

Acetylcholinesterase im humanen Ovar

Jan Blohberger



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

München 2015

Diese Dissertation wurde angefertigt
unter der Leitung von Prof. Dr. Artur Mayerhofer
an der Anatomischen Anstalt; Anatomie III - Zellbiologie
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

1. Gutachter: PD Dr. Lars Kunz
2. Gutachter: Prof. Dr. Barbara Conradt

Tag der Abgabe: 05.08.2015

Tag der mündlichen Prüfung: 22.12.2015

Eidesstattliche Erklärung

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

Die vorliegende Dissertation wurde nicht ganz oder 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 04.08.2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Zusammenfassung.....	XI
Summary	XII
1 Einleitung	1
1.1 Das Ovar	1
1.1.1 Funktion und Aufbau	1
1.1.2 Follikelentwicklung.....	1
1.1.3 Corpus luteum	4
1.1.4 Granulosazellen	5
1.1.5 Atresie und Zelltod.....	6
1.2 Acetylcholinesterase und Acetylcholin	9
1.2.1 Das nicht-neuronale cholinerge System des ovariellen Follikels.....	9
1.2.2 Acetylcholinesterase.....	12
1.2.3 Nicht-enzymatische Funktionen der AChE.....	15
1.3 Polyzystisches Ovar-Syndrom.....	16
1.4 Assistierte Reproduktion	18
1.5 Zielsetzung der Arbeit	19
2 Ergebnisse	20
2.1 Acetylcholinesterase als Teil des cholinergen Systems des humanen Ovars	20
2.1.1 Aktive Acetylcholinesterase in humaner Follikelflüssigkeit	20
2.1.2 AChE-Varianten in kultivierten humanen Granulosazellen.....	21
2.1.3 Expression von AChE in Ovargewebe von Mensch und Rhesusaffe	23
2.1.4 Trophische ACh-Wirkung auf humane Granulosazellen	26
2.1.5 ChAT-Regulation durch NGF	28
2.2 ARP (AChE-R-spezifisches Peptid) vermittelter Zelltod.....	29
2.2.1 Vermehrtes Auftreten des Zelltods unter ARP-Behandlung.....	29
2.2.2 Apoptose in Granulosazellen	32
2.2.3 ARP-vermittelte Nekroptose in humanen Granulosazellen	34
2.2.4 Nachweis von p-MLKL in ovariellem Gewebe	37
2.2.5 Mechanismus der Nekroptose-Induktion	38
2.3 AChE und das Polyzystische Ovar-Syndrom	39

2.4	AChE im Ovar der Ratte	41
3	Diskussion.....	43
3.1	AChE als Teil des ovariellen cholinergen Systems.....	43
3.2	AChE-R und Nekroptose.....	47
3.3	Die Bedeutung der AChE für PCOS	50
4	Methoden und Material.....	51
4.1	Zellbiologische Methoden	51
4.1.1	Isolierung und Kultivierung humaner Granulosazellen	51
4.1.2	Kultivierung der GFSHR17-Zellen	52
4.1.3	Mykoplasmentest	53
4.1.4	Konfluenzmessung	53
4.1.5	Live Cell Imaging.....	53
4.1.6	CASY-Zellzählung.....	54
4.1.7	Caspase-Assay.....	54
4.1.8	LDH-Assay.....	54
4.1.9	ROS-Assay	54
4.2	Proteinbiochemische Methoden	55
4.2.1	Ellman-Assay	55
4.2.2	Proteinisolierung	56
4.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	56
4.2.4	Immunhistochemie	57
4.2.5	Aufarbeitung der Rattenovarien	58
4.3	Nukleinsäurearbeiten	59
4.3.1	RNA-Isolation	59
4.3.2	cDNA-Synthese.....	59
4.3.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	60
4.3.4	qPCR	61
4.4	Statistik	62
4.5	Material.....	62
4.5.1	Antikörper	62
4.5.2	Primer	63
4.5.3	Chemikalien	64
4.5.4	Puffer und Lösungen	66
4.5.5	Kits und Assays	68
4.5.6	Verbrauchsmaterialien	68
4.5.7	Geräte	69
4.5.8	Medien.....	70
4.5.9	Zellen.....	71

4.5.10	Biologisches Material	71
5	Literaturverzeichnis	71
6	Danksagung.....	83
7	Publikationen	84
7.1	Originalarbeiten	84
7.2	Poster	84

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Übersicht über die wichtigsten Entwicklungsschritte des Follikels und des <i>Corpus luteum</i>	2
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der möglichen Aktivierungswege des Nekrosoms.	8
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des ovariellen nicht-neuronalen cholinergen Systems.	10
Abbildung 4:	Vereinfachte Darstellung der AChE-Genstruktur, der alternativen Transkripte und der Proteinprodukte.	13
Abbildung 5:	Nachweis der AChE in Follikelflüssigkeit von IVF-Patientinnen.....	20
Abbildung 6:	AChE und BChE in kultivierten humanen Granulosazellen.....	21
Abbildung 7:	AChE-Varianten in humanen Granulosazellen.	22
Abbildung 8:	Immunhistochemischer Nachweis von AChE, ChAT und AChE-R in humanem ovariellen Gewebe.	24
Abbildung 9:	Immunhistochemischer Nachweis von AChE, ChAT und AChE-R in ovariellem Gewebe des Rhesusaffen.....	25
Abbildung 10:	Evaluierung des Ach Systems in humanen Granulosazellen	27
Abbildung 11:	Regulierung von ChAT durch NGF.....	28
Abbildung 12:	Vermehrtes Absterben von Granulosazellen unter ARP-Behandlung.	30
Abbildung 13:	Charakteristische Morphologie des durch ARP-Behandlung vermehrt auftretenden Zelltods.....	31
Abbildung 14:	Auswirkungen der ARP-Behandlung auf die Konfluenz und Größe humaner Granulosazellen.....	32
Abbildung 15:	Caspase 3/7-Aktivität in humanen Granulosazellen unter ARP-Behandlung..	33
Abbildung 16:	Durch ARP bedingte Erhöhung der LDH-Freisetzung.	34

Abbildung 17: Inhibierung des ARP-vermittelten Zelltods durch Nek-1 und NSA im LDH-Assay	35
Abbildung 18: Identifikation der an Nekroptose beteiligten Schlüsselfaktoren in humanen Granulosazellen	36
Abbildung 19: Vermehrte Phosphorylierung von MLKL in humanen Granulosazellen unter ARP-Behandlung	37
Abbildung 20: Identifikation von p-MLKL in ovariellem Gewebe des Menschen und des Rhesusaffen	38
Abbildung 21: Konfluenz und ROS-Messungen mit humanen Granulosazellen.....	39
Abbildung 22: Vergleich der AChE-Proteinmenge und Aktivität in Follikelflüssigkeit von nicht-PCOS und PCOS-Patientinnen.....	40
Abbildung 23: Vergleich der AChE-S-, AChE-R- und ColQ-Expression von nicht-PCOS und PCOS-Patientinnen.....	41
Abbildung 24: Konfluenz unter ACh-Behandlung von Granulosazellen von nicht-PCOS- und PCOS-Patientinnen.....	41
Abbildung 25: AChE im Ovar und Granulosazellen der Ratte.....	42
Abbildung 26: Immunhistochemischer Nachweis von AChE und ChAT in ovariellem Gewebe der Ratte.	43
Abbildung 27: Schematische Darstellung des erweiterten ovariellen nicht-neuronalen cholinergen Systems.....	44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.....	56
Tabelle 2: Zusammensetzung des RT-PCR-Reaktionsansatzes.....	60
Tabelle 3: Thermocyclerprogramm für RT-PCR-Reaktion	60
Tabelle 4: Zusammensetzung des qPCR-Reaktionsansatzes	61
Tabelle 5: Thermocyclerprogramm für qPCR-Reaktion.....	61
Tabelle 6: Liste der verwendeten Primärantikörper	63
Tabelle 7: Liste der verwendeten Sekundärantikörper.....	63
Tabelle 8: Liste der verwendeten Kontrollpeptide	63
Tabelle 9: Liste der für die RT-PCR verwendeten Primer.....	63
Tabelle 10: Liste der für die qPCR verwendeten Primer	64

Tabelle 11: Liste der verwendeten Chemikalien.....	66
Tabelle 12: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen.....	67
Tabelle 13: Liste der verwendeten Kits und Assays.	68
Tabelle 14: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.	69
Tabelle 15: Liste der verwendeten Geräte.....	70
Tabelle 16: Liste der verwendeten Kulturmedien.	70
Tabelle 17: Liste der verwendeten Zellen.	71
Tabelle 18: Liste des verwendeten biologischen Materials.	71

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AChE-E	Erythrozyten-Variante der AChE
AChE-R	"Readthrough"-Variante der AChE
AChE-S	Synaptische Variante der AChE
ANOVA	Analysis of variance
ARP	AChE-R spezifisches Peptid
ARPin	Hitzeinaktiviertes ARP
ATC	Acetylthiocholinjodid
BChE	Butyrylcholinesterase
BK _{Ca}	Ca ²⁺ -abhängige K ⁺ -Kanäle
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Complementary DNA
ChAT	Cholin-Acetyltransferase
CL	<i>Corpus luteum</i>
ColQ	Collagen Q
C _T	Treshold cycle
DAB	Diaminobenzidin
DAI	DNA dependend activator of interferon regulatory factors
DCFH ₂ -DA	2-,7-Dichlordihydrofluoresceindiacetat
DEPC	Diethyldicarbonat
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTNB	Dithiobis-2-nitrobenzoësäure
DTT	Dithiothreitol
egr-1	Early growth related factor-1
EtOH	Ethanol
FADD	Fas-associated death domain
FCS	Fetal calf serum
FF	Follikelflüssigkeit
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GnRH	Gonadotropin-releasing Hormone
GPI	Glykophosphatidylinositol
GZ	Granulosazellen
h	Stunden
HupA	Huperzin A
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
iso-OMPA	Tetra-isopropylpyrophosphoramid
IVF	In-vitro-Fertilisation
kDa	Kilo-Dalton
L-19	60S ribosomales Protein L-19
LDH	Laktatdehydrogenase
LGZ	Luteinisierte Granulosazellen
LH	Luteinisierenden Hormon
LPS	Lipopolysaccharid
LTZ	Luteinisierte Thekazellen
min	Minuten
miRNA	microRNA
MLKL	Mixed lineage kinase domain-like
mRNA	Messenger-RNA
mU	Milli-Unit (Enzymeinheit)
N-AChE	AChE mit alternativem N-Terminus
Nek-1	Nekrostatin-1
NGF	Nerve growth factor
NSA	Nekrosulfonamid
P	Phosphorylierung
PAGE	Polyacrylamid-Gelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCOS	Polyzystisches Ovar-Syndrom
PCR	Polymerase chain reaction
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PKR	Proteinkinase R
p-MLKL	Phosphoryliertes MLKL
pNGF	Pro-NGF
POX	Peroxidase

PRiMA	Proline rich membrane anchor
qPCR	Quantitative PCR
RACK1	Receptors for activated C kinase 1
RIPK1	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
RIPK3	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Rounds per minute
rRNA	Ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkription - PCR
s	Sekunden
S.E.M.	Standard error of the mean
Scr	ARP-Kontrollpeptid
SDS	Sodium dodecyle sulfate
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	tris buffered saline - Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TIR	Toll-interleukin-1 receptor
TLR	Toll-like Receptor
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
TRADD	TNF- α -receptor-associated death domain
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TZ	Thekazellen
V	Volt
VACHT	Vesikulärer ACh-Transporter
WB	Western Blot
ZVF	Z-VAD-FMK

Zusammenfassung

Proliferation, Differenzierung und auch der Zelltod der ovariellen Zellen sind für die Funktionalität der weiblichen Keimdrüse während der reproduktiven Phase der Frau von großer Bedeutung. Diese Prozesse werden durch vielseitige Mechanismen reguliert, bei denen auch Neurotransmitter eine Rolle spielen. Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass nicht-neuronale Zellen des Ovars, nämlich Granulosa- und Lutealzellen, Acetylcholin synthetisieren. Acetylcholin kann über muskarinische Acetylcholinrezeptoren eine Reihe von trophischen Effekten im ovariellen Follikel und *Corpus luteum* haben. Auf welche Weise diese Wirkung im Ovar lokal und zeitlich eingeschränkt werden kann, war bisher unbekannt. In dieser Arbeit konnte in humaner Follikelflüssigkeit enzymatisch aktive Acetylcholinesterase als das Produkt humaner Granulosazellen identifiziert werden. Die Acetylcholinesterase kann Acetylcholin spalten und so dessen trophische Wirkung mindern. In humanen Granulosazellen konnte durch die Inhibierung der Acetylcholinesterase mittels Huperzin A eine Verstärkung der trophischen Wirkung des Acetylcholins erreicht werden. Neben der synaptischen und der Erythrozyten-Variante konnte auch die „readthrough“-Variante der Acetylcholinesterase in humanen Granulosazellen von IVF-Patientinnen nachgewiesen werden. Diese verfügt neben der enzymatischen Aktivität auch über nicht-enzymatische Funktionen. Der immunhistologische Nachweis dieser Variante in Follikelflüssigkeit, Granulosazellen, Thekazellen und auch in luteinisierten Zellen legt nahe, dass diese nicht-enzymatischen Funktionen auch im Ovar von Bedeutung sind. Unter der Verwendung eines synthetischen Peptids (ARP), welches spezifisch für die „readthrough“-Variante der Acetylcholinesterase ist, konnte eine solche Funktion aufgezeigt werden. In kultivierten humanen Granulosazellen induziert ARP eine Caspase-unabhängige Form des Zelltods. Hierbei waren eine spezifische Morphologie und die Freisetzung von Laktatdehydrogenase zu beobachten. Der RIPK1-Inhibitor Nekrostatin-1 und der MLKL-Blocker Nekrosulfonamid konnten das durch ARP induzierte Auftreten dieser Art des Zelltods signifikant reduzieren. Dies weist darauf hin, dass es sich bei der durch ARP induzierten Form des Zelltods um RIPK1/MLKL abhängige regulierte Nekrose (Nekroptose) handelt. Granulosazellen und luteinisierte Zellen sind in ovariellem Gewebe des Primaten (*Homo sapiens*, *Macacca mulatta*) positiv für phosphoryliertes MLKL. Dies lässt vermuten, dass die Nekroptose auch *in vivo* eine Rolle spielt und bei Vorgängen wie Atresie und Luteolyse involviert ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die enzymatische Aktivität der Acetylcholinesterase und den Vorgang der Nekroptose als neue potentielle Ansatzpunkte auf, um die ovariale Funktion zu beeinflussen.

Summary

Proliferation, differentiation and death of ovarian cells ensure orderly functioning of the female gonad during the reproductive phase in women. These processes are regulated by several mechanisms, including local signaling via neurotransmitters. Previous studies showed that ovarian non-neuronal endocrine cells, i.e. granulosa and luteal cells, produce acetylcholine, which likely acts as a trophic factor within the ovarian follicle and the corpus luteum via muscarinic acetylcholine receptors. How its actions are restricted was unknown. We identified enzymatically active acetylcholinesterase in human ovarian follicular fluid as a product of human granulosa cells. Acetylcholinesterase breaks down acetylcholine and thereby attenuates its trophic functions. Blockage of acetylcholinesterase by huperzine A increased the trophic actions as seen in studies with IVF-derived granulosa cells. Among the synaptic and the erythrocyte variant of acetylcholinesterase, the readthrough variant was identified, which has further, non-enzymatic roles. This variant was detected by immunohistochemistry in follicular fluid, granulosa and theca cells, as well as luteal cells, implying that such functions also occur in the ovary. A synthetic peptide (ARP), which is specific for the readthrough variant, was used to explore such actions and induced in primary, cultured human granulosa cells a caspase-independent form of cell death with a distinct balloon-like morphology and the release of lactate dehydrogenase. The RIPK1 inhibitor necrostatin-1 and the MLKL blocker necrosulfonamide significantly reduced this form of cell death. Thus a novel non-enzymatic function of acetylcholinesterase is to stimulate RIPK1/MLKL-dependent regulated necrosis (necroptosis). Necroptosis likely occurs in the primate ovary (*Homo sapiens*, *Macacca mulatta*) *in vivo*, as granulosa and luteal cells were immunopositive for phospho-MLKL, and hence necroptosis may contribute to follicular atresia and luteolysis.

The results suggest that interference with the enzymatic activities of acetylcholinesterase, and/or interference with necroptosis may be novel approaches to influence ovarian functions.

1 Einleitung

1.1 Das Ovar

1.1.1 Funktion und Aufbau

Eine der Hauptaufgaben des Ovars besteht in der Bereitstellung von weiblichen Keimzellen, den Oozyten. In den paarig angelegten Ovarien reifen die Oozyten heran und werden schließlich im befruchtungsfähigen Stadium in regelmäßigen Abständen abgegeben. Daneben nimmt das Ovar aber auch eine wichtige endokrine Rolle ein. Es ist verantwortlich für die Produktion von Östrogenen, welche für die korrekte Entwicklung der weiblichen Geschlechtsorgane unabdingbar sind, und Progesteron, welches notwendig für die Etablierung einer Schwangerschaft ist (Georges et al., 2014). Das Ovar als Organ kann in eine Rindenschicht und eine Markzone eingeteilt werden. Die Rinde beherbergt die Follikel in den verschiedenen Entwicklungsstadien und Gelbkörper (*Corpora lutea*), während im Mark hauptsächlich Blutgefäße und vegetative Nervenfasern anzutreffen sind (Schiebler et al., 1995). Das Ovar stellt einen komplex organisierten Verband von Keimzellen und somatischen Zellen dar. Die Interaktion verschiedener Zelltypen bestimmt die entscheidenden Vorgänge wie Follikelbildung, die Entwicklung der Eizelle und die Bildung eines *Corpus luteum* in diesem Organ (Richards und Pangas, 2010).

1.1.2 Follikelentwicklung

Ein Follikel setzt sich aus der Eizelle und den Zellen, welche diese direkt unterstützen, zusammen. Hierzu können die Granulosa- und Thekazellen gezählt werden. Zu den Hauptaufgaben des Follikels gehören die Unterstützung der Eizellenentwicklung und die Hormonproduktion. Die Follikelentwicklung (Abb. 1) zieht sich über mehrere Follikelstadien vom Primordialfollikel bis zum präovulatorischen Follikel hin (Georges et al., 2014; Richards und Pangas, 2010). Die Bildung von Primordialfollikeln in einem Fötus startet in etwa in einem Alter von vier Monaten. In einem Alter von fünf Monaten beträgt die Gesamtpopulation an Eizellen circa sieben Millionen Stück. Bei der Geburt hat sich diese Zahl auf etwa zwei Millionen verringert. Von den vorhandenen Oozyten bei einem Neugeborenen überleben bis zum siebten Lebensjahr lediglich 300 000 Stück (Baker, 1963). Durch die Bildung einer einschichtigen Lage an Granulosazellen um die Eizellen bilden sich die Primordialfollikel (Buccione et al., 1990). Nur ein kleiner Teil dieser Follikel wird das Ovulationsstadium erreichen, während ein Großteil zugrunde gehen wird (Craig et al., 2007). Bis zur

Geschlechtsreife ruhen diese noch vorhandenen Eizellen in den rudimentären Follikeln. Die Follikelentwicklung im humanen Ovar ist ein langwieriger Prozess und erstreckt sich von der Rekrutierung der Primordialfollikel bis zum präovulatorischen Follikel über etwa 175 Tage (Baerwald et al., 2012; Gougeon, 1986).

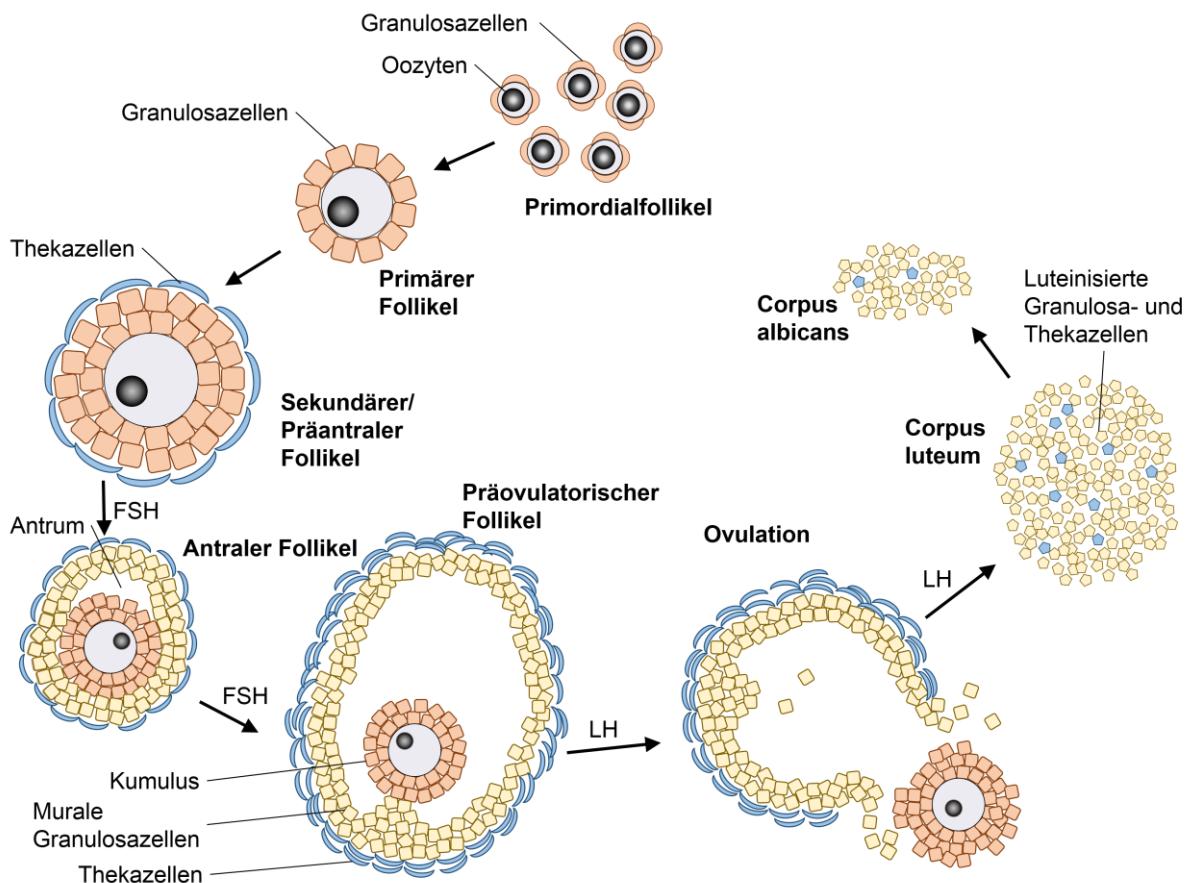


Abbildung 1: Übersicht über die wichtigsten Entwicklungsschritte des Follikels und des *Corpus luteum*. Diese beginnt mit den Primordialfollikeln, die in regelmäßigen Abständen rekrutiert werden und sich zu primären Follikeln entwickeln. Durch die Proliferation der Granulosazellen hat sich ab dem Stadium des sekundären Follikels eine mehrschichtige Zellhülle um die Oozyte gebildet. Ab diesem Zeitpunkt wird der Follikel auch von Thekazellen umschlossen und die Östrogensynthese des Follikels wird eingeleitet. Die von den Thekazellen produzierten Androgene werden von den Granulosazellen in Östrogene umgewandelt. Erst ab der Stufe des antralen Follikels wird das Wachstum abhängig von Gonadotropinen und hängt maßgeblich von der Stimulation durch FSH ab. Durch die anhaltende Proliferation der Granulosazellen bildet sich das Antrum aus und es entwickeln sich zwei Hauptpopulationen (Kumulus- und murale Granulosazellen) der Granulosazellen. Zu diesem Zeitpunkt findet die Selektion des dominanten Follikels statt und nur wenige Follikel überleben. Die meisten Follikel treten in das Stadium der Atresie ein. Nach der Ovulation, welche durch einen starken Anstieg von LH ausgelöst wird, luteinisieren die Granulosazellen und Thekazellen und bilden das *Corpus luteum*, welches für die Progesteronproduktion verantwortlich ist (Georges et al., 2014).

Durch welche Mechanismen die ruhenden Primordialfollikel in die Wachstumsphase eintreten, ist noch nicht vollständig geklärt. Das Schicksal der einzelnen Follikel scheint aber durch ein sensibles Gleichgewicht zwischen Wachstum, Differenzierung und Zelltod bestimmt zu werden (Baerwald et al., 2012; Wang et al., 2014c). Die folgende Entwicklung vom Primordialfollikel bis zum präantralen Follikel spielt sich zunächst unabhängig von Gonadotropinen ab. Beginnt sich im wachsenden Follikel eine mit Flüssigkeit gefüllte Kavität, das Antrum, zu entwickeln, wird das Wachstum allmählich abhängig von Gonadotropinen (Buccione et al., 1990; Craig et al., 2007). Die beiden durch GnRH (gonadotropin-releasing hormone) regulierten Gonadotropine FSH (Follikelstimulierendes Hormon) und LH (Luteinisierendes Hormon) nehmen hierbei eine entscheidende Rolle ein. Sie sind unerlässlich für das Follikelwachstum und die Ovulation. Zu Beginn des weiblichen Menstruationszyklus bewirkt das in niedriger Frequenz vom Hypothalamus ausgeschüttete GnRH einen Anstieg des FSH-Spiegels, was zu einem vermehrten Follikelwachstum führt. Später führt eine hochfrequente GnRH-Ausschüttung zu einem kurzzeitig stark erhöhten LH-Spiegel, wodurch die Ovulation und die Bildung des *Corpus luteum* ausgelöst werden. Die Schlüsselrolle des Ovars für die weibliche Fertilität wird allerdings auch durch Rückkopplungs-Mechanismen des Ovars an die Hypophyse und den Hypothalamus bestimmt. So hemmen die in den wachsenden Follikeln produzierten Östrogene die GnRH-Produktion im Hypothalamus, bewirken aber auch die starke pulsatile GnRH-Freisetzung, die letztendlich für den starken Anstieg des LH-Spiegels, welcher zur Ovulation führt, verantwortlich ist. Dies zeigt, auf welch fein ausbalancierten Mechanismen zwischen unterschiedlichen Organen die Fertilität beruht (Richards und Pangas, 2010).

Von den zahlreichen heranreifenden Follikeln wird lediglich ein dominanter Follikel das präovulatorische Stadium erreichen, während die übrigen sich zurückbilden (Ginther et al., 2001). Welcher Follikel den dominanten Follikel darstellt, zeigt sich bei einer Follikelgröße von etwa 10 mm. Der sich zum dominanten Follikel entwickelnde Follikel besitzt mehr Granulosazellen und damit auch mehr FSH-Rezeptoren und erhöhte Aromatase-Aktivität. Dadurch ist er im Vergleich zu den konkurrierenden Follikeln sensitiver für FSH und kann sich der Atresie, der Follikelrückbildung, entziehen. Die Follikelflüssigkeit des dominanten Follikels enthält auch mehr Östrogene und weniger Androgene als die der kleineren Follikel. Den kleineren Follikeln ist es nicht möglich, der Atresie unter den zeitweise durch den negativen Feedback-Mechanismus bedingten niedrigen FSH-Konzentrationen zu entgehen. Aufgrund der erhöhten Anzahl der Granulosazellen wird der dominante Follikel während des Selektionsprozesses FSH-unabhängiger und LH-sensitiver. Die durch LH geförderte

Androgensynthese kann durch die erhöhte Aromataseaktivität abgefangen werden (Baerwald et al., 2012).

In der späten Phase der Follikelentwicklung tritt der dominante Follikel in das präovulatorische Stadium ein. Erreicht die Östrogenproduktion schließlich ihren Höhepunkt, kommt es kurzzeitig durch einen positiven Feedback-Mechanismus zu einem schlagartigen Anstieg der LH-Ausschüttung (Bomsel-Helmreich et al., 1979; Vande Wiele et al., 1970). Der nun LH-Rezeptoren besitzende Follikel ist in dieser Phase in der Lage, auf den LH Anstieg zu reagieren (Bomsel-Helmreich et al., 1979; McNatty, 1978; Tsang et al., 1979). Innerhalb von 24 Stunden nach der LH-Spitze erfolgt die Ovulation (Kerin et al., 1981). In der Maus konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen LH und EGF (epidermal growth factor) eine verminderte Proliferation der Granulosazellen und eine Expansion des Kumulus bewirkt, was letztendlich zur Ovulation führt (Duggavathi und Murphy, 2009). Die Anzahl der ruhenden und somit zur Verfügung stehenden Follikel im Ovar nimmt also aufgrund der kontinuierlichen Follikelrekrutierung im Laufe des Lebens bis zur Menopause im Alter von etwa 50 Jahren stetig ab (Wallace und Kelsey, 2010).

1.1.3 Corpus luteum

Nach der Ovulation kommt es zur Bildung des *Corpus luteum*. Dieser bildet sich unter anderem aus den verbleibenden Theka- und Granulosazellen. Das *Corpus luteum* stellt eine dynamische endokrine Drüse dar, welche eine entscheidende Rolle während des Menstruationszyklus und der frühen Schwangerschaft einnimmt (Baerwald et al., 2005). Findet keine Befruchtung der Eizelle statt, so entwickelt sich das Corpus luteum zum *Corpus albicans* und bildet sich schließlich zurück (Sawyer, 1995). Kommt es jedoch zu einer Schwangerschaft, so vergrößert sich das *Corpus luteum* und ist zu Beginn der Schwangerschaft hauptsächlich für die Produktion von Progesteron und Östrogenen verantwortlich (Fauser und Van Heusden, 1997). Progesteron und Östrogene stellen die Hauptprodukte des *Corpus luteum* in der Lutealphase dar, deren Ausschüttung durch LH gefördert wird. Durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus kann allerdings eine Minderung des LH- und FSH-Spiegels bewirkt werden. Dies führt zur Rückbildung des *Corpus luteum* und leitet, falls sich keine Schwangerschaft etabliert hat, letztendlich durch einen erneuten Anstieg des FSH-Spiegels eine erneute Rekrutierungswelle von Follikeln ein (Mesen und Young, 2015; Smith und Meidan, 2014; Stouffer et al., 2013).

1.1.4 Granulosazellen

Granulosazellen sind somatische Zellen, die sich um die Oozyte herum anlagern und auf diese Weise mit dieser zunächst den Primordialfollikel bilden. Anfangs liegt lediglich eine einschichtige Granulosazellhülle vor, die sich im Laufe der Follikelentwicklung zu einer festen Struktur aus mehreren Schichten Granulosazellen ausbildet (Buccione et al., 1990). In einem wachsenden Follikel proliferieren die Granulosazellen sehr stark. Die Zahl wächst von ein paar Hundert Zellen auf etwa 60 Millionen in einem präovulatorischen Follikel an (Erickson und Shimasaki, 2001). Durch die Expansion des extrazellulären Raums des primären Follikels bildet sich das flüssigkeitsgefüllte Antrum. In einem antralen Follikel lassen sich die Granulosazellen in zwei große Populationen unterteilen. Zum einen die Kumuluszellen, welche die Oozyte umgeben, und zum anderen die der Follikelwand zugeordneten muralen Granulosazellen. Hierbei haben die äußeren muralen Granulosazellen Kontakt zur Basalmembran des Follikels (Buccione et al., 1990). Die Basalmembran stellt eine spezialisierte Schicht extrazellulärer Matrix dar, die das Innere des Follikels von den Thekazellen trennt. Das Antrum ist mit Follikelflüssigkeit gefüllt, die sich aus Komponenten des Blutkreislaufs und den sezernierten Produkten der somatischen Zellen im Follikel zusammensetzt. Unter anderem finden sich hier Steroide, proteinogene Hormone, Enzyme und Elektrolyte. Die Follikelflüssigkeit bildet die unmittelbare Umgebung für die Oozyte während deren Entwicklung und ermöglicht die Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen des Follikels (Hennet und Combelles, 2012). Die Interaktion zwischen der Keimzelle und den somatischen Granulosazellen bleibt während des Wachstums, der Differenzierung, der Reifung und der Befruchtung der Eizelle bestehen und ist entscheidend für die erfolgreiche Entwicklung dieser (Buccione et al., 1990). Thekazellen bilden unter LH-Stimulation mittels 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase das Testosteron aus dem aus Progesteron synthetisierten Androstendion. Testosteron wird nach passivem Transport in den Granulosazellen unter FSH-Stimulation mittels Aromatase in Östrogen umgewandelt (Gervasio et al., 2014). Granulosazellen, deren Follikel das präovulatorische Stadium erreicht, bilden LH-Rezeptoren aus, die funktional an die Aromatase und die Inhibinsynthese gekoppelt sind. Inhibin ist in der Lage, die Androgenproduktion der Thekazellen zu verstärken. Somit ist das aus den Granulosazellen stammende Inhibin Teil eines parakrinen, die lokale Androgenproduktion verstärkenden Mechanismus in präovulatorischen Follikeln (Hillier et al., 1994). Schließlich bleibt zu erwähnen, dass sich Granulosazellen aufgrund ihrer entscheidenden Rolle im Follikel sehr gut als Modell für die Untersuchung physiologischer oder pathogener Prozesse im humanen Ovar eignen. Sie können relativ leicht während einiger Methoden der assistierten

Reproduktion isoliert werden und ihre Erforschung lässt Einblicke in die Bedingungen und Vorgänge in den Follikeln zu. So konnte gezeigt werden, dass sich Granulosazellen aus gesunden Ovarien von denen aus pathologisch veränderten Ovarien bezüglich ihrer Proliferation und des Auftretens von Zelltod unterscheiden (Das et al., 2008).

1.1.5 Atresie und Zelltod

Im Ovar reifen die Follikel heran, erreichen eventuell das Ovulationsstadium oder werden atretisch. Atresie zeichnet sich durch das Absterben von Follikelzellen aus und bezeichnet den Rückbildungsprozess, den alle Follikel durchlaufen, die das Ovulationsstadium nicht erreichen. Somit ist die Zahl der Follikel, die der Atresie unterliegen, sehr viel höher als die der Follikel, die das Ovulationsstadium erreichen. Atresie führt möglicherweise zur Depletion der Follikelreserve, was im Menschen letztendlich zur Menopause führt (Richardson et al., 1987; Wallace und Kelsey, 2010). Der Vorgang des kontrollierten Zelltods stellt während der Atresie einen entscheidenden Mechanismus dar. Ein Follikel in frühem atretischen Stadium kann nur wenige sterbende Zellen enthalten, während im späteren Verlauf die Granulosazellen und die Oozyte absterben und die Follikelflüssigkeit resorbiert wird (Hennet und Combelles, 2012). Ein atretischer Follikel kann durch morphologische Beobachtungen wie pyknotische Zellkerne oder eine reduzierte Anzahl der mitotischen Zellkerne beschrieben werden. Somit scheint ein enger Zusammenhang zwischen dem Zelltod der Granulosazellen und dem Vorgang der Atresie zu bestehen (Irving-Rodgers et al., 2001). Apoptose nimmt eine wichtige Rolle während des Vorgangs der Atresie ein (Hughes und Gorospe, 1991; Matsuda-Minehata et al., 2006). Diese regulierte Form des Zelltods ist essentiell für die Eliminierung von Zellen, die nicht länger benötigt werden, beziehungsweise beschädigt oder schädlich für den Organismus sind (Schwartzman und Cidlowski, 1993). Somit ist die Apoptose ein Mechanismus, der zur Aufrechterhaltung der Homöostase in einem Gewebe unerlässlich ist. Neben der Atresie spielt der programmierte Zelltod auch eine wichtige Rolle in einer ganzen Reihe von weiteren physiologischen, aber auch pathologischen Vorgängen (Schwartzman und Cidlowski, 1993). Obwohl die genauen Stimuli, Rezeptoren und Signalwege, welche die Granulosazellen zum regulierten Zelltod bewegen, noch unbekannt sind, konnten schon einige involvierte Moleküle identifiziert werden. So scheinen zum einen für das Überleben des Follikels notwendige Faktoren wie zum Beispiel FSH, IGF-1 (insulin like growth factor-1), Interleukin 1 β (IL-1 β) oder EGF, aber auch atretogene Faktoren wie Inhibin, TNF- α (tumor necrosis factor α) oder Caspase hierbei von Bedeutung zu sein (Hussein, 2005). Allerdings spielt nicht nur die Apoptose, sondern auch andere Arten des Zelltods während der Atresie eine Rolle. So konnten

in der Maus nicht-apoptotische Mechanismen nachgewiesen werden, die für die Atresie von Primordialfollikeln verantwortlich sind (Tingen et al., 2009). Ebenso ist bekannt, dass neben der Apoptose in großen Follikeln auch Formen von Autophagie, Kornifizierung und Nekrose auftreten können (Bulling et al., 2000; Hatzirodos et al., 2014; Rodgers und Irving-Rodgers, 2010; Saller et al., 2010; Van Wezel et al., 1999; Zhu et al., 2012).

Für lange Zeit wurde angenommen, dass Apoptose die einzige Art des regulierten Zelltods ist, die nicht nur bei der Aufrechterhaltung der Homöostase in einem Gewebe, sondern auch bei anderen physiologischen und pathologischen Vorgängen eine entscheidende Rolle spielt. Nekrose hingegen wurde als unregulierte Form des Zelltods angesehen, welche keinerlei Kontrolle unterliegt. Diese Sichtweise hat sich mittlerweile gewandelt, und es sind zahlreiche unterschiedliche morphologische und biochemische Formen des regulierten Zelltods bekannt (Galluzzi et al., 2012; Vandenabeele et al., 2010). Die regulierte Nekrose zum Beispiel, auch Nekroptose genannt, spielt bei einer stetig wachsenden Anzahl von Krankheiten eine Rolle. Beispiele hierzu sind ischämische Schädigungen bei Myokardinfarkten, Reperfusionschäden, Arteriosklerose, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, Pankreatitis, Neurodegeneration oder virale Infektionen (Galluzzi et al., 2014; Galluzzi et al., 2012; Giampietri et al., 2014; Linkermann und Green, 2014; Vanden Berghe et al., 2014; Wu et al., 2012). Nekroptose (Abb. 2) kann unter anderem durch Todesrezeptoren wie zum Beispiel den TNF- α -Rezeptor 1 oder den TLR (toll-like receptor), durch Interferonrezeptoren und die Aktivierung der Proteinkinase R (PKR) oder durch den DNA-Rezeptor DAI (DNA dependend activator of interferon regulatory factors) induziert werden (Holler et al., 2000; Kim et al., 2001; Linkermann und Green, 2014; Vanlangenakker et al., 2012).

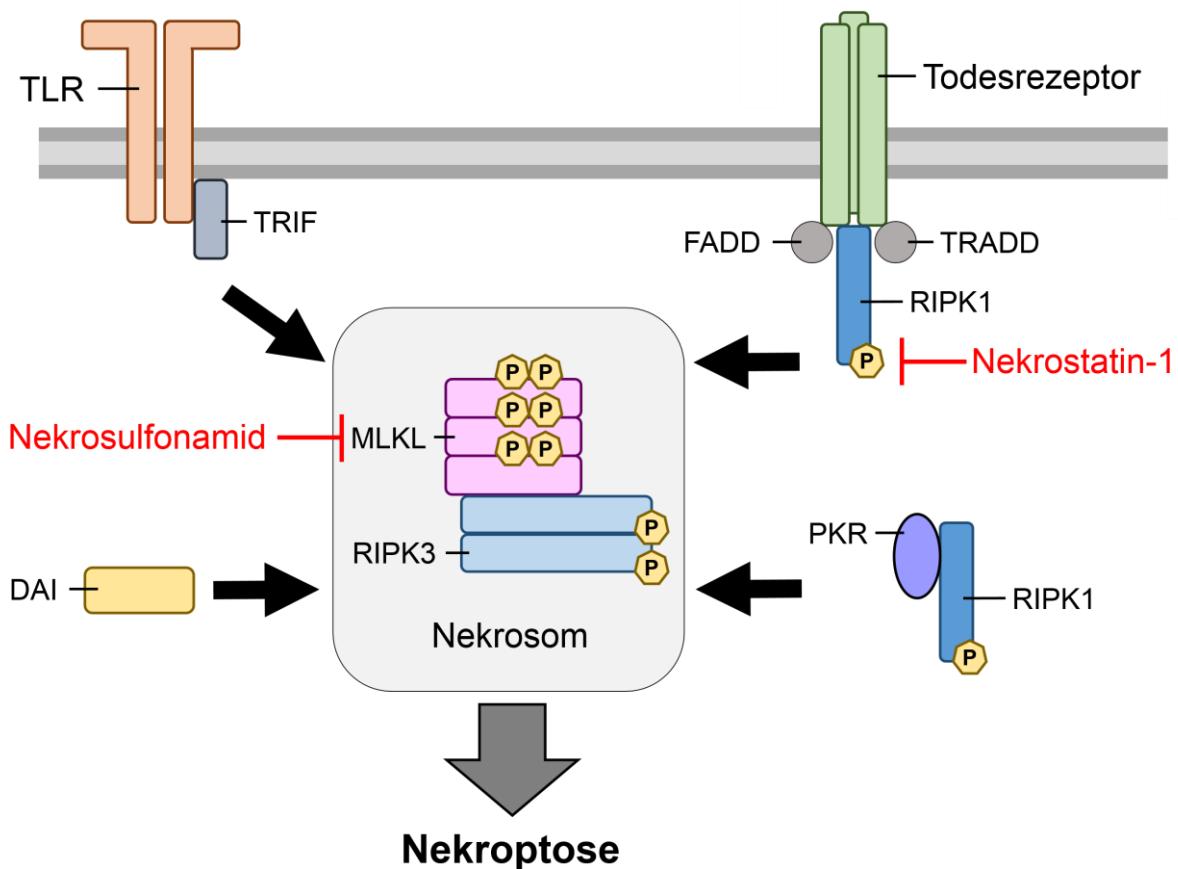


Abbildung 2: Schematische Darstellung der möglichen Aktivierungswege des Nekrosoms. Der supramolekulare, Nekroptose induzierende Komplex, auch Nekrosome genannt, kann durch verschiedene Stimuli aktiviert werden. Die intrazellulären Adaptermoleküle FADD (Fas-associated death domain) und TRADD (TNF-receptor-associated death domain) rekrutieren RIPK1 (receptor-interacting protein kinase 1), welche eine Reihe von Ubiquitinierungen, Deubiquitinierungen und Phosphorylierungen (P) durchläuft, um letztendlich RIPK3 zu rekrutieren. RIPK1, RIPK3 und MLKL (mixed lineage kinase domain like) werden während der Nekrosombildung phosphoryliert. TRIF (toll-interleukin-1 receptor (TIR)-domain-containing adapter-inducing interferon-β), ein intrazelluläres Signalmolekül, ist in der Lage, nach TLR (toll-like receptor)-Aktivierung die Nekrosombildung zu induzieren. DAI (DNA-dependent activator of interferon regulatory factors), ein intrazellulärer Sensor für virale RNA, ist ebenfalls in der Lage, die Nekrosombildung zu aktivieren. Auch durch die verstärkte Synthese von PKR (protein kinase R) aufgrund einer viralen Infektion kann es zur Nekrosomaktivierung kommen. PKR kann FADD phosphorylieren, welches direkt mit RIPK1 interagiert. Der Nekroptoseinhibitor Nekrostatin-1 richtet sich gegen RIPK1, während Nekrosulfonamid sich gegen MLKL richtet und so die Nekrosomaktivierung hemmt (Linkermann und Green, 2014).

Bei der Initierung der Nekroptose kommt es zur Aktivierung von RIPK1 und RIPK3 (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1/3) und der Bildung des Nekrosoms. Im weiteren Verlauf kommt es zur Phosphorylierung der Pseudokinase MLKL (mixed lineage kinase domain like) durch RIPK3. In einer aktuellen Studie konnte in humanem, medikamentös geschädigtem Lebergewebe phosphorylierte MLKL (p-MLKL) unter Verwendung eines

monoklonalen Antikörpers nachgewiesen werden (Wang et al., 2014a). Durch die Oligomerbildung von MLKL kann sich dieses in die Membran der Zelle und Zellorganellen einlagern, woraufhin es zu einem Anschwellen der Zelle und letztendlich zum Aufbrechen der Plasmamembran und der Organellen kommt (McCall, 2010). Nekroptose kann spezifisch durch Nekrostatin-1 und dessen Derivate und durch Nekrosulfonamid inhibiert werden. Dies stellt einen möglichen klinischen Ansatz dar, um Zellschädigungen während eines Krankheitsverlaufes zu unterbinden. Die Frage, ob Nekroptose auch bei physiologischen Vorgängen eine Rolle spielt, ist noch nicht eindeutig geklärt. (Linkermann und Green, 2014). In Bezug auf das Ovar ist die morphologische Beobachtung von nekrotischen Granulosazellen und eingewanderten Makrophagen in den Follikeln (Rodgers und Irving-Rodgers, 2010) ein starker Hinweis darauf, dass sich hier nekrotische Prozesse und womöglich auch Nekroptose abspielen (Brouckaert et al., 2004; Galluzzi et al., 2014; Galluzzi et al., 2012; Giampietri et al., 2014; Linkermann und Green, 2014; Vanden Berghe et al., 2014; Wu et al., 2012).

1.2 Acetylcholinesterase und Acetylcholin

1.2.1 Das nicht-neuronale cholinerge System des ovariellen Follikels

Das Schicksal der Follikel im Ovar wird durch sowohl systemische als auch lokale Signalmoleküle wie Hormone oder Wachstumsfaktoren bestimmt (Matsuda et al., 2012; Richardson et al., 1987). Auch Neurotransmitter wie Katecholamine und Neuropeptide sind an der Regulierung der Follikelentwicklung beteiligt (Lara et al., 2001; Mayerhofer et al., 1997; Mayerhofer et al., 1998). So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Noradrenalin und Dopamin in Granulosazellen zu einer verstärkten ROS (reactive oxygen species)-Bildung führen (Saller et al., 2014; Saller et al., 2012). Acetylcholin (ACh) nimmt unter diesen Faktoren eine besondere Rolle ein, da es im Ovar von Granulosazellen, dem zellulären Hauptbestandteil des Follikels, synthetisiert wird. In Granulosazellen des Menschen und der Ratte konnten das ACh-synthetisierende Enzym Cholinacetyltransferase (ChAT) sowie von Granulosazellen stammendes ACh nachgewiesen werden. Die Expression des vesikulären ACh-Transporters (VACHT) konnte ebenfalls in humanen Granulosazellen gezeigt werden (Fritz et al., 1999; Fritz et al., 2001; Mayerhofer et al., 2006). Somit stellen Granulosazellen für den Follikel eine lokale Quelle für ACh dar. Um Einfluss auf das Geschehen im Follikel nehmen zu können, müssen aber auch ACh-Rezeptoren vorhanden sein, die aufgrund der labilen Natur des ACh auch in unmittelbarer Umgebung der ACh-Sekretion zu finden sein müssen. Es gibt im Falle der Granulosazellen einige Hinweise auf das Vorhandensein nikotinischer ACh Rezeptoren (Sanders et al., 2002); funktionale muskarinische ACh-Rezeptoren konnten jedoch schon in

Granulosazellen nachgewiesen werden. Der muskarinische M3-Rezeptortyp wird in Oozyten exprimiert, während der M1- und M5-Rezeptor in Granulosazellen gefunden werden kann (Fritz et al., 1999; Fritz et al., 2001). Das cholinerge System des Ovars (Abb. 3), welches auch muskarinische Rezeptoren mit einschließt, ist Teil eines weitgreifenden Systems von nicht-neuronaler Acetylcholinproduktion und lokaler Acetylcholinwirkung (Mayerhofer et al., 2003; Mayerhofer und Kunz, 2005).

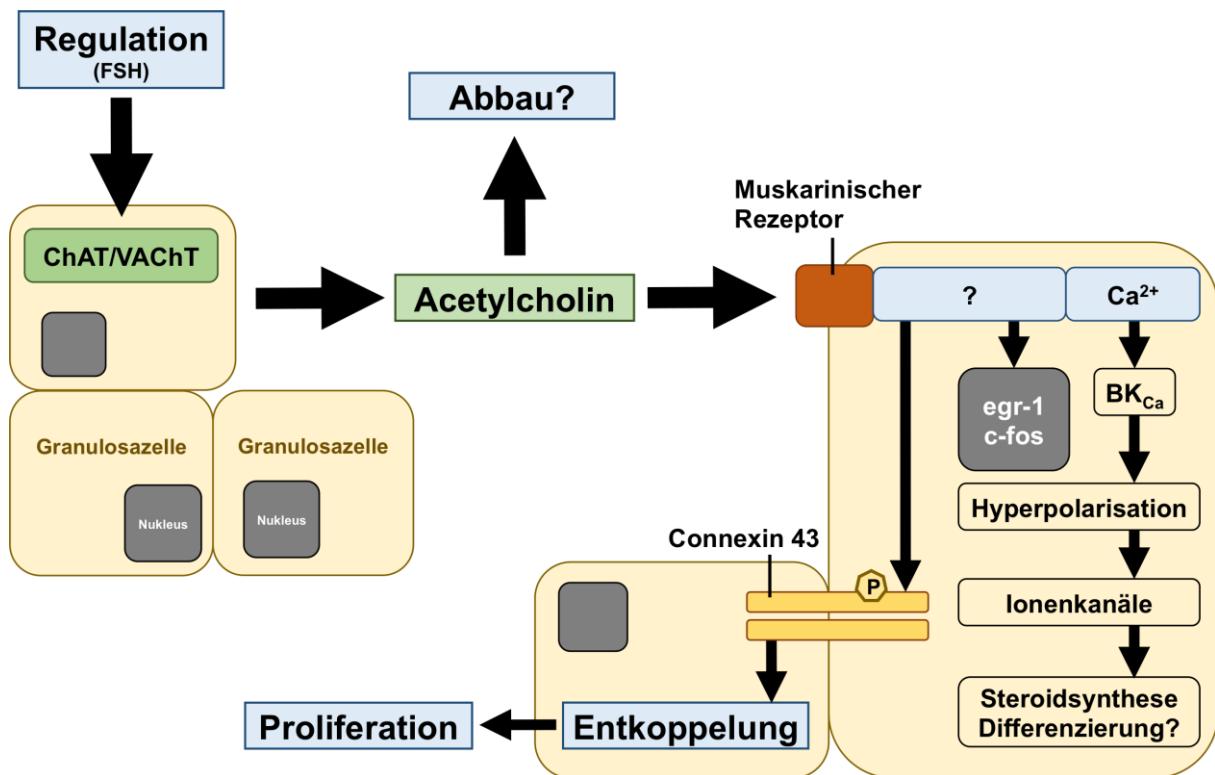


Abbildung 3: Schematische Darstellung des ovariellen nicht-neuronalen cholinergen Systems. Acetylcholin wird durch Cholinacetyltransferase (ChAT) in den Granulosazellen synthetisiert. Der vesikuläre Acetylcholintransporter VACHT ermöglicht den Granulosazellen die vesikuläre Sekretion des Acetylcholins. Über muskarinische M1/M5-Rezeptoren der Granulosazellen kann es nahe seines Syntheseortes wirken und es kommt zu einem intrazellulären Anstieg des Ca²⁺ Spiegels. Dies kann zu einer Aktivierung der Ca²⁺ abhängigen BK_{Ca} Kanäle führen und schließlich das Membranpotential und weitere spanungsabhängige Kanäle beeinflussen. Ebenso führt die Aktivierung der muskarinischen Rezeptoren zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren egr-1 und c-fos. Eine verstärkte Phosphorylierung (P) des Gap Junction Proteins Connexin 43 führt zu einer Verminderung der Kommunikation zwischen den Zellen, was wiederum zu einer vermehrten Zellproliferation führen kann. Wie die Synthese und Speicherung sowie der Abbau des Acetylcholins reguliert werden, ist noch nicht eindeutig geklärt. Allerdings konnte FSH als ein Fördernder Faktor identifiziert werden. Sowohl die Präsenz weiterer Acetylcholinrezeptoren als auch die Wirkung des Systems auf die Oozyte konnten noch nicht gezeigt werden (Mayerhofer und Kunz, 2005).

Nicht-neuronale cholinerge Systeme liegen nicht nur im Ovar vor, sondern finden sich auch in anderen Organen und sind vor allem mit Fokus auf das Immunsystem Gegenstand der

Forschung (Kawashima und Fujii, 2008; Rosas-Ballina et al., 2008; Rosas-Ballina et al., 2011). Die Bedeutung des cholinergen Systems des Ovars ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. In früheren Studien konnte ein trophischer, wachstumsfördernder Effekt von ACh auf bovine und humane Granulosazellen festgestellt werden (Al-Zi'abi et al., 2009; Mayerhofer und Fritz, 2002; Mayerhofer und Kunz, 2005). ACh bewirkt über die muskarinischen M1/M5-Rezeptoren der humanen Granulosazellen eine rapide Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels (Fritz et al., 1999; Mayerhofer et al., 1992). Ähnliche Effekte konnten auch schon in anderen Spezies beobachtet werden (Morley et al., 1992). Aufgrund der Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels in den Granulosazellen öffnen sich Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle (BK_{Ca}). Es war möglich, verschiedene spannungsabhängige K^+ -, Ca^{2+} - und Na^+ -Kanäle in Granulosazellen nachzuweisen (Agoston et al., 2004; Bulling et al., 2000; Kunz et al., 2006; Kunz et al., 2002; Mayerhofer und Kunz, 2005). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der cholinerge Agonist Carbachol den in humanen Granulosazellen exprimierten Kaliumkanal Kv7.1 reversibel hemmt. Durch eine Blockierung dieses Kanals mit einem selektiven Blocker konnte in humanen Granulosazellen eine verminderte Gonadotropin-abhängige Steroidproduktion und eine verstärkte Proliferation erreicht werden (Kunz et al., 2007). Ein weiterer ACh-Effekt bezieht sich auf die Regulierung der Gap Junctions der Granulosazellen. In einem wachsenden Follikel weisen Granulosazellen typischerweise eine starke Koppelung mittels Gap Junctions auf (Fritz et al., 2002). Sie können stark proliferieren, obwohl die Verknüpfung von Zellen über Gap Junctions eigentlich negativ zur Proliferationsrate korreliert (Stout et al., 2004). Die Tatsache, dass ACh in Granulosazellen zu einer verminderten Kommunikation per Gap Junctions führt, könnte diese Diskrepanz erklären. Eine Phosphorylierung des Gap Junction Moleküls Connexin 43, welches in Granulosazellen das am häufigsten vorkommende Molekül dieser Klasse darstellt, könnte für die durch ACh hervorgerufene Hemmung der interzellulären Kommunikation verantwortlich sein. Durch diese Blockierung der Vernetzung der Granulosazellen und das daraus resultierende Entkoppeln der Zellen könnte ACh eine proliferative Wirkung auf Granulosazellen besitzen. Neben dieser proliferativen Wirkung konnte nach der Behandlung mit Carbachol auch eine verstärkte Expression des Mastertranskriptionsfaktors egr-1 (early growth related factor-1) und c-fos beobachtet werden (Fritz et al., 2002). Ersteres könnte für die durch LH induzierte Reprogrammierung der Follikelzellen von Bedeutung sein (Espey et al., 2000). Die Details der Bedeutung dieser Beobachtungen sind allerdings noch unklar (Mayerhofer und Kunz, 2005). Der Mastertranskriptionsfaktor egr-1 konnte in der Maus als ein für die Ovulation entscheidendes Element identifiziert werden. So wurde unter anderem gezeigt, dass egr-1 über den MAPK3/1

(mitogen-activated protein kinase 3/1)-Signalweg reguliert werden kann und an den Promotor der auch für die Ovulation wichtigen Cyclooxygenase-2 bindet (Siddappa et al., 2015). In einer weiteren Arbeit mit humanem Material konnte gezeigt werden, dass FSH, die treibende Kraft hinter dem Follikelwachstum, die ACh-Produktion fördert. Da ACh Einfluss auf Proliferation und Differenzierung der Granulosazellen nimmt, könnte ACh im wachsenden Follikel durchaus Effekte haben, die eigentlich FSH zugeschrieben werden (Mayerhofer et al., 2006). Aufgrund dieser wichtigen trophischen Funktion des ACh sollten dessen Wirkung räumlich und zeitlich begrenzt sein. Die beiden aus dem Nervensystem bekannten Esterasen Acetylcholinesterase (AChE) und Butyrylcholinesterase (BChE) können ACh spalten und somit inaktivieren. BChE konnte in früheren Proteomik-Studien schon als Komponente der Follikelflüssigkeit identifiziert werden (Ambekar et al., 2013; Twigt et al., 2012), während über die ovarielle AChE bisher nur wenig bekannt ist. Immunhistochemische Studien lassen jedoch vermuten, dass AChE in einigen Spezies von Granulosazellen exprimiert wird (Silver, 1978).

1.2.2 Acetylcholinesterase

Die AChE ist ein Enzym, dessen Hauptaufgabe die Hydrolyse des Neurotransmitters ACh zu Essigsäure und Cholin ist. Als eines der schnellsten Enzyme in der Natur wird die Rate, in der ACh umgesetzt wird, allein durch die Diffusion begrenzt. Dies macht die AChE zu einem fast perfekten Terminator von ACh-vermittelten Wirkungen (Ramos und Techert, 2005). Vor allem an den Synapsen des Nervensystems kommt der AChE eine entscheidende Rolle zu. Hier reduziert sie die Aktionsdauer des ACh und ermöglicht hierdurch erst eine geregelte Funktionalität der Synapse (Bernard et al., 2011). Interessanterweise werden AChE-Knock-out-Mäuse lebend geboren und können trotz verlangsamter Entwicklung bis zu 21 Tage überleben. Wahrscheinlich können andere Enzyme, wie die BChE, das Schwesterenzym der AChE, teilweise das Fehlen der AChE kompensieren (Xie et al., 2000). Diesen Schluss lässt auch eine weitere Studie mit einem BChE-defizienten Mausmodell zu (Duyzen et al., 2007). Während AChE eine hohe Spezifität für ACh aufweist, kann BChE sowohl ACh, wenn auch nicht so effizient, als auch eine Reihe weiterer Cholinester und Nicht-Cholinester hydrolysieren. Die Rolle der BChE für den humanen Organismus ist zwar noch nicht eindeutig geklärt, es wird aber angenommen, dass sie zum einen den Abbau von ACh um dessen Wirkung außerhalb des synaptischen Spalts wie zum Beispiel im Blutkreislauf eindämmen soll und zum anderen dem Abbau schädlicher Faktoren dient (Darvesh et al., 2003).

Die AChE-Expression scheint in Zusammenhang mit der Veränderung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels zu stehen (Jiang und Zhang, 2008), während das Spleißen der AChE unter anderem

unter dem Einfluss von Glukokortikoiden, NGF (nerve growth factor) und Östrogenen steht (Soreq und Seidman, 2001). Es sind mehrere Spleißvarianten der AChE (Abb. 4) bekannt, welche sich in ihrer Löslichkeit und subzellulären Lokalisation unterscheiden können (Gilboa-Geffen et al., 2007; Meshorer und Soreq, 2006).

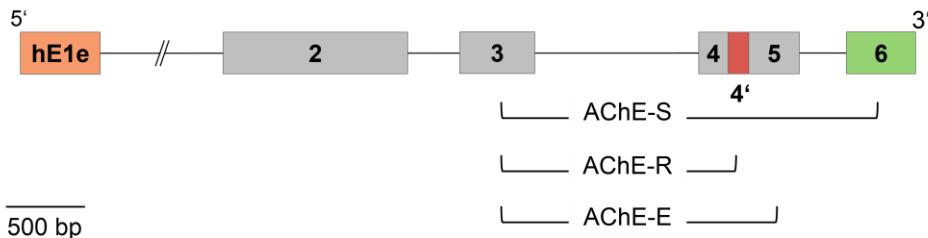
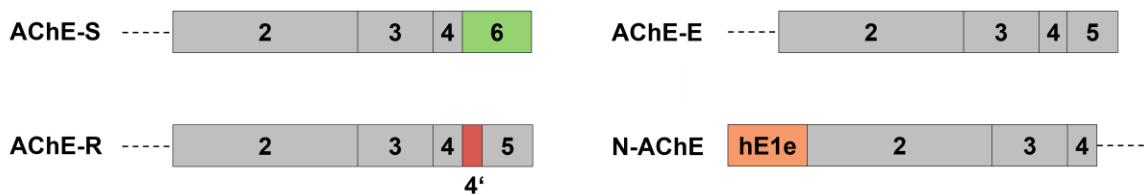
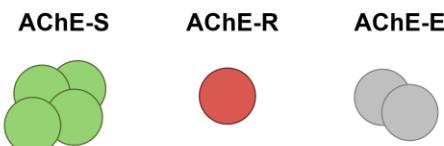
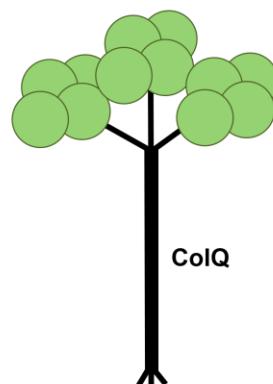
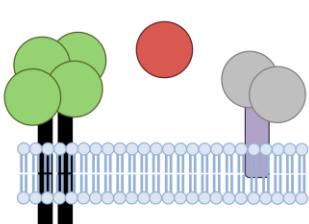
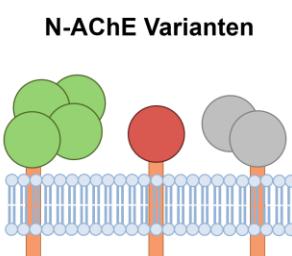
A**B****C****D****E****F**

Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der AChE-Genstruktur, der alternativen Transkripte und der Proteinprodukte. (A) Struktur des humanen AChE-Gens. Die Exons hE1e, 2 bis 6 und das Pseudoexon 4' sind als Rechtecke, die Introns als Linie dargestellt. Die Klammern markieren den Bereich des analysierten PCR-Produkts. (B) Darstellung der möglichen AChE-Spleißvarianten AChE-S, AChE-R, AChE-E und der N-terminal verlängerten N-AChE. (C) Die Proteinprodukte der Varianten AChE-S, AChE-E und AChE-R. Dargestellt sind die tetramere AChE-S, die monomere AChE-R und die dimere Form der AChE-E. (D) Bis zu drei Tetramere der AChE-S können über einen ColQ-Triplett-Strang an extrazelluläre Matrix gebunden werden. (E) Schematische

Darstellung der AChE-S als Teramer, welches per PRiMA (schwarz) an die Zellmembran gebunden sein kann. Die AChE-R liegt als lösliches Monomer vor und AChE-E kann mittels GPI-Anker (violett) an die Membran gebunden sein. (F) Darstellung der entsprechenden Varianten der N-AChE (N-AChE-S, N-AChE-R, N-AChE-E), welche möglicherweise durch den verlängerten N-Terminus (orange) an die Plasmamembran gebunden werden können (Legay, 2000; Meshorer und Soreq, 2006; Rotundo, 2003).

Die synaptische AChE-Variante (AChE-S), die „readthrough“-Variante (AChE-R) und die Erythrozyten-Variante (AChE-E) unterscheiden sich jeweils in ihrer C-terminalen Struktur (Karpel et al., 1994). AChE-S wird synthetisiert, indem es unter anderem zu einer Kombination der Exons 4 und 6 kommt. Diese Variante enthält einen Cystein-reichen C-Terminus, der die Bildung von Tetrameren begünstigt (Massoulie et al., 1998). Diese können wiederum mittels ColQ (Collagen Q) an extrazelluläre Matrix oder per PRiMA (prolinerich membrane anchor) an die Plasmamembran gebunden werden. Bis zu drei Tetramere der AChE-S können über einen ColQ-Triplett-Strang an Extrazelluläre Matrix gebunden werden (Bernard et al., 2011; Perrier et al., 2002). Neben der AChE kann ColQ auch BChE an die extrazelluläre Matrix binden, da BChE einen C-Terminus besitzt, welcher dem der AChE-S ähnelt (Massoulie, 2002). Durch die Kombination der Exons 4 und 5 und des Pseudoexons 4' kann es zur Bildung der AChE-R kommen. AChE-R wird häufig mit neurodegenerativen Prozessen und stressassoziierten Funktionsstörungen in Verbindung gebracht. So konnte unter anderem schon eine durch Stress bedingte Erhöhung der mRNA-Konzentration der AChE-R beobachtet werden (Härtl et al., 2011; Kaufer et al., 1998; Meshorer et al., 2002). Ob die erhöhte AChE-R-Synthese auch mit erhöhter AChE-Aktivität im entsprechenden Gewebe korreliert, ist noch nicht eindeutig geklärt (Perrier et al., 2006). Die AChE-R-Variante kommt auch in gesunden Geweben vor (Legay et al., 1995). AChE-R hat im Vergleich zu AChE-S einen kürzeren, nicht Cystein-reichen C-Terminus und kann dadurch keine Multimere bilden. AChE-R liegt folglich als lösliches Monomer vor (Massoulie, 2002). Ebenso unterliegt die Expression der AChE-R der Regulation durch die microRNA (miRNA)-132 (Hanin und Soreq, 2011), welche in boviner und humaner Follikelflüssigkeit wachsender Follikel nachgewiesen werden konnte (Sang et al., 2013; Sohel et al., 2013).

Die Kombination der Exons 4 und 5 ist spezifisch für die AChE-E-Variante. Diese im Blut vorkommende Variante kann in Dimeren mittels eines Glykophosphatidylinositol (GPI)-Ankerproteins an die Plasmamembran gebunden werden (Legay et al., 1993; Massoulie et al., 1998).

Neben den oben genannten Varianten, die sich im C-Terminus unterscheiden, gibt es auch N-terminale Varianten. So konnten beim Menschen drei alternative 5'-Exons identifiziert werden,

wovon aber lediglich eines (hE1e) in einem N-terminal-verlängerten Protein (N-AChE) resultiert, während die anderen beiden nicht translatiert werden. Theoretisch könnten die Varianten N-AChE-S, N-AChE-R oder N-AChE-E existieren. Vermutlich verhindert die N-terminale Modifikation die Abspaltung des Signalpeptids der AChE und es kommt zu einer permanenten Bindung an die Plasmamembran. Der modifizierte N-Terminus könnte somit als Membrananker dienen (Meshorer et al., 2004).

Die enzymatische Aktivität der AChE kann durch Inhibitoren pharmakologisch gehemmt werden. Ein Beispiel hierfür stellt Huperzin A (HupA) dar, welches zu einer reversiblen Hemmung der AChE-Aktivität führt (Ashani et al., 1992). HupA wird unter anderem bereits in der Alzheimertherapie eingesetzt (Yang et al., 2013a).

1.2.3 Nicht-enzymatische Funktionen der AChE

Neben der klassischen enzymatischen Aktivität besitzt AChE auch weitere nicht-enzymatische Funktionen (Cousin et al., 2005; Soreq und Seidman, 2001). So gibt es zum Beispiel Hinweise darauf, dass AChE über nicht-enzymatische Mechanismen Einfluss auf die Neuritenbildung nehmen kann (Layer et al., 1993). Des Weiteren könnte AChE-S und AChE-R auch im Bereich der Zell-Adhäsion eine Rolle spielen (Darboux et al., 1996; Grifman et al., 1998). Zu weiteren potentiellen Wirkungsbereichen für AChE zählen zum Beispiel auch die Hämatopoese und Synaptogenese (Soreq und Seidman, 2001). Als lösliches Monomer stellt speziell die AChE-R-Variante in Bezug auf Wirkungen jenseits der klassischen ACh-Hydrolyse ein interessantes Forschungsfeld dar. So konnte der AChE-R in Bezug auf die β -Amyloid-Pathologie der Alzheimer-Krankheit ein neuroprotektiver Effekt zugeschrieben werden (Berson et al., 2008). AChE-R unterscheidet sich durch ihren C-Terminus von den anderen AChE-Varianten (Meshorer und Soreq, 2006). Diese für die AChE-R spezifische Aminosäuresequenz wird als AChE-R-spezifisches Peptid (ARP) bezeichnet. Dieses 26 Aminosäuren lange Peptid scheint in verschiedensten Geweben eine Rolle zu spielen (Dori und Soreq, 2006). So konnte dieses Peptid zum Beispiel als ein Migrationsfaktor für Radialgliazellen (Dori et al., 2005) oder als hämatopoetischer Wachstumfaktor identifiziert werden (Deutsch et al., 2002). Es gibt auch Hinweise darauf, dass ARP in die Proliferationsregulierung des Myometriums eingreift (Grisaru et al., 2007). Mittels immunologischer Studien konnte gezeigt werden, dass ARP im Gegensatz zu seinem entsprechenden Gegenstück, dem C-Terminus der AChE-S, vom AChE-Kernprotein abgespalten werden kann und die ARP-Sequenz über die Speziesgrenze hinweg konserviert ist (Dori und Soreq, 2006). Die ARP-Abspaltung kann bei Stress verstärkt auftreten (Grisaru et al., 2001). So konnte in einer Studie mittels einer Injektion von bakteriellen

Lipopolsacchariden beim Menschen eine erhöhte ARP-Konzentration im Plasma festgestellt werden (Cohen et al., 2003). Über welche Mechanismen ARP jedoch seine Wirkung entfaltet, ist noch nicht vollständig geklärt. Es ist bisher bekannt, dass das Gerüstprotein RACK1 (receptors for activated C kinase) als potentieller Bindungspartner für ARP in Frage kommt (Dori und Soreq, 2006). RACK1 stellt einen Rezeptor für aktivierte Proteinkinase C II β dar und bestimmt dessen Lokalisierung und funktionelle Aktivität (Ron et al., 1999). Aufgrund der zahlreichen Studien, welche sich mit AChE beschäftigen, lässt sich feststellen, dass die AChE ein äußerst facettenreiches Protein darstellt, welches sowohl enzymatische als auch nicht-enzymatische Funktionen in sich vereint (Layer et al., 2013).

1.3 Polyzystisches Ovar-Syndrom

Das Polyzystische Ovar-Syndrom (PCOS) ist einer der häufigsten Gründe für eine Infertilität bei Frauen und betrifft 5 bis 10 % der Frauen im reproduktionsfähigen Alter (Azziz et al., 2004; Knochenhauer et al., 1998; Solomon, 1999). PCOS zeichnet sich hauptsächlich durch klinische und/oder biochemische Anzeichen von Hyperandrogenismus, polyzystische Ovarien und Oligo- oder Anovulation aus. Treffen zwei dieser drei Kriterien zu, so kann von PCOS gesprochen werden. Zusätzlich müssen andere Krankheitsursachen, wie zum Beispiel Androgen-sezernierende Tumore oder das Cushing-Syndrom, ausgeschlossen werden. Es gibt für PCOS kein einzelnes eindeutiges Kriterium, auf dem eine Diagnose beruhen kann. Auch Menstruationsstörungen, Zeichen des Androgen-Überschusses und Übergewicht können das klinische Erscheinungsbild begleiten (Rotterdam, 2004). PCOS steht außerdem im Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für Typ-2-Diabetes (Ehrmann et al., 1999; Legro et al., 1999). Die ersten Symptome des PCOS treten für gewöhnlich mit der Menarche auf (Franks, 2002). In einem PCOS-Ovar kommt es verstärkt zu einem Entwicklungsarrest der frühen antralen Follikel (Adams et al., 1985; Pache et al., 1992). Die Anzahl der Primordialfollikel ist mit der von gesunden Ovarien vergleichbar. Allerdings ist die Zahl der heranwachsenden und der atretischen Follikel erhöht (Hughesdon, 1982; Webber et al., 2003). PCOS ist eine komplexe Krankheit mit unbekannten Ursachen und unterschiedlichsten Ausprägungen (Jansen et al., 2004).

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Thekazellen von PCOS-Patientinnen effektiver in der Testosteronsynthese arbeiten als gesunde Thekazellen (Nelson et al., 1999; Nelson et al., 2001). LH reguliert die Androgenproduktion der Thekazellen, während FSH für die Aromataseaktivität der Granulosazellen und deren Östrogenproduktion verantwortlich ist. Steigt nun die LH-Konzentration relativ zu der des FSH an, so werden in den betroffenen

Follikeln bevorzugt Androgene gebildet (Ehrmann, 2005). Untersuchungen bezüglich des veränderten Genexpressionsprofils in PCOS-Ovarien konnten zeigen, dass die Veränderungen in einem PCOS-Ovar denen von Androgen-behandelten Ovarien ähneln. Dies weist auf die wichtige Rolle der Androgene in der Pathologie von PCOS hin (Jansen et al., 2004). Man vermutet, dass die erhöhten Androgenspiegel im Ovar einen negativen Einfluss auf die Follikulogenese haben. Diese könnten in Verbindung mit LH-Hypersekretion zum einen zur Stagnation der Follikelwachstums in den frühen Entwicklungsstufen (früher antraler Follikel) und zum anderen zu einer Störung in der Entwicklung der dominanten Follikel führen. Diese Vorgänge können zu chronischer Anovulation und letztendlich zu Infertilität führen (Gervasio et al., 2014).

Obwohl es Hinweise auf genetische Ursachen für PCOS gibt (Ehrmann, 2005), sind auch umweltbedingte Faktoren von Bedeutung. Dies schließt diverse Formen von Stress mit ein, welche mit erhöhten Konzentrationen von Stresshormonen und der Aktivierung des sympathischen Nervensystems in Verbindung stehen (Greiner et al., 2005; Manni et al., 2005; Stener-Victorin et al., 2008; Sverrisdottir et al., 2008). So konnte zum Beispiel beschrieben werden, dass Stress in PCOS-Patientinnen andere Auswirkungen hat als in gesunden Patientinnen. So waren unter anderem die Cortisol-Stressreaktion und die Herzfrequenz in der PCOS-Gruppe erhöht (Benson et al., 2009). Diese veränderten Reaktionen könnten sich auch auf das Ovar auswirken und das erhöhte Vorkommen von ROS könnte eine mögliche Auswirkung bei PCOS-Patientinnen darstellen (Chattopadhyay et al., 2010; Fenkci et al., 2003; Gonzalez et al., 2006; Sabuncu et al., 2001).

Auch neuronale Faktoren spielen während der Entwicklung des PCOS-Phänotyps eine Rolle (Lara et al., 1993). So konnte zum Beispiel mittels eines PCOS-Modells in Ratten gezeigt werden, dass es unter PCOS-Bedingungen zu einer verstärkten Bildung von NGF und einer Hyperaktivierung der ovariellen sympathischen Nerven kommt. Dies könnte auch beim Menschen zur Ausbildung des PCOS-Phänotyps beitragen (Lara et al., 2000). Ebenso konnte eine erhöhte Konzentration von Dopamin in der Follikelflüssigkeit und ein veränderter Dopamin-Metabolismus der Granulosazellen von PCOS-Patientinnen nachgewiesen werden. Dopamin führte in PCOS-Granulosazellen zu einer übermäßigen ROS-Produktion und einem vermehrten Auftreten von Apoptose. Diese Beobachtungen könnten die Fehlregulation des Ovars bei PCOS begünstigen (Saller et al., 2014). In Bezug auf ACh ist zu erwähnen, dass es Hinweise auf veränderte ACh-abhängige mikrovaskuläre Vorgänge in unterschiedlichen Gruppen von PCOS-Patientinnen gibt (Ketel et al., 2008). Einen therapeutischen Ansatz für PCOS stellt die In-vitro-Fertilisation (IVF) dar.

1.4 Assistierte Reproduktion

Die Schwangerschaftswahrscheinlichkeit bei gesunden jungen Paaren beträgt 20 bis 25 % je reproduktivem Zyklus und etwa 90 % über ein Jahr gerechnet. Kommt es nach einem Jahr ungeschütztem Verkehr nicht zu einer Schwangerschaft, so lässt sich von einem Infertilitätsproblem sprechen. Infertilität betrifft in etwa 10 % aller Paare (Gnoth et al., 2003; Gnoth et al., 2005). Ein wichtiger Faktor hierbei ist das Alter der Frau. Mit zunehmenden Alter der Frau sinkt die Fertilität (Van Voorhis, 2007). Diese Tatsache ist zunehmend von Bedeutung, da das Alter der gebärenden Frauen stetig ansteigt (Hamilton und Ventura, 2006). IVF ist ungeachtet der Gründe für Infertilität die Behandlung, welche zur höchsten Schwangerschaftsrate pro reproduktivem Zyklus führt (Van Voorhis, 2007). Der Prozess der IVF wurde 1978 zum erstem Mal durchgeführt (Steptoe und Edwards, 1978) und setzt sich aus der ovariellen Stimulation, der Gewinnung der Eizellen, der Befruchtung, der Kultivierung des Embryos und dem Embryotransfer zusammen. Zunächst werden die Ovarien mittels täglicher Injektion von Gonadotropinen stimuliert, um eine optimale Follikelentwicklung zu gewährleisten, welche unter Verwendung von transvaginaler Ultraschalluntersuchung überwacht wird. Durch die Gonadotropinbehandlung wird das Follikelwachstum gefördert. Nach erfolgreicher Stimulation der Ovarien werden die Eizellen mittels Ultraschall-gestützter, transvaginaler Aspiration der Follikelflüssigkeit entnommen (Van Voorhis, 2007). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der erhaltenen Eizellen einen guten Indikator für die klinische Erfolgswahrscheinlichkeit, in diesem Fall eine Lebendgeburt, darstellt (Sunkara et al., 2011). Die erhaltenen Eizellen werden häufig *in vitro* durch die Zugabe von zahlreichen motilen Spermien befruchtet. Alternativ können die Eizellen auch durch die Injektion eines einzelnen Spermiums (intracytoplasmic sperm injection; ICSI) befruchtet werden. Diese Technik wurde eigentlich für Fälle von Infertilität auf männlicher Seite entwickelt, wird heute aber häufig bei IVF eingesetzt. Nach der Befruchtung werden mehrere Embryos für drei bis fünf Tage kultiviert und nach der Selektion der am besten geeigneten Embryos werden diese in den Uterus transferiert. Wurden mehr qualitativ gute Embryos erzeugt als transferiert werden, werden die übrigen Embryos meist kryokonserviert (Van Voorhis, 2007). Oftmals werden mehr als ein Embryo transferiert, um die Wahrscheinlichkeit einer Schwangerschaft zu erhöhen. Allerdings führt dies auch zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit von Mehrlingsschwangerschaften (Russell et al., 2003). Die Lebendgeburt-Rate bei IVF Behandlungen liegt etwa bei 30 %. Somit ist IVF im Vergleich zu anderen Methoden, wie der künstlichen Insemination, zwar relativ effektiv, die meisten IVF-Zyklen enden jedoch nicht in einer Schwangerschaft (Van Voorhis, 2007).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Viele der Informationen über die Funktionsweise des Ovars stammen aus Studien, die mit Hilfe von Tiermodellen durchgeführt wurden. Die Übertragbarkeit der hierdurch erhaltenen Erkenntnisse auf das humane System muss stets hinterfragt werden. Die Untersuchung von humanem Gewebe stellt sich gegenüber dem Tiermodell als ungleich schwieriger dar, da humanes ovarielles Gewebe der Forschung nur in stark limitierter Zahl Verfügung steht. Hier bietet die assistierte Reproduktion eine Möglichkeit, Einblick in die Biologie und Pathologie des humanen Ovars zu erhalten. Die Untersuchung der Granulosazellen und der Follikelflüssigkeit, welche neben der Oozyte bei Verfahren wie der IVF gewonnen werden, kann Aufschluss über die Funktionsweise von Vorgängen wie zum Beispiel Follikelwachstum oder Atresie geben. Ein zentrales Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation und Funktion des nicht-neuronalen cholinergen Systems des Ovars in Hinblick auf dessen Biologie besser zu begreifen. ACh stellt zunächst ein potentielles Signalmolekül im Ovar und speziell im Follikel und *Corpus luteum* dar. Es scheint in grundlegende Prozesse wie Proliferation und Steroidsynthese involviert zu sein. Wie dessen Wirkung allerdings lokal und temporär eingegrenzt werden kann, war bisher unbekannt. Deshalb sollte zunächst anhand von humanen Gewebeschnitten des Ovars, Follikelflüssigkeit und des Granulosazell-Modells die Frage geklärt werden, ob ein ACh-abbauendes Enzym wie die AChE in diesem System, auch auf Hinblick auf pathologische Umstände wie PCOS, eine Rolle spielt. Neben dem Nachweis der AChE-Aktivität konnte auch eine nicht-enzymatische Funktion einer AChE-Variante beobachtet werden. Unter Verwendung eines für diese Variante spezifischen Peptids sollte dessen Effekte und Wirkmechanismus im Granulosazell-Modell näher untersucht werden. Schließlich sollte neben dem System des Primaten auch das ovariente ACh-System der Ratte Gegenstand dieser Arbeit sein, um die potentiellen Möglichkeiten eines Rattenmodells beurteilen zu können. Ein solches Modell könnte genutzt werden, um Einblicke in die Regulation des ovarienten cholinergen Systems *in vivo* zu erhalten. Die Arbeit mit den Versuchstieren wurde durch eine Kooperation mit der Universität von Chile ermöglicht; die entsprechenden Versuche wurden auch dort durchgeführt. Die gesamte Arbeit wurde im Rahmen eines DFG-Projektes (MA1080/19-1) angefertigt.

2 Ergebnisse

2.1 Acetylcholinesterase als Teil des cholinergen Systems des humanen Ovars

2.1.1 Aktive Acetylcholinesterase in humaner Follikelflüssigkeit

Um das durch AChE regulierte ACh-System des Follikels näher zu beschreiben, wurden Experimente mit humaner Follikelflüssigkeit durchgeführt. Sowohl AChE Aktivität als auch Aktivität des AChE-Schwesterenzyms BChE konnte in humaner Follikelflüssigkeit von 15 IVF-Patientinnen mittels Ellman-Assay nachgewiesen werden (Abb. 5A).

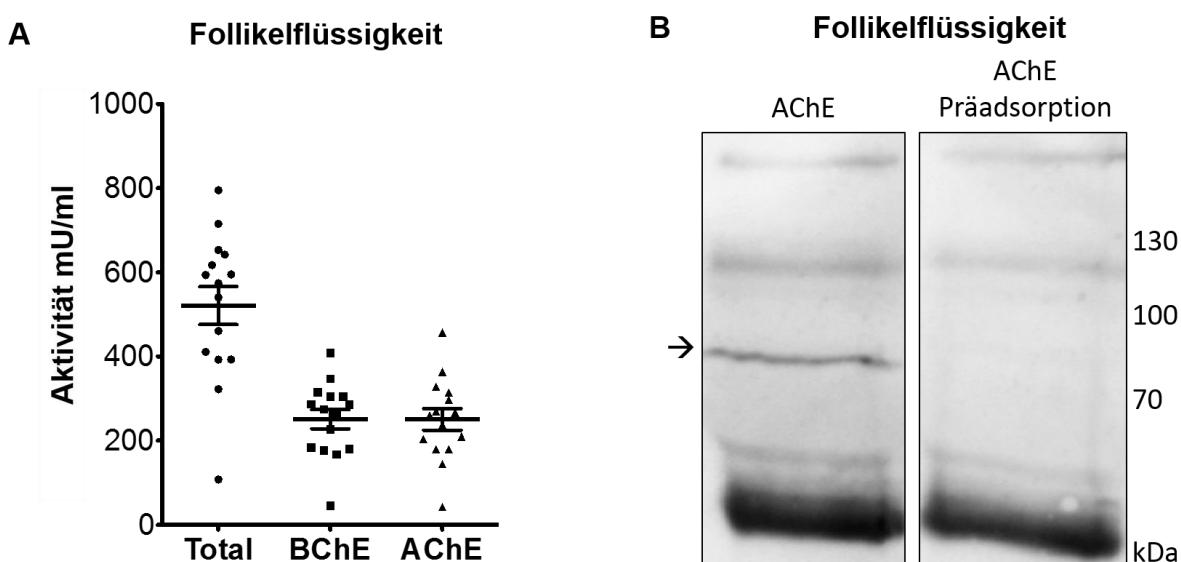


Abbildung 5: Nachweis der AChE in Follikelflüssigkeit von IVF-Patientinnen. (A) Mit dem Ellman-Assay gemessene Gesamt-, AChE- und BChE-Aktivität in humaner Follikelflüssigkeit. Dargestellt sind die individuellen Messwerte und Mittelwerte \pm S.E.M. von $n = 15$ Follikelflüssigkeiten verschiedener Patientinnen (Gesamtaktivität: 521 ± 45 mU/ml; BChE: 251 ± 23 mU/ml; AChE: 251 ± 26 mU/ml). (B) Identifikation des AChE-Proteins in humaner Follikelflüssigkeit mittels eines Western Blot Präadsorptionsexperiments. Der Pfeil zeigt die erwartete Bandenhöhe (82 kDa). Das Präadsorptionsexperiment bestätigt die Identität der Proteinbande.

Auch AChE-Protein konnte in humaner Follikelflüssigkeit von 4 IVF-Patientinnen durch ein Präadsorptionsexperiment im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 5B; 1 Präparation gezeigt). Unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers konnte eine Proteinbande bei der erwarteten Größe von 82 kDa detektiert werden. Wurde der Antikörper vor der Verwendung mit dem entsprechenden Blocking-Peptid inkubiert, trat keine Proteinbande bei 82 kDa auf, was für die korrekte Identität der detektierten Bande spricht.

2.1.2 AChE-Varianten in kultivierten humanen Granulosazellen

Der Frage nach der Quelle der follikulären AChE wurde mit Versuchen an humanen Granulosazellen nachgegangen. Mit Hilfe des Ellman-Assays war es möglich in Lysaten kultivierter humaner Granulosazellen aus 8 unabhängigen Präparationen Cholinesteraseaktivität zu messen (Abb. 6 A). Die enzymatischen Aktivitäten wurden auf den ebenfalls gemessenen Gesamtproteingehalt der jeweiligen Probe normiert. AChE war für den Großteil der gemessenen Aktivität verantwortlich, während nur eine geringe BChE-Aktivität in den Lysaten gemessen werden konnte.

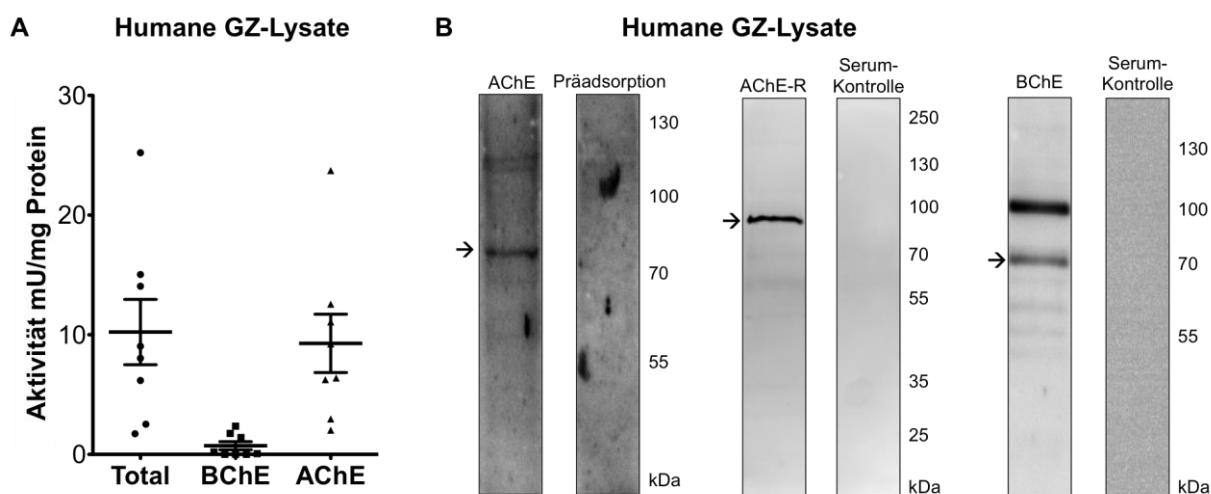


Abbildung 6: AChE und BChE in kultivierten humanen Granulosazellen. (A) Lysate von kultivierten humanen Granulosazellen (GZ) zeigen im Ellman-Assay sowohl AChE als auch geringe BChE Aktivität. Dargestellt sind die auf den Gesamtproteingehalt normierten individuellen Messwerte und Mittelwerte \pm S.E.M. von $n = 15$ Follikelflüssigkeiten verschiedener Patientinnen (Gesamtaktivität: 10 ± 3 mU/mg; BChE: $0,7 \pm 0,3$ mU/mg; AChE: 9 ± 2 mU/mg). (B) Mittels Western Blot konnte Protein der AChE, AChE-R und BChE in Lysaten humaner Granulosazellen nachgewiesen werden. Die Pfeile zeigen die erwartete Bandenhöhe (AChE 82 kDa, BChE 68 kDa) und spezifische Banden an. Die jeweiligen Präadsorptions- und Serumkontrollen sind negativ.

Dies weist auf eine Produktion von vorwiegend AChE und weniger BChE durch Granulosazellen hin. Mittels Western Blot war es möglich das AChE-Protein auch in Granulosazellen aus 4 unabhängigen Präparationen zu identifizieren. Bei Verwendung eines Antikörers, der gegen alle AChE-Varianten gerichtet ist, zeigte sich eine Proteinbande auf Höhe der erwarteten 82 kDa, die unter Präadsorptionsbedingungen nicht auftrat (Abb. 6 B; 1 Präparation gezeigt). Hierdurch kann auf die Spezifität des verwendeten Antikörpers geschlossen werden.

Des Weiteren wurde auch ein Antikörper speziell gegen die AChE-R Variante (Pick et al., 2006) im Western Blot eingesetzt, um diese Variante in den Granulosazellen aus 6

unabhängigen Präparationen nachzuweisen. Hierbei zeigte sich eine einzelne Bande im Western Blot, welche in der Serumkontrolle nicht auftrat und als spezifisch zu interpretieren ist (Abb. 6B; 1 Präparation gezeigt). Neben AChE konnte auch BChE mittels Western Blot in den Granulosazellen aus 4 unabhängigen Präparationen nachgewiesen werden. Hier zeigte sich auf der Membran eine Bande auf der erwarteten Höhe von 68 kDa, die im Kontrollexperiment nicht zu beobachten war (Abb. 6B; 1 Präparation gezeigt). Neben der erwarteten BChE Proteinbande bei 68 kDa zeigte sich allerdings auch eine zweite, etwa bei 100 kDa liegende Proteinbande auf der Membran. Dies könnte auf eine andere Splice-Variante oder eine an ein anderes Protein gebundene BChE zurückzuführen sein.

Ferner war es neben dem Proteinnachweis auch möglich, die mRNA verschiedener AChE-Spleißvarianten in humanen Granulosazellen aus 6 unabhängigen Präparationen mittels RT-PCR zu detektieren (Abb. 7A; 1 Präparation gezeigt).

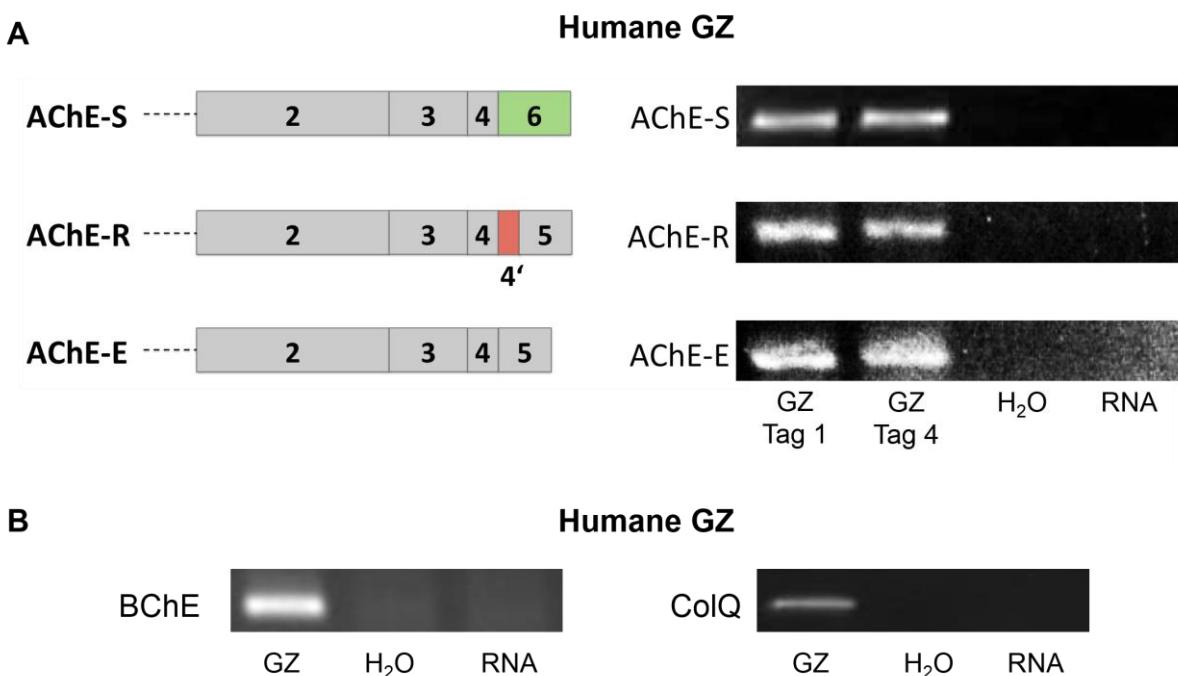


Abbildung 7: AChE-Varianten in humanen Granulosazellen. (A) Mittels RT-PCR und Sequenzierung konnten die Varianten AChE-S, AChE-R und AChE-E in humanen Granulosazellen (GZ) an verschiedenen Tagen der Kultivierung nachgewiesen werden. Die Wasser- und RNA-Kontrolle sind negativ. (B) Mittels RT-PCR und Sequenzierung konnten neben den AChE-Varianten auch BChE und ColQ mRNA an unterschiedlichen Kulturtagen nachgewiesen werden. Die Kontrolle ohne cDNA (H₂O) und die RNA-Kontrolle sind negativ.

Die isolierte RNA wurde hierfür zunächst in cDNA umgeschrieben und anschließend wurde eine PCR mit spezifischen Primern durchgeführt. Die Varianten AChE-S, AChE-R und AChE-E konnten auf mRNA-Ebene an verschiedenen Tagen der Kultivierung in den humanen Granulosazellen nachgewiesen werden. Die Wasser- und RNA-Kontrollen fielen hierbei

negativ aus. BChE-mRNA und mRNA des AChE Bindungsproteins ColQ konnten ebenfalls mittels RT-PCR in kultivierten humanen Granulosazellen aus 4 unabhängigen Präparationen nachgewiesen werden (Abb. 7B). Die RNA- und Wasserkontrollen zeigten kein Produkt. Die Identität der PCR-Produkte wurde mittels Sequenzierung und der BLAST Software überprüft.

2.1.3 Expression von AChE in Ovargewebe von Mensch und Rhesusaffe

Zur Evaluierung der Expression von AChE, AChE-R und ChAT in humanen ovariellen Gewebeschnitten wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Granulosa- und Thekazellen in antralen Follikeln zeigten sich bei Verwendung eines Antikörpers gegen alle humanen AChE-Varianten als positiv für AChE (Abb. 8A). Durch eine Präadsorption mit dem entsprechenden Peptid konnte diese Färbung verhindert werden (Abb. 8B). Auch die humanen luteinisierten Zellen des *Corpus luteum* wiesen eine Färbung mit diesem Antikörper auf (Abb. 8C). Im Präadsorptionsexperiment verschwand diese Färbung fast vollständig (Abb. 8D). In humanen Granulosa- und Thekazellen konnte ebenfalls AChE-R nachgewiesen werden, wobei hier das Signal in den Thekazellen stärker ausfiel als in den Granulosazellen (Abb. 8E). Die Serumkontrolle wies keine Färbung auf (Abb. 8F). Auch das humane *Corpus luteum* zeigte eine Färbung für die AChE-R-Variante (Abb. 8G). Hierbei zeigten die luteinisierten Thekazellen im Vergleich zu den luteinisierten Granulosazellen das stärkere Signal. Die entsprechende Serumkontrolle fiel negativ aus (Abb. 8H). Durch die Verwendung eines gegen das ACh-synthetisierende Enzym ChAT gerichteten Antikörpers konnte lediglich eine Färbung in den Granulosazellen gezeigt werden, während in den Thekazellen keine Farbreaktion zu beobachten war (Abb. 8I). Auch hier trat in der entsprechenden Serumkontrolle keine Färbung auf (Abb. 8J). Die Zellen des *Corpus luteum* zeigten ebenfalls ein spezifisches Signal für ChAT (Abb. 8K), wobei die Serumkontrolle negativ ausfiel (Abb. 8L).

Ovar Mensch

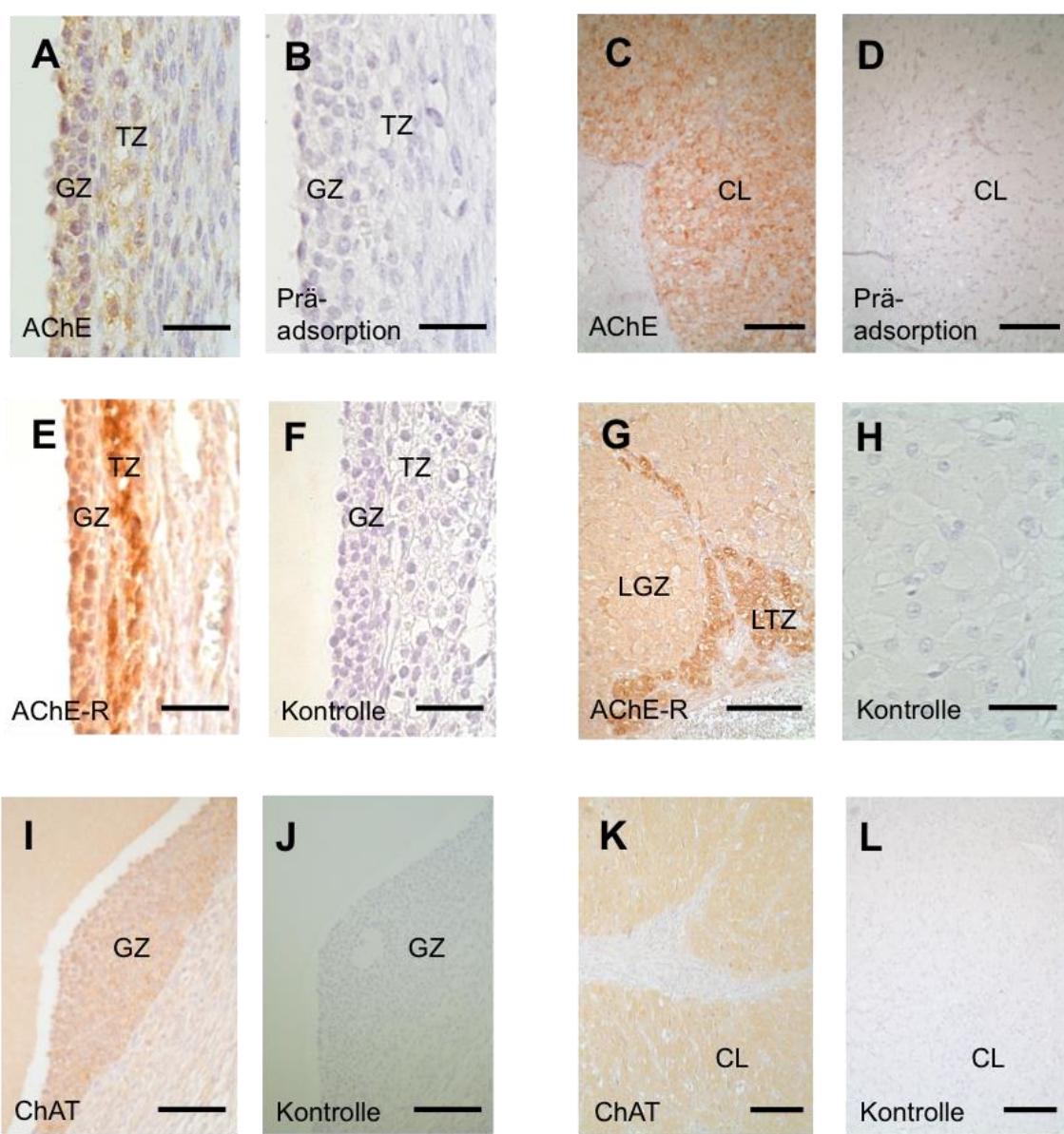


Abbildung 8: Immunhistochemischer Nachweis von AChE, ChAT und AChE-R in humanem ovariellen Gewebe.

(A) Immunhistochemische Methoden zeigen, dass Granulosazellen (GZ) und Thekazellen (TZ) in Gewebeschnitten des humanen Ovars positiv für AChE sind. (B) Die Präadsorptionskontrolle ist negativ und zeigt keine Färbung. (C) Die luteinisierten Zellen des *Corpus luteum* (CL) zeigen eine spezifische Färbung für AChE. (D) Die Präadsorptionskontrolle ist negativ und zeigt keine Färbung. (E) Granulosa- und Thekazellen eines antralen Follikels zeigen eine spezifische Färbung für AChE-R. (F) Die Serumkontrolle fällt negativ aus. (G) Luteinisierte Granulosa- (LGZ) und Thekazellen (LTZ) sind immunhistologisch positiv für AChE-R. (H) Die entsprechende Serumkontrolle weist keine Färbung auf. (I) Humane Granulosazellen eines großen antralen Follikels sind immunhistologisch positiv für ChAT. (J) Die entsprechende Serumkontrolle weist keine Färbung auf. (K) Die luteinisierten Zellen des *Corpus luteum* (CL) zeigen ebenfalls eine spezifische Färbung für ChAT. (L) Die Serumkontrolle ist negativ und zeigt keine Färbung. Die jeweiligen Balken entsprechen 50 µm (A, B, E, F, H) oder 100 µm (C, D, G, I-L).

Neben humanem Material wurde auch ovarielles Gewebe von Rhesusaffen immunhistologisch analysiert. Hierbei wurden die gleichen Antikörper wie bei den humanen Schnitten eingesetzt. Es zeigten sich die Follikelflüssigkeit und die Granulosazellen in den antralen Follikeln positiv für AChE (Antikörper gegen alle AChE-Varianten; Abb. 9A, C). Eine Präadsorption des Antikörpers konnte die vorher beobachtete Färbung verhindern (Abb. 9B, D). Eine Präadsorption des Antikörpers konnte die vorher beobachtete Färbung verhindern (Abb. 9B, D).

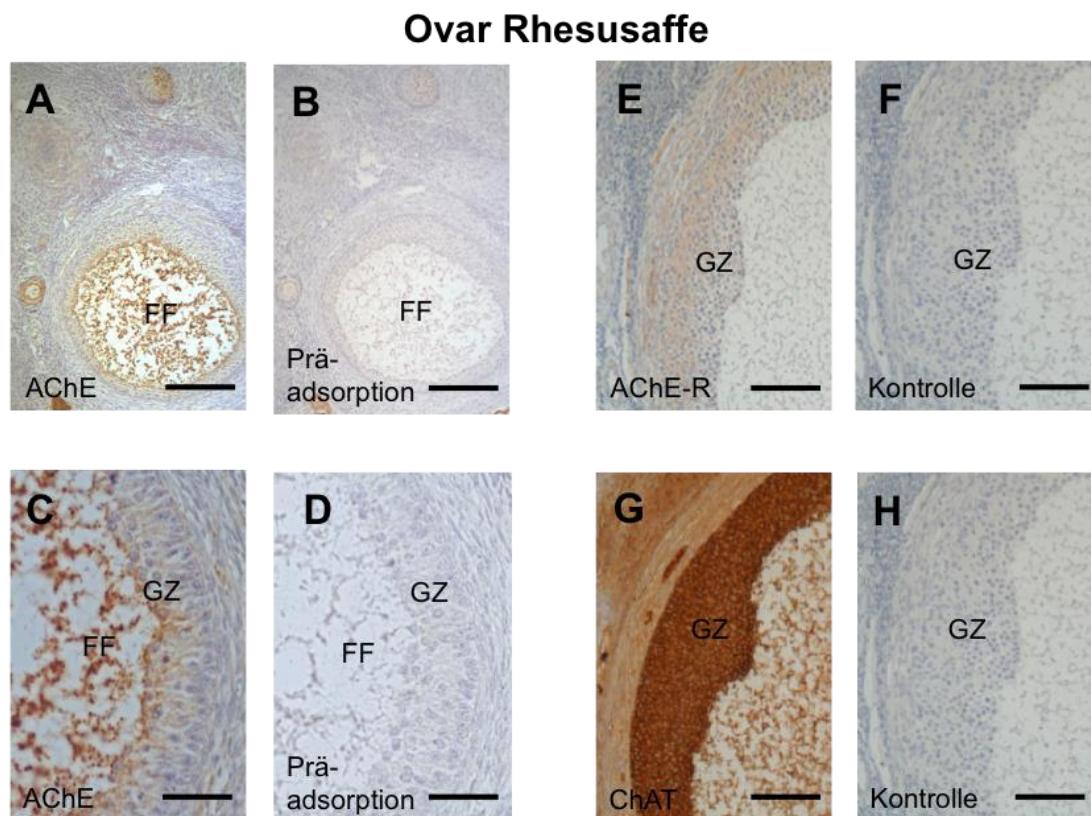


Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis von AChE, ChAT und AChE-R in ovariellem Gewebe des Rhesusaffen. (A, C) Immunhistochemische Methoden zeigen, dass Granulosazellen (GZ) und Follikelflüssigkeit (FF) des Rhesusaffen in Gewebeschnitten des Ovars positiv für AChE sind. (B und D) Die Präadsorptionskontrollen sind negativ und zeigen keine Färbung. (E) Granulosazellen eines antralen Follikels zeigen eine spezifische Färbung für AChE-R. (F) Die Serumkontrolle ist negativ und zeigt keine Färbung. (G) Granulosazellen eines großen antralen Follikels des Rhesusaffen sind immunhistologisch positiv für ChAT. (H) Die entsprechende Serumkontrolle weist keine Färbung auf. Die Balken entsprechen 200 µm (A,B), 50 µm (C, D) oder 100 µm (E-H).

Der gegen AChE-R gerichtete Antikörper wurde ebenfalls bei Gewebe des Rhesusaffen eingesetzt und wies eine spezifische Färbung der Follikelflüssigkeit und Granulosazellen in antralen Follikeln auf (Abb. 9E). Die Serumkontrolle war negativ (Abb. 10F). Ein ähnliches Muster zeigte die immunhistologische Färbung mit dem gegen ChAT gerichteten Antikörper.

Hier waren die Granulosazellen und die Follikelflüssigkeit im antralen Follikel stark gefärbt. (Abb. 9G). Die Serumkontrolle wies keine Färbung auf (Abb. 9H).

2.1.4 Trophische ACh-Wirkung auf humane Granulosazellen

Um die funktionellen Komponenten des ovariellen ACh-Systems zu untersuchen, wurden Konfluenzmessungen mit kultivierten Granulosazellen, welche den Großteil des zellulären Bestandteils im humanen antralen Follikel darstellen, durchgeführt. Eine Zunahme der Konfluenz, verursacht durch eine Veränderung der Zellgröße oder der Zellzahl, wurde hierbei als trophischer Einfluss gewertet. Die Verwendung von 3 unabhängigen Präparationen der Zellen zeigte eine signifikant erhöhte Zunahme der Konfluenz unter dem Einfluss von ACh ($10 \mu\text{M}$) nach 6 und 12 h (Abb. 10A, B). Nach 24 h war dieser Effekt nicht mehr zu beobachten, da das eingesetzte ACh möglicherweise abgebaut wird (Abb. 10C). Wurden die Zellen jedoch sowohl mit ACh als auch mit dem AChE-Inhibitor HupA ($10 \mu\text{M}$) behandelt, war der trophische ACh-Effekt nach 6 h tendenziell und nach 12 h und auch noch nach 24 h signifikant zu beobachten. Dies weist auf einen eventuell intrinsischen Abbaumechanismus für ACh hin, der durch HupA blockiert werden kann. AChE könnte hierfür von Granulosazellen produziert werden oder durch den Einsatz von FCS im Medium vorhanden sein. Bei einer Behandlung nur mit HupA zeigte sich erst nach 12 und 24 h eine signifikant erhöhte Zunahme der Konfluenz. Dies unterstützt die Annahme, dass ACh von Granulosazellen gebildet wird und auch auf diese Auswirkungen hat. Der Einsatz von Atropin ($1 \mu\text{M}$), einem Inhibitor der muskarinischen ACh-Rezeptoren, führte zu einer signifikant verminderter Zunahme der Konfluenz nach 12 und 24 h. Dies lässt darauf schließen, dass ACh über muskarinische ACh-Rezeptoren auf die Zellen einwirkt. Zusätzlich wurde eine Stimulation mit Nikotin durchgeführt, welche keine Auswirkung auf die Konfluenz zeigte. Die simultane Behandlung der Granulosazellen mit ACh, HupA, und Atropin führte zu keiner Veränderung in der Konfluenzzunahme nach 12 und 24 h. Lediglich nach 6 h war eine verminderte Konfluenzzunahme zu beobachten, wobei hier der Standardfehler größer ausfiel als bei den übrigen Behandlungsgruppen.

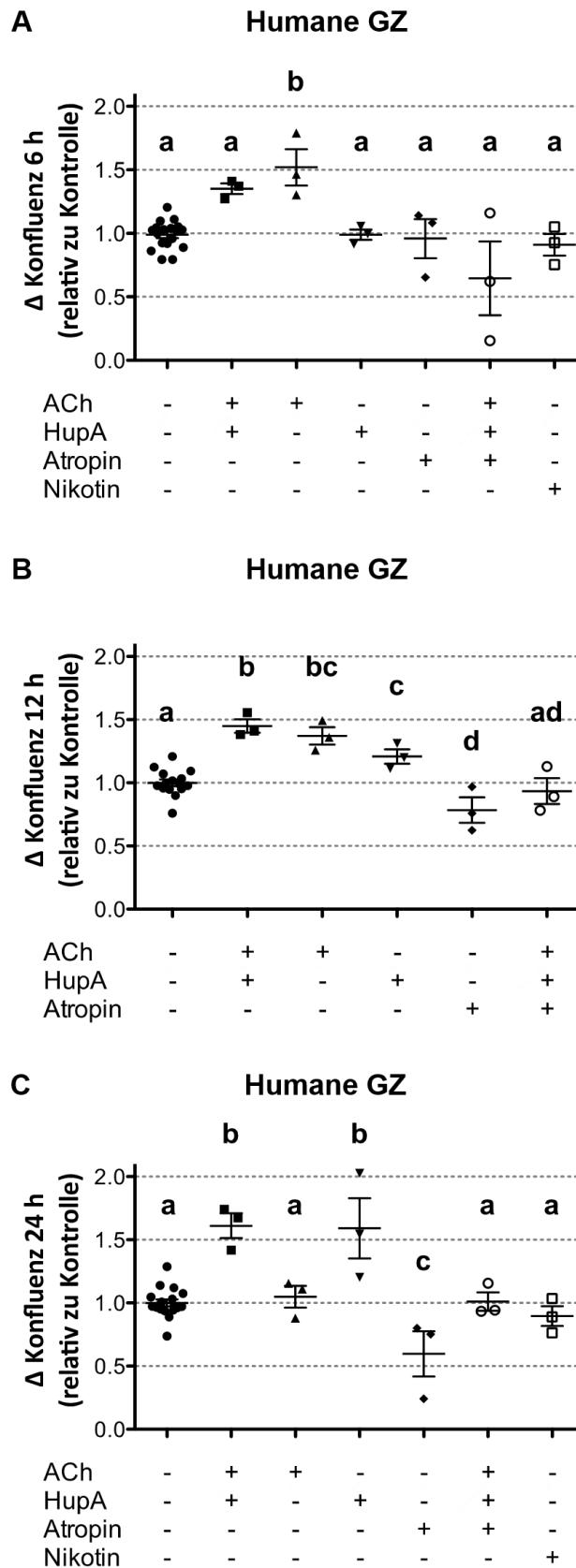


Abbildung 10: Evaluierung des Ach Systems in humanen Granulosazellen (GZ). (A bis C) Darstellung der Veränderungen in der Konfluenz (relativ zur Kontrolle) kultivierter humaner Granulosazellen nach einer 6, 12 und 24 h Behandlung mit verschiedenen Kombinationen von ACh ($10 \mu\text{M}$), HupA ($10 \mu\text{M}$), Atropin ($1 \mu\text{M}$) und Nikotin.

Nikotin ($10 \mu\text{M}$). ACh zeigt anfangs einen trophischen Effekt, wird anscheinend aber während der 24 h abgebaut. HupA inhibiert die ACh-Degradierung durch AChE; so können die trophischen Effekte des ACh auch noch nach 24 h beobachtet werden. Atropin kann die ACh-vermittelten Effekte inhibieren und kann somit auch die basale Konfluenz nach 24 h vermindern. Nikotin wurde als Kontrolle bei 6 h und 24 h verwendet und zeigt keine Effekte auf die Konfluenz. Die Werte sind als individuelle Messwerte und Mittelwert \pm S.E.M. von $n = 3$ unabhängigen Präparationen aus zusammengeführten Zellen von jeweils zwei bis fünf Patientinnen dargestellt. Für jede Stimulation wurde ein paralleles Kontrollexperiment durchgeführt. Unterschiedliche Buchstaben implizieren einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$; ANOVA, Newman-Keuls).

2.1.5 ChAT-Regulation durch NGF

Während der Untersuchung der Regulation des ACh-synthetisierenden Enzyms ChAT konnte durch ein Western Blot-Experiment gezeigt werden, dass NGF (50 ng/ml) die ChAT-Proteinkonzentration im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht (Abb. 11A, B). Neben NGF wurde auch Pro-NGF (pNGF), das Vorläuferprotein des NGF, eingesetzt.

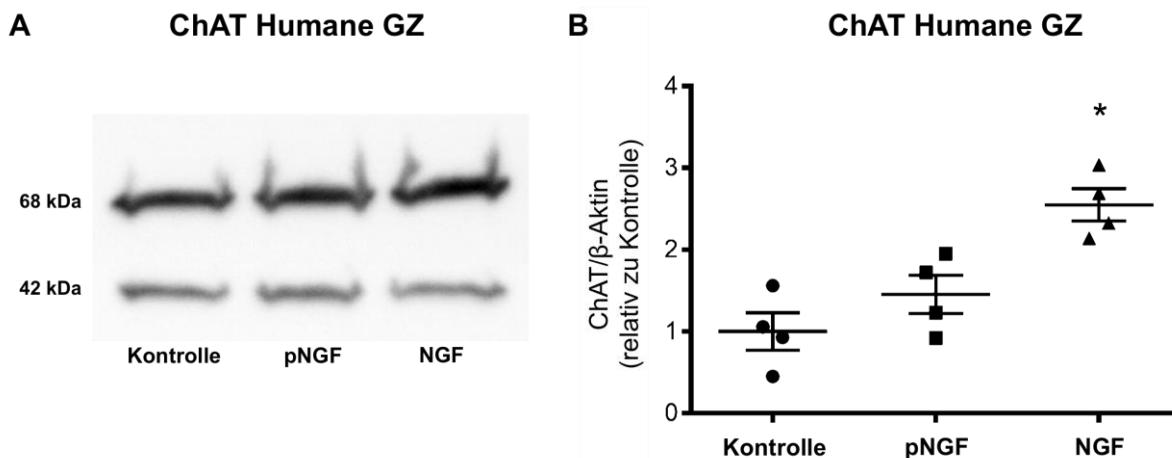


Abbildung 11: Regulierung von ChAT durch NGF. (A) Beispiel eines Western Blots mit humanen Granulosazellen an Tag 2-3 in Kultur. Eine Stimulation mit NGF (50 ng/ml) führt im Vergleich zur Kontrolle zu einer Erhöhung der ChAT-Proteinkonzentration. β -Aktin diente hier als interne Kontrolle. (B) Die densitometrische Auswertung des Western Blot-Experiments zeigt einen signifikanten Anstieg ($p < 0,05$; ANOVA, Newman-Keuls) der ChAT-Proteinmenge nach 24-stündiger NGF-Stimulation, während dies durch pNGF (50 ng/ml) nicht erreicht werden kann. Die Werte sind als individuelle Messwerte und Mittelwert \pm S.E.M. von $n = 4$ Proteinlysaten unabhängiger Präparationen aus zusammengeführten Zellen von jeweils zwei bis fünf Patientinnen dargestellt.

Das Experiment wurde mit 4 unabhängigen Granulosazell-Präparationen durchgeführt. Die Behandlung mit pNGF führte bei einer Konzentration von 50 ng/ml lediglich zu einer tendenziell verstärkten ChAT-Expression in den kultivierten Zellen. Der leichte Anstieg könnte durch einen intrinsischen Mechanismus, welcher zur Umwandlung von pNGF in NGF führt,

bedingt sein. Somit hat NGF hier eine ähnliche Wirkung, wie sie auch auf neuronale Zellen bekannt ist.

2.2 ARP (AChE-R-spezifisches Peptid) vermittelter Zelltod

2.2.1 Vermehrtes Auftreten des Zelltods unter ARP-Behandlung

Im Gegensatz zu AChE-S und AChE-E ist die AChE-R Variante ein lösliches Monomer, dessen spezifischem C-terminalen Peptid ARP zusätzliche nicht-enzymatische Funktionen zugeschrieben werden (Pick et al., 2006). Um diese nicht-enzymatischen Effekte in humanen Granulosazellen zu untersuchen, wurde ein synthetisches ARP verwendet. Mittels Live Cell Imaging über 24 h konnte ein signifikant erhöhtes Vorkommen von Zelltoden in den mit ARP (50 ng/ml; n = 10) behandelten Präparationen von Granulosazellen im Vergleich zu unbehandelten Granulosazellen (Kontrolle; n = 5) beobachtet werden (Abb. 12A, B).

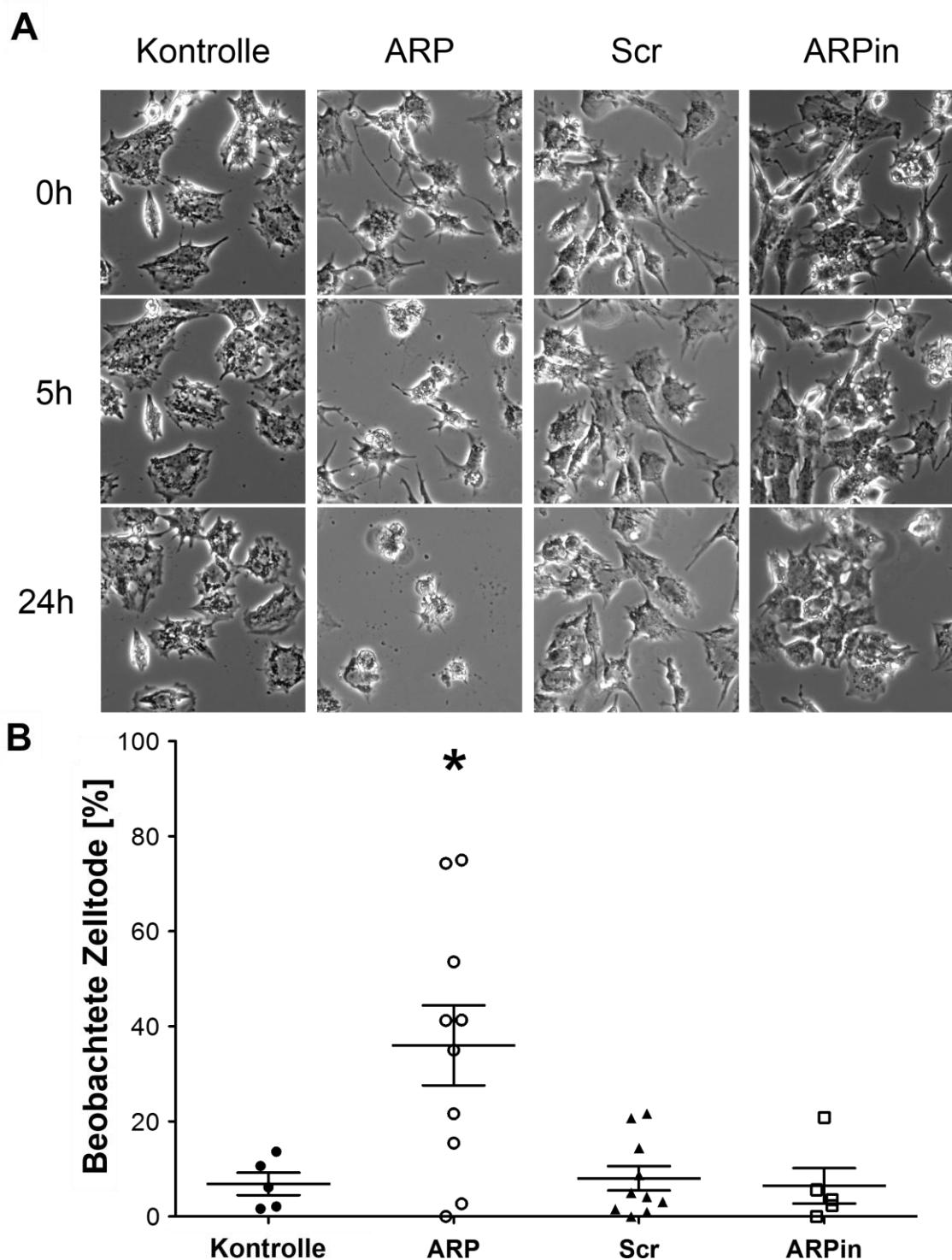
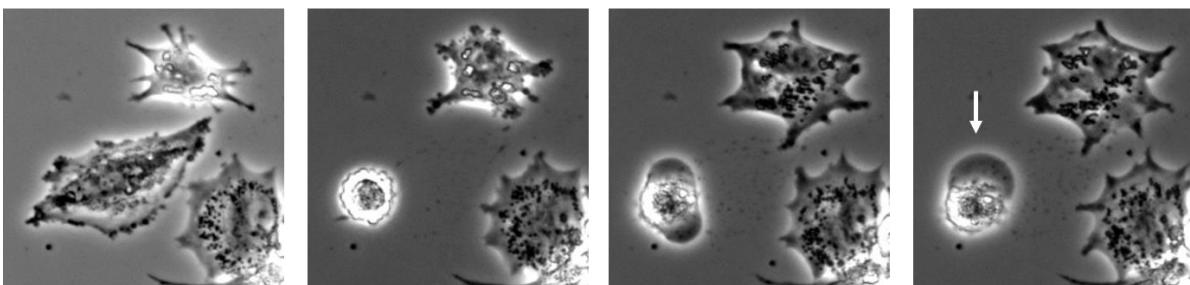


Abbildung 12: Vermehrtes Absterben von Granulosazellen unter ARP-Behandlung. (A) Aufnahmen mittels Live Cell Imaging von humanen Granulosazellen, welche unbehandelt (Kontrolle), ARP (50ng/ml), Scr (50 ng/ml) und hitzeinaktiviertem ARP (ARPin; 50 ng/ml) behandelt wurden. Nach 24 h lässt sich eine verminderte Anzahl an Zellen erkennen. (B) Die beobachtete Anzahl an Zelltoden ist in der ARP-behandelten Gruppe nach 24 h im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant erhöht ($p < 0,05$; ANOVA, Newman-Keuls). Die Werte sind als individuelle Messwerte und Mittelwert \pm S.E.M. von $n = 5$ (Kontrolle, ARPin) und $n = 10$ (ARP, Scr) unabhängiger Präparationen aus zusammengeführten Zellen von jeweils zwei bis fünf Patientinnen dargestellt.

Ein Kontrollpeptid (Scr; 50 ng/ml; n = 10) mit definierter, aber zufälliger Aminosäureabfolge und hitzeinaktiviertes ARP (ARPin; 50 ng/ml; 10 min, 95 °C; n = 5) zeigten keinen Effekt. Das erste gehäufte Auftreten von Zelltoden fand etwa 2 bis 3 h nach der Zugabe von ARP statt und hielt bis 24 h nach Stimulation an. Die sterbenden Zellen wiesen eine charakteristische Morphologie unter ARP-Behandlung auf. Hierbei konnte ein „Aufblähen“ des Zytosplasmas beobachtet werden (Abb. 13), welches auch in sehr viel geringerer Häufigkeit in den Kontrollgruppen auftrat.

Kontrolle



Zeit (6 h)

ARP

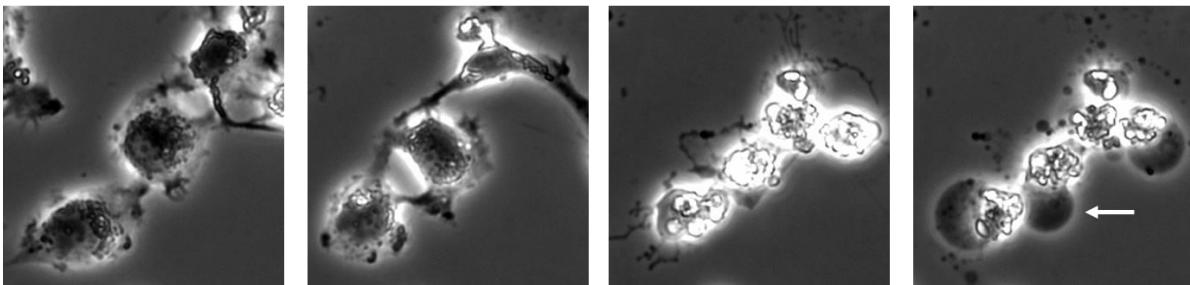


Abbildung 13: Charakteristische Morphologie des durch ARP-Behandlung vermehrt auftretenden Zelltods. Auch ohne ARP (50 ng/ml)-Behandlung (Kontrolle) tritt ein Absterben mit dieser spezifischen Morphologie auf. Die weißen Pfeile weisen auf das beobachtete „Aufblähen“ der Zellen hin.

Durch ARP-Behandlung (50 ng/ml; n = 3) konnte auch eine Verminderung der Konfluenz im Vergleich zur Kontrollgruppe erreicht werden (Abb. 14A). Hierbei sank die gemessene Konfluenz innerhalb von 24 h auf kontinuierlich auf etwa 80 % der Konfluenz in der Kontrollgruppe ab. Eine Messung des Zelldurchmessers bei Granulosazellen zeigte eine signifikante Verminderung dieses Parameters in ARP behandelten Zellen (Abb. 14B). Das Experiment wurde mit 5 unabhängigen Granuloszellpräparationen durchgeführt.

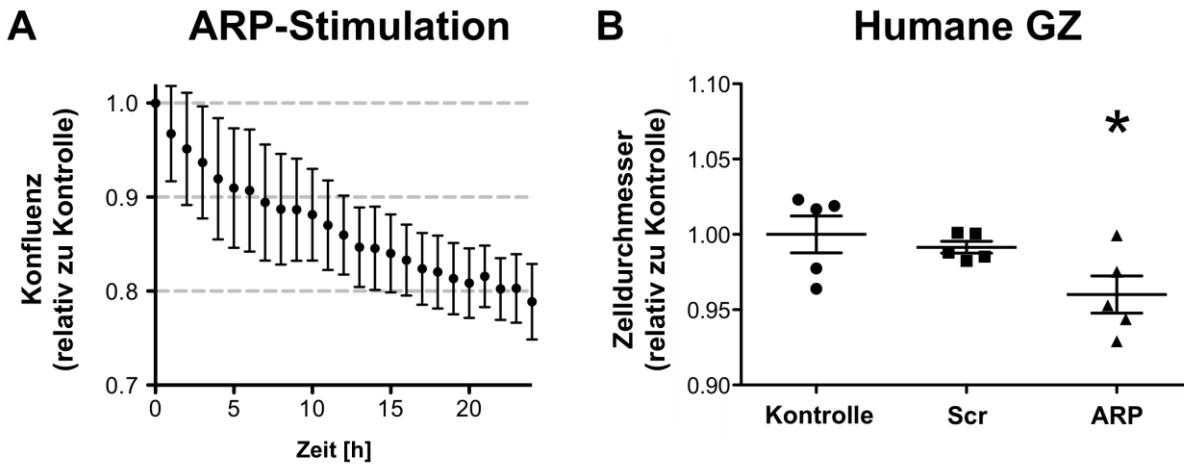


Abbildung 14: Auswirkungen der ARP-Behandlung auf die Konfluenz und Größe humaner Granulosazellen. (A) Die Stimulation kultivierter humaner Granulosazellen (GZ) mit ARP (50 ng/ml) führt zu einer Abnahme der Konfluenz über einen Zeitraum von 24 h. Die Werte sind als Mittelwert \pm S.E.M. von n = 3 unabhängigen Präparationen aus zusammengeführten Zellen von jeweils zwei bis fünf Patientinnen dargestellt. (B) Die für 24 h mit ARP behandelten Zellen weisen im Vergleich zu den Kontrollzellen (H₂O, Scr) einen signifikant verminderten Zelldurchmesser auf ($p < 0,05$; ANOVA, Newman-Keuls). Die Werte sind als individuelle Messwerte und Mittelwert \pm S.E.M. von n = 3 unabhängigen Präparationen aus zusammengeführten Zellen von jeweils zwei bis fünf Patientinnen dargestellt.

2.2.2 Apoptose in Granulosazellen

Um Apoptose als Art des beobachteten Zelltods abzuklären, wurde zunächst die Caspase 3/7 Aktivität in 3 unabhängigen Präparationen von humanen Granulosazellen gemessen (Abb. 15). Die ARP-Behandlung führte zu keiner Erhöhung der Caspase 3/7-Aktivität im Vergleich zu unbehandelten und mit Scr behandelten Granulosazellen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es sich bei dem hier beobachteten Zelltod nicht um Caspase-abhängige Apoptose handeln kann.

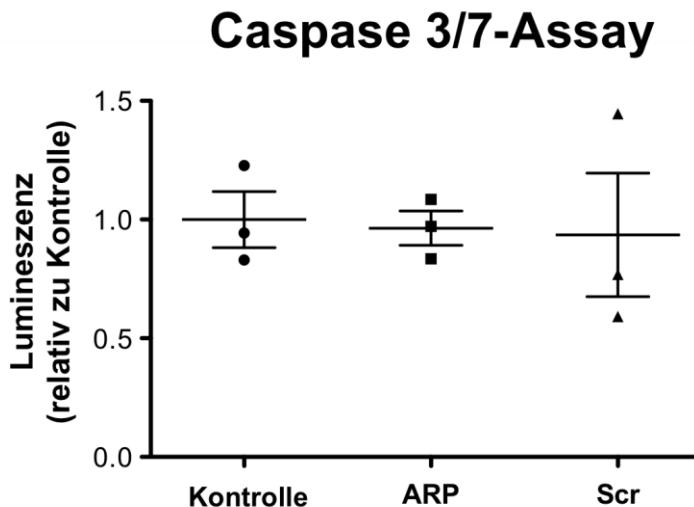


Abbildung 15: Caspase 3/7-Aktivität in humanen Granulosazellen unter ARP-Behandlung. Es konnte keine vermehrte Caspase 3/7-Aktivität in ARP-behandelten (50 ng/ml) humanen Granulosazellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen festgestellt werden ($p > 0,05$; ANOVA, Newman-Keuls). Die Werte sind als individuelle Messwerte und Mittelwert \pm S.E.M. von $n = 3$ unabhängigen Präparationen aus zusammengeführten Zellen von jeweils zwei bis fünf Patientinnen dargestellt.

Im Folgenden wurden Lactatdehydrogenase (LDH)-Assays mit 10 unabhängigen Präparationen von humanen Granulosazellen durchgeführt, um den LDH-Gehalt in Zellkulturüberständen als Indikator für die Zellmembranschädigung der behandelten Granulosazellen zu bestimmen (Abb. 16A). Die Messungen zeigten einen signifikanten Anstieg der LDH-Konzentration im Überstand von für 5 h mit ARP behandelten Granulosazellen im Vergleich zu Kontrollzellen, mit dem Kontrollpeptid oder mit hitzeinaktiviertem ARP behandelten Zellen. Dies weist auf eine zytotoxische Wirkung von ARP hin und bestätigt die Ergebnisse aus den vorhergegangen Live Cell Imaging-Experimenten, bei welchen ebenfalls ein verstärktes Absterben der Zellen unter ARP-Behandlung erkennbar war.

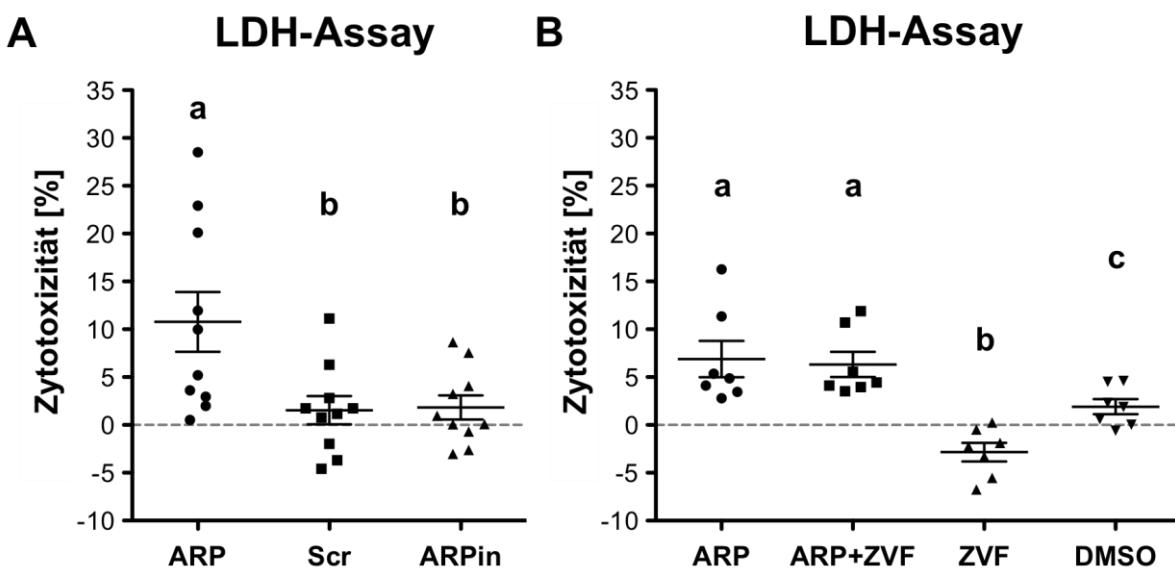


Abbildung 16: Durch ARP bedingte Erhöhung der LDH-Freisetzung. (A) Dargestellt sind die Ergebnisse eines LDH-Zytotoxizitäts-Assays, welcher mit kultivierten humanen Granulosazellen durchgeführt wurde. ARP (50 ng/ml) erhöht hier im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Scr (50 ng/ml), ARPin (50 ng/ml)) nach 5 h signifikant die Zytotoxizität ($p < 0,05$; ANOVA, Newman-Keuls). (B) Z-VAD-FMK (ZVF; 20 μ M) ist nicht in der Lage, den ARP-vermittelten Anstieg der Zytotoxizität zu verhindern. Allerdings vermindert ZVF signifikant die Zytotoxizität im Vergleich zur Kontrollgruppe (DMSO 1%, $p < 0,05$; ANOVA, Newman-Keuls). Alle Werte der LDH-Assays sind als individuelle Messwerte und Mittelwert \pm S.E.M. von $n = 10$ (A) oder $n = 7$ (B) unabhängigen Präparationen aus zusammengeführten Zellen von jeweils zwei bis fünf Patientinnen dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben implizieren einen signifikanten Unterschied.

Unter der Verwendung von 7 unabhängigen Granulosazellpräparationen wurde ein weiteres LDH-Experiment durchgeführt (Abb. 16B). Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Pan-Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK (20 μ M) den ARP-vermittelten Anstieg in der Zytotoxizität nicht verhindern kann. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Apoptose nicht die in diesem Fall involvierte Art des Zelltods ist. Allerdings konnte beobachtet werden, dass Z-VAD-FMK in der Lage ist, die Anzahl der basal auftretenden Zelltode im Vergleich zur Kontrolle (DMSO) zu verringern.

2.2.3 ARP-vermittelte Nekroptose in humanen Granulosazellen

Mit dem RIPK1 Inhibitor Nek-1 (20 μ M) war es möglich, den Anstieg der Zytotoxizität in ARP-behandelten Granulosazellen signifikant zu blockieren ($n = 10$; Abb. 17A). Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass Nekroptose für die erhöhte Zahl an Zelltoden bei ARP-behandelten Granulosazellen verantwortlich ist. In der Gruppe der nur mit Nek-1 behandelten Granulosazellen konnte eine signifikant verminderte Zytotoxizität im Vergleich zur

Kontrollgruppe (EtOH) beobachtet werden, was ein basales Auftreten der Nekroptose in Granulosazellen vermuten lässt ($n = 10$; **Abb. 17B**).

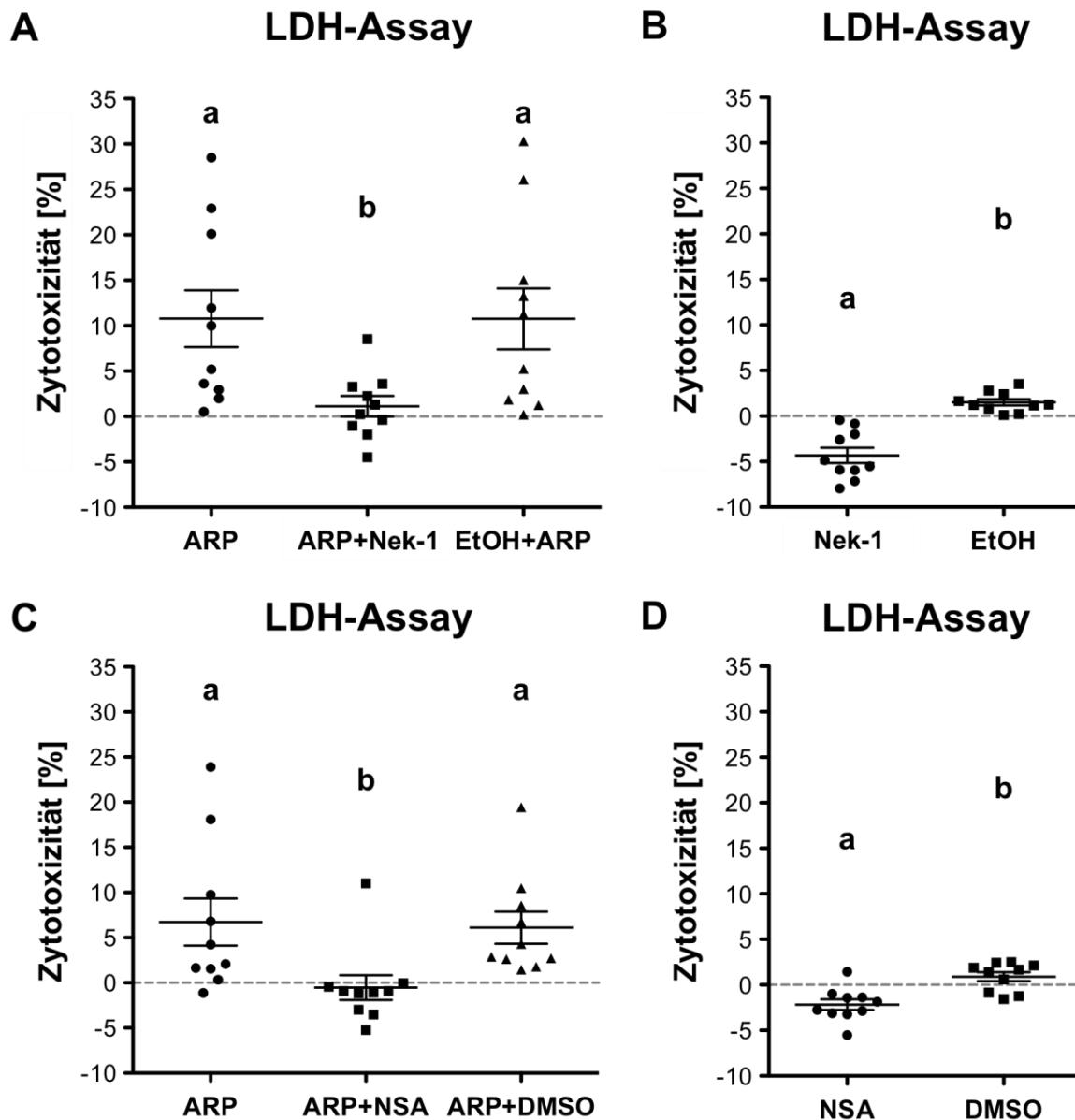


Abbildung 17: Inhibierung des ARP-vermittelten Zelltods durch Nek-1 und NSA im LDH-Assay. (A) Eine Behandlung mit Nek-1 (20 μ M) führt zu einer signifikanten Inhibition ($p < 0,05$; ANOVA) der durch ARP vermittelten Zytotoxizität. Ethanol (EtOH; 0,1%) zeigt keinen Effekt auf die durch ARP erhöhte Zytotoxizität. (B) Nek-1 bewirkt eine signifikant verminderte Zytotoxizität im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,05$; *t*-test). (C) NSA (0,5 μ M) ist in der Lage, den durch ARP vermittelten Anstieg der Zytotoxizität signifikant zu hemmen ($p < 0,05$; ANOVA, Newman-Keuls). DMSO (0,1%) zeigt keinen Effekt auf den ARP-vermittelten Anstieg der Zytotoxizität. (D) NSA bewirkt eine signifikant verminderte Zytotoxizität im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,05$; *t*-test). Alle Werte der LDH-Assays sind als individuelle Messwerte und Mittelwert \pm S.E.M. von $n = 10$ unabhängigen Präparationen aus zusammengeführten Zellen von jeweils zwei bis fünf Patientinnen dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben implizieren einen signifikanten Unterschied.

Um Nekroptose als Art des hervorgerufenen Zelltods weiter zu bestätigen, wurde neben Nek-1 NSA als weiterer Nekroptoseblocker verwendet. NSA blockiert MLKL und somit auch den Nekroptosesignalweg. In einem LDH-Assay-basierten Experiment mit 10 unabhängigen Präparationen von Granulosazellen konnte gezeigt werden, dass NSA ($0.5 \mu\text{M}$) in der Lage ist, die durch ARP bedingte erhöhte Zytotoxizität in Granulosazellen zu verhindern (Abb. 17C). Eine Behandlung mit NSA allein zeigte wiederum im Vergleich zur Kontrollgruppe (DMSO) eine verminderte basale Zytotoxizität (Abb. 17D).

Die Schlüsselproteine des Nekroptose-Signalwegs RIPK1, RIPK3 und phosphoryliertes MLKL (p-MLKL) konnten mittels Western Blot in 3 unabhängigen Präparationen humaner Granulosazellen nachgewiesen werden (Abb. 18A; 1 Präparation gezeigt). Die mRNAs von RIPK1 und MLKL, den Faktoren, an denen das Wirkprinzip von Nek-1 und NSA ansetzt, konnten ebenfalls mittels RT-PCR und Sequenzierung in humanen Granulosazellen nachgewiesen werden (Abb. 18B).

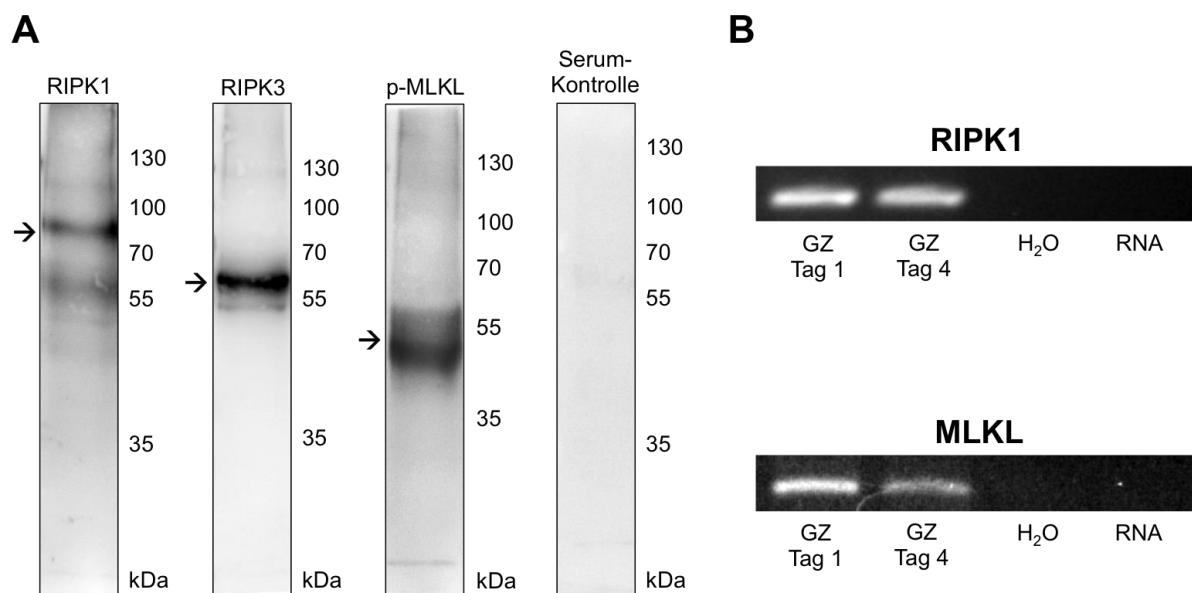


Abbildung 18: Identifikation der an Nekroptose beteiligten Schlüsselfaktoren in humanen Granulosazellen. (A) RIPK1, RIPK2 und p-MLKL konnten in humanen Granulosazellen mittels Western Blot nachgewiesen werden. Die Pfeile markieren die erwartete Bandenhöhe (RIPK1: 76 kDa; RIPK3: 57 kDa; p-MLKL: 54 kDa). Die Serum-Kontrolle fällt negativ aus. (B) Mittels RT-PCR und Sequenzierung konnten die mRNAs von RIPK1 und MLKL in humanen Granulosazellen (GZ) nachgewiesen werden. Die RNA- und Wasser-Kontrolle fällt jeweils negativ aus.

Des Weiteren konnte mittels Western Blot an 5 unabhängigen Präparationen gezeigt werden, dass eine ARP-Behandlung zu einer erhöhten Konzentration von p-MLKL in humanen

Granulosazellen führt (Abb. 19A, B). Dies stellt einen weiteren Hinweis auf die Involvierung des Nekroptosesignalwegs dar.

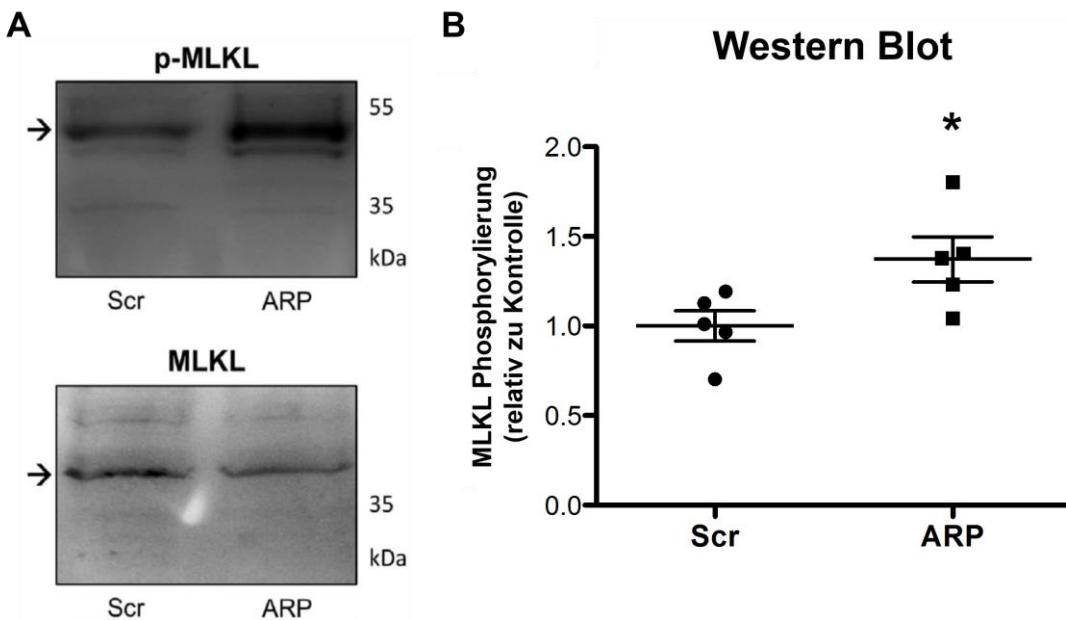


Abbildung 19: Vermehrte Phosphorylierung von MLKL in humanen Granulosazellen unter ARP-Behandlung. (A) Identifizierung von p-MLKL und MLKL in humanen Granulosazellen mittels Western Blot. Eine 5 h ARP-Behandlung führt im Vergleich zur Kontrolle (Scr) zu einer erhöhten Menge an p-MLKL. Die Pfeile zeigen die erwartete Bandenhöhe an (MLKL 37 kDa; p-MLKL: 54 kDa). (B) Eine densitometrische Auswertung des p-MLKL/MLKL Western Blot-Experiments zeigt eine signifikante Erhöhung des p-MLKL-Gehalts unter ARP-Behandlung ($p<0,05$, t -Test). Die Werte von MLKL und p-MLKL wurden auf die MLKL-Werte normiert. Die Werte sind als individuelle Messwerte und Mittelwert \pm S.E.M. von $n = 5$ unabhängigen Präparationen aus zusammengeführten Zellen von jeweils zwei bis fünf Patientinnen dargestellt.

2.2.4 Nachweis von p-MLKL in ovariellem Gewebe

Unter der Verwendung eines gegen p-MLKL gerichteten Antikörpers war es möglich, p-MLKL, einen spezifischen Marker für Nekroptose (Wang et al., 2014a), in humanem ovariellem Gewebe immunhistochemisch nachzuweisen. Das humane *Corpus luteum* zeigte eine spezifische Färbung für p-MLKL (Abb. 20A, B), während die Immunglobulin G (IgG)-Kontrolle negativ ausfiel (Abb. 20C). In den Follikeln des Rhesusaffen waren die Granulosazellen in den Follikeln immunoreaktiv für p-MLKL (Abb. 20D). Hier fiel die IgG-Kontrolle ebenfalls negativ aus (Abb. 20E).

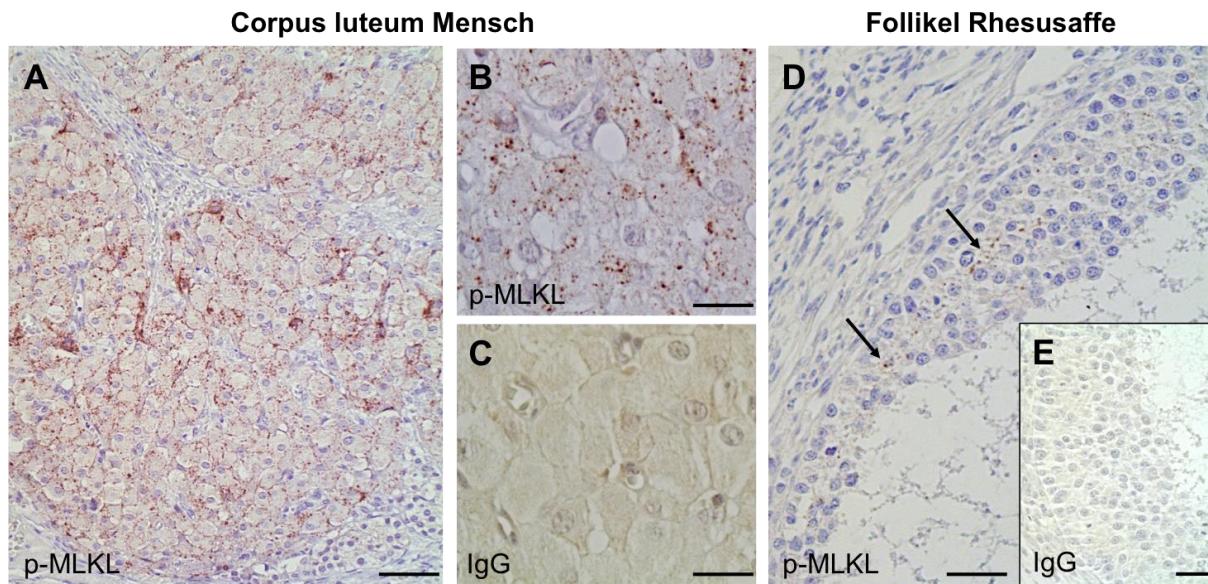


Abbildung 20: Identifikation von p-MLKL in ovariellem Gewebe des Menschen und des Rhesusaffen. (A und B) Die Zellen des humanen *Corpus luteum* sind in einer immunohistochemischen Färbung positiv für p-MLKL. (C) Die IgG-Kontrolle zeigt keine Färbung. (D) In großen antralen Follikeln des Rhesusaffen zeigen die Granulosazellen eine positive Färbung für p-MLKL. (E) Die IgG-Kontrolle weist keine Färbung auf. Die Balken stehen für 100 µm (A) oder 40 µm (B bis E).

2.2.5 Mechanismus der Nekroptose-Induktion

Um Hinweise auf den Mechanismus, über den ARP zu einem verstärkten Auftreten von Nekroptose führt, zu erhalten, wurden 3 Präparationen humaner Granulosazellen mit Lipopolysaccharid (LPS; 10 µg/ml), einem TLR4 Ligand und TNF α (10 ng/ml) behandelt. In einer Konfluenzmessung konnte jedoch kein entscheidender Effekt dieser Stimulation beobachtet werden (Abb. 21A, B). Auch eine Messung der ROS-Bildung unter Verwendung des Farbstoffs DCFH₂-DA (2-,7-Dichlordihydrofluoresceindiacetat) in humanen Granulosazellen unter ARP-Behandlung (50 ng/ml) über 5 h hinweg konnte keine Veränderung im Vergleich zur mit einem Kontrollpeptid behandelten Kontrolle aufzeigen ($n = 3$; Abb. 21C).

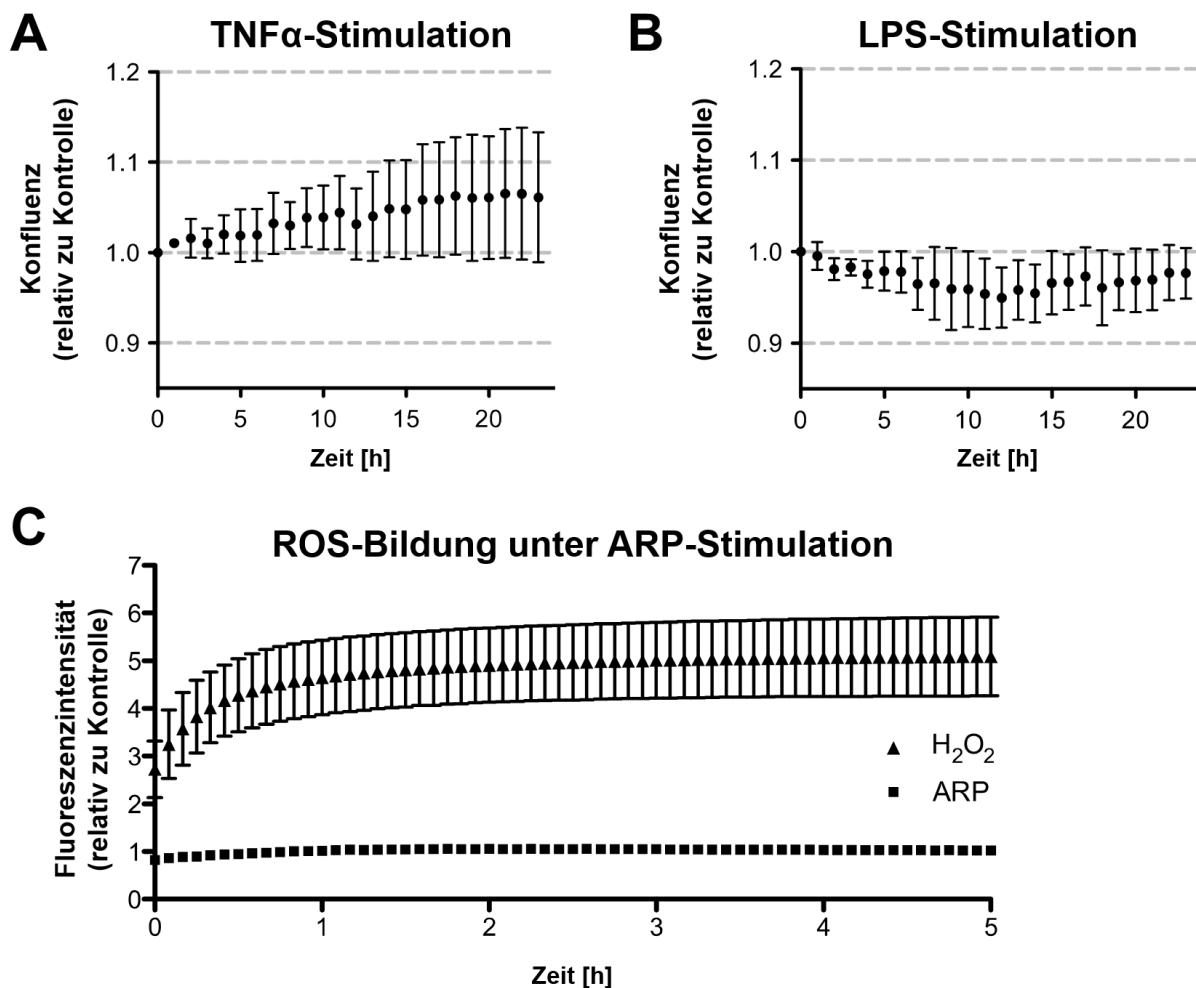


Abbildung 21: Konfluenz und ROS-Messungen mit humanen Granulosazellen. (A) TNF α (10ng/ml) hat über einen Zeitraum von 24 h keinen Effekt auf die Konfluenz humaner Granulosazellen. (B) Eine Behandlung mit LPS (10 μ g/ml) über 24 h wirkt sich nicht auf die Konfluenz humaner Granulosazellen aus. (C) Mittels einer DCF-Fluoreszenzmessung lässt sich während einer ARP-Behandlung (50 ng/ml) über 5 h lässt keine vermehrte ROS-Bildung in humanen Granulosazellen beobachten. H₂O₂ (1 mM) dient hier als Positivkontrolle. Alle Werte der einzelnen Messzeitpunkte wurden auf die Kontrolle (Scr, 50 ng/ml) normiert und sind als Mittelwert \pm S.E.M. von n = 3 (A und B) oder n = 6 (C) unabhängigen Präparationen aus zusammengeführten Zellen von jeweils zwei bis fünf Patientinnen dargestellt.

2.3 AChE und das Polyzystische Ovar-Syndrom

Um eine eventuelle Rolle der AChE in der Pathologie von PCOS zu untersuchen, wurden zunächst Follikelflüssigkeiten von PCOS-Patientinnen mit denen von nicht-PCOS-Patientinnen verglichen. In den Follikelflüssigkeiten beider Gruppen konnte das AChE-Protein mittels Western Blot und einem gegen AChE gerichteten Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 22A).

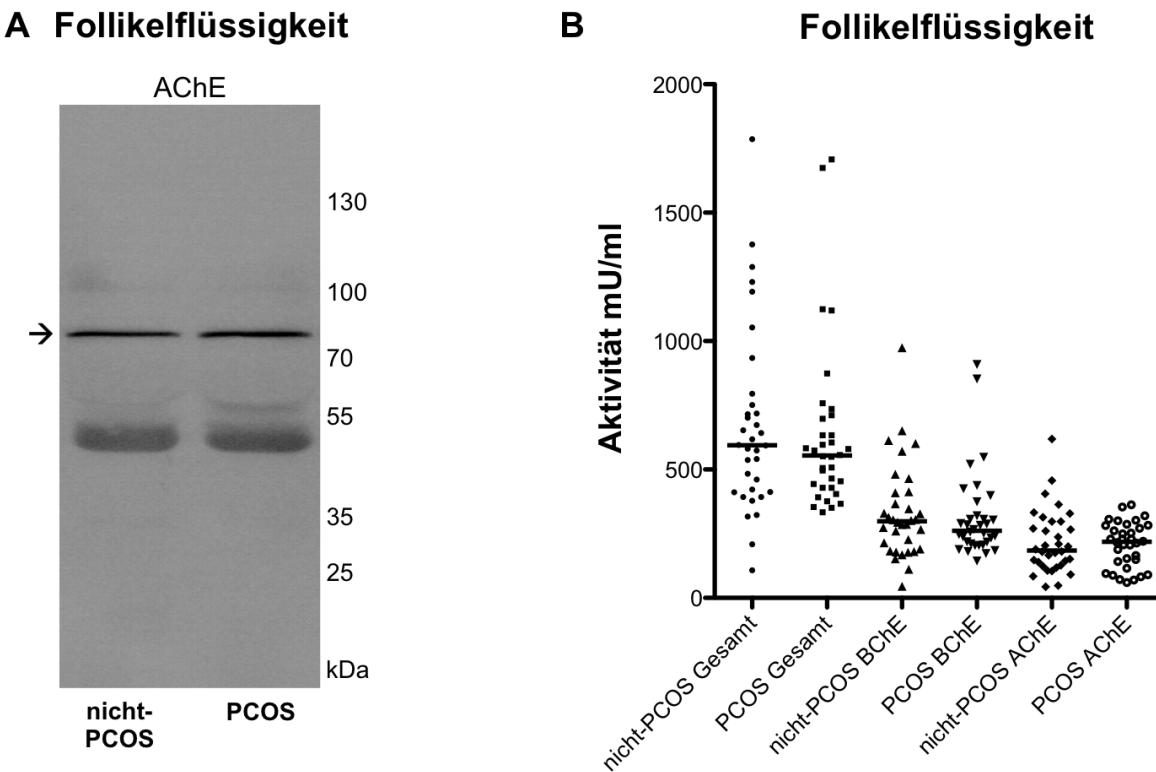


Abbildung 22: Vergleich der AChE-Proteinmenge und Aktivität in Follikelflüssigkeit von nicht-PCOS und PCOS-Patientinnen. (A) Identifikation des AChE-Proteins in humaner Follikelflüssigkeit von nicht-PCOS- und PCOS-Patientinnen mittels eines Western Blots. Der Pfeil zeigt die erwartete Bandenhöhe (82 kDa). (B) Mit dem Ellman-Assay gemessene Gesamt-, AChE- und BChE-Aktivität in humaner Follikelflüssigkeit von nicht-PCOS- (Gesamtaktivität: 594 mU/ml; BChE: 298 mU/ml; AChE: 185 mU/ml) und PCOS-Patientinnen (Gesamtaktivität: 554 mU/ml; BChE: 262 mU/ml; AChE: 218 mU/ml). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen gemessen werden ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis, Dunn). Dargestellt sind die individuellen Messwerte und der Median von $n = 34$ Follikelflüssigkeiten verschiedener Patientinnen je Gruppe.

Eine Aktivitätsmessung von Follikelflüssigkeiten mittels Ellman-Assay konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen (nicht-PCOS, PCOS) bezüglich der Gesamt-, BChE- und AChE-Aktivität aufzeigen (Abb. 22B). Es wurden in jeder Gruppe Follikelflüssigkeiten von 34 Patientinnen untersucht.

Neben den Follikelflüssigkeiten wurden auch Granulosazellen von nicht-PCOS- und PCOS-Patientinnen mittels qPCR auf mRNA-Basis verglichen. Es wurden hierzu spezifische Primer für AChE-S, AChE-R und ColQ verwendet. Als Referenzgene dienten das 60S ribosomale Protein L-19 und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). Die verarbeitete RNA wurde direkt nach der Präparation der Zellen (Tag 0) isoliert. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen identifiziert werden (Abb. 23A, B, C).

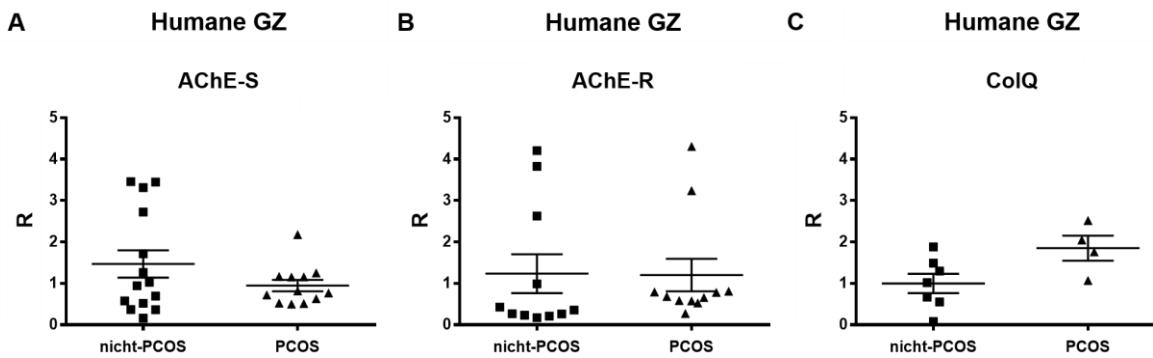


Abbildung 23: Vergleich der AChE-S-, AChE-R- und ColQ-Expression von nicht-PCOS und PCOS-Patientinnen. (A) Vergleich der AChE-S mRNA Spiegel von Granulosazellen an Tag 0. (B) Vergleich der AChE-R-mRNA-Spiegel von Granulosazellen an Tag 0. (C) Vergleich der ColQ-mRNA-Spiegel von Granulosazellen an Tag 0. Alle Werte sind auf den Mittelwert der nicht-PCOS-Patientinnen normiert und dargestellt als individuelle Messwerte und Mittelwerte \pm S.E.M. von $n = 11$ (A), $n = 14/12$ (B) und $n = 7/4$ ($p > 0,05$; t -Test) unabhängigen Präparationen aus zusammengeführten Zellen von jeweils zwei bis fünf Patientinnen je Gruppe. Als Referenzgene dienten das ribosomale Protein L-19 und GAPDH.

Neben den mRNA-Konzentrationen wurde auch die Reaktion der Granulosazellen auf eine ACh-Stimulation ($10 \mu\text{M}$) hin untersucht und Zellen von nicht-PCOS-Patientinnen mit denen von PCOS-Patientinnen verglichen. Mittels einer Konfluenzmessung konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ermittelt werden (Abb. 24A, B, C).

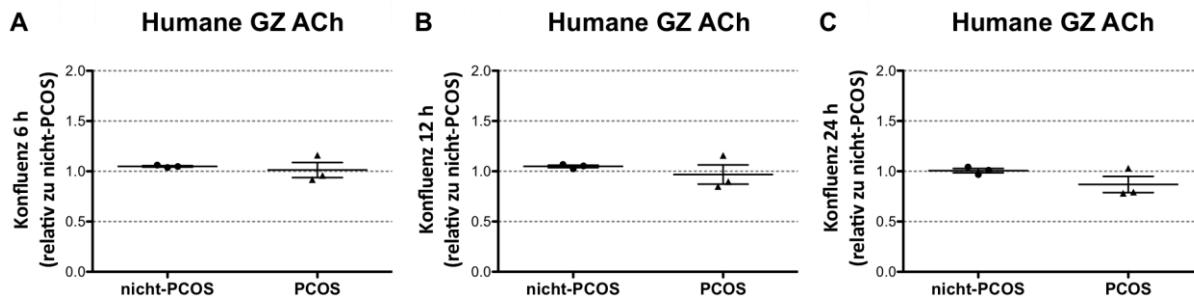


Abbildung 24: Konfluenz unter ACh-Behandlung von Granulosazellen von nicht-PCOS- und PCOS-Patientinnen. Darstellung der Konfluenz (relativ zu nicht-PCOS) kultivierter humaner Granulosazellen nach einer 6 h (A), 12 h (B) und 24 h (C) Behandlung mit ACh ($10 \mu\text{M}$). Alle Werte dargestellt als individuelle Messwerte und Mittelwerte \pm S.E.M. von $n = 3$ unabhängigen Präparationen aus zusammengeführten Zellen von jeweils zwei bis fünf Patientinnen ($p > 0,05$; t -Test).

2.4 AChE im Ovar der Ratte

Um die Präsenz von AChE im Ovar auch in anderen Spezies wie der Ratte zu untersuchen, wurden zunächst Ovarien der Ratte mittels Ellman-Assay auf Cholinesteraseaktivität hin

untersucht (Abb. 25A). Sowohl BChE- und AChE-Aktivität als auch der Proteingehalt der Ovarlysate von je einem Ovar aus 4 verschiedenen Tieren wurde gemessen. Die gemessene Aktivität wurde auf den Gesamtproteingehalt der Proben normiert. Es konnte sowohl AChE- als auch BChE-Aktivität in den Lysaten gemessen werden, wobei die gemessene BChE-Aktivität höher ausfiel als die der AChE (BChE: 19 ± 1 mU/mg Gesamtprotein; AChE: $3 \pm 0,2$ mU/mg Gesamtprotein; Werte als Mittelwert \pm S.E.M.).

Zusätzlich zu den Ovarien wurde auch die aus der Ratte stammende Granulosazell-Linie GFSHR17 kultiviert und für weitere Untersuchungen verwendet. Mit einem spezifischen Antikörper gegen AChE der Ratte war ein immunologischer Nachweis von AChE in GFSHR17-Zelllysaten im Western Blot möglich (Abb. 25B). Eine spezifische Proteinbande bei 82 kDa konnte detektiert werden, welche im Präadsorptionsexperiment nicht auftrat. Neben dem AChE Protein konnte auch AChE-mRNA mittels RT-PCR und Sequenzierung in GFSHR17 Zellen identifiziert werden (Abb. 25C). Um das gewünschte RT-PCR Produkt zu erhalten war hier ein weiterer PCR Schritt mit semi-nested PCR-Primern notwendig. Es folgte eine Überprüfung des Produkts mittels Sequenzierung und BLAST Software.

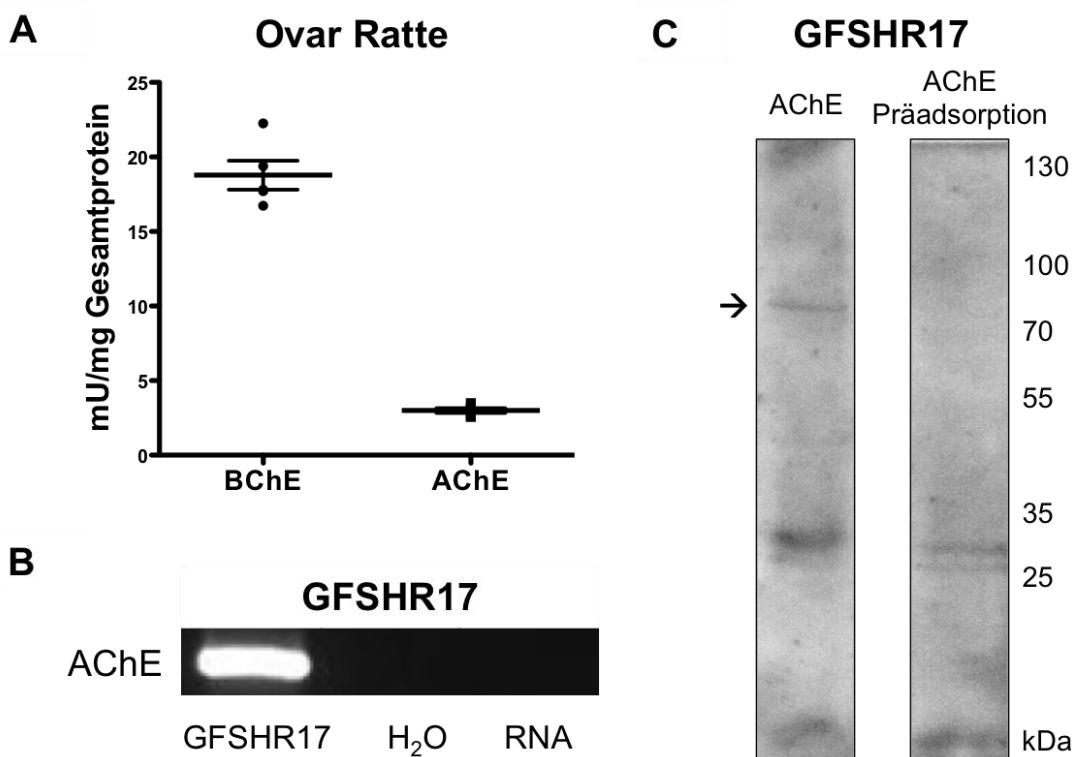


Abbildung 25: AChE im Ovar und Granulosazellen der Ratte. (A) Mittels Western Blot konnte das AChE Protein in GFSHR17-Zellen nachgewiesen werden. Der Pfeil zeigt die erwartete Bandenhöhe (82 kDa) an. (B) Unter der Verwendung von RT-PCR und Sequenzierung konnte AChE-mRNA in den GFSHR17-Zellen identifiziert werden. Die Wasser- und RNA-Kontrolle sind negativ. (C) Lysate von Ovarien der Ratte zeigen im Ellman-Assay sowohl BChE- als auch AChE-Aktivität. Die Werte sind auf das Gesamtprotein normiert und als individuelle Messwerte

und Mittelwert \pm S.E.M. von $n = 4$ Ovarien unterschiedlicher Versuchstiere dargestellt (BChE: 19 ± 1 mU/mg; AChE: $3 \pm 0,2$ mU/mg).

Mit Ovargewebe der Ratte wurden ebenfalls immunhistologische Färbungen durchgeführt. Hierbei wurde ein Antikörper gegen alle AChE-Varianten der Ratte verwendet. Die Granulosazellen in den verwendeten Schnitten waren positiv für AChE (Abb. 26A). In der Präadsorptionskontrolle waren die Granulosazellen negativ für AChE (Abb. 26B). Auch bei Verwendung eines gegen ChAT gerichteten Antikörpers zeigte sich in Granulosazellen der antralen Follikel eine Färbung (Abb. 26C). Diese trat in der Serumkontrolle nicht auf (Abb. 26D).

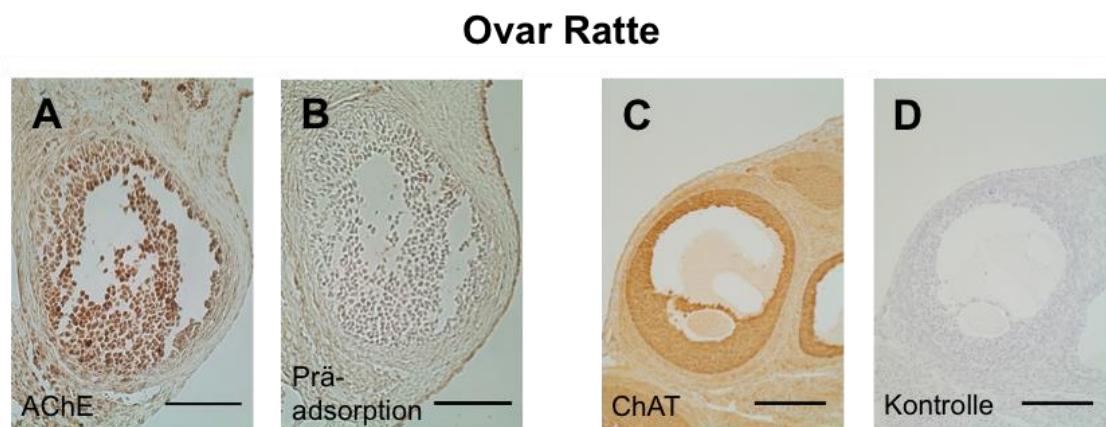


Abbildung 26: Immunhistochemischer Nachweis von AChE und ChAT in ovariellem Gewebe der Ratte. (A) Granulosazellen eines antralen Follikels der Ratte zeigen eine spezifische Färbung für AChE. (B) Die Präadsorptionskontrolle fällt negativ aus. (C) In den Follikeln zeigen Granulosazellen eine spezifische Färbung für ChAT. (D) Die entsprechende Serumkontrolle fällt negativ aus. Die Balken implizieren $100 \mu\text{m}$.

3 Diskussion

3.1 AChE als Teil des ovariellen cholinergen Systems

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal die Anwesenheit von AChE im humanen Ovar näher beschrieben werden. Die AChE fügt sich somit in das schon in vorangegangenen Arbeiten beschriebene nicht-neuronale cholinerge System (Abb. 3) des Ovars ein. Zum einen stellt sich die AChE als regulatorischer Faktor mit enzymatischer Aktivität, welcher die Wirkung des ACh lokal und zeitlich eingrenzt, dar und zum anderen als Signalmolekül mit nicht-enzymatischer Wirkung, das in die Entwicklung der Granulosazellen im Follikel und *Corpus luteum*

einzu greifen scheint. Somit liefert diese Arbeit einen Einblick in einen weiteren entscheidenden Teil des ovariellen cholinergen Systems (Abb. 27).

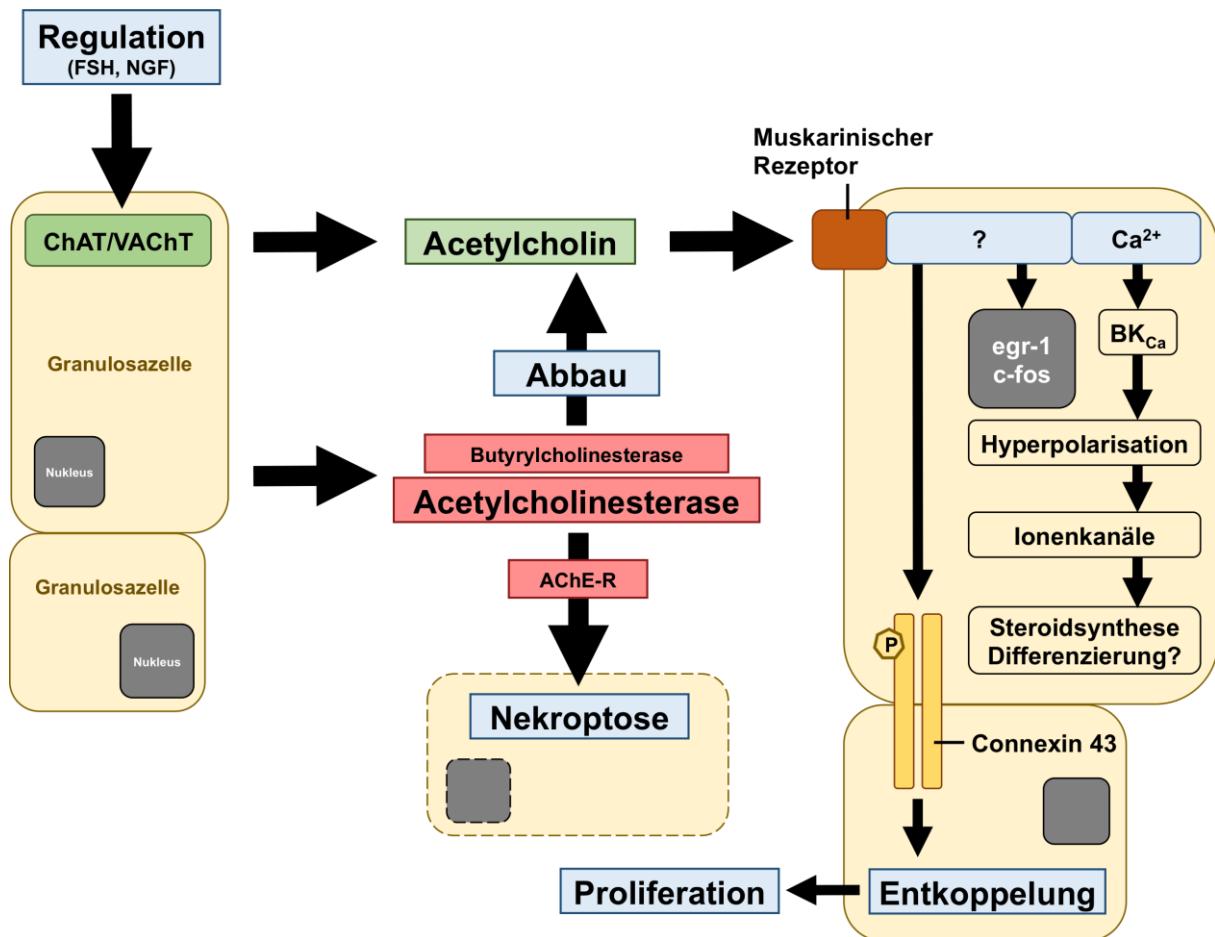


Abbildung 27: Schematische Darstellung des erweiterten ovariellen nicht-neuronalen cholinergen Systems. Die beiden von den Granulosazellen gebildeten Enzyme Acetylcholinesterase und Butyrylcholinesterase können das gebildete Acetylcholin abbauen und somit dessen Wirkung eingrenzen. Neben der enzymatischen Wirkung kann die „readthrough“-Variante der AChE (AChE-R) über einen nicht-enzymatischen Mechanismus in den Granulosazellen eine Form des Zelltods (Nekroptose) auslösen. Acetylcholin wird durch Cholinacetyltransferase (ChAT) in den Granulosazellen synthetisiert. Der vesikuläre Acetylcholintransporter VACHT ermöglicht den Granulosazellen die Sekretion des Acetylcholins. Über muskarinische M1/M5-Rezeptoren der Granulosazellen kann es nahe seines Syntheseortes wirken und es kommt zu einem intrazellulären Anstieg des Ca²⁺-Spiegels. Dies kann zu einer Aktivierung der Ca²⁺-abhängigen BK_{Ca}-Kanäle führen und schließlich das Membranpotential und weitere spannungsabhängige Kanäle beeinflussen. Ebenso führt die Aktivierung der muskarinischen Rezeptoren zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren egr-1 und c-fos. Eine verstärkte Phosphorylierung (P) des Gap Junction Proteins Connexin 43 führt zu einer Verminderung der Kommunikation zwischen den Zellen, was wiederum zu einer vermehrten Zellproliferation führen kann. Wie die Synthese und Speicherung des Acetylcholins reguliert wird, ist noch nicht eindeutig geklärt. Allerdings konnte neben der in einer vorherigen Arbeit gezeigten Wirkung des FSHs in dieser Arbeit NGF als ein die Synthese des Acetylcholins fördernder Faktor identifiziert werden (Mayerhofer und Kunz, 2005).

Die vorliegenden Messdaten der AChE-Aktivität in der Follikelflüssigkeit (Abb. 5A) und der Lysate der Granulosazellen (Abb. 6A), lassen darauf schließen, dass aktive AChE im Gegensatz zur BChE größtenteils lokal im Follikel und dem *Corpus luteum* synthetisiert wird. Zum einen, da in den Zelllysaten fast ausschließlich AChE-Aktivität zu messen war, und zum anderen, da die absoluten Aktivitätswerte der AChE (251 ± 26 mU/ml) in der Follikelflüssigkeit um ein Vielfaches höher liegen als jene Werte, welche in der Literatur für das Blutplasma genannt werden (Garcia-Ayllon et al., 2012). Die Plasmawerte liegen lediglich bei etwa 30 mU/ml. Die Aktivität der BChE im Blutplasma hingegen liegt in der Literatur im Vergleich zu den gemessenen Werten der Follikelflüssigkeit meist deutlich höher (Eddleston et al., 2008; Yang et al., 2013c). Es konnte ein Nachweis des BChE-Proteins und der BChE-mRNA in Lysaten humaner Granulosazellen erbracht werden. Dennoch wäre es möglich, dass die BChE in der Follikelflüssigkeit zu größeren Teilen aus dem Blutkreislauf stammt, da sich Plasmaproteine wie Albumin oder Serotransferrin ebenfalls in der Follikelflüssigkeit nachweisen lassen (Twigt et al., 2012). Bezuglich der AChE weisen die vorliegenden Daten hingegen eher darauf hin, dass diese hauptsächlich lokal produziert wird. Dies lässt die Granulosazellen als lokalem ACh-Produzenten eine große Rolle im Rahmen des ovariellen cholinergen Systems zukommen. Neben der Enzym-Aktivität konnten auch spezifische Nachweise des AChE-Proteins in humaner Follikelflüssigkeit und humanen Granulosazellen erbracht werden (Abb. 5B, 6B). Diese Daten untermauern die gefundene Aktivität in den entsprechenden Proben. Die unterschiedlichen Eigenschaften (Legay, 2000; Meshorer und Soreq, 2006) der drei Varianten der AChE (Abb. 7A), welche in den kultivierten Granulosazellen identifiziert wurden, lassen vermuten, dass dieses Enzym unterschiedliche Aufgaben im Follikel und im *Corpus luteum* erfüllt. So kann AChE-S zum Beispiel lokal gebunden werden (Bernard et al., 2011) und lokal produziertes ACh schnell abbauen, während AChE-R als lösliches Monomer eher Züge eines Signalmoleküls besitzt. Die Identifikation der ColQ-mRNA (Abb. 7B) in humanen Granulosazellen lässt vermuten, dass die gebildete AChE-S und BChE zumindest teilweise durch dieses Protein an die extrazelluläre Matrix im Follikel und *Corpus luteum* gebunden wird. Dies hätte zur Folge, dass die AChE an ihrem Syntheseort verbleiben kann und das lokal produzierte ACh aufgrund der räumlichen Nähe schnell abgebaut werden kann (Bernard et al., 2011). Die durchgeführten immunhistochemischen Färbungen sind ein Beleg dafür, dass das cholinerge System einschließlich der AChE auch *in vivo* vorhanden ist (Abb. 8). Hier scheinen AChE und ChAT sowohl im Follikel als auch im *Corpus luteum* von Bedeutung zu sein. Auch in ovariellem Gewebe des Rhesusaffen war ein Nachweis dieser beiden Gegenspieler möglich

(Abb. 9). Dies wiederum ist ein Hinweis darauf, dass das in dieser Arbeit beschriebene System sich nicht nur auf den Menschen beschränkt ist, sondern bei Primaten allgemein vorhanden ist. Die Konfluenzmessungen an kultivierten humanen Granulosazellen (Abb. 10) zeigen, dass das cholinerge System in diesen Primärzellen *in vitro* seine Funktionalität behält und sich dieses Zellmodell gut für die Erforschung dieses Systems eignet. Mit Blockern wie HupA kann dieses System pharmakologisch beeinflusst werden. Diese Tatsache macht HupA zu einem potentiellen Kandidaten, um gegebenenfalls auch *in vivo* die Regulation ovarieller Vorgänge zu beeinflussen. HupA hat sich als Medikament vor allem schon in der Erforschung der Alzheimer-Krankheit etabliert (Yang et al., 2013a). Seine Wirkungen werden allerdings auch in Bezug auf andere neurodegenerative Erkrankungen hin untersucht (Hao et al., 2009; Malkova et al., 2011). Die Ergebnisse der Konfluenzmessung der mit Atropin behandelten Granulosazellen (Abb. 10) unterstützen wiederum die in früheren Arbeiten (Fritz et al., 1999; Mayerhofer et al., 1992; Mayerhofer und Kunz, 2005) beschriebene Funktionalität muskarinischer Rezeptoren auf den humanen Granulosazellen und stellen diese als essenziellen Teil des ovariellen cholinergen Systems dar.

Neben der Identifizierung des ACh-abbauenden Enzyms AChE war es auch möglich, das ACh-synthetisierende Enzym ChAT zum einen in humanem ovariellem Gewebe (Abb. 9) und zum anderen auch in kultivierten Granulosazellen (Abb. 11) nachzuweisen. Hierbei konnte eine erhöhte Konzentration dieses Proteins in humanen Granulosazellen, welche mit NGF behandelt wurden, gemessen werden (Abb. 11). Im Nervensystem stellt NGF einen für das Überleben der Nervenzellen wichtigen Regulationsfaktor dar (Levi-Montalcini, 1987) und konnte auch im Ovar beschrieben werden (Linher-Melville und Li, 2013). Die in dieser Arbeit beobachtete Regulation lässt vermuten, dass neben dem in einer früheren Arbeit gezeigten FSH-Effekt (Mayerhofer et al., 2006) auch NGF Teil eines Regulationsmechanismus ist, dem das cholinerge System des Ovars unterliegt. Des Weiteren deutet diese Beobachtung darauf hin, dass dieses System nicht nur im Menschen, sondern auch in anderen Spezies vorhanden ist und auf ähnliche Art und Weise funktioniert, da diese Regulation von ChAT im bovinen System beschrieben wurde (Al-Zi'abi et al., 2009). In dieser Arbeit wurde neben dem humanen Material und dem Material des Rhesusaffen auch Gewebe der Ratte untersucht. Hier konnten AChE und ChAT ebenfalls in ovariellem Gewebe nachgewiesen werden (Abb. 26). Diese Daten, der Nachweis von AChE Aktivität im Ovar der Ratte und der Nachweis der AChE in einer Granulosazelllinie der Ratte (Abb. 25), sind ein weiterer Hinweis darauf, dass das hier beschriebene cholinerge System neben dem Primaten auch in weiteren Spezies vorhanden ist. Die im Ovar der Ratte gemessene Aktivität der BChE fällt höher aus als die der AChE. Jedoch

zeigen noch nicht veröffentlichte Daten (Urra, et al. 2015; s. 7.1 Originalarbeiten), dass die mRNA der AChE in den Granulosazellen stärker vertreten ist als im umliegenden Gewebe. Dies macht die AChE zu einem interessanten Ziel, um Vorgänge im Follikel und in den Granulosazellen zu beeinflussen. Eine Blockierung der AChE mittels HupA führte in der Ratte zu einer Veränderung der Follikelentwicklung und zu einer erhöhten ACh-Konzentration im Ovar. Diese noch nicht veröffentlichten Daten zeigen zum einen, dass AChE ein potentielles Ziel darstellt, um Abläufe im Follikel *in vivo* zu beeinflussen und zum anderen, dass HupA hierfür ein geeignetes Mittel ist.

3.2 AChE-R und Nekroptose

Es sind bereits mehrere Stimuli bekannt, die den regulierten nekrotischen Zelltod auslösen können (Galluzzi et al., 2012; Linkermann und Green, 2014; Vanlangenakker et al., 2012), zu denen nun auch AChE-R gezählt werden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass AChE-R über einen RIPK1/MLKL-abhängigen Mechanismus regulierte Nekrose (Nekroptose) auslösen kann. Diese Form des Zelltods wurde bisher noch nicht in primären humanen Granulosazellen beschrieben.

Die AChE wurde auch schon in anderen Arbeiten mit dem Auftreten des Zelltods in Verbindung gebracht (Kehat et al., 2007; Zhang und Greenberg, 2012). In HeLa-Zellen, Endothelzelllinien und primären glatten Muskelzellen der Aorta der Ratte zum Beispiel scheint AChE bei der TNF α -induzierten Apoptose eine Rolle zu spielen. Die vornehmlich auftretende Form in den apoptotischen Zellen war hier die AChE-S-Variante, durch deren pharmakologische Hemmung das Auftreten der Apoptose verhindert werden konnte (Zhang et al., 2002). In Neuronen konnte der N-terminal-verlängerten N-AChE-S eine Apoptose-fördernde Wirkung zugeschrieben werden (Toiber et al., 2008). AChE-R wiederum konnte schon in Verbindung mit verstärktem Auftreten der Apoptose bei männlichen Keimzellen während der Spermatogenese gebracht werden. Der Mechanismus über den AChE-R Einfluss auf die Spermatogenese nehmen kann, wurde mit einem Interaktionspartner der AChE-R, dem Gerüstprotein RACK1 (receptor of activated C kinase 1) und dem glykolytischem Enzym Enolase- α in Verbindung gebracht (Mor et al., 2008). In den meisten Arbeiten dient jedoch die Methode der TUNEL-Färbung dem Nachweis der Apoptose. Diese Methode muss allerdings nicht zwangsläufig spezifisch für Apoptose sein (Grasl-Kraupp et al., 1995; Rodgers und Irving-Rodgers, 2010).

AChE-R konnte sowohl auf mRNA- (Abb. 7A) als auf auch Protein-Ebene (Abb. 6B) in humanen Granulosazellen sowie immunhistochemisch in humanem Gewebe (Abb. 8) und in

Gewebe des Rhesusaffen (Abb. 9) nachgewiesen werden. Somit kann auch auf die Präsenz von AChE-R geschlossen werden. Des Weiteren bringen in dieser Arbeit morphologische Beobachtungen (Abb. 12, 13), Messung der LDH-Freisetzung (Abb. 16), Caspase-Aktivitätsmessungen (Abb. 15), die Verwendung des hitzeinaktivierten ARPs und des Kontrollpeptids sowie die Verwendung von Nek-1 und NSA (Abb. 17) die AChE-R-Variante *in vitro* eindeutig mit dem Vorgang der Nekroptose in Verbindung. Neben den ARP-Effekten auf humane Granulosazellen konnten auch die für die Nekroptose entscheidenden Faktoren RIPK1, RIPK3 und MLKL in diesen Zellen nachgewiesen werden (Abb. 18). Ebenso wurde eine verstärkte Phosphorylierung von MLKL unter ARP-Behandlung beobachtet (Abb. 19), was einen starken Hinweis auf die Involvierung von MLKL-abhängiger Nekroptose gibt (Linkermann und Green, 2014). Der Nachweis von phosphoryliertem MLKL in ovariellem Gewebe (Abb. 20) legt nahe, dass neben der Apoptose auch Nekroptose *in vivo* im Ovar des Primaten auftritt. Die Beobachtung, dass Nek-1 und NSA auch die basale Zytotoxizität senken können (Abb. 17B, 17D) sowie die Beobachtung, dass die beobachtete Morphologie des ARP-regulierten Zelltods auch in geringer Zahl in den Kontrollgruppen zu beobachten war (Abb. 13), lassen den Schluss zu, dass Nekroptose auch basal in humanen Granulosazellen auftritt. Der immunhistochemische Nachweis von phosphoryliertem MLKL in humanem Gewebe (Abb. 20) unterstützt diese Vermutung zusätzlich. Neben dem basalen Auftreten der Nekroptose weist die Behandlung der Zellen mit dem Pan-Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK auch auf einen gewissen Grad an Apoptose in den unbehandelten Zellen hin. Auch wenn ein basales Auftreten des Zelltods durch die Zellkulturbedingungen begünstigt werden könnte, lassen die vorhandenen Daten darauf schließen, dass mehrere Arten des Zelltods in der Biologie der humanen Granulosazellen eine Rolle spielen. Die Beobachtung von Granulosazellen mit den morphologischen Merkmalen der Apoptose und der Nekrose im bovinen Ovar (Irving-Rodgers et al., 2001) stützt diese Ansicht.

Die regulierte Nekrose (Nekroptose) steht unter anderem in näherem Zusammenhang mit einigen humanen Krankheiten (Galluzzi et al., 2012; Linkermann und Green, 2014). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Nekroptose eine bisher unbeachtete Form des Zelltods in ovariellen Zellen und somit auch einen Teil der ovariellen Physiologie darstellt. Nekroptose könnte in grundlegende Vorgänge wie Atresie oder Luteolyse involviert sein. Hierauf weist der Nachweis von p-MLKL in antralen Follikeln des Rhesusaffen (Abb. 20) hin. Diese Annahme passt zu der Beobachtung nekrotischer Zellen in *Drosophila*-Ovarien (Pritchett et al., 2009) und der Nekrose von Granulosazellen in Säugetierfollikeln (Rodgers und Irving-Rodgers, 2010).

Wie genau AChE-R/ARP in Granulosazellen Nekroptose induzieren kann, ist noch nicht geklärt. Aufgrund vorheriger Studien lässt sich vermuten, dass hierbei RACK1 (Mor et al., 2008) oder auch TLR und andere Todesrezeptoren von Bedeutung sind (He et al., 2009; Zhang et al., 2009). Zwar besitzen Granulosazellen TLR4-Rezeptoren (Price et al., 2013), doch weder Lipopolysaccharide als TLR4-Liganden noch TNF α waren in der Lage, in Granulosazellen Nekroptose zu induzieren (Abb. 21). Auch die ROS- (reactive oxygen species) Bildung (McCall, 2010) blieb in Granulosazellen über fünf Stunden unter ARP-Stimulation unverändert. AChE-R wird häufig mit Stress in Verbindung gebracht, da deren Expression durch oxidativen Stress verstärkt werden kann (Härtl et al., 2011; Zimmermann, 2013).

Kultivierte Granulosazellen stellen nicht nur ein Modell für den großen präovulatorischen Follikel, sondern auch für das *Corpus luteum* dar. In beiden Systemen, dem Follikel und dem *Corpus luteum*, ist das Absterben von Zellen unerlässlich, um die Funktionalität des Ovars aufrecht zu erhalten. Die Atresie vieler Follikel ermöglicht die Selektion einiger weniger dominanter Follikel. Die Regression des *Corpus luteum* ist notwendig, um einen neuen ovariellen Zyklus zu beginnen. Es wird angenommen, dass die Apoptose die treibende Kraft hinter der Luteolyse darstellt (Devoto et al., 2009; Rodgers und Irving-Rodgers, 2010). Im Gegensatz zur Atresie ist im Falle der Luteolyse die Apoptose bis heute die einzige beschriebene Form des auftretenden Zelltods (Devoto et al., 2009; Shikone et al., 1996). Im Follikel und im *Corpus luteum* steht das dortige cholinerge System im Zusammenhang mit trophischen Effekten (Al-Zi'abi et al., 2009; Mayerhofer und Kunz, 2005). Die zellbiologischen Beobachtungen dieser Arbeit erweitern das vorhandene Modell und zeigen auf, dass AChE als ACh-abbauendes Enzym eine wichtige Rolle in diesem System einnimmt. Hinzu kommt der nicht-enzymatische AChE-R-Effekt, der eine weitere Komponente des cholinergen Systems des Ovars darstellt.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen dieser Arbeit gehen die enzymatische Aktivität der AChE und die Nekroptose als neue pharmakologische Ziele zur Beeinflussung der Ovarfunktion hervor. So steigt zum Beispiel der AChE-R-Gehalt im Blut mit dem Alter an (Sklan et al., 2004). Des Weiteren ist die Inhibierung der AChE ein weit verbreiteter Ansatzpunkt in der Alzheimer-Forschung (Birks, 2006). Ein ähnlicher Ansatz könnte vielleicht auch bei der Einflussnahme auf ovarielle Funktionen Erfolg haben. Es wäre möglich, dass eine verstärkte trophische Wirkung des ACh die Zahl der atretischen Follikel mindert oder die Lebensdauer des *Corpus luteum* erhöht. Ebenso könnte die durch ACHE-R und andere Faktoren hervorgerufene Nekroptose in den Granulosazellen mit Nek-1 oder NSA „behandelt“ werden. Diese neu erschienenen Möglichkeiten könnten in Zukunft noch weiter untersucht werden.

(Linkermann und Green, 2014). Die Atresie der Follikel, deren Motor die Apoptose und vielleicht auch die Nekroptose ist, führt letztendlich zur Menopause der Frau (Matsuda et al., 2012; Richardson et al., 1987; Wallace und Kelsey, 2010). Falls das cholinerge System und die Nekroptose einen wichtigen Teil dieses Prozesses darstellen, könnten AChE-Inhibitoren oder Nekroptose-Inhibitoren die Depletion des Follikelpools und somit auch die Menopause hinauszögern.

3.3 Die Bedeutung der AChE für PCOS

Als eine der häufigsten Ursachen für weibliche Infertilität (Azziz et al., 2004; Knochenhauer et al., 1998; Solomon, 1999) war PCOS auch ein Aspekt dieser Arbeit. Mittels der Analyse der Follikelflüssigkeit von PCOS- und nicht-PCOS-Patientinnen bezüglich der AChE-Aktivität (Abb. 22), sowie der Untersuchung kultivierter humaner Granulosazellen der beiden Patientengruppen (Abb. 23), konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der PCOS-Gruppe und der nicht-PCOS-Gruppe aufzeigen. Allerdings konnte bei der Untersuchung der AChE-S-Expression (Abb. 23A) eine Tendenz für eine verminderte Expression bei PCOS-Zellen beobachtet werden. Eventuell wären hier eine größere Versuchsgruppe und ein differenzierterer Abgleich der Patientengruppen durch Kriterien wie Alter oder BMI (Body Mass Index) notwendig, um einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen nicht-PCOS und PCOS beobachten zu können. Ein solcher Unterschied könnte auch in Bezug auf den Zelltod der Granulosazellen von Interesse sein, da in einer aktuellen Arbeit der Zusammenhang von nicht-enzymatischen Effekten der AChE-S und Zelltod gezeigt werden konnte (Du et al., 2015). Beziüglich der Reaktion der Granulosazellen auf eine Stimulation mit ACh konnten *in vitro* keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen aufgezeigt werden (Abb. 24). Dies könnte sich allerdings durch die Zellkulturbedingungen, durch welche beide Zellgruppen unter gleichen Bedingungen kultiviert werden, kompensiert werden. In Bezug auf die AChE-Aktivität in den Follikelflüssigkeiten konnte auch eine weitere Eingrenzung der nicht-PCOS-Patientengruppe auf die Patientinnen, deren Behandlung lediglich aufgrund der Infertilität der Partners begründet war, zu keiner signifikanten Veränderung der Messdaten führen. Falls bei PCOS eine Fehlregulation des cholinergen Systems vorliegt, könnte diese nicht nur auf Seiten der AChE, sondern auch auf Seiten der ACh-Synthese vorliegen. In einer Studie, welche sich mit miRNAs in humaner Follikelflüssigkeit beschäftigt, konnte gezeigt werden, dass bei PCOS-Patientinnen eine veränderte Konzentration der miRNA-132, welche wiederum Einfluss auf die Expression der AChE-R nehmen kann, vorliegt (Hanin und Soreq, 2011; Sang et al., 2013). Dies weist darauf hin, dass es auch weitere Regulationsmechanismen gibt, welche nicht

Gegenstand dieser Arbeit sind. Es ist ebenfalls zu bedenken, dass das untersuchte Material ausschließlich von IVF-Patientinnen stammt, welche im Vorfeld der Follikelpunktion eine starke hormonelle Stimulation durchlaufen. Hierdurch könnten eventuelle Fehlregulationen des ovariellen cholinergen Systems kompensiert werden. So wird zum Beispiel das ACh-synthetisierende Enzym ChAT durch FSH reguliert (Mayerhofer et al., 2006). Die Tatsache, dass bereits gezeigt werden konnte, dass ovarielle Erkrankungen wie PCOS im Zusammenhang mit der Fehlregulation neuronaler Faktoren steht, lässt vermuten, dass auch ACh eine Rolle bei PCOS spielen könnte. Neben der veränderten Konzentration von Dopamin in humaner Follikelflüssigkeit (Saller et al., 2014) sind die Noradrenalkonzentrationen bei einem PCOS-Phänotyp in Mensch und Ratte verändert (Bernuci et al., 2013; Lara et al., 1993; Saller et al., 2012). Ein weiterer wichtiger neuronaler Faktor des Ovars ist NGF, welches unter anderem die ACh-Synthese in Granulosazellen zu regulieren scheint (Abb. 11). In einem PCOS-Rattenmodell konnte bereits gezeigt werden, dass eine vermehrte NGF-Synthese innerhalb des Ovars zu einer Hyperstimulation des ovariellen sympathischen Nervensystems führt. Dies steht wiederum im Zusammenhang mit ovarieller Zystenbildung (Lara et al., 2000), einem der Hauptkriterien des PCOS (Rotterdam, 2004). Somit konnten hier zwar keine Unterschiede zwischen PCOS- und nicht-PCOS-Patientinnen bezüglich der AChE ermittelt werden, doch lässt dies aufgrund der oben genannten Gründe nicht den Schluss zu, dass dies auf das gesamte ovarielle cholinerge System zutrifft. Hier wären weiterführende Studien notwendig, um einen vollständigen Einblick in dieses System zu erhalten.

4 Methoden und Material

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Isolierung und Kultivierung humaner Granulosazellen

Die verwendeten humanen Granulosazellen stammen aus Follikelpunktat von IVF-Patientinnen, deren Behandlung nach Standardprotokollen durchgeführt wurde (Praxis: Prof. Berg, A.R.T. Bogenhausen, München, Deutschland). Die Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München stimmte der Verwendung des humanen Materials für diese Arbeit zu (Projekt 323-05). Des Weiteren wurde eine schriftliche Zustimmung der Patientinnen eingeholt und die Proben anonymisiert. Punktate von zwei bis fünf Patientinnen wurden für die Präparation der nicht-PCOS-Zellen zusammengeführt. An dieser Stelle wurde das Material zur weiteren Untersuchung der Follikelflüssigkeit entnommen und nach einem

Zentrifugationsschritt (10000 rpm, 10 min) bei -20 °C gelagert. Punktate von PCOS-Patientinnen wurden nicht gepoolt. Unter Verwendung eines Filtersiebs (40µm Porengröße) wurde das Punktat zunächst filtriert. Hierbei wurden die Filtersiebe zunächst auf einem 50 ml Falconröhrchen positioniert. Anschließend wurden maximal 50 ml Punktat auf ein Filtersieb gegeben. Nach zweimaligem Spülen mit DMEM/Ham's F12 Medium wurden die im Filtersieb verbleibenden Granulosazellen mit DMEM/Ham's F12 Medium aus dem Filtersieb gespült und in 10 ml DMEM/Ham's F12 Medium pro Filtersieb aufgefangen. Die Zellsuspension wurde anschließend mittels einer Spritze mit aufgesetzter 0,9 mm Kanüle in 15 ml Röhrchen überführt und nachfolgend bei 900 rpm für 3 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium (DMEM/Ham's F12, 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin) aufgenommen und in entsprechenden Zellkulturgefäßen ausgesät. Der Tag der Präparation entspricht Tag 0 der Kultivierung. An Tag 1 wurden die Zellen mehrmals mit DMEM/Ham's F12 Medium gespült und anschließend weiter in Kulturmedium für maximal 6 Tage bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ Begasung kultiviert. Um die Zellen in andere Gefäße zu überführen oder definiert auszusäen wurde eine Trypsin/EDTA-Lösung verwendet. Nach 3-4 Minuten Inkubationszeit wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe der doppelten Menge an Kulturmedium gestoppt. Nach zweimaligem Waschen (Zentrifugation bei 900 rpm, 3 min) wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und in entsprechenden Kulturgefäßen ausgesät. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Zellen vor jeder Stimulation 2 h in zusatzfreiem DMEM/Ham's F12 Medium inkubiert und auch in zusatzfreiem DMEM/Ham's F12 Medium stimuliert. Das verwendete AChE-R spezifische Peptid (ARP; 1- GMQGPAGSGWEEGSGSPPGVTPLFSP-26) und ein entsprechendes Kontrollpeptid mit definierter Zusammensetzung und zufälliger Aminosäurenabfolge (Scr) wurde am Genzentrum der LMU München synthetisiert.

4.1.2 Kultivierung der GFSHR17-Zellen

Die GFSHR17-Zelllinie stellt eine stabile steroidogene Zelllinie aus der Ratte dar, welche ACh synthetisiert (Keren-Tal et al., 1993; Mayerhofer et al., 2006). Die Zellen wurden unter Verwendung von DMEM/Ham's F12 Medium mit 5 % FCS bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ Begasung kultiviert. Um die Zellen zu passagieren oder in andere Kulturgefäße zu überführen, wurden die Zellen durch Spülen mit DMEM/Ham's F12 Medium mechanisch von der Oberfläche gelöst und nach einem Waschschnitt (Zentrifugation bei 900 rpm, 3 min) in gewünschter Anzahl in einem neuen Gefäß ausgesät. Um die Zellen über längere Zeit zu lagern, wurde flüssiger Stickstoff für die Kryokonservierung verwendet. Das Zellaliquot in den verwendeten Einfrierröhrchen wurde nach der Entnahme aus dem Stickstoff in einem 37 °C

warmen Wasserbad aufgetaut und anschließend in 10 ml DMEM/Ham's F12 Medium mit 5 % FCS aufgenommen und bei 900 rpm für 3 min zentrifugiert, um das enthaltene DMSO zu entfernen. Daraufhin wurden die Zellen in Zellkulturschalen ausgesät.

4.1.3 Mykoplasmentest

Um eine Mycoplasmenkontamination der Zellen auszuschließen, wurde ein auf PCR basierender kommerziell erhältlicher Mykoplasmentest (Minerva, Berlin, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen 48 h kultiviert und der konditionierte Überstand mittels PCR auf Mycoplasmen-16S rRNA getestet.

4.1.4 Konfluenzmessung

Die Konfluenz der humanen Granulosazellen wurde unter Verwendung eines innerhalb des Zellkulturinkubators einsetzbaren Imagingsystems von Peqlab bestimmt, welches mittels integrierter Bildanalysesoftware die Konfluenz der beobachteten Zellen darstellen kann. Die Messungen über 24 h hinweg, bei denen alle 10 min ein Bild aufgenommen wurde, fanden zwischen Tag 1 und 4 der Kultur in 60 mm Zellkulturschalen statt. Die Konfluenz der beobachteten Zellen lag zu Beginn der Messung zwischen 20 und 40 %, wobei die Startwerte der Kontrolle und der behandelten Zellen nicht mehr als 3 % voneinander abwichen. Es wurde DMEM/Ham's F12 Medium mit 5 % FCS Gehalt für die Messungen verwendet. Die Konfluenzentwicklung bei Berechnung und Darstellung der Konfluenzänderung (Δ Konfluenz) war immer positiv. Kontrollzellen und behandelte Zellen wurden parallel aufgezeichnet.

4.1.5 Live Cell Imaging

Nachdem die zu beobachtenden Zellen in spezielle Kulturschalen mit Glasboden (μ Dish) überführt wurden, konnten sie in einem inversen Lichtmikroskop, welches mit einer Inkubationskammer, die konstante Bedingungen bei einer Temperatur von 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ Konzentration bietet, für 24 h beobachtet werden. 100 bis 200 Zellen wurden in jedem Experiment berücksichtigt. Die Bilder wurden mit einer digitalen Mikroskopkamera aufgenommen und mit Hilfe der Micro-Manager 1.3 Software (www.micro-manager.org; 29.07.15) analysiert. Aufgrund der Zahl der vitalen Zellen zu Beginn der Messung und der Anzahl der Zelltode (manuelle Auszählung nach visuellen Kriterien) bis zum Ende der Messung konnte der prozentuale Anteil der Zelltode ermittelt werden.

4.1.6 CASY-Zellzählung

Das CASY-Messsystem erfasst und zählt Zellen mittels der elektrischen Widerstandsänderung und Volumenverdrängung, die beim Durchtritt einer Zelle durch die verbaute Messspore stattfindet. Mit diesen Parametern und einem vorher festgelegten Messprofil kann auf die Anzahl, Größe und Vitalität der Zellen in der untersuchten Probe geschlossen werden. Für optimale Messergebnisse wurden die Zellen in 10 ml Casyton entsprechend dem Messbereich verdünnt.

4.1.7 Caspase-Assay

Die Aktivität der Effektorcaspase 3/7 dient in kultivierten Zellen als Apoptoseindikator und wurde mittels dem auf Lumineszenz basierenden Caspase-Glo Assaysystem von Promega bestimmt. Nach der Zelllyse wird ein vorgelegtes Substrat von zellulärer Caspase 3/7 abgebaut. Das hiebei entstandenen Produkt dient wiederum der zugesetzten Luziferase als Substrat, wodurch ein messbares Lumineszenzsignal entsteht. Die Zellen wurden für die Caspase 3/7-Aktivitätsmessung in 96-Wellplatten ausgesät und die Lumineszenz nach 5 h Stimulation in Triplikaten an einem Photometer bestimmt.

4.1.8 LDH-Assay

Die isolierten Granulosazellen wurden in transparenten 96-Wellplatten ausgesät, um die zytotoxische Wirkung verschiedener Substanzen auf die Zellen zu erfassen. Hierbei wurde ein auf Laktatdehydrogenase (LDH) basierender Zytotoxizitätsassay der Firma Thermo Scientific verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. LDH, welche nur bei Schädigung der Zellmembran in das Kulturmedium gelangen kann, wird mit diesem Assay in den Zellkulturüberständen der zu untersuchenden Zellen erfasst. Es wird Diaphorase eingesetzt, die in einer Folgereaktion der LDH das eingesetzte farblose Tetrazolium zu rotem Formazan reduziert. Diese Farbreaktion kann bei einer Wellenlänge von 492 nm und 690 nm (Hintergrund) in einem Photometer gemessen werden. Jede Messung wurde in Triplikaten durchgeführt.

4.1.9 ROS-Assay

Um eine Bestimmung der ROS-Bildung durch kultivierte humane Granulosazellen durchzuführen, wurde eine auf dem Farbstoff DCFH₂-DA basierende Methode angewandt (Saller et al., 2014). Hierbei wird DCFH₂-DA durch intrazelluläre ROS, wie zum Beispiel H₂O₂, zu dem fluoreszierenden Farbstoff DCF (2-, 7-Dichlorfluorescein) hydrolysiert. Die

Fluoreszenz kann bei 520 nm Wellenlänge unter Anregung bei einer Wellenlänge von 485 nm gemessen werden. Die in einer schwarzen 96-Well-Platte ausgesäten Zellen wurden 30 min vor der Messung bei 37 °C mit DCFH₂-DA (10 µM) beladen und anschließend mit dem entsprechenden Stimulanz oder der Kontrolle behandelt. Die ROS-Bildung wurde anschließend 5 h lang in einem Fluorimeter bei 37 °C verfolgt. Die erhaltenen Fluoreszenzwerte wurden schließlich auf die Kontrolle normiert.

4.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.1 Ellman-Assay

Dieser enzymatische Assay basiert auf einem etablierten Assay zur Bestimmung der Esterase-Aktivität in biologischem Probenmaterial (Ellman et al., 1961; Thullberg et al., 2005) und wurde leicht abgewandelt. Der zu untersuchenden Probe wird Acetylthiocholinjodid (ATC; 1,5 mM) zugesetzt, welches durch Esterasen gespalten werden kann. Sind Esterasen vorhanden, kann die frei werdende Thiolgruppe des ATC mit der ebenfalls zugesetzten 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoësäure (DTNB; 0,6 mM) reagieren und es entsteht der gelbe Farbstoff 2-Nitro-5-thiobenzoat. Der so verursachte Farbumschlag in der Probe kann mittels Absorptionsmessung bei 405 nm in einem Photometer verfolgt werden. Der AChE Inhibitor BW284c51 (0,1 mM) und der BChE Inhibitor Tetra-isopropylpyrophosphoramid (iso-OMPA; 0,1 mM) wurden eingesetzt um neben der Gesamtaktivität auch die AChE und BChE Aktivität bestimmen zu können. Absolute Werte konnten durch die Verwendung eines AChE-Standards (*Electrophorus electricus*) berechnet werden. Der Assay wurde in transparenten 96-Wellplatten durchgeführt, wobei sich das Gesamtvolumen pro Well auf 250 µl belief. Die Veränderung der Absorption wurde über 8 min bei 25 °C verfolgt. Follikelflüssigkeiten wurden in einer 1:320, Zelllysate in einer 1:8 Endverdünnung vermessen. Der Assay wurde in KP_i-Puffer durchgeführt. Die Messung erfolgte in Duplikaten, wobei die Follikelflüssigkeiten jeweils in 3 Assays vermessen wurden. Die Follikelflüssigkeiten wurden vor der Messung bei 10000 rpm und 4 °C für 3 min abzentrifugiert. Für die Messung wurde der Überstand verwendet. Zur Gewinnung der Zelllysate wurden die Zellen aus einer 60 mm Kulturschale zunächst bei -20 °C eingefroren, wieder aufgetaut und anschließend in KP_i-Puffer aufgenommen und bei 10000 rpm und 4 °C für 3 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl KP_i-Puffer resuspendiert und für die Messung verwendet. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

4.2.2 Proteinisolierung

Nach Ablauf des Stimulationszeitraums wurden die Zellen direkt weiterverarbeitet oder zunächst bei -20 °C gelagert. Danach wurden die Zellen in gekühltem NPE-Puffer aufgenommen und mit einem Zellschaber vom Zellkulturgefäß gelöst. Die Suspension wurde anschließend bei 10000 rpm und 4 °C für 3 min zentrifugiert und in 10 mM PBS resuspendiert. Dieser Waschschnitt wurde ein weiteres Mal wiederholt, bevor die Zellen in ca. 100 µl Inhibitorcocktail aufgenommen und schließlich mittels Ultraschall aufgeschlossen wurden. Die so erhaltenen Proben wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Der Proteingehalt der Proben wurde in transparenten 96-Wellplatten unter Verwendung des DC Protein-Assay Kits der Firma Bio-Rad bestimmt, welches mit dem Bradford-Reagenz arbeitet. Durch eine Absorptionsmessung bei 690 nm kann der Proteingehalt anhand einer Standardgerade bestimmt werden.

4.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die aus den Zellen isolierten Proteine wurden mittels eindimensionaler diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) aufgetrennt, wobei es zu einer Auf trennung der Proteine nach Molekulargewicht kommt. Es wurde sowohl ein niedrig Prozentiges Sammelgel eingesetzt, um die Proteine bei neutralem pH-Wert an der Lauffront zu konzentrieren, als auch ein Trenngel, welches die Proteine bei basischem pH-Wert schließlich nach Molekulargewicht auftrennt (**Tab. 1**). Das Sammelgel wird hierzu auf das Trenngel geschichtet. Es wurden 15 µg Protein pro Tasche auf das Gel geladen.

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

Tabelle 1: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.

Western Blot

Um die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine immunologisch zu analysieren, wurden diese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. So können einzelne Proteine aus dem aufgetrennten

Proteingemisch unter Verwendung spezifischer Primärantikörper und an ein Enzym gekoppelte Sekundärantikörper detektiert werden (Burnette, 1981; Towbin et al., 1979). Das Filterpapier, die Membran und das Acrylamidgel wurden zunächst 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Nach dem Zusammenbau des Blotsystems erfolgte in Transferpuffer der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran innerhalb 75 min bei 100 V. Anschließend wurde eine Ponceau-Kontrollfärbung vorgenommen. Die Absättigung der freien Bindungsstellen der Membran erfolgte mit 5 % Milchpulver in TBS-T für 30 min. Bei der Verwendung von Antikörpern gegen phosphorylierte Proteine wurde die Absättigung und alle weiteren Schritte mit BSA (bovines Serumalbumin) an Stelle des Milchpulvers durchgeführt. Über Nacht und bei 4 °C wurde die Membran mit dem Primärantikörper (**Tab. 6**) in 1 % Milchpulver in TBS-T inkubiert. War eine Präadsorption vorgesehen, um die Spezifität des verwendeten Primärantikörpers zu bestätigen, wurde dieser für 2 h bei 4 °C mit dem zugehörigen Blockierungs-Peptid (**Tab. 8**) inkubiert. Bei 13000 rpm und 4 °C wurde die Antikörper-Peptid Mischung abzentrifugiert. Der Überstand wurde zunächst entsprechend dem eigentlichen Primärantikörper verdünnt und wie die Primärantikörper-Lösung weiter verwendet. Nach der Primärantikörper-Inkubation über Nacht wurde die Membran 3 mal 5 min mit TBS-T auf einem Schüttler gewaschen. Anschließend folgte für 1 h die Inkubation auf einem Schüttler mit einem entsprechenden Peroxidase (POX)-gekoppelten Sekundärantikörper (**Tab. 7**) in einer 1:5000 Verdünnung in 5 % Milchpulver in TBS-T. Nach weiteren 3 Waschschritten (5 min TBS-T) erfolgte die Detektion des Chemilumineszenzsignals. Hierzu wurde das SuperSignal West Femto-Kit nach Angaben des Herstellers und das Chemi-Smart 5000 Detektionssystem verwendet. Mit dem zugehörigen Programm ChemiCapt wurden die Aufnahmen festgehalten.

4.2.4 Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden 5 µm starke Paraffinschnitte von humanem, Affen- und Rattengewebe verwendet. Diese wurden zunächst in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (3 mal Xylol für je 5 min; 2 mal 100 % Isopropanol für je 3 min; 90 %, 80 % und 70 % Isopropanol für je 3 min; 1 mal PBS-Puffer für 10 min) entparaffiniert und rehydriert. Mit Citratpuffer (9 ml Zitronensäurelösung vermischt mit 41 ml Natriumcitratlösung) wurden anschließend die Antigene demaskiert. Hierzu wurden die Schnitte 25 min in Citratpuffer gekocht. Nach dreimaligem Waschen in PBS-Puffer wurden die Gewebeschnitte auf den Objektträgern mit einem Fettstift umrandet und alle folgenden Reagenzien wurden tropfenweise auf die Schnitte aufgetragen. Die Inkubation der weiteren Schritte erfolgte in einer Feuchtkammer. Um die endogene Peroxidase zu blockieren erfolgte eine 30 minütige

Inkubation des Gewebes mit 9 % Methanol und 3 % H₂O₂ in PBS-Puffer bei Raumtemperatur. Nach weiteren 3 Waschschritten mit PBS-Puffer wurden die Protein-Bindungsstellen des Gewebes mit Normalserum blockiert. Es wurde hierzu Ziegen-Normalserum verwendet. Handelte es sich um einen Primärantikörper aus der Ziege wurde Esel-Normalserum verwendet. Das Gewebe wurde 30 min bei Raumtemperatur mit entsprechendem 5 % Normalserum in PBS-Puffer inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper (**Tab. 6**) in gewünschter Verdünnung in 5 % Normalserum in PBS-Puffer aufgebracht. Eine Normalserumverdünnung ohne Primärantikörper diente als Negativkontrolle. Zusätzlich wurde teilweise eine Präadsorption durchgeführt, um die Spezifität des verwendeten Primärantikörpers zu bestätigen. Dieser wurde hierzu für 2 h bei 4 °C mit dem zugehörigen Blockierungs-Peptid (**Tab. 8**) inkubiert und die Antikörper-Peptid Mischung bei 13000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde zunächst entsprechend dem eigentlichen Primärantikörper verdünnt und wie ein Primärantikörper weiter verwendet. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C wurde das Gewebe 3 mal mit PBS-Puffer gewaschen und nachfolgend mit einer 1:500 Verdünnung des entsprechenden biotinylierten Sekundärantikörpers (**Tab. 7**) in 5 % Normalserum in PBS-Puffer 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde das Gewebe für 2 h mit einem kommerziell erhältlichen ABC-Reagenz behandelt. Das Funktionsprinzip beruht auf einer beschriebenen Methode (Hsu et al., 1981). Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Puffer wurden die Schnitte für 10 min mit Tris/HCl-Puffer inkubiert. Schließlich erfolgte der Färbevorgang unter Verwendung des chromogenen 3-3'-Diaminobenzidin (DAB) und H₂O₂. Die durch die Peroxidase bedingte Farbreaktion wurde bei gewünschter Intensität oder nach maximal 10 min in destilliertem Wasser gestoppt. Anschließend konnten die Schnitte bei Bedarf mit Hämalaun gegengefärbt werden. Die Färbung der Zellkerne erfolgte unter fließendem Leitungswasser. Die gefärbten Gewebeschnitte wurden anschließend durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol (Isopropanol 70 %, 80 %, 90 % für je 3 min; 2 mal Isopropanol 100 % für je 3 min; 3 mal Xylol für je 5 min) geführt und somit dehydriert. Abschließend wurden die Schnitte in Entellan eingebettet und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet (Lahr et al., 1990).

4.2.5 Aufarbeitung der Rattenovarien

Die Arbeit mit den Versuchstieren wurde an der Universität von Chile in Santiago de Chile, Chile durchgeführt. Es wurden weibliche Sprague Dawley Ratten mit etwa 250 bis 300 g Körpergewicht verwendet. Die Tiere wurden ad libidum mit Wasser und Nahrung versorgt und unter einem 12/12 h Tag/Nacht-Zyklus gehalten. Die Versuche wurden durch das Bioethische

Komitee der Fakultät für Chemie und Pharmazeutische Wissenschaften der Universität von Chile genehmigt und erfüllen die internationalen Richtlinien (CONICYCT Guide for the Care and Use of Laboratory Animals). Es wurden stets alle Anstrengungen unternommen die Anzahl und ein Leiden der Versuchstiere so gering wie möglich zu halten. Die für den Ellman-Assay verwendeten Rattenovarien wurden nach der Entnahme zunächst 3 mal in einer gekühlten NaCl Lösung ($\text{pH} = 7,0$; 0,9 %) gewaschen und jeweils bei 2000 rpm für 3 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das Gewebe in 300 μl KP_i-Puffer homogenisiert. Das Probenvolumen wurde anschließend auf das 10-fache des vorher bestimmten Gewichts der Ovarien aufgefüllt und bei 10 000 rpm für 3 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in einer 1:17 Endverdünnung für die Messung mittels Ellman-Assay verwendet.

4.3 Nukleinsäurearbeiten

4.3.1 RNA-Isolation

Die Total-RNA der kultivierten Zellen wurde mit einem RNeasy Plus mini Kit der Firma Quiagen entsprechend der Herstelleranleitung isoliert. Nach Ende der Stimulation wurden die Zellen in RLT-Puffer mit 1 % β -Mercaptoethanol aufgenommen und bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die in RLT-Puffer befindlichen Zellen wurden zunächst mit einem Probenvolumen 70 % Ethanol versetzt und anschließend bei Raumtemperatur über einer RNeasy Säule abzentrifugiert (10000 rpm, 15 s). Nach einem RW1-Puffer (10000 rpm, 15 s) und zwei RPE-Puffer (10000 rpm, 15 s)-Waschschritten wurde die Säule mittels Zentrifugation (10000 rpm, 1 min) getrocknet. Schließlich wurde die RNA in 30 μl RNase-freiem Wasser eluiert. Die RNA Qualität und Ausbeute wurde durch eine Absorptionsmessung von 2 μl RNA-Probe in 58 μl DEPC-Wasser bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge in einem Photometer bestimmt. Liegt der Quotient der 260 nm und 280 nm Absorption zwischen 1,9 und 2,0 weist dies auf eine gute Qualität der RNA hin. Die isolierte RNA wurde bei -80 °C gelagert.

4.3.2 cDNA-Synthese

Aus der isolierten RNA wurde mittels reverser Transkription cDNA für die weitere Analyse der Proben hergestellt. Für die Umschreibung wurden 0,4 μg RNA und 1,6 μl Random 15-mer Primer mit DEPC-Wasser auf 23 μl Gesamtvolumen aufgefüllt und anschließend in einem Thermocycler für 10 min bei 70 °C und 5 min bei 25 °C inkubiert. Im darauffolgenden Schritt wurden der Probe 15 μl Nukleotidmix (8 μl first strand buffer; 4 μl 0,1M DTT; 2 μl 10 mM dNTPs; 1 μl 40 U/ml RNAsin) beigefügt und es folgte ein weiterer Inkubationsschritt bei 25 °C für 10 min und 42 °C für 2 min. Schließlich wurden 2 μl Superscript II reverse Transkriptase

zugegeben und ein Umschreibungsprogramm mit 42 °C für 50 min, 70 °C für 15 min und 4 °C für 10 min wurde initiiert. Die entstandenen cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

4.3.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Durch die Analyse von cDNA mittels RT-PCR war der Nachweis spezifischer Gene in den kultivierten Zellen möglich. Unter Verwendung eines PCR-Kits der Firma Promega wurden die Reaktionen nach **Tabelle 2** angesetzt und die Amplifizierung in einem Thermocycler durchgeführt (**Tab. 3**).

Reagenz	Volumen [µl]
5x GoTaq-Buffer	5
dNTPs [2 mM]	2,5
Primer forward [100 µM]	0,5
Primer reverse [100 µM]	0,5
DEPC-H2O	15,37
cDNA Template	1
GoTaq-Polymerase	0,13

Tabelle 2: Zusammensetzung des RT-PCR-Reaktionsansatzes.

Schritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
Initiation	1	95 °C	2 min
Denaturierung	35	95 °C	1 min
Annealing	35	52-62 °C (primerspezifisch)	45 s
Elongation	35	72 °C	1 min
Finale Elongation	1	72 °C	5 min

Tabelle 3: Thermocyclerprogramm für RT-PCR-Reaktion.

Um eine Verunreinigung auszuschließen, wurden Negativkontrollen ohne cDNA und dem verwendeten Wasser sowie mit nicht umgeschriebener RNA durchgeführt. Die verwendeten Primer wurden mit der Primer3 (<http://primer3.ut.ee>; 18.09.14) und PrimerBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>; 18.09.14) Software erstellt und von der Firma Metabion (Planegg, Deutschland) synthetisiert (**Tab. 9**). Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte nach Größe aufgetrennt. Es wurden 2 % Agarosegele mit zugesetztem Ethidiumbromid (0,01 %) oder Midori Green (0,005 %) für die spätere Detektion mittels UV- beziehungsweise Blaulicht verwendet. Um die Größe der PCR-Produkte zu bestimmen, wurde auf das jeweilige Gel neben den PCR Produkten ein Marker (100 bp Schritte) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in TBE-Puffer bei 90 V und einer Laufzeit von 35 min durchgeführt. Mit einem entsprechenden Kamerasytem wurden Bilder

der PCR-Gele aufgenommen und dokumentiert. Um die Produkte zu sequenzieren und somit auf ihre Identität hin zu überprüfen, wurden die entsprechenden Banden der PCR-Produkte aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem MinElute Gel Extraction Kit entsprechend der Herstellerangaben aufgereinigt. Die Sequenzierung wurde von der Firma GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) durchgeführt und die Ergebnisse unter Verwendung der BLAST Software (<http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; 22.09.14) ausgewertet.

4.3.4 qPCR

Für die Durchführung der quantitativen real-time PCR (qPCR) wurde das LightCycler 96 System mit entsprechender Software und das QuantiFast SYBR Green Kit verwendet. Die Kombination der Reaktionskomponenten ist in **Tabelle 4**, das verwendete Cycler-Programm in **Tabelle 5** dargestellt.

Reagenz	Volumen [µl]
Quanti-Fast Mix	6,25
H2O RNase-frei	1,25
Primer forward [25 µM]	0,5
Primer reverse [25 µM]	0,5
cDNA Template (1:20)	4

Tabelle 4: Zusammensetzung des qPCR-Reaktionsansatzes.

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiierung	95 °C	300 s
Zyklusphase (40 Zyklen)	95 °C	10 s
	59-60 °C	30 s
Schmelzkurve (Anstieg von 65 - 97 °C)	95 °C	45 s
	65 °C	60 s
	97 °C	1 s

Tabelle 5: Thermocyclerprogramm für qPCR-Reaktion.

Die verwendeten Primer (**Tab. 10**) wurden auf dieselbe Weise wie in der RT-PCR entworfen. Mittels Schmelzkurvenanalyse und Gelelektrophorese konnten die Primer auf ihre Spezifität hin getestet werden. Durch die Verwendung einer cDNA-Standardreihe konnte die Effizienz (E) der jeweilen Primer bestimmt werden. Die erhaltenen Daten wurden mittels der „delta-delta CT“ Methode und folgender Formel ausgewertet:

$$R = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_T \text{ Zielgen} (\text{MITTELWERT}_{\text{Kontrolle}} - \text{MITTELWERT}_{\text{Stimulation}})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta C_T \text{ Referenzgen} (\text{MITTELWERT}_{\text{Kontrolle}} - \text{MITTELWERT}_{\text{Stimulation}})}}$$

Hierbei beschreibt CT (threshold cycle) den Zyklus, ab dem die Fluoreszenz exponentiell über das Hintergrundsignal ansteigt. Die Daten werden als das berechnete Verhältnis (R) angegeben

(Pfaffl, 2001). Bei den Untersuchungen der PCOS- und nicht-PCOS-Granulosazellen wurde auf den Mittelwert der nicht-PCOS-Gruppe normiert.

4.4 Statistik

Die Daten und Ergebnisse wurden mit den Programmen Graphpad PRISM 5.0d, Microsoft Office für Mac 2011 und Adobe Photoshop CS4 verarbeitet und dargestellt. Die Ergebnisse des Live Cell Imaging, der entsprechenden Western Blots, der Messung des Zelldurchmessers und der Konfluenzmessungen wurden mittels eines one-way ANOVA ($p < 0,05$), gefolgt von einem Newman-Keuls-Test, auf Signifikanz hin untersucht. Für die Daten des Caspase-Assays und der LDH-Assays wurde ein repeated measures ANOVA ($p < 0,05$), gefolgt von einem Newman-Keuls-Test analysiert. Die Ergebnisse der Esterasen-Aktivitätsmessung mit Follikelflüssigkeiten von PCOS- und nicht-PCOS-Patientinnen wurden mittels eines Kruskal-Wallis-Tests, gefolgt von einem Dunn-Test (multiple comparison), analysiert. Für die LDH-Assays, welche lediglich mit Nek-1 oder NSA und entsprechender Kontrollgruppe durchgeführt wurden, wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt ($p < 0,05$). Dies gilt ebenso für alle Daten der qPCR-Experimente und die Daten der Konfluenzmessungen, bei denen PCOS- mit nicht-PCOS-Zellen verglichen wurden. Auch der p-MLKL/MLKL Western Blot wurde auf diese Weise analysiert.

4.5 Material

4.5.1 Antikörper

Antigen	Verdünnung	Spezies	Klonalität	Hersteller
AChE	1:500 (WB) 1:100 (IHC)	Ziege	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
AChE (Ratte)	1:250 (WB) 1:50 (IHC)	Ziege	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
AChE-R	1:1000 (WB) 1:200 (IHC)	Kaninchen	polyklonal	Hebräische Universität Jerusalem, Jerusalem, Israel
BChE	1:800 (WB)	Kaninchen	polyklonal	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
ChAT	1:500 (WB) 1:100 (IHC)	Maus	monoklonal	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
MLKL	1:1000 (WB)	Maus	monoklonal	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
p-MLKL	1:1000 (WB) 1:100 (IHC)	Kaninchen	monoklonal	Abcam, Cambridge, UK
RIPK1	1:500 (WB)	Kaninchen	polyklonal	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
RIPK3	1:500 (WB)	Kaninchen	polyklonal	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA

Tabelle 6: Liste der verwendeten Primärantikörper. Teilweise wurden die gleichen Antikörper sowohl für Western Blot (WB) als auch für die Immunhistochemie (IHC) verwendet.

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Methode	Hersteller
POX rabbit anti goat	1:10000	Kaninchen	WB	Dianova, Hamburg, Deutschland
POX donkey anti mouse	1:10000	Esel	WB	Dianova, Hamburg, Deutschland
POX goat anti rabbit	1:10000	Ziege	WB	Dianova, Hamburg, Deutschland
Biotynilated donkey anti goat	1:500	Esel	IHC	Dianova, Hamburg, Deutschland
Biotynilated goat anti rabbit	1:500	Ziege	IHC	Dianova, Hamburg, Deutschland
Biotynilated goat anti mouse	1:500	Ziege	IHC	Dianova, Hamburg, Deutschland

Tabelle 7: Liste der verwendeten Sekundärantikörper.

Protein	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
AChE	2 µg Peptid pro 1 µg Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA

Tabelle 8: Liste der verwendeten Kontrollpeptide.

4.5.2 Primer

mRNA	Sequenz (5' - 3')*		Genbak.-Nr.
AChE (Ratte)	F	CCCATGGCTATGAAATCGAG	NM_172009.1
	R	TTCAGGCTCACGTATTGCTG	
AChE (Ratte; nested)	F	CCTGGATCCCTCACTGAAC	
	R	CGGGTCTACGCCTACGTCTTGAAACACCGTGCTTC	NM_015831.2
AChE-E	F	ATGGGTGAAGCCTGGCAGGTG	
	R	CCCCTGGACCCCTCTGAAAC	NM_015831.2
AChE-R	F	ACCTGGCGGGCTCCACTC	NC_018918.2
	R	CACAGGTCTGAGCAGCGATCCTGTTGCTG	
AChE-S	F	CCAATAAGCATGCAGAGCAA	NM_000665.3
	R	TTGCCATCTTGTTGCAGAG	
BChE	F	CTGTTCCACCACCATCTT	NM_005677.3
	R	ACCGTTGTGGATGACCTGG	
MLKL	F	TACAGTCAGCAGAGTCAGG	NM_152649.2
	R	CGCCTTTCCATGTAAGTAGCA	
RIPK1	F	TGGGCGTCATCATAGAGGAAG	NM_003804
	R	CGCCTTTCCATGTAAGTAGCA	

Tabelle 9: Liste der für die RT-PCR verwendeten Primer. Dargestellt sind sowohl die „forward“ (F), als auch die „reverse“ (R) Primer.

mRNA	Sequenz (5' - 3')*		Genbak.-Nr.
AChE-R	F	CTTCCTCCCCAAATTGCTC	NM_015831.2
	R	GGGGAGAAGAGAGGGGTTAC	NC_018918.2
AChE-S	F	CCTGGATCCCTCACTGAACT	NM_000665.3
	R	TTCAGGCTCACGTATTGCTG	
ColQ	F	CTGTTCCCACCACCATTCTT	NM_005677.3
	R	CAGGCATGCCAGGAACAC	
GAPDH	F	GTCTTCACTACCATGGAGAAGG	NM_002046.5
	R	TCATGGATGACCTTGGCCAG	
L-19	F	AGGCACATGGG ATAGGTAA	NM_000981
	R	CCATGAGAATCCGCTTGT	

Tabelle 10: Liste der für die qPCR verwendeten Primer. Dargestellt sind sowohl die „forward“ (F), als auch die „reverse“ (R) Primer.

4.5.3 Chemikalien

Substanz	Hersteller
5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoësäure (DTNB)	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
5x First Strand Buffer	Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
5x Go Taq Reaction Buffer	Promega, Madison, WI, USA
Acetylcholin	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Acetylcholinesterase <i>Electrophorus electricus</i>	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Acetylcholinthiocholinjodid (ATC)	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
AChE-R-spezifisches Peptid (ARP)	Genzemtrum der LMU München, München, Deutschland
Acrylamid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Albumin Standard	Pierce - Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Atropin	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Borsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serum Albumin	PAA, Pasching, Österreich
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, Deutschland
BW284c51	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
CaCl x2 H ₂ O	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
CASYclean	Roche, Basel, Schweiz
CASYton	Roche, Basel, Schweiz
DCFDA-H ₂	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
DEPC Wasser	Ambion - Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Dithiothreithol (DTT)	Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

DMEM/Ham's F12 mit L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
dNTPs (dATP/dCTP/dGTP/dTTP)	PeqLab, Erlangen, Deutschland
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Entellan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Fetal Calf Serum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
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
H ₂ O ₂ (30 %)	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Huperzin-A	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland
KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MgCl x6 H ₂ O	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Midori-Green Direct Farbstoff	Nippon Genetics, Düren, Deutschland
Milchpulver	Vitalia, Bruckmühl, Deutschland
N, N, N', N'-Tetramethylenthylendiamin (TEMED)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl-Lösung (0,9 %)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Na-II-Citrat Dihydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nekrostatin-1	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
Nekrosulfonamid	Tocris, Bristol, UK
Nikotin	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Normalserum Esel	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Normalserum Kaninchen	Chemikon, Billerica, MA, USA
Normalserum Ziege	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Pierce - Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
PBS	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
pH Kalibrationsstandard pH 4/7/10	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PIPES	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Protease und Phosphatase Inhibitor Tabletten	Pierce - Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA

Rekombinantes humanes pro-NGF	Cedarlane, Burlington, Kanada
Rekombinantes humanes β -NGF	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Rnasin Plus	Promega, Madison, WI, USA
Saccharose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Superscript II	Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Tetra-isopropyl-pyrophosphoramid (iso-OMPA)	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
TNF α	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	PAA, Pasching, Österreich
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Z-VAD-FMK	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA

Tabelle 11: Liste der verwendeten Chemikalien.

4.5.4 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
1x Transferpuffer	100 ml 10x Transferpuffer 100 ml Methanol auf 1 l mit ddH ₂ O auffüllen
10x Lämmelpuffer	30,3 g Tris 144,1 g Glycin 10 g SDS auf 1 l mit ddH ₂ 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 1 l mit ddH ₂ O auffüllen, pH 8,0
10x Transferpuffer	30,3 g Tris 144,1 g Glycin auf 1 l mit ddH ₂ O auffüllen, pH 8,3
20x TBS-T	116,8 g NaCl 12,1 g Tris 10 ml Tween 20 auf 1 l mit dH ₂ O auffüllen, pH 7,5
APS (10 %)	1 g APS 10 ml ddH ₂ O
Bromphenolblau	1 ml Tris 2,4 ml Glycerin 50 mg SDS 1 Spatelspitze Bromphenolblau

	auf 10 ml mit ddH ₂ O auffüllen, pH 6,8
Natriumcitratlösung	29,41 g Na-III-citrat Dihydrat auf 1 l mit dH ₂ O auffüllen
NPE-Puffer	4,4 g NaCl 1,5 g PIPES 0,15 g EDTA auf 0,5 l mit dH ₂ O auffüllen, pH 7,2
PBS (Proteinlysate)	4,4 g NaCl 93,3 mg KCl 400,47 mg Na ₂ HPO ₄ x2 H ₂ O 171,2 mg K ₂ HPO ₄ x3 H ₂ O auf 0,5 l mit dH ₂ O auffüllen, pH 7,5
PBS	9,55 g PBS Dulbecco auf 1 l mit dH ₂ O auffüllen, pH 7,5
Probenpuffer	1,9 g Tris 5 g SDS 25 g Saccharose auf 0,25 l mit dH ₂ O auffüllen, pH 6,8
Inhibitorcocktail	1 Inhibitor-Tablette auf 10 ml mit Probenpuffer auffüllen
Sammelgelpuffer	15,15 g Tris 0,75 g EDTA 1 g SDS auf 0,25 l mit ddH ₂ O auffüllen, pH 6,8
SDS (10 %)	1 g SDS auf 10 ml mit dH ₂ O auffüllen
Trenngelpuffer	45,43 g Tris 0,75 g EDTA 1 g SDS auf 0,25 l mit ddH ₂ O auffüllen, pH 8,8
Tris/HCl (50 mM)	6,06 g Tris 38,9 ml HCl auf 1 l mit dH ₂ O auffüllen, pH 7,6
Zitronensäurelösung	21,01 g Zitronensäure auf 1 l mit ddH ₂ O auffüllen
EC-Lösung	8,18 g NaCl 0,22 g KCl 0,2 g MgCl x6 H ₂ O 0,15 g CaCl x2 H ₂ O 2,38 g HEPES 1,98 g Glucose auf 1 l mit ddH ₂ O auffüllen, pH 7,35

Tabelle 12: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen.

4.5.5 Kits und Assays

Kit	Hersteller
3,3' Diaminobenzidin (DAB) Tabletten Set	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Caspase-Glo 3/7 Assay	Promega, Madison, WI, USA
DC Protein Assay	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
LDH Cytotoxicity Assay Kit	Pierce - Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
MinElute Gel Extraction Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
Mykoplasmentest	Minerva, Berlin, Deutschland
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
SuperSignal West Femto Maximum Sensivity Substrate	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

Tabelle 13: Liste der verwendeten Kits und Assays.

4.5.6 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
0,9 mm Kanüle Sterican	B. Braun, Melsungen, Deutschland
96 Well Culture Plate, transparent	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
BZO Seal Film	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
CASY Cups	Roche, Basel, Schweiz
Cell Strainer (40 µm)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Combitips Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cryo Pure Röhrchen	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Deckgläser (24 x 60 mm)	Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland
F96 MicroWell White Polystyrene Plate	Nunc, Roskilde Dänemark
Falcon Röhrchen (15/50 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Feather Disposable Scalpel	Feather, Osaka, Japan
Injekt Einmalspritzen (10 ml)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Latexhandschuhe	Kimberly-Clark, Dallas, TX, USA
LightCycler 480 Multiwell Plate 96	Roche, Basel, Schweiz
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Mikroreaktionsgefäße (0,25/0,5/1,0/2,0 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Nitrozellulosemembran	Machinery & Nagel, Düren, Deutschland
Nunclon 96-Well-Platte, schwarz	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
PAP-Pen	Science Services, München, Deutschland
Parafilm	American National Can, Chicago, IL, USA
Pasteurpipette 150 mm, Glas	Poulton & Graf, Wertheim, Deutschland
Pasteurpipetten, Plastik	ratiolab, Dreieich, Deutschland
PCR 96 Well TW-MT Platte weiß	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Perfusor Spritzen (50 ml)	B. Braun, Melsungen, Deutschland

Petrischalen (35/60 mm)	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 10/20/100/200/1000 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen 200 µl	Rainin, Greifensee, Schweiz
Reagent Reservoirs (25 ml)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Röhrchen (13 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (5/10/25/50 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Spritzenfilter Filtrpur S (0,2/0,45 µm)	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Superfrost Plus Objektträger	Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland
Urinbecher	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Uvette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellschaber	Kisker, Steinfurt, Deutschland
µ-Dish (35 mm, Glasboden)	ibidi, Planegg, Deutschland

Tabelle 14: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

4.5.7 Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe	KNF Neuberger, Freiburg, Deutschland
Analysewaage DualRange XS 205	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Hanau, Deutschland
Bunsenbrenner Fireboy plus	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
CASY Zellzähler	Schärfe Systems, Reutlingen, Deutschland
Chemi Smart 5000	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Elektronischer Rührer Multipoint HP15	Variomag, Daytona Beach, FL, USA
FastGene GelPic LED Box	Nippon Genetics, Düren, Deutschland
Fluoreszenzlampe HBO 100 W	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axioplan	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Gefriertruhe -80 °C	Sanyo, Morigucci, Japan
ibidi Gas Incubation System	ibidi, Planegg, Deutschland
ibidi Heating System	ibidi, Planegg, Deutschland
IKA-Magnetrührer RTC	IKA-Werk, Staufen, Deutschland
IKA-Minishaker MS 2	IKA-Werk, Staufen, Deutschland
IKA-Schüttler MTS4	IKA-Werk, Staufen, Deutschland
Kamera 18.2 Color Mosaik	Visitron Systems, Puchheim, Deutschland
Kamera ProgRes CT3	Jenoptik, Jena, Deutschland
Kamera ProgRes MF cool	Jenoptik, Jena, Deutschland
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlzentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland
Light Cycler 96 System	Roche, Basel, Schweiz
Mehrkanalpipette 20-200 µl	Rainin, Greifensee, Schweiz
Mikroliterzentrifuge	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Mikroplatten-Reader Fluostar Optima	BMG Labtech, Ortenberg, 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
Mikrozentrifuge	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Mini-PROTEAN3 Cell System	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Multipipette Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ph-Meter FE20/EL20	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
Pipetten 2/10/20/100/200/1000/5000 µl	Gilson, Middleton, WI, USA
Power Pac 300	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Präzisionswaage BP 310 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Schüttler Duomax 1030/2030	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Sterilbank	Holten LaminAir, Allerød, Dänemark
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
Timer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tischzentrifuge 1-14	Sigma, Osterode am Harz, Deutschland
Ultraschallprozessor 50H	Hielscher Unltronics, Teltow, Deutschland
Ultraturax T25	IKA-Werk, Staufen, Deutschland
UV Detektionssystem	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge Labofuge 400	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Labofuge 400e	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge MC 6	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland

Tabelle 15: Liste der verwendeten Geräte.

4.5.8 Medien

Medium	Zusammensetzung
Kulturmedium für humane Granulosazellen	DMEM/Ham's F12 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptamycin
Kulturmedium für GFSHR17-Zellen	DMEM/Ham's F12 5 % FCS
Medium für Stimulation	DMEM/Ham's F12

Tabelle 16: Liste der verwendeten Kulturmedien.

4.5.9 Zellen

Zellen	Herkunft
Humane Granulosazellen	A.R.T. Bogenhausen, München, Deutschland
GFSHR17-Zellen	Weizmann-Institute of Science, Rehovot, Israel

Tabelle 17: Liste der verwendeten Zellen.

4.5.10 Biologisches Material

Material	Herkunft
Ovargewebe, Mensch (Homo sapiens)	Institut für Zellbiologie (Anatomie III), LMU München, München, Deutschland
Ovargewebe, Rhesusaffe (Macacca mulatta)	Oregon National Primate Research Center (ONPRC), Beaverton, OR, USA
Ovargewebe, Ratte (Rattus norvegicus, Sprague Dawley)	Laboratorio de Neurobioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile
Follikelflüssigkeit, Mensch (Homo sapiens)	A.R.T. Bogenhausen, München, Deutschland Hormon- und Kinderwunschzentrum, LMU München, München, Deutschland

Tabelle 18: Liste des verwendeten biologischen Materials.

5 Literaturverzeichnis

Adams J, Franks S, Polson D W, Mason H D, Abdulwahid N, Tucker M, Morris D V, Price J und Jacobs H S (1985). „Multifollicular ovaries: clinical and endocrine features and response to pulsatile gonadotropin releasing hormone.“ Lancet 2(8469-70): 1375-1379.

Agoston A, Kunz L, Krieger A und Mayerhofer A (2004). „Two types of calcium channels in human ovarian endocrine cells: involvement in steroidogenesis.“ J Clin Endocrinol Metab 89(9): 4503-4512.

Al-Zi'abi M O, Bowolaksono A und Okuda K (2009). „Survival role of locally produced acetylcholine in the bovine corpus luteum.“ Biol Reprod 80(4): 823-832.

Ambekar A S, Nirujogi R S, Srikanth S M, Chavan S, Kelkar D S, Hinduja I, Zaveri K, Prasad T S, Harsha H C, Pandey A und Mukherjee S (2013). „Proteomic analysis of human follicular fluid: a new perspective towards understanding folliculogenesis.“ J Proteomics 87: 68-77.

Ashani Y, Peggins J O, 3rd und Doctor B P (1992). „Mechanism of inhibition of cholinesterases by huperzine A.“ Biochem Biophys Res Commun 184(2): 719-726.

Azziz R, Woods K S, Reyna R, Key T J, Knochenhauer E S und Yildiz B O (2004). „The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population.“ J Clin Endocrinol Metab 89(6): 2745-2749.

Baerwald A R, Adams G P und Pierson R A (2005). „Form and function of the corpus luteum during the human menstrual cycle.“ Ultrasound Obstet Gynecol 25(5): 498-507.

Baerwald A R, Adams G P und Pierson R A (2012). „Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review.“ Hum Reprod Update 18(1): 73-91.

- Baker T G (1963). „A Quantitative and Cytological Study of Germ Cells in Human Ovaries.“ *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 158: 417-433.
- Benson S, Arck P C, Tan S, Hahn S, Mann K, Rifaie N, Janssen O E, Schedlowski M und Elsenbruch S (2009). „Disturbed stress responses in women with polycystic ovary syndrome.“ *Psychoneuroendocrinology* 34(5): 727-735.
- Bernard V, Girard E, Hrabovska A, Camp S, Taylor P, Plaud B und Krejci E (2011). „Distinct localization of collagen Q and PRiMA forms of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction.“ *Mol Cell Neurosci* 46(1): 272-281.
- Bernuci M P, Leite C M, Barros P, Kalil B, Leoni G B, Del Bianco-Borges B, Franci C R, Szawka R E, Lara H E und Anselmo-Franci J A (2013). „Transitory activation of the central and ovarian norepinephrine systems during cold stress-induced polycystic ovary in rats.“ *J Neuroendocrinol* 25(1): 23-33.
- Berson A, Knobloch M, Hanan M, Diamant S, Sharoni M, Schuppli D, Geyer B C, Ravid R, Mor T S, Nitsch R M und Soreq H (2008). „Changes in readthrough acetylcholinesterase expression modulate amyloid-beta pathology.“ *Brain* 131(Pt 1): 109-119.
- Birks J (2006). „Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease.“ *Cochrane Database Syst Rev*(1): CD005593.
- Bomsel-Helmreich O, Gougeon A, Thebault A, Saltarelli D, Milgrom E, Frydman R und Papiernik E (1979). „Healthy and atretic human follicles in the preovulatory phase: differences in evolution of follicular morphology and steroid content of follicular fluid.“ *J Clin Endocrinol Metab* 48(4): 686-694.
- Brouckaert G, Kalai M, Krysko D V, Saelens X, Vercammen D, Ndlovu M N, Haegeman G, D'Herde K und Vandenebeele P (2004). „Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production.“ *Mol Biol Cell* 15(3): 1089-1100.
- Buccione R, Schroeder A C und Eppig J J (1990). „Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis.“ *Biol Reprod* 43(4): 543-547.
- Bulling A, Berg F D, Berg U, Duffy D M, Stouffer R L, Ojeda S R, Gratzl M und Mayerhofer A (2000). „Identification of an ovarian voltage-activated Na+-channel type: hints to involvement in luteolysis.“ *Mol Endocrinol* 14(7): 1064-1074.
- Burnette W N (1981). „Western blotting“: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112(2): 195-203.
- Chattopadhyay R, Ganesh A, Samanta J, Jana S K, Chakravarty B N und Chaudhury K (2010). „Effect of follicular fluid oxidative stress on meiotic spindle formation in infertile women with polycystic ovarian syndrome.“ *Gynecol Obstet Invest* 69(3): 197-202.
- Cohen O, Reichenberg A, Perry C, Ginzberg D, Pollmacher T, Soreq H und Yirmiya R (2003). „Endotoxin-induced changes in human working and declarative memory associate with cleavage of plasma "readthrough" acetylcholinesterase.“ *J Mol Neurosci* 21(3): 199-212.
- Cousin X, Strahle U und Chatonnet A (2005). „Are there non-catalytic functions of acetylcholinesterases? Lessons from mutant animal models.“ *Bioessays* 27(2): 189-200.
- Craig J, Orisaka M, Wang H, Orisaka S, Thompson W, Zhu C, Kotsuji F und Tsang B K (2007). „Gonadotropin and intra-ovarian signals regulating follicle development and atresia: the delicate balance between life and death.“ *Front Biosci* 12: 3628-3639.
- Darboux I, Barthalay Y, Piovant M und Hipeau-Jacquotte R (1996). „The structure-function relationships in *Drosophila* neurotactin show that cholinesterasic domains may have adhesive properties.“ *EMBO J* 15(18): 4835-4843.
- Darvesh S, Hopkins D A und Geula C (2003). „Neurobiology of butyrylcholinesterase.“ *Nat Rev Neurosci* 4(2): 131-138.

Das M, Djahanbakhch O, Hacihanefioglu B, Saridogan E, Ikram M, Ghali L, Raveendran M und Storey A (2008). „Granulosa cell survival and proliferation are altered in polycystic ovary syndrome.“ *J Clin Endocrinol Metab* 93(3): 881-887.

Deutsch V R, Pick M, Perry C, Grisaru D, Hemo Y, Golan-Hadari D, Grant A, Eldor A und Soreq H (2002). „The stress-associated acetylcholinesterase variant AChE-R is expressed in human CD34(+) hematopoietic progenitors and its C-terminal peptide ARP promotes their proliferation.“ *Exp Hematol* 30(10): 1153-1161.

Devoto L, Fuentes A, Kohen P, Cespedes P, Palomino A, Pommer R, Munoz A und Strauss J F, 3rd (2009). „The human corpus luteum: life cycle and function in natural cycles.“ *Fertil Steril* 92(3): 1067-1079.

Dori A, Cohen J, Silverman W F, Pollack Y und Soreq H (2005). „Functional manipulations of acetylcholinesterase splice variants highlight alternative splicing contributions to murine neocortical development.“ *Cereb Cortex* 15(4): 419-430.

Dori A und Soreq H (2006). „ARP, the cleavable C-terminal peptide of "readthrough" acetylcholinesterase, promotes neuronal development and plasticity.“ *J Mol Neurosci* 28(3): 247-255.

Du A, Xie J, Guo K, Yang L, Wan Y, OuYang Q, Zhang X, Niu X, Lu L, Wu J und J. Z X (2015). „A novel role for synaptic acetylcholinesterase as an apoptotic deoxyribonuclease.“ *Cell Discovery* 1(15002).

Duggavathi R und Murphy B D (2009). „Development. Ovulation signals.“ *Science* 324(5929): 890-891.

Duyesen E G, Li B, Darvesh S und Lockridge O (2007). „Sensitivity of butyrylcholinesterase knockout mice to (-)-huperzine A and donepezil suggests humans with butyrylcholinesterase deficiency may not tolerate these Alzheimer's disease drugs and indicates butyrylcholinesterase function in neurotransmission.“ *Toxicology* 233(1-3): 60-69.

Eddleston M, Eyer P, Worek F, Sheriff M H und Buckley N A (2008). „Predicting outcome using butyrylcholinesterase activity in organophosphorus pesticide self-poisoning.“ *QJM* 101(6): 467-474.

Ehrmann D A (2005). „Polycystic ovary syndrome.“ *N Engl J Med* 352(12): 1223-1236.

Ehrmann D A, Barnes R B, Rosenfield R L, Cavaghan M K und Imperial J (1999). „Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome.“ *Diabetes Care* 22(1): 141-146.

Ellman G L, Courtney K D, Andres V, Jr. und Feather-Stone R M (1961). „A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.“ *Biochem Pharmacol* 7: 88-95.

Erickson G F und Shimasaki S (2001). „The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors.“ *Fertil Steril* 76(5): 943-949.

Espey L L, Ujioka T, Russell D L, Skelsey M, Vladu B, Robker R L, Okamura H und Richards J S (2000). „Induction of early growth response protein-1 gene expression in the rat ovary in response to an ovulatory dose of human chorionic gonadotropin.“ *Endocrinology* 141(7): 2385-2391.

Fauser B C und Van Heusden A M (1997). „Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences.“ *Endocr Rev* 18(1): 71-106.

Fenkci V, Fenkci S, Yilmazer M und Serteser M (2003). „Decreased total antioxidant status and increased oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome may contribute to the risk of cardiovascular disease.“ *Fertil Steril* 80(1): 123-127.

Franks S (2002). „Adult polycystic ovary syndrome begins in childhood.“ *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 16(2): 263-272.

Fritz S, Fohr K J, Boddien S, Berg U, Brucker C und Mayerhofer A (1999). „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.“ *J Clin Endocrinol Metab* 84(5): 1744-1750.

- Fritz S, Kunz L, Dimitrijevic N, Grunert R, Heiss C und Mayerhofer A (2002). „Muscarinic receptors in human luteinized granulosa cells: activation blocks gap junctions and induces the transcription factor early growth response factor-1.“ *J Clin Endocrinol Metab* 87(3): 1362-1367.
- Fritz S, Wessler I, Breitling R, Rossmanith W, Ojeda S R, Dissen G A, Amsterdam A und Mayerhofer A (2001). „Expression of muscarinic receptor types in the primate ovary and evidence for nonneuronal acetylcholine synthesis.“ *J Clin Endocrinol Metab* 86(1): 349-354.
- Galluzzi L, Kepp O, Krautwald S, Kroemer G und Linkermann A (2014). „Molecular mechanisms of regulated necrosis.“ *Semin Cell Dev Biol*.
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams J M, Alnemri E S, Baehrecke E H, Blagosklonny M V, Dawson T M, Dawson V L, El-Deiry W S, Fulda S, Gottlieb E, Green D R, Hengartner M O, Kepp O, Knight R A, Kumar S, Lipton S A, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nunez G, Peter M E, Piacentini M, Rubinsztein D C, Shi Y, Simon H U, Vandenebelle P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G und Kroemer G (2012). „Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012.“ *Cell Death Differ* 19(1): 107-120.
- Garcia-Ayllon M S, Millan C, Serra-Basante C, Bataller R und Saez-Valero J (2012). „Readthrough acetylcholinesterase is increased in human liver cirrhosis.“ *PLoS One* 7(9): e44598.
- Georges A, Auguste A, Bessiere L, Vanet A, Todeschini A L und Veitia R A (2014). „FOXL2: a central transcription factor of the ovary.“ *J Mol Endocrinol* 52(1): R17-33.
- Gervasio C G, Bernuci M P, Silva-de-Sa M F und Rosa E S A C (2014). „The role of androgen hormones in early follicular development.“ *ISRN Obstet Gynecol* 2014: 818010.
- Giampietri C, Starace D, Petrungaro S, Filippini A und Ziparo E (2014). „Necroptosis: molecular signalling and translational implications.“ *Int J Cell Biol* 2014: 490275.
- Gilboa-Geffen A, Lacoste P P, Soreq L, Cizeron-Clairac G, Le Panse R, Truffault F, Shaked I, Soreq H und Berrih-Aknin S (2007). „The thymic theme of acetylcholinesterase splice variants in myasthenia gravis.“ *Blood* 109(10): 4383-4391.
- Ginther O J, Beg M A, Bergfelt D R, Donadeu F X und Kot K (2001). „Follicle selection in monovular species.“ *Biol Reprod* 65(3): 638-647.
- Gnoth C, Godehardt D, Godehardt E, Frank-Herrmann P und Freundl G (2003). „Time to pregnancy: results of the German prospective study and impact on the management of infertility.“ *Hum Reprod* 18(9): 1959-1966.
- Gnoth C, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Friol K, Tigges J und Freundl G (2005). „Definition and prevalence of subfertility and infertility.“ *Hum Reprod* 20(5): 1144-1147.
- Gonzalez F, Rote N S, Minium J und Kirwan J P (2006). „Reactive oxygen species-induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome.“ *J Clin Endocrinol Metab* 91(1): 336-340.
- Gougeon A (1986). „Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results.“ *Hum Reprod* 1(2): 81-87.
- Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W und Schulte-Hermann R (1995). „In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note.“ *Hepatology* 21(5): 1465-1468.
- Greiner M, Paredes A, Araya V und Lara H E (2005). „Role of stress and sympathetic innervation in the development of polycystic ovary syndrome.“ *Endocrine* 28(3): 319-324.
- Grifman M, Galyam N, Seidman S und Soreq H (1998). „Functional redundancy of acetylcholinesterase and neuroligin in mammalian neuritogenesis.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(23): 13935-13940.

- Grisaru D, Deutsch V, Shapira M, Pick M, Sternfeld M, Melamed-Book N, Kaufer D, Galyam N, Gait M J, Owen D, Lessing J B, Eldor A und Soreq H (2001). „ARP, a peptide derived from the stress-associated acetylcholinesterase variant, has hematopoietic growth promoting activities.“ *Mol Med* 7(2): 93-105.
- Grisaru D, Keidar R, Schreiber L, Lessing J B und Deutsch V (2007). „The effect of the readthrough acetylcholinesterase variant (AChE-R) on uterine muscle and leiomyomas.“ *Mol Hum Reprod* 13(5): 351-354.
- Hamilton B E und Ventura S J (2006). „Fertility and abortion rates in the United States, 1960-2002.“ *Int J Androl* 29(1): 34-45.
- Hanin G und Soreq H (2011). „Cholinesterase-Targeting microRNAs Identified in silico Affect Specific Biological Processes.“ *Front Mol Neurosci* 4: 28.
- Hao Z, Liu M, Liu Z und Lv D (2009). „Huperzine A for vascular dementia.“ *Cochrane Database Syst Rev*(2): CD007365.
- Härtl R, Gleinich A und Zimmermann M (2011). „Dramatic increase in readthrough acetylcholinesterase in a cellular model of oxidative stress.“ *J Neurochem* 116(6): 1088-1096.
- Hatzirodos N, Hummitzsch K, Irving-Rodgers H F, Harland M L, Morris S E und Rodgers R J (2014). „Transcriptome profiling of granulosa cells from bovine ovarian follicles during atresia.“ *BMC Genomics* 15: 40.
- He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L und Wang X (2009). „Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha.“ *Cell* 137(6): 1100-1111.
- Hennet M L und Combelles C M (2012). „The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation.“ *Int J Dev Biol* 56(10-12): 819-831.
- Hillier S G, Whitelaw P F und Smyth C D (1994). „Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited.“ *Mol Cell Endocrinol* 100(1-2): 51-54.
- Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, Bodmer J L, Schneider P, Seed B und Tschopp J (2000). „Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule.“ *Nat Immunol* 1(6): 489-495.
- Hsu S M, Raine L und Fanger H (1981). „The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics.“ *Am J Clin Pathol* 75(6): 816-821.
- Hughes F M, Jr. und Gorospe W C (1991). „Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia.“ *Endocrinology* 129(5): 2415-2422.
- Hughesdon P E (1982). „Morphology and morphogenesis of the Stein-Leventhal ovary and of so-called "hyperthecosis".“ *Obstet Gynecol Surv* 37(2): 59-77.
- Hussein M R (2005). „Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms.“ *Hum Reprod Update* 11(2): 162-177.
- Irving-Rodgers H F, van Wezel I L, Mussard M L, Kinder J E und Rodgers R J (2001). „Atresia revisited: two basic patterns of atresia of bovine antral follicles.“ *Reproduction* 122(5): 761-775.
- Jansen E, Laven J S, Dommerholt H B, Polman J, van Rijt C, van den Hurk C, Westland J, Mosselman S und Fausser B C (2004). „Abnormal gene expression profiles in human ovaries from polycystic ovary syndrome patients.“ *Mol Endocrinol* 18(12): 3050-3063.
- Jiang H und Zhang X J (2008). „Acetylcholinesterase and apoptosis. A novel perspective for an old enzyme.“ *FEBS J* 275(4): 612-617.
- Karpel R, Ben Aziz-Aloya R, Sternfeld M, Ehrlich G, Ginzberg D, Tarroni P, Clementi F, Zakut H und Soreq H (1994). „Expression of three alternative acetylcholinesterase messenger RNAs in human tumor cell lines of different tissue origins.“ *Exp Cell Res* 210(2): 268-277.

- Kaufer D, Friedman A, Seidman S und Soreq H (1998). „Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression.“ *Nature* 393(6683): 373-377.
- Kawashima K und Fujii T (2008). „Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance.“ *J Pharmacol Sci* 106(2): 167-173.
- Kehat R, Zemel E, Cuenca N, Evron T, Toiber D, Loewenstein A, Soreq H und Perlman I (2007). „A novel isoform of acetylcholinesterase exacerbates photoreceptors death after photic stress.“ *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(3): 1290-1297.
- Keren-Tal I, Dantes A, Sprengel R und Amsterdam A (1993). „Establishment of steroidogenic granulosa cell lines expressing follicle stimulating hormone receptors.“ *Mol Cell Endocrinol* 95(1-2): R1-10.
- Kerin J F, Edmonds D K, Warnes G M, Cox L W, Seemark R F, Matthews C D, Young G B und Baird D T (1981). „Morphological and functional relations of Graafian follicle growth to ovulation in women using ultrasonic, laparoscopic and biochemical measurements.“ *Br J Obstet Gynaecol* 88(2): 81-90.
- Ketel I J, Stehouwer C D, Serne E H, Korsen T J, Hompes P G, Smulders Y M, de Jongh R T, Homburg R und Lambalk C B (2008). „Obese but not normal-weight women with polycystic ovary syndrome are characterized by metabolic and microvascular insulin resistance.“ *J Clin Endocrinol Metab* 93(9): 3365-3372.
- Kim S O, Ono K und Han J (2001). „Apoptosis by pan-caspase inhibitors in lipopolysaccharide-activated macrophages.“ *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281(5): L1095-1105.
- Knochenhauer E S, Key T J, Kahsar-Miller M, Waggoner W, Boots L R und Azziz R (1998). „Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study.“ *J Clin Endocrinol Metab* 83(9): 3078-3082.
- Kunz L, Ramsch R, Krieger A, Young K A, Dissen G A, Stouffer R L, Ojeda S R und Mayerhofer A (2006). „Voltage-dependent K⁺ channel acts as sex steroid sensor in endocrine cells of the human ovary.“ *J Cell Physiol* 206(1): 167-174.
- Kunz L, Roggors C und Mayerhofer A (2007). „Ovarian acetylcholine and ovarian KCNQ channels: insights into cellular regulatory systems of steroidogenic granulosa cells.“ *Life Sci* 80(24-25): 2195-2198.
- Kunz L, Thalhammer A, Berg F D, Berg U, Duffy D M, Stouffer R L, Dissen G A, Ojeda S R und Mayerhofer A (2002). „Ca²⁺-activated, large conductance K⁺ channel in the ovary: identification, characterization, and functional involvement in steroidogenesis.“ *J Clin Endocrinol Metab* 87(12): 5566-5574.
- Laemmli U K (1970). „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.“ *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lahr G, Heiss C, Mayerhofer A, Schilling K, Parmer R J, O'Connor D T und Gratzl M (1990). „Chromogranin A in the olfactory system of the rat.“ *Neuroscience* 39(3): 605-611.
- Lara H E, Dissen G A, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler J L und Ojeda S R (2000). „An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat.“ *Endocrinology* 141(3): 1059-1072.
- Lara H E, Ferruz J L, Luza S, Bustamante D A, Borges Y und Ojeda S R (1993). „Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome.“ *Endocrinology* 133(6): 2690-2695.
- Lara H E, Porcile A, Espinoza J, Romero C, Luza S M, Fuhrer J, Miranda C und Roblero L (2001). „Release of norepinephrine from human ovary: coupling to steroidogenic response.“ *Endocrine* 15(2): 187-192.
- Layer P G, Klaczinski J, Salfelder A, Sperling L E, Thangaraj G, Tuschl C und Vogel-Hopker A (2013). „Cholinesterases in development: AChE as a firewall to inhibit cell proliferation and support differentiation.“ *Chem Biol Interact* 203(1): 269-276.
- Layer P G, Weikert T und Alber R (1993). „Cholinesterases regulate neurite growth of chick nerve cells in vitro by means of a non-enzymatic mechanism.“ *Cell Tissue Res* 273(2): 219-226.

- Legay C (2000). „Why so many forms of acetylcholinesterase?“ *Microsc Res Tech* 49(1): 56-72.
- Legay C, Bon S und Massoulie J (1993). „Expression of a cDNA encoding the glycolipid-anchored form of rat acetylcholinesterase.“ *FEBS Lett* 315(2): 163-166.
- Legay C, Huchet M, Massoulie J und Changeux J P (1995). „Developmental regulation of acetylcholinesterase transcripts in the mouse diaphragm: alternative splicing and focalization.“ *Eur J Neurosci* 7(8): 1803-1809.
- Legro R S, Kunselman A R, Dodson W C und Dunaif A (1999). „Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women.“ *J Clin Endocrinol Metab* 84(1): 165-169.
- Levi-Montalcini R (1987). „The nerve growth factor 35 years later.“ *Science* 237(4819): 1154-1162.
- Linher-Melville K und Li J (2013). „The roles of glial cell line-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor during the final stage of folliculogenesis: a focus on oocyte maturation.“ *Reproduction* 145(2): R43-54.
- Linkermann A und Green D R (2014). „Necroptosis.“ *N Engl J Med* 370(5): 455-465.
- Malkova L, Kozikowski A P und Gale K (2011). „The effects of huperzine A and IDRA 21 on visual recognition memory in young macaques.“ *Neuropharmacology* 60(7-8): 1262-1268.
- Manni L, Holmang A, Lundeberg T, Aloe L und Stener-Victorin E (2005). „Ovarian expression of alpha (1)- and beta (2)-adrenoceptors and p75 neurotrophin receptors in rats with steroid-induced polycystic ovaries.“ *Auton Neurosci* 118(1-2): 79-87.
- Massoulie J (2002). „The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases.“ *Neurosignals* 11(3): 130-143.
- Massoulie J, Anselmet A, Bon S, Krejci E, Legay C, Morel N und Simon S (1998). „Acetylcholinesterase: C-terminal domains, molecular forms and functional localization.“ *J Physiol Paris* 92(3-4): 183-190.
- Matsuda-Minehata F, Inoue N, Goto Y und Manabe N (2006). „The regulation of ovarian granulosa cell death by pro- and anti-apoptotic molecules.“ *J Reprod Dev* 52(6): 695-705.
- Matsuda F, Inoue N, Manabe N und Ohkura S (2012). „Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells.“ *J Reprod Dev* 58(1): 44-50.
- Mayerhofer A, Dimitrijevic N und Kunz L (2003). „The expression and biological role of the non-neuronal cholinergic system in the ovary.“ *Life Sci* 72(18-19): 2039-2045.
- Mayerhofer A, Dissen G A, Costa M E und Ojeda S R (1997). „A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary.“ *Endocrinology* 138(8): 3320-3329.
- Mayerhofer A, Fohr K J, Sterzik K und Gratzl M (1992). „Carbachol increases intracellular free calcium concentrations in human granulosa-lutein cells.“ *J Endocrinol* 135(1): 153-159.
- Mayerhofer A und Fritz S (2002). „Ovarian acetylcholine and muscarinic receptors: hints of a novel intrinsic ovarian regulatory system.“ *Microsc Res Tech* 59(6): 503-508.
- Mayerhofer A und Kunz L (2005). „A non-neuronal cholinergic system of the ovarian follicle.“ *Ann Anat* 187(5-6): 521-528.
- Mayerhofer A, Kunz L, Krieger A, Proskocil B, Spindel E, Amsterdam A, Dissen G A, Ojeda S R und Wessler I (2006). „FSH regulates acetylcholine production by ovarian granulosa cells.“ *Reprod Biol Endocrinol* 4: 37.
- Mayerhofer A, Smith G D, Danilchik M, Levine J E, Wolf D P, Dissen G A und Ojeda S R (1998). „Oocytes are a source of catecholamines in the primate ovary: evidence for a cell-cell regulatory loop.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18): 10990-10995.

- McCall K (2010). „Genetic control of necrosis - another type of programmed cell death.“ *Curr Opin Cell Biol* 22(6): 882-888.
- McNatty K P (1978). „Cyclic changes in antral fluid hormone concentrations in humans.“ *Clin Endocrinol Metab* 7(3): 577-600.
- Mesen T B und Young S L (2015). „Progesterone and the luteal phase: a requisite to reproduction.“ *Obstet Gynecol Clin North Am* 42(1): 135-151.
- Meshorer E, Erb C, Gazit R, Pavlovsky L, Kaufer D, Friedman A, Glick D, Ben-Arie N und Soreq H (2002). „Alternative splicing and neuritic mRNA translocation under long-term neuronal hypersensitivity.“ *Science* 295(5554): 508-512.
- Meshorer E und Soreq H (2006). „Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies.“ *Trends Neurosci* 29(4): 216-224.
- Meshorer E, Toiber D, Zurel D, Sahly I, Dori A, Cagnano E, Schreiber L, Grisaru D, Tronche F und Soreq H (2004). „Combinatorial complexity of 5' alternative acetylcholinesterase transcripts and protein products.“ *J Biol Chem* 279(28): 29740-29751.
- Mor I, Sklan E H, Podoly E, Pick M, Kirschner M, Yoge L, Bar-Sheshet Itach S, Schreiber L, Geyer B, Mor T, Grisaru D und Soreq H (2008). „Acetylcholinesterase-R increases germ cell apoptosis but enhances sperm motility.“ *J Cell Mol Med* 12(2): 479-495.
- Morley P, Tsang B K, Whitfield J F und Schwartz J L (1992). „The effect of muscarinic cholinergic agonists on intracellular calcium and progesterone production by chicken granulosa cells.“ *Endocrinology* 130(2): 663-670.
- Nelson V L, Legro R S, Strauss J F, 3rd und McAllister J M (1999). „Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries.“ *Mol Endocrinol* 13(6): 946-957.
- Nelson V L, Qin K N, Rosenfield R L, Wood J R, Penning T M, Legro R S, Strauss J F, 3rd und McAllister J M (2001). „The biochemical basis for increased testosterone production in theca cells propagated from patients with polycystic ovary syndrome.“ *J Clin Endocrinol Metab* 86(12): 5925-5933.
- Pache T D, Hop W C, de Jong F H, Leerentveld R A, van Geldorp H, Van de Kamp T M, Gooren L J und Fauser B C (1992). „17 beta-Oestradiol, androstenedione and inhibin levels in fluid from individual follicles of normal and polycystic ovaries, and in ovaries from androgen treated female to male transsexuals.“ *Clin Endocrinol (Oxf)* 36(6): 565-571.
- Perrier A L, Massoulie J und Krejci E (2002). „PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain.“ *Neuron* 33(2): 275-285.
- Perrier N A, Salani M, Falasca C, Bon S, Augusti-Tocco G und Massoulie J (2006). „Readthrough acetylcholinesterase expression remains minor after stress or exposure to inhibitors.“ *J Mol Neurosci* 30(1-2): 75-76.
- Pfaffl M W (2001). „A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.“ *Nucleic Acids Res* 29(9): e45.
- Pick M, Perry C, Lapidot T, Guimaraes-Sternberg C, Naparstek E, Deutsch V und Soreq H (2006). „Stress-induced cholinergic signaling promotes inflammation-associated thrombopoiesis.“ *Blood* 107(8): 3397-3406.
- Price J C, Bromfield J J und Sheldon I M (2013). „Pathogen-associated molecular patterns initiate inflammation and perturb the endocrine function of bovine granulosa cells from ovarian dominant follicles via TLR2 and TLR4 pathways.“ *Endocrinology* 154(9): 3377-3386.
- Pritchett T L, Tanner E A und McCall K (2009). „Cracking open cell death in the Drosophila ovary.“ *Apoptosis* 14(8): 969-979.
- Ramos A S und Techert S (2005). „Influence of the water structure on the acetylcholinesterase efficiency.“ *Biophys J* 89(3): 1990-2003.

Richards J S und Pangas S A (2010). „The ovary: basic biology and clinical implications.“ *J Clin Invest* 120(4): 963-972.

Richardson S J, Senikas V und Nelson J F (1987). „Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion.“ *J Clin Endocrinol Metab* 65(6): 1231-1237.

Rodgers R J und Irving-Rodgers H F (2010). „Morphological classification of bovine ovarian follicles.“ *Reproduction* 139(2): 309-318.

Ron D, Jiang Z, Yao L, Vagts A, Diamond I und Gordon A (1999). „Coordinated movement of RACK1 with activated betaIIIPKC.“ *J Biol Chem* 274(38): 27039-27046.

Rosas-Ballina M, Ochani M, Parrish W R, Ochani K, Harris Y T, Huston J M, Chavan S und Tracey K J (2008). „Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(31): 11008-11013.

Rosas-Ballina M, Olofsson P S, Ochani M, Valdes-Ferrer S I, Levine Y A, Reardon C, Tusche M W, Pavlov V A, Andersson U, Chavan S, Mak T W und Tracey K J (2011). „Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit.“ *Science* 334(6052): 98-101.

Rotterdam E A-S P C W G (2004). „Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome.“ *Fertil Steril* 81(1): 19-25.

Rotundo R L (2003). „Expression and localization of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction.“ *J Neurocytol* 32(5-8): 743-766.

Russell R B, Petrini J R, Damus K, Mattison D R und Schwarz R H (2003). „The changing epidemiology of multiple births in the United States.“ *Obstet Gynecol* 101(1): 129-135.

Sabuncu T, Vural H, Harma M und Harma M (2001). „Oxidative stress in polycystic ovary syndrome and its contribution to the risk of cardiovascular disease.“ *Clin Biochem* 34(5): 407-413.

Saller S, Kunz L, Berg D, Berg U, Lara H, Urrea J, Hecht S, Pavlik R, Thaler C J und Mayerhofer A (2014). „Dopamine in human follicular fluid is associated with cellular uptake and metabolism-dependent generation of reactive oxygen species in granulosa cells: implications for physiology and pathology.“ *Hum Reprod* 29(3): 555-567.

Saller S, Kunz L, Dissen G A, Stouffer R, Ojeda S R, Berg D, Berg U und Mayerhofer A (2010). „Oxytocin receptors in the primate ovary: molecular identity and link to apoptosis in human granulosa cells.“ *Hum Reprod* 25(4): 969-976.

Saller S, Merz-Lange J, Raffael S, Hecht S, Pavlik R, Thaler C, Berg D, Berg U, Kunz L und Mayerhofer A (2012). „Norepinephrine, active norepinephrine transporter, and norepinephrine-metabolism are involved in the generation of reactive oxygen species in human ovarian granulosa cells.“ *Endocrinology* 153(3): 1472-1483.

Sanders S R, Cuneo S P und Turzillo A M (2002). „Effects of nicotine and cotinine on bovine theca interna and granulosa cells.“ *Reprod Toxicol* 16(6): 795-800.

Sang Q, Yao Z, Wang H, Feng R, Wang H, Zhao X, Xing Q, Jin L, He L, Wu L und Wang L (2013). „Identification of microRNAs in human follicular fluid: characterization of microRNAs that govern steroidogenesis in vitro and are associated with polycystic ovary syndrome in vivo.“ *J Clin Endocrinol Metab* 98(7): 3068-3079.

Sawyer H R (1995). „Structural and functional properties of the corpus luteum of pregnancy.“ *J Reprod Fertil Suppl* 49: 97-110.

Schiebler T H, Schmidt W und Zilles K (1995). „Anatomie“. 6. Auflage, Springer-Verlag.

Schwartzman R A und Cidlowski J A (1993). „Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death.“ *Endocr Rev* 14(2): 133-151.

- Shikone T, Yamoto M, Kokawa K, Yamashita K, Nishimori K und Nakano R (1996). „Apoptosis of human corpora lutea during cyclic luteal regression and early pregnancy.“ *J Clin Endocrinol Metab* 81(6): 2376-2380.
- Siddappa D, Beaulieu E, Gevry N, Roux P P, Bordignon V und Duggavathi R (2015). „Effect of the transient pharmacological inhibition of mapk3/1 pathway on ovulation in mice.“ *PLoS One* 10(3): e0119387.
- Silver A (1978). „Species variation in the distribution of cholinesterases in the ovary of the plains viscacha, cat, ferret, rabbit, rat, guinea-pig and roe deer.“ *Histochem J* 10(1): 79-102.
- Sklan E H, Lowenthal A, Korner M, Ritov Y, Landers D M, Rankinen T, Bouchard C, Leon A S, Rice T, Rao D C, Wilmore J H, Skinner J S und Soreq H (2004). „Acetylcholinesterase/paraoxonase genotype and expression predict anxiety scores in Health, Risk Factors, Exercise Training, and Genetics study.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(15): 5512-5517.
- Smith G W und Meidan R (2014). „Ever-changing cell interactions during the life span of the corpus luteum: relevance to luteal regression.“ *Reprod Biol* 14(2): 75-82.
- Sohel M M, Hoelker M, Noferesti S S, Salilew-Wondim D, Tholen E, Looft C, Rings F, Uddin M J, Spencer T E, Schellander K und Tesfaye D (2013). „Exosomal and Non-Exosomal Transport of Extra-Cellular microRNAs in Follicular Fluid: Implications for Bovine Oocyte Developmental Competence.“ *PLoS One* 8(11): e78505.
- Solomon C G (1999). „The epidemiology of polycystic ovary syndrome. Prevalence and associated disease risks.“ *Endocrinol Metab Clin North Am* 28(2): 247-263.
- Soreq H und Seidman S (2001). „Acetylcholinesterase--new roles for an old actor.“ *Nat Rev Neurosci* 2(4): 294-302.
- Stener-Victorin E, Jedel E und Manneras L (2008). „Acupuncture in polycystic ovary syndrome: current experimental and clinical evidence.“ *J Neuroendocrinol* 20(3): 290-298.
- Steptoe P C und Edwards R G (1978). „Birth after the reimplantation of a human embryo.“ *Lancet* 2(8085): 366.
- Stouffer R L, Bishop C V, Bogan R L, Xu F und Hennebold J D (2013). „Endocrine and local control of the primate corpus luteum.“ *Reprod Biol* 13(4): 259-271.
- Stout C, Goodenough D A und Paul D L (2004). „Connexins: functions without junctions.“ *Curr Opin Cell Biol* 16(5): 507-512.
- Sunkara S K, Rittenberg V, Raine-Fenning N, Bhattacharya S, Zamora J und Coomarasamy A (2011). „Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles.“ *Hum Reprod* 26(7): 1768-1774.
- Sverrisdottir Y B, Mogren T, Kataoka J, Janson P O und Stener-Victorin E (2008). „Is polycystic ovary syndrome associated with high sympathetic nerve activity and size at birth?“ *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294(3): E576-581.
- Thullberry M D, Cox H D, Schule T, Thompson C M und George K M (2005). „Differential localization of acetylcholinesterase in neuronal and non-neuronal cells.“ *J Cell Biochem* 96(3): 599-610.
- Tingen C M, Bristol-Gould S K, Kiesewetter S E, Wellington J T, Shea L und Woodruff T K (2009). „Prepubertal primordial follicle loss in mice is not due to classical apoptotic pathways.“ *Biol Reprod* 81(1): 16-25.
- Toiber D, Berson A, Greenberg D, Melamed-Book N, Diamant S und Soreq H (2008). „N-acetylcholinesterase-induced apoptosis in Alzheimer's disease.“ *PLoS One* 3(9): e3108.
- Towbin H, Staehelin T und Gordon J (1979). „Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354.
- Tsang B K, Moon Y S, Simpson C W und Armstrong D T (1979). „Androgen biosynthesis in human ovarian follicles: cellular source, gonadotropin control, and adenosine 3',5'-monophosphate mediation.“ *J Clin Endocrinol Metab* 48(1): 153-158.

- Twigt J, Steegers-Theunissen R P, Bezstarosti K und Demmers J A (2012). „Proteomic analysis of the microenvironment of developing oocytes.“ *Proteomics* 12(9): 1463-1471.
- Van Voorhis B J (2007). „Clinical practice. In vitro fertilization.“ *N Engl J Med* 356(4): 379-386.
- Van Wezel I L, Dharmarajan A M, Lavranos T C und Rodgers R J (1999). „Evidence for alternative pathways of granulosa cell death in healthy and slightly atretic bovine antral follicles.“ *Endocrinology* 140(6): 2602-2612.
- Vande Wiele R L, Bogumil J, Dyrenfurth I, Ferin M, Jewelewicz R, Warren M, Rizkallah T und Mikhail G (1970). „Mechanisms regulating the menstrual cycle in women.“ *Recent Prog Horm Res* 26: 63-103.
- Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhout S, Walczak H und Vandenabeele P (2014). „Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways.“ *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(2): 135-147.
- Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T und Kroemer G (2010). „Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion.“ *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(10): 700-714.
- Vanlangenakker N, Vanden Berghe T und Vandenabeele P (2012). „Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview.“ *Cell Death Differ* 19(1): 75-86.
- Wallace W H und Kelsey T W (2010). „Human ovarian reserve from conception to the menopause.“ *PLoS One* 5(1): e8772.
- Wang H, Sun L, Su L, Rizo J, Liu L, Wang L F, Wang F S und Wang X (2014a). „Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3.“ *Mol Cell* 54(1): 133-146.
- Wang L Q, Liu J C, Chen C L, Cheng S F, Sun X F, Zhao Y, Yin S, Hou Z M, Pan B, Ding C, Shen W und Zhang X F (2014c). „Regulation of primordial follicle recruitment by cross-talk between the Notch and phosphatase and tensin homologue (PTEN)/AKT pathways.“ *Reprod Fertil Dev*.
- Webber L J, Stubbs S, Stark J, Trew G H, Margara R, Hardy K und Franks S (2003). „Formation and early development of follicles in the polycystic ovary.“ *Lancet* 362(9389): 1017-1021.
- Wu W, Liu P und Li J (2012). „Necroptosis: an emerging form of programmed cell death.“ *Crit Rev Oncol Hematol* 82(3): 249-258.
- Xie W, Sibley J A, Chatonnet A, Wilder P J, Rizzino A, McComb R D, Taylor P, Hinrichs S H und Lockridge O (2000). „Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking acetylcholinesterase.“ *J Pharmacol Exp Ther* 293(3): 896-902.
- Yang G, Wang Y, Tian J und Liu J P (2013a). „Huperzine A for Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials.“ *PLoS One* 8(9): e74916.
- Yang L X, Ma S G, Liu H und Xu W (2013c). „Influence of obstructive sleep apnea on serum butyrylcholinesterase activity and ischemia-modified albumin levels.“ *Clinics (Sao Paulo)* 68(7): 968-973.
- Zhang D W, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu B J, Lin S C, Dong M Q und Han J (2009). „RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis.“ *Science* 325(5938): 332-336.
- Zhang X J und Greenberg D S (2012). „Acetylcholinesterase involvement in apoptosis.“ *Front Mol Neurosci* 5: 40.
- Zhang X J, Yang L, Zhao Q, Caen J P, He H Y, Jin Q H, Guo L H, Alemany M, Zhang L Y und Shi Y F (2002). „Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types.“ *Cell Death Differ* 9(8): 790-800.
- Zhu L, Yuan H, Guo C, Lu Y, Deng S, Yang Y, Wei Q, Wen L und He Z (2012). „Zearalenone induces apoptosis and necrosis in porcine granulosa cells via a caspase-3- and caspase-9-dependent mitochondrial signaling pathway.“ *J Cell Physiol* 227(5): 1814-1820.

Zimmermann M (2013). „Neuronal AChE splice variants and their non-hydrolytic functions: redefining a target of AChE inhibitors?“ Br J Pharmacol 170(5): 953-967.

6 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gebührt Herrn Professor Dr. Artur Mayerhofer, der mir die Durchführung meiner Doktorarbeit am Institut für Zellbiologie ermöglicht und stets für eine umfangreiche Betreuung gesorgt hat.

PD Dr. Lars Kunz danke ich sehr für die Übernahme der Begutachtung meiner Doktorarbeit und die stets konstruktiven Anregungen.

Ebenfalls gilt mein Dank allen Mitarbeitern der AG Mayerhofer. Daniel Einwang, Herrn Dr. King Kim-Manfred Dietrich, Karin Metzrath und Astrid Tiefenbacher danke ich besonders für ihre tatkräftige Unterstützung und gute Zusammenarbeit. Theresa Buck, Lena Glashauser, Stefanie Gruschka, Carola Herrmann, Andreas Huber, Dr. Cornelia Kampfer, Prof. Dr. Egon Skelett, Dr. Silvana Lauf, Dr. Christine Mayer, Dr. Sabine Meinel, Dr. Verónica Rey Berutti, Dr. Sabine Saller, Dr. Franziska Sandner, Kerstin Schubert, Dr. Harald Welter und Dr. Stefanie Windschüttl danke ich sehr für ihre Hilfsbereitschaft, Unterstützung und die stets angenehme, kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor Dr. Hernan Lara und Dr. Javier Urra D. für die gute Zusammenarbeit und Gastfreundschaft während meines Aufenthalts in Chile.

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

Meiner Familie danke ich ganz besonders für ihre wunderbare, liebevolle Unterstützung während der Anfertigung meiner Doktorarbeit.

Bei Kerstin Zistler möchte ich mich von ganzem Herzen für ihre großartige Unterstützung, Geduld und Lesefreude während der Anfertigung meiner Doktorarbeit bedanken. Danke!

7 Publikationen

7.1 Originalarbeiten

Blohberger J, Kunz L, Einwang D, Berg U, Berg D, Ojeda S R, Dissen G A, Frohlich T, Arnold G J, Soreq H, Lara H und Mayerhofer A (2015). „Readthrough acetylcholinesterase (AChE-R) and regulated necrosis: pharmacological targets for the regulation of ovarian functions?” Cell Death Dis 6: e1685.

Urra J, Blohberger J, Tiszavari M, Mayerhofer A, Lara HE (2015). „Effect of in vivo blockade of acetylcholinesterase on follicular development in rat’s ovary.” Reproduction. In Revision.

Meinel S, Blohberger J, Berg U, Berg D, Ojeda S R, Dissen G A, Mayerhofer A (2015). „Pro-Nerve growth factor (proNGF) in the ovary and human granulosa cells.“ Horm Mol Biol Clin Investig. Eingereicht.

7.2 Poster

Blohberger J, Einwang D, Berg D, Berg U, Saller S, Mayerhofer A. „Identification of active acetylcholine-esterase and variants in follicular fluid and granulosa cells of the human ovary.” 59. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG), München, 2012.

Blohberger J, Einwang D, Berg D, Berg U, Hecht S, Pavlik R, Thaler C, Saller S, Mayerhofer A. „Butyryl- and acetylcholine-esterase in human IVF derived follicular fluid and luteinizing granulosa cells.” 56. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE), Düsseldorf, 2013.

Auszeichnung: Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie im Rahmen des 56. Symposiums der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie in Düsseldorf.

Blohberger J, Einwang D, Berg D, Berg U, Dissen G, Ojeda S, , Saller S, Urra J, Lara H, Mayerhofer A. „Acetylcholinesterase in the ovary.” 5. Kongress des Dachverbands Reproduktionsbiologie (DVR), Münster, 2013.

Blohberger J, Einwang D, Berg D, Berg U, Dissen G, Ojeda S, , Saller S, Urra J, Lara H, Mayerhofer A. „Acetylcholinesterase in the ovary.” 30. jährliches Treffen der European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), München, 2014.