

**Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Universität zu Lübeck**

Direktor: Prof. Dr. med. K. Diedrich

**Untersuchungen zum Migrationsverhalten primärer und immortalisierter humaner
Granulosazellen unter dem Einfluss von Sphingosin 1-Phosphat und
Thrombozytensekret**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von

Christiane Kümpers

aus Steinfurt

Lübeck 2009

1. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. Sören von Otte
2. Berichterstatterin:	Priv.-Doz. Dr. med. Ingeborg Bos
Tag der mündlichen Prüfung:	07. 07. 2010
zum Druck genehmigt. Lübeck, den	07. 07. 2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Der Gelbkörper (Corpus luteum).....	1
1.1.1 Bedeutung des Gelbkörpers.....	1
1.1.2 Entwicklung des Gelbkörpers.....	1
1.2 Sphingosin 1-Phosphat	4
1.2.1 Biosynthese und Metabolismus	4
1.2.2 Vorkommen	5
1.2.3 Wirkungsweisen und Funktionen	6
1.2.3.1 S1P als Ligand der S1P-Rezeptoren.....	6
1.2.3.2 Mitwirkung der S1P-Rezeptoren an der Steuerung der Zellmigration.....	8
1.2.3.3 S1P als intrazellulärer second messenger	9
1.2.3.4 Agonisten und Antagonisten der S1P-Rezeptoren	9
1.3 Thrombozyten.....	11
1.3.1 Thrombozyten und S1P	11
1.3.2 Übersicht über weitere thrombozytäre Faktoren	12
1.3.3 Die Rolle der Thrombozyten bei der Gelbkörperentwicklung	13
1.4 Fragestellung	14
2. Material und Methoden	17
2.1 Bezugsquellennachweis.....	17
2.1.1 Chemikalien und Materialien	17
2.1.2 Zellkulturmedien und Antibiotika	18
2.1.3 Materialien für Zellkulturen	19
2.1.4 Zubehör für die Assays.....	19
2.1.5 Färbungen	19
2.1.6 Assays und Kits	19
2.1.7 Testsubstanzen.....	20
2.1.8 Verbrauchsmaterialien.....	20
2.1.9 Geräte und Software	21
2.2 Zusammensetzung der Puffer	22
2.3 Zusammensetzung der Medien.....	23

2.4 Zellkultur	24
2.4.1 Allgemeine Zellkulturtechniken	24
2.4.2 Granulosazellen	24
2.4.3 Granulosazellpräparation.....	25
2.4.4 HGL5-Zelllinie	25
2.5 Thrombozytensekret	26
2.5.1 Herstellung des Thrombozytensekrets.....	26
2.5.2 Der Begriff „Thrombozytensekret“	27
2.5.3 Bestimmung der S1P-Konzentration im Thrombozytensekret.....	27
2.5.4 Behandlung des Thrombozytensekrets mit Aktivkohle	27
2.5.5 Behandlung des Thrombozytensekrets mit Hitze	28
2.5.6 Behandlung des Thrombozytensekrets mit alkalischer Phosphatase	28
2.6 Sphingosin 1-Phosphat	29
2.7 Follikelflüssigkeit	29
2.8 Migrationsassay	29
2.8.1 Allgemeines	29
2.8.2 Vorbereitung des Migrationsassay	31
2.8.3 Durchführung des Migrationsassay	31
2.8.4 Migrationsassay mit einer Konzentrationsreihe von Thrombozytensekret	32
2.8.5 Migrationsassay mit einer Konzentrationsreihe von S1P.....	32
2.8.6 Migrationsassay nach Manipulation von Thrombozytensekret bzw. S1P.....	33
2.8.7 Migrationsassay mit Agonisten und Antagonisten der S1P-Rezeptoren.....	33
2.9 MTT-Assay.....	35
2.9.1 Prinzip.....	35
2.9.2 Durchführung	35
2.10 Auswertung.....	36
3. Ergebnisse.....	37
3.1 Thrombozytensekret	37
3.1.1 S1P-Konzentration im Thrombozytensekret	37
3.2 Migrationsassays	37
3.2.1 Migrationsassay mit einer Konzentrationsreihe von Thrombozytensekret	37
3.2.2 Migrationsassay mit einer Konzentrationsreihe von S1P.....	39

3.2.3 Migrationsassays mit manipuliertem Thrombozytensekret und S1P	40
3.2.3.1 Hitze	41
3.2.3.2 Aktivkohle	43
3.2.3.3 Alkalische Phosphatase	44
3.2.4 Migrationsassay mit Agonisten und Antagonisten der S1P-Rezeptoren.....	45
3.2.4.1 FTY720 (Agonist des S1P ₁ -, S1P ₃ -, S1P ₄ - und S1P ₅ -Rezeptors)	46
3.2.4.2 SEW-2871 (Agonist des S1P ₁ -Rezeptors).....	47
3.2.4.3 Phytosphingosin (Agonist des S1P ₁ - und S1P ₄ -Rezeptors).....	48
3.2.4.4 VPC 24191 (Agonist der S1P ₁ -und S1P ₃ -Rezeptors).....	50
3.2.4.5 Cay10444 (Antagonist des S1P ₃ -Rezeptors)	51
3.2.4.6 Pertussis-Toxin (Inhibitor von G ₀ /G _i -Proteinen).....	53
3.3 MTT-Assay.....	54
3.3.1 MTT-Assay mit Thrombozytensekret und Follikelflüssigkeit	54
3.4 Kurzzusammenfassung der Ergebnisse	57
4. Diskussion	58
4.1 Überblick	58
4.2 Thrombozytensekret induziert die Migration von Granulosazellen.....	59
4.3 Sphingosin 1-Phosphat induziert die Migration von Granulosazellen	60
4.4 Identifikation des Sphingosin 1-Phosphat im Thrombozytensekret.....	63
4.4.1 Effekte der Hitzebehandlung.....	63
4.4.2 Effekte der Aktivkohlebehandlung.....	64
4.4.3 Effekte der Alkalische Phosphatasebehandlung.....	64
4.4.4 Schlussfolgerung	64
4.5 Sphingosin 1-Phosphat vermittelt die Zellmigration G _i -Protein-.....	65
abhängig über den S1P ₃ -Rezeptor	65
4.5.1 FTY720.....	66
4.5.2 SEW-2871	67
4.5.3 Phytosphingosin	67
4.5.4 VPC 24191	68
4.5.5 Cay10444.....	69

4.5.6 Pertussis-Toxin	69
4.5.7 Schlussfolgerung	70
4.6 Thrombozytensekret induziert keine Granulosazell-Proliferation	72
4.7 Ausblick.....	73
5. Zusammenfassung	75
6. Literaturverzeichnis	76
7. Anhang	85
7.1 Abbildungsverzeichnis	85
8. Danksagung	86
9. Lebenslauf	88

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AK	Aktivkohle
ANOVA	analysis of variance
ANPT	Angiopoietin
AP	alkalische Phosphatase
BCA	bicinchoninic acid
bFGF	basischer fibroblast growth factor
BM	Basalmedium
BSA	bovines Serum Albumin
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
Cay10444	2-undecyl-thiazolidine-4-carboxylic acid
CHO	chinese hamster ovary cells
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EOC	epithelial ovarian cancer cells
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FKS	Fötales Kälber Serum
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
FTY720	2-Amino-2-(2-(4-octylphenyl)ethyl)propane-1,3-diol,HCl
GLZ	Granulosazellen, primäre
HAECs	human aortic endothelial cells
hCG	humanes Choriongonadotropin
HCl	Salzsäure
HDL	high density lipoprotein
HEK 293	human embryonic kidney 293 cells

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- Ethansulfonsäure
HGF	hepatocyte growth factor
HGL5	human granulosa line 5
HOSE	human ovarian surface epithelial cells
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
ICSI	intracytoplasmatischen Spermatozoen- Injektion
IGF	insulin like growth factor
IU	international units
IVF	in-vitro Fertilisation
LDL	low density lipoprotein
LH	luteinisierendes Hormon
MTT	3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5- diphenyltetrazolium bromide
PBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
PhS1P	Phytosphingosin-1-Phosphat
Phytosphingosin	Phytosphingosine 4-Hydroxy- Sphinganine (2S, 3S, 4R)-2-Amino- 1,3,4-Octadecanetriol
PLC	Phospholipase C
PR	platelet releasate
PS	Phytosphingosin
PS-Röhrchen	Polystyrol-Röhrchen
PTX	Pertussis-Toxin
RPMI	Nährmedium, benannt nach dem Roswell Park Memorial Institute
S1P	Sphingosin 1-Phosphat
SD	standard deviation
SDS	Natriumdodecylsulfat

SEW-2871	5-[4-Phenyl-5-(trifluoromethyl) thiopen-2-yl]-3-[3-trifluoromethyl) phenyl]-1,2,4-oxadiazole
SphK	Sphingosinkinase
SPP	S1P-Phosphatase
TGF- β	transforming growth factor β
TS	Thrombozytensekret
VEGF	vascular endothelial growth factor
VPC 24191	(S)-Phosphoric acid mono-[2-amino-3- (4-octyl-phenylamino)-propyl]ester

1. Einleitung

1.1 Der Gelbkörper (Corpus luteum)

1.1.1 Bedeutung des Gelbkörpers

Der weibliche Zyklus kann in die Follikel- und in die Corpus-luteum-Phase eingeteilt werden. Die Follikelphase entspricht der ersten Zyklushälfte und beginnt mit dem ersten Tag der Menstruation. Die Corpus-luteum-Phase entspricht der zweiten Zyklushälfte und beginnt mit dem Tag der Ovulation (11).

Das Corpus luteum entwickelt sich nach Freisetzung der Eizelle aus den zurückbleibenden Zellen des Follikels; dies sind Granulosa-und Theka-interna-Zellen (73). Der Gelbkörper ist eine transiente endokrine Drüse, deren Lebensspanne hormonell gesteuert wird. Aufgrund der Fähigkeit Progesteron zu produzieren ist er für die Implantation und den Erhalt der Schwangerschaft essentiell (71). Seine Vorstufe ist das Corpus hämorrhagicum. Dieses entsteht durch periovulatorische Blutungen in die Follikelhöhle. Im Falle einer Schwangerschaft wächst das Corpus luteum unter dem Einfluss von humanem Choriogonadotropin (hCG) bis zu einer Größe von 5 cm im Durchmesser heran und persistiert während der gesamten Schwangerschaft (Corpus luteum graviditatis). Falls es zu keiner Schwangerschaft kommt, ist seine Lebensspanne auf 10-14 Tage begrenzt (Corpus luteum menstruationis). Dabei kommt es zunächst zu einer funktionellen, dann zu einer morphologischen Rückbildung. Aus dem atretischen Corpus luteum bildet sich eine bindegewebige Narbe, das Corpus albicans (33). Der ovarielle Zyklus ist schematisch in Abbildung 1 veranschaulicht. Zwei wesentliche Prozesse sind für die Gelbkörperentwicklung charakteristisch: die Luteinisierung der Granulosazellen, d.h. Differenzierung der Granulosazellen zu Progesteron produzierenden Zellen (71) und die Neovaskularisation, d.h. Bildung eines neuen Gefäßnetzes (18).

1.1.2 Entwicklung des Gelbkörpers

Dem Übergang des präovulatorischen Follikels in den Gelbkörper liegt eine dramatische Umstrukturierung des follikulären Gewebes zugrunde. Der Vorgang beinhaltet Mechanismen ähnlich der Wundheilung und Tumorbildung. Einzelne Schritte der Gelbkörperentstehung sollen hier näher beleuchtet werden.

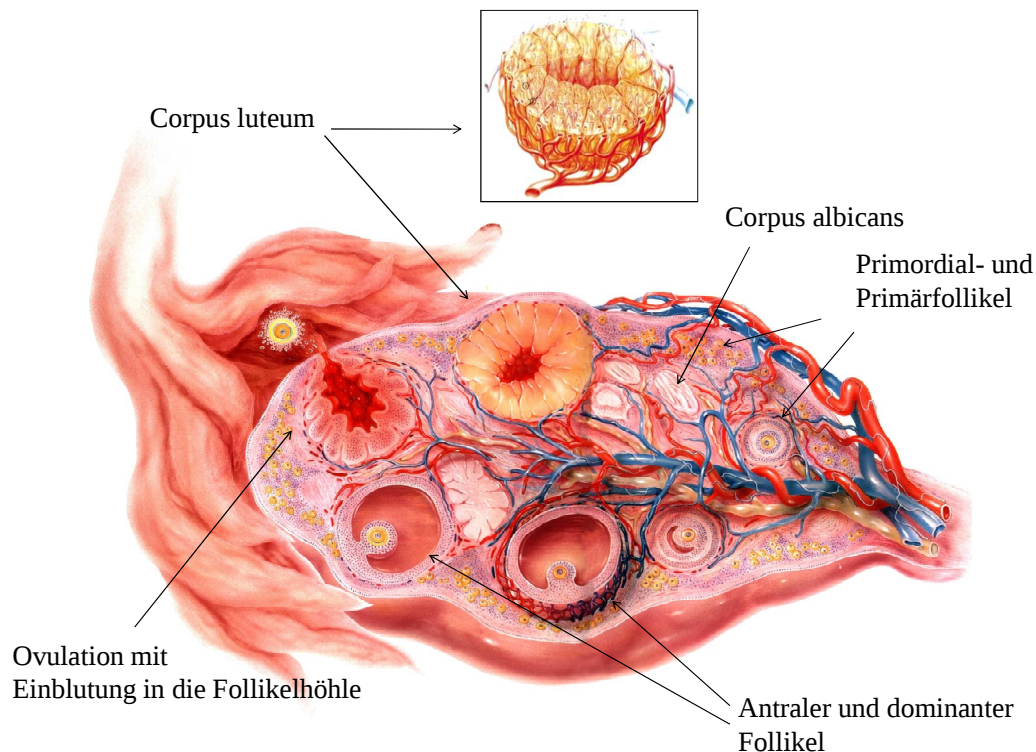


Abb. 1: Schematische Darstellung des ovariellen Zyklus

Dargestellt ist die schematische Entwicklung des Primordialfollikels zum Corpus albicans im Ovar. Das Corpus luteum und seine ausgeprägte Angiogenese ist im kleinen Fenster gesondert veranschaulicht (modifiziert nach Breckwoldt, M.: *Exempla endocrinologica*, 1991 (10)).

Nach Freisetzung der Eizelle wirft sich die zurückgebliebene Follikelhülle in Falten. Diese Faltenbildung vereinfacht vermutlich die Migration von Fibroblasten, Endothelzellen, Granulosazellen und Theka-interna-Zellen in das Zentrum der Follikelhöhle (8;73). Die Stimulation der Zellmigration wird als ein wesentlicher Mechanismus der Gelbkörperentwicklung betrachtet. Zum einen ist die Migration von Endothelzellen zur Etablierung neuer Gefäße notwendig, zum anderen ist eine zentripetale Migration verschiedener Zellarten (s.o.) bei der Gelbkörperentwicklung zu beobachten. Auf die zentripetale Zellmigration könnte die in der Follikelhöhle verbliebene Follikelflüssigkeit Einfluss haben, da diese angiogenetische Faktoren enthält (82). Zudem gelangen Thrombozyten durch die ovulationsbedingte Blutung (Corpus hämorrhagicum) in die Follikelhöhle und sezernieren nach Aktivierung durch Kontakt mit Komponenten extrazellulärer Matrix Inhaltsstoffe, die chemotaktisch wirken können (18).

Die Transformation des Follikels geht mit der Auflösung der follikulären Basalmembran einher. Durch proteolytische Enzyme wie z.B. Metalloproteinasen wird diese nach der Ovulation abgebaut. Die follikuläre Basalmembran stellt die Grenze zwischen der präovulatorisch avaskulären Granulosazellschicht und der Theka-interna-Zellschicht dar (65;73). Ihr Wegfall erleichtert die Migration von Blutzellen in extravaskuläre Räume zwischen Granulosazellen (18).

Vaskularisierung

Eine ausgeprägte Vaskularisierung des Gelbkörpers ist Voraussetzung für eine adäquate Corpus luteum-Funktion, denn nur so kann ein ausreichendes Substratangebot für die Progesteronproduktion und den Transport von Progesteron zu den Zielgeweben gewährleistet werden (18). Die Angiogenese wird durch die Migration und Proliferation endothelialer Zellen, die aus den Gefäßen der Theka-interna-Zellschicht in die Granulosazellschicht aussprossen, begünstigt (71). Bezüglich der Gesamtzellzahl des Corpus luteum repräsentieren Endothelzellen mit bis zu 85% die quantitativ größte Zellpopulation. Jede Granulosazelle hat zu mehreren Kapillaren Kontakt (71). Im Vergleich zu anderen Organen soll der Gelbkörper eines der Gewebe mit der stärksten physiologischen Angiogenese darstellen (4). Neben der endokrinen Funktion des luteinisierenden Hormons (LH) scheinen auch lokale Regulatoren wie Wachstumsfaktoren, Peptide, Steroide und Prostaglandine eine wichtige Rolle bei der Angiogenese zu spielen (71). In diesem Zusammenhang sind als angiogenetische Faktoren u.a. der vascular endothelial growth factor (VEGF) (54;71), basischer fibroblast growth factor (bFGF) (71;73), insulin-like growth factors (IGF -1 und IGF -2) und Angiopoietin (ANPT-1 und ANPT-2) (71) identifiziert worden. Einige dieser Mediatoren werden auch von den Granulosa- und Theka-interna-Zellen produziert. Zudem sind sie in der Follikelflüssigkeit zu finden, die nach der Ovulation in der Follikelhöhle zurückbleibt (82). VEGF ist eigentlich für seine Wirkungen auf das Endothel bekannt. Im Follikel soll VEGF allerdings nicht nur Effekte auf Endothelzellen haben, sondern auch antiapoptotisch und migrationsfördernd auf die Granulosazellen wirken. Die Apoptosehemmung und Migration der Granulosazellen sind zwei Mechanismen, die zu der Entwicklung und Aufrechterhaltung des Gelbkörpers beitragen (67). Hirschberg et al. fanden heraus, dass Granulosazellen ähnlichen Prozessen wie Endothelzellen unterliegen, wie z.B. Migration, Proliferation, Differenzierung, Expression von angiogenetischen Faktoren und deren

Rezeptoren (25). Die Autoren sprechen in diesem Zusammenhang von einem vaskulären Mimikry der Granulosazellen und gehen von einer Beteiligung der Granulosazellen bei der Angiogenese des Corpus luteum aus (25).

Luteinisierung

Unter Einfluss von LH kommt es im Rahmen der Luteinisierung zu morphologischen, endokrinologischen und biochemischen Veränderungen der Granulosa- und Thekazellen (73). Diese hypertrophieren und lagern Lipide und Cholesterinester aus der Leber ein. Aus Cholesterin werden Steroidhormone wie das Progesteron synthetisiert. Die Zellen werden zu diesem Zeitpunkt als Granulosalutein- (größer) bzw. Thekaluteinzellen (kleiner) bezeichnet (3). Sie zeigen dann Kennzeichen von Steroidhormone produzierenden Zellen wie reichlich glattes endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien vom tubulären Typ und Lipidtröpfchen (33).

1.2 Sphingosin 1-Phosphat

1.2.1 Biosynthese und Metabolismus

Sphingosin 1-Phosphat ist ein Metabolit des Sphingolipid-Stoffwechsels. Sphingolipide sind Strukturkomponenten von Lipiddoppelschichten (engl. bilayer) und somit wesentliche Bestandteile tierischer Zellmembranen. Die Struktur besteht aus einem langkettigen Hauptstrang sphingoider Basen, einer Amid-gebundenen Fettsäure variabler Länge und einer von vielen verschiedenen polaren Kopfgruppen (75). Sphingosin 1-Phosphat (S1P) ist ein Ceramid-Derivat. Ceramid entsteht durch Hydrolyse des Membranlipids Sphingomyelin. Die Reaktion wird durch die Sphingomyelinase katalysiert. Durch Ceramidase kann Ceramid seinerseits zu Sphingosin, der Vorstufe von S1P, umgesetzt werden. S1P entsteht durch Phosphorylierung von Sphingosin. Diese Reaktion wird durch die Sphingosin-Kinase (SphK) katalysiert (69). Von dieser sind zwei Isoformen bei den Säugetieren bekannt, SphK 1 und SphK 2 (46). Intrazelluläre S1P-Konzentrationen stehen mit der Verfügbarkeit von Sphingosin in Zusammenhang. Sphingosin als Substrat der SphK kann einerseits durch Neusynthese oder andererseits durch Hydrolyse von Membranlipiden („recycling pathway“) gebildet werden. Die de novo-Synthese findet am endoplasmatischen Retikulum statt. Sie wird durch die Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA initiiert, katalysiert durch die Palmitoyltransferase (69). Die Hydrolyse von

Membranlipiden (s.o.) stellt die quantitativ häufiger vorkommende Möglichkeit dar, Sphingosin zu bilden (19).

Die intrazelluläre S1P-Konzentration wird durch dessen Aufbau einerseits und Abbau andererseits reguliert. Der Abbau von S1P kann auf zwei Wegen stattfinden. Zum einen reversibel durch Dephosphorylierung zurück zum Sphingosin durch die S1P-Phosphatase (SPP), zum anderen irreversibel durch die S1P-Lyase (75). Bei dieser Reaktion wird S1P zu Phospho-Ethanolamin und Hexadecanal abgebaut. Diese werden für die Biosynthese von Phosphatidylethanolamin benötigt, ein Phospholipid, das für den Membranaufbau verwendet wird (77). Beide S1P-abbauenden Enzyme sind dem endoplasmatischen Retikulum zugeordnet (75;76).

S1P und seine Vorstufen Sphingosin und Ceramid haben in verschiedenen Zelltypen gegensätzliche Wirkungen. Sphingosin und Ceramid führen zu Wachstumshemmung und Apoptose, wohingegen S1P Zellwachstum stimuliert und Apoptose supprimiert (77). Die Metabolisierung von Sphingosin bzw. Ceramid zu S1P kann daher als regulatorische Schaltstelle angesehen werden. Die Balance zwischen der intrazellulären Konzentration an S1P und Sphingosin bzw. Ceramid beeinflusst so das Überleben oder Zugrundegehen der Zellen. Dieses Konzept wurde von Cuvillier et al. als „sphingolipid rheostat“ beschrieben (15). Als wesentliche Regulatoren des sphingolipid rheostat werden die SphK und SPP angesehen (77).

1.2.2 Vorkommen

S1P kommt im menschlichen Organismus ubiquitär vor. Seine intrazelluläre Konzentration ist generell gering (75). Es ist bisher nicht bekannt, wie intrazellulär gebildetes S1P von einer Zelle sezerniert wird um dann extrazellulär an die S1P-Rezeptoren derselben bzw. benachbarter Zellen binden zu können (autokrine bzw. parakrine Sekretion) (77). Allerdings kann die SphK von Zellen freigesetzt werden und extrazellulär vorkommendes Sphingosin zu S1P umsetzen (2). Im Blut ist die S1P-Konzentration hoch, da zelluläre Blutbestandteile wie z.B. Thrombozyten und Erythrozyten S1P sezernieren (23;88). S1P liegt im Blut in freier und gebundener Form vor. Es bindet an Blutbestandteile wie Albumin (87) und an Lipoproteine wie das high density lipoprotein (HDL) und low density lipoprotein (LDL). Seine Konzentration beträgt im Serum gesunder Probanden ca. 0,4 $\mu\text{mol/l}$, im Plasma ca. 0,1 $\mu\text{mol/l}$ (69). Intraindividuell können diese Werte schwanken

(23). Aufgrund der räumlichen Nähe zwischen Blut und umgebenden Gefäßwänden interagiert S1P besonders stark mit Endothelzellen, die S1P-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (69).

S1P ist auch als Bestandteil der Follikelflüssigkeit identifiziert worden. Dort liegt es hauptsächlich an follikuläres HDL gebunden vor. Die gemessene Konzentration von S1P in humaner Follikelflüssigkeit beträgt im Mittel 0,17 μ M. (82).

1.2.3 Wirkungsweisen und Funktionen

Die Wirkungen von S1P auf Zellprozesse sind vielfältig. Es beeinflusst u.a. die Zellproliferation, DNA-Synthese, Zellmigration, Angiogenese, Zelldifferenzierung, Apoptose, Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten, Kalziumhomöostase, immunologische Vorgänge sowie den Gefäßtonus.

S1P kann sowohl als intrazellulärer second messenger als auch als extrazellulärer Ligand der S1P-Rezeptoren fungieren (75).

1.2.3.1 S1P als Ligand der S1P-Rezeptoren

S1P wirkt extrazellulär als Ligand der S1P-Rezeptoren, die ubiquitär auf Plasmamembranen höher entwickelter Eukaryonten vorkommen (76). Die frühere Bezeichnung dieser Rezeptoren war endothelial differentiation gene-1 (EDG-1), da der EDG-1/S1P₁-Rezeptor als erster der Rezeptoren als Genprodukt aus humanen Endothelzellen isoliert wurde (27). Die S1P-Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte Transmembranrezeptoren, die die extrazelluläre Bindung des Liganden in ein intrazelluläres Signal umsetzen können (69). Spezifische Liganden sind ausschließlich S1P und dihydro-S1P. Dihydro-S1P, auch Sphingalin 1-Phosphat genannt, ist ebenfalls ein Intermediat des Sphingolipidstoffwechsels. Es besitzt außer einer 4,5 Doppelbindung dieselbe Struktur wie S1P (77). Derzeit sind fünf verschiedene S1P-Rezeptoren bekannt: S1P₁ (EDG-1), S1P₂ (EDG-5), S1P₃ (EDG-3), S1P₄ (EDG-6) und S1P₅ (EDG-8). Diese sind auf verschiedenen Zelltypen unterschiedlich stark exprimiert (75). Die Subtypen der S1P-Rezeptoren-Familie sind an verschiedene G-Proteine gekoppelt, denen wiederum unterschiedliche Signaltransduktionswege nachgeschaltet sind. Durch Bindung an die Rezeptoren kann S1P auf diese Weise viele, auch gegensinnige, Wirkungen haben. Es ist nicht bekannt, ob die S1P-Rezeptoren ständig aktivierbar sind oder nur situativ exprimiert

bzw. an die Zelloberfläche transloziert werden (69). Die einzelnen Rezeptoren sollen im Folgenden näher vorgestellt werden.

S1P₁-Rezeptor: Der S1P₁-Rezeptor ist an G_i-Proteine gekoppelt (76). Er vermittelt über die Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt, p38 mitogen-activated kinase (p38MAPK) und Rac migratorische Effekte (36). S1P soll über diesen Rezeptor an Gefäßentwicklung, -reifung und -stabilisierung beteiligt sein, indem es die Migration von Perizyten und glatten Gefäßmuskelzellen reguliert. S1P₁-Rezeptor-defiziente Mäuse sterben in utero an inneren Blutungen (48). Der S1P₁-Rezeptor wird von Lymphozyten exprimiert und soll die Migration reifer T-Zellen aus lymphatischen Organen in die Zirkulation fördern. Über einen Rho-Kinase vermittelten Signalweg wird die Ausbildung von Zell-Zell-Verbindungen durch VE-Cadherin vermittelt (44). Zudem soll der S1P₁-Rezeptor über die extracellular signal-regulated kinase (ERK) antiapoptotische Wirkung haben (36). Eine Aktivierung des ERK-Signalwegs soll die DNA-Synthese der Zellen steigern (37). Über die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) kommt es zu einer Kalzium-Mobilisierung (58). Der S1P₁-Rezeptor bewirkt zudem eine Inhibition der Adenylatzyklase (57).

S1P₂-Rezeptor: Der S1P₂-Rezeptor kann mit allen G-Proteinen gekoppelt vorliegen (76). Diese sind sowohl Pertussis-Toxin (PTX)-sensitiv als auch PTX-insensitiv (20). Gekoppelt an G_{12/13} wirkt der Rezeptor durch Aktivierung von Rho und Hemmung von Rac inhibitorisch auf die Migration (58). An G_{q/11} gekoppelt führt er zur Aktivierung der PLC und damit zu einer intrazellulären Kalziumerhöhung. An G_s gekoppelt stimuliert er die Adenylatzyklase mit Steigerung von cAMP (57). Dieser Rezeptor soll in der embryonalen Entwicklung des Herzens eine Rolle spielen (42).

S1P₃-Rezeptor: Der S1P₃-Rezeptor bindet an G_i, G_q und G_{12/13} (76). Er vermittelt wie der S1P₁-Rezeptor Zellmigration über die Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt, p38MAPK und Rac (36) und steigert die DNA-Synthese von Zellen über den ERK-Signalweg (37). Durch die Aktivierung der PLC erhöht S1P die intrazelluläre Kalziumkonzentration (76). Über G_i-Proteine wird die Inhibition der Adenylatzyklase vermittelt (57). Wie bei dem S1P₁-Rezeptor stimuliert S1P über den S1P₃-Rezeptor die Ausbildung von VE-Cadherin als Adhäsionsmolekül zwischen Zellen. Auf diese Weise hat S1P Einfluss auf die Gefäßpermeabilität (44).

S1P₄-Rezeptor: Der S1P₄-Rezeptor ist hauptsächlich auf Zellen lymphatischer Gewebe exprimiert. Er koppelt an G_i und G₁₂-Proteine (76). Untersucht wurde seine fördernde

Wirkung auf die Zellmigration u.a. an chinese hamster ovary-Zellen (CHO). Vermittelt wird dieser Einfluss über die Aktivierung von cdc42, einer kleinen GTPase der Rho-Familie (39). Der Rezeptor vermittelt die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration über die Aktivierung der PLC (84).

S1P₅-Rezeptor:

Der S1P₅-Rezeptor ist an G_i-Proteine gekoppelt (76). Einflüsse auf Zellmigration sind bisher unbekannt (5). Er wird vor allem von Oligodendrozyten und Astrozyten der Ratte exprimiert (30). Als einziger der S1P-Rezeptoren wirkt er über eine Hemmung der ERK1/2 antiproliferativ (49).

1.2.3.2 Mitwirkung der S1P-Rezeptoren an der Steuerung der Zellmigration

Somit ist allen S1P-Rezeptoren, außer dem S1P₅-Rezeptor, gemeinsam, dass sie die Zellmotilität positiv oder negativ beeinflussen können. Dies geschieht vornehmlich durch die Interaktion mit den kleinen GTPasen der Rho-Familie, vor allem mit Rho und Rac (44). Die GTPasen der Rho-Familie gelten als Schlüssel-Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts (22). Rho induziert die Formation von Stressfasern und fokalen Adhäsionskontakten. Die Aktivierung von Rac führt zur Ausbildung von Lamellopodien (Ausstülpungen der Zellmembran) und Membrankräuselungen, welche Zellen bei der Migration vorantreiben.

Zellmotilität spielt in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle. So soll S1P u.a. in der Entzündungsreaktion, Wundheilung, Angiogenese, Tumorentstehung, Metastasierung oder in der embryonalen Entwicklung (75) involviert sein. Studien zeigen, dass S1P u.a. die Migration von human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) (36;87), human aortic endothelial cells (HAECs) (37), ML-1-Zellen, einer follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie (5), epithelialen Ovarialkarzinom-Zellen (83), CHO-Zellen (41;58) und Lymphozyten (1;50) induziert.

S1P hat neben der Migrationsinduktion noch weitere Effekte auf Endothelzellen. Es stimuliert deren Proliferation und Differenzierung und trägt damit zur Formation neuer Gefäße bei. Daher ist S1P als angiogenetischer Faktor anerkannt (16;37;44). Zudem wirkt S1P antiapoptotisch auf Endothelzellen (26;36), es fördert die intrazelluläre Kalzium-Mobilisierung und reguliert die Zytoskelett-Reorganisation (87). Endothelzellen exprimieren den S1P₁- und S1P₃-Rezeptor. Es ist anzunehmen, dass S1P über diese

Rezeptoren Einfluss auf die Zellen nimmt (43;44). Thrombozyten enthalten reichlich S1P und können dieses sezernieren (s.u.). Daher wird vermutet, dass die Freisetzung von S1P durch Thrombozyten die Integrität der Endothelzellen aufrecht erhalten (26) bzw. diese im Rahmen der Wundheilung wieder herstellen kann (43).

1.2.3.3 S1P als intrazellulärer second messenger

S1P wird auch als ein intrazellulärer second messenger beschrieben. Eine Begründung für die Vermutung, dass S1P nicht nur extrazellulär über die S1P-Rezeptoren wirkt ist, dass S1P auch in Organismen wie Hefen und Pflanzen, in denen keine S1P-Rezeptoren exprimiert sind, verschiedene Prozesse regulieren kann. (21;55) Ein weiterer Grund ist, dass dihydro-S1P als weiterer spezifischer Ligand der S1P-Rezeptoren nach Bindung und Aktivierung derselben nicht alle Effekte des S1P nachahmen kann. (80) S1P intrazellulär injiziert führt zur Zellproliferation und Kalziumausschüttung, was diese These ebenfalls erhärtet. (80;81) Diese Kalziummobilisierung ist im Gegensatz zur rezeptorvermittelten Kalziummobilisierung Inositoltriphosphat-unabhängig (77). Die intrazellulären Zielstrukturen von S1P sind bisher allerdings nicht identifiziert worden, weshalb dieser Punkt kontrovers diskutiert wird (76).

In der Form eines intrazellulären second messengers soll S1P besonders auf die Kalziumhomöostase (51), Suppression von Apoptose (programmierter Zelltod) (15) und Zellproliferation (59) Einfluss haben.

1.2.3.4 Agonisten und Antagonisten der S1P-Rezeptoren

In den letzten Jahren konnten mehrere Agonisten und Antagonisten der S1P-Rezeptoren entwickelt werden. Einige werden in der vorliegenden Studie verwandt und sollen daher näher vorgestellt werden.

Agonisten:

FTY720 (2-Amino-2-(2-(4-octylphenyl)ethyl)propane-1,3-diol, hydrochloride):

FTY720 wird in vivo hauptsächlich durch die Sphingosinkinase 2 phosphoryliert und damit in seine aktive Form FTY720-P überführt. FTY720-P ist ein Agonist des S1P₁-, S1P₃-, S1P₄- und S1P₅-Rezeptors (12). Er ist für seine immunmodulatorischen Eigenschaften in der Transplantationsmedizin bekannt. Studien zeigen, dass es bei

fortdauernder Stimulation des S1P₁-Rezeptors durch FTY720-P zu dessen down-regulation kommt (14). Der S1P₁-Rezeptor ist auf Lymphozyten exprimiert und stimuliert deren Auswandern aus dem Thymus und sekundär lymphatischen Organen in die Peripherie (1). Auf diese Weise inhibiert FTY720-P die Migration von Lymphozyten und führt folglich zu einer Lymphopenie. FTY720-P soll sich positiv in der Behandlung von Autoimmunkrankheiten und der von Transplantatempfängern auswirken (12). FTY720-P induziert die Phosphorylierung der ERK1/2 in S1P₁- und S1P₄-transfizierten CHO-Zellen (50).

SEW-2871(5-[4-Phenyl-5-(trifluoromethyl)thiophen-2-yl]-3-[(trifluoromethyl)phenyl]-1,2,4-oxadiazole):

SEW-2871 ist ein selektiver Agonist des S1P₁-Rezeptors. An dem S1P₂-, S1P₃-, S1P₄- und S1P₅-Rezeptor ist er inaktiv. Es bestehen keine strukturellen Ähnlichkeiten zum S1P. SEW-2871 stimuliert die GTP-Bindung, die intrazelluläre Kalziumerhöhung und die Phosphorylierung von Akt (5) und ERK1/2. An S1P₁-Rezeptor exprimierenden CHO-Zellen induziert er Zellmigration in vitro. In vivo inhibiert er die Rezirkulation von Lymphozyten und führt zu einer Lymphopenie (70).

Phytosphingosin:

Durch Phosphorylierung von Phytosphingosin entsteht Phytosphingosin-1-Phosphat (PhS1P), eine natürlich vorkommende Sphingoidbase und Komponente von Zellmembranen. Zwischen S1P und PhS1P bestehen strukturelle Ähnlichkeiten. Bisher ist bekannt, dass PhS1P an den S1P₁- und S1P₄-Rezeptor binden kann (31). PhS1P führt in Fibroblasten der Maus durch eine Aktivierung der PLC zu einer intrazellulären Kalziumerhöhung. Dies soll über PTX-insensitive G-Proteine vermittelt werden. An denselben Zellen induziert PhS1P über PTX-sensitive G-Proteine, die p38 Kinase und Phosphatidylinositol 3-Kinase (Pi3K) Zellmigration (35). PhS1P stimuliert zudem ERK-vermittelt die Proliferation von Chondrozyten der Ratte (34).

VPC 24191 ((S)-Phosphoric acid mono-[2-amino-3-(4-octyl-phenylamino)-propyl ester]):

VPC 24191 ist ein Agonist des S1P₁- und S1P₃-Rezeptors. Brizuela et al. berichten, dass VPC 24191 wie S1P über diese Rezeptoren die Aldosteronproduktion von Zellen der Zona glomerulosa der Nebenniere steigert. Dieser Effekt wird über Phosphorylierung der PI3K/protein kinase B (PKB) und mitogen activated kinase kinase (MEK)/ERK1/2

vermittelt (13). Hinsichtlich der Migrationsvermittlung wird VPC 24191 in der Literatur nicht erwähnt.

Antagonisten:

Cay10444 (2-undecyl-thiazolidine-4-carboxylic acid):

Cay10444 (Synonym BML-241) wurde von Koide et al. entwickelt und ist als spezifischer Antagonist des S1P₃-Rezeptors anerkannt. Cay10444 blockt die S1P-vermittelte Kalziumerhöhung in der human cervical carcinoma cell line (HeLa-Zelllinie) um 40 % bei einer Konzentration von 10 μ M (40).

Pertussis-Toxin:

Pertussis-Toxin (PTX) ist ein Inhibitor G_i-gekoppelter Rezeptoren. Es besteht aus mehreren Proteinen, die von dem Keuchhustenerreger Bordatella pertussis abstammen. Pertussis-Toxin verursacht eine permanente Hemmung der G_i-Proteine, indem es die G_{i α} -Untereinheit ADP-ribolysiert (77). Eine Gemeinsamkeit aller S1P-Rezeptoren ist, dass sie u.a. an G_i-Proteine koppeln. Daher können viele rezeptorvermittelte Effekte von S1P durch Pertussis-Toxin geblockt werden.

1.3 Thrombozyten

1.3.1 Thrombozyten und S1P

Thrombozyten beinhalten eine hohe Menge S1P, da diese keine S1P-Lyase-Aktivität, wohl aber eine hohe Sphingosin-Kinase-Aktivität aufweisen (89). Thrombozyten generieren S1P auf zweierlei Weise: Zum einen durch Aufnahme von Sphingosin aus dem Blutplasma, zum anderen durch Metabolisierung von Sphingomyelin aus ihrer Plasmamembran. Die de novo Biosynthese von Sphingolipiden findet in Thrombozyten wegen einer schwachen Palmitoyltransferase-Aktivität nur in sehr geringen Maße statt (78). Yatomi et al. maßen $1,41 \pm 0,04$ nmol S1P (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; n=3) pro 10^9 Thrombozyten (89). Thrombozyten werden als bedeutendste Quelle von extrazellulärem S1P angesehen (78). Sie schütten S1P nach Stimulation durch prothrombotische Stimuli wie Thrombin, ADP und Kollagen aus (85). Thrombozyten reagieren auf eine äußere Stimulation mit einer Formveränderung unter Ausbildung von Pseudopodien, Aggregation untereinander und Sekretion ihrer Inhaltsstoffe (88). Die Freisetzung von S1P korreliert mit der

Proteinkinase C-Aktivität. So führt die Stimulierung von Thrombozyten mit Protein C-Aktivatoren, wie z.B. Thrombin, zur Ausschüttung von S1P (89).

Das von Thrombozyten freigesetzte S1P nimmt im Sinne eines mutmaßlichen positiven Rückkopplungsmechanismus über die S1P-Rezeptoren wiederum Einfluss auf die Thrombozyten. Randriamboavonjy et al. zufolge soll der S1P₂-Rezeptor der dafür verantwortliche Rezeptor sein (62). Stimulation der Thrombozyten mit S1P erhöht deren intrazelluläre Kalziumkonzentration und führt zu Formveränderungen der Thrombozyten. Diese nehmen eine kugelige Form an und bilden Pseudopodien aus. Diese Zellfortsätze setzen eine Vernetzungsreaktion in Gang, die zu einer Aggregation der Thrombozyten führt (88). Intrazelluläres S1P vermittelt diese Effekte hingegen nicht. Da Thrombozyten eine bedeutende Rolle bei der Blutgerinnung zukommt, lassen diese Beobachtungen vermuten, dass S1P bei der Hämostase, aber auch bei pathologischen Prozessen wie der Thrombose und Atherosklerose eine Rolle spielt (89).

1.3.2 Übersicht über weitere thrombozytäre Faktoren

Thrombozyten beinhalten viele Adhäsions- und Aggregationsfaktoren (u.a. ADP, Serotonin, Thromboxan A₂, den von Willebrand-Faktor, Faktor V, Plättchenfaktor 4 und Kalzium), die vornehmlich der primären Blutstillung (Bildung eines Thrombozytenpfropfes) dienen. Diese vermitteln eine Vasokonstriktion und Plättchenaggregation (9).

Thrombozyten enthalten weitere Faktoren, die ähnliche Effekte wie S1P haben. Bei Untersuchungen zum Einfluss eines thrombozytären Wachstumsfaktorenpräparates auf die Zellmigration und –proliferation ist wie in der vorliegenden Arbeit zu berücksichtigen, dass neben S1P auch weitere thrombozytäre Inhaltsstoffe Einfluss auf die Ergebnisse haben können. Thrombozyten enthalten u. a. den platelet derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), hepatocyte growth factor (HGF) (16;24), epithelial growth factor (EGF), transforming growth factor β (TGF- β) (24) und den vascular endothelial growth factor (VEGF) (16). All diese Mediatoren sind dafür bekannt, dass sie die Proliferation, Migration und Differenzierung von Zellen, v. a. Endothelzellen, vielfältig beeinflussen. Deshalb kommt ihnen Bedeutung bei der Angiogenese bei. Zudem supprimieren sie die Apoptose.

Diese Faktoren sind -im Gegensatz zum Lipid S1P- Proteine (17;38;63;64). Proteine und Lipide haben unterschiedliche Eigenschaften, welche durch Manipulationen wie Hitzebehandlung, Aktivkohlefiltration oder Verdau durch alkalische Phosphatase differenzierbar sind. Hitze führt bei Proteinen zu einer Denaturierung. Sie sind also hitzelabil, wohingegen Lipide hitzestabil sind. Die Behandlung von Lipiden mit Aktivkohle führt zu deren Extraktion (Delipidation). Proteine werden durch Aktivkohle nicht extrahiert (16). Durch alkalische Phosphatase wird S1P abgebaut und dadurch inaktiviert (68). Auch Proteine können bei Tragen einer Phosphatgruppe auf diese Weise dephosphoryliert werden. In der aktuellen Studie wurden die genannten Manipulationen zur Differenzierung S1P-spezifischer Effekte im thrombozytären Wachstumsfaktorenpräparat angewandt.

1.3.3 Die Rolle der Thrombozyten bei der Gelbkörperentwicklung

Im Rahmen der Ovulation gelangen Thrombozyten in den extravaskulären Raum der Follikelhöhle und umgeben Granulosaluteinzellen. Dies zeigen immunhistochemische Untersuchungen von Furukawa et al. (18). Durch Kontakt mit Komponenten extrazellulärer Matrix, vermutlich Kollagen, werden Thrombozyten aktiviert. Die Autoren untersuchten die Migration von HUVECs anhand eines Assays („matrigel invasion assay“) bei dem Thrombozyten im unteren Kompartiment als Stimulans für die HUVECs dienten. Sie fanden eine signifikante Steigerung der Endothelzell-Migration. Dieselben Autoren spekulieren, dass Thrombozyten durch Abgabe von angiogenetischen Faktoren einen Gradienten zwischen Zentrum und Peripherie des Follikels herstellen, der dann eine zentripetale Migration von Endothelzellen bewirkt. Somit könnte Thrombozyten im Rahmen der Neovaskularisation des Corpus luteum eine große Bedeutung zukommen. Thrombozyten scheinen auf verschiedene Weise auf die Gelbkörperentwicklung Einfluss zu nehmen. So berichten Furukawa et al. weiterhin, dass die Progesteronproduktion der Granulosaluteinzellen durch Koinkubation mit Thrombozyten signifikant verstärkt wird. Außerdem sollen Thrombozyten mutmaßlich an der Differenzierung der Granulosazellen zu Luteinzellen beteiligt sein, da sich die Zellmorphologie der Granulosazellen unter dem Einfluss von Thrombozyten verändert: Die Granulosaluteinzellen zeigen nach 48-stündiger Inkubation mit Thrombozyten eine signifikante Zunahme in Größe und Umfang sowie eine

Ausbildung von Zellausstülpungen (18). Die von den Autoren beschriebenen Wirkungen von Thrombozyten auf die Entwicklung des Gelbkörpers sind in Abbildung 2 veranschaulicht.

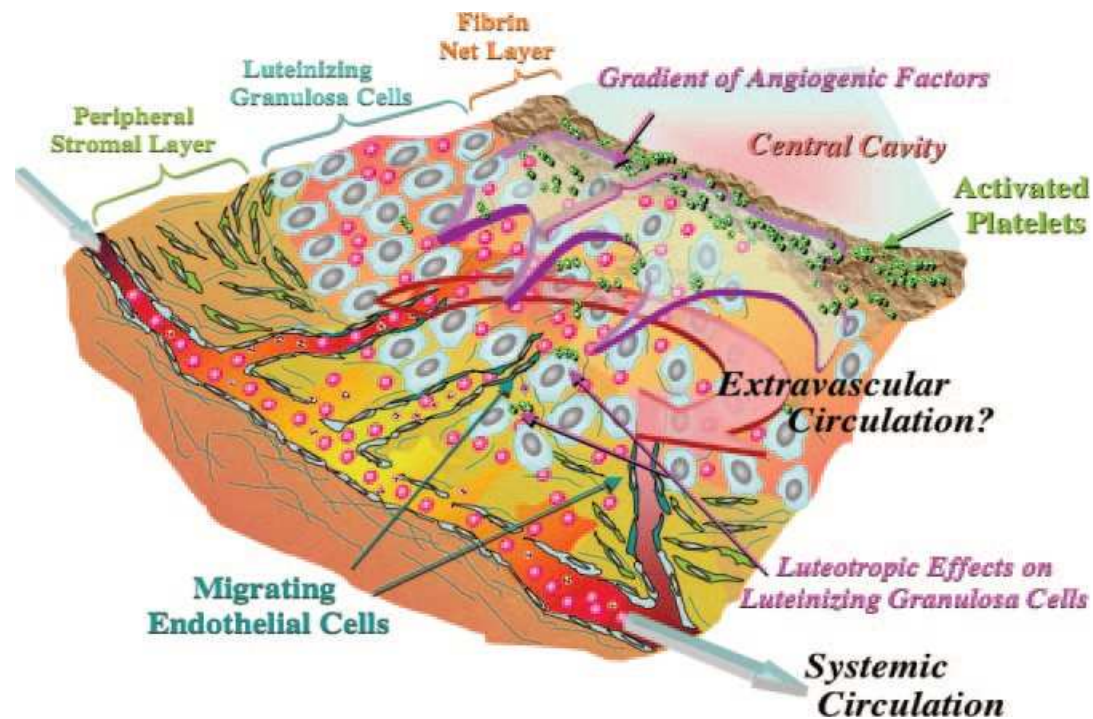


Abb.2 : Die mutmaßliche Rolle der Thrombozyten bei der Gelbkörperformation

Thrombozyten befinden sich hauptsächlich in der Follikelhöhle, wo sie durch Kontakt mit extrazellulärer Matrix aktiviert werden. Sie etablieren einen Gradienten angiogenetischer Faktoren, der eine zentripetale Migration von Endothelzellen bewirkt. Thrombozyten sind zudem in direktem Kontakt mit Granulosazellen, was Einfluss auf ihre Differenzierung zu Luteinzellen haben soll. Durch das feine Gefäßnetz zwischen den Granulosazellen wird das Progesteron der systemischen Zirkulation zugeführt. (Aus: Furukawa et al., 2007, Abb. 7 (18))

1.4 Fragestellung

In Vorarbeiten (8) konnte gezeigt werden, dass S1P als Bestandteil von follikulärem HDL die Migration von primären humanen Granulosazellen sowie immortalisierten Granulosazellen (sog. HGL5-Zellen) induzieren kann. Beide Zelltypen exprimieren den S1P₁-, S1P₂-, S1P₃- und S1P₅-Rezeptor (8), so dass eine S1P-vermittelte Migration von Granulosazellen in vivo wahrscheinlich erscheint. Eine Stimulation endothelialer Zellmigration und -proliferation durch S1P konnte bereits gezeigt werden (37;43). Beide Mechanismen, sowohl die Migration von Granulosazellen als auch die Neovaskularisation des Gewebes sind wesentliche Bestandteile der Gelbkörperentwicklung. Aus diesem Grund

wird S1P von einigen Autoren als neuer Mediator in der Entstehung des Corpus luteum angesehen (82).

S1P wird nach Stimulation von Thrombozyten freigesetzt (89). Thrombozyten nehmen aktuellen Studien zufolge ebenfalls Einfluss auf die Gelbkörperentwicklung (18). Sie gelangen im Rahmen der Ovulation durch eine Einblutung aus der Riss-Stelle des gesprungenen Follikels in die Follikelhöhle (Corpus hämorrhagicum). Durch die Freisetzung von chemotaktischen Faktoren wie z.B. S1P könnten Thrombozyten Angiogenesemechanismen im Corpus luteum fördern.

Ziel dieser Arbeit ist die Überprüfung, ob ein thrombozytäres Wachstumsfaktorenpräparat („Thrombozytensekret“) und insbesondere dessen Inhaltsstoff S1P die Migration von humanen Granulosazellen induzieren kann.

Zunächst soll die Migrationsinduktion der Zellen durch Thrombozytensekret und S1P anhand von Konzentrationsreihen in einem Migrationsassay untersucht und jeweils Wirkoptima bestimmt werden. Desweiteren soll durch Manipulation des Thrombozytensekrets und des S1P (Hitzebehandlung zur Proteindenaturierung, Aktivkohlefiltration zur Lipidextraktion und Verdau durch alkalische Phosphatase zur Inaktivierung des S1P) der indirekte Beweis erbracht werden, dass S1P zu den maßgeblichen Faktoren im Thrombozytensekret zählt, die die Granulosazellmigration induzieren.

Zudem soll durch Einsatz verschiedener Agonisten und Antagonisten der von Granulosaluteinzellen exprimierten S1P-Rezeptoren erhoben werden, welcher Rezeptor die Migrationsinduktion vermittelt.

S1P ist ebenfalls dafür bekannt, dass es die Zellproliferation steigern kann. Zum Ausschluss, dass die erhobenen Ergebnisse im Migrationsassay durch eine Zellproliferation verfälscht wurden, soll im Anschluss ein MTT-Proliferationsassay mit einer Konzentrationsreihe von Thrombozytensekret durchgeführt werden.

Die Migration von Granulosazellen gilt u.a. als wichtiger Mechanismus in der Entstehung und Aufrechterhaltung des Corpus luteum (67). Die Ergebnisse sollen weitere Hinweise erbringen, mit welchen Mechanismen sich Thrombozyten an der Regulation der Gelbkörperentwicklung beteiligen können. Mit dieser Studie sollen weiterführende Erkenntnisse über die grundlegende Physiologie der Gelbkörperentwicklung erlangt

werden, aus der sich perspektivisch Erklärungsmodelle zur Pathophysiologie ableiten lassen.

2. Material und Methoden

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Chemikalien und Materialien

Albumin, bovine serum	Sigma, A7030-10G, Steinheim
Alkalische Phosphatase	Sigma, P5521-1KU, Steinheim
Aktivkohle	charcoal Norit A; Serva, 30890, Heidelberg
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	Merck, 1.01146, Darmstadt
Äthylendiamintetraessigsäure/EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$)	Sigma, E-5134, Steinheim
Destilliertes Wasser	Apotheke UKSH Campus Lübeck
Dextran	dextran T 70; Pharmacia Biotech, 17-0280-01, Schweden
D-Glukose	Sigma, G-5400, Steinheim
Dimethylformamid (DMF)	Merck, 3053.1000, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, D-2650, St. Louis
Ethanol, 70%	Apotheke UKSH Campus Lübeck
Ficollpaque Plus	Amersham;17-1440-02, Schweden
Glycine	Sigma, G 8898, Steinheim
HEPES	Gibco BRL, CatNo: 11344-025 Schottland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, 1.05001.0250, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3)	Merck, 4854, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck, 1.05833, Darmstadt
Methanol	Merck, 1.06009, Darmstadt
MTT	Sigma; M2128

Natriumchlorid (NaCl)	Serva, 30183, Boehringer Ingelheim Heidelberg
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Na_2HPO_4)	Merck, 1.06346.0500, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva; 20763, Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck, 1.06329.1000, Darmstadt
Natronlauge (NaOH)	Merck, 1.09136, Darmstadt
Reinstwasser	TKA-LAB Wasseraufbereitungssystem Typ HP 5 UV
Salzsäure (HCl)	Merck, 1.09057.1000, Darmstadt
Schwefelsäure (H_2SO_4)	Apotheke UKSH Campus Lübeck
Thrombin, from Human Plasma	Sigma, T 7009, USA
Trinatriumzitat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$)	Sigma, S- 4641, Steinheim
Tris-HCl	Bio- Rad Laboratories, 161-0716 Hercules, CA 94547
Zitronensäure ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	Sigma, C-7129, Steinheim

2.1.2 Zellkulturmedien und Antibiotika

Accutase	PAA; l 11-007, Pasching
Antibiotic-Antimycotic	Gibco; 1392, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA)	Safco; A 2153- 50G, Steinheim
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)	Sigma; D 8537, Steinheim
Fötale Kälber Serum (FKS)	PAA; A 15773, Pasching
Nährmedium RPMI 1640	Gibco; 52400, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Gibco; 15070-063, Karlsruhe

Ultrasoner G	Pall Biosepra; 15950-017, Frankreich
--------------	---

2.1.3 Materialien für Zellkulturen

Einfriereröhren,	1,8 ml	Cryo Tube™ Vials nunc™, Roskilde, Dänemark
Kulturflaschen,	25, 75, 175 cm ²	tissue culture flask, Sarstedt, USA
Pipetten,	2, 5, 10, 25 ml	Cellstar, greiner bio-one, Frickenhausen
Pasteurpipetten,	230 mm, Glas	Assistent, Deutschland
Pasteurpipette,	single use, 3 ml, steril	VWR, Hannover
Falcon-Röhren,	50 ml, steril	Cellstar, greiner bio-one, Frickenhausen
PS-Röhren,	12 ml, steril	Cellstar, greiner bio-one, Frickenhausen
Zellsieb,	70µm	Falcon, Becton Dickinson

2.1.4 Zubehör für die Assays

Inserts	Porengröße 3 µm	Transwell, Corning, USA Omnilab-Laborzentrum, Bremen
Platten	Tissue Culture Plate; 24-Well Tissue Culture Plate; 96-Well	Sarstedt, Newton, USA

2.1.5 Färbungen

Kristall Violett	Carl Roth; T123.1, Karlsruhe
0,1 g/100 ml destilliertes Wasser	
Pulver wurde vorher mit Ethanol (100 %) gelöst	
Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma; T 8154, Taufkirchen

2.1.6 Assays und Kits

BCA™ Protein Assay Kit	Pierce; Rockford, USA
------------------------	-----------------------

MTT- Stoffwechseltest

Sigma; M2128

2.1.7 Testsubstanzen

Cay10444

Cayman Chemical,
298186-80-8, Ann Arbor, USA

FTY720

Calbiochem, 344597, Merck
Biosciences GmbH, Schwalbach

Pertussis Toxin

Sigma- Aldrich Chemie GmbH,
P2980, Taufkirchen

Phytosphingosin

Avanti Polar Lipids, 860499P,
Alabaster, Alabama, USA

SEW-2871

Biomol, 256414-75-2,
Hamburg

Sphingosin-1-Phosphat

Biomol, 26993-30-6, Hamburg

VPC 24191

Avanti Polar Lipids, 857365,
Alabaster, Alabama, USA

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Combitips plus, 5 ml, steril

Eppendorf, Hamburg

Einmalspritze, 5 ml, steril

B. Braun, Melsungen

Falcon-Röhrchen, 15 ml, steril

Cellstar, greiner bio-one,
Frickenhausen

Handschuhe

Peha-soft powderfree,
Hartmann, Heidenheim

Indikatorpapier

Macherey- Nagel, Düren

Kanüle

Becton Dickinson, Spanien

Kosmetiktücher

AS 67, astrein, Dahlewitz

Pipettenspitzen, 200, 1000µl,

Eppendorf Reloads, Eppendorf

PS-Röhrchen 4,5 ml, steril

Cellstar, greiner bio-one,
Frickenhausen

Reagiergefäße 1,5 ml

Sarstedt, Nümbrecht

Reagiergefäße 2,0 ml

Sarstedt, Nümbrecht

Schraubbecher 100 ml, steril

Sarstedt, Nümbrecht

Stericup,	250 ml, 0,22 µm Porengröße	Millipore Corporation Billerica, Massachusetts, USA
Sterilfilter,	0,2 µm Porengröße	Sarstedt, Nümbrecht
Tücher		Wypall X 60, Kimberly Clark
Wattestäbchen		NOBA Verbandmittel, Wetter

2.1.9 Geräte und Software

Abzug		Typ 2-412 NL, Köttermann, Uetze- Hänigsen
Brutschrank		Sanyo CO ₂ Inkubator
Erlenmeyerkolben,	250 ml	Schott, Deutschland
Gefrierschrank,	-20° C	Bosch economic
Gefrierschrank,	-80° C	Heraeus, Osterode am Harz
Hitzeblock		Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg
Kamera		EOS 350 D Digital, Canon, Japan
Kühlschrank,	4° C	Bosch
Magnetrührer		Mini MR standard, IKA Labortechnik, Deutschland
Magnetrührer		EMA 30, IDL GmbH Nidderau
Messzylinder,	1000 ml	Vit Lab, West Germany
Microplate Reader		MRX, Dynatech Laboratories, Denkendorf
Mikroskop		Wilovert A, Hund, Wetzlar
Mikroskop		Axiovert 135 M, Zeiss, Deutschland
Neubauer-Zählkammer		Assistent, Deutschland
Pipettierhilfe		Multipette plus, Eppendorf
Pipettierhilfe		Pipetus akku, Hirschmann
Pumpe		KNF, Laboport, Neuberger

Rotator	Ltf Labortechnik, Wasserburg
Rüttler	Titramax 100, Heidolph, Bad Nauheim
Sterilbank	Clean Air, Biohazard
Thermomixer compact	eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Biofuge pico, Heraeus, Kendro Laboratory Products, Osterode
Variopetten, 10-100 µl, 100-1000µl	Eppendorf Research
Vortex	Heidolph, Deutschland
Waage	Kern 770, Kern & Sohn GmbH, Albstadt
Waage	Kern 440-47, Kern & Sohn GmbH, Albstadt
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Deutschland
Wecker	Mali
Zentrifuge	Megafuge 1.0, Heraeus, Osterode am Harz

2.2 Zusammensetzung der Puffer

Hämolyspuffer:	8,29 g Ammoniumchlorid (NH_4Cl) 1,00 g Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3) 0,037 g Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) ad 1l Reinstwasser, sterilfiltrieren, pH 7,2 Lagerung bei 4°C
ACD-Puffer 1 (56):	0,8 g Zitronensäure 2,2 g Trinatriumzitat 2,45g D-Glukose ad 100 ml destilliertes Wasser, sterilfiltrieren Lagerung bei 4°C

ACD-Puffer 2 (56): 7,94 g Natriumchlorid (Na Cl)
 0,19 g Kaliumchlorid (K Cl)
 0,043g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Na₂HPO₄)
 1,1 g Glukose
 0,9 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)
 0,3 g HEPES
 ad 1000 ml destilliertes Wasser, sterilfiltrieren,
 pH 7,35 (diesen vorher eingestellt mit 1 Normal H Cl)
 Lagerung bei Raumtemperatur

Tris-Glycine Puffer: 3 M Glycine pH 9, 0
 1 M Tris-HCl pH 7,4
 1 M MgCl₂
 für 25 ml: 16,7 ml Glycine
 5 ml Tris-HCl
 1,88 ml MgCl₂
 mit destillierten Wasser ad 25 ml
 Lagerung bei 4° C

Stopp-Puffer des MTT-Assay: 10% SDS
 50% N,N-Dimethylformamid
 pH 4,7
 für 500 ml wurden 50 g SDS in 250 ml destillierten
 Wasser und 250 ml DMF gelöst und der pH-Wert mit
 HCl eingestellt.
 Lagerung bei Raumtemperatur

2.3 Zusammensetzung der Medien

Nährmedium: 500 ml RPMI 1640
 50 ml FKS
 10 ml Ultoser G
 5 ml Penicillin/Streptomycin

Basalmedium: 500 ml RPMI 1640
5 ml Penicillin/Streptomycin

Einfriermedium: FKS (nach Bedarf)
10 % DMSO

Migrationsmedium: 50 ml RPMI
0,5 ml BSA (Stocklösung: 5 g BSA auf 50 ml PBS)

2.4 Zellkultur

2.4.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Die Zellen wurden in Brutschränken bei 5% CO₂, 37° C und Wasserdampf gesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und passagiert. Alle Zellkulturarbeiten wurden in Sterilbänken ausgeführt.

2.4.2 Granulosazellen

Die verwandten Granulosazellpools wurden aus Follikelaspiraten von Frauen gewonnen, die sich einer in vitro Fertilisation (IVF) bzw. einer intracytoplasmatischen Spermatozoeninjektion (ICSI) unterzogen haben. Zur Stimulierung der Follikelreifung wurden die Frauen mit rekombinanten Follikel-stimulierenden Hormon (FSH; Gonal F®, Merck-Serono, Darmstadt) behandelt. Zur Suppression einer vorzeitigen Luteinisierung bzw. Ovulation wurde ab dem sechsten Tag der Stimulation täglich zusätzlich 0,25 mg Cetrorelix (Cetrotide®, Merck-Serono, Darmstadt) subkutan injiziert. Sobald mindestens drei Follikel einen Durchmesser von 17 mm erreicht hatten, wurde durch Verabreichung von 10.000 IU humanem Choriongonadotropin (hCG; Choragon®, Ferring, Kiel) die Ovulation induziert. Die Follikelpunktionen wurden nach 36 Stunden transvaginal unter sonografischer Kontrolle durchgeführt. Der Antrag bezüglich der Nutzung der Follikelflüssigkeit und der Granulosazellen für diese Studie wurde von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck genehmigt (Antragsteller: PD Dr. med. S. von Otte, Frau cand. med. Christiane Kümpers; Aktenzeichen 06-167; genehmigt am 12.01.2007).

2.4.3 Granulosazellpräparation

Die aus der Punktion erworbene Follikelflüssigkeit wurde bei 1500 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten zentrifugiert. Durch die Zentrifugation setzten sich die Zellen als Sediment ab. Nach dem Abpipettieren der Follikelflüssigkeit wurde das Zellpellet mit 10 ml PBS, das 0,1% BSA beinhaltetete, gewaschen. Es folgte eine weitere zehnminütige Zentrifugation bei 1500 Umdrehungen pro Minute. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das verbliebene Zellpellet mit 3 ml PBS + 0,1% BSA resuspendiert. Diese Lösung wurde auf 5ml Ficollpaque Plus pipettiert und für 20 Minuten bei 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das Verfahren der Ficollgradientenzentrifugation wurde von Sonntag et al. beschrieben (74). Ficoll ist ein ungeladenes Sucrose-Polymer, das der dichteabhängigen Trennung von verschiedenen Zellpopulationen dient. Während der Zentrifugation werden die Zellarten aufgrund ihrer differentiellen Dichte voneinander getrennt und sammeln sich in unterschiedlichen Schichten des Polymers an. Am Boden befinden sich aggregierte Erythrozyten und in der Schicht darüber Granulozyten, die die Ficoll-Schicht passieren. Aufgrund ihrer geringeren Dichte befinden sich die Granulosazellen nach der Zentrifugation über der Ficoll-Schicht auf dem Interphasering. Von diesem wurden sie mit einer Pipette aufgesaugt und in ein neues Röhrchen pipettiert. Es folgte ein erneuter Waschvorgang mit 10 ml PBS + 0,1% BSA. Anschließend erfolgte eine erneute zehnminütige Zentrifugation mit 1500 Umdrehungen pro Minute und ein erneutes Absaugen des Überstandes. Um noch verbliebene Erythrozyten zu eliminieren, wurde das Zellpellet in 5 ml Hämolysepuffer bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Wachstumsmedium hinzugegeben, erneut bei 1500 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten zentrifugiert und nach dem Absaugen des Überstandes dem Zellpellet 5 ml Wachstumsmedium hinzugegeben. Die Lösung wurde in eine T 25-Kulturflasche überführt und die Zellen kultiviert. Für die Versuche wurden isolierte Granulosazellen von mindestens vier Patientinnen gepoolt, um die Zellvariabilität zu gewährleisten.

2.4.4 HGL5-Zelllinie

Bei der HGL5-Zelllinie handelt es sich um eine luteinisierte immortalisierte Granulosa-Zelllinie. Rainey et al. haben diese 1994 erstmals beschrieben. Ihre Entwicklung erfolgte,

um Nachteile einer Primärkultur (Problem der Beschaffung, unterschiedliche Reifungsstadien der aspirierten Follikel, Variabilität durch verschiedene Patientinnen) zu umgehen. Humane Granulosazellen aus Follikelaspiraten wurden mit dem humanen Papillomavirus Typ 16 (HPV 16) transformiert. Dazu wurden sie mit Retroviren infiziert, die die E6- und E7- Regionen des humanen Papillomavirus 16 enthielten (61). Die HGL5-Zellen behalten ihre Fähigkeit, Progesteron und Östradiol zu produzieren. Die hier verwandten HGL5-Zellen kamen aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Universität zu Münster, Direktor Prof. Dr. med. L. Kiesel.

2.5 Thrombozytensekret

Leukozytendepletierte, gepoolte Thrombozytenkonzentrate wurden vom Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität zu Lübeck, Direktor Prof. Dr. med. H. Kirchner, zur Verfügung gestellt. Diese setzten sich jeweils aus vier Einzelspenden gesunder Blutspender zusammen. Das mittlere Packungsvolumen betrug 330 ± 30 ml. Die Thrombozytenzahl pro Einheit (4 Einzelspenden) betrug $2-4 \cdot 10^{11}$. Dies entspricht pro ml $0,7-1,7 \cdot 10^9$ Thrombozyten. In jeder Einheit befanden sich $< 2 \cdot 10^9$ Resterythrozyten und $< 1 \cdot 10^6$ Restleukozyten pro Einheit. Weitere Bestandteile pro ml Thrombozytenkonzentrat waren 0,77-0,83 ml Spenderplasma und 0,17-0,23 ml Stabilisatorlösung CPD (25-27,6 g Natriumcitrat-Dihydrat, 2,94-3,6 g Zitronensäure-Monohydrat, 22-24,3 g wasserfreie Glukose, 2,38-2,64 g Natriumdihydrogenphosphat in Wasser ad 1000 ml). Durch Leukozytendepletion wird das Risiko einer Immunisierung des Empfängers gegen humane leukozytäre Alloantigene (HLA) des Spenders verringert. Thrombozytenkonzentrate werden ABO-verträglich transfundiert. Indikationen sind die Behandlung thrombozytopenischer Blutungen sowie die Blutungsprophylaxe bei thrombozytären Bildungs- oder Umsatzstörungen. Sie sind 5 Tage bei 22 ± 2 °C unter gleichmäßiger Agitation haltbar (79).

2.5.1 Herstellung des Thrombozytensekrets

Die Aufarbeitung der Thrombozytenkonzentrate erfolgte einen Tag nach Verstreichen der Verfallsdaten. Jeweils 35 ml des Thrombozytenkonzentrats wurden mit 4 ml ACD-Puffer 1 gemischt und bei 1800 Umdrehungen pro Minute für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und zu jedem der verbliebenen Zellpellets wurden 2 bis 3 ml ACD-Puffer 2 gegeben. Die mit dem Puffer versetzten Pellets wurden anschließend in

einem Falcon-Röhrchen vereint. 100 Units Thrombin wurden parallel in 5 ml PBS gelöst. Das Thrombin wurde zu den Pellets hinzu gegeben und mit dem ACD-Puffer 2 auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde anschließend in einen sterilen Erlenmeyerkolben (250 ml) überführt. Der Einsatz von Thrombin diente der Stimulierung und Aktivierung der Thrombozyten zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren. Das Verfahren wurde von Nofer et al. beschrieben (56). Die Lösung wurde mit einem Magnetrührer für 10 Minuten gerührt. Da alle Arbeiten, die der Aufarbeitung des Thrombozytenkonzentrats dienten, steril durchgeführt werden mussten, wurde das Magnetstäbchen vor Gebrauch mit Alkohol behandelt und ausschließlich sterile Gefäße benutzt. Unter Rühren entstanden ein Zellkonglomerat und klare Flüssigkeit. Diese wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt und bei 1800 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten zentrifugiert. Von dem zellfreien Überstand wurden Aliquots à 4 ml für spätere Versuche bei -80 °C eingefroren.

2.5.2 Der Begriff „Thrombozytensekret“

In der englischsprachigen Literatur wird dieser zellfreie Überstand „platelet releasate“ (PR) genannt. Für diesen Begriff gibt es keine eigenständige deutsche Übersetzung. Umschreiben könnte man platelet releasate beispielsweise mit „thrombozytäres Wachstumsfaktorenpräparat“ oder „Präparat aus von Thrombozyten freigesetzten Faktoren“. Aus Gründen der Lesbarkeit wird im Folgenden ausschließlich der Begriff „Thrombozytensekret“ verwandt.

2.5.3 Bestimmung der S1P-Konzentration im Thrombozytensekret

Die S1P-Konzentration im Thrombozytensekret wurde vom Institut für Immunologie der Medizinischen Hochschule Hannover (Arbeitsgruppe Dr. rer. nat. M. Gräler) massenspektrometrisch ermittelt. Die Methodik wurde von Sensken et al. beschrieben (72). Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, so dass das Ergebnis den Mittelwert der Einzelergebnisse darstellt.

2.5.4 Behandlung des Thrombozytensekrets mit Aktivkohle

Für die Behandlung von 4 ml Thrombozytensekret wurden 20 mg Aktivkohle entsprechend 0,5 % und 2 mg Dextran entsprechend 0,05 % abgewogen und zu dem aufgetauten Sekret in ein PS-Röhrchen gegeben. Dieses wurde über Nacht im Kühlraum in einem Rotator über Kopf geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Lösung in sterile Eppendorfgefäße überführt

und daraufhin bei 3000 Umdrehungen pro Minute für 30 Minuten in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, erneut in Eppendorfgefäße überführt und bei gleicher Umdrehungszahl und Dauer zentrifugiert. Die Aktivkohle hatte sich durch die Zentrifugation als Sediment abgesetzt und konnte verworfen werden. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis der Überstand klar und keine Reste der Aktivkohle mehr zu erkennen waren. Das auf diese Weise behandelte Thrombozytensekret wurde dann frisch für den Migrationsassay genutzt.

2.5.5 Behandlung des Thrombozytensekrets mit Hitze

Aufgetautes Thrombozytensekret wurde für die Hitzebehandlung in sterile Eppendorfgefäße überführt und diese für 30 Minuten bei 90°C in einem Thermomixer belassen. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation des Sekrets bei 4000 Umdrehungen pro Minute für 20 Minuten in einer Tischzentrifuge. Die sich bei der Zentrifugation abgesetzten Pellets wurden verworfen. Der Überstand wurde abpipettiert und umgehend als weitere Testsubstanz im Migrationsassay verwendet.

2.5.6 Behandlung des Thrombozytensekrets mit alkalischer Phosphatase

Die hier angewandte Behandlung des Thrombozytensekrets mit alkalischer Phosphatase diente der Inaktivierung des darin enthaltenen S1P und beruft sich auf das Verfahren von Ruwisch et al. (68). Für den Verdau des Thrombozytensekrets durch alkalische Phosphatase wurden von 450 µl Tris-Glycine Puffer 8,5 µl abgenommen und verworfen. Im Gegenzug wurden 8,5 µl Alkalische Phosphatase hinzugegeben. Dies entsprach 50 Units des Enzyms. Das Entfernen von Puffer diente dazu, trotz der Zugabe von alkalischer Phosphatase ein Gesamtvolumen von 450 µl zu behalten. Zu dem Gemisch wurden 1500 µl Thrombozytensekret hinzugefügt. Es folgte eine dreißigminütige Inkubation im Wasserbad. Daraufhin wurden zur Neutralisation des pH-Wertes 100 µl HCl zugegeben und die Lösung bei 3000 Umdrehungen pro Minute für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde im Anschluss für die Versuche genutzt, nachdem mit Hilfe von Indikatorpapier ausgeschlossen wurde, dass die Lösung einen zu niedrigen pH-Wert aufwies. In diesem Falle wurde zur Neutralisation Natronlauge in 10 µl-Schritten hinzugegeben, bis sich ein Farbumschlag von gelb nach rosa vollzog. Die Verdünnung, zu welcher es durch Zugabe von Puffer, Salzsäure und Natronlauge kam, wurde zuvor in die

Berechnung der Konzentration des Sekrets für den Migrationsassay mit einbezogen. Auch das auf diese Weise modifizierte Sekret wurde frisch in den Versuchen verwendet.

2.6 Sphingosin 1-Phosphat

1 mg Sphingosin 1- Phosphat wurde in 2 ml Methanol bei 65°C im Wasserbad gelöst. Von der Lösung wurden Aliquots à 25 µl in Eppendorfgefäße gefüllt und diese zur Konservierung mit Stickstoff eingedampft. Das S1P war nun als weißlicher Film am Boden der Gefäße erkennbar. Das S1P wurde in diesem Zustand bei -20°C gelagert. Zur Verwendung des S1P in den Versuchen wurde eine Stocklösung von 125 µM hergestellt, indem das eingedampfte S1P mit 250 µl BSA (0,4 %) gemischt und diese Lösung bei 37°C und 1400 Umdrehungen pro Minute für 30 Minuten im Thermomixer geschüttelt wurde.

Die Behandlung des S1P mit Hitze und Aktivkohle verlief analog der Behandlung des Thrombozytensekrets. Beim Verdau des S1P durch alkalische Phosphatase wurden anstatt 50 Units des Enzyms 100 Units benutzt. Hier wurden 17 µl von 450 µl Tris-Glycine Puffer abgenommen und anschließend durch 17µl alkalische Phosphatase ersetzt. Die weiteren Schritte stimmten mit denen des Thrombozytensekret-Verdaus überein. Allerdings war eine Korrektur des pH-Wertes der Lösung durch Zugabe von Natronlauge nicht notwendig, da die Verdünnung des S1P mit Basalmedium stärker als die des Thrombozytensekrets war.

2.7 Follikelflüssigkeit

Bei der Granulosazellpräparation wurden (wie oben beschrieben) Zellen und Follikelflüssigkeit durch Zentrifugation voneinander getrennt. Die als Überstand separierte Follikelflüssigkeit wurde abpipettiert. Analog zu den Granulosazellen wurde auch hier aus Aspiraten von mindestens vier Patientinnen gepoolt. Zu diesem Zweck wurden die Follikelflüssigkeiten in einem Erlenmeyerkolben mit einem Magnetrührer vermischt. Für spätere Experimente wurde sie bei -80°C gelagert.

2.8 Migrationsassay

2.8.1 Allgemeines

Die hier verwandten Migrationsassays bestanden aus 24-er Well-Platten und dazu passenden Inserts, die einen Durchmesser von 6,5 mm und eine Membranfläche von 0,33

cm² besaßen. Durch Einsetzen von Inserts wurden die Wells in ein oberes und ein unteres Kompartiment geteilt, wobei die Membran des Inserts die Grenzfläche darstellte (sog. boyden chamber; Abb.3). Das Insert war in einem Well aufgehängt, so dass die Membran zum Boden einen Abstand von einem Millimeter hatte. Die Membran verfügte über Poren mit einer Größe von 3 µm. Durch diese erfolgte die Membranpassage vom oberen in das untere Kompartiment. Beim Gebrauch des Migrationsassay wurden zuerst die unteren Kompartimente mit 600µl Assayvolumen befüllt, das die eingesetzten Testsubstanzen in unterschiedlichen Konzentrationen enthielt. Daraufhin wurden die Inserts in die Wells eingefügt und in die oberen Kompartimente jeweils 100 µl Medium, die 100 000 Zellen enthielten, pipettiert. Es schloss sich eine zwanzigstündige Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ an. Nach dieser Zeit wurde die Migration quantifiziert.

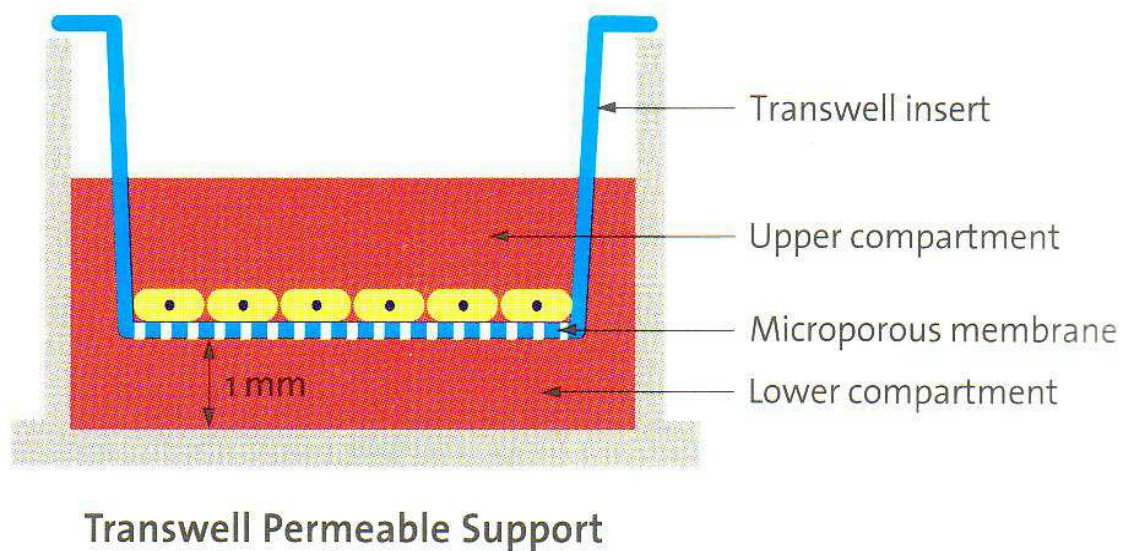


Abb. 3: Schematische Darstellung einer boyden chamber

Die Membran des Inserts teilt das Well in ein oberes und ein unteres Kompartiment. Diese Membran verfügt über Mikroporen, durch die eine Zellmigration vom oberen in das untere Kompartiment möglich ist. Der Abstand zwischen dem Boden des Wells und der Membran beträgt einen Millimeter (nach: Corning Incorporated, Instructions for Use, printed 7/04).

2.8.2 Vorbereitung des Migrationsassay

Zur Vorbereitung auf die Versuche wurden die Inserts über Nacht in Basalmedium präinkubiert. Die Wells wurden so befüllt, dass die Membran von beiden Seiten vom Medium benetzt war. Am nächsten Tag wurden Zellen mit 10 ml Accutase aus den Zellkulturflaschen gelöst. Die Accutase wurde dazu für ca. 3 Minuten auf den Zellen belassen. Nach Überführung der Zellen in ein Falcon-Röhrchen und einem Spülvorgang der Flasche mit 10 ml PBS wurde dieses für 10 Minuten bei 1500 Umdrehungen pro Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in Migrationsmedium resuspendiert. Es folgte die Zählung der Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension, 40 µl Migrationsmedium und 50 µl Trypan-Blau gemischt und ein Teil davon auf die Zählkammer aufgetragen. Die Ermittlung der Zellzahl beruhte auf der mikroskopischen Auszählung der Zellen in 4 Quadranten. Vitale Zellen stellten sich ungefärbt dar, abgestorbene Zellen waren blau gefärbt und wurden nicht gezählt. Auf diese Weise war eine Prüfung der Zellvitalität möglich. Die erhaltene Zahl wurde zur Ermittlung des Mittelwertes durch 4 dividiert. Dieser Wert wurde mit dem Faktor 5 (1:5 Verdünnung mit dem Migrationsmedium), dem Faktor 2 (1:1 Verdünnung mit Trypan-Blau) und dem Faktor 10000 (Faktor der Zählkammer) multipliziert. Das Ergebnis stellte die Zellzahl pro ml dar. Anhand der ermittelten Zellzahl konnte die Zellsuspension mit Migrationsmedium entsprechend so verdünnt werden, dass sich etwa 100 000 Zellen in 100 µl Medium befanden. Im weiteren Schritt wurden die unteren Kompartimente einer 24-er Well-Platte mit je 600 µl Basalmedium befüllt und die über Nacht inkubierten Inserts in die Platte eingefügt. Von der neu angesetzten Zellsuspension wurden dann jeweils 100 µl in die oberen Kompartimente pipettiert, so dass sich auf jeder Membran ca. 100 000 Zellen befanden. Es folgte eine zweistündige Inkubation im Brutschrank.

2.8.3 Durchführung des Migrationsassay

Nach zweistündiger Inkubation wurden die Inserts in eine neue Platte umgesetzt. Deren Wells waren zuvor mit den jeweiligen Testsubstanzen befüllt worden. In der sich anschließenden zwanzigstündigen Inkubation im Brutschrank erfolgte die Migration der Zellen aus dem oberen Kompartiment durch die Membran in das untere Kompartiment. Nach Inkubation wurden die Inserts mit einer Pinzette aus den Wells gehoben und die

oberen Kompartimente zuerst mit einem trockenen und dann mit einem PBS-getränkten Wattestäbchen gesäubert. Dieser Schritt diente der Beseitigung aller nicht migrierten Zellen von der Membranoberfläche. Die Inserts wurden daraufhin unter dem Abzug für ca. 15 Minuten getrocknet. Der nächste Arbeitsschritt bestand in der Fixierung der migrierten Zellen an der Membranunterseite. Dazu wurden jeweils 700 µl Methanol (100 %) in die unteren Wells einer unsterilen 24-er Well-Platte gegeben und die Inserts eingefügt. Die Platte wurde für eine Stunde in den Kühlschrank gestellt, die Inserts anschließend aus der Platte gehoben und wieder für ca. 15 Minuten unter dem Abzug getrocknet. Zur Färbung der Zellen wurden die Inserts für 2 Stunden in Wells eingefügt, in die zuvor 700 µl Kristallviolett pipettiert wurden. Um Farbrückstände zu beseitigen, wurden die Inserts nach der Färbung so lange in mit Leitungswasser gefüllten Platten gespült, bis sich das Wasser nicht mehr verfärbte. Nachfolgend wurden die Zellmembranen der migrierten Zellen mit Dodecylsulfat (10 %) lysiert. Nachdem die Inserts getrocknet waren, wurden dazu je 200 µl SDS auf die Membran jedes Inserts pipettiert und die Platte für 10 Minuten auf einen Rüttler gestellt. Dadurch wurde erreicht, dass sich das SDS durch die lysierten Zellen blau anfärbte. Je mehr Zellen sich auf der Membran befanden, desto dunkler blau stellte sich nun die Flüssigkeit in den Wells dar. Von dem gefärbten SDS wurden anschließend jeweils 100µl in Wells einer 96-er Well-Platte pipettiert. Die Messung der Absorptionen erfolgte mit Hilfe eines Plattenreaders bei 560 nm. Diese Handhabung des Migrationsassay ist von Hornung et al. beschrieben worden (29).

2.8.4 Migrationsassay mit einer Konzentrationsreihe von Thrombozytensekret

Die unteren Wells einer 24-er Well-Platte wurden jeweils mit 600 µl einer Mischung aus Thrombozytensekret und Basalmedium befüllt. Diese eingesetzten Mengen des Thrombozytensekrets waren 0, 10, 20, 40, 80 und 100 µl pro 100 µl Mischung. Die Inserts, in denen die Zellen 2 Stunden lang inkubiert hatten, wurden dementsprechend in die mit dem Thrombozytensekret befüllten Wells eingesetzt. Es folgte wie oben beschrieben die zwanzigstündige Inkubation.

2.8.5 Migrationsassay mit einer Konzentrationsreihe von S1P

Aus der Stocklösung des S1P wurden durch das Mischen mit Basalmedium fünf verschiedene Konzentrationen hergestellt, die analog zum oben beschriebenen Versuchsaufbau eine S1P-Konzentrationsreihe ergaben. Die eingesetzten Konzentrationen

waren 0,1 μM , 0,2 μM , 1 μM , 5 μM und 10 μM S1P. Vondiesen wurden ebenfalls je 600 μl in Wells einer 24-er Platte gegeben und die Inserts mit den vorinkubierten Zellen eingefügt.

2.8.6 Migrationsassay nach Manipulation von Thrombozytensekret bzw. S1P

Die Wells wurden mit Basalmedium und jeweils vier verschiedenen Modifikationen von Thrombozytensekret bzw. S1P befüllt. Es handelte sich hierbei um unbehandeltes, hitzebehandeltes, mit Aktivkohle und mit alkalischer Phosphatase behandeltes Sekret bzw. S1P. Als Konzentrationen für das Thrombozytensekret und S1P wurden die in den Vorversuchen spezifisch für die beiden Zellarten ermittelten Wirkoptima verwandt. Die gewünschte Konzentration wurde durch Mischen der Substanzen mit Basalmedium erreicht. Als Negativkontrolle diente reines Basalmedium, als Positivkontrolle das unbehandelte Sekret bzw. S1P. Die Zellmigration wurde auch hier für jede Konzentration dreifach bestimmt. Die weitere Handhabung des Migrationsassays verlief wie beschrieben analog zum ersten Versuch.

2.8.7 Migrationsassay mit Agonisten und Antagonisten der S1P-Rezeptoren

Die eingesetzten Agonisten und Antagonisten sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Die Agonisten und Antagonisten lagen in insgesamt vier verschiedenen Lösemitteln vor. Zur Kontrolle wurden die Lösemittel jeweils isoliert nach einer entsprechenden Verdünnung mit Basalmedium (1:100) in die Versuchsreihen einbezogen (Negativkontrolle). Als Positivkontrolle diente wiederum Thrombozytensekret in der bereits ermittelten Konzentration seines Wirkoptimums. Zum Erreichen dieser Konzentration wurde das Sekret mit dem Gemisch aus Basalmedium und Lösemittel vermischt. Die verwandten Lösemittel waren für SEW-2871, FTY720 und Pertussis-Toxin Dimethylsulfoxid, für Cay10444 Dimethylformamid, für Phytosphingosin Methanol und für VPC 24191 ein Gemisch aus Dimethylsulfoxid, Salzsäure und bovinem Serum-Albumin. Zur Herstellung dieses Lösemittels wurden Dimethylsulfoxid und 1N Salzsäure im Verhältnis 95: 5 vermischt und mit wässriger fettfreier BSA-Lösung (3 %) im Verhältnis 1:20 verdünnt.

Tab. 1: Übersicht über die untersuchten Agonisten und Antagonisten der S1P-Rezeptoren

Name	Charakterisierung	Eingesetzte Konzentration bei der HGL5-Zelllinie	Eingesetzte Konzentration bei den primären Granulosazellen
2-Amino-2-(2-(4-octylphenyl)ethyl)propane-1,3-diol, HCl (FTY720)	Agonist des S1P ₁ -, S1P ₃ -, S1P ₄ - und S1P ₅ -Rezeptors	1 n M, 1 µM	1 n M, 1 µM
Phytosphingosine 4-Hydroxysphinganine (2S,3S,4R)-2-Amino-1,3,4-Octadecanetriol (Phytosphingosin)	Agonist der S1P ₁ - und S1P ₄ -Rezeptors	0,2 µM, 2 µM	0,2 µM, 2 µM
5-[4-Phenyl-5-(trifluoromethyl)thiopen-2-yl]-3-[3-trifluoromethylphenyl]-1,2,4-oxadiazole (SEW-2871)	Agonist des S1P ₁ -Rezeptors	0,1 µM, 1 µM	0,2 µM, 1 µM
(S)-Phosphoric acid mono-[2-amino-3-(4-octylphenylamino)-propyl] ester (VPC 24191)	Agonist der S1P ₁ - und S1P ₃ -Rezeptors	0,1 µM	0,2 µM
2-undecyl-thiazolidine-4-carboxylic acid (Cay10444)	Antagonist des S1P ₃ -Rezeptors	0,2 µM, 1 µM	0,2 µM, 1 µM
Pertussis-Toxin (PTX)	Inhibitor von G ₀ /G _i -Proteinen	100 ng / ml	100 ng / ml

Für die Herstellung der gewünschten Konzentrationen wurde zuerst eine Vorverdünnung mit dem jeweiligen Lösemittel vollzogen und im Anschluss wiederum eine 1:100 Verdünnung mit Basalmedium. Durch diese zweite Verdünnung wurde erreicht, dass der Lösemittelanteil in den Kontrollen und in den Ansätzen mit den Agonisten und

Antagonisten gleich groß und die Migration der Zellen damit vergleichbar war. Zur Vorbereitung auf den Agonisten-Assay wurden die mit Zellen befüllten Inserts wie üblich für zwei Stunden mit Basalmedium vorinkubiert. Im Antagonisten-Assay erfolgte eine einstündige Vorinkubation mit Basalmedium und eine sich anschließende Vorinkubation mit den Antagonisten PTX und Cay10444. Agonisten- und Antagonistenassay unterschieden sich zudem darin, dass im Agonistenansatz Basalmedium und im Antagonistenansatz Thrombozytensekret zugegeben wurde.

2.9 MTT-Assay

2.9.1 Prinzip

Der MTT-Assay, erstmals 1983 von Mosmann beschrieben (52), ist ein quantitativ-colorimetrischer Test zur Bestimmung der Zellproliferation. Das Prinzip des MTT-Zell-Proliferationsassay beruht auf der Reduktion des gelben Tetrazoliums Salzes MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) durch Dehydrogenasen in stoffwechselaktiven Zellen. Als Reaktionsprodukt entsteht das wasserunlösliche Formazan, das blau-violett gefärbt ist. Dieses kann photometrisch gemessen werden. Die Farbintensität der Lösung und Vitalität der Zellen sind einander direkt proportional.

2.9.2 Durchführung

Der MTT-Assay wurde in 96-er Well-Platten angesetzt. In jedes Well wurden 100 µl Kulturmedium mit 10 000 Zellen gegeben (Herstellung analog Migrationsassay) und anschließend für ca. 3 Stunden im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit setzten sich die Zellen auf dem Boden der Wells ab. Anschließend wurde das Medium als Überstand mit einer Pipette aus den Wells abgesaugt, wobei darauf geachtet wurde, die auf dem Boden haftende Zellschicht nicht zu beschädigen. Es folgte ein Spülvorgang mit 100 µl PBS. Daraufhin wurden den Zellen verschiedene Testsubstanzen (ebenfalls je 100 µl) zugesetzt und diese für 20 Stunden auf den Zellen belassen. In der vorliegenden Studie waren dies Follikelflüssigkeit und Thrombozytensekret in verschiedenen Konzentrationen, die durch Mischen mit Basalmedium hergestellt wurden. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank. Zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität wurden im darauf folgenden Schritt 10 µl MTT-Lösung auf jeden Ansatz gegeben und die Platten für 4 Stunden im Inkubator

verwahrt. Zuvor wurden die Testsubstanzen abpipettiert und wiederum durch 100 µl Kulturmedium ersetzt. Die MTT-Lösung wurde hergestellt durch Lösung von 250 mg MTT in 50 ml PBS und Sterilfiltration dieser Suspension. Nach der vierstündigen Inkubationszeit wurden 100 µl Stopp-Puffer zu den Testsubstanzen in jedes Well gegeben und die Platten 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. In dieser Zeit erfolgte ein Farbumschlag von gelb nach blau. Die Absorptionsmessung der Ansätze erfolgte dual im Plattenreader bei 560 und 650 nm.

2.10 Auswertung

Die Auswertung der Migrations- und Proliferationsassays erfolgte mit dem Computerprogramm „EXCEL“. Für jede Testsubstanz wurde immer mindestens eine Dreifachbestimmung im Assay durchgeführt. In allen Versuchen wurde eine Negativkontrolle eingesetzt, die die Migration bzw. Proliferation der Zellen bei Inkubation mit Basalmedium darstellte. Die gemessenen Absorptionen der Negativkontrolle wurden gemittelt und als Bezugsgröße verwandt. Jeder Messwert der verschiedenen Ansätze wurde durch diesen Wert geteilt („foldness-Werte“) und aus diesen relativen Größen wiederum der Mittelwert gebildet. Es ergab sich für die Negativkontrolle ein Wert von 1 und für die anderen Ansätze Verhältniszahlen („Relative Migration bzw. Proliferation“). Diese wurden in Balkendiagrammen veranschaulicht, wozu das Computerprogramm Graph Pad Prism 4 verwendet wurde. Die Standardabweichung der Messwerte wurde berechnet und durch Fehlerindikatoren über den Balken dargestellt. Zur Untersuchung auf Signifikanz wurden initial die foldness-Werte der Absorptionen mittels eines one way ANOVA (engl.: analysis of variance) mit einer sog. Tukey-Korrektur für multiples Testen analysiert. Signifikante, von der Negativkontrolle abweichende Werte wurden zusätzlich mit einem einseitigen t-Test für gepaarte Stichproben auf Signifikanz getestet. Dies erfolgte ebenfalls mit dem Computerprogramm Graph Pad Prism 4.

3. Ergebnisse

3.1 Thrombozytensekret

3.1.1 S1P-Konzentration im Thrombozytensekret

Die Konzentration des S1P im Thrombozytensekret wurde extern im Institut für Immunologie der Medizinischen Hochschule Hannover per Massenspektrometrie gemessen. Die Messung ergab eine mittlere S1P-Konzentration von 3,2 μM .

Die Thrombozytensekret-Konzentrationsreihe (10, 20, 40, 80 und 100 μl TS/100 μl) ist durch die nun bekannte S1P-Konzentration im Thrombozytensekret darstellbar als 0,32, 0,64, 1,28, 2,56 und 3,2 μM S1P.

3.2 Migrationsassays

3.2.1 Migrationsassay mit einer Konzentrationsreihe von Thrombozytensekret

Mittels eines Migrationsassay mit einer Konzentrationsreihe von Thrombozytensekret sollte die Möglichkeit einer Migrationsinduktion durch das Thrombozytensekret sowie ggfs. dessen Wirkoptimum untersucht werden. Die eingesetzten Mengen waren 10, 20, 40, 80 und 100 μl Thrombozytensekret pro 100 μl Testsubstanz (Thrombozytensekret in Mischung mit Basalmedium). Zudem wurde als Negativkontrolle die Zellmigration bei Inkubation mit reinem Basalmedium eingesetzt. Die Ergebnisse werden im Folgenden als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung dargestellt.

HGL5-Zelllinie:

Die HGL5-Zelllinie zeigte bei einer Thrombozytensekret-Konzentration von 10 μl eine kaum von der Negativkontrolle ($1,0 \pm 0,142$) abweichende Migration von $1,044 \pm 0,187$ (Abb.4). Bei der nächst höheren Konzentration des Thrombozytensekrets (20 μl) war die Migration $1,194 \pm 0,236$ fach erhöht, ohne sich statistisch von der Negativkontrolle zu unterscheiden. Das Migrationsoptimum lag mit einem mittleren Wert von $1,784 \pm 0,429$ bei 40 μl deutlich über den anderen Werten und war (hoch)signifikant gegenüber der Negativkontrolle erhöht ($p=0,0003$). Bei 80 μl Thrombozytensekret war die induzierte Migration der HGL5-Zellen ($1,239 \pm 0,272$) wieder deutlich kleiner. Bei der Stimulation

durch reines Thrombozytensekret (100 μ l) wurde eine Migration erreicht, die auf Niveau der basalen Migration lag ($1,046 \pm 0,136$).

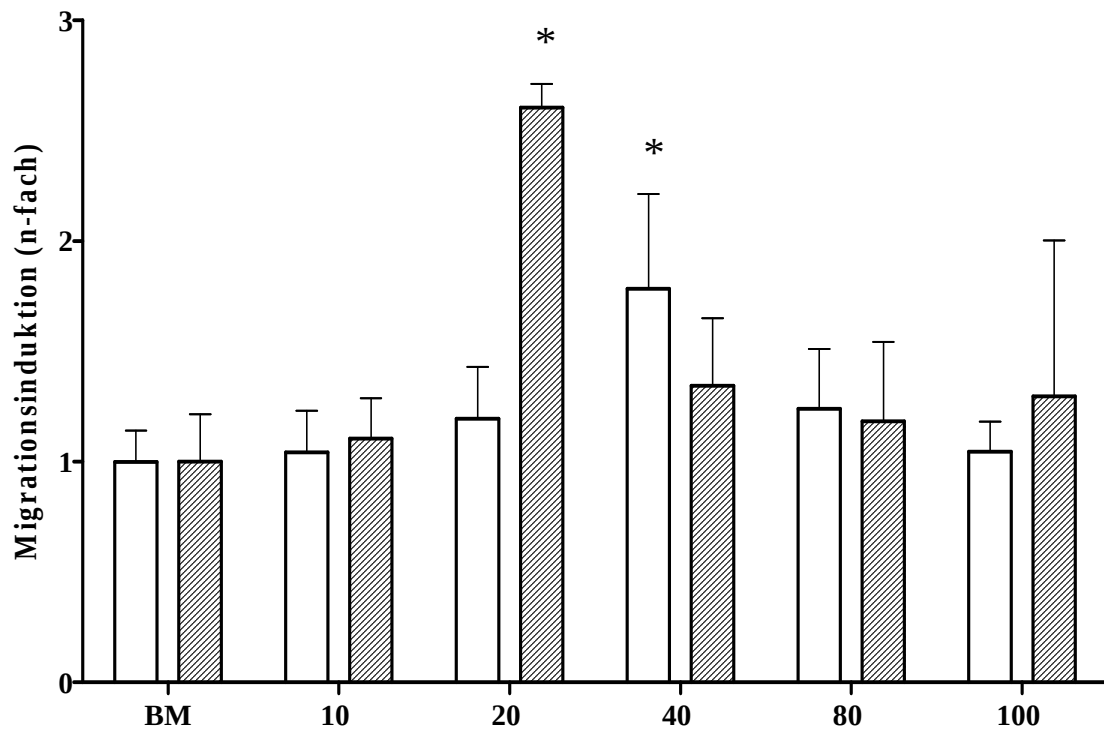


Abb. 4: Migrationsassay mit einer Thrombozytensekret-Konzentrationsreihe

Dargestellt ist die relative Migration (Mittelwerte und Standardabweichungen) von HGL5- (weiß) und primären Granulosazellen (schraffiert) bei Stimulation durch Thrombozytensekret in den Konzentrationen 10-100 μ l zugesetzt zu jeweils 100 μ l sowie ausschließlich Basalmedium (BM) im Assay (Negativkontrolle) nach zwanzigstündiger Inkubation. Markierungen: * ($p < 0,05$ vs. Negativkontrolle). HGL5: $n=9$; GLZ: $n=3$.

Primäre Granulosazellen:

Die primären Granulosazellen zeigten bei der kleinsten Thrombozytensekretmenge (10 μ l) eine im Bereich der Negativkontrolle ($1,0 \pm 0,215$) liegende Migrationsinduktion von $1,106 \pm 0,181$ (Abb.4). Das Migrationsoptimum bei 20 μ l stach mit einem mittleren Wert von $2,605 \pm 0,106$ sehr deutlich hervor und war signifikant gegenüber der Negativkontrolle erhöht ($p=0,003$). Alle übrigen erhobenen Werte waren nicht signifikant erhöht. Bei einer zugesetzten Menge von 40 μ l betrug die Migrationsinduktion $1,344 \pm 0,307$. Noch geringer fiel das Ergebnis bei 80 μ l Thrombozytensekret mit einer mittleren Migration von $1,182 \pm 0,361$ aus. Durch Stimulation mit reinem Thrombozytensekret lag die erhobene Migration bei $1,296 \pm 0,708$.

Das Wirkoptimum des Thrombozytensekrets lag bei den primären Granulosazellen demnach eine Konzentrationsstufe unterhalb des der HGL5-Zelllinie. Zudem zeigten die primären Zellen hier eine stärkere Migrationsinduktion als die immortalisierten Zellen.

3.2.2 Migrationsassay mit einer Konzentrationsreihe von S1P

Dieser Assay diente analog dem Migrationsassay mit der Konzentrationsreihe von Thrombozytensekret der Ermittlung einer potenziellen Migrationsinduktion durch das S1P und seines Wirkoptimums. Das S1P wurde durch Mischen seiner Stocklösung mit Basalmedium in fünf verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Dies waren 0,1 μ M, 0,2 μ M, 1 μ M, 5 μ M und 10 μ M S1P. Die erhobene Zellmigration bei Inkubation mit reinem Basalmedium diente als Negativkontrolle.

HGL5-Zelllinie:

Die HGL5-Zellen zeigten mit steigenden Konzentrationen des S1P eine abnehmende Migrationsbereitschaft. Die stärkste Migration ($2,624 \pm 0,249$) wurde bei der kleinsten Konzentration von S1P, also bei 0,1 μ M erreicht. Mit $p < 0,0001$ war das Wirkoptimum (hoch)signifikant gegenüber der Negativkontrolle ($1,0 \pm 0,027$) erhöht (Abb.5). Bei einer Konzentration von 0,2 μ M S1P war die Migration $1,376 \pm 0,278$ fach erhöht. Keine Migrationsinduktion konnte hingegen bei 1 μ M S1P beobachtet werden. Mit einer mittleren Migration von $0,981 \pm 0,209$ unterschied sich das Niveau nicht von der Negativkontrolle. Vergleichbare Werte zeigten sich bei S1P-Konzentrationen von 5 bzw. 10 μ M. Es wurde bei beiden Konzentrationen ebenfalls keine Migration induziert. Die erhobenen Mittelwerte waren $0,983 \pm 0,062$ bzw. $0,906 \pm 0,171$.

Primäre Granulosazellen:

Das Migrationsverhalten der primären Granulosazellen zeigte bis zu einer S1P-Konzentration von 0,2 μ M (Wirkoptimum) einen steigenden und danach wieder abfallenden Verlauf (Abb.5). Bei einer Konzentration von 0,1 μ M S1P wurde gegenüber der Negativkontrolle ($1,0 \pm 0,018$) eine $1,425 \pm 0,147$ fach erhöhte Migration erreicht. Die erhobene mittlere Migration bei 0,2 μ M S1P betrug $1,937 \pm 0,543$ mit einer Signifikanz zur Negativkontrolle von $p = 0,021$. Bei 1 μ M S1P lag die mittlere Migration bei $1,284 \pm 0,117$, bei 5 μ M S1P nur noch bei $1,035 \pm 0,017$. Keine Zellmigration wurde bei der höchsten Konzentration (10 μ M S1P) beobachtet. Das Niveau lag unterhalb des der Negativkontrolle mit einer mittleren Migration von $0,842 \pm 0,10$.

Das S1P-Wirkoptimum der primären Granulosazellen lag hier um eine Konzentrationsstufe oberhalb des der HGL5-Zellen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Assays mit einer Konzentrationsreihe von Thrombozytensekret war hier die Migrationsinduktion der HGL5-Zellen stärker ausgeprägt.

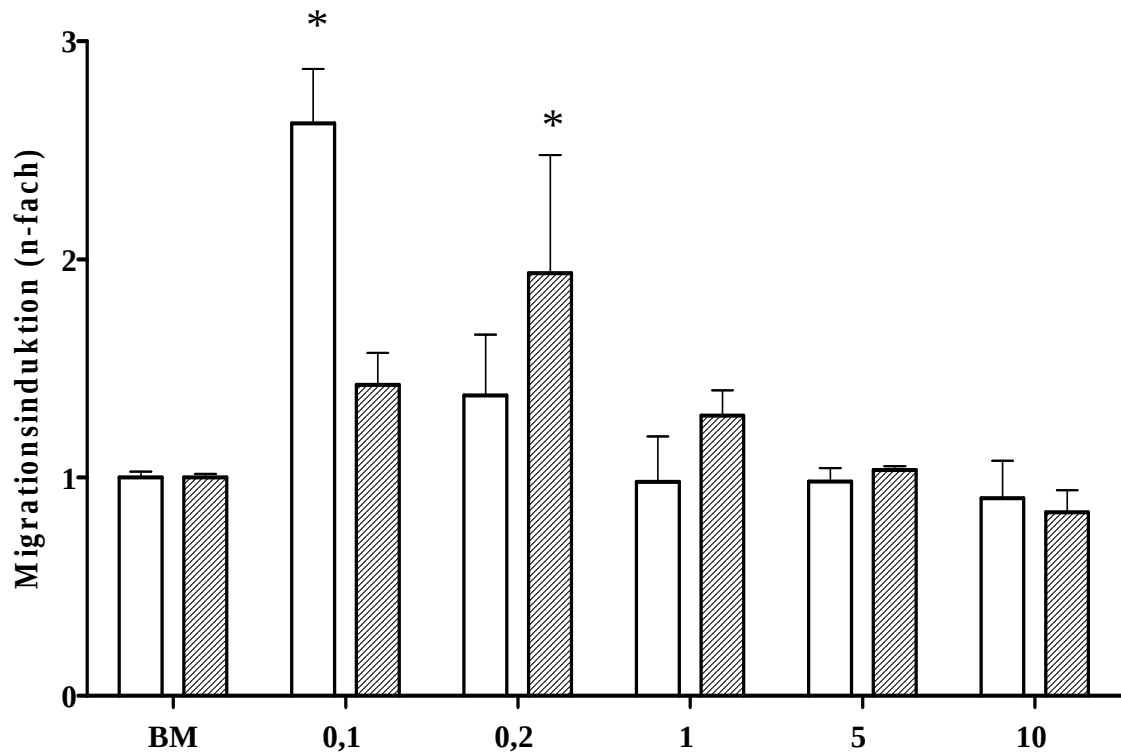


Abb. 5: Migrationsassay mit einer S1P-Konzentrationsreihe

Dargestellt ist die relative Migration (Mittelwerte und Standardabweichungen) von HGL5- (weiß) und primären Granulosazellen (schraffiert) bei Stimulation durch S1P in verschiedenen Konzentrationen (μM) und durch Basalmedium (Negativkontrolle) nach zwanzigstündiger Inkubation. Abkürzungen: BM=Basalmedium, S1P=Sphingosin 1-Phosphat. Markierungen: * ($p < 0,05$ vs. Negativkontrolle). HGL5: $n=5$; GLZ: $n=4$.

3.2.3 Migrationsassays mit manipuliertem Thrombozytensekret und S1P

Ziel dieses Assay war die Untersuchung der Auswirkungen einer Manipulation von Thrombozytensekret und S1P mit Hitze (Proteindenaturierung), Aktivkohle (Lipidextraktion) und alkalischer Phosphatase (Dephosphorylierung) auf die Zellmigration. Als Positivkontrolle diente die Zellmigration bei Stimulation mit nativem Thrombozytensekret bzw. S1P, in der Konzentration des jeweils in den Vorversuchen ermittelten Wirkoptimums (HGL5-Zellen: $40 \mu\text{l}$ TS und $0,1 \mu\text{M}$ S1P; Granulosazellen: 20

μ l TS und 0,2 μ M S1P (Kap. 3.2.1 bzw. Kap. 3.2.2)). Als Negativkontrolle wurde wiederum die Migration bei Inkubation mit Basalmedium verwendet. Zudem war von Interesse, ob sich das Migrationsverhalten der Zellen zwischen dem Thrombozytensekret- und S1P-Assay als äquivalent darstellt. Daraus könnten Rückschlüsse gezogen werden, ob die durch das Thrombozytensekret induzierte Migration auf das Vorhandensein von S1P erklärt werden könnte.

3.2.3.1 Hitze

HGL5-Zelllinie:

Durch natives Thrombozytensekret (40 μ l) wurde bei den HGL5-Zellen eine $4,438 \pm 0,493$ fach erhöhte Migration induziert, die gegenüber der Negativkontrolle ($1,0 \pm 0,103$) signifikant gesteigert war ($p=0,004$). Bei Stimulation der Zellen mit hitzebehandeltem Thrombozytensekret war die mittlere Migration ($3,888 \pm 1,108$) ebenfalls signifikant gegenüber der Negativkontrolle erhöht ($p=0,023$). Zwischen nativem und hitzebehandeltem Thrombozytensekret bestand kein signifikanter Unterschied.

Natives S1P (0,1 μ M) bewirkte eine gegenüber der Negativkontrolle $2,768 \pm 0,415$ fach gesteigerte Zellmigration ($p=0,008$). Eine noch etwas stärkere Migration ($3,041 \pm 0,465$; $p=0,021$) bewirkte das hitzebehandelte S1P. Auch hier unterschieden sich die Zellmigrationen nicht signifikant voneinander (Abb.6).

Primäre Granulosazellen:

Bei den Granulosazellen war die durch natives Thrombozytensekret (20 μ l) induzierte Migration im Mittel $5,260 \pm 0,855$ fach gegenüber der Negativkontrolle ($1,0 \pm 0,194$) erhöht und damit signifikant gesteigert ($p=0,004$). Bei Hitzebehandlung des Thrombozytensekrets war die Zellmigration $4,519 \pm 0,678$ fach erhöht. Gegenüber der Negativkontrolle war diese signifikant erhöht ($p=0,003$), gegenüber TS-nativ bestand kein signifikanter Unterschied.

Durch natives S1P (0,2 μ M) wurde eine $4,430 \pm 0,448$ fache Migration verglichen mit der Negativkontrolle erreicht ($p=0,005$). Bei der Hitzebehandlung des S1P kam es zu einer $3,785 \pm 0,928$ fach gesteigerten Migration ($p=0,012$). Der Unterschied zwischen der Migrationsinduktion durch natives und hitzebehandeltes S1P erreichte auch hier kein signifikantes Niveau (Abb.6).

Durch Hitzebehandlung des Thrombozytensekrets und S1P war demnach bei beiden Zellarten keine Einschränkung der Zellmigration zu beobachten.

Die n-fachen Induktionen durch Basalmedium und durch natives Thrombozytensekret und S1P waren im Assay mit Aktivkohle oder alkalischer Phosphatase identisch. Auffallend war, dass die primären Zellen in den Positivkontrollen eine stärkere Migrationsinduktion als die HGL5-Zellen aufwiesen. Verglich man die durch natives Thrombozytensekret und S1P induzierten Zellmigrationen, war bemerkenswert, dass ersteres bei beiden Zellarten einen stärkeren Effekt als S1P hatte.

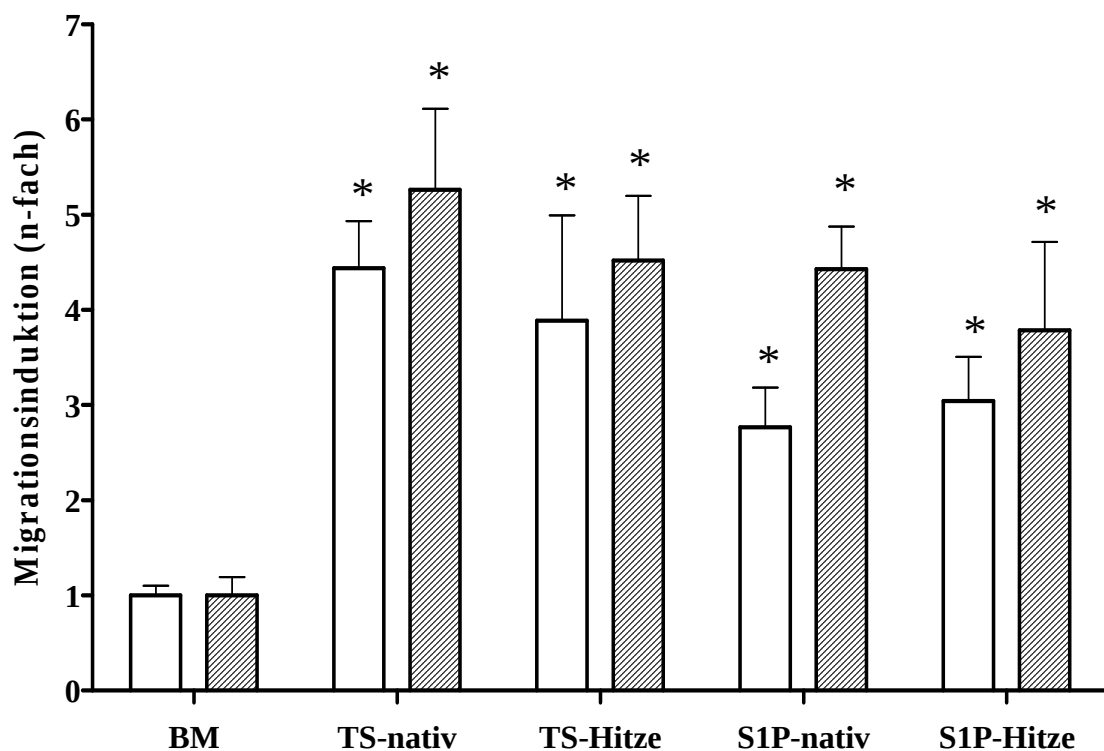


Abb. 6: Migrationsassay mit hitzebehandeltem S1P und Thrombozytensekret

Dargestellt ist die relative Migration (Mittelwerte und Standardabweichungen) von HGL5 (weiß)- und primären Granulosazellen (schraffiert) bei Stimulation durch natives und hitzebehandeltes TS und S1P nach zwanzigstündiger Inkubation. Migration bei Basalmedium diente als Negativkontrolle, bei nativem TS bzw. S1P als Positivkontrolle. Die S1P-Konzentration bzw. TS-Konzentration war 0,1 μ M bzw. 40 μ l für HGL5 und 0,2 μ M bzw. 20 μ l für Granulosazellen. Abkürzungen: BM=Basalmedium, S1P=Sphingosin1-Phosphat, TS=Thrombozytensekret. Markierungen: * ($p < 0,05$ vs. Negativkontrolle). $n=3$ für beide Zellarten.

3.2.3.2 Aktivkohle

HGL5-Zelllinie:

Die Migrationsinduktion bei Behandlung des Thrombozytensekrets mit Aktivkohle wurde vollständig unterdrückt ($0,88 \pm 0,244$). Dies war signifikant erniedrigt ($p=0,005$ vs. TS-nativ) verglichen mit der Migration bei Stimulation mit nativem Thrombozytensekret ($4,438 \pm 0,493$).

Bei Behandlung des S1P mit Aktivkohle war die Migrationsinduktion ebenfalls drastisch reduziert ($0,953 \pm 0,231$) und signifikant gegenüber der Migration durch S1P ohne Aktivkohlefiltration ($2,768 \pm 0,415$) erniedrigt ($p=0,004$ vs. S1P-nativ) (Abb.7).

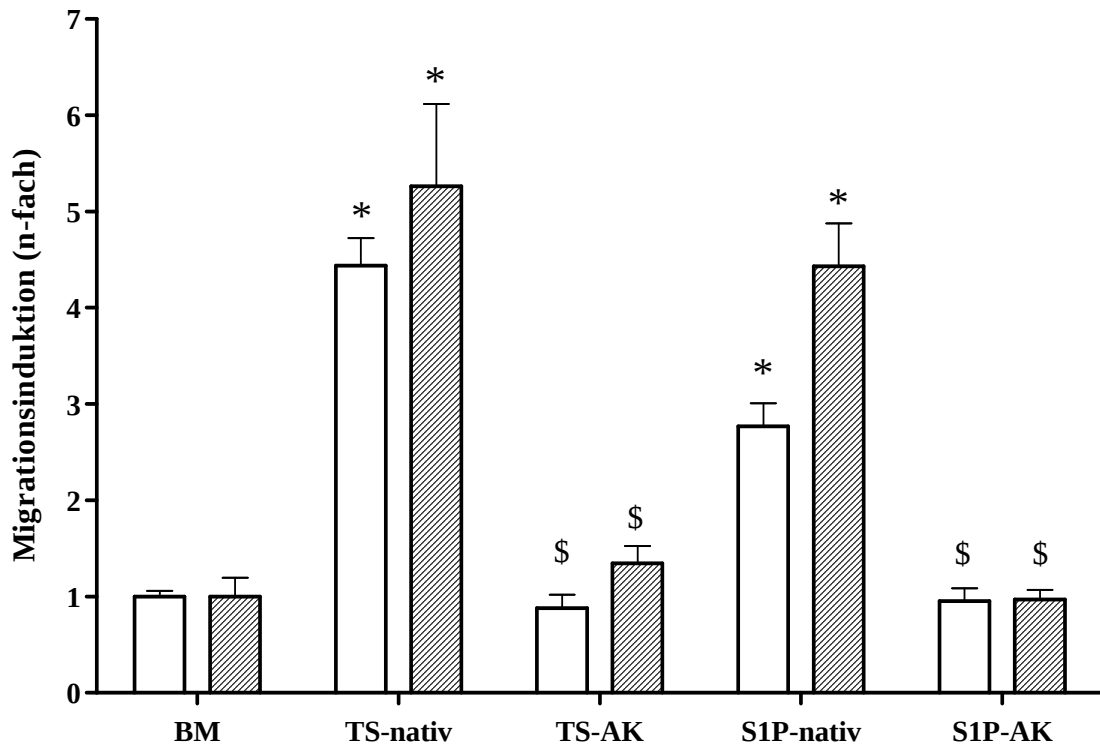


Abb. 7: Migrationsassay mit AK-filtrierte S1P und Thrombozytensekret

Dargestellt ist die relative Migration (Mittelwerte und Standardabweichungen) von HGL5 (weiß)- und primären Granulosazellen (schraffiert) bei Stimulation durch natives und AK-filtrierte TS und S1P nach zwanzigstündiger Inkubation. Migration bei Basalmedium diente als Negativkontrolle, bei nativem TS und S1P als Positivkontrolle. Die S1P-Konzentration bzw. TS-Konzentration war $0,1 \mu\text{M}$ bzw. $40 \mu\text{l}$ für HGL5 und $0,2 \mu\text{M}$ bzw. $20 \mu\text{l}$ für Granulosazellen. Abkürzungen: AK=Aktivkohle, BM=Basalmedium, S1P=Sphingosin 1-Phosphat, TS=Thrombozytensekret. Markierungen: * ($p<0,05$ vs. Negativkontrolle), \$ ($p<0,05$ vs. TS- bzw. S1P-nativ). $n=3$ für beide Zellarten.

Primäre Granulosazellen:

Auch bei diesen Zellen fiel die Migration bei mit Aktivkohle manipuliertem Thrombozytensekret deutlich geringer aus ($1,345 \pm 0,18$) verglichen mit der Migration bei Stimulation mit unbehandeltem Sekret ($5,26 \pm 0,855$). Der Unterschied war signifikant mit $p=0,006$ vs. TS-nativ.

Bei Manipulation des S1P mit Aktivkohle wurde die S1P-vermittelte Migration vollständig geblockt ($0,970 \pm 0,101$). Verglichen mit der Migration bei Stimulation mit nativem S1P ($4,43 \pm 0,448$) war dies signifikant erniedrigt ($p=0,004$ vs. S1P nativ) (Abb.7).

Die Aktivkohlefiltration führte bei beiden Zellarten zu einer deutlichen Reduktion der Thrombozytensekret- und S1P-induzierten Migration.

3.2.3.3 Alkalische Phosphatase**HGL5-Zelllinie:**

Durch alkalische Phosphatase wurde die Migrationsinduktion der HGL5-Zellen ähnlich stark wie durch Aktivkohle verhindert ($1,0 \pm 0,113$). Auch hier war der Unterschied zur Migrationsinduktion durch Thrombozytensekret ohne Phosphatasebehandlung ($4,438 \pm 0,493$) signifikant ($p=0,005$ vs. TS-nativ).

Ähnliche Werte ergaben sich bei Behandlung des S1P mit alkalischer Phosphatase. Hier lag die erhobene mittlere Migration unterhalb der basalen Migration ($0,887 \pm 0,104$). Zur Migrationsinduktion durch natives S1P ($2,768 \pm 0,415$) bestand ein signifikanter Unterschied ($p=0,007$ vs. S1P-nativ) (Abb.8).

Primäre Granulosazellen:

Bei den primären Granulosazellen war die induzierte Migration bei Stimulation der Zellen mit durch alkalische Phosphatase behandeltes Thrombozytensekret ebenfalls drastisch eingeschränkt ($1,326 \pm 0,087$). Auch hier war der Unterschied zur Migration ohne Phosphatasebehandlung ($5,26 \pm 0,855$) signifikant ($p=0,007$ vs. TS-nativ).

Durch die Behandlung des S1P mit alkalischer Phosphatase konnte keine Migration induziert werden ($0,857 \pm 0,134$). Gegenüber der Zellmigration ohne Phosphatasebehandlung des S1P ($4,43 \pm 0,448$) war die mittlere Migration signifikant erniedrigt ($p=0,002$ vs. S1P nativ) (Abb.8).

Beim Verdau des Thrombozytensekrets und S1P durch alkalische Phosphatase wurden bei beiden Zellarten lediglich Migrationen erhoben, die im Bereich der basalen Migration lagen.

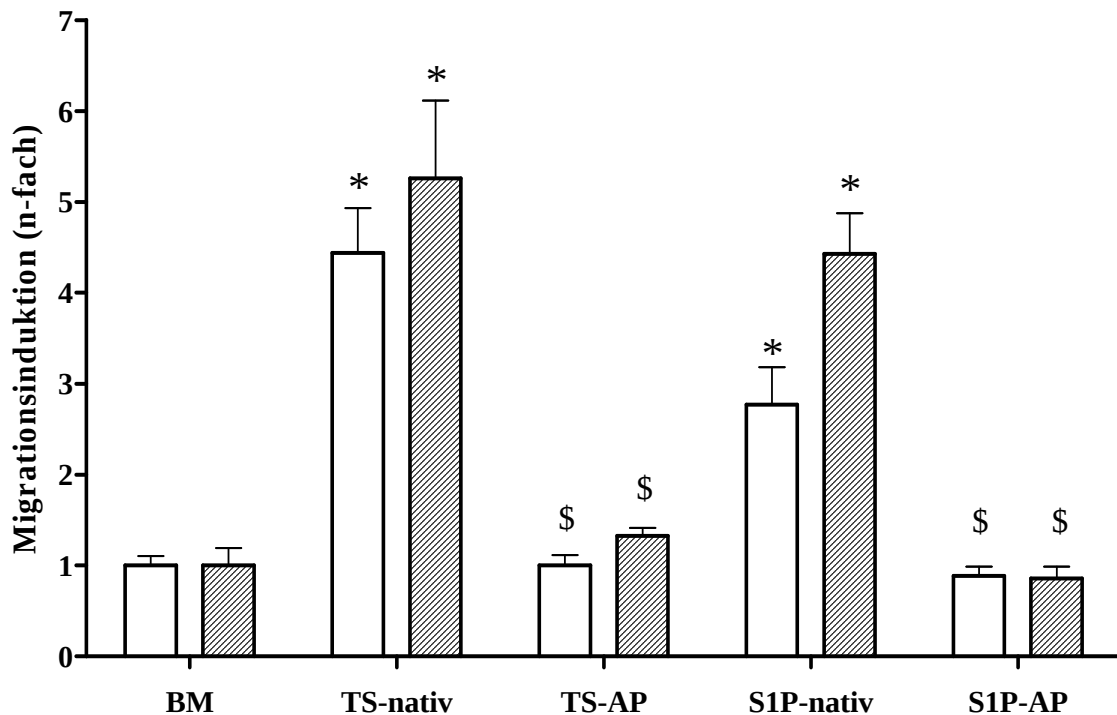


Abb. 8: Migrationsassay mit AP-verdaulichem S1P und Thrombozytensekret

Dargestellt ist die relative Migration (Mittelwerte und Standardabweichungen) von HGL5 (weiß)- und primären Granulosazellen (schraffiert) bei Stimulation durch natives und AP-verdautes TS und S1P nach zwanzigstündiger Inkubation. Migration bei Basalmedium diente als Negativkontrolle, bei nativem TS und S1P als Positivkontrolle. Die S1P-Konzentration bzw. TS-Konzentration war 0,1 μ M bzw. 40 μ l für HGL5 und 0,2 μ M bzw. 20 μ l für Granulosazellen. Abkürzungen: AP=alkalische Phosphatase, BM=Basalmedium, S1P=Sphingosin 1-Phosphat, TS=Thrombozytensekret. Markierungen: * ($p < 0,05$ vs. Negativkontrolle), \$ ($p < 0,05$ vs. TS- bzw. S1P-nativ). $n=3$ für beide Zellarten.

3.2.4 Migrationsassay mit Agonisten und Antagonisten der S1P-Rezeptoren

Zur Differenzierung durch welchen S1P-Rezeptor die Migrationsinduktion vermittelt wird, wurden in den Assays verschiedene spezifische Agonisten und Antagonisten der S1P-Rezeptoren als Testsubstanzen eingesetzt. Um mögliche Störeinflüsse der zugehörigen Lösemittel auszugleichen, wurden diese in allen Ansätzen in derselben Konzentration verwandt. Zudem wurde die Migrationsinduktion mit verschiedenen Konzentrationen der

Agonisten und Antagonisten getestet, um ein gewisses Konzentrationsspektrum abzudecken.

3.2.4.1 FTY720 (Agonist des S1P₁-, S1P₃-, S1P₄- und S1P₅-Rezeptors)

HGL5-Zelllinie:

Durch Thrombozytensekret (1:100 mit DMSO gemischt) wurde eine $1,599 \pm 0,234$ fach erhöhte Migration erreicht, die gegenüber der basalen Migration ($1,0 \pm 0,101$) signifikant gesteigert war ($p=0,041$). FTY720 induzierte in einer Konzentration von 1nM eine mittlere Migration der HGL5-Zellen, die in etwa vergleichbar war mit der Migrationsinduktion durch Thrombozytensekret in Mischung mit DMSO ($1,602 \pm 0,132$; $p=0,019$ vs. BM-DMSO). FTY720 in stärkerer Konzentration (1 μ M) bewirkte hingegen eine im Bereich der Negativkontrolle liegende Zellmigration ($1,143 \pm 0,385$) (Abb.9).

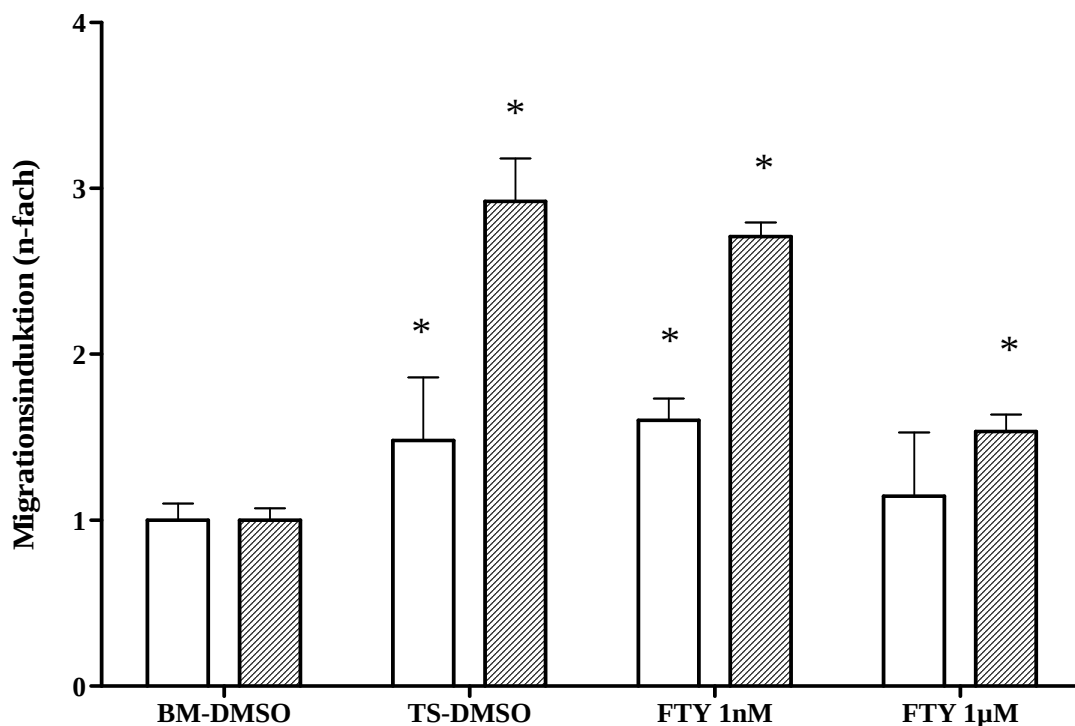


Abb. 9: Migrationsassay mit dem S1P-Rezeptoragonisten FTY720

Dargestellt ist die relative Migration (Mittelwerte und Standardabweichungen) von HGL5 (weiß) - und primären Granulosazellen (schraffiert) bei Einsatz des S1P-Rezeptoragonisten FTY720 (1nM, 1 μ M) nach zwanzigstündiger Inkubation. Migration bei Basalmedium diente als Negativkontrolle, bei Thrombozytensekret (HGL5: 40 μ l; primäre Granulosazellen 20 μ l) als Positivkontrolle. Abkürzungen: BM=Basalmedium, DMSO=Dimethylsulfoxid, TS=Thrombozytensekret. Markierungen: * ($p < 0,05$ vs. Negativkontrolle). $n=3$ für beide Zellarten.

Primäre Granulosazellen:

Thrombozytensekret in Mischung mit DMSO brachte eine $2,921 \pm 0,26$ fach gesteigerte Migrationsinduktion hervor. Gegenüber der Negativkontrolle ($1,0 \pm 0,072$) wurde ein signifikantes Niveau erreicht ($p=0,004$). Der Agonist FTY720 (1nM) verursachte bei den Granulosazellen eine deutliche Migrationsinduktion, die im Bereich der Migration bei Stimulation mit TS-DMSO lag ($2,710 \pm 0,084$). Gegenüber der Inkubation mit Basalmedium in Mischung mit DMSO bestand ein (hoch)signifikanter Unterschied ($p=0,0002$). FTY720 in einer Konzentration von 1 μ M bewirkte eine $1,536 \pm 0,102$ fach gesteigerte Migration, die ebenfalls signifikant zur Negativkontrolle erhöht war ($p=0,013$) (Abb.9).

Die Migrationsinduktionen der primären Zellen fielen durch TS-DMSO höher als die der immortalisierten Zellen aus. Dies galt dementsprechend auch für den Assay mit SEW-2871 (Kap.3.2.4.2) oder mit PTX (Kap.3.2.4.6).

3.2.4.2 SEW-2871 (Agonist des S1P₁-Rezeptors)**HGL5-Zelllinie:**

Sowohl die durch Basalmedium ($1,0 \pm 0,101$) als auch durch Thrombozytensekret ($1,599 \pm 0,234$), beide in Mischung mit DMSO, induzierte Migration der HGL5-Zelllinie war identisch mit der aus dem Assay mit FTY720 (Kap. 3.2.4.1). Bei Zugabe des Rezeptoragonisten SEW-2871 (0,1 μ M) zeigten die Zellen keine von der basalen Migration positiv abweichende Migration ($1,042 \pm 0,074$). Wählte man eine zehnfach erhöhte Konzentration von SEW-2871 (1 μ M) fiel die induzierte Migration sogar noch etwas kleiner aus ($1,014 \pm 0,047$) (Abb.10). Bei beiden Konzentrationen des Agonisten wurden lediglich Migrationen erhoben, die auf Niveau der basalen Migrationsbereitschaft lagen.

Primäre Granulosazellen:

Die primären Granulosazellen zeigten bei Stimulation mit Thrombozytensekret in Mischung mit DMSO gegenüber der basalen Migration (BM-DMSO: $1,0 \pm 0,072$) eine $2,921 \pm 0,260$ fach erhöhte Migration ($p=0,004$; vgl. auch Kap. 3.2.4.1). Dieser Effekt wurde durch die Zugabe von 0,2 μ M SEW-2871 komplett verhindert ($0,995 \pm 0,017$). Bei Einsatz einer stärkeren Konzentration des Rezeptoragonisten (1 μ M) lag die Zellmigration

im selben Bereich ($0,875 \pm 0,006$) (Abb.10). Es wurden durch SEW-2871 demnach keine positiv von der Kontrolle abweichenden Migrationen beobachtet.

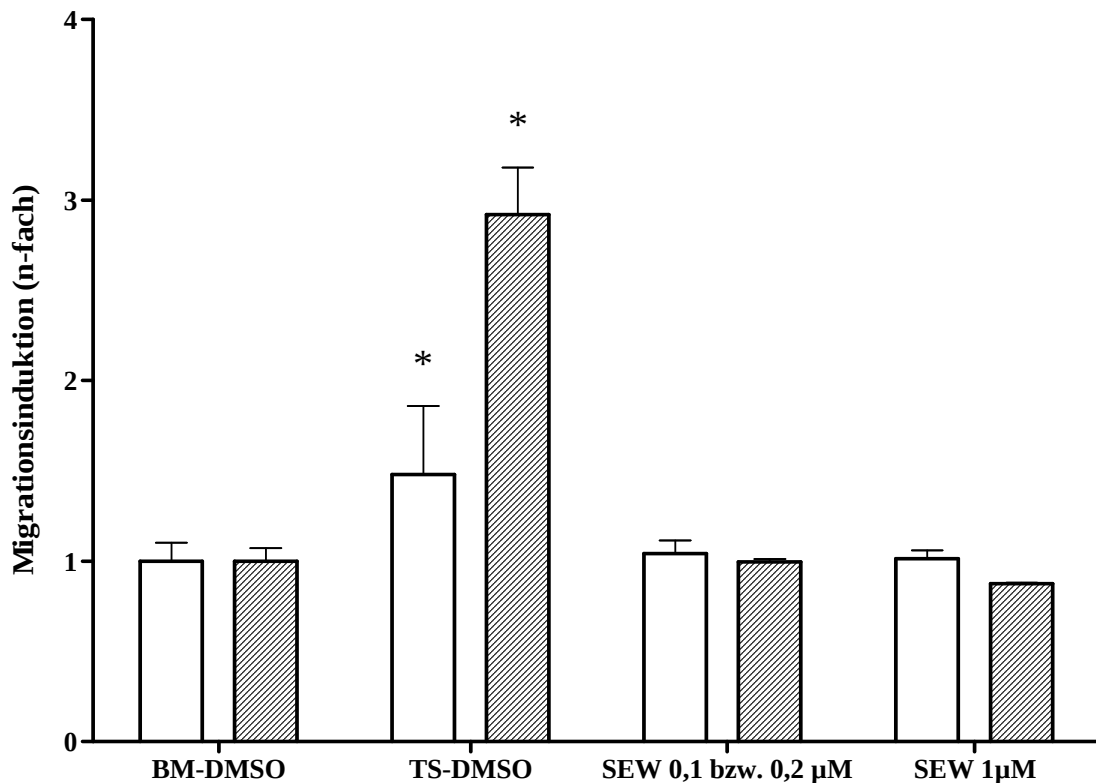


Abb. 10: Migrationsassay mit dem S1P-Rezeptoragonisten SEW-2871

Dargestellt ist die relative Migration (Mittelwerte und Standardabweichungen) von HGL5 (weiß) - und primären Granulosazellen (schraffiert) bei Einsatz des S1P-Rezeptoragonisten SEW-2871 nach zwanzigstündiger Inkubation. Migration bei Basalmedium diente als Negativkontrolle, bei Thrombozytensekret (HGL5: 40µl; primäre Granulosazellen: 20µl) als Positivkontrolle. Die Konzentration von SEW-2871 war 0,1 µM für die HGL5, 0,2 µM für die Granulosazellen und 1µM für Beide. Abkürzungen: BM=Basalmedium, DMSO=Dimethylsulfoxid, TS=Thrombozytensekret. Markierungen: * ($p < 0,05$ vs. Negativkontrolle). $n=3$ für beide Zellarten.

3.2.4.3 Phytosphingosin (Agonist des S1P₁- und S1P₄-Rezeptors)

HGL5-Zelllinie:

Durch Thrombozytensekret (1:100 verdünnt in Methanol) betrug die mittlere Migration der HGL5-Zellen $1,773 \pm 0,528$. Verglichen mit Basalmedium (ebenfalls 1:100 verdünnt in Methanol; $1,0 \pm 0,134$) war dies signifikant gesteigert ($p=0,041$). Die mittlere Migration bei Zugabe von Phytosphingosin (0,2 µM) lag mit $1,212 \pm 0,165$ zwischen beiden Kontrollen. Es bestand kein signifikanter Unterschied zur Migration bei Inkubation mit

Basalmedium in Mischung mit Methanol. Durch Phytosphingosin in der höher gewählten Konzentration (2 μ M) fiel die Migrationsinduktion noch etwas geringer aus ($1,147 \pm 0,083$) als bei 0,2 μ M. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle (Abb.11).

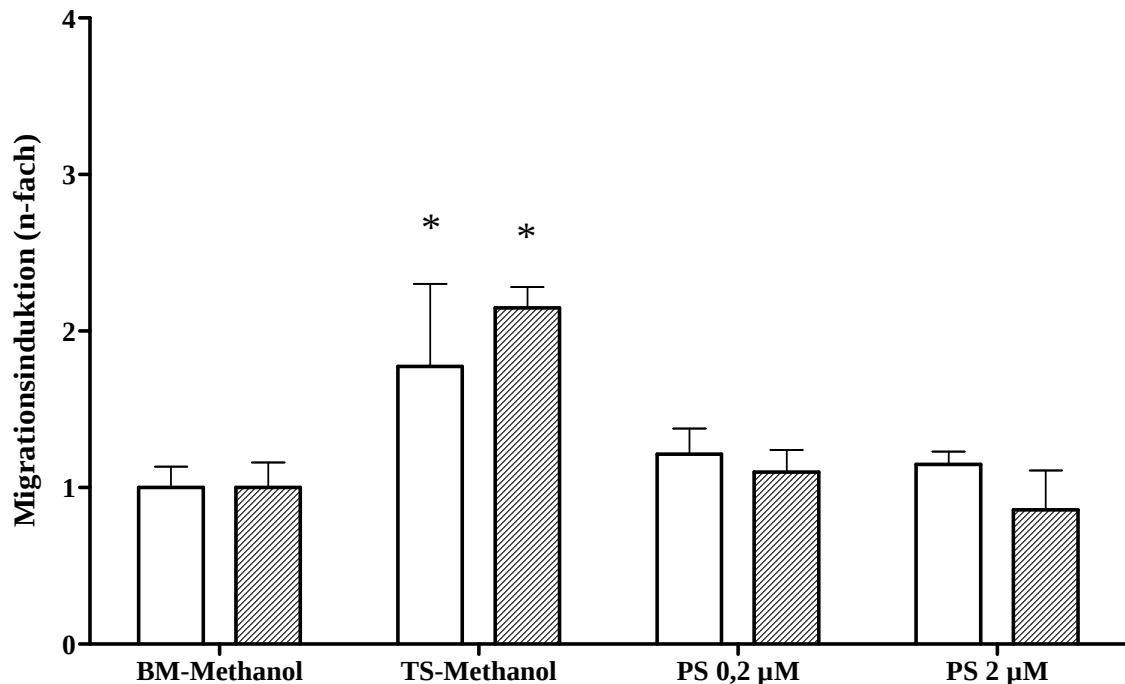


Abb. 11: Migrationsassay mit dem S1P-Rezeptoragonisten Phytosphingosin

Dargestellt ist die relative Migration (Mittelwerte und Standardabweichungen) von HGL5 (weiß) - und primären Granulosazellen (schraffiert) bei Einsatz des S1P-Rezeptoragonisten Phytosphingosin (0,2 μ M, 2 μ M) nach zwanzigstündiger Inkubation. Migration bei Basalmedium diente als Negativkontrolle, bei Thrombozytensekret (HGL5: 40 μ l; primäre Granulosazellen: 20 μ l) als Positivkontrolle. Abkürzungen: BM=Basalmedium, TS=Thrombozytensekret, PS=Phytosphingosin. Markierungen: * ($p < 0,05$ vs. Negativ-Kontrolle). $n=3$ für beide Zellarten.

Primäre Granulosazellen:

Thrombozytensekret in Mischung mit Methanol bewirkte eine $2,149 \pm 0,133$ fach gesteigerte Migrationsinduktion bei den Granulosazellen gegenüber der Negativkontrolle ($1,0 \pm 0,16$; $p=0,011$). Durch Einsatz von Phytosphingosin (0,2 μ M) migrierten die Zellen nur geringfügig mehr als bei Inkubation mit Basalmedium ($1,098 \pm 0,141$). Der Unterschied war nicht signifikant. Keine Zellmigration wurde bei der zweiten Konzentration von

Phytosphingosin (2 μ M) erhoben. Mit einem mittleren Wert von $0,857 \pm 0,251$ lag die mittlere Migration im Bereich der Negativkontrolle (Abb.11).

Verglich man die n-fachen Migrationen beider Zellarten war bemerkenswert, dass die primären Zellen durch Thrombozytensekret (in Mischung mit Methanol) stärker migrierten als die HGL5-Zellen. Bei Einsatz von Phytosphingosin war dies umgekehrt der Fall.

3.2.4.4 VPC 24191 (Agonist der S1P₁-und S1P₃-Rezeptors)

HGL5-Zelllinie:

Die Migrationsinduktion nach Stimulation der HGL5-Zellen mit Thrombozytensekret in DMSO, Salzsäure und bovinem Serum-Albumin als Lösemittel betrug im Mittel $1,369 \pm 0,207$. Der Unterschied zur Negativkontrolle ($1,0 \pm 0,095$) war signifikant mit $p=0,027$. Bei Stimulation durch den Rezeptoragonisten VPC 24191 (0,1 μ M) betrug die mittlere Migration $1,324 \pm 0,087$ und war damit ähnlich stark wie bei Stimulation mit Thrombozytensekret versetzt mit dem Lösemittel. Gegenüber der Negativkontrolle wurde ein signifikantes Niveau erreicht ($p=0,021$) (Abb.12).

Primäre Granulosazellen:

Durch Thrombozytensekret versetzt mit DMSO, HCl und BSA migrierten die Granulosazellen $3,456 \pm 0,678$ mal stärker als bei Inkubation mit Basalmedium plus Lösemittel ($1,0 \pm 0,117$; $p=0,016$). Der Einsatz von 0,2 μ M VPC 24191 induzierte eine geringere Zellmigration ($2,239 \pm 0,307$) als TS-DMSO, HCl, BSA. Diese war verglichen mit der Negativkontrolle allerdings signifikant erhöht ($p=0,004$) (Abb.12).

Die durch TS-DMSO, HCl, BSA und VPC 24191 induzierten Migrationen waren bei den primären Zellen deutlich stärker ausgeprägt als bei den HGL5-Zellen.

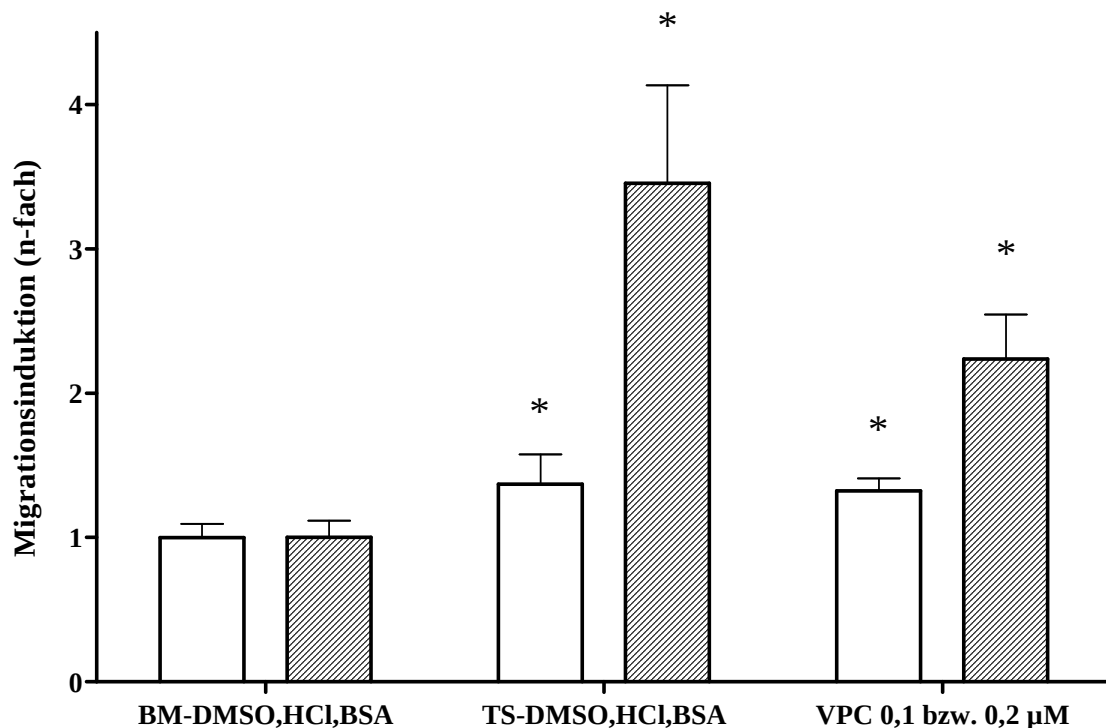


Abb. 12: Migrationsassay mit dem S1P-Rezeptoragonisten VPC 24191

Dargestellt ist die relative Migration (Mittelwerte und Standardabweichungen) von HGL5 (weiß) - und primären Granulosazellen (schraffiert) bei Einsatz des S1P-Rezeptoragonisten VPC 24191 nach zwanzigstündiger Inkubation. Migration bei Basalmedium diente als Negativkontrolle, bei Thrombozytensekret (HGL5: 40µl; primäre Granulosazellen: 20µl) als Positivkontrolle. Die VPC-Konzentration war 0,1 µM für die HGL5- bzw. 0,2 µM für die Granulosazellen. Abkürzungen: BM=Basalmedium, TS=Thrombozytensekret, DMSO=Dimethylsulfoxid, HCl=Salzsäure, BSA=bovines Serum-Albumin. Markierungen: * ($p < 0,05$ vs. Negativkontrolle). $n=3$ für beide Zellarten.

3.2.4.5 Cay10444 (Antagonist des S1P₃-Rezeptors)

HGL5-Zelllinie:

Durch das Thrombozytensekret in Mischung mit Dimethylformamid (DMF) wurde bei den HGL5-Zellen eine mittlere Migrationsinduktion erreicht, die gegenüber der basalen Migration ($1,0 \pm 0,08$) $1,375 \pm 0,011$ fach erhöht war ($p=0,009$). Der Einsatz von Cay10444 (0,2 µM) verhinderte die Migration ($1,083 \pm 0,054$). Bei 5-facher Steigerung der Konzentration von Cay10444 (1 µM) war die Hemmung der Migration etwas schwächer ($1,155 \pm 0,133$) als bei Cay10444 in einer Konzentration von 0,2 µM (Abb.13). Bei beiden Konzentrationen von Cay10444 lag die Migration der HGL5-Zellen im Bereich der basalen Migration. Zu TS-DMF wurde kein signifikanter Unterschied erhoben.

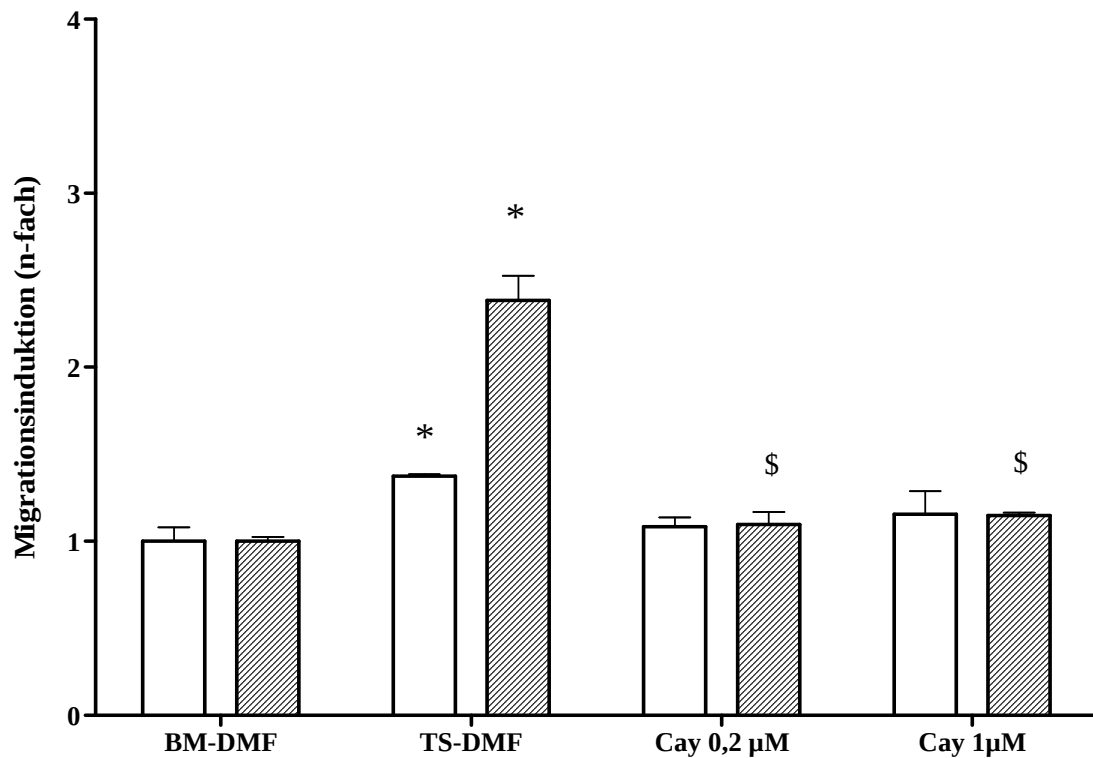


Abb. 13: Migrationsassay mit dem S1P-Rezeptorantagonisten Cay10444

Dargestellt ist die relative Migration (Mittelwerte und Standardabweichungen) von HGL5 (weiß) - und primären Granulosazellen (schraffiert) bei Einsatz des S1P-Rezeptorantagonisten Cay10444 (0,2µM, 1µM) nach zwanzigstündiger Inkubation. Migration bei Basalmedium diente als Negativkontrolle, bei Thrombozytensekret (HGL5: 40µl; primäre Granulosazellen 20µl) als Positivkontrolle. Abkürzungen: BM=Basalmedium, DMF=Dimethylsulfoxid, TS=Thrombozytensekret. Markierungen: * ($p < 0,05$ vs. Negativkontrolle), \$ ($p < 0,05$ vs. TS-DMF). $n=3$ für beide Zellarten.

Primäre Granulosazellen:

Bei Stimulation der Granulosazellen durch Thrombozytensekret in Mischung mit DMF konnte ebenfalls eine deutlich gesteigerte Migrationsinduktion festgestellt werden. Diese war $2,383 \pm 0,143$ fach gegenüber der Negativkontrolle ($1,0 \pm 0,025$) erhöht ($p=0,002$). Cay10444 in einer Konzentration von 0,2 µM inhibierte die Thrombozytensekret-vermittelte Zellmigration nahezu vollständig ($1,096 \pm 0,072$; $p=0,004$ vs. TS-DMF). In der höher gewählten Konzentration von Cay10444 (1µM) war die Migrationshemmung vergleichbar stark ($1,147 \pm 0,016$), wobei der Unterschied gegenüber der Positivkontrolle sogar als hochsignifikant bezeichnet werden konnte ($p < 0,0001$) (Abb.13). Beide

Konzentrationen von Cay10444 inhibierten bei den primären Granulosazellen also signifikant die Thrombozytensekret-vermittelte Migration.

Durch TS-DMF migrierten die primären Zellen auch in diesem Assay stärker als die immortalisierten Granulosazellen.

3.2.4.6 Pertussis-Toxin (Inhibitor von G_0/G_i -Proteinen)

HGL5-Zelllinie:

Bei der HGL5-Zelllinie wurde durch das Thrombozytensekret in Mischung mit Dimethylsulfoxid (DMSO) eine $1,599 \pm 0,234$ fache Migration induziert. Im Vergleich zur Migrationsinduktion bei Basalmedium gemischt mit DMSO ($1,0 \pm 0,101$; Negativkontrolle) war dies signifikant ($p=0,041$; vergl. auch Kap. 3.2.4.1 oder Kap. 3.2.4.2). Die Zugabe von Pertussis-Toxin (100 ng/ml) zu dem Thrombozytensekret führte zu keiner wesentlichen Abnahme der Migration ($1,311 \pm 0,053$). Zu TS-DMSO wurde kein signifikantes Niveau erreicht (Abb.14).

Primäre Granulosazellen:

Bei den primären Granulosazellen betrug die durch das Thrombozytensekret (1:100 gemischt mit DMSO) induzierte mittlere Migration $2,921 \pm 0,260$. Verglichen zur Negativkontrolle (Basalmedium mit DMSO; $1,0 \pm 0,072$) ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,004$; s. auch Kap. 3.2.4.1 oder Kap. 3.2.4.2). Die Zugabe von Pertussis-Toxin (100 ng/ml) reduzierte die Migration nahezu vollständig ($1,068 \pm 0,049$). Der Unterschied zur Migration bei Stimulation mit Thrombozytensekret in Mischung mit DMSO war signifikant ($p=0,004$ vs. TS-DMSO) (Abb.14).

Bemerkenswert war hier, dass die Zellen der Primärkultur im Vergleich zu den HGL5-Zellen durch TS-DMSO stärker migrierten, durch TS-PTX allerdings auch stärker gehemmt wurden.

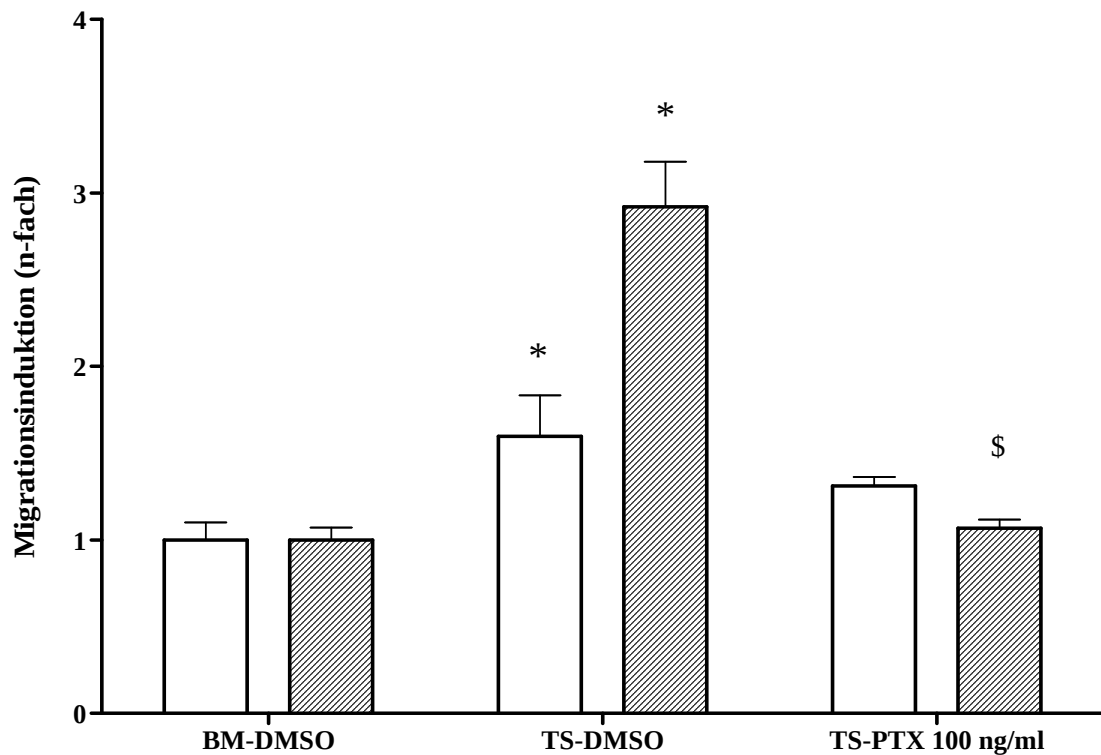


Abb. 14: Migrationsassay mit Pertussis-Toxin

Dargestellt ist die relative Migration (Mittelwerte und Standardabweichungen) von HGL5 (weiß) - und primären Granulosazellen (schraffiert) bei Einsatz von Pertussis-Toxin (100 ng/ml) nach zwanzigstündiger Inkubation. Migration bei Basalmedium diente als Negativkontrolle, bei Thrombozytensekret (HGL5: 40µl; primäre Granulosazellen: 20µl) als Positivkontrolle. Abkürzungen: BM=Basalmedium, DMSO=Dimethylsulfoxid, PTX=Pertussis-Toxin, TS=Thrombozytensekret. Markierungen: * ($p < 0,05$ vs. Negativkontrolle), \$ ($p < 0,05$ vs. TS-DMSO). $n=3$ für beide Zellarten.

3.3 MTT-Assay

3.3.1 MTT-Assay mit Thrombozytensekret und Follikelflüssigkeit

Mittels eines MTT-Proliferationsassays sollten eventuell verfälschende Proliferationseffekte (ausgelöst durch Stimulation der Zellen mit Thrombozytensekret) ausgeschlossen werden. Dazu wurde hier die im Migrationsassay benutzte Konzentrationsreihe von Thrombozytensekret eingesetzt. Als Positivkontrolle diente in diesem Fall Follikelflüssigkeit. Diese wurde ebenfalls in einer Konzentrationsreihe

verwandt. Auch in diesem Assay wurde die Proliferation der Zellen bei Inkubation mit Basalmedium als Negativkontrolle angesehen.

HGL5-Zelllinie:

Alle hier erhobenen mittleren Proliferationen wichen ausnahmslos hochsignifikant von der Negativkontrolle ab ($p < 0,001$) (Abb.15). Die HGL5-Zellen zeigten nach Stimulation mit Follikelflüssigkeit in einer Konzentration von 20 μl eine verglichen mit der basalen Proliferation ($1,0 \pm 0,034$) $1,422 \pm 0,052$ fach erhöhte Proliferation. Bei der nächst stärkeren Konzentration der Follikelflüssigkeit (40 μl) lag die mittlere Proliferation mit $1,650 \pm 0,091$ noch etwas höher. Follikelflüssigkeit in einer Konzentration von 80 μl bewirkte eine mittlere Zellproliferation von $1,682 \pm 0,076$. Damit stellte diese Konzentration das Wirkoptimum dar. Nach Einsatz von purer Follikelflüssigkeit (100 μl) wurde eine gegenüber dem Maximalwert etwas erniedrigte Proliferation gemessen ($1,582 \pm 0,049$). Die durch das Thrombozytensekret induzierten Zellproliferationen der HGL5-Zelllinie lagen alle deutlich unter dem Niveau der Negativkontrolle und zeigten mit steigender Konzentration des Thrombozytensekrets eine abnehmende Proliferationsrate. Thrombozytensekret (10 μl) verursachte eine $0,831 \pm 0,019$ fache, Thrombozytensekret (20 μl) eine $0,77 \pm 0,03$ fache und Thrombozytensekret (40 μl) nur noch eine $0,767 \pm 0,038$ fache Proliferation. Die niedrigste mittlere Proliferation der HGL5-Zellen wurde bei einer Konzentration von 80 μl Thrombozytensekret gemessen ($0,578 \pm 0,038$). Bei Einsatz von purem Sekret (100 μl) wurde wieder eine etwas erhöhte Proliferation beobachtet ($0,613 \pm 0,044$).

Primäre Granulosazellen:

Auch bei den Granulosazellen waren alle gemessenen mittleren Proliferationen hochsignifikant gegenüber der Negativkontrolle ($1,0 \pm 0,047$) verändert ($p < 0,001$)

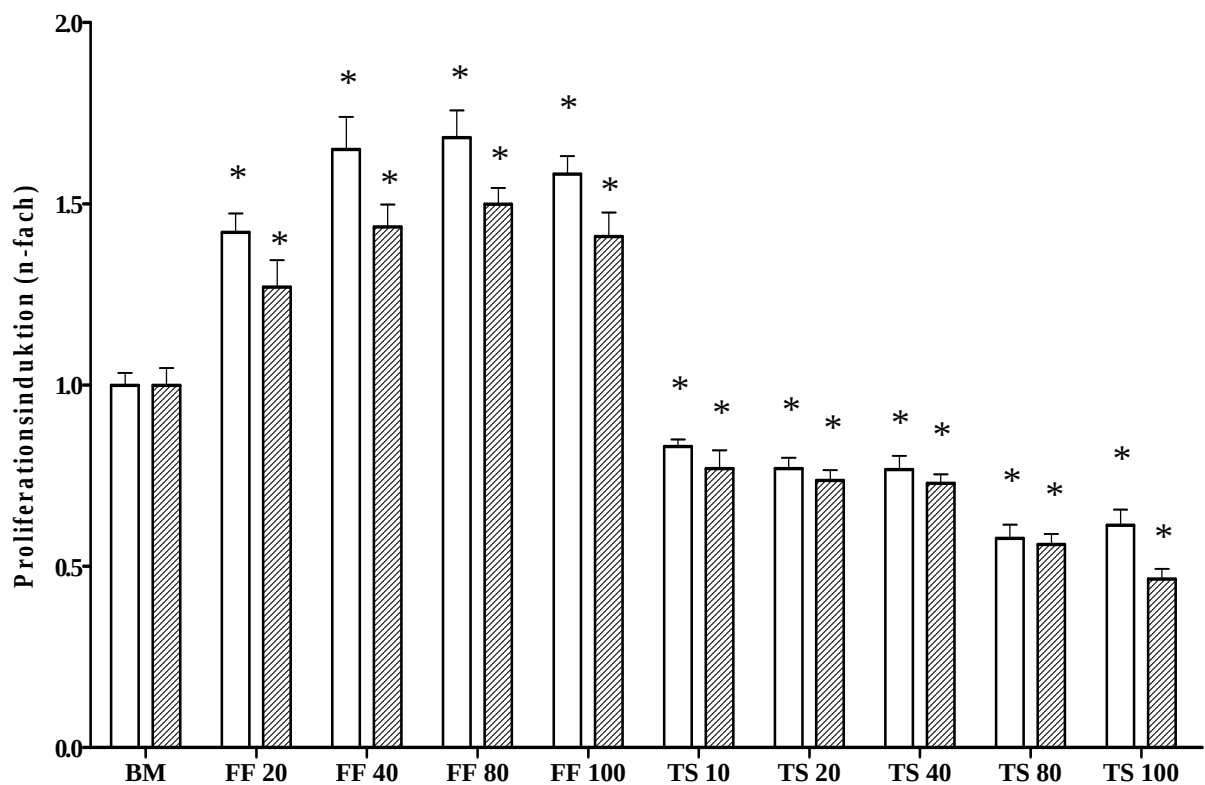


Abb. 15: MTT-Assay

Dargestellt sind die relativen Proliferationen (Mittelwerte und Standardabweichungen) von HGL5 (weiß) - und primären Granulosazellen (schraffiert) bei Stimulation durch Follikelflüssigkeit und Thrombozytensekret in verschiedenen Konzentrationen ($\mu\text{l}/100\mu\text{l}$) und durch Basalmedium (Negativkontrolle) nach zwanzigstündiger Inkubation. Abkürzungen: BM=Basalmedium, FF=Follikelflüssigkeit, TS=Thrombozytensekret, Markierungen:* ($p < 0,001$ vs. Negativkontrolle). $n=10$ für beide Zellarten.

(Abb.15). Mit einer Konzentration von 20 μl Follikelflüssigkeit wurde eine $1,271 \pm 0,074$ fache Proliferation erzielt. Bei Verdoppelung der Konzentration (40 μl) erhöhte sich die mittlere Proliferation auf $1,437 \pm 0,062$. Das Wirkoptimum der Follikelflüssigkeit lag bei den primären Granulosazellen ebenfalls bei 80 μl . Hier lag die gemessene Proliferation bei $1,499 \pm 0,045$. Bei der Höchstkonzentration der Follikelflüssigkeit (100 μl) fiel die mittlere Proliferation auf $1,410 \pm 0,066$ ab. Thrombozytensekret in einer Konzentration von 10 μl ließ die Zellproliferation auf $0,77 \pm 0,051$ absinken. Mit 20 μl Thrombozytensekret als Stimulans proliferierten die Granulosazellen im Mittel $0,737 \pm 0,028$, mit 40 μl $0,729 \pm 0,025$ und mit 80 μl Sekret nur noch $0,561 \pm 0,029$. Die niedrigste Proliferation wurde bei purem Thrombozytensekret (100 μl) erhoben. Diese lag bei $0,466 \pm 0,028$.

Auffallend war, dass in diesem Assay die HGL5-Zellen in jedem Ansatz eine höhere Proliferation als die primären Zellen zeigten.

3.4 Kurzzusammenfassung der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit behandelt erstmals die Frage, ob Thrombozytensekret bzw. Sphingosin 1-Phosphat Einfluss auf die Migration von Granulosazellen haben kann. Die Daten zeigten, dass sowohl Thrombozytensekret als auch S1P bei primären humanen und immortalisierten Granulosazellen eine Zellmigration hervorriefen (Abb.4 und 5). Dieser Effekt wurde durch Behandlung des Thrombozytensekrets bzw. S1P mit Aktivkohle oder alkalischer Phosphatase komplett aufgehoben (Abb.7 und 8). Hitzebehandlung führte hingegen zu keiner Hemmung der Migration (Abb.6). Pertussis-Toxin blockte die Migration der primären Granulosazellen komplett, wohingegen die der HGL5-Zellen kaum eingeschränkt wurde (Abb.14). Cay10444 rief bei den beiden Zellarten keine Migration hervor (Abb.13). SEW-2871 konnte ebenfalls keine Zellmigration induzieren (Abb.10). Bei Einsatz von FTY720 migrierten die Zellen dagegen vergleichbar stark wie durch Stimulation mit Thrombozytensekret (Abb.9). Dieser Effekt konnte etwas abgeschwächt auch bei VPC 24191 beobachtet werden (Abb.12). Phytosphingosin induzierte wiederum weder bei den primären Granulosazellen noch bei den HGL5-Zellen eine Migration (Abb.11). Mit Thrombozytensekret stimuliert zeigten die Zellen keine Proliferation, wohingegen nach Stimulation mit Follikelflüssigkeit bei beiden Zellarten erhöhte Proliferationsraten gesehen wurden (Abb.15).

4. Diskussion

Der Gelbkörper spielt in der weiblichen Physiologie eine wichtige Rolle. Als Produzent von Progesteron ist er für die Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft essentiell (71). Zahlreiche Autoren haben sich mit den einzelnen Mechanismen der Gelbkörperentwicklung beschäftigt. Obwohl auf diesem Gebiet bereits sehr viele Erkenntnisse vorliegen, sind viele Fragen noch offen. Neben Mechanismen der Neovaskularisation und der Luteinisierung gilt die Migration von Granulosazellen als ein wichtiger Mechanismus in der Entwicklung und Aufrechterhaltung des Gelbkörpers (67). Bisher ist nicht abschließend geklärt, wie die Migration dieser Zellen vermittelt wird. Neuerdings werden Thrombozyten als neue Regulatoren der Gelbkörperformation betrachtet (18). Der Eisprung geht mit einer Blutung in die Follikelhöhle einher (Corpus hämorrhagicum). Thrombozyten gelangen dabei in Kontakt mit extrazellulärer Matrix. Von einigen Autoren wird spekuliert, dass Thrombozyten in diesem Rahmen aktiviert werden und dass von Thrombozyten ausgeschüttete Faktoren an der Formation des Gelbkörpers beteiligt sind (18). Thrombozyten enthalten Sphingosin 1-Phosphat im hohen Maße (86). Von diesem Lipid ist bekannt, dass es die Migration von verschiedenen Zellen stimulieren kann.

4.1 Überblick

Die vorliegende Arbeit behandelt erstmals die Frage, ob Thrombozytensekret bzw. dessen Inhaltsstoff Sphingosin 1-Phosphat Einfluss auf die Migration von Granulosazellen haben kann. Die Daten zeigen, dass sowohl Thrombozytensekret als auch S1P bei primären humanen als auch immortalisierten humanen Granulosazellen eine Zellmigration hervorruft. Hitzedenaturierung mindert die Migration nicht, wohingegen nach Lipidextraktion und Dephosphorylierung keine Migration beobachtet wird. Dies sind Eigenschaften, die sämtlich auf S1P zutreffen, so dass S1P als der für die Migrationsvermittlung maßgeblicher Faktor im Thrombozytensekret betrachtet werden kann. Die Migrationsinduktion wird anscheinend hauptsächlich über den S1P₃-Rezeptor vermittelt und ist offensichtlich G_i-Protein-abhängig. Eine Zellproliferation wurde durch Thrombozytensekret nicht induziert und kann daher als Störfaktor der Ergebnisse ausgeschlossen werden.

4.2 Thrombozytensekret induziert die Migration von Granulosazellen

Auch andere Autoren haben sich mit der Frage beschäftigt, ob ein Präparat aus freigesetzten thrombozytären Wachstumsfaktoren (platelet releasate; PR) Zellmigration in vitro hervorrufen kann. Barnes et al. (6) untersuchten in diesem Zusammenhang die Migration von glomerulären Mesangiumzellen. Ihre Daten zeigen eine linear steigende Anzahl von migrierten Zellen in einem Konzentrationsbereich von 25-100 µg/ml PR. Das Migrationsoptimum ist hier ca. 40fach im Vergleich zu den Kontrollen erhöht (6).

Der Einfluss von PR auf Zellmigration ist in weiteren Studien untersucht worden. Hartwig et al. (24) fanden, dass PR (65% in Mischung mit Medium) die Zellmigration von SV40-Zellen, einer immortalisierten humanen kornealen Epithelzelllinie, induziert. Die Autoren maßen eine Steigerung der Migration um $175,3 \pm 5,9$ % nach einer Inkubationszeit von 96 Stunden. Der hier verwandte Migrationsassay („colony dispersion assay“) folgt allerdings einem anderem Prinzip als der hier benutzte. Die Zellen wurden auf einer Kollagen-Matrix ausgesät. Die Größenzunahme der Fläche, die nach einer bestimmten Zeit von Zellen bewachsen war, diente als Maß für die Zellmigration (24).

In der aktuellen Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Thrombozytensekret bei Granulosazellen eine Migration induziert. Das Migrationsoptimum der Granulosazellen liegt bei 20 µl TS (2,6 fache Induktion), das der HGL5-Zellen bei 40 µl (1,8 fache Induktion) (vgl. Kap. 3.2.1). Die unterschiedlich ausgeprägten Migrationsinduktionen in den einzelnen Studien könnten begründet sein in den verschiedenen Zellarten, Inkubationszeiten, Porengröße der Insert-Membran, Zellzahl pro Membran, Methoden der Quantifizierung der migrierten Zellen, als auch Herstellung des PR. Das Migrationsoptimum der Granulosazellen (20µl) liegt eine Konzentrationsstufe unterhalb des der HGL-5-Zellen (40 µl). Dieser Konzentrationsunterschied ist sehr gering. Vergleicht man jeweils die stärkste n-fache Migrationsinduktion ist zudem auffallend, dass diese bei den Zellen der Primärkultur höher ausfällt. Die Gründe dafür sind bislang nicht bekannt. Obwohl es sich bei beiden Zellen um humane Granulosazellen handelt, muss natürlich berücksichtigt werden, dass es sich bei den HGL5-Zellen um eine immortalisierte und damit um eine genetisch modifizierte Zelllinie handelt.

Zur Herstellung des Thrombozytensekrets wurde Thrombin benötigt. Anders als bei Barnes et al. (6) wurde hier nicht der Einfluss von Thrombin allein auf die Migration der Granulosazellen untersucht. Dies könnte eine Limitation der aktuellen Studie darstellen.

Jedoch geben die Autoren an, dass die Anzahl der migrierten Zellen in den Kontrollen mit und ohne Thrombin gleich groß ist und Thrombin somit keinen Einfluss auf die Migration der Mesangialzellen zu haben scheint (6). Dies ist ein wichtiger Punkt, obwohl diese Daten nicht unmittelbar auf die vorliegenden Versuche übertragbar sind.

Barnes et al. (6) unterscheiden in ihren Versuchen Chemotaxis und Chemokinese. Chemotaxis bedeutet eine zielgerichtete Zellbeweglichkeit (entlang eines Gradienten) wohingegen Chemokinese eine ungerichtete oder zufallsbedingte Fortbewegung von Zellen meint (7). Zur Differenzierung der beiden Vorgänge wird PR nur in das untere Kompartiment gegeben (Chemotaxis) bzw. in äquimolarer Konzentration in das untere und obere Kompartiment (Chemokinese). Die Anzahl der migrierten Mesangiumzellen nahm bei Fehlen des Konzentrationsgradienten (äquimolare Konzentration von PR im unteren und oberen Kompartiment) stark ab. Demzufolge wird die Migration der Zellen von den Autoren zum größten Teil der Chemotaxis zugeschrieben (6). In der vorliegenden Studie wie allerdings in den meisten Studien fehlt diese Differenzierung ebenfalls.

Barnes et al. (6) berichten weiterhin, dass die thrombozytären Faktoren TGF- α , TGF- β , EGF und Plättchenfaktor 4 nicht die Migration von glomerulären Mesangiumzellen beeinflussen (Kap. 1.3.2). Mittels Hitzedenaturierung konnte gezeigt, dass diese Mediatoren auch hier für die Migrationsinduktion der Granulosazellen nicht hauptverantwortlich sind (Kap. 3.2.3.1).

4.3 Sphingosin 1-Phosphat induziert die Migration von Granulosazellen

Wie bereits erwähnt ist S1P u.a. dafür bekannt, dass es die Zellmigration von verschiedenen Zellarten stimulieren kann. Balthasar et al. (5) analysierten den Effekt von S1P auf die Migration von primären Schilddrüsenzellen und Schilddrüsenkarzinomzellen. Die Ergebnisse fallen zwischen den einzelnen Zelllinien unterschiedlich aus. Auf die Migration von primären Schilddrüsenzellen hat S1P keinen Einfluss. In den Karzinomzelllinien, die hauptsächlich den S1P₂-Rezeptor exprimieren, wird die Migration durch S1P gehemmt. Im Gegensatz dazu induziert S1P die Migration bei der follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie ML-1. Mit steigender Konzentration des S1P (0,01 μ M, 0,03 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M und 3 μ M) zeigen die Daten einen glockenförmigen Verlauf der gemessenen Migrationen. Die stärkste Migrationsinduktion (im Mittel 100 migrierte Zellen pro Gesichtsfeld; Vergrößerung 40x) wird bei einer mittleren S1P-Konzentration von 0,1

μM nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden erzielt. Bei stärkerer Konzentration des S1P ($3\mu\text{M}$) wird die Migration gehemmt (5).

S1P gilt durch seine Fähigkeit, Zellmigration von Endothelzellen zu induzieren als angiogenetischer Faktor. Kimura et al. (37) untersuchten den Einfluss von S1P auf die Migration von HAECs. Sie fanden ebenfalls einen glockenförmigen Verlauf der erhobenen Migrationen nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden. Das Maximum lag im Durchschnitt bei ca. 600 migrierten Zellen/4 Gesichtsfelder (Vergrößerung 400x) bei einer S1P-Konzentration von $1\mu\text{M}$. Die Erhöhung der S1P-Konzentration bis $10\mu\text{M}$ führte zu einer Reduktion des Effektes auf basale Level. Die Autoren folgerten, dass S1P ab einer bestimmten Konzentration toxisch auf die Zellen wirken könnte (37). Worin die Toxizität von S1P auf die Zellen besteht, wurde dort allerdings nicht näher erläutert.

Sehr ähnliche Ergebnisse weisen in diesem Zusammenhang Lee et al. (43) vor. Im selben Konzentrationsspektrum ($0,01\text{--}10\mu\text{M}$ S1P) migrieren HUVECs auch in dieser Studie am stärksten bei einer S1P-Konzentration von $1\mu\text{M}$ (im Mittel ca. 270 migrierte Zellen/4 Gesichtsfelder; Vergrößerung 150x). Bei höheren Konzentrationen ($10\mu\text{M}$) fällt die induzierte Migration der Zellen deutlich geringer aus. Lee et al. vermuten, dass ab dieser Konzentration die Migration vermittelnden S1P-Rezeptoren gesättigt sein könnten und damit eine weitere Zunahme der Migration blockieren (43).

Kon et al. (41) erörtern den Effekt von S1P auf die Migration von CHO-Zellen, die jeweils mit dem S1P₁- und S1P₃- Rezeptor transfiziert wurden. Die höchste Migration wird bei beiden Zellen bei einer S1P-Konzentration von $0,01\mu\text{M}$ erzielt (im Durchschnitt ca. 300 bzw. 260 migrierte Zellen/ $0,6\text{ mm}^2$). Höhere S1P-Konzentrationen führen wiederum zu einer Abnahme des Effektes (41).

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals der Einfluss von S1P auf die Migration von Granulosazellen untersucht. Die Daten legen dar, dass die HGL5-Zellen die stärkste Migration (2,6-fach) bei einer Konzentration von $0,1\mu\text{M}$ S1P zeigen. Die primären Granulosazellen migrieren am stärksten (1,9-fach) bei einer Konzentration von $0,2\mu\text{M}$ S1P (Kap. 3.2.2). Das Migrationsoptimum der Granulosazellen liegt hier im Gegensatz zu dem Assay mit Thrombozytensekret eine Konzentrationsstufe oberhalb der HGL5-Zellen. Die Konzentrationsstufen sind allerdings sehr klein, so dass die Migrationsoptima beider Zelltypen sehr nahe beieinander liegen. Interessanterweise migrieren die HGL5-Zellen in diesem Assay stärker als die primären Zellen. Dies ist eine Ausnahme, da ansonsten in

allen Versuchen der aktuellen Studie die Migration der primären Granulosazellen höher ausfällt.

Da die in den vorgestellten Studien verwandten Zellarten bei sehr differierenden S1P-Konzentrationen die stärkste Migration aufweisen (HAECs/HUVECs: 1 μ M, ML-1 Zellen: 0,1 μ M, CHO-Zellen: 0,01 μ M), könnte man vermuten, dass das jeweilige Wirkoptimum von S1P zellspezifisch ist. Beispielsweise migrieren Granulosazellen in vitro schon bei deutlich geringeren S1P-Konzentrationen als Endothelzellen. Es gibt bislang keine Daten bzgl. der Migrationsinduktion von Granulosazellen durch S1P. Die vorgestellten Ergebnisse (0,1 bzw. 0,2 μ M S1P) sind dementsprechend schwer mit anderen Quellen vergleichbar.

Sowohl die Ergebnisse der vorliegenden Studie (Abb. 5) als auch die Daten aus der Literatur zeigen übereinstimmend, dass mit steigenden S1P-Konzentrationen die Zellmigration in vitro abnimmt. Wang et al.(83), die die S1P-induzierte Migration von epithelial ovarian cancer (EOC) und human ovarian surface epithelial (HOSE)-Zellen untersucht haben, vermuten als Grund differierende Dosis-Wirkungskurven für jeden S1P-Rezeptor. Ihnen zufolge aktivieren geringe S1P-Konzentrationen den S1P₁-und/oder S1P₃-Rezeptor, die einen stimulierenden Einfluss auf die Zellmigration haben. Höhere S1P-Konzentrationen könnten hingegen den S1P₂-Rezeptor stimulieren, so dass der inhibitorische Effekt auf die Migration überwiegt.

Eine weitere Erklärung stellt eine S1P-induzierte Rezeptorinternalisierung dar. Dieses Phänomen wurde von Liu et al. (45) an EDG-1-cDNA transfizierten human embryonic kidney 293 cells (HEK 293) untersucht. S1P verursacht dosisabhängig eine reversible Translokation des EDG-1-Rezeptors von der Plasmamembran zu intrazellulären Vesikeln. Bei einer S1P-Konzentration von 0,1 μ M war dieser Effekt am stärksten (Reduktion des Rezeptors auf der Plasmamembran um ca. 80%) ausgeprägt (45). Jongsma et al. (32) kamen zu vergleichbaren Ergebnissen. Die Autoren arbeiteten ebenfalls mit dem S1P₁-Rezeptor, nehmen allerdings an, dass die gewonnenen Erkenntnisse auch auf andere Rezeptoren übertragbar sind (32). Beide Erklärungsmodelle könnten die hier erhobenen fallenden Migrationsinduktionen (Abb. 5) bei steigenden S1P-Konzentrationen plausibel machen.

Wie Barnes et al. (6) (vergl. Kap. 4.2) haben auch Balthasar et al. in ihrer Studie die Prozesse Chemotaxis und Chemokinese unterschieden. Ihre Daten indizieren, dass S1P

sowohl chemokinetisch als auch chemotaktisch auf die ML-1-Zellen wirkt. Die chemotaktische Komponente ist allerdings stärker ausgeprägt (5). Wie bereits oben erwähnt, wurde in der vorliegenden Arbeit diese Differenzierung nicht vorgenommen. Die Autoren beider Quellen begründen die Zellmigration nach Stimulierung mit PR (6) bzw. S1P (5) allerdings eher durch Chemotaxis als durch Chemokinese. Daraus könnten eventuell Rückschlüsse gezogen werden, dass die Migration der Granulosazellen ebenfalls eher chemotaktisch als chemokinetisch bedingt war.

4.4 Identifikation des Sphingosin 1-Phosphat im Thrombozytensekret

Bisher konnte demonstriert werden, dass sowohl Thrombozytensekret als auch S1P die Zellmigration von Granulosazellen stimuliert. S1P ist in Thrombozyten enthalten und kann von diesen ausgeschüttet werden (88). Dass S1P tatsächlich Bestandteil von dem hier verwandten Thrombozytensekret ist, konnte durch eine extern durchgeführte S1P-Messung gezeigt werden (Kap. 3.1.2). Aufgrund dieser Befunde sollte die These bestätigt werden, dass im Thrombozytensekret vor allem S1P die Migrationsinduktion bedingt. Zur Überprüfung dienten Migrationsassays, in denen manipuliertes S1P und Thrombozytensekret benutzt wurden. Die Hitzebehandlung diente der Proteindenaturierung, die Aktivkohlefiltration diente der Extraktion von Lipiden und der Verdau durch alkalische Phosphatase führte zum Abbau phosphatgruppentragender Moleküle wie S1P.

4.4.1 Effekte der Hitzebehandlung

Durch Hitzebehandlung des Thrombozytensekrets und S1P kommt es zu keiner Hemmung der Zellmigration (Kap.3.2.3.1). Die erhobenen Werte weichen statistisch nicht von der Migrationsinduktion durch natives Thrombozytensekret und S1P ab (HGL5-Zellen: 4,4 fach (TS-nativ), 3,9 fach (TS-Hitze), 2,8 fach (S1P-nativ), 3,0 fach (S1P-Hitze); Granulosazellen: 5,3 fach (TS-nativ), 4,5 fach (TS-Hitze), 4,4 fach (S1P-nativ), 3,8 fach (S1P-Hitze)) (Abb.6). Bei dem die Zellmigration vermittelndem Faktor im Thrombozytensekret scheint es sich demnach nicht um ein Protein zu handeln, da diese durch die Hitze denaturiert wurden. S1P im Gegensatz ist als Lipid hitzestabil (16) und Hitzebehandlung kann dessen Effekte daher nicht mindern.

4.4.2 Effekte der Aktivkohlebehandlung

Die Migrationsinduktion beider Zellarten wird durch mit Aktivkohle behandeltes Thrombozytensekret und S1P unterdrückt (Kap.3.2.3.2). Die Aktivkohlefiltration führt zu einer Extraktion von Lipiden (16). Da es sich beim S1P um ein Lipid handelt (75), ist es schlüssig, dass dessen Wirkung auf die Zellen verloren geht (0,95 fach (HGL5), 0,97 fach (primäre Granulosazellen)). Nach Filtration des Thrombozytensekrets mit Aktivkohle werden ebenfalls keine von der Negativkontrolle abweichenden Migrationen beobachtet (0,9 fach (HGL5), 1,3 fach (primäre Granulosazellen)) (Abb.7). Die Daten legen nahe, dass ein Lipid als Bestandteil des Thrombozytensekrets ein potenzieller Vermittler der Migrationsinduktion darstellt.

4.4.3 Effekte der Alkalische Phosphatasebehandlung

Die Behandlung des Thrombozytensekrets und S1P mit alkalischer Phosphatase führt zu einer ähnlich starken Reduktion der Zellmigration wie die mit Aktivkohle (Kap.3.2.3.3). S1P kann durch alkalische Phosphatase abgebaut werden (68). Erwartungsgemäß induziert mit alkalischer Phosphatase behandeltes S1P in den Versuchen keine Zellmigration (0,88 fach (HGL5), 0,86 fach (primäre Granulosazellen)). Die Ergebnisse fallen für mit alkalischer Phosphatase behandeltes Thrombozytensekret vergleichbar aus (1,0 fach (HGL5), 1,3 fach (primäre Granulosazellen)) (Abb.8). Dies zeigt ebenfalls, dass der Migration vermittelnde Mediator im Thrombozytensekret eine Phosphatgruppe trägt und durch Dephosphorylierung inaktiviert werden kann.

4.4.4 Schlussfolgerung

Bei dem im Thrombozytensekret enthaltenen Faktor scheint es sich demnach um einen hitzestabilen Faktor zu handeln, dessen Wirkung durch Lipidextraktion und Dephosphorylierung aufgehoben werden kann. Diese Eigenschaften treffen sämtlich auf S1P zu. Dass S1P tatsächlich im Thrombozytensekret vorhanden ist, wurde bereits demonstriert (Kap.3.1.2). Dementsprechend stellt sich das Migrationsverhalten beider Zelltypen in den Assays (Manipulation des Thrombozytensekrets und S1P) auch identisch dar. In Zusammenschau dieser Ergebnisse wird die Hypothese, dass S1P maßgeblich für die Migrationsinduktion des Thrombozytensekrets verantwortlich sein könnte, stark erhärtet.

Durch die Kenntnis der S1P-Konzentration im Thrombozytensekret sind die jeweiligen Migrationsoptima der Zellen bei Stimulation mit Thrombozytensekret und reinem S1P vergleichbar. Die maximale Migration der HGL5-Zellen wird bei 40 μ l TS erreicht (Kap.3.2.1). Dies entspricht einer S1P-Konzentration im Assay von 1,28 μ M. Bei Stimulation durch reines S1P liegt das Migrationsoptimum hingegen bei 0,1 μ M S1P (Kap.3.2.2). Hier zeigt sich ein deutlicher Unterschied. Bei den Granulosazellen stimmt dieser Konzentrationsunterschied besser überein. Die maximale Migration liegt hier bei 20 μ l TS entsprechend 0,64 μ M S1P im Assay bzw. bei 0,2 μ M S1P in Reinform (Kap.3.2.1 bzw. 3.2.2). Die Konzentrationen von S1P im Thrombozytensekret bzw. in Reinform sind im Migrationsoptimum demnach für eine Zellart nicht identisch. Bei Stimulation mit Thrombozytensekret ist zur Migrationsvermittlung eine höhere S1P-Konzentration notwendig als sie es bei Stimulation mit reinem S1P ist. Dafür könnte eine herabgesetzte Rezeptoraffinität ursächlich sein. Murata et al. (53) fanden heraus, dass S1P-vermittelte Effekte deutlich abgeschwächt sind, wenn S1P an Proteine gebunden vorliegt und daher dessen Bindung an die S1P-Rezeptoren behindert wird. Übertragen auf die vorliegende Studie könnte das Ergebnis damit erklärt werden, dass das S1P im Thrombozytensekret ebenfalls an Trägersubstanzen gebunden ist.

Vergleicht man die n-fache Migrationsinduktion durch natives S1P (HGL5: 2,8 fach; primäre Granulosazellen: 4,4 fach) (Abb.5) und Thrombozytensekret (HGL5: 4,4 fach; primäre Granulosazellen: 5,3 fach) (Abb.4) fällt auf, dass das Thrombozytensekret im Vergleich zum S1P einen stärkeren Effekt hat. Dies könnte mit der These erklärt werden, dass das Thrombozytensekret noch andere Faktoren enthält, die zwar nicht hauptverantwortlich für die Migrationsvermittlung sind, aber doch zu dieser beitragen könnten. Die n-fache Induktion durch natives S1P und Thrombozytensekret ist bei den Zellen der Primärkultur stärker ausgeprägt als bei der immortalisierten Zelllinie.

4.5 Sphingosin 1-Phosphat vermittelt die Zellmigration G_i-Protein-abhängig über den S1P₃-Rezeptor

S1P kann sowohl als intrazellulärer second messenger als auch als extrazellulärer Ligand über die S1P-Rezeptoren wirken (75). Die Induktion der Zellmigration ist dabei vermutlich ausschließlich rezeptorvermittelt (75). Von den 5 bekannten Subtypen ist der S1P₁-, S1P₂-,

S1P₃- und S1P₄-Rezeptor an der Vermittlung einer Zellmigration beteiligt. Der S1P₂-Rezeptor soll inhibitorisch wirken, wohingegen der S1P₁-, S1P₃- und S1P₄-Rezeptor fördernd auf die Zellmigration wirken soll. Je nach Zelltyp und Expression der jeweiligen Rezeptoren kann S1P beide Effekte haben. (58). Auf Granulosazellen konnten der S1P₁-, S1P₂-, S1P₃- und S1P₅-Rezeptor detektiert werden (8). Um zu prüfen, welche/r Rezeptor/en die Migration von den Granulosazellen vermittelt, wurden verschiedene Agonisten und Antagonisten der S1P-Rezeptoren eingesetzt.

4.5.1 FTY720

Als Rezeptoragonisten wurde zunächst FTY720 eingesetzt. Dieser ist als Agonist des S1P₁-, S1P₃-, S1P₄-und S1P₅-Rezeptors bekannt (12). In der vorliegenden Studie induziert FTY720 in einer Konzentration von 1nM bei beiden Zellarten eine Migration, die der des Thrombozytensekrets entspricht (HGL5: 1,59 fach (TS-DMSO), 1,6 fach (FTY720 1nM); primäre Granulosazellen: 2,9 fach (TS-DMSO), 2,7 fach (FTY720 1nM)). Mit einer Konzentration von 1µM FTY720 fällt die induzierte Migration deutlich schwächer aus (HGL5: 1,1 fach; primäre Granulosazellen: 1,5 fach), ist aber bei den primären Granulosazellen noch signifikant gesteigert. In jedem Ansatz dieses Assays sind die induzierten Migrationen von den Zellen der Primärkultur größer als die der HGL5-Zellen (vgl. Kap.3.2.4.1).

Da FTY720 (1nM) einen ähnlich starken Effekt wie das Thrombozytensekret hat, scheint der S1P₁-, und/oder S1P₃-Rezeptor als Vermittler der Migration in Frage zu kommen. Der S1P₄-Rezeptor konnte nicht auf Granulosazellen detektiert werden (8), der S1P₅-Rezeptor ist der Literatur zufolge nicht an der Migrationsvermittlung beteiligt (5). Das Ergebnis, dass 1nM FTY720 eine signifikante Migration der Granulosazellen hervorbringt, stimmt nicht mit dem anderer Autoren überein. Über den S1P₁-Rezeptor soll FTY720-P Einfluss auf die Migration von Lymphozyten haben (1). Matsuyuki et al. fanden eine signifikante Hemmung der Migration von murinen T-Zellen durch Einsatz von 0,1 und 1 nM (S)-FTY720-P (50). Chiba et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen (14). Es ist anerkannt, dass FTY720-P zu einer down-regulation des S1P₁-Rezeptors auf Lymphozyten führt und so die Migration dieser Zellen inhibiert (12;14). Eine aktuelle Studie belegt allerdings, dass FTY720 als Vorläufersubstanz von FTY720-P im Gegensatz zu diesem zu keiner Degradation des S1P₁-Rezeptors auf HUVECs führt (60). Diese Erkenntnis könnte

begründen, warum FTY720 keine Hemmung der Granulosazellmigration hervorruft. Obwohl FTY720 meistens in Zusammenhang mit dem S1P₁-Rezeptor besprochen wird, ist nicht ausgeschlossen, dass die Migration der Granulosazellen über den S1P₃-Rezeptor vermittelt wird. Studien belegen, dass dieser ebenfalls die Migration von Zellen induzieren kann (5;37).

4.5.2 SEW-2871

Studien belegen, dass der S1P₁-Rezeptor Zellmigration vermitteln kann (58). Daher wurde hier die Migration der Granulosazellen nach Stimulation mit SEW-2871, einem Agonisten des S1P₁-Rezeptors, untersucht. Über SEW-2871 wird berichtet, dass er wie S1P zu einer Migration von S1P₁-Rezeptor-transfizierten CHO-Zellen führt (70). SEW-2871 induziert überraschenderweise in keiner der eingesetzten Konzentrationen eine Migration der Granulosazellen (HGL5-Zellen 1,04 fach (0,1µM) bzw. 1,01 fach (1µM); primäre Granulosazellen 0,99 fach (0,2µM) bzw. 0,88 fach (1µM)). Die n-fache Migrationsinduktion durch TS-DMSO ist bei den primären Granulosazellen (2,9 fach) deutlich höher als bei den HGL5-Zellen (1,6 fach), wohingegen sie bei SEW-2871 geringer ausfällt (vgl. Kap.3.2.4.2). Obwohl der Befund, dass SEW-2871 keine Migration hervorbringt anders als erwartet ausfällt, entspricht dieser dem von Balthasar et al.: SEW-2871 in einer Konzentration von 1 µM verursacht bei der ML-1-Zelllinie ebenfalls keine Zellmigration. Die Antagonisierung des S1P₁- und S1P₃-Rezeptors durch VPC 23019 in dieser Studie führt hingegen zu einer Hemmung der Zellmigration. Als Begründung wird von den Autoren vermutet, dass der S1P₁- und/oder S1P₃-Rezeptor zwar an der Vermittlung der Zellmigration beteiligt ist/sind, dass aber die Aktivierung des S1P₁-Rezeptors alleine nicht ausreichend ist, eine Migration hervorzurufen (5). Diese These könnte eventuell auch für die vorliegende Situation zutreffend sein.

4.5.3 Phytosphingosin

Als weiteren Agonisten des S1P₁-Rezeptors wurde Phytosphingosin eingesetzt. Phytosphingosin bindet ebenfalls an den S1P₄-Rezeptor (34). Dieser konnte allerdings nicht auf Granulosazellen nachgewiesen werden (8). Phytosphingosin (PS) vermag in keiner der eingesetzten Konzentrationen eine Migration der Granulosazellen zu induzieren, die signifikant gegenüber der Negativkontrolle gesteigert ist (HGL5-Zellen: 1,21 fach (0,2µM PS) bzw. 1,15 fach (2µM PS); primäre Granulosazellen: 1,1 fach (0,2µM PS) bzw.

0,86 (2 μ M PS) (vgl. Kap.3.2.4.3). Diese Ergebnisse sowie die aus dem Versuch mit SEW-2871 (vgl. Kap. 4.5.2) machen unwahrscheinlich, dass der S1P₁-Rezeptor –zumindest allein- die Migration der Granulosazellen vermittelt. Interessanterweise ist die n-fache Migration der Primärzellen (2,1 fach) nach Stimulation mit TS-Methanol stärker als die der HGL5-Zellen (1,8 fach), wohingegen diese Situation nach Stimulation mit Phytosphingosin umgekehrt ist. Kim et al. (35) untersuchten den Einfluss von Phytosphingosin-1-Phosphat (PhS1P) auf die Migration von L2071-Mausfibroblasten. Phytosphingosin-1-Phosphat entsteht durch Phosphorylierung von Phytosphingosin und ist dem S1P strukturell sehr ähnlich. Die Studie weist allerdings konträre Ergebnisse auf. Die Daten zeigen, dass PhS1P in einer Konzentration von 0,001, 0,01, 0,1 und 1 μ M eine Migration der Zellen hervorruft, die signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht ist. Das Migrationsoptimum (ca. 4,8 fach gesteigert) wird bei einer Konzentration von 0,1 μ M PhS1P erreicht.

4.5.4 VPC 24191

Um die Rolle des S1P₃-Rezeptors zu prüfen, wurde VPC 24191 als Agonist des S1P₁-und S1P₃-Rezeptors eingesetzt. Erkenntnisse über dessen Wirkung auf die Zellmigration tauchen in der Literatur nicht auf. Weder Thrombozytensekret noch VPC 24191 (0,1 μ M) induzieren bei der HGL5-Zelllinie eine starke Erhöhung der Migration (TS-DMSO, HCl, BSA: 1,37 fach; VPC 24191: 1,32 fach). Dennoch unterscheiden sich die induzierten Migrationen beider Substanzen statistisch von der Negativkontrolle. Bei den primären Granulosazellen ist nach Stimulation mit TS-DMSO, HCl, BSA und VPC 24191 (0,2 μ M) eine sehr viel stärkere Migrationsinduktion zu beobachten (TS-DMSO, HCl, BSA: 3,46 fach; VPC 24191 0,2 μ M: 2,24 fach). Auch hier ist der Unterschied zu BM-DMSO, HCl, BSA signifikant (vgl. Kap. 3.2.4.4). Diese Daten machen wahrscheinlich, dass der S1P₁-und/oder S1P₃-Rezeptor die Migration der Granulosazellen vermittelt/n. Diese Schlussfolgerung ist mit der anderer Autoren übereinstimmend (5;37;41;58).

Durch Einsatz von SEW-2871 und Phytosphingosin (Agonisten des S1P₁- Rezeptors) wurde keine Migration hervorgerufen. Mutmaßlich ist daher der S1P₃-Rezeptor eher als der S1P₁-Rezeptor bzw. eine synergistische Kostimulation beider Rezeptoren für die Migrationsvermittlung an den Granulosazellen verantwortlich.

4.5.5 Cay10444

Um die Rolle des S1P₃-Rezeptors weiter zu beleuchten, wurde der Einfluss von Cay10444, einem Antagonisten des S1P₃-Rezeptors (40), auf die Migration der Granulosazellen überprüft. Auch in diesem Assay fällt die Thrombozytensekret-induzierte Migration bei den primären Granulosazellen (2,4 fach) höher aus als bei der immortalisierten Zelllinie (1,4 fach). Der Einfluss von Cay10444 auf die Zellmigration ist bisher nicht beschrieben worden. Wie in Abbildung 13 ersichtlich, induziert Cay10444 keine von den basalen Leveln positiv abweichende Zellmigration. Die erhobenen Daten zeigen bei einer Konzentration von 0,2 µM eine noch geringer ausfallende Migration (HGL5: 1,08 fach; primäre Granulosazellen: 1,1 fach) als bei 1µM Cay10444 (HGL5: 1,16 fach; primäre Granulosazellen: 1,15 fach). Bei beiden Konzentrationen ist die Migration der primären Granulosazellen signifikant vs. TS-DMF erniedrigt (vgl. Kap.3.2.4.5). Dadurch kann demonstriert werden, dass der S1P₃-Rezeptor definitiv an der Migrationsinduktion beteiligt ist, da durch dessen Antagonisierung keine Zellmigration zustande kommt.

4.5.6 Pertussis-Toxin

Alle S1P-Rezeptoren koppeln an G_i-Proteine (76). Pertussis-Toxin (PTX) als Inhibitor von G₀/G_i-Proteinen vermag alle Effekte von S1P, die über PTX-sensitive G-Proteine vermittelt werden, zu unterdrücken. Die Daten zeigen, dass PTX die Migration der primären Granulosazellen komplett blockiert (1,07 fache Induktion). Die Migration der HGL5-Zellen wird durch PTX ebenfalls reduziert (1,31 fach) (vgl. Kap. 3.2.4.6). Auffallend ist, dass die Migration von den Zellen der Primärkultur im Vergleich zu der immortalisierten Zelllinie durch TS-DMSO höher ausfällt und durch PTX stärker gehemmt wird. Obwohl die Migration der HGL5-Zellen nicht so drastisch eingeschränkt ist wie die der Granulosazellen, zeigen die Ergebnisse eindeutig, dass G₀/G_i-Proteine an der Vermittlung der Zellmigration durch Thrombozytensekret beteiligt sind. Dieses Ergebnis stimmt mit denen anderer Autoren überein (5;36;37;41;50). Balthasar et al. berichten beispielsweise, dass die S1P-vermittelte Migration von ML-1-Zellen (follikuläre Schilddrüsenkarzinomzellen) komplett durch PTX aufgehoben werden konnte (5). Auch Kimura et al. geben an, dass PTX die Migration von HUVECs und HAECs inhibiert (36;37).

4.5.7 Schlussfolgerung

In Zusammenschau der Ergebnisse des Agonisten- und Antagonistenassays ist davon auszugehen, dass der $S1P_3$ -Rezeptor die Migration der Granulosazellen entscheidend vermittelt (Kap. 4.5.5). Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, dass eine Kostimulation des $S1P_1$ - und $S1P_3$ -Rezeptors für diese Wirkung notwendig ist (Kap.4.5.4). Der Einsatz von Pertussis-Toxin zeigt, dass diese Migrationsvermittlung von PTX-sensitiven G_i -Proteinen abhängig ist (Kap.4.5.6). Die anhand dieser Ergebnisse vermutete Migrationsvermittlung ist zusammenfassend in Abbildung 16 dargestellt.

Die Agonisten und Antagonisten waren in verschiedenen Lösemitteln gelöst worden. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die Lösemittel ebenfalls in den Kontrollen eingesetzt worden. Interessant wäre es gewesen, den alleinigen Einfluss des jeweiligen Lösemittels auf die Zellmigration zu untersuchen. Dieses wurde leider verpasst.

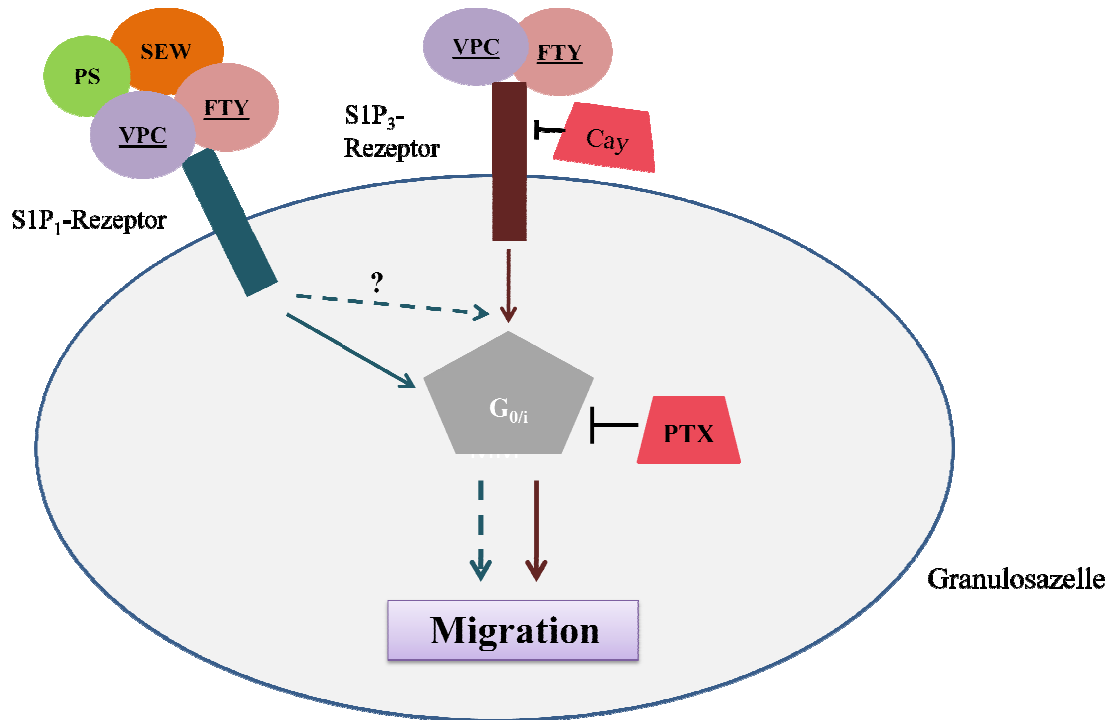


Abb. 16: Schematische Darstellung der vermuteten Rezeptorvermittlung der Migration

Die Migration der Granulosazellen wird entscheidend durch den S1P₃-Rezeptor vermittelt, da durch dessen alleinige Antagonisierung durch Cay10444 dieser Effekt ausbleibt und VPC 24191 als Agonist an diesem Rezeptor eine deutliche Migration hervorbringt. Da VPC 24191 auch Agonist des S1P₁-Rezeptors ist, kann eine für die Migrationsvermittlung notwendige Kostimulation des S1P₁-Rezeptors nicht ausgeschlossen werden. Der S1P₁-Rezeptor vermag die Migration nicht allein zu vermitteln, was durch den Einsatz von SEW-2871 als selektiver Agonist an diesen Rezeptor und Phytosphingosin ersichtlich ist. Eine Abhängigkeit von G-Proteinen bei der Migrationsvermittlung wird durch den Einsatz von Pertussis-Toxin aufgezeigt. FTY720 bedingt ebenfalls eine deutliche Migration. Da FTY720 Agonist beider hier dargestellten Rezeptoren ist, hilft er nicht bei der Identifikation des verantwortlichen Rezeptors.

Nicht näher untersucht und daher nicht dargestellt wurden der S1P₂- und S1P₅-Rezeptor. Der S1P₂-Rezeptor soll die Zellmigration inhibieren; der S1P₅-Rezeptor ist der Literatur zufolge nicht an einer Migrationsvermittlung beteiligt. Der S1P₄-Rezeptor konnte nicht auf Granulosazellen detektiert werden (8).

Die Agonisten bzw. Antagonisten sind als Liganden an ihren spezifischen S1P-Rezeptoren dargestellt. Zeichenerklärung: Antagonisten bzw. Inhibitoren (eckig und ⊥); Agonisten (rund); Agonisten, die eine Granulosazellmigration bedingen (unterstrichen). Abkürzungen: Cay=Cay10444, FTY=FTY720, PS=Phytosphingosin, PTX=Pertussis-Toxin, SEW=SEW-2871, VPC=VPC 24191.

4.6 Thrombozytensekret induziert keine Granulosazell-Proliferation

Sowohl S1P (37;43) als auch andere thrombozytäre Wachstumsfaktoren (17;28;38;64;66;90) können die Proliferation von Zellen stimulieren. Zum Ausschluss, dass die erhobenen Ergebnisse durch diesen Zellprozess verfälscht worden sind, wurde der Effekt des Thrombozytensekrets auf die Proliferation der Granulosazellen geprüft.

Bei den HGL5-Zellen wie auch den primären Granulosazellen liegen die durch das Thrombozytensekret induzierten Proliferationen deutlich unterhalb des Niveaus der Negativkontrolle (HGL5: 0,83 fach (10µl), 0,77 fach (20 µl), 0,77 fach (40µl), 0,58 fach (80µl), 0,61 fach (100µl); primäre Granulosazellen: 0,77 fach (10µl), 0,74 fach (20µl), 0,73 fach (40µl), 0,56 fach (80µl), 0,47 fach (100µl)). In jeder eingesetzten Konzentration des Thrombozytensekrets ist dieser Unterschied statistisch signifikant (Abb. 15). Auffallend ist analog zu dem Migrationsassay (Abb. 4) die abnehmende Proliferationsrate bei steigender Konzentration des Thrombozytensekrets. Dieser Befund könnte anhand der bereits erwähnten Rezeptorinternalisierung (45) erklärt werden (vergl. Kap.4.3). Das Ergebnis steht im Widerspruch zu denen von Hartwig et al. (24) und Liu et al. (47): Epithelzellen der Kornea zeigen mit steigender Konzentration des PR (6, 12, 25, 50, 100%) erhöhte Proliferationsraten mit einem Maximum von $31,2 \pm 15,9\%$ Standardabweichung bei Einsatz von unverdünntem PR (24). Zu identischen Ergebnissen kamen auch Liu et al. (47). Beide Autoren benutzten zur Messung den ATP-Biolumineszenz-Assay. Das Prinzip beruht auf der Messung der ATP-Menge, die mit der Zellproliferation korreliert (47).

Für die Herstellung des Thrombozytensekrets wird Thrombin benötigt. Den alleinigen Einfluss von Thrombin auf die Proliferation der Granulosazellen wurde in der vorliegenden Studie nicht untersucht. In diesem Zusammenhang berichten Hartwig et al. allerdings, dass Thrombin auf die Zellproliferation der kornealen Epithelzellen keinen Effekt hat (24).

Aufgrund von Kenntnissen aus einer vorherigen Studie (82) wurde Follikelflüssigkeit (FF) im MTT-Assay als Positivkontrolle ein. Wie in Abb.15 (vgl. Kap.3.3.1) ersichtlich, induziert Follikelflüssigkeit in jeder der eingesetzten Konzentration deutlich erhöhte Proliferationen der Granulosazellen, die sämtlich signifikant gegenüber der Kontrolle verändert sind (HGL5: 1,42 fach (20µl), 1,65 fach (40µl), 1,68 fach (80µl), 1,58 fach (100µl); primäre Granulosazellen: 1,27 fach (20µl), 1,44 fach (40µl), 1,5 fach (80µl), 1,41 fach (100µl)). Von Otte et al. (82) fanden eine gesteigerte Proliferation von HUVECs nach

Stimulation mit Follikelflüssigkeit. Identisch zu den vorliegenden Daten wird dort die höchste Proliferation (ca. 60% im Vergleich zur basalen Proliferation gesteigert) bei einer Konzentration von 80 μ l FF/well beobachtet (82).

Interessanterweise zeigen die HGL5-Zellen in diesem Assay eine gering höhere Proliferationsaktivität als die Zellen der Primärkultur. Im Gegensatz dazu war in den Migrationsassays meist die Aktivität der primären Zellen stärker.

Dass Follikelflüssigkeit und Thrombozytensekret hinsichtlich der Proliferation konträre Effekte auf die Granulosazellen haben ist unter der Annahme, dass beide Substanzen S1P enthalten (82),(vgl. Kap. 3.1.2) ein unerwartetes und nicht gänzlich nachvollziehbares Ergebnis. S1P vermag die Proliferation zahlreicher, jedoch nicht aller Zelltypen zu stimulieren (37;43). S1P ist in der Literatur hinsichtlich seiner Wirkung auf die Proliferation von Granulosazellen nicht untersucht worden, so dass sich keine Vergleichsmöglichkeiten bieten. Balthasar et al. (5) zufolge bleiben die Proliferationsraten von primären Schilddrüsenzellen bei Stimulation durch S1P (0,1 μ M, 3 μ M) unbeeinflusst. Inhibitorisch wirkt S1P auf die Proliferation von ML-1 und FRO-Zellen (follikuläre bzw. anaplastische Schilddrüsenkarzinomzellen) (5). Dieses Beispiel könnte die Beobachtung, dass Thrombozytensekret die Proliferation der Granulosazellen inhibiert plausibel machen, erklärt jedoch nicht, dass Follikelflüssigkeit einen gegenteiligen Effekt auf die Zellen hat. Die unterschiedlichen Effekte von Thrombozytensekret und Follikelflüssigkeit könnten auf andere Faktoren zurück geführt werden, die neben S1P in diesen Substanzgemischen enthalten sind.

Abbildung 15 (Kap.3.3.1) zeigt jedoch deutlich, dass Thrombozytensekret keine Proliferation von Granulosazellen induziert. Eine Zellproliferationsbedingte Verfälschung der erhobenen Daten aus den Migrationsassays kann daher ausgeschlossen werden.

4.7 Ausblick

Obwohl aufgrund der hier dargestellten in vitro-Experimente keine definitiven Schlüsse auf die Gegebenheiten in vivo gezogen werden können, liefert die vorliegende Studie Hinweise auf einen bisher nicht beschriebenen molekularen Mechanismus in der Gelbkörperentwicklung. Wie bereits oben ausgeführt ist u.a. die Migration von Granulosazellen für die Formation des Gelbkörpers wichtig. Der Befund, dass mit Thrombozytensekret und S1P stimulierte Granulosazellen migrieren, könnte demnach für

die in vivo-Situation Bedeutung haben. Thrombozyten kommen im Stadium des Corpus hämorrhagicum mit Granulosazellen in Kontakt und können thrombozytäre Faktoren wie z.B. S1P ausschütten. S1P scheint im Thrombozytensekret maßgeblich für die Migration der Granulosazellen verantwortlich zu sein (vgl. Kap.4.4.4). Eine Übertragung auf die in vivo-Situation erscheint daher sinnvoll, zumal die follikuläre Hämorrhagie im Rahmen der Ovulation ein physiologischer Vorgang ist. Das Corpus hämorrhagicum wäre demnach eine notwendige Voraussetzung für die Entstehung des Corpus luteum, welches wiederum für die erfolgreiche Reproduktion wesentliche Bedeutung hat.

Aufgrund seines hohen Stellenwertes sind bezüglich der Entwicklungsmechanismen des Corpus luteum weitere Untersuchungen sinnvoll:

Insbesondere sollte die Rolle der Thrombozyten im Stadium des Corpus hämorrhagicum und des von diesen freigesetzten S1P näher beleuchtet werden. Dazu wäre es bedeutsam, die Thrombozytenzahl sowie die physiologische S1P-Konzentration in der Follikelhöhle in vivo zu bestimmen. Die Neovaskularisation und die Luteinisierung der Granulosazellen sind zwei für die Gelbkörperentwicklung wesentliche Prozesse. Da die angiogenetischen Eigenschaften des S1P bereits bekannt sind, wäre es sinnvoll, die Wirkungen des Thrombozytensekrets auf die Migration und Proliferation von Endothelzellen näher zu untersuchen. Weiterhin könnte der Effekt von S1P und Thrombozytensekret auf die Differenzierung der Granulosazellen zu Luteinzellen analysiert werden. Dies könnte durch Analyse von Änderungen der Zellmorphologie als auch durch Messung der Progesteronproduktion geschehen.

S1P wird die Beeinflussung vieler biologischer Vorgänge in diversen Geweben zugeschrieben. Weitere Analysen hinsichtlich S1P-vermittelter Effekte auf Zellprozesse im Ovar wären daher lohnenswert. Beispielsweise könnte die Migration anderer ovarieller Zellen wie Fibroblasten oder Theka-interna-Zellen untersucht werden. In diesem Zusammenhang wäre auch eine Identifikation des S1P-Rezeptorenbesatzes dieser Zellen wichtig. In Knock-out-Mausmodellen könnte die Funktion der S1P-vermittelten Effekte umfassend analysiert werden. Auch der Einfluss von S1P-Rezeptor-Agonisten und – Antagonisten könnte systematisch im in-vivo-Modell untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Einleitung: Für die Entwicklung des Gelbkörpers (Corpus luteum) ist neben der Angiogenese und Luteinisierung die Migration der Granulosazellen bedeutsam. Welche Mediatoren für die Migration der Granulosazellen verantwortlich sind, ist bislang unklar. Es ist bekannt, dass das bioaktive Lipid Sphingosin 1-Phosphat (S1P) die Migration verschiedener Zellen über S1P-Rezeptoren reguliert. Sphingosin 1-Phosphat wird von Thrombozyten synthetisiert und bei Stimulation sezerniert. Durch eine ovulationsbedingte Blutung (Corpus hämorrhagicum) gelangen Thrombozyten in der Follikelhöhle mit Granulosazellen in Kontakt. Da Granulosazellen Sphingosin 1-Phosphat-Rezeptoren exprimieren, befasst sich die vorliegende Arbeit erstmals mit der Frage, ob Sphingosin 1-Phosphat bzw. Thrombozytensekret die Migration von Granulosazellen regulieren kann.

Methoden: Anhand von Migrations- und Proliferationsassays wurden sowohl primäre als auch immortalisierte (HGL5-Zelllinie) humane Granulosazellen untersucht. Die Identifizierung möglicher migrationsvermittelnder Mediatoren im Thrombozytensekret und nachgeschalteter Signalwege erfolgte mittels Proteindenaturierung, Lipidextraktion, Dephosphorylierung, Inhibition von G_0/G_i -Proteinen (Pertussis-Toxin), sowie Einsatz verschiedener Agonisten (FTY720, SEW-2871, VPC 24191, Phytosphingosin) und Antagonisten (Cay10444) der Sphingosin 1-Phosphat-Rezeptorfamilie.

Ergebnisse: Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Sphingosin 1-Phosphat als auch Thrombozytensekret die Migration der Granulosazellen induzieren. Im Thrombozytensekret konnte Sphingosin 1-Phosphat als maßgeblicher Mediator für die Migration identifiziert werden. Darüberhinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Migration hauptsächlich über den $S1P_3$ -Rezeptor erfolgt und die nachfolgende intrazelluläre Signaltransduktion G_0/G_i -Protein-abhängig ist. Eine Thrombozytensekret-induzierte Proliferation der Granulosazellen wurde ausgeschlossen.

Diskussion: Trotz bekannter Limitationen einer in-vitro Studie liefern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit Hinweise auf einen neuen molekularen Mechanismus in der Gelbkörperformation. Demnach könnten Thrombozyten im Stadium des Corpus hämorrhagicum durch Ausschüttung von Sphingosin1-Phosphat die Migration der Granulosazellen induzieren und so die Gelbkörperentwicklung beeinflussen. Die Überprüfung dieser Hypothese sollte Ziel weiterer in-vivo Untersuchungen sein.

6. Literaturverzeichnis

1. Allende ML, Dreier JL, Mandala S, and Proia RL: Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration. *J Biol Chem* 2004, 279: 15396-15401
2. Ancellin N, Colmont C, Su J, Li Q, Mittereder N, Chae SS, Stefansson S, Liao G, and Hla T: Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation. *J Biol Chem* 2002, 277: 6667-6675
3. Arnold G, Beier HM, Herrmann M, Kaufmann P, Kretschmann HJ, Kühnel W, Schiebler TH, Schmidt W, Steiniger B, Winckler J, van der Zypen E, and Killes K: Becken und Beckeneingeweide. Anatomie: Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopisch Anatomie des Menschen. Edited by Schiebler TH, Schmidt W, and Zilles K. Berlin, Heidelberg, New York, Springer, 1997, pp. 613-683
4. Augustin HG: Vascular morphogenesis in the ovary. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000, 14: 867-882
5. Balthasar S, Samulin J, Ahlgren H, Bergelin N, Lundqvist M, Toescu EC, Eggo MC, and Tornquist K: Sphingosine 1-phosphate receptor expression profile and regulation of migration in human thyroid cancer cells. *Biochem J* 2006, 398: 547-556
6. Barnes JL and Hevey KA: Glomerular mesangial cell migration. Response to platelet secretory products. *Am J Pathol* 1991, 138: 859-866
7. Becker EL: Stimulated neutrophil locomotion: chemokinesis and chemotaxis. *Arch Pathol Lab Med* 1977, 101: 509-513
8. Becker, S., Paletta, J., Nofer, J. R., Schultze-Mosgau, A., Griesinger, G., Diedrich, K., and von Otte, S. Sphingosine 1-phosphate and follicular fluid High Density Lipoproteine induce human granulosa cell migration and may contribute to corpus luteum formation; Promotion von Frau S. Becker, eingereicht 2009. unpublished data . 2009.
9. Braun J and Renz-Polster H: Hämorrhagische Diathese. Basislehrbuch Innere Medizin. Edited by Renz-Polster H, Krautzig S, and Braun J. München, Jena, Urban & Fischer, 2004, pp. 319-325

10. Breckwoldt M: *Exempla endokrinologica: Bildatlas zur Physiologie und Morphologie des endokrinen Systems*. München Schering AG/medical Service, 1991
11. Breckwoldt M, Karck U, Keck C, Martius J, Pfeleiderer A, Schneider H, and Schuth W: Geschlechtsspezifische Funktionen in den einzelnen Lebensphasen der Frau. *Gynäkologie und Geburtshilfe: Sicher durch Studium und Praxis*. Edited by Pfeleiderer A, Breckwoldt M, and Martius G. Stuttgart; New York, Thieme, 2002, pp. 50-77
12. Brinkmann V, Davis MD, Heise CE, Albert R, Cottens S, Hof R, Bruns C, Prieschl E, Baumruker T, Hiestand P, Foster CA, Zollinger M, and Lynch KR: The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem* 2002, 277: 21453-21457
13. Brizuela L, Rabano M, Gangoiti P, Narbona N, Macarulla JM, Trueba M, and Gomez-Munoz A: Sphingosine-1-phosphate stimulates aldosterone secretion through a mechanism involving the PI3K/PKB and MEK/ERK 1/2 pathways. *J Lipid Res* 2007, 48: 2264-2274
14. Chiba K, Matsuyuki H, Maeda Y, and Sugahara K: Role of sphingosine 1-phosphate receptor type 1 in lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus. *Cell Mol Immunol* 2006, 3: 11-19
15. Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S, and Spiegel S: Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 1996, 381: 800-803
16. English D, Welch Z, Kovala AT, Harvey K, Volpert OV, Brindley DN, and Garcia JG: Sphingosine 1-phosphate released from platelets during clotting accounts for the potent endothelial cell chemotactic activity of blood serum and provides a novel link between hemostasis and angiogenesis. *FASEB J* 2000, 14: 2255-2265
17. Ferrara N and Davis-Smyth T: The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997, 18: 4-25
18. Furukawa K, Fujiwara H, Sato Y, Zeng BX, Fujii H, Yoshioka S, Nishi E, and Nishio T: Platelets are novel regulators of neovascularization and luteinization during human corpus luteum formation. *Endocrinology* 2007, 148: 3056-3064

19. Gillard BK, Clement RG, and Marcus DM: Variations among cell lines in the synthesis of sphingolipids in de novo and recycling pathways. *Glycobiology* 1998, 8: 885-890
20. Gonda K, Okamoto H, Takuwa N, Yatomi Y, Okazaki H, Sakurai T, Kimura S, Sillard R, Harii K, and Takuwa Y: The novel sphingosine 1-phosphate receptor AGR16 is coupled via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins to multiple signalling pathways. *Biochem J* 1999, 337 (Pt 1): 67-75
21. Gottlieb D, Heideman W, and Saba JD: The DPL1 gene is involved in mediating the response to nutrient deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol Res Commun* 1999, 1: 66-71
22. Hall A: Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998, 279: 509-514
23. Hanel P, Andreani P, and Graler MH: Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *FASEB J* 2007, 21: 1202-1209
24. Hartwig D, Harloff S, Liu L, Schlenke P, Wedel T, and Geerling G: Epitheliotrophic capacity of a growth factor preparation produced from platelet concentrates on corneal epithelial cells: a potential agent for the treatment of ocular surface defects? *Transfusion* 2004, 44: 1724-1731
25. Hirschberg RM and Plendl J: Vascular Mimicry of Granulosa Cells: a New Concept of Corpus Luteum Development? *Anat Histol Embryol* 2005, 34-(s1):19 16300534
26. Hisano N, Yatomi Y, Satoh K, Akimoto S, Mitsumata M, Fujino MA, and Ozaki Y: Induction and suppression of endothelial cell apoptosis by sphingolipids: a possible in vitro model for cell-cell interactions between platelets and endothelial cells. *Blood* 1999, 93: 4293-4299
27. Hla T and Maciag T: An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 1990, 265: 9308-9313
28. Hoch RV and Soriano P: Roles of PDGF in animal development. *Development* 2003, 130: 4769-4784
29. Hornung D, Bentzien F, Wallwiener D, Kiesel L, and Taylor RN: Chemokine bioactivity of RANTES in endometriotic and normal endometrial stromal cells and peritoneal fluid. *Mol Hum Reprod* 2001, 7: 163-168

30. Im DS, Heise CE, Ancellin N, O'Dowd BF, Shei GJ, Heavens RP, Rigby MR, Hla T, Mandala S, McAllister G, George SR, and Lynch KR: Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8. *J Biol Chem* 2000, 275: 14281-14286
31. Inagaki Y, Pham TT, Fujiwara Y, Kohno T, Osborne DA, Igarashi Y, Tigyi G, and Parrill AL: Sphingosine 1-phosphate analogue recognition and selectivity at S1P4 within the endothelial differentiation gene family of receptors. *Biochem J* 2005, 389: 187-195
32. Jongsma M, Florczyk UM, Hendriks-Balk MC, Michel MC, Peters SL, and Alewijnse AE: Validation of a rapid, non-radioactive method to quantify internalisation of G-protein coupled receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2007, 375: 329-336
33. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO, Heiss C, and Ovtcharoff W: *Weibliche Geschlechtsorgane. Histologie*. Edited by Gratzl M. Berlin, Heidelberg, New York, Springer, 2002, pp. 394-419
34. Kim MK, Lee HY, Kwak JY, Park JI, Yun J, and Bae YS: Sphingosine-1-phosphate stimulates rat primary chondrocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 345: 67-73
35. Kim MK, Park KS, Lee H, Kim YD, Yun J, and Bae YS: Phytosphingosine-1-phosphate stimulates chemotactic migration of L2071 mouse fibroblasts via pertussis toxin-sensitive G-proteins. *Exp Mol Med* 2007, 39: 185-194
36. Kimura T, Sato K, Malchinkhuu E, Tomura H, Tamama K, Kuwabara A, Murakami M, and Okajima F: High-density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, 23: 1283-1288
37. Kimura T, Watanabe T, Sato K, Kon J, Tomura H, Tamama K, Kuwabara A, Kanda T, Kobayashi I, Ohta H, Ui M, and Okajima F: Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. *Biochem J* 2000, 348 Pt 1: 71-76
38. Knight PG and Glister C: TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 2006, 132: 191-206
39. Kohno T, Matsuyuki H, Inagaki Y, and Igarashi Y: Sphingosine 1-phosphate promotes cell migration through the activation of Cdc42 in Edg-6/S1P4-expressing cells. *Genes Cells* 2003, 8: 685-697

40. Koide Y, Hasegawa T, Takahashi A, Endo A, Mochizuki N, Nakagawa M, and Nishida A: Development of novel EDG3 antagonists using a 3D database search and their structure-activity relationships. *J Med Chem* 2002, 45: 4629-4638
41. Kon J, Sato K, Watanabe T, Tomura H, Kuwabara A, Kimura T, Tamama K, Ishizuka T, Murata N, Kanda T, Kobayashi I, Ohta H, Ui M, and Okajima F: Comparison of intrinsic activities of the putative sphingosine 1-phosphate receptor subtypes to regulate several signaling pathways in their cDNA-transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1999, 274: 23940-23947
42. Kupperman E, An S, Osborne N, Waldron S, and Stainier DY: A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development. *Nature* 2000, 406: 192-195
43. Lee H, Goetzl EJ, and An S: Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate stimulate endothelial cell wound healing. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000, 278: C612-C618
44. Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, Volpi M, Sha'afi RI, and Hla T: Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 1999, 99: 301-312
45. Liu CH, Thangada S, Lee MJ, Van Brocklyn JR, Spiegel S, and Hla T: Ligand-induced trafficking of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1. *Mol Biol Cell* 1999, 10: 1179-1190
46. Liu H, Chakravarty D, Maceyka M, Milstien S, and Spiegel S: Sphingosine kinases: a novel family of lipid kinases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2002, 71: 493-511
47. Liu L, Hartwig D, Harloff S, Herminghaus P, Wedel T, Kasper K, and Geerling G: Corneal epitheliotropic capacity of three different blood-derived preparations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006, 47: 2438-2444
48. Liu Y, Wada R, Yamashita T, Mi Y, Deng CX, Hobson JP, Rosenfeldt HM, Nava VE, Chae SS, Lee MJ, Liu CH, Hla T, Spiegel S, and Proia RL: Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest* 2000, 106: 951-961
49. Malek RL, Toman RE, Edsall LC, Wong S, Chiu J, Letterle CA, Van Brocklyn JR, Milstien S, Spiegel S, and Lee NH: Nrg-1 belongs to the endothelial differentiation gene family of G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors. *J Biol Chem* 2001, 276: 5692-5699

50. Matsuyuki H, Maeda Y, Yano K, Sugahara K, Chiba K, Kohno T, and Igarashi Y: Involvement of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor type 1 and type 4 in migratory response of mouse T cells toward S1P. *Cell Mol Immunol* 2006, 3: 429-437
51. Mattie M, Brooker G, and Spiegel S: Sphingosine-1-phosphate, a putative second messenger, mobilizes calcium from internal stores via an inositol trisphosphate-independent pathway. *J Biol Chem* 1994, 269: 3181-3188
52. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983, 65: 55-63
53. Murata N, Sato K, Kon J, Tomura H, Yanagita M, Kuwabara A, Ui M, and Okajima F: Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochem J* 2000, 352 Pt 3: 809-815
54. Neulen J, Raczek S, Pogorzelski M, Grunwald K, Yeo TK, Dvorak HF, Weich HA, and Breckwoldt M: Secretion of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor from human luteinized granulosa cells is human chorionic gonadotrophin dependent. *Mol Hum Reprod* 1998, 4: 203-206
55. Ng CK, Carr K, McAinsh MR, Powell B, and Hetherington AM: Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* 2001, 410: 596-599
56. Nofer JR, Noll C, Feuerborn R, Assmann G, and Tepel M: Low density lipoproteins inhibit the Na⁺/H⁺ antiport in human platelets via activation of p38MAP kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 340: 751-757
57. Okamoto H, Takuwa N, Gonda K, Okazaki H, Chang K, Yatomi Y, Shigematsu H, and Takuwa Y: EDG1 is a functional sphingosine-1-phosphate receptor that is linked via a Gi/o to multiple signaling pathways, including phospholipase C activation, Ca²⁺ mobilization, Ras-mitogen-activated protein kinase activation, and adenylate cyclase inhibition. *J Biol Chem* 1998, 273: 27104-27110
58. Okamoto H, Takuwa N, Yokomizo T, Sugimoto N, Sakurada S, Shigematsu H, and Takuwa Y: Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Mol Cell Biol* 2000, 20: 9247-9261

59. Olivera A and Spiegel S: Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* 1993, 365: 557-560
60. Oo ML, Thangada S, Wu MT, Liu CH, Macdonald TL, Lynch KR, Lin CY, and Hla T: Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor. *J Biol Chem* 2007, 282: 9082-9089
61. Rainey WH, Sawetawan C, Shay JW, Michael MD, Mathis JM, Kutteh W, Byrd W, and Carr BR: Transformation of human granulosa cells with the E6 and E7 regions of human papillomavirus. *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 78: 705-710
62. Randriamboavonjy V, Badenhop K, Schmidt H, Geisslinger G, Fisslthaler B, and Fleming I: The S1P(2) receptor expressed in human platelets is linked to the RhoA-Rho kinase pathway and is down regulated in type 2 diabetes. *Basic Res Cardiol* 2009,
63. Reigstad LJ, Varhaug JE, and Lillehaug JR: Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel members of the platelet-derived growth factors family. *FEBS J* 2005, 272: 5723-5741
64. Reynolds LP and Redmer DA: Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. *J Anim Sci* 1998, 76: 1671-1681
65. Riley SC, Gibson AH, Leask R, Mauchline DJ, Pedersen HG, and Watson ED: Secretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases into follicular fluid during follicle development in equine ovaries. *Reproduction* 2001, 121: 553-560
66. Rodeck U, Jost M, Kari C, Shih DT, Lavker RM, Ewert DL, and Jensen PJ: EGF-R dependent regulation of keratinocyte survival. *J Cell Sci* 1997, 110 (Pt 2): 113-121
67. Rolaki A, Coukos G, Loutradis D, DeLisser HM, Coutifaris C, and Makrigiannakis A: Luteogenic hormones act through a vascular endothelial growth factor-dependent mechanism to up-regulate alpha 5 beta 1 and alpha v beta 3 integrins, promoting the migration and survival of human luteinized granulosa cells. *Am J Pathol* 2007, 170: 1561-1572
68. Ruwisch L, Schafer-Korting M, and Kleuser B: An improved high-performance liquid chromatographic method for the determination

- of sphingosine-1-phosphate in complex biological materials. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2001, 363: 358-363
69. Saba JD and Hla T: Point-counterpoint of sphingosine 1-phosphate metabolism. Circ Res 2004, 94: 724-734
70. Sanna MG, Liao J, Jo E, Alfonso C, Ahn MY, Peterson MS, Webb B, Lefebvre S, Chun J, Gray N, and Rosen H: Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor subtypes S1P1 and S1P3, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate. J Biol Chem 2004, 279: 13839-13848
71. Schams D and Berisha B: Regulation of corpus luteum function in cattle--an overview. Reprod Domest Anim 2004, 39: 241-251
72. Sensken SC, Bode C, and Graler MH: Accumulation of FTY720 in lymphoid tissues contributes to prolonged efficacy. J Pharmacol Exp Ther 2008,
73. Smith MF, McIntush EW, and Smith GW: Mechanisms associated with corpus luteum development. J Anim Sci 1994, 72: 1857-1872
74. Sonntag B, Gotte M, Wulfing P, Schuring AN, Kiesel L, and Greb RR: Metformin alters insulin signaling and viability of human granulosa cells. Fertil Steril 2005, 84 Suppl 2: 1173-1179
75. Spiegel S and Kolesnick R: Sphingosine 1-phosphate as a therapeutic agent. Leukemia 2002, 16: 1596-1602
76. Spiegel S and Milstien S: Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. J Biol Chem 2002, 277: 25851-25854
77. Spiegel S and Milstien S: Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. Nat Rev Mol Cell Biol 2003, 4: 397-407
78. Tani M, Sano T, Ito M, and Igarashi Y: Mechanisms of sphingosine and sphingosine 1-phosphate generation in human platelets. J Lipid Res 2005, 46: 2458-2467
79. Uniklinikum Giessen: Gefiltertes Thrombozytenkonzentrat CPD: Gebrauchsinformation und Fachinformation. <http://www.uniklinikum-giessen.de/immunologie/transfusion/unabh%20GIF-TKF-2006-Juni-27.pdf> 2007,
80. Van Brocklyn JR, Lee MJ, Menzeleev R, Olivera A, Edsall L, Cuvillier O, Thomas DM, Coopman PJ, Thangada S, Liu CH, Hla T, and Spiegel S: Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. J Cell Biol 1998, 142: 229-240

81. van Koppen CJ, Meyer zu HD, Alemany R, and Jakobs KH: Sphingosine kinase-mediated calcium signaling by muscarinic acetylcholine receptors. *Life Sci* 2001, 68: 2535-2540
82. von Otte S, Paletta JR, Becker S, Konig S, Fobker M, Greb RR, Kiesel L, Assmann G, Diedrich K, and Nofer JR: Follicular fluid high density lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate is a novel mediator of ovarian angiogenesis. *J Biol Chem* 2006, 281: 5398-5405
83. Wang D, Zhao Z, Caperell-Grant A, Yang G, Mok SC, Liu J, Bigsby RM, and Xu Y: S1P differentially regulates migration of human ovarian cancer and human ovarian surface epithelial cells. *Mol Cancer Ther* 2008, 7: 1993-2002
84. Yamazaki Y, Kon J, Sato K, Tomura H, Sato M, Yoneya T, Okazaki H, Okajima F, and Ohta H: Edg-6 as a putative sphingosine 1-phosphate receptor coupling to Ca(2+) signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 268: 583-589
85. Yang L, Yatomi Y, Miura Y, Satoh K, and Ozaki Y: Metabolism and functional effects of sphingolipids in blood cells. *Br J Haematol* 1999, 107: 282-293
86. Yatomi Y, Igarashi Y, Yang L, Hisano N, Qi R, Asazuma N, Satoh K, Ozaki Y, and Kume S: Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. *J Biochem* 1997, 121: 969-973
87. Yatomi Y, Ohmori T, Rile G, Kazama F, Okamoto H, Sano T, Satoh K, Kume S, Tigyi G, Igarashi Y, and Ozaki Y: Sphingosine 1-phosphate as a major bioactive lysophospholipid that is released from platelets and interacts with endothelial cells. *Blood* 2000, 96: 3431-3438
88. Yatomi Y, Ruan F, Hakomori S, and Igarashi Y: Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets. *Blood* 1995, 86: 193-202
89. Yatomi Y, Yamamura S, Ruan F, and Igarashi Y: Sphingosine 1-phosphate induces platelet activation through an extracellular action and shares a platelet surface receptor with lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 1997, 272: 5291-5297
90. Zachow R and Uzumcu M: The hepatocyte growth factor system as a regulator of female and male gonadal function. *J Endocrinol* 2007, 195: 359-371

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des ovariellen Zyklus	2
Abb.2 : Die mutmaßliche Rolle der Thrombozyten bei der Gelbkörperformation	14
Abb. 3: Schematische Darstellung einer boyden chamber	30
Abb. 4: Migrationsassay mit einer Thrombozytensekret-Konzentrationsreihe.....	38
Abb. 5: Migrationsassay mit einer S1P-Konzentrationsreihe	40
Abb. 6: Migrationsassay mit hitzebehandeltem S1P und Thrombozytensekret.....	42
Abb. 7: Migrationsassay mit AK-filtrierte S1P und Thrombozytensekret.....	43
Abb. 8: Migrationsassay mit AP-verdaute S1P und Thrombozytensekret.....	45
Abb. 9: Migrationsassay mit dem S1P-Rezeptoragonisten FTY720.....	46
Abb. 10: Migrationsassay mit dem S1P-Rezeptoragonisten SEW-2871	48
Abb. 11: Migrationsassay mit dem S1P-Rezeptoragonisten Phytosphingosin	49
Abb. 12: Migrationsassay mit dem S1P-Rezeptoragonisten VPC 24191	51
Abb. 13: Migrationsassay mit dem S1P-Rezeptorantagonisten Cay10444.....	52
Abb. 14: Migrationsassay mit Pertussis-Toxin	54
Abb. 15: MTT-Assay.....	56
Abb. 16: Schematische Darstellung der vermuteten Rezeptorvermittlung der Migration ..	71

8. Danksagung

Dem Klinikdirektor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität zu Lübeck, Prof. Dr. med. K. Diedrich, danke ich für die Nutzung des Arbeitsplatzes und für das Überlassen des Materials. Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn PD Dr. med. S. von Otte, nun im fertility center Kiel tätig, angefertigt. Ihm gilt mein besonderer Dank – nicht nur für die Überlassung des interessanten Themas der Arbeit, sondern vor allem für die allzeit sehr engagierte, kompetente und persönliche Betreuung und für die Korrektur des Manuskriptes. Nicht zuletzt auch für das in mich gesetzte Vertrauen, das mich sehr motiviert hat. Frau Dipl. Biol. Steffi Becker danke ich für die Erstellung des Studienprotokolls. Weiterhin möchte ich mich bei der technischen Assistentin Christiane Schulz für ihre liebevolle und ausdauernde Unterstützung im Labor bedanken. Ohne sie wären die experimentellen Untersuchungen nicht geglückt. Sie ist die gute Seele des S1-Labors und hat maßgeblich zum Gelingen der Studie beigetragen. Nicht zuletzt danke ich allen anderen, die mich im Labor begleitet haben: Birte Münchow, Barbara Nehls, Stephan Polack und Dr. rer. nat. Frank Köster für ihre kleinen Hilfen am Rande und für die Schaffung einer guten Arbeitsatmosphäre. Herrn Schultze aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität zu Lübeck danke ich für die Bereitstellung der Thrombozytenkonzentrate. Herr Dr. rer. nat. Markus Gräler aus dem Institut für Immunologie der Medizinischen Hochschule Hannover hat die Messung der Sphingosin 1-Phosphat-Konzentration im Thrombozytensekret ohne Aufwandsentschädigung durchgeführt. Dafür bin ich ihm sehr dankbar.

Auch außerhalb der Uni haben einige zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Allen voran bin ich meinem Bruder, Dr. med. Philipp Kümpers, zu großen Dank verpflichtet. Für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung, das Korrekturlesen, seine vielen Tipps hinsichtlich der Bedienung der unterschiedlichsten Computerprogramme und Mut machenden Worte bin ich ihm sehr dankbar. Die Erstellung der Dissertation wäre ohne ihn nicht geglückt. Meiner Schwägerin, Dr. med. Ulrike Kümpers, danke ich ebenfalls für viele aufmunternde Worte und das Austauschen von Erfahrungen. Meiner Familie, insbesondere aber meiner Mutter, danke ich für ihre bedingungslose Unterstützung sowohl in moralischer als auch in finanzieller Hinsicht, ohne die mir weder Studium noch Promotion möglich gewesen wäre. Die letzten Zeilen sind Andreas gewidmet, der immer ein offenes Ohr für mich hat und die

Höhen und Tiefen der Zeit der experimentellen Untersuchungen und die des Schreibens mit mir durchlebt hat.

9. Lebenslauf

Christiane Charlotte Kümpers

Königstraße 4/6

23552 Lübeck

geboren am: 29.11.1983 in Steinfurt-Borghorst/Westfalen als zweites Kind von
Dres. med. Hildburg und Rüdiger Kümpers (Fachärzte für
Anästhesie bzw. Pädiatrie)

Familienstand: ledig

Schulischer Werdegang:

1990- 1992 Besuch der kath. Werner-Rolevink-Grundschule in Laer (NRW)

1992- 1994 Besuch der Marien-Grundschule in Steinfurt-Borghorst (NRW)

1994- 2003 Besuch des städt. Gymnasiums Steinfurt-Borghorst

Mai 2003 Abitur; Note: 2,0

Universitärer Werdegang:

Oktober 2003 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität zu
Lübeck

August 2005 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung; Note: „gut“

August 2006 Beginn der vorliegenden laborexperimentellen Dissertation in der
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität zu
Lübeck zum Thema: „Untersuchungen zum Migrationsverhalten
primärer und immortalisierter humaner Granulosazellen unter
Einfluss von Sphingosin 1-Phosphat und Thrombozytensekret“.
Doktorvater: PD Dr. med. S. von Otte

Dezember 2006 Abschluss der laborexperimentellen Untersuchungen

November 2008 Beendigung der schriftlichen Abfassung der Dissertation

Dezember 2008 Beginn des Praktischen Jahres an der Universität zu Lübeck;
Tertiale: Pathologie, Chirurgie, Innere Medizin

Mai 2010 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung; Note: „gut“

Juli 2010 Promotion

August 2010 Assistenzärztin im Institut für Pathologie (Leiter: Prof. Feller),
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

Famulaturen: Innere Medizin in Krankenhaus und Praxis, Frauenheilkunde und
Geburtshilfe, Anästhesiologie und Notfallmedizin, Rechtsmedizin,
Mikrobiologie und Hygiene, Pathologie

Wahlfächer: Sonografie; Note „sehr gut“
Naturheilverfahren; Note „sehr gut“
Rechtsmedizin; Note „sehr gut“

Veröffentlichungen:

C Kümpers, S von Otte. Die Wanderung von Zellen im Eierstock-was treibt sie an?
Posterausstellung am Dritten Lübecker Doktorandentag 2009