptoren für proNGF und NGF wurden in hGC nachgewiesen.**

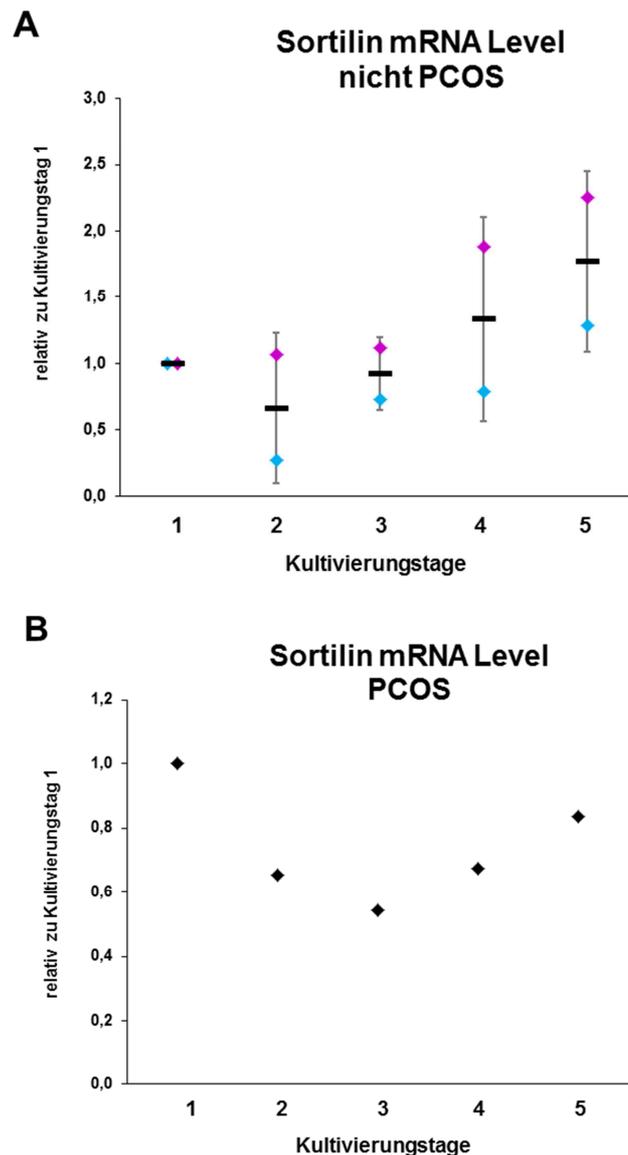
**A:** Die Expression der Rezeptoren für NGF (TrkA und p75<sup>NTR</sup>) sowie der Rezeptoren für proNGF (p75<sup>NTR</sup> und Sortilin) wurden an unterschiedlichen Kultivierungstagen in den hGC auf mRNA Ebene nachgewiesen. β-Aktin wurde als interner Standard verwendet, DEPC Wasser (-) bzw. RNA anstelle von cDNA als Kontrolle. **B:** TrkA, p75<sup>NTR</sup> und Sortilin konnten an verschiedenen Kultivierungstagen ebenfalls auf Proteinebene detektiert werden. Die Proteinmengen der einzelnen Rezeptoren veränderten sich in den fünf Kultivierungstagen wenig (TrkA und p75<sup>NTR</sup>) bzw. nahmen deutlich zu (Sortilin). Die Präadsorption von Sortilin wurde als Kontrolle und β-Aktin als interner Standard verwendet.

Die genaue Quantifizierung des Sortilin mRNA Gehalts in den humanen Granulosazellen erfolgte mittels qPCR. Ebenso wie für proNGF/NGF (Abbildung 13) wurde die Expression von Sortilin auf mRNA Ebene auch in den humanen Granulosazellen von PCOS Patientinnen untersucht.

Die beiden untersuchten Probenreihen von humanen Granulosazellen verhielten sich tendenziell unterschiedlich (Abbildung 21A). Bei der ersten Probenreihe (rosa Werte) stiegen die Sortilin mRNA Level im Vergleich zu Tag 1 erst langsam über diese Konzentration an (Tag 2 und Tag 3) und an Kultivierungstag 4 und Kultivierungstag 5 bis über die 2fache Menge von Tag 1.

Die Zweite Probenreihe (blaue Werte) zeigte an Tag 2 der Kultur einen deutlichen Abfall des mRNA Gehalts von Sortilin bis unter die Hälfte der an Tag 1 vorhandenen Menge. Im weiteren Verlauf der Kultivierung der Zellen nahm die Menge an Sortilin wieder zu, erreichte aber nicht so hohe Werte wie in Probenreihe eins. Die mRNA Level von Sortilin lagen an Tag 5 bei der zweiten Probenreihe (blaue Werte) nur knapp über dem Ausgangswert an Tag 1.

Die Sortilin mRNA Expression in den humanen Granulosazellen von PCOS Patientinnen (Abbildung 21B), die anhand einer Probenreihe erhalten wurde, verhielt sich ähnlich zur zweiten Probenreihe (blaue Werte) mit Zellen aus Patientinnen ohne PCOS. Bei den PCOS Patientinnen sank die Menge bis zum dritten Tag ab, jedoch nicht so stark wie in den Granulosazellen aus Patientinnen ohne PCOS, und stieg dann im weiteren Verlauf wieder leicht an, jedoch nicht bis zum Ausgangswert an Tag 1.



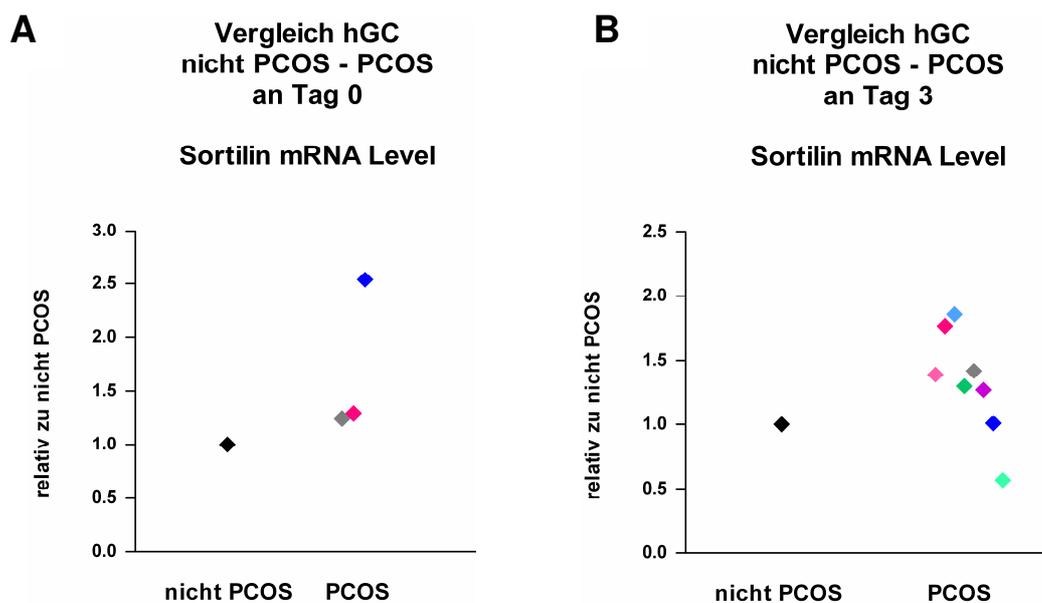
**Abbildung 21: Sortilin mRNA Level in hGC von Patientinnen ohne und mit PCOS im Verlauf von fünf Kultivierungstagen.**

qPCR Experimente. **A:** Zwei unterschiedliche Probenreihen (n=2) an hGC aus Patientinnen ohne PCOS zeigten unterschiedliche Verläufe der mRNA Expression von Sortilin während der fünftägigen Kultivierung. Mittelwert  $\pm$ SD (schwarzer Balken). **B:** Eine Probenreihe von hGC aus PCOS Patientinnen zeigte im Verlauf der Kultivierung zuerst eine Abnahme bis Tag 3 und anschließend wieder eine Zunahme der Sortilin mRNA Menge bis zum fünften Tag in Kultur. Normierung der Werte jeweils auf Tag 1. GAPDH wurde als interner Standard verwendet.

Wie schon für proNGF/NGF (Abbildung 14) wurden auch die mRNA Mengen von Sortilin in den humanen Granulosazellen aus Patientinnen ohne und mit PCOS an Tag 0 und an Tag 3 quantitativ miteinander verglichen.

Bei den frischen, noch nicht kultivierten Zellen (Tag 0) lagen die mRNA Werte von Sortilin in den Granulosazellen von PCOS Patientinnen bei zwei Proben leicht über dem Wert aus dem Pool von 11 Patientinnen ohne PCOS (Abbildung 22A). Die dritte Probe zeigte einen deutlich erhöhten Sortilingehalt bei den PCOS Patientinnen. Dennoch war die Erhöhung der Sortilin mRNA Expression in den PCOS Patientinnen im Vergleich zu den Patientinnen ohne PCOS nicht signifikant ( $p = 0,25$ ; Wilcoxon rank sum Test).

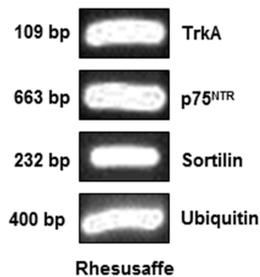
An Kultivierungstag 3 lagen die mRNA Mengen von Sortilin in den humanen Granulosazellen von sechs der acht untersuchten Proben aus PCOS Patientinnen über dem Wert aus dem Pool von zehn Patientinnen ohne PCOS (Abbildung 22B). Die anderen beiden Werte lagen knapp bis deutlich unter dem Vergleichswert. Die statistische Auswertung ergab, dass der mRNA Gehalt von Sortilin an Kultivierungstag 3 bei den PCOS Patientinnen im Vergleich zu den Patientinnen ohne PCOS nicht signifikant erhöht war ( $p = 0,109$ , Wilcoxon rank sum Test).



**Abbildung 22: Vergleich der Sortilin mRNA Level in hGC von Patientinnen ohne und mit PCOS.**

qPCR Experimente. **A:** Der Vergleich der frischen, unkultivierten Zellen (Tag 0) beider Patientengruppen zeigte keine signifikante Zunahme der mRNA Level von Sortilin bei den PCOS Patientinnen.  $p = 0,25$  (Wilcoxon rank sum Test). **B:** An Tag 3 war ebenfalls keine signifikante Zunahme der Sortilinmenge in den hGC aus PCOS Patientinnen zu erkennen.  $p = 0,109$  (Wilcoxon rank sum Test).

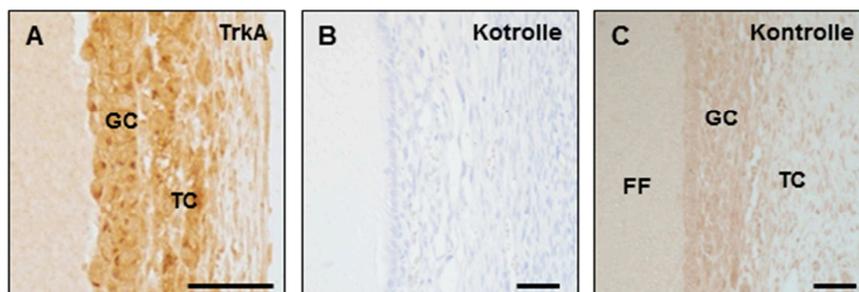
Um eine Konservierung dieses Systems zu überprüfen, wurde auch untersucht, ob die einzelnen Rezeptoren im Rhesusaffen exprimiert werden. Tatsächlich konnten alle drei Rezeptoren – TrkA, p75<sup>NTR</sup> und Sortilin – in den Proben aus ovariellm Gewebe von Rhesusaffen nachgewiesen werden (RT-PCR) (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Nachweis der Rezeptoren für proNGF und NGF im Affenovar.**

RT-PCR: TrkA (Rezeptor für NGF), Sortilin (Rezeptor für proNGF) sowie p75<sup>NTR</sup> (Rezeptor für beide Proteine) wurden in ovarieller cDNA aus Rhesusaffen detektiert. Ubiquitin diente als interne Kontrolle.

Des Weiteren wurde das Vorkommen von TrkA in humanem ovariellm Gewebe untersucht. Dabei konnte der NGF Rezeptor TrkA in den Granulosa- und Thekazellen im humanen Ovar nachgewiesen werden (Abbildung 24A).



**Abbildung 24: TrkA wurde im humanen Ovar nachgewiesen.**

Immunohistochemische Färbungen von in Paraffin eingebettetem ovariellm Gewebe. **A:** TrkA wurde in GC und TC exprimiert. **B:** Kontrolle mit dem Sekundärantikörper. **C:** Kontrolle mit Ratten Normalserum. Positive Färbung der Schnitte war braun. Teilweise wurden die Schnitte mit Hematoxylin gegengefärbt. Maßstabsleiste: ~100 µm.

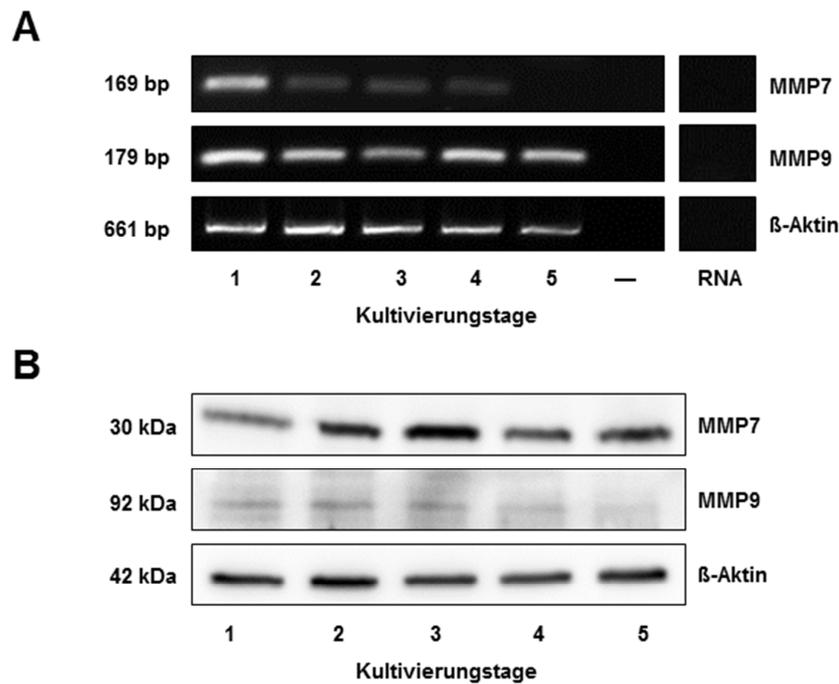
Somit konnten weitere wichtige Faktoren des proNGF/NGF-Systems, nämlich die Rezeptoren TrkA, p75<sup>NTR</sup> und Sortilin, im *in vitro* System in den humanen Granulosazellen und TrkA *in vivo* in den humanen Gewebeschnitten nachgewiesen werden.

### **3.1.3 Die Prozessierungsenzyme MMP7 und MMP9 sind im humanen und im Affenfollikel vorhanden:**

NGF wird nicht als reifes Protein, sondern als Pro-Form – proNGF – in der Zelle synthetisiert. Für die Bildung des reifen NGF aus proNGF sind Proteasen nötig. MMP7 gehört zu den Proteasen, die proNGF extrazellulär zu NGF abbauen. Wird das reife NGF in der Zelle nicht mehr benötigt, wird es ebenfalls durch eine Protease, MMP9, abgebaut. Um einen theoretisch funktionellen proNGF/NGF-Signalweg nachzuweisen, wurde als nächstes untersucht, ob die für die posttranslationale Umwandlung von proNGF zu NGF bzw. die für den Abbau von NGF erforderlichen Proteasen in den humanen Granulosazellen während der Kultivierungstage 1 bis 5 auf mRNA Ebene und Proteinebene vorhanden sind.

Beide Proteasen – MMP7 und MMP9 – wurden auf mRNA Ebene (Abbildung 25A) durch RT-PCR nachgewiesen. Die Expression der MMP7 mRNA nahm im Verlauf der fünftägigen Kultivierung deutlich ab und war an Kultivierungstag 5 nicht mehr nachweisbar. Der mRNA Gehalt von MMP9 variierte an den einzelnen Kultivierungstagen, stieg jedoch nicht über die Menge an mRNA an Tag 1 an.

Die Proteilevel von MMP7 und MMP9 (Abbildung 25B) verhielt sich im Vergleich zur mRNA Menge (Abbildung 25A) anders. MMP7 Protein wurde im Laufe der Kultivierungstage 1 bis 3 mehr und sank dann in seiner Expression wieder etwas ab, jedoch nicht unter die Menge, die an Tag 1 gebildet wurde. MMP9 war an allen Kultivierungstagen nachweisbar. Dabei war an den Kultivierungstagen 1 bis 3 etwas mehr Protein in den Zellen vorhanden als an Kultivierungstag 4 und Kultivierungstag 5.



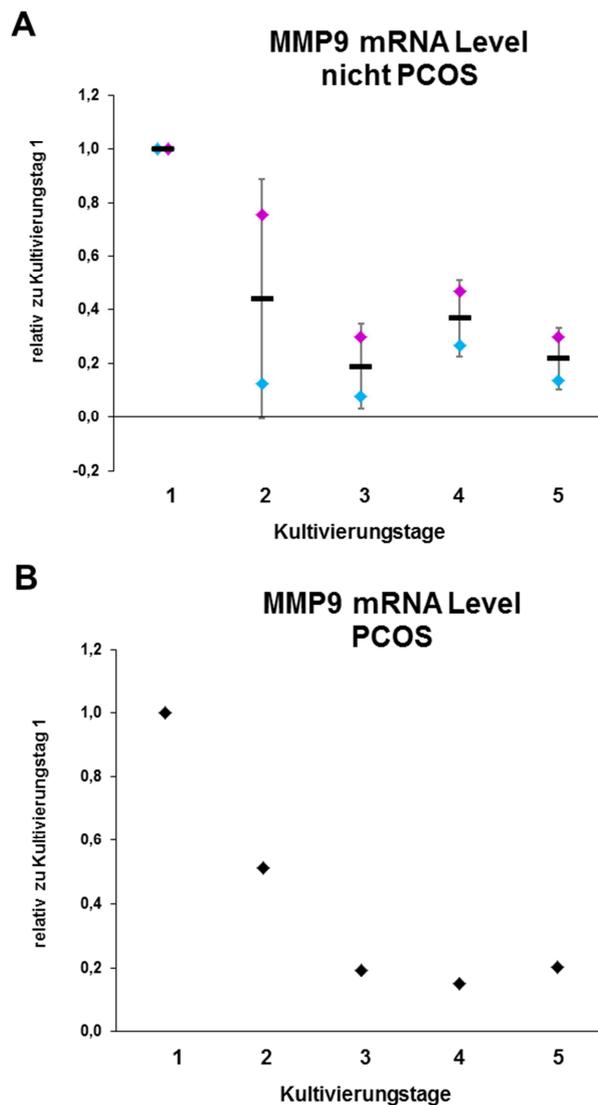
**Abbildung 25: Die Abbauenzyme von proNGF und NGF wurden in hGC detektiert.**

**A:** Das proNGF Abbauenzym MMP7 wurde an unterschiedlichen Kultivierungstagen auf mRNA Ebene in den hGC exprimiert. Dabei nahm die Menge von MMP7 deutlich ab. Auch MMP9 – Abbauenzym für NGF – wurde in den hGC gebildet und veränderte seine Menge während der Kultivierung nur gering. Als Kontrolle wurde DEPC Wasser (-) bzw. RNA anstatt cDNA verwendet. β-Aktin diente als interner Standard. **B:** MMP7 und MMP9 wurden ebenfalls auf Proteinebene nachgewiesen. Die Menge an MMP7 nahm an den ersten Kultivierungstagen zu und wurde an Tag 4 und Tag 5 wieder weniger. MMP9 hingegen war an allen Kultivierungstagen nur in geringen Mengen detektierbar. β-Aktin diente als interner Standard.

Zur quantitativen Bestätigung der RT-PCR Ergebnisse über den mRNA Gehalt von MMP9 in den humanen Granulosazellen im Verlauf der fünftägigen Kultivierungsdauer wurden qPCR Experimente mit zwei unterschiedlichen Probenreihen durchgeführt. Außerdem wurde anhand einer Probenreihe die Expression von MMP9 auf mRNA Ebene in den humanen Granulosazellen von PCOS Patientinnen untersucht.

Generell war in beiden Patientengruppen – sowohl bei Patientinnen ohne als auch bei Patientinnen mit PCOS – eine deutliche Abnahme der MMP9 mRNA im Laufe der fünftägigen Kultur zu erkennen. Der mRNA Gehalt von MMP9 in den humanen Granulosazellen aus Patientinnen ohne PCOS nahm bis zu Kultivierungstag 3 deutlich ab, stieg an Tag 4 wieder leicht an, um an Tag 5 wieder auf etwa die Werte an Tag 3 abzusinken (Abbildung 26A).

Der mRNA Gehalt der Protease MMP9 in den humanen Granulosazellen aus PCOS Patientinnen sank bis zum vierten Kultivierungstag deutlich ab und stieg an Kultivierungstag 5 wieder etwa auf die Menge von Tag 3 an (Abbildung 26B).



**Abbildung 26: Die MMP9 mRNA Level in hGC von Patientinnen ohne und mit PCOS nahmen im Verlauf der Kultivierung ab.**

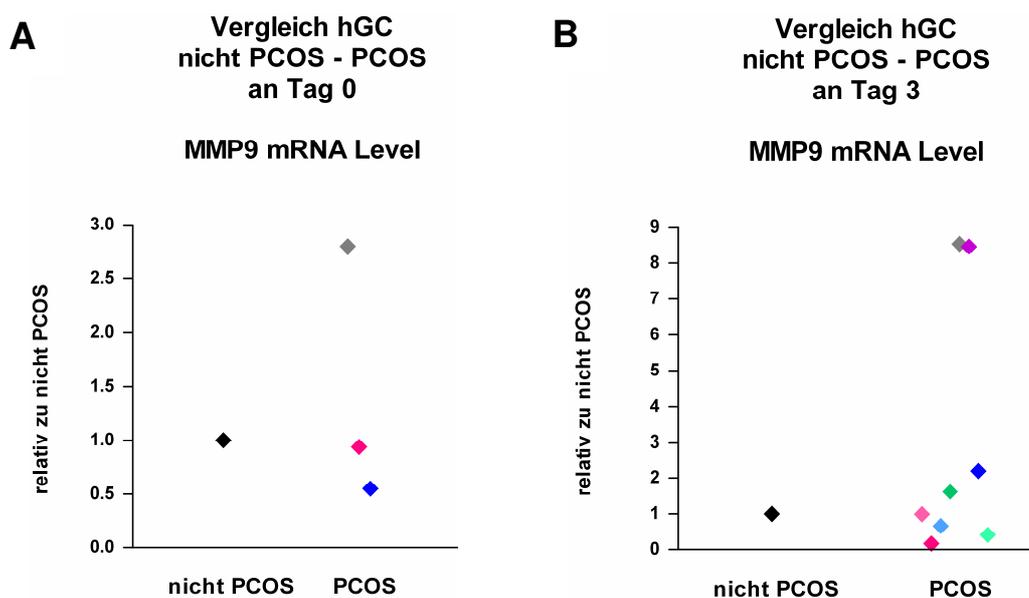
qPCR Experimente. **A:** Die MMP9 mRNA Menge in hGC von Patientinnen mit und ohne PCOS nahm bis zum fünften Tag der Kultivierung deutlich ab. Mittelwert  $\pm$ SD (schwarzer Balken).  $n=2$  **B:** Eine Probenreihe von hGC aus PCOS Patientinnen zeigte im Verlauf der Kultivierung ebenfalls eine deutliche Abnahme der MMP9 mRNA Level bis zum fünften Tag in Kultur. Normierung der Werte jeweils auf Tag 1. GAPDH wurde als interner Standard verwendet.

Im nächsten Schritt wurde der mRNA Gehalt von MMP9 in frischen, unkultivierten (Tag 0) und in drei Tage kultivierten humanen Granulosazellen sowohl von Patientinnen mit als auch von Patientinnen ohne PCOS quantitativ (qPCR) untersucht und miteinander verglichen.

Die mRNA Level von MMP9 in den noch unkultivierten Zellen (Abbildung 27A) verhielten sich ähnlich zu denen von proNGF/NGF (vgl. Abbildung 14A). Zwei Proben der PCOS Patientinnen zeigten tendenziell niedrigere Werte, die dritte Probe einen deutlich erhöhten Wert im Vergleich zu dem Wert aus dem Pool aus 11 Patientinnen ohne PCOS. Aufgrund der großen Schwankungen der einzelnen

Messwerte ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen in der Menge an vorhandener MMP9 mRNA ( $p = 1,25$ ; Wilcoxon rank sum Test).

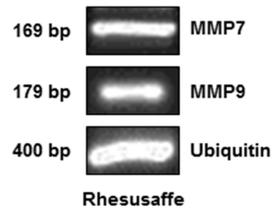
An Versuchstag 3 zeigten zwei der acht untersuchten PCOS Proben sehr deutlich erhöhte MMP9 Werte im Vergleich zu dem Wert aus dem Pool aus zehn Patientinnen ohne PCOS und auch im Vergleich zu den restlichen Proben (Abbildung 27B). Die restlichen sechs Proben lagen in etwa gleichmäßig über bzw. unter dem Vergleichswert der Patientinnen ohne PCOS. Somit war der Unterschied zwischen der mRNA Menge von MMP9 in den Granulosazellen von Patientinnen ohne und mit PCOS nicht signifikant ( $p = 0,383$ ; Wilcoxon rank sum Test).



**Abbildung 27: Vergleich der MMP9 mRNA Level in hGC von Patientinnen ohne und mit PCOS.**

qPCR Experimente. **A:** Der Vergleich der frischen, unkultivierten Zellen (Tag 0) beider Patientengruppen zeigte keine signifikante Zu- oder Abnahme der mRNA von MMP9 bei den PCOS Patientinnen.  $p = 1,25$  (Wilcoxon rank sum Test). **B:** An Tag 3 war ebenfalls keine signifikante Zu- oder Abnahme von MMP9 in den hGC aus PCOS Patientinnen zu erkennen.  $p = 0,383$  (Wilcoxon rank sum Test).

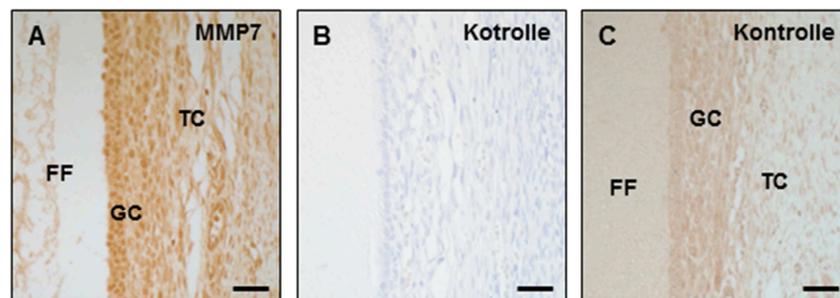
Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass sowohl proNGF/NGF als auch ihre Rezeptoren TrkA, p75<sup>NTR</sup> und Sortilin auf mRNA Ebene in Rhesusaffen vorhanden sind, sollten nun noch die einzelnen Proteasen für den Abbau von proNGF zu NGF – MMP7 – sowie für den Abbau von NGF – MMP9 – nachgewiesen werden. Die Expression dieser beiden Proteasen konnte analog zum humanen System im Rhesusaffen mittels RT-PCR bestätigt werden (Abbildung 28).



**Abbildung 28: Die Abbauenzyme für proNGF und NGF wurden im Affenovar nachgewiesen.**

MMP7 und MMP9 wurden in ovarieller cDNA aus Rhesusaffen exprimiert. Ubiquitin diente als interne Kontrolle.

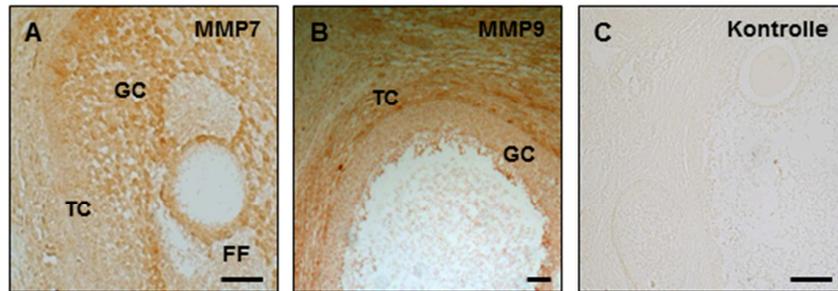
Des Weiteren wurde untersucht, ob und in welchen Regionen MMP7 und MMP9 im ovariellen Gewebe von Mensch und Rhesusaffe exprimiert werden. MMP7 konnte in humanem ovariellen Gewebe in der Follikelflüssigkeit sowie den Granulosa- und Thekazellen nachgewiesen werden (Abbildung 29A).



**Abbildung 29: MMP7 Expression wurde im humanen Ovar gezeigt.**

Immunohistochemische Färbung von in Paraffin eingebettetem humanem ovariellen Gewebe. **A:** MMP7 wurde in GC, TC und der FF exprimiert. **B:** Kontrolle mit dem Sekundärantikörper. **C:** Kontrolle mit Ratten Normalserum. Positive Färbung der Schnitte war braun. Teilweise wurden die Schnitte mit Hematoxylin gegengefärbt. Maßstabsleiste: ~100 µm.

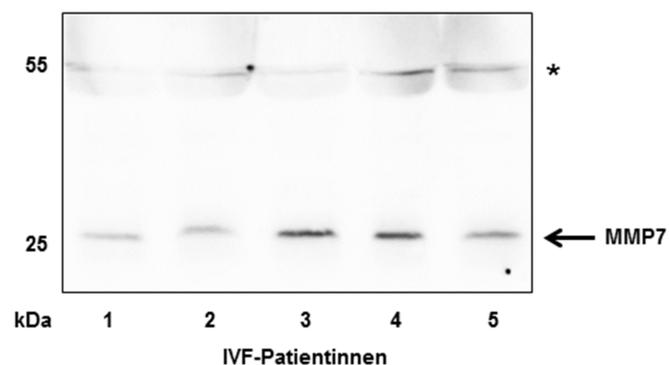
In ovariellen Gewebe aus Rhesusaffen konnte MMP7 (Abbildung 30A) ebenso wie bei humanem ovariellen Gewebe (Abbildung 29A) in den Granulosa- und Thekazellen sowie in der Follikelflüssigkeit nachgewiesen werden. MMP9 hingegen wurde nur in den Granulosa- und Thekazellen des ovariellen Gewebes aus Rhesusaffen angefärbt (Abbildung 30B).



**Abbildung 30: MMP7 und MMP9 wurden im Ovar von Rhesusaffen detektiert.**

Immunhistochemische Färbung von in Paraffin eingebettetem ovariellen Gewebe aus Rhesusaffen. **A:** MMP7 Expression in GC, TC sowie der FF. **B:** MMP9 Expression in GC und TC von Affenfollikeln. **C:** Kontrolle mit dem Sekundärantikörper. Positive Färbung der Schnitte war braun. Maßstabsleiste: ~100 µm.

Da proNGF in der Follikelflüssigkeit von IVF-Patientinnen (Abbildung 18) sowie anhand immunhistochemischer Färbungen in der Follikelflüssigkeit von humanem ovariellen Gewebe (Abbildung 16) nachgewiesen werden konnte und ebenfalls anhand immunhistochemischer Färbungen von humanem ovariellen Gewebe gezeigt werden konnte, dass MMP7 auch in der Follikelflüssigkeit (Abbildung 29) exprimiert wurde, stellte sich die Frage, ob proNGF in der Follikelflüssigkeit zu NGF prozessiert wird. Da MMP7 für den extrazellulären Abbau von proNGF zu reifem NGF nötig ist, wurde untersucht, ob diese Matrix-Metalloprotease auch in der Follikelflüssigkeit von IVF-Patientinnen vorhanden ist. Tatsächlich konnte in allen Proben von Follikelflüssigkeiten MMP7 in unterschiedlichen Mengen mittels Western Blot gefunden werden (Abbildung 31).

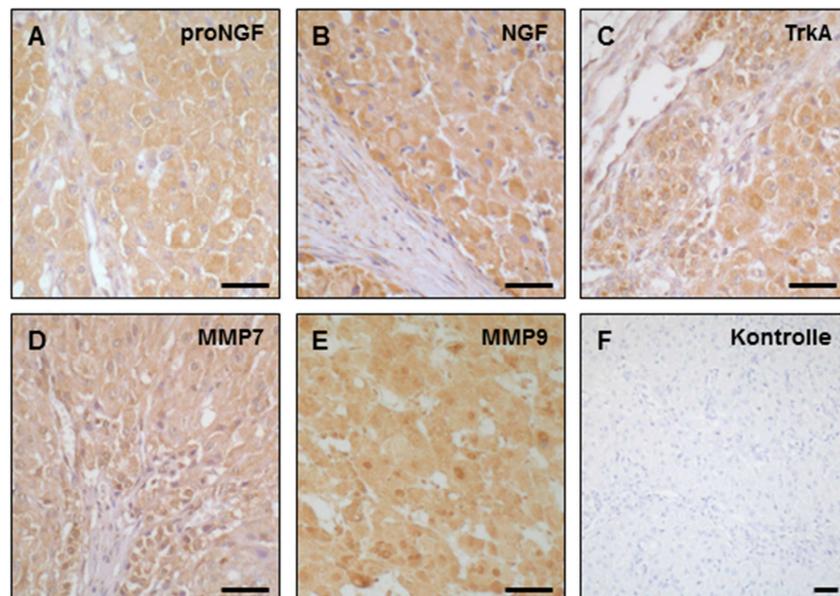


**Abbildung 31: MMP7 wurde in der FF nachgewiesen.**

MMP7 war in der FF von fünf unterschiedlichen IVF-Patientinnen vorhanden. 30 µg Gesamtprotein wurden aufgetragen. \*: Albuminbande.

### 3.1.4 Komponenten des proNGF/NGF-Systems sind im Gelbkörper nachweisbar

Im Gelbkörper konnten sowohl proNGF (Abbildung 32A) als auch NGF (Abbildung 32B), TrkA (Abbildung 32C) sowie MMP7 und MMP9 (Abbildung 32D und E) nachgewiesen werden.



**Abbildung 32: Die Faktoren des proNGF/NGF-Systems konnten im Gelbkörper detektiert werden.**

Immunhistochemische Färbungen von in Paraffin eingebettetem humanem ovariellen Gewebe zur Expression von **A:** ProNGF. **B:** NGF. **C:** TrkA. **D:** MMP7. **E:** MMP9. **F:** Kontrolle mit dem Sekundärantikörper. Positive Färbung der Schnitte war braun. Die Schnitte wurden mit Hematoxylin gegengefärbt. Maßstabsleiste: ~50 µm.

### 3.2 Funktionen des proNGF/NGF-Systems in humanen Granulosazellen

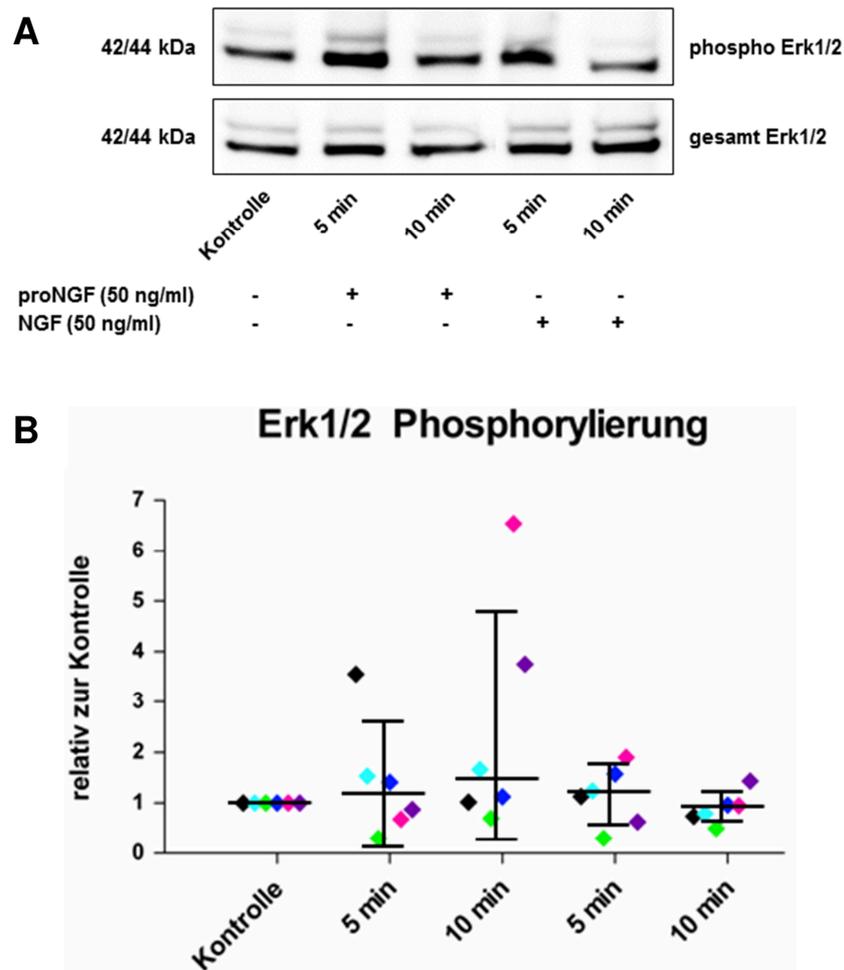
Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass alle wichtigen Faktoren des proNGF/NGF-Systems – proNGF und NGF, MMP7 und MMP9, TrkA, p75<sup>NTR</sup> und Sortilin – in den humanen Granulosazellen vorhanden sind, sollten nun unterschiedliche Funktionen dieses Systems bzw. Effekte durch proNGF und NGF auf die humanen Granulosazellen untersucht werden.

#### 3.2.1 Einfluss von proNGF und NGF Stimulation auf die MAPK Phosphorylierung

Um zu testen, ob es bei Stimulation mit proNGF zu ähnlichen Effekten kommt wie mit NGF, wurden die humanen Granulosazellen an Tag 2 der Kultivierung mit rekombinantem proNGF (50 ng/ml) und NGF (50 ng/ml) einer Kurzzeitstimulation (5 min bzw. 10 min) unterzogen. Anschließend wurde im Western Blot überprüft, ob es zu einer Phosphorylierung von Erk1/2 kam. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem ANOVA Test (post-Test: Newman-Keuls multiple comparison Test).

Sowohl Erk1/2 als auch phospho Erk1/2 konnten in den humanen Granulosazellen nachgewiesen werden (Abbildung 33A). Die densitometrische Auswertung der sechs biologischen Replikate ergab, dass bei fünf- und zehnminütiger Behandlung der humanen Granulosazellen mit proNGF (50 ng/ml) die einzelnen Werte sehr streuten (Abbildung 33B). Aufgrund der starken Abweichungen der Einzelwerte ließ sich keine klare Aussage über die Phosphorylierung von Erk1/2 durch die proNGF Stimulation machen. Dennoch hatte proNGF eher keinen Einfluss auf die MAPK Phosphorylierung.

Ebenso wie bei der Behandlung mit proNGF, jedoch nicht ganz so stark, streuten die Einzelwerte nach fünf- und zehnminütiger Stimulation der Zellen mit NGF (50 ng/ml) (Abbildung 33B). Somit begünstigte auch die Stimulation der Granulosazellen mit NGF die Phosphorylierung von Erk1/2 nicht. Die statistische Auswertung aller sechs Replikate ergab zu allen Zeitpunkten und bei beiden Behandlungen (proNGF und NGF) keine signifikanten Änderungen in der Phosphorylierungsrate von Erk1/2 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen und zwischen der Behandlung mit proNGF und der Behandlung mit NGF ( $p > 0,05$ ).



**Abbildung 33: ProNGF und NGF Stimulation führt nicht zur Phosphorylierung von Erk1/2.**

**A:** Beispiel Western Blot mit hGC nach Stimulation mit proNGF und NGF (jeweils 50 ng/ml) für 5 min bzw. 10 min an Tag 2 der Kultivierung. Gesamt Erk1/2 diente als interner Standard. **B:** Die densitometrische Auswertung aller Western Blots ergab zu allen Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede in der Phosphorylierung der MAPK zwischen den behandelten und den unbehandelten Zellen sowie zwischen beiden Behandlungen ( $p > 0,05$ ; ANOVA: Newman-Keuls multiple comparison Test). Aufgetragen wurden die Einzelwerte der sechs biologischen Replikate mit dem Median  $\pm$ SD. Die Werte der Stimulationen wurden auf die unbehandelte Kontrolle normiert.

### 3.2.2 Einfluss von proNGF und NGF auf die Vitalität der humanen Granulosazellen

Haben proNGF und NGF auch auf die humanen Granulosazellen dieselbe Wirkung wie auf die Nervenzellen (proNGF Stimulation führt zur Apoptose, NGF Stimulation zum Überleben/Proliferation)? Um dies zu überprüfen, wurden verschiedene Vitalitätsparameter an unterschiedlichen Kultivierungstagen unter Einfluss von proNGF bzw. NGF bestimmt.

#### 3.2.2.1 ProNGF und NGF haben keinen nachweisbaren Effekt auf das Zellwachstum von humanen Granulosazellen

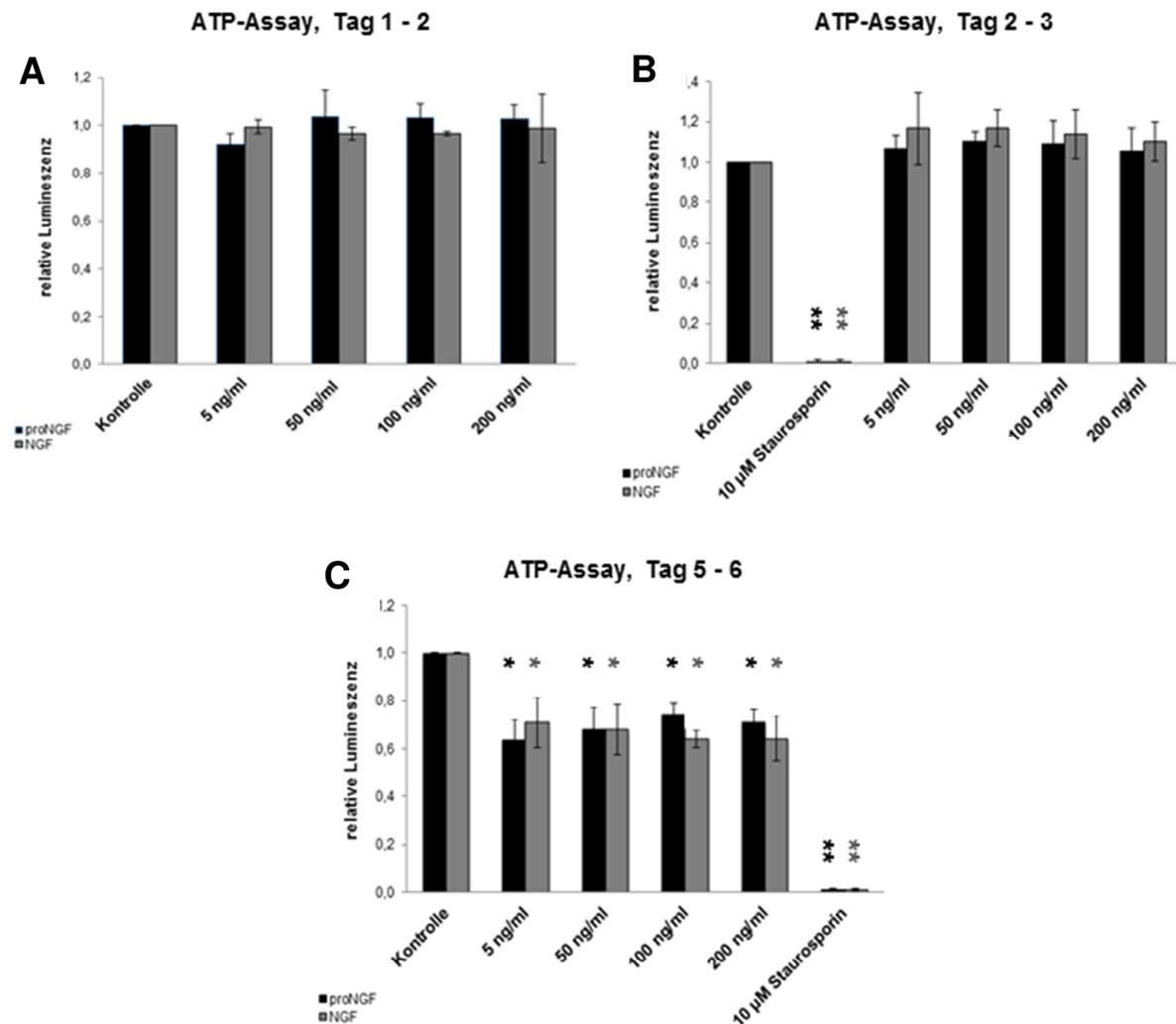
Niedrige ATP-Konzentrationen in den Zellen sind ein Anzeichen für verringerte Zellvitalität. Um zu untersuchen, ob proNGF die Vitalität der humanen Granulosazellen herabsetzt und NGF deren Vitalität erhöht, wurden ATP-Assays durchgeführt. Dazu wurden die humanen Granulosazellen an verschiedenen Kultivierungstagen ausgesät und für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an proNGF bzw. NGF (jeweils 5, 50, 100 und 200 ng/ml) stimuliert. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem ANOVA Test (post-Test: Newman-Keuls multiple comparison Test).

An Versuchstag 1 bis 2 und Versuchstag 2 bis 3 war zwischen den mit proNGF bzw. NGF behandelten humanen Granulosazellen und den unbehandelten Kontrollzellen sowie zwischen den proNGF und den NGF behandelten Zellen kein signifikanter Unterschied in der ATP-Menge in den Zellen zu erkennen ( $p > 0,05$ ) (Abbildung 34A und B). Die Werte der stimulierten Zellen unterschieden sich an diesen beiden Versuchstagen nur geringfügig von denen der unbehandelten Kontrollzellen. So war im Konzentrationsbereich von 5 ng/ml bis 200 ng/ml weder für proNGF noch für NGF eine dosisabhängige Wirkung zu erkennen. Ein möglicher Grund dafür, dass zwischen der Behandlung mit proNGF und der Behandlung mit NGF kein großer und signifikanter Unterschied vorliegt, könnte dadurch bedingt sein, dass proNGF im Laufe der 24stündigen Behandlung zu NGF abgebaut wurde. Es gab nur an Versuchstag 2 auf 3 einen signifikanten Unterschied zwischen der Behandlung mit Staurosporin und der Kontrolle (\*\*:  $p > 0,001$ ).

An den Kultivierungstagen 5 bis 6 waren die ATP-Werte der behandelten Zellen deutlich geringer als die der Kontrollzellen (\*:  $p < 0,01$ ) (Abbildung 34C). Es gab jedoch zwischen den Behandlungen mit proNGF und NGF keinen signifikanten Unterschied ( $p > 0,05$ ). Außerdem war keine Dosisabhängigkeit in dem verwendeten Konzentrationsbereich erkennbar. Zwischen den mit Staurosporin behandelten und den unbehandelten Kontrollzellen war ein signifikanter Unterschied im ATP-Gehalt zu erkennen (\*\*:  $p < 0,001$ ).

Anhand dieser Ergebnisse war an allen Versuchstagen keine unterschiedliche Wirkung von proNGF und NGF auf die humanen Granulosazellen erkennbar. Zumindest an den Versuchstagen 1 auf 2 und 2 auf 3 konnte nicht beobachtet werden, dass sich die Vitalität der Zellen durch Stimulation mit proNGF bzw. NGF verbesserte oder verschlechterte. Nur an Versuchstag 5 bis 6 verschlechterte sich die Vitalität der humanen Granulosazellen sowohl durch die Behandlung mit proNGF als auch durch die Behandlung mit NGF, was möglicherweise auf einen apoptotischen Effekt der beiden Faktoren an diesen Versuchstagen schließen lässt.

Somit hat die Wirkung von proNGF und NGF auf die humanen Granulosazellen möglicherweise nicht immer denselben Effekt wie auf neuronale Zellen.



**Abbildung 34: ProNGF und NGF hatten nicht an allen Versuchstagen einen Effekt auf die Vitalität von hGC.**

Die Stimulation der hGC erfolgte mit unterschiedlichen Konzentrationen an proNGF und NGF für 24 h von **A:** Tag 1 auf 2. **B:** Tag 2 auf 3. **C:** Tag 5 auf 6 der Kultur. Zwischen proNGF und NGF war kein signifikanter Unterschied in der Wirkung auf die Zellen an allen drei Versuchstagen zu erkennen ( $p > 0,05$ ). Des Weiteren wurde die Vitalität der Zellen durch beide Faktoren an Versuchstag 1 auf 2 (**A**) und Versuchstag 2 auf 3 (**B**) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle weder erheblich verbessert noch verschlechtert. An Tag 5 auf Tag 6 (**C**) konnte eine signifikante Abnahme des ATP-Gehalts bei den mit proNGF und NGF behandelten Zellen beobachtet werden (\* bzw. \*:  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle). Staurosporin (10  $\mu$ M) diente als Negativkontrolle (\*\* bzw. \*\*:  $p < 0,001$ , im Vergleich zur Kontrolle). Aufgetragen wurde der Mittelwert  $\pm$ SD aus fünf (Tag 1 auf Tag 2) bzw. vier (Tag 2 auf 3 und Tag 5 auf 6) Einzelmessungen mit jeweils sechs Replikaten. ANOVA: Newman-Keuls multiple comparison Test.

### 3.2.2.2 ProNGF und NGF haben keinen signifikanten Einfluss auf die Caspaseaktivität in humanen Granulosazellen

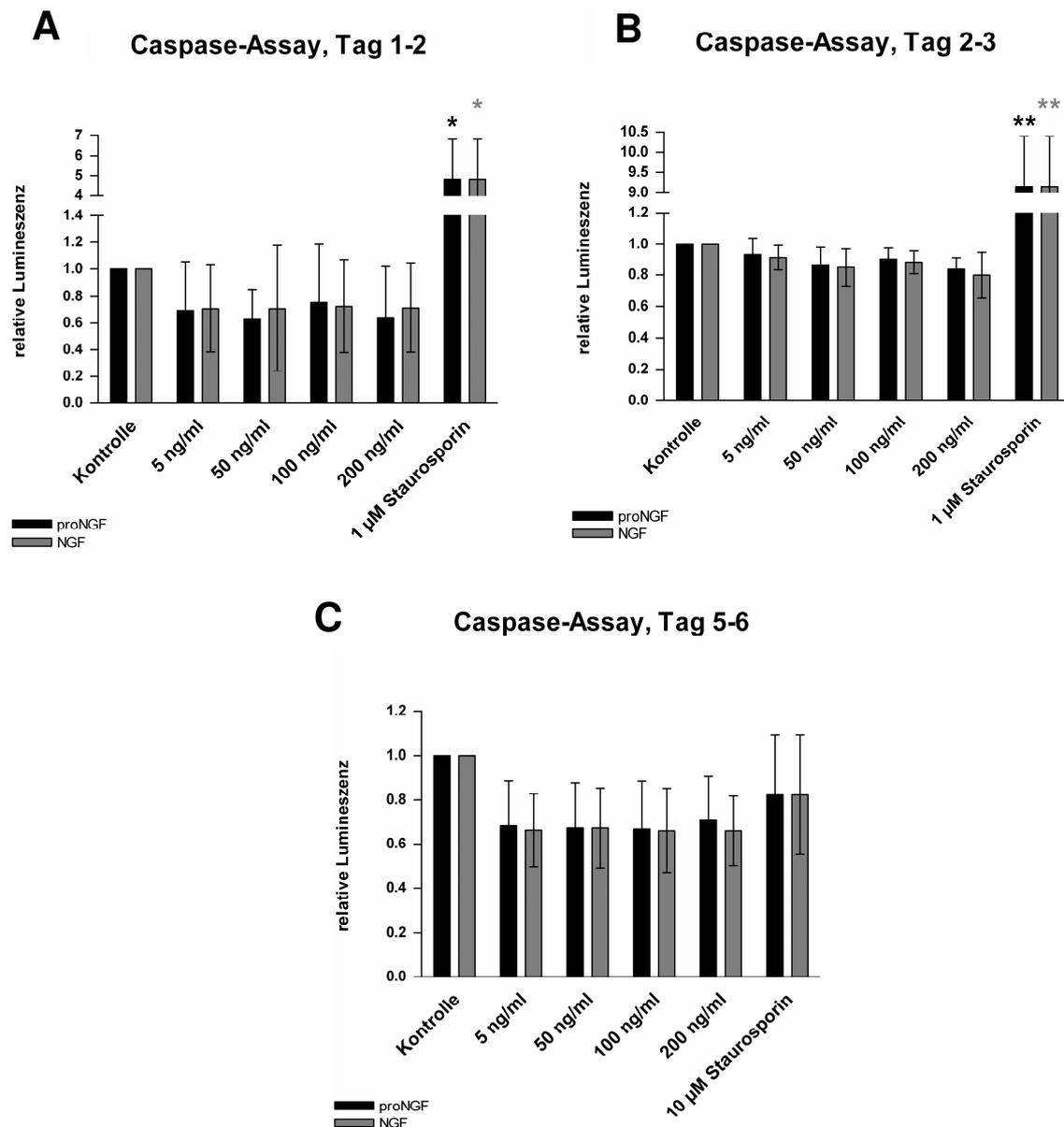
Um die Effekte von proNGF und NGF auf die Apoptoserate der kultivierten Zellen zu überprüfen, wurden Caspase-Assays an denselben Versuchstagen wie bei der Vitalitätsbestimmung durchgeführt. Hierfür wurden die humanen Granulosazellen ausgesät und mit unterschiedlichen Konzentrationen an proNGF bzw. NGF (jeweils 5, 50, 100 und 200 ng/ml) für 24 h stimuliert. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem ANOVA Test (post-Test: Newman-Keuls multiple comparison Test).

Ebenso wie schon die ATP-Assays zur Vitalitätsbestimmung (Abbildung 34A-C), zeigten auch die Caspase-Assays zur Apoptosemessung (Abbildung 35A-C) keine signifikanten Unterschiede in der Wirkung von proNGF bzw. NGF auf die humanen Granulosazellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen ( $p > 0,05$ ). Des Weiteren war ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen der Behandlung mit proNGF und der Behandlung mit NGF zu erkennen. Dies liegt möglicherweise darin begründet, dass proNGF im Laufe der Stimulationsdauer zu NGF abgebaut wurde. Zudem war keine Dosisabhängigkeit in der Wirkung der beiden Stimulanzien in dem verwendeten Konzentrationsbereich von 5 ng/ml bis 200 ng/ml zu erkennen.

Weder proNGF noch NGF bewirkten an Versuchstag 1 auf 2 sowie an Versuchstag 2 auf 3 (Abbildung 35A und B) ein apoptotisches Absterben der Zellen durch die Caspasen 3 und 7. Die Positivkontrolle Staurosporin hingegen löste in den humanen Granulosazellen die Apoptose aus (\*:  $p < 0,01$  bzw. \*\*:  $p < 0,001$ ). Die relative Lumineszenz der behandelten Zellen lag unter der der unbehandelten Kontrollzellen und nicht deutlich darüber wie bei Staurosporin.

Ebenso wie an den ersten beiden Versuchstagen war auch an Versuchstag 5 bis 6 kein signifikanter Unterschied zwischen den mit proNGF bzw. NGF behandelten Zellen und den unbehandelten Kontrollzellen zu erkennen ( $p > 0,05$ ), obwohl die relative Lumineszenz im Vergleich zur Kontrolle geringer war (Abbildung 35C). Unterschiedlich zu den vorherigen Ergebnissen war, dass Staurosporin an Versuchstag 5 bis 6 keinen pro-apoptotischen Effekt auf die Zellen hatte wie an den beiden anderen Versuchstagen (Tag 1 bis 2 und Tag 2 bis 3) bzw. wie man es von Staurosporin erwartet hätte (Chae et al. 2000).

Somit hatten weder proNGF noch NGF an diversen Versuchstagen einen Apoptose auslösenden Effekt auf die humanen Granulosazellen.



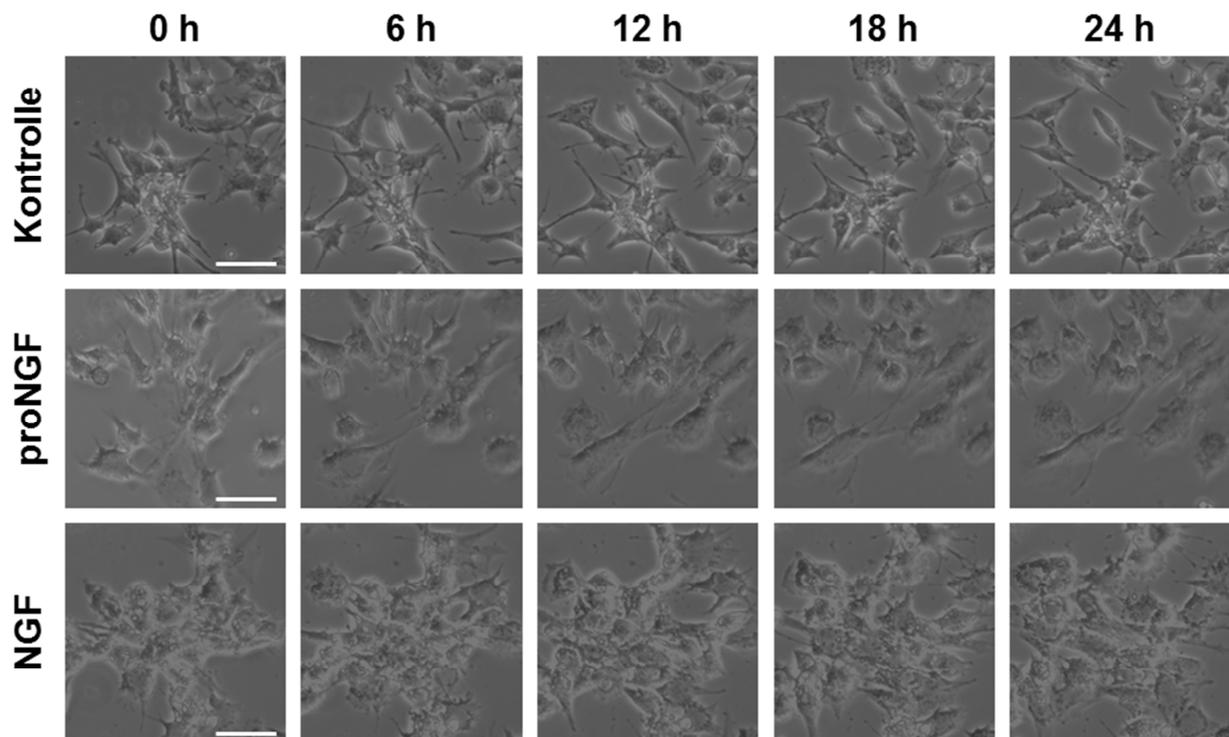
**Abbildung 35: ProNGF und NGF hatten keinen apoptotischen Effekt auf die hGC.**

Die Stimulation der Zellen erfolgte mit unterschiedlichen Konzentrationen an proNGF und NGF für 24 h von **A**: Tag 1 auf 2. **B**: Tag 2 auf 3. **C**: Tag 5 auf 6 der Kultur. Zwischen proNGF und NGF war an allen drei Versuchstagen kein signifikanter Unterschied in ihrer Wirkung auf die hGC zu erkennen ( $p > 0,05$ ). Beide Faktoren hatten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ebenfalls keinen apoptotischen Effekt auf die Zellen ( $p > 0,05$ ). Staurosporin (1  $\mu\text{M}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$ ) diente als Positivkontrolle. Aufgetragen wurde der Mittelwert  $\pm$  die Spannweite der Werte (**A**) bzw.  $\pm\text{SD}$  (**B** und **C**) (aus zwei (Tag 1 auf 2), drei (Tag 2 auf 3) bzw. vier (Tag 5 auf 6) Einzelmessungen mit jeweils sechs Replikaten). \* bzw. \*:  $p < 0,01$ ; \*\* bzw. \*\*:  $p < 0,001$ , jeweils relativ zur unbehandelten Kontrolle. ANOVA: Newman-Keuls multiple comparison Test.

### 3.2.2.3 Das Wachstumsverhalten von humanen Granulosazellen wird von proNGF und NGF nicht beeinflusst

Nachdem anhand von ATP- (Abbildung 34) und Caspase-Assays (Abbildung 35) an unterschiedlichen Kultivierungstagen gezeigt werden konnte, dass, im Gegensatz zu den Nervenzellen, weder proNGF apoptotisch noch NGF proliferativ auf die humanen Granulosazellen wirkten, wurde das Wachstumsverhalten und die Morphologie der Zellen bei Stimulation mit diesen beiden Faktoren überprüft. Dazu wurden die humanen Granulosazellen von Tag 2 auf 3 der Kultivierung mit proNGF (50 ng/ml) und NGF (50 ng/ml) 24 h behandelt und in diesem Zeitraum wurde alle 20 min ein Bild von den Zellen aufgenommen.

Anhand der Aufnahmen (Abbildung 36) war zu erkennen, dass die unbehandelten Kontrollzellen (Abbildung 36, obere Reihe) kein auffälliges Wachstumsverhalten (starke Vermehrung oder vermehrtes Absterben) zeigten. Ebenso konnte bei den mit proNGF (Abbildung 36, mittlere Reihe) bzw. NGF (Abbildung 36, untere Reihe) behandelten humanen Granulosazellen weder Apoptose noch Proliferation in Folge der Stimulation mit diesen beiden Faktoren beobachtet werden. Somit hatten proNGF und NGF keine erkennbare Wirkung auf das Wachstumsverhalten und die Morphologie der humanen Granulosazellen.



**Abbildung 36: ProNGF und NGF hatten keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten und die Morphologie der hGC.**

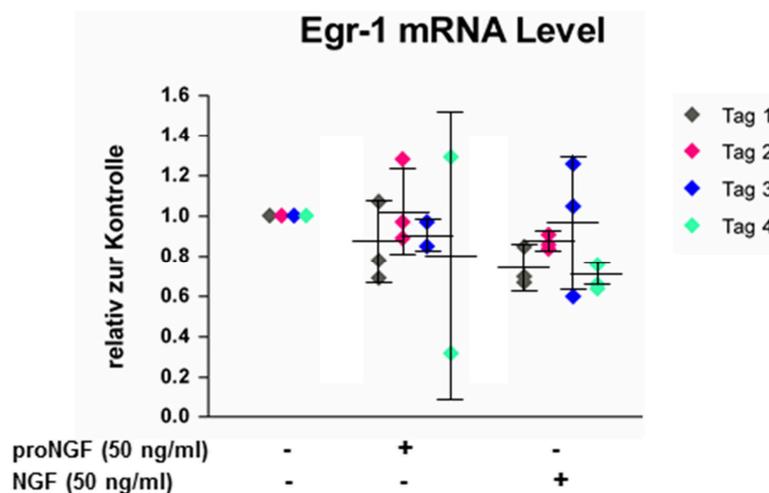
Das Wachstum von hGC wurde über einen Zeitraum von 24 h beobachtet (Kultivierungstag 2 bis 3). Dazu wurden die Zellen sowohl mit proNGF (50 ng/ml) als auch mit NGF (50 ng/ml) behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Zwischen der Kontrolle und den einzelnen Behandlungen war kein Unterschied im Wachstumsverhalten und der Morphologie zu erkennen. Maßstabsleiste: ~50  $\mu$ m.

### 3.2.3 Die Regulation von Egr-1 wird durch NGF, aber nicht durch proNGF beeinflusst

Neben den Effekten von proNGF und NGF auf die humanen Granulosazellen wurden auch Effekte der beiden Faktoren auf die Regulation anderer Gene untersucht. Egr-1 ist ein Transkriptionsfaktor in Säugern, der von proNGF und NGF in HMC-1 Zellen (Human Mast Cell Line-1) in unterschiedlicher Weise reguliert wird (Dutta et al. 2011). Um die unterschiedliche Regulation von Egr-1 in humanen Granulosazellen durch proNGF und NGF zu überprüfen, wurden diese Zellen sowohl auf mRNA Ebene als auch auf Proteinebene auf Veränderungen im Egr-1 Gehalt untersucht.

Für die Versuche wurden die humanen Granulosazellen an unterschiedlichen Kultivierungstagen (Tag 1 bis 4 bzw. Tag 1 bis 5) jeweils mit proNGF (50 ng/ml) und NGF (50 ng/ml) für 1 h behandelt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem ANOVA Test (post-Test: Newman-Keuls multiple comparison Test).

Die Auswertung der qPCR Experimente ergab, dass beide Faktoren – proNGF und NGF – an allen vier Kultivierungstagen keinen signifikanten Effekt auf die Egr-1 mRNA Level ( $p > 0,05$ ) hatten (Abbildung 37). Weder proNGF noch NGF bewirkten eine verstärkte Bildung von Egr-1 mRNA. Zudem konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen mit proNGF und NGF beobachtet werden ( $p > 0,05$ ). Die Betrachtung der Einzelwerte der qPCR Experimente zeigte, dass die Einzelergebnisse an den jeweiligen Versuchstagen teilweise deutlich voneinander abwichen (Abbildung 37).



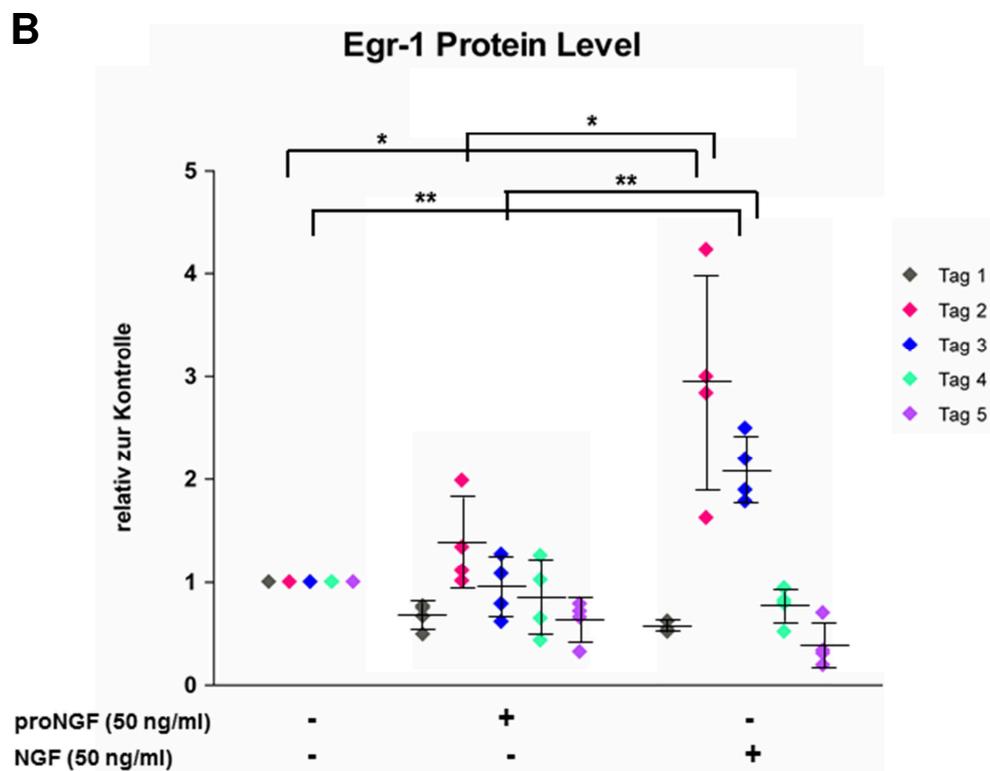
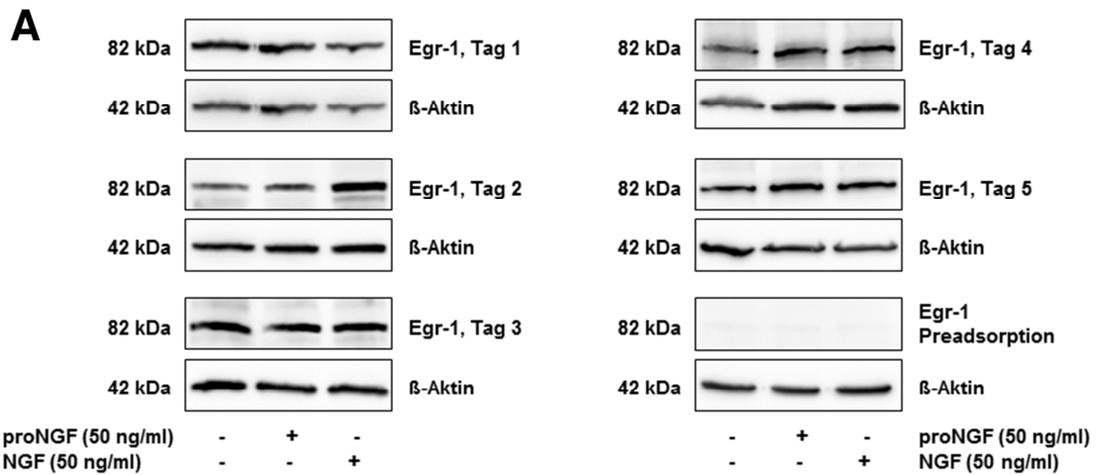
**Abbildung 37: Die Egr-1 mRNA Level in hGC wurden durch proNGF und NGF nicht beeinflusst.**

qPCR Experimente. Weder durch Stimulation mit proNGF (50 ng/ml) noch mit NGF (50 ng/ml) für 1 h kam es an unterschiedlichen Kultivierungstagen zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA Menge von Egr-1 in den hGC ( $p > 0,05$ ; im Vergleich zur Kontrolle und zwischen den beiden Behandlungen. ANOVA: Newman-Keuls multiple comparison Test). Aufgetragen wurden alle Einzelmesswerte der drei biologischen Replikate. Die Werte der Stimulationen wurden auf die unbehandelte Kontrolle normiert. GAPDH wurde als interner Standard verwendet.

Die Western Blot Experimente zeigten, dass Egr-1 Protein an allen fünf Kultivierungstagen in den humanen Granulosazellen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 38A). Die Präadsorption von Egr-1 wurde zur Überprüfung der Identität der Bande durchgeführt. Die densitometrische Auswertung der einzelnen Blots (jeweils vier biologische Replikate pro Versuchstag) ergab, dass die mit proNGF stimulierten Zellen nur an Kultivierungstag 2 einen leichten, jedoch nicht signifikanten ( $p > 0,05$ ) Anstieg im Egr-1 Gehalt in den Zellen aufwiesen (Abbildung 38B). Ansonsten entsprachen die Werte tendenziell denen der Kontrolle oder waren etwas geringer. An Kultivierungstag 1 und Kultivierungstag 5 war die Proteinmenge von Egr-1 bei proNGF Stimulation signifikant niedriger als bei der unbehandelten Kontrolle ( $p < 0,001$  bzw.  $p < 0,05$ ). Insgesamt konnten die Werte an den einzelnen Versuchstagen relativ gut reproduziert werden.

Die Auswertung der NGF Stimulation ergab, dass es nur in den zwei und drei Tage kultivierten humanen Granulosazellen durch NGF zu einem signifikanten Anstieg der Egr-1 Proteinmenge kam (\*:  $p < 0,01$ ; \*\*:  $p < 0,001$ ). Die Proteinmenge von Egr-1 war an Tag 2 und Tag 3 ebenfalls zwischen der proNGF und der NGF Behandlung statistisch signifikant unterschiedlich (\*:  $p < 0,01$ ; \*\*:  $p < 0,001$ ). An den übrigen Versuchstagen (1, 4 und 5) dagegen war keine Erhöhung der Egr-1 Konzentration bei NGF Stimulation zu erkennen. Die Werte lagen deutlich unter denen der unbehandelten Kontrolle.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die mRNA Menge von Egr-1 durch proNGF und NGF nicht beeinflusst wurde. Auf Proteinebene hingegen kam es nur durch NGF an Kultivierungstag 2 und Kultivierungstag 3 zu einem signifikanten Anstieg von Egr-1 in den Zellen.



**Abbildung 38: NGF und nicht proNGF erhöhte die Egr-1 Proteinlevel in den hGC an Tag 2 und Tag 3 der Kultur signifikant.**

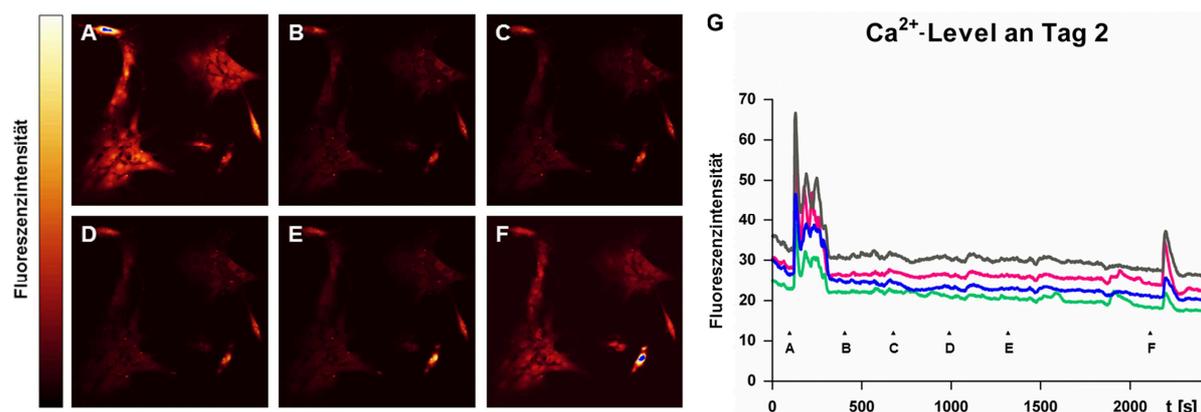
**A:** Repräsentative Western Blots für Egr-1 nach Stimulation der hGC mit proNGF und NGF (jeweils 50 ng/ml) an unterschiedlichen Kultivierungstagen. Die Präadsorption von Egr-1 diente als Kontrolle,  $\beta$ -Aktin als interner Standard. **B:** Densitometrische Auswertung aller Western Blots. Aufgetragen wurden die Werte der vier biologischen Replikate (an jedem Versuchstag) mit dem Mittelwert  $\pm$ SD. Es zeigte sich, dass die Egr-1 Menge an Kultivierungstag 2 und Kultivierungstag 3 nach NGF Stimulation im Vergleich zur Kontrolle und im Vergleich zur proNGF Stimulation signifikant anstieg (\*:  $p < 0,01$ ; \*\*:  $p < 0,001$ ; ANOVA: Newman-Keuls multiple comparison Test). Die stimulierten Proben wurden auf die unbehandelte Kontrolle normiert.

### 3.2.4 ProNGF und NGF haben keinen Einfluss auf den intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel

In Signaltransduktionskaskaden dient  $\text{Ca}^{2+}$  oft als second messenger. Dabei wird  $\text{Ca}^{2+}$  aus seinen intrazellulären Speichern freigesetzt oder fließt aus dem extrazellulären Raum ein und bewirkt verschiedene Effekte auf die Zielproteine, wie z.B. Phosphorylierung. Ist  $\text{Ca}^{2+}$  auch an der Signaltransduktion von proNGF und NGF beteiligt? Um dies herauszufinden, wurden die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in den humanen Granulosazellen nach Applikation von proNGF und NGF (jeweils 50 ng/ml bzw. 100 ng/ml) an Tag 2 und Tag 3 der Kultivierung untersucht. Als methodische Positivkontrollen dienten Histamin (10  $\mu\text{M}$ ) und Trypsin (1:10, entspricht 0,005%), die den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx auslösen. Zwischen der Zugabe der einzelnen Stimulanzien wurden die Zellen mit DMEM/Ham's F12 Medium ohne Zusätze gespült.

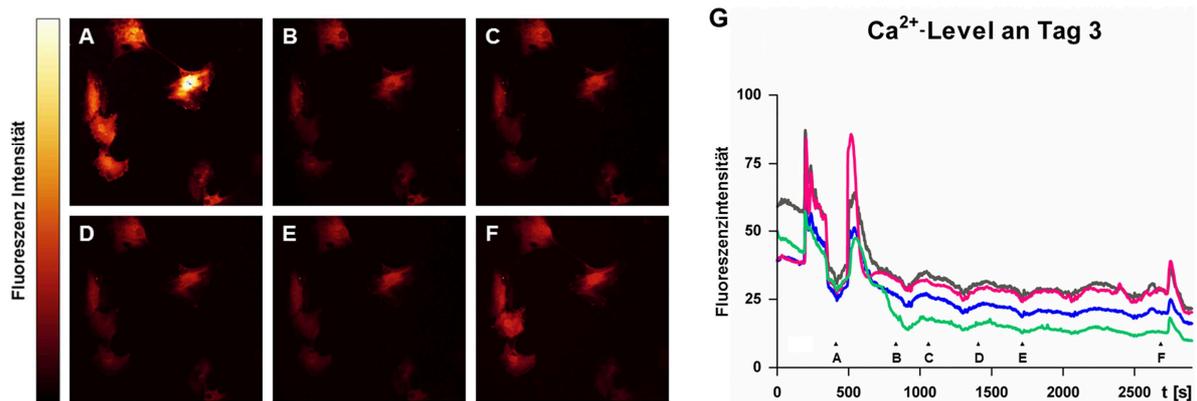
An Kultivierungstag 2 (Abbildung 39) und Kultivierungstag 3 (Abbildung 40) kam es weder durch Stimulation mit proNGF noch mit NGF zu Veränderungen im intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel in den humanen Granulosazellen. Die methodischen/empirischen Kontrollen Histamin (Abbildung 39A) und Trypsin (Abbildung 40A) dagegen bewirkten eine klare Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel in den humanen Granulosazellen. Zur Überprüfung der Vitalität der Zellen und der Funktionalität des Assays wurden die Zellen am Ende der Messung erneut mit Histamin (Abbildung 39F und Abbildung 40F) behandelt. Sowohl an Tag 2 als auch an Tag 3 konnte nochmals eine leichte Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels detektiert werden. Die Intensität der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale einzelner Zellen wurde graphisch dargestellt (Versuchstag 2: Abbildung 39G und Versuchstag 3: Abbildung 40G).

Dieselben Effekte, nämlich dass die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen durch proNGF und NGF nicht erhöht wurden, konnten auch beobachtet werden, nachdem zuerst proNGF bzw. NGF zugegeben wurden, und erst dann die Positivkontrollen Histamin oder Trypsin.



**Abbildung 39: ProNGF und NGF erhöhten die  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel in hGC an Tag 2 der Kultur nicht.**

Zur Bestimmung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Level wurden die hGC behandelt mit **A:** Histamin (10  $\mu\text{M}$ ) als Positivkontrolle. **B:** ProNGF (50 ng/ml). **C:** NGF (50 ng/ml). **D:** ProNGF (100 ng/ml). **E:** NGF (100 ng/ml). **F:** Histamin (10  $\mu\text{M}$ ) als Positivkontrolle. Nur bei der Positivkontrolle Histamin kam es zu einer Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels. **G:** Graphische Darstellung der Fluoreszenzintensität von vier unterschiedlichen Zellen. Das Experiment wurde insgesamt fünfmal wiederholt.  $\blacktriangle$ : Zeitpunkt der Zugabe des Stimulans.



**Abbildung 40: ProNGF und NGF erhöhten die Ca<sup>2+</sup>-Spiegel in hGC an Tag 3 der Kultur nicht.**

Zur Bestimmung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Level wurden die hGC behandelt mit **A:** Trypsin (0,005%) als Positivkontrolle. **B:** ProNGF (50 ng/ml). **C:** NGF (50 ng/ml). **D:** ProNGF (100 ng/ml). **E:** NGF (100 ng/ml). **F:** Histamin (10 µM) als Positivkontrolle. Nur bei den Positivkontrollen Trypsin und Histamin kam es zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegels. **G:** Graphische Darstellung der Fluoreszenzintensität von vier unterschiedlichen Zellen. Das Experiment wurde insgesamt viermal wiederholt. ▲: Zeitpunkt der Zugabe des Stimulans.

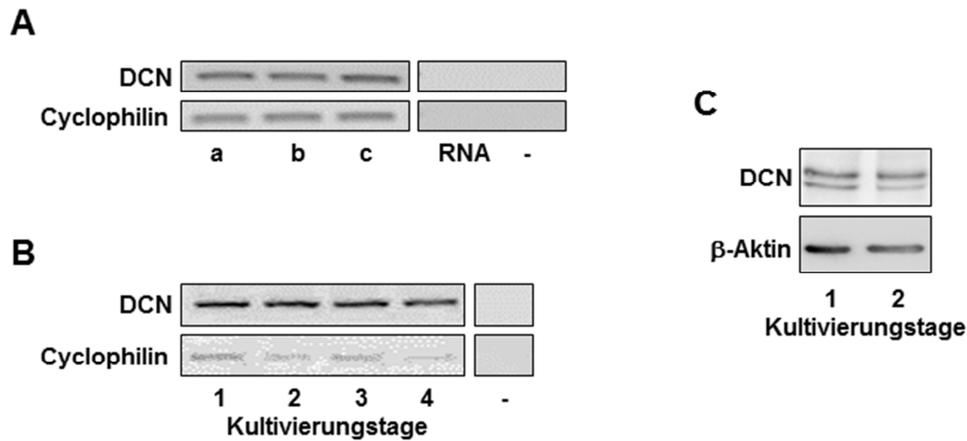
### 3.3 Nebenprojekt: Decorin als Signalmolekül im Ovar

Decorin ist ein kleines, leucinreiches Proteoglykan und Bestandteil der extrazellulären Matrix. Des Weiteren ist Decorin auch in verschiedenen Gewebetypen im Körper zu finden (Iozzo und Schaefer 2010).

In einem Antikörper-basierenden Assay zur Untersuchung der Phosphorylierung von Rezeptor Tyrosinkinasen (RTK) in humanen testikulären peritubulären Zellen (HTPC) wurde gezeigt, dass es durch die Behandlung mit Decorin (5 min, 10 µg/ml) zur Phosphorylierung von Rezeptoren verschiedener Wachstumsfaktoren kam (Dissertation Marion Adam). Unter den detektierten Rezeptoren fand sich auch TrkA, der Rezeptor von NGF. Daher stellte sich die Frage, ob Decorin auch in den humanen Granulosazellen und der Follikelflüssigkeit exprimiert wird und welche Wirkung Decorin auf diese Zellen hat.

#### 3.3.1 Decorin ist in den humanen Granulosazellen detektierbar

Humane Granulosazellen wurden auf die Expression von Decorin sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene untersucht. Dazu wurden frische, noch unkultivierte Zellen (Tag 0) sowie Zellen, die bis zu vier Tage kultiviert wurden, verwendet. Dabei konnte Decorin sowohl in den frischen, unkultivierten Zellen (Abbildung 41A) als auch in den zwischen einem und vier Tagen kultivierten Zellen (Abbildung 41B) auf mRNA Ebene mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Ebenso konnte Decorin auf Proteinebene in ein bzw. zwei Tage kultivierten Zellen (Abbildung 41C) gezeigt werden.

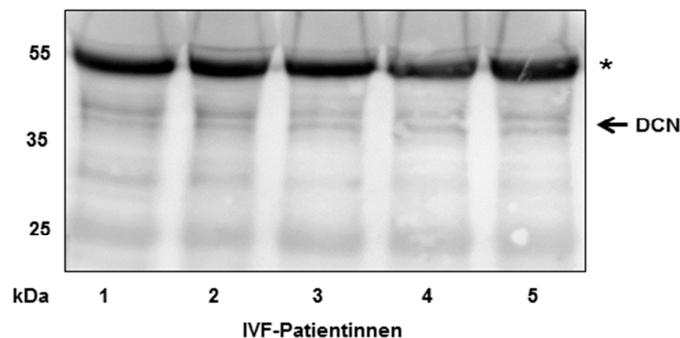


**Abbildung 41: DCN wurde in hGC nachgewiesen.**

**A:** DCN mRNA (Produkt 221 bp) wurde in unterschiedlichen Pools (a – c) von frisch isolierten hGC gefunden. Cyclophilin wurde als interner Standard verwendet. Kontrollen wurden mit RNA anstelle von cDNA (RNA) und ohne cDNA (-) durchgeführt. **B:** DCN mRNA (221 bp Produkt) konnte ebenso in bis zu vier Tage kultivierten hGC nachgewiesen werden. Cyclophilin diente als interner Standard. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne cDNA (-) durchgeführt. **C:** DCN (~ 40 kDa) Expression konnte auch auf Proteinebene mittels Western Blot in kultivierten hGC gezeigt werden. β-Aktin wurde als interner Standard verwendet. Abbildung aus (Adam et al. 2012).

### 3.3.2 Decorin ist in der Follikelflüssigkeit nachweisbar

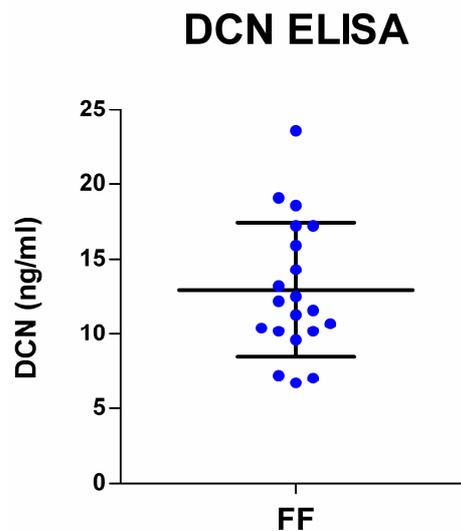
Des Weiteren wurde die Expression von Decorin auch in der Follikelflüssigkeit von IVF-Patientinnen auf Proteinebene untersucht. Decorin konnte in geringen Mengen in der Follikelflüssigkeit von mehreren IVF-Patientinnen nachgewiesen werden (Abbildung 42).



**Abbildung 42: DCN wurde in der FF gefunden.**

DCN (~ 40 kDa) konnte in der FF von fünf unterschiedlichen IVF-Patientinnen nachgewiesen werden. 30 µg Gesamtprotein wurden aufgetragen. \*: Albuminbande.

Zur Bestätigung der Western Blot Ergebnisse und um einen Anhaltspunkt dafür zu bekommen, in welchen Konzentrationen DCN in der Follikelflüssigkeit enthalten ist, wurde zusätzlich ein Decorin ELISA mit weiteren 20 Follikelflüssigkeiten durchgeführt. Im Mittel lag die Decorinkonzentration in der Follikelflüssigkeit bei etwa 12,9 ng/ml (Abbildung 43). Die Betrachtung der Einzelergebnisse der vermessenen Follikelflüssigkeiten zeigte, dass die Werte der untersuchten Proben teilweise sehr streuten. Der Decoringehalt in der Follikelflüssigkeit von IVF-Patientinnen variierte zwischen 6,7 ng/ml und 23,6 ng/ml.



**Abbildung 43: DCN Konzentration in der FF.**

DCN war in der FF von 20 IVF-Patientinnen enthalten. Die einzelnen Messwerte streuten jedoch aufgrund der Inhomogenität der Proben. Auftragung der einzelnen Messwerte  $\pm$ SD. Mittelwert: 12,9 ng/ml. Median: 11,9 ng/ml.

### 3.4.3 Einfluss von Decorin auf die Vitalität der humanen Granulosazellen

Nachdem Decorin in den humanen Granulosazellen nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, welche Wirkung Decorin auf die humanen Granulosazellen hat.

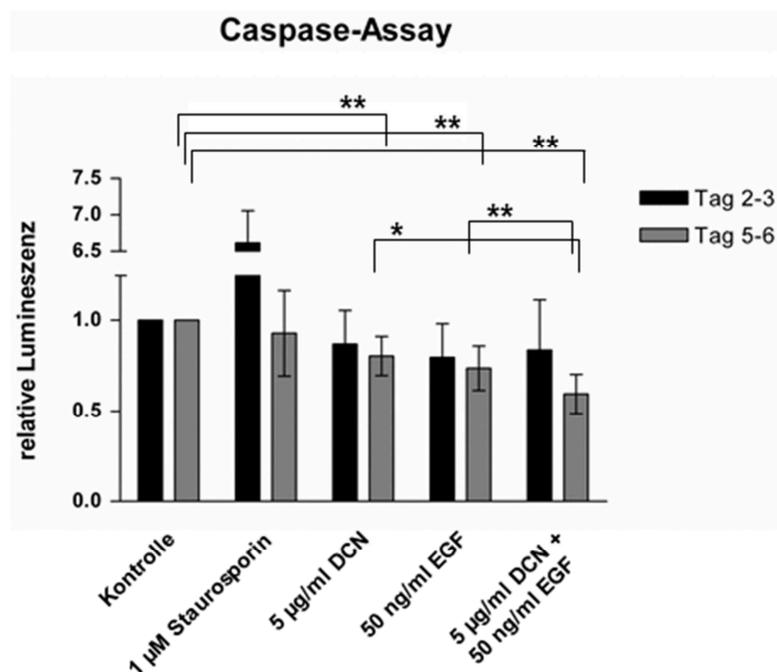
#### 3.4.3.1 Decorin und EGF haben tendenziell antiapoptotische Effekte auf humane Granulosazellen

Zunächst wurde untersucht, ob Decorin Einfluss auf die Vitalität der Zellen nimmt. Dazu wurden die humanen Granulosazellen mit Decorin (5  $\mu$ g/ml) und EGF (50 ng/ml) behandelt und anschließend Caspase-Assays durchgeführt. Für die Experimente wurden Zellen von Kultivierungstag 2 auf 3 bzw. Kultivierungstag 5 auf 6 verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem ANOVA Test (post-Test: Newman-Keuls multiple comparison Test).

An Kultivierungstag 2 bis 3 lag die relative Lumineszenz bei den mit Decorin (5 µg/ml), mit EGF (50 ng/ml) sowie mit einer Kombination aus beiden Faktoren (5 µg/ml DCN + 50 ng/ml EGF) behandelten Granulosazellen leicht unter der der unbehandelten Kontrollzellen. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Somit lösten diese beiden Faktoren sowie die Kombination der beiden Faktoren in den humanen Granulosazellen an Kultivierungstag 2 bis 3 keine Apoptose aus (Abbildung 44). Nur durch die Behandlung mit Staurosporin als Positivkontrolle stiegen die Werte der relativen Lumineszenz signifikant an ( $p < 0,001$ ).

An Versuchstag 5 auf 6 war ein signifikanter Unterschied zwischen den mit Decorin, EGF bzw. Decorin und EGF behandelten Zellen und den Kontrollzellen zu erkennen (\*\*:  $p < 0,001$ ). Ebenso war der Unterschied zwischen den Decorin bzw. EGF behandelten Zellen zur Behandlung mit Decorin und EGF signifikant (\*:  $p < 0,01$  bzw. \*\*:  $p < 0,001$ ). Staurosporin jedoch löste an diesem Versuchstag in drei biologisch unabhängigen Replikaten keine Apoptose aus. Dies war unerwartet, da Staurosporin die Apoptose über Caspase 3 induziert (Chae et al. 2000).

Alle Ergebnisse zusammen könnten auf eine tendenziell antiapoptotische Wirkung von Decorin und EGF auf die humanen Granulosazellen hinweisen.



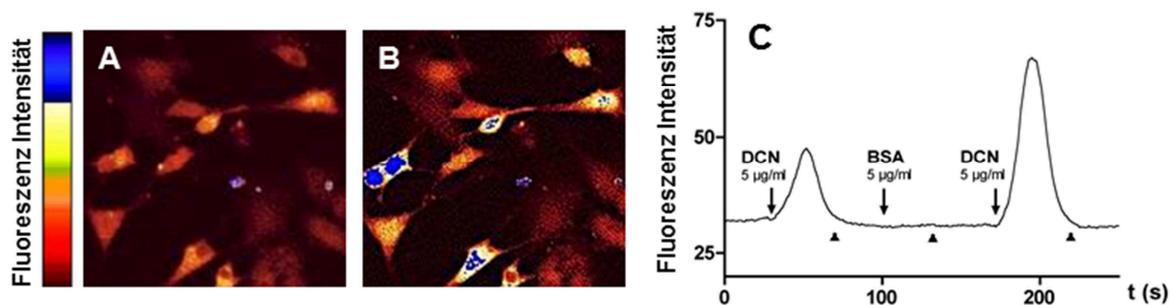
**Abbildung 44: DCN wirkte tendenziell antiapoptotisch auf hGC.**

DCN (5 µg/ml) und EGF (50 ng/ml) sowie eine Kombination aus beiden Faktoren (5 µg/ml DCN + 50 ng/ml EGF) wirkten tendenziell antiapoptotisch auf die hGC. Staurosporin wurde als Positivkontrolle verwendet. Aufgetragen wurden die Mittelwerte  $\pm$ SD aus vier (Tag 2 bis 3) bzw. drei (Tag 5 bis 6) Einzelmessungen mit jeweils sechs Replikaten. \*:  $p < 0,01$ . \*\*:  $p < 0,001$ . ANOVA: Newman-Keuls multiple comparison Test.

### 3.4.3.2 Decorin erhöht die intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel

Des Weiteren wurde untersucht, welchen Einfluss Decorin auf die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in humanen Granulosazellen hat. Dazu wurden die Zellen mit Decorin ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) behandelt und gleichzeitig die Fluoreszenzintensität beobachtet.

Die Ergebnisse zeigten, dass in den meisten Zellen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel in den Zellen nach Decorin-Zugabe sehr schnell anstiegen (Abbildung 45B). Die Zugabe von DMEM/Ham's F12 Medium (Kontrolle) erhöhte die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen nicht (Abbildung 45A). Die graphische Darstellung der Fluoreszenzintensität über die Zeit am Beispiel einer einzelnen Zelle (Abbildung 45C) zeigte, dass die Reaktion sehr schnell auf die Decorin-Zugabe erfolgte und auch wiederholbar war.



**Abbildung 45: DCN erhöhte die  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel in hGC.**

**A:** Behandlung der hGC mit DMEM/Ham's F12 Medium. Die Zellen reagierten nicht auf die Zugabe von Medium und es kam zu keiner Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Level. **B:** Behandlung der Zellen mit DCN ( $5 \mu\text{g/ml}$ ). Die meisten Zellen reagierten auf die Behandlung mit DCN und zeigten erhöhte Konzentrationen an intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ . **C:** Graphische Darstellung der Fluoreszenzintensität einer einzelnen Zelle. Die Antwort auf DCN erfolgte innerhalb von Sekunden und war wiederholbar. ▲: Zugabe von DMEM/Ham's F12 Medium. Abbildung aus (Adam et al. 2012).

## 4. Diskussion

### 4.1 Die Komponenten des proNGF/NGF-Systems sind in den humanen Granulosazellen vorhanden

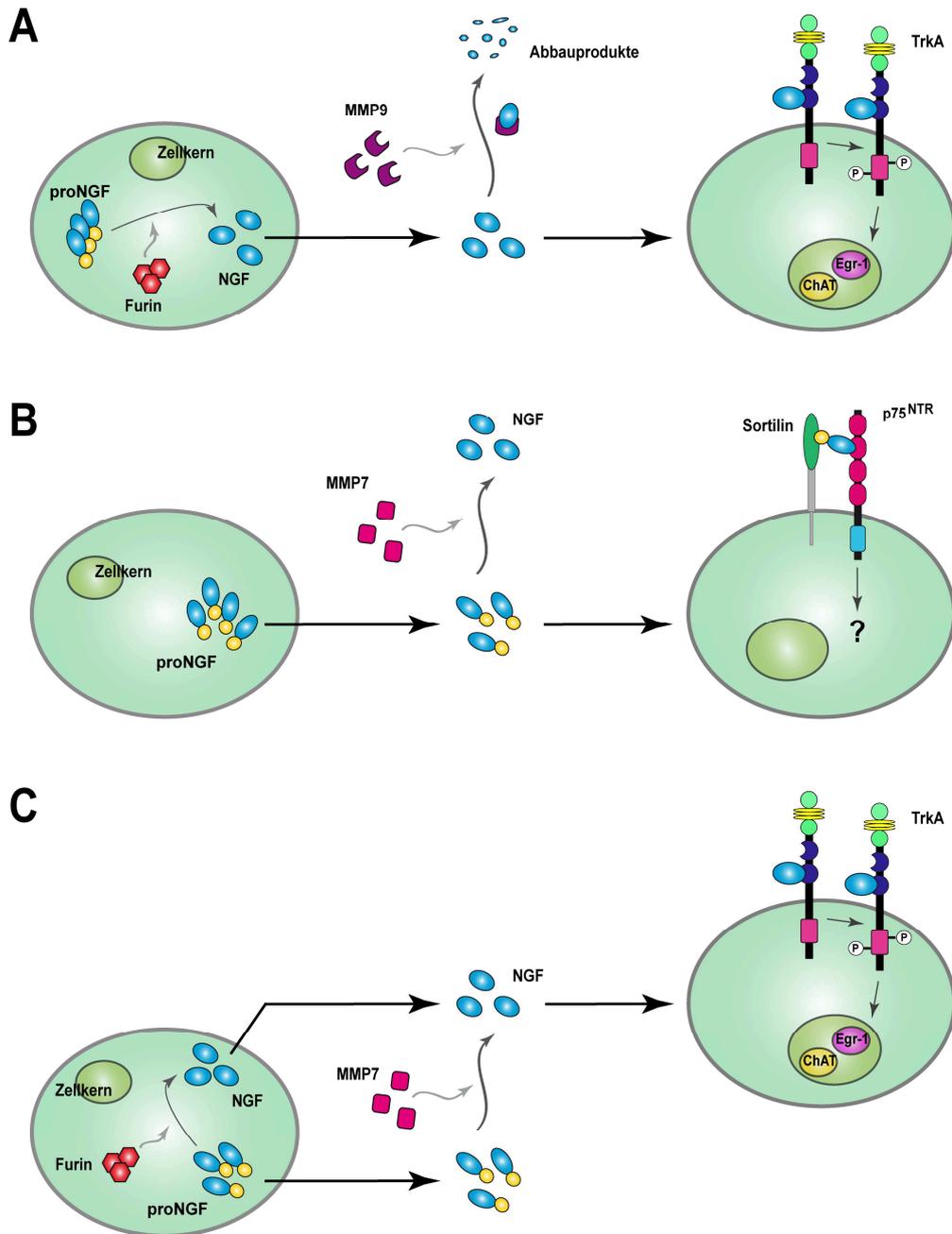
ProNGF und NGF sind wichtige Signalmoleküle im Nervengewebe und auch in anderen Geweben. Sie steuern dabei oft die Zellproliferation und die Apoptose. Nachdem in Nagern eine Beteiligung von NGF an der Follikelbiogenese gezeigt wurde, war von Interesse, ob proNGF und NGF in den humanen Follikeln ebenfalls eine wichtige Rolle spielen. Als Grundvoraussetzung dafür müssen die zentralen Komponenten des proNGF/NGF-Signalwegs vorhanden sein. Für die Untersuchung des proNGF/NGF-Systems wurden in dieser Studie Follikelflüssigkeiten und humane Granulosazellen aus Follikelpunktionen von IVF-Patientinnen als *in vitro* Modellsystem für den humanen Follikel verwendet. Die humanen Granulosazellen von IVF-Patientinnen können als Modell für den periovulatorischen Follikel und eventuell auch als Modell für den Gelbkörper (luteale Zellen), angesehen werden. Andere Follikelstadien werden jedoch nicht abgedeckt. Granulosazellen „luteinisieren“ in Kultur, produzieren für zwei bis vier Tage Steroide und verlieren dann diese Fähigkeit. Der Untersuchungszeitraum wurde daher auf fünf/sechs Kultivierungstage festgelegt. Daher ist es mit diesem Modell schwierig, allgemeine Aussagen über den gesamten Follikel bzw. die Follikelreifung im humanen Ovar zu machen. Erschwerend kommt hinzu, dass diese humanen Zellen sehr heterogen sind aufgrund des unterschiedlichen Alters und der verschiedenen Grunddiagnosen/Vorerkrankungen der einzelnen Patientinnen, über die wenig bekannt ist. Dieser Aspekt ist besonders bei den Proben von PCOS Patientinnen zu beachten, da zum einen die Kriterien dieser Erkrankung sehr variabel sind (zwei von drei Kriterien müssen vorliegen) und zum anderen auch Faktoren der allgemeinen Gesundheit (z.B. Adipositas, Diabetes Typ II) bei diesem Syndrom eine Rolle spielen (vgl. 2.6 Polycystisches Ovarialsyndrom). Neben dem *in vitro* Modellsystem wurden auch ovarielle Gewebeschnitte zur Verifizierung der Situation *in vivo* verwendet, wodurch unterschiedliche Follikelstadien sowie der Gelbkörper in die Untersuchung mit einbezogen werden konnten.

In dieser Studie wurde neben NGF zum ersten Mal proNGF in den *in vitro* kultivierten humanen Granulosazellen (Abbildung 11) und der Follikelflüssigkeit (Abbildung 18) nachgewiesen. Die Expression von proNGF in der Follikelflüssigkeit konnte durch den proNGF ELISA (Abbildung 19) bestätigt werden. Für die extrazelluläre Prozessierung von proNGF zu NGF ist unter anderem MMP7 verantwortlich (Smith et al. 1995, Lee et al. 2001, Kendall et al. 2009). Dieses Enzym konnte in den humanen Granulosazellen nachgewiesen werden (Abbildung 25). Zudem war MMP7 – wie proNGF – *in vivo* auch in der Follikelflüssigkeit vorhanden (Abbildung 31). Dies lässt vermuten, dass MMP7 in der Follikelflüssigkeit an der Prozessierung von proNGF zu NGF beteiligt ist. Somit könnte MMP7 für die Regulation der Prozessierung von proNGF zu NGF und damit verbunden auch für die Wirkung dieser beiden Faktoren verantwortlich sein. Ein weiteres Enzym, das proNGF enzymatisch spalten kann, ist die Serinprotease Plasmin, das durch die katalytische Spaltung von Plasminogen durch tPA (tissue Plasminogen Activator) entsteht (Lee et al. 2001, Bruno und Cuello 2006). Die Anwesenheit des proNGF spaltenden Plasmin in den Granulosazellen und der Follikelflüssigkeit wurde bereits gezeigt, aber die Aktivität von Plasmin scheint von verschiedenen Enzymen kontrolliert zu werden

(Twigt et al. 2012, Ambekar et al. 2013, Liu et al. 2013). Bisher ist die Regulation von MMP7 und Plasmin im humanen Ovar nicht detailliert untersucht.

Somit kann prinzipiell von der Anwesenheit einer proNGF- und einer NGF-Signalkaskade ausgegangen werden. Sowohl die Rezeptoren für NGF – TrkA und p75<sup>NTR</sup> – als auch die Rezeptoren für proNGF – p75<sup>NTR</sup> und Sortilin – konnten detektiert werden (Abbildung 20). Ebenfalls scheint die Expression von NGF einer Regulation unterworfen zu sein, da MMP9, das NGF degradiert, in den humanen Granulosazellen ebenfalls vorhanden ist (Abbildung 25). Zusätzlich konnte mittels Immunhistochemie gezeigt werden, dass nicht nur Granulosazellen sondern auch Thekazellen eine Quelle für proNGF, NGF, TrkA und MMP7 in großen, antralen Follikeln sind (Abbildung 16, Abbildung 24 und Abbildung 29). Dies spiegelt die Komplexität des proNGF/NGF-Systems im Follikel wieder. Diese Studie zeigte außerdem, dass das proNGF/NGF-System (proNGF, NGF, TrkA, MMP7 und MMP9) auch nach der Ovulation im Gelbkörper vorhanden ist (Abbildung 32).

Das proNGF/NGF-System scheint unter Primaten konserviert zu sein, da in dieser Studie alle Komponenten des Systems auch im Rhesusaffen nachgewiesen werden konnten. Einzelne Komponenten wurden bereits in früheren Studien mit Nagetieren beschrieben (Dissen et al. 1991, Shi et al. 2004). Somit können in den Granulosazellen sowohl die durch proNGF als auch die durch NGF induzierten Signalkaskaden ablaufen.



**Abbildung 46: Übersicht über die nachgewiesenen Komponenten der proNGF/NGF-Signalkaskade.**

**A:** ProNGF wird intrazellulär durch Furin zu NGF gespalten. NGF wird aus der Zelle freigesetzt und kann entweder über die Bindung an den TrkA Rezeptor unterschiedliche Signalkaskaden auslösen (Erhöhung von Egr-1 bzw. ChAT, Ergebnisse dieser Studie) oder durch MMP9 abgebaut werden. **B:** ProNGF, die Pro-Form von NGF, kann ebenfalls aus der Zelle freigesetzt werden. Es kann entweder an den p75<sup>NTR</sup> – Sortilin Rezeptorkomplex binden und so die Aktivierung von Signalkaskaden auslösen oder durch MMP7 extrazellulär zu NGF abgebaut werden. Das extrazellulär gebildete NGF wiederum kann an seinen Rezeptor (TrkA) binden oder durch MMP9 abgebaut werden (vgl. **A**). **C:** Möglicher Ablauf der Bildung, Freisetzung und Wirkung von proNGF und NGF in humanen Granulosazellen anhand der Ergebnisse dieser Studie. ProNGF kann in diesem System sowohl intra- als auch extrazellulär prozessiert werden. NGF und auch proNGF werden von den Zellen sezerniert, aber nur NGF kann seine Wirkung auf die Zielzellen entfalten.

## 4.2 Wirkung von proNGF und NGF

In einer früheren Studie mit PC12 Zellen (Pheochromocytom aus der Nebenniere der Ratte; Modellsystem für neuronale Differenzierung) konnte gezeigt werden, dass proNGF und NGF distinkt unterschiedliche Gengruppen regulieren (D'Onofrio et al. 2011). Zu den von diesen beiden Faktoren unterschiedlich regulierten Genen zählt Egr-1. Egr-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der Gene reguliert, die für die Differenzierung und Zellteilung nötig sind (Cao et al. 1990). Außerdem steuert Egr-1 die Expression des LH-Rezeptors in Granulosazellen von Ratten (Yoshino et al. 2002). Dies deutet auf eine potentiell proliferative Wirkung durch NGF-Stimulation im Follikel hin. Ähnlich zu den Ergebnissen der Studie von D'Onofrio et al. 2011 konnte diese unterschiedliche Regulation von Egr-1 auch in den humanen Granulosazellen auf Proteinebene bestätigt werden. Auf mRNA Ebene war jedoch kein ausgeprägter Anstieg detektierbar (Abbildung 37). Es kam nur durch NGF in den zwei bzw. drei Tage kultivierten humanen Granulosazellen zu einer signifikanten Erhöhung der Egr-1 Proteinmenge auf etwa das Zwei- bis Dreifache (Abbildung 38). Die erhöhte Expression von Egr-1 durch NGF ist bereits aus anderen Studien mit neuronalen Zellmodellen bekannt. Jedoch war durchwegs ein deutlich stärkerer Anstieg von Egr-1 mRNA zu beobachten. Nach einer Stunde Behandlung von Spinalganglienzellen (Ratte) mit 200 ng/ml NGF konnte ein 25facher Anstieg an Egr-1 mRNA beobachtet werden (Kendall et al. 1994). Des Weiteren wurde ein bis zu 200facher Anstieg der Egr-1 mRNA Menge in PC12 Zellen nach NGF Behandlung (10 ng/ml, 1 h) gemessen (D'Onofrio et al. 2011). *In vivo* konnten in humaner Follikelflüssigkeit NGF Mengen zwischen 3 ng/ml und 5 ng/ml mittels NGF ELISA nachgewiesen werden (Dissen et al. 2009a). Bei dieser detektierten Menge an NGF ist jedoch zu beachten, dass der im ELISA verwendete Antikörper auch die Pro-Form von NGF – proNGF – erkennt, da beide Formen zum größten Teil aus derselben Sequenz bestehen. Etwa 0,5 ng/ml der in der Follikelflüssigkeit gemessenen NGF-Konzentrationen dürften proNGF entsprechen (proNGF ELISA Messungen aus dieser Studie). Somit kann zwar die Menge beider Faktoren – proNGF und NGF – in der Follikelflüssigkeit bestimmt werden, eine klare Aussage über das Mengenverhältnis von proNGF zu NGF ist jedoch nicht möglich, da im NGF ELISA beide Formen (proNGF und NGF) erkannt werden.

Die zur Stimulation verwendeten NGF-Konzentrationen (50 ng/ml) sind ausreichend, um die physiologischen Bedingungen widerzuspiegeln. Dies ist ein Hinweis darauf, dass NGF seine Wirkung in den humanen Granulosazellen zwar entfalten kann, aber es dabei nicht zu so ausgeprägten Effekten kommt wie in Zellen neuronalen Ursprungs. Bei der Stimulation mit proNGF spiegelt sich dies ebenfalls wider. So hat D'Onofrio et al. 2011 gezeigt, dass proNGF (20 ng/ml, 1 h) die Egr-1 Level in den PC12 Zellen nur etwa um Faktor fünf erhöht, NGF hingegen um ca. das 200fache. D'Onofrio et al. (2011) konnten ebenfalls beweisen, dass diese niedrige Egr-1 Induktion nicht durch eine teilweise Spaltung des proNGF Pools zu NGF verursacht wurde, da proNGF-KR (Mutation in der Furinschnittstelle: RSKR zu RSAA), eine nicht durch Furin zu NGF spaltbare Mutante, in etwa gleiche Egr-1 Mengen wie proNGF induzierte. Dies lässt darauf schließen, dass die proNGF Wirkung deutlich geringer ist als die von NGF und daher in dem hier verwendeten System vermutlich nicht mehr detektierbar war.

Eine weitere Funktion von NGF ist die Induktion von ChAT (Cholinacetyltransferase) in den Lutealzellen von Rindern (Al-zi'abi et al. 2009). Dieses Enzym ist wichtig für die Produktion von Acetylcholin in Granulosazellen und konnte bereits im humanen Ovar und in humanen Granulosazellen nachgewiesen werden (Fritz et al. 1999, Fritz et al. 2002, Mayerhofer und Kunz 2005, Mayerhofer et al. 2006). In Zusammenarbeit mit Jan Blohberger konnte gezeigt werden, dass NGF (50 ng/ml) nach 24 h Behandlung die ChAT Proteinmenge in den humanen Granulosazellen um das 2,5fache erhöht. ProNGF hingegen hatte, wie auch schon bei Egr-1, keinen signifikanten Effekt auf ChAT. Ein erhöhter Gehalt an ChAT, dem Schlüsselenzym der Synthese des Neurotransmitters Acetylcholin, deutet, zusammen mit der Induktion von Egr-1, darauf hin, dass eine aktive NGF-Signalkaskade in den humanen Granulosazellen vorhanden ist. NGF stimuliert bei Mensch und Rind die Produktion von Acetylcholin, das im Ovar mit der Regulation der Proliferation und mit Ionenkanälen in humanen Granulosazellen (Mayerhofer und Kunz 2005) sowie mit der Apoptose im Gelbkörper von Rindern (Al-zi'abi et al. 2009) verbunden ist. Somit könnte Acetylcholin im Ovar als nachgeschalteter Vermittler der trophischen NGF-Wirkung angesehen werden.

Die schwache Antwort der humanen Granulosazellen auf proNGF und NGF spiegelte sich auch in den anderen Experimenten dieser Studie wider: So konnte durch NGF keine proliferative Wirkung auf die humanen Granulosazellen in den an unterschiedlichen Kultivierungstagen (Tag 1 bis 2 und Tag 2 bis 3) durchgeführten ATP-Assays nachgewiesen werden (Abbildung 34), obwohl unter vergleichbaren Bedingungen das proliferativ wirkende Egr-1 stimuliert (erhöht) wurde. Dies konnte durch die Beobachtung des Wachstumsverhaltens der humanen Granulosazellen mit NGF-Stimulation im live cell imaging bestätigt werden (Abbildung 36). Durch die NGF-Behandlung kam es innerhalb von 24 h zu keinem vermehrten Wachstum der Zellen. Unter denselben Bedingungen der ATP-Assays wurden auch Caspase-Assays durchgeführt. Hier waren an Versuchstag 1 bis 2 und Versuchstag 2 bis 3 bei den mit NGF stimulierten Zellen geringe, nicht signifikante Verringerungen der Caspase-Aktivität zu beobachten (Abbildung 35). Dies könnte auf eine leichte antiapoptotische Wirkung von NGF hindeuten, die im Einklang mit der nur sehr geringen Induktion von Egr-1 steht.

Für proNGF konnte der bisher in neuronalen Zellen beschriebene apoptotische Effekt (Nykjaer et al. 2004, Teng et al. 2005, Jansen et al. 2007, Willnow et al. 2008) weder anhand der Vitalitätsassays (ATP- und Caspase-Assays) noch im live cell imaging beobachtet werden. Übereinstimmend konnte an keinem Versuchstag eine Regulation von Egr-1 durch proNGF festgestellt werden. Interessanterweise konnte im Caspase-Assay für proNGF, ähnlich zu NGF, eine tendenziell geringe, nicht signifikante Verringerung der Caspase-Aktivität detektiert werden (Abbildung 35). Dies könnte zum einen in einer potentiell antiapoptotischen Wirkung von proNGF auf humane Granulosazellen begründet sein. Zum anderen könnte der Effekt auch durch die Spaltung von proNGF zu NGF durch das in den Zellen nachgewiesene MMP7 (Abbildung 25) und der darauf folgenden Stimulation durch das entstandene NGF hervorgerufen werden. Mittels proNGF ELISA konnten *in vivo* in der Follikelflüssigkeit proNGF Konzentrationen von etwa 0,5 ng/ml nachgewiesen werden (Abbildung 19). Dies zeigt, dass die für die Stimulation verwendeten proNGF Konzentrationen (50 ng/ml) nicht zu gering waren, um die physiologischen Bedingungen widerzuspiegeln. So wäre es denkbar, dass proNGF nur die Funktion eines inaktiven Vorläufermoleküls hat, das durch MMP7 prozessiert und

aktiviert wird. Möglicherweise hatte proNGF auch deshalb keine Wirkung auf die humanen Granulosazellen, da es während der 24stündigen Stimulation zu NGF prozessiert wurde. Dadurch, dass proNGF, wenn es als aktives Signalmolekül auftritt, oft gegensätzliche Wirkungen zu NGF hat, erscheint es sinnvoll, dass die Zellen nur auf einen Stimulus reagieren, da in diesem System immer beide Moleküle vorhanden sind. Auf diese Weise könnte verhindert werden, dass proNGF im Follikel, ähnlich wie im neuronalen Gewebe, Apoptose auslöst (Absterben der Follikel). Als Limitation ist jedoch zu beachten, dass das rekombinante proNGF (Cedarlane) zwar prinzipiell aktiv sein sollte (Chevalier et al. 1994b), jedoch die verwendete Charge vor den Versuchen nicht auf ihre biologische Aktivität getestet wurde. Rekombinantes NGF selbst war biologisch aktiv (vgl. Egr-1 Induktion). In der TrkA vermittelten Signalkaskade kann es zur Aktivierung/Phosphorylierung der Erk1/2 MAPK kommen. Jedoch waren weder proNGF noch NGF in der Lage, Erk1/2 zu phosphorylieren (Abbildung 33). Ebenso wurden durch beide Faktoren die intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen nicht erhöht. Somit konnten in den humanen Granulosazellen nicht alle bekannten Effekte von proNGF und NGF nachgewiesen werden. Der TrkA Signalweg scheint jedoch prinzipiell über NGF aktiviert werden zu können, da die Expressionsmengen von Egr-1 durch NGF leicht nach oben reguliert wurden.

### 4.3 Unterschiede in den mRNA Expressionslevel von Patientinnen ohne und mit PCOS

Das PCOS ist die häufigste Ursache für anovulatorische Infertilität bei Frauen im reproduktionsfähigen Alter. Dabei stellt sich vor allem die Frage, wie das Überleben der Follikel in einem klinischen Zusammenhang reguliert wird. Bei Frauen mit PCOS liegt ein verändertes Follikelwachstum vor. Neurotrophine scheinen einerseits für die Follikelentwicklung wichtig zu sein. Andererseits könnte ein Ungleichgewicht im System der Neurotrophine zum PCOS führen. Daher wurden die mRNA Mengen von proNGF/NGF, MMP9 und Sortilin in den Granulosazellen von Patientinnen ohne und mit PCOS miteinander verglichen. Es konnte jedoch nur bei proNGF/NGF ein signifikanter Unterschied zwischen Patientinnen ohne und mit PCOS im mRNA Gehalt der drei Tage kultivierten humanen Granulosazellen nachgewiesen werden. In der Follikelflüssigkeit von PCOS Patientinnen konnten ebenfalls geringere proNGF Mengen als bei Patientinnen ohne PCOS gemessen werden (proNGF ELISA; Abbildung 19). Der Unterschied zwischen beiden Patientengruppen war jedoch nicht signifikant. Unerwartet anhand der erniedrigten proNGF Level wurde berichtet, dass NGF in der Follikelflüssigkeit von PCOS Patientinnen stärker exprimiert ist (NGF ELISA; detektiert sowohl proNGF als auch NGF; vgl. 4.2 Wirkung von proNGF und NGF) (Dissen et al. 2009a, Sadeu et al. 2012). Auch in Ovarien von Ratten ohne und mit PCOS konnten Unterschiede in der Expression von NGF festgestellt werden: bei PCOS konnten geringere mRNA und erhöhte Proteinmengen detektiert werden (Manni et al. 2005). Grundsätzlich ist ein erhöhter NGF Gehalt bei gleichzeitig geringeren proNGF mRNA Mengen möglich, solange der Abbau von NGF verringert wird. Denkbar wäre z.B. eine Inhibition von MMP9, das das reife NGF degradiert. In einer weiteren Studie wurden jedoch verringerte NGF Level in der Follikelflüssigkeit von PCOS Patientinnen gezeigt (Buyuk und Seifer 2008). Prinzipiell sind mehrere Erklärungen für die Diskrepanz in den einzelnen Studien möglich.

Erstens können diese Unterschiede in der Verwendung verschiedener IVF-Protokolle begründet sein. Zweitens spielt die Handhabung der Zellen, angefangen bei der Follikelpunktion über die Präparation der Zellen bis hin zu deren Kultivierungsbedingungen, eine wichtige Rolle. Drittens sind Frauen mit PCOS keine homogene Patientengruppe, da das PCOS eine komplexe, heterogene Erkrankung ist. Erschwerend kommt hinzu, dass das PCOS besonders häufig bei Frauen mit Diabetes Typ II auftritt und Insulin Einfluss auf die ovarielle Androgenproduktion nimmt (Strauss 2003, Norman et al. 2007). Des Weiteren wird in der Labordiagnostik häufig, aber nicht immer, ein erhöhter LH/FSH Quotient gemessen. Diese beiden Faktoren sind zentrale Regulatoren der Follikelreifung (Banaszewska et al. 2003, Lewandowski et al. 2011).

Die Diversität der Proben (genetisch/hormonell) war bei (Manni et al. 2005) vermutlich geringer, da hier in den Ratten ein PCOS-Phänotyp durch die Applikation von Östradiolvalerat induziert wurde, wodurch ein genetisch homogenerer Hintergrund entsteht. Interessanterweise entsprechen die so gewonnenen Erkenntnisse denen dieser Studie und von Dissen et al. 2009a.

Eine weitere Problematik der Kultivierung humaner Granulosazellen wurde in den hier präsentierten Ergebnissen auffällig. Die Granulosazellen scheinen im Laufe der Kultivierung ihre Genexpression zu verändern. So wurde beobachtet, dass z.B. die mRNA Mengen von proNGF/NGF und MMP9 im Laufe der fünftägigen Kultivierung deutlich abnahmen (Abbildung 13 und Abbildung 26). Bei Sortilin dagegen wurde während der Kultur ein leichter Anstieg beobachtet (Abbildung 21). Außerdem konnte festgestellt werden, dass sich die Zellen an Tag 5 bis 6 der Kultivierung anormal verhalten. Die Behandlung der Zellen mit Staurosporin führte hier zu keinerlei Anzeichen von Apoptose (Caspase-Assays: Abbildung 35C und Abbildung 44), obwohl durch Staurosporin normalerweise die Apoptose induziert wird (Chae et al. 2000). Des Weiteren war auffällig, dass an Versuchstag 5 bis 6 in den ATP-Assays (Abbildung 34C) Effekte zu beobachten waren, die an den anderen Versuchstagen nicht aufgetreten sind (Abbildung 34A und B).

Für zukünftige Studien wäre es aus den oben beschriebenen Gründen vorteilhaft, ein definiertes Modellsystem mit menschlichen Zellen zu etablieren, das von der Kultivierungsdauer unabhängig ist. Dadurch würde auch das Problem der limitierten Zellmenge, insbesondere für Zellen aus PCOS Patientinnen, gelöst werden. Somit wären die Ergebnisse der Experimente statistisch aussagekräftiger. Dabei wäre es denkbar, verschiedene Zellen aus Follikelpunktionen zu immortalisieren wie z.B. durch Überexpression von Telomerase (Ouellette et al. 2000). Wichtig dabei ist, dass sowohl für nicht PCOS als auch für PCOS mehrere Zelllinien etabliert werden, um gemeinsame Fehlregulationen bzw. individuelle Schwankungen zwischen den einzelnen Patientinnen zu identifizieren. Dies bietet auch die Möglichkeit, verschiedene Ursachen für das PCOS voneinander abzugrenzen bzw. zu analysieren.

Ein weiterer zukunftsweisender Ansatz, das proNGF/NGF-System im Menschen zu untersuchen und dabei der Situation *in vivo* näher zu kommen, wäre die *in vitro* Kultivierung von präantralen Follikeln, wie sie für Primaten beschrieben wurde (Xu et al. 2013). In diesem Modell werden nicht nur Granulosazellen betrachtet, sondern es werden auch das komplexe Zusammenspiel aus Oozyte, Granulosa- und Thekazellen in ihrer natürlichen Umgebung erfasst.

#### 4.4 Decorin als Signalmolekül im Ovar

Decorin wurde in frisch isolierten und auch in kultivierten Granulosazellen nachgewiesen (Abbildung 41). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Decorin auch in der Follikelflüssigkeit von IVF-Patientinnen vorhanden ist (Abbildung 42). Außerdem konnte die Expression von Decorin in ovariellen Gewebe von Mensch und Affe detektiert werden (Adam et al. 2012). Anhand der Gewebeschnitte ist zu sehen, dass Decorin hauptsächlich im Stroma, den Thekazellen und im lutealen Gewebe vorhanden ist. In den Granulosazellen präantraler und antraler Follikel konnte Decorin jedoch nicht nachgewiesen werden. Im Gelbkörper war Decorin zwischen den Granulosazellen und dem Zytoplasma anderer Lutealzellen angehäuft sowie im Bindegewebe. Decorin kann somit als Bestandteil der extrazellulären Matrix im Ovar von Primaten angesehen werden (Adam et al. 2012). Die weiteren Ergebnisse lassen Schlüsse auf eine mögliche Funktion von Decorin im Ovar zu. Im Modellsystem der humanen Granulosazellen verhält sich Decorin als ein parakriner Faktor. Decorin erhöhte die intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegel und hatte keinen apoptotischen Effekt bzw. eine tendenziell leicht antiapoptotische Wirkung auf die humanen Granulosazellen.

Die Follikelflüssigkeit von IVF-Patientinnen enthält Decorin, was auch durch neuere Studien bestätigt wurde (Ambekar et al. 2013). Möglicherweise sind die periovulatorischen, luteinisierenden Granulosazellen für die Synthese verantwortlich. Aber auch die Thekazellen könnten dazu beitragen, da auch sie Decorin enthalten. Des Weiteren kann Decorin mit einigen Wachstumsfaktorrezeptoren interagieren, wie z.B. mit dem EGF-Rezeptor (Schaefer und Iozzo 2008). Möglicherweise kann Decorin ovarielle Signalwege über diese Rezeptoren aktivieren, die auch in den Granulosazellen exprimiert werden (Kwintkiewicz und Giudice 2009, Karakida et al. 2011). Daher sind die Granulosazellen ein geeignetes Modellsystem. Da Decorin in den Granulosazellen exprimiert wird und in der Follikelflüssigkeit vorhanden ist, ist auch der mögliche Ligand für die Rezeptoren der Wachstumsfaktoren in diesem Modellsystem vorhanden.

Die Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegel durch Decorin (Abbildung 45) ist ein Anzeichen dafür, dass diese Rezeptoren durch Decorin aktiviert werden (Iozzo und Schaefer 2010, Finkel 2011). Decorin kann mit unterschiedlichen Affinitäten an verschiedene Wachstumsfaktorrezeptoren binden (Iozzo und Schaefer 2010). Die Expressionsmuster der Rezeptoren, die Menge und die lokale Decorinkonzentration scheinen daher zu bestimmen, ob und wie Decorin wirkt. Die Apoptose in den Lutealzellen kann durch die Wirkung des EGF-Rezeptor-Signalwegs blockiert werden, wie es für das Überleben der humanen Granulosazellen gezeigt wurde (Ben-Ami et al. 2006). Übereinstimmend mit der Studie von Ben-Ami et al. 2006 konnte auch anhand der hier durchgeführten Experimente gezeigt werden, dass die Caspaseaktivität durch EGF an Kultivierungstag 5 bis 6 signifikant erniedrigt wird. An Kultivierungstag 2 bis 3 konnte ebenfalls eine erniedrigte Caspase-Aktivität beobachtet werden, diese war aber nicht signifikant (Abbildung 44). Für Decorin konnte derselbe Effekt wie für EGF gezeigt werden. Die gleichzeitige Stimulation mit beiden Faktoren verstärkte die Inhibition der Caspaseaktivität. Daraus lässt sich schließen, dass Decorin, teilweise über den EGF-Rezeptor, die Caspaseaktivität und möglicherweise somit die Apoptose beeinflusst. Dennoch sollte auch hier beachtet werden, dass Staurosporin bei den an Kultivierungstag 5 bis 6 durchgeführten Experimenten nicht die erwartete Wirkung (Erhöhung der Caspase-Aktivität) zeigte wie an Tag 2 bis 3.

Aufgrund seiner weiten Verbreitung im Ovar von Primaten und der deutlichen Änderung seiner Konzentrationen während des ovariellen Zyklus lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass Decorin ein wichtiger, noch unbekannter Regulator ovarieller Funktionen ist.

## 5. Methoden

### 5.1 Zellbiologische Methoden

#### 5.1.1 Isolation von humanen Granulosazellen aus Follikelpunktat

Die humanen Granulosazellen wurden aus Follikelpunktionen von Frauen, die sich einer *in vitro* Fertilisation unterzogen haben, präpariert. Der Ethikrat der Ludwig-Maximilians-Universität München stimmte der Verwendung des Follikelpunktats und der Granulosazellen für wissenschaftliche Experimente zu. Ebenso wurde eine schriftliche Zustimmung der Patientinnen eingeholt. Die Studie wurde gemäß der Richtlinien der Deklaration von Helsinki 1975 durchgeführt. Alle Proben sowie die klinischen Informationen waren anonym. Von den einzelnen Patientinnen waren nur das Alter und eine Grunddiagnose bekannt.

Die Punktate mit den humanen Granulosazellen von etwa zwei bis fünf Patientinnen wurden resuspendiert, vereinigt und anschließend durch eine Spritze mit aufgesetzter Kanüle (0,9x40 mm, 20Gx1½“) homogenisiert. Der Tag der Follikelpunktion und der Präparation entspricht Tag 0 der Kultivierung (frische, unkultivierte Zellen). Aus diesem Pool wurden geringe Mengen (~ 2 ml) für Experimente mit Follikelflüssigkeiten abgenommen. Die Follikelflüssigkeiten wurden bei Raumtemperatur (RT) abzentrifugiert (10 min, 10000 rpm) und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Das restliche Punktat wurde anschließend 1:2 mit DMEM/Ham's F12 Medium ohne Zusätze versetzt und die Zellen durch Zentrifugation (3 min, 800 rpm, RT) separiert. Nach dem darauf folgenden Waschschrift mit Medium wurden die Zellen in Kulturmedium (DMEM/Ham's F12 + 10% FCS + 1% Pen/Strep) aufgenommen und in Petrischalen oder Deckgläschen ausgesät. Am nächsten Tag (entspricht Tag 1 der Kultivierung) wurden die Zellen zwei- bis dreimal mit DMEM/Ham's F12 Medium ohne Zusätze gespült und für die nachfolgenden Experimente in Kulturmedium weiter kultiviert.

Sollten die Zellen an Tag 0 für Experimente verwendet werden, erfolgte die Präparation mit der „Filtermethode“. Bei dieser Präparationsmethode wurde die oben beschriebene Präparation leicht verändert, indem ein zusätzlicher Filtrationsschritt mit einem Zellsieb eingeführt wurde, bei dem die humanen Granulosazellen im Filter zurückbleiben und die Erythrozyten besser aus der Follikelflüssigkeit entfernt werden können. Dafür wurden die Punktate der einzelnen Patientinnen ebenfalls vereinigt. Anschließend wurde das Punktat durch Zellsiebe mit einem Porendurchmesser von 40 µm gefiltert. Die Granulosazellen verblieben dabei im Filter. Die Zellsiebe wurden mit serumfreiem Medium gespült. Anschließend wurden die Zellen mit Medium ohne Zusätze aus den Filtern gespült. Die Zellsuspension wurde durch eine Spritze mit aufgesetzter Kanüle (0,9x40 mm, 20Gx1½“) homogenisiert und dann abzentrifugiert (3 min, 800 rpm, RT). Das Zellpellet wurde anschließend für die entsprechenden Versuche weiter aufgearbeitet (RNA- oder Proteinisolation).

Die Follikelpunktate mit den humanen Granulosazellen von Frauen mit PCOS wurden nicht gepoolt, sondern für jede Patientin einzeln, nach den beschriebenen Methoden, präpariert.

### 5.1.2 Kultivierung und Stimulation der humanen Granulosazellen

Die Kultivierung der adhärennten humanen Granulosazellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mit DMEM/Ham's F12 Medium mit Zusatz von 10% FCS und 1% Pen/Strep bis maximal 5 Tage nach der Präparation.

Um Effekte von proNGF und NGF auf die humanen Granulosazellen zu testen, wurden die Zellen mit Konzentrationen zwischen 5 ng/ml und 200 ng/ml (entspricht 0,102 nM – 4,08 nM proNGF bzw. 0,37 nM – 14,8 nM NGF) dieser Substanzen behandelt. Vor der Stimulation wurden die Zellen mit Medium ohne Zusätze gespült und darin für 2 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Stimulanzien in der entsprechenden Konzentration mit nachfolgender Inkubation im Brutschrank.

Zur Untersuchung der Effekte auf die Phosphorylierung der MAPK durch proNGF und NGF wurden die Zellen für 5 min und 10 min mit 50 ng/ml proNGF und 50 ng/ml NGF stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit dem Lösungsmittel des jeweiligen Stimulans behandelt wurden (im Folgenden als unbehandelte Zellen bezeichnet). Nach der Stimulation wurde das Medium abgenommen und die Zellen für Western Blot Experimente weiter aufgearbeitet.

Für die Beurteilung der Egr-1 Menge nach Behandlung mit proNGF und NGF wurden die Zellen für 1 h mit jeweils 50 ng/ml der beiden Substanzen inkubiert. Unbehandelte Zellen wurden als Referenz verwendet. Die Zellen wurden nach der Stimulation entweder für qPCR- oder Western Blot Experimente weiterverarbeitet.

ATP- und Caspase-Level wurden nach einer 24stündigen Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an proNGF und NGF (jeweils 5, 50, 100 und 200 ng/ml) gemessen.

### 5.1.3 CASY – automatische Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl für ATP- und Caspase-Assays mit humanen Granulosazellen wurden die Zellen im CASY (Schärfe Systems) gezählt. Die CASY-Technologie bestimmt die Vitalität der Zellen, basierend auf der Unversehrtheit der Plasmamembran. Dabei werden die Zellen geringen elektrischen Impulsen ausgesetzt. Ist die Plasmamembran intakt, kann dieser Impuls die Membran nicht durchdringen, bei nicht intakten Membranen jedoch schon.

Für die Messung wurden die Zellen mit Medium ohne Zusätze gespült, anschließend trypsinisiert und das erhaltene Zellpellet in 1 ml DMEM/Ham's F12 Medium ohne Zusätze aufgenommen. Je nach Größe des Zellpellets wurden die Zellen in 10 ml der Messlösung (CASYton) entsprechend verdünnt. Die Messung wurde automatisch, mit dem für die jeweilige Zellart entsprechenden Programm, durchgeführt.

### 5.1.4 ATP-Assay

Die Vitalität der humanen Granulosazellen wurde mit dem CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega), basierend auf der Quantifizierung der vorhandenen ATP-Menge, gemessen. Der gemessene ATP-Gehalt ist direkt proportional zur Zahl der in Kultur metabolisch aktiven Zellen. Nach der Zellyse wird ATP freigesetzt, welches mit Luziferin in einer Luziferase-katalysierten Reaktion zu Oxyluziferin umgesetzt wird. Das bei dieser Reaktion freigesetzte Licht ist proportional zur enthaltenen ATP-Menge.

Die Zellen wurden in 6fach Replikaten auf 96-Well Platten ausgesät (20000 Zellen pro Well) und für 24 h mit proNGF bzw. NGF (jeweils 5, 50, 100 und 200 ng/ml) in 100 µl DMEM/Ham's F12 Medium ohne Phenolrot und weitere Zusätze kultiviert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Um die Hintergrundlumineszenz zu erfassen, wurden Kontrollwells (6fach Replikate) nur mit Medium ohne Zellen (Blank) vermessen. Staurosporin (10 µM) diente als Kontrolle. Die Experimente wurden bei Raumtemperatur unter Vermeidung direkter Lichteinstrahlung durchgeführt. Nach der Inkubation mit dem Stimulanz wurden 100 µl des CellTiter-Glo Reagenz zu den Zellen pipettiert. Anschließend wurde die Platte auf einem Schüttler für 2 min geschüttelt und dann für weitere 10 min zur Stabilisierung des Lumineszenzsignals ohne Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Lumineszenz der Luziferasereaktion erfolgte am Fluostar Optima (BMG Labtech). Für die Auswertung wurde der Mittelwert der Hintergrundlumineszenz (Blank) von den erhaltenen Ergebnissen abgezogen. Die Auswertung wurde mit Excel bzw. Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) durchgeführt.

### 5.1.5 Caspase-Assay

Um Apoptose in den humanen Granulosazellen nachzuweisen, wurde die Caspaseaktivität (Cysteine-aspartic protease) gemessen. Dies erfolgte mit dem Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega). Bei diesem Nachweis werden die Zellen lysiert und das Substrat wird anschließend durch die Caspasen gespalten. Daraufhin kommt es zur Bildung eines Lumineszenzsignals durch die Luziferase. Die Lumineszenz ist proportional zur Höhe der Caspaseaktivität. Caspasen sind in der Zelle am programmierten Zelltod, der Apoptose, beteiligt.

Die Zellen wurden in 6fach Replikaten auf 96-Well Platten ausgesät (20000 Zellen pro Well) und für 24 h zum einen mit proNGF bzw. NGF (jeweils 5, 50, 100 und 200 ng/ml) in 100 µl DMEM/Ham's F12 Medium ohne Phenolrot und weitere Zusätze kultiviert. Zum anderen wurden die Zellen mit Decorin (5 µg/ml, entspricht 91 nM), EGF (50 ng/ml, entspricht 8,3 nM) sowie Decorin und EGF in Kombination (5 µg/ml und 50 ng/ml) ebenfalls für 24 h in DMEM/Ham's F12 Medium ohne Phenolrot und Zusätze behandelt. Unbehandelte Zellen dienten jeweils als Kontrolle. Staurosporin (1 µM bzw. 10 µM) wurde als Positivkontrolle verwendet. Um die Hintergrundlumineszenz zu erfassen, wurden Kontrollwells (6fach Replikate) nur mit Medium ohne Zellen (Blank) vermessen. Die Experimente wurden bei Raumtemperatur unter Vermeidung direkter Lichteinstrahlung durchgeführt. Nach der Inkubation mit dem Stimulanz wurden 100 µl des Caspase-Glo 3/7 Reagenz zu den Zellen pipettiert. Anschließend wurde die Platte auf einem Schüttler für 30 s geschüttelt und dann ohne Schütteln für 1 h bei

Raumtemperatur inkubiert. Die Lumineszenzmessung wurde am Fluostar Optima (BMG Labtech) durchgeführt. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der Hintergrundlumineszenz (Blank) von den erhaltenen Ergebnissen abgezogen. Die Auswertung erfolgte mit Excel bzw. Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

### 5.1.6 Wachstumsverhalten

Um das Wachstumsverhalten humaner Granulosazellen sowie die Effekte von proNGF und NGF auf diese Zellen genauer zu untersuchen, wurden die humanen Granulosazellen über einen Zeitraum von 24 h beobachtet.

Dazu wurden die Zellen in  $\mu$ -Dishes (Ibidi) ausgesät. Das Wachstumsverhalten der Zellen wurde 24 h von Tag 2 auf 3 der Kultivierung beobachtet. Dabei wurden die Zellen in DMEM/Ham's F12 Medium ohne Zusätze in einem Heizsystem (Ibidi) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zusätzlich wurden die Zellen auch mit proNGF bzw. NGF (jeweils 50 ng/ml) behandelt. Alle 20 min wurden automatisch Bilder von den Zellen aufgenommen (Mikroskop Axiovert 135 mit ProgRes MF Cool Kamera), um Veränderungen in der Morphologie sowie im Wachstumsverhalten der humanen Granulosazellen zu dokumentieren.

### 5.1.7 Ca<sup>2+</sup>-Messung

Für die Messung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegel wurden die humanen Granulosazellen auf Deckgläschen ausgesät und in DMEM/Ham's F12 Medium mit 10% FCS und 1% Pen/Strep kultiviert. Die Zellen wurden zur Messung mit 5  $\mu$ M Fluo-4 Acetoxymethylester (Fluo-4 AM) beladen und anschließend 30 min im Brutschrank inkubiert. Die Deckgläschen wurden, ohne sie zu spülen, in die Messkammer überführt. Die Messung erfolgte in serumfreiem Medium am konfokalen Lasermikroskop (Leica). Die Fluoreszenz wurde bei 500 – 540 nm (Anregungswellenlänge: 488 nm) alle 2 s detektiert und ihre Intensität über einzelne Zellen quantifiziert. Durch Zugabe von proNGF bzw. NGF (jeweils 50 ng/ml und 100 ng/ml) wurde getestet, ob diese Faktoren einen Einfluss auf die Ca<sup>2+</sup>-Spiegel in den humanen Granulosazellen haben. Als empirische/methodische Positivkontrollen dienten Histamin (10  $\mu$ M) und Trypsin (1:10, entspricht 0,005% Trypsin). Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgte mit der Leica Confocal Software v2.61.

### 5.1.8 Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie wurde ovarielles Gewebe von Mensch und Affe, eingebettet in Paraffin und als 5  $\mu$ m dicke Schnitte auf Glasobjektträger aufgebracht, verwendet.

Die Paraffinschnitte wurden für die immunhistochemische Färbung in Xylol und Isopropanol (100%, 90%, 80% und 70%) entparaffiniert. Anschließend wurden die Schnitte in PBS rehydriert und mit 10 mM Citratpuffer in der Mikrowelle aufgekocht. Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte mit PBS gewaschen und die endogene Peroxidase mit einer Lösung aus 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Methanol blockiert. Um

unspezifische Antikörperbindungen zu verringern, wurden die Schnitte mit 5% Normalserum behandelt. Daraufhin erfolgte die Behandlung mit dem Primärantikörper (Tabelle 11) über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer.

Als Kontrolle diente die Inkubation mit nicht immunogenem Normalserum anstelle des spezifischen Primärantikörpers oder die Inkubation nur mit dem Sekundärantikörper. Als eine weitere Kontrolle wurde die Präadsorption des Primärantikörpers mit dem entsprechenden Kontrollantigen (Tabelle 13) durchgeführt.

Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Schnitte mit PBS gewaschen und mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (Tabelle 12) für 1-2 h bei Raumtemperatur behandelt. Daraufhin erfolgte die Behandlung mit dem Avidin-Biotin Peroxidase Komplex (ABC Methode, Hsu et al. 1981) für 1 h. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die Schnitte mit 50 mM Tris/HCl Puffer für 10 min inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Lokalisation des Antikörpers in einer Farbreaktion mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die DAB Reaktion wurde mit destilliertem Wasser abgestoppt. Daraufhin wurden die Schnitte mit Isopropanol (70%, 80%, 90% und 100%) sowie Xylol dehydriert und mit Entellan eingebettet.

Für die Präadsorption wurde mit dem Primärantikörper und dem entsprechenden Peptid eine Vorverdünnung hergestellt. Das Peptid wurde dabei in zweifacher Menge des Antikörpers eingesetzt. Diese Vorverdünnung wurde anschließend für 2 h bei 4°C unter ständigem Drehen inkubiert. Daraufhin wurde die Suspension abzentrifugiert (10 min, 10000 rpm, 4°C). Der Überstand der Vorverdünnung wurde zur Herstellung der endgültigen Antikörperverdünnung (Immunhistochemie: siehe Tabelle 11; Western Blot: siehe Tabelle 10) verwendet.

## 5.2 Molekularbiologische Methoden

### 5.2.1 RNA-Isolation

Für die RNA-Extraktion aus humanen Granulosazellen wurde der RNeasy Plus Mini Kit (Quiagen) entsprechend der Herstelleranleitung verwendet. Die Extraktion erfolgte bei Raumtemperatur.

Die Zellen wurden in RLT Puffer + 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol lysiert und anschließend über eine Spinsäule abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde in demselben Volumen 70% Ethanol aufgenommen und über eine RNeasy Spinsäule abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mehrmals gewaschen (RW1 und RPE Puffer). Die RNA wurde mit RNase freiem Wasser eluiert und deren Gehalt sowie die Qualität (Quotient aus der optischen Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm) anhand einer Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm am Photometer bestimmt. Bei reiner RNA liegt das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  bei etwa zwei. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die RNA bei -80°C aufbewahrt.

### 5.2.2 cDNA-Synthese

Die Umschreibung der einzelsträngigen RNA in einzelsträngige cDNA erfolgte mittels reverser Transkription (RT-PCR) mit Superscript II (Invitrogen – Life Technologies). Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis.

Für die Herstellung des cDNA-Templates wurden 0,4 µg RNA sowie 1,6 µl random 15-mer Primer in einem Gesamtvolumen von 23 µl verwendet. Die Proben wurden im Thermocycler inkubiert (10 min bei 70°C, 5 min bei 25°C). Anschließend wurden 15 µl Nukleotid-Mix (Tabelle 1) zugegeben und die Proben nochmals im Thermocycler inkubiert (10 min bei 25°C, 2 min bei 42°C). Nach Zugabe von 2 µl reverser Transkriptase erfolgte die reverse Transkription (Tabelle 2). Das Endvolumen der RT-PCR betrug 40 µl.

Reagenz	Volumen
5x first Strand Buffer	8 µl
0,1 M DTT	4 µl
10 mM dNTP	2 µl
RNasin	1 µl

**Tabelle 1:** Nukleotid-Mix für die RT-PCR.

Temperatur	Zeit
42°C	50 min
70°C	15 min
4°C	10 min

**Tabelle 2:** Bedingungen für die reverse Transkription.

### 5.2.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Spezifische Gene (Tabelle 8) wurden durch RT-PCR amplifiziert (Saiki et al. 1985). Dazu wurde 1 µl cDNA in einem Gesamtreaktionsvolumen von 25 µl verwendet. Zum Ausschluss von Verunreinigungen wurden Negativkontrollen mit RNA bzw. DEPC Wasser verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Mastermix-Komponenten mit Volumina sind in Tabelle 3, die PCR-Bedingungen in Tabelle 4 zusammengefasst. Die verwendeten Primersequenzen (Tabelle 8) wurden mit der Primer3 Software (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>) erstellt.

Reagenz	Volumen
5x GoTaq Puffer	5 µl
2 mM dNTPs	2,5 µl
3' Primer (50 pmol/µl)	0,5 µl
5' Primer (50 pmol/µl)	0,5 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	15,37 µl
GoTaq Polymerase	0,13 µl
cDNA Template	1 µl
Gesamtvolumen	25 µl

**Tabelle 3:** Mastermix-Komponenten für die PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiation	94°C	5 min
Denaturierung	94°C	30 s
Annealing	primerspezifische Temperatur	1 min
Elongation	72°C	1 min
End-Elongation	72°C	7 min
	4°C	

**Tabelle 4:** PCR-Cycler Programm.

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (2%iges Gel; Gellauf bei 120 V für 20 min) aufgetrennt und mit UV-Licht detektiert. Die entsprechenden Banden wurden mit dem MinElute Gel Extraction Kit (Quiagen) entsprechend der Herstellerangaben aufgereinigt und sequenziert (GATC Biotech, Konstanz, Deutschland). Die Sequenziererergebnisse wurden mit der BLAST Software (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

### 5.2.4 quantitative real-time PCR (qPCR)

Die quantitative real-time PCR wurde mit dem StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt. Zur Detektion wurde der QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Quiagen) verwendet. Die einzelnen Proben wurden immer in Triplikaten analysiert. Als Negativkontrollen wurden DEPC Wasser sowie die –RT-Reaktion (RT-Reaktion ohne reverse Transkriptase) verwendet. GAPDH wurde als interner Standard verwendet. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das Cyclerprogramm sind in Tabelle 5 und Tabelle 6 aufgelistet.

Die Primer wurden mit Hilfe des Universal ProbeLibrary Assay Design Centers (Roche) entworfen und auf ihre Spezifität und auf Dimerbildung über eine Schmelzkurvenanalyse der einzelnen Amplifikationsprodukte getestet. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 9 aufgelistet. Die Berechnung der Primereffizienzen erfolgte über die Standardkurven. Die Auswertung zur Analyse der Anreicherung erfolgte über die komparative Ct Methode, relativ zur Kontrolle, entsprechend der Formel  $(E^{(C_T^{\text{stim}} - C_T^{\text{Ko}})})_{\text{GAPDH}} / (E^{(C_T^{\text{stim}} - C_T^{\text{Ko}})})_{\text{Gen von Interesse}}$  (Livak und Schmittgen 2001) mit Excel bzw. Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Der  $C_T$  Wert (Cycle Threshold) gibt den Zyklus an, bei dem die Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt. E steht für die Primereffizienz, die im Optimalfall zwei ist.

Reagenz	Volumen
2x Quanti-Fast-Mix	6,25 µl
3' Primer (12,5 µM)	1,125 µl
5' Primer (12,5 µM)	1,125 µl
cDNA (1:5 bzw. 1:10)	4,0 µl
Gesamtvolumen	12,5 µl

**Tabelle 5:** Mastermix-Komponenten für die qPCR.

	Initiale Denaturierung	Zyklusphase (40 Zyklen)		Schmelzkurve		
<b>Temperatur</b>	95°C	95°C	59°C	95°C	70°C	70°C - 95°C
<b>Zeit</b>	5 min	10 s	30 s	15 s	1 min	15 s
<b>Temperaturstufen (Schmelzkurve)</b>						0,3°C pro s
	Stufe 1	Stufe 1	Stufe 2	Stufe 1	Stufe 2	Stufe 3

**Tabelle 6:** qPCR-Cycler Programm.

## 5.3 Proteinbiochemische Methoden

### 5.3.1 Proteinisolation

Die Proteinisolation erfolgte aus kultivierten humanen Granulosazellen, die entweder nicht behandelt oder stimuliert wurden. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt, um die Denaturierung der Proteine zu verhindern.

Die Zellen wurden mit NPE Puffer von den Petrischalen abgeschabt und zentrifugiert (10000 rpm, 3 min, 4°C). Das erhaltene Zellpellet wurde mit PBS gespült und nochmals abzentrifugiert (10000 rpm, 3 min, 4°C). Je nach Größe des Zellpellets wurde dieses in 50 - 100 µl Inhibitorcocktail aufgenommen und anschließend mit Ultraschall aufgeschlossen.

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte mittels des DC Protein Assay Kits (Bio-Rad) nach der Methode von Lowry (Lowry et al. 1951). 5 µl Standard (BSA, 0 – 2 µg/µl) bzw. Probe wurden in Duplikaten aufgetragen. Dann erfolgte die Zugabe von 25 µl Reagenz A' (20 µl Reagenz S pro 1 ml Reagenz A) sowie von 200 µl Reagenz B. Nach 15minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 750 nm gemessen und die Werte auf die BSA Standardkurve abgeglichen.

Anschließend wurde die restliche Probenmenge mit jeweils 10% β-Mercaptoethanol und 10% Bromphenolblau versetzt, bei 95°C für 5 min im Thermomixer aufgekocht und entweder direkt für Western Blot Experimente verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C weggefroren.

### 5.3.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese wurde mit dem Mini-PROTEAN3 System (Bio-Rad) nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970) durchgeführt. 10 µg bzw. 30 µg Protein wurden auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte mit Laemmli Puffer bei 190 V für ca. 1 h.

Reagenz	Sammelgel	Trenngel 10%	Trenngel 15%
Acrylamid 30%	0,9 ml	4,3 ml	6,5 ml
4x Sammelgelpuffer	1,5 ml	-	-
4x Trenngelpuffer	-	3,25 ml	3,25 ml
H <sub>2</sub> O	3,55 ml	4,55 ml	3,25 ml
TEMED	20 µl	26 µl	26 µl
10% APS	30 µl	52 µl	52 µl

**Tabelle 7:** Zusammensetzung der SDS Gele.

### 5.3.3 Western Blot

Für den Western Blot wurden die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dies erfolgte im Wet-Blot-Verfahren (Bio-Rad). Der Transfer erfolgte bei 100 V für 75 min. Nach dem Transfer wurden die Proteine auf der Membran mit 1x Ponceau S sichtbar gemacht. Die Blockierung der nicht spezifischen Bindestellen erfolgte entweder mit 5% Magermilchpulver in TBS-T oder 5% BSA in TBS-T, je nach Antikörper, für 1 h bei Raumtemperatur. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Tabelle 10) erfolgte über Nacht bei 4°C. Zur Kontrolle der Richtigkeit der detektierten Bande wurde eine Präadsorption des Primärantikörpers durchgeführt (vgl. 5.1.8 Immunhistochemie). Anschließend wurde die Membran mit TBS-T gewaschen und mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (Tabelle 12) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Proteine mit dem Chemiluminescent Substrate (Pierce – Thermo Fischer Scientific) im Chemi Smart 5000 (PeqLab) detektiert.

Die Western Blot Ergebnisse wurden mit ImageJ (public domain Programm, Version 1.45s, National Institutes of Health, MD, USA) densitometrisch ausgewertet. Die erhaltenen Werte wurden auf die von  $\beta$ -Aktin oder Phospho-p44/42 MAPK normalisiert.

### 5.3.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ProNGF und DCN wurden in Follikelflüssigkeiten von IVF-Patientinnen mittels des Enzyme-linked Immunosorbent Assays (CUSABIO bzw. R&D Systems) nachgewiesen. Die Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt. Standardreihen für proNGF und DCN waren im jeweiligen ELISA Kit enthalten. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

#### 5.3.4.1 ProNGF ELISA

Die 96-Well Platten waren bereits mit einem spezifischen proNGF Antikörper vorbehandelt. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei 37°C. Die proNGF-Standardreihe bzw. die Proben wurden auf die Platte aufgetragen und 2 h inkubiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit einem Biotin Antikörper für 1 h. Nach einem Waschschrift wurde die Platte eine weitere Stunde mit Avidin-konjugierter HRP (Horseradish Peroxidase) inkubiert. Darauf folgte ein weiterer Waschschrift, nach dem vermieden werden sollte, dass die Platte direkter Lichteinstrahlung ausgesetzt wird. Die Behandlung mit der Substratlösung (TMB Substrate) dauerte 25 min. Die Reaktion wurde mit der Stop Solution beendet. Die Messung der optischen Dichte erfolgte am Fluostar Optima (BMG Labtech) bei 450 nm und 540 nm. Unregelmäßigkeiten auf der Platte, die die optische Messung beeinflussen, wurden durch die Subtraktion der Messwerte bei 540 nm von denen bei 450 nm ausgeglichen. Die in der Follikelflüssigkeit enthaltene proNGF Menge wurde anhand der Standardkurve berechnet.

#### 5.3.4.2 DCN ELISA

Die 96-Well Platten wurden über Nacht mit capture antibody (2 µg/ml) inkubiert. Daraufhin wurde die Platte gewaschen und mit Reagent Diluent für 1 h geblockt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Decorin-Standardreihe bzw. die Proben aufgetragen und 2 h inkubiert. Auf einen weiteren Waschschrift folgte die Inkubation mit der Streptavidin-horseradish Peroxidase für 20 min. Ab diesem Schritt sollte vermieden werden, die Platte direkter Lichteinstrahlung auszusetzen. Die Inkubation mit der Substrat Solution für 20 min erfolgte nach erneutem Waschen der Platte. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Stop Solution in jedes Well zugegeben und im Anschluss daran die optische Dichte am Fluostar Optima (BMG Labtech) bei 450 nm und 540 nm gemessen. Um Unregelmäßigkeiten auf der Platte, die die optische Messung beeinflussen, auszugleichen, wurden die Messwerte bei 540 nm von denen bei 450 nm subtrahiert. Die Decorinmenge in der Follikelflüssigkeit wurde anhand der Standardkurve berechnet.

#### 5.4 Statistik

Um Aussagen über die Signifikanz der Ergebnisse der MAPK-Phosphorylierung, der ATP- und Caspase-Assays sowie über die Egr-1 Expression in den humanen Granulosazellen zu treffen, wurden ANOVA-Analysen (post-Test: Newman-Keuls multiple comparison Test) durchgeführt. Der Wilcoxon rank sum Test (Vergleich der Medianwerte) wurde verwendet, um die qPCR Ergebnisse des Vergleichs der Proben von IVF-Patientinnen ohne und mit PCOS auszuwerten. Da die zu analysierenden Werte aufgrund der Heterogenität der Proben wahrscheinlich nicht normalverteilt sind, können die Mittelwerte nicht miteinander verglichen werden (one-sample t-test). Daher mussten die Medianwerte für die Auswertung verwendet werden. Des Weiteren wurde der Mann Whitney Test als nicht parametrischer t-Test verwendet, um die Signifikanz des proNGF ELISAs zu untersuchen. Alle Daten wurden als Mittelwert oder Median  $\pm$ SD angegeben.

## 6. Literaturverzeichnis

A.D.A.M. Medical Encyclopedia. Polycystic ovary syndrome. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0001408/>.

Abir R, Fisch B, Jin S, Barnnet M, Ben-Haroush A, Felz C, Kessler-Icekson G et al. Presence of NGF and its receptors in ovaries from human fetuses and adults. *Mol Hum Reprod*. 2005; **11** (4): 229–236.

Adam M, Saller S, Ströbl S, Hennebold JD, Dissen GA, Ojeda SR, Stouffer RL et al. Decorin is a part of the ovarian extracellular matrix in primates and may act as a signaling molecule. *Human Reproduction*. 2012; **27** (11): 3249–3258.

Adashi EY. The IGF family and folliculogenesis. *J Reprod Immunol*. 1998; **39** (1-2): 13–19.

Alexander CM, Hansell EJ, Behrendtsen O, Flannery ML, Kishnani NS, Hawkes SP, Werb Z et al. Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development*. 1996; **122** (6): 1723–1736.

Aloe L. Nerve growth factor and neuroimmune responses: basic and clinical observations. *Arch Physiol Biochem*. 2001; **109** (4): 354–356.

Aloe L, Bracci-Laudiero L, Bonini S, Manni L. The expanding role of nerve growth factor: from neurotrophic activity to immunologic diseases. *Allergy*. 1997; **52** (9): 883–894.

Aloyz RS, Bamji SX, Pozniak CD, Toma JG, Atwal J, Kaplan DR, Miller FD et al. p53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors. *J Cell Biol*. 1998; **143** (6): 1691–1703.

Al-zi'abi MO, Bowolaksono A, Okuda K. Survival Role of Locally Produced Acetylcholine in the Bovine Corpus Luteum. *Biology of Reproduction*. 2009; **80** (4): 823–832.

Ambekar AS, Nirujogi RS, Srikanth SM, Chavan S, Kelkar DS, Hinduja I, Zaveri K et al. Proteomic analysis of human follicular fluid: a new perspective towards understanding folliculogenesis. *J Proteomics*. 2013; **87**: 68–77.

Angeletti RH, Bradshaw RA. Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971; **68** (10): 2417–2420.

Auffray I, Chevalier S, Froger J, Izac B, Vainchenker W, Gascan H, Coulombel L et al. Nerve growth factor is involved in the supportive effect by bone marrow-derived stromal cells of the factor-dependent human cell line UT-7. *Blood*. 1996; **88** (5): 1608–1618.

Azziz R. Controversy in clinical endocrinology: diagnosis of polycystic ovarian syndrome: the Rotterdam criteria are premature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; **91** (3): 781–785.

Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; **89** (6): 2745–2749.

Bagavandoss P. Differential distribution of gelatinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the rat ovary. *J. Endocrinol*. 1998; **158** (2): 221–228.

Baker AH, Zaltsman AB, George SJ, Newby AC. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. *J. Clin. Invest*. 1998; **101** (6): 1478–1487.

Bamji SX, Majdan M, Pozniak CD, Belliveau DJ, Aloyz R, Kohn J, Causing CG et al. The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *J Cell Biol*. 1998; **140** (4): 911–923.

Banaszewska B, Spaczyński RZ, Pelesz M, Pawelczyk L. Incidence of elevated LH/FSH ratio in polycystic ovary syndrome women with normo- and hyperinsulinemia. *Rocz. Akad. Med. Białymst*. 2003; **48**: 131–134.

Barbacid M. The Trk family of neurotrophin receptors. *J. Neurobiol*. 1994; **25** (11): 1386–1403.

Barbacid M. Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors. *Ann N Y Acad Sci*. 1995; **766**: 442–458.

Barde YA. Trophic factors and neuronal survival. *Neuron*. 1989; **2** (6): 1525–1534.

Barde YA. Neurotrophins: a family of proteins supporting the survival of neurons. *Prog Clin Biol Res*. 1994; **390**: 45–56.

Barde YA, Davies AM, Johnson JE, Lindsay RM, Thoenen H. Brain derived neurotrophic factor. *Prog Brain Res*. 1987; **71**: 185–189.

- Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1982; **1** (5): 549–553.
- Barker PA, Shooter EM. Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. *Neuron.* 1994; **13** (1): 203–215.
- Basset P, Wolf C, Rouyer N, Bellocq JP, Rio MC, Chambon P. Stromelysin-3 in stromal tissue as a control factor in breast cancer behavior. *Cancer.* 1994; **74** (3 Suppl): 1045–1049.
- Bauer J, Jarre A, Klingmüller D, Elger CE. Polycystic ovary syndrome in patients with focal epilepsy: a study in 93 women. *Epilepsy Res.* 2000; **41** (2): 163–167.
- Belaouaj A, Shipley JM, Kobayashi DK, Zimonjic DB, Popescu N, Silverman GA, Shapiro SD et al. Human macrophage metalloelastase. Genomic organization, chromosomal location, gene linkage, and tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* 1995; **270** (24): 14568–14575.
- Ben-Ami I, Freimann S, Armon L, Dantes A, Ron-El R, Amsterdam A. Novel function of ovarian growth factors: combined studies by DNA microarray, biochemical and physiological approaches. *Mol Hum Reprod.* 2006; **12** (7): 413–419.
- Berger EA, Shooter EM. Evidence for pro-beta-nerve growth factor, a biosynthetic precursor to beta-nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1977; **74** (9): 3647–3651.
- Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolics K, Goeddel DV, Rosenthal A. Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron.* 1991; **7** (5): 857–866.
- Betts T, Dutton N, Yarrow H. Epilepsy and the ovary (cutting out the hysteria). *Seizure.* 2001; **10** (3): 220–228.
- Bibel M, Barde YA. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* 2000; **14** (23): 2919–2937.
- Bibel M, Hoppe E, Barde YA. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J.* 1999; **18** (3): 616–622.
- Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors.* 2004; **22** (3): 123–131.
- Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; **4** (2): 197–250.
- Bischoff SC, Dahinden CA. Effect of nerve growth factor on the release of inflammatory mediators by mature human basophils. *Blood.* 1992; **79** (10): 2662–2669.
- Bjersing L, Cajander S. Ovulation and the mechanism of follicle rupture. V. Ultrastructure of tunica albuginea and theca externa of rabbit graafian follicles prior to induced ovulation. *Cell Tissue Res.* 1974; **153** (1): 15–30.
- Bocchini V, Angeletti PU. The nerve growth factor: purification as a 30,000-molecular-weight protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1969; **64** (2): 787–794.
- Bonini S, Lambiase A, Levi-Schaffer F, Aloe L. Nerve growth factor: an important molecule in allergic inflammation and tissue remodelling. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999; **118** (2-4): 159–162.
- Boomsma CM, Fauser BCJM, Macklon NS. Pregnancy complications in women with polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Med.* 2008; **26** (1): 72–84.
- Bothwell M. Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev Neurosci.* 1995; **18**: 223–253.
- Bothwell M. Evolution of the neurotrophin signaling system in invertebrates. *Brain Behav Evol.* 2006; **68** (3): 124–132.
- Boyle MD, Lawman MJ, Gee AP, Young M. Nerve growth factor: a chemotactic factor for polymorphonuclear leukocytes in vivo. *J Immunol.* 1985; **134** (1): 564–568.
- Bracci-Laudiero L, Celestino D, Starace G, Antonelli A, Lambiase A, Procoli A, Rumi C et al. CD34-positive cells in human umbilical cord blood express nerve growth factor and its specific receptor TrkA. *J Neuroimmunol.* 2003; **136** (1-2): 130–139.
- Brann AB, Tcherpakov M, Williams IM, Futerman AH, Fainzilber M. Nerve growth factor-induced p75-mediated death of cultured hippocampal neurons is age-dependent and transduced through ceramide generated by neutral sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* 2002; **277** (12): 9812–9818.
- Bresnahan PA. Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro- beta-NGF in vivo. *The Journal of Cell Biology.* 1990; **111** (6): 2851–2859.
- Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002; **3** (3): 207–214.

- Brodie C, Gelfand EW. Functional nerve growth factor receptors on human B lymphocytes. Interaction with IL-2. *J Immunol.* 1992; **148** (11): 3492–3497.
- Brummer O, Bohmer G, Hollwitz B, Flemming P, Petry K, Kuhnle H. MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation--an immunohistochemical study. *Gynecol Oncol.* 2002; **84** (2): 222–227.
- Bruno MA, Cuello AC. Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; **103** (17): 6735–6740.
- Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod.* 1990; **43** (4): 543–547.
- Buhler LA, Samara R, Guzman E, Wilson CL, Krizanac-Bengez L, Janigro D, Ethell DW et al. Matrix metalloproteinase-7 facilitates immune access to the CNS in experimental autoimmune encephalomyelitis. *BMC Neurosci.* 2009; **10** (1): 17.
- Butte MJ, Hwang PK, Mobley WC, Fletterick RJ, Butte MJ, Hwang PK, Mobley WC et al. Crystal structure of neurotrophin-3 homodimer shows distinct regions are used to bind its receptors. *Biochemistry.* 1998; **37** (48): 16846–16852.
- Buyuk E, Seifer DB. Follicular-fluid neurotrophin levels in women undergoing assisted reproductive technology for different etiologies of infertility. *Fertility and Sterility.* 2008; **90** (5): 1611–1615.
- Cantarella G, Lempereur L, Presta M, Ribatti D, Lombardo G, Lazarovici P, Zappala G et al. Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo. *FASEB J.* 2002; **16** (10): 1307–1309.
- Cao XM, Koski RA, Gashler A, McKiernan M, Morris CF, Gaffney R, Hay RV et al. Identification and characterization of the Egr-1 gene product, a DNA-binding zinc finger protein induced by differentiation and growth signals. *Mol. Cell. Biol.* 1990; **10** (5): 1931–1939.
- Carmina E, Lobo RA. Polycystic ovary syndrome (PCOS): arguably the most common endocrinopathy is associated with significant morbidity in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; **84** (6): 1897–1899.
- Caroleo MC, Costa N, Bracci-Laudiero L, Aloe L. Human monocyte/macrophages activate by exposure to LPS overexpress NGF and NGF receptors. *J. Neuroimmunol.* 2001; **113** (2): 193–201.
- Carter BD, Lewin GR. Neurotrophins live or let die: does p75NTR decide? *Neuron.* 1997; **18** (2): 187–190.
- Casaccia-Bonnel P, Carter BD, Dobrowsky RT, Chao MV. Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature.* 1996; **383** (6602): 716–719.
- Casademunt E, Carter BD, Benzel I, Frade JM, Dechant G, Barde YA. The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75(NTR) and participates in programmed cell death. *EMBO J.* 1999; **18** (21): 6050–6061.
- Cattoretti G, Schiro R, Orazi A, Soligo D, Colombo MP. Bone marrow stroma in humans: anti-nerve growth factor receptor antibodies selectively stain reticular cells in vivo and in vitro. *Blood.* 1993; **81** (7): 1726–1738.
- Cauwe B, van den Steen PE, Opdenakker G. The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2007; **42** (3): 113–185.
- Chae HJ, Kang JS, Byun JO, Han KS, Kim DU, Oh SM, Kim HM et al. Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. *Pharmacol. Res.* 2000; **42** (4): 373–381.
- Chakrabarti S, Sima AA, Lee J, Brachet P, Dicou E. Nerve growth factor (NGF), proNGF and NGF receptor-like immunoreactivity in BB rat retina. *Brain Res.* 1990; **523** (1): 11–15.
- Chao MV. The p75 neurotrophin receptor. *J. Neurobiol.* 1994; **25** (11): 1373–1385.
- Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci.* 2003; **4** (4): 299–309.
- Chao MV, Bothwell M. Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron.* 2002; **33** (1): 9–12.
- Chao MV, Hempstead BL. p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci.* 1995; **18** (7): 321–326.
- Chen Y, Dicou E, Djakiew D. Characterization of nerve growth factor precursor protein expression in rat round spermatids and the trophic effects of nerve growth factor in the maintenance of Sertoli cell viability. *Mol Cell Endocrinol.* 1997; **127** (2): 129–136.
- Chesnel F, Eppig JJ. Synthesis and accumulation of p34cdc2 and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis. *Mol Reprod Dev.* 1995; **40** (4): 503–508.
- Chevalier S, Praloran V, Smith C, MacGrogan D, Ip NY, Yancopoulos GD, Brachet P et al. Expression and functionality of the trkA proto-oncogene product/NGF receptor in undifferentiated hematopoietic cells. *Blood.* 1994a; **83** (6): 1479–1485.

- Chevalier S, Praloran V, Smith C, MacGrogan D, Ip NY, Yancopoulos GD, Brachet P et al. Expression and functionality of the trkA proto-oncogene product/NGF receptor in undifferentiated hematopoietic cells. *Blood*. 1994b; **83** (6): 1479–1485.
- Chung T, Lee Y, Kim C. Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: involvement of invasive potential. *FASEB J*. 2004; **18** (10): 1123–1125.
- Clewes O, Fahey MS, Tyler SJ, Watson JJ, Seok H, Catania C, Cho K et al. Human ProNGF: biological effects and binding profiles at TrkA, P75NTR and sortilin. *J. Neurochem*. 2008; **107** (4): 1124–1135.
- Cohen S. Purification and metabolic effects of a nerve growth-promoting protein from snake venom. *J. Biol. Chem*. 1959; **234** (5): 1129–1137.
- Cohen S. Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neuro-cytotoxic antiserum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1960; **46** (3): 302–311.
- Cohen S, Levi-Montalcini R. A nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1956; **42** (9): 571–574.
- Cohen S, Levi-Montalcini R, Hamburger V. A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcoma 37 and 180. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1954; **40** (10): 1014–1018.
- Cooke RG, Nothnack WB, Komar C, Burns P, Curry TE. Collagenase and gelatinase messenger ribonucleic acid expression and activity during follicular development in the rat ovary. *Biol. Reprod*. 1999; **61** (5): 1309–1316.
- Cordon-Cardo C, Tapley P, Jing SQ, Nanduri V, O'Rourke E, Lamballe F, Kovary K et al. The trk tyrosine protein kinase mediates the mitogenic properties of nerve growth factor and neurotrophin-3. *Cell*. 1991; **66** (1): 173–183.
- Cortvrindt R, Smits J, van Steirteghem AC. Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture in vitro. *Hum. Reprod*. 1997; **12** (4): 759–768.
- Currie J, Fortier S, Sina A, Galipeau J, Cao J, Annabi B. MT1-MMP down-regulates the glucose 6-phosphate transporter expression in marrow stromal cells: a molecular link between pro-MMP-2 activation, chemotaxis, and cell survival. *J Biol Chem*. 2007; **282** (11): 8142–8149.
- Curry TE, Osteen KG. Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus. *Biol Reprod*. 2001; **64** (5): 1285–1296.
- Curry TE, Song L, Wheeler SE. Cellular localization of gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases during follicular growth, ovulation, and early luteal formation in the rat. *Biol. Reprod*. 2001; **65** (3): 855–865.
- Darling TL, Petrides PE, Beguin P, Frey P, Shooter EM, Selby M, Rutter WJ et al. The biosynthesis and processing of proteins in the mouse 7S nerve growth factor complex. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol*. 1983; **48 Pt 1**: 427–434.
- Davey F, Davies AM. TrkB signalling inhibits p75-mediated apoptosis induced by nerve growth factor in embryonic proprioceptive neurons. *Curr Biol*. 1998; **8** (16): 915–918.
- Dechant G. Molecular interactions between neurotrophin receptors. *Cell Tissue Res*. 2001; **305** (2): 229–238.
- Dechant G, Barde Y. Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR. *Current Opinion in Neurobiology*. 1997; **7** (3): 413–418.
- Dechant G, Barde Y. The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci*. 2002; **5** (11): 1131–1136.
- Delsite R, Djakiew D. Characterization of nerve growth factor precursor protein expression by human prostate stromal cells: a role in selective neurotrophin stimulation of prostate epithelial cell growth. *Prostate*. 1999; **41** (1): 39–48.
- Dierich A, Sairam MR, Monaco L, Fimia GM, Gansmuller A, LeMeur M, Sassone-Corsi P et al. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; **95** (23): 13612–13617.
- Dissen GA, Garcia-Rudaz C, Paredes A, Mayer C, Mayerhofer A, Ojeda SR. Excessive Ovarian Production of Nerve Growth Factor Facilitates Development of Cystic Ovarian Morphology in Mice and Is a Feature of Polycystic Ovarian Syndrome in Humans. *Endocrinology*. 2009a; **150** (6): 2906–2914.
- Dissen GA, Hill DF, Costa ME, Les Dees CW, Lara HE, Ojeda SR. A role for trkA nerve growth factor receptors in mammalian ovulation. *Endocrinology*. 1996; **137** (1): 198–209.
- Dissen GA, Hill DF, Costa ME, Ma YJ, Ojeda SR. Nerve growth factor receptors in the peripubertal rat ovary. *Mol Endocrinol*. 1991; **5** (11): 1642–1650.

- Dissen GA, Hirshfield AN, Malamed S, Ojeda SR. Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated: changes at the time of folliculogenesis. *Endocrinology*. 1995; **136** (10): 4681–4692.
- Dissen GA, Parrott JA, Skinner MK, Hill DF, Costa ME, Ojeda SR. Direct effects of nerve growth factor on thecal cells from antral ovarian follicles. *Endocrinology*. 2000; **141** (12): 4736–4750.
- Dissen GA, Romero C, Hirshfield AN, Ojeda SR. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. *Endocrinology*. 2001; **142** (5): 2078–2086.
- Dissen G, Garcia-Rudaz C, Ojeda S. Role of Neurotrophic Factors in Early Ovarian Development. *Semin Reprod Med*. 2009b; **27** (1): 24–31.
- diZerega GS, Hodgen GD. Folliculogenesis in the primate ovarian cycle. *Endocr Rev*. 1981; **2** (1): 27–49.
- D'Onofrio M, Paoletti F, Arisi I, Brandi R, Malerba F, Fasulo L, Cattaneo A et al. NGF and proNGF regulate functionally distinct mRNAs in PC12 cells: an early gene expression profiling. *PLoS ONE*. 2011; **6** (6): e20839.
- Dunaif A, Thomas A. Current concepts in the polycystic ovary syndrome. *Annu. Rev. Med*. 2001; **52**: 401–419.
- Duncan S. Polycystic ovarian syndrome in women with epilepsy: a review. *Epilepsia*. 2001; **42 Suppl 3**: 60–65.
- Dutta P, Koch A, Breyer B, Schneider H, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Tamura T et al. Identification of novel target genes of nerve growth factor (NGF) in human mastocytoma cell line (HMC-1 (V560G c-Kit)) by transcriptome analysis. *BMC Genomics*. 2011; **12**: 196.
- Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev*. 2009; **30** (6): 624–712.
- Edwards RH, Selby MJ, Mobley WC, Weinrich SL, Hruby DE, Rutter WJ. Processing and secretion of nerve growth factor: expression in mammalian cells with a vaccinia virus vector. *Mol Cell Biol*. 1988; **8** (6): 2456–2464.
- Edwards RH, Selby MJ, Rutter WJ. Differential RNA splicing predicts two distinct nerve growth factor precursors. *Nature*. 1986; **319** (6056): 784–787.
- Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer*. 2002; **2** (3): 161–174.
- Emanuelli C, Salis MB, Pinna A, Graiani G, Manni L, Madeddu P. Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hindlimbs. *Circulation*. 2002; **106** (17): 2257–2262.
- Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 2001; **122** (6): 829–838.
- Ernfors P, Ibanez CF, Ebendal T, Olson L, Persson H. Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: developmental and topographical expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990a; **87** (14): 5454–5458.
- Ernfors P, Wetmore C, Olson L, Persson H. Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron*. 1990b; **5** (4): 511–526.
- Esposito D, Patel P, Stephens RM, Perez P, Chao MV, Kaplan DR, Hempstead BL et al. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J Biol Chem*. 2001; **276** (35): 32687–32695.
- Fahnestock M, Michalski B, Xu B, Coughlin MD. The Precursor Pro-Nerve Growth Factor Is the Predominant Form of Nerve Growth Factor in Brain and Is Increased in Alzheimer's Disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2001; **18** (2): 210–220.
- Fahnestock M, Yu G, Coughlin MD. ProNGF: a neurotrophic or an apoptotic molecule? *Prog Brain Res*. 2004; **146**: 101–110.
- Farhadi H, Pareek S, Day R, Dong W, Chretien M, Bergeron JJM, Seidah NG et al. Prohormone Convertases in Mouse Submandibular Gland: Co-localization of Furin and Nerve Growth Factor. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1997; **45** (6): 795–804.
- Fausser BC, van Heusden AM. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr Rev*. 1997; **18** (1): 71–106.
- Fini ME, Cook J, Mohan R, Brinckerhoff CE. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. In: *Matrix Metalloproteinases* (Parks WC, Mecham RP, eds). 1998; Academic Press, San Diego.
- Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol*. 2011; **194** (1): 7–15.
- Folgueras AR, Pendas AM, Sanchez LM, Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol*. 2004; **48** (5-6): 411–424.

- Fortune JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci.* 2003; **78** (3-4): 135–163.
- Fortune JE, Armstrong DT. Androgen production by theca and granulosa isolated from proestrous rat follicles. *Endocrinology.* 1977; **100** (5): 1341–1347.
- Fortune JE, Eppig JJ. Effects of gonadotropins on steroid secretion by infantile and juvenile mouse ovaries in vitro. *Endocrinology.* 1979; **105** (3): 760–768.
- Frade JM, Rodriguez-Tebar A, Barde YA. Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature.* 1996; **383** (6596): 166–168.
- Franks S. Polycystic ovary syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1995; **333** (13): 853–861.
- Freije JM, Diez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J, Lopez-Otin C et al. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem.* 1994; **269** (24): 16766–16773.
- Friedman WJ. Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *J Neurosci.* 2000; **20** (17): 6340–6346.
- Fritz S, Föhr KJ, Boddien S, Berg U, Brucker C, Mayerhofer A. Functional and Molecular Characterization of a Muscarinic Receptor Type and Evidence for Expression of Choline-Acetyltransferase and Vesicular Acetylcholine Transporter in Human Granulosa-Luteal Cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 1999; **84** (5): 1744–1750.
- Fritz S, Fritz S, Kunz L, Dimitrijevic N, Grünert R, Heiss C, Mayerhofer A et al. Muscarinic receptors in human luteinized granulosa cells: activation blocks gap junctions and induces the transcription factor early growth response factor-1. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2002; **87** (3): 1362–1367.
- Gall CM, Isackson PJ. Limbic seizures increase neuronal production of messenger RNA for nerve growth factor. *Science.* 1989; **245** (4919): 758–761.
- García R, Ballesteros LM, Hernández-Pérez O, Rosales AM, Espinosa R, Soto H, Díaz de León L et al. Metalloproteinase activity during growth, maturation and atresia in the ovarian follicles of the goat. *Anim. Reprod. Sci.* 1997; **47** (3): 211–228.
- Gibbs BF, Zillikens D, Grabbe J. Nerve growth factor influences IgE-mediated human basophil activation: functional properties and intracellular mechanisms compared with IL-3. *Int Immunopharmacol.* 2005; **5** (4): 735–747.
- Girard BM, Malley SE, Vizzard MA. Neurotrophin/receptor expression in urinary bladder of mice with overexpression of NGF in urothelium. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011; **300** (2): F345-55.
- Gogly B, Fournier B, Couty L, Naveau A, Brasselet C, Durand E, Coulomb B et al. Gingival fibroblast inhibits MMP-7: evaluation in an ex vivo aorta model. *J Mol Cell Cardiol.* 2009; **47** (2): 296–303.
- Goldenberg N, Glueck C. Medical therapy in women with polycystic ovarian syndrome before and during pregnancy and lactation. *Minerva Ginecol.* 2008; **60** (1): 63–75.
- Götz R, Koster R, Winkler C, Raulf F, Lottspeich F, Scharlt M, Thoenen H et al. Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature.* 1994; **372** (6503): 266–269.
- Greenwald GS, Roy SK. Follikular development and its control. In: The physiology of reproduction (Knobil E, Neill J, eds). 2nd edition 1994. 1995; Raven Press, New York.
- Grewal SS, York RD, Stork PJ. Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol.* 1999; **9** (5): 544–553.
- Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1962; **48**: 1014–1022.
- Hallböök F, Ibanez CF, Persson H. Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron.* 1991; **6** (5): 845–858.
- Hantzopoulos PA, Suri C, Glass DJ, Goldfarb MP, Yancopoulos GD. The low affinity NGF receptor, p75, can collaborate with each of the Trks to potentiate functional responses to the neurotrophins. *Neuron.* 1994; **13** (1): 187–201.
- Hasan W, Pedchenko T, Krizsan-Agbas D, Baum L, Smith PG. Sympathetic neurons synthesize and secrete pro-nerve growth factor protein. *J. Neurobiol.* 2003; **57** (1): 38–53.
- Hashizume K. Analysis of uteroplacental-specific molecules and their functions during implantation and placentation in the bovine. *J Reprod Dev.* 2007; **53** (1): 1–11.
- Hempstead BL. The many faces of p75NTR. *Curr Opin Neurobiol.* 2002; **12** (3): 260–267.

- Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, Chao MV. High-affinity NGF binding requires coexpression of the *trk* proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature*. 1991; **350** (6320): 678–683.
- He X, Garcia KC. Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science*. 2004; **304** (5672): 870–875.
- Heymach JV, Shooter EM. The biosynthesis of neurotrophin heterodimers by transfected mammalian cells. *J Biol Chem*. 1995; **270** (20): 12297–12304.
- Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol*. 1991; **124**: 43–101.
- Hofer MM, Barde Y. Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death in vivo. *Nature*. 1988; **331** (6153): 261–262.
- Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature*. 1990; **344** (6264): 339–341.
- Holland DR, Cousens LS, Meng W, Matthews BW. Nerve growth factor in different crystal forms displays structural flexibility and reveals zinc binding sites. *J Mol Biol*. 1994; **239** (3): 385–400.
- Hsueh AJ, Billig H, Tsafrii A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr. Rev*. 1994; **15** (6): 707–724.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol*. 1981; **75** (6): 816–821.
- Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*. 2001; **24**: 677–736.
- Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 2003; **72**: 609–642.
- Hyman C, Hofer M, Barde YA, Juhasz M, Yancopoulos GD, Squinto SP, Lindsay RM et al. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature*. 1991; **350** (6315): 230–232.
- Ibanez CF. Neurotrophic factors: from structure-function studies to designing effective therapeutics. *Trends Biotechnol*. 1995; **13** (6): 217–227.
- Ii M, Yamamoto H, Adachi Y, Maruyama Y, Shinomura Y. Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006; **231** (1): 20–27.
- Inoue N, Matsuda F, Goto Y, Manabe N. Role of cell-death ligand-receptor system of granulosa cells in selective follicular atresia in porcine ovary. *J. Reprod. Dev*. 2011; **57** (2): 169–175.
- Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycans in health and disease: novel regulatory signaling mechanisms evoked by the small leucine-rich proteoglycans. *FEBS J*. 2010; **277** (19): 3864–3875.
- Ip NY, Ibanez CF, Nye SH, McClain J, Jones PF, Gies DR, Belluscio L et al. Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; **89** (7): 3060–3064.
- Ip NY, Stitt TN, Tapley P, Klein R, Glass DJ, Fandl J, Greene LA et al. Similarities and differences in the way neurotrophins interact with the Trk receptors in neuronal and nonneuronal cells. *Neuron*. 1993; **10** (2): 137–149.
- Isackson PJ, Huntsman MM, Murray KD, Gall CM. BDNF mRNA expression is increased in adult rat forebrain after limbic seizures: temporal patterns of induction distinct from NGF. *Neuron*. 1991; **6** (6): 937–948.
- Jackson BC, Nebert DW, Vasiliou V. Update of human and mouse matrix metalloproteinase families. *Hum Genomics*. 2010; **4** (3): 194–201.
- Jana B, Koszykowska M, Czarzasta J. Expression of nerve growth factor and its receptors, TrkA and p75, in porcine ovaries. *J. Reprod. Dev*. 2011; **57** (4): 468–474.
- Jansen P, Giehl K, Nyengaard JR, Teng K, Lioubinski O, Sjoegaard SS, Breiderhoff T et al. Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury. *Nat Neurosci*. 2007; **10** (11): 1449–1457.
- Jiang J, Cheung CKM, Wang Y, Tsang BK. Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia. *Front. Biosci*. 2003; **8**: d222-37.
- Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E, Bothwell M et al. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell*. 1986; **47** (4): 545–554.
- Jones KR, Reichardt LF. Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; **87** (20): 8060–8064.
- Kaisho Y, Yoshimura K, Nakahama K. Cloning and expression of a cDNA encoding a novel human neurotrophic factor. *FEBS Lett*. 1990; **266** (1-2): 187–191.

- Kannan Y, Ushio H, Koyama H, Okada M, Oikawa M, Yoshihara T, Kaneko M et al. 2.5S nerve growth factor enhances survival, phagocytosis, and superoxide production of murine neutrophils. *Blood*. 1991; **77** (6): 1320–1325.
- Kaplan DR, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao MV, Parada LF. The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science*. 1991a; **252** (5005): 554–558.
- Kaplan DR, Martin-Zanca D, Parada LF. Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature*. 1991b; **350** (6314): 158–160.
- Kaplan DR, Miller FD. Signal transduction by the neurotrophin receptors. *Current Opinion in Cell Biology*. 1997; **9** (2): 213–221.
- Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*. 2000; **10** (3): 381–391.
- Karakida S, Kawano Y, Utsunomiya Y, Furukawa Y, Sasaki T, Narahara H. Effect of heparin-binding EGF-like growth factor and amphiregulin on the MAP kinase-induced production of vascular endothelial growth factor by human granulosa cells. *Growth Factors*. 2011; **29** (6): 271–277.
- Kendall G, Ensor E, Brar-Rai A, Winter J, Latchman DS. Nerve growth factor induces expression of immediate-early genes NGFI-A (Egr-1) and NGFI-B (nur 77) in adult rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res*. 1994; **25** (1-2): 73–79.
- Kendall TJ, Hennedige S, Aucott RL, Hartland SN, Vernon MA, Benyon RC, Iredale JP et al. p75 neurotrophin receptor signaling regulates hepatic myofibroblast proliferation and apoptosis in recovery from rodent liver fibrosis. *Hepatology*. 2009; **49** (3): 901–910.
- Klein R, Jing SQ, Nanduri V, O'Rourke E, Barbacid M. The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell*. 1991a; **65** (1): 189–197.
- Klein R, Nanduri V, Jing SA, Lamballe F, Tapley P, Bryant S, Cordon-Cardo C et al. The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell*. 1991b; **66** (2): 395–403.
- Klein R, Parada LF, Coulier F, Barbacid M. trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBO J*. 1989; **8** (12): 3701–3709.
- Klinke R, Pape HC, Kurtz A, Silbernagel S. Physiologie. 2009; Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Kogner P, Barbany G, Dominici C, Castello MA, Raschella G, Persson H. Coexpression of messenger RNA for TRK protooncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis. *Cancer Res*. 1993; **53** (9): 2044–2050.
- Kono T, Obata Y, Yoshimzu T, Nakahara T, Carroll J. Epigenetic modifications during oocyte growth correlates with extended parthenogenetic development in the mouse. *Nat Genet*. 1996; **13** (1): 91–94.
- Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet*. 1997; **15** (2): 201–204.
- Kwintkiewicz J, Giudice LC. The interplay of insulin-like growth factors, gonadotropins, and endocrine disruptors in ovarian follicular development and function. *Semin Reprod Med*. 2009; **27** (1): 43–51.
- La Sala A, Corinti S, Federici M, Saragovi HU, Girolomoni G. Ligand activation of nerve growth factor receptor TrkA protects monocytes from apoptosis. *J Leukoc Biol*. 2000; **68** (1): 104–110.
- Labouyrie E, Dubus P, Groppi A, Mahon FX, Ferrer J, Parrens M, Reiffers J et al. Expression of neurotrophins and their receptors in human bone marrow. *Am J Pathol*. 1999; **154** (2): 405–415.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; **227** (5259): 680–685.
- Lai KO, Fu WY, Ip FC, Ip NY. Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp. *Mol Cell Neurosci*. 1998; **11** (1-2): 64–76.
- Lamballe F, Klein R, Barbacid M. trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell*. 1991; **66** (5): 967–979.
- Lara HE, Dees WL, Hiney JK, Dissen GA, Rivier C, Ojeda SR. Functional recovery of the developing rat ovary after transplantation: contribution of the extrinsic innervation. *Endocrinology*. 1991; **129** (4): 1849–1860.
- Lara HE, Hill DF, Katz KH, Ojeda SR. The gene encoding nerve growth factor is expressed in the immature rat ovary: effect of denervation and hormonal treatment. *Endocrinology*. 1990; **126** (1): 357–363.
- Le AP, Friedman WJ. Matrix Metalloproteinase-7 Regulates Cleavage of Pro-Nerve Growth Factor and Is Neuroprotective following Kainic Acid-Induced Seizures. *Journal of Neuroscience*. 2012; **32** (2): 703–712.

- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*. 2001; **294** (5548): 1945–1948.
- Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengerer B, Masiakowski P, Thoenen H et al. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature*. 1989; **341** (6238): 149–152.
- Le-Niculescu H, Bonfoco E, Kasuya Y, Claret FX, Green DR, Karin M. Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death. *Mol. Cell. Biol.* 1999; **19** (1): 751–763.
- Levi-Montalcini R. Effects of mouse tumor transplantation on the nervous system. *Ann N Y Acad Sci.* 1952; **55** (2): 330–344.
- Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science*. 1987; **237** (4819): 1154–1162.
- Levi-Montalcini R, Cohen S. In vitro and in vivo effects of a nerve growth-stimulating agent isolated from snake venom. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1956; **42** (9): 695–699.
- Levi-Montalcini R, Hamburger V. A diffusible agent of mouse sarcoma, producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo. *J. Exp. Zool.* 1953; **123** (2): 233–287.
- Lewandowski KC, Cajdler-Luba A, Salata I, Bieńkiewicz M, Lewiński A. The utility of the gonadotrophin releasing hormone (GnRH) test in the diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS). *Endokrynol Pol.* 2011; **62** (2): 120–128.
- Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci.* 1996; **19**: 289–317.
- Liepinsh E, Ilag LL, Otting G, Ibanez CF. NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J.* 1997; **16** (16): 4999–5005.
- Linggi MS, Burke TL, Williams BB, Harrington A, Kraemer R, Hempstead BL, Yoon SO et al. Neurotrophin receptor interacting factor (NRIF) is an essential mediator of apoptotic signaling by the p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem.* 2005; **280** (14): 13801–13808.
- Lippert H. Lehrbuch Anatomie. 2011; Urban & Fischer, München.
- Liu Y, Liu X, Nin L, Shi L, Chen S. Serine protease and ovarian paracrine factors in regulation of ovulation. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2013; **18**: 650–664.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods.* 2001; **25** (4): 402–408.
- Lobos E, Gebhardt C, Kluge A, Spanel-Borowski K. Expression of nerve growth factor (NGF) isoforms in the rat uterus during pregnancy: accumulation of precursor proNGF. *Endocrinology.* 2005; **146** (4): 1922–1929.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry.* 1951; **193** (1): 265–275.
- Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci.* 2005; **6** (8): 603–614.
- Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. Taschenlehrbuch Histologie. 2012; Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Mahadeo D, Kaplan L, Chao MV, Hempstead BL. High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *J Biol Chem.* 1994; **269** (9): 6884–6891.
- Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, Ip NY, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD et al. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science*. 1990; **247** (4949 Pt 1): 1446–1451.
- Majdan M, Lachance C, Gloster A, Aloyz R, Zeindler C, Bamji S, Bhakar A et al. Transgenic mice expressing the intracellular domain of the p75 neurotrophin receptor undergo neuronal apoptosis. *J Neurosci.* 1997; **17** (18): 6988–6998.
- Majdan M, Walsh GS, Aloyz R, Miller FD. TrkA mediates developmental sympathetic neuron survival in vivo by silencing an ongoing p75NTR-mediated death signal. *J Cell Biol.* 2001; **155** (7): 1275–1285.
- Malamed S, Gibney JA, Ojeda SR. Ovarian innervation develops before initiation of folliculogenesis in the rat. *Cell Tissue Res.* 1992; **270** (1): 87–93.
- Manni L, Cajander S, Lundeborg T, Naylor AS, Aloe L, Holmäng A, Jonsdottir IH et al. Effect of exercise on ovarian morphology and expression of nerve growth factor and alpha(1)- and beta(2)-adrenergic receptors in rats with steroid-induced polycystic ovaries. *J. Neuroendocrinol.* 2005; **17** (12): 846–858.
- Marchenko GN, Marchenko ND, Strongin AY. The structure and regulation of the human and mouse matrix metalloproteinase-21 gene and protein. *Biochem. J.* 2003; **372** (Pt 2): 503–515.
- Matsuda F, Inoue N, Manabe N, Ohkura S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *J Reprod Dev.* 2012; **58** (1): 44–50.

- Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science*. 2002; **296** (5576): 2178–2180.
- Mayerhofer A, Kunz L. A non-neuronal cholinergic system of the ovarian follicle. *Ann. Anat.* 2005; **187** (5-6): 521–528.
- Mayerhofer A, Kunz L, Krieger A, Proskocil B, Spindel E, Amsterdam A, Dissen GA et al. FSH regulates acetylcholine production by ovarian granulosa cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 2006; **4** (1): 37.
- McCaffery FH, Leask R, Riley SC, Telfer EE. Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. *Biol. Reprod.* 2000; **63** (1): 267–273.
- McDonald NQ, Lapatto R, Murray-Rust J, Gunning J, Wlodawer A, Blundell TL. New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature*. 1991; **354** (6352): 411–414.
- McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev.* 2000; **21** (2): 200–214.
- Melamed I, Kelleher CA, Franklin RA, Brodie C, Hempstead B, Kaplan D, Gelfand EW et al. Nerve growth factor signal transduction in human B lymphocytes is mediated by gp140trk. *Eur. J. Immunol.* 1996; **26** (9): 1985–1992.
- Miller FD, Kaplan DR. Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 2001; **58** (8): 1045–1053.
- Monniaux D, Huet C, Besnard N, Clement F, Bosc M, Pisselet C, Monget P et al. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J Reprod Fertil Suppl.* 1997; **51**: 3–23.
- Moon S, Cha B, Kim C. In vitro cellular aging is associated with enhanced proliferative capacity, G1 cell cycle modulation, and matrix metalloproteinase-9 regulation in mouse aortic smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys.* 2003; **418** (1): 39–48.
- Moon S, Cha B, Kim C. ERK1/2 mediates TNF- $\alpha$ -induced matrix metalloproteinase-9 expression in human vascular smooth muscle cells via the regulation of NF- $\kappa$ B and AP-1: Involvement of the ras dependent pathway. *J Cell Physiol.* 2004a; **198** (3): 417–427.
- Moon S, Cha B, Lee Y, Nam K, Runge MS, Patterson C, Kim C et al. Age-related changes in matrix metalloproteinase-9 regulation in cultured mouse aortic smooth muscle cells. *Exp. Gerontol.* 2004b; **39** (1): 123–131.
- Moor RM. Regulation of the meiotic cycle in oocytes of domestic mammals. *Ann N Y Acad Sci.* 1988; **541**: 248–258.
- Morales TI, Woessner JF, Marsh JM, LeMaire WJ. Collagen, collagenase and collagenolytic activity in rat Graafian follicles during follicular growth and ovulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1983; **756** (1): 119–122.
- Mufson EJ, Bothwell M, Kordower JH. Loss of nerve growth factor receptor-containing neurons in Alzheimer's disease: a quantitative analysis across subregions of the basal forebrain. *Exp Neurol.* 1989; **105** (3): 221–232.
- Murdoch WJ, McCormick RJ. Enhanced degradation of collagen within apical vs. basal wall of ovulatory ovine follicle. *Am. J. Physiol.* 1992; **263** (2 Pt 1): E221-5.
- Murphy G, Cockett MI, Ward RV, Docherty AJ. Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan. A quantitative comparison of the activities of 95 kDa and 72 kDa gelatinases, stromelysins-1 and -2 and punctuated metalloproteinase (PUMP). *Biochem J.* 1991; **277** (Pt 1): 277–279.
- Nagase, H. Matrix metalloproteinases. In: Zinc Metalloproteases in Health and Disease (Hooper NM, ed). 1996; Taylor & Francis, London.
- Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006; **69** (3): 562–573.
- Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999; **274** (31): 21491–21494.
- Nakagawara A, Liu XG, Ikegaki N, White PS, Yamashiro DJ, Nycum LM, Biegel JA et al. Cloning and chromosomal localization of the human TRK-B tyrosine kinase receptor gene (NTRK2). *Genomics.* 1995; **25** (2): 538–546.
- Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J. Clin. Oncol.* 2000; **18** (5): 1135–1149.
- Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev.* 2005; **85** (1): 1–31.
- Nilsson A, Fainzilber M, Falck P, Ibáñez CF. Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS Letters.* 1998; **424** (3): 285–290.
- Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. *Lancet.* 2007; **370** (9588): 685–697.

- Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C et al. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*. 2004; **427** (6977): 843–848.
- Okada A, Bellocq JP, Rouyer N, Chenard MP, Rio MC, Chambon P, Basset P et al. Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; **92** (7): 2730–2734.
- Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 1991; **14**: 453–501.
- Otten U, Ehrhard P, Peck R. Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; **86** (24): 10059–10063.
- Ouellette MM, McDaniel LD, Wright WE, Shay JW, Schultz RA. The establishment of telomerase-immortalized cell lines representing human chromosome instability syndromes. *Hum. Mol. Genet*. 2000; **9** (3): 403–411.
- Overall CM. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Mol Biotechnol*. 2002; **22** (1): 51–86.
- Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK et al. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science*. 2004; **306** (5695): 487–491.
- Paredes A, Romero C, Dissen GA, DeChiara TM, Reichardt L, Cornea A, Ojeda SR et al. TrkB receptors are required for follicular growth and oocyte survival in the mammalian ovary. *Dev Biol*. 2004; **267** (2): 430–449.
- Parks WC, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir. Res*. 2001; **2** (1): 10–19.
- Patapoutian A, Reichardt LF. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol*. 2001; **11** (3): 272–280.
- Peng C, Ohno T, Khorasheh S, Leung PC. Activin and follistatin as local regulators in the human ovary. *Biol Signals*. 1996; **5** (2): 81–89.
- Pepper MS. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; **21** (7): 1104–1117.
- Petersen CM, Nielsen MS, Nykjaer A, Jacobsen L, Tommerup N, Rasmussen HH, Roigaard H et al. Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J Biol Chem*. 1997; **272** (6): 3599–3605.
- Peters H. The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1969; **62** (1): 98–116.
- Phillips HS, Hains JM, Armanini M, Laramie GR, Johnson SA, Winslow JW. BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron*. 1991; **7** (5): 695–702.
- Philo J, Talvenheimo J, Wen J, Rosenfeld R, Welcher A, Arakawa T. Interactions of neurotrophin-3 (NT-3), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and the NT-3.BDNF heterodimer with the extracellular domains of the TrkB and TrkC receptors. *J Biol Chem*. 1994; **269** (45): 27840–27846.
- Piccard H, van den Steen PE, Opdenakker G. Hemopexin domains as multifunctional liganding modules in matrix metalloproteinases and other proteins. *J Leukoc Biol*. 2007; **81** (4): 870–892.
- Purves D. Body and brain. A trophic theory of neural connections. 1990; Harvard University Press, Cambridge (Massachusetts).
- Purves D, Snider WD, Voyvodic JT. Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. *Nature*. 1988; **336** (6195): 123–128.
- Rabahi F, Monniaux D, Pisselet C, Chupin D, Durand P. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis of bovine follicular cells during the preovulatory period. *Mol. Reprod. Dev*. 1991; **30** (3): 265–274.
- Rabizadeh S, Oh J, Zhong LT, Yang J, Bitler CM, Butcher LL, Bredesen DE et al. Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science*. 1993; **261** (5119): 345–348.
- Radeke MJ, Misko TP, Hsu C, Herzenberg LA, Shooter EM. Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature*. 1987; **325** (6105): 593–597.
- Rattenholl A, Lilie H, Grossmann A, Stern A, Schwarz E, Rudolph R. The pro-sequence facilitates folding of human nerve growth factor from Escherichia coli inclusion bodies. *Eur J Biochem*. 2001; **268** (11): 3296–3303.
- Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006; **361** (1473): 1545–1564.
- Reinshagen M, Geerling I, Eysselein VE, Adler G, Huff KR, Moore GP, Lakshmanan J et al. Commercial recombinant human beta-nerve growth factor and adult rat dorsal root ganglia contain an identical molecular species of nerve growth factor prohormone. *J Neurochem*. 2000; **74** (5): 2127–2133.

- Richards JS, Midgley AR. Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. *Biol Reprod.* 1976; **14** (1): 82–94.
- Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest.* 2010; **120** (4): 963–972.
- Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Espey LL. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annu Rev Physiol.* 2002; **64**: 69–92.
- Robinson LL, Sznajder NA, Riley SC, Anderson RA. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human fetal testis and ovary. *Mol Hum Reprod.* 2001; **7** (7): 641–648.
- Robinson RC, Radziejewski C, Spraggon G, Greenwald J, Kostura MR, Burtnick LD, Stuart DI et al. The structures of the neurotrophin 4 homodimer and the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 4 heterodimer reveal a common Trk-binding site. *Protein Sci.* 1999; **8** (12): 2589–2597.
- Robinson RC, Radziejewski C, Stuart DI, Jones EY. Structure of the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 3 heterodimer. *Biochemistry.* 1995; **34** (13): 4139–4146.
- Rodríguez-Tebar A, Dechant G, Barde YA. Neurotrophins: structural relatedness and receptor interactions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1991; **331** (1261): 255–258.
- Rodríguez-Tébar A, Dechant G, Barde YA. Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron.* 1990; **4** (4): 487–492.
- Rodríguez-Tébar A, Dechant G, Götz R, Barde YA. Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J.* 1992; **11** (3): 917–922.
- Romero C, Paredes A, Dissen GA, Ojeda SR. Nerve growth factor induces the expression of functional FSH receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology.* 2002; **143** (4): 1485–1494.
- Rosenthal A, Goeddel DV, Nguyen T, Lewis M, Shih A, Laramée GR, Nikolics K et al. Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron.* 1990; **4** (5): 767–773.
- Rotterdam ESHRE/ASRM Workgroup. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod.* 2004; **19** (1): 41–47.
- Roux PP, Barker PA. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol.* 2002; **67** (3): 203–233.
- Ryden M, Hempstead B, Ibanez CF. Differential modulation of neuron survival during development by nerve growth factor binding to the p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem.* 1997; **272** (26): 16322–16328.
- Ryden M, Sehgal R, Dominici C, Schilling FH, Ibanez CF, Kogner P. Expression of mRNA for the neurotrophin receptor trkC in neuroblastomas with favourable tumour stage and good prognosis. *Br J Cancer.* 1996; **74** (5): 773–779.
- Sadeu J, Doedée A, Neal M, Hughes E, Foster W. Neurotrophins (BDNF and NGF) in follicular fluid of women with different infertility diagnoses. *Reproductive BioMedicine Online.* 2012; **24** (2): 174–179.
- Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H, Arnheim N et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985; **230** (4732): 1350–1354.
- Salas C, Julio-Pieper M, Valladares M, Pommer R, Vega M, Mastronardi C, Kerr B et al. Nerve growth factor-dependent activation of trkA receptors in the human ovary results in synthesis of follicle-stimulating hormone receptors and estrogen secretion. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2006; **91** (6): 2396–2403.
- Schaefer L, Iozzo RV. Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J. Biol. Chem.* 2008; **283** (31): 21305–21309.
- Schecterson LC, Bothwell M. Neurotrophin receptors: Old friends with new partners. *Dev Neurobiol.* 2010; **70** (5): 332–338.
- Schneider R, Schweiger M. A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic trk and trkB tyrosine kinase receptors. *Oncogene.* 1991; **6** (10): 1807–1811.
- Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr. Rev.* 1993; **14** (2): 133–151.
- Segal RA. Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annu Rev Neurosci.* 2003; **26**: 299–330.
- Segal RA, Goumnerova LC, Kwon YK, Stiles CD, Pomeroy SL. Expression of the neurotrophin receptor TrkC is linked to a favorable outcome in medulloblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994; **91** (26): 12867–12871.
- Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Savaria D, Hamelin J, Goulet B, Laliberte J et al. Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem. J.* 1996; **314** (3): 951–960.

- Seifer DB, Lambert-Messerlian G, Schneyer AL. Ovarian brain-derived neurotrophic factor is present in follicular fluid from normally cycling women. *Fertil. Steril.* 2003; **79** (2): 451–452.
- Selby MJ, Edwards R, Sharp F, Rutter WJ. Mouse nerve growth factor gene: structure and expression. *Mol Cell Biol.* 1987; **7** (9): 3057–3064.
- Shah PK. Inflammation, metalloproteinases, and increased proteolysis: an emerging pathophysiological paradigm in aortic aneurysm. *Circulation.* 1997; **96** (7): 2115–2117.
- Shiomi T, Okada Y. MT1-MMP and MMP-7 in invasion and metastasis of human cancers. *Cancer Metastasis Rev.* 2003; **22** (2-3): 145–152.
- Shi Z, Jin W, Watanabe G, Suzuki AK, Takahashi S, Taya K. Expression of nerve growth factor (NGF), and its receptors trkA and p75 in ovaries of the cyclic golden hamster (*Mesocricetus auratus*) and the regulation of their production by luteinizing hormone. *J. Reprod. Dev.* 2004; **50** (6): 605–611.
- Shooter EM. Early days of the nerve growth factor proteins. *Annu Rev Neurosci.* 2001; **24**: 601–629.
- Siegenthaler W. Klinische Pathophysiologie. 2006; Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Skaper SD. The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2008; **7** (1): 46–62.
- Skaper SD, Pollock M, Facci L. Mast cells differentially express and release active high molecular weight neurotrophins. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001; **97** (2): 177–185.
- Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update.* 2005; **11** (5): 461–471.
- Smith MM, Shi L, Navre M. Rapid identification of highly active and selective substrates for stromelysin and matrilysin using bacteriophage peptide display libraries. *J. Biol. Chem.* 1995; **270** (12): 6440–6449.
- Soppet D, Escandon E, Maragos J, Middlemas DS, Reid SW, Blair J, Burton LE et al. The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor. *Cell.* 1991; **65** (5): 895–903.
- Sorensen RA, Wassarman PM. Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol.* 1976; **50** (2): 531–536.
- Spears N, Molinek MD, Robinson LL, Fulton N, Cameron H, Shimoda K, Telfer EE et al. The role of neurotrophin receptors in female germ-cell survival in mouse and human. *Development.* 2003; **130** (22): 5481–5491.
- Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res.* 2002; **90** (5): 520–530.
- Squinto SP, Stitt TN, Aldrich TH, Davis S, Bianco SM, Radziejewski C, Glass DJ et al. trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell.* 1991; **65** (5): 885–893.
- Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol.* 1935; (29): 181–191.
- Stephoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet.* 1978; **2** (8085): 366.
- Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J.* 1993; **7** (15): 1434–1441.
- Strauss JF. Some new thoughts on the pathophysiology and genetics of polycystic ovary syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003; **997**: 42–48.
- Suter U, Heymach JV, Shooter EM. Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF. *EMBO J.* 1991; **10** (9): 2395–2400.
- Takino T, Sato H, Shinagawa A, Seiki M. Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from a human placenta cDNA library. MT-MMPs form a unique membrane-type subclass in the MMP family. *J Biol Chem.* 1995; **270** (39): 23013–23020.
- Teede H, Deeks A, Moran L. Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC Med.* 2010; **8**: 41.
- Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P et al. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci.* 2005; **25** (22): 5455–5463.
- Teng KK, Felice S, Kim T, Hempstead BL. Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges. *Dev Neurobiol.* 2010; **70** (5): 350–359.
- Teng KK, Hempstead BL. Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. *Cell Mol Life Sci.* 2004; **61** (1): 35–48.

- Toonen H. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science*. 1995; **270** (5236): 593–598.
- Thorpe LW, Stach RW, Hashim GA, Marchetti D, Perez-Polo JR. Receptors for nerve growth factor on rat spleen mononuclear cells. *J Neurosci Res*. 1987; **17** (2): 128–134.
- Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJ. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology*. 1991; **129** (5): 2799–2801.
- Turrini P, Gaetano C, Antonelli A, Capogrossi MC, Aloe L. Nerve growth factor induces angiogenic activity in a mouse model of hindlimb ischemia. *Neurosci Lett*. 2002; **323** (2): 109–112.
- Twigt J, Steegers-Theunissen RP, Bezstarosti K, Demmers JAA. Proteomic analysis of the microenvironment of developing oocytes. *Proteomics*. 2012; **12** (9): 1463–1471.
- Ullrich A, Gray A, Berman C, Dull TJ. Human  $\beta$ -nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse. *Nature*. 1983; **303** (5920): 821–825.
- van Voorhis BJ. Clinical practice. In vitro fertilization. *N. Engl. J. Med*. 2007; **356** (4): 379–386.
- van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; **87** (14): 5578–5582.
- Varon S, Nomura J, Shooter EM. Subunit structure of a high-molecular-weight form of the nerve growth factor from mouse submaxillary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1967; **57** (6): 1782–1789.
- Verdi JM, Birren SJ, Ibáñez CF, Persson H, Kaplan DR, Benedetti M, Chao MV et al. p75<sup>N</sup>NGFR regulates Trk signal transduction and NGF-induced neuronal differentiation in MAH cells. *Neuron*. 1994; **12** (4): 733–745.
- Visse R. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *Circulation Research*. 2003; **92** (8): 827–839.
- Vlodavsky I, Brown KD, Gospodarowicz D. A comparison of the binding of epidermal growth factor to cultured granulosa and luteal cells. *J Biol Chem*. 1978; **253** (10): 3744–3750.
- Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev*. 2000; **14** (17): 2123–2133.
- Wandji SA, Pelletier G, Sirard MA. Ontogeny and cellular localization of 125I-labeled basic fibroblast growth factor and 125I-labeled epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. *Biol Reprod*. 1992; **47** (5): 807–813.
- Wang F, Reierstad S, Fishman DA. Matrilysin over-expression in MCF-7 cells enhances cellular invasiveness and pro-gelatinase activation. *Cancer Lett*. 2006; **236** (2): 292–301.
- Wang F, So J, Reierstad S, Fishman DA. Matrilysin (MMP-7) promotes invasion of ovarian cancer cells by activation of progelatinase. *Int J Cancer*. 2005; **114** (1): 19–31.
- Webb R, Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutierrez CG, Garverick HA, Armstrong DG et al. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reprod Suppl*. 2003; **61**: 71–90.
- Welsch U. Lehrbuch Histologie 2006; Urban & Fischer, München.
- Wickramasinghe D, Ebert KM, Albertini DF. Meiotic competence acquisition is associated with the appearance of M-phase characteristics in growing mouse oocytes. *Dev Biol*. 1991; **143** (1): 162–172.
- Wiesmann C, Vos AM de. Nerve growth factor: structure and function. *Cell Mol Life Sci*. 2001; **58** (5-6): 748–759.
- Willnow TE, Petersen CM, Nykjaer A. VPS10P-domain receptors - regulators of neuronal viability and function. *Nat Rev Neurosci*. 2008; **9** (12): 899–909.
- Wilson CL, Matrisian LM. Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. *Int J Biochem Cell Biol*. 1996; **28** (2): 123–136.
- Wilson, CL, Matrisian, LM. Matrilysin. In: Matrix Metalloproteinases (Parks WC, Mecham RP, eds). 1998; Academic Press, San Diego.
- Xu J, Xu M, Bernuci MP, Fisher TE, Shea LD, Woodruff TK, Zelinski MB et al. Primate follicular development and oocyte maturation in vitro. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2013; **761**: 43–67.
- Yan H, Chao MV. Disruption of cysteine-rich repeats of the p75 nerve growth factor receptor leads to loss of ligand binding. *J Biol Chem*. 1991; **266** (18): 12099–12104.
- Yardley G, Relf B, Lakshmanan J, Reinshagen M, Moore GPM. Expression of nerve growth factor mRNA and its translation products in the anagen hair follicle. *Exp Dermatol*. 2000; **9** (4): 283–289.
- Yoon SO, Casaccia-Bonnel P, Carter B, Chao MV. Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci*. 1998; **18** (9): 3273–3281.

---

Yoshino M, Mizutani T, Yamada K, Tsuchiya M, Minegishi T, Yazawa T, Kawata H et al. Early growth response gene-1 regulates the expression of the rat luteinizing hormone receptor gene. *Biol. Reprod.* 2002; **66** (6): 1813–1819.

Young JM, McNeilly AS. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction.* 2010; **140** (4): 489–504.

## 7. Danksagung

Danken möchte ich ...

... Prof. Dr. Artur Mayerhofer für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und dafür, die Experimente in seinem Labor durchführen zu können.

... herzlich PD Lars Kunz für die Übernahme der Begutachtung meiner Doktorarbeit und die hilfreichen Diskussionen dieser Arbeit.

... allen Mitglieder der AG Mayerhofer für die sehr angenehme und kollegiale Atmosphäre, die Hilfsbereitschaft und Diskussionen.

Mein ganz besonderer Dank gilt ...

... meinen Eltern Gertrud und Johann Ströbl für ihre Unterstützung, Aufmunterung und Hilfe.

... Dominik Meinel für seine Unterstützung, Hilfe, Aufmunterung, Beratung und vor allem für seine Geduld. Es ist schön, dass es Dich gibt!

## 8. Anhang

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Homodimer- und Heterodimerbildung einzelner Neurotrophine. ....	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Primärstruktur von Prä-Pro-NGF. ....	9
Abbildung 3: Primärstruktur des humanen Prä-Pro-NGF.....	9
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Neurotrophin-Rezeptoren. ....	11
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Ligand-Rezeptorspezifität der Neurotrophine. ....	12
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Sortilin - p75 <sup>NTR</sup> und TrkA - p75 <sup>NTR</sup> Rezeptorkomplexe. .	13
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Follikelentwicklung beim Menschen.....	17
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Primärstruktur von Prä-Pro-MMP7.....	23
Abbildung 9: Schematische Darstellung der extrazellulären Prozessierung von proNGF zu NGF. ....	24
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Primärstruktur von Prä-Pro-MMP9.....	25
Abbildung 11: ProNGF/NGF Expression wurde in hGC detektiert.....	29
Abbildung 12: ProNGF/NGF mRNA Expression wurde im Affenovar nachgewiesen.....	29
Abbildung 13: Der proNGF/NGF mRNA Gehalt in hGC von Patientinnen ohne und mit PCOS nahm während der Kultivierung ab.....	30
Abbildung 14: Vergleich der proNGF/NGF mRNA Level in hGC von Patientinnen ohne und mit PCOS. ....	32
Abbildung 15: NGF wurde in hGC exprimiert.....	32
Abbildung 16: ProNGF und NGF wurde im humanen Ovar nachgewiesen.....	33
Abbildung 17: ProNGF wurde im Affenovar nachgewiesen.....	34
Abbildung 18: ProNGF wurde in der FF gefunden.....	34
Abbildung 19: Die proNGF Mengen in der FF von PCOS Patientinnen waren tendenziell geringer als bei Patientinnen ohne PCOS. ....	35
Abbildung 20: Die Rezeptoren für proNGF und NGF wurden in hGC nachgewiesen. ....	37
Abbildung 21: Sortilin mRNA Level in hGC von Patientinnen ohne und mit PCOS im Verlauf von fünf Kultivierungstagen. ....	38
Abbildung 22: Vergleich der Sortilin mRNA Level in hGC von Patientinnen ohne und mit PCOS. ....	39
Abbildung 23: Nachweis der Rezeptoren für proNGF und NGF im Affenovar.....	40
Abbildung 24: TrkA wurde im humanen Ovar nachgewiesen. ....	40
Abbildung 25: Die Abbauenzyme von proNGF und NGF wurden in hGC detektiert. ....	42
Abbildung 26: Die MMP9 mRNA Level in hGC von Patientinnen ohne und mit PCOS nahmen im Verlauf der Kultivierung ab. ....	43
Abbildung 27: Vergleich der MMP9 mRNA Level in hGC von Patientinnen ohne und mit PCOS. ....	44
Abbildung 28: Die Abbauenzyme für proNGF und NGF wurden im Affenovar nachgewiesen.....	45
Abbildung 29: MMP7 Expression wurde im humanen Ovar gezeigt.....	45
Abbildung 30: MMP7 und MMP9 wurden im Ovar von Rhesusaffen detektiert. ....	46
Abbildung 31: MMP7 wurde in der FF nachgewiesen.....	46
Abbildung 32: Die Faktoren des proNGF/NGF-Systems konnten im Gelbkörper detektiert werden. ...	47
Abbildung 33: ProNGF und NGF Stimulation führt nicht zur Phosphorylierung von Erk1/2. ....	49

---

Abbildung 34: ProNGF und NGF hatten nicht an allen Versuchstagen einen Effekt auf die Vitalität von hGC. ....	51
Abbildung 35: ProNGF und NGF hatten keinen apoptotischen Effekt auf die hGC.....	53
Abbildung 36: ProNGF und NGF hatten keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten und die Morphologie der hGC. ....	54
Abbildung 37: Die Egr-1 mRNA Level in hGC wurden durch proNGF und NGF nicht beeinflusst. ....	55
Abbildung 38: NGF und nicht proNGF erhöhte die Egr-1 Proteinlevel in den hGC an Tag 2 und Tag 3 der Kultur signifikant. ....	57
Abbildung 39: ProNGF und NGF erhöhten die $Ca^{2+}$ -Spiegel in hGC an Tag 2 der Kultur nicht.....	58
Abbildung 40: ProNGF und NGF erhöhten die $Ca^{2+}$ -Spiegel in hGC an Tag 3 der Kultur nicht.....	59
Abbildung 41: DCN wurde in hGC nachgewiesen. ....	60
Abbildung 42: DCN wurde in der FF gefunden. ....	60
Abbildung 43: DCN Konzentration in der FF. ....	61
Abbildung 44: DCN wirkte tendenziell antiapoptotisch auf hGC. ....	62
Abbildung 45: DCN erhöhte die $Ca^{2+}$ -Spiegel in hGC.....	63
Abbildung 46: Übersicht über die nachgewiesenen Komponenten der proNGF/NGF-Signalkaskade. ....	66

## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nukleotid-Mix für die RT-PCR. ....	78
Tabelle 2: Bedingungen für die reverse Transkription. ....	78
Tabelle 3: Mastermix-Komponenten für die PCR.....	78
Tabelle 4: PCR-Cycler Programm.....	78
Tabelle 5: Mastermix-Komponenten für die qPCR.....	79
Tabelle 6: qPCR-Cycler Programm.....	79
Tabelle 7: Zusammensetzung der SDS Gele.....	80
Tabelle 8: Liste der verwendeten Primer für die RT-PCR.....	105
Tabelle 9: Liste der verwendeten Primer für die quantitative real-time PCR. ....	106
Tabelle 10: Liste der verwendeten Primärantikörper für Western Blot Experimente. ....	106
Tabelle 11: Liste der verwendeten Primärantikörper für die Immunhistochemie. ....	107
Tabelle 12: Liste der verwendeten Sekundärantikörper.....	107
Tabelle 13: Liste der verwendeten Kontrollantigene. ....	107
Tabelle 14: Liste der verwendeten Chemikalien. ....	109
Tabelle 15: Liste der verwendeten Kits und Assays. ....	110
Tabelle 16: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien. ....	111
Tabelle 17: Liste der verwendeten Geräte. ....	112
Tabelle 18: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen.....	113
Tabelle 19: Liste der verwendeten Stimulanzen. ....	114
Tabelle 20: Liste der verwendeten Medien. ....	114
Tabelle 21: Liste der verwendeten Zelllinien.....	114
Tabelle 22: Liste der verwendeten RNA Proben.....	114
Tabelle 23: Liste der verwendeten Gewebeproben. ....	114

### 8.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
AK	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
AMH	anti-Müller Hormon
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ART	Assisted Reproductive Technology / assistierte Reproduktionstechniken
AS	Aminosäure
ASRM	American Society for Reproductive Medicine
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CASY	Cell Counter and Analyzer System
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
ChAT	Cholinacetyltransferase
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
C <sub>T</sub>	cycle threshold
DAB	Diaminobenzidin
DCN	Decorin
ddH <sub>2</sub> O	demineralisiertes Wasser
DEPC	Diethylcarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Effizienz
eCG	equines Choriongonadotropin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
Egr-1	Early growth response protein 1
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Reticulum
Erk	Extracellular regulated kinase
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embryology
FCS	Fetal calf serum
FF	Follikelflüssigkeit
Fluo-4 AM	Fluo-4 Acetoxymethylester

FSH	Follikel stimulierendes Hormon
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
hCG	humanes Choriongonadotropin
HCl	Salzsäure
hGC	humane Granulosazellen
HMC-1	human mast cell linie-1
HRP	Horseradish Peroxidase
HTPC	humane testikuläre peritubuläre Zellen
ICSI	intracytoplasmic sperm injection
IGF	insulin-like growth factor
IVF	<i>in vitro</i> Fertilisation
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton
Ko	Kontrolle
LH	luteinisierendes Hormon
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivated Proteinkinase
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	messenger ribunocleic acid
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	Nanogramm
NGF	Nerve Growth Factor
NIH	National Institutes of Health
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NPE	Sodiumchlorid/Pipes/EDTA
NRIF	neurotrophin receptor interacting factor
NT	Neurotrophin
OD	optische Dichte
p75 <sup>NTR</sup>	p75 Neurotrophin Rezeptor
PBS	Phosphate Bufferde Saline
PCOS	polycystisches Ovarialsyndrom
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PI3-K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PIPES	Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

---

Pox	Peroxidase
proNGF	pro-Nerve Growth Factor
qPCR	quantitative real-time PCR
Ras	Rat sarcoma
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
s	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SP	Signalpeptid
stim	stimuliert
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TBS-T	Tris buffered Saline-Tween
TC	Thekazellen
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF	tumor necrosis factor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trk	Tropomyosin-related Kinase
V	Volt
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

## 8.4 Material

### 8.4.1 PCR Primer

Gen	Sequenz (5' – 3')	GenBank Accession Nr.	Amplikongröße	Annealing-temperatur
<b>β-Aktin</b>		NM_001101		
<i>forward</i>	TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA		661 bp	60°C
<i>reverse</i>	CTA GAA GCA TTG CGG TGG ACG ATG GAG GG			
<b>Egr-1</b>		NM_001964		
<i>forward</i>	TGACCGCAGAGTCTTTTCCT		203 bp	59°C
<i>reverse</i>	TGGGTTGGTCATGCTCACTA			
<b>MMP7</b>		NM_002423		
<i>forward</i>	GAGTGCCAGATGTTGCAGAA		169 bp	58°C
<i>reverse</i>	AAATGCAGGGGATCTCTTT			
<b>MMP9</b>		NM_004994		
<i>forward</i>	TTGACAGCGACAAGAAGTGG		179 bp	57°C
<i>reverse</i>	GCCATTCACGTCGTCCTTAT			
<b>NGF</b>		NM_002506		
<i>forward</i>	CAC ACT GAG GTG CAT AGC GTA		103 bp	57°C
<i>reverse</i>	CAG GGA CAT TGC TCT CTG AGT			
<b>p75<sup>NTR</sup></b>		NM_002507		
<i>forward</i>	AGC CAA CCA GAC CGT GTG TG		663 bp	57°C
<i>reverse</i>	TTG CAG CTG TTC CAC CTC TT			
<b>Sortilin</b>		NM_002959		
<i>forward</i>	TCCTGGGTTGGAGATAGCAC		232 bp	60°C
<i>reverse</i>	TTCCTCCAGACACCTCTGCT			
<b>TrkA</b>		NM_001007792		
<i>forward</i>	TCAACAAATGTGGACGGAGA		197 bp	56°C
<i>reverse</i>	GTGGTGAACACAGGCATCAC		109 bp	56°C
<i>sn reverse</i>	GAGCTGCCACCCAATGTC			
<b>Ubiquitin</b>		von Dr. H. Welter		
<i>forward</i>	AGATCCAGGATAAGGAAGGCAT		400 bp	54°C
<i>reverse</i>	GCTCCACCTCCAGGGTGAT			

**Tabelle 8:** Liste der verwendeten Primer für die RT-PCR.

### 8.4.2 Real-time PCR Primer

Gen	Sequenz (5' – 3')	GenBank Accession Nr.	Amplikongröße	Annealing-temperatur
<b>Egr-1</b>		NM_001964		
<i>forward</i>	AGCCCTACGAGCACCTGAC		104 bp	59°C
<i>reverse</i>	GGCAGTCGAGTGGTTTG			
<b>GAPDH</b>		Berisha et al., 2002		
<i>forward</i>	GTC TTC ACT ACC ATG GAG AAG G		197 bp	59°C
<i>reverse</i>	TCA TGG ATG ACC TTG GCC AG			

<b>MMP9</b>		NM_004994		
<i>forward</i>	ATCCGGCACCTCTATGGTC			
<i>reverse</i>	CTGAGGGGTGGACAGTGG		121 bp	59°C
<b>NGF</b>		NM_002506		
<i>forward</i>	TCCGGACCCAATAACAGTTT			
<i>reverse</i>	GGACATTACGCTATGCACCTC		75 bp	59°C
<b>Sortilin</b>		NM_002959		
<i>forward</i>	GAGGAAGCCTGAAAACAGTGA			
<i>reverse</i>	GGCCATTGGAACATTCA		113 bp	59°C

**Tabelle 9:** Liste der verwendeten Primer für die quantitative real-time PCR.

### 8.4.3 Primärantikörper

#### 8.4.3.1 Für Western Blot

Antikörper	Verdünnung	Spezies/Klonalität	Hersteller
β-Aktin	1:5000	Maus/monoklonal	Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA
Decorin	1:1000	Ziege/monoklonal	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Egr-1	1:500	Kaninchen/polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
MMP7	1:1000	Kaninchen/polyklonal	Acris, Herford, Deutschland
MMP9	1:1000	Kaninchen/polyklonal	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
NGF-beta	1:500	Kaninchen/polyklonal	Chemikon, Billerica, MA, USA
NGFR (p75 <sup>NTR</sup> )	1:1000	Kaninchen/polyklonal	Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA
p44/42 MAPK (Erk1/2)	1:1000	Kaninchen/monoklonal	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)	1:1000	Maus/monoklonal	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
proNGF	1:500	Kaninchen/polyklonal	Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Sortilin	1:500	Kaninchen/polyklonal	Alomone Labs, Jerusalem, Israel
TrkA	1:1000	Kaninchen/monoklonal	Cell Signaling, Danvers, MA, USA

**Tabelle 10:** Liste der verwendeten Primärantikörper für Western Blot Experimente.

### 8.4.3.2 Für Immunhistochemie

Antikörper	Verdünnung	Spezies/Klonalität	Hersteller
MMP7	1:100	Kaninchen/polyklonal	Acris, Herford, Deutschland
MMP9	1:100	Kaninchen/polyklonal	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
NGF-beta	1:500	Kaninchen/polyklonal	Chemikon, Billerica, MA, USA
NGFR (p75 <sup>NTR</sup> )	1:500	Kaninchen/polyklonal	Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA
proNGF	1:100	Kaninchen/polyklonal	Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Sortilin	1:100	Kaninchen/polyklonal	Alomone Labs, Jerusalem, Israel
TrkA	1:250	Kaninchen/polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

**Tabelle 11:** Liste der verwendeten Primärantikörper für die Immunhistochemie.

### 8.4.4 Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Anwendung	Hersteller
Biotinylated goat anti rabbit	1:500	Immunhistochemie	Dianova, Hamburg, Deutschland
Pox donkey anti mouse	1:10000	Western Blot	Dianova, Hamburg, Deutschland
Pox goat anti rabbit	1:10000	Western Blot	Dianova, Hamburg, Deutschland
Pox rabbit anti goat	1:10000	Western Blot	Dianova, Hamburg, Deutschland

**Tabelle 12:** Liste der verwendeten Sekundärantikörper.

### 8.4.5 Kontrollantigene

Gen	Anwendung	Hersteller
Egr-1	2 µg Peptid pro 1 µg AK	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
proNGF	2 µg Peptid pro 1 µg AK	Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Sortilin	2 µg Peptid pro 1 µg AK	Alomone Labs, Jerusalem, Israel

**Tabelle 13:** Liste der verwendeten Kontrollantigene.

## 8.4.6 Chemikalien

Substanz	Hersteller	Ort
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	St. Luis, MO, USA
5x First Strand Buffer	Invitrogen – Life Technologies	Carlsbad, CA, USA
5x Green GoTaq Reaction Buffer	Promega	Madison, WI, USA
Acrylamid 2K – Lösung (30%)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Agarose Metaphor	Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Albumin Standard	Pierce – Thermo Fischer Scientific	Waltham, MA, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Aprotinin	AppliChem	St. Luis, MO, USA
Borsäure	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAA	Pasching, ,Österreich
Bromphenolblau	Serva	Heidelberg, Deutschland
CASYclean	Roche Applied Science	Basel, Schweiz
CASYton	Roche Applied Science	Basel, Schweiz
Decorin, human rekombinant	Immundiagnostik	Bensheim, Deutschland
DEPC Wasser	Ambion – Life Technologies	Carlsbad, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	St. Luis, MO, USA
Dithiothreitol (DTT) 0,1 M	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
DMEM/Ham's F12 mit L-Glutamin	PAA	Pasching, ,Österreich
DNA Ladder 100 bp	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
dNTPs (dATP/dCTP/dGTP/dTTP)	PeqLab	Erlangen, Deutschland
EDTA	Roth	Karlsruhe, Deutschland
EGF	Sigma-Aldrich	St. Luis, MO, USA
Entellan	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethanol 100% p.a.	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Fetal Calf Serum (FCS)	PAA	Pasching, ,Österreich
Fluo-4 AM	Molecular Probes – Life Technologies	Carlsbad, CA, USA
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fischer Scientific	Waltham, MA, USA
Glycerin	Merck	Darmstadt, Deutschland
Glycin	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
GoTaq DNA Polymerase	Promega	Madison, WI, USA
HCl	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Klinikum Rechts der Isar	München, Deutschland
$K_2HPO_4 \times 3 H_2O$	Merck	Darmstadt, Deutschland
KCl	Merck	Darmstadt, Deutschland
Leupeptin	Sigma-Aldrich	St. Luis, MO, USA
Methanol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Vitalia	Bruckmühl, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Na-III-citrat Dihydrat	Roth	Karlsruhe, Deutschland
$Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$	Merck	Darmstadt, Deutschland

NaCl	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )	Sigma-Aldrich	St. Luis, MO, USA
Normalserum goat	Sigma-Aldrich	St. Luis, MO, USA
Normalserum rabbit	Chemikon	Billerica, MA, USA
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Pierce – Thermo Fischer Scientific	Waltham, MA, USA
PBS	PAA	Pasching, ,Österreich
PBS Dulbecco	Biochrom	Berlin, Deutschland
Penicillin / Streptomycin	PAA	Pasching, ,Österreich
pH Kalibrationsstandard (pH 4/7/10)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Invitrogen – Life Technologies	Carlsbad, CA, USA
PIPES	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S	Sigma-Aldrich	St. Luis, MO, USA
Protease und Phosphatase Inhibitor Tabletten	Pierce – Thermo Fischer Scientific	Waltham, MA, USA
Recombinant Human pro-Nerve Growth Factor	Cedarlane	Burlington, Kanada
Recombinant Human $\beta$ -NGF	R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
RNasin Plus, 10000 U	Promega	Madison, WI, USA
Saccharose	Merck	Darmstadt, Deutschland
Sodiumdodecylsulfate (SDS)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Staurosporin	Sigma-Aldrich	St. Luis, MO, USA
Superscript II, 10000U	Invitrogen – Life Technologies	Carlsbad, CA, USA
Tris	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Trypsin-EDTA	PAA	Pasching, ,Österreich
Tween 20	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	Fluka – Sigma Aldrich	St. Luis, MO, USA
Xylol 99%	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Zitronensäure	Roth	Karlsruhe, Deutschland

**Tabelle 14:** Liste der verwendeten Chemikalien.

### 8.4.7 Kits und Assays

Kit	Hersteller	Ort
3,3' Diaminobenzidin (DAB) Tabletten Set	Sigma-Aldrich	St. Luis, MO, USA
Caspase-Glo 3/7 Assay	Promega	Madison, WI, USA
CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	Promega	Madison, WI, USA
DC Protein Assay (Reagenz A/B/S)	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
DuoSet ELISA Development System, human Decorin	R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
MinElute Gel Extraction Kit	Quiagen	Hilden, Deutschland
proNGF ELISA Kit	CUSABIO	Wuhan, China
QuantiFast SYBR Green PCR Kit	Quiagen	Hilden, Deutschland
Restore Western Blot Stripping Buffer	Pierce – Thermo Fischer Scientific	Waltham, MA, USA
RNeasy Plus Mini Kit	Quiagen	Hilden, Deutschland

Substrate Reagent Pack Farbreagenz A (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) und Farbreagenz B (Tetramethylbenzidin)	R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce – Thermo Scientific	Fischer Waltham, MA, USA
SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce – Thermo Scientific	Fischer Waltham, MA, USA
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories	Burlingame, CA, USA

**Tabelle 15:** Liste der verwendeten Kits und Assays.

### 8.4.8 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Ort
25 ml Röhre	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
96-Well Kultur Platte	Greiner Bio-One GmbH	Kremsmünster, Österreich
Casy Cups	Roche Applied Science	Basel, Schweiz
Combitips Plus	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
CryoPure Röhren	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Deckgläschen (Ø 12 mm)	Kindler	Freiburg, Deutschland
Deckgläser (24 x 60 mm)	Menzel Gläser	Braunschweig, Deutschland
Einmalspritzen (10 ml)	B. Braun	Melsungen, Deutschland
Eppendorfgefäße (0,5/1,0/2,0 ml)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
F96 MicroWell Weiße Polystyrene Platte	Nunc – Thermo Fischer Scientific	Waltham, MA, USA
Falcon Röhrchen (15/50 ml)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Feather disposable Skalpelle	FEATHER® Safety Razor Co. Ltd.	Osaka, Japan
Injektionskanüle 20G x 1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> “	B. Braun	Melsungen, Deutschland
Injektionskanüle 21G x 1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> “	BD Bioscience	San Jose, CA, USA
Kulturflaschen (25/75 cm <sup>2</sup> )	Nunc – Thermo Fischer Scientific	Waltham, MA, USA
Latexhandschuhe puderfrei	Kimberly-Clark	Dallas, TX, USA
MicroAmp Fast Optical 96-Well Platten	Applied Biosystems	Foster City, CA, USA
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems	Foster City, CA, USA
Nitrocellulosemembran	Whatman	Maidstone, Kent, UK
Nitrocellulosemembran	Machery&Nagel	Düren, Deutschland
Nunclon 24-Well Multischale	Nunc – Thermo Fischer Scientific	Waltham, MA, USA
Pap-Pen	Science Services	München, Deutschland
Parafilm	American National Can	Chicago, IL, USA
Pasteurpipetten 150 mm, Glas	Poulsen & Graf	Wertheim, Deutschland
Pasteurpipetten, Plastik	ratiolab	Dreieich, Deutschland
Perfusor Spritzen (50 ml)	B. Braun	Melsungen, Deutschland
Petrischalen (Ø 35/60 mm)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 200 µl	Rainin	Greifensee, Schweiz
Pipettenspitzen, 10/20/100/200/1000 µl	Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Reagent Reservoirs (25 ml)	VWR	Darmstadt, Deutschland
Röhrchen (13 ml)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland

Serologische Pipetten (5/10/25/50 ml)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Spritzenfilter Filtropur S (0,2/0,45 µm)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Superfrost Plus Objektträger	Menzel Gläser	Braunschweig
Urinbecher	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
UVette	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Zellschaber	Kisker	Steinfurt, Deutschland
Zellsieb (40 µm)	BD Bioscience	San Jose, CA, USA
µ-Dish (Ø 35 mm, Glasboden)	Ibidi	Martinsried, Deutschland

**Tabelle 16:** Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

### 8.4.9 Geräte

Gerät	Hersteller	Ort
Absaugpumpe	KNF Neuberger	Freiburg, Deutschland
Analysewaage DualRange XS 205	Mettler-Toledo	Greifensee, Schweiz
BioPhotometer	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Brutschränke BBD 6220	Heraeus Holding GmbH	Hanau, Deutschland
Bunsenbrenner Fireboy plus	Integra Biosciences	Zizers, Schweiz
CASY Zellzähler	Schärfe Systems	Reutlingen, Deutschland
Chemi Smart 5000	PeqLab	Erlangen, Deutschland
Count-down / Count-up Timer	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Duomax Schüttler 1030 und 2030	Heidolph	Schwabach, Deutschland
Elektronischer Rührer Multipoint HP15	Variomag	Daytona Beach, FL, USA
ELISA Reader	Dynex Technologies	Chantilly, VA, USA
Fluoreszenzlampe HBO 100 W	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axioplan	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Fluostar Optima	BMG Labtech	Ortenberg, Deutschland
Gefriertruhe -80°C	Sanyo	Morigucci, Japan
Heating System 1 (Axiovert 135)	Ibidi	Martinsried, Deutschland
IKA-Magnetrührer RTC	IKA-Werk	Staufen, Deutschland
IKA-Minishaker MS 2	IKA-Werk	Staufen, Deutschland
IKA-Schüttler MTS4	IKA-Werk	Staufen, Deutschland
Kamera am Fluoreszenzmikroskop	Visitron Systems	Puchheim, Deutschland
Kamera ProgRes CT3 (Nikon Diaphot)	Jenoptik	Jena, Deutschland
Kamera ProgRes MF cool (Axiovert 135)	Jenoptik	Jena, Deutschland
Konfokales Mikroskop TCS SP2 mit Laser und Scanner	Leica Microsystems	Wetzlar, Deutschland
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr	Bulle, Schweiz
Kühlzentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus	Hanau, Deutschland
Mehrkanalpipette 20-200 µl	Rainin	Greifensee, Schweiz
Mikroliterzentrifuge	Hettich	Tuttlingen, Deutschland
Mikroliterzentrifuge MC6	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Mikroskop Nikon Diaphot	Nikon	Chiyoda, Japan
Mikrowelle M690	Miele	Gütersloh, Deutschland
Mikrowelle R-210A	Sharp	Osaka, Japan
Mikrowellenkochtopf	Nordic Ware	Minneapolis, MN, USA

Mini-PROTEAN3 Cell System	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Multipette Plus	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
pH Meter FE20/EL20	Mettler-Toledo	Greifensee, Schweiz
Pipetten 2/10/20/100/200/1000 µl	Gilson	Middleton, WI, USA
Power Pac 300	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Präzisionswaage	Sartorius	Göttingen, Deutschland
StepOnePlus Real-Time PCR Systems	Applied Biosystems	Foster City, CA, USA
Sterilbank	BDK	Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Stripettor	Corning	Corning, NY, USA
Sub Cell GT Agarose Gel System	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Thermocycler PTC 200	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge	Sigma Laborzentrifugen GmbH	Osterode, Deutschland
Ultraschallprozessor 50H	Hielscher Ultrasonics GmbH	Teltow, Deutschland
UV Detektionssystem	MWG Biotech	Ebersberg, Deutschland
Vortex Genie 2	Scintific Industries	Bohemia, NY, USA
Wasserbad	Memmert	Schwabach, Deutschland
Zentrifuge Labofuge 400	Heraeus	Hanau, Deutschland

**Tabelle 17:** Liste der verwendeten Geräte.

#### 8.4.10 Puffer und Lösungen

Puffer	Einzelkomponenten
1x Transferpuffer	100 ml 10x Transferpuffer 20% Methanol auf 1l mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen
10x Laemmli-puffer	30,3 g Tris (250 mM) 144,1 g Glycin (1,92 M) 10 g SDS (1%) auf 1l mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen
10x Ponceau S	1g Ponceau S lösen in 500 ml 1% Essigsäure
10x TBE Puffer	108 g Tris 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M EDTA auf 1l mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen, pH 8,0
10x Transferpuffer	30,3 g Tris (250 mM) 144,1 g Glycin (1,92 M) auf 1l mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen, pH 8,3
20x TBS-T	116,8 g NaCl (2 M) 12,1 g Tris (80 mM) 10 ml Tween 20 (1%) auf 1l mit Aqua dest. auffüllen, pH 7,5
APS (10%)	1g APS in 10 ml ddH <sub>2</sub> O lösen

Bromphenolblau	1 ml Tris (1 M, pH 6,8) 2,4 ml Glycerin 50 mg SDS (5 mg/ml) 1 Spatelspitze Bromphenolblau auf 10 ml mit Aqua dest. auffüllen, pH 6,8
Natriumcitrat (0,1 M)	29,41 g Na-III-citrat Dihydrat auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen
NPE-Puffer	4,4 g NaCl (150 mM) 1,5 g PIPES (10 mM) 0,15 g EDTA (1 mM) auf 500 ml mit Aqua dest. auffüllen, pH 7,2
PBS (10 mM)	9,55 g PBS Dulbecco in 1 l Aqua dest. lösen
PBS (10 mM)	4,4 g NaCl (150 mM) 93,3 mg KCl (2,5 mM) 400,47 mg Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (4,5 mM) 171,2 mg K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O (1,5 mM) auf 500 ml mit Aqua dest. auffüllen, pH 7,5
Probenpuffer	1,9 g Tris (62,5 mM) 5 g SDS (2%) 25 g Saccharose (10%) auf 250 ml mit Aqua dest. auffüllen, pH 6,8
Proteinaseinhibitorcocktail	1 ml Probenpuffer 10 µl PMSF (10 mg/ml) 10 µl Aprotinin 10 µl Leupeptin (10 mM) 0,5 µl Natriumorthovanadat (1M)
Sammelpuffer	15,15 g Tris 0,75 g EDTA 1g SDS auf 250 ml mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen, pH 6,8
SDS (10%)	1 g SDS in 10 ml ddH <sub>2</sub> O lösen
Trenngelpuffer	45,43 g Tris 0,75 g EDTA 1 g SDS auf 250 ml mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen, pH 8,8
Tris/HCl (50 mM)	6,06 g Tris 38,9 ml HCl auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen, pH 7,6
Zitronensäure (0,1 M)	21,01 g Zitronensäure auf 1 l mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen

**Tabelle 18:** Liste der verwendeten Puffer und Lösungen.

### 8.4.11 Stimulanzen

Stimulans	gelöst in
Decorin, human rekombinant	H <sub>2</sub> O
EGF	10 mM Essigsäure
Histamin	H <sub>2</sub> O
Recombinant human $\beta$ -NGF	PBS
Recombinant human pro-Nerve Growth Factor	H <sub>2</sub> O + 0,1% BSA
Staurosporin	DMSO

**Tabelle 19:** Liste der verwendeten Stimulanzen.

### 8.4.12 Medien

Medium	Einzelkomponenten
DMEM/Ham's F12 Kulturmedium für hGC	500 ml DMEM/Ham's F12 10% FCS 1% Pen/Strep
DMEM/Ham's F12 zur Stimulation für hGC	500 ml DMEM/Ham's F12 ohne Zusätze

**Tabelle 20:** Liste der verwendeten Medien.

### 8.4.13 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
humane Granulosazellen	aus FF von IVF-Patientinnen, Praxis Prof. Dr. Berg, München

**Tabelle 21:** Liste der verwendeten Zelllinien.

### 8.4.14 RNA Proben

RNA Probe	Herkunft
Ovar, Rhesusaffe	Oregon National Primate Research Center (ONPRC), Beaverton, USA

**Tabelle 22:** Liste der verwendeten RNA Proben.

### 8.4.15 Gewebeproben

Gewebe	Herkunft
Ovar, human	eingebettet in Paraffin; Gewebebank des Instituts für Anatomie III – Zellbiologie der LMU München
Ovar, Rhesusaffe (5-6 Jahre)	eingebettet in Paraffin; Oregon National Primate Research Center (ONPRC), Beaverton, USA

**Tabelle 23:** Liste der verwendeten Gewebeproben.

## 8.5 Publikationen

### Manuskripte:

Adam, M, Saller, S, Ströbl, S, Hennebold, JD, Dissen, GA, Ojeda, SR, Stouffer, RL, Berg, D, Berg, U, Mayerhofer, A. Decorin is a part of the ovarian extracellular matrix in primates and may act as a signaling molecule. *Human Reproduction* 2012; **27** (11): 3249-3258.

Ströbl S, Blohberger, J, Berg, D, Berg, U, Dissen, GA, Ojeda, SR, Mayerhofer, A. ProNGF, NGF and MMP7 in the human ovary. In Bearbeitung.

### Poster:

Ströbl S, Saller S, Berg D, Berg U, Ojeda SR, Dissen GA, Mayerhofer A. ProNGF, a novel player in the ovarian follicle? 4. DVR (Dachverband Reproduktionsbiologie und -medizin e.V.) Kongress, Berlin 2011.

Ströbl S, Berg D, Berg U, Dissen GA, Ojeda SR, Mayerhofer A. Identification of proNGF – NGF and their receptors in the ovary. 55. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE), Mannheim 2012.

Ströbl S, Berg D, Berg U, Dissen GA, Ojeda SR, Mayerhofer A. ProNGF in the human ovary. 59. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG), München 2012.