

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

**Untersuchung negativer allosterischer Modulatoren des FSH-
Rezeptors bei humanen primären Granulosazellen**

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



vorgelegt von
Verena Katharina Pia Nick
aus Lahnstein
2020

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Udo Jeschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Markus S. Kupka
Prof. Dr. Artur Mayerhofer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Dr. Sabine Heublein

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2020

Im Andenken an meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| I. Einleitung..... | 1 |
| II. Literaturübersicht..... | 3 |
| 1. Der Ovarialzyklus: Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse | 3 |
| 2. Follikulogenese | 4 |
| 3. Beschreibung humane GC als Modellsystem | 8 |
| 4. FSH und FSHR: Einfluss auf die Reproduktion..... | 9 |
| 5. Negative allosterische Modulatoren (NAM) des FSHR: Charakterisierung von ADX68692, ADX68693, ADX68128 | 12 |
| 6. Hormonelle Kontrazeption mit der Pille | 13 |
| 7. Zielsetzung..... | 16 |
| III. Material und Methoden..... | 17 |
| 1. Material | 17 |
| 1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien | 17 |
| 1.2. Chemikalien | 18 |
| 1.3. Lösungen | 18 |
| 1.4. Stimulantien | 19 |
| 1.5 Reagenzien, Lösungen und Zubehör | 19 |
| 1.5.1 WST | 19 |
| 1.5.2 Immunzytochemie | 19 |
| 1.5.3 ELISA..... | 20 |
| 1.5.4 Bradford Assay..... | 20 |
| 1.6. Zellen | 20 |
| 1.7. Software..... | 21 |
| 2. Methoden | 21 |
| 2.1. Zellkultur | 21 |
| 2.1.1. Zellkultur der Zelllinie Ovar3..... | 21 |
| 2.1.2 Bestimmung der Zellzahl..... | 22 |
| 2.1.3 Einfrieren von Zellen | 22 |
| 2.1.4 Aussaat von eingefrorenen Zellen..... | 23 |
| 2.1.5 Zellkultur humaner primärer Granulosazellen | 23 |
| 2.2 Bradford | 24 |
| 2.3 WST Messung..... | 25 |
| 2.4 Immunzytochemie | 26 |
| 2.5 ELISA..... | 27 |

| | |
|---|----|
| 2.6 Statistische Auswertung mit SPSS..... | 29 |
| IV. Ergebnisse | 30 |
| 1. Charakterisierung und Validierung des in vitro Modellsystems | 30 |
| 1.1. Bestimmung des Gesamtproteins in Abhängigkeit von der Zellzahl..... | 30 |
| 1.2. Steroidhormonsynthese in Abhängigkeit von der Zellzahl..... | 30 |
| 2. Nachweis und Lokalisation des FSH Rezeptors in humanen primären Granulosazellen mittels immuncytochemischer Färbung..... | 32 |
| 3. WST Messung..... | 32 |
| 3.1 Ovcar 3: Kontrollexperiment bei Zellkulturlinie mit bekannter FSHR Positivität..... | 32 |
| 3.2 WST Granulosazellkultur | 33 |
| 4. Bestimmung der Steroidhormonsynthese mittels Elisa | 34 |
| 4.1 Estradiolsynthese bei primären humanen GC nach ADX Stimulation | 34 |
| 4.2 Progesteronsynthese bei primären humanen GC nach ADX Stimulation | 35 |
| V. Diskussion..... | 37 |
| 1.1 Diskussion der Methode..... | 37 |
| 1.1.1 Primärzellkultur vs. Zellkultur | 37 |
| 1.1.2 Vorversuche | 38 |
| 1.1.3 Immunzytochemie | 40 |
| 1.1.4 WST | 40 |
| 1.1.5 ELISA..... | 41 |
| 1.2 Ausblick..... | 41 |
| VI. Zusammenfassung | 43 |
| VII. Literaturverzeichnis..... | 46 |
| VIII. Abbildungsverzeichnis | 56 |
| IX. Danksagung..... | 57 |
| X. Eidesstattliche Versicherung..... | 58 |

Abkürzungen und Symbole

| | |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| % | Prozent |
| § | Paragraph |
| > | größer als |
| < | kleiner als |
| °C | Grad Celsius |
| µl | Mikroliter |
| Aqua ad inj. | Aqua ad injectabilia |
| Aqua dest. Aqua destillata, | destilliertes Wasser |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| Ca | Calcium |
| cAMP | Cyclisches Adenosinmonophosphat |
| Cox-2 | cyclooxygenase 2 |
| CREB | cAMP response element binding protein |
| E2 | Estradiol |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| FSH | Follikel stimulierendes Hormon |
| GC | Granulosazelle |
| h | Stunde |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HAS2 | hyaluronic acid synthase 2 |
| HBSS | Hank`s Balanced Salt Solution |
| IGF-I | insulin-like growth factor I |
| IVF | In-vitro Fertilisation |
| LH | Luteinisierendes Hormon |
| m | Molar |
| Mg | Magnesium |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mRNA | Messenger Ribonukleinsäue |
| NaHCO ₃ | Natriumhydrogencarbonat |
| NAM | Negativer allosterischer Modulator |

| | |
|----------|---|
| ng | Nanogramm |
| nM | Nano molar |
| nm | Nanometer |
| Ovcar3 | Humane Ovarialkarzinomzelllinie 3 |
| P4 | Progesteron |
| P450AROM | P450 Aromatase |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| P450SCC | P450 side chain cleavage |
| PBST | Phosphate Buffered Saline mit Tween |
| PKA | Proteinkinase A |
| PKC | Proteinkinase C |
| PLC | Phospholipase C |
| PTX | pentraxin |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| sec | Sekunde |
| TNFAIP6 | tumor necrosis factor-induced protein 6 |
| u-PA | urokinase-type plasminogen activator |
| UV-Block | Ultraviolettblock |
| WST | water soluble tetrazolium |

I. Einleitung

Der physiologische weibliche Zyklus ist ein höchst komplexer dynamischer Prozess. Der Ovarialzyklus wird durch die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse hormonell gesteuert. Gründe in diesen natürlichen Hormonkreislauf einzugreifen, können unterschiedlich bedingt sein. Zum einen gibt es gesellschaftliche Gründe, im Sinne der Familienplanung mittels hormoneller Kontrazeption oder durch Reproduktionsmedizin, zum anderen gibt es aber auch gesundheitliche Gründe, im Sinne einer medikamentösen Therapie verschiedener hormonabhängiger Erkrankungen oder Beschwerden.

Statistisch gesehen hat sich seit 1969 die Fertilitätsrate weltweit durch Kontrazeption fast halbiert (UNFPA Weltbevölkerungsbericht 2019). In Deutschland verwenden etwa 69% aller Frauen zwischen 15 und 49 Jahren verschiedene Kontrazeptionsmethoden. Bei verheirateten oder in einer festen Partnerschaft lebenden Frauen verhüten sogar knapp 80%. Mit etwa 42-47% ist dabei die am häufigsten verwendete Methode die orale Kontrazeption mit der Pille (BZgA 2018; United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division 2019). In aktuellen Umfragen zeigt sich dieser Trend bei jungen Frauen jedoch rückläufig. So nutzten 2018 im Vergleich zu 2011 von den 18-29-jährigen Frauen etwa 16% weniger die Pille zur Kontrazeption. Als Grund hierfür wurden von etwa 48% vor allem Bedenken vor negativen Auswirkungen auf Körper und Seele durch Hormoneinnahme genannt (BZgA 2018).

Während dieser Arbeit wurde speziell die Rolle des FSHR auf die Steroidhormonsynthese untersucht. Der FSHR ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, welcher hauptsächlich bei Granulosazellen des Ovars exprimiert wird. Sein Ligand ist das gonadotrope Peptidhormon FSH, welches im Hypophysenvorderlappen synthetisiert wird. FSH spielt eine zentrale Rolle bei Zellproliferation und -metabolismus der Follikel, sowie bei der Synthese und Sekretion der Steroidhormone. Die in dieser Arbeit untersuchten Moleküle ADX92, ADX93 und ADX28 sind negative allosterische Modulatoren, welche spezifisch an den FSHR binden, ohne periphere und zentrale Gewebe zu beeinflussen (Dias et al. 2011). Eine gezielte Modulation des FSHR könnte ein möglicher Ansatz für die nichtsteroidale Kontrazeption sein.

Mit dieser Arbeit sollte das Wissen über essentielle Mechanismen der humanen Reproduktion erweitert werden, um so mögliche Ansätze für nichtsteroidale Kontrazeption, aber weiterblickend auch für Reproduktionsmedizin und die Therapie vielfältiger hormonabhängiger Erkrankungen, wie beispielsweise die Endometriose, zu finden.

II. Literaturübersicht

1. Der Ovarialzyklus: Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse

Der Ovarialzyklus wird durch Hormone der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse gesteuert. Als Taktgeber fungiert das vom Hypothalamus pulsatil sezernierte Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH). Es stimuliert die Sekretion der gonadotropen Hormone im Hypophysenvorderlappen. Zu den gonadotropen Hormonen zählen das follikelstimulierende Hormon (FSH) und das luteinisierende Hormon (LH), welche im Ovar ihre geschlechtsspezifischen Wirkungen entfalten (Barbieri 2014). Über G-Protein gekoppelte Rezeptoren wirken FSH und LH auf Zellproliferation und -metabolismus der Follikel, sowie auf die Synthese und Sekretion der Steroidhormone (Fan et al. 2005). Zu den Steroidhormonen zählt Östrogen, welches hauptsächlich von den Granulosazellen des Ovars und zu einem geringen Anteil auch von Plazenta-, Fett- und der Nebennierenrindenzellen produziert wird. Es hat zahlreiche Wirkungen auf den weiblichen Körper, wie etwa das Wachstum und die Differenzierung der weiblichen Geschlechtsmerkmale, die Förderung der Oogenese und Proliferation des Endometriums und es wirkt zudem auf extragonadale Zielorgane, wie etwa die Haut und Knochen (Tang et al. 2019). Ein weiteres Steroidhormon ist Progesteron, welches im Corpus luteum bzw. während der Schwangerschaft von der Plazenta synthetisiert wird. Es wirkt auf das Endometrium, fördert die Einnistung einer befruchteten Oozyte, der Blastozyste, und sorgt für die Aufrechterhaltung einer bestehenden Schwangerschaft (Taraborrelli 2015). Bis zu einer bestimmten Konzentration im Blut wirken Steroidhormone durch negatives Feedback inhibierend auf die Synthese von GnRH, FSH und LH in den übergeordneten Regelzentren. Überschreitet wiederum die Konzentration von Östrogen einen Schwellenwert, wird die Freisetzung der gonadotropen Hormone im Sinne eines positiven Feedbacks stimuliert und es kommt zum FSH- und LH-Peak, wodurch die Ovulation ausgelöst wird (Abbildung 1) (Barbieri 2014).

Der Ovarialzyklus lässt sich in zwei verschiedene Phasen unterteilen, die folliculäre und die luteale Phase. Während der folliculären Phase wachsen die Follikel durch Vermehren der Granulosa- und Thekazellen und durchlaufen die verschiedenen Follikelstadien bis es zur Ovulation kommt. Nach der Ovulation

beginnt die luteale Phase mit Ausbildung des Corpus luteum (Holesh et al. 2019).

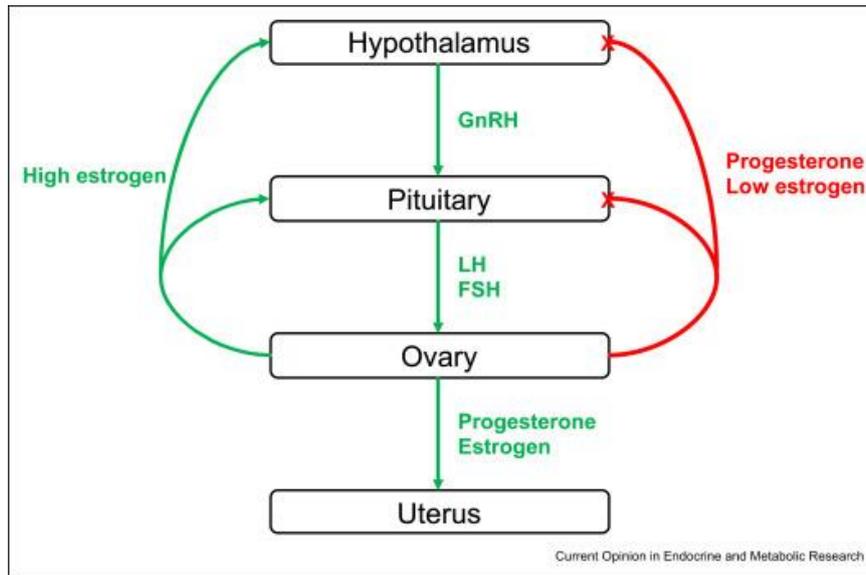


Abbildung 1: Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (Holtzman et al. 2019).

2. Follikulogenese

In den Ovarien findet die Entwicklung der weiblichen Keimzellen, den Oozyten, statt. Dieser Prozess beginnt bereits während der Embryonalentwicklung. Mit dem Einwandern der Urkeimzellen in die Gonadenanlagen differenzieren sich durch Mitose etwa 6-7 Millionen Oogonien. Bis zur Geburt atresieren jedoch die meisten Oogonien durch Apoptose. Aus den verbliebenen entwickeln sich bis zum 9. Gestationsmonat Primordialfollikel. Ein Follikel besteht aus der Oozyte und den sie umgebenden Granulosa- und Thekazellen, welche eine wichtige Rolle bei der Steroidhormonsynthese spielen. Die Primordialfollikel verbleiben bis zum Eintritt in die Pubertät in einem Ruhestadium der Meiose (= Dictyotän). Ab der Pubertät beginnt die Follikulogenese. Sie findet im Cortex der Ovarien statt und ist ein Prozess der Zellproliferation und Zytodifferenzierung. Es reifen in jedem Ovarialzyklus Primordialfollikel zu Primärfollikeln heran und entwickeln sich über den Sekundär- zum Tertiärfollikel. Der größte Tertiärfollikel wird zum sprungreifen Graaf'schen Follikel. Die erste Reifeteilung der Meiose wird erst kurz vor der Ovulation vollendet. Die zweite Reifeteilung der Meiose wird mit der Befruchtung der Oozyte durch ein Spermium vollendet (Behrends et al., 2012).

Bei der Follikulogenese werden vier wesentliche Schritte durchlaufen. Dazu gehört die Rekrutierung der Primordialfollikel, die Entwicklung der präantralen Follikel, die Selektion und das Wachstum der antralen Follikel und die Follikelatresie.

Die Rekrutierung und Aktivierung der Primordialfollikel stellt dabei den Übergang eines im Dictyotän Stadium der Meiose (= Ruhestadium zwischen Pro- und Metaphase der Meiose) arretierten Primordialfollikels zu den wachsenden Follikeln dar. Histologisch betrachtet bestehen Primordialfollikel aus der Oozyte, einer einzelligen Schicht aus flachen Granulosazellen und einer Basallamina (Williams et al. 2012). Die Veränderung von flachen zu kubischen Granulosazellen kennzeichnet die Rekrutierung der Primordialfollikel und definiert den Primärfollikel. Die wesentliche Entwicklung der Primärfollikel besteht dabei in der FSH-Rezeptor Expression. Die Rekrutierung und die initialen Phasen des Follikelwachstums sind dabei gonadotropinunabhängig, jedoch wird FSH für die Weiterentwicklung zum präantralen Stadium des Follikels benötigt (Oktay et al. 1998). Hierbei ändert sich die Struktur des Follikels durch Anhäufen mehrerer Schichten von Granulosazellen um die Oozyte, sowie durch Anlagern von Thekazellen. Ein voll entwickelter Sekundärfollikel besteht aus einer Oozyte umgeben von einer Zona pellucida, etwa neun Schichten von Granulosazellen, einer Basallamina, sowie einer Thekazellschicht, bestehend aus Theca interna und externa mit kapillärem Netzwerk. Mit Bildung des Antrums, einer Follikelhöhle gefüllt mit Follikelflüssigkeit, entsteht der Tertiärfollikel. Bei einem dominanten Graafschen Follikel proliferieren Granulosa- und Thecazellen fast 100-fach, einhergehend mit dem Wachsen des Antrums. Gleichzeitig steigt die Expression von LH- und FSH-Rezeptoren (Abbildung 2) (Williams et al. 2012).

Die Selektion des dominanten Follikels beruht auf dem Anstieg von FSH im Plasma. Steigende bzw. anhaltende FSH Produktion während der folliculären Phase ist obligat für die Selektion des dominanten Follikels. Der primäre Mechanismus der FSH vermittelten Follikelselektion wird über FSHR stimulierte Signaltransduktionswege der Granulosazellen gesteuert. Dabei wirkt FSH als anti-apoptotischer Überlebensfaktor. Durch das Eintreten von FSH in die Follikelflüssigkeit des Antrums wird eine Apoptoseinduktion und damit Zellatresie verhindert (Orisaka et al. 2009, Williams et al. 2012).

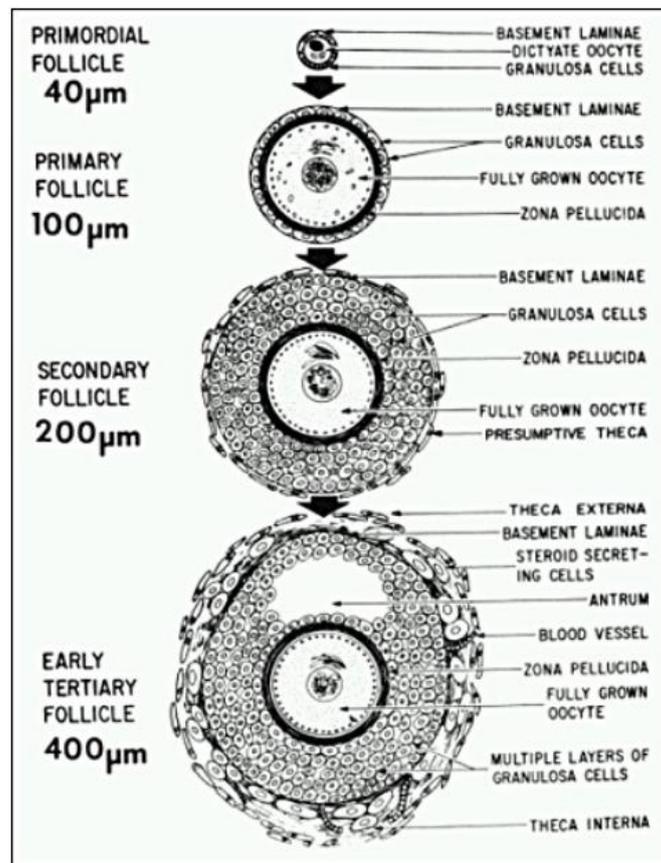


Abbildung 2: Follikulogenese

Während der präantralen Phase der Follikulogenese differenzieren sich die Granulosazellen und durchlaufen die verschiedenen Follikelstadien. (Williams C.J., Erickson G.F. 2012).

FSH steigert bei dominanten Follikeln die Expression der Aromatase in den Granulosazellen, sowie die Expression von LH-Rezeptoren in den Thecazellen. LH ist nicht essentiell bei der Follikelselektion, es erhöht jedoch die Produktion von Androstendion in den Thecazellen. Als wichtiges Ausgangsprodukt der Östrogensynthese diffundiert Androstendion über die Basallamina von der Theca- zur benachbarten Granulosazelle. In den Granulosazellen wird dann über das Enzym Aromatase das Androstendion zu Östrogen umgewandelt. So kann die Östrogensynthese indirekt gesteigert werden (Abbildung 3). Durch das Prinzip der zwei-Zellen-zwei-Gonadotropine-Theorie wird die Östrogensynthese enorm gesteigert, so dass es nach Überschreiten des Östrogen-Schwellenwertes zum FSH- und LH-Peak kommt (Abbildung 4) (Williams et al 2012).

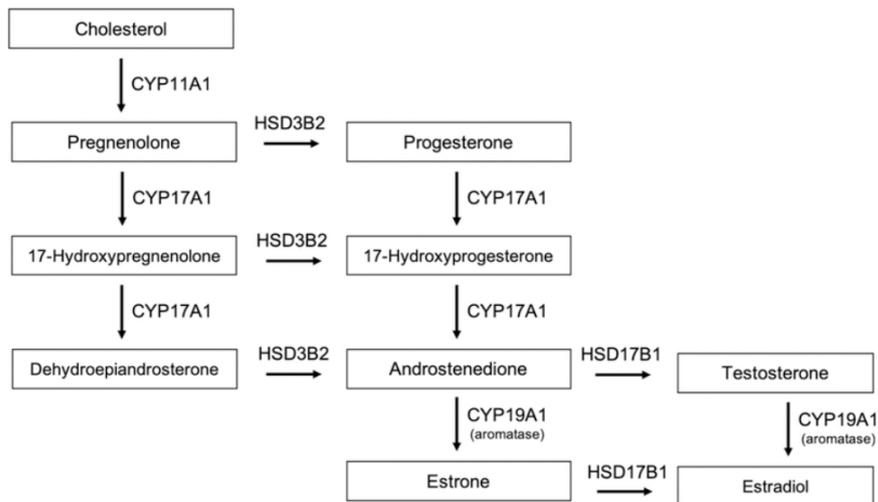


Abbildung 3: Steroidhormonbiosynthese

Ausgangsprodukt der Biosynthese von Steroidhormonen ist Cholesterin, welches über verschiedene Enzymreaktionen zu Progesteron, Androstendion und abschließend zu Östrogen synthetisiert wird (Fuentes et al. 2019).

Mit Erreichen des LH-Peaks wird die Ovulation des dominanten Graafschen Follikels ausgelöst. Die Oozyte wird nach Ovulation vom Fimbrientrichter der Tuba uterina aufgefangen und gelangt so ins Corpus uteri. Die im Ovar verbliebenen Granulosa- und Thecazellen lagern durch den LH-Peak Lipide ein. Durch diesen Prozess der Luteinisierung der Granulosa- und Thecazellen entsteht nach der Ovulation das Corpus luteum (Holesh et al. 2019). Das Corpus luteum ist eine endokrine Drüse, welche zeitweilig große Mengen an Steroidhormonen, vor allem Progesteron, synthetisiert. Es sorgt so nach Implantation einer befruchteten Oozyte für die Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft, bis die Steroidhormonsynthese von der Plazenta übernommen wird. Während der Frühschwangerschaft produziert die Plazenta hCG, wodurch das Corpus luteum so lange erhalten bleibt, bis eine suffiziente Progesteronproduktion durch die Plazenta möglich ist. Falls keine Befruchtung der Oozyte stattfindet, kommt es zu einem Abfall der Progesteron- und der Östrogenkonzentration. Hierdurch kommt es durch Luteolyse zur Atresie des Corpus luteum und es bildet sich das Corpus albicans (Bagnjuk et al. 2019). Vermittelt durch die sinkende Steroidhormonkonzentration kommt es erneut zur vermehrten Ausschüttung von GnRH, FSH und LH, so dass ein neuer Ovarialzyklus beginnt (Holesh et al. 2019).

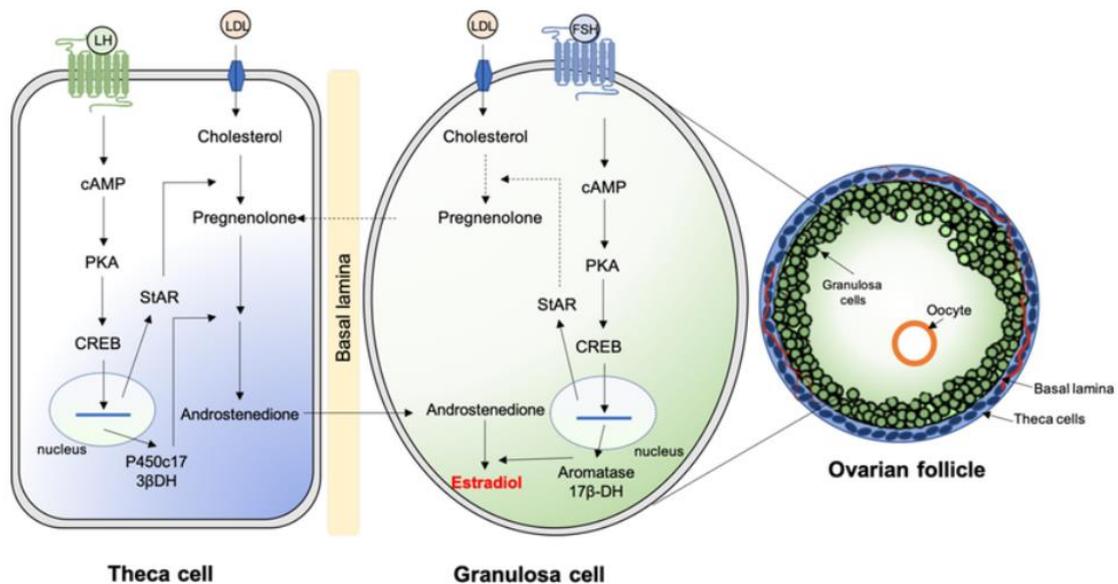


Abbildung 4: Zwei-Zellen-zwei-Gonadotropine: Östrogensynthese im ovariellen Follikel

Ein Follikel besteht aus Granulosa- und Thekazellen, einer Oozyte und einer Basallamina. LH induziert die Androstendionsynthese in den Thekazellen. FSH induziert die vermehrte Expression von Aromatase in den Granulosazellen. Nach Diffusion von Androstendion in die Granulosazellen wird so die Östrogensynthese mittels Aromatase gesteigert (Fuentes et al. 2019).

3. Beschreibung humane GC als Modellsystem

Um die Mechanismen und Abläufe des Ovarialzyklus und der Follikulogenese auf molekularer Ebene zu untersuchen und zu verstehen, werden passende Zellen und Methoden benötigt. Hierfür eignen sich als Modellorganismus besonders primäre humane GC. Sie sind Teil nahezu jeder Stufe der Follikulo- und Oogenese und spielen eine wichtige Rolle bei der Synthese von Steroidhormonen.

Während dieser Arbeit wurden GC mittels Follikelpunktion von Kinderwunschpatientinnen gewonnen, von anderen Zellen isoliert und in Kultur genommen. Um eine ausreichende Anzahl an GC für die Versuche zu erhalten, wurden diese aus mehreren Follikelpunktionen von verschiedenen Kinderwunschpatientinnen gewonnen. Bei unbekannter Krankengeschichte der Kinderwunschpatientinnen, besteht bei den isolierten GC eine gewisse Heterogenität. Um diese auszugleichen, wurden die GC bei der Isolierung gepoolt. In vivo proliferieren GC während der Follikulogenese und luteinisieren nach dem präovulatorischen LH Peak durch Einlagern von Lipiden. Die luteinisierten GC bilden in vivo das Corpus luteum und produzieren große

Mengen der Steroidhormone Progesteron und Östrogen. Bei in vitro GC handelt es sich ebenfalls um Granulosaluteinzellen. Hierbei wird die Luteinisierung jedoch nicht durch LH, sondern durch β HCG ausgelöst, welches im Rahmen der Kinderwunschbehandlung gegeben wird und eine ähnliche Wirkung hat (Bagnjuk et al 2019). Die Expression von FSHR und Aromatase wurde bei humanen luteinisierten GC in vitro bereits nachgewiesen (Kossowska-Tomaszczuk et al. 2009). Sie weisen eine deutlich höhere Steroidhormonsynthese auf als nicht-luteinisierte GC (Lindeberg et. al 2007). Am ersten Tag in Kultur ist die Steroidhormonsynthese am höchsten und zeigt sich refraktär auf die Zugabe von FSH, lässt sich also nicht steigern. Nach 24 Stunden in Kultur konnte eine erneute Steigerung der Östrogensynthese durch Zugabe von FSH erzielt werden. Dies legt die Überlegung nahe, dass die Behandlung der GC mit β HCG vor der Follikelpunktion die Luteinisierung hervorruft und die Zellen für FSH desensitisiert (Lambert et al. 2000). Humane primäre GC weisen eine Östrogensynthese bis Tag 9 in Kultur auf, jedoch mit jedem Tag sukzessive fallend. Durch Zugabe von FSH oder Androgenen ist die Östrogensynthese jedoch auch am 9. Tag in Kultur steigerbar (Földesi et al. 1998). Während dieser Arbeit wurden humane primäre Granulosazellen als Modellsystem verwendet. Sie kommen den GC in vivo sehr nahe und eignen sich gut um die Auswirkungen von FSHR Modulatoren auf die Steroidhormonsynthese zu untersuchen.

4. FSH und FSHR: Einfluss auf die Reproduktion

FSH spielt eine entscheidende Rolle bei der Reproduktion. In den weiblichen Gonaden entfaltet es seine Wirkung in den Granulosazellen des Ovars, durch Steuerung der Follikulogenese mit Entwicklung und Selektion des dominanten Follikels, und durch Aktivieren der Steroidhormonbiosynthese (Holesh et al. 2019). In den männlichen Gonaden wirkt FSH in den Sertolizellen der Testes, wo es Wachstum und Reifen der Tubuli seminiferi fördert und damit indirekt die Spermatogenese (Ulloa-Aguirre et al. 2016). Es zählt, ebenso wie LH und CG (Choriogonadotropin), zu den Gonadotropinen. Alle drei sind heterodimere Glykoproteine, bestehend aus einer α -Untereinheit, deren Aufbau allen Glykoproteinormonen gemein ist, und einer β -Untereinheit, durch welche die hormonspezifischen Wirkungen hervorgerufen werden (Kara et al. 2019). FSH bindet als Ligand an den FSHR, einen membrangebundenen Rezeptor, welcher

zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) gehört. Der FSHR zählt zu den Glykoproteinrezeptoren und ist verwandt mit dem TSH-, LH- und Choriogonadotropin-Rezeptor. Der FSHR wird hauptsächlich in den Gonaden, zu geringem Anteil aber auch extragonadal in Fettzellen, Osteoklasten, Monozyten und in Endothelzellen von Nabelschnurvenen, von verschiedenen Krebszellen oder von Metastasen exprimiert. Die genaue Bedeutung der Funktion des FSHR in extragonadalen Zellen ist bislang unklar (Ulloa-Aguirre et al. 2016). Wie alle GPCRs ist der FSHR ein 7-Transmembranrezeptor, welcher über heterotrimere G-Proteine reguliert wird. Er besteht aus 3 Domänen: Eine große extrazelluläre Domäne mit einem NH₂-terminalen Ende als FSH-Bindestelle, eine Transmembrandomäne, an der nach Bindung eines Liganden die Konformationsänderung stattfindet, und eine intrazelluläre Domäne, an der die G-Protein gekoppelte Signaltransduktion ausgelöst wird (Banerjee et al. 2015). Über eine hinge Region ist die extrazelluläre Domäne mit der 7-Transmembrandomäne verlinkt. Durch die hinge Region erhält der Rezeptor seine hohe Affinität für die Ligandenbindung und die daraus resultierende Rezeptoraktivierung und intramolekulare Signaltransduktion (Abbildung 5) (Dias et al. 2002).

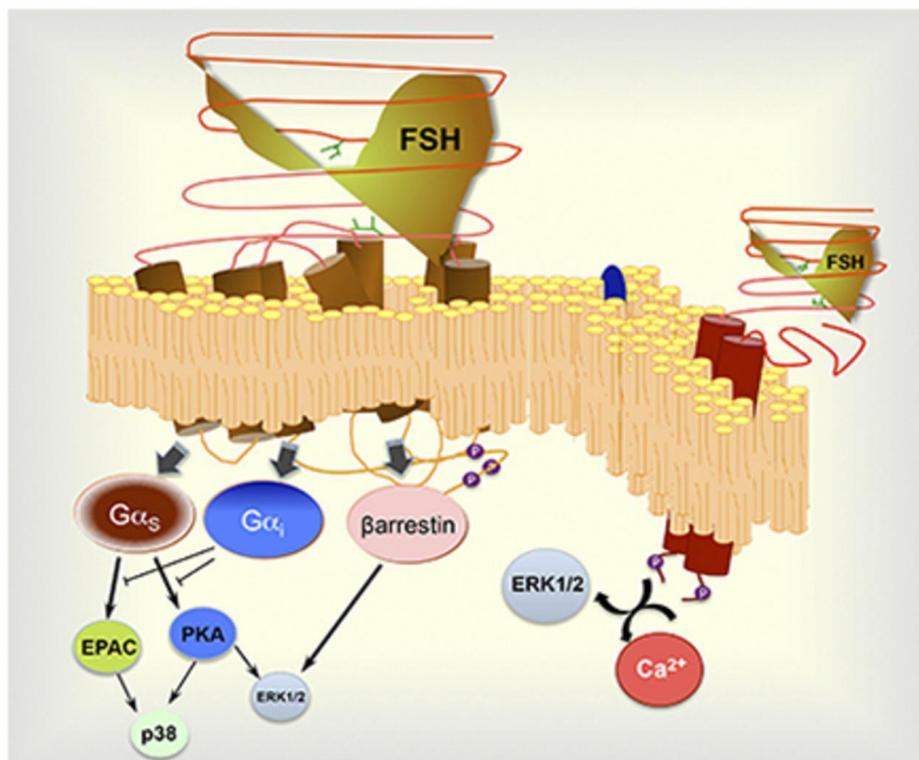


Abbildung 5: Schematische Darstellung des FSHR

Er besteht aus 3 Domänen: extrazelluläre Domäne mit FSH-Bindestelle, 7-Transmembrandomäne und intrazelluläre Domäne, mit G-Protein gekoppelter Signaltransduktion (Ulloa-Aguirre et al. 2016).

Es wird vermutet, dass der FSHR in einem Gleichgewicht aus aktiven und inaktiven Konformationen vorliegt. Dabei ist die Art der Konformation abhängig von der Art des Liganden. Nach Bindung von FSH an seinen Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung von FSH und so zur Aktivierung des FSHR. Der FSH-FSHR Komplex formt Dimere mit anderen FSH-FSHR Komplexen und löst so eine Signaltransduktionskaskade aus (Fan et al. 2005). Weiterhin wurde beschrieben, dass der FSHR zeitweilig auch Heterodimere mit dem LHR formen kann. Als FSHR-LHR Heterodimer kommt es zu einer negativen Kooperativität, wodurch es zur Inhibierung der Signaltransduktionskaskaden kommt. Je nach Expressionslevel der Rezeptoren könnte diese negative Kooperativität zum einen dazu führen, dass unreife Follikel nicht vorzeitig luteinisieren, zum anderen aber auch dazu, dass es nicht zu einer ovariellen Überstimulation kommt (Ulloa-Aguirre et al. 2016).

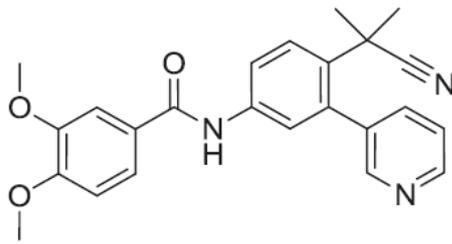
Über verschiedene komplexe Wege entfaltet der FSHR seine Wirkung an den Zielzellen. Der Hauptsignaltransduktionsweg läuft über die Gs gekoppelte Adenylylcyclase mit Bildung von cAMP und Aktivierung der PKA. Hierüber ist eine Aktivierung von Proteinkinase C (inositol phosphate), MAP Kinase (mitogen-activated protein kinase), sowie die extrazelluläre Aktivierung von ERK (extracellular signal-regulated kinase) möglich. Des Weiteren sind auch die Aktivierungen von Gq und Gi beschrieben. Am Ende der Signaltransduktionswege wird ein komplexes Muster von Genexpression in den Granulosazellen induziert, wodurch die Follikulogenese und Steroidhormonbiosynthese gesteuert werden (Hunzicker-Dunn et al. 2006, Andersen et al. 2014, Kara et al. 2019). Beim FSHR wurde eine funktionelle Selektivität nachgewiesen. Durch diese funktionelle Selektivität werden je nach Art des Liganden verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert oder inhibiert (Ulloa-Aguirre et al. 2016). Verdeutlicht wurde dies mittels Stimulation mit einem negativen allosterischen Modulator (ADX23). Bei steigender Bindeaffinität von FSH an seinen Rezeptor, wurden sowohl die Synthese von cAMP, als auch von Progesteron inhibiert, ohne die Östrogensynthese zu beeinflussen (Dias et al. 2011). Eine Auswirkung der Beeinflussung des FSHR auf die Reproduktion wurde bei einem weiteren negativen allosterischen Modulator (ADX 92) gezeigt. Dieser führte in vivo zu einer Inhibierung der Östrogen- und Progesteronbiosynthese und damit zu einer gestörten Follikulogenese bei Ratten (Dias et al. 2014). Bei Versuchen mit weiblichen FSH β -Gen knock-out

Mäusen, waren diese aufgrund einer fehlenden Follikulogenese infertil (Kumar et al. 1997). Ähnlich wurde auch bei Frauen mit dem seltenen resistant ovary syndrome aufgrund von inaktiven FSHR eine Infertilität beschrieben (Aittomaki et al. 1995). Hieraus lässt sich schließen, dass FSHR-Antagonisten die Follikulogenese und Ovulation hemmen könnten (Dias et al. 2014).

Die Wirkungen von FSH auf den FSHR sind durch die Eigenschaften der negativen Kooperativität mit dem LHR, der funktionellen Selektivität des FSHR, dem Einfluss verschiedener Liganden, sowie durch die verschiedenen Signaltransduktionswege insgesamt sehr komplex. Die genauen Wirkmechanismen auf molekularer Ebene und auch nicht zuletzt der genaue Aufbau des FSHR bleiben Gegenstand weiterer Forschung. Während dieser Arbeit wurden kleine Moleküle untersucht, welche als negative allosterische Modulatoren des FSHR identifiziert wurden. Aufgrund der spezifischen Wirkung dieser Moleküle auf ovarielles Gewebe, ohne periphere oder zentrale Gewebe zu beeinflussen, könnten solche FSHR Modulatoren zum Beispiel ein neuer Ansatz für nichtsteroidale Kontrazeption oder in der Reproduktionsmedizin sein (Dias et al. 2011).

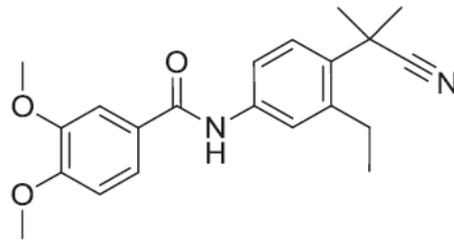
5. Negative allosterische Modulatoren (NAM) des FSHR: Charakterisierung von ADX68692, ADX68693, ADX68128

Mittels high throughput screening wurden neben dem zuvor beschriebenen negativen allosterischen Modulator ADX23 weitere kleine Moleküle identifiziert. ADX92 und ADX93 wirken ebenfalls spezifisch als negative allosterische Modulatoren des FSHR und zeigen eine unterschiedliche Auswirkung auf die Steroidhormonsynthese, obwohl die Bindung von FSH nicht blockiert wird (Dias et al. 2014). Ebenfalls dazu zählt ADX28, über welches bislang noch nichts publiziert wurde.



ADX68692

Chemical Formula: $C_{24}H_{23}N_3O_3$
Molecular Weight: 401.46



ADX68693

Chemical Formula: $C_{21}H_{24}N_2O_3$
Molecular Weight: 352.43

Abbildung 6: Chemische Struktur der beiden NAMs ADX92 und ADX93
(Dias et al. 2014).

Bei Versuchen mit primären Granulosazellen von Ratten wirkte ADX 92 inhibitorisch, sowohl auf die Progesteron-, als auch auf die Östrogensynthese. Bei Ratten zeigte sich nach oraler Gabe bei etwa der Hälfte der Tiere ein gestörter Sexualzyklus mit verminderter Anzahl an Ovulationen. ADX 93 ist ein strukturelles Analog zu ADX 92 (Abbildung 6) und zeigt eine ähnlich starke Inhibierung der Progesteronsynthese, ohne jedoch die Östrogensynthese zu beeinflussen. Bei besserer oraler Bioverfügbarkeit von ADX 93 zeigte sich bei Ratten, unabhängig von der verwendeten Konzentration, keine Auswirkung auf die Anzahl an Oozyten oder Ovulationen. Dies veranschaulicht eindrücklich, dass zur Kontrazeption effektiv beide Arme der FSHR stimulierten Steroidhormonsynthese, also Progesteron- und Östrogensynthese, inhibiert werden müssen (Dias et al. 2014). Durch diese funktionelle Selektivität des FSHR besteht die Möglichkeit, mit verschiedenen Liganden gezielt intrazelluläre Signaltransduktionswege zu aktivieren bzw. inhibieren (Landomiel et al. 2014). So könnten sich verschiedene Ansätze ergeben, die in Zukunft für therapeutische Zwecke in der Reproduktionsmedizin, bei der Kontrazeption oder bei sonstigen hormonabhängigen Erkrankungen genutzt werden könnten.

6. Hormonelle Kontrazeption mit der Pille

Die Familienplanung ist als Bestandteil der Lebensplanung ein gesellschaftlich wichtiges Thema. Sie gilt als grundlegendes Menschenrecht und kann abhängig von individuellen Faktoren, aber auch sozialen und gesellschaftlichen Rahmenbedingungen umgesetzt werden. Sie umfasst alle Entscheidungen und

Entwicklungen in denen das private Leben mit und ohne Kinder gestaltet wird. Seit 1969 hat sich die Fertilitätsrate weltweit durch Kontrazeption fast halbiert. (Abbildung 7, UNFPA Weltbevölkerungsbericht 2019).

| GLOBALE UND REGIONALE DATEN | BEVÖLKERUNG | | | FERTILITÄT | | | LEBENSERWARTUNG | | | BEVÖLKERUNGS-ENTWICKLUNG | ZUSAMMENSETZUNG DER BEVÖLKERUNG | | | |
|-----------------------------------|----------------------------|-------|-------|-----------------------------------|------|------|---|------|------|---|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| | Gesamtbevölkerung, in Mio. | | | Gesamtfruchtbarkeitsrate pro Frau | | | Lebenserwartung bei der Geburt, in Jahren | | | Durchschnittl. jähr. Bevölkerungswachstum, in % | Bevölkerung im Alter 0-14 J., in % | Bevölkerung im Alter 10-24 J., in % | Bevölkerung im Alter 15-64 J., in % | Bevölkerung im Alter >64 J., in % |
| | 1969 | 1994 | 2019 | 1969 | 1994 | 2019 | 1969 | 1994 | 2019 | 2010-2019 | 2019 | 2019 | 2019 | 2019 |
| WELT | 3.626 | 5.670 | 7.715 | 4,8 | 2,9 | 2,5 | 56 | 65 | 72 | 1,1 | 26 | 24 | 65 | 9 |
| Stärker entwickelte Regionen | 1.001 | 1.167 | 1.266 | 2,3 | 1,6 | 1,7 | 71 | 74 | 80 | 0,3 | 16 | 17 | 65 | 19 |
| Weniger entwickelte Regionen | 2.625 | 4.503 | 6.448 | 5,9 | 3,2 | 2,6 | 53 | 63 | 71 | 1,3 | 27 | 25 | 65 | 7 |
| Am wenigsten entwickelte Regionen | 301 | 570 | 1.050 | 6,8 | 5,6 | 3,9 | 44 | 52 | 65 | 2,4 | 39 | 32 | 57 | 4 |

Abbildung 7: Weltbevölkerungsbericht 2019 UNFPA

Die weltweite Fertilitätsrate hat sich seit 1969 von 4,8 auf 2,5 nahezu halbiert (s. roter Kasten). Bei steigender Lebenserwartung ist das durchschnittliche Bevölkerungswachstum dennoch zunehmend. (Stärker entwickelte Regionen = Industriestaaten, weniger entwickelte Regionen = Länder des globalen Südens, am wenigsten entwickelte Länder = ärmste Entwicklungsländer)

Zur Familienplanung gehören traditionelle und moderne Kontrazeptionsmethoden, welche in Deutschland von etwa 69% aller Frauen zwischen 15 und 49 Jahren genutzt werden. Bei verheirateten oder in einer festen Partnerschaft lebenden Frauen verhüten sogar knapp 80%. Mit etwa 42-47% ist die am häufigsten verwendete Methode die orale Kontrazeption mit der Pille (BZgA 2018; United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division 2019).

Die Pille gilt als einfaches, kostengünstiges und sicheres Mittel zur Kontrazeption (Trussel et al. 1995). Das Prinzip der oralen Kontrazeption beruht auf der Einnahme von synthetisch hergestellten Steroidhormonanaloga. Meist wird eine Kombination aus Gestagenen und Östrogenen verwendet. Hierdurch wird eine Hemmung der Ovulation erreicht und das Aufsteigen von Spermien in den Uterus durch Verändern des Zervikalschleimes verhindert. Progestine sind die synthetisch hergestellten Analoga der Gestagene. Sie werden aus Progesteron und Testosteron gewonnen und wirken bereits in einer deutlich geringeren Dosierung als die natürlichen Hormone. Die kontrazeptive Wirkung der Progestine beruht auf einer Veränderung des Zervikalschleimes, welcher durch zähflüssige Konsistenz und verminderte Spinnbarkeit undurchlässig für Spermien ist. Das am häufigsten verwendete synthetische Östrogen ist das

Ethinylestradiol. Die Kombination mit Östrogenen wird in oralen Kontrazeptiva vor allem zur Blutungskontrolle eingesetzt. Gemeinsam wirken Östrogene und Gestagene synergistisch hemmend auf die GnRH-Synthese des Hypothalamus, so dass die FSH- und LH-Sekretion der Hypophyse gehemmt wird und eine Ovulation ausbleibt (Lobo et al. 1994).

In den letzten Jahren sind die Möglichkeiten der Kontrazeption immer effektiver und vielfältiger geworden (Dhont 2010). Die am häufigsten verwendete Kontrazeptionsmethode ist die hormonelle Kontrazeption. Unabhängig von der Applikationsart werden hormonelle Kontrazeptionsmethoden je nach Konzentration des Östrogen- und Art des Gestagenanteils jedoch mit verschiedenen thrombembolischen Komplikationen in Verbindung gebracht. Vor allem die neuen Generationen der Pille haben bei 9-12 von 10.000 Frauen pro Jahr ein deutlich erhöhtes Risiko (AWMF Leitlinie 2018). Die kardiovaskuläre Morbidität resultiert am ehesten aus den starken hepatischen Wirkungen von Östrogen. Durch Modifizierung einiger hämostatischer Faktoren kommt es zu einem prokoagulatorischen Status und einer fibrinolytischen Imbalance, welche thrombembolische Ereignisse begünstigt. Vor allem Dosierungen von 50 µg Ethinolestradiol oder höher werden mit einem höheren Risiko assoziiert als geringere Dosierungen. Progestine werden ebenfalls mit einem Risiko für venöse Thrombosen in Verbindung gebracht. Hierbei wurde das größte Risiko für Progestine der 3. und 4. Generation (beispielsweise Drospirenon, Gestoden, Desogestrel) beschrieben (Serfaty 2019). Das Risiko eine venöse Thrombose zu erleiden, ist bei der Verwendung von kombinierten hormonellen Kontrazeptiva (CHC) 3-fach höher, als bei nicht hormoneller Kontrazeption. Komplikationen im arteriellen System, wie Myokardinfarkte oder Schlaganfälle, sind insgesamt eher selten, aber mit einer höheren Mortalität und einem höheren Risiko für langfristige Schäden assoziiert. Das Risiko für thrombembolische Komplikationen wird durch zusätzliche kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie Nikotinabusus, Adipositas, Alter über 35 Jahre, Immobilität oder bereits stattgehabte Thrombosen noch einmal erhöht, so dass bei Vorliegen dieser Risikofaktoren eine Kontraindikation zur hormonellen Kontrazeption besteht. Weitere Kontraindikationen bestehen für Frauen, die an Migräne oder einer rheumatischen Erkrankung, wie beispielsweise dem systemischen Lupus erythematodes, leiden. Auch bei Vorliegen eines Mammakarzinoms oder bei genetischen Risikofaktoren (BRCA1/-2-Mutation)

bestehen Kontraindikationen (Serfaty 2019). Weitere Nebenwirkungen können zum Beispiel Blutungsstörungen, Gewichtszunahme und Stimmungsschwankungen sein (AWMF Leitlinie 2018). Gerade in den letzten Jahren ist das Gesundheitsbewusstsein vor allem bei jungen Frauen größer geworden. So nutzten 2018 im Vergleich zu 2011 von den 18- bis 29-jährigen Frauen etwa 16% weniger die Pille zur Kontrazeption. Als Grund hierfür wurden von etwa 48% vor allem Bedenken vor negativen Auswirkungen auf Körper und Seele durch Hormoneinnahme genannt (BZgA 2018).

Bei Kontraindikationen für eine hormonelle Kontrazeption oder Wunsch nach Kontrazeption ohne Hormone, könnten FSHR Antagonisten ein Ansatz zur nichtsteroidalen oralen Kontrazeption sein. Diese weisen eine spezifische Wirkung auf ovarielles Gewebe auf, ohne periphere oder zentrale Gewebe zu beeinflussen. Die verwendeten FSHR Antagonisten wurden bisher nur am Mausmodellsystem und primären Granulosazellen von Ratten untersucht (Dias et al. 2014). Während dieser Arbeit wurden Versuche mit diesen Substanzen erstmals an humanen primären Granulosazellen durchgeführt.

7. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkung von negativen allosterischen Modulatoren des FSHR auf die Steroidhormonsynthese humaner Granulosazellen zu ermitteln. So sollte das Wissen über die Wirkung des FSHR auf die Steroidhormonsynthese erweitert werden und dadurch mögliche neue Ansätze für die nichtsteroidale Kontrazeption und medikamentöse Therapie endokriner Erkrankungen gefunden werden. Somit ergaben sich folgende Aufgabenstellungen für diese Arbeit:

- Ermitteln der passenden Zellzahl von humanen primären Granulosazellen für die Stimulationsversuche.
- Nachweis des FSHR bei humanen primären Granulosazellen.
- Untersuchung zelltoxischer Wirkung der Stimulantien auf die Zellen.
- Untersuchung der Auswirkung von negativen allosterischen Modulatoren des FSHR auf die Steroidhormonsynthese bei humanen primären Granulosazellen.

III. Material und Methoden

1. Material

1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|---|------------------------------------|
| Chambersslides, 8-Well | Nalge-Nunc, Rochester, USA |
| Deckgläser „Thermo Scientific“ 24 x 60 mm | Menzel-Gläser, Braunschweig, DE |
| Digitales Kamerasystem, AxioCam MRm | Carl Zeiss, Oberkochen, DE |
| ELISA Reader MRX II | Dynex Technologies, Chantilly, USA |
| Eppendorf-Reaktionsgefäße, 2ml | Eppendorf, Hamburg, DE |
| Fluoroskan Ascent FI. Thermo Scientific | Waltham, USA |
| Gefrierschrank, -20°C | Siemens, München, DE |
| Gefrierschrank, -80°C | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| Kamerasystem JVC | JVC, Yokohama, Japan |
| Kühlschrank, 4°C | Liebherr, Biberach an der Riss, DE |
| Lichtmikroskop Diaplan | Leitz, Wetzlar, DE |
| Neubauer-Zählkammer | Marienfeld, Lauda-Königshofen, DE |
| Objektträger Superfrost® | Menzel-Gläser, Braunschweig, DE |
| PCR Eppendorf Reaktionsgefäße | Eppendorf, Hamburg, DE |
| Pipetten | Eppendorf, Hamburg, DE |
| Pipettenspitzen 1 µl- 10 µl | Biozym, Hessisch Oldendorf, DE |
| Pipettenspitzen 10 µl- 100 µl | Biozym, Hessisch Oldendorf, DE |
| Pipettenspitzen 100 µl- 1000 µl | Biozym, Hessisch Oldendorf, DE |
| Pipettenspitzen 20 µl- 300 µl | Biozym, Hessisch Oldendorf, DE |
| Pipettierhilfe „Pipet Boy“ | Eppendorf, Hamburg, DE |
| Serologische Pipetten, 2 ml – 25 ml | Becton Dickinson, New-Jersey, USA |
| Sterilwerkbank Uniequip | Planegg, DE |
| Sterile Spitzen | Biozym, Hessisch Oldendorf, DE |
| Stickstofftank | Talor-Wharton, Theodore, USA |

| | |
|---|---|
| Tischzentrifuge Mini Spin® | Eppendorf, Hamburg, DE |
| Falcon 50 ml, 15 ml | Becton Dickinson, New-Jersey, USA |
| Waage „Sartorius“ | Kremer und Kreiler Laborgeräte, München, DE |
| Wellplatten MultiwellTM, 24-Well, 96- well | Becton Dickinson, New-Jersey, USA Corning Incorporated, Corning, USA |
| Zellkulturflasche T75 cm ² | Falcon Becton Dickinson Labware, New-Jersey, USA |
| Zellscraper | Sarstedt, Nümbrecht, DE |
| Zentrifuge „Stratos“ | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |

1.2. Chemikalien

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|--------------------|--------------------------------------|
| Aceton | Apothekenbedarf der LMU, München, DE |
| Aqua dest. | B. Braun, Melsungen, DE |
| Ethanol | Apothekenbedarf der LMU, München, DE |
| Methanol | Apothekenbedarf der LMU, München, DE |
| Formalin | Apothekenbedarf der LMU, München, DE |
| Wasserstoffperoxid | Apothekenbedarf der LMU, München, DE |
| Xylol | Apothekenbedarf der LMU, München, DE |

1.3. Lösungen

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|--|----------------------|
| Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) Flüssigmedium ohne Na- Pyruvat mit stabilem Glutamin (3,7 g/l NaHCO ₃ , 4,5 g/l D-Glucose) | Biochrom, Berlin, DE |
| Fetales Kälberserum (FCS) PAA | PAA, Pasching, A |
| Hanks' Salzlösung (HBSS) mit 0,35 g/l NaHCO ₃ , ohne | Biochrom, Berlin, DE |

| | |
|--|-----------------------------------|
| Phenolrot, ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ | |
| Gibco Medium M 199 | Life Technologies, Darmstadt, DE |
| PBS | Dulbecco Biochrom, Berlin, DE |
| Ultrosor G | Pall Life Sciences, New York, USA |
| Trypanblaulösung 0,4% | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g / 0,2 g) | Biochrom, Berlin, DE |
| Penicillin-Streptomycin Liquid | Invitrogen, Darmstadt, DE |
| 100 x Antibiotic Antimycotic | Life Technologies, Darmstadt, DE |

1.4. Stimulantien

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|--|---------------------------------|
| DMSO | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Recombinant hFSH (Gonal F) | MerckSerono, Darmstadt, Germany |
| FSHR NAMs: ADX68692 (MW 437.91) ADX68693 (MW 352.43) ADX68128 (MW 358.82) | Addex Pharmaceuticals S.A. |

1.5 Reagenzien, Lösungen und Zubehör

1.5.1 WST

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|-------------|-----------------------|
| WST-1 | Roche Applied Science |

1.5.2 Immunzytochemie

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|------------------------------|--------------------------------------|
| Anti FSH (Polyclonal Rabbit) | Acris |
| Hämalaun | Apothekenbedarf der LMU, München, DE |

| | |
|--|--------------------------------------|
| Substrat Chromogen | Dako, Glostrup, DK |
| 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) plus Vectastain Elite ABC-Kit rabbit IgG | Vector Laboratories, Burlingame, USA |
| Liquid DAB + Substrate chromogen system | Dako, Glostrup, DK |

1.5.3 ELISA

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|--------------------------------------|-----------------------------------|
| Estradiol-ELISA Kit DRG EIA - 2693 | DRG Instruments GmbH, Marburg, DE |
| Progesteron-ELISA Kit DRG EIA - 1561 | DRG Instruments GmbH, Marburg, DE |

1.5.4 Bradford Assay

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|--|-------------------------------|
| Bradford-Reagenz, Protein Assay Farbstoff-Konzentrat | Bio-Rad, München, DE |
| Bradford-Standard, Protein Assay Standard II | Bio-Rad, München, DE |
| Reagenzgefäße 0,5 ml | Eppendorf |
| Küvette (Halb-Mikro-Küvette 10 x 4 x 45 mm) | Sarstedt, Nümbrecht, DE |
| Zellysepuffer zusammengesetzt aus: | |
| - Protease-Inhibitor-Cocktail | Sigma Aldrich, St. Louis, USA |
| - RIPA-Puffer Sigma Aldrich | Sigma Aldrich, St. Louis, USA |

1.6. Zellen

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|--------------------|---|
| Ovcar3 (Zelllinie) | American Tissue Culture Collection (ATCC, Wesel, Germany) |

| | |
|---|--|
| Humane primäre Granulosazellen (Bewilligt von der Ethikkommission derLMU München, Projektnummer: 395/04) | Zentrum für Reproduktionsmedizin München, DE und Zentrum für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin am Klinikum der Universität München, München, DE |
|---|--|

1.7. Software

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|--|---------------------------------------|
| ABI PRISM 7500 Fast | Applied Biosystems, Forster City, USA |
| Axio Vision, V.4.5 | Carl Zeiss, Oberkochen, DE |
| Revelation ELISA Reader | Dynex Technologies, Chantilly, USA |
| IBM SPSS Statistics 26 für Windows, Social Sciences Computer Software | SPSS, Chicago, USA |

2. Methoden

Zunächst wurde das Modellsystem der humanen primären Granulosazellen etabliert und so die passende Zellzahl für die Stimulationsversuche festgesetzt. Zur Analyse der Hormonsynthese nach Stimulation von primären Granulosazellen mit den negativen allosterischen FSHR Modulatoren wurden Untersuchungen mittels ELISA durchgeführt. Zum Ausschluss zelltoxischer Auswirkungen der Stimulantien auf die verwendeten Zellen wurden Viabilitätstests mittels WST durchgeführt.

2.1. Zellkultur

2.1.1. Zellkultur der Zelllinie Ovar3

Ovar3 ist eine Zelllinie eines humanen epithelialen Ovarialkarzinoms und wurde bei bereits nachgewiesenem FSH als Kontrolle mitgeführt (Hamilton et al. 1983, Heublein et al. 2013). Die Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen in 10 ml DMEM Nährmedium (+1% Penicillin/Streptomycin, + 1% Antibiotic Antimycotic) ausgesät und bei 37°C kultiviert. Einmal pro Woche wurde steril das Nährmedium ersetzt und die Zellzahl ermittelt. Nach Abziehen des Nährmediums wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend

wurde 1 ml Trypsin zu den Zellen gegeben und für 10 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert, um ein Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu erreichen. Danach wurde mit 9 ml Nährmedium verdünnt und 20 µl dieser Zelllösung im Anschluss mit 20 µl Trypanblau für die Zellzählung vermischt.

2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Mit Hilfe eines Lichtmikroskops wurden durch die Anfärbung mit Trypanblau vitale von beschädigten Zellen unterschieden, da der blaue Farbstoff in die beschädigte Zellmembran avitaler Zellen eindringt und diese blau färbt. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurden die vitalen Zellen auf 4 x 16 Kästchen ausgezählt. Die Berechnung der Gesamtzellzahl ergab sich aus der Summe der gezählten Zellen, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor von 10 (den 10 ml Zellsuspension entsprechend) und 10⁴ (Maße der Neubauer Zählkammer). Anschließend wurde eine definierte Menge an Zellen in eine neue Zellkulturflasche in 10 ml Nährmedium angelegt oder für die jeweiligen Versuche entsprechend auf Wellplatten ausgesät.

2.1.3 Einfrieren von Zellen

Das Einfrieren der Ovar3 Zellen erfolgte bei niedriger Passagieranzahl (maximal Passagennummer 30). Zunächst wurde das Einfrieremedium bei 4°C im Kühlschrank aufgetaut. Durch die enthaltene kryoprotektive Substanz DMSO können Einfrierschäden durch Kristallbildung verhindert werden. Bei einer zytotoxischen Wirkung von DMSO bei Raumtemperatur, wurde das Einfrieren der Zellen auf Eis durchgeführt. Die Trypsinierung und Zellzählung erfolgten wie unter 2.1.2 beschrieben. Es erfolgte nach Zentrifugation das Abnehmen des überstehenden Mediums und das Waschen des Zellpellets mit 10 ml PBS. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min. bei 1000 Upm wurde das abzentrifugierte Falcon auf Eis gestellt, das überstehende Medium erneut abgezogen und mit dem Kryomedium eine Zellsuspension mit der Konzentration von 5 Millionen Zellen pro 1 ml erstellt. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen abgefüllt. Um eine schrittweise Akklimatisierung der Zellen zu gewährleisten, wurden die Kryoröhrchen

zunächst bei -80°C im Gefrierschrank über Nacht zwischengelagert und erst im Anschluss im Stickstofftank eingefroren.

2.1.4 Aussaat von eingefrorenen Zellen

Zunächst wurde ein Wasserbad auf 37°C geheizt. Die aus dem Stickstofftank entnommenen Kryoröhrchen wurden mit 70% Ethanol steril abgewaschen und im Wasserbad aufgetaut. Im Anschluss wurden die Zellen in ein Falcon mit 5 ml vorgewärmten Medium überführt. Durch das hinzugefügte Medium wird das DMSO des Einfriermediums neutralisiert. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 1000 rpm wurde der Überstand abgezogen und 12 ml frisches Medium hinzugegeben. Diese Zellsuspension wurde dann in eine T75 Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank inkubiert.

2.1.5 Zellkultur humaner primärer Granulosazellen

Granulosazellen wurden mittels ultraschallgesteuerter Follikelpunktion von Kinderwunschpatientinnen gewonnen und in einem sterilen 50 ml Falcontube gepoolt. Die Follikelflüssigkeit wurde 10 min bei 1000 g zentrifugiert, der Überstand bis auf ca. 5 ml verworfen und das entstandene Zellpellet ausgiebig mit der Restflüssigkeit resuspendiert. Anschließend wurde mit HBSS aufgefüllt und 5 Minuten bei 1000g zentrifugiert und der vorangehende Schritt wiederholt. Das resuspendierte Zellpellets wurde dann in ein 15 ml Falcontube mit 5 ml vorgelegtem 100% Ficoll pipettiert, 10 Minuten bei 2000g zentrifugiert und so durch den Dichtegradienten Granulosazellen von einem Großteil der Erythrozyten im Follikelaspirat getrennt. Die sich bildende Interphase, in der sich die Granulosazellen sammelten, wurde vorsichtig abpipettiert, in ein 50 ml Falcon mit HBSS gegeben und 5 Minuten bei 1000g zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde nach Verwerfen des Überstandes das Zellpellet gut mit Trypsin resuspendiert (ca. doppelt so viel Trypsin wie Restmenge der Zellflüssigkeit), gevortext und 20 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Gemisch mit HBSS + 1% FCS aufgefüllt um Trypsin zu inhibieren, bei 400g 5 Minuten zentrifugiert und der Vorgang noch einmal wiederholt. Durch einen erneuten Dichtegradienten mit 100% Ficoll und Zentrifugation für 10 Minuten bei 2000g, wurde die Zellflüssigkeit nochmals von einigen Erythrozyten getrennt und mit HBSS + FCS 1% vermischt. Nach erneutem Zentrifugieren 5 Minuten

bei 400 g wurde der Überstand wieder verworfen und das Zellpellet gut resuspendiert. Im Anschluss wurde die Zellflüssigkeit durch einen Filter mit ca. 40 ml HBSS + 1% FCS gespült, um Granulosazellen von größeren Zellen zu trennen. Der Filter wurde verworfen und erneut 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abgenommen und das Zellpellet in 5 ml M199 (10% FBS, 1% PS, 1% Antianti, 1 µmol Androstendion) resuspendiert. 20 µl der Zellflüssigkeit wurden zum Zählen in ein PCR Tube gefüllt und anschließend die Zellen in der entsprechenden Konzentration ausgesät. Um die passende Zellzahl von primären humanen GC für die Stimulationsversuche zu ermitteln, wurden zunächst Vorversuche durchgeführt.

| 96-Wellplatte | 8er Chamberslide | 24-Wellplatte |
|--------------------|---------------------|---------------------|
| 40.000 Zellen/well | 200.000 Zellen/well | 400.000 Zellen/well |

2.2 Bradford

Um die genaue Proteinmenge der Lysate zu bestimmen, erfolgte eine Proteinbestimmung nach Bradford. Zunächst wurde eine Standardkurve erstellt.

Erstellung der Standardkurve: Verdünnung des Bradfordstandards

1000 µg/ml = 840 µl Standard (unverdünnt) + 160 µl Aqua ad inj.

800 µg/ml = 400 µl Standardlösung (1000 µg/ml) + 100 µl Aqua ad inj.

400 µg/ml = 200 µl Standardlösung (800 µg/ml) + 200 µl Aqua ad inj.

200 µg/ml = 200 µl Standardlösung (400 µg/ml) + 200 µl Aqua ad inj.

100 µg/ml = 200 µl Standardlösung (200 µg/ml) + 200 µl Aqua ad inj.

50 µg/ml = 200 µl Standardlösung (100 µg/ml) + 200 µl Aqua ad inj.

Das Bradford-Reagenz wurde im Verhältnis 1:5 in Aqua ad inj. verdünnt. Die zu untersuchenden Lysate wurden bei 4°C für 15 min bei 13000 g zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Überstände in Reagenzgefäße pipettiert. Hieraus wurden 10 µl entnommen und jeweils zu 1 ml verdünnter Bradford-Reaktionslösung gegeben. Die Proben wurden mittels Vortex gut vermischt und im Anschluss in Küvetten zur photometrischen Messung überführt. Durch die Bindung von Coomassie blue im Bradford Reagenz an die Proteine der Proben kommt es zu einer Farbveränderung, welche zu einer Verschiebung des

Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm führt. Die Veränderung der Absorption wird mit einem Photometer bestimmt. Mit der zu Beginn erstellten Standardkurve wurde dann die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

2.3 WST Messung

Zum Ausschluss von Zelltoxizität der Stimulantien wurde eine Viabilitätstestung mittels WST-Assay durchgeführt. Hierbei wird das hell rote Tetrazoliumsalz WST-1 durch das Succinat-Tetrazolium Reduktase System der mitochondrialen Atmungskette in das dunkelrote Formazan gespalten und die Absorption des Farbumschlags mittels ELISA Reader gemessen. Die Absorption korreliert hierbei direkt mit der Anzahl der vitalen Zellen und dient so dem Nachweis einer intakten Atmungskette.

Zunächst werden Zellen von Ovar3 und von primären Granulosazellen in einer 96 Wellplatte ausgesät und mit den zu testenden Substanzen stimuliert. Nach 48h bzw. 72h wurde WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) hinzugegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Farbumschlag wurde nach 30 Minuten mit einem ELISA Reader gemessen und ausgewertet. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen und ein blank mit Medium ohne Zellen.

| | Stimulation mit ADX |
|--------------------------------|--|
| Kultivierung der Zellen | 96-well Platte: 40.000 Zellen/well |
| Verwendetes Nährmedium | Pro Vertiefung: 100 µl M199 +1% Antibiotic Antimycotic, + 1% Penicillin/Streptomycin, + 10% FCS + 1 µmol Androstendion |
| Mediumwechsel | Nach 72 Stunden |
| Stimulation nach X Stunden (h) | 24 |
| Stimulationsdauer (h) | 48h und 72h |
| Verwendete Konzentration | ADX 30 uM |

2.4 Immunzytochemie

Mittels Immunzytochemie wurde die FSHR Expression bei humanen primären Granulosazellen nachgewiesen. Das Grundprinzip der Immunzytochemie beruht auf dem Detektieren eines Antigens, hier des FSHR, mit der Avidin-Biotin-Komplex-Peroxidase Methode (ABC-Methode). Avidin hat als Glykoprotein eine hohe Affinität zum hydrophilen Vitamin Biotin. Um den Primärantikörper mit dem Avidin-Biotin-Komplex zu verbinden, dient ein mit Biotin markierter Antikörper als Brücken-/ Sekundärantikörper. Mittels Peroxidase kommt es zu einer rot-braunen Farbreaktion des Substratpuffers mit dem zugefügten AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol).

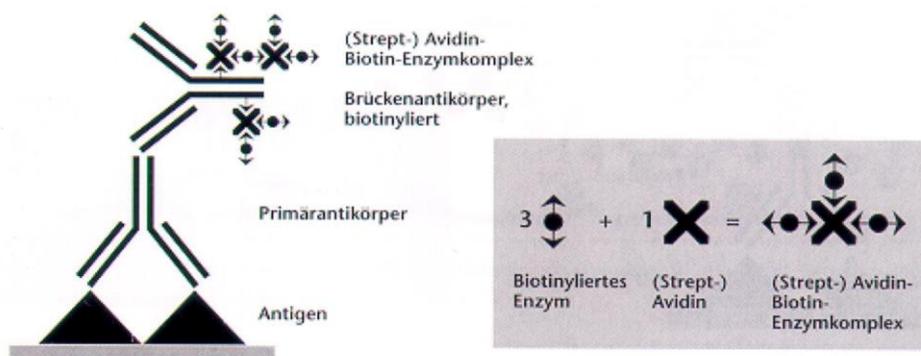


Abbildung 8: Die Avidin-Biotin-Methode.

Nach Bindung eines Primärantikörpers an das nachzuweisende Antigen, bindet der ABC-Komplex über einen Brücken-/ Sekundärantikörper. Der ABC-Komplex besteht aus Avidin, Biotin und der Peroxidase.

Die entsprechend auf Chamberslides ausgesäten humanen primären GC wurden zunächst 5 Minuten mit PBS gewaschen und im Anschluss 15 Minuten mit 50% Ethanol/ 50% Methanol fixiert und an der Luft getrocknet. Danach wurde zum Entfernen der Fixierlösung erneut 5 Minuten mit PBS gewaschen. Danach wurde Blockierungsserum (Vectastain Elite rabbit IgG-Kit) auf die Zellen gegeben. Hierdurch werden elektrostatische Ladungen im Gewebe gesättigt, so dass unspezifische hydrophobe Bindungen und damit unspezifische Anfärbung verhindert werden. Nach 20 Minuten wurde das Blockierungsserum abgeklopft und der anti-FSHR Primärantikörper auf die Zellen gegeben. Diese wurden über Nacht 16h bei 4°C inkubiert. Nach Inkubation wurde 5 Minuten mit PBS gewaschen und der biotinylierte Sekundärantikörper für 30 Minuten hinzugegeben. Es wurde erneut für 5 Minuten mit PBS gewaschen und im Anschluss für 30 Minuten der ABC-Komplex hinzugefügt. Es folgte erneutes Waschen mit PBS für 5 Minuten und

Zugaben von AEC für 3-5 Minuten, bis sich unter dem Mikroskop eine ausreichende Anfärbung zeigte. Die Färbereaktion wurde durch Wässern mit Aqua dest. gestoppt. Es erfolgte zudem eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun nach Mayer. Das positiv geladene Hämalaun ist ein basischer Farbstoff, welcher sich in saurem Milieu (pH4,5) an negativ geladene Phosphatgruppen der DNA im Zellkern anlagert und nach Spülen mit Wasser (pH 7) zu einer Blaufärbung des Zellkerns führt. Die Chamberslides wurden zum Schluss in Aquatex eingedeckt.

2.5 ELISA

Zur Bestimmung der Steroidhormonkonzentrationen wurde die colorimetrische Messung mittels ELISA verwendet. Der ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, bei dem das nachzuweisende Antigen, von einem Primärantikörper gebunden. Der Primärantikörper in den verwendeten Kits ist auf den zugehörigen 96-well Mikrotiterplatten enthalten. Diese sind jeweils mit einem Östrogen- bzw. Progesteron polyklonalen Antikörper beschichtet und richten sich gegen das in den Proben enthaltene Estradiol bzw. Progesteron gerichtet, und wirken über kompetitive Bindung. Über einen Enzym-gekoppelten Zweitantikörper wird nach Zugabe eines Farbstoffsubstrates eine enzymatische Farbreaktion hervorgerufen, welche durch ein Photometer bestimmt werden kann.

Die humanen primären GC wurden entsprechend des Protokolls isoliert, kultiviert und stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte GC. Die Überstände wurden nach 48h bzw. 72h abgezogen und aus den verbleibenden Zellen Proteinlysate hergestellt, um die Proteingehalte der einzelnen Proben nach Bradford zu bestimmen. Nach Bestimmung der Proteingehalte, wurden die Proben normiert. Für jede Messung wurde eine Standardkurve mit den im Kit enthaltenen Standards erstellt. Die Überstände der Proben wurden 1:50 mit Standard Zero vorverdünnt. Von den Standards und den vorverdünnten Proben wurden jeweils 25 µl auf eine entsprechenden 96-well Platte pipettiert. Um Pipettierfehler auszugleichen wurden die einzelnen Proben als Doppelbestimmung angelegt. Zu jeder Probe und Standard wurden 200 µl Enzymkonjugat gegeben und 10 Sekunden durch Schütteln gut vermischt. Für die Estradiolbestimmung wurde 120 Minuten, für die Progesteronbestimmung 60 Minuten auf einer Schüttelplatte bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der

Inkubationszeit wurde der Überstand kräftig ausgeschüttet und 3-mal mit einem gemäß Herstellerangaben hergestellten Waschpuffer gewaschen. Durch das Waschen wurde nicht gebundenes Konjugat entfernt. Im Anschluss wurde die Substratlösung zu den Proben pipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einer Schüttelplatte inkubiert. Die Farbreaktion wurde danach durch Zugabe von Stopplösung beendet. Für die Bestimmung von Estradiol wurden dabei 100 µl Substratlösung, sowie 50 µl Stopplösung, und für Progesteron 200 µl Substratlösung, sowie 100 µl Stopplösung verwendet. Mittels colorimetrischer Messung wurden die Estradiol- und Progesteronkonzentrationen bestimmt. Dabei ist die Intensität der Farbreaktion umgekehrt proportional zur Hormonkonzentration. Die Messung erfolgte dabei innerhalb von 10 Minuten nach Hinzufügen der Stopplösung gemäß des Herstellerprotokolls bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenmesser. Die mittels ELISA bestimmten Steroidhormonkonzentrationen wurden auf die zu der jeweiligen Probe gehörigen Proteinkonzentration normiert. Die so ermittelten Steroidhormonkonzentrationen wurden im Anschluss mit den unstimulierten Kontrollen verglichen.

| | ELISA |
|--------------------------------|---|
| Kultivierung der Zellen | 24-well Platte Pro Vertiefung: 400.000 Zellen |
| Verwendetes Nährmedium | Pro Vertiefung: 500 µl M199 +1% Antibiotic Antimycotic, + 1% Penicillin/Streptomycin + 10% FCS + 1 µmol Androstendion |
| Mediumwechsel | Nach 72 Stunden |
| Mediumwechsel zu | M199 + 1% Antibiotic Antimycotic + 1% Penicillin/Streptomycin + 1% Androstendion ohne FCS |
| Stimulation nach X Stunden (h) | 24h |
| Stimulationsdauer (h) | 48h und 72h |
| Verwendete FSH | 5 U/ml |

| | |
|---------------------------------|-------|
| Konzentration | |
| Verwendete ADX Konzentration | 30 uM |

2.6 Statistische Auswertung mit SPSS

Die statistische Auswertung erfolgte über das Statistikprogramm SPSS. Zur Analyse zweier abhängiger Stichproben wurde der Wilcoxon Test verwendet. Es wurden für jeden Versuch drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Ein p-Wert von ≤ 0.05 wurde als signifikant definiert.

IV. Ergebnisse

1. Charakterisierung und Validierung des in vitro Modellsystems

Um primäre humane Granulosazellen als Modellsystem zu etablieren und das beste Verhältnis der Zellzahl zur Steroidhormonsynthese für die eigentlichen Versuche zu erhalten, wurden zunächst Vorversuche durchgeführt. Es wurden unstimulierte humane primäre Granulosazellen verwendet.

1.1. Bestimmung des Gesamtproteins in Abhängigkeit von der Zellzahl

Um eine Aussage über das Wachstum der Zellen auf den verwendeten Well Platten zu erhalten, wurde in einem ersten Schritt mittels Bradford Assay das Gesamtprotein unterschiedlicher Zellzahlen pro Well bestimmt. Es zeigte sich mit steigender Zellzahl ein signifikant steigendes Gesamtprotein ($p < 0,001$).

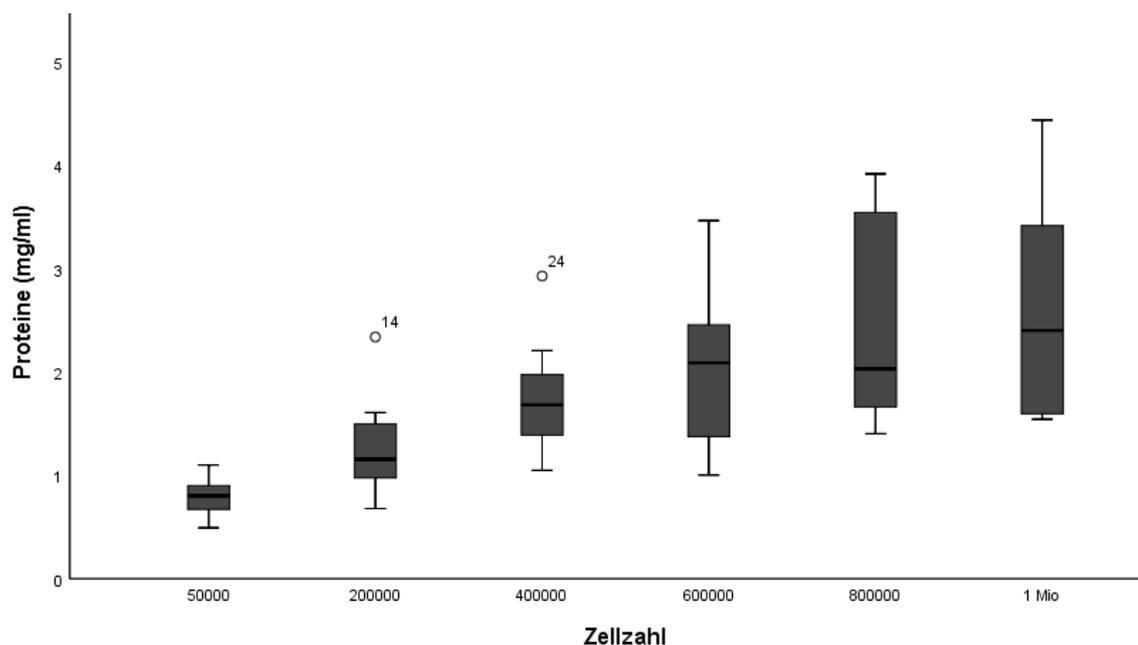


Abbildung 9: Gesamtprotein in Abhängigkeit von der Zellzahl

Die Konzentration des Gesamtproteins nimmt mit steigender Zellzahl zu.

1.2. Steroidhormonsynthese in Abhängigkeit von der Zellzahl

Im nächsten Schritt wurde die Steroidhormonkonzentration für Estradiol und Progesteron bei unterschiedlichen Zellzahlen bestimmt. Hierbei zeigte sich ein Maximum der Estradiolsynthese bei 400.000 Zellen/Well. Bei höheren

Zellzahlen war eine abnehmende bis stagnierende Estradiolsynthese zu erkennen ($p < 0,001$). Für Progesteron ließ sich eine derartige Regulation nicht eruieren. Mit steigender Zellzahl stieg auch die Progesteronsynthese ($p < 0,001$). Anhand dieser Ergebnisse wurde die optimale Zellzahl für die Versuche auf 400.000 Zellen/Well festgelegt.

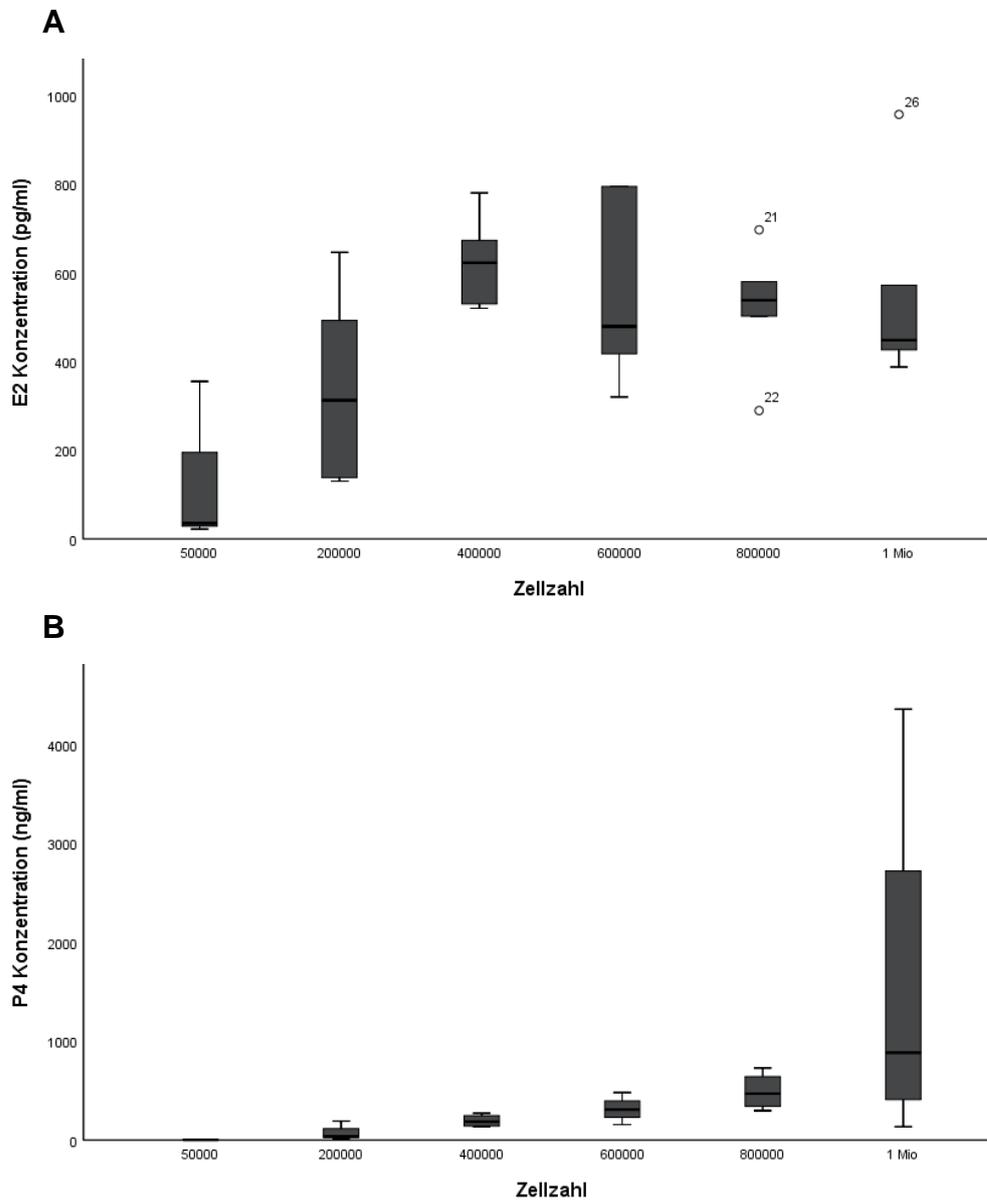


Abbildung 2: Steroidhormonsynthese in Abhängigkeit von der Zellzahl, normiert auf Gesamtprotein

(A) Die Konzentration an Östrogen nimmt ab einer Zellzahl von 400.000 ab, bzw. stagniert.

(B) Die Konzentration an Progesteron nimmt hingegen mit steigender Zellzahl kontinuierlich zu.

2. Nachweis und Lokalisation des FSH Rezeptors in humanen primären Granulosazellen mittels immunocytochemischer Färbung

Zum Nachweis der FSHR Expression bei primären Granulosazellen wurde dieser mittels Immunzytochemie angefärbt. Es zeigte sich eine schwache cytoplasmatische Färbung bei unstimulierten Zellen.

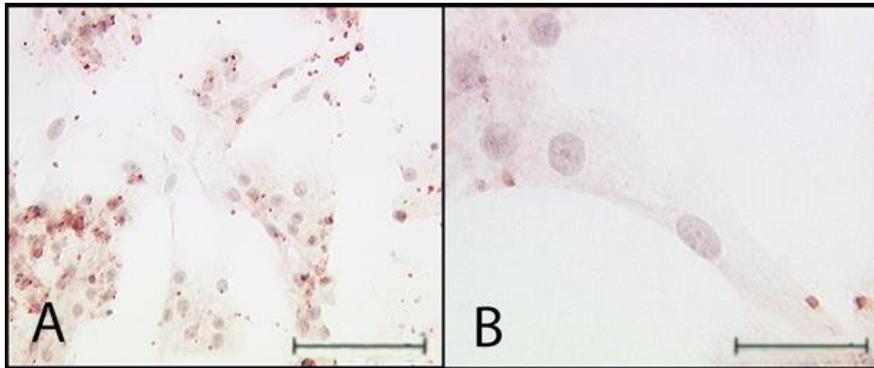


Abbildung 10: Immunzytochemische Färbung des FSHR bei unstimulierten primären Granulosazellen

(A) Cytoplasmatische FSHR Expression auf Proteinebene nach 7 Tagen Kultivierung. Mit im Bild einige deutlich kleinere Erythrozyten. x10, Skala 200 µm und (B) x25, Skala 100 µm.

3. WST Messung

Um zelltoxische Effekte von ADX auf die Zellen zu untersuchen, wurden Viabilitätstests mittels WST Messung durchgeführt. Um dabei Unterschiede zwischen primären Granulosazellen und einer Zellkultur zu unterscheiden, wurde als Kontrolle die Zellkulturlinie Ovar 3 verwendet, bei der der FSHR nachgewiesen ist.

3.1 Ovar 3: Kontrollexperiment bei Zellkulturlinie mit bekannter FSHR Positivität

In den Kontrollexperimenten mit Ovar 3 Zellen zeigte sich bei mit ADX stimulierten Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen eine geringere Zellviabilität. Die geringste Zellviabilität zeigt sich unabhängig von der Stimulationsdauer bei ADX 28 ($p = 0,003$ nach 48 Stunden, $p = 0,008$ nach 72 Stunden) und die größte bei ADX 92 ($p = 0,05$ nach 48 Stunden, $p = 0,008$ nach 72 Stunden). Insgesamt zeigt sich eine größere Viabilität der Zellen nach 72 Stunden, wobei die Zugabe von FSH diese noch einmal signifikant erhöht (ADX 92 $p = 0,028$, ADX 93 $p = 0,021$, ADX 28 $p = 0,008$). Nach 48 Stunden zeigt die

Zugabe von FSH signifikant keinen Effekt auf die Viabilität (ADX 92 $p = 0,034$, ADX 93 $p = 0,002$, ADX 28 $p = 0,002$).

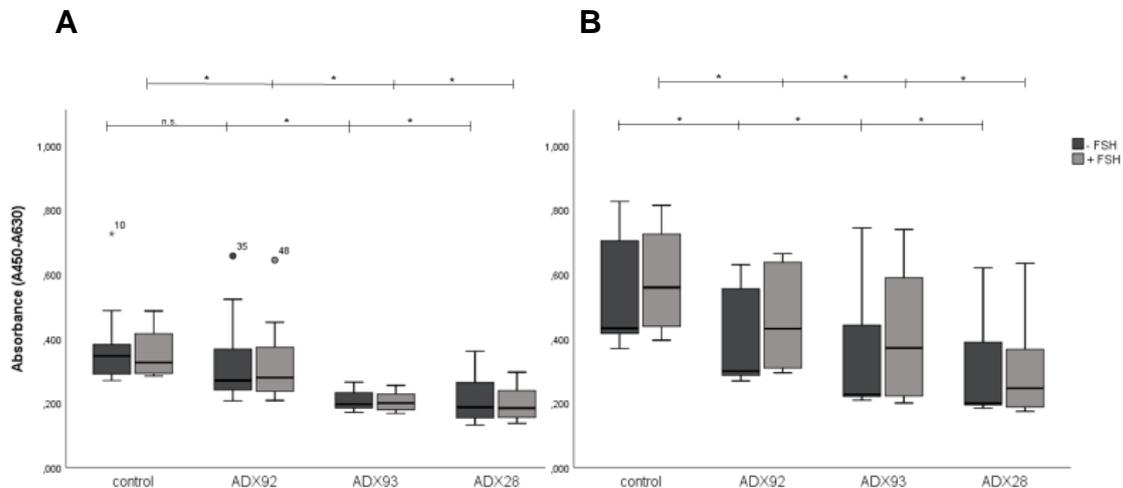


Abbildung 11: Zellviabilität bei Ovar3 stimuliert mit ADX

(A) 48h Stimulation mit ADX zeigt eine geringe Abnahme der Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle. Dabei wirken ADX92, ADX93 und ADX28 in abnehmender Reihenfolge zelltoxisch. Die Zugabe von FSH zeigt keinen Unterschied.

(B) 72h Stimulation zeigt ebenfalls eine Abnahme der Zellviabilität. Insgesamt zeigt sich nach 72h eine höhere Viabilität, welche durch die Zugabe von FSH noch einmal erhöht werden kann.

3.2 WST Granulosazellkultur

Bei primären Granulosazellen zeigte sich bei mit ADX stimulierten Zellen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle eine geringere Zellviabilität. Die geringste Zellviabilität zeigte sich unabhängig von der Stimulationsdauer bei ADX 28 ($p = 0,017$ nach 48 Stunden, $p = 0,008$ nach 72 Stunden). Die Zugabe von FSH erhöht insgesamt die Zellviabilität unabhängig von der Stimulationsdauer. 48 Stunden mit ADX 93 stimulierte Granulosazellen zeigten eine deutliche Steigerung der Zellviabilität nach Zugabe von FSH, jedoch nicht signifikant ($p = 0,917$). Ebenso waren die Ergebnisse von 48 Stunden mit ADX 92 und 93 stimulierten Zellen ohne Zugabe von FSH nicht signifikant (ADX 92 ($p = 0,123$) und ADX 93 ($p = 1$)).

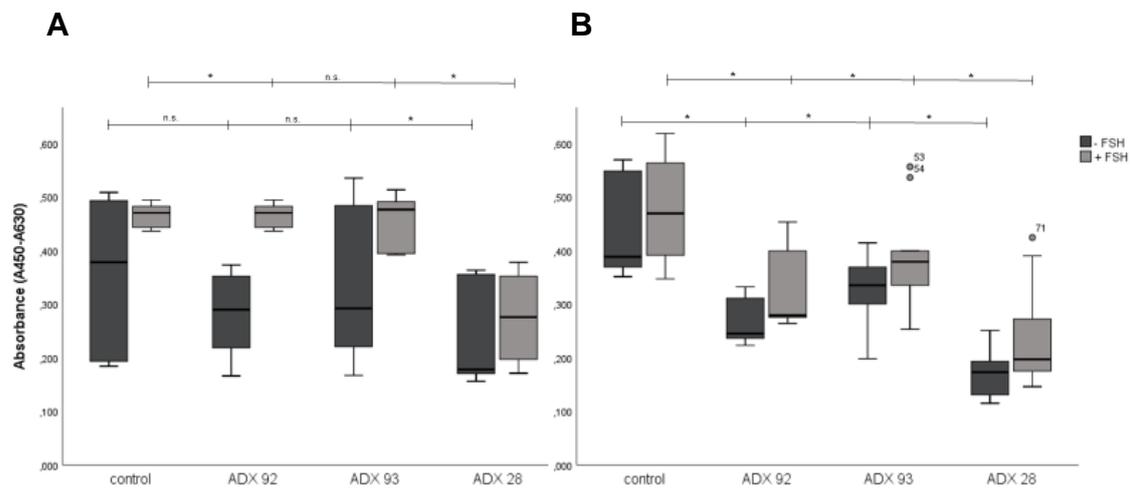


Abbildung 12: Zellviabilität bei GC stimuliert mit ADX

(A) 48h Stimulation mit ADX zeigt eine Abnahme der Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle.

(B) 72h Stimulation zeigt den gleichen Effekt auf die Granulosazellen. ADX28 zeigt sich im Vergleich unabhängig von der Stimulationsdauer am zelltoxischsten.

4. Bestimmung der Steroidhormonsynthese mittels Elisa

Um die Auswirkung der FSH Rezeptor Blockade durch ADX auf die Steroidhormonsynthese zu untersuchen, wurden jeweils die Konzentrationen von Östrogen und Progesteron nach ADX Stimulation bestimmt.

4.1 Estradiolsynthese bei primären humanen GC nach ADX Stimulation

Nach 48 Stunden Stimulation mit ADX nimmt die Konzentration an Östrogen im Vergleich zur Kontrolle bei den stimulierten Zellen ab (ADX92 ($p = 0,043$), ADX93 ($p = 0,043$), ADX28 ($p = 0,043$)). Bei der Kontrolle lässt sich die Östrogenkonzentration durch Zugabe von FSH steigern. Im Gegensatz dazu macht die zusätzliche Stimulation mit FSH bei ADX 92 und ADX 28 nur einen geringen Unterschied aus (ADX92 ($p = 0,043$), ADX28 ($p = 0,043$)). Die gesteigerte Östrogensynthese nach Zugabe von FSH bei ADX 93 ist nicht signifikant ($p = 0,225$). Nach 72 Stunden Stimulation zeigt sich im Vergleich zur Kontrolle eine gesteigerte Östrogensynthese bei mit ADX92 stimulierten Granulosazellen (ADX92 ($p = 0,08$), ADX93 ($p = 0,043$), ADX28 ($p = 0,043$)). Bei zusätzlicher Stimulation mit FSH zeigt sich keine signifikante Steigerung (ADX92 $p = 0,225$). Bei ADX 93 und 28 zeigt sich eine deutlich erniedrigte Östrogenkonzentration, die auch durch FSH nicht gesteigert wird (ADX93 ($p = 0,043$), ADX28 ($p = 0,043$)).

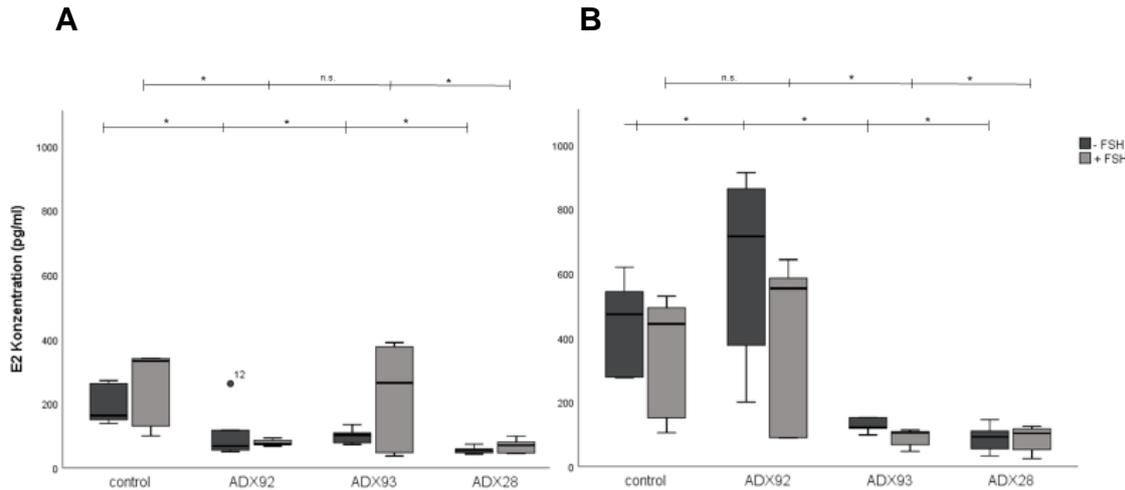


Abbildung 13: Östrogensynthese nach Stimulation mit ADX bei GC

(A) Nach 48 Stunden Stimulation. Die Konzentration an Östrogen nimmt im Vergleich zur Kontrolle bei den stimulierten Zellen ab. Bei der Kontrolle lässt sich die Östrogenkonzentration durch Zugabe von FSH steigern. Im Gegensatz dazu macht die zusätzliche Stimulation mit FSH bei ADX 92 und ADX 28 nur einen geringen Unterschied. Die gesteigerte Östrogensynthese bei ADX 93 nach Zugabe von FSH ist nicht signifikant ($p = 0,225$).

(B) Nach 72 Stunden Stimulation. Im Vergleich zur Kontrolle zeigt sich eine gesteigerte Östrogensynthese bei mit ADX92 stimulierten Granulosazellen. Bei zusätzlicher Stimulation mit FSH zeigt sich Steigerung bei aADX92 nicht signifikant ($p = 0,225$). Bei ADX 93 und 28 zeigt sich eine deutlich erniedrigte Östrogenkonzentration, die auch durch FSH nicht gesteigert wird.

4.2 Progesteronsynthese bei primären humanen GC nach ADX Stimulation

Nach 48 Stunden Stimulation zeigt sich eine verminderte Progesteronkonzentration bei mit ADX stimulierten Granulosazellen ADX92 ($p = 0,043$), ADX93 ($p = 0,043$), ADX28 ($p = 0,043$)). Die zusätzliche Stimulation mit FSH macht dabei nur einen geringen Unterschied (ADX92 ($p = 0,043$), ADX93 ($p = 0,043$), ADX28 ($p = 0,043$)). Nach 72 Stunden Stimulation nimmt die Konzentration an Progesteron im Vergleich zur Kontrolle bei mit ADX stimulierten Zellen ebenfalls ab (ADX93 ($p = 0,043$), ADX28 ($p = 0,043$)). Die Stimulation mit ADX 92 ohne FSH zeigt sich nicht signifikant ($p = 0,345$). Die zusätzliche Stimulation mit FSH erhöht die Zellviabilität nicht signifikant nach Stimulation mit ADX 28 ($p = 0,5$). Ansonsten zeigt sich durch Zugabe von FSH keine Steigerung der Progesteronsynthese (ADX92 ($p = 0,043$), ADX93 ($p = 0,043$)).

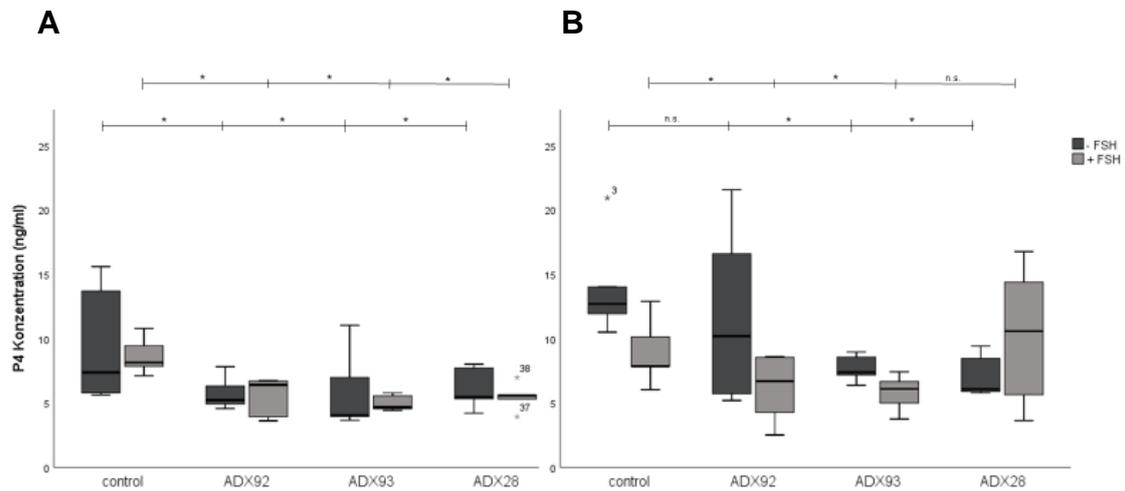


Abbildung 14: Progesteronsynthese nach Stimulation mit ADX bei GC

(A) Nach 48 Stunden Stimulation. Es zeigt sich eine verminderte Progesteron Konzentration bei mit ADX stimulierten Granulosazellen. Die zusätzliche Stimulation mit FSH macht dabei nur einen geringen Unterschied.

(B) Nach 72 Stunden Stimulation. Die Konzentration an Progesteron nimmt im Vergleich zur Kontrolle bei mit ADX stimulierten Zellen ab. Die Stimulation mit ADX 92 ohne FSH zeigt sich nicht signifikant ($p = 0,345$). Auch hier macht die zusätzliche Stimulation mit FSH kaum einen Unterschied. Die erhöhte Progesteronkonzentration nach Stimulation mit ADX 28 und zusätzlicher Stimulation mit FSH ist nicht signifikant ($p = 0,5$).

V. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen der drei NAMs ADX 92, ADX 93 und ADX 28 auf die Steroidhormonsynthese bei humanen primären GC zu untersuchen. Dabei wurde zunächst in Vorversuchen die passende Zellzahl an GC ermittelt. Im Anschluss wurde untersucht, ob die Substanzen eine zelltoxische Wirkung hervorrufen. Schließlich wurde die Steroidhormonkonzentration für Östrogen und Progesteron nach Stimulation mit den NAMs zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. So sollten neue Erkenntnisse über die Rolle des FSHR für die Steroidhormonsynthese gewonnen werden und ein möglicher Ansatz für die nichtsteroidale Kontrazeption und medikamentöse Therapie verschiedener endokriner Erkrankungen gefunden werden.

1.1 Diskussion der Methode

1.1.1 Primärzellkultur vs. Zellkultur

Die während dieser Arbeit verwendeten humanen primären GC sind ein ideales Modellsystem, um Mechanismen der Follikulogenese auf molekularer Ebene zu untersuchen. Dennoch gibt es einige Vor- und Nachteile, die Auswirkungen auf die Ergebnisse haben könnten.

Im Vergleich zur Zellkultur kommen sie einem in vivo Modellsystem sehr nahe, da sie die meisten Eigenschaften in Kultur behalten und im Vergleich zu einer immortalisierten Zellkulturlinie, wie Ovar 3, kein verändertes Genexpressionsprofil haben. So ist beispielsweise die Expression von Rezeptoren und Synthese von Hormonen und Proteinen die gleiche wie in vivo. Sie erlauben somit Versuche mit humanen Zellen und stellen eine gute Alternative zum in vivo Tiermodell dar. Jedoch verändern sich die Primärzellen in Kultur. Die Expression an Rezeptoren nimmt mit der Zeit ab und die Zellen gehen schließlich in ein seneszenten Stadium über. Weiterhin haben Primärzellen in Kultur aufgrund einer verminderten Zellteilungsrate eine limitierte Lebensdauer und können dadurch im Gegensatz zu immortalisierten Zellkulturlinien nicht dauerhaft in Kultur gehalten werden. Weiterhin ist zu bedenken, dass in vitro nicht die gesamten Regelkreisläufe der Hypothalamus-

Hypophysen-Gonaden-Achse wirken. Somit könnten sich bei in vivo Versuchen andere Ergebnisse ergeben.

Die Isolierung von ausreichend Zellmaterial für die Versuche ist insgesamt eher einfach, besteht jedoch aus vielen Schritten und ist sehr arbeits- und zeitaufwändig. Letztlich ist eine Verunreinigung durch andere Zellen nicht ganz auszuschließen. Während dieser Arbeit wurden die GC von unterschiedlichen Kinderwunschpatientinnen gewonnen und gepoolt. Der Grund des unerfüllten Kinderwunsches wurde im Rahmen dieser Arbeit vernachlässigt. Ob daher die Granulosazellen von gesunden Frauen stammen, die aufgrund einer Infertilität des Partners, oder einer Sterilität tubaren Ursprungs in Kinderwunschbehandlung sind, oder eine eigene Erkrankung auf hormoneller oder genetischer Ebene besteht, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht berücksichtigt. Daher sind die GC sehr heterogen und es besteht eine gewisse Variabilität. Dies sollte durch das Poolen der verschiedenen Proben ausgeglichen werden. Bei der Wiederholung der einzelnen Versuche könnte dies aber ebenso eine Variabilität der Ergebnisse hervorgerufen haben.

1.1.2 Vorversuche

Es wurden zunächst Vorversuche durchgeführt, um die passende Zellzahl für die Hauptversuche festzulegen. In den Vorversuchung zeigte sich bei den primären GC bereits ohne Stimulation eine Art Regulation der Östrogensynthese, ausgehend von den Granulosazellen selbst. Bei höheren Zellzahlen war eine abnehmende bis stagnierende Synthese zu erkennen. Zum einen könnte dies auf einem negativen Feedback-Mechanismus beruhen, welcher auch unabhängig von der GnRH-Ausschüttung des Hypothalamus in den Granulosazellen stattfindet. Zum anderen könnte dies auch auf einem Verbrauch des Ausgangsstoffes der Steroidbiosynthese im Zellmedium, dem Androstendion, beruhen.

Für Progesteron zeigte sich bei niedrigen Zellzahlen eine sehr geringe Synthese. Eine Überlegung könnte sein, dass die niedrige Progesteronsynthese daher rührt, dass Progesteron als Ausgangsstoff der Östrogensynthese über die Aromatase weiter zu Östrogen umgesetzt wird (Abbildung 3). Bei sehr großer Zellzahl zeigte sich im Gegensatz zur Östrogensynthese eine enorm gesteigerte Progesteronsynthese. Die Östrogensynthese sinkt also bei hoher

Zellzahl zu Gunsten der Progesteronsynthese. Diese Unterschiede bei der Steroidhormonbiosynthese in Anhängigkeit von der Zelldichte wurden bereits zuvor bei humanen primären GC beschrieben (Bar-Ami et al. 1993). Bei bovinen primären GC wurde zusätzlich die Expression von Enzymen der Östrogensynthese und der Progesteronsynthese untersucht. Bei niedriger Zelldichte zeigten sich entsprechend die Östrogensynthese fördernden Enzyme gesteigert und dem entgegengesetzt bei hoher Zelldichte Enzyme der Progesteronsynthese (Portella et. al 2010). Die Zugabe der Gonadotropine FSH und β -HCG wurde ebenfalls bereits untersucht. Beide förderten jeweils die Östrogensynthese vor allem bei niedriger Zelldichte. Bei hoher Zelldichte wurde wiederum die Progesteronproduktion gesteigert (Bar-Ami et al. 1993, Földesi et al. 1998). Während dieser Arbeit konnte die gesteigerte Östrogensynthese nach Zugabe von FSH nach 48h reproduziert werden. Nach 72h zeigte die Zugabe von FSH jedoch keine Steigerung. Ebenso zeigte sich für Progesteron keine gesteigerte Synthese nach FSH Zugabe.

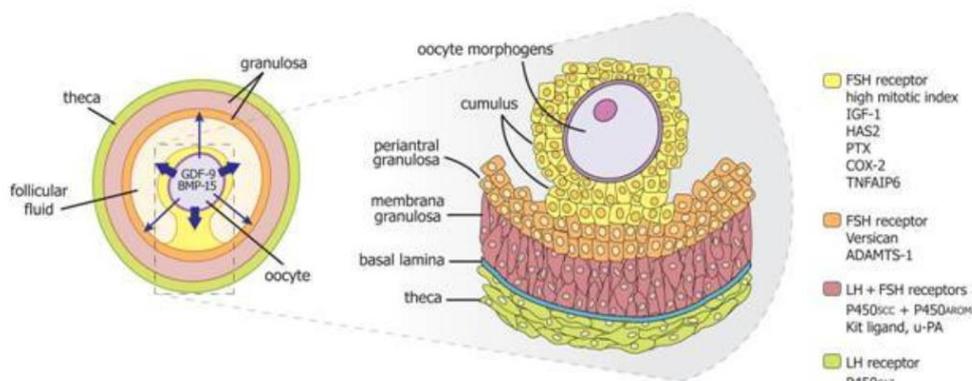


Abbildung 15: Differenzierung der GC zu 3 unterschiedlichen Phänotypen. Abhängig von Signalmolekülen der Oozyte differenzieren sich je nach Entfernung zur Oozyte durch einen Konzentrationsgradienten drei verschiedene Phänotypen von GC: die Kumulus-, periantralen- und membrana granulosa GC. Jeder dieser drei Phänotypen reagiert anders auf FSH-Stimulation. Weitere Beispiele für verschiedene Genexpressionen sind in der Abbildung dargestellt (Erickson et al. 2000)

Eine weitere Auswirkung auf die Steroidhormonsynthese könnten die unterschiedlichen Phänotypen der GC haben. Sprungreife Tertiärfollikel bestehen nicht nur aus einer Art von GC, sondern aus drei verschiedenen Phänotypen: die Kumulus-, periantralen- und membrana granulosa GC. Diese wiederum besitzen durch Expression verschiedener Rezeptoren

möglicherweise jeweils auch andere Eigenschaften bei der Steroidhormonsynthese. Beispielsweise exprimieren die Granulosazellen der membrana granulosa im Gegensatz zu den anderen sowohl LH-, als auch FSH-Rezeptoren und eine Aromatase (P450AROM) (Abbildung 15). Je nachdem welcher Phänotyp vermehrt bei der Zellisolation in Kultur gebracht wurde, könnte dies auch Auswirkung auf die Steroidhormonsynthese haben.

1.1.3 Immunzytochemie

Die immunzytochemische Färbung des FSHR gestaltete sich als schwierig. Es wurden verschiedene Verdünnungen des Primärantikörpers ausprobiert. Dennoch ließ sich nur eine schwache cytoplasmatische Färbung der GC erzielen. Es sollte das Mitführen einer FSHR positiven Zelllinie als Positivkontrolle und einer Negativkontrolle erwogen werden. Es könnten zudem zusätzlich Versuche auf Proteinebene, beispielsweise mittels Westernblot, zum Nachweis des FSHR durchgeführt werden.

1.1.4 WST

Bei den Viabilitätstests mit Ovar 3 Zellen zeigte sich nach 72 Stunden Stimulation mit den Substanzen insgesamt eine höhere Viabilität, welche sich durch Zugabe von FSH nochmals steigern ließ. Daraus könnte man schließen, dass die Wirkung der Substanzen auf den FSHR möglicherweise nach 72 Stunden nachlässt, so dass durch die Zugabe und Bindung von FSH an den FSHR die Viabilität der Zellen gesteigert wird. Bei primären Granulosazellen zeigte sich sogar unabhängig von der Stimulationsdauer eine höhere Viabilität durch Zugabe von FSH. Schlussfolgernd könnte FSH also einen protektiven Effekt auf die Zellviabilität haben.

Dennoch lässt sich aus den Viabilitätstests mit Ovar 3 ableiten, dass ADX 28 im Vergleich zu den anderen Substanzen und zur Kontrolle scheinbar am schädlichsten für die Zellen ist. Das gleiche Ergebnis ließ sich auch für die primären Granulosazellen gewinnen. Nach Stimulation mit ADX 28 zeigte sich unabhängig von der Stimulationsdauer auch hier die geringste Zellviabilität.

So lässt sich die These aufstellen, dass der FSHR wichtig für die Zellviabilität ist. Nachgewiesen wurde bereits, dass der FSHR über Signaltransduktionswege die Expression antiapoptotischer Faktoren in den GC

induziert (Hunzicker-Dunn et al. 2006). Weiterhin könnte man aus den Ergebnissen der Viabilitätstests schließen, dass primäre GC im Vergleich zu einer immortalisierten Zellkulturline empfindlicher sind.

1.1.5 ELISA

Während dieser Arbeit wurden die Substanzen ADX 92, ADX 93 und ADX 28 bei humanen primären GC untersucht. Die vorbekannten Ergebnisse konnten hier nicht bestätigt werden. Im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen zeigte sich bei allen drei Substanzen eine verminderte Synthese beider Steroidhormone.

Die gesteigerte Östrogensynthese nach 72 Stunden Stimulation mit ADX 92 bei zusätzlicher Stimulation mit FSH ist nicht signifikant. Ohne zusätzliche Gabe von FSH war die gesteigerte Östrogensynthese durch ADX 92 zwar signifikant, da ADX 92 jedoch bekannterweise sowohl die Progesteron- als auch die Östrogensynthese blockiert, sollten diese Versuche noch einmal wiederholt werden. Es könnten hier zusätzlich Stimulationsversuche mit unterschiedlichen Konzentrationen der drei Substanzen durchgeführt werden. Zudem sollte als Kontrolle eine Zellkultur aus humanen GC, z.B. HGL5 (Humane Granulosaluteinzelllinie 5), mitgeführt werden, um einen besseren Vergleich zu haben.

1.2 Ausblick

Zusammenfassend zeigen die negativen allosterischen Modulatoren des FSHR ADX 92, ADX 93 und ADX 28 eine negative Wirkung auf die Steroidhormonbiosynthese, sowohl von Östrogen, als auch von Progesteron. Die an Ratten vorher beschriebenen unterschiedlichen Effekte auf Östrogen- bzw. Progesteronsynthese konnten jedoch bei humanen primären GC nicht reproduziert werden. Für künftige Versuche wäre zu überlegen, für die Granulosazellisolation bestimmte Krankheitsbilder ein- bzw. auszuschließen. So könnten noch genauere Ergebnisse erzielt werden und die negativen allosterischen Modulatoren auch zielgerichtet für verschiedene Krankheiten, wie beispielsweise die Endometriose, untersucht werden.

Bei in Zukunft vielversprechenden Ergebnissen bei Versuchen mit humanen primären GC in vitro und in vivo mit Tiermodellen, könnten auch klinische

Studien überlegt werden. Da in vivo die gesamten Regelkreisläufe der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse wirken, welche in vitro nicht vorhanden sind, könnten die Auswirkungen auf die Steroidhormonsynthese nach Stimulation mit den Substanzen noch genauer untersucht werden.

NAMs könnten so in Zukunft vielseitige therapeutische Möglichkeiten, sowohl auf dem Feld der Kontrazeption, als auch in der Reproduktionsmedizin und bei hormonabhängigen Erkrankungen bieten.

VI. Zusammenfassung

Der weibliche Zyklus ist ein höchst komplexer dynamischer Prozess. Um die Steuerung der Follikulogenese besser verstehen zu können, ist ein Verständnis der Wirkungen, molekularen Mechanismen und der hormonellen Regulation wegweisend. Ziel dieser Arbeit war es, das Wissen über essentielle Mechanismen der humanen Reproduktion zu erweitern und mögliche Ansatzpunkte im Rahmen der Familienplanung mit Kontrazeption, weitblickend aber für klinische Fragestellungen in der Reproduktionsmedizin und bei vielfältigen hormonbedingten Erkrankungen zu finden.

Weltweit ist Familienplanung ein gesellschaftlich wichtiges Thema. Als Bestandteil der Lebensplanung gilt sie als grundlegendes Menschenrecht und kann abhängig von individuellen Faktoren, aber auch sozialen und gesellschaftlichen Rahmenbedingungen umgesetzt werden. Sie umfasst alle Entscheidungen und Entwicklungen in denen das private Leben mit und ohne Kinder gestaltet wird. Seit 1969 hat sich die Fertilitätsrate weltweit durch Kontrazeption fast halbiert (UNFPA Weltbevölkerungsbericht 2019). In Deutschland ist die am häufigsten verwendete Kontrazeptionsmethode die orale Kontrazeption mit der Pille. In aktuellen Umfragen zeigt sich dieser Trend bei jungen Frauen jedoch im Vergleich zu 2011 rückläufig. Die Verwendung von hormonellen Kontrazeptionsmethoden wird aufgrund von möglichen unerwünschten Nebenwirkungen immer kritischer betrachtet (BZgA 2018).

Um die Mechanismen und Abläufe der Follikulogenese und Follikelfunktion auf molekularer Ebene beim Menschen zu untersuchen und zu verstehen, werden passende Zellen und Methoden benötigt. Hierfür eignen sich als Modellorganismus besonders primäre humane GC, welche den Großteil der Zellen des Ovars ausmachen. Sie übernehmen viele Funktionen im Rahmen der Follikulo- und Oogenese, der Synthese von Steroidhormonen, der Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft und der embryonalen Entwicklung (Kranc et al 2017). Die humanen primären GC wurden mittels Follikelpunktion von Kinderwunschpatientinnen gewonnen, von anderen Zellen isoliert und in Kultur genommen, ohne jedoch die Krankengeschichte der Kinderwunschpatientinnen zu berücksichtigen. Bei den isolierten GC handelt es

sich um Granulosaluteinzellen, welche durch Expression des FSHR und der Aromatase große Mengen an Steroidhormonen produzieren.

Während dieser Arbeit wurde die Auswirkung der Substanzen ADX 92, ADX 93 und ADX 28 auf die Steroidhormonsynthese untersucht. Bei diesen Substanzen handelt es sich um negative allosterische Modulatoren (NAM) des FSHR. Sie binden spezifisch an den FSHR und inhibieren verschiedene Signaltransduktionswege, ohne die Bindung des eigentlichen Liganden FSH zu blockieren. Der FSHR ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, welcher durch seinen Liganden, das Gonadotropin FSH, aktiviert wird. Er spielt eine zentrale Rolle bei der Zellproliferation und -metabolismus der Follikel, sowie bei der Synthese und Sekretion der Steroidhormone. Eine Modulation des FSHR könnte daher ein möglicher Ansatz für die nichtsteroidale Kontrazeption sein.

Während dieser Arbeit wurden humane primäre GC mit den drei NAMs ADX 92, ADX 93 und ADX 28 stimuliert, welche bisher nur an Ratten untersucht wurden. Bei Ratten konnte bereits nachgewiesen werden, dass ADX 92 und ADX 93 über negative allosterische Modulation des FSHR die Steroidhormonsynthese beeinflussen. ADX 92 wirkte *in vitro* bei primären GC von Ratten sowohl auf die Progesteron-, als auch auf die Östrogensynthese inhibitorisch. Bei Ratten zeigte sich *in vivo* nach oraler Gabe bei etwa der Hälfte der Tiere ein gestörter Sexualzyklus und eine damit verbundene verminderte Anzahl an Ovulationen. ADX 93 ist ein strukturelles Analog zu ADX 92 und zeigt eine ähnlich starke Inhibierung der Progesteronsynthese, ohne jedoch die Östrogensynthese zu verringern. Im Gegenteil, es konnte sogar gezeigt werden, dass ADX 93 bei steigenden Konzentrationen einen synergistischen Effekt auf die FSH gesteuerte Östrogensynthese hat und diese so steigern kann. Bei besserer oraler Bioverfügbarkeit von ADX 93 zeigte sich bei Ratten unabhängig von der verwendeten Konzentration keine Auswirkung auf die Anzahl der Ovulationen, was am Ehesten auf die fehlende Östrogensyntheseinhibierung zurückzuführen ist. Somit ist für eine suffiziente Kontrazeption die Inhibierung beider Steroidhormone erforderlich (Dias et al. 2014). Über ADX 28, welches ein weiteres strukturelles Analog zu ADX 92 darstellt, gibt es bislang noch keine veröffentlichten Studien oder Ergebnisse und so wurde es im Rahmen dieser Arbeit erstmals untersucht.

Während dieser Arbeit konnte bewiesen werden, dass die untersuchten NAMs auch bei humanen primären GC eine inhibierende Wirkung auf die

Steroidhormonsynthese haben. Die vorbeschriebenen Ergebnisse konnten während dieser Arbeit jedoch nicht reproduziert werden. Im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen zeigte sich bei allen drei Substanzen sowohl die Östrogen- als auch die Progesteronsynthese vermindert.

Für künftige Versuche wäre zu überlegen, bestimmte Krankheitsbilder für die Granulosazellisolation ein- bzw. auszuschließen, um noch genauere Ergebnisse zu erhalten. So könnten NAMs in Zukunft auch zielgerichtet für verschiedene hormonabhängige Erkrankungen, wie beispielsweise die Endometriose, untersucht werden.

Bei in Zukunft vielversprechenden Ergebnissen bei Versuchen in vitro und an Tiermodellen, könnten anschließend auch klinische Studien überlegt werden. Da in vivo die gesamten Regelkreisläufe der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse wirken, welche in vitro nicht vorhanden sind, können die Auswirkungen auf die Steroidhormonsynthese nach Stimulation mit den Substanzen noch genauer untersucht werden. So könnten NAMs in Zukunft vielseitig eingesetzt werden, sowohl auf dem Feld der Kontrazeption, als auch in der Reproduktionsmedizin und bei hormonabhängigen Erkrankungen.

VII. Literaturverzeichnis

Andruska N, Zheng X, Yang X, Helferich WG, Shapiro DJ (2014): Anticipatory estrogen activation of the unfolded protein response is linked to cell proliferation and poor survival in estrogen receptor α -positive breast cancer.

Oncogene (2014), 1–10.

Andersen CY, Ezcurra D (2014): Human steroidogenesis: implications for controlled ovarian stimulation with exogenous gonadotropins.

Reproductive Biology and Endocrinology, 12: 128.

Hormonal Contraception. Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics (S3-Level, AWMF Registry No. 015/015, December 2018)
<http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/015-015.html>

Bagnjuk K, Mayerhofer A (2019): Human Luteinized Granulosa Cells-A Cellular Model for the Human Corpus Luteum.

Front Endocrinol (Lausanne). 2019;10:452. doi:10.3389/fendo.2019.00452

Banerjee AA, Mahale SD (2015): Role of the extracellular and intracellular loops of follicle-stimulating hormone receptor in its function.

Frontiers in Endocrinology doi: 10.3389/fendo.00110.

Barbieri R.L. (2014): The Endocrinology of the Menstrual Cycle. In: Rosenwaks Z., Wassarman P. (eds) Human Fertility. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 1154. Humana Press, New York, NY.

Bar-Ami S, Gitay-Goren H (1993): Altered steroidogenic activity of human granulosa-lutein cells at different cell densities in culture

Molecular and Cellular Endocrinology, Volume 90, Issue 2, January 1993, Pages 157-164

Bayasula, Akira Iwase, Tohru Kiyono, Sachiko Takikawa, Maki Goto, Tomoko Nakamura, Yoshinari Nagatomo, Tatsuo Nakahara, Tomomi Kotani, Hiroharu Kobayashi, Mika Kondo, Shuichi Manabe, Fumitaka Kikkawa (2012):

Establishment of a Human Nonluteinized Granulosa Cell Line that Transitions from the Gonadotropin-Independent to the Gonadotropin-Dependent Status.

Endocrinology 153(6):2851–2860.

Bender H., Dietrich K., Künzel W., (2001): Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, 4. Edn (München und Jena, Urban und Fischer Verlag)

Behrends et al., Duale Reihe Physiologie, Thieme, 2012

Bildik G, Akin N, Seyhan A, Esmaeilian N, Yakin K, Keles I, Balaban B, Ata B, Urman B, Oktem O (2019): Luteal granulosa cells from natural cycles are more capable of maintaining their viability, steroidogenic activity and LH receptor expression than those of stimulated IVF cycles.

Human Reproduction, Volume 34, Issue 2, February 2019, Pages 345–355.

Bloom W, Fawcett DW: A Textbook of Histology. Philadelphia, WB Saunders Company, 1975.

Burns K.H., Yan C., Kumar T.R., Matzuk M.M. (2001): Analysis of Ovarian Gene Expression in Follicle-Stimulating Hormone β Knockout Mice

Endocrinology, Volume 142, Issue 7, 2742–2751.

Casarini L, Reiter E, Simoni M (2016): β -arrestins regulate gonadotropin receptor-mediated cell proliferation and apoptosis by controlling different FSHR or LHCGR intracellular signaling in the hGL5 cell line.

Mol Cell Endocrinol. 2016 Dec 5;437:11-21.

Chabab A, Hedon B, Arnal F, Diafouka F, Bressot N, Flandre O, Cristol P (1986): Follicular steroids in relation to oocyte development and human ovarian stimulation protocols.

Human Reprod 1(7): 449-453.

Choi KC, Kang SK, Tai CJ, Auersperg N, Leung PCK (2002): Follicle-Stimulating Hormone Activates Mitogen-Activated Protein Kinase in Preneoplastic and Neoplastic Ovarian Surface Epithelial Cells.

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, Volume 87, Issue 5, 1 May 2002, Pages 2245–2253, <https://doi.org/10.1210/jcem.87.5.8506>.

Dhont M (2010): History of oral contraception, The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care, 15:sup2, S12-S18, DOI: 10.3109/13625187.2010.513071.

Dias JA, Campo B, Weaver BA, Watts J, Kluetzman K, Thomas RM, Bonnet B, Mutel V, and Poli SM (2014): Inhibition of Follicle-Stimulating Hormone-Induced Preovulatory Follicles in Rats Treated with a Nonsteroidal Negative Allosteric Modulator of Follicle-Stimulating Hormone Receptor
Biology of Reproduction 90(1):19, 1–11.

Dias JA, Bonnet B, Weaver BA, Watts J, Kluetzman K, Thomas RM, Poli SM, Mutel V and Campo B (2011): A negative allosteric modulator demonstrates biased antagonism of the follicle stimulating hormone receptor.
Mol Cell Endocrinol 333(2): 143–150.

Dietel M, Denkert C, Darb-Esfahani S (2013): Pathologie (Mamma, Weibliches Genitale, Schwangerschaft und Kindererkrankungen), 431-432.

Denschlag D, Keck C (2002): The corpus luteum.
Ther Umsch 59(4): 159-162.

Dufau ML (1998): The luteinizing hormone receptor.
Annu Rev Physiol 60: 461-496.

Erickson GF, Hofeditz C, Unger M, Allen WR, Dulbecco R (1985): A monoclonal antibody to a mammary cell line recognize two distinct subtypes of ovarian granulosa cells. Endocrinol 117(4): 1490-1499.

Espey LL (1974): Ovarian proteolytic enzymes and ovulation.
Biol Reprod 10(2): 216-235.

Fan QR, Hendrickson WA (2005): Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor.
Nature. 2005 January 20; 433(7023): 269–277. doi:10.1038/nature03206.

Filicori M, Santoro N, Merriam GR, Crowley WF Jr (1986): Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle.
J Clin Endocrinol Metab 62(6): 1136-1144.

Földesi I, Breckwoldt M, Neulen J (1998): Oestradiol production by luteinized human granulosa cells: evidence of the stimulatory action of recombinant human follicle stimulating hormone. Human Reproduction vol.13 no.6 pp.1455–1460, 1998

Fujimoto M, Kanzaki H, Nakayama H, Higuchi T, Hatayama H, Iwai M, Kaneko Y, Mori T, Fujita J. (1996): Requirement for transglutaminase in progesterone-induced decidualization of human endometrial stromal cells.
Endocrinology.137(3):1096-101.

Fuentes N., Silveyra P. (2019): Estrogen receptor signaling mechanisms.
Adv Protein Chem Struct Biol; 116: 135–170.

Gougeon A (1998): Ovarian follicular growth in humans: ovarian ageing and population of growing follicles.
Maturitas 30: 137-142.

Garrido C, Saule S, Gospodarowicz D (1993): Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ovarian bovine granulosa cells.
Growth Factors 8(2): 109-117.

Goodman AL, Hodgen GD (1982): The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res* 39: 1-73.

Gutkowska J, Jankowski M, Sairam MR, Fujio N, Reis AM, Mukaddam-Daher S, Tremblay J (1999): Hormonal regulation of natriuretic peptide system during induced ovarian follicular development in the rat. *Biol Reprod* 61: 162-170.

Hamilton TC, Young RC, McKoy WM, Grotzinger KR, Green JA, Chu EW, Whang-Peng J, Rogan AM, Green WR, Ozols RF (1983): Characterization of a Human Ovarian Carcinoma Cell Line (NIH:OVCAR-3) with Androgen and Estrogen Receptors. *Cancer Research* 43, 5379-5389, November 1983.

Heublein S, Mayr D, Vrekoussis T, Friese K, Hofmann SS, Jeschke U, Lenhard M (2013): The G-Protein Coupled Estrogen Receptor (GPER/GPR30) Is a Gonadotropin Receptor Dependent Positive Prognosticator in Ovarian Carcinoma Patients. *PLoS ONE* 8(8): e71791. doi:10.1371/journal.pone.0071791

Holesh JE, Hazhirkarzar B, Lord M (2019): *Physiology, Ovulation*. 2019, StatPearls Publishing LLC

Holtzman B, Ackerman KE (2019): Hypothalamic–pituitary–gonadal axis in women's sport: injuries, manipulations, and aberrations. *Sports Endocrinology*, Volume 9, December 2019, Pages 78-85

Hunzicker-Dunn M, Maizels ET (2006): FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cell Signal*. 2006;18(9):1351–1359. doi:10.1016/j.cellsig.2006.02.011

Kara E, Dupuy L, Bouillon C, Casteret S and Maurel M-C (2019): Modulation of Gonadotropins Activity by Antibodies. *Front. Endocrinol.* 10:15. doi: 10.3389/fendo.2019.0

Kranc W, Budna J, Kahan R, Chachuła A, Bryja A, Ciesiółka S, Borys S, Antosik MP, Bukowska D, Brussow KP (2017): Molecular Basis of Growth, Proliferation, and Differentiation of Mammalian Follicular Granulosa Cells. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 2017, 31, 1–8.

Kranc W, Brazert M, Ozegowska K, Nawrocki MJ, Budna J, Celichowski P, Dyszkiewicz-Konwinska M, Jankowski M, Jeseta M, Pawelczyk L, Bruska M, Nowicki M, Zabel M, Kempisty B (2017): Expression Profile of Genes Regulating Steroid Biosynthesis and Metabolism in Human Ovarian Granulosa Cells - A Primary Culture Approach. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 2673.

Kossowska-Tomaszczuk K, De Geyter C, De Geyter M, Martin I, Holzgreve M, Scherberich A, Zhang H (2009): The Multipotency of Luteinizing Granulosa Cells Collected from Mature Ovarian Follicles. *Stem Cells* 2009;27:210 –219.

Kamat BR, Brown LF, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF (1995): Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. *Am J Pathol* 146(1): 157-165.

Karck U, Keck C (2002): Physiology of ovarian function. *Ther Umsch* 59(4): 153-158.

Kishi H, Minegishi T, Tano M, Abe Y, Ibuki Y, Miyamoto K (1997): Down-regulation of LH/hCG receptor in rat cultured granulosa cells. *FEBS Lett* 402(2-3): 198-202.

Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM (1997): Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet.* 1997 Feb;15(2):201-4.

LaPolt PS, Tilly HL, Aihara T, Nishimori K, Hsueh AJ (1992): Gonadotropin-induced up-and down-regulation of ovarian follicle-stimulating hormone (FSH)

receptor gene expression in immature rats: effects of pregnant mare's serum gonadotropin, human chorionic gonadotropin, and recombinant FSH. *Endocrinol* 130: 1289-1295.

Lambert A, Harris SD, Knaggs P, Robertson WR (2000): Improved FSH sensitisation and aromatase assay in human granulosa–lutein cells, *Molecular Human Reproduction*, Volume 6, Issue 8, August 2000, Pages 677–680, <https://doi.org/10.1093/molehr/6.8.677>

Landomiel F, Gallay N, Jégot G, Tranchant T, Durand G, Bourquard T, Crépieux P, Poupon A, Reiter E (2014): Biased signalling in follicle stimulating hormone action. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Volume 382, 452-459.

Licht P, Wildt L (1998): Luteal and extraluteal receptors for hCG and LH. *Zentralbl Gynäkol* 120(3): 98-105.

Lindeberg M, Carlström K, Ritvos O, Hovatta O (2007): Gonadotrophin stimulation of non-luteinized granulosa cells increases steroid production and the expression of enzymes involved in estrogen and progesterone synthesis, *Human Reproduction*, Volume 22, Issue 2, Feb 2007, Pages 401–406.

Lobo RA, Stanczyk FZ (1994): New knowledge in the physiology of hormonal contraceptives. *Am J Obstet Gynecol*.170(5 Pt 2):1499-507.

McNatty KP, Maktis A, Osathanondh R, Ryan KJ (1980): Effects of luteinizing hormone on steroidogenesis by thecal tissue from human ovarian follicle in vitro. *Steroids* 36(1): 53-63.

Murphy BD (2000): Models of luteinization. *Biol Reprod* 63(1): 2-11.

Oktay K, Newton H, Mullan J, Gosden RG (1998): Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/ hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod*. 13(5): 1133-8.

Orisaka M, Tajima K, Tsang BK, Kotsuji F (2009): Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development.
J Ovarian Res.; 2: 9.

Pate JL, Keyes LP (2001): Immune cells in the corpus luteum: friends or foes.
Reprod 122(5): 665-676.

Pauerstein CJ, Eddy CA, Croxatto HD, Hess R, Siler-Khodr TM, Croxatto HB (1978): Temporal relationships of estrogen, progesterone, and luteinizing hormone levels to ovulation in women and infrahuman primates.
Am J Obstet Gynecol 130(8): 876-868.

Portela VM, Zamberlam G, Price CA (2010): Cell plating density alters the ratio of estrogenic to progestagenic enzyme gene expression in cultured granulosa cells. Fertility and Sterility, Volume 93, Issue 6, 2050 – 2055.

Rainey WH, Sawetawan C, Shay JW, Michael MD, Mathis JM, Kutteh W, Byrd W, Carr BR (1994): Transformation of human granulosa cells with the E6 and E7 regions of human papillomavirus.
J Clin Endocrinol Metab. 1994 Mar;78(3):705-10.

Ryan KJ, Meigs R, Petro Z (1966): The formation of progesterone by the human placenta. Am J Obstet Gynecol 96(5): 676-686.

Serfaty D (2019): Update on the contraceptive contraindications.
Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction, Volume 48, Issue 5, Pages 297-307.

Stauber und Weyerstahl, 2005: Gynäkologie und Geburtshilfe. Thieme, Stuttgart, S. 78.

Stamouli A, O'Sullivan MJ, Frankel S, Thomas EJ, Richardson MC (1996): Suppression of matrix metalloproteinase production by hCG in cultures of human luteinized granulosa cells as a model for gonadotrophin-induced luteal rescue. J Reprod Fertil 107(2): 235-239.

Stocco C, Telleria C, Gibori G (2007): The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function, and Regression.
Endocrine Reviews 28(1):117–149.

Speroff L (1999): Role of progesterone in normal breast physiology.
J Reprod Med 44(2): 172-179.

Speroff L, Fritz MA (2005): Clinical gynecologic endocrinology and infertility
lippincott Williams & wilkins.

Tang ZR, Zhang R, Lian ZX, Deng SL, Yu K (2019): Estrogen-Receptor Expression and Function in Female Reproductive Disease.
Cells. 2019;8(10):1123. Published 2019 Sep 21. doi:10.3390/cells8101123

Taraborrelli S (2015): Physiology, production and action of progesterone.
Acta Obstet Gynecol Scand 2015 ; 94: 8–16.

Tilly HL, Aihara T, Nishimori K, Jia XC, Billig H, Kowalski KI, Perlas EA, Hsueh AJ (1992): Expression of recombinant human follicle-stimulating hormone receptor: species-specific ligand binding., signal transduction, and identification of multiple ovarian messenger ribonucleic acid transcripts.
Endocrinol 131(2): 799-806.

Trussell J, Leveque JA, Koenig JD, London R, Borden S, Henneberry J, LaGuardia KD, Stewart F, Wilson TG, Wysocki S (1995): The economic value of contraception: a comparison of 15 methods.
American Journal of Public Health 85, 494_503.

Ulloa-Aguirre A, Zariñán T (2016): The Follitropin Receptor: Matching Structure and Function. Molecular Pharmacology, 90 (5) 596-608

UNFPA Weltbevölkerungsbericht 2019.

United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2019): World Contraceptive Use 2019 (POP/DB/CP/Rev2019)

Williams C.J., Erickson G.F. (2012): Morphology and Physiology of the Ovary. 2000-2019, MDText.com, Inc

Yamamoto S, Konishi I, Tsuruta Y, Nanbu Mandai M, Kuroda H, Matsushita K, Hamid AA, Yura Y, Mori T (1997): Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) during folliculogenesis and corpus luteum formation in the human ovary. *Gynecol Endocrinol* 11(6): 371-381.

Yan Z, Neulen J, Raczek S, Weich HA, Keck C, Grunwald K, Breckwoldt M (1998): Vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular permeability factor (VPF) production by luteinized human granulosa cells in vitro; a paracrine signal in corpus luteum formation. *Gynecol Endocrinol* 12(3): 149-153.

Yuan W, Connor ML, Buhr MM (1993): Responsiveness of porcine large and small luteal cells to luteotropic or luteolytic hormones and cells morphologic changes during the estrous cycle and pregnancy. *J Anim Sci* 71(2): 481-491.

Zhang M, Xia G (2012): Hormonal control of mammalian oocyte meiosis at diplotene stage. *Cell. Mol. Life Sci.* 69:1279–1288.

VIII. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse | 4 |
| Abbildung 2: Follikulogenese..... | 6 |
| Abbildung 3: Steroidhormonbiosynthese | 7 |
| Abbildung 4: Zwei-Zellen-zwei-Gonadotropine: Östrogensynthese im ovariellen Follikel | 8 |
| Abbildung 5: Schematische Darstellung des FSHR | 10 |
| Abbildung 6: Chemische Struktur der beiden NAMs ADX92 und ADX93..... | 13 |
| Abbildung 7: Weltbevölkerungsbericht 2019 UNFPA | 14 |
| Abbildung 8: Die Avidin-Biotin-Methode. | 26 |
| Abbildung 9: Gesamtprotein in Abhängigkeit von der Zellzahl | 30 |
| Abbildung 10: Immunzytochemische Färbung des FSHR bei unstimulierten primären Granulosazellen | 32 |
| Abbildung 11: Zellviabilität bei Ovar3 stimuliert mit ADX | 33 |
| Abbildung 12: Zellviabilität bei GC stimuliert mit ADX | 34 |
| Abbildung 13: Östrogensynthese nach Stimulation mit ADX bei GC..... | 35 |
| Abbildung 14: Progesteronsynthese nach Stimulation mit ADX bei GC | 36 |
| Abbildung 15: Differenzierung der GC zu 3 unterschiedlichen Phänotypen. | 39 |

IX. Danksagung

Ich möchte mich an erster Stelle besonders bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Udo Jeschke für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in seiner Forschungsgruppe bedanken. Vielen Dank für die fachkundige Unterstützung bei allen auftretenden Fragen und deine unendliche Geduld.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern des Immunhistologischen Labors der Frauenklinik Maistraße für die fachliche Hilfe und die ausgezeichnete Betreuung danken, insbesondere Christina Kuhn und Simone Hofmann für die sehr gute Einarbeitung, die professionelle Unterstützung und die herzliche Atmosphäre im Labor.

Des Weiteren möchte ich Sabine Heublein für das Thema und die Unterstützung bei der Einarbeitung der Versuche danken.

Ein großer Dank gilt meiner Familie, allen voran meiner Mutter, die mich während meines gesamten Studiums und meiner Promotion unterstützten. Auch bei meiner Mitdotorandin Annika und meiner Freundin Ite möchte ich mich besonders bedanken.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei meinem Freund Rasso bedanken, ohne den das Fertigstellen dieser Arbeit nicht funktioniert hätte. Vielen Dank für deine große Geduld, dein beständiges Ermahnen weiter zu machen und deine Liebe. Das Jahr 2020 ist zu etwas besonderem geworden und ich freue mich auf unsere Zukunft.

X. Eidesstattliche Versicherung

Nick, Verena Katharina Pia

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Untersuchung negativer allosterischer Modulatoren des FSH-Rezeptors
bei humanen primären Granulosazellen**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 11.01.2021

Ort, Datum

Verena Nick

Unterschrift Doktorandin