

# Inhaltsverzeichnis

<b>Publikationsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Vorsätze im Dezimalsystem .....</b>	<b>X</b>
<b>1 Literaturübersicht .....</b>	<b>1</b>
1.1 Die humane Plazenta .....	1
1.1.1 Funktion der Plazenta .....	1
1.1.2 Aufbau der Plazenta .....	2
1.2 Östrogene während der Schwangerschaft des Menschen .....	4
1.2.1 Das Zusammenspiel von sulfatierten Steroiden und der Sulfatase in der Sexualhormon-Synthese .....	4
1.2.2 Syntheseweg von Östrogenen in der humanen Plazenta .....	6
1.2.3 Konzentration von Steroidsulfaten während der Schwangerschaft .....	9
1.2.4 Konzentration von Östrogenen während der Schwangerschaft .....	11
1.2.5 Die Rolle von Östrogenen während der Schwangerschaft .....	12
1.2.6 Das „Schwangerschaftshormon“ Estriol .....	14
1.3 Östrogene während der Trächtigkeit von Tieren .....	15
1.3.1 Pferd .....	15
1.3.2 Rind und Schwein .....	16
1.3.3 Hund .....	16
1.4 Die Familie der SLC10-Transporter .....	16
1.4.1 Überblick über die SLC10-Familie .....	17
1.4.2 Die Gallensäuretransporter NTCP (SLC10A1) und ASBT (SLC10A2) .....	17
1.4.3 Der Steroidsulfattransporter SOAT (SLC10A6) .....	19
1.5 Die Familie der SLCO-Transporter .....	21
1.5.1 Eigenschaften der SLCO-Familie .....	21
1.5.2 OATPs in der humanen Plazenta .....	22
1.5.3 OATP2B1 ( <i>SLCO2B1</i> ) für die lokale Östrogenbereitstellung .....	23
1.6 Die Familie der SLC22-Transporter .....	24
1.6.1 Überblick über die SLC22-Familie .....	24
1.6.2 OAT4 (SLC22A11) als Anionenaustauscher in Niere und Plazenta .....	24
1.7 Die Chorionkarzinomzelllinie JEG-3 .....	27
1.8 Zielsetzung .....	28
<b>2 Material .....</b>	<b>29</b>
2.1 Zellkultur .....	29
2.1.1 Zelllinien .....	29
2.1.2 Vektoren .....	30
2.1.3 Zellkulturmiedien und -lösungen .....	32
2.1.4 Antibiotika .....	33
2.2 Antikörper .....	33
2.3 Enzyme .....	34
2.3.1 Polymerasen .....	34
2.3.2 Restriktionsenzyme .....	34
2.3.3 DNAsen und RNAsen .....	35

2.4 Real-Time qRT-PCR .....	35
2.5 Kits .....	36
2.6 Kommerziell erhältliche Puffer, Lösungen und Reagenzien .....	36
2.7 Chemikalien und Substanzen .....	37
2.8 Radioaktiv markierte Substanzen .....	39
2.9 Geräte .....	39
2.10 Verbrauchsmaterial .....	41
2.11 „Rezepte“ für hergestellte Puffer und Lösungen .....	42
2.11.1 Ethanolpräzipitation .....	42
2.11.2 Agarose-Gelelektrophorese .....	42
2.11.3 Transformation kompetenter Zellen .....	43
2.11.4 RNA-Isolierung .....	43
2.11.5 DNA-Isolierung .....	43
2.11.6 $\beta$ -Galactosidase-Assay .....	44
2.11.7 Transportmessungen an Zellen .....	45
2.11.8 Proteinbestimmung .....	46
2.11.9 Immunfluoreszenz .....	46
2.11.10 Western Blot .....	47
2.11.11 Immunhistochemie .....	49
2.11.12 In-situ-Hybridisierung .....	50
<b>3 Methoden .....</b>	<b>53</b>
3.1 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmungen .....	53
3.2 Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA .....	53
3.3 Phenol-Chloroform-Extraktion .....	53
3.4 Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren .....	54
3.5 Transformation kompetenter Zellen und Aufreinigung von Plasmid-DNA .....	54
3.5.1 Transformation .....	54
3.5.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA im Midi-Maßstab .....	55
3.6 Isolierung von RNA .....	55
3.6.1 Gesamt-RNA-Isolierung aus Zellen .....	56
3.6.2 Gesamt-RNA-Isolierung aus LACP-Proben .....	56
3.7 cDNA-Synthese .....	57
3.7.1 cDNA-Synthese aus Zell-RNA .....	57
3.7.2 cDNA-Synthese aus LACP-RNA .....	58
3.8 Isolierung von DNA aus Zellen .....	59
3.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	60
3.9.1 PCR .....	61
3.9.2 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) .....	61
3.9.3 Real-Time quantitative Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR) .....	63
3.10 Agarose-Gelelektrophorese .....	65
3.11 Zellbiologische Methoden .....	65
3.11.1 Kultivierung und Passagieren von Zellen .....	65
3.11.2 Auszählen und Aussäen von Zellen .....	66
3.11.3 Einfrieren von Zellen .....	66
3.11.4 Auftauen von Zellen .....	66
3.11.5 Herstellung von DCC-FKS .....	67

3.12	Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen .....	67
3.12.1	Generierung einer FlpIn-JEG-3-Wirtszelllinie .....	68
3.12.2	β-Galactosidase-Assay .....	68
3.12.3	Generierung von stabil mit Transportern transfizierten JEG-3-Zellen .....	70
3.13	Transportmessungen mittels Flüssigszintillationsmessung .....	71
3.13.1	Versuchsvorbereitung .....	71
3.13.2	Aufnahmemessung .....	71
3.13.3	IC <sub>50</sub> -Messungen .....	72
3.13.4	Flüssigszintillationsmessung .....	72
3.13.5	Proteinbestimmung nach Lowry .....	72
3.13.6	Auswertung der Transportmessungen .....	73
3.14	Transportmessungen mittels Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS-MS) .....	73
3.14.1	Versuchsvorbereitung .....	73
3.14.2	Aufnahmemessung .....	74
3.14.3	LC-MS-MS-Messung .....	74
3.14.4	Proteinbestimmung mit dem BCA-Assay .....	74
3.14.5	Auswertung der Transportmessungen .....	74
3.15	Metabolismusmessungen .....	75
3.16	Immunfluoreszenz .....	75
3.17	Western Blot .....	76
3.17.1	Proteinextraktion aus Zellen .....	76
3.17.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	77
3.17.3	Proteintransfer (Gel-Blot) .....	78
3.17.4	Blockieren der Blotting-Membran und Antikörperraktion .....	79
3.17.5	Detektion .....	79
3.17.6	Stripping .....	80
3.18	Anfertigen histologischer Präparate .....	80
3.18.1	Anfertigen von Schnitten .....	80
3.18.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.) .....	80
3.19	Immunhistochemie .....	81
3.20	Laser-assisted cell picking (LACP) .....	82
3.20.1	Herstellung der Präparate .....	82
3.20.2	Gewinnung der Proben mittels LACP .....	83
3.21	In-situ-Hybridisierung .....	83
3.21.1	Herstellung der Sonde .....	83
3.21.2	Durchführung der In-situ-Hybridisierung .....	84
4	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>87</b>
4.1	Lokalisation von SOAT in der humanen Plazenta .....	87
4.1.1	Nachweis von SOAT-mRNA mittels Laser-assisted cell picking (LACP) und In-situ-Hybridisierung .....	87
4.1.2	Immunhistochemischer Nachweis des SOAT-Proteins .....	89
4.2	Identifizierung der Transporter für 16α-OH-DHEAS .....	91
4.2.1	Darstellung der Genexpression von stabil mit Transportern transfizierten HEK293-Zelllinien .....	91
4.2.2	Aufnahmemessungen mit 16α-OH-DHEAS .....	92
4.2.3	Hemmstudien mit 16α-OH-DHEAS .....	95
4.3	JEG-3-Zellen als Plazentamodell - Untersuchung von nativen JEG-3-Zellen .....	97
4.3.1	Expressionsprofil nativer JEG-3-Zellen .....	97
4.3.2	Aufnahme von sulfatierten Steroiden in nativen JEG-3-Zellen .....	98

<b>4.4</b>	<b>Stabile Transfektion von JEG-3-Zellen mit Steroidsulfattransportern .....</b>	<b>99</b>
4.4.1	Generierung einer FlpIn-JEG-3-Wirtszelllinie .....	99
4.4.2	Generierung von stabil mit Transportern transfigierten JEG-3-Zelllinien .....	102
4.4.3	Aufnahmemessungen an stabil mit Transportern transfigierten JEG-3-Zelllinien.....	106
<b>4.5</b>	<b>Metabolismusmessungen an JEG-3-Zellen .....</b>	<b>108</b>
4.5.1	Metabolismus von nativen JEG-3-Zellen .....	108
4.5.2	Metabolismus von stabil mit Transportern transfigierten JEG-3-Zelllinien .....	109
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>115</b>
<b>5.1</b>	<b>SOAT in der humanen Plazenta .....</b>	<b>115</b>
5.1.1	Lokalisation von SOAT .....	115
5.1.2	Physiologische Bedeutung von SOAT in der Plazenta .....	116
<b>5.2</b>	<b>Transport des Estriol-Vorläufers 16<math>\alpha</math>-OH-DHEAS .....</b>	<b>118</b>
5.2.1	Transporteigenschaften der getesteten Transporter .....	118
5.2.2	Überlegungen zur Bedeutung des Steroidsulfattransports für die hohe plazentare Estriolsynthese .....	121
<b>5.3</b>	<b>Steroidsulfattransporter in JEG-3-Zellen.....</b>	<b>122</b>
5.3.1	Expressionsprofil.....	122
5.3.2	Transport von Steroidsulfaten .....	123
<b>5.4</b>	<b>Stabile Transfektion von JEG-3-Zellen mit Steroidsulfattransportern .....</b>	<b>124</b>
5.4.1	SOAT-JEG-3-Zellen .....	124
5.4.2	OATP2B1-JEG-3-Zellen .....	126
5.4.3	Bewertung der stabilen Transfektion von JEG-3-Zellen.....	126
<b>5.5</b>	<b>Metabolismusmessungen an JEG-3-Zellen .....</b>	<b>127</b>
5.5.1	Metabolismus von nativen JEG-3-Zellen .....	128
5.5.2	Metabolismus von stabil mit Transportern transfigierten JEG-3-Zellen .....	133
5.5.3	Bewertung der Versuchsergebnisse.....	136
<b>5.6</b>	<b>16<math>\alpha</math>-Hydroxylasen in JEG-3-Zellen und der humanen Plazenta .....</b>	<b>138</b>
<b>5.7</b>	<b>CYP17 in JEG-3-Zellen und der humanen Plazenta .....</b>	<b>139</b>
5.7.1	Bisheriges Verständnis zur CYP17-Expression der Plazenta .....	139
5.7.2	Neue Erkenntnisse zur CYP17-Expression .....	140
5.7.3	Rolle von CYP17 in der Plazenta .....	141
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>143</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>144</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>146</b>
<b>9</b>	<b>Danksagungen .....</b>	<b>163</b>