

---

Dekan:	Prof. Dr. A. Steinbüchel
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Ch. Klämbt
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. GF Weinbauer
Tage der mündlichen Prüfungen:	11. und 12.12.2002
Tag der Promotion:	12.12.2002

---

**Melanie Rickert-Föhring**

**Studien zum LH Rezeptor**

**-Charakterisierung der LH Rezeptor cDNA von *Macaca fascicularis*-  
-Studien zur Modulation der LH Rezeptor Expression  
mit Hilfe der Antisense Oligonukleotid Technik-**

**-2002-**

Zoologie

**Studien zum LH Rezeptor**

**-Charakterisierung der LH Rezeptor cDNA von *Macaca fascicularis*-  
-Studien zur Modulation der LH Rezeptor Expression  
mit Hilfe der Antisense Oligonukleotid Technik-**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Melanie Rickert-Föhring  
aus Bad Sassendorf

-2002-

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Endokrine Steuerungsmechanismen	1
1.2 Hormonelle Regulation der Keimzellreifung	1
1.3 Bedeutung von LH für die Spermatogenese	4
1.4 Organisation des testikulären Gewebes	4
1.5 Die Leydig Zelle	5
1.6 Testosteronbiosynthese	6
1.7 Der LH Rezeptor	6
1.7.1 Genetische Organisation des LH Rezeptors	7
1.7.2 Signaltransduktion	8
1.7.3 LHR Expression	8
1.8 Störungen der endokrinen Regulation	9
1.9 LH Rezeptor Mutationen	10
1.9.1 Aktivierende Mutationen	10
1.9.2 Inaktivierende LHR Mutationen	10
1.10 Funktion des Testosterons	11
1.11 Untersuchungen zur parakrinen Funktion des Testosterons	12
1.12 Antisense Oligonukleotid (AON) Technologie	13
1.12.1 AON Modifikation	15
1.12.2 Zelluläre Aufnahme von AON	16
1.13 Einsatz der AON Technologie gegen LHR mRNA	17
1.13.1 Zellkulturmodell	18
1.13.2 Organkulturmodell	19
1.13.3 Tiermodell	19
1.14 Zielsetzung	20
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>21</b>
2.1 Molekularbiologische Methoden	21
2.1.1 Gesamt-RNA-Isolierung aus Gewebe	21
2.1.1.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA	22
2.1.2 cDNA Synthese durch Reverse Transkription von RNA	22
2.1.3 Reverse Transkriptions Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	22
2.1.4 Elektrophoresetechniken	25

2.1.4.1 Agarose Gelelektrophorese -----	25
2.1.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese -----	25
2.1.5 Klonierung -----	26
2.1.5.1 Ligation -----	26
2.1.5.2 Herstellung kompetenter Zellen -----	26
2.1.5.3 Transformation-----	27
2.1.5.4 Mini-Plasmidisolierung -----	27
2.1.5.5 Restriktionsverdau -----	28
2.1.6 Sequenzierung -----	28
2.2 In situ Hybridisierung -----	29
2.2.1 Herstellung einer cRNA Sonde für die in situ Hybridisierung -----	30
2.3 Zellkulturarbeiten -----	31
2.3.1 Zellkultur von hLHR CHO Zellen -----	31
2.3.2 Kryokonservieren von Zellen-----	32
2.3.3 Auftauen von Zellen -----	32
2.4 Studien zur Anwendung von mit Antisense Oligonukleotiden (AON) -----	33
2.4.1 in vitro Studien -----	33
2.4.1.1 Antisense Oligonukleotide (AON) -----	33
2.4.1.2 Zelluläre Aufnahme -----	34
2.4.1.3 Testung der AON Wirkung-----	35
2.4.1.4 Zusatz von Oligofectamin -----	35
2.4.1.5 Stimulationsversuche mit hCG -----	36
2.4.1.6 cAMP ELISA (Enzyme Linked Immuno Adsorbent Assay) -----	36
2.4.2 Organkultur Studien -----	38
2.4.3 Studien in der Primärzellkultur-----	39
2.4.3.1 Proteinbestimmung -----	40
2.4.3.2 Radio Immuno Assay (RIA) zum Nachweis von Testosteron -----	41
2.4.4 in vivo Studien -----	42
2.4.4.1 Studie I-----	42
2.4.4.2 Studie II-----	44
2.5 Zellkulturmedien, Lösungen -----	46

2.6 Materialien und Geräte -----	48
2.6.1 Materialien -----	48
2.6.1.2 Plasmidvektoren und Bakterienstämme -----	48
2.6.1.1 Chemikalien -----	48
2.6.2 Geräte -----	49
<b>3 ERGEBNISSE -----</b>	<b>50</b>
3.1 Klonierung der LH Rezeptor cDNA des Java Affen ( <i>Macaca fascicularis</i> ) -----	50
3.1.1 RT PCR der testikulären RNA des Java Affen -----	50
3.1.2 Proberestriktion -----	51
3.1.3 cDNA Consensus Sequenz des <i>Macaca fascicularis</i> LH Rezeptors -----	52
3.1.3.1 Consensus Nukleotidsequenz der <i>Macaca fascicularis</i> LHR cDNA -----	53
3.1.4 Proteinalignment mit LHR Proteinsequenzen verschiedener Spezies -----	54
3.2 In situ Hybridisierung -----	55
3.3 Studien zur Etablierung der Antisense Oligonukleotidtechnik – in vitro -----	57
3.3.1 Aufnahme FITC markierter Kontrolloligonukleotide in CHO-Zellen -----	57
3.3.2 Überprüfung der cAMP Produktion durch hCG Stimulation -----	59
3.3.3 Ermittlung der optimalen Stimulationsdauer mit hCG -----	60
3.3.4 Abhängigkeit der cAMP Konzentration von der Zellzahl -----	61
3.3.5 Überprüfung der Wirkung von drei Antisense Oligonukleotid Molekülen --	62
3.3.6 Dosisabhängigkeit der Antisense Oligonukleotid Wirkung -----	63
3.3.7 Reproduzierbarkeit der Antisense Oligonukleotid Wirkung -----	65
3.3.8 Antisense Oligonukleotid Wirkung unter Oligofectamin Additiv -----	68
3.4 Studien zur Antisense Oligonukleotid Technik in Organkultur -----	71
3.4.1 Stimulierbarkeit der Testosteronproduktion in der Hodengewebskultur ----	71
3.4.2 Antisense Oligonukleotidwirkung an einer testikulären Primärzellkultur --	73
3.5 Studien zur Etablierung der Antisense Oligonukleotidtechnik – in vivo -----	75
3.5.1 In vivo Studie I -----	75
3.5.2 In vivo Studie II -----	77
<b>4 DISKUSSION -----</b>	<b>79</b>
4.1 Klonierung der <i>Macaca fascicularis</i> LHR cDNA -----	79
4.2 In situ Hybridisierung -----	81
4.3 Experimente zur Etablierung der Antisense Oligonukleotidtechnik in vitro -----	82
4.3.1 Charakteristika des Zellkulturmodells hLHR CHO Zellen -----	82
4.3.2 Zelluläre Aufnahme des FITC markierten Antisense Oligonukleotids -----	83

4.3.3 Stimulierbarkeit der LHR exprimierenden Zellen mit hCG-----	84
4.3.4 Testung der Effektivität verschiedener AON -----	85
4.3.5 Experiment zur AON Dosisfindung -----	86
4.3.6 Reproduzierbarkeit der dosisabhängigen Wirkung des AON 1 -----	87
4.3.6.1 Veränderung der cAMP Konzentration unter AON Wirkung-----	87
4.3.6.2 Überprüfung zytotoxischer Effekte nach Forskolin Stimulation -----	90
4.3.7 AON Wirkung unter Zusatz von Oligofectamin Additiv -----	90
4.4 Studien zur Etablierung der Antisense Oligonukleotidtechnik in der Organkultur	92
4.4.1. Stimulierbarkeit der Testosteronproduktion in der Hodengewebeskultur ---	92
4.4.2. Antisense Oligonukleotidwirkung an einer testikulären Primärzellkultur--	93
4.5 Studien zur Antisense Oligonukleotidwirkung in vivo -----	94
4.5.1. Studie I -----	94
4.5.2 Studie II -----	95
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG -----</b>	<b>97</b>
<b>6 AUSBLICK-----</b>	<b>98</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS -----</b>	<b>99</b>
<b>8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS -----</b>	<b>111</b>
<b>9 VORTRÄGE UND VERÖFFENTLICHUNGEN -----</b>	<b>113</b>
<b>DANKSAGUNG-----</b>	<b>114</b>
<b>LEBENS LAUF -----</b>	<b>115</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Endokrine Steuerungsmechanismen

Hormone dienen sowohl im menschlichen als auch in tierischen Organismen als mobile Botenstoffe, deren Nachricht in der Zielzelle in ein Signal umgesetzt wird, welches Auswirkungen auf den gesamten Organismus ausübt. Sie werden im Menschen und im Primaten von den endokrinen Organen Hypothalamus, Hypophyse, Schilddrüse, Pankreas und Nebenniere produziert, um dann in das Blut sezerniert zu werden. Gebunden an Trägerproteine gelangen sie via Blutkreislauf zu ihren Zielzellen. Während die Hormone der Schilddrüse (L-Trijodthyronin, L-Thyroxin), des Pankreas (Insulin) und der Nebennieren (Corticoide) den menschlichen Organismus zeitlebens kontinuierlich beeinflussen, kommt den Hormonen des Hypothalamus und der Hypophyse erstmals besondere Bedeutung zu Beginn der Pubertät zu.

In den Zellen des Hypophysenvorderlappens wird das Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) produziert und pulsatil an das Zielorgan Hypophyse entlassen. Dort stimuliert es die Zellen, die Gonadotropine Luteinisierendes Hormon (LH) und Follikel stimulierendes Hormon (FSH) zu produzieren. LH und FSH wirken sowohl im männlichen als auch im weiblichen Organismus auf die Keimzellreifung ein.

### 1.2 Hormonelle Regulation der Keimzellreifung

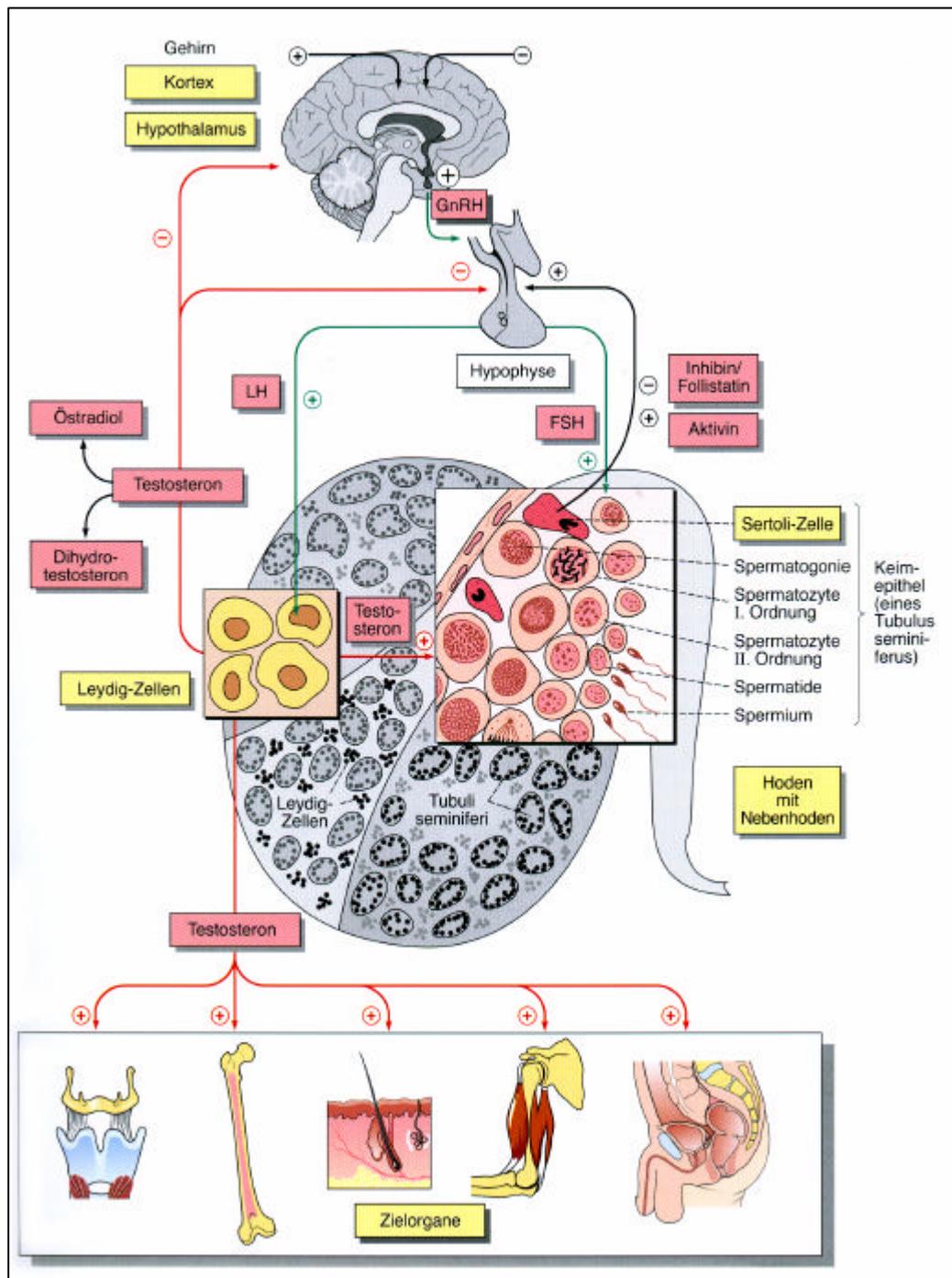
Im weiblichen Organismus erfolgt diese während des monatlichen ovulatorischen Zyklus. Die im Ovarium ansässigen Granulosazellen der Primärfollikel sind die Zielzellen des FSH, welches die Zellen zur Produktion von Östradiol veranlaßt. Dieses trägt zur Reifung der Follikel bei und der Anstieg dieses Hormons sorgt für eine negative Rückkopplung des FSH: Östradiol hemmt die Ausschüttung von GnRH, so daß die FSH Produktion unterbleibt. In dem Maße wie der Östradiolspiegel nun ansteigt, sinkt der FSH-Spiegel. Durch diesen Mechanismus wird das Wachstum nur eines dominanten Follikels gefördert, wofür zudem das von den Granulosazellen sezernierte Inhibin sorgt, das die FSH Freisetzung hemmt. Das Ende der Follikelphase wird durch den LH Puls eingeleitet. Östradiol bewirkt die Freisetzung des LH aus der Hypophyse, welches zur Ovulation führt, die den Beginn der Lutealphase signalisiert. Unter dem Einfluß von LH schaltet der größte Teil der Granulosazellen auf die Produktion von Progesteron um, daher sind Östradiol und Progesteron die charakteristischen Hormone dieser Zyklusphase. Sie hemmen nun die Ausschüttung der gonadotropen Hormone durch Suppression der hypothalamischen

GnRH-Sekretion und verhindern somit ein Heranreifen weiterer Follikel im Falle einer Befruchtung der Eizelle.

Neben der Steuerung der Gonadotropinsekretion sind die weiblichen Hormone Östradiol und Progesteron essentiell für die Knochenbildung und Brustbildung, des weiteren wirken sie antagonistisch auf den Lipidstoffwechsel ein: während Östradiol einen anabolen Effekt erzielt, kommt dem Progesteron eine katabole Wirkung zu.

Im männlichen Organismus sind die Ziele der Gonadotropine zum einen die Sertoli-, zum anderen die Leydig Zellen; beide Zelltypen befinden sich im Hodengewebe. Die Leydig Zelle bewerkstelligt die Interaktion mit LH, welches sie zur Produktion von Testosteron veranlaßt. Dieses wirkt nun auf die Sertoli Zellen ein, welche Rezeptoren sowohl für Testosteron als auch für FSH besitzen . Daher wird angenommen, daß Testosteron und FSH zusammen über die Sertoli Zelle auf die Spermatogenese einwirken. Während die Keimzellen im weiblichen Organismus bereits in der Embryonalentwicklung die erste meiotische Reifeteilung beginnen und in diesem Stadium bis zum Eintritt der Pubertät arretiert sind, liegen sie im Hoden zu Beginn der Pubertät in Form der Spermatogonien vor, die noch den diploiden Chromosomensatz aufweisen. Durch die Nährfunktion der Sertoli Zellen durchlaufen die Spermatogonien zunächst weitere mitotische Teilungen. Zur Vorbereitung der ersten meiotischen Reifeteilung wird ein tetraploider Chromosomensatz angelegt, es entsteht ein primärer Spermatozyt. Nach der ersten Meiose gehen aus einem primären Spermatozyten zwei sekundäre Spermatozyten hervor; sie beinhalten einen haploiden Chromosomensatz als Duplikat. Aus einem sekundären Spermatozyten entstehen dann nach der zweiten Meiose zwei haploide Spermatiden. Diese teilen sich nicht mehr, sondern differenzieren sich zu elongierenden Spermatiden und schließlich zu Spermien.

Testosteron übt eine negative Rückkopplung auf den Hypothalamus aus und hemmt dort die Sekretion der Gonadotropine. Weiterhin wirkt das von den Sertoli Zellen sezernierte Inhibin zusätzlich hemmend auf die FSH-Produktion. Neben der parakrinen Wirkung auf die Spermatogenese beeinflusst Testosteron zudem als endokrine Komponente die sekundären männlichen Geschlechtsmerkmale, den Kehlkopf, die Knochendichte, das Haarwachstum, und die Funktion der reproduktiven Organe.



**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung der hormonellen Regulation der Keimzellreifung beim Mann. Stimulierende Einflüsse der Hormone durch „+“, hemmende Einflüsse durch „-“ gekennzeichnet (in: Nieschlag et al., 1999).

### **1.3 Bedeutung von LH für die Spermatogenese**

Mit Einsatz der Pubertät beginnt die Hypophyse mit der pulsatilen Freisetzung des LH, welches essentiell ist für die Produktion des Testosterons in den Leydig Zellen des Hodens. In Zusammenarbeit mit FSH setzt es dann die erste Spermatogenesewelle in Gang, die von der Spermatogonie bis zum reifen Spermium im menschlichen Organismus 64 Tage dauert. Für Patienten mit hypogonadalem Hypogonadismus ist daher eine pulsatile Verabreichung von GnRH oder den Gonadotropinen LH und FSH die Therapie der Wahl, um die Spermatogenese zu initiieren (Burgues et al., 1997).

Unter normalen Physiologischen Bedingungen produziert das testikuläre Keimzellgewebe 3-7 Millionen Spermien pro Gramm Hodengewebe pro Tag. Unverzichtbar für die Aufrechterhaltung der Spermatogenese ist die Bereitstellung von LH und FSH (Übersicht: Weinbauer und Nieschlag, 1993). Dies wurde am Beispiel eines hypophysektomierten Patienten besonders offensichtlich, der ohne endogene LH und FSH Produktion und nur durch Testosteronsubstitution zeugungsfähig war. Die FSH Wirkung wurde hier durch eine konstitutiv aktive Mutation im FSH Rezeptor kompensiert, der ohne Bindung an FSH funktionierte (Gromoll et al., 1996).

### **1.4 Organisation des testikulären Gewebes**

Der Hoden dient sowohl der Reifung der Gameten als auch der Steroidbiosynthese. Die zwei morphologisch und funktionell unterschiedlichen Kompartimente des Hodens nehmen diese Aufgaben wahr: Die Keimzellreifung erfolgt in den Tubuli seminiferi, die Testosteronsynthese in den im Interstitium ansässigen Leydig Zellen (de Kretser et al., 1995).

Das tubuläre Kompartiment umfaßt etwa 70% des Hodenvolumens und ist durch bindegewebige Septen in etwa 250 – 300 Lobuli unterteilt, von denen jedes ein bis drei stark aufgeknauelte Tubuli seminiferi enthält. Neben den Keimzellen sind zusätzlich die peritubulären Zellen und die Sertoli Zellen im Tubulus vorhanden.

Die peritubulären Zellen (Myofibroblasten) sind ein Bestandteil der den Tubulus umgebenden Lamina propria. Als gering differenzierte Myozyten enthalten sie Aktin vom Typ der glatten Muskulatur, das sie befähigt, Kontraktionen auszuüben, die sich im Tubulus als peristaltische Welle ausbreiten. Diese Funktion trägt wahrscheinlich zum Transport der reifen Spermien bei.

Die Sertoli Zellen sind in das Keimzellepithel eingebettete somatische Zellen, die etwa einen Anteil von 35 % – 40 % am Keimepithel einnehmen. Sie sind der Basalmembran aufgelagert und koordinieren die Spermatogenese, sind sie doch verantwortlich für das Hodenvolumen und die Spermienanzahl im Erwachsenenalter. Jede Sertoli Zelle steht morphologisch und funktionell in Kontakt mit einer definierten Anzahl von Spermien, die in Abhängigkeit von der Spezies variiert. Im menschlichen Hoden sind durchschnittlich vier Spermien, in der Ratte etwa zehn mit jeweils einer Sertoli Zelle verbunden. Sekretionsprodukte der Sertoli Zellen sind Proteine, Zytokine, Wachstumsfaktoren, Opioide, Steroide, Prostaglandine, Zellteilungsfaktoren, etc., mit deren Hilfe sie sowohl topographisch als auch funktionell Einfluß auf die Spermatogenese ausüben. Die Sertoli Zellen durchlaufen mitotische Zellteilungen bis zum Einsatz der Pubertät. Sobald die Keimzellen mit der ersten meiotischen Teilung beginnen, endet die Teilungsfähigkeit der Sertoli Zellen. Zu diesem Zeitpunkt stehen die Sertoli Zellen durch tight junctions miteinander in Verbindung und bilden somit die Blut-Hoden-Schranke. Diese isoliert die haploiden und damit antigenen Keimzellen vor einem Angriff des Immunsystems und macht den Hoden somit zu einer immunologisch privilegierten Region, in der ein gleichbleibendes Milieu optimal für die Reifung der Keimzellen gewährleistet ist

### **1.5 Die Leydig Zelle**

Im humanen Organismus umfaßt der interstitielle Raum etwa 12 % - 15 % des Hodenvolumens und beinhaltet neben den für die Testosteronbiosynthese verantwortlichen Leydig Zellen auch Zellen des Immunsystems, Blut- und Lymphgefäße, Nerven und Bindegewebe.

Die Leydig Zellen wurden erstmalig 1850 von Franz Leydig beschrieben. Sie besetzen etwa 10 % - 20 % des Interstitiums und bilden daher eine quantitativ kleine Population..

Die Leydig Zellen differenzieren sich aus mesenchymalen Zellen und Fibroblasten ähnlichen Zellen im Interstitium, ihre Proliferation wird durch LH gesteuert. Charakteristisch für adulte Leydig Zellen ist das stark ausgeprägte glatte endoplasmatische Retikulum, das für die Testosteronbiosynthese essentiell und auch für andere Steroid produzierende Zellen typisch ist.

### 1.6 Testosteronbiosynthese

Testosteron wird in den Leydig Zellen de novo synthetisiert, da diese keine Speichermöglichkeit für das Hormon besitzen. Pro Tag wird es in einer Menge von 6-7 mg produziert. Ausgangsprodukt ist das Cholesterol, dessen steroidales Grundgerüst über mehrere Intermediate, die ihrerseits als Androgene wirksam sind, zu Testosteron oxidiert wird. Cholesterol gelangt entweder durch Rezeptor vermittelte Endozytose in die Leydig Zelle oder es wird ausgehend von Acetyl-Coenzym A de novo synthetisiert und anschließend in Form von Lipidtröpfchen gespeichert.

Cholesterol wird zunächst in die Mitochondrien eingeschleust, wo es an der inneren Mitochondrienmembran durch Cytochrom P450<sub>ssc</sub> (ssc=side change cleavage) zu Pregnenolon umgewandelt wird. Dies findet Eintritt in das glatte endoplasmatische Retikulum und wird dort zunächst in Progesteron und weiter in 17 $\beta$ -Hydroxyprogesteron umgewandelt. In Abhängigkeit von der Position der C-C-Doppelbindung im 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron stehen zwei verschiedene Stoffwechselwege zur Verfügung. Über den  $\Delta^4$  Weg (C-C-Doppelbindung zwischen 4. und 5. C-Atom) wird über Androstendion zu Testosteron oxidiert. Im Falle einer C-C-Doppelbindung zwischen 5. und 6. C-Atom wird das Molekül als Dehydroepiandrosteron definiert, welches über Androstendiol zu Testosteron hydroxyliert wird ( $\Delta^5$  Weg). Dieses bildet das Ausgangsprodukt für die extratestikuläre Produktion von Östrogenen (Hall, 1994), während für 17 $\beta$ -Hydroxyprogesteron und Progesteron noch keine unmittelbare Funktion im Hoden bewiesen werden konnte.

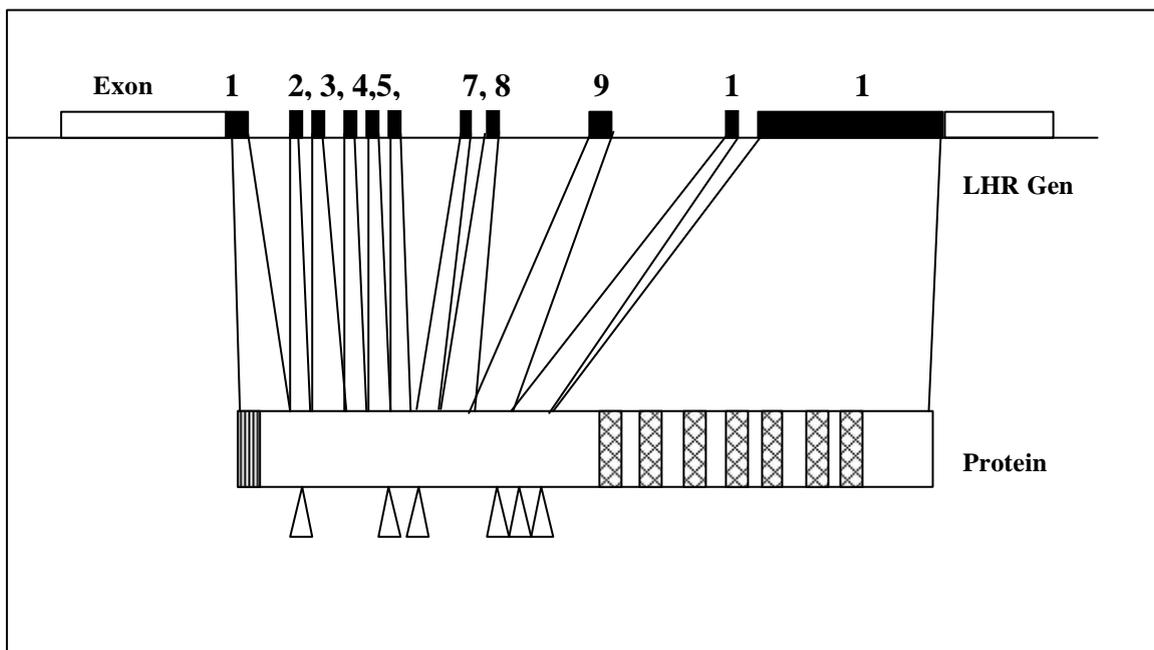
Eine weitere Produktionsstätte für androgene Hormone bildet die Nebenniere, jedoch werden von ihr nur etwa 5 % der Androgensynthese bewerkstelligt.

### 1.7 Der LH Rezeptor

Voraussetzung für die Synthese des Testosterons ist die einwandfreie Funktion des Rezeptors für das Luteinisierende Hormon (LHR), übersetzt er doch die hormonelle Botschaft des LH in das Signal für die Testosteronbiosynthese. Der LHR zählt zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und wird in den Leydig Zellen des Hodens exprimiert.

### 1.7.1 Genetische Organisation des LH Rezeptors

Der den humanen LHR codierende Genabschnitt befindet sich auf dem Chromosom 2p21 (Rousseau-Merck et al., 1990) und umfasst 11 Exons. Exon 1 codiert das Signal Peptid, welches das fertige Protein in das Endoplasmatischen Retikulum einschleust und in 5' Richtung vor dem Startcodon der Proteintranslation (ATG) liegt (Minegishi et al., 1990). Die Exone 2-10 codieren die extrazelluläre Domäne, die für die Ligandenbindung verantwortlich und über eine „hinge-region“ mit der Transmembrandomäne verbunden ist (Braun et al., 1991). Exon 11 codiert für die Transmembrandomäne, deren Struktur der sieben membrandurchspannenden  $\alpha$ -Helices charakteristisch für die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren ist. Diese Helices sind durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Loops miteinander verbunden, wobei der vierte im C-Terminus endende intrazelluläre Loop die G-Protein Interaktion bewerkstelligt (Atger et al., 1995; Huhtaniemi et al., 2000).



**Abb. 1.2: Schematische Darstellung des humanen LHR Gens und des LHR Proteins.** LHR Gen: Offene Balken zeigen Exonabschnitte an, die den untranslatierten Bereich der mRNA codieren. Gefüllte Balken zeigen Protein codierende Sequenzen an. Die Genabschnitte sind nicht im Maßstab gezeichnet. Gestrichelte Linien repräsentieren die Grenzen zwischen Exon/Intron bzw. einzelnen Proteindomänen. Exon 1 codiert das Signalpeptid und einen kleinen Teil der extrazellulären Domäne. Die folgenden 9 Exons codieren den Rest der extrazellulären Domäne. Exon 11 ist das größte und codiert für die Transmembran- und Signaltransduktionsdomäne. LHR Protein: Waagrecht schraffierte Balken stellen das Signalpeptid dar, die kreuzförmig schraffierten Balken stehen für die sieben Segmente der Transmembrandomäne. Zahlen unterhalb des Proteinschemas zeigen Start und Ende des Signalpeptides bzw. Länge des gesamten Protein Produkts inklusive Signal Peptid an. Numerierte Dreiecke markieren Glykosylierungspositionen. (nach: Themmen und Huhtaniemi, 2000).

### 1.7.2 Signaltransduktion

Im Falle einer Bindung des Hormons LH an die extrazelluläre Domäne des LHR erfolgt die Aktivierung des G Proteins (G für Guanylnukleotid). Dieses setzt sich aus drei mit  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bezeichneten Untereinheiten zu einem zunächst inaktiven G-Protein zusammen. Der Hormon-Rezeptor-Komplex bewirkt durch Katalyse des G-Protein gebundenen GDP zu GTP die Freisetzung der  $\alpha$ -Untereinheit ( $G_{\alpha}$ -GTP = stimulatorisches G-Protein), die dann die Adenylatzyklase als Effektorprotein aktiviert. Durch Einwirkung der Adenylatzyklase wird ATP zu cAMP umgesetzt, welches die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A aktiviert und damit die Testosteronbiosynthese aus Cholesterol startet. Ein einziger Hormon Rezeptor Komplex ist in der Lage, viele  $G_{\alpha}$ -GTP Moleküle zu erzeugen, wodurch das Hormonsignal verstärkt wird.

Das in der Hypophyse produzierte LH findet in allen Primaten sein Gegenstück in dem in der Plazenta produzierten Choriongonadotropin (CG). Beide zählen zusammen mit dem follikelstimulierenden Hormon (FSH) und Thyrotropin (TSH) zur Familie der heterodimeren Glycoprotein hormone, bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Obwohl die  $\beta$ -Untereinheiten jeweils die Spezifität jedes der Hormone determinieren, weisen sie eine starke Strukturähnlichkeit auf. Zwischen LH $\beta$  und CG $\beta$  besteht eine Homologie von 85 % in den ersten 114 Aminosäuren (Shome et al., 1973). Das CG stimuliert in der frühen Schwangerschaft die Produktion von Steroiden in der fetalen Nebennierenrinde und hält die Progesteron- und Östrogenproduktion im mütterlichen Organismus aufrecht, bis die Plazenta selbst diese Aufgabe übernimmt.

Aufgrund der enormen Strukturähnlichkeit zwischen CG und LH können beide Hormone an den LHR binden und dadurch die Signaltransduktionskaskade in Leydig Zellen bzw. Granulosazellen starten. In der Literatur findet man daher häufig die Bezeichnung LHCGR für den LHR.

### 1.7.3 LHR Expression

Der LHR wird vorwiegend in den verschiedenen Zelltypen der Androgen abhängigen Gewebe exprimiert. Während man ihn im Ovarium in den Theca- und Granulosazellen des reifen Follikels antrifft, wird er im Hoden ausschließlich in den interstitiellen Leydig Zellen exprimiert.

Außerhalb dieser Gewebe konnte der LHR auch in androgen unabhängigen Geweben nachgewiesen werden. So konnte beispielsweise sein Vorkommen in humaner Plazenta und fetalen Membranen (Reshef et al., 1990), Gehirn (Lei et al., 1993), in der Prostata von Mensch und Ratte (Reiter et al., 1995; Dirnhofner et al., 1998), in der Nebennierenrinde von Ratte und Maus (Kero et al., 2000), im Uterus von Mensch, Schwein und Maus (Reshef et al., 1990, Derecka et al., 1995, Stepien et al., 2000, Zheng et al., 2001) und in menschlichen Spermien (Eblen et al., 2001) nachgewiesen werden. Die Funktion des Rezeptors in diesen Geweben ist noch unklar.

### **1.8 Störungen der endokrinen Regulation**

Bei Funktionsstörungen der Hypothalamus-Hypophysen-Achse kann es zu Auswirkungen auf die Gonadotropinproduktion kommen. So ist beispielsweise bei der X-Chromosomal gekoppelten Form des Kallmann Syndroms (hypogonadotroper Hypogonadismus) eine abnormale Lage der GnRH Neuronen festzustellen, die zu einer Entwicklungsstörung des olfaktorischen Traktes führen (Seminara et al., 1998). Umgekehrt können auch eine Vielzahl von Tumoren, Stoffwechselkrankheiten, Trauma und Stress zu abnormal niedrigen Gonadotropinspiegeln führen, während bei verfrühter Pubertät und primärem Hypogonadismus pathologisch erhöhte Gonadotropinwerte festzustellen sind (Grumbach MM, 1998, Thorne et al., 1998).

Störungen in der Gonadotropinwirkung können zudem durch Gonadotropinresistenz des Hodens bedingt sein, wodurch sich ein hypergonadotroper Hypogonadismus ausprägt. Ursächlich dafür sind anatomische und /oder strukturelle Abnormalitäten, die auf einer gestörten Gonadenentwicklung beruhen (Carr BR et al., 1998). Eine der bekanntesten genetischen Ursache der Gonadotropinresistenz des Hodens ist das Klinefelter Syndrom mit der gonosomalen Zusammensetzung XXY, das mit einer eingeschränkten Virilisation und Spermatogenese einhergeht, ebenso wie die Trisomie 21. Weiterhin können Spermatogenesestörungen erworben werden, z.B. durch Autoimmunerkrankungen, neurologische Erkrankungen, Bestrahlungstherapie, AIDS, Drogen und Umwelttoxinen (Griffin et al., 1998).

## **1.9 LH Rezeptor Mutationen**

Da der LHR für die LH Wirkung essentiell ist, können sich in Abhängigkeit von Art und Umfang der Mutation erhebliche Auswirkungen auf die Testosteronproduktion ergeben und somit die Spermatogenese beeinflussen.

### **1.9.1 Aktivierende Mutationen**

Die aktivierenden LHR Mutationen waren die ersten LHR Mutationen, die entdeckt wurden. 1981 gab es den Fall eines Jungen mit ungeklärter verfrühter Pubertät, die Hypophysen unabhängig war. Diagnostiziert wurde ein beidseitig vergrößertes Hodenvolumen bereits im Alter von 3 – 4 Jahren, sowie erhöhten Testosteronwerten, niedrigen LH und FSH Werten und eine typisch präpubertäre Antwort auf den GnRH Stimulationstest (Schedewie et al., 1981, Rosenthal et al., 1983, Frost, 1985). Es handelte sich um eine familiäre Form der auf das männliche Geschlecht bezogenen verfrühten Pubertät (male-limited precocious puberty = FMPP), die ein autosomal dominantes Vererbungsmuster aufweist (Egli et al., 1985). Dieses Syndrom konnte auf Mutationen im LHR zurückgeführt werden, die den Austausch einzelner Aminosäuren bewirkten (Kremer et al., 1993, Shenker et al., 1993). Diese ersten entdeckten Mutationen wurden im Bereich der sechsten transmembranären Helix entdeckt, die an den dritten intrazellulären Loop anschließt und lassen daher den Schluß zu, daß diese Rezeptor Region in die GProtein Bindung involviert ist.

Mittlerweile sind mehrere aktivierende LHR Mutationen entdeckt worden, die fast alle im Bereich der sechsten Transmembran Helix und dem dritten intrazellulären Loop liegen, so daß dieser Bereich einen Hot Spot für Mutationen aufweist (Übersicht in Huhtaniemi, 2000).

### **1.9.2 Inaktivierende LHR Mutationen**

Das Vorhandensein einer inaktivierenden LHR Mutation kann von einer Leydig Zell Hypoplasie bis hin zu einer vollständigen Leydig Zell Aplasie führen. Unabhängig vom Alter ist dieser Zustand in mehreren Fallbeispielen in präpubertären Jungen, bei jugendlichen Männern und bei erwachsenen Männern beschrieben worden (Brown et al., 1978, Wu et al., 1984, Arnhold et al., 1985). Ebenso wurde 1976 der Fall einer 35 jährigen Frau mit Pseudohermaphroditismus beschrieben. Die Frau wies den Genotyp 46, XY auf und zeigte erhöhte LH Werte, normale FSH Werte und extrem niedriges Testosteron. Durch einen GnRH Stimulationstest konnte erwartungsgemäß eine LH Antwort erzeugt

werden, jedoch blieb die Testosteronproduktion nach Stimulation mit hCG aus. Die Patientin wies weibliche äußere Genitalien auf und hatte zwei abdominale Hoden entwickelt, die mit Nebenhoden und ableitenden Vasa deferentia ausgestattet waren, Müller'sche Gänge waren jedoch nicht nachweisbar. Die mikroskopische Untersuchung des Hodengewebes zeigte das Vorhandensein von Tubuli seminiferi mit normal aussehenden Sertoli Zellen und vereinzelt unreifen Keimzellvorstufen, Leydig Zellen jedoch fehlten (Berthezène et al., 1976).

Da in allen bekannten Fällen der Leydig Zell Hypoplasie eine Antwort auf hCG Stimulation ausbleibt wurde postuliert, daß sich aufgrund einer unzureichenden LHR Expression oder LHR Funktion die Vorstufen der Leydig Zellen nicht entwickeln konnten (Schwartz et al., 1981, David et al., 1984, Martinez-Mora et al., 1991). Es wird unterschieden zwischen der schweren und der leichten Form der Leydig Zell Hypoplasie. Die schwere Form geht mit männlichem Pseudohermaphroditismus und kompletter Blockade der hCG Antwort einher, während bei der leichten Form eingeschränkte hCG Stimulierbarkeit und abhängig davon entsprechende Veränderungen im Phänotyp, z.B. Mikropenis zu beobachten sind (Toledo et al. 1985, Toledo et al., 1992).

Bis heute sind zahlreiche inaktivierende Mutationen des LHR in verschiedenen Spezies entdeckt worden, welche durch Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen von Nukleotiden zu einer Verschiebung des offenen Leserahmens führen können (Mirashi et al., 1997, Stavrou et al., 1998).

Generell können Mutationen posttranskriptional entweder unbemerkt bleiben, wenn z. B. trotz Punktmutation dieselbe Aminosäure kodiert wird („silent Mutation“), oder zur Veränderung der Aminosäuresequenz und damit oftmals zu funktionellen Störungen (aktivierende oder inaktivierende Mutation) führen.

### **1.10 Funktion des Testosterons**

Besteht eine LHR Funktionsstörung, kommt es in den meisten Fällen zu den bereits geschilderten systemischen Auswirkungen auf die Hypothalamus – Hypophysen – Gonaden Achse und zur Ausprägung von Krankheitsbildern wie Pubertas praecox, Pseudohermaphroditismus und Leydig Zell hypoplasie. Da ein funktionell eingeschränkter LHR das LH möglicherweise nicht in der richtigen Konstellation binden kann, bzw. die G-Protein Kopplung fehlerhaft ist, kann die Testosteronsynthese nur unzureichend

stattfinden. Die genaue parakrine Funktion des Testosteron für die Spermatogenese ist in diesen Vorgängen noch nicht vollständig geklärt.

Aus Tierstudien ist jedoch seit langem bekannt, dass Testosteron durch Wirkung auf die intratubulären Sertoli Zellen ein starker endokriner und parakriner Stimulationsfaktor der Spermatogenese ist (Weinbauer und Nieschlag 1996, Schlatt et al., 1997), dessen genaue Wirkungsweise größtenteils an Nagern untersucht wurde. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Immunisierung gegen den LHR in der Ratte einen Rückgang der Spermienanzahl (Graf et al., 1997), und in der Maus sogar männliche Infertilität bewirkt (Remy et al., 1993., 1996).

### **1.11 Untersuchungen zur parakrinen Funktion des Testosterons**

Um die Rolle des Testosterons auf zellulärer Ebene aufklären zu können, existieren verschiedene Methoden der kurz- oder langfristigen Entfernung des intratestikulären Testosterons.

Eine Methode bietet die Immunisierung gegen LH oder Testosteron, bei der spezifisch an das Zielhormon bindende Antikörper verabreicht werden. Studien in Rhesus Affen (*Macaca mulatta*) zeigten nach Immunisierung gegen Testosteron erniedrigte Serum-Testosteron Werte, jedoch keine Veränderung der intratestikulären Testosteronkonzentration, der Hodengröße und der Spermatogenese (Wickings und Nieschlag, 1978). Suresh et al. (1995) erzielten in Pavianen (*Macaca radiata*) durch Immunisierung gegen LH eine Blockade der Spermienproduktion.

Eine weitere Methode, die Testosteronproduktion zu hemmen, ist der Einsatz von GnRH-Antagonisten, z.B. Cetrorelix, welches sowohl die Synthese von LH als auch von FSH in der Hypophyse verhindert. Auf diese Weise kann eine Gonadotropindefizienz erreicht werden, die in Java-Affen (*Macaca fascicularis*) zur Azoospermie führte und durch Testosteronsubstitution aufgehoben werden konnte (Weinbauer und Nieschlag, 1993, Weinbauer et al., 1998; Aslam et al., 1999).

Die Intoxikation und damit das Absterben der Leydig Zellen durch Verabreichung von Ethandimethansulfonat (EDS) hat sich in der Ratte als erfolgreich erwiesen. Es konnten

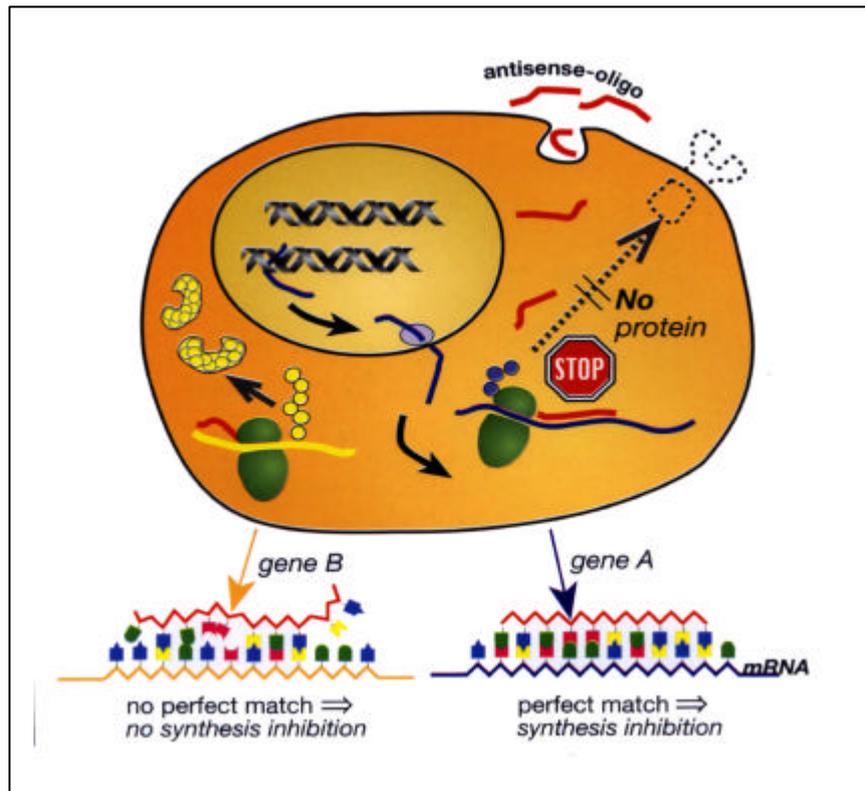
erniedrigte Serum-Testosteronspiegel erreicht werden (Bartlett et al., 1986, Sharpe et al., 1986), was in Java-Affen nicht möglich war (Weinbauer, unveröffentlicht).

Die hier aufgeführten Methoden zur Modulation der Testosteronkonzentration wirken zum Teil ausserhalb der Testosteron produzierenden Leydig Zelle, indem sie entweder LH an seiner Bindung an den LH Rezeptor hindern (Immunisierung) oder unspezifisch die Entstehung von LH und FSH verhindern (GnRH-Antagonisten). Die direkt auf die Leydig Zellen wirkende EDS Behandlung führt wegen der Zerstörung der Leydig Zellen zur Veränderung des intratestikulären Milieus, welches für funktionelle Untersuchungen nicht wünschenswert ist.

Im Gegensatz dazu wirkt die Antisense Oligonukleotid Methode lokal im Zielorgan und zwar mit Hilfe geeigneter Antisense Oligonukleotide (AON), welche die Translation eines Zielproteins blockieren und somit dessen Expression in der Zelle verhindern.

### **1.12 Antisense Oligonukleotid (AON) Technologie**

Prinzip der Antisense Oligonukleotid Technik ist die Hybridisierung eines Antisense Oligonukleotid (AON) Moleküls an die komplementäre Sequenz auf der mRNA, die für das Zielprotein kodiert. Ein AON besteht aus einer kurzen Sequenz von 13-20 Nukleotiden. Im Falle einer exakten Watson-Crick-Basenpaarung zwischen AON und Zielsequenz entsteht ein RNA-DNA-Duplex, so daß sich die ribosomalen Untereinheiten an der Stelle nicht zusammensetzen können und daher die Translation und somit die Expression des Zielproteins in der Zelle verhindert wird (Matsukara et al., 1987). Findet jedoch nur ein Teil der Basen des AONs einen komplementären Bindungspartner auf der mRNA, funktioniert dieser Mechanismus nicht, da der Duplex nicht stabil ist. Theoretisch kann daher jedes beliebige Protein mit bekannter Gensequenz auf diese Weise spezifisch reprimiert werden. Da im Gegensatz zu genetischen „knock-out“ Modellen jedoch das entsprechende Gen nicht eliminiert, sondern nur an der Translation gehindert wird, spricht man hier vom genspezifischen „knock-down“.



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung der AON Wirkung.** Die AON (rot) wandern in die Zelle ein und hybridisieren an mRNA. Das AON kann nur an die mRNA Sequenz binden, die komplementär zur AON Sequenz ist (siehe Gen A, blau). Andere Gene innerhalb der Zelle dürfen nicht die gleiche Sequenz wie die Ziel mRNA aufweisen, damit das genspezifische AON nicht binden kann (siehe Gen B). Der zwischen Gen A und AON gebildete Duplex ist stabil genug, um die Translation des codierten Proteins zu verhindern, während die unvollständige Bindung an Gen B einen instabilen Duplex bildet, der die Proteintranslation nicht beeinflusst (in: Schlingensiepen et al., 1997).

Das Wirkungsprinzip der Antisense Oligonukleotide wurde nicht von Menschen erfunden, sondern kommt ursprünglich in einigen Bakterienarten vor, die Oligonukleotide zur eigenen Genregulation verwenden (Merino et al., 1994).

Erste Versuche, dieses in der Natur etablierte Prinzip zur Translationshemmung *in vitro* einzusetzen unternahmen 1978 Paul Zameznik und Mary Stephenson. Es gelang ihnen, die Replikation des Rous-Sarkoma-Virus in infizierten Hühner-Fibroblasten mit Hilfe eines genspezifischen AONs zu hemmen (Stephenson und Zameznik, 1978). Seitdem fand diese Technik Einzug in viele Gebiete der Biologie und Medizin, wie z.B. der Immunologie, der Onkologie, der Virologie aber auch in die Entwicklung von Arzneimitteln.

Dabei wurde die Methode sowohl *in vivo* als auch *in vitro* angewendet. So konnte beispielsweise die Expression des murinen  $\mu$ -Opioid Rezeptors (DOR) sowohl in einer entsprechenden Zelllinie als auch im Nervengewebe der Maus reduziert und damit die

Antwort auf einen DOR selektiven Agonisten abgeschwächt werden (Lai et al., 1996). In humanen und murinen malignen Mesotheliom Zelllinien wurde ein AON gegen den „Transforming Growth Factor  $\beta$ “ (TGF  $\beta$ ) eingesetzt. TGF  $\beta$  ist an der Wachstumsregulation der Zelle beteiligt. Durch Verwendung eines entsprechenden AON wurde die Zellproliferation in vitro gehemmt und in vivo (Maus) ein Tumorstadium eingedämmt (Marzo et al., 1997). Gleiches konnte für eine Mammacarcinom Zelllinie festgestellt werden, die mit einem AON gegen den Transferrinrezeptor behandelt wurde (Yang et al., 2001). An humanen Monocyten konnte durch ein spezifisches AON die Sekretion des Interleukin 5 gehemmt werden, das mitbeteiligt ist an der Antigen-induzierten allergischen Bronchitis (Weltman et al., 1998). Im Bereich der angioplastischen Operationen konnte in der Ratte gezeigt werden, daß die Anwendung eines AON gegen den Transkriptionsfaktor c-myc bei lokaler Anwendung eine unerwünschte Restenose des Gefäßes verhindert (Di Micco et al., 2002).

Ein AON, welches den Schritt von der Entwicklung zur Anwendung am Patienten bereits vollzogen hat ist das unter dem Handelsnamen „Vitravene“ (ISIS, Carlsbad, California, USA) vertriebene AON. Es hat die mRNA des Cytomegalie Virus (CMV) zum Ziel und wird seit 1999 zur Behandlung von CMV verursachter Retinitis bei AIDS Patienten eingesetzt (Marwick, 1998, Holmlund et al, 1999, Henry et al, 2001, Geary et al., 2002).

Anhand der verschiedenen aufgeführten Anwendungsbeispiele wird ersichtlich, in welchem Ausmaß sie AON Technologie in die verschiedensten Forschungsgebiete Einzug gehalten hat. Jedoch ist das prinzipiell sehr einfache Wirkungsprinzip nicht immer in einem in vitro oder in vivo System realisierbar. Trotz Forschung in diesem Gebiet seit 1978 ist bis jetzt erst ein Medikament auf AON Basis zur klinischen Anwendung und damit auch zur Marktreife gekommen. Ziel laufender Studien ist es daher, die pharmakologischen Eigenschaften der AON zu optimieren.

### **1.12.1 AON Modifikation**

AON Moleküle bestehen aus kurzen Nukleotidsequenzen, so daß sie unabhängig von einer in vitro oder in vivo Anwendung immer dem Angriff von Exo- und Endonukleasen ausgesetzt sind. Die Halbwertszeit und damit die potentielle Wirkungszeit solcher AON ist somit sehr kurz und liegt beispielsweise in purem fetalem Kälberserum (FCS) bei nur fünf Minuten (Shaw et al., 1991).

Um die AON zu stabilisieren wurde daher das Phosphodiesterückgrat der Moleküle modifiziert. Bei der Phosphothioat Modifikation wird dabei ein nicht brückenbindendes Sauerstoffatom durch ein Schwefelatom ersetzt, wodurch sich die Halbwertszeit in FCS auf 18 Stunden und in herkömmlichem Zellkulturmedium mit 10 % FCS Zusatz sogar auf über eine Woche erhöht (Shaw et al., 1991). Modifiziert man nicht alle im AON vorhandenen Phosphodiester, sondern beispielsweise nur die ersten Nukleotide des 5'- bzw. 3'-Endes (end-capped), so wird mit jedem verbleibende Phosphodiester die Halbwertszeit erheblich herabgesetzt (Hoke et al., 1991).

Eine andere Modifikation bietet die Substitution mit einer neutralen Methylgruppe (CH<sub>3</sub>) (Miller et al., 1981). Die Methylphosphonat Oligonukleotide weisen in üblichen Zellkulturmedien eine Halbwertszeit von 10 Stunden auf (Tidd et al., 1989). Aufgrund ihres neutralen Ladungszustandes sind sie schlechter in Wasser löslich als die negativ geladenen Phosphothioat Oligonukleotide. Weiterhin trägt die große Methylgruppe zu sterischen Behinderungen bei der AON/mRNA Duplexbildung bei. Um die gleiche Wirksamkeit wie Phosphothioat Oligonukleotide zu erzielen, muß die Konzentration der Methylphosphonate daher auf das 20- bis 100 fache erhöht werden (Agris et al., 1986, Maher und Dolnick, 1988).

### **1.12.2 Zelluläre Aufnahme von AON**

Je nach Modifikation des AON existieren unterschiedliche Aufnahmemechanismen. Entscheidend ist zunächst der Ladungszustand des AON, der entweder negativ geladen (unmodifizierte oder phosphothioierte AON) oder neutral (methylphosphoniertes AON) sein kann.

Unmodifizierte und phosphothioierte AON sind polyanionische, hydrophile Makromoleküle mit einem Molekulargewicht von 3000 –10 000 Da. Sie können nicht passiv durch die Zellmembran diffundieren. Die Aufnahme in die Zielzelle geschieht vermutlich durch ein 80 kDa Rezeptorprotein, das polyanionische Moleküle wie AON, Polysulfate oder Dextransulfate transportiert (Yakubov et al., 1989). Der Transportvorgang wird nicht nur als zeitabhängig und temperaturabhängig beschrieben, sondern ist auch abhängig von der Länge des AON (Crooke 1991, Iversen et al., 1992).

Im Gegensatz zu den negativ geladenen AON gelangen neutrale Methyl modifizierte AON unabhängig von ihrer Länge durch passive Diffusion oder Pinocytose in die Zielzelle (Miller et al., 1981).

Da die zelluläre Aufnahme Voraussetzung für eine AON Wirkung ist, wurden verschiedene Versuche unternommen, diesen Vorgang mit Hilfe von lipophilen oder polykationischen Molekülen zu optimieren.

Ein solches als „Enhancer“ wirkendes Molekül ist das polykationische poly-L-Lysin (PLL), das die negative Ladung des AON neutralisiert. Auf unmodifizierte AON wirkt es zudem protektiv gegen Abbau durch Nukleasen, so daß eine verbesserte AON Wirkung eintritt (Crooke et al., 1991). Nachteil des PLL ist seine bekannte Zytotoxizität, die sich durch eingeschränktes Zellwachstum äußert, falls PLL in zu hohen Konzentrationen zugesetzt wird (Uhlmann und Peymann, 1990).

Das gebräuchlichere Enhancer Molekül ist ein Cholesterolderivat und wird unter dem Handelsnamen Oligofectamine (Invitrogen; Karlsruhe) vertrieben. In Kombination mit AON Molekülen formiert das Oligofectamine (OFA) Micellen, die das AON umhüllen (Fields and Lancaster, 1993). Diese fusionieren dann mit der Membran der Zielzelle und entlassen das AON in die Zelle (Bennett et al., 1992, Kanamaru et al., 1998, Fillion et al., 2001, Buck et al., 2002). Auch das Oligofectamin kann in zu hohen Konzentrationen toxisch wirken (Saxon et al., 1992), daher ist für jedes Experiment ein Kompromiß zwischen optimaler AON Aufnahme und niedriger Zytotoxizität abzuwägen.

### **1.13 Einsatz der AON Technologie gegen LHR mRNA**

Die parakrine Rolle des Testosteron für die Spermatogenese des Primaten ist in weiten Teilen noch unbekannt. Durch Eliminierung des Testosterons, eine sogenannte „loss of function“ Studie, können Veränderungen beobachtet und daher auf die Funktion des Testosterons geschlossen werden. Die bisher geschilderten Methoden zur Testosteron Eliminierung wirken entweder indirekt über Hemmung der LH Bindung (Immunisierung) oder unspezifisch auf beide Gonadotropine (GnRH-Antagonisten) bzw. zerstören das physiologische Hodenmilieu (EDS). Die Anwendung von AON gegen die LHR mRNA dagegen sorgt für eine spezifische Testosteron reduzierende Wirkung ausschließlich in den Leydig Zellen. Um die AON Methode für den genspezifischen „knock-down“ des LHR zu etablieren, sind zunächst in vitro Studien notwendig, denen dann in vivo Studien folgen können.

### 1.13.1 Zellkulturmodell

Zur Testung von LHR spezifischen AON Molekülen mußte ein geeignetes in vitro System gewählt werden. Eine von Herrn Prof. T. Gudermann, Marburg, freundlicherweise zur Verfügung gestellte Zelllinie von Chinese Hamster Ovarian (CHO) Zellen, die mit dem humanen LHR (hLHR) stabil transfiziert ist, diente als Zellkulturmodell. Sind diese Zellen doch wesentlich kostengünstiger und anspruchsloser in der Aufrechterhaltung als Leydig Zellkulturen.

Unter AON Behandlung sollte nun das gegen die LHR mRNA gerichtete AON die Translation und damit Expression des LHR auf der Zelle verhindern. Um diese Wirkungsweise zu überprüfen mußten die Zellen mit LH oder hCG stimuliert werden, um durch die Hormon Rezeptor Bindung die Signaltransduktionskaskade zu starten. Da der hLHR CHO Zelle die biochemische Ausstattung zur Testosteronproduktion fehlt, konnte Testosteron nicht als Nachweisparameter gelten, sondern cAMP, welches in der Zelle nach G-Protein Aktivierung durch den Hormon Rezeptor Komplex und anschließender Aktivierung der Adenylatzyklase produziert wird. Der Nachweis von cAMP gilt für Hormon Rezeptor Studien als etabliertes Detektionsparameter (Zhang et al., 1997, Kuhn und Gudermann 1999, Stepien und Ziecik, 2002). Im Falle einer effektiven AON Wirkung sollte demnach der cAMP Spiegel sinken, da weniger LHR Proteine exprimiert werden.

Ein weiteres in vitro System zur Testung von LHR spezifischen AON an Leydig Zellen bietet die Primärzellkultur von testikulären Zellen. Dazu standen uns Affen- und Maushoden zur Verfügung, die enzymatisch verdaut wurden, so daß eine Einzelzellsuspension entstand, die dann kultiviert wurde. In einer solchen Zellkultur haben die Leydig Zellen etwa einen Anteil von 5%. Daher konnte in diesem Fall Testosteron als Nachweisparameter herangezogen werden. Aufgrund des niedrigen Anteils an Leydig Zellen tritt allerdings durch das Zellkulturmedium ein sehr starker Verdünnungseffekt des produzierten Testosterons ein, was daher oftmals unterhalb der Nachweisgrenze lag und somit nicht immer verlässlich bestimmt werden konnte. Ein weiterer Nachteil der Primärzellkultur ist die Gefahr der Kontamination, da bei der Organentnahme keine sterilen Bedingungen vorherrschen.

### **1.13.2 Organkulturmodell**

Einen Schritt näher an der in vivo Situation befindet sich das System der Hoden Organkultur. Dafür werden kleinste Hodenfragmente (Affe oder Maus) präpariert und kultiviert (Steinberger und Steinberger 1971, Zhou und Hutson, 1995, Gregoraszcuk et al., 1997). Trotz Präparation bleibt der größte Teil der die Keimzellkanälchen in jedem Fragment intakt. Die Testung von AON kann daher in einem Gewebeverband durchgeführt werden, in dem die Leydig Zellen in ihrem physiologischen Milieu vorliegen, jedoch nicht so große AON Mengen wie in einem Tierexperiment benötigt werden. Auch hier dient nach LH oder hCG Stimulation produziertes Testosteron als Nachweisparameter der AON Wirkung.

### **1.13.3 Tiermodell**

Zur Testung LHR spezifischer AON im Tiermodell dienten adulte männliche Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*). Diese zu den Neuwelt Affen zählenden Primaten werden im Alter von 50 bis 60 Wochen geschlechtsreif und haben als Adultus ein Körpergewicht von etwa 400 g. Dadurch ergibt sich ein im Vergleich zu anderen nicht-humanen Primaten ein niedrigerer Reagenzienverbrauch. Die Überprüfung des Testosteronspiegels nach AON Behandlung erfolgte durch Testosteronbestimmung im Serum.

### 1.14 Zielsetzung

Dem LHR kommt eine essentielle Rolle in der Initiierung und Aufrechterhaltung der Spermatogenese im Primaten zu. Fehlfunktionen des humanen LHR beeinflussen daher die reproduktive Gesundheit des Mannes erheblich und können bis zur Infertilität führen. Im Bemühen um neue Therapiekonzepte müssen daher die Reaktionsmechanismen der LH/hhCG Bindung an den LHR und die Signaltransduktionskaskade zur Biosynthese von Testosteron weiter aufgeklärt werden. Die Klonierung und Charakterisierung des LHR des Java Affen (*Macaca fascicularis*) trägt daher zu Strukturvergleichen von LH Rezeptoren verschiedener Spezies bei. Der LHR des nicht humanen Primaten *Macaca fascicularis* bietet zudem ein ideales Modell für Spezies vergleichende Hormon Rezeptor Studien.

Ein weiterer Fokus unserer Untersuchungen ist die parakrine Rolle des Testosterons in der Spermatogenese des Primaten, die noch nicht vollständig verstanden ist. Mit Hilfe der AON Technologie soll ein lokal begrenzter genspezifischer „knock-down“ der LHR Expression, sowohl in vitro als auch in vivo vorgenommen und die eintretenden Veränderungen im Hinblick auf die Funktion von Testosteron genauer studiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 Gesamt-RNA-Isolierung aus Gewebe

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben wurde mit einer Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Lösung (Ultraspec<sup>TM</sup>, Biotecx Laboratories Inc., Houston, Texas, USA) nach dem Prinzip der sauren Guanidiniumthiocyanat-Phenol/Chloroform-Methode (modifiziert nach Chromczynski und Sacchi, 1987) durchgeführt. Die Zellen oder das Gewebe wurden dabei durch Tenside und Guanidiniumthiocyanat denaturiert und die RNA mittels einer Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert. Da die chaotrope Substanz Guanidiniumthiocyanat auch RNasen reversibel denaturiert, wirkte sie während der RNA Extraktion zusätzlich als RNase-Inhibitor.

Im folgenden sind die einzelnen Arbeitsschritte für die Isolation von Gesamt-RNA aus Geweben beschrieben:

1. Jeweils bis zu 100 mg des bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorenen Gewebes wurden zunächst mit einem sterilen Skalpell auf Trockeneis zerkleinert und dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit vorgelegten 100  $\mu\text{l}$  Ultraspec<sup>TM</sup> überführt. Für eine möglichst effiziente Aufschließung des Gewebes wurde dieses anschließend im Reaktionsgefäß homogenisiert.
2. Nach Zugabe von weiteren 900  $\mu\text{l}$  Ultraspec<sup>TM</sup> wurde die Suspension kurz gevortext und zur vollständigen Dissoziation der Nukleo-Protein-Komplexe 5 min auf Eis inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde daraufhin mit Chloroform extrahiert. Dazu wurde die Suspension mit 200  $\mu\text{l}$  Chloroform versetzt, 15 s kräftig gevortext, erneut 5 min auf Eis inkubiert und anschließend die RNA-haltige wässrige Phase durch Zentrifugation (15 min bei 13000 x g und  $4^{\circ}\text{C}$ ) abgetrennt.
3. Zur Präzipitation wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumen Isopropanol vermischt. Die Fällung der Gesamt-RNA erfolgte über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Das Präzipitat wurde am darauffolgenden Tag abzentrifugiert (15 min bei 13000 x g und  $4^{\circ}\text{C}$ ), durch Waschen mit 75%igem Ethanol (in DEPC-Wasser) entsalzt, an der Luft getrocknet und in 30-50  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser aufgenommen.

Die Messung der RNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt.

### 2.1.1.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Quantifizierung der RNA erfolgte mit Hilfe eines Photometers. Ein Aliquot der zu messenden RNA wurde mit DEPC-H<sub>2</sub>O 1:100 verdünnt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Da eine OD-Einheit einer RNA Konzentration von 40 µg/ml entspricht, konnte die RNA Konzentration über folgende Formel bestimmt werden:

$$[\text{RNA}] \mu\text{g/ml} = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40$$

### 2.1.2 cDNA Synthese durch Reverse Transkription von RNA

Zur Herstellung von cDNA aus RNA wurde die Reverse Transkriptase des „Moloney murine leukemia virus“ Stammes (MMLV-RTase) eingesetzt, die ausgehend von einem reversen genspezifischen Primer die cDNA synthetisiert.

Dazu wurden 1 µg RNA in entsprechendem Volumen DEPC-Wasser, 4 µl MMLV-Puffer (5x), 2 µl dNTP-Lösung (1 mM) und 1 µl Reverser genspezifischer Primer (10 ng/µl) mit DEPC- Wasser ad 20 µl aufgefüllt und für 5 min bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlung auf 37 °C wurden die hitzeempfindlichen Komponenten 0,5 µl rRNasin<sup>TM</sup> (40 IU/µl), (Promega) und 0,5 µl MMLV-RTase (Promega) zugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde dann eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Zum Beenden der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch kurz auf 95 °C erhitzt und bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert. Das Material stand dann zur RT PCR zur Verfügung.

### 2.1.3 Reverse Transkriptions Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Als Ausgangsprodukt für die PCR diente die durch Reverse Transkription gewonnene cDNA. Entsprechend der Klonierungsstrategie zur Klonierung des *Macaca fascicularis* LHR wurden genspezifische Primerpaare eingesetzt, um die gewünschten Genabschnitte aus der cDNA zu amplifizieren.

Die PCR wurde in einem programmierbaren PCR Gerät durchgeführt. In Abhängigkeit von der Annealingtemperatur der eingesetzten Primer (56-62 °C) wurde folgendes PCR Programm verwendet:

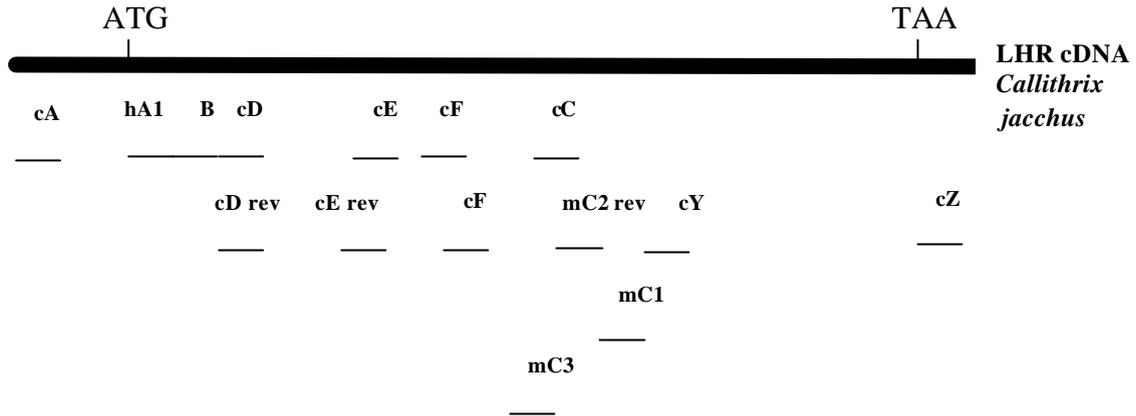
Schritt 1:	initiale Denaturierung	94 °C	2 min	1 Zyklus
Schritt 2:	Denaturierung	94 °C	40 sec	} 35 Zyklen
	Primer Annealing	56-62 °C	40 sec	
	Extension	72 °C	2 min	
Schritt 3:	Finales Annealing	72 °C	2 min	} 1 Zyklus
	Abkühlen	4 °C	10 min	

Der PCR Mastermix bestand aus folgenden Komponenten:

Thermo Puffer (10x) (Promega)	5,0 µl
Magnesiumchlorid (25 mM) (Promega)	3,0 µl
dNTPs (1mM) (Amersham Pharmacia)	2,0 µl
Primer vorwärts (100 ng/µl) (MWG Biotech)	1,0 µl
Primer revers (100 ng/µl) (MWG Biotech)	1,0 µl
Template cDNA	variabel
Taq DNA-Polymerase (5 IU/µl) (Promega)	0,5 µl
Aqua bidest	ad 50,0 µl

Für die Amplifikation der von den Primern hA1 und cDrev flankierten Bereiche wurde dem Mastermix „Q-Solution“ (Quiagen, Hilden) nach Dosierungsangaben des Herstellers zugefügt, da es sich hier um besonders GC-reiche Sequenzen handelt.

Die Primer wurden größtenteils komplementär zu der LHR cDNA des Weißbüschelaffen (Cj) erstellt, aber auch komplementär zur humanen (Hs) LHR cDNA bzw. Java Affen (Mf) LHR cDNA. Die Auswahl letzterer konnte natürlich erst erfolgen, nachdem bereits eine LHR bekannt war.



**Abb. 2.1: Klonierungsstrategie** und schematische Position der gewählten Primer in Anlehnung an die LHR cDNA von *Callithrix jacchus* (c), *Macaca fascicularis* (m) bzw. *Homo sapiens* (h) (kleine Buchstaben kennzeichnen die Komplementarität zur LHR cDNA der entsprechenden Spezies). Pfeil: nach rechts: Vorwärts Primer, nach links: Reverser Primer

Verwendete Primer:

Bezeichnung	Sequenz	enthalten in LHR cDNA von
A	5'-CAG ATG GTA GGG GAC AAC A-3'	Cj
hA1	5'-ATG AAG CAG CGG TTC TCG GCG -3'	Hs
B	5'-CTG CCC TGA GCC CTG CAA CTG-3'	Cj
C	5'-GAA CCA GAT GCT TTT AAT CCC T-3'	Cj
C1	5'-GGC ACT GTA AGT TTG TAA CGA C-3'	Mf
C2	5'-GGA CAG TCA TGT TTC CC-3'	Mf
C3	5'-AGG GAT TAA AAG CAT CTG GTT C-3'	Mf
D	5'-GCT TTC AGA GGA CTT AAT GAG G-3'	Cj
D reverse	5'-CTT CTA TCC TTT CCA GGG AAT C-3'	Cj
E	5'-CCA GGA AAT GCT TTT CAA GGG-3'	Cj
E reverse	5'-CCA TTG AAC GCA TGA CTT TGT AC-3'	Cj
F	5'-CTT CCA CCA AAT TGC AGG CC-3'	Cj
F reverse	5'-CTA AAA GCA CAG CAG TGG CTG-3'	Cj
Y	5'-AGC CCC ATG CAA AAG TCT GCA AAG GA-3'	Cj
Z	5'-ACA GGT TTA AGA AGA ATT CAA TAA TGC AG-3'	Cj

## 2.1.4 Elektrophoresetechniken

### 2.1.4.1 Agarose Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA bzw. PCR Fragmenten erfolgte elektrophoretisch entsprechend ihrer Größe in einem Agarose-Gel. Dabei verwendet man für große DNA-Fragmente (> 1 kb) niedrig prozentige Agarose-Gele (0,5 % - 1 %), während zur besseren Auftrennung kleiner DNA-Fragmente (< 1 kb) höher prozentige Agarose Gele (1 % - 4 %) verwendet werden. Die DNA Fragmente wandern im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode, ihre Wanderungsgeschwindigkeit und damit ihre Auftrennung in unterschiedlich große DNA Fragmente hängt neben ihrer Länge und Konformation auch von der Zusammensetzung des Gelpuffers und seines pH Wertes ab. Auch die angelegte elektrische Spannung spielt eine Rolle. Für DNA Fragmente von bis zu 50 kb Länge gilt, daß der Logarithmus ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld proportional zur Agarosekonzentration im Gel ist.

Zur Herstellung von Agarosegelen wurden in dieser Arbeit 1-3 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst, zur späteren UV Detektion der DNA bei 302 nm mit 5 µl einer 1 % Ethidiumbromidlösung versetzt und in eine Horizontal-Elektrophoresekammer gegossen. Nach Erkalten des Gels wurden die mit 1/10 Volumen Beladungspuffer versetzten DNA-Proben und ein Längenmarker aufgetragen und bei 50-100 V für 0,5-2 h in TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele konnten zur Auswertung mittels einer Kamera direkt auf dem UV-Tisch fotografisch dokumentiert werden.

### 2.1.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde in dieser Arbeit im Rahmen von Sequenzierungen (2.1.6) verwendet. Für die Auftrennung der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente wurde ein Polyacrylamidgel in eine vertikale Gelapparatur gegossen. Für eine Größenauftrennung der DNA Fragmente unabhängig von ihrer Sequenz wurde sein denaturierendes Polyacrylamidgel verwendet. Die Elektrophorese wurde über Nacht bei 1500 V auf einem automatischen Sequenziergerät der Firma LiCor durchgeführt (DNA-Analyser Gene ReadIR 4.200). Detektion und Aufnahme der Daten erfolgte automatisch mit dem Programm „Data Collection“ (LiCor).

### 2.1.5 Klonierung

Die isolierten und gereinigten cDNA-Fragmente wurden zur späteren Amplifikation in *E. coli* Zellen in den Vektor pGem-T Easy (Promega) kloniert. Der pGem-T Easy Vektor ist durch seine T7 und SP6 Promotorsequenzen für die direkte Sequenzierung des Inserts geeignet. Neben multiplen Restriktionsschnittstellen (u. a. für Eco RI) weist der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen auf und macht so die Selektion von transformierten Bakterienkolonien auf Ampicillin haltigem Nähragar möglich. Darüber hinaus enthält der Vektor in der Klonierungsregion ein lacZ-Gen, das durch die Ligation mit dem Insert gespalten wird und so die Kontrolle der Ligation mittels Blau/Weiss-Screening ermöglicht

#### 2.1.5.1 Ligation

Der pGem-T Easy Vektor ist besonders für die Ligation von PCR-Produkten geeignet, da sich bei der Ligation 3'-Thymidin Überhänge in seiner Klonierungsregion mit 3'-Adenosin-Überhängen von Taq-DNA Polymerase-Produkten verbinden.

Zur Ligation der jeweiligen PCR-Produkte in den pGem-T Easy Vektor wurden folgende Komponenten gemischt und bei 4°C über Nacht inkubiert:

2 x Rapid Ligation Buffer	5 µl
pGem- T Easy Vektor	1 µl
PCR-Produkt	1-1 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
Aqua dest.	ad 10 µl

#### 2.1.5.2 Herstellung kompetenter Zellen

*E. coli* Zellen vom Stamm XL 1blue (Stratagene) wurden vor der Transformation mit den entsprechenden Plasmiden mit Hilfe der Calciuchlorid-Methode kompetent gemacht. Diese Vorbehandlung macht die spätere endozytotische Aufnahme der in Lösung befindlichen Plasmide durch die Bakterienzellen möglich. Dazu wurden 40 ml LB-Medium ohne Antibiotikum mit 400 µl einer frischen *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter schütteln bis zu einer OD von ca. 0,5 angezüchtet. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterienzellen abzentrifugiert (10 min, 300 Upm, 4°C), das Pellet in 10

ml kalter 100 mM Calciumchloridlösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem zentrifugieren (10 min, 3000 upm, 4°C) wurde das Pellet in 4 ml 100 mM Calciumchloridlösung mit 15 % Glycerol aufgenommen und in 300 µl Aliquots bis zum späteren Gebrauch bei –80°C gelagert.

### **2.1.5.3 Transformation**

Zur Transformation der kompetenten E.coli Zellen wurden 100 µl eines Aliquots mit einem 10 µl Ligationsansatz gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Während dieser Inkubation lagern sich die jeweiligen Plasmide an die Bakterienwände an. Im nachfolgenden kurzen Hitzeschritt, 42 °C für 1 min, nehmen die Bakterien die Plasmide durch Endozytose auf. Die Transformation wurde durch eine weitere zweiminütige Inkubation der Zellsuspension auf Eis abgeschlossen.

Aufgrund der durch das Plasmid vermittelten Ampicillin Resistenz konnten die transformierten Bakterien auf einem Ampicillin haltigen Nährboden selektiert werden. Dazu wurden die transformierten Bakterien zunächst in 900 µl LB-Medium ohne Antibiotikum eine Stunde lang bei 37°C unter schütteln angezchtet. Von diesem Ansatz wurden 200 µl auf Ampicillin haltigen (50µg/ml) Agarplatten mit IPTG-/X-Gal-Beschichtung ausgestrichen und über Nacht kultiviert. Mittels Blau-Weiss-Screenings wurden jeweils 6 inserttragende Klone selektiert und separat in 3 ml Ampicillin haltigem (50 µg/ml) LB-Medium bei 37 °C über Nacht angezchtet.

### **2.1.5.4 Mini-Plasmidisolierung**

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde nach dem Verfahren der alkalischen Lyse durchgeführt. Zunächst wurden 5 ml Ampicillin haltigen Nähmediums mit 10 µl eines überprüften positiven Klons angeimpft und über Nacht bei 37°C unter schütteln angezchtet. Die Bakteriensuspension wurde auf 1,5 ml Eppendorfgefässe verteilt und die Bakterien abzentrifugiert (13000 Upm, 1 min, 4°C). Die Pellets wurden durch Vortexen in 300 µl RNase-haltigem P1 Puffer (Quiagen) resuspendiert. Anschliessend wurden die Bakterien unter alkalischen Bedingungen mit 300 µl P2-Puffer (Quiagen) lysiert und die freigesetzte DNA sowie Proteine 5 min lang unter vorsichtigen Schwenken denaturiert. Durch den Zusatz von 300 µl P3-Puffer (Quiagen) wurde das Zelllysate neutralisiert und gleichzeitig Proteine, chromosomale DNA und Zelltrümmer durch die hohe

Salzkonzentration des P3-Puffers als unlösliche Komplexe präzipitiert. Die Plasmid-DNA bleibt unter diesen Bedingungen in Lösung und renaturiert unter normalen Bedingungen wieder. Die unlöslichen Bestandteile wurden zweimal abzentrifugiert (13000 Upm, 10 min, 4°C), und der klare Überstand wurde jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 500 µl kaltem Isopropanol bei -20°C für 30 min gefällt und abzentrifugiert (13000 Upm, 15 min, 4°C). Das Pellet wurde durch Waschen mit 70 % Ethanol entsalzt, bei 37 °C kurz getrocknet und in 21 µl Aqua bidest. aufgenommen.

Zur Abschätzung der Plasmidkonzentration wurde 1 µl der Plasmid-DNA mit 2 µl Probenpuffer und 7 µl Aqua bidest. versetzt auf ein Agarosegel aufgetragen und eine Elektrophorese durchgeführt. Die Konzentrationsabschätzung erfolgte gegen einen mitgeführten Längenstandard (Hae III oder HindIII) mit definierter Konzentration.

#### **2.1.5.5 Restriktionsverdau**

Zur Größenkontrolle des Inserts wurde die isolierte Plasmid-DNA mit dem entsprechenden Restriktionsenzym (New England Biolabs) verdaut. Dazu wurden 20 µl der jeweiligen Plasmid-DNA zusammen mit 5 µl Enzympuffer und 1-2µl Restriktionsenzym 90 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Restriktionsverdau in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, um die Größe des Inserts zu überprüfen und damit nochmals die Richtigkeit des Klon abzusichern.

#### **2.1.6 Sequenzierung**

Nach der Klonierung der RT PCR Produkte und Selektion der positiven Klone konnte ihre Nukleotidsequenz schließlich mit Hilfe der Sequenzierung nach Sanger ermittelt werden.

Die Sequenzierung wurde nicht radioaktiv mit dem Kettenabbruch- oder Didesoxyverfahren nach Sanger (Sanger et al., 1977) auf einem automatischen Sequenziergerät der Firma LiCor durchgeführt (DNA-Analyzer Gene ReadIR 4.200).

Das Didesoxyverfahren nach Sanger beruht auf der Synthese einer Population von basenspezifisch terminierten DNA-Fragmenten an der zu sequenzierenden Matrize, die ihrer Größe nach elektrophoretisch in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt werden.

Die Sequenzierungsreaktion wurde in vier parallelen , mit A, C, G und T bezeichneten Ansätzen durchgeführt. Jeder dieser Ansätze enthielt neben den natürlich vorkommenden 2'-Desoxynukleotiden jeweils einen Typ synthetischer 2', 3'-Didesoxynukleotide, die als sogenannte Terminatoren den Kettenabbruch während der Sequenzierungsreaktion herbeiführen. Für eine Sequenzierung wurden ca. 1 µg Plasmid-DNA mit 1 µl IRD 800 fluoreszenzmarkierten T7- bzw. SP6- Primer (MWG Biotech) und 0,7 µl DMSO gemischt und mit Aqua bidest auf 22 µl Endvolumen aufgefüllt. Je 4,5 µl dieses Gemisches wurden daraufhin zu je 1,5 µl der beschriebenen Nukleotidlösungen gegeben, die neben dem jeweiligen Nukleotidgemisch auch die T7-DNA-Polymerase, Magnesiumchlorid und eine thermostabile Phosphatase in einem Tris-HCl-Puffer (pH 9,5) enthalten. Die Sequenzierungsreaktion wurde in einer Mikrotiterplatte angesetzt und in einem PCR-Block nach zweiminütiger Inkubation bei 95 °C mit dem folgenden „Cycle Sequencing“-Programm über 27 Zyklen durchgeführt:

- 1) 15 sec 95 °C
- 2) 15 sec 58 °C
- 3) 15 sec 72 °C

Nach Beendigung des Programmes wurden die vier Reaktionsansätze mit je 5 µl eines gefärbten Probenpuffers versetzt. Je 1,5 µl der vier Teilreaktionen wurde auf einem 6 % denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetragen und über Nacht elektrophoretisch aufgetrennt (2.1.4.2). Das Erfassen der Daten und die automatische Sequenzierung erfolgte mit den Programmen „Data Collection“ und „Image Analysis“ (LiCor).

Für die Sequenzierung der Plasmid DNA wurden die folgenden, am 5'-Ende IRD 800 markierten Primer verwendet:

<b>IRD 800 Primer</b>	<b>Sequenz</b>
T7 forward	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
SP 6 reverse	5'-ATT TAG CTG ACA CTA TAG AAT AC-3'

## 2.2 In situ Hybridisierung

Mit Hilfe der in situ Hybridisierung lassen sich definierte mRNA Transkripte oder DNA Sequenzen in unterschiedlichen Geweben, Zellen oder Zellkompartimenten lokalisieren. Im Rahmen dieser Arbeit diente die in situ Hybridisierung zur Detektion von LHR mRNA in den Leydig Zellen des Hodengewebes des Java Affen *Macaca fascicularis*.

Dazu wurde Java Affen Hoden in Bouin's Fixierungslösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Aus dem eingebetteten Gewebe wurden dann 5µm dicke Schnitte hergestellt und auf einen Objektträger (Super Frost Plus, Langenbrinck) aufgebracht. Nach dem Entparaffinieren und Rehydrieren wurden das Gewebe zunächst vorbereitet, um eine optimale Hybridisierung zu gewährleisten. Die Prähybridisierung erfolgte für zwei Stunden bei 37°C mit 50 µl (pro Schnitt) Hybridisierungspuffer (50 % Formamid, 2x SSC, 1x Denhardt's Lösung, 250 µg/ml yeast tRNA und 125 µg/ml Heringssperma-DNA) und wurde in einer feuchten Kammer durchgeführt. Für die in situ Hybridisierung wurden 40 µl Hybridisierungspuffer mit 10 % Dextransulfat und 70-100 ng DIG-markierter „sense“- oder „antisense“-cDNA Sonde versetzt und 18 h bei 37 °C inkubiert. Die verwendete cDNA Sonde war komplementär zu der Sequenz zwischen Exon 9 und 11 des humanen LHR. Die Sonden wurden mit Hilfe der in vitro Transkription hergestellt. Dabei wurde die SP6- bzw. T7 RNA Polymerase und die Komponenten des DIG-RNA labeling Kit (Roche) eingesetzt. Nach abgeschlossener Inkubation wurden die Schnitte bei 37 °C in 2x SSC für 2x 15 min, in 1 x SSC für 2 x 15 min, in Puffer versetzt mit 20 µg/ml RNase A für 30 min und in 0,1x SSC für 2x 30 min. Durch Inkubation mit Anti-DIG-Alkalische Phosphatase (AP) Antikörper und nachfolgender Färbung mit NBT/BCIP (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride/5-Bromo-4-Chloro-Indolyl-Phosphat) Substratlösung (Boehringer) wurden Hybridisierungssignale detektiert. Die Gewebeschnitte wurden dann mit Haematoxylin gegengefärbt und anschließend eingedeckelt. Die so fixierten in situ hybridisierten Schnitte konnten dann lichtmikroskopisch beurteilt werden. Die fotografische Dokumentation Aufnahmen wurde mit der CCD AxioCam (Carl Zeiss Jena GmbH, Köln) vorgenommen.

### **2.2.1 Herstellung einer cRNA Sonde für die in situ Hybridisierung**

Zur Herstellung einer cRNA Sonde für die in situ Hybridisierung wurde eine in vitro Transkription durchgeführt. Als Template diente der Abschnitt Exon 9 –11 der humanen LHR cDNA, in den Vektor pGem kloniert.

Zunächst wurden 10 µg Plasmid DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen am 5'- und am 3'-Ende linearisiert. So konnte eine Transkription in gegenläufige Richtungen stattfinden, um ein „sense“-Transkript (als negative Kontrolle) in der einen, ein „antisense“ – Transkript in der anderen Richtung zu produzieren. Der Restriktionsansatz wurde in einem 1 % Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt, das Insert aus dem Gel ausgeschnitten und

mit Hilfe des „High Pure PCR Purification Kit“ (Roche) aufgereinigt. Die DNA wurde mit 70 µl DEPC H<sub>2</sub>O pH 8,5 eluiert, um eine Plamidkonzentration von 100-150 µg/µl zu erhalten. Bei niedrigeren Ausbeuten wurde eine Ammonium Acetat Fällung durchgeführt. Die in vitro Transkription erfolgte mit Hilfe der RNA Polymerase (T7, T3 oder SP6) in einer 20 µl Reaktion: 1-1,5 µg linearisiertes Plasmid wurde bis zu einem Volumen von 9,75 µl mit DEPC H<sub>2</sub>O aufgefüllt und für 10 min bei 65°C, dann 1 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe von 4 µl Transkriptionspuffer (5x), 2 µl 10x „Digoxigenin (DIG) labeling-Mix“ (10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6,5 mM TTP, 3,5 mM DIG-11-UTP, pH 7,5), (Roche), 2 µl 100 mM Dithiothreitol (DTT), 0,75 µl RNasin (40 U/µl) (Promega). Dann wurde kurz zentrifugiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Zur Entfernung der DNA wurden 5 µl DNase I zugesetzt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Der Stop der Reaktion erfolgte durch Zusatz von 2µl 0,2 M EDTA pH 8. Dann wurden 73 µl DEPC H<sub>2</sub>O zugegeben und die erhaltene Sonde mit Hilfe des „High Pure PCR Purification Kit“ aufgereinigt. Nach Zusatz von 1 µl RNasin wurden Aliquots erstellt und bei -80°C gelagert.

## **2.3 Zellkulturarbeiten**

### **2.3.1 Zellkultur von hLHR CHO Zellen**

Bei der verwendeten Zelllinie handelt es sich um Chinese Hamster Ovarian (CHO) Zellen, die den humanen LH Rezeptor permanent exprimieren. Sie wurden als Monolayerkulturen in Zellkulturschalen (Nunc) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Kulturmedium diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Life Technologies) mit Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FCS) (PAA Laboratories) und 400 µg/ml Geneticin (G 418) (Life Technologies). Die Zellen wurden bis zu 100 % Konfluenz in 10 cm Zellkulturschalen kultiviert. Dann erfolgte das Passagieren der Zellen in neue Kulturschalen. Dazu wurden 5 ml einer Trypsinlösung (Life Technologies) für drei Minuten auf den Zellrasen gegeben, wodurch der adhärierende Zellrasen vom Boden der Kulturschale abgelöst wurde. Trypsin wurde nun dekantiert und die Zellen mit 1 ml Kulturmedium mechanisch abgespült durch mehrmaliges Spülen mit der Kolbenpipette. Aus der erhaltenen Einzelzellsuspension wurden 150 µl überführt in eine neue Petrischale mit 5 ml Kulturmedium. Zum Zeitpunkt der Aussaat war wurde eine Konfluenz von etwa zu 40 % erreicht, nach etwa drei Tagen war vollständige Konfluenz zu beobachten. Da Zelllinien prinzipiell altern und nicht

unbegrenzt passagiert werden können, sollten möglichst während der ersten Passagen auch Zellen kryokonserviert werden, um Reserven zu haben, sobald die aktuellen Passagen seneszent werden.

### **2.3.2 Kryokonservieren von Zellen**

Der auf einer 10 cm Kulturschale gewachsene Zellrasen wird nach Trypsinbehandlung vom Schalenboden mit 2 ml Kulturmedium abgelöst. Je 1 ml der Zellsuspension wird in ein Kryokonservierungsröhrchen pipettiert und mit 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO), welches die Zellmembranen vor Eiskristallbildung schützt, versetzt. Nach sorgfältiger Durchmischung werden die Gefäße sofort in einen Gefrierkontainer überführt und bei –80°C für 3 h gelagert. Der Gefrierkontainer ist mit Isopropanol gefüllt und enthält einen Einsatz, in den die Kryokonservierungsröhrchen hineingestellt werden. Die Zellsuspension wird somit von RT auf –80 °C herunter gekühlt und zwar mit einer Abkühlungsrate von 1°C pro Minute, daher schonend für die Zellen. Die endgültige Lagerung erfolgt anschließend in tiefkaltem Flüssigstickstoff bei –196°C.

### **2.3.3 Auftauen von Zellen**

Das Kryokonservierungsröhrchen mit der enthaltenen Zellsuspension wird aus dem Flüssigstickstofftank entnommen, mit einer Greifzange gefaßt und möglichst schnell in ein 37°C Wasserbad verbracht. Das Röhrchen wird im Wasserbad leicht geschwenkt, um den Auftauvorgang zu beschleunigen. Sobald die Zellsuspension aufgetaut ist, wird sie in eine 10 cm Kulturschale, gefüllt mit Kulturmedium, dekantiert. Dies sollte möglichst rasch geschehen, da DMSO bei RT toxisch auf die Zellen wirkt.

## 2.4 Studien zur Anwendung von Antisense Oligonukleotiden (AON)

### 2.4.1 in vitro Studien

#### 2.4.1.1 Antisense Oligonukleotide (AON)

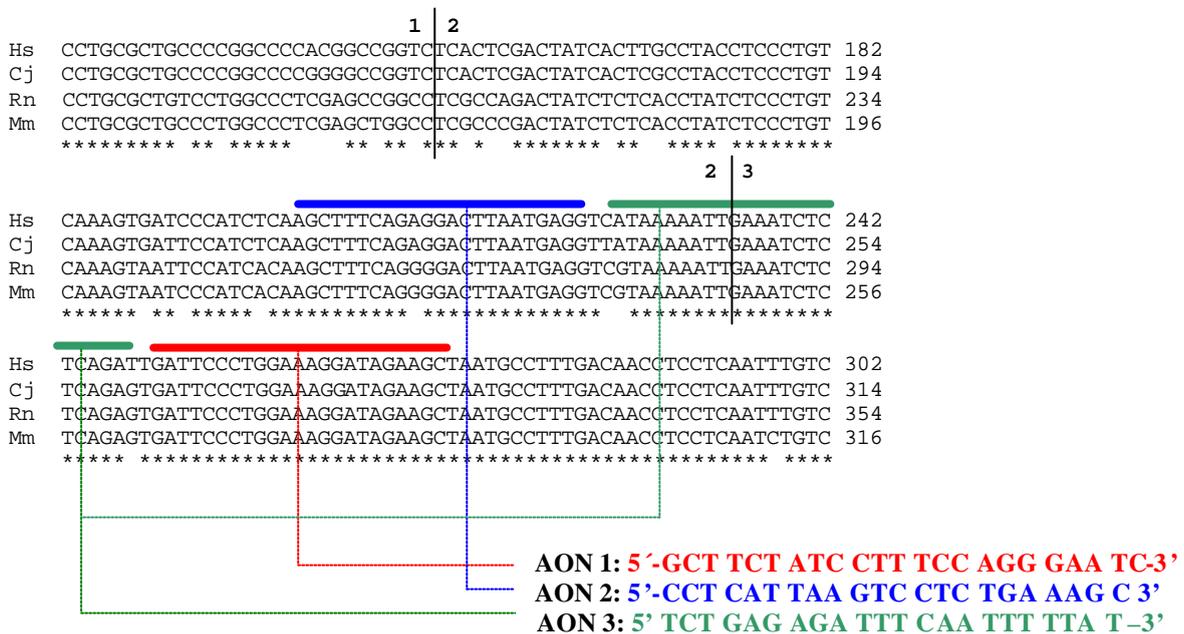
Die in dieser Arbeit verwendeten AON Moleküle waren gegen die LHR mRNA gerichtet. Die Sequenz eines Moleküle wurde jeweils so gewählt, daß es an die LHR mRNA von Mensch, Weißbüschelaffe, Ratte und Maus im Bereich der Exons 1 und 2 binden konnte. Voraussetzung dafür war eine möglichst maximale Homologie der Zielsequenzen in diesem Bereich, um eine optimale, also vollständige Hybridisierung (Kap. 1.12) der AON Moleküle in allen Spezies zu gewährleisten. Somit stehen die AON Moleküle für vergleichende Studien der LHR Funktion in verschiedenen Spezies zur Verfügung.

Die in AON Moleküle wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Zur Verlängerung der ihrer extra- und intrazellulären Halbwertzeit wurden sie mit der sogenannten „end-capped“ Phosphorthioat Modifikation ausgestattet. Dabei wurden vier Nukleotide des 5'-Endes und des 3'-Endes verändert, in dem jeweils ein nicht brückenbildendes Sauerstoffatom des Phosphodiesterückgrats durch eine Schwefelgruppe ersetzt wurde.

Weiterhin wurde ein Kontroll Oligonukleotid (KON) hergestellt, um innerhalb einer Studie den Effekt der Oligonukleotidmoleküle auf das in vitro bzw. in vivo System beobachten zu können. Das KON besaß die gleichen Eigenschaften wie ein AON, jedoch bestand es aus einer beliebigen Zufallssequenz und hatte daher keine komplementäre Zielsequenz in der LHR mRNA.

Die Synthesemengen beliefen sich für die in vitro Versuche auf 1  $\mu\text{mol}$  („normal Scale“) und für die in vivo Studien auf 0,1 mmol (Milligramm Maßstäbe; „large Scale“).

Die verwendeten AON hatten ihre Zielsequenz innerhalb der Exons 2 und 3 hatten folgende Position:



**Abb. 2.1: Zielsequenzen der verwendeten AON Moleküle.** Ausschnitt aus der LHR cDNA von Mensch (Hs), Weißbüschelaffe (Cj), Ratte (Rn) und Maus (Mm) (Benennung der Spezies rechtsseitig) in den Bereichen Exon 1 bis 3. Nummerierung der Nukleotide rechtsseitig. Farbige Balken repräsentieren die AON Moleküle: AON 1 (rot), AON 2 (blau), AON 3 (grün). Exongrenzen durch senkrechte Balken markiert, Exonnummerierung links- und rechtsseitig davon.

Das eingesetzte Kontrolloligonukleotid hatte folgende Sequenz:

5'-CTA GTT ACG CTA AGT CAC TGT CG-3'

#### 2.4.1.2 Zelluläre Aufnahme

Zur Überprüfung der Aufnahme Fluoroisothiocyanat (FITC) markierter KON Moleküle in hLHR CHO Zellen wurden diese auf gekammerten Objektträgern (Nunc, Dänemark) ausgesät in einer Zelldichte von 10 000 Zellen pro Kammer und in üblichem Zellkulturmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Aussaat konnten sich die Zellen über Nacht auf dem Objektträger absetzen. Dann wurde das Zellkulturmedium dekantiert und durch Kulturmedium mit FITC markierten KON Molekülen (FITC-KON) in definierter Konzentration versetzt und für eine begrenzte Zeit inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubationsdauer wurden die Kammerwände vom Objektträger entfernt, damit das Präparat für mikroskopische Untersuchungen vorbereitet werden konnte. Die

Zellen wurden dann zweimal mit vorgewärmtem PBS (Life Technologies) gewaschen und mit Paraformaldehyd für 5 min fixiert. Danach erfolgten zwei Waschschrte in PBS für je eine Minute. Nach Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 70 %, 96 % EtOH für jeweils 90 sec) zur Dehydrierung wurde eine Zellkernfärbung mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, Sigma) durchgeführt. Dazu wurden die Objektträger mit DAPI-Lösung (1µg/ml PBS) bedeckt und 10 Minuten bei RT inkubiert. Abschließend wurden die Objektträger 2x 30 sec in PBS gewaschen und dann mit Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), einem fluoreszenzerhaltenden Eindeckmittel unter eingedeckelt.

#### **2.4.1.3 Testung der AON Wirkung**

Für die *in vitro* Experimente wurden hLHR CHO Zellen in 96 well Platten ausgesät in einer Zelldichte von 1250 Zellen/well. Dem Zellkulturmedium wurden dann AON, bzw. als Reagenzienkontrolle KON in definierter Konzentration zugesetzt. Als negative Kontrolle dienten Zellen ohne AON/KON Zusatz im Medium. Die Zellen wurden anschließend unter den üblichen Zellkulturbedingungen (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) weiterkultiviert. Die AON Inkubation erfolgte über unterschiedliche begrenzte Zeiträume bis maximal 96 Stunden. Nach abgeschlossener Inkubationsdauer wurde das Zellkulturmedium dekantiert und die Zellen zweimal mit vorgewärmtem PBS (Life Technologies) gewaschen. Zur Überprüfung der AON/KON Wirkung wurden die Zellen dann mit humanem Choriongonadotropin (hCG, Choragon 5000<sup>®</sup>, Serono, London, GB) stimuliert.

#### **2.4.1.4 Zusatz von Oligofectamin**

Oligofectamin<sup>™</sup> (Invitrogen) ist ein Cholesterolderivat und daher lipophil. Es formiert micellenartige Strukturen in die AON Moleküle eingeschlossen werden. Nach Fusion dieser Komplexe mit der Membran der Zielzelle werden die AON Moleküle in das Zellinnere entlassen. Auf diese Weise soll die Aufnahme des AON in die Zelle erleichtert und daher effektiver werden.

Für die Experimente wurden nach Angaben des Herstellers 0,6 µl Oligofectamin pro 100 µl Zellkulturmedium eingesetzt. Die für ein Experiment benötigte Gesamtmenge an Oligonukleotidmolekülen wurde zunächst mit der benötigten Menge an Oligofectamin vorinkubiert (Protokoll des Herstellers Invitrogen), bevor mit serumfreiem

Zellkulturmedium die AON- Endkonzentration eingestellt und dann auf die Zellen gegeben wurde. Die erleichterte Aufnahme der AON Moleküle in die Zelle würde durch Serumzusatz behindert, da die Serumproteine die Oligofectaminkomplexe beeinflussen. Die Verwendung von serumfreiem Medium ist daher notwendig.

#### **2.4.1.5 Stimulationsversuche mit hCG**

Falls das AON Molekül effektiv hybridisieren und somit die Translation neuer LHR Proteine auf der Zelle blockieren konnte, sollte die LHR Expressionsrate abnehmen und folglich die cAMP Produktion der Zelle herabgesetzt sein. Um die Wirkung des AON/KON in den hLHR CHO Zellen zu überprüfen, mußten die Zellen mit humanem Choriongonadotropin (hCG, Choragon 5000<sup>®</sup>, Serono, London) stimuliert werden, um eine Hormon Rezeptorbindung und damit den Start der Signaltransduktionskaskade, also auch die cAMP Produktion hervorzurufen.

Das hCG wurde in PBGI (PBS mit Glucose- und Isobutylmethylxanthin) als Trägerflüssigkeit gelöst. Das Isobutylmethylxanthin diente dabei als Phosphodiesterasehemmer und führte so zu einer Akkumulation des produzierten cAMP.

Die Zellen wurden für einen definierten Zeitraum (60-360 min) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> mit hCG (0,15-150 000 mIU/ml) stimuliert. Während der Stimulation von den Zellen produziertes cAMP läßt sich sowohl intra- als auch extrazellulär nachweisen. Um das Gesamte cAMP detektieren zu können, war nach der Stimulation ein Aufschluß der Zellen notwendig, um intrazelluläres cAMP freizusetzen. Das geschah durch Einfrieren der Zellkulturplatten bei -20°C unmittelbar nach erfolgter Stimulation über Nacht. Nach dem Auftauen konnte dann der cAMP Nachweis aus dem Zellkulturüberstand erfolgen.

#### **2.4.1.6 cAMP ELISA (Enzyme Linked Immuno Adsorbent Assay)**

Um cAMP im Zellkulturüberstand störungsfrei bestimmen zu können, mußten zunächst im Überstand befindliche Zellreste durch Aufkochen der Probe für 2 min und anschließende Zentrifugation für 10 min bei 3000x g entfernt werden. Nach Abkühlung der Proben erfolgte dann die Bestimmung des gesamt cAMP mit Hilfe des cAMP ELISA (Institut für Hormon- und Fertilitätsforschung, Hamburg).

Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Doppelantikörper-Enzymimmunoassays. Prinzip ist die kompetitive Konkurrenz von cAMP-Molekülen um freie Antikörperbindungsstellen.

Dabei konkurrieren in einem ersten Reaktionsschritt die cAMP-Moleküle der Probe und die in definierter Menge zugesetzten cAMP-Biotin-Derivate (Tracer). Die entstehenden cAMP- und cAMP-Biotin-Antikörperkomplexe werden durch die Zweitantikörper (Goat-Anti-Rabbit) gebunden, welche an die Wandungen eines jeden Wells der Mikrotiterplatte gekoppelt sind.

Im nächsten Schritt wird an Streptavidin gekoppelte Horseradishperoxidase (HRP) zugegeben, die ausschließlich an die Biotin-haltigen Immunkomplexe bindet, indem eine Streptavidin-Biotin Bindung hergestellt wird.

Anschließend erfolgt die Zugabe des farblosen Substrates Tetramethylbenzidin (TMB), das als Chromogen fungiert. Durch Reaktion des HRP wird es in einen blauen Farbstoff umgewandelt, welcher nach Zugabe von Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ) gelb wird. Die Farbentwicklung des Chromogens ist abhängig von der an die Wells gebundenen Enzymmenge und damit umgekehrt proportional zu gesuchten cAMP-Konzentration der Probe. Der Meßbereich für diesen Assay reicht von 1 pmol/ml bis zu 243 pmol/ml.

Der Assay wurde im Institut für Hormon- und Fertilitätsforschung, Hamburg entwickelt und wird von dort als Kit bezogen. Man setzt maximal 12 Module, jedes Modul bestehend aus 8 Wells, zu einer 96-well Mikrotiterplatte zusammen. Die Anzahl der benötigten Wells richtet sich nach der Anzahl der zu bestimmenden Proben, welche jeweils in Doppelbestimmung angesetzt werden. Die Durchführung des Assays ist folgendermaßen:

1. Waschen. Wells mit 375  $\mu$ l E-PBS füllen und 2 min stehen lassen. Dann dekantieren, so daß möglichst wenig Restfeuchtigkeit zurückbleibt.
2. cAMP-Inkubation. Wells A1, A2 mit 150  $\mu$ l E-PBS beschicken (Nullwert). Die folgenden Wells B1, B2 bis H1, H2 sind für die cAMP-Standardreihe vorgesehen, das Probevolumen beträgt 50  $\mu$ l /well. In B1, B2 dient E-PBS als Nullstandard. Es folgen 1, 3, 9, 27, 81, 243 pmol/ml. Die restlichen Wells werden je mit 50  $\mu$ l der zu bestimmenden Proben beschickt wobei zur Ermittlung der Assaydrift vor und nach den Proben ein High- und ein Low-Standard mitgeführt werden sollten. Anschließend werden 50  $\mu$ l cAMP-Biotin (Tracer) zugegeben, sowie 100  $\mu$ l Antiserum. Die Mikrotiterplatte wird abgedeckt und 18 –24 h bei 4-6°C in  $H_2O$  gesättigter Kammer lichtgeschützt inkubiert.

3. HRP-Streptavidin-Inkubation. Anschließend wird die Platte dekantiert, so daß möglichst wenig Restflüssigkeit in den Wells zurückbleibt. 200 µl HRP-Streptavidin-Lösung werden pro well pipettiert, die Platte 30 min bei 4°C lichtgeschützt inkubiert und anschließend dekantiert.
4. Waschen. Zwecks Entfernung ungebundener Komponenten werden alle Wells mit 375 µl Waschpuffer versehen, 1 min stehen gelassen und dann dekantiert. Dieser Waschvorgang ist insgesamt 4 mal durchzuführen.
5. Substrat-Inkubation. Danach werden 250 µl Substratlösung pro Well pipettiert und die Platte 40 min lichtgeschützt bei RT in H<sub>2</sub>O gesättigter Kammer inkubiert.
6. Stoppen. Zum Stoppen der Farbreaktion werden 50 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro Well pipettiert.

Schließlich wird die Farbintensität der Proben photometrisch bestimmt. Dies erfolgt in einem Spectramax 250-Photometer (Molecular Devices, USA) mit dem Programm Soft Max Pro 2.0.

#### **2.4.2 Organkultur Studien**

Mit Hilfe der Organkultur lassen sich die Leydig Zellen im weitgehend intakten Gewebeverband untersuchen, so daß das Kultursystem der in vivo Situation einen Schritt näher kommt. Die Organkultur wurde in dieser Arbeit an Hoden des Weißbüschelaffen (Alter: 53 Wochen) und der Maus (Alter: 13 Wochen, Stamm NMRI, Harlan Winkelmann, Borching) vergleichend durchgeführt.

Zunächst wurde der Hoden entnommen (unsterile Bedingungen), dann in eine Petrischale überführt und dekapsuliert (sterile Bedingungen). Der dekapsulierte Hoden wurde kurz mit Medium gewaschen, bevor kleine Fragmente (1 mm<sup>3</sup>) präpariert wurden.

In die Vertiefungen einer 24-well Platte wurden zunächst 1,5 ml Zellkulturmedium (Dulbecco's modified Eagle Medium mit 1000 mg/ml Glucose; (Life Technologies), versetzt mit 1% (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren (Life Technologies) und 2% (v/v) Penicillin-Streptomycin-Glutamin Kombinationsantibiotikum (Life Technologies)) pipettiert. Anschließend wurden Inserts mit Polycarbonatmembran (Nunc, Dänemark) so eingesetzt, daß die offene Seite des Inserts auf dem Plattenboden positioniert war und die Membran sich an der Grenzschicht zwischen Luft und Medium befand. Darauf wurden

dann die Fragmente des Hodengewebes plaziert, welche bei 35°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert wurden.

Für die Organkultur ist es essentiell, die Organfragmente an der Grenzschicht zwischen Medium und Luft zu kultivieren, damit eine Versorgung mit Nährstoffen aus dem Medium gewährleistet ist und gleichzeitig eine Anoxie des Gewebes durch Mangelversorgung verhindert wird. Um die Diffusion der Nährstoffe zu garantieren, dürfen die Gewebestücke nicht größer als 1 mm<sup>3</sup> sein.

Bevor eine Testung der AON Moleküle an der Organkultur vorgenommen werden konnte, mußte die Stimulierbarkeit der Testosteronproduktion durch hCG Zugabe überprüft werden. Dazu wurden definierte Konzentrationen hCG (100-1000 mIU/ml) direkt in das Kulturmedium gegeben und für 24 h inkubiert. Anschließend konnte die Testosteronkonzentration im Kulturmedium mittels Radio Immuno Assay (RIA) (2.4.3.2) bestimmt werden.

### **2.4.3 Studien in der Primärzellkultur**

Um die Testung von AON Molekülen an den Leydig Zellen des Hodengewebes vornehmen zu können, ist es möglich, aus dem Hodengewebe eine Einzelzellsuspension herzustellen. Vorteil der Primärzellkultur gegenüber der Organkultur ist die Quantifizierbarkeit der Zellzahl und der kleinere Maßstab, der einen geringeren Verbrauch an AON Molekülen erfordert. Nachteil ist jedoch die Zerstörung des Gewebeverbandes.

Die Einzelzellsuspension wurde durch enzymatischen Verdau des Gewebes hergestellt. Dazu wurde zunächst ein Enzym-Mix Kulturmedium mit den Zusätzen Collagenase (Sigma) (1mg/ml) und DNase (Sigma) (1 mg/ml) hergestellt. Der Hoden einer 13 Wochen alten Maus (Stamm NMRI, Harlan Winkelmann, Borching) wurde dekapsuliert, mit Medium gewaschen und in einer Petrischale mit 1 ml Enzym-Mix versetzt. Das Gewebe wurde dann mit einer Augenschere mechanisch zerkleinert bis eine pipettierbare Suspension entstand. Diese wurde in einem 13 ml Röhrchen mit 9 ml des Enzym-Mixes versetzt und eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert, wobei zwischenzeitlich die Suspension alle 10 min durchmischt wurde. Nach einer Stunde hatte sich ein Bodensatz mit groben Fragmenten von der trüben Zellsuspension abgesetzt. Der Überstand wurde abgenommen und 10 min lang bei 800x g zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit

Medium gewaschen und zentrifugiert. Das gewaschene Zellpellet wurde schließlich in 8-10 ml Kulturmedium aufgenommen (Dulbecco's modified Eagle Medium mit 1000 mg/ml Glucose; (Life Technologies), versetzt mit 1% (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren (Life Technologies) und 2% (v/v) Penicillin-Streptomycin-Glutamin Kombinationsantibiotikum (Life Technologies)) und die Zellzahl in der Neubauer Zählkammer bestimmt.

In einer 48 well Platte wurden dann 500 000 Zellen pro well ausgesät. Nachdem sie vollständig adhärten, wurden sie mit verschiedenen AON Konzentrationen (10–20 µM) für eine Dauer von 48-72 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit hCG (100 mIU/ml) für die Dauer von 4 h. Anschließend wurde Testosteron im Zellkulturüberstand bestimmt.

#### **2.4.3.1 Proteinbestimmung**

Um den Proteingehalt der Organkultur zu bestimmen, wurde ein Proteinassay auf Basis der Bichinonsäure-Methode durchgeführt. Prinzip des Tests ist die Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{+}$  unter Anwesenheit von Protein. Bichinon-Moleküle reagieren mit  $\text{Cu}^{+}$  und bilden einen Bichinon- $\text{Cu}^{+}$ -Komplex im Verhältnis von 2:1, der bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch gemessen werden kann.

Zur Erstellung der Standardkurve wurden ausgehend von einer 2 mg/ml BSA (bovines Serumalbumin, Sigma) Stocklösung vier Standardverdünnungen (0,1-0,8 mg/ml) eingesetzt.

Zur Aufbereitung der Organkulturfragmente wurden die Fragmente jeder einzelnen Probe in ein Reaktionsgefäß mit 100 µl PBS überführt und mit Hilfe eines Stabhomogenisators zu einer Zellsuspension homogenisiert (Ernst Schütt, Göttingen).

Das Farbreagenz wurde aus zwei Komponenten nach Angaben des Herstellers (Pierce, Rockford, USA) gemischt: Reagenz A (Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bichinonsäure, Natriumtartrat in 0,1 M NaOH) und Reagenz B (4 % Kupfersulfatlösung) im Verhältnis 3:1 (v/v).

Der Test wurde in einer 96 well Platte durchgeführt. 10 µl einer Standard- bzw. Probenlösung (Doppelbestimmung) wurden mit 200 µl Farbreagenz versetzt, gemischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des Programms „Soft Max Pro 2.0“.

### 2.4.3.2 Radio Immuno Assay (RIA) zum Nachweis von Testosteron

Zum Nachweis von Testosteron in einer Trägerflüssigkeit eignet sich das Prinzip des Radio Immuno Assays. Dabei konkurrieren in definierter Konzentration zugesetzte radioaktiv markierte Testosteron-Moleküle (Tracer) mit dem in der Probe vorhandenen Testosteron um die freien Bindungsplätze an einem Erst-Antikörper. Ein zweiter Antikörper bindet dann an den vorhandenen Antigen-Antikörper-Komplex. Es folgt die Immunpräzipitation durch Einsatz eines gegen den Zweit-Antikörper gerichteten Antikörpers. Die Konzentration des Testosterons in der zu bestimmenden Probe ist demnach umgekehrt proportional zur ermittelten Konzentration der radioaktiven Tracer-Moleküle.

Der Assay unterteilt sich in zwei Abschnitte: 1. Ermittlung der Tracer Recovery nach Extraktion, 2. Radio Immuno Assay.

#### 1. Ermittlung der Tracer Recovery

Für die Recovery Berechnung wurden 25  $\mu\text{l}$  (1000 cpm)  $\text{H}^3$ -Testosteron Arbeitstracer, jeweils 100  $\mu\text{l}$  einer Probe und 200  $\mu\text{l}$  Testosteron-Puffer in jedes Extraktionsröhrchen pipettiert. In das jeweils erste und letzte Röhrchen einer Messreihe wurden nur 300  $\mu\text{l}$  Puffer als Reagenzienleerwert gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 20 Min. Danach wurden alle Extraktionsröhrchen mit 3 ml Ethylether versetzt und 30 Min auf einem Rotor extrahiert. Anschliessend wurden die Gefässe 5-10 Min bei 1000 x g zentrifugiert. In einem Kryostaten wurden dann die Röhrchen für 2 Min bei -40°C eingefroren und der Überstand dann in entsprechend beschriftete Glasröhrchen dekantiert. Das Reaktionsgemisch wurde in ein 37°C Wasserbad gestellt und soweit eingengt, dass das enthaltene Testosteron (radioaktiv markiert bzw. nativ) an der Röhrchenwandung antrocknet. Die Proben wurden anschließend mit 1 ml Testosteron-Puffer rekonstruiert und gründlich gemischt. Von jeder rekonstruierten Probe wurden 500  $\mu\text{l}$  bzw. vom  $\text{H}^3$  Testosteron Arbeitstracer 25  $\mu\text{l}$  (1000cpm) in die entsprechenden Szintillationsröhrchen pipettiert und 4 ml Szintillationscocktail (Aqualuma plus, Firma Baker) zugegeben. Die Radioaktivität der Proben nach dem Extraktionsvorgang wurde in einem Beta-Counter bestimmt, wobei die Radioaktivität des Arbeitstracers nach dem Extraktionsvorgang die Gesamt recovery darstellt und als 100 % gesetzt wurde. Die Prozentuale Recovery der Proben nach dem Extraktionsvorgang konnte somit anhand der Messergebnisse berechnet werden.

## 2. Radio Immuno Assay

Zwecks Herstellung einer Standardreihe wurde ausgehend von der Stocklösung (1000 pg/100 µl) eine geometrische Verdünnungsreihe angesetzt, um Konzentrationen von 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91; 1,95 pg/100µl vorzulegen. In jedes Messröhrchen wurden 100 µl Standard bzw. 100 µl rekonstruierte Probe, sowie 100 µl Testosteron-Puffer pipettiert. Weiterhin wurden folgende Assay-Komponenten zugegeben: 100 µl Erst-Antikörper (AS-EN 5105/9-11/2; Verdünnung 1:20 000), 100 µl Tracer (Amersham IM 128: Testosteron-3-(O-carboxymethyl)-oximino-(2)iodohistamin; 25 µCi), sowie 100 µl Rabbit γ-Globulin (Zweit-Antikörper) und 100 µl Anti-Rabbit IgG (Präzipitationsantikörper). Zur Bestimmung der Totalaktivität wurden lediglich 100 µl Tracer in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Die unspezifische Bindung der Tracermoleküle wurde ermittelt, indem statt Erst-Antikörper Puffer pipettiert wurde. Zur Bestimmung der spezifischen Bindung wurden statt einer Probe 100 µl Puffer zugesetzt. Alle Röhrchen wurden gut durchmischt und 2 h bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurden 2 ml Waschlösung in jedes Röhrchen gegeben, 20 Min bei 1000 x g zentrifugiert und dann dekantiert. Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Gamma-Counter. Der Messwert jeder einzelnen Probe ist durch die prozentuale Recovery derselben Probe zu korrigieren ( $\text{Messwert} \times 100 / \% \text{ Recovery} = \text{Wert in nmol/l}$ ).

### 2.4.4 in vivo Studien

Die zwei durchgeführten in vivo Studien dienten der Testung der AON Moleküle im nicht humanen Primaten Modell des Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*). Im Fall einer genspezifischen AON Wirkung wäre diese durch abgesenkte Plasma Testosteron Konzentrationen festzustellen, da die Expressionsrate der LHR Proteine erheblich herabgesetzt und daher die Testosteronbiosynthese stark gedrosselt wäre.

#### 2.4.4.1 Studie I

Für diese Studie wurden sechs adulte Tiere ausgewählt, die zwischen 55 und 90 Wochen alt waren. Es wurden zwei Gruppen gebildet, von denen die eine Gruppe mit AON (AON Gruppe) und die andere mit KON (KON Gruppe) behandelt wurde. Das AON/KON wurde in einer Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht eingesetzt. Die Verabreichung erfolgte als intraperitoneale Injektion. Zur Herstellung der gebrauchsfertigen AON- bzw. KON-Injektionslösung wurde zunächst die für jedes einzelne Tier benötigte AON- bzw. KON-

Menge auf einer Feinwaage in einem sterilen Aluminium-Wiegeschiffchen eingewogen. Entsprechend der hier benötigten großen AON/KON Mengen, erfolgte die Synthese der Oligonukleotide (MWG Biotech, Ebersberg) im „large Scale“-Maßstab, so daß sie als Pulver zur Einwaage vorlagen. Das Aluminium-Wiegeschiffchen mit der entsprechenden Reagenzienmenge wurde dann in ein 13 ml Röhrchen (Falcon) überführt und in 600 µl physiologische Kochsalzlösung (Braun, Melsungen) gelöst. Aufgrund der geringen Körpergröße der Tiere war es beabsichtigt, ein minimales Injektionsvolumen zu verwenden und einen guten Kompromiß zwischen Löslichkeit des Oligonukleotids und minimaler Injektionsmenge zu finden. Bei Lösung von bis zu 4 mg war ein Volumen von 500 µl NaCl geradeausreichend, um die gesamte Reagenzienmenge lösen zu können. Für jedes Tier wurde bei der Einwaage eine durch Spritze (Tuberkulinspritze, Braun, Melsungen) und Kanüle (20 Gauge, Braun, Melsungen) verursachte Verschleißmenge von 100 µl eingerechnet.

Zur Durchführung der Injektion wurde der jeweilige Weißbüschelaffe von dem Tierpfleger in Kopfstandlage gehalten, damit sich das Darmkonvolut Richtung Zwerchfell bewegen konnte, um eine Darmverletzung während der Injektion auszuschließen.

Die Blutentnahmen erfolgten aus einer gut zugänglichen Beinvene. Pro Blutentnahme wurden 700-800 µl Blut entnommen, über Nacht bei 4 °C gelagert und für 20 min bei 3000 upm (Eppendorf Tischzentrifuge) und 8°C zentrifugiert. Die flüssige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt und für 10 min bei 3000 upm und 8°C zentrifugiert. In dem Serum konnte dann Testosteron bestimmt werden (2.4.6.2).

Vor jeder Injektion oder Blutentnahme wurde der Gesundheitszustand des Tieres genau überprüft (Fellbild, Körperöffnungen, Schleimhäute). Nur bei tadellosem Zustand des Tieres wurden die Anwendungen fortgesetzt. Nach jeder Anwendung bekamen die Tiere eine Nahrungsbelohnung (Marmoset-Gum) mit Zusatz eines Eisenpräparates (Ferrosanol, Essex Pharma) nach Dosierungsangaben des Herstellers.

Die Studie war im Rahmen der Tierversuchsgenehmigung des Instituts abgedeckt (Nr. G41/98)

In dieser Studie eingesetzte Tiere:

Name des Tieres	Probanden Nummer	Körpergewicht (g)	Alter (Wochen)	Gruppe
Adam	1	260	67	AON
Bill	2	258	83	KON
Dirk	3	348	55	AON
Jürgen	4	322	75	KON
Lukas	5	394	68	AON
Ludger	6	307	90	KON

Bevor mit der AON/KON Injektion begonnen wurde, erfolgten zwei Blutentnahmen an zwei unterschiedlichen Tagen zur Bestimmung der basalen Testosteronwerte. Der Verlauf der Studie war wie folgt:

Tag	0	1	2	3	4	5	6	7
Blutentnahme	x			x		x	x	x
Injektion					x	x	x	

Ziel war, einen kontinuierlichen Abfall der Testosteronproduktion nach jeder erfolgten Injektion anhand der Blutentnahmen zu verfolgen.

#### 2.4.4.2 Studie II

Diese Versuchsreihe wurde als „Cross Over“ Studie zu Studie I angelegt, so daß die in Studie I mit AON behandelten Tiere jetzt mit KON behandelt wurden und umgekehrt. Zudem wurden die verabreichten AON/KON Dosen auf 20 mg/kg erhöht und somit im Vergleich zu Studie I verdoppelt. Die AON Gruppe wurde um zwei Tiere erweitert, um die Fallzahl zu erhöhen und Tendenzen in der AON Wirkung besser feststellen zu können. Die Studie wurde drei Wochen nach Beendigung der Studie I durchgeführt, damit war gewährleistet, daß die Tiere keine Oligonukleotidrückstände mehr aufwiesen und eine ausreichende Erholungsphase hatten. Das Tier Nr. 1 aus Studie I wurde in dieser Studie nicht mehr eingesetzt, da seine Beinvenen sehr dünn waren und sich die Blutentnahme daher schwierig gestaltete.

Gruppeneinteilung der Tiere im Vergleich zu Studie I („Cross Over“)

Name des Tieres	Probanden Nummer	Gruppe Studie I	Gruppe Studie II	Körpergewicht (g)	Alter (Wochen)
Cindus	1	-	KON	459	71
Bill	2	KON	AON	272	86
Bruno	3	-	AON	321	64
Claudius	4	-	KON	409	53
Dirk	5	AON	KON	356	58
Jürgen	6	KON	AON	336	78
Klaus	7	KON	AON	340	74
Lukas	8	AON	KON	390	71
Luidger	9	KON	AON	303	93
Otto	10	-	AON	349	54

Der hauptsächliche Unterschied zur ersten Studie lag in der Abfolge der AON/KON Injektionen und Blutentnahmen. In der ersten Studie sollten die Testosteronskonzentrationen jeweils 24 Stunden nach der letzten AON/KON Injektion gemessen werden, um Veränderungen nach jeder einzelnen Injektion zu ermitteln. In dieser Studie sollte der akkumulative Effekt aller aufeinander folgenden AON/KON Injektionen gemessen und der Testosteronspiegel der Tiere nach Abschluß der AON/KON Behandlung länger beobachtet werden. Im Falle einer positiven AON Wirkung würde die niedrigste Testosteronkonzentration nach Abschluß aller AON/KON Injektionen festgestellt werden und dann mit Nachlassen der AON Wirkung wieder ansteigen.

Der Studienzeitplan war wie folgt:

Tag	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Blutentnahme	x		x								x	x		x	x
Injektion							x	x	x	x					

Injektionen und Blutentnahmen erfolgten wie in Studie I (2.4.4.1) beschrieben.

## 2.5 Zellkulturmedien, Lösungen

### Lösungen für die Sequenzierungen

Denaturierendes Acrylamidgel	28 ml	Aqua bidest
	5 ml	TBR (10x)
	21 g	Harnstoff
	7,5 ml	Rapid Gel XL (MWG Biotech)
	500 µl	APS (10 %)
	50 µl	TEMED
Ammoniumpersulfat (APS)	10 %	APS in Aqua bidest (w/v)
TBE (10x)	0,9 M	Trisma-Base
	0,9 M	Borsäure
	40 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
TBS (10x)	0,5 M	Trisma-Base
	2,5 M	NaCl

### Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

Beladungspuffer	0,25 %	Bromphenolblau
	30 %	Glycerin
Elektrophoresepuffer (10x)	0,25 M	Trisma-Base
	1,9 M	Glycin
	35 mM	SDS
TAE-Puffer	40 mM	Tris/Acetat
	1 mM	EDTA

Lösungen für den cAMP ELISA

ELISA-Waschpuffer	86 mM	NaCl
	0,02 %	Tween (v/v)
E-PBS-Puffer	0,1 M	Natriumphosphat, pH 7,0
	0,15 M	NaCl
	5 mM	EDTA
	0,2 M	BSA
	0,01 %	Thiomersal
HRP-Streptavidin-Konjugat	20 µl	HRP-Streptavidin-Stocklösung (167 µg/ml in 20 ml E-PBS) (frisch anzusetzen)
HRP-Substratlösung	500 µl	Substratpuffer ( (4,8 M Natriumacetat, 0,24 M Zitronensäure)
	500 µl	0,2 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	500 µl	0,5 % Tetramethylbenzidin

Lösungen für den Testosteronassay

Zur Herstellung eines 0,01 M Phosphat Puffers, pH 7,5, 0,2 % BSA

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O (Merck)	0,276 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O (Merck)	1,423 g
BSA (Sigma)	2 g
NaN <sub>3</sub> (Merck)	0,1 g

In 1 l Aqua dest lösen, pH 7,5 einstellen.

Lösungen für die Zellkultur

<b>PGBI Lösung</b>	<b>0,2 % Glucose</b>
	0,1 % BSA
	16,9 mM IMX (in PBS)

**2.6 Materialien und Geräte****2.6.1 Materialien****2.6.1.1 Chemikalien**

Die Chemikalien wurden soweit nicht anders angegeben von den Firmen Aldrich (Steinheim), Amersham Pharmacia (Freiburg), Ares Serono (London), BioRAD (München), Biozym (Hameln), Fluka (Neu-Ulm), Invitrogen (Groningen, Niederlande), Life Technologies (Eggenstein), Merck (Darmsatdt), MWG Biotech (Ebersberg), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Nunc (Wiesbaden-Biebrich), PAA Laboratories(Cölbe), Promega (Heidelberg), Quiagen (Hilden), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Schleicher und Schuell (Dassel), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Stratagene (Heidelberg), USB/Amersham (Braunschweig) und WAK-Chemie (Bad Soden) sowie aus der Apotheke der Universitätskliniken Münster bezogen.

**2.6.1.2 Plasmidvektoren und Bakterienstämme**

Plasmidvektor: pGGEM®-T Easy (Promega)

Bakterienstamm: E. coli XL1 Blue (*supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lac<sup>-</sup> F'[proAB<sup>+</sup>lacI<sup>q</sup>lacZ-M15 Tn10 (tet<sup>r</sup>)*)

Längenmarker: Als DNA-Größenstandard wurde „FX-174 RF DNA-Hae III“ verwendet (Amersham Pharmacia).

### 2.6.2 Geräte

Neben den Standardlaborgeräten wurden folgende weitere Geräte benutzt:

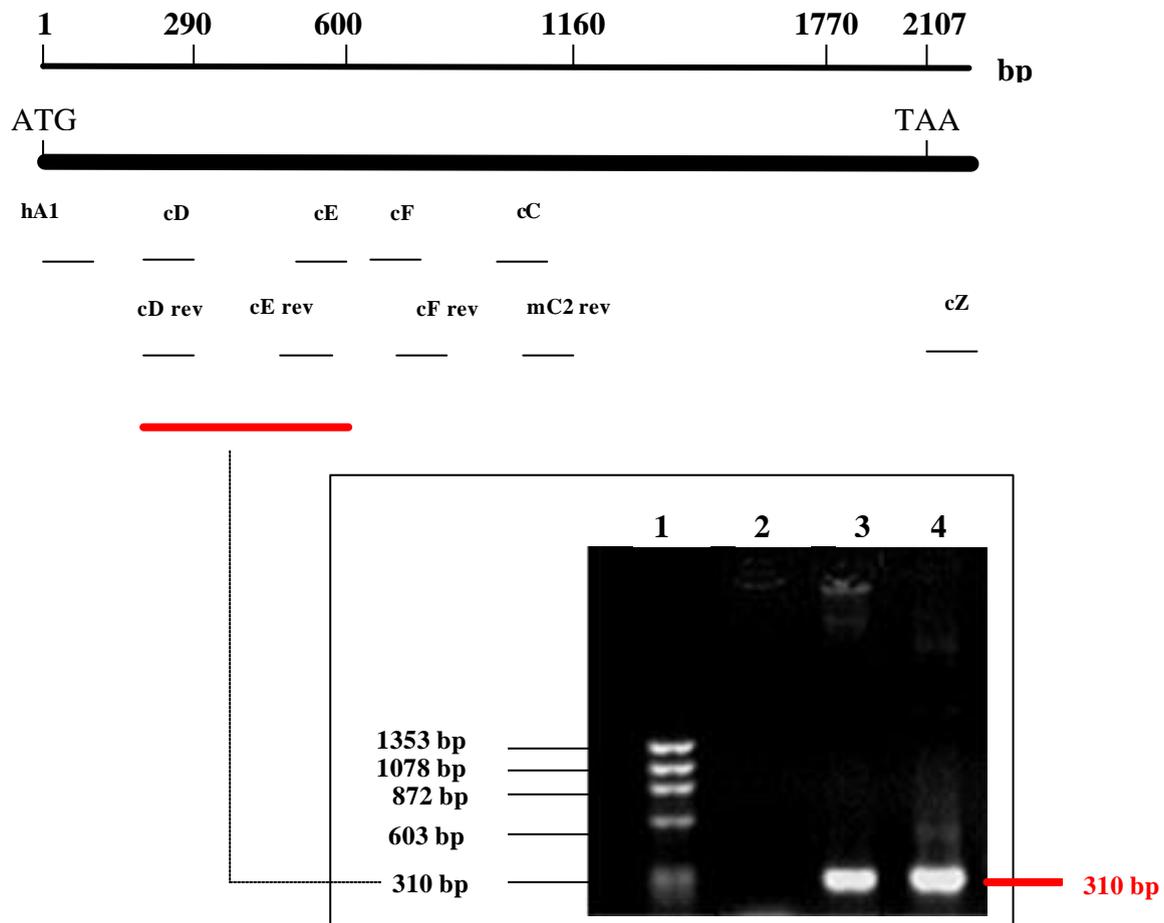
Inkubatoren	Forma Scientific	Labotect GmbH, Göttingen
Mikroskop	Zeiss Axioskop	Carl Zeiss, Oberkochen
PCR Gerät	Hybaid Express	Hybaid, Heidelberg
Photometer	Spectramax 250	Molecular Devices, USA
	Gene Quant II	Amersham Pharmacia, Freiburg
Sequenziergerät	LiCor	MWG Biotech, Ebersberg
	DNA –Analyzer	
	Gene ReadIR 4.200	
Scintillationszähler	Wallac 1409 und 1277	LKB Wallac, Finnland
Sterilbank	Hera Safe	Kendro, Düsseldorf

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klonierung der LH Rezeptor cDNA des Java Affen (*Macaca fascicularis*)

##### 3.1.1 RT PCR der testikulären RNA des Java Affen

Aus dem Hodengewebe eines *Macaca fascicularis* gewonnene RNA wurde zunächst mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben und anschließend eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit genspezifischen Primern durchgeführt. In dieser PCR diente dann die synthetisierte cDNA als Template. Durch Einsatz verschiedener Primer Paare, welche verschiedene Abschnitte des LHR Gens flankierten (Kap. 2.1.3), konnten überlappende Amplicons unterschiedlicher Größe gewonnen werden. Diese wurden nach Elektrophorese im Agarose Gel detektiert (Kap. 2.1.4.1) und ergaben in ihrer Gesamtheit die den LHR kodierende Basensequenz.

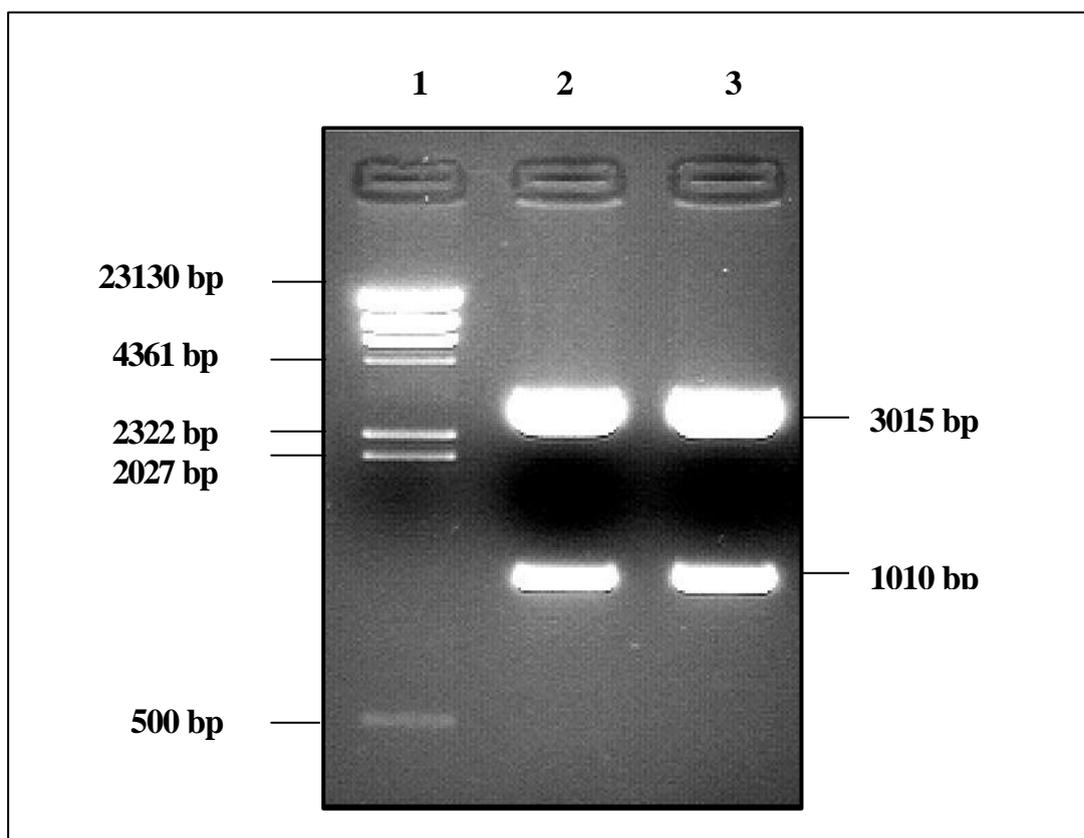


**Abb. 3.1: Klonierungsstrategie und RT PCR der *Macaca fascicularis* RNA.** Schwarzer Balken: *Macaca fascicularis* (*mf*) LH Rezeptor vom Start- bis zum Stopcodon (ATG bis TAA). Obere numerierte Linie: Zahlen geben die Position der Primer innerhalb der *mf*LHR Sequenz an. Pfeil nach rechts: Vorwärtsprimer (Beschriftung zeigt die Benennung). Pfeil nach links: Reverse Primer (Beschriftung zeigt die Benennung). Rot: Position des Amplicons. Spur 1: Negativkontrolle, Spuren 2, 3: Mit dem Primerpaar cD/cErev generierte Amplicons (310 bp). Zur Längenabschätzung diente der Marker HaeIII.

Der Reaktionsansatz der RT PCR mit den enthaltenen und in der Gelelektrophorese nachgewiesenen Amplicons wurde anschließend aufgereinigt, um die entsprechenden Amplicons von Enzym- und Reagenzienrückständen zu reinigen und für die Ligation in einen Vektor vorbereiten zu können.

### 3.1.2 Proberestriktion

Nachdem das durch RT PCR erhaltene Amplicon in den Vektor pGem ligiert ( Kap. 2.1.5.1), in den E. coli Stamm XL1 Blue transformiert (Kap. 2.1.5.3) und daraus isoliert (Kap. 2.1.5.4) wurde, diente die Proberestriktion (Kap. 2.1.5.5) der Längenüberprüfung des im Vektor enthaltenen Inserts. Dazu wurden die aus den Bakterienklonen isolierten pGem Vektorkonstrukte mit Ezym EcoRI restringiert und ein Teil des Reaktionsansatzes einer Agarose Gelelektrophorese unterzogen.

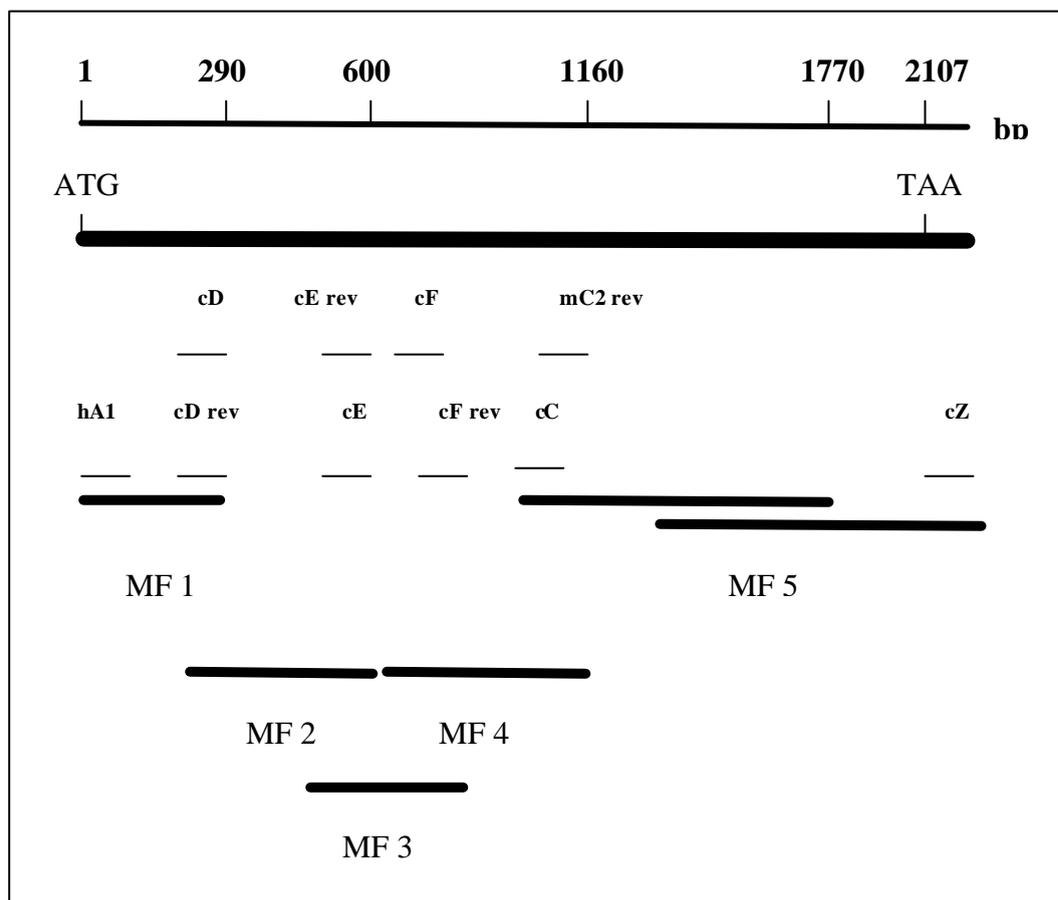


**Abb. 3. 2: Proberestriktion des Vektorkonstruktes.** Die Banden stellen den linearisierten Vektor (3015 bp) und das durch das Primer Paar cC (forward) und cZ (reverse) generierte Insert ( 1010 bp) dar. Spur 1: 2  $\mu$ l Probevolumen, Spur 2: 3  $\mu$ l Probevolumen. Zur Längenabschätzung diente der Marker HindIII.

Nach Überprüfung auf Richtigkeit des Inserts wurde der restliche Reaktionsansatz der DNA Isolierung für die Sequenzierungsreaktion ( Kap. 2.1.6) verwendet.

### 3.1.3 cDNA Consensus Sequenz des *Macaca fascicularis* LH Rezeptors

Nach Sequenzierung der verschiedenen Klone erfolgte die Selektion der positiven Klone. Dazu erfolgte deren Überprüfung auf Homologie mit den bekannten LHR cDNAs verschiedener Spezies. Als Referenzsequenz diente die cDNA des humanen LHR, aber auch die der Spezies *Callithrix jacchus*, *Rattus norvegicus* und *Mus musculus*. Die Homologieabklärung erfolgte computergestützt mit dem Programm BLAST („basic local alignment search tool“) in der Datenbank des „National Center for Biotechnology“ (NCBI). Mit den Sequenzen der positiven Klone wurde ein Alignment gegen die humane LHR cDNA durchgeführt, um zu ermitteln, um welchen Abschnitt des LHR es sich handelt. Aus etwa 60 sequenzierten Klonen waren letztendlich sechs Sequenzen für den kodierenden Bereich des vollständigen LHR von *Macaca fascicularis* ausreichend.



**Abb. 3.3: Klonierungsstrategie zur Klonierung der *Macaca fascicularis* LHR cDNA.** Die schwarzen Balken repräsentieren partielle bzw. Consensus cDNA des *Macaca fascicularis* LHR. Pfeile nach rechts: Vorwärtsprimer. Pfeile nach links: Reverse Primer. Beschriftung über den Pfeilen: Primerbenennung. Die Primer sind aus cDNA Sequenzen von *Callithrix jacchus* (c), *Homo sapiens* (h) bzw. *Macaca fascicularis* (m) (Kap. 2.1.3). Durch RT PCR mit den Primern hA1-cDrev konnte das Fragment MF 1, durch cD-cErev MF 2, durch cE-cFrev MF 3, durch cF-mC2rev MF 4 und durch cC-cZ das Fragment MF 5 amplifiziert werden.

3.1.3.1 Consensus Nukleotidsequenz der *Macaca fascicularis* LHR cDNA

ATG	AAG	CAG	CGG	TTC	TCG	GCG	CTG	CAG	CTG	CTG	AAG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	54
CTG	CTG	CAG	CCG	TTG	CTG	CCA	CGA	GCG	CTG	CGC	GAG	GCG	CGC	TGC	CCT	GAG	CCC	108
TGC	AAC	TGC	GCG	CCC	GAC	GGC	GCC	CTG	CGC	TGC	CCC	GGC	CCG	ACG	GCC	GGT	CTC	162
ACT	CGA	CTA	TCA	CTT	GCC	TAC	CTC	CCT	GTC	AAA	GTG	ATC	CCA	TCT	CAA	GCT	TTC	216
AGA	GGA	CTT	AAT	GAG	GTC	GTA	AAA	ATT	GAA	ATC	TCT	CAG	ATT	GAT	TCC	CTG	GAA	270
AGG	ATA	GAA	GCT	AAT	GCC	TTT	GAC	AAN	CTC	CTC	AAT	TTG	TCT	GAA	ATA	CTG	ATC	324
CAG	AAC	ACC	AAA	AAT	CTG	AGA	TAC	ATT	GAG	CCC	GGA	GCA	TTT	ATA	AAT	CTT	CCC	378
CGA	TTA	CAA	TAC	TTG	AGC	ATC	TGT	AAC	ACG	GGC	ATC	AGA	AAG	TTT	CCA	GAT	GTT	432
ACG	AAG	ATC	TTG	TCC	TCT	GAA	TTA	AAT	TTC	ATT	CTG	GAA	ATT	TGT	GAT	AAC	TTA	486
CAC	ATA	ACC	ACC	ATA	CCA	GGA	AAT	GCT	TTT	CAA	GGG	ATG	AAT	AAT	GAA	TCT	GTA	540
ACA	CTC	AAA	CTA	TAT	GGA	AAT	GGA	TTT	GAA	GAA	GTA	CAA	AGT	CAT	GCG	TTC	AAT	594
GGG	ACG	ACA	CTG	ATT	TCA	CTG	GAG	CTA	AAG	GAA	AAC	ATA	CAT	CTG	GAA	AAG	ATG	648
CAC	AAT	GGA	GCC	TTC	CGT	GGG	GCC	ACG	GGG	CCG	AAA	ATC	TTG	GAT	ATT	TCT	TCC	702
ACC	AAA	TTG	CAG	GCC	CTG	CCG	AGC	TAT	GGC	CTA	GAG	TCC	ATT	CAG	ACG	CTA	ATT	756
GCC	ACG	TCA	TCC	TAT	TCT	CTA	AAA	AAA	TTG	CCA	TGC	AGA	GAA	AAA	TTT	GCC	AAT	810
CTC	CTG	GAA	GCC	ACG	TTG	ACT	TAC	CCC	AGC	CAC	TGC	TGT	GCT	TTT	AGA	AAC	TTG	864
CCA	ACA	AAA	GAA	CAG	AAT	TTT	TCA	CTT	TCC	ATT	TCT	GAA	AAC	TTT	TCC	AAA	CAA	918
TGT	GAA	AGC	ACA	GTA	AGG	AAA	CTG	AAT	AAT	AAA	ACA	TTT	TAT	TCT	GCC	ATG	CTT	972
GCT	GAG	AGT	GAA	CTG	AGT	GGC	TGG	GAC	TAT	GAA	TAT	GGT	TTC	TGC	TTA	CCC	AAG	1026
ACA	CCC	CGA	TGT	GCT	CCT	GAA	CCA	GAT	GCT	TTT	AAT	CCC	TGT	GAA	GAT	ATT	ATG	1080
GGC	TAT	GAC	TTC	CTT	AGG	GTC	CTG	ATT	TGG	CTG	ATT	AAT	ATT	CTA	GCC	ATC	ATG	1134
GGA	AAC	ATG	ACT	GTC	CTT	TTT	GTT	CTC	CTG	ACA	AGT	CGT	TAC	AAA	CTT	ACA	GTG	1188
CCT	CGT	TTT	CTC	ATG	TGC	AAT	CTC	TCC	TTT	GCA	GAC	TTT	TGC	ATG	GGG	CTC	TAT	1242
CTG	CTG	CTC	ATA	GCC	TCA	GTT	GGT	TCC	CAA	ACC	AAG	GGC	CAG	TAC	TAT	AAC	CAT	1296
GCC	ATA	GAC	TGG	CAG	ACA	GGG	AGT	GGG	TGC	AGC	ACT	GCT	GGC	TTT	TTC	ACT	GTA	1350
TTC	GCA	AGT	GAA	CTT	TCT	GTC	TAC	ACC	GTC	ATC	ACT	GTC	ATA	ACT	GAA	AGA	TGG	1404
CAC	ACC	ATC	ACT	TAT	GCT	ATT	CAC	CTG	GAC	CAA	AAG	CTG	CGA	TTA	AGA	CAT	GCC	1458
ATT	CTG	ATT	ATG	CTT	GGA	GGA	TGG	CTC	TTT	TCT	TCT	CTA	ATA	GCT	ATG	TTG	CCC	1512
CTT	GTG	GGT	GTC	AGC	AAT	TAC	ATG	AAG	GTC	AGT	ATA	TGT	TTC	CCC	ATG	GAT	GTG	1566
GAA	ACC	ACT	CTC	TCA	CAA	GTC	TAT	ATA	TTA	ACC	ATC	CTG	ATT	CTC	AAT	GTG	GTG	1620
GCC	TTT	ATC	ATA	ATT	TGT	GCT	TGC	TAC	ATT	AAA	ATT	TAT	TTT	GCA	GTT	CAA	AAC	1674
CCA	GAA	TTA	ATG	GCT	ACC	AAC	AAA	GAT	ACA	AAG	ATT	GCT	AAG	AAA	ATG	GCA	ATC	1728
CTC	ATC	TTC	ACC	GAT	TTC	ACC	TGC	ATG	GCA	CCT	ATC	TCT	TTT	TTT	GCC	ATC	TCA	1782
GCT	GCC	TTC	AAA	GCG	CCT	CTT	ATC	ACA	GTA	ACC	AAC	TCT	AAA	GTT	TTA	CTG	GTT	1836
CTT	TTT	TAT	CCC	ATC	AAT	TCT	TGT	GCC	CAT	CCA	TTT	CTG	TAT	GCA	ATA	TTC	ACT	1890
AAG	ACA	TTC	CAA	AGA	GAT	TTC	TTT	CTG	TTG	CTG	AGC	AAA	TTT	GGA	TGC	TGT	AAA	1944
CAT	CGG	GCT	GAA	CTT	TAT	CGA	AGG	AAG	GAT	TTT	TCA	GCT	TAT	ACC	TCC	AAC	TGC	1998
AAA	AAT	GGC	TTC	ACT	GGA	TCA	AAT	AAG	CCT	TCT	CAG	TCC	ACC	TTG	AAG	CTG	TCC	2052
ACA	TTG	CAC	TGT	CAA	GGT	ACA	GCT	CTC	CTA	GAC	AAG	ACG	TGC	TAC	ACA	GAG	TGT	2106
TAA	*																	

**Abb. 3.4: Consensus Nukleotidsequenz der *Macaca fascicularis* LHR cDNA mit Aminosäure Translation.** Nukleotidsequenz (obere Zeile) mit Nukleotidnumerierung jeweils rechts neben jeder Zeile. Aminosäure Translation (untere Zeile) im Ein Buchstaben Code, Sternchen repräsentieren einen Translationsstop. Grau unterlegte Boxen repräsentieren CpG reiche Regionen.



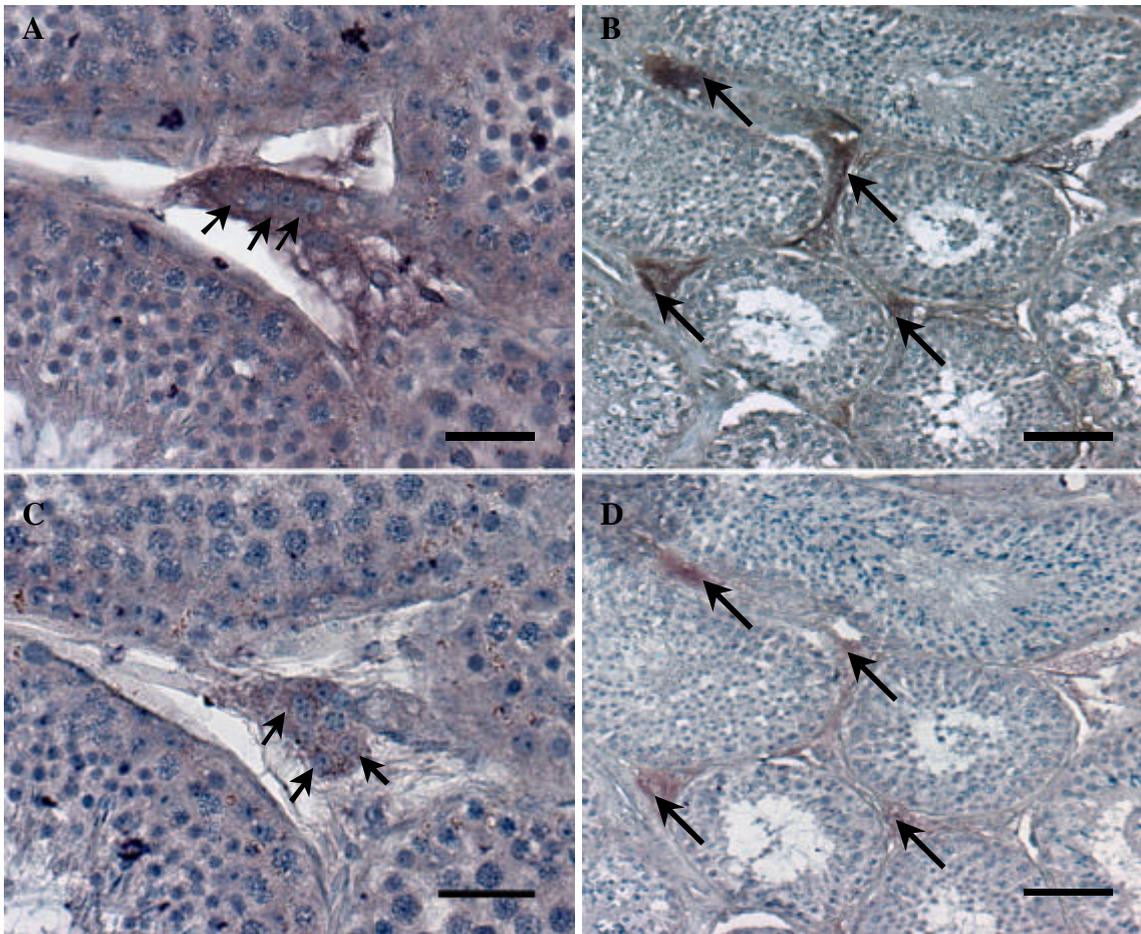
markiert und mit TM 1 bis TM 7 bezeichnet. Die drei extrazellären Loops und drei intrazellulären Loops sind, welche die TM miteinander verbinden sind mit EL 1 bis EL 3 bzw. IL 1 bis IL 3 bezeichnet.

Durch RT PCR konnten sieben überlappende cDNA Fragmente erzeugt werden, die insgesamt zu einer 2153 Nukleotide umfassenden Consensus Sequenz führten, mit einem offenen Leserahmen von Position 1 bis Position 2107. Vom 5'-Ende aus erstreckt sich stromabwärts eine GC reiche Region, die bis zur Position 325 reicht, eine zweite GC reiche Insel folgt von Nukleotid 644 bis 857.

Nach Translation ergab sich ein Rezeptormolekül von 702 Aminosäuren. Die Extrazelluläre Domäne besteht aus 366 Aminosäuren, die transmembrane Region aus 264 Aminosäuren und 72 Aminosäuren bilden die intrazelluläre Domäne. Der vollständige *Macaca fascicularis* LHR weist eine Homologie von 96 % zum humanen LHR, sowie von 92 % zum Weißbüschelaffen LHR, 84 % zum Ratten LHR und 83 % zum Maus LHR auf (Ermittlung durch Clustal W, EMBL-EBI Datenbank).

### **3.2 In situ Hybridisierung**

Zwecks Nachweises der LHR mRNA in den Leydigzellen des testikulären Interstitiums wurde an Hodengewebschnitten von *Macaca fascicularis* eine in situ Hybridisierung vorgenommen. Dazu wurde mittels in vitro Transkription eine der humanen LHR cDNA homologe cRNA Sonde hergestellt (Kap. 2.2.1), mit der die Detektion der LHR mRNA erfolgte (Kap. 2.2).



**Abb. 3.6: In situ Hybridisierung der LHR mRNA in den Leydig Zellen mit einer hLHR spezifischen cRNA Sonde.** Hoden Gewebe des Java Affen *Macaca fascicularis*. A, B: Hybridisierung mit „antisense“-Sonde. Die an die Ziel mRNA hybridisierte Sonde ist durch die Farbreaktion (Alkalische Phosphatase katalysiert Farbumschlag des Substrates NBT/BCIP) nachweisbar (Pfeil ). C, D: Hybridisierung mit „Sense“-Sonde, Negativkontrolle (Pfeil ). A, C: Vergrößerung 250x, Linie entspricht 50  $\mu\text{m}$ . B, D: Vergrößerung 100x, Linie entspricht 100  $\mu\text{m}$

Durch in situ Hybridisierung ließ sich die LHR mRNA im Cytoplasma der Leydigzellen nachweisen, wie die Abb. 3.6 A zeigt. Nach Inkubation des Gewebes mit der „antisense“ cRNA Sonde, konnte ein Signal nachgewiesen werden. Zwar war es in seiner Intensität schwach, jedoch vorhanden, was der Vergleich mit der Negativkontrolle (Abb. 3.6. C) verdeutlicht. Insgesamt zeigt die Negativkontrolle eine hohe Hintergrundfärbung, die durch Vergleich der Übersichtsaufnahmen (Abb. 3.6 B, D) sichtbar wird.

### 3.3 Studien zur Etablierung der Antisense Oligonukleotidtechnik – in vitro

Durch die hier durchgeführten Experimente sollte die genspezifische translationshemmende Wirkung von AON Molekülen am Zellkulturmodell der hLHR CHO Zellen ermittelt werden.

Die in vitro Experimente zur Etablierung der AON Methode wurden in folgender Reihenfolge durchgeführt:

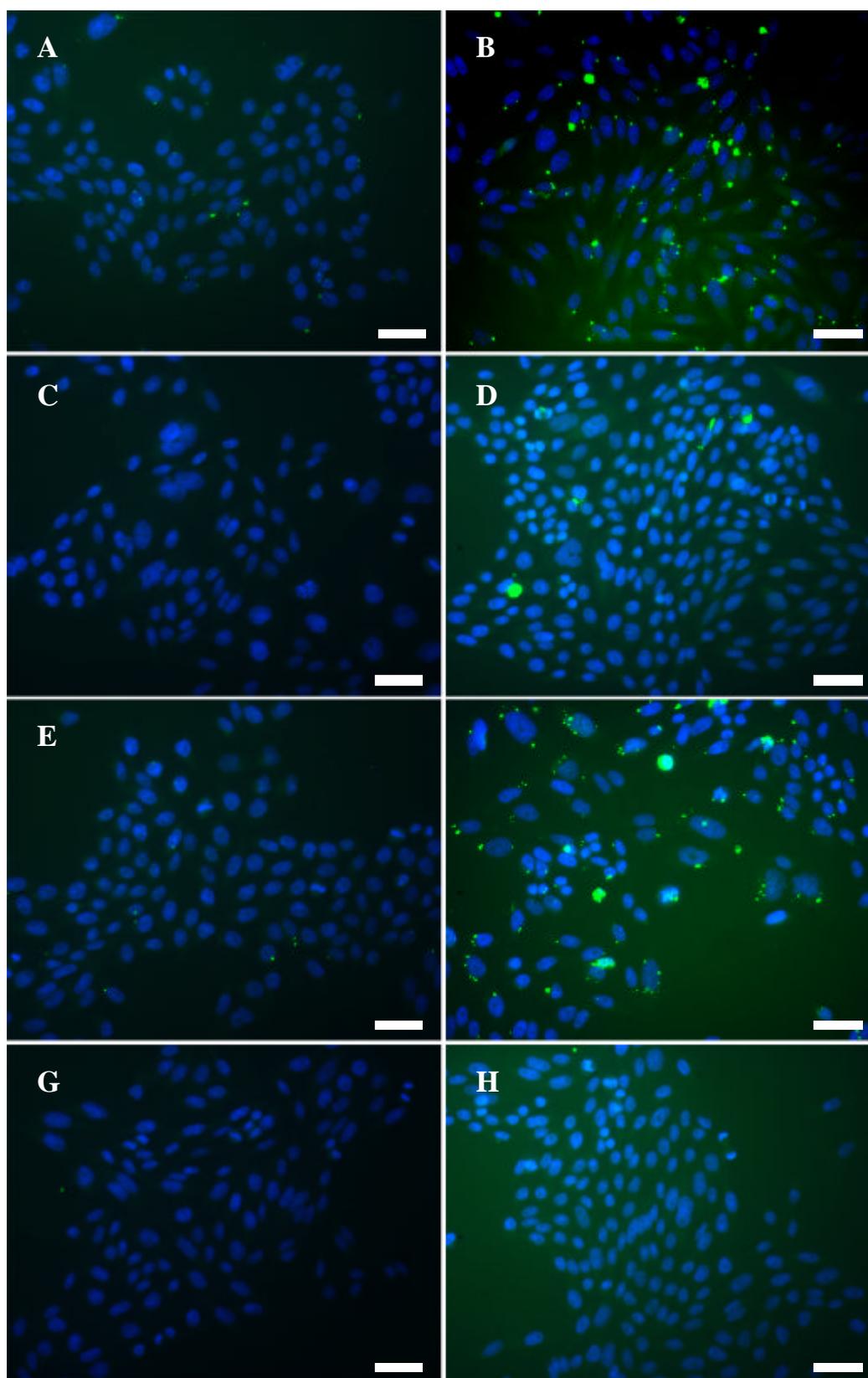
1. Aufnahme markierter Oligonukleotidmoleküle in die Zelle
2. Überprüfung der Hormon Rezeptor Bindung durch hCG Stimulation
3. Ermittlung der optimalen Stimulationsdauer
4. Abhängigkeit der cAMP Konzentration von der Zellzahl
5. Testung verschiedener AON Moleküle
6. Ermittlung einer Dosisabhängigkeit der AON Wirkung
7. Testung der AON Wirkung unter Oligofectamin Zusatz

#### 3.3.1 Aufnahme FITC markierter Kontrolloligonukleotide in CHO-Zellen

Die Abb. 3.7 zeigt die Aufnahme des FITC markierten KON (0,2  $\mu\text{M}$  bzw. 0,4  $\mu\text{M}$ ) in hLHR CHO Zellen mit und ohne Oligofectamin.

Zunächst ließ sich sowohl eine zeit- als auch eine konzentrationsabhängige Aufnahme des FITC-KON in die Zellen feststellen, da nach 24 stündiger Inkubation (Abb. 3.7, rechte Spalte) deutlich stärkere Fluoreszenzsignale im Cytoplasma der Zellen zu beobachten waren als nach 4 stündiger FITC KON Inkubation (Abb. 3.7, linke Spalte).

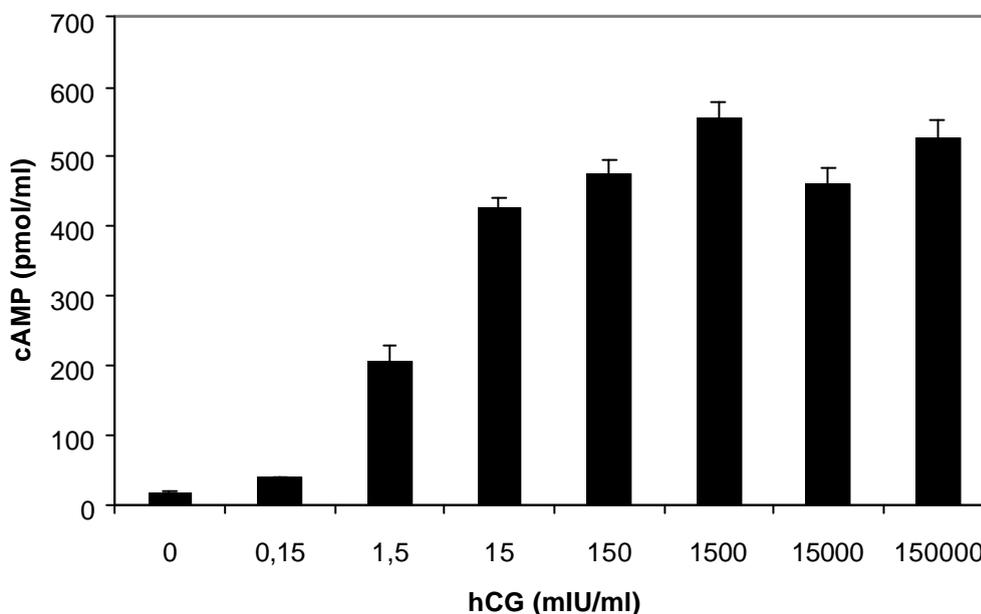
Zu beiden Inkubationszeitpunkten bewirkte der Zusatz von Oligofectamin eine beschleunigte FITC KON Aufnahme in die Zelle. Bei gleicher KON Konzentration zeigte sich stärkere Fluoreszenz in den mit Oligofectamin behandelten Zellen (Abb. 3.7 A, B, E, F) als in den Oligofectamin unbehandelten (Abb. 3.7 C, D, G, H). Das schwächste Signal war daher im Falle der 0,2  $\mu\text{M}$  FITC KON Konzentration ohne Oligofectaminzusatz Zellen nach 4 stündiger Inkubationsdauer, das stärkste für die 0,5  $\mu\text{M}$  Konzentration mit KON nach 24 stündiger Inkubationsdauer festzustellen.



**Abb. 3.7: Zelluläre Aufnahme des FITC markierten KON in hLHR CHO Zellen.** Inkubationsdauer 4 h (linke Spalte) bzw. 24 h (rechte Spalte). FITC KON Konzentration 0,2  $\mu\text{M}$  (A-D) bzw. 0,4  $\mu\text{M}$  (E-H). Inkubation mit Oligofectamin (A, B, E, F) bzw. ohne Oligofectamin (C, D, G, H). Zellkernfärbung: DAPI. Vergrößerung 250x. Markierung entspricht 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.2 Überprüfung der cAMP Produktion durch hCG Stimulation

Die verwendete CHO (Chinese Hamster Ovarian) Zelllinie exprimiert stabil den humanen LH Rezeptor (hLHR), daher die Bezeichnung hLHR CHO Zellen. Um zunächst die Stimulierbarkeit der Signaltransduktionskaskade durch hCG zu untersuchen, wurden die Zellen (100 000 / well; 6 well plate) mit hCG (Choragon 5000®, Serono) in einer Dosierung von 0-150 000 mIU/ml für zwei Stunden stimuliert. Als hCG Trägerlösung diente eine phosphatgepufferte Salzlösung mit Glucosezusatz (PBGI). Unmittelbar nach der Stimulation wurden die Zellkulturplatten eingefroren, um ein Aufbrechen der Zellen zu erreichen und somit den Gehalt des intrazellulären und extrazellulären, also des gesamten cAMPs, messen zu können (Kap.2.4.1.6).

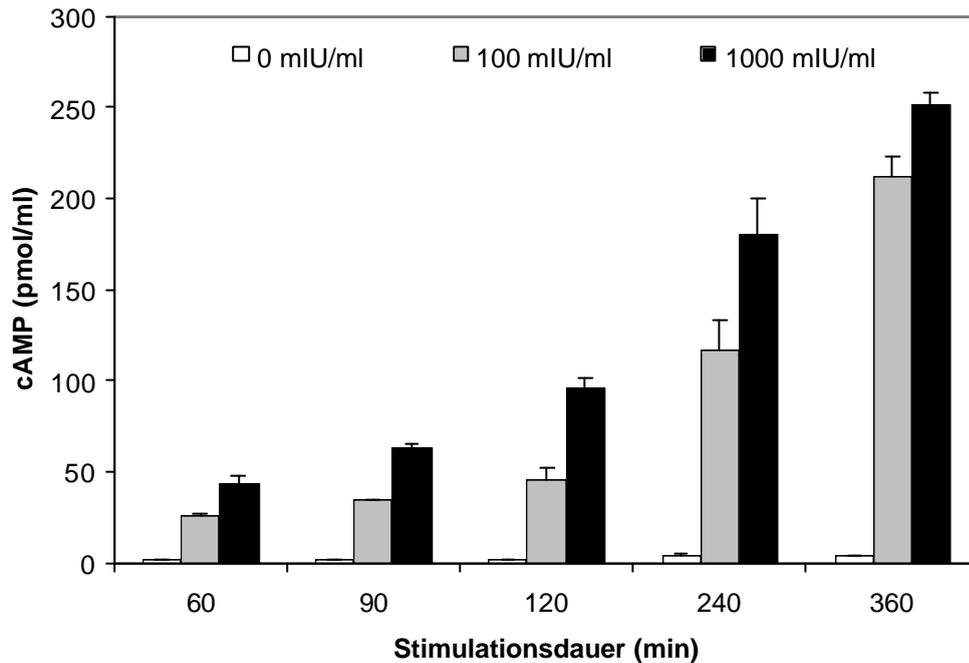


**Abb. 3.8: hCG Dosisabhängigkeit der cAMP Konzentration in hLHR CHO Zellen.** 100 000 Zellen/well (6 well Platte) wurden mit verschiedenen hCG Dosierungen für 2 h stimuliert. Säulen repräsentieren jeweils die cAMP Mittelwerte einer Doppelbestimmung mit Standardabweichungen.

In der Zelle wird cAMP in verschiedenen Stoffwechselwegen als second messenger benutzt, daher produzieren die Zellen per se etwa 20 pmol/ml cAMP ohne durch hCG stimuliert zu werden. Durch Zusatz von hCG in den Konzentrationen von 0,15 bis 150 mIU/ml war ein Anstieg der cAMP Produktion um den Faktor 25 auf 475 pmol/ml cAMP gegenüber den unbehandelten Zellen zu verzeichnen. Durch die Erhöhung der hCG Dosis um weitere Zehnerpotenzen war allerdings kein weiterer signifikanter Anstieg der cAMP Produktion zu beobachten.

### 3.3.3 Ermittlung der optimalen Stimulationsdauer mit hCG

Zwecks möglichst geringen Einsatzes an hCG zur Stimulation wurde die Kultivierung der Zellen auf 96 well plates umgestellt. Zur Ermittlung der Zeitabhängigkeit der hCG Wirkung wurden 20 000 Zellen pro well eingesetzt, mit einer Dosierung von 0 bis 1000 mIU/ml für eine Dauer von 1h bis 6h stimuliert und anschließend cAMP bestimmt.

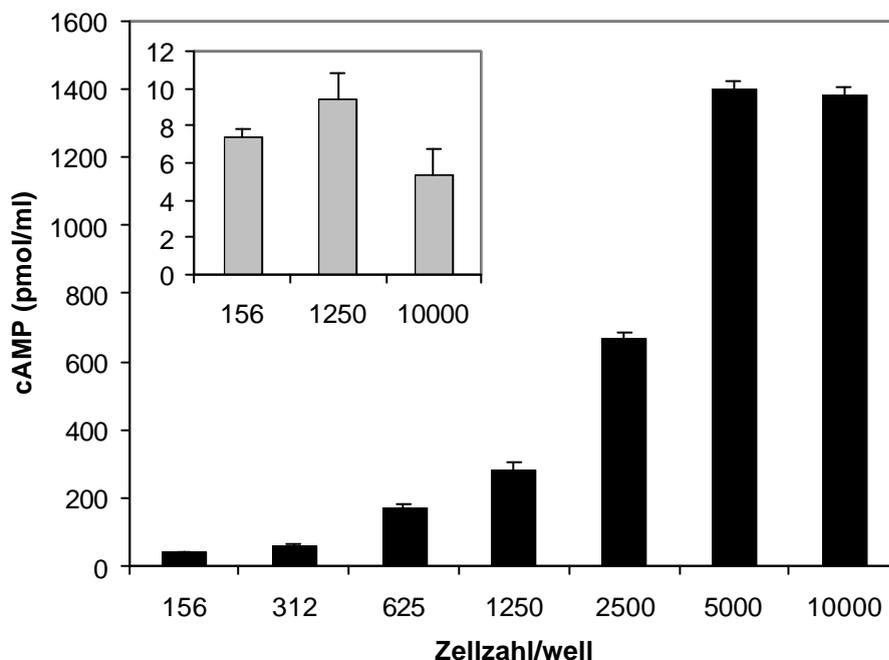


**Abb.3.9: Zeitabhängigkeit der hCG Wirkung in hLHR CHO Zellen.** 20 000 Zellen/well (96 well Platte) ohne hCG Zusatz, bzw. mit 100 und 1000 mIU/ml hCG stimuliert für 1-6 h. Säulen repräsentieren jeweils die cAMP Mittelwerte einer Doppelbestimmung mit Standardabweichungen.

Produzierten die Zellen ohne Zusatz von hCG nach einer Stunde Stimulationsdauer nur 2,1 pmol/ml cAMP, so waren es nach drei stündiger Stimulation schon 4,3 pmol/ml, so daß eine Verdopplung der Produktion eingetreten war. Unter Zusatz von 100 mIU/ml hCG wurde im Zeitverlauf ein Anstieg der cAMP-Produktion um den Faktor acht erreicht, nämlich von 26 pmol/ml cAMP nach einer Stunde auf 212 pmol/ml cAMP nach sechs Stunden. Verglichen mit den unbehandelten Zellen war nach zweistündiger Stimulation mit 100 mIU/ml hCG somit eine um den Faktor 19 gesteigerte cAMP Produktion (2,4 pmol/ml versus 46,1 pmol/ml) zu beobachten, welche schon ausreichend war, um eine inhibierende Wirkung von Antisense Oligonukleotiden auf die cAMP Produktion zu untersuchen. Um also einen möglichst wirtschaftlichen Einsatz des hCG zu gewährleisten, konnte auf eine höhere Dosierung des hCG (1000 mIU/ml) in den folgenden Experimenten verzichtet werden.

### 3.3.4 Abhängigkeit der cAMP Konzentration von der Zellzahl

Das von den hLHR CHO Zellen unter hCG Stimulation produzierte cAMP wurde mit Hilfe des cAMP ELISA Assays detektiert (Kap. 2.4.1.6), der einen Meßbereich von 0 bis 243 pmol/ml umfaßt. Um den Verbrauch an Assayplatten zu minimieren, war es ein Ziel, die Zelldichte in den Experimenten so einzustellen, daß die unter hCG Stimulation maximal erreichten cAMP Konzentrationen noch im linearen Meßbereich lagen, so daß eine Verdünnung der Proben und eine erneute Messung vermieden werden konnte. Dazu wurden Zellen in einer Dichte von 156 Zellen pro well bis 10 000 Zellen pro well ausgesät, für zwei Stunden mit hCG (100 mIU/ml) bzw. ohne hCG stimuliert und anschließend cAMP bestimmt.



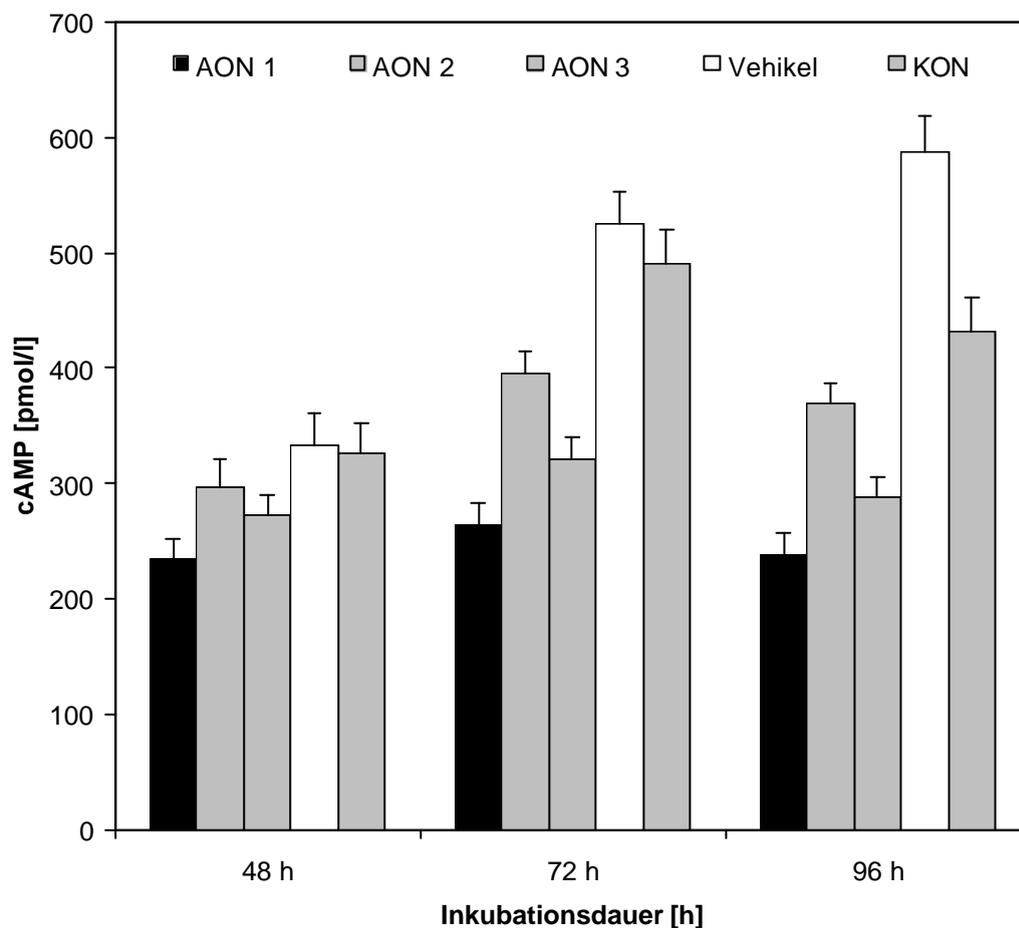
**Abb. 3.10: Abhängigkeit der cAMP Konzentration von der hLHR CHO Zellzahl.** 156–10000 Zellen/well (96 well Platte) mit 100 mIU/ml hCG für 2 h stimuliert. Säulen repräsentieren jeweils die cAMP Mittelwerte einer Doppelbestimmung mit Standardabweichungen. Insert: Zellen ohne hCG Zusatz.

Unter hCG Stimulation (100 mIU/ml) lagen die resultierenden cAMP Konzentrationen bis zu einer Zellzahl von 1250 pro well noch im linearen Meßbereich des Assays. Ab einer Zellzahl von 2500/well wurde der lineare Meßbereich überschritten und das Ergebnis war daher nicht mehr verlässlich. Die Verwendung einer Zellzahl von 1250 Zellen pro well wurde daher für folgende Experimente festgelegt, so war gewährleistet, daß sowohl die

von den nicht stimulierten Zellen produzierten cAMP Konzentrationen (s. Abb. 3.10 Insert) als auch die der stimulierten Zellen verlässlich detektiert werden konnten.

### 3.3.5 Überprüfung der translationshemmenden Wirkung von drei Antisense Oligonukleotid Molekülen

Mit dem Ziel, die Translation der LHR mRNA in den hLHR CHO Zellen zu inhibieren (Kap. 1, Abb. 1.3) und somit eine verminderte cAMP Produktion zu erzeugen, wurden insgesamt drei verschiedene AON (AON 1, AON 2, AON 3; Kap. 2.4.1.1 ) getestet. Dazu wurden 1250 Zellen pro well eingesetzt. Diese wurden dann für 48, 72 bzw. 96 Stunden mit je einem AON (15  $\mu$ M) bzw. Kontroll Oligonukleotid (KON, 15  $\mu$ M) inkubiert und anschließend für zwei Stunden mit hCG (100 mIU/ml) stimuliert. Danach erfolgte die Bestimmung des total cAMP.



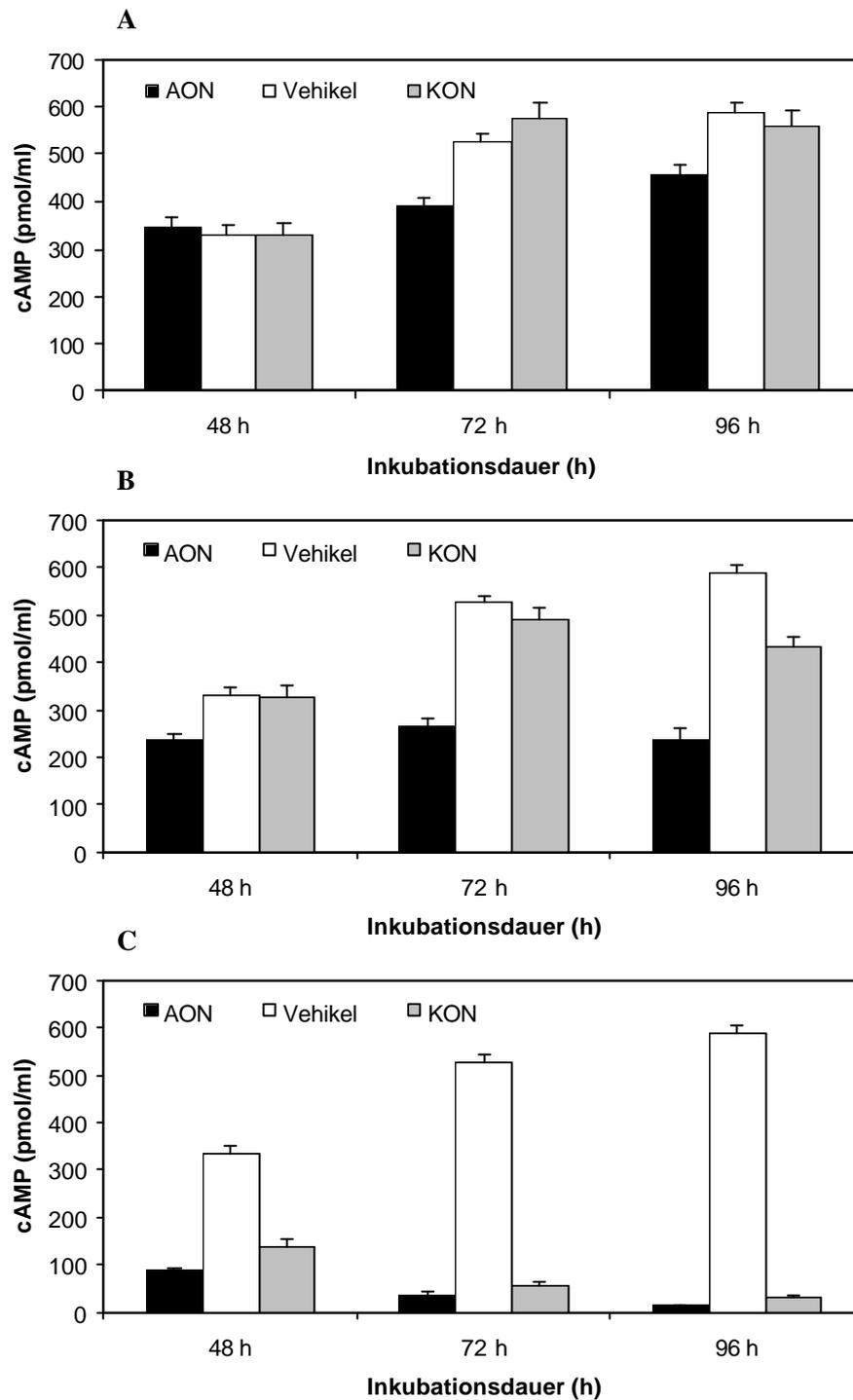
**Abb. 3.11: Effektivität verschiedener Oligonukleotide (AON 1, AON 2, AON 3) nach unterschiedlichen Inkubationszeiträumen.** 1250 Zellen/well (96 well Platte) inkubiert mit 15  $\mu$ M AON 1, AON 2, AON 3 bzw. KON für 48, 72, bzw. 96 h und stimuliert mit 100 mIU/ml hCG für 2 h. Säulen repräsentieren jeweils die cAMP Mittelwerte einer Doppelbestimmung mit Standardabweichungen.

Ein Vergleich der cAMP Produktion der Zellen mit bzw. ohne AON Zusatz zeigte zunächst einen die cAMP Produktion hemmenden Effekt für alle drei AON zu allen Inkubationszeitpunkten. Nach einer Inkubationsdauer von 48 h bewirkte AON 1 eine Verminderung des cAMP Spiegels um 29 %, AON 2 um 11 % und AON 3 um 18 % gegenüber den AON unbehandelten Zellen. Nach einer Inkubationsdauer von 72 h ergab sich bereits eine Hemmung der cAMP Produktion von 50 % für AON 1, 25 % für AON 2 und 39 % für AON 3. Damit war das AON 1 eindeutig das effektivste aller getesteten AON. Nach 96 stündiger Inkubationsdauer zeigte es zwar eine Verminderung der cAMP Konzentration um 60 % versus AON unbehandelten Zellen, jedoch traten unter diesen Bedingungen offensichtlich stärkere zytotoxische Effekte auf. Diese lassen sich aus dem Vergleich der AON/KON unbehandelten Zellen mit den KON behandelten Zellen ableiten. Der Zusatz von KON bewirkte nach 96 stündiger Inkubationsdauer eine Absenkung des cAMP Spiegels um 27 % versus unbehandelter Zellen, während dieser Effekt nach einer Inkubationsdauer von 48 h nur 2 % und nach 72 h 7 % betrug. Für nachfolgende Experimente wurde AON 1 eingesetzt.

### **3.3.6 Dosisabhängigkeit der Antisense Oligonukleotid Wirkung**

Ziel diese Experimentes war die Ermittlung einer AON 1 Dosis, die unter optimaler Inkubationsdauer zu einem maximalen Hemmeffekt der cAMP Produktion führte und gleichzeitig minimale zytotoxische Wirkung hatte.

Zu diesem Zweck wurden 1250 hLHR CHO Zellen pro well ausgesät und mit AON 1 (10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 20  $\mu$ M), mit KON (10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 20  $\mu$ M), bzw. ohne AON/KON Zusatz (Vehikel) für 48 h, 72 h bzw. 96 h inkubiert, danach für 2 h mit hCG (100 mIU/ml) stimuliert.

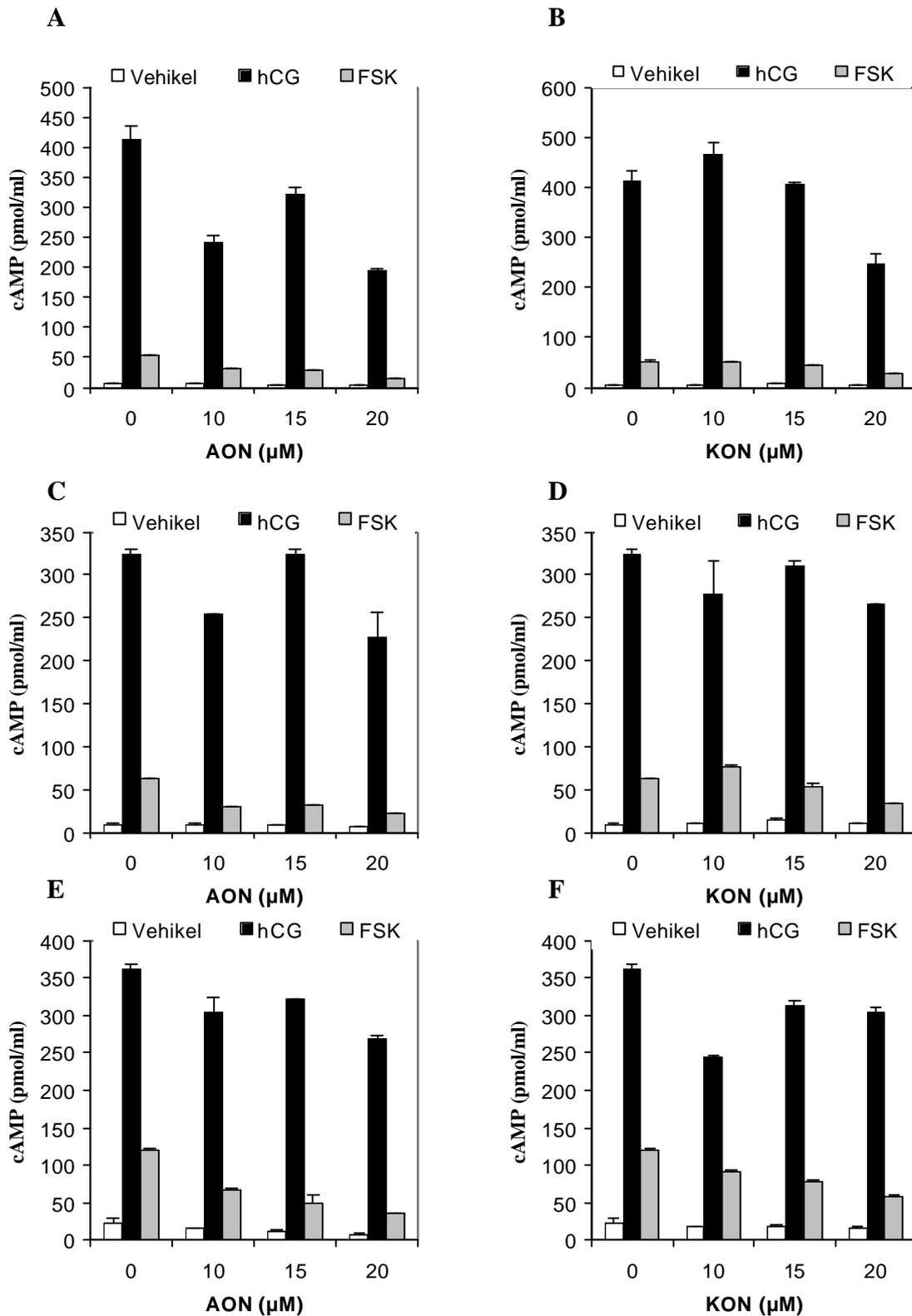


**Abb. 3.12: Effektivität des AON 1.** 1250 Zellen/well (96 well Platte). Inkubiert ohne AON Zusatz oder mit AON 1 bzw. KON für 48, 72, 96 h. Stimuliert mit 100 mIU/ml hCG für 2 h. A: AON bzw. KON Konzentration 10  $\mu$ M, B: 15  $\mu$ M, C: 20  $\mu$ M. Säulen repräsentieren jeweils die cAMP Mittelwerte einer Doppelbestimmung mit Standardabweichungen.

Der Vergleich zwischen AON behandelten und AON unbehandelten Zellen zeigte nach 48 stündiger Inkubation unter 10  $\mu$ M AON/KON Dosierung keinen Hemmeffekt auf die cAMP Produktion. Nach 72 h ergab sich eine Hemmung um 26 %, nach 96 h um 22 %. Die Wirkung des AON 1 verstärkte sich offensichtlich durch Einsatz der 15  $\mu$ M Konzentration. Hier wurde bereits nach einer Inkubationsdauer von 48 h eine 29 %ige Absenkung des cAMP Spiegels beobachtet, welche nach 72 h schon 50 %, nach 96 h 60 % betrug. Unter Verwendung der 20  $\mu$ M Dosierung von AON bzw. KON kam es schon nach einer Inkubationszeit von 48 h zu zytotoxischen Effekten. Vergleicht man die unbehandelten Zellen mit den KON behandelten so ist auffällig, daß allein durch Zusatz des KON der cAMP Spiegel um 59 % niedriger war als der unbehandelte Zellen (136 pmol/ml vs. 333 pmol/ml). Nach 72 h lag er um 90 %, nach 96 h um 95 % niedriger als der von den Vehikel behandelten Zellen. Insgesamt ließ sich unter Verwendung einer 15  $\mu$ M AON 1 Konzentration eine dosisabhängige Wirkung feststellen.

### **3.3.7 Reproduzierbarkeit der Antisense Oligonukleotid Wirkung**

Nachdem ein erster Hinweis auf die Wirkung des AON 1 vorlag (3.3.6, Abb. 3.12), sollte in einem folgenden Experiment sowohl die Reproduzierbarkeit des Ergebnisses überprüft als auch ein Vergleich mit AON/KON unbehandelten und nicht hCG stimulierten Zellen angestellt werden. Dazu wurde der gleiche Versuchsaufbau wie in 3.3.6 gewählt, jedoch wurden als Kontrolle zusätzlich AON/KON unbehandelte Zellen mitgeführt, welche nicht mit hCG stimuliert, sondern nur mit der hCG Trägersubstanz PGBI inkubiert wurden. Weiterhin wurde eine Forskolin Kontrolle mitgeführt. Forskolin stimuliert als unspezifischer Aktivator der Adenylatzyklase die cAMP Produktion unabhängig von der Hormon Rezeptor Bindung. Mit Hilfe der Forskolin Stimulation kann daher die Integrität der Signaltransduktionskaskade überprüft werden. Im Fall einer zytotoxischen Wirkung der AON/KON Moleküle würde der Signaltransduktionsapparat geschädigt und die Stimulierbarkeit durch Forskolin wäre gegenüber AON/KON unbehandelten Zellen herabgesetzt.



**Abb. 3.13: Effektivität des AON 1 unter hCG- bzw. Forskolin-Stimulation.** 1250 Zellen/well (96 well Platte) für 2 h ohne hCG, mit 100 mIU/ml hCG bzw. mit 50 μM Forskolin. A,B: AON/KON Inkubation für 48 h, C,D: 72 h, E, F: 96 h. Säulen repräsentieren jeweils die cAMP Mittelwerte einer Doppelbestimmung mit Standardabweichungen.

Ein Vergleich der AON unbehandelten mit den AON inkubierten Zellen nach hCG Stimulation zeigte zunächst einen Hemmeffekt des AON 1 auf die cAMP Produktion für alle Inkubationszeiträume und alle verwendeten Konzentrationen. Eine Ausnahme bildete die 15  $\mu\text{M}$  AON 1 Konzentration nach 72 stündiger Inkubation.

Für die Inkubationszeit von 48 h belief sich die Hemmung der cAMP Produktion auf 41 % (10  $\mu\text{M}$ ), 22 % (15  $\mu\text{M}$ ) bzw. 52% (20  $\mu\text{M}$ ), während eine 72 stündige Inkubation eine Hemmung von 22 % (10  $\mu\text{M}$ ) bzw. 30 % (20  $\mu\text{M}$ ) bewirkte; für die 15  $\mu\text{M}$  Konzentration ergab sich kein Hemmeffekt. Dieser war jedoch nach 96 stündiger Inkubation mit AON 1, wenn auch nur in geringem Maße feststellbar: 16 % (10  $\mu\text{M}$ ), 11 % (15  $\mu\text{M}$ ) und 26 % (20  $\mu\text{M}$ ). Bei Betrachtung aller Inkubationszeiträume und aller verwendeten Konzentrationen war kein dosisabhängiger Effekt feststellbar.

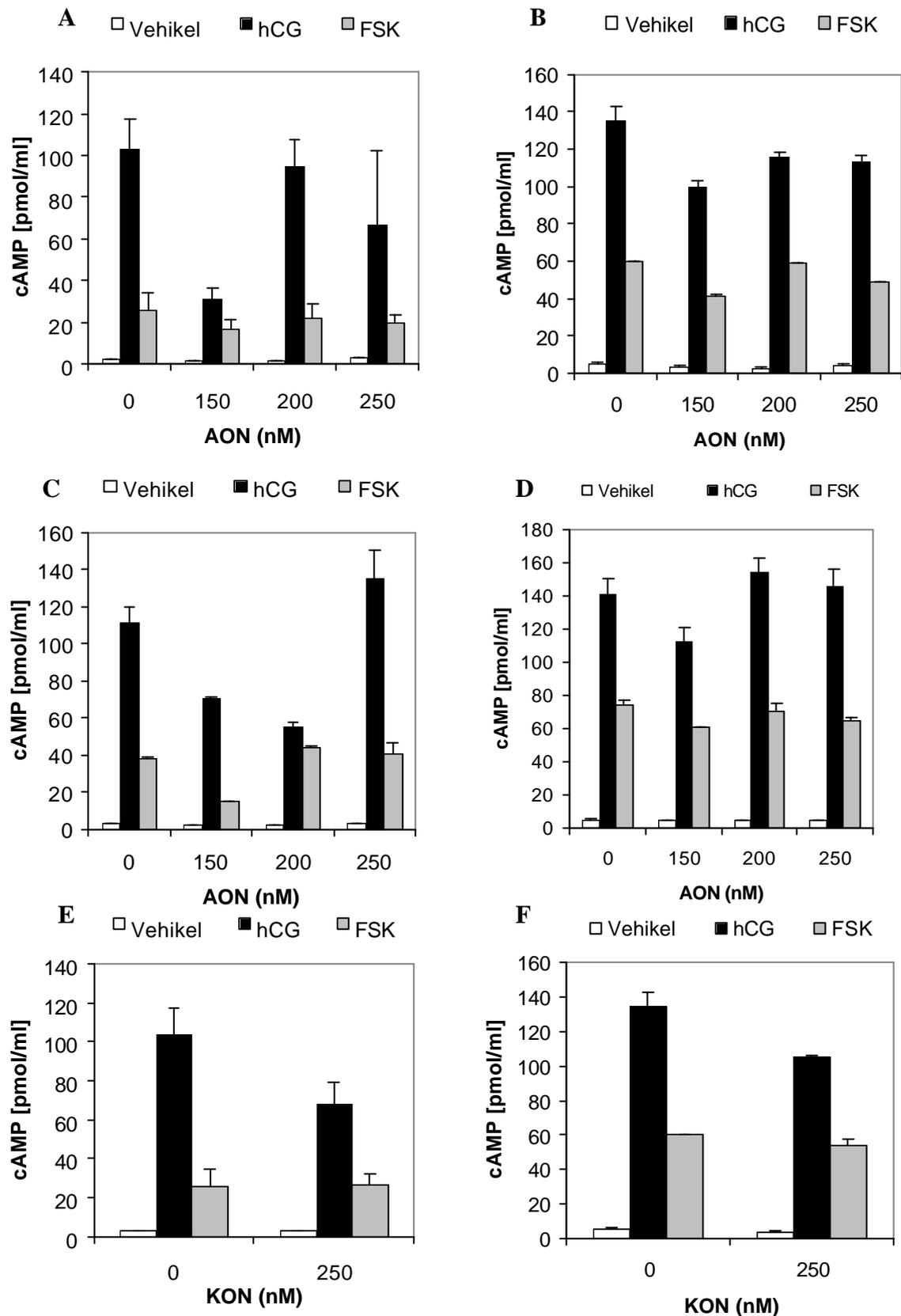
Zwischen den KON unbehandelten und den KON behandelten hCG stimulierten Zellen ergab sich erwartungsgemäß kein Hemmeffekt auf die cAMP Produktion mit Ausnahme der 96 stündigen Inkubation mit KON: 33 % (10  $\mu\text{M}$ ), 13 % (15  $\mu\text{M}$ ) bzw. 16 % (20  $\mu\text{M}$ ). Diese Effekte sind, ebenso wie die Hemmung des cAMP Spiegels nach 48 h und 20  $\mu\text{M}$  KON Konzentration, wahrscheinlich auf zytotoxische Effekte des KON zurückzuführen.

Zellschädigende Wirkungen lassen sich bestätigen durch die Ergebnisse der Stimulation der Zellen mit Forskolin. Forskolin ist ein unspezifischer Aktivator der Adenylatzyklase und aktiviert daher die cAMP Produktion ohne daß eine Bindung an den LH Rezeptor stattfinden muß. Jegliche zytotoxische Wirkungen auf die cAMP Produktionsmaschinerie der Zelle zeigen sich daher in einer verminderten cAMP Stimulierbarkeit durch Forskolin.

Ein Vergleich der AON unbehandelten mit AON behandelten und Forskolin stimulierten Zellen zeigte, daß mit zunehmender AON-Konzentration der cAMP Spiegel nach Forskolin Stimulation sank (um maximal 73 % nach 48 h, 66 % nach 72 h bzw. 70 % nach 96 h), und zwar um so stärker, je länger die AON Inkubation dauerte. Bei der Verwendung von KON war der cAMP hemmende Effekt nicht gleichermaßen stark. Während sich nach 48 stündiger KON Inkubation fast keine Veränderung der cAMP Spiegel ergab, zeigte sich nach 72 h ein Effekt unter der Verwendung von 20  $\mu\text{M}$  KON Konzentration. Nach 96 stündiger Inkubationsdauer reduzierte sich die cAMP Konzentration ebenfalls mit zunehmender KON Konzentration. Dieses Ergebnis ist nicht plausibel, da AON und KON in ihrer Konstitution gleich sind und sich lediglich in ihrer Basensequenz unterscheiden.

### **3.3.8 Antisense Oligonukleotid Wirkung unter Oligofectamin Additiv**

Ziel dieses Experimentes war die Ermittlung einer besseren AON Wirkung unter Verwendung von Oligofectamin, welches die Aufnahme des AON in die Zelle erleichtern soll (3.3.1). Dazu wurden 1250 hLHR CHO Zellen pro well ausgesät und für 48 bzw. 72 h mit AON 1 bzw. AON 3 oder KON inkubiert. In Kombination mit Oligofectamin ist die AON Konzentration um den Faktor 10 zu reduzieren gegenüber einem Experiment ohne Oligofectamin (Schlingensiepen et al., 1997), so daß für beide AON Konzentrationen von 150 nM, 200 nM und 250 nM, für das KON 250 nM eingesetzt wurden. Nach abgeschlossener AON/KON Inkubationszeit wurden die Zellen für zwei Stunden mit hCG (100 mIU/ml), FSK (50 µM) bzw. Vehikel (PBGI) stimuliert, danach der gesamt cAMP bestimmt.



**Abb. 3.14: Effektivität von AON 1 und AON 3 unter Oligofectamin Zusatz.** 1250 Zellen/well (96 well Platte) inkubiert ohne AON bzw. KON Zusatz, bzw. mit 150-250 nM AON bzw. 250 nM KON für 48 h (A, C, E) oder für 72 h (B, D, F). AON 1(A,B), AON 3(C, D); KON (E, F). Stimuliert für 2 h ohne hCG, mit 100 mIU/ml hCG, bzw. mit 50  $\mu$ M Forskolin. Säulen repräsentieren jeweils die cAMP Mittelwerte einer Doppelbestimmung mit Standardabweichungen.

Zunächst ist bemerkenswert, daß sowohl unter AON 1 als auch unter AON 3 Behandlung und Oligofectamin Zusatz nach 48 stündiger Inkubation ein stärkerer Hemmeffekt eintrat als nach 72 stündiger Inkubation (Abb. 3.7 A-D). Während für AON 1 (150 nM) nach 48 h Inkubationsdauer eine Reduktion des cAMP Spiegels um 70 % gegenüber den AON unbehandelten Zellen erreicht wurde, waren es nach 72 stündiger Inkubation lediglich 26 %.

Gleiches galt für AON 3, wenn auch der Effekt unter 150 nM AON Konzentration nicht so stark war wie im Falle von AON 1: Hemmung der cAMP Produktion um 37 % (48 h) bzw. um 20 % (72 h).

Es ergab sich jedoch nach einer Inkubationsdauer von 48 h für beide AON kein Dosis abhängiger Hemmeffekt (Abb. 3.7 A, C). Mit zunehmender AON 1 Konzentration über 150 nM hinaus verminderte sich der Hemmeffekt auf nur 8 %ige (200 nM) bzw. 36 %ige (250 nM) Hemmung.

Für AON 3 war für die Konzentrationen 150 nM und 200 nM ein Dosis abhängiger Effekt zu beobachten, der sich aber unter Verwendung einer 250 nM Konzentration nicht fortführen, sondern eher eine cAMP stimulierende Wirkung vermuten ließ.

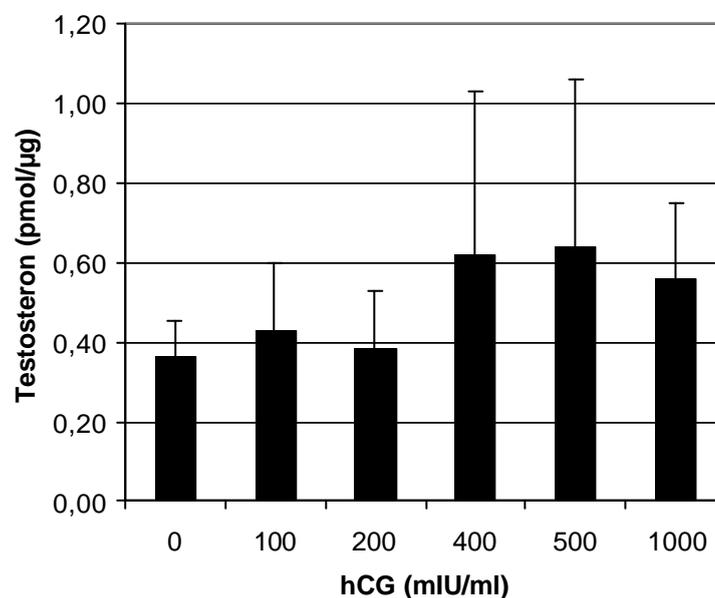
Ein Vergleich der FSK stimulierten Zellen zeigte für alle AON behandelten Zellen eine gleichbleibende Stimulierbarkeit gegenüber dem AON unbehandelten Material (Ausnahme bildete der Wert für 150 nM AON 3 nach 48 h).

Unter Verwendung von 250 nM KON (48 h) (Abb. 3.7 E) zeigte sich nach hCG Stimulation eine Verminderung der cAMP Produktion gegenüber den KON unbehandelten Zellen, woraus sich ein unspezifischer hemmender Einfluß des KON auf die cAMP Produktion ergab. Nach 72 h (Abb. 3.7 F) zeigte sich nahezu der gleiche Hemmeffekt für die Verwendung von 250 nM KON bzw. AON 1 (22 % versus 16 %). Für weitere Experimente ist es daher notwendig, für alle gewählten AON Konzentrationen entsprechende KON Konzentrationen einzusetzen. Dies würde einen Vergleich zwischen AON und KON behandelten Zellen ermöglichen und somit einen Korrekturfaktor für die AON Wirkung bieten.

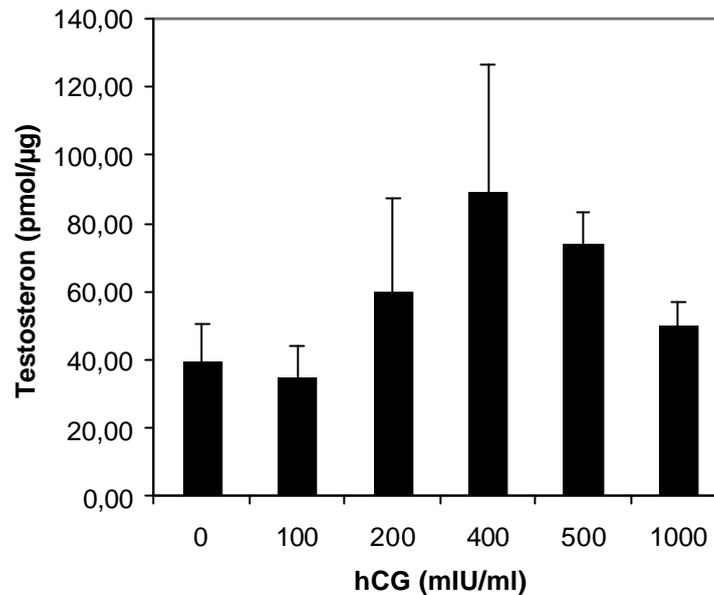
### 3.4 Studien zur Antisense Oligonukleotid Technik in Organkultur

#### 3.4.1 Stimulierbarkeit der Testosteronproduktion in der Hodengewebeskultur von *Callithrix jacchus* und *Mus Musculus*

Während die hLHR CHO Zellkultur ein gutes Modell für Antisense Oligonukleotid Experimente auf zellulärer Ebene bietet, ist das Modell der Organkultur ein nächst höherer experimenteller Schritt, bleiben doch zumindest kleine Areale des Gewebeverbandes intakt und kommen daher der in vivo Situation näher (Kap. 2.4.2). Ziel dieser Experimente war daher, die Stimulierbarkeit der Hodengewebefragmente von *Callithrix jacchus* und *Mus Musculus* mit hCG (0, 100, 200, 400, 500 und 1000 mIU/ml für 24 h) zu ermitteln. Da die in der Hodenorgankultur vorhandenen Leydig Zellen in der Lage sind Testosteron zu produzieren, galt dies als Detektionsparameter im Kulturmedium nach erfolgter hCG Stimulation.



**Abb. 3.15 A: hCG Stimulation der *Callithrix jacchus* Organkultur.** 16 Organkulturfragmente (4 Fragmente pro well pro hCG Konzentration) unstimuliert, bzw. stimuliert mit 100-1000 mIU/ml hCG. Säulen repräsentieren jeweils die Mittelwerte einer Vierfachbestimmung mit Standardabweichungen.



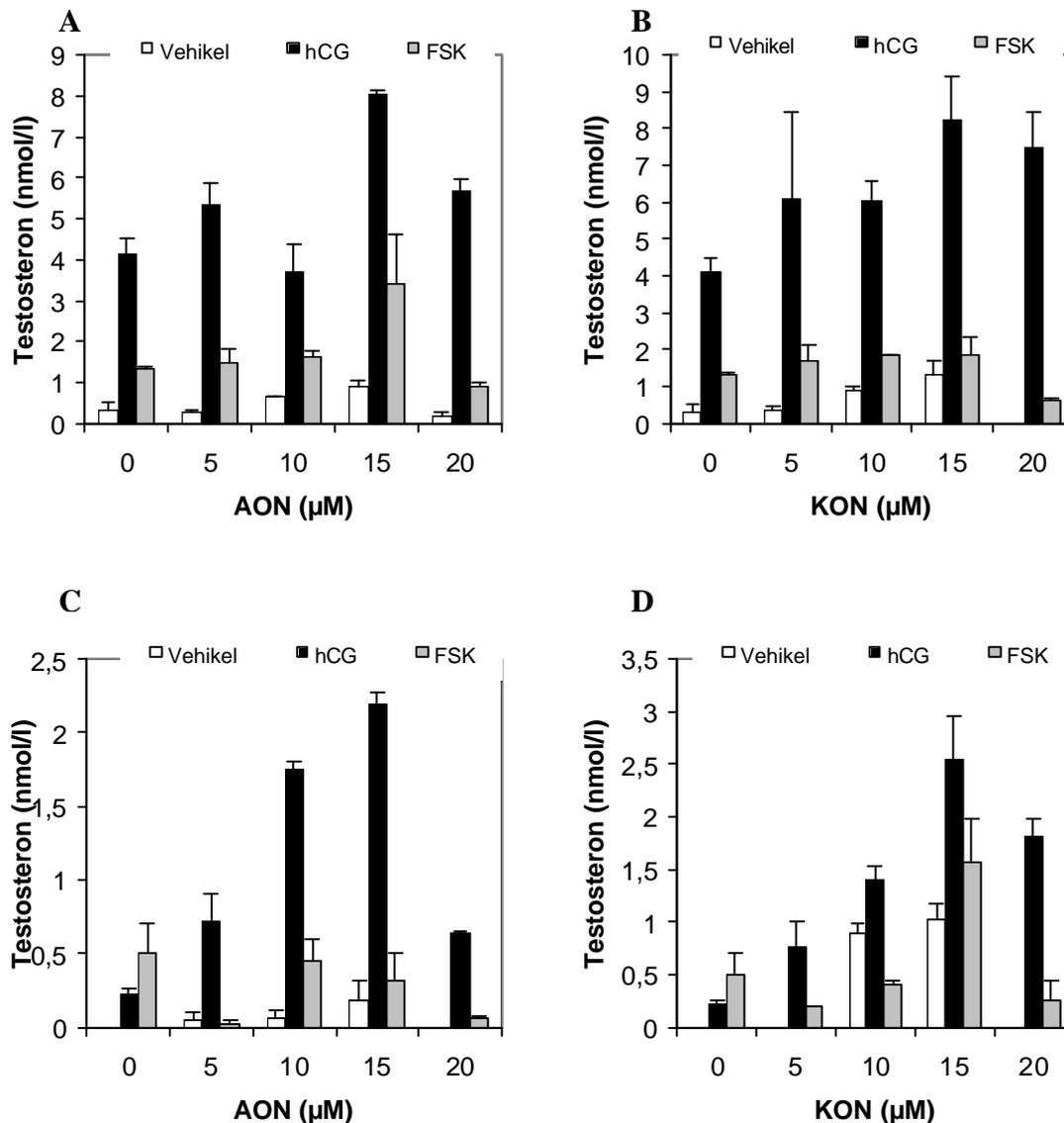
**Abb. 3.15 B: hCG Stimulation der *Mus musculus* Organkultur.** 16 Organkulturfragmente (4 Fragmente pro well pro hCG Konzentration) unstimuliert, bzw. stimuliert mit 100-1000 mIU/ml hCG. Säulen repräsentieren jeweils die Mittelwerte einer Vierfachbestimmung mit Standardabweichungen

Für die Organkultur des Hodengewebes von *Callithrix jacchus* ließ sich keine signifikante Stimulierbarkeit der Testosteronproduktion in den Leydig Zellen durch hCG feststellen (Abb. 3.15 A). Während die Organfragmente ohne hCG Zufuhr bereits eine Testosteronmenge von etwa 0,4 pmol/µg produzierten, so ließ sich diese durch hCG Stimulation (500 mIU/ml) lediglich auf 0,65 pmol/µg erhöhen, was einem Faktor von 1,4 entspricht. Die hohen Standardabweichungen innerhalb der Vierfachbestimmung sprechen für eine höchst unterschiedliche Testosteronproduktion innerhalb der einzelnen Organfragmente, die natürlich in der geringfügig unterschiedlichen Größe der Fragmente und damit durch den unterschiedlichen Anteil an Leydig Zellen begründet ist.

Die Hodengewebeskultur der Maus (Abb. 3.15 B) ließ sich offensichtlich besser mit hCG stimulieren als die des Affen. Während das Gewebe ohne hCG bereits 40 pmol/µg Testosteron produzierte, waren es nach hCG Stimulation (400 mIU/ml) 90 pmol/µg, was einem Anstieg um den Faktor 2,25 entspricht. Allerdings lagen auch hier die Standardabweichungen innerhalb der Vierfachbestimmung recht hoch (80,59 pmol/µg ± 37,31). Da die Stimulierbarkeit dieser Organkultur für einen intakten Gewebeverband spricht, sollte ein nächstes Experiment zur Testung der Wirkung eines AON durchgeführt werden.

### 3.4.2 Antisense Oligonukleotidwirkung an einer testikulären Primärzellkultur von *Mus musculus*

Um zunächst die Wirkung des AON 1 in einem kleinen Maßstab messen zu können, wurde statt der Maus Hodengewebskultur eine testikuläre Zellkultur des Tieres gewählt. Dazu wurde der Maus Hoden enzymatisch verdaut und in eine Einzelzellsuspension überführt (Kap. 2.4.3). Für das Experiment wurden dann jeweils 500 000 Zellen pro well in einer 96 well Platte ausgesät und für 48 und 72 h ohne bzw. mit AON / KON (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M und 20  $\mu$ M) inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit hCG (100 mIU/ml) oder FSK (50  $\mu$ M), bzw. die Inkubation mit PBGI für die Dauer von 4 h. Als Detektionsparameter wurde Testosteron im Zellkulturüberstand bestimmt.



**Abb. 3.16: Wirkung des AON 1 auf die testikuläre Primärzellkultur einer Maus.** 500000 Zellen/well inkubiert ohne AON Zusatz oder mit 5-20  $\mu$ M AON bzw. KON und stimuliert mit 100 mIU/ml hCG bzw. 50  $\mu$ M Forskolin für 4 h. A, B: 48 h Inkubation; C, D: 72 h Inkubation. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte einer Doppelbestimmung mit Standardabweichungen.

In dieser Zellkultur, die sich aus allen das Hodengewebe bildenden Zelltypen zusammensetzte, war zunächst beim Vergleich der hCG stimulierten Zellen auffällig, daß durch die Anwendung des AON 1 keine Hemmung der Testosteron Produktion erreicht wurde, das AON also offensichtlich wirkungslos war. Entgegen der Erwartungen war sogar eine Stimulation des Testosteron Spiegels festzustellen (Abb. 3.16 A, C). Während dieser Effekt für die 48 stündige Inkubationsdauer weitgehend dosisunabhängig war (Abb. 3.16 A), war nach 72 stündiger AON Inkubation mit zunehmender AON Dosis ein steigender Testosteronspiegel zu verzeichnen, mit Ausnahme der 20  $\mu\text{M}$  Konzentration (Abb. 3.16 C). Gleiches galt für den Einsatz des KON. Hier war jedoch bereits nach 48 stündiger Inkubation ein tendenziell Dosis anhängiger Effekt ersichtlich (Abb. 3.16 B), der sich nach 72 h verstärkte (Abb. 3.16 D).

Die Stimulation mit Forskolin führte unter Einsatz des AON nach 48 h zu gleichbleibenden Testosteronwerten gegenüber den AON unbehandelten Zellen, mit Ausnahme der 15  $\mu\text{M}$  AON Konzentration, welche zur Steigerung der Testosteron Produktion um den Faktor 3 führte (Abb. 3.16 A). Dies war nach 72 h nicht der Fall. Hier sank die Testosteronkonzentration unter Verwendung von 5  $\mu\text{M}$  bzw. 20  $\mu\text{M}$  AON um etwa den Faktor 0,5 ab (Abb. 3.16 C). Der Einsatz des KON hatte nach 48 stündiger Inkubation einen von der Dosis unabhängigen gleichbleibenden Testosteron Spiegel zur Folge (Abb. 3.16 B), nach 72 h nahm die T Produktion unter 15  $\mu\text{M}$  KON um den Faktor 3 zu (Abb. 3.16 D). Für die restlichen KON Konzentrationen konnte keine Veränderung gegenüber den KON unbehandelten und FSK stimulierten Zellen beobachtet werden.

Die T stimulierende Wirkung von AON bzw. KON zeigte sich auch an den unstimulierten Zellen. Sowohl unter Behandlung mit AON als auch mit KON ergaben sich mit zunehmender Konzentration (bis 15  $\mu\text{M}$ ) steigende Testosteron Spiegel, die unter einer 20  $\mu\text{M}$  Konzentration wieder stark absanken. Dieser Effekt war für beide Inkubationszeiträume von 48 h und 72 h zu beobachten. Nach 72 stündiger Inkubation jedoch war die Testosteron Konzentration unter 5  $\mu\text{M}$  bzw. 20  $\mu\text{M}$  AON / KON Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze.

### 3.5 Studien zur Etablierung der Antisense Oligonukleotidtechnik – in vivo

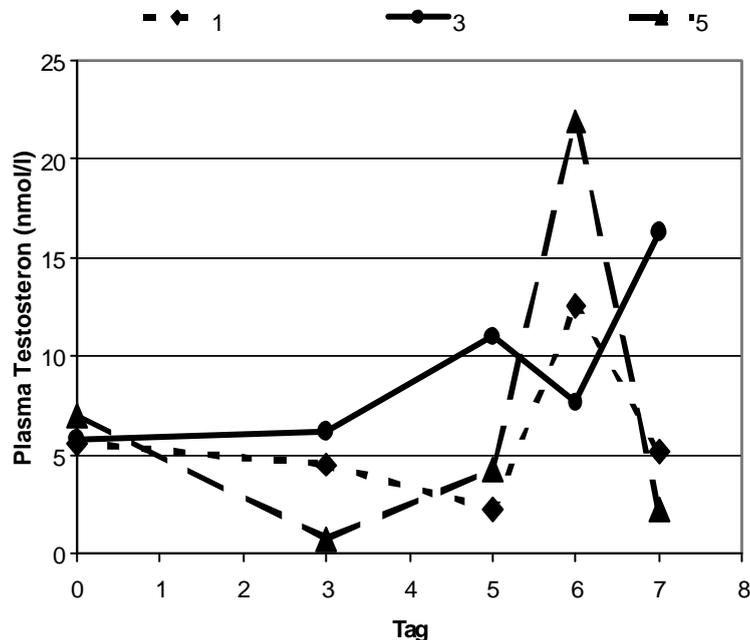
#### 3.5.1 In vivo Studie I

Um das AON 1, welches in vitro zu einem Hemmeffekt der cAMP Produktion von geführt hatte (Kap. 3.3.6), in vivo zu testen, diente der Weißbüschelaffe Affe (*Callithrix jacchus*) als Modell.

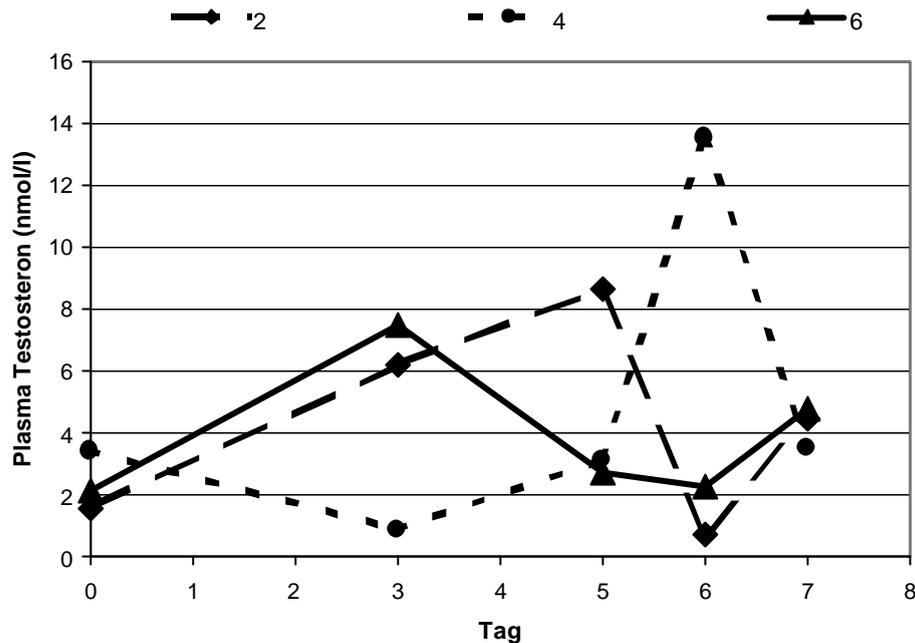
Ziel dieser Studie war es, mit Hilfe des injizierten AON 1 die Expression des LHR auf den Leydig Zellen zu reduzieren und somit eine Verminderung des Testosteronspiegels herbeizuführen.

Für die Studie wurden 6 adulte Tiere ausgewählt, welche in zwei Gruppen eingeteilt wurden: Jeweils 3 bekamen das AON 1 (AON Gruppe) und 3 das KON (KON Gruppe) verabreicht.

Der zeitliche Rahmen der Studie ist in Kap. 2.4.4.1 beschrieben. Zunächst wurden pro Tier zwei Testosteron Basalwerte bestimmt (Kap. 2.4.3.2) bevor mit den AON / KON Injektionen begonnen wurde. Dann erfolgten die AON / KON Injektionen (10 mg/kg Körpergewicht) an drei aufeinander folgenden Tagen und jeweils 24 h nach AON / KON Applikation eine Blutentnahme zur Bestimmung des T Spiegels.



**Abb. 3.17 A: Testosteronwerte der Tiere der AON-Gruppe im Verlauf der Studie.** Tage 0 und 3: Basale Werte vor AON Verabreichung, Tage 5, 6, 7: Werte 24 h nach letzter AON Injektion.



**Abb. 3.17 B: Testosteronwerte der Tiere der KON-Gruppe im Verlauf der Studie.** Tage 0 und 3: Basale Werte vor KON Verabreichung, Tage 5, 6, 7: Werte 24 h nach letzter KON Injektion.

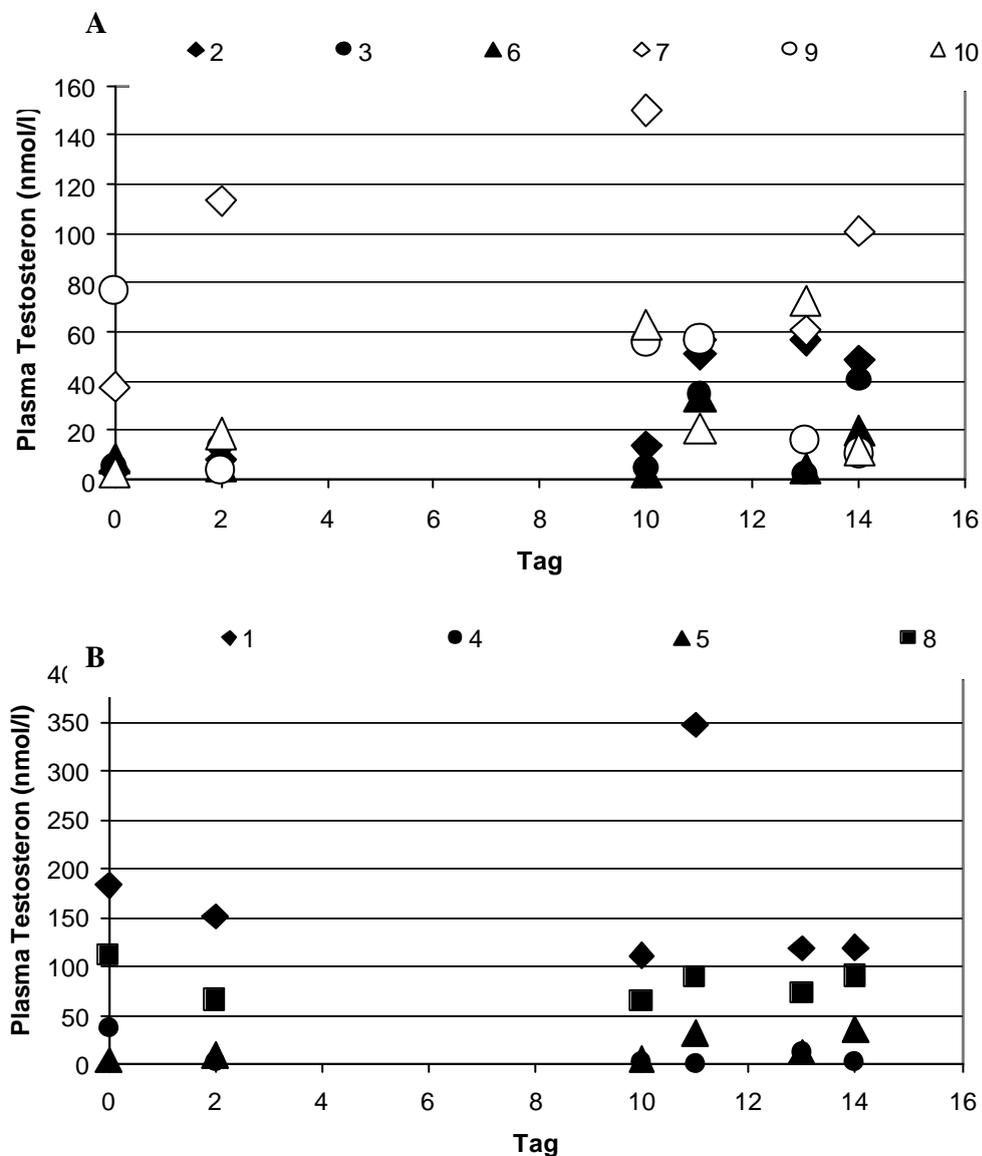
Bei Betrachtung der basalen Testosteronwerte (Tag 0 und Tag 3) der AON behandelten Tiere fielen bereits starke individuelle Schwankungen auf, da das Testosteron offensichtlich pulsatil produziert wird. So kam es zu einem bis zu 10 fachen Unterschied in der intraindividuellen Testosteron Produktion (Tier 5: 7,02 nmol/l vs. 0,72 nmol/l). Auch nach Verabreichung von AON (erstmalig am Tag 4) blieb diese Pulsatilität generell erhalten, die besonders für Tier 5 nach Verabreichung der ersten zwei Injektionen stark ausgeprägt war (4,29 nmol/l (Tag 5) vs. 21,29 nmol/l (Tag 6)). Gleiches galt für Tier 1, obwohl hier die Basalwerte fast gleich waren, betrug die Veränderungen zwischen Tag 5 und Tag 6 den Faktor 6. Tier 3 zeigte bis zum Tag 6 die geringsten Unterschiede im Testosteron Spiegel, wies aber am Tag 7 nach Verabreichung aller drei AON Injektionen eine steigende Testosteron Tendenz auf, was für die Tiere 1 und 5 nicht galt.

Die Gruppe der KON behandelten Tiere behielt erwartungsgemäß den pulsatilen Testosteron Verlauf bei. Auch hier war der intraindividuelle Unterschied in der Testosteron Produktion bereits in den beiden Basalwerten augenscheinlich und setzte sich offensichtlich nach den KON Injektionen fort, was in dem für alle drei Tiere unterschiedlichen Verlauf der Testosteron Werte abzulesen war.

Insgesamt ist in dieser Studie die Erwartung eines geminderten oder zumindest in der Pulsatilität abgeflachten Testosteron Spiegels durch AON Behandlung nicht eingetreten.

### 3.5.2 In vivo Studie II

Die Studie II wurde prinzipiell als „Cross over“ Studie zu dem ersten Projekt geplant. Das heißt, daß alle Tiere die in der ersten Studie mit AON behandelt wurden, jetzt KON erhielten und umgekehrt. Außerdem wurde die AON Gruppe um drei weitere Tiere, die KON Gruppe um ein Tier erweitert. Im Gegensatz zur Studie I wurden die Blutentnahmen nicht jeweils 24 h nach der letzten AON/KON Injektion vorgenommen, sondern erst nach Abschluß der gesamten AON/KON Injektionen. Zunächst 24 h, dann 48 h, 96 und 144 h später (Kap. 2.4.4.2). Weiterhin wurde die AON/KON Dosis auf 20 mg/kg Körpergewicht verdoppelt.



**Abb. 3.18: Testosteronwerte der Tiere im Verlauf der Studie.** Tage 0 und 2: Basalwerte vor Beginn der AON bzw. KON Verabreichung, Tage 10,11,13,14 Werte nach Abschluß der Injektionen. A: AON Gruppe, B: KON Gruppe

Auch in dieser Studie waren, wie bereits in Studie 1, auffällige Unterschiede in den basalen Testosteron Werten zu beobachten. Sie reichten von geringfügigen Unterschieden um den Faktor 1,7 (8,6 vs.5,1; Tier 6) bis zu extremen Schwankungen um den Faktor 22 (76,4 vs. 3,5; Tier 9). Nach den erfolgten AON Injektionen war in der Gesamtheit des Kollektivs keine Tendenz in Richtung eines sich verändernden Testosteronspiegels festzustellen (Abb. 3.18A). So war beispielsweise für das Tier 2 24 h nach der letzten AON Applikation eine um den Faktor 2,4 erhöhte Testosteron Konzentration gegenüber dem Mittelwert der zwei Basalwerte zu beobachten. Nach zwei, drei und vier Tagen erreichte sie sogar eine Steigerung um den Faktor 10. Für das Tier 9 dagegen war ein sinkender Verlauf des Testosteron Spiegels zu verzeichnen. Während an den Tagen 1 und 2 nach letzter AON Injektion die Testosteron Konzentration noch um den Faktor 1,4 über dem Mittelwert der Basalwerte lag, so sank sie nach 3 bis 4 Tagen auf etwa den Faktor 4 darunter ab. Ein ähnliches Ergebnis ergab sich für das Tier 7. Die Tiere 3, 6 und 10 zeigten nach AON Behandlung einen pulsatilen Verlauf der T Konzentration, wobei vier Tage nach der letzten AON Verabreichung eine gegenüber dem Mittelwert der Basalwerte erhöhte Testosteron Konzentration für die Tiere 3 und 6, bzw. eine erniedrigte Konzentration für das Tier 10 zu beobachten war.

Auch für die KON behandelten Tiere (Abb. 3.18 B) ergab sich nach Abschluß der Injektionen ein pulsatilem Verlauf der Testosteron Konzentration bei recht unterschiedlichen Basalwerten vor Behandlungsbeginn (183,3 vs. 151,6; Tier 1, bzw. 37,2 vs.3,3; Tier 4). Ebenso wie für einige AON behandelten Tiere ergab sich für die Tiere 1 und 4 ein tendenziell sinkender Verlauf der Testosteron Konzentration, welche 4 Tage nach Abschluß der KON Behandlung um den Faktor 1,4 (Tier 1) bzw. 7,2 (Tier 4) unterhalb des Mittelwertes der Basalwerte lag. Für die Tiere 5 und 8 war ein pulsatilem Verlauf des Testosteron Spiegels festzustellen. 4 Tage nach der letzten KON Injektion lag die Testosteron Konzentration um den Faktor 5 höher (Tier 5) bzw. etwa gleich gegenüber dem Mittelwert der Basalwerte.

Insgesamt lassen sich zwischen AON und KON behandeltem Kollektiv keine solchen Unterschiede hervorheben, die auf eine spezifische Wirkung des AON hindeuten würden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Klonierung der *Macaca fascicularis* LHR cDNA

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wird die Klonierung des LHR des nicht-humanen Primaten *Macaca fascicularis* auf cDNA Ebene beschrieben.

Bisher sind die cDNA Sequenzen von LH Rezeptoren mehrerer Spezies identifiziert und veröffentlicht worden, wie beispielsweise von Mensch (Jia et al., 1991), Weißbüschelaffe (Zhang et al., 1997), Rind (Kawate et al., 2002), Schaf (Genbankdaten), Ratte (McFarland et al., 1989) und Maus (Gudermann et al., 1992). Die Aufklärung der LHR Sequenzen machen analytische Untersuchungen möglich, die zu einem besseren Verständnis sowohl der physiologischen als auch der pathophysiologischen Mechanismen zwischen Luteinisierendem Hormon (LH) und LHR beitragen sollen. Das Wissen darum ist um so wichtiger, da es sich bei der Hormon Rezeptor Interaktion um eine zentrale endokrinologische Drehscheibe handelt, in der die Botschaft des LH in eine biochemische Zellaktion der Zielzelle (Leydig Zelle bzw. Granulosa Zelle) umgesetzt werden muß. Die einwandfreie Funktion der Signaltransduktion ist daher zwingend notwendig, um eine normale Produktion des Testosterons im männlichen bzw. des Östrogens im weiblichen Organismus zu gewährleisten und damit dessen Reproduktionsfähigkeit zu ermöglichen. Speziesübergreifend weist der LHR eine einheitliche Zusammensetzung auf, eine Ausnahme davon bildet der LHR des Weißbüscheläffchens *Callithrix jacchus*. Während in allen anderen bekannten Spezies elf Exons für den LHR kodieren, fehlt der mRNA des *Callithrix jacchus* das Exon 10 (Zhang et al., 1997), was jedoch keine Auswirkung auf die reproduktive Gesundheit oder Fertilität des Tieres hat, wie an freilebenden oder auch in Gefangenschaft lebenden Kolonien augenscheinlich wird.

Die Nukleotidsequenz des *Macaca fascicularis* LHR weist ebenfalls elf kodierende Exone auf, was durch ein Alignment der Sequenz mit der humanen LHR Nukleotidsequenz sichtbar wurde. Wie in den LH Rezeptoren der anderen Spezies, so kodieren auch im LHR Gen des *Macaca fascicularis* die Exons 1 bis 10 für die extrazelluläre Domäne. Exon 11 kodiert für die Transmembran- und die intrazelluläre Domäne. Das Verbindungsstück zwischen extrazellulärer- und intrazellulärer Domäne bildet die von Exon 11 kodierte „hinge“- Region und die Transmembrandomäne wird von sieben membrandurchspannenden  $\alpha$ -Helices gebildet, die für die Familie der G-Protein

gekoppelten Rezeptoren typisch ist. Sie sind durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Loops miteinander verbunden. An die siebte Transmembranregion schließt sich die intrazelluläre Domäne an.

Mit der Klonierung der *Macaca fascicularis* LHR cDNA steht nun eine weitere Spezies für vergleichende Untersuchungen der LH LHR Wechselwirkungen zur Verfügung. So können zunächst funktionelle Experimente geplant werden, in denen Stimulierbarkeit und Hormon Bindungsaffinität des Rezeptors überprüft und mit den Charakteristika anderer LH Rezeptoren verglichen werden. Dazu müßte eine Zelllinie, z. B. CHO Zellen, stabil mit der *Macaca fascicularis* LHR cDNA transfiziert werden, wie es für den murinen und humanen LHR bereits praktiziert wurde (Gudermann et al., 1995).

Weiterhin wäre es interessant, den Rezeptor durch Sequenzanalysen von Subklonen auf das Vorhandensein von Polymorphismen zu untersuchen, ist doch bekannt, daß der humane LHR einen Insertionspolymorphismus im Exon 10 an Position 55-60 aufweisen kann (Tsai-Morris et al., 1999). Außerdem würde die Untersuchung von LHR Mutationen ermöglicht, in dem mit Hilfe der in vitro Mutagenese Punktmutationen eingefügt werden können, deren Auswirkungen dann in einer transfizierten Zelllinie beobachtet werden. Auf diese Weise könnten Vergleiche mit bereits bekannten Mutationen im menschlichen LHR gezogen werden. So führen beispielsweise inaktivierende LHR Mutationen zur Blockade der pränatalen hCG Wirkung, wodurch die männliche Geschlechtsdifferenzierung ausbleibt. Im weiblichen Organismus führt eine solche Mutation zu anovulatorischer Infertilität. Aktivierende Mutationen hingegen bewirken eine auf das männliche Geschlecht beschränkte Gonadotropin unabhängige frühe Pubertät (Hutaniemi 2000). Erst kürzlich konnte eine Insertion mit Leserasterverschiebung im Exon 1 des humanen LHR entdeckt werden, der aufgrund einer insuffizienten LHR Signaltransduktion zur Leydigzell Hypoplasie in dem betroffenen Patienten führte (Richter-Unruh et al., 2002).

## 4.2 In situ Hybridisierung

Das Ergebnis der in situ Hybridisierung beweist das Vorhandensein von LHR mRNA in den Leydig Zellen des Hodengewebes eines adulten *Macaca fascicularis*. Als Hybridisierungssonde wurde eine der humanen LHR cDNA in den Bereichen zwischen Exon 9 und 11 komplementären Sonde verwendet. Daher detektiert diese Sonde Teile der mRNA, welche für die extrazelluläre LHR Domäne kodieren.

Die verwendete Digoxigenin (DIG) markierte „antisense“-Sonde hybridisierte an komplementäre LHR mRNA in den Leydigzellen. Mittels Farbreaktion (durch Alkalische Phosphatase katalysierter Farbumschlag des Substrats NBT/BCIP (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride/5-Bromo-4-Chloro-Indolyl-Phosphat) konnte die Lokalisation der LHR mRNA im Gewebe sichtbar gemacht und eine Anfärbung des Cytoplasmas der Leydig Zellen erreicht werden. (Kap. 3, Abb. 3.6). Es kommt hier zur Ausbildung eines recht schwachen Signals, das sich zwar eindeutig der Leydig Zelle zuordnen läßt, jedoch kann durch das bei der Methode angewandte Andauen des Gewebes mit Proteinase K die Sonde auch in alle anderen Zellen des Gewebes eintreten. Dadurch kommt es generell dazu, daß eine geringe Menge der Sonde trotz verschiedener Waschvorgänge in den Zellen zurück bleibt und so für eine relativ starke Hintergrundfärbung sorgt. Dies kann auch in dem mit der „sense“-Sonde behandelten Gewebeschnitt beobachtet werden.

Weiterhin ist es möglich, daß die Leydig Zellen des adulten Tieres nur eine geringe Menge der LHR mRNA produzieren und das Hybridisierungssignal daher schwächer ist. Dies ist plausibel, da es sich bei dem LHR, wie auch bei anderen Rezeptoren, (z.B. Rezeptor für das Follikel stimulierende Hormon (FSHR), Östrogen Rezeptor (ER), Progesteron Rezeptor (PR) ) um ein Molekül mit langer Halbwertszeit handelt (Zhang et al., 1998; Ing et al., 1999), welches nur selten erneuert wird, im Gegensatz zu Proteinen mit kürzerer Verweildauer in der Zelle, die z.B. sezerniert werden. Diesbezüglich wäre es interessant, die Expressionsrate des LHR in verschiedenen Entwicklungsstadien des Java Affen zu untersuchen, um eventuelle Unterschiede ermitteln zu können. So konnte in Keimzellen des adulten Java Affen beispielsweise für das DAZ (Deleted in Azoospermia) Protein ein zeitversetztes Auftreten von mRNA und Protein festgestellt werden. Während in früheren Keimzellstadien (A<sub>pale</sub>- und B- Spermatogonien) sowohl DAZ mRNA als auch DAZ Protein detektiert werden können, ist in späteren Reifungsstadien (Spermatozyten 2. Ordnung, Spermatischen) zwar das DAZ Protein, nicht aber die mRNA nachweisbar (Kostova, 2002).

### 4.3 Experimente zur Etablierung der Antisense Oligonukleotidtechnik in vitro

Der folgende Teil der Arbeit beschäftigt sich mit den Studien zur Etablierung der AON Technik.

Ziel unserer Experimente war der genzspezifische „knock-down“ des LHR Proteins im Hinblick auf die Blockierung der Testosteronproduktion. Die Antisense Oligonukleotidtechnik bietet eine spezifische, gering invasive Methode zur Untersuchung der parakrinen Testosteronfunktion im Sinne einer „loss of function“ Untersuchung. Im Gegensatz zu anderen Methoden der Testosteron Modulation (Immunisierung, GnRH Antagonisten, EDS-Behandlung) (Kap. 1.13) wirkt sie spezifisch in der Leydig Zelle, ohne das physiologische Mileu des Hodens zu beeinträchtigen. Die Anwendung dieser Methode könnte daher zur weiteren Aufklärung des parakrinen Testosteronfunktion beitragen, welche für die Spermatogenese im Primaten noch nicht vollständig geklärt ist.

Der LHR ist als Kandidatenprotein besonders gut geeignet, da seine Funktion sowohl in vitro als auch im Tiermodell einfach zu überprüfen ist. Durch die Hormon Rezeptor Interaktion zwischen LH und LHR wird die Signaltransduktionskaskade zur Biosynthese von Testosteron gestartet, welches als Endprodukt meßbar und ein Maß für die Funktion des LHRs ist. Für in vitro Untersuchungen müßte demnach eine Testosteron produzierende Leydig Zelllinie zur Verfügung stehen, die sehr aufwendige Kulturbedingungen benötigt und sich daher nicht besonders als Routine Zelllinie eignet. Zur Durchführung erster AON Experimente wählten wir daher eine etablierte Zelllinie (hLHR CHO Zellen) von stabil mit dem humanen LHR (hLHR) transfizierten Chinese Hamster Ovarian (CHO) Zellen aus, welche uns freundlicherweise von Herrn Prof. T. Gudermann, Marburg, zur Verfügung gestellt wurde. Als Detektionsparameter in diesem System diene cAMP, welches in der Signaltransduktionskaskade als second messenger fungiert, da der CHO Zelle die biochemische Ausstattung zur Testosteronbiosynthese fehlt.

Im Falle der in vivo Studien mit Weißbüscheläffchen (*Callithrix jacchus*) als Modell, konnte zur Überprüfung der AON Wirkung Testosteron als Nachweisparameter herangezogen werden.

#### 4.3.1 Charakteristika des Zellkulturmodells hLHR CHO Zellen

Die stabil mit dem hLHR transfizierten Chinese Hamster Ovarian (CHO) Zellen sind in einem Routine Zellkulturlabor einfach und kostengünstig mit den handelsüblichen Zellkulturmedien und Antibiotikazusätzen zu kultivieren und boten daher für unser Vorhaben eine gute Alternative zu Leydig Zellen. Die Zellen enthalten ein

Vektorkonstrukt, das die humanen LHR cDNA enthält, die transkribiert, translatiert und das LHR Protein dann auf der Zellmembran exprimiert wird.

Zu Beginn der AON Experimente wurde zunächst die Aufnahme von Oligonukleotidmolekülen in die hLHR CHO Zellen getestet.

#### **4.3.2 Zelluläre Aufnahme des FITC markierten Antisense Oligonukleotids**

Zur Untersuchung der Aufnahme von Oligonukleotidmolekülen in hLHR CHO Zellen diente ein FITC markiertes Kontroll Oligonukleotid (KON) mit einer zufälligen Nukleotidsequenz, welches keine Ziel mRNA in der Zelle hatte.

Die KON Aufnahme erfolgt in Abhängigkeit von Struktur und Dosis des Moleküls, sowie von der Inkubationsdauer (Crooke 1991, Iversen et al., 1992). So ist es plausibel, daß nach einer Inkubationsdauer von 4 h mit zunehmender KON Konzentration ein stärkeres FITC Signal im Cytoplasma zu beobachten ist (Abb. 3.7 C, G), welches durch den Einsatz von Oligofectamin (Abb. 3.7 A, E) verstärkt wird. Durch eine längere Inkubationsdauer von 24 h ließ sich entsprechend mehr KON in der Zelle akkumulieren, da mehrere KON Moleküle eingeschleust wurden, welche in der Zelle bedingt durch ihre Modifizierung der 3'- und 5'-Enden vor dem Angriff von Exonukleasen geschützt waren. Hier machte sich der transportfördernde Effekt des Oligofectamins noch stärker bemerkbar als nach kürzerer Inkubationszeit. Anhand dieser Ergebnisse wirkt sich offensichtlich der Einsatz des Oligofectamins erleichternd auf den KON Transport in die Zelle aus, ohne auf diese zytotoxisch zu wirken, ist doch unabhängig vom Oligofectamin Gebrauch eine intakte Zellmorphologie zu verzeichnen.

FITC allein wird nicht von der Zelle aufgenommen und kann nur gebunden an KON in die Zelle gelangen. Nach Abspaltung vom KON in der Zelle wird es in den extrazellulären Raum ausgeschleust (Leonetti et al., 1991). Daher ist eine durch die FITC Markierung allein verursachte Färbung des Cytoplasmas der Zielzellen auszuschließen.

Weiterhin ist bekannt, daß Fluorochrom markierte modifizierte Nukleotide sich in einem punktuellen Muster im Cytoplasma verteilen. Es wird angenommen, daß sie beim Eintritt in die Zelle von Endosomen eingeschlossen und langsam an das Cytoplasma abgegeben werden (Iversen et al., 1992). Dies könnte die Wirksamkeit der Nukleotide in der Zielzelle über einen längeren Zeitraum begründen, auch wenn es nur einmalig der Zellkultur zugesetzt wurde (Simons et al., 1993).

### 4.3.3 Stimulierbarkeit der LHR exprimierenden Zellen mit hCG

Aufgrund der starken Homologie zwischen den hormonspezifischen  $\beta$ -Untereinheiten des Luteinisierenden Hormons (LH) und des humanen Choriongonadotropins (hCG), die etwa 85 % beträgt (Shome et al, 1973), wird für Stimulationsexperimente in vielen Bereichen der Endokrinologie das hCG verwendet (Ottander et al., 1999; Demirel 2000; Salvador et al., 2002).

Für die uns verwendete Zelllinie der hLHR CHO Zellen konnte im Bereich von 0,15 bis 150000 mIU/ml hCG eine Stimulierbarkeit, gemessen in der cAMP Produktion, festgestellt werden (Kap. 3, Abb. 3.8). Die Stimulationsdauer von zwei Stunden ist an gebräuchliche Protokolle angelehnt (Zhang et al., 1997). Obwohl der Start der Signaltransduktionskaskade in jeder einzelnen Zelle ein Prozeß ist, der innerhalb von Sekunden in Gang kommt, ist diese Dauer notwendig, damit die Konzentration der cAMP Moleküle eine für den cAMP ELISA ausreichende Nachweisgrenze erreicht. Die Akkumulation der von der Zelle sezernierten cAMP Moleküle im Stimulationsmedium wurde durch den Zusatz von 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) zur Trägerlösung PBG (Phosphate buffered Glucose) erreicht, einer Substanz, die als Phosphodiesterase Hemmer wirkt und somit den Abbau von cAMP verhindert. In dem Bereich von 0 bis 150 mIU/ml hCG konnte eine hCG Stimulation der hLHR CHO Zellen um den Faktor 25 gegenüber den hCG unbehandelten Kontrollzellen erreicht werden, die sich aber durch Dosiserhöhung nicht steigern ließ (Kap. 3, Abb. 3.8). Offensichtlich ist daher bei einer Stimulationsdosis von 150 mIU/ml hCG eine Sättigung der LH Rezeptoren erreicht, so daß ein großer Teil der besetzten Rezeptoren gegenüber hCG desensibilisiert wird. Der Desensibilisierung folgt durch Dephosphorylierung der phosphorylierten Serinreste im carboxyterminalen Bereich die Wiederherstellung des aktivierbaren Zustandes des LHR, so daß durch eine Verlängerung der Stimulationsdauer eine weitere Steigerung der cAMP Produktion erreicht werden konnte (Kap. 3, Abb. 3.9). Eine Verlängerung der Stimulationsdauer war aber nicht notwendig, da nach zwei Stunden bereits eine ausreichend gesteigerte cAMP Produktion vorhanden war, um eine produktionshemmende Wirkung von AON überprüfen zu können.

Um für die in vitro Experimente eine Zellzahl auszuwählen, deren cAMP Produktion in den Meßbereich des cAMP ELISAs fällt, wurde ein Experiment zur Findung der optimalen Zelldichte durchgeführt. Für eine Zelldichte von 1250 Zellen/well war dieser Zustand

zutreffend, so daß sowohl die cAMP Konzentration unstimulierter als auch stimulierter Zellen im linearen Meßbereich erfaßt werden konnte, ohne die Meßprobe verdünnen zu müssen (Kap. 3, Abb. 3.10). Diese Zellzahl von 1250 Zellen/well wurde für alle AON Experimente eingesetzt und cAMP Konzentrationen, die dennoch den Meßbereich von 243 pmol/ml überstiegen, wurden in entsprechender Verdünnung erneut gemessen und die Konzentration mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor berechnet.

#### 4.3.4 Testung der Effektivität verschiedener AON

In einem ersten AON Experiment wurden drei verschiedene AON getestet. Sie umfaßten jeweils 22 bis 23 Nukleotide mit Phosphorothioat Modifikation an jeweils vier Nukleotiden des 3'- und des 5'-Endes waren komplementär gegen verschiedene Teilsequenzen im Exon 2 bzw. 3 (Kap. 2.4.1.1) der Spezies *Homo sapiens*, *Callithrix jacchus*, *Rattus norvegicus* und *Mus musculus*.

Da es sich bei dem LHR Protein nicht um ein zu sezernierendes Protein handelt, ist die Halbwertszeit des Rezeptors auf der Zelloberfläche relativ lang und das Molekül unterliegt einem nur langsam fortschreitenden Erneuerungsprozeß. Soll nun die Translation des LHR mit Hilfe der genspezifischen AON verhindert werden, so ist zu bedenken, daß sich zum Zeitpunkt der AON Behandlung noch restliche, bereits fertig translatierte LHR Moleküle in der Zelle befinden. Ein kompletter „knock down“ der LHR Expression war daher nicht zu erreichen, wohl aber eine signifikante Erniedrigung der Expressionsrate. Der AON Inkubationszeitraum wurde daher so ausgewählt, daß währenddessen mindestens eine Zellteilung erfolgte, um den translationshemmenden Effekt in der Tochterzellgeneration nutzen zu können. Da diese Zellen auch neue LHR mRNA transkribieren, kann das AON deren Translation verhindern und somit die cAMP Produktion absenken, ohne daß restliche LH Rezeptoren noch zur cAMP Produktion beitragen. Daher wurde der Inkubationszeitraum auf mindestens 48 h festgelegt und bis zu 96 h erweitert. (Anazodo et al., 1995; Moon et al., 2000). Nach Abschluß der AON Inkubationszeit wurden die Zellen für zwei Stunden mit dem hCG haltigen Stimulationsmedium versetzt, um in den Zellen eine hCG LHR Interaktion herbeizuführen. Die Messung der cAMP Konzentrationen in den Zellkulturüberständen beinhaltete das totale, also sowohl das von den Zellen an das Stimulationsmedium abgegebene als auch das in den Zellen enthaltene cAMP. Zu vergleichen waren nun einerseits die AON- bzw. KON-behandelten mit den unbehandelten

Zellen. Wie das in Abb. 3.11 dargestellte Ergebnis zeigt, war das AON 1 für alle Inkubationszeiträume das effektivste der drei getesteten AON mit einer Hemmung der cAMP Produktion um 50 % nach 72 Stunden verglichen mit den unbehandelten Zellen.

Der Vergleich zwischen unbehandelten und KON behandelten Zellen bietet eine Abschätzung der Zytotoxizität der Oligonukleotide gegenüber den Zellen. Nach einer Inkubationsdauer von 48 h bzw. 72 h liegen die cAMP Konzentrationen beider annähernd gleich, während nach 96 h eine Absenkung des cAMP Spiegels um 27 %, verursacht durch den KON Zusatz, festzustellen ist. Dieser Effekt ist ein Hinweis auf eine mögliche zellschädigende Wirkung des KON nach 96 stündiger Inkubationsdauer.

#### **4.3.5 Experiment zur AON Dosisfindung**

Aufgrund der relativ langen Halbwertszeit des LHR Proteins und unseres permanent den LHR exprimierenden Zellkultursystems war das Ziel unserer Versuche, zunächst mit möglichst hohen AON Konzentrationen zu arbeiten, unter denen mögliche Veränderungen des cAMP Spiegels stark auffällig sein sollten. Es wurde daher ein Konzentrationsbereich zwischen 10  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  ausgewählt. In gängigen in vitro Protokollen zur Anwendung von AON werden bis zu 5  $\mu\text{M}$  empfohlen (Schlingensiepen et al., 1997; Le Roy et al., 1998)

In diesem Konzentrationsbereich wurde von uns ein Experiment durchgeführt, in dem die Zellen ohne bzw. mit Zusatz von AON 1 bzw. KON behandelt wurden (Kap. 3, Abb. 3.12). Als Vehikel diente Zellkulturmedium. Nach erfolgter AON/KON Inkubationsdauer von 48 h bis 96 h wurde die Stimulation mit hCG (100 mIU/ml) angeschlossen.

Für die unbehandelten Zellen ließ sich ein Anstieg der cAMP Konzentration im Verlauf der Inkubationszeit von etwa dem Faktor 1,5 feststellen, der auf die Zellteilung zurückzuführen ist. Vergleicht man AON behandelte und AON unbehandelte Zellen miteinander, so ergab sich für die AON Konzentration von 15  $\mu\text{M}$  die stärkste Hemmung der cAMP Produktion. Lag sie nach 48 stündiger Inkubationszeit bereits bei 29 %, so konnte nach 72 h eine 50 % ige Hemmung beobachtet werden. Infolgedessen kann durch die Verwendung der 15  $\mu\text{M}$  AON Konzentration eine AON spezifische Wirkung festgestellt werden, da durch Zellteilung die cAMP Produktion der unbehandelten bzw. KON behandelten Zellen stieg, in den AON behandelten jedoch zwischen 48 und 72 stündiger Inkubationsdauer unverändert blieb. Es ist daher offensichtlich, daß die AON

spezifische Wirkung in den Tochterzellen stattgefunden hat und der gemessene cAMP Spiegel durch die restlichen LH Rezeptoren der Mutterzellen zustande kam.

Im Falle der 20  $\mu\text{M}$  AON/KON Dosierung traten zytotoxische Effekte ein, die daran abzulesen waren, daß durch den KON Zusatz der cAMP Spiegel bereits nach einer Inkubationszeit von 48 h um 59 % unter dem der unbehandelten Zellen lag. Dies war unter Verwendung der 10  $\mu\text{M}$  bzw. 15  $\mu\text{M}$  KON Konzentration nicht der Fall. Vielmehr zeigten unbehandelte und KON behandelte Zellen weitgehend gleiche cAMP Werte; erste Anzeichen für einen zytotoxischen Effekt waren nach 96 stündiger Inkubation mit 15  $\mu\text{M}$  AON/KON Konzentration zu verzeichnen, da der cAMP Spiegel der KON behandelten Zellen weit unter den der unbehandelten Zellen absank. Insgesamt ist daher für den Konzentrationsbereich von 10  $\mu\text{M}$  bis 15  $\mu\text{M}$  eine dosisabhängige AON Wirkung festzustellen. Der Einsatz einer 15  $\mu\text{M}$  AON/KON Konzentration ist sowohl effektiv in der Hemmung der cAMP Produktion, als auch unschädlich für die Physiologie der Zellen.

#### **4.3.6 Reproduzierbarkeit der dosisabhängigen Wirkung des AON 1**

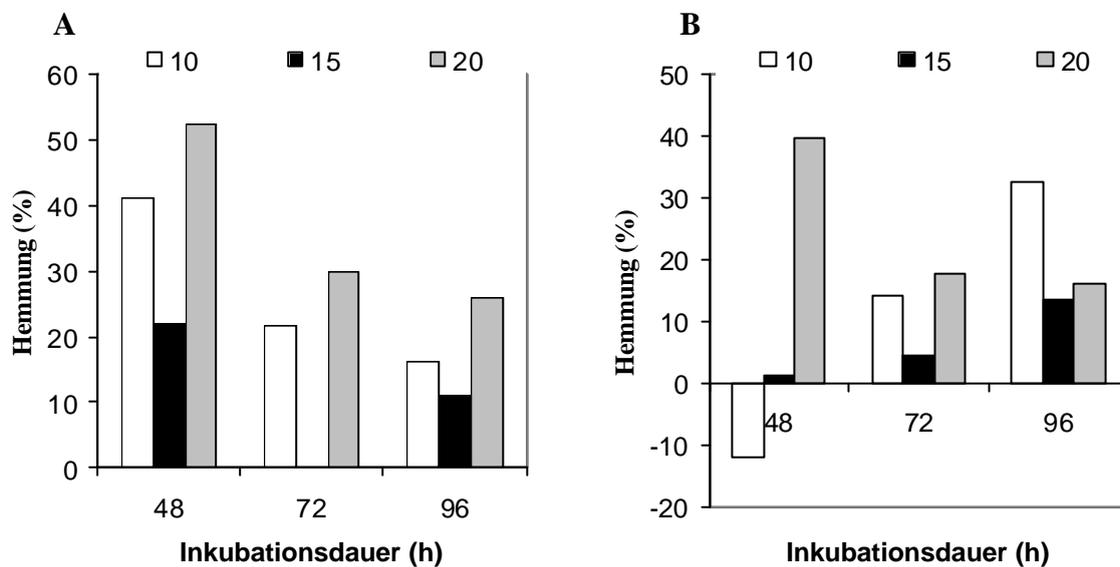
Grundsätzlich wurde für dieses Experiment der gleiche Versuchsaufbau wie im Dosisfindungsexperiment (Kap. 3.3.6) gewählt, zusätzlich wurden jedoch AON/KON unbehandelte und unstimulierte Zellen als Leerwert Kontrolle mitgeführt, um Veränderungen der cAMP Konzentration unter diesen Bedingungen verfolgen zu können. Zudem wurde außer der Stimulation mit hCG auch eine Stimulation mit Forskolin vorgenommen. Dieses wirkt unspezifisch aktivierend auf die Adenylatzyklase und kann daher die cAMP Produktion ohne vorausgehende Hormon Rezeptor Interaktion stimulieren. Die Stimulierbarkeit der Zelle mit Forskolin ist daher ein Maß für die Intaktheit der Signaltransduktionsmaschinerie der Zelle (Chen et al., 2002).

##### **4.3.6.1 Veränderung der cAMP Konzentration unter AON Wirkung**

Zunächst fällt gegenüber dem Dosisfindungsexperiment (Kap. 3.3.6) auf, daß die hCG Stimulation zu cAMP Spiegeln von maximal 450 pmol/ml führt, während im vorigen Experiment unter gleichen Bedingungen Werte bis zu 600 pmol/ml erreicht wurden, wodurch eine Inter Assay Drift der Meßwerte deutlich wird.

Die nicht stimulierten Kontrollen zeigen innerhalb eines Inkubationszeitraumes unabhängig von AON bzw. KON Zusatz weitgehend gleiche cAMP Konzentrationen.

Vergleicht man allerdings die verschiedenen Inkubationszeiträume miteinander, so ist eine Steigerung der cAMP Spiegel etwa um den Faktor 3 zwischen 48 stündiger und 96 stündiger Inkubationsdauer festzustellen. Ein Anstieg der cAMP Produktion ist plausibel, da sich die Zellen durchschnittlich einmal pro Tag teilen. Ein parallel zum exponentiellen Wachstum des Zellverbandes steigender cAMP Spiegel ist jedoch nicht zu verzeichnen. Für die AON behandelten Zellen ließ sich nach hCG Stimulation für alle AON Konzentrationen und Inkubationszeiträume eine Hemmung der cAMP Produktion gegenüber den AON unbehandelten Zellen beobachten. Der Einsatz der 15  $\mu\text{M}$  AON Konzentration ergab in diesem Experiment durchgängig niedrigere Hemmeffekte als der Zusatz von 10  $\mu\text{M}$  bzw. 20  $\mu\text{M}$  AON Konzentrationen, wie es in Abb. 4.1 dargestellt wird.

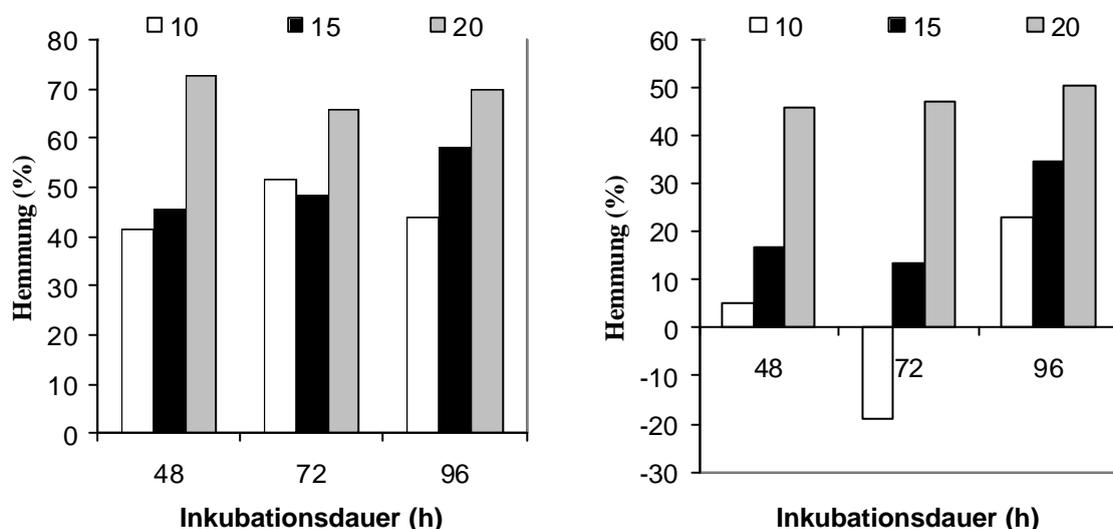


**Abb. 4.1: Prozentuale Hemmung der cAMP Konzentration nach hCG Stimulation:** Vergleich der AON behandelten Zellen mit AON unbehandelten Zellen. Die Säulen repräsentieren die Prozent Hemmung der cAMP Produktion. Berechnungsgrundlage waren die Mittelwerte einer Doppelbestimmung. A: AON Behandlung, B: KON Behandlung

Läßt man die 15  $\mu\text{M}$  AON Konzentration unberücksichtigt, so ist für die einzelnen Inkubationszeiträume zwischen 10  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  AON Konzentration ein dosisabhängiger Hemmeffekt auf die cAMP Produktion festzustellen. Wie in Abb. 4.1 A ersichtlich wird, rief die Verwendung einer 20  $\mu\text{M}$  AON Konzentration pro Inkubationszeitraum stärkere Hemmeffekte als die 10  $\mu\text{M}$  AON Konzentration hervor. Bei Betrachtung aller Inkubationszeiträume wird jedoch eine Abnahme des Hemmeffektes mit zunehmender Inkubationsdauer sichtbar. Dieser Befund ist plausibel, da das AON

aufgrund der Modifikation des Nukleotidrückgrades zwar eine verlängerte Halbwertszeit im Zellkulturmedium und auch in der Zelle hat, jedoch trotzdem einem Abbau durch Endonukleasen unterliegt. (Khan et al., 1997; Yu et al., 2001; Kurrek et al., 2002).

Der Vergleich der KON behandelten Zellen mit den KON unbehandelten Zellen (Abb. 4.1 B) zeigt, daß die unspezifische Hemmung der cAMP Produktion, verursacht durch zytotoxische Effekte, in dem Maße ansteigt, wie die spezifische AON Wirkung abnimmt (Abb. 4.1 A). Diese Aussage kann jedoch nur dann getroffen werden, wenn der Wert für die 20  $\mu$ M KON Konzentration nach einer Inkubationsdauer von 48 h unberücksichtigt bleibt und als Ausreißer gewertet wird. Weiterhin zeigt sich für die unspezifische KON Wirkung auf die cAMP Konzentration für die einzelnen Inkubationszeiträume kein eindeutiger dosisabhängiger Effekt. Für die 48 stündige Inkubationsdauer ergab sich eine Dosisabhängigkeit, jedoch muß der Wert für die 20  $\mu$ M KON Konzentration als Ausreißer gesehen werden. Nach 72 bzw. 96 stündiger Inkubation ist jeweils der Wert der 10  $\mu$ M KON Konzentration zu hoch, wodurch eine Dosisabhängigkeit nicht nachgewiesen werden kann.



**Abb. 4.2: Prozentuale Hemmung der cAMP Konzentration nach FSK Stimulation:** Vergleich der AON behandelten Zellen mit AON unbehandelten Zellen. Die Säulen repräsentieren die Prozent Hemmung der cAMP Produktion. Berechnungsgrundlage waren die Mittelwerte einer Doppelbestimmung. A: AON Behandlung, B: KON Behandlung.

#### 4.3.6.2 Überprüfung zytotoxischer Effekte nach Forskolin Stimulation

Durch eine unspezifische Stimulation der cAMP Produktion mit Forskolin (FSK) wurde die Hormon Rezeptor Bindung umgangen.

Für die AON behandelten Zellen sind zu jedem Inkubationszeitraum dosisabhängige Hemmeffekte der cAMP Produktion zu beobachten (Abb. 4.2 A), die etwa 40 % (10  $\mu$ M), 50 % (15  $\mu$ M) bzw. 75 % (20  $\mu$ M) betragen. Folglich wurde allein durch den AON Zusatz die Zelle in ihrer Signaltransduktionsmaschinerie geschädigt. Die nach hCG Stimulation beobachteten Veränderungen in der cAMP Produktion können daher nicht als AON spezifisch gewertet werden, müßte für den Fall doch die Forskolin Stimulierbarkeit von unbehandelten und AON behandelten Zellen weitgehend gleich bleiben.

Die durch KON Behandlung hervorgerufenen Effekte auf die cAMP Produktion nach Forskolin Stimulation sind nicht so ausgeprägt wie unter AON Behandlung. Vergleicht man KON behandelte mit KON unbehandelten Zellen, so lassen sich zwar auch dosisabhängige Effekte sehen, jedoch betragen sie 5 % (10  $\mu$ M) bis maximal 50 % (20  $\mu$ M). Nach 72 stündiger KON Inkubation lassen sich sogar cAMP stimulierende Effekte beobachten, die wohl als Ausreißer gewertet werden müssen, obwohl in der Literatur auch Angaben über ähnliche unspezifische Oligonukleotidwirkungen zu finden sind. So berichten Zador und Mitarbeiter über eine Hochregulation der Ziel mRNA nach AON Behandlung in vivo (Zador et al., 2002) bzw. über immunstimulatorische Effekte nach Oligonukleotid Verabreichung (Krieg et al., 1998).

Die unterschiedlichen Zytotoxizitätseffekte von AON und KON auf die Zellen entsprechen nicht den Erwartungen, da beide Nukleotidsequenzen die gleiche Komposition aufweisen und sich nur in der Basenabfolge unterscheiden. Erwartungsgemäß wären daher prozentual gleiche Auswirkungen gewesen.

Bei diesen Ergebnissen handelt es sich um erste Versuche, die AON Technologie am in vitro System zu etablieren. Um klare Aussagen bezüglich einer AON Wirkung treffen zu können, sind unbedingt weitere Experimente notwendig, die dann ausreichende Wertemengen zur Berechnung statistischer Signifikanzen zur Verfügung stellen.

#### 4.3.7 AON Wirkung unter Zusatz von Oligofectamin Additiv

Zwecks erleichterter AON/KON Aufnahme in die Zelle, wurde in diesem Experiment der Zusatz von Oligofectamin (Invitrogen) als Additiv verwendet. Dabei wurde die Wirkung zweier AON Moleküle (AON 1 und AON 3) untersucht.

Gegenüber dem AON Einsatz ohne Additiv, war die AON Konzentration laut Literatur (Schlingensiepen et al., 1997) etwa um das 10fache herabzusetzen und wurde daher im Bereich von 150 bis 250 nM benutzt. Nachdem sich ohne Additiv das AON 1 als wirksamstes AON der drei getesteten AON erwiesen hatte (Abb. 3.11), sollte unter diesen Bedingungen zusätzlich das AON 3 getestet werden. Weiterhin wurde auf eine 96 stündige Inkubationsdauer aufgrund der starken zytotoxischen Effekte in den vorigen Experimenten verzichtet.

Für beide getesteten AON konnte eine, wenn auch nicht dosisabhängige Hemmung der cAMP Produktion nach hCG Stimulation festgestellt werden. Diese war für das AON 1 stärker ausgeprägt als für AON 3. Sie betrug für das AON 1 nach 48 h 70 % gegenüber den nicht AON behandelten Zellen, nach 72 stündiger Inkubationsdauer noch 26 %. Dementsprechend wurde nach 48 h Inkubation bereits für die niedrigste mit Additiv eingesetzte AON Dosis von 150 nM eine um 18 % stärkere cAMP Hemmung erreicht als das unter der höchsten AON Dosis ohne Additiv der Fall war (70 % vs. 52 %). Nach 72 stündiger Inkubation sind etwa gleiche Hemmeffekte zwischen beiden Experimenten zu beobachten (26 % mit Additiv vs. 30 % ohne Additiv).

Zwecks Einsparungen an Reagenzien wurde für dieses Experiment nur eine einzige KON Konzentration von 250 nM mitgeführt. Dafür ergab sich sowohl nach 48 als auch nach 72 stündiger Inkubationsdauer nach hCG Stimulation eine unspezifische Hemmung der cAMP Produktion verglichen mit den KON unbehandelten Zellen. Dieser Hemmeffekt war nach 48 h Inkubationsdauer stärker als nach 72 h. Sowohl nach 48 als auch nach 72 h betrug er in etwa den gleichen Wert wie unter Verwendung der 250 nM AON 1 Konzentration (34 % vs. 36 % bzw. 22 % vs. 16 %), wodurch der durch die 250 nM AON Konzentration erreichte Hemmeffekt nicht als AON spezifische Wirkung gewertet werden kann. Für künftige Experimente wäre daher der Einsatz einer entsprechenden KON Konzentration zu jeder gewählten AON Konzentration notwendig, um die AON Wirkung beurteilen zu können.

Daß es sich im Falle der unspezifischen durch KON Zusatz ezielten Hemmeffekte nicht um zytotoxische Effekte handelt, zeigt die Stimulation mit Forskolin. Sowohl nach 48 als auch nach 72 stündiger KON Inkubation bleiben die cAMP Spiegel der KON behandelten gleich denen der KON unbehandelten Zellen, was für eine gute Verträglichkeit des KON in dieser Konzentration spricht.

Nach Forskolin Stimulation der AON 1 behandelten Zellen waren, verglichen mit den AON 1 unbehandelten Zellen niedrigere cAMP Werte zu verzeichnen. So wurde durch

den AON Zusatz eine Hemmung der cAMP Produktion von 30 % (150 nM), 1 % (200 nM) und 18 % (250 nM) verursacht. Die nach hCG Stimulation beobachteten Absenkungen lagen bei 26 % (150 nM), 14 % (200 nM) und 16 % (250 nM). Eine spezifische AON Wirkung vorausgesetzt, dürften sich nach Forskolin Stimulation die cAMP Konzentrationen der AON behandelten nicht von denen der AON unbehandelten Zellen unterscheiden, da Forskolin die cAMP Produktion unspezifisch aktiviert. Daher muß die unter AON Zusatz erreichte Hemmung der cAMP Produktion als unspezifische und damit zytotoxische Wirkung beurteilt und nicht als spezifische AON Wirkung gesehen werden. Gleiche Verhältnisse sind für das AON 3 zu folgern.

#### **4.4 Studien zur Etablierung der Antisense Oligonukleotidtechnik in der Organkultur**

##### **4.4.1. Stimulierbarkeit der Testosteronproduktion in der Hodengewebeskultur**

Die Hodengewebeskultur kommt aufgrund ihrer Beschaffenheit der in vivo Situation eines intakten Gewebeverbandes näher als die Zellkultur. Ziel dieser Methode ist durch Präparation kleinster Hodenareale das Gewebe so intakt zu halten, daß es seine normale Physiologie behält. Die Schwierigkeit besteht darin, die Gewebestücke weder zu groß noch zu klein zu präparieren. Zu kleine Fragmente würden keine für das Detektionsverfahren ausreichende Testosteron Mengen produzieren, zu große hingegen würden durch mangelnde Sauerstoffversorgung nekrotisch und daher in der Testosteronproduktion eingeschränkt.

Während sich die Hodenorgankultur des Weißbüscheläffchens selbst unter 500 mIU/ml hCG wider Erwarten nur um den Faktor 1,4 verglichen mit der hCG unbehandelten Kultur stimulieren ließ, sprachen die Hodengewebesfragmente der Maus besser auf die hCG Stimulation an. So konnte unter Zusatz von 400 mIU/ml hCG eine Steigerung der Testosteronproduktion um den Faktor 2,25 erreicht werden. Bei Erhöhung der hCG Dosis konnte kein weiterer Anstieg erzielt werden, was für eine Sättigung der LH Rezeptoren der vorhandenen Leydig Zellen spricht.

Die Organfragmente des Affen wurden eventuell zu klein präpariert, so daß die nach hCG Stimulation produzierten Testosteron Mengen für das Nachweisverfahren zu niedrig lagen, oder das Ergebnis liegt in der Physiologie des Affenhodens an sich begründet. Da die Testosteronproduktion des *Callithrix jacchus* einer extremen Pulsatilität unterliegt ist es möglich, daß die Hodenfragmente gerade im Stadium einer sehr geringen Testosteronproduktion präpariert wurden. Für die Organkultur der Maus hingegen waren

offensichtlich günstige Bedingungen erfüllt, da eine dosisabhängige hCG Stimulierbarkeit gegeben war.

#### **4.4.2. Antisense Oligonukleotidwirkung an einer testikulären Primärzellkultur von *Mus musculus***

Eine spezifische AON Wirkung auf die Testosteronproduktion der murinen Leydig Zellen konnte in der testikulären Zellkultur nicht festgestellt werden. Stattdessen handelte es sich offensichtlich um einen unspezifisch fördernden Effekt auf die Testosteronproduktion, und zwar unabhängig von AON oder KON Einsatz, jeweils mit Ausnahme der 20  $\mu\text{M}$  Konzentrationen. Dieser Effekt steigerte sich mit zunehmender Inkubationsdauer. Vergleicht man AON unbehandelte mit AON (15  $\mu\text{M}$ ) behandelten Zellen nach hCG Stimulation, so war nach 48 h eine Steigerung der Testosteronproduktion um etwa den Faktor 2, nach 72 um den Faktor 10 ersichtlich. Gleiches galt für die Verwendung von KON.

Diese unspezifische Wirkung der Nukleotide ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß durch den AON/KON Zusatz eine Bindung der Nukleotide an die vorhandenen mRNA Moleküle erfolgt, welche dann für die Translation nicht mehr zur Verfügung stehen, so daß kompensatorisch mehr mRNA transkribiert wird (Probst und Skutella, 1996; Zador et al., 2002). Ähnliche unspezifische Oligonukleotidwirkungen wurden von Krieg und Stein beobachtet, die eine hohe Affinität der Moleküle zu Polymerasen, Laminin und Kinasen feststellen konnten (Stein und Cheng, 1993; Krieg und Stein, 1995). Auch an AON behandelten Neuronen ließ sich ein unspezifischer Nebeneffekt feststellen (Neumann et al., 1995).

Eine direkte zytotoxische AON/KON Wirkung auf die Leydig Zellen läßt sich anhand der Forskolin Stimulation nicht ablesen, da die Testosteronspiegel der AON/KON unbehandelten Zellen denen der AON/KON behandelten Zellen nach FSK Stimulation gleichen oder sogar höher liegen (15  $\mu\text{M}$  AON, 48 h). Eine Ausnahme bilden die Werte für die Verwendung der 20  $\mu\text{M}$  AON/KON Konzentrationen. Es kann daher von einer intakten Synthesemaschinerie zur Testosteronproduktion ausgegangen werden. Dieser Befund wird untermauert durch die Ergebnisse der unstimulierten Zellen. Allein durch den AON/KON Zusatz kam es zu einer Steigerung der Testosteron Konzentration, woraus sich eine unspezifisch stimulierende AON/KON Wirkung ableiten läßt.

Weiterhin muß bei dieser Art der Primärzellkultur bedacht werden, daß es sich im Gegensatz zur Sekundärzellkultur um eine Mischung verschiedenster testikulärer Zellen handelt, wovon die Leydig Zellen nur etwa 5 % ausmachen. Daher kann auch eine AON/KON Wirkung auf Nicht-Leydig Zellen in Betracht gezogen werden, die ihre parakrine Wirkung auf die Leydig Zellen unter diesen Bedingungen verändern und zu einer gesteigerten Testosteronproduktion beitragen könnten.

Letztlich müßte die AON/KON Aufnahme in die Leydig Zellen experimentell überprüft werden, um die Charakteristika dieses Vorgangs zellspezifisch ermitteln zu können, da Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen bezüglich der Oligonukleotidaufnahme bekannt sind. Beispielsweise nehmen HeLa Zellen unter gleichen Bedingungen pro Zeiteinheit die vierfache AON Menge im Vergleich zu humanen Colonkarzinomzellen auf (Nakai et al., 1996).

#### **4.5 Studien zur Antisense Oligonukleotidwirkung in vivo**

##### **4.5.1. Studie I**

Um die Tiere nicht durch zu viele Blutentnahmen zu schädigen, entschlossen wir uns zu drei AON Injektionen insgesamt, die an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils zur gleichen Tageszeit durchgeführt wurden. Jeweils 24 h nach einer AON/KON Injektion erfolgten Blutentnahme und Bestimmung des Plasma Testosteronspiegels, so daß die AON Wirkung auf den Testosteronspiegel nach jeder Injektion überprüft werden konnte. Unter diesen Bedingungen sollte gewährleistet sein, daß zunächst die Translation neuer LHR mRNA und damit eine Expression neu synthetisierter LH Rezeptormoleküle auf der Zelloberfläche verhindert wird. Erwartungsgemäß würde der Plasma Testosteronspiegel nicht unmittelbar nach der ersten AON Injektion absinken, da noch restliche LHR Moleküle auf den Leydig Zellen ansässig waren. Deren Erneuerung jedoch sollte durch Einsatz des AON verhindert werden, weshalb im Studienverlauf nach mehreren AON Injektionen der Plasma Testosteronspiegel sinken oder mindestens in der Pulsatilität gehemmt werden sollte.

Diese Erwartungen haben sich nach Durchführung der Studie nicht bestätigt (Kap. 3, Abb. 3.17 A, B). Unabhängig von der Behandlung mit AON bzw. KON blieb die Pulsatilität der Plasma Testosteronkonzentration erhalten. Zwar zeigte das Tier 3 der AON Gruppe nach den ersten zwei AON Injektionen die geringsten Schwankungen in der Testosteron

Konzentration, jedoch war nach Verabreichung aller Injektionen wieder ein Anstieg weit über den Mittelwert der Basalwerte zu verzeichnen. Dies deutet darauf hin, daß selbst nach drei AON Dosierungen mit jeweils 10 mg/kg Körpergewicht noch eine genügend hohe LH Rezeptordichte auf den Leydig Zellen exprimiert war, das AON demnach nicht in der erwarteten Weise reagiert hat.

#### 4.5.2 Studie II

Die in vivo Studie II unterschied sich von der ersten Studie hauptsächlich durch Verdopplung der applizierten AON/KON Dosis, sowie durch die Abfolge von AON/KON Injektion und Blutentnahmen. So wurden die Blutproben hier erst nach Verabreichung aller AON/KON Injektionen entnommen. Die zugrunde liegende Überlegung für dieses Protokoll war, zunächst den Wirkstoff akkumulieren zu lassen und danach erwartungsgemäß einen gegenüber dem Basalwert abgesunkenen Testosteronspiegel zu messen. Die folgenden Blutentnahmen sollten dann den erneuten Anstieg des Testosterons und damit das Auswirken des AON dokumentieren.

Die Ergebnisse entsprachen allerdings auch in dieser Studie nicht den Erwartungen. Die Tiere der AON Gruppe zeigten trotz AON Verabreichung weiterhin pulsatile Testosteronwerte, während die der KON Gruppe tendenziell niedrigere Werte aufwiesen.

Das Zustandekommen dieser Ergebnisse kann auf viele verschiedene Faktoren zurückgeführt werden. So ist sicherlich eine Schwierigkeit in dem Tiermodell des *Callithrix jacchus* an sich begründet. Da diese Affenart recht starke intraindividuelle Schwankungen im Testosteronspiegel aufweist, ist eine Wirkung des AON nur schwer sichtbar zu machen. Jedoch ist dieser Affe für erste in vivo Experimente geeignet, da er aufgrund seines Körpergewichtes nicht nur leichter zu sedieren, sondern auch mit geringerem Reagenzienverbrauch zu behandeln ist als größere Affenarten, z. B. *Macaca fascicularis*.

Weiterhin ist die Art der AON/KON Applikation zu berücksichtigen. Die von uns gewählte intraperitoneale Injektion bietet den Vorteil einer unkomplizierten und effektiven AON Verabreichung, da das Reagenz schon im Peritoneum verteilt wird, bevor es in die Blutbahn aufgenommen wird. Es kommt daher vor allem inden ersten 12 Stunden nach Applikation zu einer schnellen Verteilung des AON/KON, ohne daß Kontakt zu Transportproteinen oder abbauenden Enzymen des Blutes besteht. Nachteilig erweist sich

allerdings diese Art der Applikation auf die effektiv im Hoden wirkende Menge an AON/KON, die sich natürlich gegenüber der injizierten Menge erheblich reduziert (Agrawal et al., 1991). Eine direkte Injektion in den Hoden empfiehlt sich aufgrund des geringen Hodenvolumens (ca. 2 ml) von *Callithrix jacchus* keinesfalls.

Ein weiterer Aspekt kommt der Halbwertszeit der Oligonukleotide in vivo zu. In der Literatur ist eine weite Bandbreite von Plasma Halbwertszeiten der Oligonukleotide zu finden, die natürlich entscheidend vom Versuchstier sowie von der Modifikation des AON/KON abhängt (Agrawal et al., 1991, Zhang et al., 1996). Eine im Java Affen durchgeführte Studie mit phosphorothioierten Oligonukleotiden zeigte nach einer kurzen Plasma Verteilungsphase von etwa 2 Stunden eine Plasma Eliminationsphase von 56 Stunden. Nach erst 240 Stunden waren 70 % der AON Menge über den Urin ausgeschieden (Grindel et al., 1998). Die AON Verweildauer im Hodengewebe konnte in einer Studie in Mäusen auf bis zu 50 Stunden beziffert werden und wies ähnliche AON Konzentrationen auf wie das Herzgewebe. In Lunge und Gehirn hingegen war sie deutlich vermindert, in Leber und Niere erhöht (Agrawal et al., 1991).

Zumindest ähnliche pharmakologische Verhältnisse im Weißbüschelaffen vorausgesetzt, sollte bei Anwendung unserer Studienprotokolle eine AON Wirkung und damit eine Testosteronabsenkung möglich gewesen sein.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegende Arbeit konnte die LHR cDNA des Java Affen *Macaca fascicularis* kloniert werden. Er weist eine Homologie zu den LH Rezeptoren folgender Spezies auf: Mensch (96 %), Weißbüschelaffe (92 %), Ratte (84 %) und Maus (83 %). Damit steht der LHR des Java Affen für weitere vergleichende LHR Studien zwischen verschiedenen Spezies zur Verfügung und trägt dazu bei, die Hormon Rezeptor Interaktion unter physiologischen und pathologischen Bedingungen untersuchen zu können.

Mit Hilfe der in situ Hybridisierung konnte die LHR mRNA in den Leydig Zellen des Hodengewebes von *Macaca fascicularis* nachgewiesen werden, die in den in vivo Studien und den Primärzellkulturexperimenten als Ziel mRNA für eingesetzte AON Moleküle diente.

Im in vitro Experiment konnte eine zeit- und dosisabhängige Aufnahme FITC markierter KON Moleküle in hLHR CHO Zellen festgestellt werden.

Die Testung von drei verschiedenen AON Molekülen (AON 1, AON 2 und AON 3) ergab den stärksten cAMP Hemmeffekt für AON 1; es wurde in allen folgenden AON Experimenten verwendet.

Für AON 1 konnte in einem Experiment eine dosisabhängige Wirkung erzielt werden, die sich aber als nicht reproduzierbar herausstellte.

Zytotoxische Effekte der Oligonukleotidmoleküle zeigten sich bei Verwendung von 20 µM Konzentrationen. Sowohl unter AON- als auch unter KON Behandlung ergaben sich erniedrigte cAMP Konzentrationen.

Die Zytotoxizität der Oligonukleotidmoleküle ließ sich durch Stimulation mit Forskolin bestätigen. Sie war um so stärker ausgeprägt, je länger die Inkubationsdauer mit AON/KON Molekülen war.

Unter Verwendung von Oligofectamin ergaben sich keine Verbesserungen der AON Wirkung, jedoch zeigten die Zellen eine gute Verträglichkeit des Additivs, da die Stimulierbarkeit durch Forskolin unter allen verwendeten AON/KON Konzentrationen erhalten blieb.

Für die Maus Hodenorgankultur konnte eine Stimulierbarkeit der Testosteronsynthese festgestellt werden, nicht aber für die Weißbüschelaffen Hodenorgankultur.

In der testikulären Primärzellkultur der Maus bewirkte die AON Behandlung eine Stimulation der Testosteronproduktion.

Die in vivo Studien am nicht humanen Primaten *Callithrix jacchus* ergaben keine Tendenzen, aus denen eine AON Wirkung ersichtlich wäre.

## 6 Ausblick

Zukünftige Experimente mit dem LHR des Java Affen könnten funktionelle Studien zur weiteren Charakterisierung des LHR Proteins sein. Dazu müßte eine Zelllinie hergestellt werden, die den LHR permanent exprimiert. Damit könnten Hormonbindungsstudien, Mutations- und Polymorphismusstudien in einem speziesübergreifenden Vergleich durchgeführt werden. Die weitere Aufklärung der LHR Mechanismen würde zur Entwicklung neuer Therapiekonzepte für Patienten mit LHR Fehlfunktionen beitragen, die erhebliche Auswirkungen auf die reproduktive Gesundheit des Mannes haben können.

Für Studien zur weiteren Aufklärung der parakrinen Funktion des Testosterons mit Hilfe der AON Technologie könnten AON Moleküle der zweiten Generation (Morpholinos) benutzt werden, die kostengünstiger in der Herstellung sind und eine längere Halbwertszeit als phosphorthioierte AON Moleküle haben. Weiterhin wären für weitere in vitro Experimente Leydig Zelllinien sinnvoll, um ein möglichst physiologisches Zellkulturmodell einzusetzen. Die AON Technologie eignet sich besonders für „loss of function“ Untersuchungen, da sie genspezifisch und ausschließlich in der Zielzelle ansetzt. Im Falle einer erfolgreichen Herabregulation der Testosteronproduktion, könnten sowohl funktionelle Studien als auch Untersuchungen zur kontrazeptiven Wirkung eines LHR spezifischen AON durchgeführt werden.

## 7 Literaturverzeichnis

**McFarland KC, Sprengel R, Phillips HS, Kohler M, Rosembly N, Nikolics K, Segaloff DL, Seeburg PH** 1989 Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family *Science* 245: 494-499

**Agrawal S, Kandimalla ER** 2001 Antisense and/or immunostimulatory oligonucleotide therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets* 1:197-209

**Jia XC, Oikawa M, Bo M, Tanaka T, Ny T, Boime I, Hsueh AJ** 1991 Expression of human luteinizing hormone (LH) receptor: interaction with LH and chorionic gonadotropin from human but not equine, rat and ovine species *Mol. Endocrinol.* 5: 759-768

**Gudermann T, Birnbaumer M and Birnbaumer L** 1992 Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca<sup>2+</sup> mobilization. Studies with the cloned murine luteinizing hormone receptor expressed in L cells *J. Biol. Chem.* 267: 4479-4488

**Kawate N, Tamada H, Inaba T, Sawada T** 2002 Expression of a cloned full-length cDNA encoding bovine luteinizing hormone receptor in COS-7 cells *J. Reprod. Dev.* In press

**Gudermann T, Birnbaumer M, Birnbaumer L** 1995 Homologous desensitization of the murine luteinizing hormone receptor expressed in L cells *Mol Cell Endocrinol.* 110:125-35

**Huhtaniemi I** 2000 The Parkes lecture. Mutations of gonadotrophin and gonadotrophin receptor genes: what do they teach us about reproductive physiology? *J Reprod Fertil.* 119:173-86.

**Aslam H, Rosiepen G, Krishnamurthy H, Arslan M, Clemen G, Nieschlag E, Weinbauer GF** 1999 The cycle duration of the seminiferous epithelium remains unaltered during GnRH. antagonist-induced testicular involution in rats and monkeys. *J Endocrinol.* 1999 161:281-8

**Richter-Unruh A, Martens JW, Verhoef-Post M, Wessels HT, Kors WA, Sinnecker GH, Boehmer A, Drop SL, Toledo SP, Brunner HG, Themmen AP** 2002 Leydig cell hypoplasia: cases with new mutations, new polymorphisms and cases without mutations in the luteinizing hormone receptor gene *Clin Endocrinol* 56:103-12

**Aman P, Panagopoulos I, Lassen C, Fioretos T, Mencinger M, Toresson H, Hoglund M, Forster A, Rabbitts TH, Ron D, Mandahl N, Mitelman F** 1996 Expression patterns of the human sarcoma-associated genes FUS and EWS and the genomic structure of FUS *Genomics* 37:1-8

**Yakubov LA, Deeva EA, Zarytova VF, Ivanova EM, Ryte AS, Yurchenko LV, Vlassov VV** 1989 Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:6454-8

- Leonetti JP, Mechti N, Degols G, Gagnor C, Lebleu B** 1991 Intracellular distribution of microinjected antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:2702-6.
- Iversen PL, Zhu S, Meyer A, Zon G** 1992 Cellular uptake and subcellular distribution of phosphorothioate oligonucleotides into cultured cells. *Antisense Res Dev.* 2:211-22.
- Simons M, Edelman ER, DeKeyser JL, Langer R, Rosenberg RD** 1992 Antisense c-myc oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulation in vivo. *Nature.* 359:67-70.
- Demirel LC, Weiss JM, Polack S, Unlu C, Diedrich K, Ortmann O** 2000 Effect of the gonadotropin-releasing hormone antagonist ganirelix on cyclic adenosine monophosphate accumulation of human granulosa-lutein cells. *Fertil Steril.* 74:1001-7.
- Ottander U, Leung CH, Olofsson JI** 1999 Functional evidence for divergent receptor activation mechanisms of luteotrophic and luteolytic events in the human corpus luteum. *Mol Hum Reprod.* 5:391-5.
- Salvador LM, Maizels E, Hales DB, Miyamoto E, Yamamoto H, Hunzicker-Dunn M** 2002 Acute signaling by the LH receptor is independent of protein kinase C activation. *Endocrinology.* 143:2986-94.
- Lee PS, Buchan AM, Hsueh AJ, Yuen BH, Leung PC** 2002 Intracellular calcium mobilization in response to the activation of human wild-type and chimeric gonadotropin receptors. *Endocrinology* 143:1732-40.
- Chen H, Hardy MP, Zirkin BR** 2002 Age-related decreases in Leydig cell testosterone production are not restored by exposure to LH in vitro. *Endocrinology.* 143:1637-42
- Chomczynski P und Sacchi N** 1987 Single Step Method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 1556-159
- Dankbar B, Brinkworth MH, Schlatt S, Weinbauer GF, Nieschlag E, Gromoll J** 1995 Ubiquitous expression of the androgen receptor and testis-specific expression of the FSH receptor in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) revealed by arbonuclease protection assay. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 55:35-41
- De Kretser DM, Risbridger GP, Kerr JB** 1995 Basic endocrinology of the testis. In: De groot MJ, Besser M, Burger HG, Jameson JL, Loriaux DL, Marshall JC, Odell WD, Potts JT Jr, Rubenstein AH (eds) *Endocrinology.* Saunders Philadelphia, 2307-2335.
- Hall PF** 1994 Testicular steroid synthesis: organization and regulation. In: Knobil E, Neill JD (eds) *The physiology of reproduction.* Raven, New York, 1334-1362
- Kostova E** 2002 Characterization of Y-chromosomal genes in the azoospermia factor region in the cynomolgus monkey *Macaca fascicularis*, Dissertation
- Bennett CF, Chiang MY, Chan H, Shoemaker JE, Mirabelli CK** 1992 Cationic Lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Mol. Pharmacol.* 41: 1023

**Shome B, Parlow AF** 1973 The primary structure of the hormone-specific, beta subunit of human pituitary luteinizing hormone (hLH). *J Clin Endocrinol Metab.* 36:618-21. Shome

**Schlingensiepen R, Brysch W, Schlingensiepen KH** 1997 *Antisense – From Technology to Therapy.* Blackwell Science

**Le Roy C, Leduque P, Yuan Li J, Saez JM, Langlois D** 1998 Antisense oligonucleotide targeting the transforming growth factor beta1 increases expression of specific genes and functions of Leydig cells. *Eur J Biochem.* 257:506-14.

**Kurreck J, Wyszko E, Gillen C, Erdmann VA** 2002 Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 30:1911-8.

**Zellweger T, Miyake H, Cooper S, Chi K, Conklin BS, Monia BP, Gleave ME** 2001 Antitumor activity of antisense clusterin oligonucleotides is improved in vitro and in vivo by incorporation of 2'-O-(2-methoxy)ethyl chemistry. *J Pharmacol Exp Ther.* 298:934-40.

**Yu RZ, Zhang H, Geary RS, Graham M, Masarjian L, Lemonidis K, Crooke R, Dean NM, Levin AA** 2001 Pharmacokinetics and pharmacodynamics of an antisense phosphorothioate oligonucleotide targeting Fas mRNA in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001 296:388-95.

**Perry CM, Balfour JA** 1999 Fomivirsen. *Drugs.* 57:375-80

**Spiller DG, Giles RV, Broughton CM, Grzybowski J, Ruddell CJ, Tidd DM, Clark RE** 1998 The influence of target protein half-life on the effectiveness of antisense oligonucleotide analog-mediated biologic responses. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 8:281-93.

**Khan K, Liekens K, Van Aerschot A, Van Schepdael A, Hoogmartens J.** 1997 Stability measurement of oligonucleotides in serum samples using capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 702:69-76.

**Krieg AM, Yi AK, Schorr J, Davis H** 1998 The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. *Trends Microbiol.* 6: 23-27

**Honore P, Kage K, Mikusa J, Watt A, Johnston J, Wyatt J, Faltynek C, Jarvis M, Lynch K** 2002 Analgesic profile of intrathecal P2X(3) antisense oligonucleotide treatment in chronic inflammatory and neuropathic pain states in rats. *Pain* 99:11

Head JF, Elliott RL, Yang DC **2002 Gene targets of antisense therapies in breast cancer. *Expert Opin Ther Targets* 6:375-85**

**Zador E, Bottka S, Wuytack F** 2002 Antisense inhibition of myoD expression in regenerating rat soleus muscle is followed by an increase in the mRNA levels of myoD, myf-5 and myogenin and by a retarded regeneration. *Biochim Biophys Acta.* 1590:52-63.

**Krieg AM, Stein CA** 1995 Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: antisense or anti-protein? *Antisense Res Dev.* 5:241

- Neumann I, Kremarik P, Pittman QJ** 1995 Acute, sequence-specific effects of oxytocin and vasopressin antisense oligonucleotides on neuronal responses. *Neuroscience*. 69:997-1003
- Stein CA, Cheng YC** 1993 Antisense Oligonucleotides as Therapeutic Agents - Is the Bullet Really Magical? *Science* 261: 1001-11
- Rubenstein M, Mirochnik Y, Slobodskoy L, Guinan P** 2001 Biotinylation of antisense oligonucleotides does not alter lipofectin enhanced cellular uptake in prostate cancer cell lines. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 23:487-90.
- Rubenstein M, Glick R, Lichtor T, Mirochnik Y, Chou P, Guinan P** 2001 Treatment of the T98G glioblastoma cell line with antisense oligonucleotides directed toward mRNA encoding transforming growth factor- $\alpha$  and the epidermal growth factor receptor. *Med Oncol*. 18:121-30.
- Nakai D, Seita T, Terasaki T, Iwasa S, Shoji Y, Mizushima Y, Sugiyama Y** 1996 Cellular uptake mechanism for oligonucleotides: involvement of endocytosis in the uptake of phosphodiester oligonucleotides by a human colorectal adenocarcinoma cell line, HCT-15. *J Pharmacol Exp Ther* 278:1362-72
- Moon IJ, Lee Y, Kwak CS, Lee JH, Choi K, Schreiber AD, Park JG** 2000 Target site search and effective inhibition of leukaemic cell growth by a covalently closed multiple anti-sense oligonucleotide to c-myc. *Biochem J*. 346:295-303.
- Anazodo MI, Salomon H, Friesen AD, Wainberg MA, Wright JA** 1995 Antiviral activity and protection of cells against human immunodeficiency virus type-1 using an antisense oligodeoxyribonucleotide phosphorothioate complementary to the 5'-LTR region of the viral genome. *Gene*. 166:227-32.
- Probst JC** 2000 Antisense oligodeoxynucleotide and ribozyme design. *Methods*. 22:271-81
- Probst JC, Skutella T** 1996 Elevated messenger RNA levels after antisense oligodeoxynucleotide treatment in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 225:861-8.
- Skutella T, Probst JC, Caldwell JD, Pedersen CA, Jirikowski GF** 1995 Antisense oligodeoxynucleotide complementary to oxytocin mRNA blocks lactation in rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 103:191-5.
- Agrawal S, Tamsamani J, Tang JY** 1991 Pharmacokinetics, biodistribution, and stability of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:7595-9
- Zhang R, Iyer RP, Yu D, Tan W, Zhang X, Lu Z, Zhao H, Agrawal S** 1996 Pharmacokinetics and tissue disposition of a chimeric oligodeoxynucleoside phosphorothioate in rats after intravenous administration. *J Pharmacol Exp Ther*. 278:971-9.

**Grindel JM, Musick TJ, Jiang Z, Roskey A, Agrawal S** 1998 Pharmacokinetics and metabolism of an oligodeoxynucleotide phosphorothioate (GEM91) in cynomolgus monkeys following intravenous infusion. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 8:43-52.

Weinbauer GF, Nieschlag E **1996 Hormonal regulation of reproductive organs. In: Greger R, Windhorst U, (eds). Comprehensive Human Physiology-from cellular mechanisms to integration. Springer Verlag, Berlin, 2231-2252**

**Schlatt S, Meinhardt A, Nieschlag E** 1997 Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *Eur J Endocrinol.* 137:107-17

Graf KM, Dias JA, Griswold MA **1997 Decreased spermatogenesis as the result of an induced autoimmune reaction directed against the gonadotropin receptors in male rats. J. Androl. 18: 174-185**

Remy JJ, Bozon V, Couture L., Goxe B, Salesse R, Garnier J **1993 Suppression of fertility in male mice by immunization against LH receptor. J. Reprod. Immunol. 25: 63-79**

**Remy JJ, Couture L, Rabesona H, Haertle T, Salesse R** 1996 Immunization against exon 1 decapeptides from lutropin/choriogonadotropin receptor or the follitropin receptor as potential male contraceptive. *J. Reprod. Immunol.* 32: 37-54.

**Wickings EJ, Nieschlag E** 1978 The effect of active immunization with testosterone on pituitary-gonadal feedback in the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Biol Reprod* 18: 602-607

Suresh R, Medhamurthy R. Moudgal NR **1995 Comparative studies on the effects of specific immunoneutralization of endogenous FSH or LH on testicular germ cell transformations in the adult bonnet monkey (*Macaca radiata*). Am. J. Reprod. Immunol. 34: 35-43**

**Sharpe RM, Kerr JB, Cooper I, Bartlett JMS** 1986 Intratesticular factors and testosterone secretion: The effect of treatment with ethane dimethanesulfonate (EDS) and the induction of seminiferous tubule damage. *Int J Androl* 9: 285-298

**Bartlett JMS, Kerr JB, Sharpe RM** 1986 **The effect of selective Destruction and Regeneration of Rat Leydig Cells on the intratesticular Distribution of Testosterone and Morphology of the seminiferous epithelium. J Androl 7: 240-253**

**Weinbauer GF, Schubert J, Yueng CH, Rosiepen G, Nieschlag E** 1998 Gonadotrophin-releasing hormone antagonist arrests premeiotic germ cell proliferation but does not inhibit meiosis in the male monkey: a qualitative analysis using 5-bromodeoxyuridine and dual parameter flow cytometry. *J Endocrinol.* 156: 23-34.

**Stephenson ML, Zamecnik PC** 1978 Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75:285-8

**Marwick C** 1998 First "antisense" drug will treat CMV retinitis. *JAMA.* 280:871

- Matsukura M, Shinozuka K, Zon G, Mitsuya H, Reitz M, Cohen JS, Broder S** 1987 Phosphorothioate analogs of oligodeoxynucleotides: inhibitors of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:7706-10
- Merino E, Balbas P, Puente JL, Bolivar F** 1994 Antisense overlapping open reading frames in genes from bacteria to humans. *Nucleic Acids Res.* 22:1903-8.
- Lai J, Riedl M, Stone LS, Arvidsson U, Bilsky EJ, Wilcox GL, Elde R, Porreca F** 1996 Immunofluorescence analysis of antisense oligodeoxynucleotide-mediated 'knock-down' of the mouse delta opioid receptor in vitro and in vivo. *Neurosci Lett.* 213:205-8
- Marzo AL, Fitzpatrick DR, Robinson BW, Scott B** 1997 Antisense oligonucleotides specific for transforming growth factor beta2 inhibit the growth of malignant mesothelioma both in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 57:3200-7
- Weltman JK, Karim AS** 1998 Interleukin-5: a proeosinophil cytokine mediator of inflammation in asthma and a target for antisense therapy. *Allergy Asthma Proc.* 19:257-61.
- Yang DC, Jiang XP, Elliott RL, Head JF** 2001 Inhibition of growth of human breast carcinoma cells by an antisense oligonucleotide targeted to the transferrin receptor gene. *Anticancer Res.* 21:1777-87
- Di Micco G, Forte A, Cipollaro M, Renzulli A, De Feo M, Rossi F, Cascino A, Cotrufo M** 2002 Surgical injury of rat arteries: genetic control of the remodelling process. *Eur J Cardiothorac Surg.* 22:266-70
- Inagawa T, Nakashima H, Karwowski B, Guga P, Stec WJ, Takeuchi H, Takaku H** 2002 Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by P-stereodefined oligo(nucleoside phosphorothioate)s in a long-term infection model. *FEBS Lett.* 25;528:48-52.
- Geary RS, Henry SP, Grillone LR** 2002 Fomivirsen: clinical pharmacology and potential drug interactions. *Clin Pharmacokinet.* 41:255-60
- Jabs DA, Griffiths PD** 2002 Fomivirsen for the treatment of cytomegalovirus retinitis. *Am J Ophthalmol.* 133:552-6
- Holmlund JT, Monia BP, Kwoh TJ, Dorr FA** 1999 Toward antisense oligonucleotide therapy for cancer: ISIS compounds in clinical development. *Curr Opin Mol Ther.* 1:372-85
- Henry SP, Miner RC, Drew WL, Fitchett J, York-Defalco C, Rapp LM, Levin AA** 2001 Antiviral activity and ocular kinetics of antisense oligonucleotides designed to inhibit CMV replication. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42:2646-51
- Shaw JP, Kent K, Bird J, Fishback J, Froehler B** 1991 Modified deoxyoligonucleotides stable to exonuclease degradation in serum. *Nucleic Acids Res.* 19:747-50

- Hoke GD, Draper K, Freier SM, Gonzalez C, Driver VB, Zounes MC, Ecker DJ** 1991 Effects of phosphorothioate capping on antisense oligonucleotide stability, hybridization and antiviral efficacy versus herpes simplex virus infection. *Nucleic Acids Res.* 19:5743-8.
- Huhtaniemi I, Zhang FP, Kero J, Hamalainen T, Poutanen M** 2002 Transgenic and knockout mouse models for the study of luteinizing hormone and luteinizing hormone receptor function. *Mol Cell Endocrinol.* 187:49-56
- Miller PS, McParland KB, Jayaraman K, Ts'o PO** 1981 Biochemical and biological effects of nonionic nucleic acid methylphosphonates. *Biochemistry.* 20:1874-80
- Tidd DM, Warenus HM.** 1989 Partial protection of oncogene, anti-sense oligodeoxynucleotides against serum nuclease degradation using terminal methylphosphonate groups. *Br J Cancer.* 60:343-50
- Buck AC, Shen C, Schirrmeister H, Schmid-Kotsas A, Munzert G, Guhlmann A, Mehrke G, Klug N, Gross HJ, Bachem M, Reske SN** 2002 Liposomal delivery of antisense oligonucleotides for efficient downregulation of Bcl-2 and induction of apoptosis. *Cancer Biother Radiopharm.* 17:281-9
- Fillion P, Desjardins A, Sayasith K, Lagace J** 2001 Encapsulation of DNA in negatively charged liposomes and inhibition of bacterial gene expression with fluid liposome-encapsulated antisense oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta* 1515:44-54
- Kanamaru T, Takagi T, Takakura Y, Hashida M** 1998 Biological effects and cellular uptake of c-myc antisense oligonucleotides and their cationic liposome complexes. *J Drug Target* 5:235-46
- Saxon M, Schieren I, Zhang LM, Tonkinson JL, Stein CA** 1992 Stimulation of calcium influx in HL60 cells by cholesteryl-modified homopolymer oligodeoxynucleotides. *Antisense Res Dev.* 2:243-50
- Stepien A, Ziecik AJ** 2002 Second messenger systems in the action of LH and oxytocin on porcine endometrial cells in vitro. *Theriogenology.* 57:2217-27.
- Bhowmick N, Narayan P, Puett D** 1999 Identification of ionizable amino acid residues on the extracellular domain of the lutropin receptor involved in ligand binding. *Endocrinology.* 140:4558-63
- Kuhn B, Gudermann T** 1999 The luteinizing hormone receptor activates phospholipase C via preferential coupling to Gi2. *Biochemistry.* 38:12490-8
- Zhou B, Hutson JM** 1995 Human chorionic gonadotropin (hCG) fails to stimulate gonocyte differentiation in newborn mouse testes in organ culture. *J Urol.* 1995 153:501-5
- Gregoraszcuk EL, Stoklosowa S, Wojtusiak A** 1997 Organ culture as a model of studying follicular development and function of postnatal mouse ovaries. *Acta Biol Hung.* 48:431-8.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** 1977 DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467

**Tsai-Morris CH, Geng Y, Buczko E, Dehejia A, Dufau ML** 1999 Genomic distribution and gonadal mRNA expression of two human luteinizing hormone receptor exon 1 sequences in random populations. *Hum Hered* 49:48-51

**Burgues S, Calderon MD** 1997 Subcutaneous self-administration of highly purified follicle stimulating hormone and human chorionic gonadotrophin for the treatment of male hypogonadotropic hypogonadism. Spanish Collaborative Group on Male Hypogonadotropic Hypogonadism. *Hum Reprod.* 12:980-6.

**Weinbauer GF, Nieschlag E** 1993 Gonadotrophin-releasing hormone analogue-induced manipulation of testicular function in the monkey. *Hum Reprod.* 2:45-50

**Gromoll J, Simoni M, Nieschlag E** 1996 An activating mutation of the follicle-stimulating hormone receptor autonomously sustains spermatogenesis in a hypophysectomized man. *J Clin Endocrinol Metab.* 81:1367-70

**Rousseau-Merck MF, Misrahi M, Loosfelt H, Atger M, Milgrom E, Berger R** 1990 Assignment of the human thyroid stimulating hormone receptor (TSHR) gene to chromosome 14q31. *Genomics.* 8:233-6.

**Minegishi T, Nakamura K, Takakura Y, Miyamoto K, Hasegawa Y, Ibuki Y, Igarashi M, Minegishi T** [corrected to Minegishi T] 1990 Cloning and sequencing of human LH/hCG receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 172:1049-54.

**Braun T, Schofield PR, Sprengel R** 1991 Amino-terminal leucine-rich repeats in gonadotropin receptors determine hormone selectivity. *EMBO J.* 10:1885-90

**Atger M, Misrahi M, Sar S, Le Flem L, Dessen P, Milgrom E** 1995 Structure of the human luteinizing hormone-choriogonadotropin receptor gene: unusual promoter and 5' non-coding regions. *Mol Cell Endocrinol.* 111:113-23

**Reshef E, Lei ZM, Rao CV, Pridham DD, Chegini N, Luborsky JL** 1990 The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placenta, fetal membranes, and decidua. *J Clin Endocrinol Metab.* 70:421-30

**Lei ZM, Rao CV, Kornyei JL, Licht P, Hiatt ES** 1993 Novel expression of human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene in brain. *Endocrinology.* 132:2262-70

**Reiter E, McNamara M, Closset J, Hennen G** 1995 Expression and functionality of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor in the rat prostate. *Endocrinology.* 136:917-23

**Dirnhofer S, Berger C, Hermann M, Steiner G, Madersbacher S, Berger P** 1998 Coexpression of gonadotropic hormones and their corresponding FSH- and LH/CG-receptors in the human prostate. *Prostate.* 35:212-20.

**Derecka K, Pietila EM, Rajaniemi HJ, Ziecik AJ** 1995 Cycle dependent LH/hCG receptor gene expression in porcine nongonadal reproductive tissues. *J Physiol Pharmacol.* 46:77-85.

**Stepien A, Derecka K, Gawronska B, Bodek G, Zwierzchowski L, Shemesh M, Ziecik AJ** 2000 LH/hCG receptors in the porcine uterus--a new evidence of their presence in the cervix. *J Physiol Pharmacol.* 51:917-31

**Zheng H, Phang T, Song Y, Ji I, Ji T** 2001 The role of the hinge region of the luteinizing hormone receptor gene expression in hormone interaction and signal generation. *J Biol Chem* 276: 3451-3458

**Eblen A, Bao S, Lei ZM, Nakajima ST, Rao CV** 2001 The presence of functional luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human sperm. *J Clin Endocrinol* 86:2643-8

**Schedewie HK, Reiter EO, Beitins IZ, Seyed S, Wooten VD, Jimenez JF, Aiman EJ, DeVane GW, Redman JF, Elders MJ** 1981 Testicular leydig cell hyperplasia as a cause of familial sexual precocity. *J Clin Endocrinol Metab.* 52:271-8

**Rosenthal SM, Grumbach MM, Kaplan SL** 1983 Gonadotropin-independent familial sexual precocity with premature Leydig and germinal cell maturation (familial testotoxicosis): effects of a potent luteinizing hormone-releasing factor agonist and medroxyprogesterone acetate therapy in four cases. *J Clin Endocrinol Metab.* 57:571-9.

**Frost GJ, Parkin JM, Scott D, Watson MJ** 1985 Pseudo-precocious puberty caused by bilateral idiopathic testicular hyperplasia. *Acta Paediatr Scand.* 74:623-8

**Egli CA, Rosenthal SM, Grumbach MM, Montalvo JM, Gondos B** 1985 Pituitary gonadotropin-independent male-limited autosomal dominant sexual precocity in nine generations: familial testotoxicosis. *J Pediatr.* 106:33-40

**Kremer H, Mariman E, Otten BJ, Moll GW Jr, Stoelinga GB, Wit JM, Jansen M, Drop SL, Faas B, Ropers HH** 1993 Cosegregation of missense mutations of the luteinizing hormone receptor gene with familial male-limited precocious puberty *Hum Mol Genet.* 2:1779-83.

**Shenker A, Laue L, Kosugi S, Merendino JJ Jr, Minegishi T, Cutler GB Jr** 1993 A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature.* 365:652-4.

**Huhtaniemi I** 2000 The Parkes lecture. Mutations of gonadotrophin and gonadotrophin receptor genes: what do they teach us about reproductive physiology? *J Reprod Fertil.* 119:173-86

**Brown DM, Markland C, Dehner LP** 1978 Leydig cell hypoplasia: a cause of male pseudohermaphroditism. *J Clin Endocrinol Metab.* 46:1-7

**Wu RH, Rosenfeld R, Fukushima D** 1984 Hypogonadism and Leydig cell hypoplasia unresponsive to human luteinizing hormone (hLH) *Am J Med Sci.* 287:23-5.

**Arnhold IJ, Mendonca BB, Bloise W, Toledo SP** 1985 Male pseudohermaphroditism resulting from Leydig cell hypoplasia. *J Pediatr.* 106:1057

- Berthezene F, Forest MG, Grimaud JA, Claustrat B, Mornex R** 1976 Leydig-cell agenesis: a cause of male pseudohermaphroditism. *N Engl J Med.* 295:969-72.
- Schwartz M, Imperato-McGinley J, Peterson RE, Cooper G, Morris PL, MacGillivray M, Hensle T** 1981 Male pseudohermaphroditism secondary to an abnormality in Leydig cell differentiation. *J Clin Endocrinol Metab.* 53:123-7
- Martinez-Mora J, Saez JM, Toran N, Isnard R, Perez-Iribarne MM, Egozcue J, Audi L** 1991 Male pseudohermaphroditism due to Leydig cell agenesis and absence of testicular LH receptors. *Clin Endocrinol (Oxf).* 34:485-91.
- Toledo SP, Arnhold IJ, Luthold W, Russo EM, Saldanha PH** 1985 Leydig cell hypoplasia determining familial hypergonadotropic hypogonadism. *Prog Clin Biol Res.* 1985;200:311-4.
- Toledo SP** 1992 Leydig cell hypoplasia leading to two different phenotypes: male pseudohermaphroditism and primary hypogonadism not associated with this. *Clin Endocrinol (Oxf).*, 36:521-2.
- Stavrou SS, Zhu YS, Cai LQ, Katz MD, Herrera C, Defillo-Ricart M, Imperato-McGinley J** 1998 A novel mutation of the human luteinizing hormone receptor in 46XY and 46XX sisters. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Jun;83(6):2091-8.
- Tidd DM, Warenus HM** 1989 Partial protection of oncogene, anti-sense oligodeoxynucleotides against serum nuclease degradation using terminal methylphosphonate groups. *Br J Cancer.* 60:343-50.
- Agris CH, Blake KR, Miller PS, Reddy MP, Ts'o PO** 1986 Inhibition of vesicular stomatitis virus protein synthesis and infection by sequence-specific oligodeoxyribonucleoside methylphosphonates. *Biochemistry.* 25:6268-75
- Maher LJ 3rd, Dolnick BJ** 1988 Comparative hybrid arrest by tandem antisense oligodeoxyribonucleotides or oligodeoxyribonucleoside methylphosphonates in a cell-free system. *Nucleic Acids Res.* 16:3341-58
- Crooke RM** 1991 In vitro toxicology and pharmacokinetics of antisense oligonucleotides. *Anticancer Drug Des.* 6:609-46
- Fields RD, Lancaster MV** 1993 Dual-attribute continuous monitoring of cell proliferation/cytotoxicity. *Am Biotechnol Lab.* 11:48-50
- Zhang FP, El-Hefnawy T, Huhtaniemi I, El-Hafnawy T** 1998 Regulation of luteinizing hormone receptor gene expression by insulin-like growth factor-I in an immortalized murine Leydig tumor cell line (BLT-1) *Biol Reprod.* 59:1116-23
- Li S, Ouyang YL, Dong W, Pestka JJ** 1997 Superinduction of IL-2 gene expression by vomitoxin (deoxynivalenol) involves increased mRNA stability *Toxicol Appl Pharmacol.* 147:331-42

- Shen H, Ranganathan S, Kuzmich S, Tew KD** 1995 Influence of ethacrynic acid on glutathione S-transferase pi transcript and protein half-lives in human colon cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 50:1233-8.
- Ing NH, Ott TL** 1999 Estradiol up-regulates estrogen receptor-alpha messenger ribonucleic acid in sheep endometrium by increasing its stability *Biol Reprod.* 60:134-9.
- Inoue K, Nakamura K, Abe K, Hirakawa T, Tsuchiya M, Matsuda H, Miyamoto K, Minegishi T** 2002 Effect of transforming growth factor Beta on the expression of luteinizing hormone receptor in cultured rat granulosa cells *Biol Reprod.* 67:610-5.
- Nair AK, Menon KM** 2000 Regulatory role of the 3' untranslated region of luteinizing hormone receptor: effect on mRNA stability *FEBS Lett.* 471:39-44.
- Hirakawa T, Minegishi T, Abe K, Kishi H, Ibuki Y, Miyamoto K** 1999 A role of insulin-like growth factor I in luteinizing hormone receptor expression in granulosa cells *Endocrinology.* 140:4965-71.
- Zhang FP, El-Hefnawy T, Huhtaniemi I, El-Hafnawy T** 1998 Regulation of luteinizing hormone receptor gene expression by insulin-like growth factor-I in an immortalized murine Leydig tumor cell line (BLT-1) *Biol Reprod.* 59:1116-23.
- Nakamura K, Minegishi T, Tano M, Kishi H, Kameda T, Miyamoto K** 1997 Effect of phorbol ester on the regulation of LH/hCG receptors *Life Sci.* 61:1435-43
- Han SW, Lei ZM, Rao CV** 1997 Homologous down-regulation of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors by increasing the degradation of receptor transcripts in human uterine endometrial stromal cells. *Biol Reprod.* 57:158-64.
- Shi H, Segaloff DL** 1995 A role for increased lutropin/choriogonadotropin receptor (LHR) gene transcription in the follitropin-stimulated induction of the LHR in granulosa cells. *Mol Endocrinol.* 9:734-44.
- Baenziger JU, Kumar S, Brodbeck RM, Smith PL, Beranek MC** 1992 Circulatory half-life but not interaction with the lutropin/chorionic gonadotropin receptor is modulated by sulfation of bovine lutropin oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:334-8.
- Genty N, Salesse R, Garnier J** 1987 Internalization and recycling of lutropin receptors upon stimulation by porcine lutropin and human choriogonadotropin in porcine Leydig cells. *Biol Cell.* 59:129-35.
- Bernier M, Clerget M, Mombrial CF, Saez JM** 1986 Processing of human choriogonadotropin and its receptors by cultured pig Leydig cells. Role of cyclic AMP and protein synthesis. *Eur J Biochem.* 155:323-30.
- Tena-Sempere M, Rannikko A, Kero J, Zhang FP, Huhtaniemi IT** 1997 Molecular mechanisms of reappearance of luteinizing hormone receptor expression and function in rat testis after selective Leydig cell destruction by ethylene dimethane sulfonate. *Endocrinology.* 138:3340-8.

**Tsai-Morris CH, Geng Y, Buczko E, Dufau ML** 1998 A novel human luteinizing hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Jan;83(1):288-91.

**Tena-Sempere M, Kero J, Rannikko A, Huhtaniemi I** 1999 Experimental cryptorchidism induces a change in the pattern of expression of LH receptor mRNA in rat testis after selective Leydig cell destruction by ethylene dimethane sulfonate. *J Endocrinol.* 1999 Apr;161(1):131-41.

**Zhang FP, Poutanen M, Wilbertz J, Huhtaniemi I.** 2001 Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol Endocrinol.* 15:172-83.

**Zhang FP, Rannikko AS, Manna PR, Fraser HM, Huhtaniemi IT** 1997 Cloning and Functional Expression of the Luteinizing Hormone Receptor Complementary Deoxyribonucleic Acid from Marmoset Monkey Testis: Absence of Sequences encoding Exon 10 in other Species. *Endocrinology* 138: 2481-2490

**Zhang M, Shi H, Segaloff DL, Van Voorhis BJ, Zheng M** 2001 Expression and localization of luteinizing hormone receptor in the female mouse reproductive tract. *Biol Reprod.* 64:179-87.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	zweifach demineralisiertes Wasser
Abb.	Abbildung
AON	Antisense Oligonukleotid
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BLAST	„basic local alignment search tool“
bp	Basenpaar
cAMP	zyklisches Adenosin-3', 5'-monophosphat
cDNA	copy DNA
CHO	Chinese Hamster Ovary
cpm	counts per minute
cRNA	copy RNA
d	1. Tag 2. desoxy
Da	Dalton
dATP	desoxy-Adenosin-5'-triphosphat
DAPI	4',6- Diamidino-2-Phenylindol
dd	didesoxy
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme linked immuno sorbant Assay
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
FSK	Forskolin
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
h	Stunde
hCG	humanes Choriongonadotropin
hLHR	humaner LH Rezeptor
HRP	Horseradishperoxidase
IU	International Units

---

Kap.	Kapitel
Kb	Kilobasen
Kg	Kilogramm
KON	Kontroll Oligonukleotid
LH	Luteinisierendes Hormon
LHR	LH Rezeptor
M	Mol/liter
Mg	milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol/liter
mRNA	messenger RNA
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
$\mu$ M	Mikromol/liter
nm	Nanometer
nM	Nanomol/liter
OD	optische Dichte
PBGI	Phosphat-gepufferte Glukoselösung mit 3-Isobutyl-1-Methylxanthin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pm	Picomol
rev	reverse
RNAse	RNA abbauendes Enzym
RT	1. Raumtemperatur 2. Reverse Transkriptase
sec	Sekunde
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt

## 9 Vorträge und Veröffentlichungen

### Vorträge

Perspektivenkonferenz der jungen Endokrinologen „Junge Forschung aktiv“,  
12.-14. Oktober 2000 in Düsseldorf

Wintertreffen der Sektion Molekulare Endokrinologie der Deutschen Gesellschaft für  
Endokrinologie, 19.01.2001 in Münster

45. Symposion der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, 07.-10.03. 2001 in  
Magdeburg

Sommerakademie des Instituts für Reproduktionsmedizin, 10.-12. 10.2001 in Münster

Vortrag anlässlich Besuch der CDU Landtagsabgeordnetenfraktion im Institut für  
Reproduktionsmedizin, 22.10.2001 in Münster

### Veröffentlichungen

M. Raulf-Heimsoth, R. Merget, H.P. Rihs, **M. Föhring**, V. Liebers, B. Gellert, G. Schulze-  
Werninghaus, X. Baur, T-cell receptor repertoire expression in workers with occupational  
asthma due to platinum salt, Eur Respir J 2000

M. Zitzmann, V. Nordhoff, G. Schröder, **M. Rickert-Föhring**, P. Gaßner, C. Rolf, H.M.  
Behre, R. Greb, L. Kiesel, E. Nieschlag, Smoking in males decrease the success rate of in  
vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI), Manuskript

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ch. Klämbt möchte ich für die Übernahme des Erstgutachtens und für die bereitwillige Unterstützung meiner Arbeit danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. E. Nieschlag für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für erstklassige Arbeitsbedingungen. Weiterhin möchte ich ihm für die Anstellung im Bereich für assistierte Reproduktion danken, durch die sich für mich ein neues und interessantes Arbeitsfeld bot.

Herrn Prof. Dr. GF Weinbauer möchte ich danken für die Überlassung des interessanten und herausfordernden Projektes meiner Dissertation und für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn PD Dr. J. Gromoll für sein Interesse an meiner Arbeit und seine Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. T. Gudermann, Marburg, möchte ich danken für die Überlassung der CHO Zelllinie, auf die sich die in vitro Studien meiner Dissertation stützten.

Herrn Dr. Marc Luetjens danke ich für seine stetige Hilfsbereitschaft hinsichtlich mikroskopischer, fotografischer und histologischer Arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt Frau E. Pekel für ihre hervorragende technische Assistenz im Rahmen der LHR Klonierung. Ebenso mein Dank an Frau R. Sandhowe-Klaverkamp für die stetige Hilfsbereitschaft hinsichtlich der Testosteron Assays.

Mein Dank auch an Herrn Martin Heuermann und Herrn Günther Stehlke für die Einarbeitung in den Umgang mit unseren Weißbüschelaffen.

Ich möchte allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Reproduktionsmedizin und der Frauenklinik für das freundliche und motivierende Arbeitsklima danken, das oft zur Unterstützung der Arbeit beigetragen hat.

Besonders möchte ich Frau Dr. E. Kostova und Herrn T. Müller für ihr Interesse an meiner Arbeit und für ihre freundschaftliche Unterstützung auf ganzer Linie danken.

Meinen Eltern und Großeltern möchte ich für ihre unermüdliche und selbstverständliche Gesprächsbereitschaft und Unterstützung danken, die vor allem in Krisenzeiten motivierend war. Dafür bin ich aufrichtig dankbar. Meinem Vater danke ich für die Korrektur der Arbeit auf Rechtschreibung und Zeichensetzung.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Mann Christian Rickert für seine stets geduldige und bedingungslose Unterstützung danken. Sein Blickwinkel war oft hilfreich, viele Dinge zu relativieren. Ich danke Dir für Alles.