

***Spannungsaktivierte Natriumkanäle
im Corpus luteum des Primaten
und ihre Rolle bei der Regulation
von Steroidproduktion und Luteolyse***

Andreas Bulling
München 2001

Anatomisches Institut der Technischen Universität München

***Spannungsaktivierte Natriumkanäle
im Corpus luteum des Primaten
und ihre Rolle bei der Regulation
von Steroidproduktion und Luteolyse***

Andreas Bulling

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des Akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher
2. Univ.-Prof. Dr. M. Gratzl
3. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Die Dissertation wurde am 06.06.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 13.07.2001 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Regulation der Ovarfunktion	7
1.1.1	Beteiligte Komponenten	7
1.1.2	Hypothalamus / Hypophyse	8
1.1.3	Synthese von Steroidhormonen	9
1.1.4	Aufbau des Ovars	10
1.1.5	Follikelphase	10
1.1.6	Lutealphase	11
1.1.7	Luteolyse	12
1.2	Spannungsaktivierte Na⁺-Kanäle	14
1.2.1	Struktur und Funktion	14
1.2.2	Beeinflussung der Natriumkanal-Aktivität durch Modulatoren und Pharmaka	15
1.2.3	Isoformen und Regulation der Expression	15
1.2.4	Funktion in nicht erregbaren Zellen	17
1.2.5	Persistierender Natriumstrom	18
1.3	Zielsetzung	20
2	Material	21
2.1	Herstellerverzeichnis	21
2.2	Verwendete Lösungen	22
3	Methoden	23
3.1	Zellkultur (humane Granulosazellen)	23
3.1.1	Vorbereitung der Kulturschalen	23
3.1.2	Präparation/Isolierung	23
3.1.3	Stimulation der Zellen	24
3.2	Progesteronbestimmung	24
3.3	Proteinbestimmung	25

3.4	Molekularbiologie	26
3.4.1	RNA-Extraktion	26
3.4.2	Reverse Transkription (RT)	26
3.4.3	Polymerase Chain Reaction (PCR)	27
3.4.4	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	28
3.4.5	DNA-Ligation (Herstellung des Vektor-Plasmids)	28
3.4.6	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	28
3.4.7	Transformation.....	29
3.4.8	Präparation des Plasmids.....	29
3.4.9	Northern Blotting.....	29
3.4.9.1	Linearisierung	30
3.4.9.2	In vitro-Transkription.....	30
3.4.9.3	RNA-Aufbereitung	31
3.4.9.4	Gelelektrophorese	31
3.4.9.5	Hybridisierung.....	32
3.5	Lysosomenfärbung / Fluoreszenzmikroskopie	32
3.6	Immunhistochemie	32
3.7	Elektronenmikroskopie	33
3.8	Elektrophysiologie	34
3.8.1	Komponenten und Aufbau des Meßplatzes	34
3.8.2	Perfusionssystem	34
3.8.3	Elektroden.....	35
3.8.4	Patch-Pipetten	36
3.8.5	Ablauf einer Messung	36
3.8.6	Messprotokolle.....	37
3.8.7	Messung der Kopplung von Zellen über Gap junctions.....	38
3.8.8	Herleitung der Kopplungsgleichung.....	38
4	Ergebnisse	42
4.1	Elektrophysiologische Charakterisierung der kultivierten Granulosazellen	42
4.1.1	Nachweis spannungsaktivierter K^+ -Kanäle.....	42
4.1.2	Hemmung der Na^+ -Kanäle durch TTX.....	43
4.1.3	Aktivierung und Inaktivierung der Na^+ -Ströme	44
4.1.4	Abhängigkeit der Aktivierung und Inaktivierung von der Kultivierungsdauer	46

4.1.5	Membranströme durch Spannungsrampen	46
4.1.6	Abhängigkeit der Na ⁺ -Stromamplitude von Kultivierungsdauer und Meßzeit.....	47
4.1.7	Regulation durch hCG	49
4.1.7.1	Kurzzeitige Applikation in Pulsexperimenten	49
4.1.7.2	Langfristige Wirkung von hCG auf Membranpotential und spezifischen Na ⁺ -Strom.	50
4.1.8	Untersuchung der interzellulären Kopplung (Gap junctions).....	51
4.2	Bedeutung der Natriumkanal-Aktivität für die Zellmorphologie und -funktion.....	53
4.2.1	Morphologische Veränderungen	53
4.2.2	Ultrastrukturelle Veränderungen.....	54
4.2.3	Ergebnisse der Lysosomenfärbung.....	54
4.2.4	Nachweis von Lysosomen im CL-Gewebe.....	56
4.2.5	Produktion von Progesteron	58
4.3	Molekularbiologische Ergebnisse	59
4.3.1	Identifikation von Na ⁺ -Kanälen in humanen Granulosazellen und im Ovar.....	59
4.3.2	Identifikation und zeitliche Regulation von eNaK im CL und Ovar des Rhesusaffen...	61
4.3.3	Zunahme von eNaK mit der Kultivierungsdauer der humanen GZ	61
4.3.4	Regulation der eNaK mRNA Transkript-Mengen durch hCG.....	62
5	Diskussion	63
5.1	Molekulare Identifikation von Na⁺-Kanälen im Ovar	63
5.2	Charakterisierung der Na⁺-Ströme in humanen Granulosazellen	66
5.3	Einfluß der Na⁺-Kanalaktivität auf die zelluläre Morphologie und Funktion.....	68
5.4	Mechanismen für den Na⁺-Einstrom in Granulosazellen.....	71
5.5	Zusammenhang zwischen Na⁺-Kanalaktivität und Luteolyse.....	72
6	Zusammenfassung	76
7	Literaturverzeichnis	77
Anhang	85

Abkürzungsverzeichnis

™	eingetragenes Warenzeichen	kbp	tausend bp
A _x	Absorption einer Lösung bei einer Wellenlänge von X nm	kDa	Kilodalton
AC	Adenylat-Zyklase	LAMP-1	Lysosomal Associated Membrane Protein 1
ANOVA	Varianzanalyse (hier einfaktoriell, ohne Messwiederholung)	LB	Luria-Bertani
BCA	Bicinchoninsäure	M	Molar
bp	Basenpaare	MMLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	Mops	4-Morpholinopropansulfonsäure
cDNA	complementary DNA	mRNA	messenger-RNA
CD68	Cluster Designation Antigen 68	nA	Nanoampère
DAB	Diaminobenzidin	NaK	Natriumkanal
DARPP-32	Dopamin- und cAMP-reguliertes Phosphoprotein von 32 kDa	NPE	Natriumchlorid / Pipes / EDTA
DEPC	Diethyl-pyrocbonat	nm	Nanometer
DME	Dulbecco's Modified Eagle's	P	Wahrscheinlichkeit für einen irrtümlich gefundenen Unterschied zweier Beobachtungsgruppen für die vorliegende Stichprobe
DNA	Desoxyribonukleinsäure	pA	Picoampère
DTT	Dithiothreitol	PBS	Phosphate Buffered Solution
EC	Extrazellulär-	PCR	Polymerase Chain Reaction
EDTA	Ethylen-diamin-tetraessigsäure	PFA	para-Formaldehyd
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure	PG	Prostaglandin
eNaK	endokriner Natriumkanal	Pipes	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
ER	endoplasmatisches Retikulum	PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
FKS	Fötales Kälberserum	PKC	Ca ²⁺ -abhängige Proteinkinase
× g	Erdbeschleunigung	PNS	peripheres Nervensystem
GnRH	Gonadotropin-Releasinghormon	RNA	Ribonukleinsäure
GZ	Granulosazellen	R.T.	Raumtemperatur
GLZ	Granulosaluteinzellen	RT	Reverse Transkription
hCG	humanes Chorion-Gonadotropin	S	Svedberg (10 ⁻¹³ s)
Hepes	N-2-hydroxypiperazin-N'-ethansulfonsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
Hz	Hertz (1 / s)	SSC	Saline Sodium Citrate
I/V-	Strom-Spannungs-(Kennlinie)	TBE	Tris / Borat / EDTA
IC ₅₀	Konzentration bei halbmaximaler Hemmung	TEA	Tetraethylammonium
I _{NaP}	persistierender Natriumstrom	TLZ	Thekaluteinzellen
I _{NaT}	transienter Natriumstrom	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
IU	internationale Einheit Enzymakt.	TTX	Tetrodotoxin
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-Galaktopyranosid	U/min	Umdrehungen pro Minute
IVF	In vitro Fertilisation	Va	Veratridin
		ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Das Weiterbestehen einer Art hängt entscheidend vom Funktionieren der Fortpflanzung ab. Charakteristisch für die sexuelle Fortpflanzung ist die Bereitstellung und Verschmelzung von Gameten, wofür sich hauptsächlich zwei Strategien bewährt haben: Bei vielen niederen Spezies werden sie in großen Mengen produziert, um die geringe Wahrscheinlichkeit ihres Zusammentreffens bei der extrakorporalen Befruchtung auszugleichen. Im Gegensatz dazu haben sich mit zunehmendem Organisationsgrad Organe und Regulationssysteme entwickelt, die eine viel genauere Steuerung der Gametenproduktion zulassen und meist mit einer intrakorporalen Befruchtung und Embryonalentwicklung verbunden sind.

Beim Menschen sind 10-15% der Partnerschaften von ungewollter Kinderlosigkeit betroffen, deren Ursachen auf beide Geschlechter nahezu gleich verteilt sind. Die Ursachen von Fertilitätsstörungen bei Frauen sind zu ungefähr 30% unbekannt. Um Strategien zur Behandlung entwickeln zu können, ist eine genaue Aufklärung der Vorgänge im weiblichen Reproduktionszyklus notwendig.

1.1 Regulation der Ovarfunktion

1.1.1 *Beteiligte Komponenten*

Die Funktion der Gonaden beim Säuger, einschließlich Mann und Frau, wird hauptsächlich durch die hypophysären Gonadotropine LH (luteinisierendes Hormon) und FSH (follikelstimulierendes Hormon) gesteuert. Im Körper der geschlechtsreifen Frau lösen die Gonadotropine zyklische Veränderungen in Morphologie und Funktion des Reproduktionstraktes aus. FSH induziert im Ovar die Reifung eines Follikels (Follikelphase), der durch seine Produktion von Östrogenen eine kurzzeitige hohe Ausschüttung von FSH und LH zur Zyklusmitte bewirkt. LH löst die Ovulation aus und führt zur Bildung des Corpus luteum (CL, Gelbkörper), welches in der zweiten Zyklushälfte (Lutealphase) für die Produktion von Progesteron verantwortlich ist. Progesteron bewirkt Veränderungen in der Sekretion des zuvor unter Östrogeneinfluß zur Proliferation angeregten Endometriums und bereitet eine mögliche Nidation vor. Während der Progesteronspiegel sinkt, kommt es zu regressiven Veränderungen des CL und zur Abstoßung des Endometriums. Auf diese Weise sind Hormon- und Menstruationszyklus gekoppelt. Ausführliche Informationen finden sich in [1;55;81].

1.1.2 Hypothalamus / Hypophyse

Die Ausschüttung von LH und FSH durch Zellen der Adenohypophyse steht unter der Kontrolle von GnRH (Gonadotropin-Releasinghormon). Es wird von hypothalamischen Neuronen pulsatil in das Portalgefäßsystem der Hypophyse freigesetzt, was synchrone Pulse von LH und FSH zur Folge hat. Die Freisetzung von LH / FSH ist zyklusabhängig: Während der Follikelphase beträgt ihre Frequenz ca. 1 / h mit zunächst niedriger Amplitude. Diese nimmt dann aufgrund der steigenden Konzentration von Östradiol im Laufe der Follikelreifung zu. In der Lutealphase bewirkt Progesteron eine Abnahme der Frequenz des hypothalamischen Pulsgebers, während die Amplitude erhöht bleibt.

Nur bei optimaler Steuerung der pulsatilen Freisetzung von GnRH kommt es zu einer synchronen Ausschüttung von LH / FSH in der Hypophyse. Bei veränderter Frequenz oder konstanter GnRH-Freisetzung erlischt die Sekretion von Gonadotropinen. Die Aktivität der dem hypothalamischen GnRH-Pulsgenerator zugrundeliegenden Neurone wird durch höhere ZNS-Zentren gesteuert und durch interne und externe Signale moduliert. Hierbei spielen vor allem Rückkopplungsmechanismen durch die ovariellen Steroidhormone eine Rolle (Abb. 1-1).

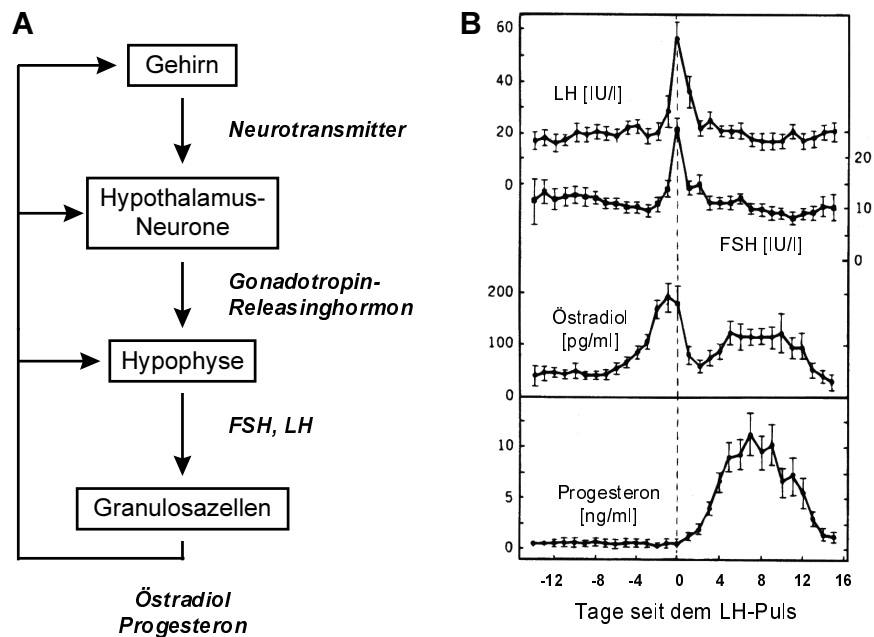


Abb. 1-1: (A) Die Regulation der Ovarfunktion über die Freisetzung der Gonadotropine FSH und LH wird wiederum durch Gehirn und Hypophyse gesteuert. Eine Rückkopplung erfolgt durch die ovariellen Steroidhormone Östradiol und Progesteron, nach [55]. (B) Konzentrationen von LH, FSH, Östradiol und Progesteron im Blut während eines normalen Zyklus. Dargestellt sind die täglichen Mittelwerte von 9 Frauen, nach [1].

1.1.3 *Synthese von Steroidhormonen*

Morphologisch sind steroidproduzierende Zellen durch eine hohe Dichte von Mitochondrien und glattem ER (endoplasmatisches Retikulum) gekennzeichnet, an denen wichtige Enzyme der Steroidsynthese lokalisiert sind; Lipidtröpfchen stellen Speicher für das Ausgangsmolekül Cholesterin dar. Bei Bedarf wird es von dort aus Cholesterinestern freigesetzt, durch rezeptorvermittelte Lipoprotein-Aufnahme aus dem Blut aufgenommen oder in den steroidproduzierenden Zellen neu synthetisiert. StAR (steroidogenic acute regulated protein) vermittelt die Cholesterin-Translokation vom Zytoplasma zur inneren Mitochondrienmembran. Hier katalysiert P450scc (Cholesterin-Monooxygenase, side-chain cleavage enzyme) die Bildung von Pregnenolon durch Abspaltung eines C6-Körpers. Im Zytoplasma entsteht durch die Aktivität von 3β-HSD (3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase) Progesteron, das Hauptprodukt der Granulosaluteinzellen im CL.

Der charakteristische Schritt bei der Bildung von Östrogenen ist die Aromatisierung des A-Ringes durch P450arom (Aromatase), wobei Androgene (Androstendion, Testosteron) als Prohormone dienen. Diese werden aus Progesteron durch P450c17 (17α-Monooxygenase) und C17,20-Lyase (Hydroxyprogesteron-Aldolase) gebildet.

Einige wichtige Enzyme der Steroidsynthese sind zyklusabhängig oder in verschiedenen Zelltypen aktiv. Für die Östrogensynthese ist z.B. das Zusammenwirken von Theka- und Granulosazellen erforderlich (Abb. 1-2).

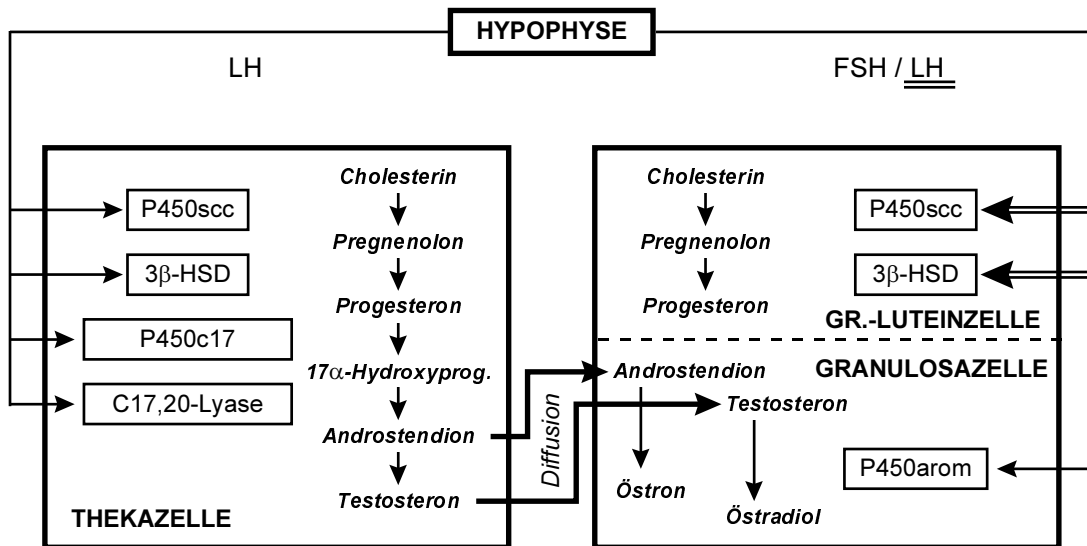


Abb. 1-2: "Zwei Zell / zwei Gonadotropin - Hypothese" der Steroidproduktion im Ovar, nach [55]. Während der Follikelphase wird in Thekazellen durch LH die Synthese von Androgenen angeregt, die zu den Granulosazellen diffundieren und durch die hier exprimierte Aromatase in Östrogene umgewandelt werden, stimuliert durch FSH. In der Lutealphase produzieren Granulosazellen aufgrund der Expression zusätzlicher Enzyme große Mengen Progesteron.

1.1.4 *Aufbau des Ovars*

Die paarigen, mandelförmigen Ovarien liegen im Bauchraum am oberen Rand des kleinen Beckens und sind jeweils über das bandartige Mesovarium mit dem Uterus verbunden. Von hier aus erfolgt die Versorgung mit Gefäßen und Nerven, die am Hilum des Ovars ein- und austreten. Nach außen wird es von einem einschichtigen Epithel umgeben, welches in das Plattenepithel des Peritoneums übergeht. Die Bereiche im Inneren des Ovars sind nicht genau abgrenzbar. Im Markbereich dominieren Blutgefäße, Lymphgefäße, Nerven und Bindegewebe, während im Rindenbereich sämtliche Stadien der Follikelentwicklung zu finden sind.

1.1.5 *Follikelphase*

Die Zahl der embryonal angelegten weiblichen Keimzellen nimmt von mehreren Millionen auf ca. 400.000 zur Zeit der Geschlechtsreife ab. Aus diesem Reservoir von primären Oozyten gelangen im Lauf von ungefähr 40 Jahren nur ca. 1‰ zur Reife und Ovulation. Zunächst sind die Oozyten von einer einfachen Schicht flacher Zellen umgeben, die sich nach außen durch eine Basallamina abgrenzen und die Vorläufer der Granulosazellen (GZ) darstellen. Diese Primordialfollikel wachsen unabhängig von Gonadotropinen zu Primärfollikeln heran, wobei sich um die Oozyten ein mehrschichtiger Verband aus kubischen GZ bildet und an die Basallamina angrenzend eine innere und äußere Thekenschicht aus Stromazellen differenziert. Die Versorgung von Oozyte und GZ erfolgt durch Diffusion, da sich die von den Gefäßen im Stroma ausgehende Vaskularisierung nur bis in die Theka interna erstreckt und nicht über die Basallamina hinausgeht. Granulosazellen stehen untereinander und mit der Oozyte durch Plasmafortsätze und Gap junctions in Verbindung, so daß auch auf diese Weise ein Austausch von Nähr- und Signalstoffen möglich ist.

Die Granulosazellen bilden eine Flüssigkeit, die sich in der Follikelhöhle (Antrum) sammelt. Dadurch entstehen die antralen Sekundärfollikel, von denen sich normalerweise nur einer zum sprungreifen Graaf'schen Follikel entwickelt. Die anderen Follikel gehen durch Apoptose zugrunde (Follikelatresie). Überlebende Zellen der Theka interna können allerdings als interstitielle Drüsenzellen weiterhin endokrin aktiv sein.

Für die in der späten Follikelphase ansteigende Östrogenproduktion sind Theka- und Granulosazellen gemeinsam verantwortlich. Da Granulosazellen das Enzym C17,20-Lyase nicht besitzen, können sie keine Androgenvorstufen für die Östrogensynthese bilden und sind dabei auf die Zellen der Theka interna angewiesen. Diese produzieren, angeregt durch LH, vorwiegend Androstendion, das durch Diffusion zu den GZ gelangt. Dort wird es durch das FSH-aktivierte Enzym P450arom aromatisiert. Dieses Modell der Aufteilung von Stimulation und Synthese ist als "zwei Zell / zwei Gonadotropin-

Hypothese" bekannt (Abb. 1-2). Eine Produktion von Progesteron durch GZ findet zumindest während der frühen Follikelphase nicht statt, da die zu den ersten Schritten der Steroidsynthese notwendigen Enzyme StAR und P450scc noch nicht vorhanden sind.

Die Dichte von FSH-Rezeptoren auf den GZ nimmt beim Wachstum der antralen Follikel zu und ist im sprungreifen Follikel am höchsten. Diese Zunahme wird vermutlich durch FSH und Östradiol ausgelöst, die auch mitogen auf GZ wirken. Östradiol bewirkt eine Verstärkung der Expression seines eigenen Rezeptors und des Rezeptors für LH auf Thekazellen. Somit findet die positive Rückkopplung neben einer indirekt verstärkten Freisetzung von Gonadotropinen aus der Hypophyse auch auf der Ebene des Ovars statt. In der frühen Follikelphase wirkt Östradiol dagegen hemmend auf Hypothalamus und Hypophyse, und damit auch auf die Ausschüttung von FSH und LH.

Der rasche mittzyklische Anstieg von LH führt nach 16-20 h zur Ovulation, wobei die Oozyte mit den sie umgebenden Granulosazellen (Corona radiata) in den Bauchraum freigesetzt und vom Eileiter aufgenommen wird. Die Ruptur der Follikelwand wird vermutlich durch eine verstärkte Durchblutung des Ovars ausgelöst. Zuvor erhöht sich der intrafollikuläre Druck durch eine verstärkte Produktion von Follikelflüssigkeit.

1.1.6 Lutealphase

Die Lutealphase ist in ihrer Dauer konstanter als die Follikelphase und beträgt ca. 14 Tage. Die nach der Ovulation zurückbleibenden Granulosa- und Thekazellen spielen weiterhin eine zentrale Rolle bei der Produktion von Steroidhormonen. Unter Einwirkung von LH entsteht durch Wachstum und Differenzierung (Luteinisierung) ein temporäres, endokrin aktives Gewebe innerhalb des Ovars, das Corpus luteum. Die Gründe für seine spätere Regression (Luteolyse) zum bindegewebigen und inaktiven Corpus albicans sind noch weitgehend unklar.

Während der Bildung des CL laufen im wesentlichen folgende Prozesse ab: Luteinisierung der Zellen zu Granulosa- bzw. Thekaluteinzellen (GLZ / TLZ), Auflösung der Basalmembran und Vaskularisierung des entstehenden Gewebes.

Bei der Luteinisierung hypertrophieren die Granulosazellen, was mit einer bis zu achtfachen Volumenzunahme einhergeht [51]. Da sie nun auch selbst Steroidvorstufen herstellen, zeigen sie die typischen Merkmale steroidproduzierender Zellen: Viel glattes ER, zahlreiche Lipidtröpfchen und Mitochondrien. Die GLZ sind als große „luteale Zellen“ vorwiegend im zentralen Bereich des CL zu finden, das bei Primaten eine strukturelle Kompartimentierung entwickelt. Nach dem Kollaps des Follikels bildet seine ehemalige Wand Einfaltungen, in denen sich Teile der bisherigen, mit Gefäßen versorgten Thekaschicht befinden. Entlang dieser Septen, sowie an der Peripherie des CL, liegen die als „paraluteal“ bezeichneten TLZ. Von hier aus wandern Bindegewebszellen ein und die

Vaskularisierung der Granulosaschicht beginnt, bis das CL in der Mitte der Lutealphase zu den am höchsten durchbluteten Geweben im Körper gehört. Das CL besteht daher auch aus Endothelzellen der Kapillaren und Zellen des Immunsystems. Welche Faktoren zur Kontrolle und Aufrechterhaltung der Vaskularisierung beitragen, wird derzeit untersucht. Es kommen u.a. spezifische Wachstumsfaktoren in Frage, wie vEGF (vascular endothelial growth factor) und bFGF (basic fibroblast growth factor).

Entsprechend der morphologischen Trennung bleibt auch das Zwei-Zell-Modell der Östrogenproduktion im CL erhalten. GLZ zeigen beim Menschen und höheren Altweltaffen auch in der Lutealphase P450arom-Aktivität und ermöglichen somit die Östradiolsynthese. Durch das Fehlen von C17,20-Lyase sind sie jedoch weiterhin auf Androgenvorstufen aus den TLZ angewiesen. Die Zu- und Abnahme des Östradiolspiegels verläuft zur Synthese von Progesteron parallel, das nun überwiegend aus den GLZ stammt.

Die gesteigerte Expression der dafür benötigten Enzyme P450scc und 3β -HSD ist nicht die einzige Auswirkung des mittzyklischen LH-Pulses. Es kommt auch zu Änderungen der Freisetzung von verschiedenen Peptidhormonen. Relaxin spielt möglicherweise für die Implantation eine Rolle (zusammen mit Östradiol) oder dient als frühes Signal für eine Schwangerschaft. Inhibin wurde als Hemmer der hypophysären FSH-Freisetzung diskutiert. Wahrscheinlicher jedoch ist eine lokale Funktion im Ovar, durch die FSH- oder LH-stimulierte Prozesse, wie die Follikelentwicklung, gehemmt werden.

1.1.7 Luteolyse

Die für die Regression des Corpus luteum verantwortlichen Faktoren und Mechanismen sind nach wie vor nicht genau bekannt. Als auslösende Signalsubstanzen wurden LH, Östrogene und Prostaglandine (PG) diskutiert [81], doch ist ihre Wichtigkeit in verschiedenen Spezies nicht gleich, was mit der Anpassung an unterschiedliche reproduktionsbiologische Anforderungen zusammenhängen dürfte.

Aus der langsamer werdenden Frequenz der LH-Pulse während der mittleren und späten Lutealphase beim Menschen und Affen wurde auf eine Abnahme des trophischen Signals für die lutealen Zellen geschlossen. Aufgrund der konstant bleibenden Zykluslänge trotz künstlicher Veränderung der LH-Pulse, konnte dies jedoch nicht als Ursache der Luteolyse bestätigt werden. Auch die gänzliche Unterdrückung des LH-Signals führte nur für die entsprechende Dauer zu einem Ausbleiben der Progesteronproduktion, so daß für die Bestimmung der Lebensdauer des CL interne oder lokal auf das Ovar beschränkte Faktoren entscheidender sein dürften. Allerdings haben sich die in Primaten durch luteale Zellen produzierten Östrogene als Mediatoren eines selbstzerstörenden Prozesses als fraglich erwiesen [81].

PGF_{2α} ist in vielen Nichtprimaten bei ausbleibender Implantation ein vom Uterus abgegebenes luteolytisches Signal. Möglicherweise wirkt es bei Primaten in der späten Lutealphase ähnlich, wo es durch das CL selbst produziert wird. Obwohl durch PGF_{2α} die experimentelle Induktion der Luteolyse möglich ist, reagieren große und kleine Lutealzellen in der frühen Phase auf andere PG mit einer verstärkten Produktion von Progesteron. Während der CL-Entwicklung kommt es also zu einer Verschiebung der Empfindlichkeit für unterschiedliche PG. Stickstoffmonoxid (NO) spielt als lokaler Faktor möglicherweise ebenfalls eine Rolle bei der Luteolyse. Humane GZ exprimieren die endotheliale NO-Synthase und NO-Donoren vermindern die Progesteronproduktion [87].

In der späten Lutealphase kann die Progesteronproduktion nur noch in großen Lutealzellen durch LH / CG stimuliert werden. Vermutlich wird hierüber die Erhaltung des CL bei einer beginnenden Schwangerschaft gesteuert. Die Veränderung des Zahlenverhältnisses zugunsten der kleinen Lutealzellen im Verlauf der zyklischen CL-Entwicklung kann durch einen Verlust großer Zellen erklären werden, die zu kleinen dedifferenzieren. Dabei spielt vermutlich neben der Reduktion des Zellvolumens auch die Eliminierung von Zellen durch zytotoxische Faktoren oder Apoptose eine Rolle, insbesondere in Nichtprimaten wie der Ratte [31;68]. Hierbei haben die Zellen des Immunsystems nicht nur Lutealzellen, sondern auch Endothelzellen des dichten Kapillarnetzes im CL zum Ziel [20]. In der Tat wurde Apoptose von Endothelzellen im CL beobachtet, und die Steuerung der vaskulären Entwicklung und Degeneration steht mit der Luteolyse in Zusammenhang [26], möglicherweise über die dadurch bedingte variable Verfügbarkeit von Gonadotropinen für das CL [92]. Auch beim Menschen wurde eine Beteiligung von Makrophagen, als hauptsächlichen Immunzellen im CL, an der Steuerung von Steroidproduktion, Angiogenese und Luteolyse vermutet. Widersprüchliche Resultate ergaben sich dabei aus der Verwendung von zellulären Markern, die nicht nur in Makrophagen, sondern auch in anderen Zellen des CL präsent sind, beispielsweise CD68 in GZ [50].

Inwiefern bei höheren Primaten die Apoptose von lutealen Zellen stattfindet, ist unklar. Sowohl positive als auch negative Marker und Hinweise wurden gefunden, wie Fas, BAX, bcl-2 oder DNA-Fragmentierung [21;60;63;64;90;91]. Auch über das Auftreten einer von Apoptose abweichenden Form der zellulären Regression im CL von Primaten wurde berichtet [22]. Entlang der Septen, sowie an der Peripherie des CL, liegen die auch als „paraluteal“ bezeichneten TLZ. Neben diesen beiden Zellpopulationen besteht das CL aus nichtlutealen Zellen, z.B. den Endothelzellen der Kapillaren oder Zellen des Immunsystems, deren Bedeutung für den Verlauf der Entwicklung des CL noch unklar sind. Als Quelle oder Ziel lokal wirkender Faktoren könnten sie an der Strukturbildung oder Regression beteiligt sein.

1.2 Spannungsaktivierte Na⁺-Kanäle

1.2.1 Struktur und Funktion

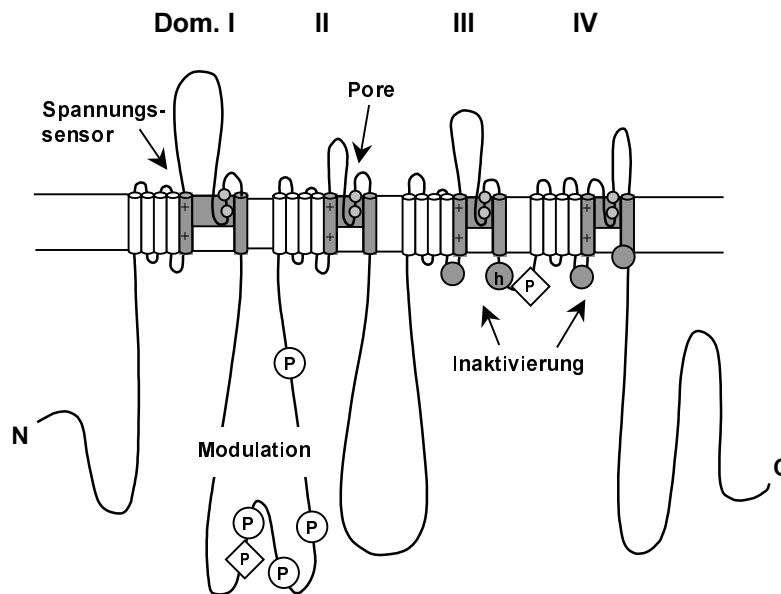


Abb. 1-3: Schematische Darstellung der Struktur spannungsaktivierter Na⁺-Kanäle, bestehend aus vier homologen Domänen mit je sechs α -helikalen Transmembransegmenten S1-S6 (Zylinder). Die wichtigsten Bereiche für die Kanalfunktion sind markiert. Phosphorylierung durch Proteinkinase A (P, Kreis) und C (P, Raute); Inaktivierungsschleife (h) und -rezeptor (ausgefüllte Kreise); Spannungssensor in S4 (+) und Kanalpore mit TTX-Interaktionsstellen (grau).

Die Untersuchung der Funktionsweise des Nervensystems führte zur Entdeckung der Erregbarkeit von Neuronen. Als Grundlage von Aktionspotentialen nach dem „Alles-oder-nichts“ Prinzip wurden die spannungsaktivierten Na⁺- und K⁺-Kanäle identifiziert. Die Isolierung der 260-270 kDa (Kilodalton) schweren α -Untereinheit des Na⁺-Kanals gelang über die Bindung spezifischer Toxine und war Ausgangspunkt für die Aufklärung seiner molekularen Struktur und Funktion [8]. Die meisten Eigenschaften des Kanals werden durch die α -Untereinheit bestimmt, z.B. Ionenselektivität und Spannungsabhängigkeit, während die beiden β -Untereinheiten (30-35 kDa) bei der Kinetik des Öffnens und Schließens und der Lokalisation in der Membran eine Rolle spielen.

Nach Isolierung der cDNA (komplementäre DNA) ließ sich aus der primären Aminosäuresequenz recht genau die Anordnung funktioneller Bereiche des Proteins vorhersagen (Abb. 1-3). Die vier homologen Domänen (I-IV) bestehen wiederum aus sechs α -helikalen Transmembransegmenten (S1-S6). Die Struktur der Domänen stellt einen Grundbaustein von Kationenkanälen dar und ist in K⁺- und Ca²⁺-Kanälen zu finden, die durch cAMP / cGMP, Ca²⁺ oder das Membranpotential gesteuert werden [9].

Am Aufbau der Kanalpore sind die Segmente S5 und S6, sowie ein Teil der dazwischenliegenden extrazellulären Schleife beteiligt. Dieser stellt den äußeren Teil der Pore dar und beinhaltet das Selektivitätsfilter für Na⁺-Ionen und die Bindungsstelle für TTX

(Tetrodotoxin) [72]. Die Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung wird durch Ladungsverschiebungen im elektrischen Feld der Membran bewirkt. Im Segment S4 jeder Domäne befinden sich mehrere positiv geladene Aminosäuren, die von benachbarten negativen Ladungen stabilisiert werden. Bei Spannungsänderungen kommt es zu einer Rotation der Helix und zur Bewegung von S4 aus der Membranebene heraus, was über Konformationsänderungen zur Kanalöffnung führt [32]. Dadurch wird auch die schnelle Inaktivierung ausgelöst, die vermutlich über den Verschluss der inneren Porenöffnung durch ein charakteristisches Motiv aus 3 Aminosäuren zwischen Domäne III und IV bewirkt wird.

1.2.2 *Beeinflussung der Natriumkanal-Aktivität durch Modulatoren und Pharmaka*

Eine Modulation der Kanalaktivität durch die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) ist an vier Stellen im Bereich der intrazellulären Schleife zwischen Domäne I und II möglich. Eine Phosphorylierung führt zu verminderten Stromamplituden, ohne die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung oder Inaktivierung zu verändern [41]. In kultivierten Neuronen des Hippocampus wird dies über Dopamin-Rezeptoren vom D1-Typ und die nachfolgende Stimulation der Adenylat-Zyklase (AC) vermittelt [7]. Neben der direkten Verminderung des Peakstroms kann der cAMP / PKA-Signalweg auch zur Aktivierung von DARPP-32 (Dopamin- und cAMP-reguliertes Phosphoprotein von 32 kDa) führen, was durch die Hemmung der Proteinphosphatase 1 eine verringerte Dephosphorylierung des Na⁺-Kanals (NaK) zur Folge hat [71].

Für die Phosphorylierung durch PKC (Ca²⁺-abhängige Proteinkinase) besitzen NaK zwei Stellen: In der Nähe des Inaktivierungsmotivs führt die Phosphorylierung zu einer langsameren Inaktivierung. Die zweite Stelle ist mit einer Reduktion der Stromamplitude verbunden. Die Phosphorylierung durch PKC und eine Depolarisation der Membran verstärken den Effekt der PKA-Phosphorylierung. Die Konvergenz dieser drei Signale erlaubt vermutlich eine Feinjustierung des neuronalen Antwortverhaltens, beispielsweise ihre allgemeine Erregbarkeit.

Die pharmakologische Beeinflussung von NaK durch Lokalanästhetika, Antiarrhythmika oder Antikonvulsiva erfolgt über spezifische Bindungsstellen, deren Lokalisation am Kanalprotein entscheidet, ob eine Substanz bevorzugt an Kanäle in bestimmten Öffnungszuständen bindet oder eine frequenz- oder spannungsabhängige Hemmung stattfindet [83].

1.2.3 *Isoformen und Regulation der Expression*

Aus verschiedenen Zellen und Geweben von Säugern wurden bisher über 30 cDNA-Sequenzen der α -Untereinheit des spannungsaktivierten Na⁺-Kanals isoliert. Sie lassen

sich in zehn Isoformen einteilen, deren Bezeichnung inzwischen vereinheitlicht wurde [29]. Demnach lassen sich drei Gruppen ausmachen, die sich in Bezug auf die Anzahl der geladenen Aminosäuren im spannungssensitiven Segment S4 und in der Sequenz der Inaktivierungsschleife unterscheiden.

Die Gene der Isoformen konnten vier paralogen Chromosomensegmenten zugeordnet werden, was Rückschlüsse auf ihre Evolution durch verschiedene Duplikationsereignisse erlaubt [56]. Beim Menschen beinhaltet die Region 2q22 fünf Gene, von denen drei eng verwandt sind und vorwiegend in Neuronen des ZNS exprimiert werden (SCN1A, 2A, 3A). Die beiden anderen (SCN7A, 9A) kommen funktionell im peripheren Nervensystem (PNS), Gliazellen und neuroendokrinen Zellen vor. Die Gene SCN5A, 10A und 11A liegen in Region 3p21 und codieren für Kanäle mit geringer TTX-Sensitivität. Sie werden vorwiegend im Herzmuskel, in sensiblen Neuronen der Spinalganglien und dem PNS exprimiert. Auf den Chromosomen 12 und 17 liegen SCN8A (vorwiegend ZNS) und 4A (Skelettmuskel).

Die Intron / Exon - Struktur ist für vier Gene bekannt und im Bereich der hoch konservierten vier Domänen identisch. Die Aminosäuresequenzen stimmen hier zu 70 bis 95% überein, gegenüber weniger als 50% im Bereich der beiden großen intrazellulären Schleifen zwischen den Domänen I/II und II/III. Hier spiegeln sich eventuell unterschiedliche zytoplasmatische Interaktionsstellen wieder, die für spezifische Eigenschaften der verschiedenen Isoformen verantwortlich sein könnten. Daß die Schleifen funktionell von Bedeutung sind, legt die hohe Sequenzhomologie von teilweise über 95% zwischen den orthologen Genen verschiedener Spezies nahe [56].

Alternatives Splicing bei SCN1, 2, 3, 8 und 9A ist für zwei Isoformen entwicklungsabhängig, mit einer neonatalen und einer adulten Form, und betrifft die Segmente S3 und S4 der Domäne I (Exon 5) bzw. S3 und S4 von Domäne III (Exon 18). Die neonatale Form von Exon 18 enthält ein Stop-Codon und wurde u.a. aus Astrozyten isoliert [54]; die Funktion dieser und anderer Aminosäureunterschiede ist unbekannt.

Mutationen als Ursache erblicher Krankheiten wurden bisher nur für NaK-Gene nachgewiesen, die in Muskeln exprimiert werden, z.B. beim "long QT" Syndrom Typ 3. Dabei kommt es meist zu einer verminderten Inaktivierung und zur Ausbildung übermäßiger Erregbarkeit, wofür bereits ein Anteil nicht-inaktivierender Kanäle von wenigen Prozent ausreicht.

Das Expressionsmuster verschiedener NaK-Typen in bestimmten Zellen und Geweben ist nicht statisch und variiert je nach den physiologischen Anforderungen. Dies könnte durch die Entwicklung typspezifischer Agonisten oder Antagonisten künftig gezieltere Therapien ermöglichen. Eine positive Regulation der NaK-Expression durch Zunahme der Osmolarität des Blutes wurde in neurosekretorischen Zellen des supraoptischen Kerns

gefunden [89]. Axotomierte Neurone verändern die Transkription verschiedener NaK-Gene unterschiedlich, was sich auch elektrophysiologisch nachweisen läßt.

Die Expression von NaK in Astrozyten steht möglicherweise unter der Kontrolle von löslichen Faktoren, die lokal von Neuronen freigesetzt werden [77]. Eine Abnahme wurde sowohl bei Isolation der Astrozyten (Retina) als auch durch die Kokultivierung mit Neuronen (Rückenmark) beobachtet [84]. Die erhöhte NaK-Expression in Astrozyten bestimmter Epilepsie-Patienten könnte im mangelnden Kontakt zu Neuronen begründet sein.

Eine Verletzung von Astrozyten führt zu einem "Umschalten" der Expression von zunächst TTX-sensitiven auf TTX-resistente NaK [44]. Dies deckt sich mit dem häufigen Vorkommen TTX-resistenter NaK in dedifferenzierten Zelltypen und wurde auch in Muskeln und Neuronen gefunden.

1.2.4 Funktion in nicht erregbaren Zellen

Der Nachweis von spannungsaktivierten Ionenkanälen in Gliazellen [12;45] war überraschend zu einer Zeit, in der die fehlende Erregbarkeit von Zellen mit einem Fehlen der den Aktionspotentialen zugrundeliegenden Kanäle assoziiert wurde. Obwohl unter bestimmten Bedingungen die Ausbildung von aktionspotentialähnlichen Zellantworten möglich ist, sind Gliazellen sehr wahrscheinlich aus folgenden Gründen nicht erregbar [77]: Die Dichte der NaK ist mit 0,1 bis 10 Kanälen pro μm^2 Membranfläche ungefähr 100- bis 1000-fach geringer als in Neuronen, gleichzeitig ist die K^+ -Leitfähigkeit sehr hoch. Außerdem sind die Zellen oft über Gap junctions miteinander gekoppelt, was größere oder schnelle Änderungen des Membranpotentials durch einen Kurzschlußeffekt verhindert.

An Ranvier'schen Schnürringen ist die Dichte von NaK nicht nur in der neuronalen Membran am höchsten, sondern auch in den direkt benachbarten glialen Fortsätzen. Dies führte zu der Hypothese, daß Gliazellen hier als lokale Quelle für NaK fungieren, und sie auf Axone übertragen könnten [62].

Es wurde auch vorgeschlagen, daß lokal konzentrierte NaK in elektrisch isolierten Gliafortsätzen über die Aktivität benachbarter Neurone und die dadurch ansteigende extrazelluläre K^+ -Konzentration aktiviert werden können [77]. Die Erregbarkeit der Neurone käme ohne die homöostatische Funktion der Gliazellen zum Erliegen: Die Aktivität ihrer Na^+/K^+ -ATPase sorgt für eine Entfernung von extrazellulär akkumuliertem Kalium [74], dessen Konzentration durch hohe neuronale Aktivität schnell ansteigen kann. Auch Neurotransmitter wie Glutamat werden aus dem Extrazellulärraum mit Hilfe des Na^+ -Gradienten entfernt. Daher steht der gliale Na^+ -Haushalt indirekt mit der neuronalen synaptischen Transmission in Verbindung. Die Na^+/K^+ -ATPase arbeitet nur bei einer

genügend hohen intrazellulären Na^+ -Konzentration. Über spannungsaktivierte NaK könnten Na^+ -Ionen nachgeliefert werden, was entweder durch eine Depolarisation (s.o.) oder durch NaK geschehen kann, die auch unter Ruhebedingungen aktiv sind, d.h. einen persistierenden Na^+ -Strom vermitteln (s. 1.2.5). In der Tat wurden Hinweise auf einen solchen Strom gefunden [78]: Kultivierte Astrozyten hyperpolarisieren bei der Applikation von TTX oder bei Entfernung des extrazellulären Na^+ . Dagegen konnte eine Änderung der intrazellulären Na^+ -Konzentration durch TTX bei einem anderen Astrozyten-Präparat nicht bestätigt werden [67].

In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung interessant, daß die Kopplung von Astrozyten über Gap junctions zu einem Austausch von Na^+ -Ionen und damit zu einer Angleichung der intrazellulären Na^+ -Konzentration führt [66]. Auf diese Weise werden Na^+ -abhängige Reaktionen der Zellen, wie die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase, koordiniert.

Möglicherweise stellt also die intrazelluläre Konzentration von Na^+ ein ähnliches, langsam veränderliches Signal dar wie Ca^{2+} . Eine Kopplung beider Parameter ist durch den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher möglich, der den großen, einwärts gerichteten Na^+ -Gradienten normalerweise zum Herausbefördern von Ca^{2+} -Ionen nutzt (s. Übersicht in [83]). Bei einer hohen intrazellulären Na^+ -Konzentration kommt dieser Prozeß zum Erliegen oder kehrt sich sogar um. Möglicherweise wird also die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration indirekt über Na^+ reguliert. Eine bislang nicht reproduzierte direkte Verknüpfung von Na^+ und Ca^{2+} -Einstrom stellt die "slip-mode" Leitfähigkeit spannungsaktivierter NaK dar, bei der die Permeabilitäten von Ca^{2+} und Na^+ bis zu 1:1 betragen sollen [70].

Auf einen Zusammenhang zwischen den Konzentrationsgradienten für Na^+ und K^+ über die Membran von Zellen im CL und der Steroidproduktion wurde aufgrund von Experimenten mit Ratten geschlossen, die mit TEA und TTX behandelt wurden [93]. In anderen nichthumanen Spezies wurden Calcium-, Kalium- und Chloridkanälen gefunden, die teilweise unter dem Einfluß von LH/CG, muskarinergen Rezeptoren oder der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration stehen [11;59;88].

1.2.5 Persistierender Natriumstrom

Sowenig wie die Expression spannungsaktivierter NaK auf erregbare Zellen beschränkt ist, liegt auch die Aufgabe dieser Kanäle wohl nicht allein in der Generierung schneller elektrischer Signale zur Informationsweitergabe. Neben dem innerhalb von Millisekunden nach der Kanalöffnung inaktivierenden, *transienten* Na^+ -Strom I_{NaT} wurde in vielen Zellen ein ebenfalls spannungsabhängiger, jedoch nicht inaktivierender, *persistierender* Strom I_{NaP} gefunden [13]. In Cortexneuronen aktivierte I_{NaP} unterhalb der Schwelle und war sensitiv für TTX, jedoch nicht für Ba^{2+} - oder Co^{2+} , die Calciumkanäle blockieren [79]. Die halbmaximale Aktivierung des I_{NaP} liegt in vielen Präparaten bei -50 mV, generell scheint

sie ungefähr 10 mV negativer zu liegen als für I_{NaT} . Eine mögliche Funktion von I_{NaP} in erregbaren Zellen wird in einem Verstärkungseffekt ansonsten unterschwelliger Reize durch ein positiveres Ruhepotential gesehen [89]; in Dendriten würde I_{NaP} dadurch zu einer verbesserten Weiterleitung postsynaptischer Potentiale beitragen.

Für das Zustandekommen des I_{NaP} wurden bisher drei mögliche Mechanismen diskutiert [13]: Die "window current" Hypothese auf der Basis des Hodgkin-Huxley Modells, ein veränderliches Öffnungsverhalten des normalerweise transient aktiven Na^+ -Kanals, und die Existenz eines eigenen, nicht inaktivierenden Na^+ -Kanaltyps.

Die Überlagerung der Kurven für die Wahrscheinlichkeiten, daß ein NaK nicht inaktiviert ist bzw. aktiviert ist, läßt im Überlappungsbereich zumindest theoretisch einen permanenten Strom erwarten, dessen Amplitude proportional zum Produkt beider Wahrscheinlichkeiten ist [52]. Dieser "window current" hängt im wesentlichen davon ab, bei welchen Potentialen die halbmaximalen Ströme der Aktivierung und der Inaktivierung (V_{50}) liegen. Je näher die Werte beieinanderliegen, desto größer ist der Überlappungsbereich. Liegt die Inaktivierungskurve bei sehr positiven Potentialen, wird die Überlappung so groß, daß I_{NaP} durch Pulsprotokolle zur Messung der Aktivierung deutlich erkennbar wird [15].

Eine mögliche Entstehung des I_{NaP} durch wechselndes Öffnungsverhalten des transienten NaK wurde durch Einzelkanalmessungen gezeigt [3]. Dabei zeigten sich nach aktivierenden Spannungspulsen neben den frühen und schnell inaktivierenden Kanalöffnungen zwei weitere Öffnungsmodi. Sie führten zu spät auftretenden "bursts" und über die gesamte Depolarisation andauernden Öffnungen. Alle drei Modi zeigten dieselben Leitfähigkeiten, was als Hinweis gewertet wurde, daß ihnen ein und dieselbe Population von NaK zugrundelag. Die meist negativere Inaktivierung von I_{NaP} gegenüber I_{NaT} wurde zwar als Argument für einen eigenen NaK-Subtyp gesehen, jedoch durch die Beobachtung abgeschwächt, daß eine Entfernung der für die Inaktivierung verantwortlichen Struktur eine ebenso negative Potentialabhängigkeit bei I_{NaT} bewirkt [6]. Gleiches gilt für die pharmakologische Ausschaltung der Inaktivierung.

In Nervenendigungen und Herzmuskelzellen induziert NO unabhängig von cGMP einen I_{NaP} , der durch lang anhaltende Kanalöffnungen verursacht wird [2]. Dies war auch durch die Aktivierung einer endogenen NO-Synthase möglich.

Die Koexpression des Orthologs von SCN2A der Ratte mit β/γ -Untereinheiten von G-Proteinen induzierte einen I_{NaP} mit normaler Aktivierung, aber langsamer und unvollständiger Inaktivierung [43]. Da der Effekt von β_2/γ_3 durch Peptide aufgehoben wurde, die das β/γ -Bindemotiv Gln-X-X-Glu-Arg besaßen, wurde auf eine direkte Interaktion von β/γ mit dem im C-Terminus des NaK ebenfalls vorkommenden Motiv geschlossen.

In kortikalen Neuronen moduliert die Aktivierung D1-artiger Rezeptoren einen durch Spannungsrampen ausgelösten I_{NaP} derart, daß er bei Potentialen negativer als -40 mV verstärkt und darüber gehemmt wird [30]. Carbachol als Agonist muskarinischer Acetyl-

cholin-Rezeptoren in Neuronen vermindert die Amplitude von I_{NaP} und I_{NaT} gleichermaßen, ohne die Spannungsabhängigkeit zu beeinflussen [49]. Dagegen wird die bevorzugte Inhibition von I_{NaP} durch Phenytoin offenbar über eine selektive Hemmung später Kanalöffnungen bewirkt [10;73].

1.3 Zielsetzung

Der weibliche Reproduktionszyklus beim Menschen und anderen Säugern kommt durch das Zusammenspiel von Gehirn, Hypophyse und Ovar zustande. Die Freisetzung von Steroidhormonen durch wachsende Follikel und nach der Ovulation durch das Corpus luteum, ist dabei ein wichtiger Schrittmacher. Der Beginn eines neuen Zyklus wird durch die Lebensdauer des Corpus luteum bestimmt, doch sind die dafür verantwortlichen Mechanismen wenig bekannt. Lokale Faktoren im Ovar spielen dabei vermutlich eine wichtige Rolle, u.a. eine Reihe von Neurotransmittern. Die mögliche Bedeutung von Ionenkanälen für die Funktion des Corpus luteum blieb dagegen bisher weitgehend unbeachtet.

Diese Arbeit hatte daher zunächst die Identifikation von Ionenkanälen in Granulosazellen und dem Corpus luteum zum Ziel. Die erstmals in diesen Zellen gefundenen spannungsaktivierten Natriumkanäle sollten mit elektrophysiologischen und molekularbiologischen Techniken näher charakterisiert werden. Ihre Bedeutung für die Funktion des Corpus luteum wurde durch die pharmakologische Beeinflussung der Kanalaktivität untersucht. Gleichzeitig wurde nach Mechanismen zur Regulation der Expression und Aktivierung der Kanäle gesucht.

2 Material

2.1 Herstellerverzeichnis

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Kits und Geräte wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Life Science Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig	Merck KGaA, Darmstadt
Appligene Oncor, Heidelberg	MJ Research, Watertown, USA
Bachofer GmbH, Reutlingen	MWG-Biotech AG, Ebersberg
Beckman München	NEN Life Science Products Inc., Boston, Massachusetts, USA
Biorad, München	Newport GmbH, Darmstadt
Biochem Immunosystems, Freiburg	Novodirect GmbH, Kehl / Rhein
Biozym Diagnostic GmbH, Hess. Oldendorf	NUNC, Wiesbaden
Canberra Packard, Dreieich	PeQLAB, Erlangen
Dr. Hielscher GmbH, Stahnsdorf	Pharmacia Biotech, Freiburg
Ingenieurbüro Elmar Engel, Augsburg	Pierce, Köln
Eppendorf - Netheler - Hinz GmbH, Köln	Promega, Mannheim
GibcoBRL Life technologies GmbH, Karlsruhe	Qiagen, Hilden
HEKA elektronik Dr.-Ing. P. Schulze GmbH, Lambrecht / Pfalz	Roche Diagnostics, Mannheim
Heto-Holten A/S, Allerød, Dänemark	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hybaid Limited, Middlesex, Großbritannien	Science Products GmbH, Hofheim
Invitrogen, DeSchelp, Niederlande	Sigma, Deisenhofen
Kindler, Freiburg	Stratagene, Heidelberg
Lorenz Meßgerätebau, Katlenburg-Lindau	TopLab, Martinsried
	TSE Technical & Scientific Equipment GmbH, Bad Homburg
	Zeiss Jena GmbH, München

2.2 Verwendete Lösungen

Zusammensetzung wichtiger Lösungen:

H₂O wurde zweifach destilliert verwendet. Alle Zahlenangaben sind in der Einheit mM, sofern nicht anders angegeben. Prozentangaben entsprechen Gewichtsprozent.

PBS (10 mM, 1 l): 0,386 g NaH₂PO₄ × H₂O; 1,282 g Na₂HPO₄ × 2 H₂O; 8,776 g NaCl; pH 7,4

Extrazelluläre Lösung: 140 NaCl; 3 KCl; 1 CaCl₂; 10 Hepes; 10 Glucose; pH 7,4 (NaOH)

Intrazelluläre Lösung (K⁺-Ströme): 140 KCl; 10 Hepes; 5 EGTA; 1 CaCl₂; 1 MgCl₂; pH 7,4 (KOH)

Intrazelluläre Lösung (Na⁺-Ströme): 120 CsCl; 20 TEA-Cl; 5 EGTA; 0,5 CaCl₂; 1 MgCl₂; 10 Hepes; pH 7,4 (CsOH)

NPE: 150 NaCl; 10 Pipes; 1 EDTA; pH 7,2

Probenpuffer (1×): 62,5 Tris; 2% SDS; 10% Saccharose, pH 6,8

DEPC-H₂O: 500 µl DEPC in 1 l H₂O über Nacht rühren lassen

DNA / RNA-Auftragspuffer (6×): 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 40% Saccharose

TBE-Puffer (5×, 1 l): 54 g Tris; 27,5 g Borsäure; 20 ml 0,5 M EDTA; pH 8,0

LB-Medium: 1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt 0,5% NaCl

LB-Agarplatten: LB-Medium mit 1,5% Agar (GibcoBRL); Ampicillin (50 µg/ml), 50 µl X-Gal (50 mg/ml in N,N,-Dimethylformamid, Sigma); 20 µl IPTG (100 mM)

MOPS (5×, 2 l): 83,72 g Mops; 13,68 g Natriumacetat; 2,92 g EDTA

Denaturierungs-Puffer: 65% deionisiertes Formamid, 22% Formaldehyd (37%) und 13% 5× MOPS

RNA-Auftragspuffer: 0,4% Bromphenolblau; 1 EDTA; 50% Glycerin

SSC (20×, 5 l): 876,5 g NaCl; 441,0 g Na-Citrat; pH 7,0

3 Methoden

3.1 Zellkultur (humane Granulosazellen)

Zum Anlegen einer Primärkultur aus menschlichen Granulosazellen wurden diese aus Follikelflüssigkeit isoliert, die vom Labor für IVF (In vitro Fertilisation; Prof. Dr. Frank D. Berg) der Universität München zur Verfügung gestellt wurde. Gegen die Kultivierung und experimentelle Verwendung der Zellen im Rahmen dieser Arbeit und einem laufenden Drittmittelprojekt gab es seitens der Ethikkommission der Universität München keine Einwände. Die betroffenen Frauen gaben ihr schriftliches Einverständnis dazu. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte innerhalb von 2 bis 5 Stunden nach ihrer Gewinnung. Durchschnittlich ergaben sich ca. 100 ml Flüssigkeit aus 3 Punktionen, dies schwankte jedoch stark. Je nach weiterem Verwendungszweck wurden die Zellen auf Falcon Kulturschalen (NUNC) von 35 oder 60 mm Durchmesser für Stimulationsexperimente mit der anschließenden Ernte von zellulärer RNA, Progesteron oder Protein, oder auf Deckgläsern (\varnothing 12 mm, Kindler) für Patch-clamp Experimente bis zu 12 Tage in Kultur gehalten.

3.1.1 Vorbereitung der Kulturschalen

Um zu vermeiden, daß die humanen GZ bereits nach wenigen Tagen eine für Patch-clamp Experimente ungünstige flache Form annahmen, war neben einer ausreichend hohen Dichte beim Aussäen auch die Beschichtung der Kulturträger-Oberfläche mit Laminin notwendig. Die Kulturschalen wurden hierzu mit 1 ml bzw. 3 ml Lamininlösung gefüllt (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, in sterilem H_2O), was ca. 0,5 μg Laminin pro cm^2 entspricht. Zur Beschichtung der Deckgläschen wurden zunächst auf 60 mm-Petrischalen 4-5 Tropfen Lamininlösung zu je 25 μl aufgebracht. Dann wurden die Gläschen in Aceton getaucht, abgeflammt, und auf je einen Tropfen gelegt. Die Schalen wurden über Nacht im Kühlschrank belassen und die Gläschen am nächsten Tag 3 mal mit sterilem H_2O gespült und getrocknet.

3.1.2 Präparation/Isolierung

Um interindividuelle Schwankungen möglichst auszugleichen, wurden die Flüssigkeiten zunächst zusammengeführt, gemischt und eventuelle Zellaggregate mit einer 10 ml Spritze mit Kanüle durch auf- und abziehen homogenisiert. Das Gesamtpunktat wurde zu je 6 ml pro Röhrchen verteilt und je 5 ml F12 / DME Medium (Ham's F12 und Dulbecco's Modified Eagle's Medium im Verhältnis 1:1) ohne FKS (fötales Kälberserum) zugesetzt. Nach Mischen und Zentrifugation für 3 min bei 1000 U/min (*Labofuge 400e*, Heraeus) wurde der Überstand bis auf ca. 1 ml abgesaugt. Um eine Konzentration der Zellen zu

erreichen, wurden die sedimentierten Zellen (Pellets) von 6 Röhrrchen zusammen mit 5 ml frischem Medium ohne FKS aufgenommen und in ein frisches Röhrrchen überführt. Nach erneutem Zentrifugieren und Absaugen (wie oben) wurde das Pellet in 5-10 ml Percoll (Amersham, 1:1 mit Medium ohne FKS verdünnt) aufgenommen und nun für 20 min bei 500 U/min zentrifugiert. Dadurch setzte sich ein großer Teil der Erythrozyten als Pellet ab und die auf der Oberfläche schwimmenden Granulozazellen konnten mit einer silikonisierten Pasteur-Pipette abgesaugt werden. Pro Röhrrchen ergaben sich ca. 3 ml, die mit Medium (ohne FKS) auf 10 ml aufgefüllt, gemischt und zentrifugiert wurden (3 min bei 1000 U/min). Nun wurde wieder wie im vorherigen Schritt abgesaugt (bis auf 1 ml), aufgefüllt und zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Je nach Pelletgröße wurden die Zellen in einer geeigneten Menge Medium (mit FKS) aufgenommen und auf den vorbereiteten Kulturgefäßen mit einer Dichte von ca. 100 Zellen pro mm^2 ausgesät. Am nächsten Morgen hafteten die Zellen bereits genügend fest am Untergrund, so daß die bei der Präparation nicht vollständig abtrennbaren Erythrozyten vorsichtig mit Medium (ohne FKS) abgespült werden konnten (bis zu 4 mal). Anschließend wurden die Zellen bis zu 11 Tage im Brutschrank (Heto-Holten) bei 5% CO_2 und 37°C kultiviert. Das Medium (mit 10% FKS) wurde alle 2 Tage ausgetauscht.

3.1.3 Stimulation der Zellen

Um die langfristige Beeinflussung der Zellen durch Veratridin (Va), TTX oder hCG (humanes Chorion-Gonadotropin) zu untersuchen, wurden diese Substanzen dem Kulturmedium zugesetzt. Dies geschah normalerweise am Tag nach der Präparation, nachdem die störenden Erythrozyten abgespült worden waren. Bei Verwendung von Veratridin, das in Ethanol gelöst werden mußte, wurde der Kontrollgruppe von Zellen Ethanol zugesetzt (Endkonzentration 0,5%). Die Zellen wurden für 24 oder 48 h inkubiert und danach geerntet bzw. fixiert.

3.2 Progesteronbestimmung

Zur Bestimmung der Progesteronkonzentration im Kulturmedium der humanen GZ stand der Enzymimmunoassay *Serozyme-M Progesterone* (Biochem Immunosystems) zur Verfügung. Um Doppelbestimmungen durchzuführen, wurde das Medium von stimulierten und unstimulierten Zellen 1:200 oder 1:400 verdünnt zum *Serozym-M*-Konjugat (mit Meerrettichperoxidase gekoppeltes Progesteron) in eine Mikrotiterplatte gegeben. Zur späteren Kalibrierung wurden die im Assay enthaltenen Progesteron-Standards (0; 0,25; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 ng/ml) verwendet. Nach einer Inkubationzeit von 2 h bei 37°C erfolgten 3 Waschschrirte mit dem vorgegebenen Waschpuffer. Danach wurde das Chromogen (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) zu allen Proben und den Standards gegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurden alle Schalen der Mikrotiterplatte mit Stopplösung versetzt und 30 min später die Extinktion bei 450 nm und der Referenzwellenlänge 620 nm gemessen. Der Hintergrund (Leerwert) jeder Mikrotiterplatte ergab sich aus der Extinktion von Chromogen und Stopplösung. Von den Standardwerten und den unbekanntem Proben (A_x) wurde der Hintergrund (A_c) abgezogen und auf den ebenfalls hintergrundbereinigten Nullstandard (A_0) bezogen (3-1).

$$C_x = \frac{A_x - A_c}{A_0 - A_c} \quad (3-1)$$

Aus den erhaltenen Werten C_x der Standards wurde eine Eichkurve erstellt, aus der die Progesteronkonzentrationen in ng/ml ermittelt werden konnten. Anschließend wurden die Verdünnungsfaktoren berücksichtigt und die Werte der Doppelbestimmungen gemittelt, sofern beide im dynamischen Bereich der Eichkurve lagen.

Aus den bestimmten Konzentrationen wurde die jeweils produzierte Progesteronmenge durch Multiplikation mit dem Gesamtvolumen des Mediums einer Kulturschale berechnet. Dieses Volumen wurde während der Abnahme des Überstands auf 50 μ l genau bestimmt.

3.3 Proteinbestimmung

Um die ermittelten Progesteronmengen auf die Zelldichte beziehen zu können, wurde die Proteinmenge der Zellen bestimmt. Dazu wurden diese mit jeweils 1 ml NPE-Puffer (NaCl / Pipes / EDTA = Ethylen-diamin-tetraessigsäure) von der Schale (\varnothing 35 mm) gelöst und bei 1000 U/min für 2 min zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1 ml NPE wurde das Pellet in 1 \times Probenpuffer aufgenommen. Durch Ultraschall wurden die Zellen lysiert (*UP 50H*, Dr. Hielscher GmbH) und der Proteingehalt der einzelnen Lysate mittels Bicinchoninsäure (*protein assay reagent*; Pierce) ermittelt. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte durch Absorptionmessung eines Bicinchoninsäure-Kupferkomplexes bei 562 nm. Zur Erstellung der Eichgeraden wurden Albumin-Lösungen von 0 bis 20 mg/ml in 1 \times Probenpuffer verwendet. Die photometrische Messung erfolgte mit dem Spektrophotometer *DU 640* (Beckman).

Für die Progesteronbestimmungen wurde anschließend die gesamte Proteinmenge durch Multiplikation des Konzentrationswertes mit dem Volumen des Probenpuffers (100 oder 150 μ l) ermittelt.

3.4 Molekularbiologie

3.4.1 RNA-Extraktion

Zur Extraktion der gesamten zellulären RNA von humanen GZ wurde der Präparations-Kit *RNeasy* (Quiagen) verwendet. Gemäß dem Arbeitsprotokoll des Herstellers wurden die mitgelieferten Puffer zur Lyse der Zellen (*RLT*, basierend auf Guanidinisothiocyanat, zuvor versetzt mit β -Mercaptoethanol) und zum Waschen der Säule verwendet (*RW1* und *RPE* / 70% Ethanol). Alle Zentrifugationsschritte wurden mit der Mikrozentrifuge *Fresco* (Heraeus) bei 4°C durchgeführt. Schließlich wurde die RNA mit 50 μ l DEPC-H₂O eluiert und bei -80°C gelagert.

Da RNA leicht degradiert, wurde ihre Qualität vor weiteren Arbeitsschritten durch Elektrophorese mit einem Agarosegel (2%) geprüft. Hierfür wurden die bei der DNA-Gelelektrophorese beschriebenen Chemikalien, Puffer und Geräte verwendet (s. 3.4.4). Pro Spur wurde 1 μ l der gewonnenen RNA aufgetragen und mittels Ethidiumbromid (1 mg/ml) sichtbar gemacht. Bei intakter RNA verhält sich die Intensität von ribosomaler 28 S zu 18 S RNA etwa wie 2:1. Die RNA aus dem CL des Rhesusaffen wurde von Richard L. Stouffer, Beaverton, USA, zur Verfügung gestellt und lag durch reverse Transkription bereits als cDNA vor.

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit von RNA oder DNA wurde die Absorption einer 1:100 verdünnten Lösung bei 260 nm und 280 nm gemessen. Ein Verhältnis $A_{260}:A_{280}$ von weniger als 1,5 deutet auf eine Protein-, von mehr als 2,0 auf eine Phenolverunreinigung hin. Aus A_{260} können die Konzentrationen nach 3-2 und 3-3 berechnet werden.

$$\text{DNA-Konzentration} = A_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} [\mu\text{g}/\mu\text{l}] \quad (3-2)$$

$$\text{RNA-Konzentration} = A_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor} [\mu\text{g}/\mu\text{l}] \quad (3-3)$$

3.4.2 Reverse Transkription (RT)

Für die RT von zellulärer mRNA in cDNA wurden das Enzym MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase), 10 \times Puffer sowie der RNase-Blocker von Stratagene verwendet. Tab. 3-1 zeigt den Reaktionsansatz für ein Gesamtvolumen von 20 μ l. Zunächst wurde das einer Menge von 200 ng RNA entsprechende Volumen mit DEPC-H₂O auf 14 μ l aufgefüllt und mit 1 μ l oligo dT15 (MWG-Biotech) für 10 min auf 70°C erhitzt. Anschließend wurde auf 4°C gekühlt und sofort 10 \times Puffer, RNase-Blocker, dNTPs (peQLAB) und MMLV-RT zugegeben. Die RT erfolgte dann bei 37°C für 1 h. Danach wurde bei 90°C denaturiert, auf 4°C gekühlt und die so gewonnene cDNA bei -20°C aufbewahrt oder direkt zur PCR (Polymerase Chain Reaction) eingesetzt.

Tab. 3-1: Reaktionsansatz für eine Reverse Transkription mit Gesamtvolumen 20 μ l.

Reagenz	Volumen
RNA in DEPC-H ₂ O	14 μ l
Oligo dT15 (85 μ M)	1 μ l
Puffer (10 \times)	2 μ l
RNase-Blocker (40 U/ μ l)	1 μ l
DNTPs (25 mM)	1 μ l
DTT (1 M)	1 μ l
MMLV-RT (50 U/ μ l)	1 μ l
Gesamtvolumen	20 μl

3.4.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Um die Art der NaK in Zellen und Geweben zu bestimmen, wurden PCR mit *panNaK*-Primern durchgeführt, die zur Sequenz mehrerer verschiedener NaK-Typen paßte. Zur Ermittlung der relativen Mengen wurden semiquantitative PCR mit zusätzlichen Primern für α -Tubulin oder Cyclophilin zur Normierung durchgeführt. In den meisten Fällen ging der PCR eine RT-Reaktion voraus, um die mRNA in cDNA umzuschreiben (3.4.2). Die Primer wurden gereinigt und lyophilisiert von MWG-Biotech bezogen (Tab. 3-2). Für Cyclophilin A entsprachen sie der Sequenz des Rhesusaffen, für *panNaK* den zum Zeitpunkt der Konstruktion verfügbaren Sequenzen für NaK-Typen in verschiedenen Spezies.

Tab. 3-2: Sequenz und Lokalisation der verwendeten PCR-Primer.

Bezeichnung	Sequenz (5' \rightarrow 3')	GenBank #	Bereich	Frag.
α -Tubulin	5': CACCCGTCTTCAGGGCTTCTTGGTTT	K00558	454-479	528
	3': CATTTCACCATCTGGTTGGCTGGCTC		956-981	
Cyclophilin A	5': GGGAAGTCCATCTACCGA	AF023861	223-240	158
	3': ACATGCTTGCCATCCAAC		363-380	
<i>panNaK</i>	5': ATCGGAATCTGAAGACAGC	mehrere		222
	3': CTGTGCTCATCATCGGCAA			

Tab. 3-3: Einfacher Reaktionsansatz für PCR mit einem Gesamtvolumen von 75 μ l.

Mix A		Mix B	
H ₂ O	46,5 μ l	H ₂ O	12 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	3 μ l	Primer 5'	1 μ l
10 \times Puffer	7,5 μ l	Primer 3'	1 μ l
Nukleotid-Mix (10 mM)	1 μ l	Taq-Polymerase	1 μ l
DNA-Template	2 μ l		

Die PCR wurde mit dem Thermocycler *PTC-200* (MJ Research) durchgeführt. Dazu wurde Mix A (**Tab. 3-3**) zur Denaturierung des Templates zunächst auf 94°C erhitzt und dann Mix B hinzugegeben ("hot start"). Anschließend erfolgten 35 Zyklen der folgenden Reaktionsschritte:

- Denaturierung bei 94°C für 15 s
- Annealing der Primer bei 54°C für 1 min
- Elongation bei 72°C für 2 min

Danach wurde eine Temperatur von 4°C gehalten, bis der Ansatz eingefroren oder elektrophoretisch aufgetrennt wurde.

3.4.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Zur Visualisierung des mit PCR amplifizierten Fragments wurde der Ansatz mit 6× Auftragspuffer versetzt und elektrophoretisch aufgetrennt, mit einem Gel aus 1% Agarose *SeaKemLe* (Biozym) in 1× TBE-Puffer, der auch als Laufpuffer verwendet wurde. Die Größe der Fragmente wurde durch Vergleich mit einem 100 bp DNA-Molekulargewichtsmarker (Roche Diagnostics) bestimmt. Die horizontale Elektrophorese (*Sub Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System*, Biorad) erfolgte für 30 min bei 100 V. Die DNA-Fragmente wurden anschließend mittels UV-Licht detektiert, digitalisiert und densitometrisch ausgewertet (*PeakFind*, eigene Software).

3.4.5 DNA-Ligation (Herstellung des Vektor-Plasmids)

Zur späteren Sequenzierung und *in vitro* Transkription des PCR-Produktes wurde dieses mit dem Plasmid *pGEM[®]-T* (Promega) ligiert, Bakterien mit der rekombinanten Vektor-DNA transformiert und später das klonierte DNA-Fragment wieder isoliert.

Um nur das gewünschte PCR-Produkt für diese Schritte zu erhalten, wurde die entsprechende DNA-Bande nach Auftrennung des gesamten PCR-Ansatzes unter UV-Licht aus dem Agarosegel herausgetrennt und mittels *Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers eluiert. Bei der anschließenden Ligation mit dem *DNA Ligation Kit* (Promega) wurde gemäß den Herstellerangaben 10 µl DNA (Vektor-DNA und Insert-DNA im molaren Verhältnis 1:3) in 1× Verdünnungspuffer mit 10 µl Ligationspuffer versetzt und mit 1 µl T4 DNA Ligase (3 U/µl) für 15 min bei Raumtemperatur (R.T.) inkubiert.

3.4.6 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Vor der Transformation der Bakterien mußten diese für die Aufnahme der Plasmid-DNA kompetent gemacht werden. Hierfür wurde eine Übernachtskultur (5 ml) von einer Einzel-

kolonie *E. coli XL1-Blue* (Stratagene) in LB-Medium angelegt, mit der dann 100 ml LB-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft und für 3 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert wurde. Nach Zentrifugation der Bakterien (15 min bei 3.000× g und 4°C) wurde das Bakterienpellet in 50 ml eiskalter MgCl₂-Lösung (100 mM) resuspendiert, für 30 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml CaCl₂-Lösung (100 mM) aufgenommen und erneut 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in 2 ml CaCl₂-Lösung aufgenommen und über Nacht auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml Glycerin und 2,5 ml kalter CaCl₂-Lösung wurden Aliquots von 100 µl bei -80°C eingefroren.

3.4.7 Transformation

Zur Transformation wurden 100 µl der kompetenten Bakterien mit 5 µl Ligationsansatz für 45 min inkubiert, gefolgt von einem Temperaturschock bei 42°C für 2 min mit anschließender Abkühlung auf Eis. Die Bakteriensuspension wurde in 900 µl LB-Medium aufgenommen und auf einer antibiotikahaltigen LB-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Dadurch wurden Bakterien selektiert, die nach der Aufnahme eines Plasmids die Antibiotikaresistenz exprimierten. Zusätzlich war eine Unterscheidung zwischen Klonen, die ein Plasmid mit Insert enthielten und jenen mit religierten Vektoren ohne Insert durch Farbselektion (blue-white-screening) möglich. Bei Insertierung des DNA-Fragments in den Vektor wurde der Leserahmen der β-Galactosidase (*lacZ*-Gen) zerstört und X-Gal konnte nicht mehr zum blauen Farbstoff umgesetzt werden. Als Folge davon blieben diese Kolonien weiß und wurden für eine Übernachtskulturen in 5 ml LB-Medium (mit Ampicillin) verwendet.

3.4.8 Präparation des Plasmids

Mit Hilfe des *Qiaprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) wurde nach Angaben des Herstellers Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli XL1-Blue* isoliert. Das Pellet einer 5 ml Übernachtskultur wurde mit 250 µl Puffer *P1*, 250 µl Puffer *P2* und 350 µl Puffer *N3* versetzt und bei 10.000× g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Qiaprep Säule überführt, mit 0,75 ml *PE*-Puffer gewaschen und die DNA mit 100 µl H₂O eluiert. Ein Teil davon wurde zur Kontrollsequenzierung eingeschickt (TopLab).

3.4.9 Northern Blotting

Für Northern Blot Experimente mußten neben der Aufarbeitung und Elektrophorese von zellulärer RNA auch spezifische, ³²P-markierte Sonden hergestellt werden. Hierzu wurden die durch RT-PCR und anschließende Klonierung und Präparation gewonnenen Plasmide verwendet.

3.4.9.1 Linearisierung

Zur Linearisierung wurde die aus der Präparation gewonnene Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen geschnitten. Hierfür wurden je 15 µg Plasmid DNA mit *Nco* I bzw. *Not* I (10 U/µl, Roche Diagnostics) für 1,5 h bei 37°C inkubiert, bei einem Gesamtvolumen von 50 µl einschließlich 5 ml 10× Puffer. Zur Kontrolle des Restriktionsverbaus wurde von diesem 5 µl plus 1 µl Auftragspuffer auf ein 2% Agarosegel aufgetragen und zusammen mit Plasmid-DNA ohne Insert zum Vergleich aufgetrennt.

Zur Extraktion des linearisierten Plasmids wurde die Lösung mit dem gleichem Volumen einer Mischung aus Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 versetzt und anschließend für 3 min bei 13.000 U/min und 4°C zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde abgetrennt, das gleiche Volumen Chloroform / Isoamylalkohol (1:1) zugegeben und wieder für 3 min bei 13.000 U/min und 4°C zentrifugiert. Danach wurde mit 0,5% Ammoniumacetat (7,5 M), 2,5% Ethanol (abs.) und 1 µl Glykogen (20 µg/µl) über Nacht bei -80°C präzipitiert. Anschließend wurde für 15 min bei 13.000 U/min und 4°C zentrifugiert und das Pellet 2× mit Ethanol (70%) gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in H₂O aufgenommen, so daß sich eine DNA-Konzentration von ca. 2 µg/µl ergab.

3.4.9.2 In vitro-Transkription

Zur Herstellung der radioaktiv markierten Sonden wurde α -³²P UTP (NEN) verwendet. Von diesem Nukleotid wurden 9.250 MBq bzw. 250 µCi in einer Vakuum-Zentrifuge (Bachofer) getrocknet und in 5 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Anschließend wurden jeweils 13 µl des Transkriptionsansatzes (Tab. 3-4) hinzugefügt. Transkriptionspuffer, Rnasin, SP6- und T7-Polymerase sowie DTT wurden von Promega und dNTPs von Amersham bezogen.

Als Template diente jeweils die linearisierte Plasmid-DNA mit den PCR-Fragmenten für eNaK und *HUMHBAX* (*SCN2A*). Bei eNaK diente das mit *Nco* I geschnittene Plasmid als Vorlage für die SP6 RNA-Polymerase zur Transkription der Antisense-Sonde. Bei *HUMHBAX* wurde die Antisense-Sonde durch T7 RNA-Polymerase und das mit *Not* I geschnittene Plasmid hergestellt. Die Transkription erfolgte für SP6 bei 40°C und für T7 bei 37°C für 1 h. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DNase (Promega) bei 37°C für 15 min unterbrochen. Eine Aufreinigung der Sonden erfolgte mit *Nick-Columns* (Pharmacia, Biotech). Nach diesem Schritt wurde 1 µl der aufgereinigten RNA in 6 ml Szintillationsflüssigkeit *Ultima Gold* (Canberra Packard) gelöst und die Aktivität in einem β -Counter *TRI CARB 2100TR*, *Liquid Scyntillation Analyzer* (Canberra Packard) gemessen. Die Kontrollsonde β -Aktin wurde auf dieselbe Weise hergestellt, wobei auf ein bereits vorhandenes Plasmid zurückgegriffen werden konnte.

Tab. 3-4: Reaktionsansatz für die *in vitro*-Transkription zur Herstellung der radioaktiv markierten Sonden. Einfaches Gesamtvolumen: 20 μ l.

Reagenz	Volumen
5 \times Transkriptionspuffer	4 μ l
DTT (1 M)	2 μ l
Rnasin (40 U/ μ l)	1 μ l
CTP, ATP, GTP (2,5 mM)	4 μ l
UTP (100 μ M)	2 μ l
Transkriptionsansatz	13 μl
³² P UTP (250 μ Ci)	5 μ l
SP6- bzw. T7-Polymerase (20 U/ μ l)	1 μ l
Template (2 μ g/ μ l)	1 μ l
Gesamtvolumen	20 μl

3.4.9.3 RNA-Aufbereitung

Für Untersuchungen mittels Northern Blot wurden jeweils 10 μ g der extrahierten Gesamt-RNA elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde die RNA zunächst getrocknet (*Vacuum Concentrator Typ Mini 30*, Bachofer), in 5 μ l Denaturierungs-Puffer aufgenommen, 45 min auf Eis belassen und anschließend für 5 min auf 65°C erwärmt. Vor dem Auftragen auf das Agarose-Gel wurden die Proben mit RNA-Auftragspuffer versetzt und jeweils 1 μ l Ethidiumbromid (1 mg/ml) zugegeben.

3.4.9.4 Gelelektrophorese

Für ein ca. 5 mm dickes Gel mit den Abmessungen 10 \times 15 cm wurde 0,7 g (1,1%) Agarose (Biozym) in 39,75 ml DEPC-H₂O aufgeköcht und nach Abkühlen auf 60°C 12,8 ml Formaldehyd (37%, Sigma) und 11,5 ml 5 \times MOPS, pH 7,0 zugegeben. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte zunächst für 10 min bei 10 V und anschließend bei 100 V in 1 \times MOPS-Puffer. Nach 90 min wurde das Gel 3 \times 5 min in DEPC-H₂O gewaschen und dann zur Vorbereitung des Membrantransfers für 5 min in 20 \times SSC belassen. Der Transfer auf eine Nylon-Membran (*Hybond-N*, Amersham) wurde mit einem Vakuumblotter (Appligene Oncor) bei einem Unterdruck von 55 mbar für 2 h durchgeführt. Das Gel wurde zuvor mit 10 \times SSC überschichtet und ca. alle 15 min frischer Puffer ergänzt. Die transferierte RNA wurde in einem UV-Crosslinker (*Stratalinker 2400*, Stratagene, Einstellung "autocrosslink") auf der Membran fixiert und entweder direkt verwendet oder bei 4°C aufbewahrt.

3.4.9.5 Hybridisierung

Zu 10 ml der Hybridisierungslösung wurde eine Menge der jeweiligen ^{32}P -markierten RNA-Sonde gegeben, die 1 Mio. Counts entsprach. Nachdem die Blots über Nacht bei 60°C in einem Hybridisierungssofen (*Shake 'n' Stack*, Hybaid) mit dieser Lösung inkubiert wurden, folgten 3 Waschschriffe zu je 30 min mit $0,1\times \text{SSC} / 0,1\% \text{SDS}$ in DEPC- H_2O bei 65°C . Nach dem Trocknen der Membran wurde ein autoradiographischer Film aufgelegt (*Hyperfilm MP*, Amersham) und in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie bei -80°C für 1 bis 5 Tage exponiert.

3.5 Lysosomenfärbung / Fluoreszenzmikroskopie

Die Stimulation der GZ mit bestimmten Substanzen führte zu morphologischen Veränderungen, die zunächst im Lichtmikroskop festgestellt wurden (s. 4.2.1). Um zu prüfen, ob davon z.B. auch die Dichte bzw. Größe der Lysosomen betroffen war, wurden Vitalfärbungen der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff *LysoTracker*TM L-7528 (Molecular Probes) durchgeführt.

Auf Deckgläsern kultivierte und für 24 oder 48 h stimulierte Granulosazellen wurden hierzu mit Extrazellulär- (EC-) Lösung gespült und für 2 min mit dem Farbstoff (10 nM in EC-Lösung) bei R.T. inkubiert. Diese Zeit wurde mit hoher Genauigkeit eingehalten, um eine unterschiedliche Beladung der Zellen mit Farbstoff beim Vergleich verschiedener Stimulationen zu vermeiden. Mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop *Axiovert 135TV* (Zeiss) wurden sie danach betrachtet und fotografiert (Filterset 00: Anregung 530-585 nm, Emission > 615 nm). Die runden Deckgläser wurden dazu auf ein größeres Deckglas gelegt bzw. bei Verwendung von Immersionsöl (40 \times Objektiv) mit zwei seitlichen Deckgläsern mechanisch stabilisiert, um den geringen Objektivabstand erreichen zu können. Eine weitere Schwierigkeit stellte das schnelle Ausbleichen des Farbstoffs dar, so daß der Bildkontrast bereits nach wenigen Sekunden für fotografische Aufnahmen nicht mehr ausreichend war.

3.6 Immunhistochemie

Vom bereits in Paraffin eingebettete Ovargewebe wurden 5 μm dicke Schnitte auf Objektträger ausgezogen und 2 h bei 37°C getrocknet. Anschließend wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

- Inkubation für 5-10 min in $0,01\% \text{Trypsin} / 0,1\% \text{CaCl}_2$ (pH 7,8) bei 37°C
- 3×5 min waschen mit 10 mM PBS (pH 7,4)
- Blockierung der endogenen Peroxidase mit $0,06\% \text{H}_2\text{O}_2$ in PBS für 30 min bei R.T.
- 3×5 min waschen mit PBS
- Blockierung mit 5% Normalserum (Spezies wie 2. Antikörper) in PBS für 30 min

- Normalserum abgießen
- Inkubation mit 1. Antikörper über Nacht bei 4°C
- 3× 5 min waschen mit PBS
- Inkubation mit 2. Antikörper für 2 h bei R.T. unter Schütteln
- 3× 5 min waschen mit PBS
- Tris-HCl für 10 min
- Tris-HCl / DAB (Diaminobenzidin) mit H₂O₂ für 5-10 min bei R.T.
- 10 min waschen mit Tris-HCl
- 3× 5 min waschen mit PBS
- Gegenfärbung mit Haematoxylin für 10-15 s
- Bläuen unter fließendem Wasser für 3 min, abspülen mit H₂O
- Eindecken mit Glyzerin-Gelatine

3.7 Elektronenmikroskopie

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden die auf Petrischalen (35 mm) kultivierten Zellen mit PFA (Paraformaldehyd, 4%) und Glutaraldehyd (0,5%) fixiert. Die Postfixierung erfolgte für 1 h in 4% OsO₄ (0,1 M in PBS) / 1,5% Kaliumhexacyanoferrat (II). Nach der Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe (50, 70, 80, 90, 95, 100%) wurden die Zellen in Epon 812 (Merck) gemäß folgendem Protokoll eingebettet [35;48]:

- Epon:Ethanol (1:2) für 20 min
- Epon:Ethanol (1:1) für 20 min
- 2× Epon für je 20 min
- Epon über Nacht

Anschließend erfolgte die Polymerisierung des Epon-Harzes für ca. einen Tag bei 60°C. Die harte Eponscheibe wurde von der Plastikscheibe befreit und die an der Braunfärbung erkennbaren Zellen in kleinen Blöckchen (ca. 2×2 mm) mit Hilfe einer Säge herausgetrennt. Von diesen wurden Ultradünnschnitte (50-70 nm) gewonnen und mit Uranylacetat (2%) / Bleizitrat (2,7%) kontrastiert (Reynolds, 1963).

Die Gewebestücke aus dem CL des Rhesusaffen waren bereits fixiert mit 5% Glutaraldehyd in 0,1M Cacodylat (pH 7,4) und wurden wie oben beschrieben weiterbehandelt.

3.8 Elektrophysiologie

3.8.1 Komponenten und Aufbau des Meßplatzes

Für Messungen im whole-cell Modus ist eine hohe mechanische Stabilität notwendig, sowohl kurzfristig gegenüber akustischen Schwingungen, als auch langfristig, z.B. bei eventueller Drift der Patch-Kapillare. Daher wurde für die Aufstellung des pneumatisch schwingungsgedämpften Arbeitstisches *VH-3848-OPT-8* (Newport) ein Standort an der Gebäudeaußenwand gewählt. Der Arbeitstisch bestand aus zwei Stahlplatten mit 90×120 cm und erhielt durch eine innere Stahlwabenstruktur eine hohe Steifigkeit. Dadurch ergab sich ein Gewicht von nur 80 kg, ebenso wie für das Gestell. Dieses wurde zunächst grob horizontal einjustiert. Nach Aufsetzen der Platte wurde die Druckluftregelung in Betrieb genommen, was eine anschließende exakte Nivellierung in der Horizontalen und eine Dämpfung von Schwingungen in allen drei Raumrichtungen ermöglichte. Das inverse Mikroskop *Axiovert 135 TV* (Zeiss) wurde mit demontierten Gummifüßen aufgestellt, um eventuelle Schwingungen zu minimieren (z.B. durch Objektivwechsel). Auf der Oberseite der Platte waren M6-Gewindebohrungen im 25 mm Raster angebracht, was eine stabile Montage weiterer Geräte erleichterte. Um das Auftreten mechanischer Schwingungen weiter zu minimieren, wurden alle nach außen führenden Kabel und Schläuche zuerst auf der Arbeitsplatte fixiert.

Auch der Mikromanipulator *5171* (Eppendorf) wurde auf diese Weise über einen eigens gefertigten Stahlträger (Dietmar Beyer) befestigt. Die Schrittmotoren des Manipulators erlaubten eine Vor- und Rückwärtsbewegung mit einer Auflösung von 50 nm. Außerdem verhinderten sie weitgehend eine Drift der Kapillare gegenüber den Zellen.

Die sorgfältige Erdung der Apparatur war für rauscharme Messungen unerlässlich. Dazu wurden ausgehend vom Erdungsanschluß des Patch-clamp Verstärkers *EPC9* (HEKA) der Faradaykäfig (Johannes Bulling), die Arbeitsplatte, der Träger des Manipulators und ein zentraler Punkt auf dem Mikroskoptisch mit einem Kupfergewebband (Querschnitt 10 mm²) verbunden. Von diesem Punkt aus erfolgte die Erdung anderer kritischer Punkte der Apparatur, insbesondere freie Metalloberflächen in der Nähe der Meßkapillare. Die Kabel der Schrittmotorsteuerung wurden mit einem Schlauch aus Stahlgewebe umgeben und zur Betriebseinheit außerhalb des Käfigs geführt. Mit der Rauschanalyseoption der Meßsoftware *Pulse* (HEKA) wurde die schrittweise Verbesserung verfolgt. Die erreichte Rauschamplitude betrug minimal 800 fA, bei eingeschaltetem Mikromanipulator ca. 5 pA. Für die beabsichtigten whole-cell Messungen war dies ausreichend.

3.8.2 Perfusionssystem

Für die Messungen wurden Deckgläser mit Zellen in eine als Badkammer verwendete Petrischale (35 mm) gelegt und durch kurzen Druck mit einer Pinzette fixiert. Der Zu- und

Ablauf von Lösungen erfolgte mit einem doppelt angelegten Perfusionssystem. Zur ständigen Zuführung frischer EC-Lösung (1 ml/min) wurde die Spritzenpumpe 540120 (TSE) verwendet, um mit einem pulsfreien Flüssigkeitsstrom eine Störung der Messungen zu vermeiden. Das schnelle Absaugen überschüssiger Badlösung an der Oberfläche mit einer Membranpumpe N86KN.18 (Roth) bewirkte gleichzeitig eine Entfernung von Staubteilchen, was eine saubere Spitze der Patchpipette nach dem Eintauchen gewährleistete und für den Sealerfolg von entscheidender Bedeutung war.

Diese Absaugkanüle war mit einer zweiten kombiniert, deren stumpfgeschliffene Spitze tiefer in die Badlösung tauchte. Sie diente zum Absaugen von Testlösungen, die mit der gegenüberliegenden Mehrkanal-Applikationsnadel und dem Substanzzulaufsystem *ValveLink8* (AutoMate Scientific / Science Products) zugegeben wurden (Anflutungszeit zwischen 1 und 10 ms). Die Absaugkanüle konnte mit dem manuellen Mikromanipulator *M1* (Bachofer), die Applikationsnadel mit einer dreiachsigen Motorsteuerung *AM3DC-K* (Bachofer) in unmittelbarer Nähe der zu untersuchenden Zellen positioniert werden. Die Zulaufgeschwindigkeit von Testlösungen wurde mit einem Drucksteuergerät *MPCU-3* (Lorenz) reguliert. Die Geschwindigkeit der gegenüberliegenden Absaugung war weniger kritisch; sie wurde über die Spritzenpumpe eingestellt. Durch eine mit Lebensmittelfarbe sichtbar gemachten Testlösung konnte durch geeignete Druckeinstellung und Positionierung der Fließkegel optimal eingestellt werden, so daß nur die gemessenen Zellen umspült wurden und eine Kontamination der gesamten Badlösung vermieden wurde. Mit der Spritzenpumpe war ein gleichzeitiges Absaugen und Ergänzen frischer Badlösung möglich. Durch die Wahl einer größeren Spritze wurde ein Überschuß des Zulaufs erreicht, um ein Trockenlaufen des Bads zu verhindern.

3.8.3 Elektroden

Zur Messung des Stromes über eine Zellmembran werden Ag / AgCl-Elektroden verwendet, deren Reaktion mit den gelösten Chloridionen die Umwandlung des Ionenstroms in einen meßbaren Elektronenstrom ermöglicht. Zu ihrer Herstellung auf elektrochemischem Weg wurden zwei Silberdrähte (\varnothing 0,5 mm) in eine angesäuerte KCl-Lösung (pH 2,0) getaucht. Die zu chlorierende Elektrode wurde mit dem Pluspol, der Hilfsdraht mit dem Minuspol verbunden. Bei 4 V Gleichspannung wurde ein Strom von 7 mA pro cm chloriertem Draht angelegt, bis sich auf der Oberfläche erst ein schwarzer, kurz darauf ein mattgrauer Belag bildete. Dies wurde bei Bedarf erneut durchgeführt, um systematische Potentialfehler bei den Messungen auszuschließen. Die differente Elektrode wurde auf einer Länge von 5 mm chloriert und war weiter hinten mit einer Teflonschicht überzogen. Die unbeschichtete Referenzelektrode wurde zur Maximierung der Kontaktfläche auf einer

Länge von 10 cm spulenförmig aufgewickelt und chloriert. Sie tauchte in eine KCl-Lösung (150 mM) und stand über eine Agarbrücke mit der Badlösung in Verbindung.

3.8.4 Patch-Pipetten

Grundvoraussetzung für Patch-clamp Experimente ist ein hochohmiger Kontakt zur Zellmembran. Dazu wurden Glaskapillaren aus Borosilikat *GB150-8P* (Science Products) auf dem Universalpuller *DMZ* (Engel) in einem dreistufigen Prozeß ausgezogen. Die Einstellung des Pullers wurde so gewählt, daß die Kapillaren bis kurz vor die Spitze stumpf zuliefen und sich nur im letzten Teil verjüngten. Dadurch wurde ein geringer Pipettenwiderstand erreicht und gleichzeitig die Streukapazität gering gehalten. Die langwierige Pullereinstellung wurde durch eine optische Kontrolle der Pipettenspitze erleichtert. Wenn der Sealerfolg nach einigen Wochen deutlich geringer wurde, lag dies meist an einer leichten Deformation des Heizfilaments, so daß es ausgetauscht und der Einstellungsprozeß wiederholt werden mußte. Nach dem Ziehen der Kapillaren wurde die Spitze hitzepoliert, was ebenfalls mit dem Puller durchgeführt werden konnte.

Die Befüllung der Kapillaren mit intrazellulärer Lösung erfolgte zunächst durch Anlegen eines Unterdrucks und Eintauchen der Spitze in filtrierte Lösung. Anschließend wurde sie von hinten befüllt, so daß die differente Elektrode schließlich gerade in die Lösung eintauchte; dadurch wurde ein Überlaufen im Pipettenhalter und dadurch mögliche Kriechströme vermieden.

3.8.5 Ablauf einer Messung

Vor dem Eintauchen in die Badlösung wurde die mit dem Druckregelsystem verbundene Patch-Pipette mit einem Überdruck von 3 bis 8 cm Wassersäule beaufschlagt. Während dem Heranfahren an die Zelle mit dem Mikromanipulator wurde der Widerstand (zwischen 1 und 7 M Ω) durch wiederholte Spannungspulse verfolgt. Zuvor wurden Offset-Potentiale korrigiert. Das Liquid-junction Potential wurde in *Pulse* manuell eingegeben und bei den Messungen berücksichtigt. Es wurde zuvor mit einer selbsterstellten Tabellenkalkulation berechnet und betrug bei den verwendeten Lösungen ca. -5 mV. Die leichte Zunahme des Widerstands bei der Annäherung an die Zellmembran wurde durch die Audiomonitor-Funktion hörbar gemacht, was bei den sehr flachen humanen GZ hilfreich für das rechtzeitigen Stoppen des Pipettenvortriebs war. Der Überdruck wurde verringert, was meist schon zu einer Zunahme des Widerstands auf mehrere hundert Megaohm führte. Zur weiteren Erleichterung des Sealvorganges wurde ein Unterdruck von 20 bis 30 cm H₂O angelegt und ein negatives Pipettenpotential von bis zu -100 mV eingestellt. Dies führte nach kurzer Zeit zu einem sprunghaften Anstieg des Widerstands auf 2 bis 5 G Ω . Nun wurde mit Hilfe einer Spritze (100 ml) ein kurzer und schneller Unterdruck erzeugt, der

zum Durchbrechen der Membran führte. Dies war an einer Zunahme des transienten kapazitiven Stroms erkennbar.

3.8.6 Messprotokolle

Für die dargestellten elektrophysiologischen Messungen wurden verschiedene Spannungssequenzen zur elektrischen Stimulation der Zellen verwendet. Diese Pulsprotokolle sind in Abb. 3-1 dargestellt und dienten zur Bestimmung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und Inaktivierung, zur Auslösung von Rampenströmen und zur Ermittlung der Wirkung verschiedener Substanzen auf die maximale Na^+ -Stromamplitude.

Für die Aktivierung (A) wurden die Zellen innerhalb einer Pulssequenz zunächst für 1000 ms auf -140 mV hyperpolarisiert, um möglichst alle NaK in den inaktiven (geschlossenen) aber aktivierbaren Zustand zu versetzen. Es stellte sich dabei heraus, daß es für die Zellen schonender war, dieses Potential über eine Spannungsrampe von 20 ms Dauer zu erreichen, ausgehend von einem Haltepotential zwischen -30 und -50 mV. Die Stromamplituden durch den nachfolgenden Testpuls bei unterschiedlichen Testpotentialen für 20 ms entsprachen dann dem Anteil der jeweils aktivierten NaK. Es wurden Potentiale zwischen -100 mV und $+100$ mV mit einer Schrittweite von $+10$ mV getestet.

Für die Inaktivierung (B) wurden die transienten Na^+ -Ströme mit einem konstanten Testpuls bei -20 mV / 20 ms ausgelöst und in Abhängigkeit des variablen Potentials des konditionierenden Präpulses untersucht. Seine Dauer wurde neben 1000 ms auch auf 100 ms eingestellt, um die Verschiebung der Aktivierungskurve bei veränderter Präpulsdauer zu demonstrieren.

Ein konstanter Testpuls von -140 mV auf 0 mV für 40 ms wurde für die Untersuchung der Wirkung von TTX und hCG auf die Amplitude der transienten Na^+ -Ströme verwendet. Sie wurden im Sekundenabstand ausgelöst, bei einer Dauer des Präpuls-Potentials von 500 ms.

Zur Auslösung von Strömen durch langsame Spannungsrampen (C) wurde das Potential der Zellen zunächst für 1000 ms auf -100 mV geklemmt, um es dann mit Geschwindigkeiten zwischen 233 und $1400 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ auf $+40$ mV zu verändern.

Die Aufnahme der Daten erfolgte mit einer Bandbreite von 15,8 kHz; die Aufnahmerate betrug 2 kHz.

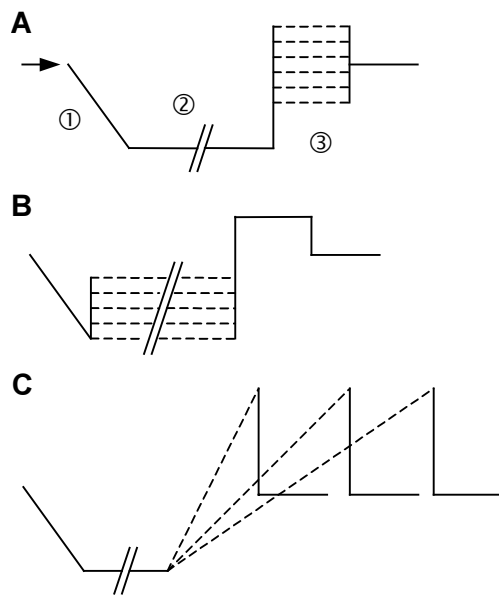


Abb. 3-1: Die verwendeten Pulsprotokolle für die Messung der Aktivierung (A), Inaktivierung (B) und der Ströme durch Spannungsrampen (C). Ausgehend von einem Haltepotential zwischen -30 und -50 mV (Pfeil) wurden verschiedene Zellen zunächst mit einer Spannungsrampe ① (20 ms) für 1000 ms hyperpolarisiert ②, um die Kanäle in den aktivierbaren Zustand zu bringen. Anschließend erfolgten Testpulse ③ auf -20 mV (A, B) oder Rampenspannungen auf +40 mV (C). Die variablen Potentiale / Geschwindigkeiten sind gestrichelt dargestellt. Zur Untersuchung der Wirkung von Testsubstanzen auf die Stromamplitude wurde ein Protokoll wie in (A) verwendet, jedoch mit konstanten Testpulsen auf 0 mV.

3.8.7 Messung der Kopplung von Zellen über Gap junctions

Während der Experimente zur Charakterisierung der Na⁺-Ströme wurden meist isoliert liegende Zellen verwendet. Zeigten sie einen bereits lichtmikroskopisch erkennbaren Kontakt zur benachbarten Zellen, trat in der Regel ein Leckstrom auf, der die Na⁺-Ströme überlagerte und ihre Auswertung unmöglich machte. Dies ließ vermuten, daß die Zellen nach wenigen Tagen in Kultur Strukturen zur interzellulären Kommunikation ausbilden, die durch die elektrische Kopplung der Zellen eine kurzschließende Wirkung haben. Eines der am Aufbau dieser Gap junctions beteiligten Proteine wurde in einer parallel durchgeführten Untersuchung bei der Granulosazelllinie *GFSHR-17* aus der Ratte nachgewiesen [67], und auch in kultivierten humanen GZ wurden funktionelle Gap junctions gefunden [25]. Um ihre Rolle bei diesen Zellen genauer untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine elektrophysiologische Methode etabliert, die durch Messung der Gesamtimpedanz ein Maß für die interzelluläre Kopplung liefert.

3.8.8 Herleitung der Kopplungsgleichung

Um den Grad der elektrischen Kopplung zwischen zwei Zellen zu bestimmen, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Eine verbreitete Methode ist die Untersuchung mittels "double patch" Technik, bei der zwei benachbarte Zellen gleichzeitig gepatcht werden. Durch Strominjektion in eine Zelle und die Messung der resultierenden Spannungsänderung in beiden Zellen kann der Spannungsabfall über den Kopplungswiderstand R_K bestimmt und daraus R_K präzise berechnet werden [37]. Diese Methode hat jedoch auch

Nachteile, da für das Patchen zweier Zellen sowohl ein großer manueller wie auch apparativer Aufwand betrieben werden muß.

Aus diesen Gründen wurde versucht, eine einfachere Technik anzuwenden, die mit nur einer gepatchten Zelle im Kontakt zu Nachbarzellen auskommt. Von Vorteil ist dabei auch, daß mehrere gekoppelte Zellen gleichzeitig untersucht werden können, und sich ein mögliches Auswaschen zytoplasmatischer Bestandteile durch den Austausch mit der Pipettenlösung auf die gepatchte Zelle beschränkt.

Eine indirekte Information über den Grad der interzellulären Kopplung kann bei dieser Meßkonfiguration aus der Kapazität und dem Eingangswiderstandes der gepatchten Zelle gewonnen werden, die sich unter bestimmten Bedingungen synchron mit R_K verändern. Dazu wird entweder der Verlauf des Membranstroms bei Rechteck-Spannungspulsen ausgewertet [5;42;57;80] oder eine komplexe Impedanzanalyse bei Anregungsspannungen mit einer oder mehreren Sinuswellen durchgeführt [28]. Die Anwendung einer einzelnen Sinusspannung erlaubt mit der "Piecewise-Linear" Technik durch Linearisierung der komplexen Gesamtleitfähigkeit L_{Ges} des Systems eine gute Schätzung kleiner Änderungen von C_M . Für die Berechnung von Absolutwerten aller drei elektrischen Parameter R_P , R_M und C_M des zugrundeliegenden Ersatzschaltkreises (Abb. 3-2) werden jedoch drei Meßgrößen benötigt. Daher muß neben dem Real- und Imaginärteil des komplexen Gesamtstroms auch noch der konstante Stromanteil bestimmt werden, was durch eine der Sinusspannung überlagerte Offsetspannung erreicht wird (Lindau-Neher Technik [28]).

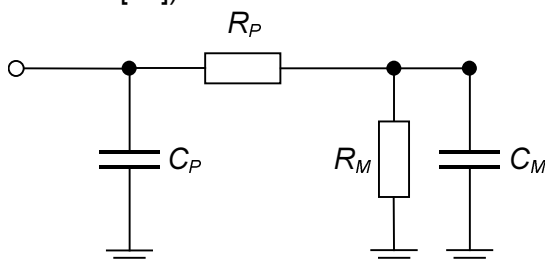


Abb. 3-2: Ersatzschaltkreis einer gepatchten Zelle mit Kapazität und Widerstand der Pipette (C_P , R_P) und der Zellmembran (C_M , R_M).

Die Pipettenkapazität C_P muß nicht berücksichtigt werden, wenn sie kompensiert wird. Sie variiert jedoch mit der Eintauchtiefe in die Badlösung, weshalb für ein konstantes Niveau des Badspiegels zu sorgen ist.

Das im Programm *Pulse* integrierte Lock-in Modul ermöglicht die automatische Berechnung der drei Parameterwerte. Ihm liegt jedoch der Ersatzschaltkreis für eine Zelle zugrunde (Abb. 3-2), während bei der Untersuchung von Gap junctions mindestens zwei Zellen und damit entsprechend mehr elektrische Parameter zu berücksichtigen sind. Um abschätzen zu können, wie sich Änderungen der realen Parameter in den berechneten Werten für das Ein-Zell-Modell auswirken, wurde ein entsprechender Ersatzschaltkreis (Abb. 3-3) analysiert. Die Formeln zur Simulation der von der Meßapparatur gelieferten

Ein-Zell-Parameter R_M^* , C_M^* und R_P^* durch vorgegebene Werte im Mehr-Zell-Modell wurden explizit gelöst und in eine Tabellenkalkulation implementiert.

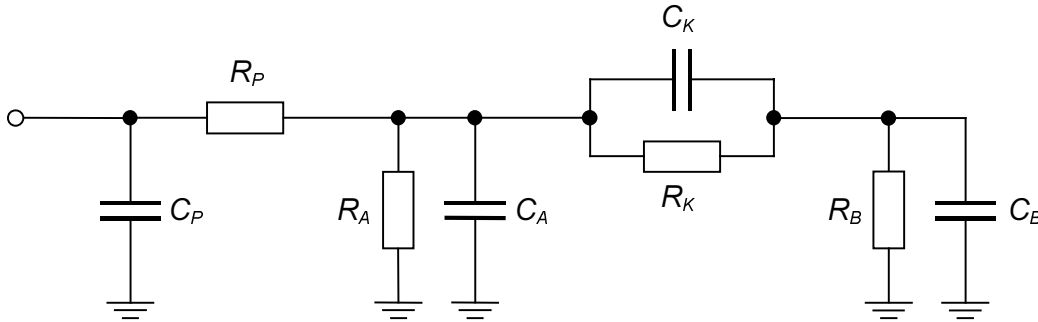


Abb. 3-3: Ersatzschaltkreis zweier gepatchter Zellen mit vier RC-Gliedern. Die Indizes A und B repräsentieren die beiden Zellen, P die Pipette und K die Kopplung zwischen den Zellen.

Vereinfachend wurde von zwei über einen Widerstand R_K gekoppelten Zellen A und B ausgegangen, deren Membraneigenschaften jeweils durch eine Parallelkombination aus Widerstand und Kapazität repräsentiert wurden. R_P bezeichnet den Serienwiderstand der Patch-Kapillare, C_P wurde wiederum nicht berücksichtigt (s.o.). Durch die Simulationen stellte sich die Berücksichtigung einer zunächst nicht auszuschließenden Kopplungs-Kapazität C_K als überflüssig heraus. In einer anderen Arbeit wurde jedoch gezeigt, daß C_K die Form von Aktionspotentialen in einer nachgeschalteten Zelle beeinflusst [36].

Mit den drei RC-Gliedern und R_P ergibt sich für die Gesamtimpedanz der folgende Ansatz:

$$I_{Ges} = R_P + \left\{ \frac{1}{R_A} + i\omega C_A + \left[\left(\frac{1}{R_K} + i\omega C_K \right)^{-1} + \left(\frac{1}{R_B} + i\omega C_B \right)^{-1} \right]^{-1} \right\}^{-1} \quad (3-4)$$

Dabei ist i die imaginäre Einheit und $\omega = 2\pi f$, mit f als Frequenz der Anregungsspannung. Durch Umformung und die Substitutionen

$$x_A := 1 + i\omega R_A C_A \quad x_B := 1 + i\omega R_B C_B \quad x_K := 1 + i\omega R_K C_K$$

ergibt sich die Gleichung

$$I_{Ges} = \frac{R_P R_B x_A x_K + R_P R_K x_A x_B + R_P R_A x_B x_K + R_A R_B x_K + R_A R_K x_B}{R_B x_A x_K + R_K x_A x_B + R_A x_B x_K} \quad (3-5)$$

und mit den Substitutionen

$$y_1 := R_P R_A + R_P R_B + R_P R_K + R_A R_B + R_A R_K$$

$$y_2 = R_P R_A R_B R_K (C_A C_K + C_A C_B + C_B C_K)$$

$$y_3 = R_P R_A R_B (C_A + C_B) + R_P R_A R_K (C_A + C_K) + (R_P R_B R_K + R_A R_B R_K) \cdot (C_B + C_K)$$

$$y_4 := R_A + R_B + R_K$$

$$y_5 := R_A R_B R_K (C_A C_K + C_A C_B + C_B C_K)$$

$$y_6 := R_A R_B (C_A + C_B) + R_A R_K (C_A + C_K) + R_B R_K (C_B + C_K)$$

schließlich eine Gleichung in der Form eines Quotienten aus zwei komplexer Zahlen:

$$I_{Ges} = \frac{y_1 - \omega^2 y_2 + i\omega y_3}{y_4 - \omega^2 y_5 + i\omega y_6} \quad (3-6)$$

oder der Gesamtleitwert

$$L_{Ges} = \frac{y_4 - \omega^2 y_5 + i\omega y_6}{y_1 - \omega^2 y_2 + i\omega y_3}$$

Zur Ermittlung des Real- bzw. Imaginärteils von L_{Ges} wird dieser Bruch mit einem zweiten multipliziert, der aus dem konjugiert komplexen Nenner von L_{Ges} (dividiert durch sich selbst) besteht:

$$L_{Ges} = \frac{y_4 - \omega^2 y_5 + i\omega y_6}{y_1 - \omega^2 y_2 + i\omega y_3} \cdot \frac{y_1 - \omega^2 y_2 - i\omega y_3}{y_1 - \omega^2 y_2 - i\omega y_3}$$

und damit

$$\text{Re}(L_{Ges}) = \frac{y_1 y_4 + \omega^4 y_2 y_5 + \omega^2 (y_3 y_6 - y_1 y_5 - y_2 y_4)}{(y_1 - \omega^2 y_2)^2 + \omega^2 y_3^2} \quad (3-7)$$

$$\text{Im}(L_{Ges}) = \frac{\omega (y_1 y_6 - y_3 y_4 + \omega^2 y_3 y_5 - \omega^2 y_2 y_6)}{(y_1 - \omega^2 y_2)^2 + \omega^2 y_3^2}$$

Diese beiden Größen stellen den frequenzabhängigen Teil der Gesamtleitfähigkeit des Mehr-Zell-Modells dar. Zur Umrechnung in die Parameter R_M^* , C_M^* und R_P^* des Ein-Zell-Modells gemäß den Gleichungen der Lindau-Neher-Technik [28], wird noch die Gleichstromleitfähigkeit benötigt. Sie kann aus der einfachen Kombination der Ohm'schen Widerstände in Abb. 3-3 ermittelt werden, d.h. in (3-4) sind sämtliche Kapazitäten auf Null zu setzen.

Dem Vorteil einer hohen Genauigkeit bei diesem Meßprinzip steht als Nachteil die Anfälligkeit der C_M -Messungen für große Änderungen von R_M gegenüber. Dieses Problem kann durch zwei Sinusspannungen verringert werden, erfordert aber zusätzliche Geräte zur Stimulation [65].

4 Ergebnisse

4.1 Elektrophysiologische Charakterisierung der kultivierten Granulosazellen

Das unmittelbar nach dem Durchbrechen der Membran gemessene Ruhepotential der GZ betrug durchschnittlich $-25,9 \pm 12,5$ mV ($n=40$), unabhängig von der Dauer ihrer Kultivierung. Die mittlere Kapazität der Zellen lag bei $50,4 \pm 21,0$ pF ($n=33$). Es wurden Zellen verwendet, die zwischen einem und elf Tagen in Kultur gehalten wurden.

In Abhängigkeit der Klemmspannung konnten durch das Pulsprotokoll für die Aktivierung ein- und auswärts gerichtete Membranströme ausgelöst werden (Abb. 4-1), jedoch erst nach drei Tagen mit nennenswerter Amplitude von mehreren hundert bis tausend Picoampère (pA). Nach ein bis zwei Tagen zeigten die Zellen nur Ströme mit sehr kleiner Amplitude.

Es gab immer wieder Experimente, bei denen eine untersuchte Zelle nach dem Durchbrechen ihrer Membran einen Eingangswiderstand von nur 50 bis 300 M Ω aufwies, obwohl zunächst ein hoher Seal-Widerstand von mehr als 1 G Ω erreicht wurde. Dies hatte so große Leckströme zur Folge, daß die Messung spannungsaktivierter Ströme nicht mehr möglich war. Der Effekt trat häufig bei Zellen auf, die sichtbaren Kontakt zu benachbarten Zellen hatten. Isoliert liegende Zellen hingegen zeigten dies nicht, so daß dieses Problem durch eine entsprechende Auswahl vermieden werden konnte.

4.1.1 Nachweis spannungsaktivierter K⁺-Kanäle

Da die auswärts gerichteten Ströme durch Verwendung von CsCl und TEA-Cl in der Pipettenlösung blockiert werden konnten (s. Abb. 4-3), mußten sie hauptsächlich von Kalium getragen sein. Außer dem hier nicht aufgetretenen, einwärts gleichrichtenden "Kir"-Typ ("inward rectifier") werden alle anderen K⁺-Kanäle durch intrazelluläres TEA blockiert [33]. Der Stromverlauf in Abhängigkeit des Spannungssprungs und die Strom-Spannungs (I/V) -Kennlinien ließen zumindest drei auswärts gleichrichtende Typen erkennen. Die einem „A-Strom“ mit schneller Inaktivierung (Abb. 4-1A) und die einem nicht inaktivierenden „delayed-rectifier-Strom“ (Abb. 4-1B) ähnelnde I/V-Kennlinie (Abb. 4-1D) war im hohen Potentialbereich gleichermaßen linear, ohne ein Plateau zu erreichen. Dagegen entsprach ein dritter Typ der Aktivität von "BK(Ca)"-Kanälen (Abb. 4-1C), deren Potentialabhängigkeit im gezeigten Beispiel auf den Bereich zwischen -20 und $+20$ mV beschränkt war. Dieser Bereich hängt von der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ab [33] und lag bei den GZ unmittelbar nach dem Durchbrechen der Membran so, daß daraus auf eine Konzentration zwischen 1 und 5 μ M geschlossen werden konnte. Wenige Minuten später verschob er sich und entsprach einer 10-fach geringeren Ca²⁺-Konzentration.

Die Experimente zeigten, daß normalerweise eine Kombination verschiedener K⁺-Kanal-typen in einer Zelle vorliegt. Die pharmakologische Trennung der Stromkomponenten

durch Verwendung spezifischer Antagonisten oder Agonisten und die genauere Bestimmung der einzelnen Kanaltypen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

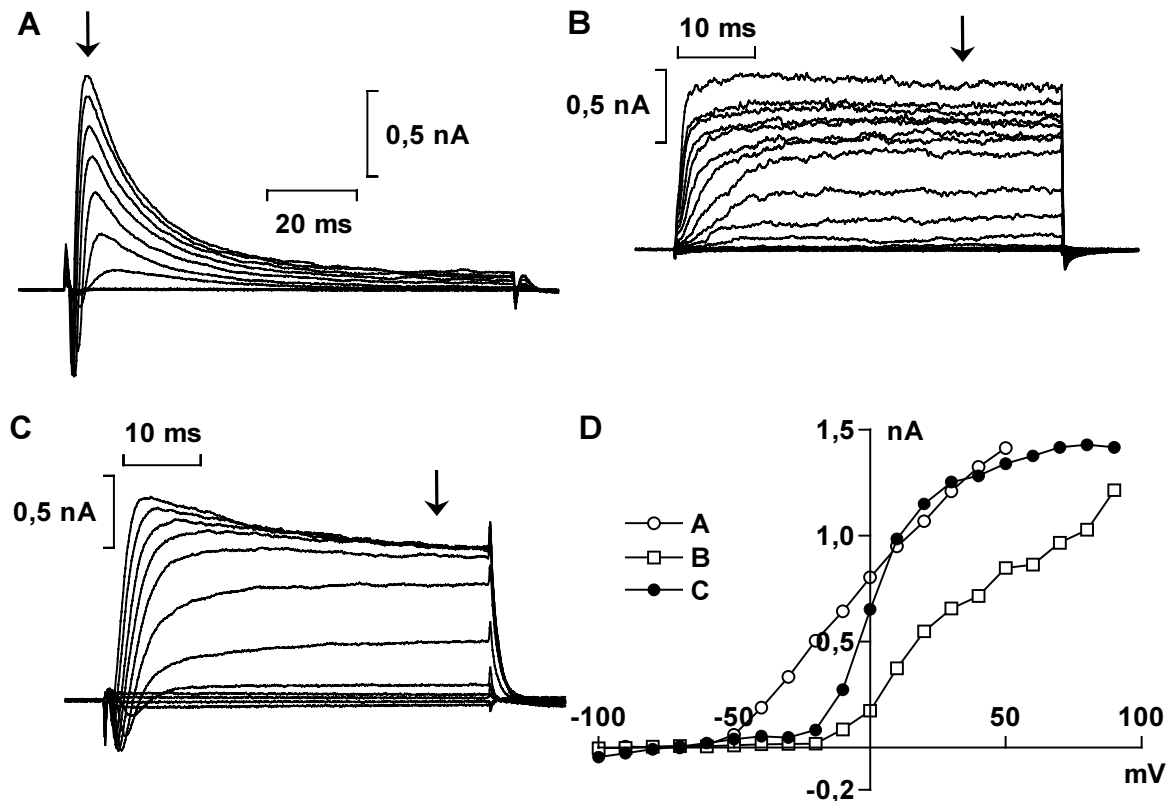


Abb. 4-1: Spannungsaktivierte K^+ - und Na^+ -Ströme in humanen GZ. Das Protokoll für die Untersuchung der Aktivierung (Spannungspulse zunehmender Amplitude ausgehend von einem Haltepotential bei -120 mV) zeigt die Aktivität von mindestens drei unterschiedlichen K^+ -Kanal-typen: (A) Einen transienten „A-Strom“, (B) einen nicht inaktivierenden Strom („delayed-rectifier“) und (C) einen im hohen Potentialbereich auf ein Plateau laufenden Strom, vermutlich durch „BK(Ca)“-Kanäle. (D) Die I/V -Kennlinien ergeben sich aus (A) bis (C) durch den Strom an der Markierung (\downarrow). Der bei (A) und (C) erkennbare Einstrom von Na^+ wurde in späteren Experimenten durch TTX blockiert. Die kurzen Stromtransienten zu Beginn und Ende des Spannungssprungs entstehen durch eine nicht vollständige Kompensation.

4.1.2 Hemmung der Na^+ -Kanäle durch TTX

Der pharmakologische Nachweis, daß dem schnellen Einwärtsstrom, ähnlich wie auch in Neuronen, die Aktivität spannungsgesteuerter Na^+ -Kanäle zugrunde liegt, wurde durch ihre Blockierbarkeit mit TTX gezeigt.

Für die Ermittlung einer Dosis-Wirkungs-Kurve war in jeweils einem Experiment die Applikation von maximal fünf unterschiedlichen TTX-Konzentrationen möglich (Abb. 4-2), da von den sieben Kanälen der Perfusionspipette einer für Spülpuffer und ein weiterer für die Einstellung des Spüldruckes (Puffer mit Lebensmittelfarbe) benötigt wurde. Um einen großen Bereich abdecken zu können, wurden deshalb verschiedene Konzentration an den einzelnen Meßtagen eingesetzt. Insgesamt wurden die Messungen von 10 verschie-

denen Zellen zur Bestimmung der halbmaximal hemmenden Konzentration (IC_{50}) verwendet. Die Anpassung einer logistischen Gleichung lieferte einen Wert von $7,7 \pm 1$ nM, die Steigung der Kurve in diesem Punkt (Hill-Koeffizient) betrug $-0,63 \pm 0,05$ (Abb. 4-2B).

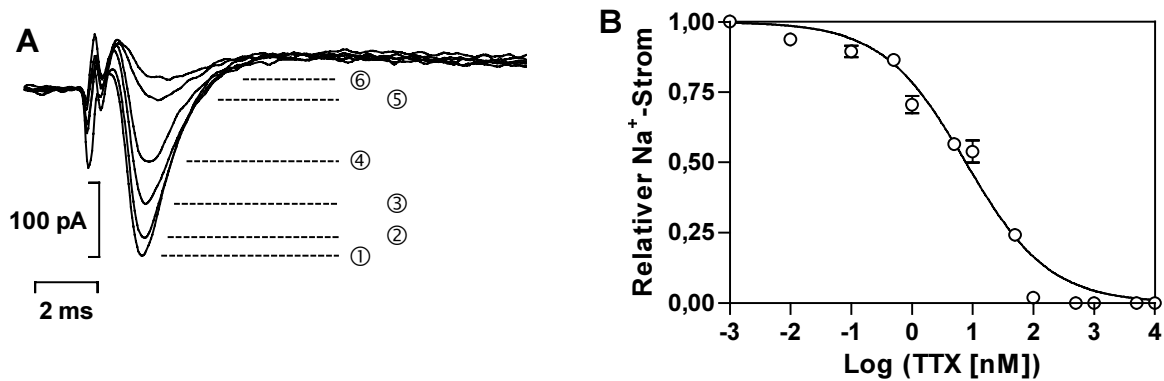


Abb. 4-2: (A) Hemmung des spannungsaktivierten Na^+ -Einstroms durch TTX. Es wurden von ① bis ⑥ Konzentrationen von 0, 10 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM und 10 μ M verwendet. (B) Dosis-Wirkungskurve der TTX-Hemmung. Für die Ermittlung der halbmaximalen Hemmkonstanten IC_{50} von 7,7 nM wurden die Experimente mit 10 verschiedenen Zellen zusammengefaßt.

4.1.3 Aktivierung und Inaktivierung der Na^+ -Ströme

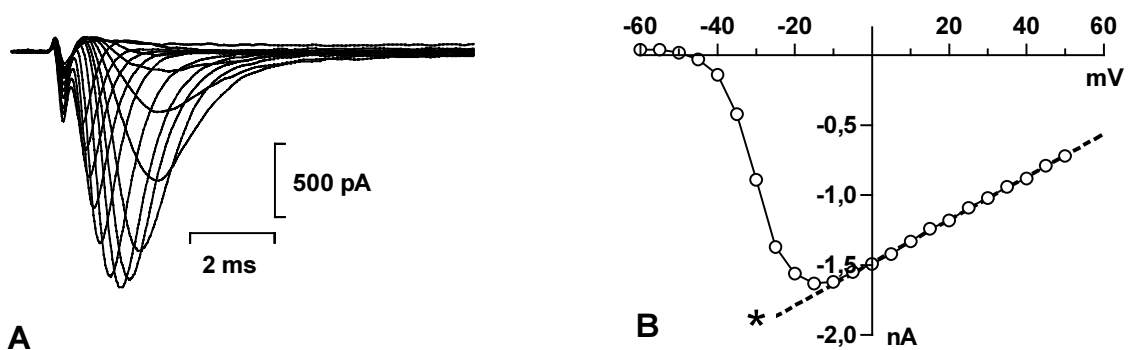


Abb. 4-3: Spannungsaktivierte Na^+ -Ströme in humanen GZ. (A) Überlagerte Stromverläufe und (B) I/V-Kennlinie, ausgelöst durch das Aktivierungsprotokoll. Die Auswärtsströme wurden durch TEA- / CsCl blockiert. Die Amplitude der Einwärtsströme nimmt mit positiveren Sprungpotentialen zu und dann linear ab. Im Potentialbereich > 0 mV sind 100% der NaK aktiviert, so daß die Amplitude allein durch die elektromotorische Kraft für Na^+ bestimmt wird. Durch Anpassung einer Geraden (*) kann die theoretische, maximale Aktivierung der NaK für alle Potentiale bestimmt werden, auf die die gemessenen Amplituden bezogen werden.

Bei allen weiteren Messungen zur Untersuchung der Na^+ -Ströme wurden die überlagernden K^+ -Ströme durch CsCl/TEA-Cl blockiert, so daß sie die Auswertung nicht beeinträchtigen konnten. Eine Überlagerung der durch das Aktivierungsprotokoll ausgelösten Ströme und die entsprechende I/V-Kennlinie der maximalen Amplituden (Peakströme) zeigen die Abb. 4-3A und B. Aus letzterer kann die Spannung bestimmt werden, bei der eine halbmaximale Aktivierung der NaK eintrat (V_{50}). Dazu wurde für jedes Experiment ermittelt, welcher maximale Na^+ -Strom bei gegebener Spannung erreicht werden konnte,

d.h. die durch eine Öffnung von 100% der NaK resultierende Stromamplitude. Dies ist bei Spannungen über ca. 0 mV der Fall, so daß der lineare Verlauf der I/V-Kennlinie (Abb. 4-3B) nur noch die Abhängigkeit des Na^+ -Stroms von der elektromotorischen Kraft widerspiegelt. Die Anpassung einer Geraden an diese Linie ergibt daher die 100%-Aktivierungslinie der NaK, auf die schließlich alle gemessenen Stromamplituden bezogen wurden. Dem sigmoiden Verlauf dieser relativen Stromamplituden wurde eine Boltzmann-Funktion angepaßt (Abb. 4-4, leere Kreise).

Zur Ermittlung der V_{50} -Werte für die Inaktivierung wurden alle Peakströme auf die mittlere Amplitude der ersten fünf Pulse bezogen und ebenfalls ein Boltzmann-Fit durchgeführt (Abb. 4-4, ausgefüllte Kreise).

Die Überlagerung der Aktivierungs- und Inaktivierungskurve kann zur Bestimmung eines möglicherweise vorhandenen persistierenden Na^+ -Einstroms auf der Basis des Hodgkin-Huxley-Modells verwendet werden. Da die Inaktivierungskurve den Anteil aktivierbarer NaK und die Aktivierungskurve den Anteil der aktivierten NaK wiedergibt, liefert die Multiplikation beider Kurven den Anteil permanent geöffneter Kanäle in Abhängigkeit vom Potential. Der resultierende "window-current" erreicht sein Maximum im Durchschnitt bei -25 mV (Abb. 4-4, $n=10$ Zellen), was dem mittleren Ruhepotential der Zellen nahekommt. Seine Amplitude beträgt durchschnittlich 2% des maximalen Na^+ -Einstroms; bei Messungen an verschiedenen Zellen schwankte dieser theoretische Wert zwischen 0,3 und 4,0%, was einer absoluten Amplitude von ca. 5 bis 100 pA entspricht.

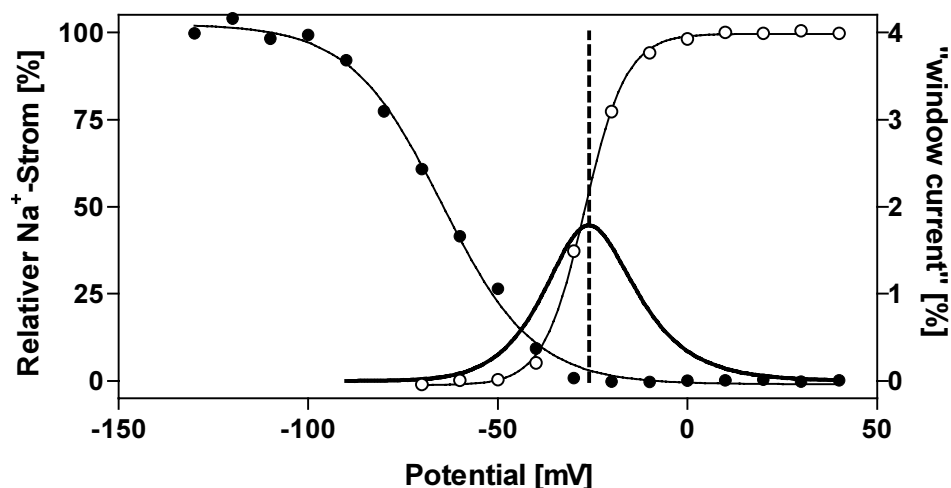


Abb. 4-4: Überlagerung der Aktivierungs- (○) und Inaktivierungskurve (●) am Beispiel einer Zelle. Die Multiplikation der beiden Boltzmann-Kurvenfits (glockenförmige Kurve) liefert die Wahrscheinlichkeit für permanent geöffnete NaK (in diesem Fall ca. 2%) und hat ein Maximum bei ca. -25 mV, was bemerkenswert gut mit den mittleren Werten des Ruhepotentials (gestrichelte Linie) und des V_{50} -Wertes der Aktivierung übereinstimmt.

4.1.4 Abhängigkeit der Aktivierung und Inaktivierung von der Kultivierungsdauer

Die halbmaximale Aktivierung (V_{50}) der Na^+ -Ströme veränderte sich mit zunehmender Kultivierungsdauer der Zellen zu negativen Werten hin (Abb. 4-5) und erreichte nach 5 Tagen vermutlich ein Plateau zwischen -20 und -25 mV, obwohl statt der Anpassung einer Exponentialfunktion auch ein linearer Trend möglich wäre ($P=0,074$, F-Test).

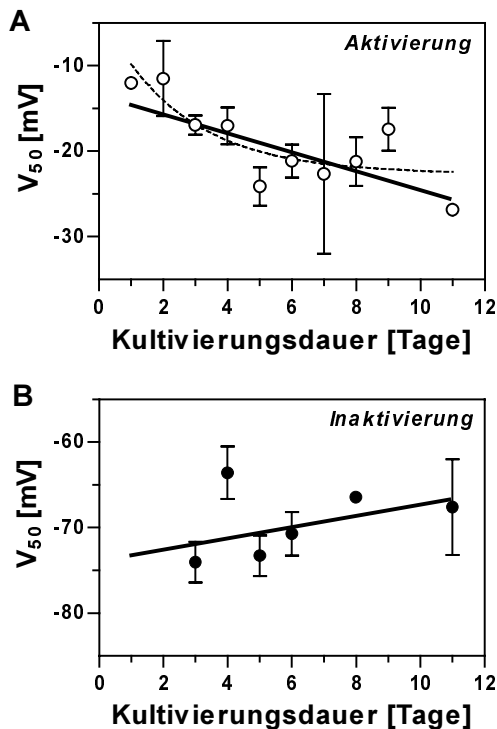


Abb. 4-5: Veränderung der halbmaximalen Aktivierung und Inaktivierung (V_{50}) mit der Kultivierungsdauer. (A) Bei der Aktivierung werden die Werte negativer und erreichen mit einer Halbwertszeit von 1,7 Tagen einen Plateauwert von $-22,6$ mV ($n=57$). (B) Die V_{50} -Werte der Inaktivierung tendieren zu positiveren Werten ($n=36$).

Die lineare Änderung der V_{50} -Werte für die Inaktivierung war nicht signifikant ($P=0,297$), der Mittelwert über alle Kultivierungsdauern betrug $-70,7 \pm 1,4$ mV ($n=36$). Wurden jedoch die V_{50} -Werte in zwei Gruppen geteilt und mittels t-Test verglichen, ergab sich bei einer Grenze von 3 Tagen ein P-Wert von 0,051 (4 Tage: $P=0,81$), d.h. vermutlich liegt der mittlere V_{50} -Wert bei jungen Zellen doch negativer als bei älteren und eine Zunahme im Laufe der Zeit lässt sich nicht ganz ausschließen. Bei der Aktivierung bestätigte sich mittels t-Test ebenfalls der Unterschied zwischen jüngeren und älteren Zellen, mit $P=0,0051$ (3 Tage) und $P=0,0006$ (4 Tage).

4.1.5 Membranströme durch Spannungsrampen

Die Potentialabhängigkeit des Membranstroms kann auch durch Spannungsrampen charakterisiert werden. Bei ausreichend kleiner Geschwindigkeit der Spannungsänderung tragen zum gemessenen Strom nur Ionenkanäle mit langsamer Kinetik bei; transiente Ströme im Millisekundenbereich, wie I_{NaT} , fallen weg.

Die durch verschiedene Spannungsrampen erzeugten I/V-Kennlinien zeigt Abb. 4-6A. Der größte Teil der spannungsaktivierten K^+ -Ströme wurde durch Cs^+/TEA blockiert. Mit

kleiner werdender Geschwindigkeit nahm die Amplitude der einwärts gerichteten Stromspitze ab, die ihr Maximum bei -30 bis -25 mV hatte. Dabei handelt es sich um den zu erwartenden Na^+ -Einstrom durch einen Teil der eNaK, die trotz der langsamen Depolarisation bei diesen positiven Potentialen noch aktivierbar blieben und bis über 5% der maximalen Na^+ -Stromamplitude I_{NaT} ausmachten. Erst bei einer Rampengeschwindigkeit von $350 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ verschwand dieser Strom nahezu vollständig.

Einzelne Zellen zeigten dagegen noch mit $230 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ einen Strom, der bei -40 mV aktivierte und dann dem zu erwartenden Strom bei der gegebenen Ionenverteilung folgte (Abb. 4-6B). Aufgrund von Problemen mit der Kompensation der Leckleitfähigkeit in den Zellen kann die Messung dieses kleinen persistierenden Stroms zunächst nur als Hinweis auf seine wahrscheinliche Existenz gesehen werden. Für seine Bestätigung ist die Durchführung weiterer Experimente notwendig, die jedoch über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen.

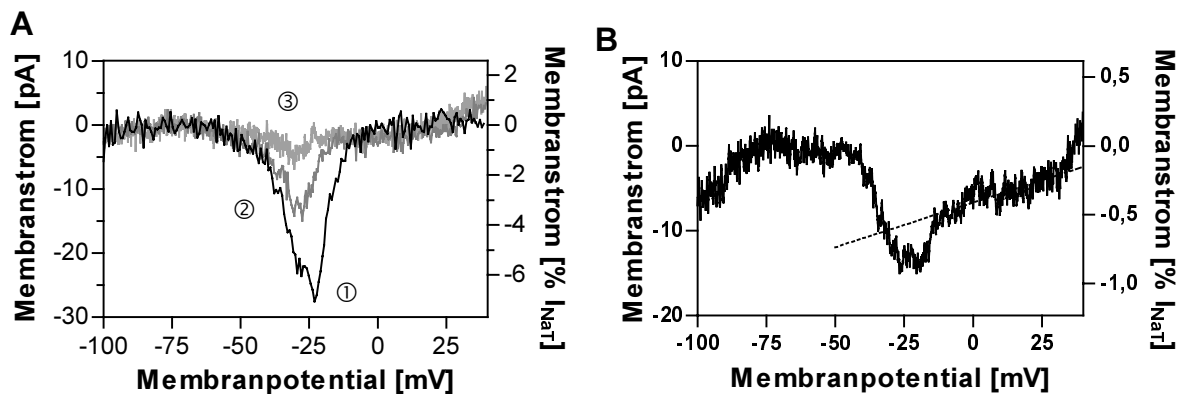


Abb. 4-6: Membranströme durch Spannungsrampen bei gleichzeitiger Blockierung von K^+ -Kanälen mit Cs^+/TEA . (A) Je geringer die Rampengeschwindigkeit (①: 1400 , ②: 700 und ③: $350 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$) desto kleiner war die Amplitude des Einwärtsstromes mit einem Maximum bei -25 bis -30 mV. (B) Bei nur noch $233 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ zeigte sich in einzelnen Fällen eine weitere Komponente, die bei positiven Potentialen nicht inaktivierte und möglicherweise einem persistierenden Na^+ -Strom I_{NaP} entsprach. Das Umkehrpotential des Stroms, bestimmt durch die Anpassung einer Geraden (gestrichelte Linie) kam dem Umkehrpotential für Natrium nahe.

4.1.6 Abhängigkeit der Na^+ -Stromamplitude von Kultivierungsdauer und Meßzeit

Aufgrund des viel größeren Pipettenvolumens gegenüber dem Zellvolumen kann davon ausgegangen werden, daß bereits wenige Minuten nach dem Erreichen der whole-cell-Konfiguration ein vollständiger Austausch der Pipettenlösung und von Substanzen mit einem Molekulargewicht bis ca. 1 kDa mit dem Zellinneren stattgefunden hat [58]. Um Pulsexperimente, z.B. zur TTX-Hemmung, mit möglichst konstanten Stromamplituden durchführen zu können, wurden die Messungen meist erst nach einigen Minuten begonnen. Vor dieser Zeit war häufig eine Zunahme der maximalen Na^+ -Stromamplitude

zu beobachten, die nach spätestens 5 bis 10 min in ein Plateau und in einigen Fällen wieder in eine leichte Abnahme überging (Abb. 4-7).

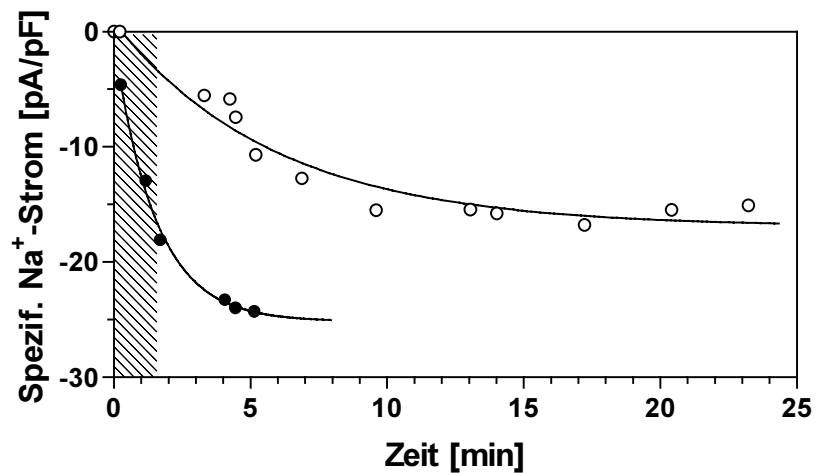


Abb. 4-7: Zunahme der spezifischen Na^+ -Stromamplitude mit der Meßzeit, d.h. der Zeit nach Erreichen der whole-cell Konfiguration, am Beispiel zweier Zellen. Nach 5 bis 10 min gingen die einer e-Funktion folgenden Meßwerte in ein Plateau über. In den meisten Fällen wurde die Hälfte des Plateauwertes innerhalb von 1 bis 2 min erreicht, so daß für einen Vergleich der frühen und späten Amplituden (s. Abb. 4-8) eine Grenze von 90 s festgelegt wurde (schraffierter Bereich).

Die Auswertung der maximalen spezifischen Na^+ -Ströme in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer und Meßzeit der Zellen ist in Abb. 4-8 zusammengefaßt. Die gemittelten Stromamplituden in den ersten 90 s nach dem Durchbrechen der Membran sind im Mittel kleiner als die späteren Meßwerte. Dieser Unterschied war jedoch nur bei Zellen signifikant, die für mindestens drei Tage in Kultur gehalten wurden. Außerdem ist zu erkennen, daß diese Zellen eine viel höhere Stromdichte aufwiesen als junge Zellen.

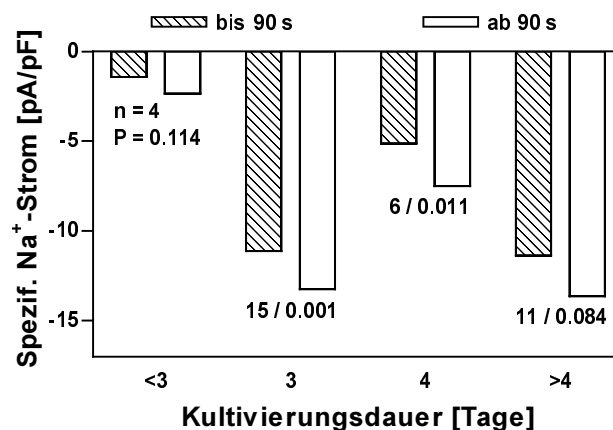


Abb. 4-8: Abhängigkeit der spezifischen Na^+ -Stromamplitude von Meßzeit und Kultivierungsdauer der Zellen. Zusammenfassung von 36 Experimenten, die wie in Abb. 4-7 durchgeführt wurden, jedoch mit Zellen verschiedenen Alters. Ein Unterschied zwischen frühen (schraffiert) und späten (nicht schraffiert) Na^+ -Stromamplituden war nur bei 3 und 4 Tage alten Zellen feststellbar. Die Anzahl der Vergleichswerte und die P-Werte der gepaarten t-Tests sind unter jedem Säulenpaar angegeben.

4.1.7 Regulation durch hCG

4.1.7.1 Kurzzeitige Applikation in Pulsexperimenten

Während durch die Applikation von hCG bei einer konstanten Klemmspannung von -70 mV kein Membranstrom ausgelöst werden konnte, zeigte sich in Puls-Experimenten ein Einfluß auf die Amplitude der wiederholt ausgelösten Na^+ -Peakströme (Abb. 4-9). In einer Konzentration von 10 IU/ml (maximal stimulierende Konzentration für die Produktion von Progesteron) führte hCG stets zu einer Reduktion der Amplitude um durchschnittlich 115 ± 86 pA ($n=28$).

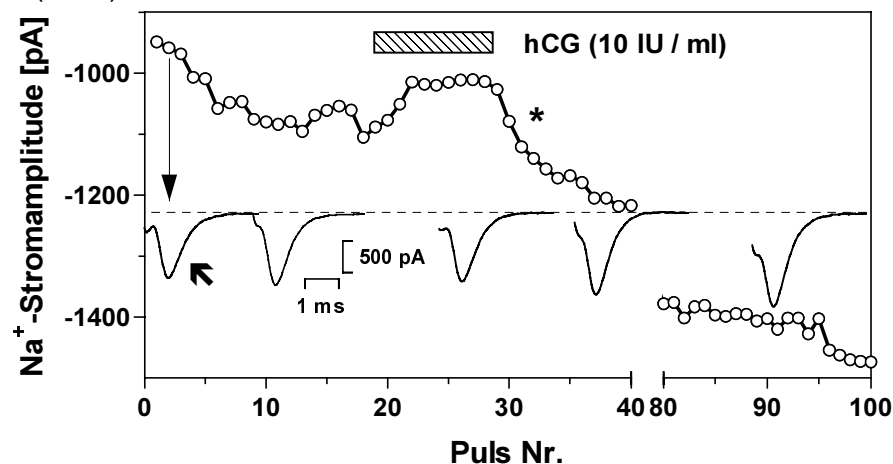


Abb. 4-9: Die Zunahme der Na^+ -Stromamplitude mit der Meßzeit (vgl. Abb. 4-8) wird durch hCG (10 IU / ml) reversibel blockiert. Nach Beendigung der Applikation ist die Erholung der Amplituden schneller, als es der allgemeinen Zunahme entspricht (*). Die zusätzlich dargestellten einzelnen Na^+ -Stromverläufe (↖) veranschaulichen das Ausmaß der absoluten Amplitudenänderung.

Wie aus Abb. 4-9 und Abb. 4-10 deutlich wird, überlagerte sich der Reduktion durch hCG die allgemeine Zunahme der Stromamplituden mit der Meßzeit (Abb. 4-7). In solchen Experimenten war die Plateauphase der Stromamplituden noch nicht erreicht, als mit der Applikation von hCG begonnen wurde. Der exponentielle Kurvenverlauf zu Beginn und Ende der Applikation (Abb. 4-9, *) hatte eine Halbwertszeit von ca. 2 s.

Die Amplituden-Reduktion durch hCG nahm im Verlauf der Meßzeit zu, was jedoch zum Teil durch die allgemeine Amplitudenzunahme erklärt werden kann. Betrachtet man die reduzierten Stromamplituden in Abb. 4-10, so erreichten sie bei allen drei Applikationen einen Wert zwischen -200 und -250 pA. Aus dieser Beobachtung kann geschlossen werden, daß die zunehmende Reduktion durch hCG und die allgemeine Zunahme der Amplituden auf dem gleichen Prozeß beruhen. Durch hCG wird offenbar die maximale Aktivierung oder Hemmung dieses Prozesses in einer Richtung ausgelöst, so daß immer derselbe absolute Wert erreicht wird. Die allgemeine Amplitudenzunahme stellt die zunehmende Aktivierung des Prozesses in der entgegengesetzten Richtung dar und erreicht seine Sättigung erst nach mehreren Minuten. Würde es sich um unabhängige

Prozesse handeln, wäre sehr wahrscheinlich eine Reduktion um stets den gleichen Betrag zu erwarten; in Abb. 4-10 hätte dann bei der dritten hCG-Applikation eine Reduktion auf ca. -300 pA statt -200 pA stattfinden müssen. Die Wirkung von hCG auf die Amplitude der Na^+ -Ströme sollte also teilweise über den gleichen Signalweg verlaufen, wie die allgemeine Amplitudenzunahme.

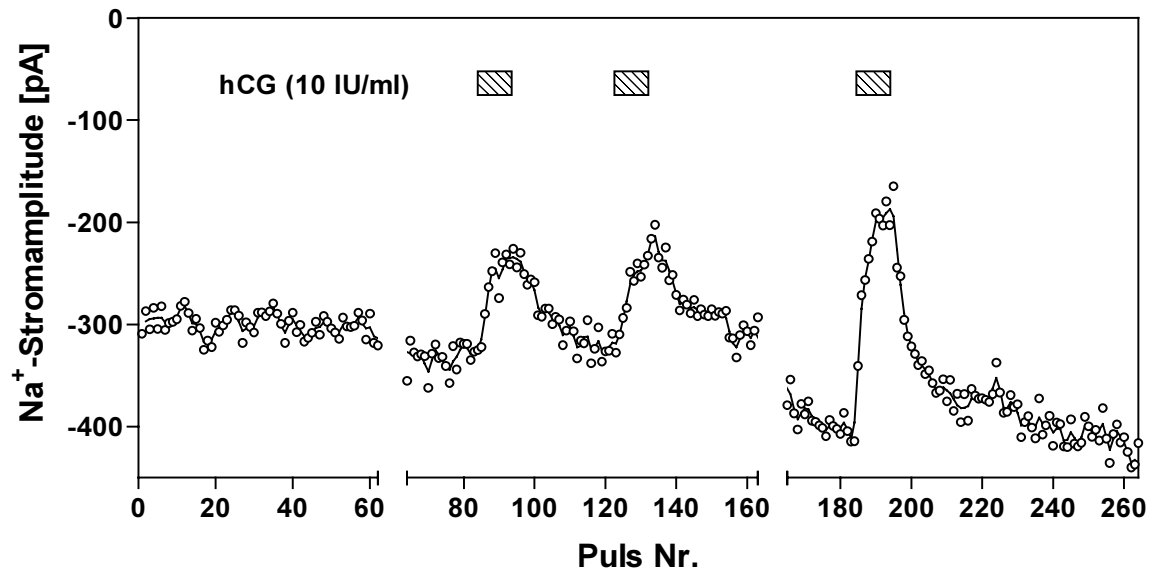


Abb. 4-10: Wird hCG erst appliziert, wenn die Na^+ -Stromamplitude über eine Minute hinweg nahezu konstant ist, kommt es zu einer deutlichen Hemmung der Amplituden mit jeweils exponentiellem Verlauf beim Ein- und Auswaschen der Substanz. Je länger die Messung fortgesetzt wird, desto ausgeprägter ist die Amplitudenreduktion.

4.1.7.2 Langfristige Wirkung von hCG auf Membranpotential und spezifischen Na^+ -Strom

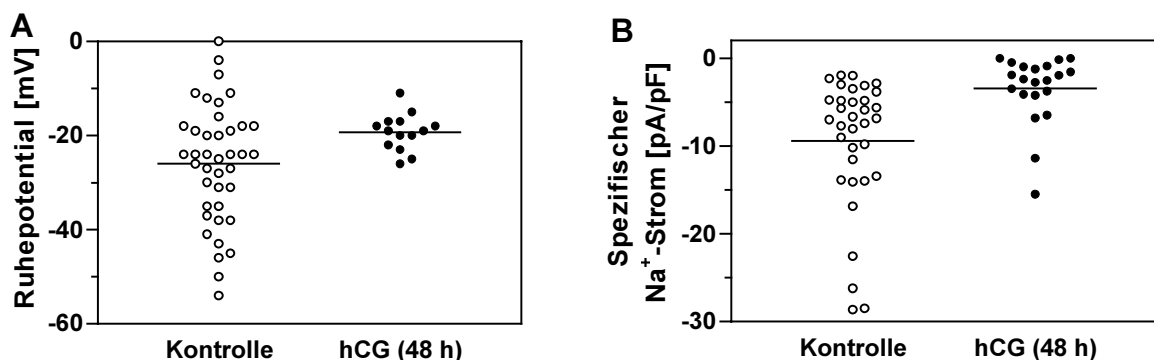


Abb. 4-11: Langfristige Wirkung von hCG auf das Ruhepotential (A) und die spezifische Na^+ -Stromamplitude (B) humaner GZ. Die Inkubation über 48 h führte jeweils zu einer mittleren Reduktion um $6,6$ mV (A) und $6,0$ pA/pF (B).

Neben dem kurzfristigen Effekt bei der Applikation von hCG in elektrophysiologischen Messungen konnten auch langfristige Wirkungen durch die Inkubation über 24 bzw. 48 h

mit hCG beobachtet werden. Änderungen der Morphologie und der Progesteronproduktion sind in 4.2.5 beschrieben.

Die Inkubation der GZ mit hCG über 48 h führte gegenüber Kontrollzellen (Alter 3 und 4 Tage) zu einer Verschiebung des Ruhepotentials (Abb. 4-11A) um $+6,6$ mV auf $-19,3 \pm 3,9$ mV ($n=14$, $P=0,0046$). Auch die spezifischen maximalen Na^+ -Ströme (Abb. 4-11B) waren bei den behandelten Zellen mit $-3,5 \pm 3,9$ pA/pF ($n=21$) kleiner ($P<0,001$) als bei den Kontrollen mit $-9,5 \pm 7,5$ pA/pF ($n=34$).

4.1.8 Untersuchung der interzellulären Kopplung (Gap junctions)

Die Simulation der vom Lock-in Modul ausgegebenen elektrischen Zellparameter R_M^* und C_M^* in Abhängigkeit des Kopplungswiderstandes R_K zeigt Abb. 4-12A. Die für beide Zellen festgelegten Werte von C_M und R_M betragen 30 pF und 1 G Ω . Die doppelte Gesamtkapazität C_M^* bei geringen Werten von R_K zeigt, daß gekoppelte Zellen elektrophysiologisch wie eine Zelle erscheinen und sich die einzelnen Kapazitäten addieren. Der Bereich, in dem C_M^* Änderungen von R_K widerspiegelt, erstreckt sich über ca. eine Größenordnung. Er liegt für eine Anregungsfrequenz von 110 Hz (gestrichelt) bei größeren R_K -Werten als für 270 Hz (durchgehende Linie). Die Abhängigkeit des Gesamtwiderstands R_M^* von R_K wäre dagegen für diese beiden Frequenzen nahezu gleich.

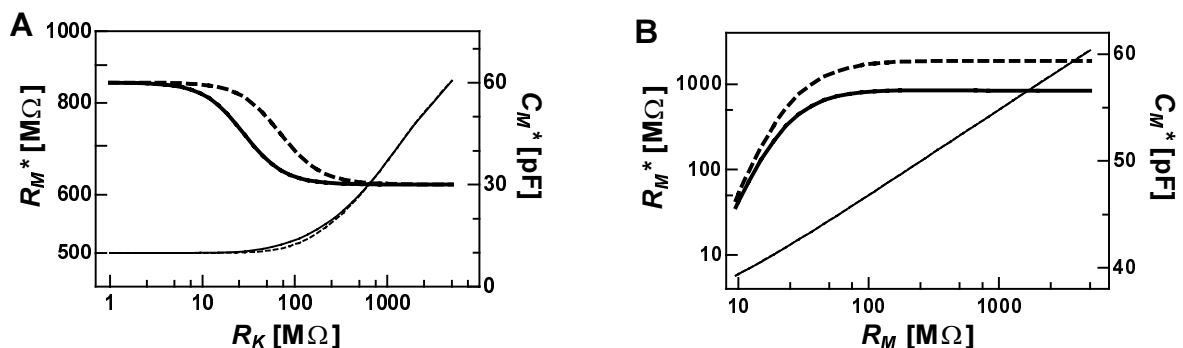


Abb. 4-12: (A) Numerische Simulation der von der Meßapparatur für das Ein-Zell-Modell bestimmten scheinbaren Zellparameter R_M^* (Eingangswiderstand, dünne Linie) und C_M^* (Kapazität, fett) in Abhängigkeit vom Kopplungswiderstand R_K und für das tatsächlich zugrundeliegende Zwei-Zell-Modell mit $C_M = 30$ pF und $R_M = 1$ G Ω für beide Zellen. (B) Einfluß des tatsächlichen Eingangswiderstands R_M auf die scheinbaren Zellparameter ($R_K = 50$ M Ω). Beide Simulationen wurden mit einer Anregungsfrequenz von 110 Hz (gestrichelt) und 270 Hz (durchgehend) berechnet.

Der mit dieser Meßmethode zu erwartende Einfluß des tatsächlichen Eingangswiderstands R_M auf C_M^* [65] sollte sich bei gekoppelten Zellen (R_K wurde zu 10 M Ω angenommen) erst ab R_M -Werten von kleiner als ca. 50 M Ω bemerkbar machen (Abb. 4-12B), darüber ist C_M^* unabhängig von R_M . Dagegen müßte sich R_M^* stets linear mit R_M verändern. Dies zeigt, daß eine Änderung der interzellulären Kopplung eher an einer

Änderung von C_M^* gemessen werden sollte, sofern die Aktivierung von Membranleitfähigkeiten nicht ausgeschlossen werden kann.

Die in Abb. 4-12 dargestellten Simulationen beziehen sich auf den Fall zweier gekoppelter GFSHR-17 Zellen. Die Ergebnisse für humane GZ stimmen damit qualitativ überein, doch sind die Effekte auf C_M^* wegen der größeren Kapazität der Zellen ausgeprägter. Dies gilt auch für den Fall mehrerer gekoppelter Zellen, in dem C_M und R_M von Zelle B im Zwei-Zell-Modell (Abb. 4-12B) zu 300 pF und 200 M Ω angenommen wurde, um einen Verbund von 5-6 Zellen zu repräsentieren.

Die theoretischen Berechnungen konnten schließlich durch konkrete Messungen bestätigt werden und zum Nachweis eines Effektes von FSH auf die Kopplung der GFSHR-17 Zellen verwendet werden [75]. Die vom Lock-in Modul berechneten Werte R_M^* , C_M^* und R_P^* wurden im Sekundenabstand ausgegeben, als Textdatei gespeichert und mit einem selbst entwickelten Programm für die spätere Auswertung vorverarbeitet. Testsubstanzen wurden mit dem in 3.8.2 beschriebenen System appliziert und die Zeiten protokolliert.

Abb. 4-13A zeigt Messungen bei zwei ungefähr gleich großen, zunächst gekoppelten GFSHR-17 Zellen, die einzeln meist eine Kapazität von 20 bis 30 pF aufwiesen. Nach kurzzeitiger Zugabe von Heptanol (1 mM) kam es zu einer Halbierung von C_M^* , was dem Ergebnis aus Abb. 4-13A entspricht. R_M^* stieg an und nahm während der folgenden Spülphase wieder ab, erreichte jedoch ebenso wie C_M^* , nicht mehr den Wert vor der Applikation von Heptanol.

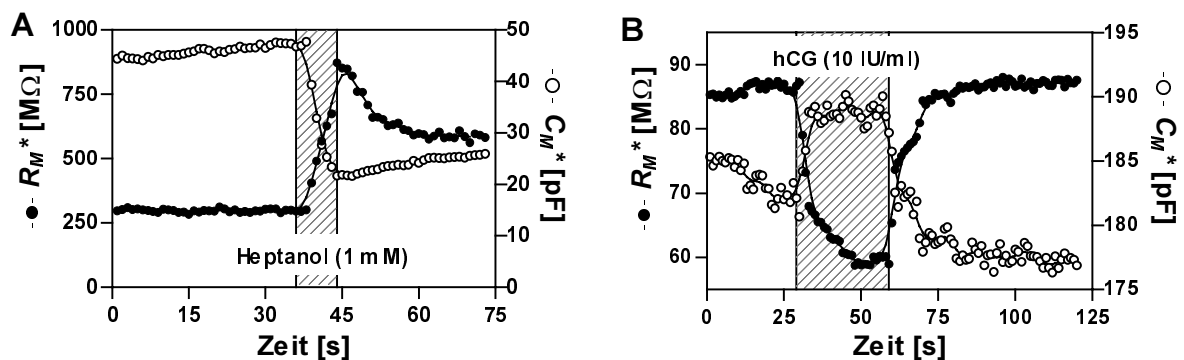


Abb. 4-13: Ergebnisse von Patch-clamp Experimenten an gekoppelten Granulosazellen. (A) Entkopplung zweier nahezu gleich großer GFSHR-17-Zellen durch Heptanol (1 mM). Das Schließen der Gap junctions spiegelt sich im Verlauf beider Parameter R_M^* und C_M^* wieder. (B) Die Applikation von hCG (10 IU/ml) führt vermutlich zur Öffnung von Gap junctions zwischen humanen GZ.

Die Applikation von hCG (10 IU/ml) führte bei einer Messung mit mehreren gekoppelten humanen GZ zur verstärkten interzellulären Kopplung (Abb. 4-13B), was sich an einer Abnahme von R_M^* und einer Zunahme von C_M^* zeigte. Die Ergebnisse waren jedoch insgesamt zu heterogen, um eine eindeutige Aussage machen zu können.

4.2 Bedeutung der Natriumkanal-Aktivität für die Zellmorphologie und -funktion

4.2.1 Morphologische Veränderungen

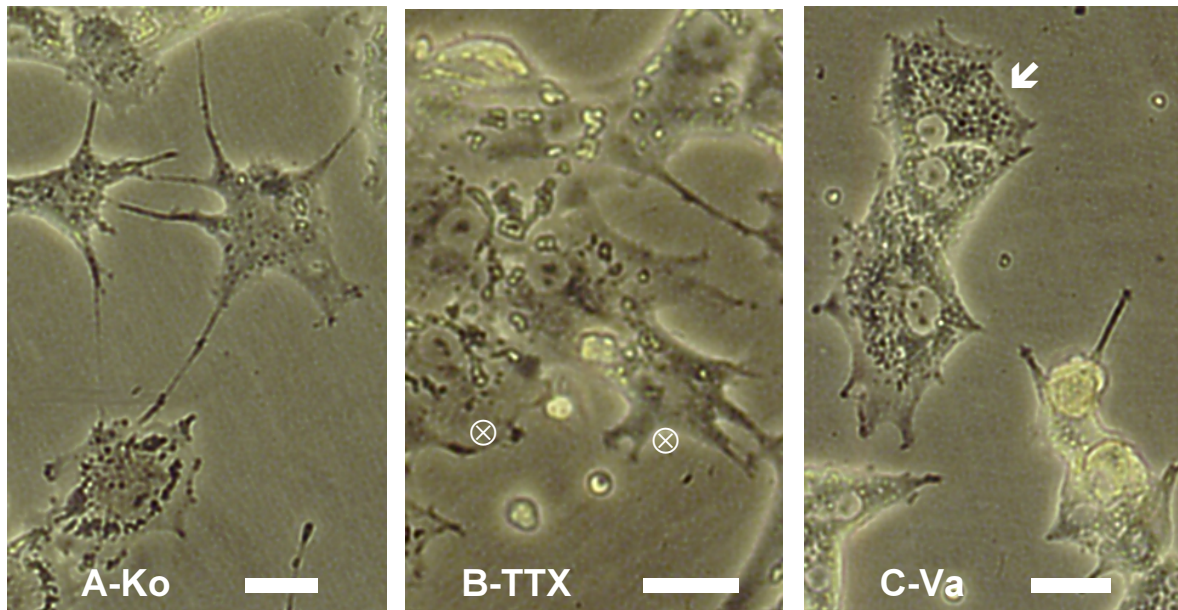


Abb. 4-14: Lichtmikroskopische Aufnahmen von humanen GZ am 2. Tag in Kultur (A), nach 24 h Inkubation mit TTX (B) oder Veratridin (C). Bei der Behandlung mit Veratridin ($50 \mu\text{M}$) zeigen die Zellen eine starke Granulation (↙). Nach TTX ($5 \mu\text{M}$) tritt dies viel seltener auf und die Zellen sind frei von heller granulärer Struktur im Zytoplasma (⊗). Skalierungsbalken: $30 \mu\text{m}$.

Die Inkubation der Zellen mit Veratridin und TTX für 24 oder 48 Stunden ließ bereits bei der Betrachtung im Lichtmikroskop eine unterschiedliche Wirkung dieser Substanzen auf die Zellmorphologie erkennen. Die mit TTX behandelten Zellen erschienen flach mit nur wenig sichtbaren intrazellulären Strukturen. Diese bestanden meist aus räumlich begrenzten, häufig um den Zellkern herum angeordneten kleinen dunklen Gebilden, bzw. um mehr peripher liegende hellere und größere (mutmaßliche) Lipidtröpfchen.

Im Gegensatz dazu waren die mit Veratridin behandelten Zellen derart mit granulären Strukturen angefüllt, daß insbesondere die hier ebenfalls gehäuft vorkommenden kleinen und abgerundeten Zellen den Eindruck einer rauhen Oberfläche erweckten. Diese Zellen erschienen heller und dicker als die anderen. Diese „Kontraktion“ von Zellen wurde zwar gelegentlich auch bei hCG-behandelten Zellen gefunden, jedoch ohne granuläre Struktur. Auch die abgeflachten Zellen zeigten eine starke Granulierung, die allerdings dunkel erschien. Unbehandelte und veratridinbehandelte Zellen zeigten eine größere Vielfalt an verschiedenen Zellformen als nach TTX oder hCG, obwohl in den Kontrollen die kontrahierten Zellen viel seltener waren. Demgegenüber zeigten die Zellen unter TTX und hCG eine viel einheitlichere Form. Zur Quantifizierung des morphologischen Unterschieds wurde in einem Stimulationsexperiment an zehn zufällig gewählten Stellen jeder Kulturschale die Zahl der im Gesichtsfeld sichtbaren Zellen bestimmt und eine mittlere Zelldichte von 260 ± 32 Zellen pro mm^2 Kulturschale errechnet. Sie zeigte zwischen den

Teilexperimenten (Kontrolle, hCG, TTX und Veratridin) keinen Unterschied ($n=10$, $P=0,19$, ANOVA). Aus der Anzahl der eindeutig „kontrahierten“ Zellen wurde deren Anteil an der gesamten Zellzahl ermittelt. Er lag bei unbehandelten und mit hCG oder TTX behandelten Zellen bei 10% (Abb. 4-15). Bei den mit Veratridin behandelten Zellen war der Anteil signifikant auf 25% erhöht ($P<0,001$, ANOVA).

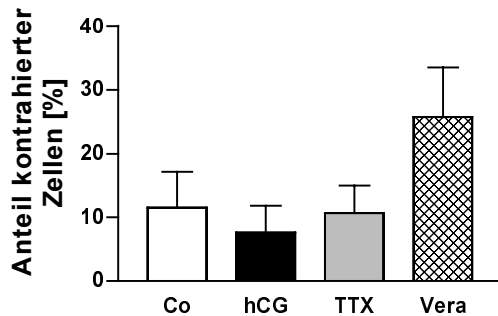


Abb. 4-15: Veratridin führt zu einer Zunahme kontrahierter Zellen. In einem Stimulations-experiment (24 h) wurde durch Zählung der Anteil dieser Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt. Er war bei Veratridin im Vergleich zur Kontrolle um das 2½-fache auf 25% erhöht ($P<0,001$, ANOVA); bei der Behandlung mit TTX bzw. hCG konnte kein signifikanter Effekt beobachtet werden.

4.2.2 Ultrastrukturelle Veränderungen

Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen von GZ konnten die morphologischen Veränderungen nach Inkubation mit Veratridin und TTX auch detaillierter untersucht werden. Die Zellen zeigten eine deutliche Zunahme sekundärer Lysosomen mit Veratridin (50 μM), die als Anhäufungen runder Strukturen erkennbar waren (Abb. 4-16C). Durch ihren größeren Durchmesser und ihre hellere Erscheinung unterscheiden sie sich von primären Lysosomen, die in allen Stimulationen schon allein durch ihre hohe Elektronendichte leicht erkennbar waren. Die genauere Betrachtung ließ zudem Strukturen innerhalb der sekundären Lysosomen erkennen, bei denen es sich vermutlich um aufgenommene Zellorganellen handelte.

Unbehandelte oder mit TTX behandelte Zellen (Abb. 4-16A und B) besaßen nur vereinzelt sekundäre Lysosomen, dagegen erschien die Zahl der intakten Mitochondrien höher zu sein, insbesondere bei TTX. Ansonsten zeigten die Zellen aller Stimulationen einen intakten Zellkern, rauhes und glattes ER sowie Lipidtröpfchen. Fragmente von Zellen oder ihren Kernen als Anzeichen für Apoptose waren nur sehr vereinzelt anzutreffen.

4.2.3 Ergebnisse der Lysosomenfärbung

Abb. 4-17 zeigt humane GZ nach Stimulation für 24 h (Abb. 4-17D: 48 h). In allen Fällen war die ungefähre Form der Zellen durch eine Rotfärbung erkennbar, wobei sich der Zellkern als dunkle Zone abhob. Bei stärkerer Vergrößerung war erkennbar, daß sich die Färbung auf Punkte konzentrierte, die den Lysosomen entsprachen und sogar feine Zellausläufer erkennen ließen (Abb. 4-17D). Viele der Zellen waren so stark abgeflacht, daß im verbleibenden Zytoplasma über und unter dem Kern offenbar keine Lysosomen Platz fanden.

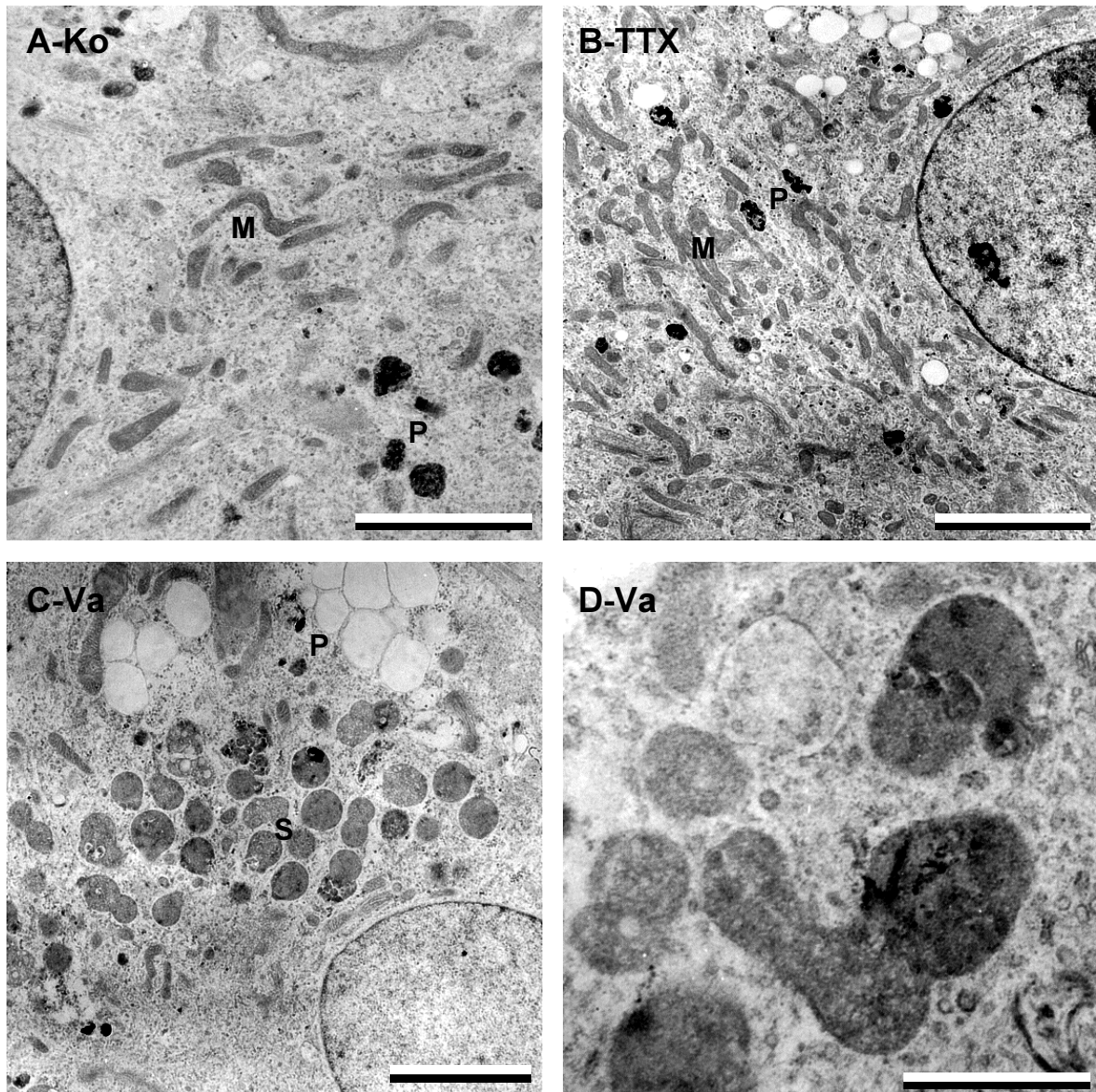


Abb. 4-16: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von GZ am 2. Kultivierungstag (A) nach 24 h Stimulation mit TTX (B) bzw. Veratridin (C, D). Kompakte und elektronendichte primäre Lysosomen (P) sind überall zu finden, während nach Veratridin (C) weniger Mitochondrien (M) und viele große sekundäre Lysosomen (S) auftreten. Bei diesen scheint es sich aufgrund des heterogenen Inhalts oft um Autophagosomen zu handeln, z.B. mit eingeschlossenen Mitochondrien (D). Oft konnte auch ein Verschmelzen der Strukturen beobachtet werden. Skalierungsbalken: 2,5 μm (A-C) und 0,8 μm (D).

Bei genauer Betrachtung schienen die Lysosomen der mit Veratridin behandelten Zellen größer zu sein als in unbehandelten oder mit TTX inkubierten Zellen. Dem entsprach auch die intensivere Gesamtfärbung der Zellen, obwohl nicht auszuschließen ist, daß sie durch eine größere Zahl von Lysosomen zustandekam. Darauf deutet die Beobachtung, daß die Zellen nach Veratridin bis in die Ausläufer hinein dicht mit Lysosomen angefüllt waren, während insbesondere bei den Kontrollzellen ihre Dichte zur Peripherie hin deutlich abnahm.

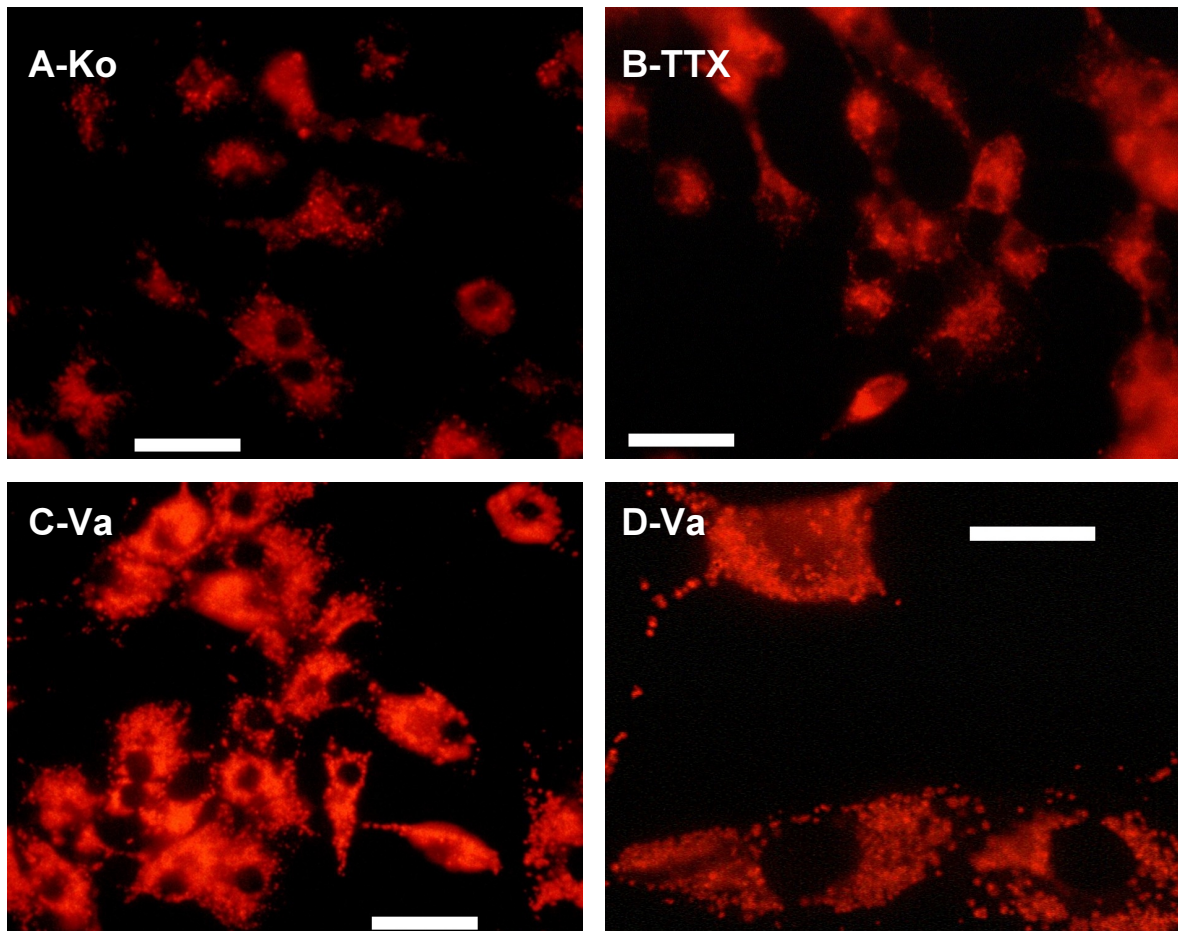


Abb. 4-17: Zunahme der Lysosomen nach Behandlung mit Veratridin. Während die Fluoreszenz durch den Lysosomenfarbstoff in Kontroll- (A) und TTX-behandelten (B) Zellen meist auf den zentralen Bereich des Zelleibs beschränkt ist, kommt es durch Veratridin (C) zu einer deutlich intensiveren Färbung, die bis in feine Zellausläufer verfolgt werden kann (D). Skalierungsbalken: 50 μm (A-C) und 20 μm (D).

4.2.4 Nachweis von Lysosomen im CL-Gewebe

Zum Vergleich der morphologischen Veränderungen in kultivierten humanen GZ mit lutealen Zellen *in vivo*, wurden Gewebeschnitte des CL aus dem Ovar des Menschen und des Affen mit immunhistochemischen Methoden und ultrastrukturell untersucht.

Als Marker für lysosomale Membranen wurde LAMP-1 (Lysosomal Associated Membrane Protein 1) verwendet. In Gewebeschnitten aus dem Ovar des Menschen (Abb. 4-18) und Affen ist eine deutliche zytoplasmatische Färbung im Bereich des CL zu erkennen, das sich vom ungefärbten restlichen Ovargewebe abhebt. Die Färbung innerhalb der Zellen ähnelt in der Verteilung der Fluoreszenzfärbung von Lysosomen in humanen GZ: Unter Aussparung des Zellkerns selbst ist ihre Intensität in unmittelbarer Kernnähe am größten und nimmt zur Peripherie hin ab. Die erkennbare Granulierung erinnert ebenfalls an die punktförmig konzentrierte Fluoreszenzfärbung (Abb. 4-17D).

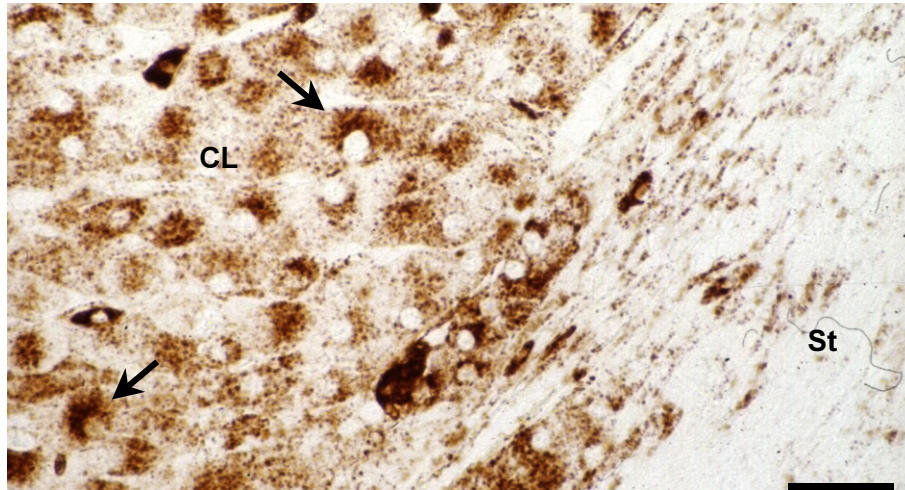


Abb. 4-18: Immunhistochemischer Nachweis des Lysosomen-Markers LAMP-1 an einem Semidünnschnitt aus dem Ovar des Menschen. Die spezifische Färbung ist auf den Bereich des Corpus luteum im linken Bildteil beschränkt. Skalierungsbalken: 40 μm .

Ultradünnschnitte von Zellen aus dem CL des Affen zeigten im Transmissions-Elektronenmikroskop, daß im funktionellen Teil der Lutealphase (Tag 7 und 11) vorwiegend homogen erscheinende, primäre Lysosomen auftraten, während sich sekundäre Lysosomen im regressiven CL (Tag 15, 16 und 18) häuften, erkennbar an ihrem heterogenen Inhalt (Abb. 4-19).

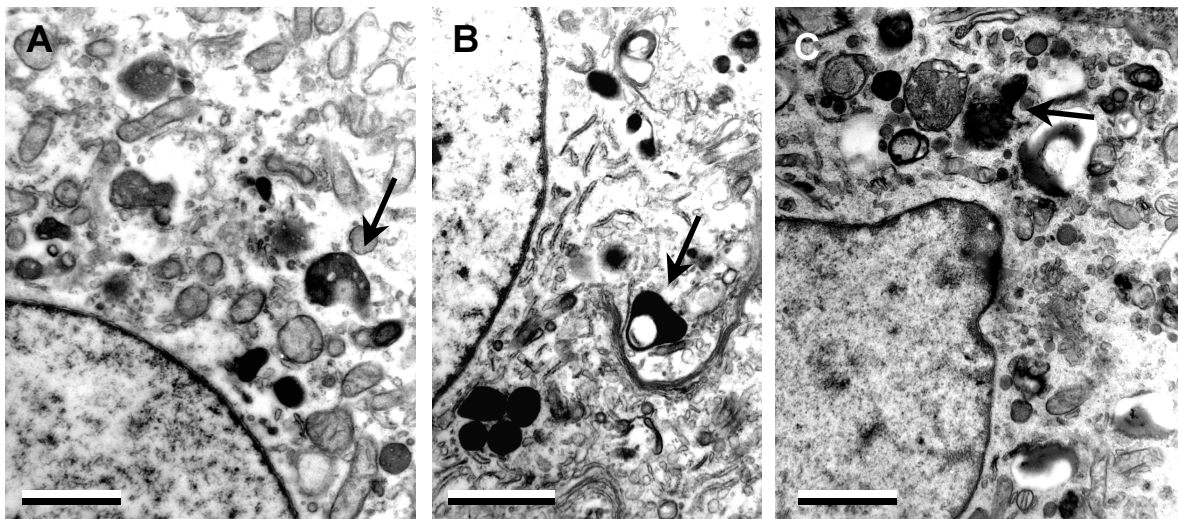


Abb. 4-19: Ultrastruktureller Nachweis von Lysosomen im CL des Rhesusaffen. (A) Tag 7, (B) Tag 11 und (C) Tag 18 der Lutealphase. Große sekundäre Lysosomen (Pfeile) sind vorwiegend in späten Phasen zu finden. Skalierungsbalken 1,3 μm .

4.2.5 Produktion von Progesteron

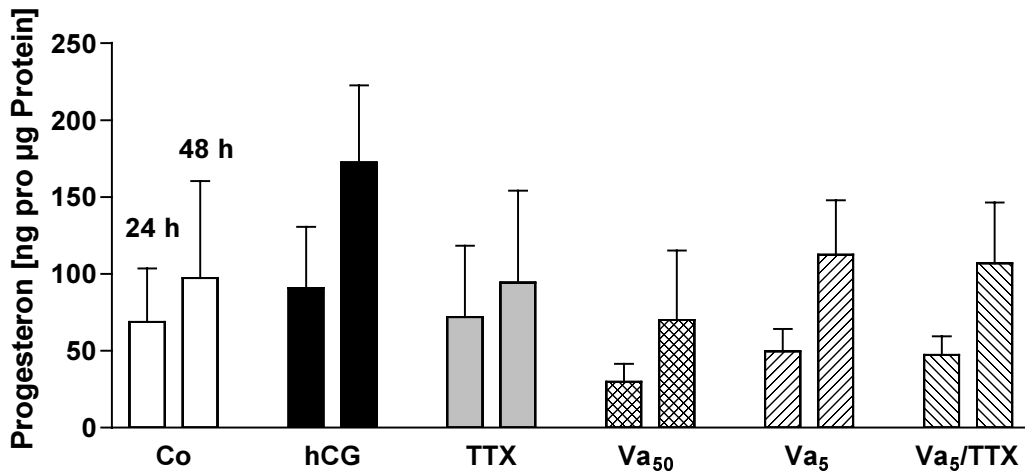


Abb. 4-20: Produktion von Progesteron nach unterschiedlicher Behandlung von humanen GZ für 24 und 48 h in Kultur. Die Aktivierung von eNaK durch Veratridin ($50 \mu\text{M}$) für 24 und 48 h führte zu einer Verminderung, während die Inkubation mit TTX ($5 \mu\text{M}$) keinen Effekt zeigte. Mit TTX war auch keine Aufhebung des Effekts von Veratridin ($5 \mu\text{M}$) nach 24 h möglich. Nur durch hCG (10 IU/ml) war eine Steigerung der Progesteronproduktion möglich

Abb. 4-20 zeigt das Ergebnis der Progesteronbestimmung von insgesamt 122 Kulturschalen mit GZ aus 30 Präparationen. Die Stimulationsdauer in den Experimenten belief sich auf 24 h bzw. 48 h. Dargestellt sind die volumenkorigierten und auf die gesamte Proteinmenge einer Kulturschale bezogenen Progesteronmengen. Da in einigen Experimenten eine Isolierung der RNA statt einer Bestimmung der Proteinmenge durchgeführt wurde, mußten die Progesteronmengen auf die mittlere Proteinmenge aus den übrigen Experimenten bezogen werden. Sie lag bei $81 \pm 34 \mu\text{g}$ und zeigte zwischen den verschiedenen Stimulationen keinen nachweisbaren Unterschied ($P=0,23$; ANOVA).

Die Anzahl der zur Mittelwertbildung verwendeten Progesteronbestimmungen ist Tab. 4-1 zu entnehmen. Ein Vergleich innerhalb der Behandlungsgruppen, zwischen den Werten der Stimulationen über 24 und 48 h (in Abb. 4-20 jeweils linke und rechte Säule), ergibt mittels t-Test jeweils eine Zunahme, außer für die unbehandelten und die mit TTX inkubierten Gruppen.

Die Abhängigkeit der Progesteronproduktion von den Stimulationssubstanzen ist in Tab. 4-1 ausgewertet. Dazu wurden, getrennt für die beiden Stimulationsdauern 24 und 48 h, die Einzelexperimente jeder Behandlungsgruppe und die entsprechenden Kontrollen mittels gepaartem t-Test verglichen.

So lag die Progesteronproduktion der GZ nach einer 24-stündigen Behandlung mit hCG um ca. ein Drittel höher als bei unbehandelten Zellen und verdoppelte sich ungefähr nach 48 h. Während TTX ($5 \mu\text{M}$) keinen Effekt zeigte, führte Veratridin in einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ zu einer Reduktion auf weniger als die Hälfte der Kontrollwerte nach 24 h.

Nach 48 h war dieser Effekt viel weniger ausgeprägt. Der P-Wert lag hier, wie auch für die 24-stündige Inkubation mit Veratridin (5 μ M) bzw. in kombiniert mit TTX (5 μ M) zwischen 0,01 und 0,1.

Tab. 4-1: Prozentuale Veränderung der Produktion von Progesteron durch Inkubation von humanen GZ mit hCG, TTX und Veratridin (Va) gegenüber unbehandelten Kontrollzellen. Die P-Werte beziehen sich auf einen Vergleich der absoluten Werte mittels gepaartem t-Test. Werte mit $P < 0,05$ sind hervorgehoben.

		Kont.	hCG	TTX	Va ₅₀	Va ₅	Va ₅ /TTX
24 h stim.	Unterschied (%)	---	+32,2	+4,5	-56,5	-27,8	-31,3
	Anzahl	16	13	12	13	7	6
	P gegen Co	---	0,004	0,7857	<0,0001	0,0603	0,0125
48 h stim.	Unterschied (%)	---	+77,5	-3,1	-28,1	+15,8	+9,9
	Anzahl	14	9	11	12	5	4
	P gegen Co	---	0,0054	0,2806	0,0729	0,6234	0,1364

4.3 Molekularbiologische Ergebnisse

4.3.1 Identifikation von Na⁺-Kanälen in humanen Granulosazellen und im Ovar

Um NaK in den verschiedenen Zellen und Geweben molekular zu identifizieren, wurden die dafür notwendigen PCR-Experimente unter Verwendung der *panNaK*-Primer durchgeführt. Dazu wurden die bekannten Sequenzen verschiedener NaK-Typen verglichen und die Primersequenzen aus Abschnitten gewählt, in denen eine möglichst große Übereinstimmung vorlag (Abb. 4-22, fett dargestellte Basen). Die Unterschiede im Bereich zwischen den Primern ermöglichten später die Identifikation isolierter Sequenzen, während seine Länge, und damit auch die zu erwartende Länge der PCR-Produkte, in allen Fällen 222 bp betrug.

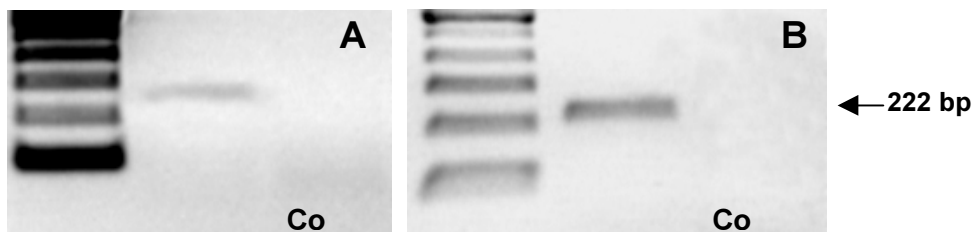


Abb. 4-21: Nachweis von Natriumkanal-mRNA in kultivierten humanen GZ (A) und aus einer cDNA-Bibliothek des humanen Ovars (B). Die PCR-Fragmente bei 222 bp wurden isoliert, kloniert und sequenziert. Co: Kontrollexperimente. Aus Gründen der besseren Qualität sind die Gelbilder negativ dargestellt.

Bei der aus humanen GZ isolierten mRNA mußte vor der PCR eine RT durchgeführt werden, während beim Ovar direkt eine cDNA-Bibliothek (Invitrogen) verwendet werden konnte. Nach Auftrennung im Agarose-Gel zeigten sich jeweils DNA-Banden bei einer Länge von 222 bp (Abb. 4-21).

4.3.2 Identifikation und zeitliche Regulation von eNaK im CL und Ovar des Rhesusaffen

Die vom Rhesusaffen verwendete mRNA stammte aus dem gesamten Ovar und aus CL-Gewebe am Tag 5, 7, 10 und 14 der Lutealphase. Nach semiquantitativer RT-PCR (Koamplifikation von Cyclophilin, jedoch nicht bei der Ovar-Probe) zeigten sich in allen Fällen Amplifikate der erwarteten Länge (222 bp, Abb. 4-23A), die durch Sequenzierung als eNaK identifiziert werden konnten.

Die Intensitäten der Banden wurden als Integral der Grauwerte quantifiziert (Abb. 4-23B) und zeigen für eNaK und Cyclophilin einen antiparallelen Verlauf, mit einer Zunahme von eNaK über den gesamten Zeitbereich.

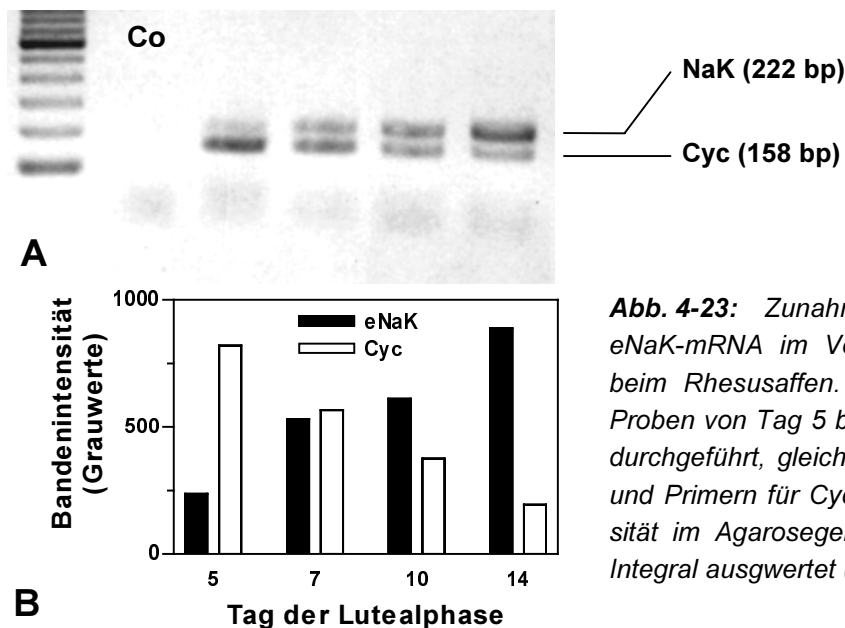


Abb. 4-23: Zunahme der Transkription von eNaK-mRNA im Verlauf der CL-Entwicklung beim Rhesusaffen. Es wurden RT-PCR mit Proben von Tag 5 bis Tag 14 der Lutealphase durchgeführt, gleichzeitig mit panNaK-Primern und Primern für Cyclophilin. Die Bandenintensität im Agarosegel (A) wurde gemäß ihrem Integral ausgewertet (B).

4.3.3 Zunahme von eNaK mit der Kultivierungsdauer der humanen GZ

Einen Hinweis auf die mögliche Zunahme der eNaK Transkription in humanen GZ lieferte die semiquantitative RT-PCR von mRNA aus Zellen vom 1. und 5. Kultivierungstag. Die Stärke der eNaK DNA-Bande nimmt im gezeigten Beispiel nach Standardisierung auf die Koamplifikation von α -Tubulin (528 bp) um das 5,2-fache zu (Abb. 4-24).

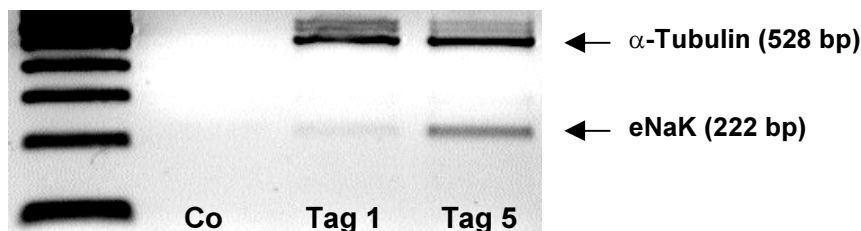


Abb. 4-24: Zunahme der Transkription von eNaK-mRNA in humanen GZ vom 1. auf den 5. Tag in Kultur. Zum Vergleich wurden Primer für α -Tubulin verwendet. Das Gelbild wurde zur besseren Darstellung kontrastverstärkt.

4.3.4 Regulation der eNaK mRNA Transkript-Mengen durch hCG

Neben der innerhalb von Sekunden einsetzenden, hemmenden Wirkung auf die Na⁺-Stromamplitude zeigte sich, daß die langfristige Behandlung von humanen GZ mit hCG eine verringerte mRNA-Menge für den eNaK zur Folge hatte. In Abb. 4-25 ist dies an zwei von drei Experimenten gezeigt, bei denen für 24 h (48 h nicht dargestellt) mit hCG stimuliert und anschließend die extrahierte RNA mittels Northern Blot aufgearbeitet wurde. Die Hybridisierung mit einer eNaK-Sonde lieferte eine Bande bei ca. 7,5 kb. Um eine Normierung durchführen zu können, wurde anschließend mit einer weiteren Sonde β -Aktin detektiert. Als Maß für die Intensität der Banden wurde das Integral der Grauwerte verwendet und auf den entsprechenden Wert für β -Aktin bezogen. In drei Experimenten mit hCG ergab sich eine Reduktion der mRNA für eNaK auf 36% und 0% des Kontrollwertes (nach 24 h) und auf 68% (nach 48 h).

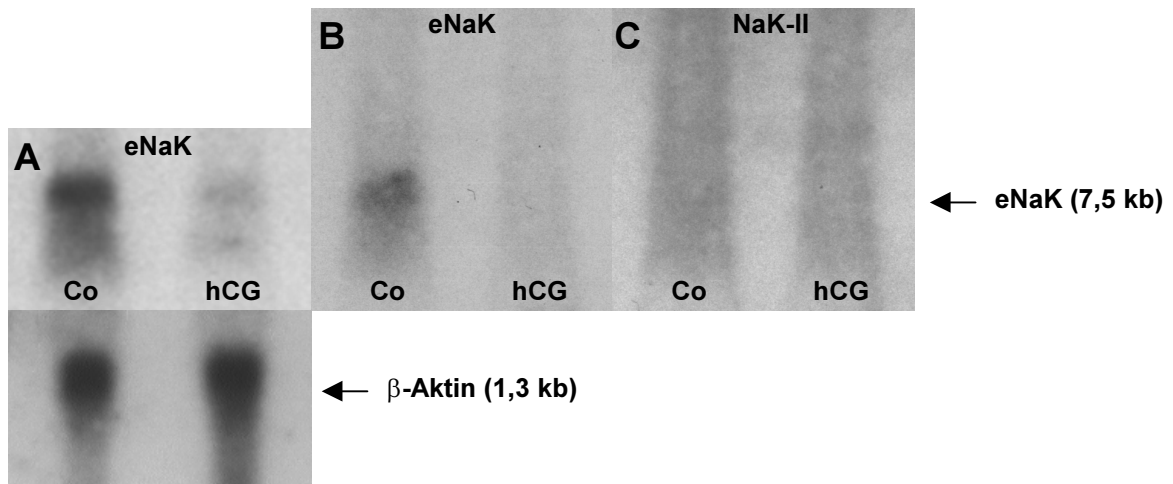


Abb. 4-25: Hemmung der Transkription von eNaK in humanen GZ durch Inkubation mit hCG für 24 h (jeweils rechte Spur in A - C, unbehandelte Kontrolle links). Die Hybridisierung von Northern blots zeigte bei Verwendung einer radioaktiv markierten Sonde für eNaK eine deutliche Abnahme der Bandenintensität in zwei Experimenten (A, oben und B). Die Kontrolle mit β -Aktin zeigte keine Veränderung (nur dargestellt bei A, unten). Die Verwendung einer Sonde für den NaK Typ II zeigte weder vor noch nach Inkubation mit hCG eine spezifische Bande (C).

In einem weiteren Experiment wurde zur Hybridisierung eine Sonde für den NaK- Gehirn II Typ (*HUMHBAX*) verwendet, die mit der aus dem menschlichen Ovar isolierten Sequenz Ov2 hergestellt wurde. Dabei wurde weder in der Kontrolle noch nach hCG eine Bande detektiert, so daß zumindest beim Beginn der Kultivierung von humanen GZ ein Vorkommen dieser Form des spannungsaktivierten NaK ausgeschlossen werden kann.

5 Diskussion

Die Möglichkeit systemischer Untersuchungen beim Menschen beschränkt sich auf die Bestimmung von Hormonspiegeln im Plasma und die Beobachtung von Veränderungen durch klinische Eingriffe, z.B. der Entfernung von Ovarien. Die zunehmende Anwendung der IVF-Technik in den letzten beiden Jahrzehnten ermöglichte Experimente mit isolierten Granulosazellen in Primärkultur. Sie werden bei der Punktion reifer Follikel für die Oozytengewinnung mit abgesaugt und normalerweise verworfen.

Das CL ist ein heterogenes, aus verschiedenen Zelltypen (endokrine, Gefäß-, Immun- und Bindegewebszellen) aufgebautes Organ, deren Zusammensetzung sich während seiner Lebensdauer stark ändert. Die GZ stellen das größte "endokrine" Kompartiment des CL dar. Untersuchungen zur Funktion dieser Zellpopulation können zusammen mit anderen Aspekten der Entwicklung des CL ein Gesamtbild seiner Stellung im Zyklus ergeben. Die während der IVF gewonnenen luteinisierten GZ bieten zudem die Möglichkeit, Kulturbedingungen für bestimmte Fragestellungen genau vorgeben zu können. Auch ist ein Zugriff auf Einzelzellen möglich, um schnelle Prozesse der Signaltransduktion mit elektrophysiologischen Methoden untersuchen zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression und Funktionalität eines spannungsaktivierten, TTX-sensitiven Natriumkanals in humanen GZ gezeigt. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, daß seine Aktivität mit der funktionellen und strukturellen Luteolyse in Zusammenhang steht und durch hCG negativ reguliert wird.

5.1 Molekulare Identifikation von Na⁺-Kanälen im Ovar

Spannungsaktivierte Ionenkanäle für Natrium, Calcium und Kalium bilden eine Familie von Membranproteinen, deren α -Untereinheiten viele strukturelle Gemeinsamkeiten aufweisen [9;39]; dies betrifft insbesondere ein als Spannungssensor fungierendes Transmembransegment. Die erste cDNA eines NaK wurde aus einem elektrischen Fisch isoliert [53], aus Säugern sind inzwischen die Sequenzen von mindestens zehn Isoformen bekannt [29;56]. Einige Kanaltypen werden in bestimmten Geweben gehäuft exprimiert, beispielsweise im ZNS, PNS oder in Muskelgewebe, wobei im Nervensystem neben Neuronen auch Schwann-Zellen und Astrozyten Na⁺-Kanäle besitzen, Oligodendrozyten jedoch nicht [4;34]. Auch von Phasen der Ontogenese kann die NaK-Expression abhängig sein oder sich auf spezielle subzelluläre Bereiche beschränken, wie Ranvier'sche Schnürringe und Wachstumskegel bei Neuronen oder Zytoplasmfortsätze von Astrozyten [77;85].

Das unerwartete Vorkommen von NaK-mRNA in humanen GZ und im Ovar konnte mittels RT-PCR und Northern Blot-Experimenten eindeutig gezeigt werden. Die verwendeten Primer wurden aus dem Bereich der ersten intrazellulären Schleife zwischen den

Domänen I und II des Proteins gewählt und waren homolog zur Sequenz mehrerer Kanal-typen, wogegen der dazwischenliegende Sequenzbereich nur eine geringe Übereinstimmung von maximal 50% aufwies. Dies erlaubte nach Subklonierung und Sequenzierung der Amplifikate die Identifizierung der vorkommenden Typen. Bei den GZ handelte es sich zu allen untersuchten Kultivierungszeiten um den erstmals aus neuroendokrinen Zellen (C-Zell-Karzinom) isolierten Kanal "hNE-Na" (GenBank # X82835), der beim Menschen mit "SCN9A" bezeichnet wurde [29]. Orthologe Sequenzen wurden auch bei der Ratte in peripheren Neuronen und in der Nebenniere und Schilddrüse des Rindes nachgewiesen, nicht jedoch im Hoden, Herz, Gehirn oder der Hypophyse [38]. Sein verbreitetes Vorkommen legt nahe, daß dieser NaK-Typ für neuroendokrine Zellen nicht so spezifisch ist, wie zuerst angenommen wurde; in der vorliegenden Arbeit wird er daher auch als "eNaK" bezeichnet. In einer cDNA-Bibliothek des humanen Ovars konnte er neben einem Kanaltyp nachgewiesen werden, der bisher nur in ZNS-Neuronen und Schwann-Zellen gefunden wurde ("HUMHBAX" / SCN2A). Dies läßt sich möglicherweise durch neuronentypige Zellen im Ovar erklären, die bereits im Rhesusaffen nachgewiesen wurden [16;47]. Eine Herkunft aus GZ konnte ausgeschlossen werden, da die Verwendung einer SCN2A-spezifischen Sonde im Northern Blot kein Hybridisierungssignal lieferte. Umgekehrt legt die Beschränkung der neuronentypigen Zellen auf das ovarielle Stroma und die Isolierung von SCN9A aus dem CL-Gewebe des Affen nahe, daß die steroidproduzierenden GZ in Primaten den hauptsächlichsten Ort der Expression von SCN9A darstellen.

Die orthologe Sequenz von SCN9A im Rhesusaffen war im überdeckten Bereich mit der des Menschen identisch. Aufgrund der vergleichsweise hohen Homologie zu SCN8A darf eine ähnliche Position der Exongrenzen auch beim eNaK erwartet werden. Darauf deutet die Sequenz an einer Stelle für alternatives Splicen hin, die zwischen "hNE-Na" [38] und "PN1" [69] verschieden ist: "hNE-Na" enthält die um 11 Aminosäuren kürzere Version des Exons 10C von SCN8A. Es ist daher anzunehmen, daß auch beim eNaK der amplifizierte Bereich die Grenze zwischen Exon 10A und 10B einschließt und somit eine Amplifikation genomischer DNA ausgeschlossen werden kann.

Die Transkriptlänge der im Northern Blot nachgewiesenen mRNA für eNaK betrug 7,5 kb. Weitere Banden bei 9,4 kb [38] oder 11 kb, wie für das Ratten-Ortholog gezeigt [69], wurden nicht gefunden.

Über die Regulation der Expression von NaK im Allgemeinen ist wenig bekannt. In lutealen Zellen des Rhesusaffen konnte durch semiquantitative RT-PCR eine Zunahme der mRNA für eNaK im Verlauf der Lebensdauer des CL gezeigt werden, d.h. von seiner Entwicklung (Tag 5) über die funktionelle Phase (Tag 10) bis zur Regression (Tag 14). Aus der gleichzeitigen Abnahme der Bandenintensität für Cyclophilin läßt sich schließen, daß die beiden cDNAs um die Nukleotide konkurrierten und tatsächlich eine Zunahme der mRNA für eNaK stattfand. Diese Beobachtung wird unterstützt durch eine 5-fache

Zunahme der eNaK-mRNA in humanen GZ vom ersten auf den fünften Kultivierungstag. Daß aus der beobachteten Zunahme von mRNA auch eine verstärkte Expression und der Einbau aus dem intrazellulären Pool in die Membran erfolgt, zeigt die ebenfalls ansteigende Stromdichte.

Eine negative hormonelle Regulation der Transkription von eNaK zeigten ebenfalls die Northern Blot-Experimente, bei denen humane GZ für 24 h oder 48 h mit hCG inkubiert wurden. Während die mRNA-Menge des zur Kontrolle verwendeten β -Aktins wenig unterschiedlich war, nahm die Bandenintensität für eNaK stark ab, in einem Fall konnte sie nicht mehr detektiert werden.

Die Expression von NaK in Neuronen und Gliazellen ist ein dynamischer Prozess. Einige neurosekretorische Zellen des Nucleus supraopticus reagieren auf einen Anstieg der Plasmaosmolarität mit einer hohen Frequenz von Aktionspotentialen [82]. Dies wird durch eine verstärkte Expression unterschiedlichen Ausmaßes der NaK-Typen α -II und Na6 in der Ratte (ortholog zu SCN2A und SCN8A) bewirkt, wobei Na6 über einen persistierenden Na^+ -Strom die Feuerschwelle erniedrigt.

Sensorische Neurone in Spinalganglien zeigen einen transienten (I_{NaT}) und einen persistierenden Na^+ -Strom I_{NaP} , der TTX-resistent ist [61]. Nach Axotomie wurde beobachtet, daß die Expression der dem I_{NaP} zugrundeliegenden Kanaltypen SNS und NaN (ortholog zu SCN10A und 11A) herunterreguliert und jener vom Typ III NaK hochreguliert wird [15;18;89]. Dies resultiert in einer größeren Erregbarkeit ("bursting"-Verhalten), die vermutlich mit neuropathischem Schmerz in Zusammenhang steht [17]. Durch NGF und GDNF kann das Verschwinden von SNS und NaN verhindert werden. Eine ähnliche positive Regulation durch von Neuronen freigesetzte trophische Faktoren unbekannter Natur wurde für einen in Astrozyten beschriebenen NaK belegt. Die verstärkte Expression TTX-resistenter NaK findet in Muskelzellen nach Denervation oder bei einer Verletzung von Astrozyten statt und wird allgemein mit einem dedifferenzierten Zelltyp assoziiert [44].

Statt indirekt über den Entzug eines trophischen Faktors, wurde von einem direkten supprimierenden Einfluß auf die Expression von NaK bisher in keinen anderen Zellen berichtet. Doch muß in GZ erst noch gezeigt werden, ob es tatsächlich hCG selbst, oder ein durch hCG induziertes Genprodukt ist, das den eigentlichen Inhibitor der Transkription von eNaK darstellt, wie z.B. Steroide, Relaxin oder Oxytozin.

Durch die Ausstattung mit NaK-Typen unterschiedlicher Eigenschaft und Funktion können Neurone und andere Zellen die für ihre Aufgabe notwendige Erregungsfähigkeit oder Ionenverteilung regulieren. Dies ermöglicht die gezielte Entwicklung spezifischer aktiver Substanzen für experimentelle und therapeutische Ansätze.

5.2 Charakterisierung der Na⁺-Ströme in humanen Granulosazellen

Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung des eNaK in humanen GZ war ähnlich, wie sie in HEK 293-Zellen beschrieben wurde, in denen die α -Untereinheit exprimiert worden war. Wichtig ist, daß sie sich auch bei Anwesenheit der β_1 -Untereinheit nicht änderte [38]. In GZ waren die mittleren V_{50} -Werte ab einem Kultivierungsalter von 5 Tagen um ca. 5 mV positiver als der im Rahmen einer anderen Arbeit gefundene Wert von -26 mV [14], ebenfalls in HEK 293-Zellen. In GZ war die Steilheit des Stromanstiegs über einen Potentialbereich von ca. 25 mV bis zur maximalen Aktivierung flach, was trotz ihrer ausgedehnten Form und teilweise dünnen Ausläufern auf eine gute Spannungsklemme über die gesamte Membranfläche schließen läßt. Der V_{50} -Wert der Inaktivierung war in HEK 293-Zellen jedoch mit -78 mV [14] um ca. 10 mV negativer als in humanen GZ, was durch einen längeres Präpulspotential erklärbar ist. Seine Verlängerung von 8 auf 512 ms führte in einer humanen Medulloblastomlinie zu einer Verschiebung um 35 mV zu negativen Potentialen hin [19], was langsamen Komponenten der Inaktivierung zugeschrieben wird. Trotz langem Präpuls wurde in [38] ein V_{50} -Wert der Inaktivierung von -60 mV beobachtet, der sich bei Anwesenheit der β_1 -Untereinheit auf -40 mV verschob. Die Untersuchung des in Xenopus-Oozyten exprimierten und zu eNaK orthologen Kanals PN1 ergab für die Inaktivierung einen V_{50} -Wert von -78 mV (Präpulsdauer 10 s) und auch die Aktivierung war mit -31 mV negativer als in humanen GZ [69].

Die Versuche zur Hemmung mit TTX ergaben übereinstimmend, daß es sich bei eNaK um einen TTX-sensitiven Kanal handelt. Der IC_{50} -Wert in humanen GZ lag mit 7,7 nM zwischen den Messungen für PN1 (4,3 nM) und hNE in HEK 293-Zellen (25 nM). Das Vorhandensein eines weiteren, TTX-resistenten NaK zu den untersuchten Kultivierungszeiten, konnte durch die vollständige Blockierung des gesamten Stroms ausgeschlossen werden.

Die Zunahme des spezifischen Na⁺-Stroms über mehrere Minuten nach dem Durchbrechen der Zellmembran spiegelt vermutlich eine fortschreitende Dephosphorylierung des eNaK wieder. Dies könnte auf eine verringerte Aktivität der PKA zurückzuführen sein [41], da auf ein energieerhaltendes System in der Pipettenlösung verzichtet wurde und auch der cAMP-Spiegel in der Zelle durch zunehmende Auswaschung abnehmen konnte. Die maximale Stromdichte nahm nach 2 Tagen in Kultur um das Vierfache zu. Ob danach ein weiterer Anstieg erfolgt ist unklar, doch deckt sich diese Beobachtung mit der Zunahme von eNaK mRNA in humanen GZ, so daß die Stromzunahme in diesem Fall mit einer verstärkten Expression des Proteins in Verbindung zu bringen ist. Es erscheint plausibel, daß auch die im Verlauf der Lutealphase ansteigende mRNA-Menge im CL des Affen zu einer höheren eNaK-Dichte führt.

Wenn der Phosphorylierungszustand bestimmend für die maximale eNaK-Stromamplitude ist, sollte sie auch durch Substanzen beeinflussbar sein, die am Beginn der Signalwege für die Aktivierung und Deaktivierung von Proteinen stehen. Für die FSH- und LH/hCG-Rezeptoren von GZ ist bekannt, daß sie eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch die Aktivierung der Adenylat-Zyklase bewirken. Die Applikation von hCG (10 IU/ml) während der wiederholten Auslösung von I_{NaT} führte zu einer Reduktion der maximalen Stromamplitude innerhalb von 4-5 s und erreichte dann einen konstanten Wert. Experimente, bei denen hCG noch in der Phase ansteigender Amplituden des I_{NaT} getestet wurde, zeigten eine zunehmende Hemmung von I_{NaT} auf ein ähnliches Absolutniveau im Verlauf der gesamten Meßzeit. Dies spricht bereits für eine zumindest teilweise Übereinstimmung des Signalwegs beider Prozesse, jedoch mit entgegengesetztem Wirkmechanismus.

Damit wird das folgende Modell gestützt, nach dem sich die eNaK in humanen GZ zu Beginn der Lutealphase größtenteils im phosphoryliertem Zustand befinden und aufgrund dessen nur einen geringen Na^+ -Einstrom ermöglichen. Im Experiment kommt es, vermutlich durch einen sinkenden cAMP-Spiegel und Dephosphorylierung, zu einer Stromzunahme, die durch hCG teilweise wieder rückgängig gemacht wird. Es ist daher anzunehmen, daß durch LH / hCG indirekt eine Phosphorylierung von eNaK stattfindet. Konsequenterweise sollte in der frühen Lutealphase die Expression von eNaK zunächst keine Folgen für Morphologie und Funktion der Zellen haben. Erst bei einem Absinken des LH-Signals werden die bis dahin "stummgeschalteten" eNaK aktiv.

Analog zur Verminderung der mRNA-Menge für eNaK konnte nach zweitägiger Inkubation mit hCG eine geringere spezifische Stromamplitude (I_{NaT}) gemessen werden, d.h. hCG beeinflusst über eine negative Regulation der Expression die Aktivität der eNaK. Unter der Annahme, daß der mutmaßliche I_{NaP} ebenfalls proportional zur Dichte der Kanäle ist, kann hCG so den Einstrom von Na^+ hemmen.

Bei der Expression von hNE-Na (SCN9A) in HEK 293-Zellen konnten Aktionspotentiale ausgelöst werden, nachdem die Kanäle durch eine vorausgehende Hyperpolarisation in den aktivierbaren Zustand gebracht worden waren [38]. Warum dies bei isolierten humanen GZ nicht möglich ist, kann verschiedene Gründe haben. Die eNaK-Dichte von 0,3 Kanälen pro μm^2 Membranfläche ist mit der Dichte von NaK in den meisten Astrozyten vergleichbar und möglicherweise zu gering, um einen ausreichenden Na^+ -Strom für die Umpolung des Membranpotentials zu generieren. Dies kann an einer gegenüber der Na^+ -Leitfähigkeit zu großen Leitfähigkeit für K^+ liegen, wie in Astrozyten gezeigt wurde [76]. Der hohe Eingangswiderstand von mehreren Gigaohm in GZ bedingt eine lange Membranzeitkonstante von 100-300 ms, was schnellen Änderungen des Membranpotentials entgegensteht, so daß die Membran nicht in ausreichend kurzer Zeit depolarisiert werden kann um eine Selbstverstärkung der eNaK-Aktivierung auszulösen.

Luteale Zellen im Ovar und aneinander grenzende GZ in vitro sind über Gap junctions niederohmig miteinander gekoppelt. Einzelne Messungen an humanen GZ zeigten, daß durch die Applikation von hCG diese Kopplung vermutlich akut verstärkt wird. Aufgrund ihrer Kurzschlußwirkung verhindert sie schnelle Änderungen des Membranpotentials und führt zur Synchronisation des Zellverbandes. Diese Überlegungen machen eine Erregbarkeit der Lutealzellen in vivo unwahrscheinlich.

5.3 Einfluß der Na⁺-Kanalaktivität auf die zelluläre Morphologie und Funktion

In Neuronen dienen spannungsaktivierte Ionenkanäle vor allem der Integration und Verarbeitung schneller elektrischer Signale, doch können sie auch zu einer Verschiebung der Ionenverhältnisse, zur Regulation des Membranpotentials und der Erregbarkeit oder zur Verstärkung elektrischer Reize beitragen [89]. Beim Verlust neuronaler Funktionen durch eine Ischämie des ZNS spielt der Einstrom von Na⁺-Ionen eine wichtige Rolle [24]. Er löst eine Vielzahl von Prozessen aus, die letztlich zum Absterben der Neuronen führen, wie Ca²⁺-Einstrom, Schwellung der Zellen, Energieverbrauch durch ein höhere Aktivität der Na/K-ATPase oder Intoxikation durch Glutamatfreisetzung. Obwohl noch nicht geklärt ist, auf welchem Weg Na⁺ in die Zellen gelangt, deutet die neuroprotektive Wirkung von TTX oder Phenytoin auf eine Beteiligung spannungsaktivierter NaK hin. Vermutlich ist hier jedoch nicht eine verminderte Erregbarkeit, sondern die Blockierung eines persistierenden Na⁺-Stroms maßgeblich. Durch den so abgeschwächten Anstieg der intrazellulären Na⁺-Konzentration kann eine abnormale Aktivität nachgeschalteter Na⁺-abhängiger Transportsysteme vermieden werden [83]. Die Erhöhung des Na⁺-Spiegels stellt für die Zellen vermutlich ein reversibles Signal dar, dem bei längerem Andauern irreversible Signale und Prozesse folgen können.

Die Aufgabe der eNaK in humanen GZ und dem CL liegt offenbar nicht der Generierung von Aktionspotentialen. Es ist daher naheliegend, die Frage nach ihrer eigentlichen Funktion vor dem Hintergrund einer möglichen Beteiligung an der Ionenhomöostase in diesen Zellen zu stellen. Hierzu wurde die pharmakologische Beeinflussbarkeit der NaK durch TTX bzw. Veratridin genutzt. Die Inkubation mit diesen Substanzen für 24 und 48 h bewirkte deutliche Änderungen in Morphologie und Funktion der Zellen.

Die Kontrollen wiesen eine höhere Diversität an Zellformen auf als nach der Behandlung mit TTX (5 µM), die zu einem ultrastrukturell differenzierten Phänotyp mit zahlreichen Mitochondrien und glattem ER führte. Vermutlich entsprachen sie den lichtmikroskopisch erkennbaren, kettenförmigen dunklen Strukturen in Kernnähe, während andere Bereiche im Zytoplasma frei von jeglichen Strukturen erschienen. Eine starke Häufung von Zellen mit dichter heller Granulation ergab sich nach Behandlung mit Veratridin (50 µM). Ein Viertel dieser Zellen wies zusätzlich eine kontrahierte Form auf, was einem mehr als

doppelt so großen Anteil entsprach als in den anderen Behandlungsgruppen; möglicherweise handelte es sich dabei um absterbende Zellen. Elektronenoptisch waren jedoch keine apoptotischen Zellen zu finden, die u.a. an typischen kondensierten oder fragmentierten Kernen erkennbar sind [46]. Dagegen zeigte sich eine Häufung sekundärer Lysosomen, mit typischerweise heterogenem Inhalt und einem Durchmesser von mehr als 700 nm. In einigen Fällen deuteten sich Verschmelzungsprozesse an, so daß sie im Laufe der Zeit weiter an Größe zunehmen dürften, was gut zu den Literaturwerten von 0,5 bis 1,5 μm paßt. Primäre Lysosomen sind dagegen kleiner (25-500 nm) und erscheinen homogener [40], sie traten bei TTX und den Kontrollen häufiger auf als sekundäre Lysosomen. Bei diesen handelt es sich in humanen GZ zumindest teilweise um Autophagosomen, da sie gelegentlich noch sichtbare Reste von Mitochondrien enthielten. Tendentiell war die Dichte von Mitochondrien in TTX-behandelten Zellen höher als in Veratridin-behandelten. Es ist also zu vermuten, daß im Zuge der regressiven zellulären Veränderungen nach Aktivierung der NaK vorwiegend diese Organellen verdaut werden. Weitere Hinweise auf einen Anstieg der lysosomalen Aktivität in diesem Zusammenhang gaben die Fluoreszenz- und immunhistologischen Färbungen. Die starke Fluoreszenz bei Veratridin war im Gegensatz zu den anderen Behandlungen nicht nur auf Punkte konzentriert und ließ schon deshalb größere Lysosomen erwarten. Auch ihr Vorkommen bis in Zellausläufer hinein ist mit der Bildung peripher abgelagerter Residualkörper aus sekundären Lysosomen vereinbar, wogegen sich die punktförmigen primären Lysosomen bei TTX und den Kontrollen auf ihren zentralen Bildungsort konzentrierten.

Die Zunahme von sekundären Lysosomen in kultivierten humanen GZ als Zeichen einer beginnenden strukturellen Luteolyse konnte durch Untersuchungen an Gewebeschnitten aus dem Ovar des Menschen und des Affen bestätigt werden. Die Immunfärbung für das lysosomale Protein LAMP-1 war für den Bereich des CL spezifisch und deutlich stärker als im umgebenden Gewebe. Auch die elektronenmikroskopisch erkennbare Zunahme sekundärer Lysosomen im regressiven CL des Affen zeigt, daß beim Menschen und bei nichthumanen Primaten die Luteolyse mit einer Zunahme des Selbstverdaus zellulärer Bestandteile verbunden ist.

Die Aktivität der eNaK steht mit der Produktion von Progesteron, einer der Hauptaufgaben der GZ, in Verbindung. Die Inkubation mit Veratridin (50 μM) für 24 h Stunden führte zu einer Verminderung der im Überstand akkumulierten Progesteronmenge um durchschnittlich mehr als die Hälfte (-56%) gegenüber dem Kontrollwert. Nach 48 h betrug dieser Unterschied nur noch -28%, ebenso wie nach 24 h mit einer 10-fach geringeren Konzentration von Veratridin (5 μM). Der P-Wert lag in beiden Fällen bei 7%, so daß zumindest von einem Trend gesprochen werden kann der zeigt, daß die Wirkung von Veratridin bei längerer Inkubation abnimmt. Mögliche Ursachen hierfür sind eine chemische Instabilität der Substanz oder Zellreaktionen, die ihre biologische Wirksamkeit

herabsetzen. Folgerichtig zeigte die geringe Veratridinkonzentration von 5 μM nach 48 h keine Wirkung mehr.

Durch TTX konnte keine veränderte Produktion von Progesteron gemessen werden, obwohl die verwendete Konzentration von 5 μM um den Faktor 100 höher lag, als die zur vollständigen Blockierung des Na^+ -Peakstroms notwendige Konzentration. Sowohl nach 24 h als auch nach 48 h war kein Unterschied gegenüber den Kontrollen nachweisbar. Dies wird auch durch Versuche bestätigt, bei denen gleichzeitig Veratridin (5 μM) und TTX verwendet wurde: Die Progesteronproduktion wurde nach 24 h im gleichen Maß gehemmt wie durch Veratridin allein, und nach 48 h war ebenfalls kein Effekt mehr feststellbar.

Da TTX zu morphologischen Änderungen führt, die denen von Veratridin entgegengesetzt sind, wäre aufgrund der Hemmung der Progesteronproduktion durch Veratridin ein gegenteiliger Effekt durch TTX zu erwarten gewesen, zumal die Zellen nicht mit hCG inkubiert wurden und eine Hemmung der Expression von eNaK daher nicht stattfinden konnte. Warum TTX weder zu einer Erhöhung von Progesteron führte, noch den Effekt von Veratridin aufzuheben vermochte, kann verschiedene Ursachen haben. Offenbar ist der Einstrom von Na^+ über eNaK in unbehandelten Zellen zumindest während der ersten Kultivierungstage so gering, daß sich eine Blockierung der wenigen aktiven Kanäle zunächst nur auf morphologischer Ebene auswirkt. Da die Steroidproduktion auf ein entwickeltes glattes ER und eine große Zahl von Mitochondrien angewiesen ist, wird eine Latenz zwischen strukturellen und funktionellen Änderungen verständlich. Selbst die Aktivierung des Rezeptors für LH/hCG bewirkt zunächst nur eine zögerliche Zunahme von Progesteron, so daß auch dieser starke Stimulus eine zelluläre Umorganisation erfordern dürfte. Demgegenüber scheint die Kopplung von Na^+ -Einstrom und lysosomalem Abbau von Komponenten, die an der Steroidproduktion beteiligt sind, viel effektiver abzulaufen, so daß dieselbe innerhalb kurzer Zeit stark abnimmt.

Für die geringe Aktivität von eNaK zu Kultivierungsbeginn dürfte hauptsächlich eine schwächere Expression der Kanäle verantwortlich sein. Wie gezeigt wurde, nimmt sie dann über mehrere Tage zu. Denkbar ist auch, daß der für einen permanenten Na^+ -Einstrom sorgende Mechanismus erst nach einigen Tagen aktiv wird.

Warum bei einer geringen Kanaldichte Veratridin dennoch einen Effekt zeigen kann, liegt an seinem Wirkmechanismus [86]: Eine Bindung an den Kanal erfolgt in der protonierten Form des Moleküls ($\text{pK}=9,54$) auf der Innen- oder Außenseite der Membran. Ein kleiner Teil liegt bei physiologischem pH-Wert in ungeladener Form vor und kann durch die Membran diffundieren, wodurch innen ein Vorrat von Veratridin entsteht und seine anhaltende Wirkung ermöglicht. Hinzu kommt, daß ein geringer, aber andauernder Einstrom von Na^+ einen permanenten Stress der Zelle zur Folge hat, was sich primär auf den Energiehaushalt durch eine erhöhte Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase niederschlägt. Ein zu starker Na^+ -Einstrom durch eine hohe Dichte von NaK wirkt in Neuronen zytotoxisch;

somit wären humane GZ zumindest im frühen Stadium der CL-Entwicklung durch ihre geringe Dichte von eNaK vor den regressiven Prozessen geschützt. Bei der zunehmenden Expression ist denkbar, daß durch einen Na^+ -Einstrom zunächst mehr Energie für die Na^+ -Homöostase aufgewendet werden muß und der Steroidproduktion nicht mehr zur Verfügung steht.

5.4 Mechanismen für den Na^+ -Einstrom in Granulosazellen

Die Ähnlichkeit der morphologischen Veränderungen im alternden CL und in humanen GZ nach Inkubation mit Veratridin läßt den Schluß zu, daß eNaK in GZ beim Primaten nicht nur vorhanden, sondern auch funktionell sind. Nach dem Ausschluß von Aktionspotentialen in diesen Zellen stellt sich die Frage, auf welche Weise ein Einstrom von Na^+ über die Aktivierung eines persistierenden Stroms I_{NaP} möglich ist.

Die Messungen an humanen GZ lassen in einzelnen Fällen einen "window current" von bis zu 100 pA möglich erscheinen und im Mittel würde der Anteil am transienten Strom immerhin 2% betragen (Abb. 4-4). Sein hypothetisches Maximum stimmt gerade mit dem mittleren Membranpotential der Zellen von -25 mV überein und interessanterweise nähern sich auch die V_{50} -Werte der Aktivierung und Inaktivierung im Laufe der Kultivierungszeit der GZ einander an, so daß ein größerer I_{NaP} resultieren würde. Die V_{50} -Werte der Aktivierung sinken jedoch nicht unter -25 mV und sind damit positiver als in vielen erregbaren Zellen [52]. Der Mittelwert von V_{50} für die Inaktivierung war mit -70 mV zwar nicht extrem negativ, doch muß die Abhängigkeit dieses Wertes von der Dauer des konditionierenden Präpuls-Potentials berücksichtigt werden. Seine Dauer betrug bei den meisten in dieser Arbeit durchgeführten Messungen 50 ms. Die bei längeren Präpuls gemessenen V_{50} -Werte liegen bei -80 mV [14], was einen größeren "window current" unter diesen Bedingungen eher unwahrscheinlich macht. Das ergibt sich auch schon aus dem vergleichsweise positiven Membranpotential: Die Zellen befinden sich permanent in einem Zustand, der eine weitgehende Inaktivierung der NaK bedingt, da auch ihre langsamen Komponenten dann eine Rolle spielen. Auch in einer Arbeit an Hippocampus-Neuronen wird auf das Verschwinden des "window current" bei positiven Potentialen hingewiesen [23].

Einen anderen Mechanismus für I_{NaP} lieferten die Untersuchungen mit in HEK 293 Zellen exprimierten eNaK [14]. Die genaue Untersuchung der Inaktivierung ergab für die beiden Prozesse der Entwicklung und Erholung sehr lange Zeitkonstanten von 50 bis 100 ms im Potentialbereich zwischen -60 und -90 mV. Sie entsprechen den Übergangsraten des Kanals vom geschlossenen in den gleichzeitig inaktivierten und geschlossenen Zustand, bzw. umgekehrt. Der Übergang vom offenen in den geschlossen-inaktivierten Zustand ist dagegen nur wenig langsamer als für andere NaK. Neuronen die den eNaK exprimieren,

können aufgrund der langsamen Erholung von der Inaktivierung keine hohe Frequenz von Aktionspotentialen erzeugen. Dagegen bewirkt die langsame Entwicklung der Inaktivierung, daß sie auch bei langsamen Potentialänderungen noch erregbar bleiben. Beide Effekte konnten auch durch Messungen an Neuronen aus Spinalganglien bestätigt werden, die diese Kanäle exprimieren. Die Erklärung für den durch langsame Spannungsrampen ausgelösten I_{NaP} ist nun, daß aufgrund der langsamen Inaktivierung vom geschlossenen Zustand aus zunächst immer genügend aktivierbare Kanäle übrigbleiben, um einen Strom zu generieren. Bei -40 mV wird ein maximaler I_{NaP} mit einer Amplitude von 1-2% des I_{NaT} erreicht; durch Cd^{2+} oder Zn^{2+} (50 bis 500 μ M) kann sie auf 5-10% erhöht werden. Die schnelle Abnahme zu positiveren Potentialen spiegelt dann die bei eNaK ebenfalls schnelle Inaktivierung vom geöffneten Zustand aus wieder.

Dieser Mechanismus kann zwar einen Teil des durch Spannungsrampen ausgelösten Stroms erklären, doch erscheint der Begriff "persistierend" nicht angebracht, da er kurz nach seinem Maximum wieder steil abfällt, ähnlich den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen, und ganz richtig durch die schnelle Inaktivierung erklärt wurde [14]. Ein persistierender Na^+ -Strom würde jedoch bedeuten, daß die zugrundeliegenden NaK ab ihrer maximalen Aktivierung, d.h. bei Potentialen positiver als ca. -30 mV, permanent im geöffneten Zustand bleiben und so der Membranstrom durch die Verteilung der Na^+ -Ionen bestimmt wird, mit einem Nulldurchgang beim Nernst-Potential für Na^+ . Ein derartiger Strom deutete sich durch Messungen in der vorliegenden Arbeit an und trat auch in der zitierten Studie [14] auf, wo er durch TTX blockierbar war. Der größte Teil des dargestellten Stroms dürfte jedoch durch eine weitere Verringerung der Rampengeschwindigkeit verschwinden und könnte einen permanenten Einstrom von Na^+ bei den in humanen GZ gemessenen Membranpotentialen nicht erklären.

5.5 Zusammenhang zwischen Na^+ -Kanalaktivität und Luteolyse

Die negative Regulation der Expression von eNaK durch hCG und die kurzfristige Hemmung des Na^+ -Stroms einerseits, und der Zusammenhang zwischen eNaK-Aktivität und der Produktion von Progesteron andererseits legen nahe, daß eNaK in GZ in vivo eine wichtige Rolle für die Funktion des CL und ihre Regulation spielen. Sie nehmen offenbar eine Schlüsselstellung ein zwischen dem trophischen LH/hCG-Signal für die lutealen Zellen und den regressiven Prozessen, die zur funktionellen und strukturellen Luteolyse führen.

In Primaten sinkt die Progesteronproduktion des alternden CL, gleichzeitig verändert sich auch das Muster der Sekretion von LH [81]. Die Änderung von Frequenz oder Amplitude scheint jedoch nicht zur funktionellen Regression des CL beizutragen, wie aus Studien an Rhesusaffen hervorging, deren endogene GnRH-Freisetzung unterbunden wurde. Weder

eine veränderte Frequenz der pulsatilen GnRH-Infusion noch eine dreitägige Unterbrechung wirkte sich auf die Zykluslänge aus, gemessen an der Produktion von Progesteron [81]. In weiteren Experimenten konnte die Abnahme der CL-Funktion durch eine kontinuierlich ansteigende Infusion von LH / CG vermindert werden [92]. Dies zeigt, daß die Empfindlichkeit des CL für Gonadotropine zum Ende seiner Lebensspanne abnimmt und nur durch das vom Trophoblasten in großen Mengen produzierte CG ausgeglichen werden kann. Die genaue Ursache für diese verminderte Empfindlichkeit ist nicht verstanden. Als möglicher Grund wird die Verschlechterung der Blutversorgung und eine damit einhergehende geringere Verfügbarkeit von Gonadotropin diskutiert. Lutealzellen produzieren am Beginn der Lutealphase LH-abhängig Faktoren zur Förderung der Gefäßbildung, hauptsächlich VEGF. Dadurch wird die zur Steroidproduktion notwendige intensive Versorgung mit Nähr- und Vorläuferstoffen gewährleistet [20]. Nach einer Konzeption kommt es zur Stabilisierung der Gefäße, vermutlich durch die weitere Produktion entsprechender Faktoren (Ang-1) unter dem Einfluß von CG. Bleibt dies im nichtfertilen Zyklus aus, kann die beginnende Gefäßrückbildung zur Luteolyse beitragen, löst sie jedoch nicht unbedingt aus.

Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu der Hypothese, daß die Luteolyse und die Rückbildung von Gefäßen parallel durch einen dritten Prozeß ausgelöst werden. Der semiquantitative Nachweis von eNaK mRNA im CL des Affen zeigt, daß trotz der wahrscheinlichen Hemmung durch LH in der frühen Lutealphase eine langsame, aber stetige Zunahme über die gesamte Dauer der CL-Entwicklung stattfindet. Sehr wahrscheinlich steht eine ebenfalls langsam zunehmende Expression von eNaK am Anfang der Prozesse, die die Luteolyse einleiten. Es ist anzunehmen, daß es in der frühen Lutealphase trotz der weitgehend gehemmten eNaK-Funktion zu einem Na^+ -Einstrom in zunächst geringem Umfang kommt, der zu einer zunehmenden metabolischen Belastung der Zellen durch den verstärkt notwendigen Betrieb der energieverbrauchenden Na^+/K^+ -ATPase führt. Dies ist jedoch nur möglich, sofern es für die gegen Na^+ ausgetauschten K^+ -Ionen eine Möglichkeit gibt, die Zellen wieder zu verlassen. Hier liegt möglicherweise die Aufgabe der in humanen GZ gefundenen K^+ -Kanäle, da es ansonsten z.B. über eine umgekehrte Aktivität des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels kommen könnte. Dieses System ist zu dem in Astrozyten vorgeschlagenen Mechanismus ähnlich, bei dem die Aktivität von NaK zur Regulation der Na^+/K^+ -ATPase dient. In GZ steht durch ihre verstärkte Aktivität weniger Energie für die Steroidproduktion zur Verfügung, und durch den beginnenden lysosomalen Abbau von Mitochondrien und glattem ER verringert sich die Sekretion von Progesteron weiter. Dies wird vermutlich von den Granulosazellen selbst über Rezeptoren für Progesteron detektiert, was die positive Rückkopplung zusätzlich verstärken dürfte. Gleichzeitig ändert sich die Freisetzung anderer Faktoren durch das CL, was u.a. zur Rückbildung der Gefäße führt und über die

verminderte Verfügbarkeit von LH für die lutealen Zellen die verstärkte Expression und Aktivität von eNaK vorantreibt.

Humane GZ, die ohne hCG kultiviert wurden, zeigten eine viel schnellere Zunahme von eNaK-mRNA. Sie entsprechen den Lutealzellen gegen Ende der Lutealphase und bestätigen somit indirekt eine beschleunigte Expression von eNaK in diesem Zeitraum. Wegen der zusätzlich entfallenden akuten Hemmung von Na^+ -Strömen durch die geringere phosphorylierende Wirkung von LH/CG kann es dann zu einem effektiven Na^+ -Einstrom in die Zellen kommen. Dies führt von der bereits eingeleiteten funktionellen Inaktivierung zur strukturellen Luteolyse, bei der die Zellen letztlich eliminiert werden oder als bindegewebige Zellen zurückbleiben.

Morphologische Untersuchungen in vivo am CL des Menschen bestätigen dieses Modell. Apoptotisch erscheinende Zellen wurden in den zentralen Bereichen des jungen CL gefunden, jedoch nicht in den äußeren Thekazellschichten [26]. Dies kann durch eine noch ungenügende Durchblutung aufgrund der von außen beginnenden Gefäßbildung und die resultierende mangelhafte Versorgung mit LH erklärt werden. Gleichzeitig ist es ein Indiz dafür, daß die Lutealzellen von Anfang an auf einen Mangel von LH / CG mit regressiven Veränderungen reagieren und eNaK exprimieren. In der späten Lutealphase gehörten die meisten der apoptotisch aussehenden Zellen zum Gefäßendothel; erst ganz am Schluß zeigten viele Lutealzellen ähnliche Anzeichen [26]. Auch hier ging also die Degeneration der Gefäße der eigentlichen Luteolyse voraus.

Ob es sich beim Absterben der Lutealzellen immer um einen apoptotischen Prozeß handelt, ist fraglich. Die genaue morphologische Untersuchung des Zelltods während der natürlichen und induzierten Luteolyse im Affen zeigte außer Zellfragmenten und anderen Anzeichen für Apoptose auch Zellen, die eine starke Vakuolisierung des Zytoplasmas aufwiesen [90]. Der Inhalt dieser Vakuolen bestand nicht aus Lipiden. Diese Form des Zelltods war zumindest auf elektronenmikroskopischer Ebene nicht mit den Kriterien für Apoptose vereinbar [22]. In menschlichen Ovarien traten ähnlich vakuolenreiche Zellen gegen Zyklusende im CL auf und waren mit einer starken Immunfärbung für CD68 verbunden, einem eigentlich für Makrophagen-Lysosomen spezifischen und mit LAMP verwandten Marker [50]. Die starke Vakuolisierung dürfte daher auf eine vermehrte Bildung von Lysosomen zurückzuführen sein. Dies deutet auf eine erhöhte Aktivität von eNaK und eine verstärkte Autophagozytose in den Lutealzellen hin. Die in dieser Arbeit gefundene Zunahme sekundärer Lysosomen im regressiven CL des Rhesusaffen wird damit bestätigt.

Die Funktion der eNaK in GZ liegt demnach vermutlich in der Regulation der intrazellulären Na^+ -Konzentration. Durch Unterschiede in der lokalen Umgebung und im Zustand der Zellen selbst ist es unwahrscheinlich, daß die Expression von eNaK und die Na^+ -Konzentration überall im CL mit gleicher Geschwindigkeit ansteigen. Dies könnte zum

frühzeitigen Absterben einzelner Zellen führen, was zumindest in der frühen Lutealphase der CL-Funktion entgegenstünde. Die durch LH/CG geförderte Kopplung der Zellen über Gap junctions stellt daher eine Möglichkeit dar, ihren physiologischen Zustand zu synchronisieren und ein Überleben aller Zellen zu ermöglichen. Ein ähnlicher Mechanismus wurde für Astrozyten beschrieben [66] und gezeigt, daß sie nach ihrer Entkopplung (u.a. mit Heptanol) eine unterschiedliche intrazelluläre Na^+ -Konzentrationen entwickeln. Insgesamt ist jedoch die Rolle der Gap junctions für die Luteolyse unklar.

6 Zusammenfassung

Im Ovar des Menschen und im Corpus Luteum des Rhesusaffen konnte die mRNA für einen bislang nur im peripheren Nervensystem und in neuroendokrinen Zellen gefundenen spannungsaktivierten Natriumkanal (eNaK, SCN9A) nachgewiesen werden. In kultivierten humanen Granulosaluteinzellen wurden sowohl die Transkriptmenge, als auch die durch depolarisierende Spannungspulse ausgelösten, TTX-sensitiven transienten Ströme durch hCG negativ reguliert. Trotz des gleichzeitigen Vorkommens spannungsaktivierter Kaliumkanäle sind die GZ jedoch nicht erregbar, was u.a. an einer intensiven Kopplung benachbarter Zellen durch Gap junctions liegt. Diese werden möglicherweise durch hCG geöffnet, wie sich durch Messungen der Membrankapazität zeigte, und sorgen in vivo vermutlich für eine Synchronisierung der Zellen, u.a. auch ihrer internen Na^+ -Konzentration. Die Aufgabe der eNaK liegt sehr wahrscheinlich in der Vermittlung eines persistierenden Natriumeinstroms in die GZ, der im Verlauf der Entwicklung des CL zunimmt und für ein zunehmendes Energiedefizit sorgt. Dies legt die kontinuierlich ansteigende Transkriptmenge von eNaK im älter werdenden CL des Affen nahe. Gleichzeitig zeigen die älteren Lutealzellen morphologische Eigenschaften, wie sie in vitro durch die pharmakologische Aktivierung von eNaK mit Veratridin innerhalb weniger Tage ausgelöst werden: Eine starke Zunahme sekundärer Lysosomen durch Autophagozytose, jedoch keine Anzeichen von Apoptose. Es handelt sich dabei um eine besondere Form der Regression im CL der Primaten, was durch Indizien in anderen Arbeiten bestätigt wird. Die Aktivierung der eNaK führt zu einer verminderten Produktion von Progesteron durch die GZ, ihre Hemmung durch TTX zeigt dagegen keine Wirkung. Daraus, und aus der hemmenden Funktion von LH/hCG folgt, daß in vivo nur eine geringe Aktivität von eNaK in der frühen Lutealphase vorhanden ist. Erst gegen Ende der Lutealphase kann es durch die verringerte Verfügbarkeit von LH und die ansteigende Expression von eNaK zu einem massiven Na^+ -Einstrom kommen, der zu einer schnellen funktionellen Inaktivierung der Lutealzellen und fallenden Progesteronwerten führt.

Die regulierte Expression und Funktion der Natriumkanäle in Granulosazellen stellt somit einen bislang unbekanntem Weg dar, dem die Luteolyse auf zellulärer Ebene im CL der Primaten folgt. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten sich auch auf das Verständnis der Physiologie bestimmter menschlicher Erkrankungen auswirken. Natriumkanäle sind das Ziel für verschiedene Medikamente, u.a. Lokalanästhetika und systemisch applizierte Antiarrhythmika, sowie antiepileptisch wirkende Substanzen wie Phenytoin. Es stellt sich daher die Frage, ob Änderungen der Funktion des CL eine mögliche Konsequenz der Behandlung von Frauen mit solchen Substanzen sein könnten.

7 Literaturverzeichnis

- [1] **Adashi, E.Y.** (1996). The Ovarian Follicle: Life Cycle of a Pelvic Clock. In *Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology*. Adashi, E.Y., Rock, J.A., und Rosenwaks, Z., eds. (Philadelphia, Pennsylvania, USA, Lippincott-Raven), 211-234.
- [2] **Ahern, G.P., Hsu, S.F., Klyachko, V.A., und Jackson, M.B.** (2000). Induction of persistent sodium current by exogenous and endogenous nitric oxide. *J Biol Chem* 275, 28810-5.
- [3] **Alzheimer, C., Schwindt, P.C., und Crill, W.E.** (1993). Modal gating of Na⁺ channels as a mechanism of persistent Na⁺ current in pyramidal neurons from rat and cat sensorimotor cortex. *J Neurosci* 13, 660-73.
- [4] **Barres, B.A., Chun, L.L., und Corey, D.P.** (1988). Ion channel expression by white matter glia: I. Type 2 astrocytes and oligodendrocytes. *Glia* 1, 10-30.
- [5] **Bigiani, A. und Roper, S.D.** (1995). Estimation of the junctional resistance between electrically coupled receptor cells in *Necturus* taste buds. *J Gen Physiol* 106, 705-25.
- [6] **Brown, A.M., Schwindt, P.C., und Crill, W.E.** (1994). Different voltage dependence of transient and persistent Na⁺ currents is compatible with modal-gating hypothesis for sodium channels. *J Neurophysiol* 71, 2562-5.
- [7] **Cantrell, A.R., Smith, R.D., Goldin, A.L., Scheuer, T., und Catterall, W.A.** (1997). Dopaminergic modulation of sodium current in hippocampal neurons via cAMP-dependent phosphorylation of specific sites in the sodium channel alpha subunit. *J Neurosci* 17, 7330-8.
- [8] **Catterall, W.A.** (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26, 13-25.
- [9] **Catterall, W.A., Scheuer, T., Thomsen, W., und Rossie, S.** (1991). Structure and modulation of voltage-gated ion channels. *Ann N Y Acad Sci* 625:174-80., 174-80.
- [10] **Chao, T.I. und Alzheimer, C.** (1995). Effects of phenytoin on the persistent Na⁺ current of mammalian CNS neurones. *Neuroreport* 6, 1778-80.
- [11] **Chiang, M., Strong, J.A., und Asem, E.K.** (1997). Luteinizing hormone activates chloride currents in hen ovarian granulosa cells. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 116, 361-8.
- [12] **Chiu, S.Y., Schrager, P., und Ritchie, J.M.** (1984). Neuronal-type Na⁺ and K⁺ channels in rabbit cultured Schwann cells. *Nature* 311, 156-7.

- [13] **Crill, W.E.** (1996). Persistent sodium current in mammalian central neurons. *Annu Rev Physiol* 58, 349-62.
- [14] **Cummins, T.R., Howe, J.R., und Waxman, S.G.** (1998). Slow closed-state inactivation: a novel mechanism underlying ramp currents in cells expressing the hNE/PN1 sodium channel. *J Neurosci* 18, 9607-19.
- [15] **Cummins, T.R. und Waxman, S.G.** (1997). Downregulation of tetrodotoxin-resistant sodium currents and upregulation of a rapidly repriming tetrodotoxin-sensitive sodium current in small spinal sensory neurons after nerve injury. *J Neurosci* 17, 3503-14.
- [16] **Dees, W.L., Hiney, J.K., Schultea, T.D., Mayerhofer, A., Danilchik, M., Dissen, G.A., und Ojeda, S.R.** (1995). The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing nerve growth factor receptors. *Endocrinology* 136, 5760-8.
- [17] **Dib-Hajj, S., Black, J.A., Felts, P., und Waxman, S.G.** (1996). Down-regulation of transcripts for Na channel alpha-SNS in spinal sensory neurons following axotomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14950-4.
- [18] **Dib-Hajj, S.D., Tyrrell, L., Black, J.A., und Waxman, S.G.** (1998). NaN, a novel voltage-gated Na channel, is expressed preferentially in peripheral sensory neurons and down-regulated after axotomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8963-8.
- [19] **Fakler, B., Ruppersberg, J.P., Spittlmeister, W., und Rüdell, R.** (1990). Inactivation of human sodium channels and the effect of tocainide. *Pflügers Arch* 415, 693-700.
- [20] **Fraser, H.M. und Lunn, S.F.** (2001). Regulation and manipulation of angiogenesis in the primate corpus luteum. *Reproduction* 121, 355-62.
- [21] **Fraser, H.M., Lunn, S.F., Cowen, G.M., und Illingworth, P.J.** (1995). Induced luteal regression in the primate: evidence for apoptosis and changes in c-myc protein. *J Endocrinol* 147, 131-7.
- [22] **Fraser, H.M., Lunn, S.F., Harrison, D.J., und Kerr, J.B.** (1999). Luteal regression in the primate: different forms of cell death during natural and gonadotropin-releasing hormone antagonist or prostaglandin analogue-induced luteolysis. *Biol Reprod* 61, 1468-79.
- [23] **French, C.R., Sah, P., Buckett, K.J., und Gage, P.W.** (1990). A voltage-dependent persistent sodium current in mammalian hippocampal neurons. *J Gen Physiol* 95, 1139-57.

- [24] **Fung, M.L.** (2000). Role of voltage-gated Na⁺ channels in hypoxia-induced neuronal injuries. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27, 569-74.
- [25] **Furger, C., Cronier, L., Poirot, C., und Pouchelet, M.** (1996). Human granulosa cells in culture exhibit functional cyclic AMP-regulated gap junctions. *Mol Hum Reprod* 2, 541-8.
- [26] **Gaytan, F., Morales, C., Garcia-Pardo, L., Reymundo, C., Bellido, C., und Sanchez-Criado, J.E.** (1998). Macrophages, cell proliferation, and cell death in the human menstrual corpus luteum. *Biol Reprod* 59, 417-25.
- [27] **Gerendai, I. und Halasz, B.** (1997). Neuroendocrine asymmetry. *Front Neuroendocrinol* 18, 354-81.
- [28] **Gillis, K.D.** (1995). Techniques for Membrane Capacitance Measurements. In *Single-Channel-Recording*. Sakman, B. und Neher, E., eds. (New York, Plenum Press), 155-198.
- [29] **Goldin, A.L.** (1999). Diversity of mammalian voltage-gated sodium channels. *Ann N Y Acad Sci* 868, 38-50.
- [30] **Gorelova, N.A. und Yang, C.R.** (2000). Dopamine D1/D5 receptor activation modulates a persistent sodium current in rat prefrontal cortical neurons in vitro. *J Neurophysiol* 84, 75-87.
- [31] **Guo, K., Wolf, V., Dharmarajan, A.M., Feng, Z., Bielke, W., Saurer, S., und Friis, R.** (1998). Apoptosis-associated gene expression in the corpus luteum of the rat. *Biol Reprod* 58, 739-46.
- [32] **Guy, H.R. und Seetharamulu, P.** (1986). Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 508-12.
- [33] **Hille, B.** (1992). Potassium Channels and Chloride Channels. In *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Hille, B., eds. (Sunderland, Mass., USA, Sinauer Associates, Inc.), 115-139.
- [34] **Howe, J.R. und Ritchie, J.M.** (1990). Sodium currents in Schwann cells from myelinated and non-myelinated nerves of neonatal and adult rabbits. *J Physiol* 425:169-210., 169-210.
- [35] **Höhne-Zell, B. und Gratzl, M.** (1996). Adrenal chromaffin cells contain functionally different SNAP-25 monomers and SNAP-25/syntaxin heterodimers. *FEBS Lett* 394, 109-16.
- [36] **Hu, X.L., Zhang, Y.T., und Bao, J.L.** (2000). Theoretical analysis of a rectifying gap junction model. *Methods Inf Med* 39, 150-2.

- [37] **Kandel, E.R., Siegelbaum, S.A., und Schwartz, J.H.** (1991). Synaptic Transmission. In *Principles of Neural Science*. Kandel, E.R., Schwartz, J.H., und Jessell, T.M., eds. (Appleton&Lange), 145-153.
- [38] **Klugbauer, N., Lacinova, L., Flockerzi, V., und Hofmann, F.** (1995). Structure and functional expression of a new member of the tetrodotoxin- sensitive voltage-activated sodium channel family from human neuroendocrine cells. *EMBO J* 14, 1084-90.
- [39] **Koester, J.** (1991). Voltage-gated ion channels and the generation of the action potential. In *Principles of Neural Science*. Kandel, E.R., Schwartz, J.H., und Jessell, T.M., eds. (Appleton&Lange), 127-134.
- [40] **Krstič, R. V.** (1984). *Illustrated Encyclopedia of Human Histology*. (Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag).
- [41] **Li, M., West, J.W., Lai, Y., Scheuer, T., und Catterall, W.A.** (1992). Functional modulation of brain sodium channels by cAMP-dependent phosphorylation. *Neuron* 8, 1151-9.
- [42] **Lindau, M. und Neher, E.** (1988). Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells. *Pflügers Arch* 411, 137-46.
- [43] **Ma, J.Y., Catterall, W.A., und Scheuer, T.** (1997). Persistent sodium currents through brain sodium channels induced by G protein betagamma subunits. *Neuron* 19, 443-52.
- [44] **Macfarlane, S.N. und Sontheimer, H.** (1998). Spinal cord astrocytes display a switch from TTX-sensitive to TTX-resistant sodium currents after injury-induced gliosis in vitro. *J Neurophysiol* 79, 2222-6.
- [45] **MacVicar, B.A.** (1984). Voltage-dependent calcium channels in glial cells. *Science* 226, 1345-7.
- [46] **Martin, S.J., Green, D.R., und Cotter, T.G.** (1994). Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci* 19, 26-30.
- [47] **Mayerhofer, A., Smith, G.D., Danilchik, M., Levine, J.E., Wolf, D.P., Dissen, G.A., und Ojeda, S.R.** (1998). Oocytes are a source of catecholamines in the primate ovary: evidence for a cell-cell regulatory loop. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 10990-5.
- [48] **Mayerhofer, A., Weis, J., Bartke, A., Yun, J.S., und Wagner, T.E.** (1990). Effects of transgenes for human and bovine growth hormones on age- related changes in ovarian morphology in mice. *Anat Rec* 227, 175-86.

- [49] **Mittmann, T. und Alzheimer, C.** (1998). Muscarinic inhibition of persistent Na⁺ current in rat neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 79, 1579-82.
- [50] **Morales, C., Garcia-Pardo, L., Reymundo, C., Bellido, C., Sanchez-Criado, J.E., und Gaytan, F.** (2000). Different patterns of structural luteolysis in the human corpus luteum of menstruation. *Hum Reprod* 15, 2119-28.
- [51] **Murphy, B.D.** (2000). Models of luteinization. *Biol Reprod* 63, 2-11.
- [52] **Neumcke, B.** (1990). Diversity of sodium channels in adult and cultured cells, in oocytes and in lipid bilayers. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 115:1-49., 1-49.
- [53] **Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., und Minamino, N.** (1984). Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312, 121-7.
- [54] **Oh, Y. und Waxman, S.G.** (1998). Novel splice variants of the voltage-sensitive sodium channel alpha subunit. *Neuroreport* 9, 1267-72.
- [55] **Ojeda, S.R.** (1996). Female Reproductive Function. In *Textbook of Endocrine Physiology*. Griffin, J.E. und Ojeda, S.R., eds. (New York, USA, Oxford University Press, Inc.), 164-200.
- [56] **Plummer, N.W. und Meisler, M.H.** (1999). Evolution and diversity of mammalian sodium channel genes. *Genomics* 57, 323-31.
- [57] **Postma, F.R., Hengeveld, T., Alblas, J., Giepmans, B.N., Zondag, G.C., Jalink, K., und Moolenaar, W.H.** (1998). Acute loss of cell-cell communication caused by G protein-coupled receptors: a critical role for c-Src. *J Cell Biol* 140, 1199-209.
- [58] **Pusch, M. und Neher, E.** (1988). Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette. *Pflugers Arch* 411, 204-11.
- [59] **Qin, W., Rane, S.G., und Asem, E.K.** (2000). Low extracellular Ca(2⁺) activates a transient Cl(-) current in chicken ovarian granulosa cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C319-C325.
- [60] **Quirk, S.M., Cowan, R.G., Joshi, S.G., und Henrikson, K.P.** (1995). Fas antigen-mediated apoptosis in human granulosa/luteal cells. *Biol Reprod* 52, 279-87.
- [61] **Renganathan, M., Cummins, T.R., Hormuzdiar, W.N., und Waxman, S.G.** (2000). alpha-SNS produces the slow TTX-resistant sodium current in large cutaneous afferent DRG neurons. *J Neurophysiol* 84, 710-8.

- [62] **Ritchie, J.M.** (1992). Voltage-gated ion channels in Schwann cells and glia. *Trends Neurosci* 15, 345-51.
- [63] **Rodger, F.E., Fraser, H.M., Duncan, W.C., und Illingworth, P.J.** (1995). Immunolocalization of bcl-2 in the human corpus luteum. *Hum Reprod* 10, 1566-70.
- [64] **Rodger, F.E., Fraser, H.M., Krajewski, S., und Illingworth, P.J.** (1998). Production of the proto-oncogene BAX does not vary with changing in luteal function in women. *Mol Hum Reprod* 4, 27-32.
- [65] **Rohlicek, V. und Schmid, A.** (1994). Dual-frequency method for synchronous measurement of cell capacitance, membrane conductance and access resistance on single cells. *Pflügers Arch* 428, 30-8.
- [66] **Rose, C.R. und Ransom, B.R.** (1997). Gap junctions equalize intracellular Na⁺ concentration in astrocytes. *Glia* 20, 299-307.
- [67] **Rose, C.R., Ransom, B.R., und Waxman, S.G.** (1997). Pharmacological characterization of Na⁺ influx via voltage-gated Na⁺ channels in spinal cord astrocytes. *J Neurophysiol* 78, 3249-58.
- [68] **Roughton, S.A., Lareu, R.R., Bittles, A.H., und Dharmarajan, A.M.** (1999). Fas and Fas ligand messenger ribonucleic acid and protein expression in the rat corpus luteum during apoptosis-mediated luteolysis. *Biol Reprod* 60, 797-804.
- [69] **Sangameswaran, L., Fish, L.M., Koch, B.D., Rabert, D.K., Delgado, S.G., Ilnicka, M., Jakeman, L.B., Novakovic, S., Wong, K., Sze, P., Tzoumaka, E., Stewart, G.R., Herman, R.C., Chan, H., Eglén, R.M., und Hunter, J.C.** (1997). A novel tetrodotoxin-sensitive, voltage-gated sodium channel expressed in rat and human dorsal root ganglia. *J Biol Chem* 272, 14805-9.
- [70] **Santana, L.F., Gomez, A.M., und Lederer, W.J.** (1998). Ca²⁺ flux through promiscuous cardiac Na⁺ channels: slip-mode conductance. *Science* 279, 1027-33.
- [71] **Schiffmann, S.N., Desdouits, F., Menu, R., Greengard, P., Vincent, J.D., Vanderhaeghen, J.J., und Girault, J.A.** (1998). Modulation of the voltage-gated sodium current in rat striatal neurons by DARPP-32, an inhibitor of protein phosphatase. *Eur J Neurosci* 10, 1312-20.
- [72] **Schlieff, T., Schonherr, R., Imoto, K., und Heinemann, S.H.** (1996). Pore properties of rat brain II sodium channels mutated in the selectivity filter domain. *Eur Biophys J* 25, 75-91.

- [73] **Segal, M.M. und Douglas, A.F.** (1997). Late sodium channel openings underlying epileptiform activity are preferentially diminished by the anticonvulsant phenytoin. *J Neurophysiol* 77, 3021-34.
- [74] **Somjen, G.G.** (1979). Extracellular potassium in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Physiol* 41:159-77., 159-77.
- [75] **Sommersberg, B., Bulling, A., Salzer, U., Frohlich, U., Garfield, R.E., Amsterdam, A., und Mayerhofer, A.** (2000). Gap junction communication and connexin 43 gene expression in a rat granulosa cell line: regulation by follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* 63, 1661-8.
- [76] **Sontheimer, H., Black, J.A., Ransom, B.R., und Waxman, S.G.** (1992). Ion channels in spinal cord astrocytes in vitro. I. Transient expression of high levels of Na⁺ and K⁺ channels. *J Neurophysiol* 68, 985-1000.
- [77] **Sontheimer, H., Black, J.A., und Waxman, S.G.** (1996). Voltage-gated Na⁺ channels in glia: properties and possible functions. *Trends Neurosci* 19, 325-31.
- [78] **Sontheimer, H., Fernandez-Marques, E., Ullrich, N., Pappas, C.A., und Waxman, S.G.** (1994). Astrocyte Na⁺ channels are required for maintenance of Na⁺/K⁽⁺⁾-ATPase activity. *J Neurosci* 14, 2464-75.
- [79] **Stafstrom, C.E., Schwindt, P.C., und Crill, W.E.** (1982). Negative slope conductance due to a persistent subthreshold sodium current in cat neocortical neurons in vitro. *Brain Res* 236, 221-6.
- [80] **Stelling, J.W. und Jacob, T.J.** (1997). Functional coupling in bovine ciliary epithelial cells is modulated by carbachol. *Am J Physiol* 273, C1876-C1881.
- [81] **Stouffer, R.L.** (1996). Corpus Luteum Formation and Demise. In *Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology*. Adashi, E.Y., Rock, J.A., und Rosenwaks, Z., eds. (New York, Lippincott-Raven), 263-263.
- [82] **Tanaka, M., Cummins, T.R., Ishikawa, K., Black, J.A., Iyata, Y., und Waxman, S.G.** (1999). Molecular and functional remodeling of electrogenic membrane of hypothalamic neurons in response to changes in their input. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1088-93.
- [83] **Taylor, C.P. und Meldrum, B.S.** (1995). Na⁺ channels as targets for neuroprotective drugs. *Trends Pharmacol Sci* 16, 309-16.
- [84] **Thio, C.L., Waxman, S.G., und Sontheimer, H.** (1993). Ion channels in spinal cord astrocytes in vitro. III. Modulation of channel expression by coculture with neurons and neuron-conditioned medium. *J Neurophysiol* 69, 819-31.

- [85] **Toledo-Aral, J.J., Moss, B.L., He, Z.J., Koszowski, A.G., Whisenand, T., Levinson, S.R., Wolf, J.J., Silos-Santiago, I., Halegoua, S., und Mandel, G.** (1997). Identification of PN1, a predominant voltage-dependent sodium channel expressed principally in peripheral neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* *94*, 1527-32.
- [86] **Ulbricht, W.** (1998). Effects of veratridine on sodium currents and fluxes. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* *133:1-54.*, 1-54.
- [87] **Van Voorhis, B.J., Dunn, M.S., Snyder, G.D., und Weiner, C.P.** (1994). Nitric oxide: an autocrine regulator of human granulosa-luteal cell steroidogenesis. *Endocrinology* *135*, 1799-806.
- [88] **Wan, X., Desilets, M., Soboloff, J., Morris, C., und Tsang, B.K.** (1996). Muscarinic activation inhibits T-type Ca^{2+} current in hen granulosa cells. *Endocrinology* *137*, 2514-21.
- [89] **Waxman, S.G., Dib-Hajj, S., Cummins, T.R., und Black, J.A.** (2000). Sodium channels and their genes: dynamic expression in the normal nervous system, dysregulation in disease states(1). *Brain Res* *886*, 5-14.
- [90] **Young, F.M., Illingworth, P.J., Lunn, S.F., Harrison, D.J., und Fraser, H.M.** (1997). Cell death during luteal regression in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *J Reprod Fertil* *111*, 109-19.
- [91] **Yuan, W. und Giudice, L.C.** (1997). Programmed cell death in human ovary is a function of follicle and corpus luteum status [published erratum appears in *J Clin Endocrinol Metab* 1998 Jan;83(1):240]. *J Clin Endocr Metab* *82*, 3148-55.
- [92] **Zelevnik, A.J.** (1998). In vivo responses of the primate corpus luteum to luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 11002-7.
- [93] **Zhao, Y.L., Wang, J.H., und Cheng, C.P.** (1991). [Effect of K^+ , Na^+ ionic channel blocker on progesterone production by rat corpus luteal cells]. *Sheng Li Xue Bao* *43*, 508-11.

Anhang

Eigene Veröffentlichungen

Buchbeiträge, CD-ROM's

Bulling, A., Agneskirchner, J., Castrop, F., Ovtscharoff, W., Wurzinger, L., Gratzl, M. (1997). *BodyExplorer, An Interactive Program on the Cross-Sectional Anatomy of the Visible Human Male*. (Berlin/Heidelberg, Springer-Verlag), CD-ROM.

Föhr, K.J., Warchol, W., Bulling, A., Brinkmeier, H., Gratzl, M. (1998). Calculation of divalent metal ion buffers containing multiple ligands for intracellular applications. In: *The Adrenal Chromaffin Cell*. Kanno, T., Nakazato, Y., Kumakura, K., eds. (Sapporo, Japan, Hokkaido University Press), 355-362.

Beck, R., Bulling, A. (1999) Sonnenfleckenperioden und ihre Messung. In: *Die Sonne beobachten*. Beck, R., Reinsch, K., Hilbrecht, H., Völker, P., eds. (Heidelberg, Sterne und Weltraum, Hüthig GmbH), 191-211.

Bulling, A., Agneskirchner, J., Castrop, F., Rumitz, M., Ovtscharoff, W., Wurzinger, L., Gratzl, M. (2000). *BodyExplorer 2.0, An Interactive Multilingual Program on the Cross-Sectional Anatomy of the Visible Human*. (Berlin/Heidelberg, Springer-Verlag), CD-ROM.

Zeitschriftenartikel

Bulling, A. (1993). Langfristige Sonnenfleckenprognosen. *SONNE* 17, 4.

Keller, H.U., Bulling, A. (1994). Scharfe Augen – Sonnenfleckenbeobachtungen von bloßem Auge. *ORION* 52, 287-290.

Bulling, A., Brucker, C., Berg, U., Gratzl, M., Mayerhofer, A. (1999). Identification of voltage-activated Na⁺ and K⁺ channels in human steroid secreting ovarian cells. *Ann. NY Acad. Sci.* 868, 77-79.

Mayerhofer, A., Frungieri, M.B., Fritz, S., Bulling, A., Jessberger, B., Vogt, H.J. (1999). Evidence for catecholaminergic, neuronlike cells in the adult human testis: changes associated with testicular pathologies. *J. Androl.* 20, 341-347.

Mayerhofer, A., Frungieri, M.B., Bulling, A., Fritz, S. (1999). Sources and function of neuronal signalling molecules in the gonads. *Medicina (B Aires)* 59, 542-545.

Bulling, A., Berg, F.D., Berg, U., Duffy, D.M., Stouffer, R.L., Ojeda, S.R., Gratzl, M., Mayerhofer, A. (2000). Identification of an ovarian voltage-activated Na⁺-channel type: Hints to involvement in luteolysis. *Mol. Endocrinol.*, 14, 1064-1074.

Grosse, J., Bulling, A., Brucker, C., Berg, U., Amsterdam, A., Mayerhofer, A., Gratzl, M. (2000). Synaptosome associated protein of 25 kDa (SNAP-25) in oocytes and steroid-

producing cells of rat and human ovary: Molecular analysis and regulation by gonadotrophins. *Biol. Reprod.* 63, 643-650.

Sommersberg, B., Bulling, A., Salzer, U., Fröhlich, U., Garfield, R.E., Amsterdam, A., Mayerhofer, A. (2000). Gap junction communication and connexin 43 gene expression in a rat granulosa cell line: Regulation by Follicle-Stimulating Hormone. *Biol. Reprod.* 63, 1661-1668.

Kongressbeiträge

Bulling, A., Finger, W., Föhr, K.J. *GABA- and glycine-activated whole-cell currents in cultivated tectal neurons of the embryonic chicken.* 1. Kongreß der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft, Berlin, Februar 1996. Abstrakt erschienen in: Special edition of Neuroforum, Feb. 1996, 219.

Bulling, A., Finger, W., Föhr, K.J. *Spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSCs) elicited by kainate in cultivated tectal neurons of the embryonic chicken.* 76. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft in Rostock, März 1997. Abstrakt erschienen in: *Pflügers Archiv* 433 (6) [Suppl] R146, 1997.

Bulling, A., Brucker, C., Berg, U., Gratzl, M., Mayerhofer, A. *Identification of voltage-dependent Na⁺ and K⁺ channels in human granulosa-luteal cells.* Molecular and Functional Diversity of Ion Channels and Receptors, Conference of the New York Academy of Sciences, New York, USA, Mai 1998.

Bulling, A., Brucker, C., Berg, U., Gratzl, M., Mayerhofer, A. *Identification and characterization of a voltage-dependent sodium channel of the neuroendocrine type in human granulosa-luteal cells.* VIIIth International Congress of Pharmacology, Munich, Juli 1998. Abstrakt erschienen in: *Archives of Pharmacology* 358/1 (S2), 702.

Bulling, A., Brucker, C., Berg, U., Gratzl, M., Mayerhofer, A. *Ovarian voltage-dependent sodium channels - evidence for a novel role in regulating steroid secretion.* 81st Meeting of the Endocrine Society, San Diego, USA, Juni 1999.

Sommersberg, B., Bulling, A., Ngezahayo, A., Amsterdam, A., Dantes, A., Garfield, R., Kolb, H.-A., Mayerhofer, A. *FSH regulates gap-junctional communication and connexin 43 gene expression in rat granulosa cells (GFSHR-17).* 81st Meeting of the Endocrine Society, San Diego, USA, Juni 1999.

Sommersberg, B., Bulling, A., Mayerhofer, A. *FSH regulates gap junctional communication and phosphorylation of connexin 43 in a rat granulosa cell line.* 44. Symposium der deutschen Gesellschaft für Endokrinologie / 35. Jahrestagung der deutschen Diabetes-Gesellschaft. Abstrakt erschienen in: *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, Suppl. 1, Vol. 108, 2000. Verleihung des Posterpreises der DGE.

Danksagung

Herrn Prof. M. Gratzl und Herrn Prof. A. Mayerhofer danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit.

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

Für weitere kritische Diskussionen und Durchsicht dieser Arbeit danke ich Dr. Lars Kunz und Christina Fischer.

Für die gute Zusammenarbeit und eine freundliche Arbeitsatmosphäre danke ich Jens Agneskirchner, Dr. Christine Bauer, Annemarie Behr, D. Sylvia Boddien, Florian Castrop, Dr. Katia Didelon-Gamel, Dr. Stefanie Fritz, Ulrike Fröhlich, Dr. Mónica Frungieri, Dr. Lothar Graff, Robert Grünert, Dr. Martina Haasemann, Dr. Barbara Höhne-Zell, Pia Körner, Andreas Mauermayer, Karin Metzrath, Prof. Wladimir Ovtscharoff, Gerhard Prechtner, Marlies Rauchfuß, Dr. Armin Reininger, Dr. Axel Reinhardt, Matthias Rumitz, Dr. Britta Sommersberg, Andrea Thalhammer, Gabriele Terfloth, Astrid Tiefenbacher, Prof. Laurenz J. Wurzinger und Barbara Zschiesche.

Lebenslauf

Name: Andreas Bulling

Geboren: 6.8.1971 in Stuttgart–Bad Cannstatt

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: Ledig

Vater: Hans Bulling

Beruf: Realschullehrer

Mutter: Waltraud von Ruepprecht-Bulling

Beruf: Sozialpädagogin

Schulbildung: Pestalozzi-Grundschule in Kierspe (1978 - 1981)
Gesamtschule der Stadt Kierspe (1981 - 1990)

Studium: Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1990 - 1996)
Biologie, Diplomprüfung in den Fächern Zoophysiologie, Genetik
und Mathematik

Diplomarbeit: Thema: *GABA- und Glycin-aktivierte Membranströme in kultivierten Nervenzellen des embryonalen Hühnchens*, am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut (NMI), Reutlingen

Berufsausbildung: C-Prüfung zum nebenamtlichen Organisten, Reutlingen (1992)

Promotion: Seit 1996, Thema: *Spannungsaktivierte Natriumkanäle im Corpus luteum des Primaten und ihre Rolle bei der Regulation von Steroidproduktion und Luteolyse* am Anatomischen Institut der Technischen Universität München

Förderung: Die Promotion wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs 333 (assoziiertes Mitglied) gefördert.