

## **DIE UNTERSCHIEDLICHEN EXPRESSIONSPROFILE, WELCHE IN GRANULOSAZELLEN DURCH REKOMBINANTES FSH ODER REKOMBINANTES LH INDUZIERT WERDEN, DEUTEN AUF DAS VORHANDENSEIN UNTERSCHIEDLICHER SUBPOPULATIONEN IM OVARIALFOLLIKEL**

Mrabet N. 1,2), Moore J.3), Kossowska-Tomaszczuk K.1,2), Zhang H.1,2), Primig M. 3), De Geyter Ch.1,2)

Einleitung: Sowohl der FSH-Rezeptor als auch der LH-Rezeptor sind membran-gebundene Rezeptoren, die, wenn sie durch ihren jeweiligen Liganden aktiviert werden, eine Aktivierung der cAMP-Phosphokinase A-Signalkette bewirken, sowie, zu einem geringeren Ausmass, auch der Inositol-Signalkette. Am Ende der Follikelreifung verfügen die Granulosazellen über beide Rezeptoren. Bislang wurde davon ausgegangen, dass beide Rezeptoren in den Granulosazellen am Ende der Follikelreifung ein jeweils identisches Expressionsmuster bewirken und beide Signalwirkungen komplementär sind.

Material und Methoden: Luteinisierte Granulosazellen wurden im Rahmen der in-vitro Fertilisation oder der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion mittels der ultraschallkontrollierten, transvaginalen Follikelpunktion gewonnen. Sie wurden anschliessend mittels der Durchflusszytometrie basierend auf dem Vorhandensein eines FSH-Rezeptors von beigemischten Zellen getrennt. Die erste Gruppe der Granulosazellen wurde dann über drei Tage mit rekombinantem FSH kultiviert. Die zweite Gruppe der Granulosazellen wurde mit rekombinantem LH kultiviert, die dritte Gruppe mit rekombinantem FSH zusammen mit rekombinantem LH und die vierte Gruppe ohne Gonadotropine. Die wirksamen Konzentrationen des jeweiligen Gonadotropins wurde im Vorfeld mittels einer Dosis-Wirkungskurve basierend auf der Produktion von cAMP ermittelt. Nach drei Tagen wurden die Granulosazellen aus der Kultur genommen und mRNA isoliert. Anschliessend wurden bei allen Gruppen der behandelten Granulosazellen mit Affymetrix Genchips die Aktivierung oder Suppression von 54'000 Genen und Genfragmenten bestimmt. Die so entstandenen Genexpressionprofile wurden miteinander verglichen.

Resultate: Verglichen mit den Granulosazellen, die mit keinem der beiden Gonadotropinen kultiviert wurden, fanden sie in den Granulosazellen, die mit rekombinantem LH behandelt wurden, eine massive Änderung des Genexpressionsprofils. Im Gegensatz zu den Granulosazellen, die mit rekombinantem LH behandelt wurden, war das Genexpressionsprofil der Granulosazellen, die mit rekombinatem FSH behandelt wurde, nur geringgradig modifiziert. Die Genexpressionsprofile der Granulosazellen, welche durch beide Gonadotropine induziert wurden, waren nicht synergistisch.

Schlussfolgerung: Die sehr unterschiedlichen Genexpressionsprofile, welche durch rekombinantes LH und rekombinantes FSH induziert wurden, deuten auf das Vorhandensein von mindestens zwei unterschiedlichen Populationen von Granulosazellen. Jede Population dürfte somit über ein unterschiedliches Signalübermittlungssystem, bestehend aus Korezeptoren und Kinasen, verfügen.

## **THE EXPRESSION PROFILE OF GRANULOSA CELLS INDUCED BY RECOMBINANT LUTEINIZING HORMONE AND RECOMBINANT FSH REFLECTS THE PRESENCE OF DIFFERENT SUBPOPULATIONS IN MATURE FOLLICLES**

Mrabet N. 1,2), Moore J.3), Kossowska-Tomaszczuk K.1,2), Zhang H.1,2), Primig M. 3), De Geyter Ch.1,2)

- 1) Woman's Hospital, University Hospital of Basel
- 2) Department BioMedicine, University Hospital of Basel
- 3) INSERM Rennes, France

Introduction: Both the FSH receptor and the LH receptor are G-protein coupled transmembrane receptors, which when activated by their specific ligand, lead to activation of the cAMP-protein kinase A pathway, and, to a minor extent, of phosphokinase C. During their final stages of maturation ovarian follicles express both the FSH and the LH receptor. Currently, it is thought that both receptors exert their signalling via the same pathways.

Material and Methods: Luteinizing GCs, collected from infertile women treated with assisted reproduction, were identified and sorted with a fluorescence-activated cell sorter (FACS) based upon the presence of the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR). A subset of sorted GCs was cultured for three days in the presence of either recombinant FSH, or recombinant LH, both recombinant FSH and LH or none of both in otherwise hormone-free culture medium. The appropriate concentrations of FSH and LH were previously determined by a dose-response curve given by their relative cAMP production rates. Then, these GCs were harvested, mRNA extracted and their respective gene expression profiles determined with Affymetrix<sup>®</sup> gene chip technology, each with 54'000 probesets of genes covering the entire human genome including probesets controlling for signalling plausibility.

Results: When compared with the GCs exposed to none of both hormones, a large array of more than a thousand probesets of genes were either up- or down-regulated by recombinant LH, whereas only a limited number of probesets of genes were either up- or downregulated by recombinant FSH. No synergy was found between the gene expression profiles of both hormones.

Conclusion: Based on these very divergent gene expression patterns, we conclude that luteinizing GCs contain at least two distinct sub-populations, each with its own regulative pathways downstream of their respective gonadotropin receptors and their respective signal transmitting complexes (G proteins, inositol pathway), presumably consisting of a cascade of kinases and regulatory circuits leading to differential gene expression patterns. Repeated sorting of GCs with FACS with antibodies against FSHR or LHR corroborates this finding, which may have significant impact on the use of recombinant FSH preparations as compared to mixed preparations with both FSH and LH activities.