

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. K. Diedrich

**15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ induziert Apoptose in
Progenitor-Leydigzellen der Ratte**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Anke Maike Anneliese Diemert
aus Düsseldorf

Lübeck 2005

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. W. Küpker

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. O. Hiort

Tag der mündlichen Prüfung:

23.03.2006

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den

23.03.2006

Gez. Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann

-Dekan der Medizinischen Fakultät-

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung	4
2	Literaturüberblick	6
2.1	Der Hoden	6
2.2	Die Leydigzelle	6
2.2.1	Die prä- und postnatale Entwicklung der Leydigzellen	8
2.3	Die Prostaglandine	10
2.3.1	Das Prostaglandinderivat 15d-PGJ ₂	12
2.4	Der programmierte Zelltod (Apoptose)	13
2.4.1	Die Bedeutung der Apoptose für das Leben	14
2.4.2	Morphologische Veränderungen während der Apoptose	15
2.4.3	Biochemische Veränderungen während der Apoptose	15
3	Material und Methoden	23
3.1	Reagenzien und Antikörper	23
3.2	Die Präparation von Progenitor-Leydigzellen (PLCs)	24
3.3	Die Kultivierung und Behandlung der Progenitor-Leydigzellen	25
3.4	Die Western-Immunoblot-Analyse	26
3.5	Die Durchflusszytometrie	26
3.5.1	Durchflusszytometrische Untersuchung des Apoptoseverlaufs	27
3.5.2	Durchflusszytometrische Messung von Reactive Oxygen- Species (ROS)	29
3.6	Statistische Analysen	30
4	Untersuchungen und Ergebnisse	31
4.1	Einfluß des Prostaglandinderivats 15d-PGJ ₂ auf die Vitalität der PLCs	31
4.2	Zeit- und dosisabhängige Effekte von 15d-PGJ ₂ auf PLCs	32
4.3	Abgrenzung der Apoptose von der Nekrose unter 15d-PGJ ₂ -Einfluss in PLCs	35
4.4	Charakteristische biochemische Veränderungen unter dem Einfluss von 15d-PGJ ₂	36
4.5	Aktivierung der Caspasenkaskade während der durch 15d-PGJ ₂ ausgelösten Apoptose	38
4.6	Abschwächung der Apoptose durch Pan-Caspasen Inhibitor Zvad	39
4.7	Abhängigkeit der durch 15d-PGJ ₂ induzierten Apoptose von PPAR γ	41
4.8	Einfluss der durch 15d-PGJ ₂ induzierten Apoptose auf die Expression von p53	42
4.9	Beteiligung der „Reactive Oxygen Species“ (ROS) an den Apoptosevorgängen	43
5	Diskussion der Ergebnisse	48
5.1	Kritische Würdigung dieser Studie	55
6	Zusammenfassung	61
7	Literaturverzeichnis	62
8	Anhänge	76
8.1	Abkürzungsverzeichnis	76
8.2	Abbildungsverzeichnis	78
	Danksagung	80
	Lebenslauf	81

1 Einleitung und Fragestellung

Die Hoden als männliche Keimdrüsen weisen eine komplexe Morphologie und Funktion auf und sind im Laufe des Lebens zahlreichen potentiell schädlichen Einflüssen ausgesetzt. Schädigungen des Hodengewebes können Infertilität, maligne Entartung oder männlichen Hypogonadismus zur Folge haben. Neben den eigentlichen Keimzellen, den Spermatozoen und ihren Vorläufern, sind insbesondere die Testosteron produzierenden Leydigzellen und ihre Vorläufer anfällig für Umwelteinflüsse. Zu ihrer Schädigung kann es durch Medikamente, Chemikalien, Stoffwechselprodukte (Urämie) und durch Entzündungen kommen (1-3). Dabei scheint die Empfindlichkeit für schädigende Einflüsse in den verschiedenen Lebensphasen unterschiedlich zu sein (4). Eine für die Funktion der Leydigzellen besonders kritische Phase ist die männliche Pubertät, in deren Verlauf es zu einer zunehmenden Steigerung der Testosteronsekretion um ein Vielfaches der präpubertären Werte (5) kommt.

Die Leydigzellen unterscheiden sich von ihren Vorläuferzellen hinsichtlich ihrer Differenzierung, ihrer Morphologie und der Fähigkeit zur Testosteron-Sekretion. Vorläuferzellen sind auch das Reservoir, aus dem sich in der Pubertät oder nach Schädigung im Erwachsenenalter die Leydigzellen differenzieren.

Unter diesen Vorläuferzellen stellen die sogenannten Progenitor-Leydigzellen (PLCs) eine wichtige Subpopulation dar. Es wird vermutet, dass diese eine essentielle Funktion beim Beginn der Pubertät haben. In dieser Phase kommt es zu einer raschen Zunahme des Hodenvolumens, die klinisch einem der ersten Pubertätszeichen entspricht (6). Durch Ausschüttung von luteinisierendem Hormon (LH) steigt der lokale Testosteronspiegel plötzlich an, obwohl zu diesem Zeitpunkt kaum reife Leydigzellen im Hoden-Interstitium vorhanden sind (7). Dieser Anstieg der Testosteronsekretion wird vermutlich durch die Progenitor-Leydigzellen ausgelöst, welche zwar unreife Vorstufen der Leydigzellen sind, jedoch bereits die Fähigkeit zur Testosteronsekretion besitzen (5, 8).

Prostaglandine sind wichtige Signalmoleküle. Sie entstehen aus der in allen Zellmembranen vorkommenden Arachidonsäure, und in einer spontanen Reaktion bildet sich das 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J_2 (15d-PG J_2) aus Prostaglandin D_2 , einem der

Hauptprodukte des sogenannten Cyclooxygenase–Zyklus. Die physiologische Funktion von 15d-PGJ₂ ist zum Teil noch ungeklärt. Es konnte schon gezeigt werden, dass 15d-PGJ₂ als Ligand des nukleären Transkriptionsfaktors PPAR γ wirkt und somit die Expression einer Reihe von Genen beeinflussen kann (9, 10). Erhöhte Gewebekonzentrationen von 15d-PGJ₂ wurden insbesondere im Rahmen von Entzündungen gemessen (11) und in zahlreichen Zelltypen wurde beobachtet, dass 15d-PGJ₂ den programmierten Zelltod (Apoptose) auslösen kann (12-18).

Möglicherweise spielt 15d-PGJ₂ auch eine Rolle in der Pathogenese der Hodenfibrose (19). Bei dieser Erkrankung kommt es zu einem fibrösen Umbau der Hodenkanälchen und dadurch zu Störungen der Spermatogenese. So wurden bei Hodenbiopsien von infertilen Männern vermehrt fibrotische Veränderungen der Tubuli Seminiferi festgestellt (20). Eine jüngere Studie zeigt außerdem, dass die Expression von Cyclooxygenase-2 (COX-2), dem Schlüsselenzym in der Synthese des Prostaglandin D₂, in fibrotischen Hodenbiopsaten vermehrt ist (19). Die ebenfalls festgestellte Aktivierung von PPAR γ (19) könnte ein weiterer Hinweis auf die Wirkung von 15d-PGJ₂ und seine Bedeutung für die Pathogenese von Erkrankungen des Hodens sein.

In der hier vorgelegten Arbeit wird der Einfluss des 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandins J₂ auf die Vitalität und die Funktion von kultivierten Progenitor-Leydigzellen der Ratte untersucht. Insbesondere soll erforscht werden, ob es in Progenitor-Leydigzellen durch 15d-PGJ₂ zur Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose) kommt und wie dieser Effekt vermittelt wird. Diese Arbeit steht in Zusammenhang mit einem umfassenden Programm zur Erforschung der Fertilität und ihrer Störungen und resultiert aus einer Kooperation von Prof. Dr. Küpker mit dem Population Council der Rockefeller University (New York, USA).

2 Literaturüberblick

Nachfolgend wird eine kurze Übersicht zu den in dieser Arbeit verwendeten Leydigzellen des Hodens und den Prostaglandinen gegeben, die an diesen Zellen getestet wurden. Dabei wird die aktuelle Literatur zu dieser Thematik ausgewertet.

2.1 Der Hoden

Die Hoden, lateinisch testis (singular) bzw. testes (plural), sind die paarig angelegten männlichen Keimdrüsen, deren Hauptaufgabe die Produktion der Spermien und des männlichen Sexualhormons Testosteron ist. Bei einer Länge von 4.5-5.1 cm, 3 cm Breite und 2 cm Tiefe (21, 22) liegt das durchschnittliche Hodenvolumen eines jungen gesunden Mannes bei ca. 15-25 ml (23). Die Hoden sind von einer festen Kapsel umschlossen. In ihr ist das testikuläre Parenchym von drei Schichten umgeben. Diese werden von innen nach außen als Tunica Vaginalis, Tunica Albuginea und Tunica Vasculosa bezeichnet. Von der Tunica Albuginea aus zieht ein Strang von Bindegewebe in den Testis, das sogenannte Mediastinum Testis. Von diesem ziehen Blutgefäße und Nerven in das Hodengewebe. Innerhalb der Kapsel wird jeder einzelne Hoden durch bindegewebige Septen in Kompartimente unterteilt. Auf diese Weise bilden sich in jedem Hoden ca. 200-300 konisch geformte Hodenläppchen oder Lobuli. Diese Lobuli enthalten wiederum einen oder mehrere Tubuli Seminiferi. In diesen Tubuli befindet sich das Keimepithel, das aus den reifen Keimzellen, ihren Vorläuferzellen (Spermatozoen und Spermatogonien) und den Sertoli-Zellen besteht, welche die sich entwickelnden Keimzellen umgeben und eine Stütz- und Ernährungsfunktion ausüben. Die einzelnen Tubuli Seminiferi werden von Bindegewebe umgeben. Die Leydigzellen residieren im interstitiellen Raum des Hodens, separiert von den Hodenkanälchen und dem Germinalepithel. Sie befinden sich dort in unmittelbarer Nachbarschaft von Mastzellen, Makrophagen, Nerven, Blut- und Lymphgefäßen (24). Im menschlichen Hoden macht dieses interstitielle Gewebe ca. 20-30 % des totalen Hodenvolumens aus, Leydigzellen alleine umfassen 5-12 % (25).

2.2 Die Leydigzelle

Leydigzellen wurden 1850 erstmalig von dem deutschen Zoologen und vergleichenden Anatom Franz von Leydig (1821-1908) beschrieben und tragen seitdem seinen Namen.

Bouin und Ancel erbrachten 1903 als Erste den Nachweis der Testosteron-Sekretion durch Leydigzellen (26).

Testosteron, welches aus den Steroidvorläufern Cholesterin und Pregnenolon gebildet wird, ist das wichtigste vom menschlichen Hoden produzierte Androgen. Neben Testosteron werden jedoch noch weitere C18-, C19- und C21-Steroide von den Leydigzellen produziert (27, 28). Pregnenolon, welches in den Mitochondrien aus Cholesterin gebildet wird, dient als Vorläufer-Molekül für alle Steroidhormone. Im Glatten Endoplasmatischen Retikulum wird Pregnenolon durch das Enzym 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase zu Progesteron umgewandelt. Progesteron ist das erste biologisch aktive Hormon. Progesteron wird durch das Enzym 17 α -Hydroxylase/C17-20lyase (P450c17) umgewandelt zu Androstendion. Der letzte Schritt in der Biosynthese des Testosterons ist die Umwandlung von Androstendion durch das Enzym 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase zu Testosteron (29). Testosteron stellt einen wesentlichen Regulator der männlichen Sexualfunktion und der Fortpflanzung dar, da es unter anderem für die Initiierung der Spermatogenese in der Pubertät und für ihr lebenslanges Bestehen verantwortlich ist. Als weitere biologische Wirkungen des Testosterons sind zum Beispiel die Differenzierung und Ausbildung des fetalen Reproduktionstraktes (24, 30), die Maskularisierung in der Pubertät (31) sowie später das weitere Wachstum und die Unterhaltung der Androgen-abhängigen Organe beim erwachsenen Mann zu nennen.

Die Testosteron-Sekretion der Leydigzellen wird durch das im Hypophysenvorderlappen gebildete Luteinisierende Hormon (LH) stimuliert. LH bindet an die membranständigen LH-Rezeptoren der Leydigzellen und löst somit eine cAMP-abhängige Signaltransduktions-Kaskade aus, welche die Testosteron-Sekretion stimuliert. Die LH-Sekretion des Hypophysenvorderlappens wird wiederum durch das übergeordnete, im Hypothalamus gebildete Gonadotropin-Releasing Hormon gesteuert (32). Neben der direkten endokrinen Kontrolle der Leydigzellen durch LH findet auf vielfältige Weise eine lokale, parakrine Kontrolle statt (33). Die Sertolizellen, welche unter der endokrinen Kontrolle des Follikel-stimulierenden Hormons (FSH) stehen, sezernieren verschiedene parakrine Substanzen, die entweder hemmend (z.B. TGF- β) oder stimulierend (z.B. Inhibin, Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1)) auf die Leydigzellen und die Testosteronproduktion wirken (34).

2.2.1 Die prä- und postnatale Entwicklung der Leydigzellen

Die prä- und postnatale Differenzierung der Leydigzellen wurde vor allem am Beispiel der Ratte untersucht. Übersichten hierzu finden sich bei Huhtaniemi und Pelliniemi (35), Hardy (36) sowie Mendis-Handagama und Ariyaratne (37). Im Folgenden werden diese Ergebnisse kurz zusammengefasst.

2.2.1.1 Fetale und adulte Leydigzellen

Generell werden zwei unterschiedliche Populationen von Leydigzellen beschrieben: fetale und adulte Leydigzellen. Fetale Leydigzellen differenzieren sich bereits während der fetalen Entwicklung in utero zu Leydigzellen. Bei der Geburt ist eine bestimmte Anzahl dieser fetalen Leydigzellen vorhanden, so dass bereits in der Neonatalperiode eine geringe Sekretion von Androgenen stattfindet. Diese zahlen- und volumenmäßig geringe Population reicht jedoch nicht für die in der Pubertät und im Erwachsenenalter erforderliche Testosteronsekretion aus. Eine zweite Population von Leydigzellen wird als adulte Leydigzellen bezeichnet. Diese differenzieren sich erst nach der Geburt bzw. im Laufe des Lebens aus mesenchymalen Vorläuferzellen im Hodeninterstitium. Die adulten Leydigzellen stellen die für die Pubertät und das Erwachsenenalter zahlenmäßig und funktionell wichtigere Population der Leydigzellen dar.

2.2.1.2 Embryonale Entwicklung

Wie alle somatischen Zellen des Hodens entwickeln sich die Leydigzellen in der Embryonalentwicklung aus dem Mesonephros. Sie entstehen aus undifferenzierten mesenchymalen Zellen in den ventromedialen Anteilen des Mesonephros, dem sogenannten testikulären Primordium. Aus diesen Primordialzellen entwickeln sich sowohl die Hodenkanäle (Tubuli Seminiferi) als auch das Interstitium des Hodens. Das Interstitium besteht zunächst aus undifferenzierten mesenchymalen Zellen. Aus diesen differenzieren sich dann im Laufe der Embryonalentwicklung verschiedene Zelltypen, wie beispielsweise Fibroblasten, glatte Muskelzellen oder die fetalen Leydigzellen. Wie bereits erwähnt, bleibt ein Teil dieser undifferenzierten, mesenchymalen Vorläuferzellen bis in das Erwachsenenalter hinein erhalten. Sie bilden den Ursprung und die Reserve für die postnatale Differenzierung der Leydigzellen.

2.2.1.3 Postnatale Differenzierung der Leydig-Zelllinie am Beispiel der Sprague-Dawley-Ratte

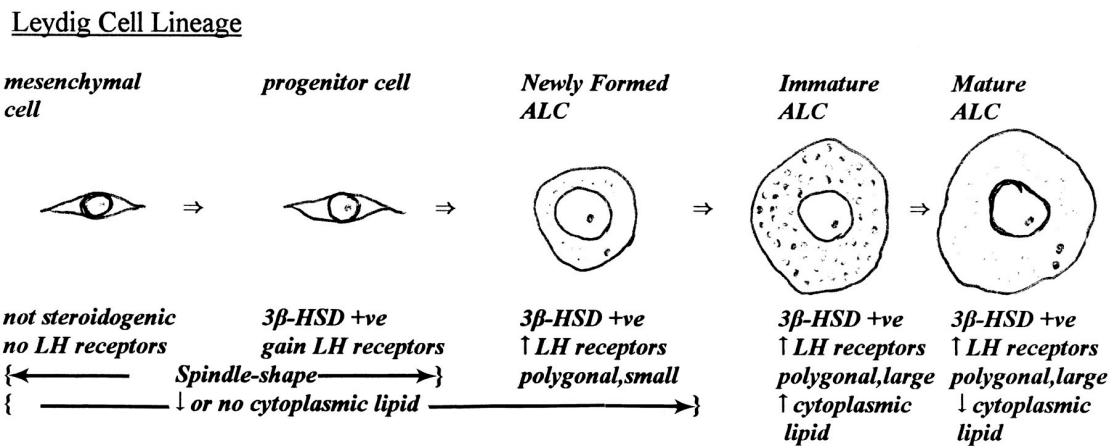


Abbildung 1: Postnatale Differenzierung der Leydig-Zelllinie (37)

Wie Abb. 1 zeigt, können fünf Differenzierungsstufen der Leydig-Zelllinie unterschieden werden. Die postnatale Entwicklung nimmt ihren Ursprung von den mesenchymalen Vorläuferzellen des Hoden-Interstitiums. In der Ratte differenzieren sich etwa am 14. Tag post partum mit dem Beginn der Pubertät zahlreiche Vorläuferzellen zu Progenitor-Leydigzellen (PLCs). PLCs sind morphologisch den mesenchymalen Vorläuferzellen noch sehr ähnlich. Wie diese sind die PLCs spindelförmige Zellen. Sie können jedoch anhand ihrer biochemischen Eigenschaften von den Vorläuferzellen unterschieden werden. Die wichtigsten Kriterien für diese Unterscheidung sind die messbare 3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSD)-Aktivität der PLCs und die Expression von LH-Rezeptoren auf der Plasmamembran. Demgegenüber haben die mesenchymalen Vorläuferzellen weder eine messbare 3β-HSD-Aktivität noch nachweisbare LH-Rezeptoren. Die PLCs sind zu einem großen Teil bereits in der Lage, Androgene zu bilden, aber trotz dieser Fähigkeit besitzen sie nur sehr wenig oder gar kein Glattes Endoplasmatisches Retikulum. Auch ist ihr zytoplasmatisches Volumen gering. Das Glatte Endoplasmatische Retikulum enthält Schlüsselenzyme der Androgen-Biosynthese. Steroidogene Zellen weisen typischerweise einen grossen Anteil an Glatttem Endoplasmatischem Retikulum auf. Mit zunehmendem Anteil an Glatttem Endoplasmatischem Retikulum steigt auch die Verfügbarkeit der Enzyme für die Steroid-Produktion. Weshalb PLCs trotz des nahezu vollständigen Fehlens nachweisbare Mengen an Androgen produzieren können, ist noch Gegenstand der Forschung (38).

Bei der Sprague-Dawley-Ratte werden etwa zwischen Tag 21 und 56 post partum aus den PLCs neugebildete adulte Leydigzellen (newly formed adult Leydig cells: ALCs). Die ALCs können wiederum morphologisch und biochemisch von den PLCs unterschieden werden. Am auffälligsten ist ihre rundliche Form im Vergleich zu den spindelförmigen PLCs. Diese mehr rundliche Form ist bedingt durch die Volumenzunahme des Endoplasmatischen Retikulums und des Zytoplasmas. Die Expression von LH-Rezeptoren auf der Plasmamembran ist gegenüber der der PLCs noch einmal deutlich gesteigert.

Aus den neugebildeten adulten Leydigzellen (newly formed ALCs) differenzieren sich als weiteres Übergangsstadium die unreifen, adulten Leydigzellen (immature ALCs), welche vor allem durch die Akkumulation von Lipid-Tropfen in ihrem Zytoplasma imponieren. Diese gespeicherten Lipide werden für die Androgen-Synthese benötigt.

Etwa ab Tag 56 post partum finden sich im Hoden der Sprague-Dawley-Ratte schließlich die reifen, ausdifferenzierten Leydigzellen (mature ALCs), die nun in der Lage sind, Testosteron in großen Mengen auszuschütten und die Geschlechtsreife zu unterhalten.

Die postnatale Differenzierung der Leydig-Zelllinie von den mesenchymalen Vorläuferzellen bis zu adulten Leydigzellen wird durch zahlreiche endokrine und parakrine Signale gesteuert. Unter diesen scheint das Thyroidea-Stimulierende Hormon (TSH) eine entscheidende Rolle zu spielen. Induziert man in Ratten eine Hypothyreose, so unterbleibt die Bildung von PLCs (39). Im Gegensatz zu TSH hemmen Androgen und Östrogen die Differenzierung von Vorläuferzellen zu PLCs (40). Die Differenzierung von PLCs zu adulten Leydigzellen (ALCs) scheint endokrinologisch hauptsächlich durch LH kontrolliert zu werden (39).

2.3 Die Prostaglandine

Anfang der dreißiger Jahre entdeckte Ulf von Euler hormonähnliche Substanzen im menschlichen Sperma, die blutdrucksenkende und uteruskontrahierende Wirkungen aufwiesen. Da er (fälschlicherweise) annahm, dass sie von der Prostata gebildet wurden, erhielten sie den Namen Prostaglandine.

Prostaglandine sind Lipide und gehören gemeinsam mit den Thromboxanen, den Prostacyclinen und den Leukotrienen zur Substanzklasse der Eicosanoide (eikosi (griechisch)= zwanzig) (41). Die Eicosanoide leiten sich biosynthetisch von der vierfach

ungesättigten C-20-Fettsäure Arachidonsäure (5Z, 8Z, 11Z, 14Z-Eicosatetraensäure) ab. Prostaglandine werden als Gewebshormone bzw. autokrine Substanzen angesehen. Wegen ihrer kurzen Halbwertszeit ist ihre Wirkung lokal begrenzt (42).

Prostaglandine kontrollieren zahlreiche physiologische Prozesse, wie z.B. die Nierenfunktion, die Thrombozytenaggregation, die Freisetzung von Neurotransmittern und die Modulation der Immunantwort (43).

Die Prostaglandin-Synthese beginnt mit der Freisetzung von Arachidonsäure aus Phospholipiden der Plasmamembran durch das Enzym Phospholipase A₂. Diese Arachidonsäure wird durch die beiden Cyclooxygenase-Enzyme COX-1 und COX-2 zu Prostaglandin H₂ umgewandelt.

Den beiden Cyclooxygenase (COX)-Isoenzymen kommt eine Schlüsselrolle in der Prostaglandin-Synthese zu, denn sie regulieren die quantitative Bildung der Prostaglandine (44, 45). Das ubiquitär vorkommende COX-1 vermittelt eine Vielzahl physiologischer Funktionen und scheint vor allem für homöostatische Prozesse wie beispielsweise die Mukusproduktion der Schleimhäute von Bedeutung zu sein (46). Dagegen ist die Expression von COX-2 konstitutionell kaum nachweisbar. Sie ist allerdings in einer Vielzahl spezialisierter Zellen, insbesondere in Zellen des Immunsystems, induzierbar (47). COX-2 nimmt an der Regulation spezifischer physiologischer Prozesse teil, wie beispielsweise Entzündung, Ovulation, Implantation oder Verschluss des Ductus arteriosus Botalli (47).

Ausgehend vom Prostaglandin H₂ können nun viele biologisch aktive Endprodukte der grossen Gruppen der Prostacycline und der Thromboxane gebildet werden. Diese Umwandlungen werden jeweils durch spezifische Enzyme (Synthasen, Isomerasen und Reduktasen) vermittelt. Zur Gruppe der Prostacycline gehören beispielsweise Prostaglandin E₂, Prostaglandin F₂ und das in hohen Konzentrationen vorkommende Prostaglandin D₂ (PGD₂).

Aus Prostaglandin D₂ entsteht durch spontane Umwandlung 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂, welches gewissermassen ein Abbauprodukt des Prostaglandins D₂ darstellt. Diese spontane Degradation von Prostaglandin D₂ nach längerer Inkubation in Gegenwart von Albumin zu 15d-PGJ₂ wurde erstmalig von Fitzpatrick 1983

beschrieben (48). Abbildung 2 gibt einen vereinfachten Überblick über die Entstehung von 15d-PGJ₂.

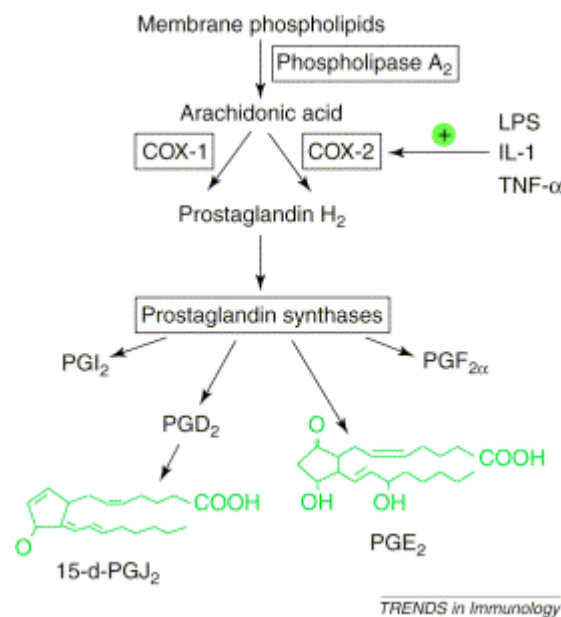


Abbildung 2: Entstehung von 15d-PGJ₂ (49)

2.3.1 Das Prostaglandinderivat 15d-PGJ₂

Bis 1995 wurde 15d-PGJ₂ zunächst keine größere Aufmerksamkeit zuteil. Im Jahre 1995 erschienen dann unabhängig voneinander in der gleichen Ausgabe der Zeitschrift „Cell“ zwei Veröffentlichungen, in denen 15d-PGJ₂ als vermutlich endogener Ligand des nukleären Rezeptors und Transkriptionsfaktors PPAR_γ (Peroxisome-Proliferator-aktivierter Rezeptor) beschrieben wurde (9, 10).

PPAR_γ reguliert eine Vielzahl von Genen mit wichtigen Funktionen im Stoffwechsel. Thiazolidinedione (Rosiglitazone, Pioglitazone und weitere) werden als synthetische Agonisten von PPAR_γ inzwischen weitverbreitet in der Diabetes-Therapie eingesetzt. Ein endogener PPAR_γ-Agonist ist jedoch bisher noch nicht identifiziert worden. In vitro zeigt 15d-PGJ₂ ähnliche Effekte wie die synthetischen PPAR_γ-Liganden (50). Diese Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass 15d-PGJ₂ als physiologischer Regulator auf verschiedene durch PPAR_γ vermittelte Effekte wirken könnte. Diese Effekte reichen von der Zelldifferenzierung und Regulation des Blutzuckerspiegels (51) über einen antikanzerogenen Effekt durch Hemmung von Tumorwachstum und Angiogenese (52) bis hin zu Regulationen im Entzündungsprozess (53, 54). Auf Grund dieser Vermutungen wurde 15d-PGJ₂ zum Gegenstand intensiver Forschung.

Während zunächst die möglichen Wirkungen von 15d-PGJ₂ als Aktivator von PPAR γ im Vordergrund standen, zeigten sich in jüngster Zeit zahlreiche Effekte, die nicht durch PPAR γ vermittelt werden. Insbesondere wurde beobachtet, dass 15d-PGJ₂ als Inhibitor der I κ B-Kinase in Makrophagen wirken kann und somit durch indirekte Hemmung des Transkriptionsfaktors NF κ B eine starke anti-entzündliche Wirkung ausübt (55).

Zahlreiche Ergebnisse deuten also darauf hin, dass das Prostaglandin 15d-PGJ₂ eine anti-entzündliche Rolle spielen könnte. Diese Vermutung wird auch durch in vivo-Studien unterstützt, die zeigen, dass 15d-PGJ₂ in Tiermodellen die entzündliche Reaktion von Krankheiten wie der adjuvant induzierten Arthritis (17) oder dem Ischämie-Reperfusionsschaden (56) hemmen kann. Verwirrenderweise lassen andere Studien einen gegenteiligen Effekt erkennen, nämlich eine pro-inflammatorische Wirkung von 15d-PGJ₂. So wurde beispielsweise gezeigt, dass 15d-PGJ₂ die Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α and IL-6 fördern kann (57). Ferner wurde in verschiedenen Zelltypen unter Behandlung mit 15d-PGJ₂ eine gesteigerte Expression von pro-inflammatorischen Proteinen wie Phospholipase A₂, COX-2 oder Interleukin 8 festgestellt (58-60). Somit bleibt die Rolle von 15d-PGJ₂ in der Pathogenese von Entzündungen weiterhin unklar. Sie ist Gegenstand intensiver Forschung.

2.4 Der programmierte Zelltod (Apoptose)

Nach heutigem Wissensstand wird der Tod einzelner Zellen des Körpers nicht nur durch äußere Einflüsse bewirkt, sondern er kann auch von den Zellen selber eingeleitet werden. Dieser programmierte Zelltod wird als Apoptose bezeichnet. Der Vorgang der Apoptose wurde erstmalig 1972 von Kerr und Mitarbeitern beschrieben (61). Er spielt eine wichtige Rolle in einer Vielzahl biologischer Prozesse, wie zum Beispiel in der Morphogenese, der Gewebs-Homöostase, der Elimination von beschädigten oder infizierten Zellen oder auch der Elimination von gegen eigene Antigene des Individuums gerichteten Zellen des Immunsystems (62).

Schon früh wurde ein Zusammenhang zwischen 15d-PGJ₂ und Apoptose vermutet. Ein pro-apoptotischer Effekt von 15d-PGJ₂ wurde in zahlreichen Studien und verschiedenen

Zelltypen beobachtet, so zum Beispiel in Brustkrebszellen (63), in aus Monozyten differenzierten Makrophagen (14, 64, 65) in Endothelzellen (15), in Synoviozyten (17) und in normalen und maligne entarteten B- und T- Lymphozyten (16, 18)

Interessanterweise existieren in den verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Mechanismen, die die durch 15d-PGJ₂ vermittelte Apoptose auslösen. In manchen Zellen wird die Apoptose offenbar durch PPAR γ vermittelt (15-18, 66). In vielen anderen Zelltypen wurde jedoch eine von PPAR γ unabhängige, durch 15d-PGJ₂ vermittelte Apoptose beschrieben. Zum Teil wird hier eine Aktivierung von Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPkinasen) als der die Apoptose auslösender Mechanismus angenommen (65, 67, 68). In anderen Zellen scheint die Hemmung der I κ B-Kinase durch 15d-PGJ₂ die Apoptose auszulösen (69, 70). Neuere Studien zeigen ferner einen Zusammenhang von durch 15d-PGJ₂ vermittelter Apoptose mit vermehrtem oxidativen Stress, welcher durch die gesteigerte Bildung von sogenannten Reactive Oxygen Species (ROS) messbar wird (71, 72). Offenbar existieren bezüglich der Wirkmechanismen der durch 15d-PGJ₂ vermittelten Apoptose Überlappungen.

2.4.1 Die Bedeutung der Apoptose für das Leben

Die Forschung auf diesem Gebiet wurde durch die Erkenntnis angetrieben, dass die normale Entwicklung und Gesundheit von Metazoen einen koordinierten Ablauf der Apoptose voraussetzt (62).

Ihr Ziel ist die Aufdeckung der molekularen und biochemischen Steuerungsmechanismen der Apoptosevorgänge. Von diesen Erkenntnissen könnten neue therapeutische Ansätze für die Behandlung zahlreicher Erkrankungen abgeleitet werden. Während ein normaler Ablauf der Apoptose unersetzlich für den Säugetier-Organismus ist, kann die abnorme Steigerung der Apoptose zur Pathogenese von Krankheiten wie AIDS, neurodegenerativen Erkrankungen und Organschädigung durch Ischämie beitragen (73). Im Gegensatz dazu wird eine Hemmung der Apoptose als ein wichtiger Faktor in der Entstehung von Karzinomen, Autoimmunerkrankungen und viralen Infektionen angesehen (73).

Die Apoptose wird charakterisiert durch eine Vielzahl morphologischer und biochemischer Veränderungen, die im Folgenden näher erläutert werden.

2.4.2 Morphologische Veränderungen während der Apoptose

Der Ablauf des programmierten Zelltods ist gekennzeichnet durch einen charakteristischen Ablauf morphologischer Veränderungen der Zelle, die kollektiv als Apoptose bezeichnet werden. Apoptose ist ein griechischer Term, der übersetzt „abfallen“ bedeutet, in dem Sinne, wie Blätter von einem Baum abfallen (61). Viele grundlegende morphologische Veränderungen wurden bereits von Kerr 1972 beschrieben, weitere morphologische Veränderungen wurden nachfolgend durch viele andere Autoren bekannt (74-76).

Die Apoptose geht einher mit Zellschrumpfung, Schädigung der Mitochondrien, Kondensierung des Chromatins, Fragmentierung der DNA und Bildung von sogenannten "apoptotic bodies" (englisch für Apoptosekörperchen). Diese morphologischen Veränderungen während der Apoptose sind spezifisch und unterscheiden sich deutlich von den Veränderungen während der Nekrose von Zellen, also dem durch äußere Einflüsse herbeigeführten Zelltod (77). Im Gegensatz zu apoptotischen Zellen zeigen Zellen in der Nekrose typischerweise eine Schwellung, welche buchstäblich zum Platzen der Zelle und zur Freisetzung von intrazellulären Substanzen in die Umgebung der nekrotischen Zelle führt. Die derartig freigesetzten Substanzen schädigen das umliegende Gewebe und führen zu einer entzündlichen Reaktion (78). Bevor es zu einer Nekrose kommt, leiten die Zellen oftmals die Apoptose ein. Damit wird die Entstehung von entzündlichen Prozesse verhindert (62, 77).

2.4.3 Biochemische Veränderungen während der Apoptose

Am Anfang der Apoptose steht ein Stimulus, der die apoptotische Antwort auslöst. Dieser kann ein externes Signal sein, welches durch Oberflächen-Rezeptoren vermittelt wird, oder er kann aus dem Inneren der Zelle selbst stammen, wie z.B. durch die Wirkung einer Droge, eines Medikaments, Toxins oder durch Bestrahlung. Die zweite Phase der Apoptose besteht in der Erkennung und Transduktion dieses Signals. Signaltransduktionskaskaden übertragen das auslösende Signal zu einer komplexen zellulären Maschinerie. Diese Maschinerie beinhaltet zum Beispiel proteolytische Enzyme wie die „Caspasen“ sowie andere Proteine, die als positive und negative Regulatoren der Apoptose wirken. In der letzten Phase der Apoptose kommt es zur Degradation der DNA. In vivo, aber nicht unbedingt in vitro, werden diese sterbenden Zellen erkannt und von anderen Zellen phagozytiert (79).

Ein großer Teil des heutigen Wissens über die Biochemie der Apoptose verdanken wir Studien an dem Wurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Der adulte, hermaphroditische Wurm bildet zunächst 1090 somatische Zellen aus, von denen genau 131 durch Apoptose sterben (80, 81). Durch genetische Untersuchungen an *C. elegans* wurde eine Reihe von Genen identifiziert, welche die Apoptose dieser Zellen steuern. Diese wurden als CED-Gene (CED= cell death defective) bezeichnet, wie zum Beispiel CED-3 (82), CED-4 (83), CED-5 (84). Die Klonierung und genauere Charakterisierung dieser Gene erbrachten wichtige Beiträge zum molekularen Verständnis der Apoptose. So stellte sich beispielsweise heraus, dass CED-9 in *C. elegans* Parallelen zur humanen Bcl-2-Familie (81, 85) und CED-3 zu der Caspase-Familie (86) besitzen. Viele der in *C. elegans* gewonnenen Erkenntnisse zur Apoptose lassen sich auf den menschlichen Organismus übertragen, da die biochemischen Bausteine der Apoptose im Verlauf der Evolution hochkonserviert geblieben sind (62).

Im Folgenden soll auf einzelne Proteine bzw. Proteinfamilien genauer eingegangen werden, da der Nachweis dieser Proteine von großer Bedeutung in dieser Arbeit ist.

2.4.3.1 Die Cystein-Familie der „Caspasen“

Als „Caspasen“ wird eine Familie von Cystein-Proteasen bezeichnet, die eine wichtige „Trigger“ (englisch= Auslöser)-Rolle in der Steuerung der Apoptose einnehmen, da sie eine proteolytische Kaskade aktivieren (87). Sie wurden Caspasen genannt, weil sie an anderen Proteinen die Aminosäure Aspartat (= *aspartate*) in kleinere Fragmente schneiden (= *cleave*). Die Caspasen stellen in den Säugetieren das Homolog zu CED-3 in *C. elegans* dar (86) und entstehen zunächst als inaktive Pro-Enzyme. Bei Beginn der Apoptose kommt es dann zur weiteren Prozessierung durch Eigenproteolyse sowie zur Proteolyse durch andere Proteasen. Durch die Proteolyse werden verschiedene kleinere und größere Untereinheiten gebildet, die sich dann zu einer aktiven Form des Enzyms zusammenlagern können (88). Die sogenannten Initiator-Caspasen (Caspasen 1,2,4,5,8,9,10 und 12) werden auf einen pro-apoptotischen Stimulus hin aktiviert (61). Diese Initiator-Caspasen besitzen spezielle N-terminale Domänen, über die sie mit Botenmolekülen interagieren können (87). Werden diese Caspasen durch entsprechende Signale aktiviert, führt dies zur Proteolyse von nachgeordneten Caspasen, den sogenannten Effektor-Caspasen (89). Die Effektor-Caspasen bewirken sodann den Zelltod auf bisher noch nicht vollständig erforschtem Weg (90). Unter anderem wurden

folgende Effekte der Caspasen beobachtet: 1. Inaktivierung der Inhibitoren von proapoptischen Proteinen, 2. Zerstörung der Zellstruktur und 3. Deregulierung von Proteinen durch Abspaltung der Regulatordomäne von der katalytischen Domäne. Die klassische Initiator-Caspase 9 wird durch Schädigung der DNA und durch die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien aktiviert. Diese schneidet hierauf die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7. Insbesondere Caspase 3 besitzt dabei eine Schlüsselrolle in der frühen Phase der Apoptose und bewirkt die Proteolyse von anderen Caspasen und weiteren Proteinen in Zytoplasma und Zellkern. Unter anderem schneidet sie auch den Androgen-Rezeptor (AR) (91).

Die Aktivierung der Caspase 3 kann durch 15d-PGJ₂ vermittelt werden und ist in einer Reihe von Zelltypen beschrieben worden (15, 65, 71, 92). Neben der Aktivierung über mitochondriale Signale, wie z.B. Cytochrom c-Freisetzung, stellt die durch den Transkriptionsfaktor p53 vermittelte Aktivierung von zunächst Caspase 8 und 9 und nachfolgend Caspase 3 einen wichtigen Auslöser der Apoptose dar (93).

2.4.3.2 Die Signalkaskade der MAP-Kinase

Die von durch Mitogen aktivierte Protein-Kinasen (MAP-Kinasen) vermittelten Signalkaskaden werden durch extrazelluläre Signale aktiviert und übertragen solche Signale an das Zellinnere. Diese Signalkaskaden bestehen aus bis zu fünf nachgeordneten Proteinkinasen, welche einander durch Phosphorylierung aktivieren. Die vier bisher bekannten MAP-Kinase-Signalkaskaden werden abgekürzt als ERK, JNK, SPK/p38MAP-Kinase und BMK (Erk5)-Kaskade bezeichnet (94). Die Signaltransduktion durch MAP-Kinasen beeinflusst so unterschiedliche Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung, Stressreaktion und Apoptose. Die sogenannte Jun-N-terminale-Kinase (JNK), die in den Experimenten dieser Arbeit eine Rolle spielt, wird von einer Vielzahl von extrazellulären Stimuli, wie zum Beispiel entzündlichen Zytokinen und Wachstumsfaktoren, aktiviert. Nach der Aktivierung findet eine Translokation von JNK in den Zellkern statt, wo diese MAP-Kinase die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise p53 und c-Jun beeinflusst (95, 96).

2.4.3.3 Das Proto-Onkogen Bcl-2

Bei vergleichenden Studien von *C. elegans* mit humanen Tumor-Zelllinien wurde ein durch die Evolution konservierter Apoptosemechanismus entdeckt, die Bcl-2-Familie, welche das Säugetier-Homolog des CED-9 Gens des *C. elegans* darstellt (81). Das

ursprünglich geklonte und charakterisierte Bcl-2-Gen agiert als ein proto-Onkogen, welches das Überleben der Zellen durch Hemmung der Apoptose fördert (97). Von den Mitgliedern der Bcl-2-Familie wurden Bax, Bad, Bcl-xl und Bcl-2 im Testis der Nager exprimiert (98-101).

In der Signaltransduktion der Apoptose spielen die Proteine der Bcl-2-Familie eine bedeutende Rolle. Mitglieder dieser Familie können sowohl pro-apoptotisch (Bad, Bax, Bcl-xs, Bak) als auch anti-apoptotisch (Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1) wirken. Dabei bestimmt das quantitative Verhältnis der einzelnen Faktoren zueinander ihre Wirkung mit (102). Außer Bad und Bid besitzen alle Mitglieder der Bcl-2-Familie eine hydrophobische Transmembrandomäne, welche diese Proteine an den Membranen von Mitochondrien, des Zellkerns oder des Endoplasmatischen Retikulums verankert (103). Bad fehlt diese Verankerung und es ist daher überall im Zytoplasma zu finden (103, 104).

Eine Veränderung der Genexpression ist für eine gesteigerte Aktivität von Proteinen der Bcl-2-Familie nicht notwendig, da Phosphorylierungen in der sogenannten variablen Domäne die Aktivität der meisten Bcl-2-Proteine regulieren. So führt beispielsweise die Phosphorylierung von Bad, vermittelt durch das mitochondriale Protein Raf-1, zu einer Sequestrierung von Bad durch das sogenannte 14-3-3-Protein und damit zur Inaktivierung von Bad (105).

Ein Hinweis auf die Wirkung der Bcl-2-Proteine ergab sich aus röntgenkristallographischen Studien. Sie implizieren, dass die Bcl-2-Proteine ionenselektive Poren in Membranen bilden. Diese Beobachtung erklärt die veränderte Permeabilität des Zellkerns, die in der Apoptose beobachtet wurde und zu einer Anfärbbarkeit der DNA mit dem Fluorochrom 7-AAD führt. Überexpression von Bcl-2 verhindert diese Permeabilitätsänderung und somit die Apoptose (103, 106).

2.4.3.4 Die Gruppe der „Heat Shock Proteine“ (HSP)

Unter den „Heat Shock Proteinen“ versteht man eine große Protein-Familie von einander sehr ähnlichen, ubiquitären Proteinen, die für das Leben der Zelle essentiell sind. Die verschiedenen Mitglieder dieser Familie werden nach ihrem Molekulargewicht in Kilodalton (kDa) benannt. Die HSP-Proteine tragen den Namen Hitzeschock-Proteine, da ihre Expression in der Zelle durch Stressfaktoren wie beispielsweise Hitze, Hypoxie, Mangel an Nährstoffen, freie Radikale oder auch virale Infektionen induziert wird (107). Ein weiterer Aktivator der HSP-Expression ist die Akkumulation von ungefalteten oder falschgefalteten Proteinen in der Zelle, der

sogenannten “unfolded protein response (UPR)” (108). Der UPR ist ebenfalls ein Stressfaktor für die Zelle und kann Apoptose auslösen.

Die HSP haben die Funktion von Chaperonen. Sie helfen bei der Komplexbildung und Faltung von anderen Proteinen oder Proteinkomplexen. Darüber hinaus wird vermutet, dass HSP auch beim Transport von Proteinen zwischen einzelnen Zellkompartimenten eine Rolle spielen (109).

Die HSP-70-Familie besteht aus mehreren Proteinen von ca. 70 kDa Molekulargewicht, welche als Chaperone funktionieren und gleichzeitig Adenosintriphosphat (ATP) spalten können. Die HSP-70-Proteine besitzen eine amino-terminale 44 kDa-Domäne, welche ATP hydrolysiert und mit der so gewonnenen Energie die Chaperon-Aktivität des Proteins antreibt. Der carboxy-terminale Anteil der Proteine besteht aus lose angeordneten β -Faltblättern. Diese Domäne bindet hydrophobe Peptide aus jeweils sechs Aminosäuren, welche den Ansatzpunkt für die Faltung und die Chaperonaktivität der HSP-70-Proteine bilden (110).

2.4.3.5 Die nukleäre Hormon-Rezeptor-Superfamilie (NR)

Die nukleäre Hormon-Rezeptor-Superfamilie (NR) besteht aus Liganden-abhängigen und -unabhängigen Transkriptionsfaktoren (111). Diese Transkriptionsfaktoren haben Bedeutung für so unterschiedliche physiologische Prozesse wie Stoffwechsel, Reproduktion und embryonale Entwicklung. Eine wichtige Gruppe in dieser Familie, auf die in dieser Studie eingegangen wird, bilden die Steroid-Hormon-Rezeptoren, im Speziellen der Glucocorticoid-Rezeptor (GR) und der Androgen-Rezeptor (AR). Es wird angenommen, dass diese nukleären Hormon-Rezeptoren im Zellkern Komplexe mit anderen Proteinen bilden. Diese Multiprotein-Komplexe können dann direkt mit der Promotor- oder Enhancer-Region der Zielgene interagieren und somit Einfluss auf deren Expression nehmen (111, 112).

2.4.3.5.1 Der Glucocorticoid-Rezeptor (GR)

Der Glucocorticoid-Rezeptor reguliert den Metabolismus der Kohlenhydrate, Proteine und Fette, unterdrückt die Immun- und Entzündungsantwort, aktiviert das ZNS, reguliert cardiovaskuläre Funktionen und wirkt auf die basale und stressinduzierte Homöostase.

2.4.3.5.2 *Der Androgen-Rezeptor (AR)*

Der Androgen-Rezeptor vermittelt in den einzelnen Geweben und Zelltypen den Effekt der Androgene Testosteron und 5- α -Dihydrotestosteron. Die Androgene wirken natürlich auf die männlichen Reproduktionsorgane, aber auch in anderen Geweben wie Muskeln, Leber, Haut, Nerven- und Immunsystem. Mutationen des Androgen-Rezeptors spielen eine Rolle in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen wie beispielsweise des Prostatakarzinoms, der testikulären Feminisierung, der spinal-bulbären Muskelatrophie und der androgenetischen Alopezie. Caspase 3 schneidet den Androgen-Rezeptor spezifisch an der Aminosäure Aspartat in Position 148, und diese Proteolyse des Androgen-Rezeptors tritt während der Apoptose vermehrt auf (113).

2.4.3.6 *Die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR)*

Die sogenannten Peroxisome-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) stellen eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren dar, die ebenfalls zur Familie der nukleären Hormon-Rezeptoren gezählt werden. PPARs sind durch Liganden-Bindung aktivierte Transkriptionsfaktoren. Sie sind verwandt mit den nukleären Rezeptoren für Retinoide, Steroidhormone und Schilddrüsenhormone (114). Bisher sind drei PPAR-Isoformen bekannt: α , δ , and γ . PPAR α beeinflusst die Transkription von Genen, welche z.B. in die β -Oxidation von Fettsäuren oder die Lipolyse von Lipoproteinen involviert sind. PPAR γ wirkt vor allem auf den Glukosestoffwechsel sowie die Differenzierung und den Metabolismus von Adipozyten und Makrophagen (115, 116). In jüngster Zeit haben die Pharmaka aus der Gruppe der Thiazolidinedione (z.B. Rosiglitazon, Pioglitazon, Ciglitazon) große Bedeutung in der Diabetestherapie erlangt (117). Diese Medikamente wirken als Agonisten von PPAR γ und vermindern somit die Insulinresistenz.

2.4.3.7 *Das Tumor-Suppressor-Gen-p53*

P53 funktioniert in zahlreichen Tumoren als Tumor-Suppressor-Gen. Abhängig vom Zelltyp und den physiologischen Bedingungen induziert p53 entweder Apoptose oder stoppt die Zellteilung, indem es in den Zell-Zyklus eingreift. P53 kontrolliert die Zellteilung, indem es als Transaktivator die Transkription vieler nachgeordneter Gene reguliert. Zu diesen nachgeordneten Genen gehören beispielsweise Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen (118, 119). Im Amino-Terminus des Proteins befindet sich eine DNA-Bindungsdomäne mit einer charakteristischen Struktur, mittels derer p53 an Zielgene binden kann.

Das Protein p53 wird aktiviert durch zelluläre Stress-Faktoren wie z.B. Schädigung der DNA durch ultraviolette Strahlung oder durch Hypoxie. Kommt es in einer Zelle durch äußere Einflüsse zu einer Schädigung der DNA, so kann p53 den Zellzyklus stoppen, so dass vor einer erneuten Zellteilung zunächst die DNA-Schäden repariert werden können. P 53 wurde deshalb auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (119).

Ist der Schaden der DNA der Zelle zu groß, kann p53 aber auch Apoptose induzieren. Zu Beginn der Apoptose läßt sich eine gesteigerte Expression von p53 sowie eine Translokation des p53-Proteins in den Nukleus beobachten (118). Ferner konnte gezeigt werden, dass es in der Apoptose unter der Wirkung von p53 zu einer gesteigerten Transkription der pro-apoptotischen Gene Bax und Fas kommt (120). Dieses wird als der Hauptmechanismus der durch p53 vermittelten Apoptose angesehen. Darüber hinaus kann p53 auch die Transkription von Bcl-2 hemmen, was ebenfalls einen pro-apoptotischen Effekt auf die Zelle hat. In zahlreichen Tumoren wurden mutierte Formen des p53-Gens gefunden, welche das pro-apoptotische Potential verloren haben und somit in der Karzinogenese mitwirken (121).

2.4.3.8 Die Stoffgruppe der „Reactive Oxygen Species“ (ROS)

ROS sind hochreaktive Stoffe, die der Klasse der freien Radikale angehören (122). Unter einem freien Radikal versteht man Moleküle oder auch einzelne Atome, die ein oder mehrere freie, ungepaarte Elektronen in ihrer äußeren Schale besitzen (123). Reactive Oxygen Species (ROS) spielen eine Rolle in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen wie z.B. Entzündungen, Infektionen, Alkoholtoxizität, Ischämieschäden, Zellschädigung durch ultraviolette Strahlung (124-126) oder auch Cryptorchidismus (127). Der kumulative oxidative Schaden durch jahrelange Exposition von Körperzellen gegenüber ROS wird als einer der Hauptmechanismen der Zellalterung angenommen (128).

Die Leydigzellen werden als besonders anfällig für durch ROS verursachte Schädigung angesehen. Dies ist vermutlich durch ihre enge Nachbarschaft zu zahlreichen Makrophagen im Hoden-Interstitium bedingt (129). Immunkompetente Zellen wie die Makrophagen im Interstitium des Hodens sezernieren als natürlicher Abwehrmechanismus (sogenannter „respiratory burst“) größere Mengen an freien Radikalen in die unmittelbare Umgebung (130). Diese Freisetzung von ROS schädigt jedoch nicht nur in das entsprechende Gewebe eingedrungene Mikroorganismen, sondern kann darüber hinaus auch empfindliche Zellen in der unmittelbaren Umgebung,

wie z.B. die Leydigzellen, durch oxidativen Stress schädigen. Nach Kontakt mit Mikroorganismen oder anderen entzündlichen Reizen wurde eine ROS-Freisetzung durch Makrophagen des Hoden-Interstitiums nachgewiesen (131). Eine solche entzündliche Aktivität tritt vermutlich in vivo z.B. im Rahmen einer Orchitis auf. Ferner konnte gezeigt werden, dass freie Radikale die Testosteron-Produktion der Leydigzellen vermindern (129). Dies geschieht vermutlich durch Hemmung des Enzyms 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, eines Schlüsselenzyms der Steroid-Synthese.

Neben der Freisetzung im Rahmen von entzündlichen Prozessen werden ROS auch kontinuierlich als Nebenprodukte der Atmungskette in den Mitochondrien gebildet. Sie können ferner als Nebenprodukt katalytischer Reaktionen in der Steroid-Biosynthese durch die Cytochrom P450-Enzyme in den Leydigzellen freigesetzt werden (132).

Zahlreiche Autoren haben eine wichtige Rolle von ROS in der Auslösung der Apoptose postuliert und viele Gewebe und Zelltypen wurden im Hinblick auf diese Fragestellung untersucht. So wurde beispielsweise eine erhöhte Apoptoserate in männlichen Keimzellen der Ratte nach exogener Zufuhr von Wasserstoffsuperoxid nachgewiesen (133). Eine weitere Arbeit beschäftigte sich mit der Rolle von Phtalat-Estern im Zusammenhang mit Infertilität. Diese Substanzen werden in großem Umfang als Weichmacher in der Kunststoffindustrie verwendet und es wird ein Zusammenhang zwischen Phtalat-Exposition und Hodenatrophie vermutet (134). Ikeda und Mitarbeiter konnten zeigen, dass eine Exposition gegenüber Phtalat-Estern zu einer erhöhten Konzentration von freien Radikalen im Rattenhoden führte, was wiederum eine erhöhte Apoptoserate im Keimepithel auslöste (135).

In den letzten Jahren wurde ROS in ihrer Bedeutung für den männlichen Reproduktionstrakt zunehmende Aufmerksamkeit zuteil. Mehrere Arbeiten haben ROS im Hinblick auf ihre potentiell toxischen Effekte auf die Keimzellen untersucht. Dabei traf man auf erhöhte ROS-Werte in 25-40 % der Samenproben infertiler Männer (136, 137).

3 Material und Methoden

3.1 Reagenzien und Antikörper

15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin- J_2 (15d-PG J_2), N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (Ome)-fluoromethylketone (ZVAD-fmk) und N-Acetyl-L-Cystein (NAC) wurden von Calbiochem (San Diego, CA, USA) bezogen. Die PPAR γ -Agonisten/Antagonisten 2-Chloro-5-nitro-N-phenylbenzamide (GW 9662), Rosiglitazone und 4-Chloro-6-(2,3-xylylidino)-2-pyrimidinylthioacetic Acid (WY 14643) stammten von Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA) und Accutase® von Innovative Cell Technologies (San Diego, CA, USA). Der Annexin V-FITC-Apoptose-Kit 2, welcher den Farbstoff Propidiumjodid (PJ) beinhaltet, wurde von BD Pharmingen (San Jose, CA, USA), 7-Actino-Aminomycin D (7-AAD) und 2',7'-Dichlorodihydrofluoreszein-Diacetate (H₂DCFDA) wurden von Molecular Probes (Eugene, OR, USA), Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde über Fischer Scientific (Brightwaters, NY, USA) erworben.

Die folgenden Antikörper wurden für die Western-Immunoblot-Analyse benutzt (die jeweiligen Verdünnungen sind in Klammern angegeben): Anti-Caspase-3-Antikörper (Kaninchen polyklonal, 1:500), Anti-Caspase-9-Antikörper (Kaninchen, polyklonal, 1:1000), Anti-p53-Antikörper (Kaninchen, polyklonal, 1:2000), sowie der Anti-Phospho (Thr183/Tyr185)-SAPK/JNK-Antikörper (Kaninchen, polyklonal, 1:1000). Diese Antikörper wurden jeweils von Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) bezogen. Kaninchen-polyklonaler Anti-Glucocortikoid-Rezeptor-Antikörper (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Kaninchen-polyklonaler Anti-COX-2-Antikörper (1:1000, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA), Maus-monoklonaler Anti-Bax-Antikörper (Ab-5, 1:50, Oncogene, San Diego, CA, USA), sowie ein Maus-monoklonaler Anti-HSP-70-Antikörper (1:5000, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA) wurden von den jeweils angegebenen Stellen bezogen. Das Kaninchen-polyklonale Anti-Androgen-Rezeptor-Antiserum (AR, PG-21, 1:1000) wurde großzügigerweise von Drs. Douglas Stocco (Texas Tech, Houston, TX, USA) und Gail Prins (University of Illinois, Chicago, IL, USA) zur Verfügung gestellt.

3.2 Die Präparation von Progenitor-Leydigzellen (PLCs)

Die Isolierung von Progenitor-Leydigzellen für die Primärkultur erfolgte aus dem Hoden von 18 Tage alten Sprague-Dawley-Ratten (CrI: CD (Sprague Dawley) BR-CD, Charles River Laboratories Inc., Kingston, NY, USA) wie in der Literatur beschrieben (138, 139). Hierzu wurden die 18 Tage alten Ratten durch Einleitung von Kohlendioxid in den Käfig getötet.



Abbildung 3: 18 Tage alte Sprague-Dawley-Ratte nach Eröffnung der Peritonealhöhle. Die Klemme greift am Hoden an. Hoden und Samenstrang sind zu erkennen.

Unter steriler Arbeitstechnik erfolgten ein suprapubitaler Schnitt und stumpfe Freipräparation der abdominalen Wand bis kurz unterhalb des Rippenbogens. Durch einen parasagitalen Schnitt wurde die Peritonealhöhle eröffnet zur Darstellung von Hoden und Samensträngen. Nach Freilegung wurden die Hoden entnommen und in eine Petrischale mit PBS (englisch für phosphate buffered saline = Phosphat gepufferte Kochsalzlösung) - Puffer überführt. Die Hodenkapsel wurde entfernt und die Hoden wurden in PBS-Puffer mit 25 mg/ml Kollagenase/Dispase (Roche Diagnostika, Mannheim, Deutschland) und 0.42 mg DNase (Sigma, St. Louis, USA) versetzt, 20 Minuten lang bei 34°C unter kontinuierlichem Rütteln angedaut, um einzelne Zellen aus dem Gewebe heraus zu lösen. Danach wurde die so gewonnene Zellsuspension durch einen 100 Micron-Filter passiert und für 10 Minuten bei 1500 UpM zentrifugiert.

Das durch die Behandlung mit Kollagenase und Dispase gewonnene Zellpellet wurde sodann einer Dichte-Gradienten-Zentrifugation in einer Percoll®-Lösung (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) zugeführt, um eine mit PLCs angereicherte Fraktion zu erhalten. Zur besseren Auftrennung wurden der Percoll-Lösung und der Zellsuspension zusätzlich sogenannte „Density-Marker-Beads“ (Sigma, St. Louis, USA)

beigemischt. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 13500 UpM in einer auf 4°C gekühlten Beckman Coulter Avant J-25-Zentrifuge, unter Verwendung eines JA-20 Rotors (Beckmann Coulter, Anaheim, USA), wurden drei separate, verschiedenfarbige Banden sichtbar. Deren Dichte korrespondierte mit Buoyant Dichte 1,019 g/ml (blaue Bande), 1,051 g/ml (grüne Bande) und 1,062 g/ml (rote Bande). Die Fraktion der aufgereinigten Progenitor-Leydigzellen (PLCs) befand sich zwischen der roten Bande (Buoyant Dichte von 1,062 g/ml) und den Erythrozyten, welche sich knapp unterhalb der blauen Bande (Buoyant Dichte von 1,019 g/ml) anreicherten.

Nach der Isolation und Aufreinigung wurden die Zellen bei 1500 UpM zentrifugiert und zweimal in PBS-Puffer gewaschen. Mittels eines Hämocytometers wurden die PLCs gezählt und in Zellkultur-Schalen ausplattiert.

Sämtliche Tierversuche folgten strikt den Richtlinien für die Pflege und den Gebrauch von Labortieren durch das National Institute of Health (NIH, USA) sowie dem Protokoll Nummer 01062 des „Institutional Animal Care and Use Commity (IACUC)“ der Rockefeller Universität (Rockefeller University, New York, NY, USA).

3.3 Die Kultivierung und Behandlung der Progenitor-Leydigzellen

Nach der Isolation und Purifikation wurden die PLCs über Nacht (24 h) kultiviert (bei 34°C, 5 % CO₂, im Wasser-isolierten Inkubator, Typ 3250, Forma Scientific, Marietta, OH, USA). Als Medium wurde Phenolrot-freies Ham's F-12/low Glucose/DMEM Medium (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) verwendet, versetzt mit 0.1 % fötalem Rinderserum (FBS, JRH Scientific, Lenexa, KS, USA), HEPES, Natriumbicarbonat (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) und dem Antibiotikum Gentamicin (Gibco, Grand Island, NY, USA).

Die Primärkultur der PLCs wurde initial für 24 Stunden bei einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen pro 60-mm- oder 5×10^6 Zellen pro 100-mm-Polystyren-Kulturschale (Corning, New York, NY, USA) unterhalten. Nach 24 Stunden Inkubation wurde das Kulturmedium aspiriert und die PLCs wurden zweimal mit serumfreiem Medium gewaschen. Die für den jeweiligen Versuch benötigten Reagenzien, Medikamente oder Inhibitoren, bzw. die jeweilige Trägersubstanz als Kontrolle (Ct), wurden sodann in spezifischer Dosierung und Zeitdauer zum Medium zugegeben.

3.4 Die Western-Immunoblot-Analyse

Progenitor-Leydigzellen wurden in 200 µl eiskaltem Extraktions-Puffer lysiert (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, versetzt mit 150 nM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % NP-540, 0.1 % SDS, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 µM Dithiothreitol, 2 µg/ml Aprotinin, 2 mg/ml Pepstatin A und 1 mM Natrium-Orthovanadat (Sigma, St. Louis, MO, USA). Anschließend wurde das Lysat für 15 Minuten bei 12000 UpM und 4°C zentrifugiert um Zelltrümmer zu entfernen. Die Proteinkonzentration des Zell-Lysates wurde anschließend mittels eines Bradford-Assays bestimmt (140). Zur elektrophoretischen Auftrennung mittels SDS-Page Gel-Elektrophorese wurden sodann 20 µg pro Bahn des Proteinextraktes auf ein Fertiggel (4-20 % Tris-Glycine Gel, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) geladen. Anschliessend erfolgte der Transfer auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA). Zur Größenunterscheidung wurde ein entsprechender Größenmarker verwendet (Rainbow Molecular Weight Marker, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England). Nach dem Transfer erfolgte die Inkubation der Membran mit den entsprechenden Maus- oder Kaninchenantikörpern. Als Sekundärantikörper wurden Meerrettichperoxidasegekoppelte Anti-Maus- oder Anti-Kaninchen-Antikörper in einer Verdünnung von 1:3000 verwendet. Unter Einsatz des ECL-Plus-Kits (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshir, England) erfolgte die Detektion der Banden mittels Chemolumineszenz. Zur Normalisierung der Proteinladung wurden die Membranen nachfolgend mit einem monoklonalen Anti-β-Actin-Antikörper inkubiert (Sigma, St. Louis, MO, USA). Die densitometrische Analyse wurde mit einem Scanner (Molecular Dynamics, Boulder, CO, USA) und der Software Scion Image des National Institute of Health durchgeführt.

3.5 Die Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden die physikalischen Eigenschaften von Zellen gemessen. Während die Zellen einzeln verschiedene Detektoren passieren, wird die Lichtstreuung aufwärts und orthogonal gemessen. Die Lichtstreuung der Zelle ist abhängig von der Zellgröße, Oberflächen- und Zytoplasmabeschaffenheit. Zusätzlich wird die Fluoreszenzintensität verschiedener mit Farbstoff konjugierter Antikörper gemessen.

Alle durchflusszytometrischen Messungen wurden auf einem FACScan (englisch= Fluorescent Aktivated Cell Sorting) des Typs FACSCalibur (4-Farben Zytometer) (BecktonDickinson, San Jose, CA, USA) ausgeführt. Dieses Durchflusszytometer ist mit einem luftgekühlten Argonionen- sowie einem Diodenlaser ausgestattet. Der Argonionenlaser strahlt Licht einer Wellenlänge von 488 nm, der Diodenlaser von 635 nm aus. Beide Laser besitzen verschiedene Kanäle zur simultanen Detektion von grünem, gelb-orangem und rotem Licht. Die mit dem Durchflusszytometer gewonnenen Daten wurden mit Hilfe der CellQuest Pro 4.0.1 Software (Beckton Dickinson, San Jose, CA, USA) analysiert.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurde zunächst eine Zellsuspension der Progenitor-Leydigzellen hergestellt, indem die Zellen durch eine 10 minütige Inkubation mit Accutase® von der Kulturoberfläche abgelöst wurden. Danach wurden die PLCs zweifach mit eiskalter Pufferlösung (PBS/1 % BSA) gewaschen und anschließend in einem Bindungs-Puffer (10 mM HEPES/NaOH (pH 7.4), 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) gelöst. Bis zur Messung mit dem Durchflusszytometer, die binnen einer Stunde erfolgte, wurden die Zellen vor Licht geschützt und gekühlt gelagert.

3.5.1 Durchflusszytometrische Untersuchung des Apoptoseverlaufs

In den letzten Jahren haben sich verschiedene Methoden etabliert, um mittels Durchflusszytometrie die Apoptoserate in Zellsuspensionen zu bestimmen. Entweder werden Antikörper verwendet (Annexin V) oder Farbstoffe, die eine in Abhängigkeit von der Integrität der Plasmamembran abhängige Färbung gestatten. Auch können die durch Apoptose induzierten Veränderungen in der Zellmorphologie, wie z.B. die Zellgröße und Granularität, mittels des sogenannten Aufwärtsstreulichtes in der Durchflusszytometrie erfasst werden.

In dieser Arbeit wurden zur durchflusszytometrischen Messung der Apoptose in PLCs Färbungen mit Propidiumjodid, 7-AAD und Annexin V-FITC durchgeführt.

3.5.1.1 Färbung mit Annexin V und Propidiumjodid

Zu den ersten Anzeichen apoptotischer Prozesse gehören Veränderungen in der Plasmamembran. In vitalen Zellen ist Phosphatidylserin (PS) asymmetrisch in der Doppelmembranen verteilt; dabei enthält die innere Schicht anionisch geladene Phospholipide (PS) und die äußere Schicht neutrale Phospholipide (141). In der

Apoptose kommt es sehr früh zu einer Translokation des Phospholipids Phosphatidylserin von der inneren in die äußere Schicht der Plasmamembran (Abbildung 4), wodurch PS der extrazellulären Umgebung gegenüber exponiert wird (142). Diese veränderte Phospholipidanordnung scheint bei der Erkennung apoptotischer Zellen durch Makrophagen eine entscheidende Rolle zu spielen (143). Annexin V ist ein 35-36 kD $-Ca^{2+}$ -abhängiges, phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität zu Phosphatidylserin. Mit FITC (Fluoreszeinisothiocyanat) markiertes Annexin V bindet an dieses Phospholipid (144) und kann so mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie (145) nachgewiesen werden. Zur Unterscheidung von Nekrose wird eine Gegenfärbung mit Propidiumjodid (PJ) angewandt. Propidiumjodid ist ein Stoff, der in DNA-Stränge interkaliert und die Durchlässigkeit der Plasmamembran belegt.

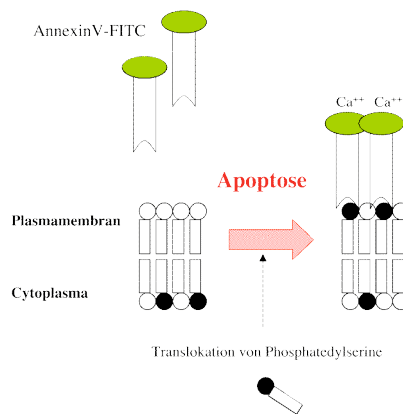


Abbildung 4: Umverteilung des Phosphatidylserins (schwarze Punkte) in der Plasmamembran während der Apoptose. Dabei kommt es zu einer Umverteilung von der inneren Schicht auf die äußere Schicht. Sobald PS in der äußeren Schicht zum Extrazellulärraum exponiert wird, bindet Annexin V-FITC.

Hierdurch können Zellen in der ersten Phase der Apoptose (Propidiumjodid-negativ) von Zellen in der letzten Phase sowie von nekrotischen Zellen (Propidiumjodid-positiv) unterschieden werden. Da Phosphatidylserin schon externalisiert wird, bevor in der DNA Strangbrüche entstehen, ist Annexin V-FITC ein hervorragender Marker, um frühe Stadien der Apoptose zu erfassen (145, 146). FITC-konjugiertes Annexin V wurde in dieser Arbeit verwendet um frühe Stadien der Apoptose in PLCs zu erfassen. Der Test wurde gemäß den Instruktionen des Herstellers Becton Dickison (San Jose, CA, USA) benutzt.

Die Fluoreszenz des Fluoreszeinisothiocyanates (FITC) wurde im grünen Spektrum mittels eines 530 nm Filters gemessen. Propidiumjodid (PJ) wurde im orangen Spektrum mittels eines 585 nm Filters gemessen. Abbildung 5 zeigt exemplarisch ein

sogenanntes Dot-Plot-Histogramm einer solchen Färbung mit Annexin V-FITC und Propidiumjodid.

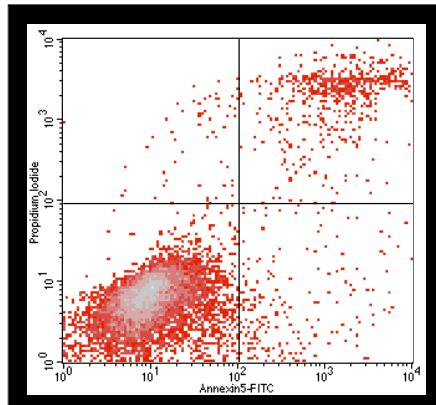


Abbildung 5: Zwei Farben Dot-Plot-Histogramm (Färbung von PLCs mit Annexin V-FITC und Propidiumjodid). Die Mehrzahl der Zellen befindet sich im linken unteren Quadranten und sind vitale Zellen. Diese Zellen weisen weder PS in der äußeren Schicht ihrer Plasmamembran auf, noch ist ihre Membran für PJ durchlässig. Zellen, die sich nur mit Annexin V, jedoch nicht mit PJ anfärben, befinden sich im rechten unteren Quadranten. Diese Zellen befinden sich im ersten, frühen Stadium der Apoptose. Sie weisen bereits PS in der äußeren Schicht der Plasmamembran auf, diese ist aber noch nicht durchlässig für PJ. Zellen, die sich sowohl mit Annexin V als auch mit PJ anfärben, befinden sich im rechten oberen Quadranten. Diese Zellpopulation durchläuft das letzte Stadium der Apoptose oder ist bereits tot.

3.5.1.2 Färbung mit 7AAD

Der kationische Farbstoff 7-AAD wird von vitalen Zellen, die eine intakte Plasmamembran besitzen, nicht resorbiert. Ist die Integrität der Plasmamembran jedoch gestört, wie dies in der Apoptose der Fall ist, färben sich die Zellen an (147). In dieser Studie wurde 7-AAD in einer Konzentration von 1 µg/ml angewendet. Aufnahme von 7-AAD durch die Zelle ist ein Indikator für Apoptose oder Zelltod. Sie wurde im dunkelroten Spektrum eines 650 nm Filters mittels Durchflusszytometrie gemessen.

3.5.2 Durchflusszytometrische Messung von Reactive Oxygen- Species (ROS)

ROS-Konzentrationen wurden mittels einer Färbung der PLCs mit de-acetyliertem 2',7'-Dichlorodihydrofluoreszein-Diacetat (H₂DCFH-DA, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) bestimmt, welches in Gegenwart von ROS zu Dichlorofluoreszein (DCF) oxidiert wird (11). Nach der initialen Behandlung mit 15d-PGJ₂ wurden die Zellen mit H₂DCF-DA inkubiert, was einer Aufladung der Zellen entspricht (20 µM, 34°C, 30 min). Danach wurde die je nach ROS-Konzentration unterschiedlich starke Excitation von DCF mit einem 525 nm Filter gemessen. In dieser Studie erfolgte die Datenerfassung der ROS Messung mittels der bereits beschriebenen Histogramm Plots.

3.6 Statistische Analysen

Alle hier beschriebenen Experimente wurden mindestens drei Mal wiederholt. Für jede Wiederholung wurden frische PLC-Primärkulturen verwandt. Die Resultate zeigen jeweils ein repräsentatives Experiment. Signifikante Unterschiede sind in den einzelnen Versuchen durch ein Sternzeichen markiert. Signifikanz wurde auf der Grundlage des Student's t-test ermittelt und ein p-Wert von $p < 0.05$ als statistisch signifikant angenommen.

4 Untersuchungen und Ergebnisse

4.1 Einfluß des Prostaglandinderivats 15d-PGJ₂ auf die Vitalität der PLCs

In der Abbildung 6 werden Progenitor-Leydigzellen, welche entweder mit PBS (Negativkontrolle) oder 10 µM 15d-PGJ₂ behandelt wurden, verglichen. Die Population der vitalen Zellen entspricht in den beiden Histogrammen dem Gipfel innerhalb des Markers M1. Wie die Histogramme in Abbildung 6 zeigen, befinden sich 93.78 % (7AAD-Färbung, blaues Histogramm) bzw. 92.63 % (Propidiumjodid-Färbung, grünes Histogramm) innerhalb der Marker M1. Diese Zellen erscheinen am linken Rand der quantitativen Fluoreszenzmessung, welche durch den Marker M1 gekennzeichnet ist. Dies bedeutet, dass Sie sich nicht mit 7-AAD oder Propidiumjodid anfärben und lediglich eine sogenannte Autofluoreszenz emittieren.

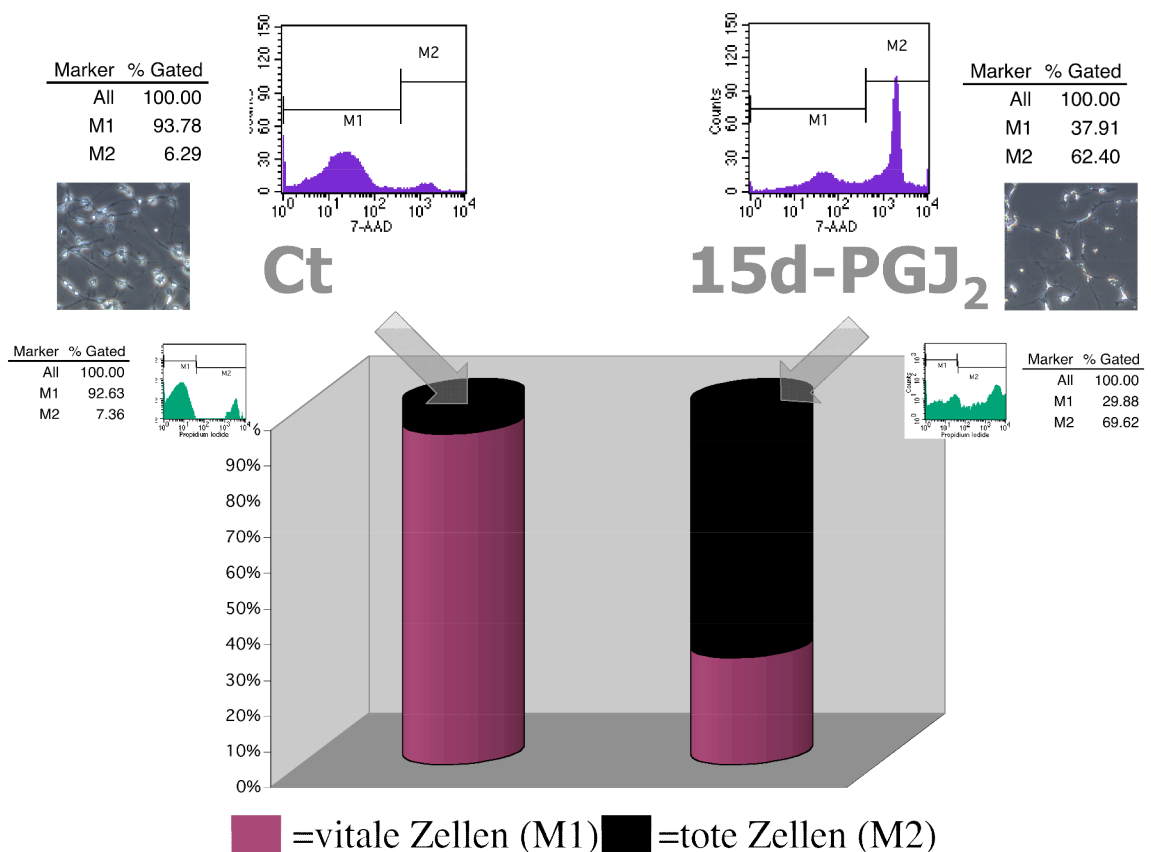


Abbildung 6: 15d-PGJ₂ verringert die Vitalität von PLCs. Das Balkendiagramm zeigt die Vitalität der PLCs unter Behandlung mit 15d-PGJ₂. Rot symbolisiert vitale Zellen, schwarz tote Zellen. Die PLCs wurden entweder mit der Trägersubstanz PBS (linke Säule, Kontrolle= Ct), oder mit 10 µM 15d-PGJ₂ (rechte Säule) behandelt. Die neben die Histogramme eingefügten Tabellen geben Daten wieder, die durch Anfärbung

der PLCs mit 7-AAD (blaue Histogramme) oder PJ (grüne Histogramme) gewonnen wurden. Die Histogramme zeigen die Intensität der Fluoreszenz von 7-AAD (blau) bzw. PJ (grün) auf der x-Achse und die Anzahl der Zellen pro Intensitätsstufe auf der y-Achse. Die vorliegende Abbildung enthält außerdem mikroskopische Bilder der PLCs für die Kontrolle (Kontrolle= Ct, linke Seite der Abbildung) sowie der mit 15d-PGJ₂ behandelten PLCs (15d-PGJ₂, rechte Seite der Abbildung).

Nach 24 h Behandlung mit 15d-PGJ₂ (rechte Seite, Abbildung 6) zeigt sich eine deutlich andere Verteilung der Zellen in den Histogrammen der Abbildung 6. In beiden Histogrammen sieht man unter Behandlung mit 15d-PGJ₂ einen deutlichen "Shift" (englisch= Verschiebung) auf der x-Achse hin zum Marker M2. Dieser Shift signalisiert eine Zunahme der Fluoreszenz-Intensität der mit 15d-PGJ₂ behandelten Zellen und bedeutet, dass sie sich vermehrt mit den Farbstoffen 7-AAD bzw. Propidiumjodid anfärben. Nur noch 37 % (7-AAD) bzw. 29 % (Propidiumjodid) der Zellen befinden sich im Bereich des Markers M1 und sind als vital anzusehen. Es kommt somit unter Behandlung der PLCs mit dem Prostaglandinderivat 15d-PGJ₂ zu einer deutlichen Abnahme der Vitalität von 55 % (7-AAD Färbung), bzw. von 62 % (Propidiumjodid). Diese Ergebnisse zeigen eine deutliche Abnahme der Vitalität der Progenitor-Leydigzellenunter dem Prostaglandinderivat 15d-PGJ₂. Das Balkendiagramm in Abbildung 6 stellt diese Ergebnisse vereinfacht dar.

4.2 Zeit- und dosisabhängige Effekte von 15d-PGJ₂ auf PLCs

Die mit der Trägersubstanz PBS behandelte Kontrolle im ersten Histogramm der Abbildung 7 zeigt fast ausschließlich vitale Zellen (M1 (Gipfel am linken Rand der x-Achse)= 91 %). Sie beinhaltet sehr wenige Zellen im letzten Stadium der Apoptose bzw. tote Zellen (M2 (Gipfel am rechten Rand der x-Achse)= 6 %). Unter Behandlung mit ansteigenden Konzentrationen (0.1-100 mM) des Prostaglandinderivates 15d-PGJ₂ zeigt sich eine kontinuierliche Abnahme der vitalen Zellfraktion. Zu erkennen ist dies unter anderem am Verschwinden des ersten Gipfels (M1) am linken Rand der Histogramme.

Der Effekt der 15d-PGJ₂ Behandlung zeigt eine klare Dosis-Wirkungsbeziehung. Geringe Konzentrationen von 15d-PGJ₂ (0-1 μM) führen kaum zu einer Einschränkung in der Vitalität der PLCs (Verringerung um 3 %), während Konzentrationen von 10-100 μM einen deutlich größeren Effekt auf die PLCs haben (Verringerung der Vitalität um 60 % auf 37 % vitale Zellen). Besonders deutlich ist dieser Effekt an der Tatsache zu erkennen, dass der erste Gipfel in den Histogrammen, welcher in den obersten drei

Histogramme (Ct, 0.1 und 1 μM 15d-PGJ₂) nahezu identische ist, ab einer 15d-PGJ₂-Konzentration von 10 μM fast komplett verschwindet. Wie bereits erwähnt, stellt dieser Gipfel die vitale Population der PLCs dar.

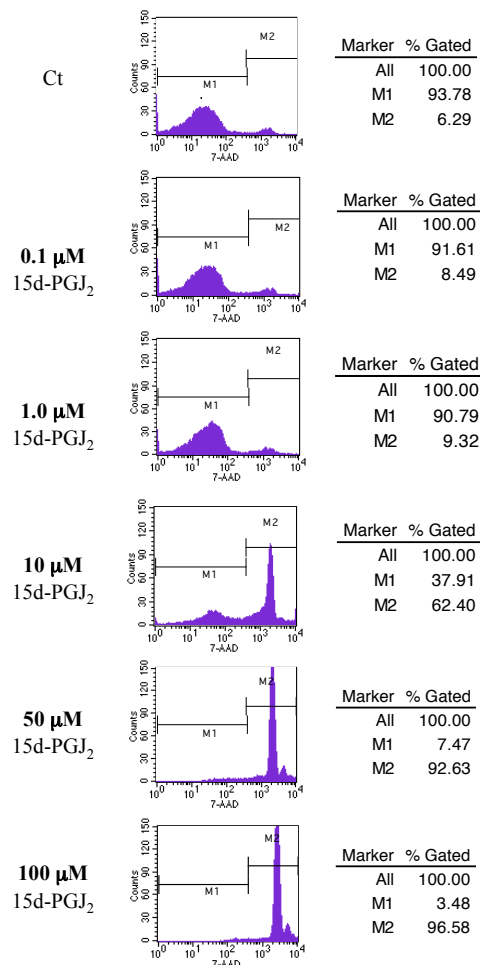


Abbildung 7: Der Effekt von 15d-PGJ₂ auf PLCs ist konzentrationsabhängig. Durchflusszytometrische Daten einer Konzentrationsstudie von 15d-PGJ₂ nach einer 24-stündigen Inkubation der PLCs mit verschiedenen 15d-PGJ₂-Konzentrationen (0.1, 1, 10, 50 und 100 μM). Die Abbildung enthält Histogramme, die auf der x-Achse die 7-AAD Fluoreszenz-Intensität der PLC und auf der y-Achse die Zellzahl pro Intensitätsstufe messen. Zur Interpretationshilfe wurde der sogenannte Marker „M“ eingefügt. Die Proben wurden entweder einer Behandlung mit PBS (Ct) oder verschiedenen Konzentrationen (0.1, 1, 10, 50 oder 100 μM) von 15d-PGJ₂ ausgesetzt, wobei die Konzentrationen in aufsteigender Reihe am linken Abbildungsrand vermerkt sind. Die Histogramm-Statistik zeigt den prozentualen Anteil der Zellen in den jeweils mit „M“ gekennzeichneten Regionen.

Im Falle der Färbung mit 7-AAD bedeutet dies, dass die Plasmamembran der PLCs intakt ist und damit undurchlässig für 7-AAD bleibt. Beginnend mit einer Konzentration von 10 μM 15d-PGJ₂, wird die Plasmamembran der PLCs zunehmend durchlässig für 7-AAD. Diese Population der Zellen erscheint als zweiter Gipfel (M2 (Gipfel am

rechten Rand der Histogramme)). Von besonderer Bedeutung ist dabei das parallele Erscheinen zweier Gipfel im 7-AAD-Histogramm, wie es sich unter Behandlung mit 10 μM 15d-PGJ₂ zeigt. Auf zellulärer Ebene bedeutet dies ein Nebeneinander von sowohl vitalen, ungefärbten, als auch toten, mit 7-AAD angefärbten Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen eine Konzentrationsabhängigkeit des von 15d-PGJ₂ vermittelten Effektes auf die PLCs. Somit stellt sich die Frage, wie dieser Effekt des 15d-PGJ₂ auf zellulärer Ebene mittels Signaltransduktion vermittelt wird. Zur Untersuchung, ob es sich bei der beobachteten Vitalitätsminderung um einen nekrotischen oder apoptotischen Effekt in den Zellen handelt, wurden unter anderem Western-Blot-Analysen von Proteinextrakten der mit 15d-PGJ₂ behandelten PLCs durchgeführt.

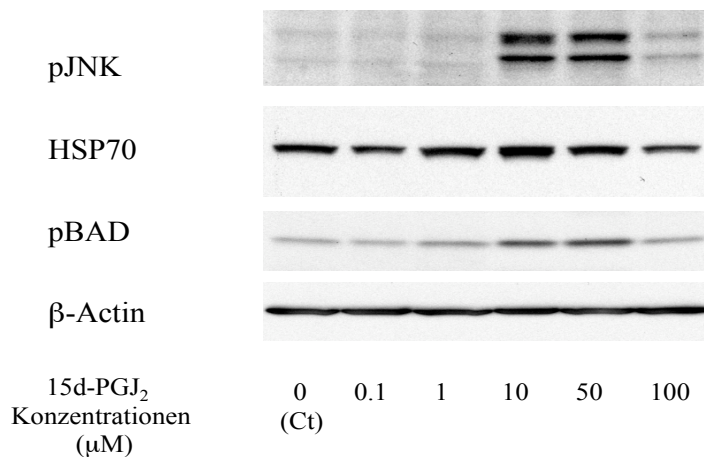


Abbildung 8: 15d-PGJ₂ induziert dosisabhängig verschiedene für Zellstress charakteristische Proteine. Immunoblotanalyse nach Behandlung der PLCs mit verschiedenen Konzentrationen von 15d-PGJ₂ (0, 0.1, 1, 10, 50, 100 μM 15d-PGJ₂) für 12 hr. β -Actin Proteinlevel sind zur Normalisierung der Ladung angegeben.

Wie in Abbildung 8 zu erkennen, induziert die Behandlung der PLCs mit ansteigenden Konzentrationen von 15d-PGJ₂ eine vermehrte Expression des Stressmarkers Heat Shock Protein 70 (HSP-70). Ferner zeigt der Immunoblot eine Zunahme der phosphorylierten Fraktionen der Stressfaktoren JNK und Bad. Wie bereits erwähnt, stellen hierbei die phosphorylierten Fraktionen, welche vom Antikörper spezifisch erkannt werden, den aktivierten Zustand dieser Proteine dar. Eine deutliche Zunahme zeigt sich sowohl in den Signalen der phosphorylierten Fraktionen von JNK und Bad, als auch in denen des HSP-70 unter Behandlung mit 10 und 50 μM 15d-PGJ₂. Die

Behandlung mit geringen Dosen von 15d-PGJ₂ zeigt dahingegen keinen Effekt auf die HSP-70-Expression und die Phosphorylierung von JNK oder Bad. Unter Behandlung mit 100 µM 15d-PGJ₂ zeigt sich ebenfalls keine Erhöhung der phosphorylierten Fraktionen von JNK, Bad oder der HSP-70-Konzentration. Dieses ist am ehesten als Folge eines zytotoxischen Effektes von extrem hohen 15d-PGJ₂-Konzentrationen zu erklären. In dem hier beschriebenen in-vitro System liegt somit das Wirkmaximum von 15d-PGJ₂ bei 10-50 µM.

Die beobachtete Dosis-Wirkungsbeziehung der 15d-PGJ₂-Behandlung auf die Vitalität der PLCs und die Aktivierung von Zell-Stress assoziierten Proteinen läßt einen spezifischen Effekt dieses Prostaglandin-Derivates auf die Testosteron-produzierenden PLCs vermuten. Im Folgenden soll untersucht werden, ob es sich hierbei um durch Toxizität induzierte Nekrose oder um den mehr spezifischen Prozess des programmierten Zelltodes, also der Apoptose, handelt.

4.3 Abgrenzung der Apoptose von der Nekrose unter 15d-PGJ₂-Einfluss in PLCs

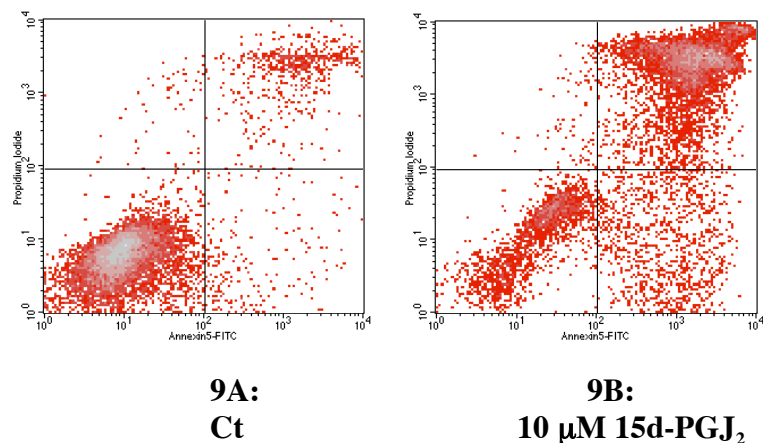


Abbildung 9A und 9B: 15d-PGJ₂ vermittelt Apoptose in PLCs. Apoptosemessung mittels Durchflusszytometrie. PLCs wurden unter Behandlung mit 10 µM 15d-PGJ₂ (15d-PGJ₂, Abb. 10B) oder nur mit der Trägersubstanz PBS (Ct, Abb. 10A) für 24 h kultiviert. Apoptoserate und Vitalität der PLCs wurden durch Färbung mit Annexin V-FITC und Propidiumjodid (PJ) gemessen, wie anhand der beiden Zwei Farben Dot-Plots erkennbar. Ungefärbte PLCs von normaler Vitalität färben doppelt negativ und erscheinen im linken, unteren Quadranten; sie besitzen weder Phosphatidylserin auf ihrer äußeren Zellmembran (was zu einer Anfärbbarkeit durch Annexin V führen würde) noch nehmen sie PJ durch undichte Membranen auf. Zellen, die nur Annexin V gebunden haben, sind apoptotisch und erscheinen im rechten, unteren Quadranten. Diese Zellen haben angefangen Phosphatidylserine auf ihrer Oberfläche zu exponieren, sind jedoch noch nicht durch den Prozess gegangen, der zur Permeabilisierung ihrer

Zytoplasmamembranen führt (was zu Anfärbbarkeit durch PJ führt). Zellen, die Annexin V binden und PJ aufnehmen, sind im letzten Stadium der Apoptose oder bereits tot und erscheinen im äußeren, oberen, rechten Quadranten.

Nach Behandlung mit 10 μM 15d-PGJ₂ weisen die PLCs die charakteristischen Veränderungen auf, die in Abbildung 9 dargestellt sind. In der PLC-Kontrolle sind fast ausschließlich vitale Zellen zu verzeichnen (linker, unterer Quadrant). Nach Behandlung mit 10 μM 15d-PGJ₂ zeigt sich eine Abnahme der vitalen und ein signifikanter Zuwachs der apoptotischen und toten Zellfraktion. Erkennbar ist dies an der Abnahme der Zellen im linken, unteren Quadranten (vitale Zellen) sowie an einer Zunahme im rechten, unteren Quadranten (1. Stadium der Apoptose) und rechten, oberen Quadranten (2. Stadium der Apoptose und tote Zellen).

4.4 Charakteristische biochemische Veränderungen unter dem Einfluss von 15d-PGJ₂

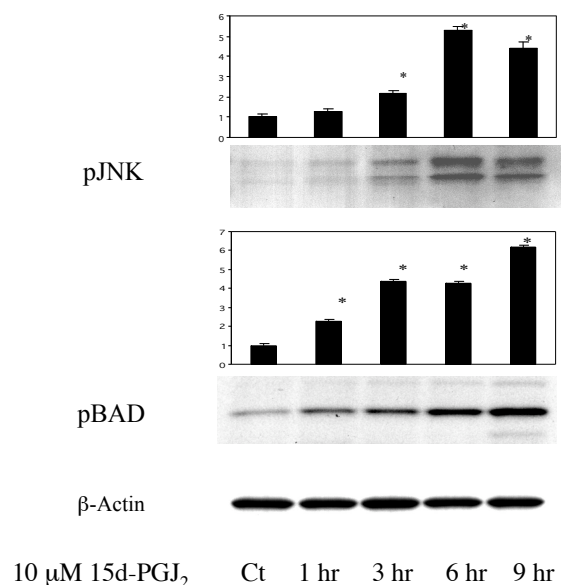


Abbildung 10: 15d-PGJ₂ aktiviert JNK und BAD. Immunoblotanalyse der PLC-Proteinextrakte nach unterschiedlicher Behandlungsdauer (1, 3, 6, 9 hr) mit 10 μM 15d-PGJ₂ oder der Trägersubstanz PBS (Ct, 9 hr). Die β -Actin-Banden wurden zur Normalisierung der Ladung verwendet. Drei verschiedene Westernblotanalysen wurden densitometrisch ausgewertet. Die Balken zeigen den Mittelwert der Intensitäten im Vergleich zur Kontrolle. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t-test bestimmt (*= $p < 0.05$). Gezeigt ist ein repräsentativer Blot.

Bereits eine Stunde nach Zufügen von 10 μM 15d-PGJ₂ zeigt die Immunoblotanalyse einen deutlich sichtbaren Anstieg der phosphorylierten Fraktion des anti-apoptisch

wirkenden Proteins phospho-Bad (pBad). Das Signal für pBad zeigt einen zeitabhängigen Anstieg in Intensität, wobei es zu einer maximalen Erhöhung des Signals nach neun Stunden Inkubation mit 15d-PGJ₂ kommt (Abbildung 10). Es zeigt sich ferner ein deutlicher Anstieg der phosphorylierten Fraktion der JUN N-terminalen Kinase (JNK) nach 3 Stunden. Der Anstieg der JNK-Expression ist also leicht verzögert gegenüber pBad. Die Expression beider Proteine bleibt bis zum Ende des Experiments nach neun Stunden Inkubation erhöht.

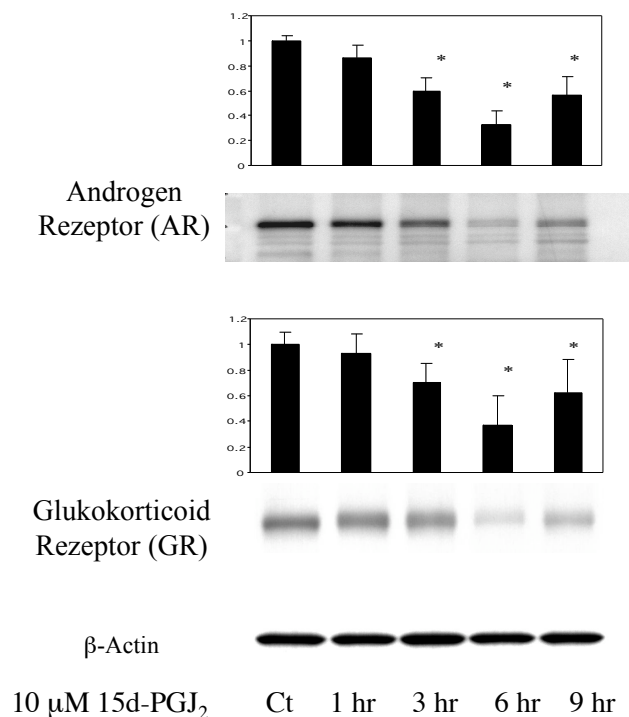


Abbildung 11: 15d-PGJ₂ bewirkt eine Spaltung des Androgen-Rezeptors und Glukokortikoid-Rezeptors. Immunoblotanalyse von PLC-Proteinextrakten nach unterschiedlicher Behandlungsdauer (1, 3, 6, 9 hr) mit 10 μM 15d-PGJ₂ oder der Trägersubstanz PBS (Kontrolle= Ct, 9 hr). Erneut wurde für jeden Zeitpunkt mittels Densitometrie der Mittelwert von drei Banden aus drei verschiedenen Westernblotanalysen ermittelt. Zur Normalisierung der Ladung wurden die Bandenintensitäten auf β-Actin bezogen. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot.

Abbildung 11 zeigt, dass unter der Inkubation mit 15d-PGJ₂ eine Abnahme der Proteinkonzentrationen des Androgen-Rezeptors (AR) und des Glukokortikoid-Rezeptors (GR) auftritt. Diese Abnahme wird vermutlich durch proteolytische Spaltung dieser nukleären Hormon-Rezeptoren verursacht. Ab einer Behandlungszeit von 3 Stunden zeigt sich ein schwächeres Signal für sowohl AR als auch GR. Das Wirkmaximum dieses Effektes scheint bei 6 Stunden zu liegen, da es bei beiden

Rezeptoren zum Zeitpunkt 9 Stunden wieder zu einer leichten Zunahme des Signals kommt.

4.5 Aktivierung der Caspasenkaskade während der durch 15d-PGJ₂ ausgelösten Apoptose

Während der Apoptose werden in den Zellen bestimmte Stoffwechselwege aktiviert, die zum Tod der Zelle führen. In deren Zentrum steht eine Kaskade aus den Proteasen der Caspasen. Im Folgendem wurde erforscht, ob die Behandlung mit 15d-PGJ₂ zu einer Aktivierung der Effektor-Caspase 3 (Cysteine Protease Protein 32) führt, der eine Schlüsselrolle in der Ausführung der Apoptose zukommt.

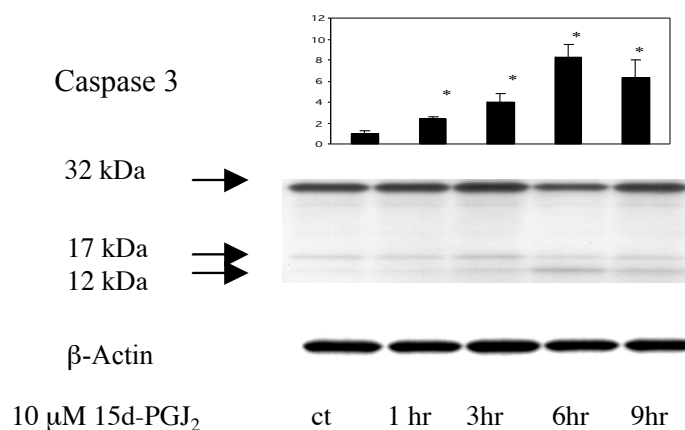


Abbildung 12: 15d-PGJ₂ aktiviert Caspase 3. Westernblotanalyse von PLC-Proteinextrakten nach unterschiedlicher Behandlungsdauer (1, 3, 6, 9 hr) mit 10 µM 15d-PGJ₂ oder der Trägersubstanz PBS (Kontrolle= Ct, 9 hr). Das Balkendiagramm zeigt die densitometrisch bestimmten Intensitäten von jeweils drei Banden pro Zeitpunkt aus drei unterschiedlichen Analysen, bezogen auf die Kontrolle. β-Actin wurde zur Normalisierung der Ladung verwendet. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot. Der Immunoblot mit dem Anti-Caspase 3-Antikörper lässt 3 Banden von unterschiedlichem Molekulargewicht erkennen. Die oberste Bande entspricht der 32 kDa Pro-Caspase 3, während am unteren Bildrand die beiden 17 kDa bzw. 12 kDa Spaltprodukte zu erkennen sind.

Wie Abbildung 12 zeigt, kommt es unter Behandlung mit 15d-PGJ₂ zu einer Aktivierung von Caspase 3. Caspase 3 liegt zunächst als inaktive Pro-Caspase 3 vor und wird bei Einleitung der Apoptose proteolytisch gespalten. Der für den Immunoblot verwendete Antikörper gegen Caspase 3 erkennt sowohl die 32-Kilodalton Pro-Caspase als auch die kleineren Spaltprodukte, welche die biologisch aktive Form des Enzyms darstellen und eine Größe von 17 bzw. 12 kDa besitzen. Bereits eine Stunde nach Inkubation mit 15d-PGJ₂ kommt es zu einem deutlich sichtbaren Anstieg der

12 bzw. 17 kDa grossen, aktiven Spaltprodukte, was für eine Aktivierung der Caspase 3 durch dieses Prostacyclin spricht.

Im nächsten Schritt wurde versucht, die Aktivierung von Caspase 3 durch 15d-PGJ₂ mittels einer Präinkubation der PLCs mit dem Pan-Caspase-Inhibitor Zvad-fmk zu hemmen.

4.6 Abschwächung der Apoptose durch Pan-Caspasen Inhibitor Zvad

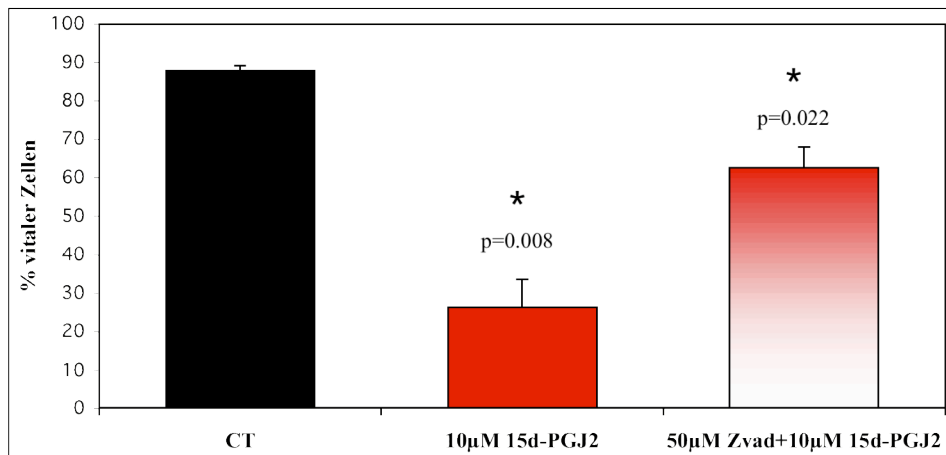


Abbildung 13: Zvad-fmk verhindert teilweise die durch 15d-PGJ₂ ausgelöste Apoptose. PLCs wurden für eine Stunde mit dem Pan-Caspase Inhibitor Zvad-fmk (50 µM) oder der Trägersubstanz PBS vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 10 µM 15d-PGJ₂ für 24 hr (rote Balken) bzw. mit PBS (Ct= schwarzer Balken). Die Vitalität der Zellen wurde durch Anfärbung mit Annexin V-FITC und Propidiumjodid (PJ) in der Durchflusszytometrie gemessen. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Messung dreier Experimente. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t-test bestimmt (*= p<0.05).

Wie in Abbildung 13 ersichtlich, lässt sich durch Vorbehandlung mit 50 µM des Caspase-Inhibitors Zvad-fmk eine Abschwächung der durch 15d-PGJ₂ ausgelösten Vitalitätsabnahme erzielen. Von den mit 15d-PGJ₂ behandelten PLCs lebten nach 24 stündiger Inkubation ca. 25 %. Wurden PLCs mit 50 µM Zvad-fmk vorbehandelt, lebten dagegen noch bis zu 65 % der PLCs nach 24 Stunden. Dem Caspase-Inhibitor Zvad-fmk gelingt es nicht, den durch 15d-PGJ₂-vermittelten Effekt komplett zu blockieren. Die Vitalität der mit dem Caspase-Inhibitor vorbehandelten Probe beträgt 60 % und bleibt damit ca. 30 % niedriger als die in der Kontrollgruppe (Ct) gemessene Vitalitätsrate von 90 %.

Daraufhin wurde untersucht, ob der Effekt von Zvad-fmk durch eine erhöhte Konzentration des Caspase-Inhibitors zu steigern ist.

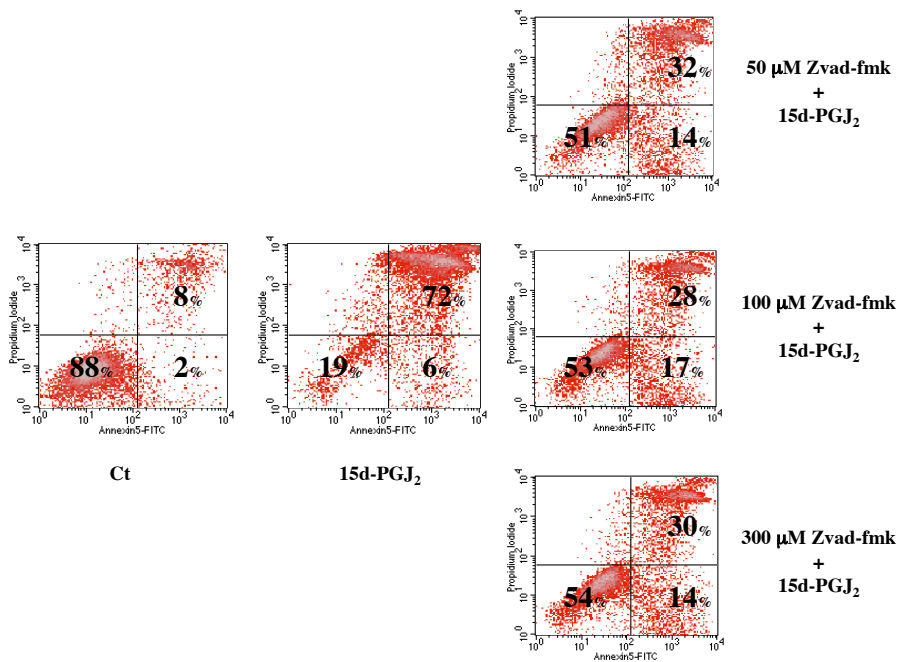


Abbildung 14: Zvad-fmk kann auch unter gesteigerter Dosis die durch 15d-PGJ₂ vermittelte Apoptose nicht komplett verhindern. Die Abbildung zeigt eine durchflusszytometrische Messung von PLCs nach Färbung mit Annexin V und PJ. Zur Interpretationshilfe sind Quadranten in die Dot Plots eingeführt. Der prozentuale Anteil der in den einzelnen Quadranten gemessenen Signale wurde in die Quadranten eingefügt. PLCs wurden entweder mit der Trägersubstanz PBS (Kontrolle= Ct) oder 10 μM 15d-PGJ₂ behandelt. Die mit Zvad-fmk markierten Proben wurden 1 Stunde mit Zvad-fmk (50, 100 oder 300 oder μM) vorbehandelt, bevor auch sie mit 10 μM 15d-PGJ₂ behandelt wurden. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte 24 Stunden nach Inkubation mit 15d-PGJ₂.

Abbildung 14 zeigt, dass, obwohl eine Vorbehandlung der PLCs mit Zvad-fmk die Vitalität der 15d-PGJ₂ exponierten PLCs zu steigern vermag (von 14 % in mit 10 μM 15d-PGJ₂ behandelten PLCs auf 51 % in den mit 50 μM Zvad-fmk behandelten PLCs beträgt die Verbesserung 36 %), dieser Effekt unter höheren Konzentrationen von Zvad-fmk (50, 100 oder 300 μM) nicht weiter steigerbar ist.

Da auch hohe Konzentrationen des Caspase-Inhibitors die durch 15d-PGJ₂ ausgelöste Apoptose nicht komplett verhindern können, wurde im Folgenden untersucht, ob möglicherweise weitere, Caspase-unabhängige Mechanismen an der durch 15d-PGJ₂ vermittelten Apoptose beteiligt sind.

4.7 Abhängigkeit der durch 15d-PGJ₂ induzierten Apoptose von PPAR_γ

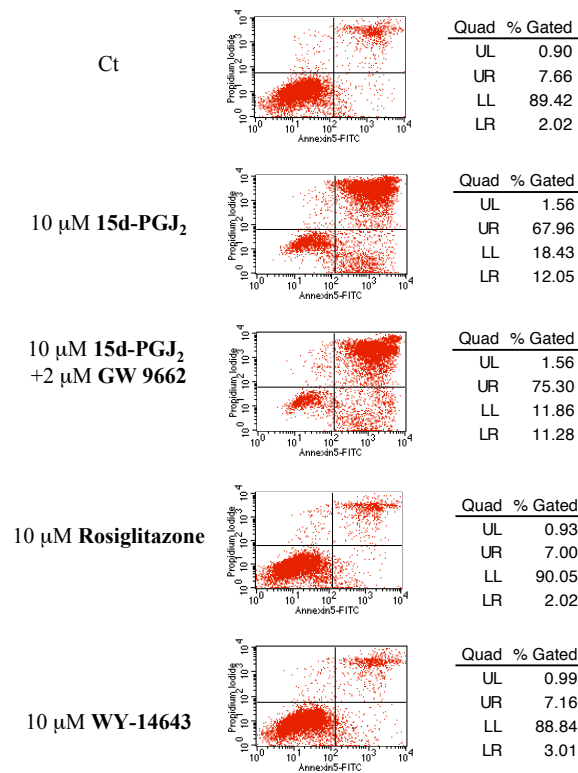


Abbildung 15: PPAR_γ- und α-Agonisten haben keine Auswirkung auf die Vitalität der PLCs. PLCs wurden für 24 Stunden mit folgenden Reagenzien behandelt: mit der Trägersubstanz PBS (Ct), 10 μM 15d-PGJ₂, 10 μM 15d-PGJ₂ und dem PPAR_γ-Antagonisten GW 9662, 10 μM des PPAR_γ-Agonisten Rosiglitazone und 10 μM des PPAR_α Agonisten WY-14643. Gezeigt ist ein Dot Plot von PLCs nach Färbung mit Annexin V und PJ. Zur besseren Interpretation sind Quadranten und Prozentzahlen angegeben. Zellen im frühen Stadium der Apoptose befinden sich im rechten unteren, Zellen im späten Stadium der Apoptose und nekrotische Zellen im rechten oberen Quadranten.

In zahlreichen Zelltypen konnte gezeigt werden, dass 15d-PGJ₂ durch Aktivierung von PPAR_γ Apoptose vermittelt (15-18, 66). Um eine mögliche PPAR_γ-Abhängigkeit der durch 15d-PGJ₂ ausgelösten Apoptose in den Progenitor-Leydigzellen zu untersuchen, wurde die Wirkung eines pharmakologischen PPAR_γ-Agonisten und eines -Antagonisten auf die Vitalität der PLCs studiert. Ferner wurde die Expression verschiedener für die Apoptose charakteristischer Proteine unter der Behandlung mit diesen Substanzen im Immunoblot untersucht.

Wie die Abbildung 16 zeigt, hat die Behandlung mit dem reinen PPAR γ -Agonisten Rosiglitazone für 24 Stunden keine Auswirkung auf die Vitalität der Progenitor-Leydigzellen. Nach 24 Stunden Behandlung befinden sich nur 7 % der PLCs im späten Stadium der Apoptose bzw. sind nekrotisch, gegenüber 68 % unter der Behandlung mit 10 μ M 15d-PGJ₂.

Eine weitere Gruppe von Zellen wurde gleichzeitig mit 10 μ M 15d-PGJ₂ und dem PPAR γ -Antagonisten GW 9662 behandelt. GW 9662 bindet sich an den Rezeptor, blockiert ihn und kann somit die Effekte von Agonisten hemmen (148). Die Beobachtung, dass die Blockierung des Rezeptors keinen Einfluß auf die durch 15d-PGJ₂ vermittelte Apoptose hat, stützt die Vermutung, dass es sich um einen von PPAR γ unabhängigen Mechanismus handelt.

Da 15d-PGJ₂ in hohen Konzentrationen (>10mM) (9, 10, 116, 149) auch als PPAR α -Ligand wirkt wurde der Effekt eines PPAR α -Agonisten (WY 14643) auf die Vitalität der Progenitor-Leydigzellen ebenfalls getestet. Bei einer Dosierung unter der die volle Aktivierung von PPAR α gegeben ist(150) war die Zahl der Zellen in der späten apoptotischen Phase bzw. Nekrose mit 7 % gegenüber der Kontrolle nicht erhöht. Eine Aktivierung von PPAR α durch WY 14643 ist somit nicht fähig, die Vitalität der PLCs einzuschränken.

Es kann daher vermutet werden, dass die durch 15d-PGJ₂ ausgelöste Apoptose in PLC über einen Mechanismus induziert wird, der unabhängig von den nukleären Rezeptoren PPAR α und PPAR γ wirkt.

4.8 Einfluss der durch 15d-PGJ₂ induzierten Apoptose auf die Expression von p53

Verschiedene Autoren haben eine Induktion von p53 in der durch 15d-PGJ₂ vermittelten Apoptose beschrieben (151-153). Im Folgenden wurde daher mittels Immunoblot-Analyse untersucht, ob es in der durch 15d-PGJ₂ vermittelten Apoptose der Progenitor-Leydigzellen zu einer Induktion von p53 kommt.

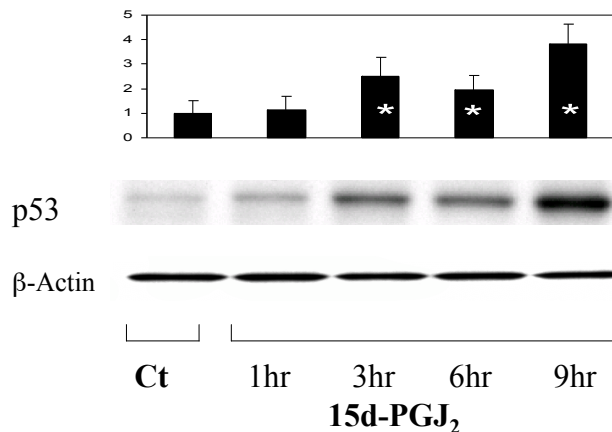


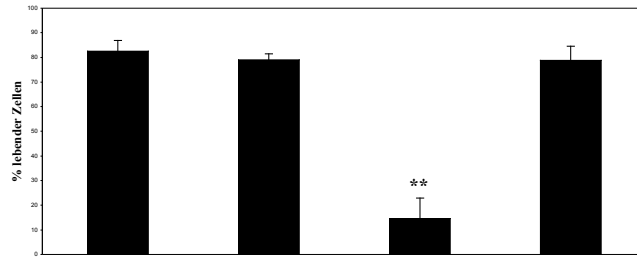
Abbildung 16: Die Behandlung mit 15d-PGJ₂ induziert die Expression von p53. Westernblotanalyse von PLC-Proteinextrakten nach unterschiedlicher Behandlungsdauer (1, 3, 6, 9 hr) mit 10 µM 15d-PGJ₂ oder der Trägersubstanz PBS (Ct, 9 hr). β-Actin-Proteinlevel wurden zur Kontrolle der Ladung bestimmt. Das Balkendiagramm zeigt die densitometrische Intensität der Banden aus drei unabhängigen Messungen.

Die Immunoblot-Analyse zeigt eine deutliche Induktion der p53-Expression in den mit 15d-PGJ₂ behandelten Progenitor-Leydigzellen. Der Effekt nimmt zeitabhängig bis zum Ende des Experiments nach 9 Stunden Inkubation zu.

Die Ergebnisse der Immunoblotanalyse lassen vermuten, dass p53 in der durch 15d-PGJ₂ ausgelösten Apoptose der Progenitor-Leydigzellen eine Rolle spielt.

4.9 Beteiligung der „Reactive Oxygen Species“ (ROS) an den Apoptosevorgängen

Mehrere Studien haben einen Zusammenhang zwischen der Bildung von freien Radikalen/oxidativem Stress und der durch 15d-PGJ₂ vermittelten Apoptose gezeigt (71, 72). Oxidativer Stress ist offenbar in der Lage unter bestimmten Umständen den Effekt von 15d-PGJ₂ zu triggern bzw. zu verstärken. Zur Untersuchung der Bedeutung von oxidativem Stress für die Auslösung von durch 15d-PGJ₂ vermittelter Apoptose in PLCs wurde daher zunächst eine pharmakologische Hemmung dieses Effektes mit Hilfe des Medikamentes N-Acetylcystein versucht. N-Acetylcystein erhöht die intrazelluläre Konzentration des natürlichen Antioxidants Glutathion und vermag somit schädliche Effekte von freien Radikalen zu vermindern (154).



10 μM 15d-PGJ₂	-	-	+	+
10 mM NAC	-	+	-	+

Abbildung 17: NAC verhindert vollständig die durch 15d-PGJ₂ vermittelte Apoptose. Das Balkendiagramm fasst die mittels Durchflusszytometrie gewonnenen Daten von drei verschiedenen Experimenten zusammen. PLCs wurden jeweils für eine Stunde mit 10 mM N-Acetylcystein (NAC) vorbehandelt. Nachfolgend erfolgte für 24 Stunden eine Inkubation entweder mit der Trägersubstanz (PBS, Ct) oder 15d-PGJ₂. Anschließend wurde mit Annexin V-FITC und Propidiumjodid (PJ) gefärbt.

Eine Vorbehandlung mit dem Anti-Oxidant NAC verhindert vollständig den dem 15d-PGJ₂ zugerechneten Abfall der Zellvitalität in PLCs. Während die Vitalität der mit 15d-PGJ₂ behandelten Probe auf 25 % absinkt, kommt es in der mit NAC und 15d-PGJ₂ behandelten Probe zu keinerlei Verringerung der Vitalität (90 %), verglichen mit der PBS-Kontrolle (90 %).

Da bekannterweise oxidativer Stress auch unter physiologischen Bedingungen vorkommt, wird im Folgenden versucht, diesen zu quantifizieren. Dabei wird, wie im Weiteren beschrieben, zuerst untersucht, ob der Anti-Oxidant NAC dosisabhängig wirkt.

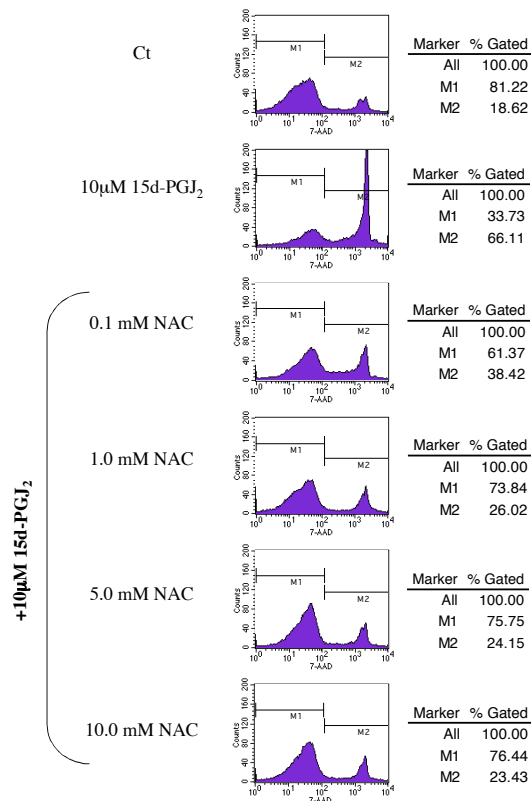


Abbildung 18: NAC inhibiert die durch 15d-PGJ₂ ausgelöste Apoptose dosisabhängig. Durchflusszytometrische Daten in Form von Histogrammen. PLCs wurden mit steigenden Konzentrationen von NAC (0.1 mM, 1 mM, 5.0 mM, 10.0 mM) für eine Stunde vorbehandelt, bevor sie für 24 Stunden mit 10 µM 15d-PGJ₂ inkubiert wurden. Anschließend erfolgte eine Färbung der PLCs mit dem Farbstoff 7-AAD zur durchflusszytometrischen Untersuchung der Vitalität. Als Interpretationshilfe sind Marker hinzugefügt (M). Der Fluoreszenzpeak am linken Rand der Histogramme (M1) entspricht den vitalen Zellen (undurchlässig für 7-AAD). Der Fluoreszenzpeak am rechten Rand der Histogramme (M2) erfasst die Zellen in später Apoptose bzw. Nekrose.

Abbildung 18 zeigt einen dosisabhängigen Effekt von NAC in der Inhibition der durch 15d-PGJ₂ vermittelten Apoptose. Dabei führt eine Vorbehandlung mit einer Dosis von 0.1 mM NAC bereits zu einer Verbesserung der Vitalität um 23 % auf 63 %. Zwischen einer Konzentration von 1 mM NAC bis zur Maximalkonzentration in diesem Experiment von 10 mM ist keine wesentliche weitere Verstärkung des hemmenden Effektes von NAC zu beobachten, was für einen Sättigungseffekt ab einer NAC-Konzentration von ca. 1 mM spricht.

Zur Bestätigung dieser durchflusszytometrisch gewonnenen Resultate wurde der Effekt einer NAC-Behandlung auf die Induktion von p53 und der MAP-Kinase JNK während der durch 15d-PGJ₂ vermittelten Apoptose untersucht.

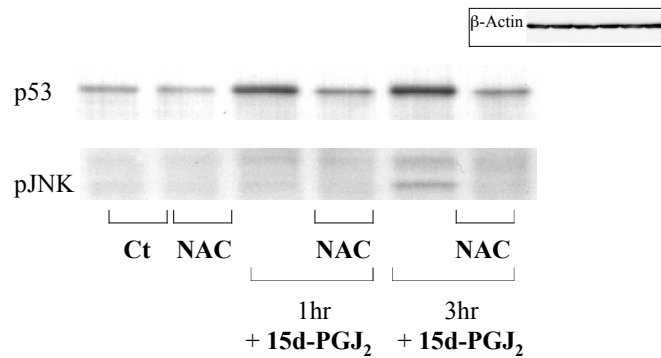


Abbildung 19: NAC verhindert den Anstieg von p53 und pJNK in mit 15d-PGJ₂ behandelten PLCs. Westernblotanalyse der PLC-Proteinextrakte nach unterschiedlicher Behandlungsdauer (1 oder 3 Stunden) mit 10 μ M 15d-PGJ₂, jeweils mit oder ohne Vorbehandlung mit dem Anti-Oxidant N-Acetyl-cystein (NAC 10 mM).

Wie bereits zuvor beschrieben, führt die Behandlung mit 15d-PGJ₂ zu einer Induktion von p53 sowie der phosphorylierten Fraktion von JNK (pJNK). Beide Proteine sind typische Marker der Apoptose. Nach einer Vorbehandlung mit dem Anti-Oxidant NAC wird die Induktion von p53 und pJNK sichtbar abgeschwächt. Dieser Effekt zeigt sich nach 3 Stunden Behandlung noch deutlicher als nach einstündiger Behandlung mit 15d-PGJ₂. Die in der Durchflusszytometrie beobachtete Verbesserung der Vitalität wird somit auf Proteinebene durch eine geringere Expression von Zellstress zugeordneten Proteinen reflektiert.

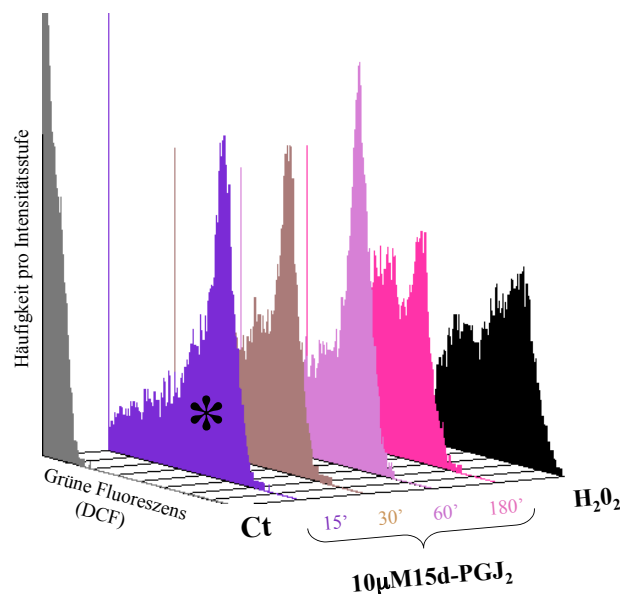


Abbildung 20: 15d-PGJ₂ führt zu einem Anstieg der intrazellulären ROS. Durchflusszytometrische Daten in Form sogenannter “überlagerter Histogramme”. Diese Darstellung entsteht durch das Hintereinanderreihen verschiedener Histogramme und dient dem besseren Vergleich der jeweiligen Fluoreszenz-Excitation. Die sechs hier gezeigten Histogramme stellen Messungen der Fluoreszenzintensität von DCF dar und entsprechen somit einer quantitativen Messung von ROS. Als Negativkontrolle dieser

Messung befinden sich am linken Rand des Diagramms (graues Histogramm) die mit der Trägersubstanz PBS behandelten Kontrollzellen. Als Positivkontrolle dienen mit Wasserstoffsuperoxid ($10 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$, 15 Minuten) behandelte PLCs (schwarzes Histogramm am rechten äußeren Ende der x-Achse). Zwischen diesen beiden Eckpunkten liegen die Messungen der mit 15d-PGJ_2 behandelten Proben ($10 \mu\text{M}$) nach unterschiedlicher Stimulationsdauer (15, 30, 60 und 180 Minuten). Eine Zunahme der Fluoreszenz bedeutet einen Shift in den Vordergrund auf der x-Achse und reflektiert eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von freien Radikalen/ROS.

Abbildung 20 zeigt eine deutliche Zunahme der Konzentration von freien Radikalen in den mit 15d-PGJ_2 behandelten Progenitor-Leydigzellen gegenüber der nur mit PBS-Puffer behandelten Kontrolle. Die Progenitor-Leydigzellen sind somit in der Lage, unter Stressbedingungen, wie in diesem Fall Behandlung mit 15d-PGJ_2 , vermehrt ROS zu bilden.

5 Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit zeigen, dass 15d-PGJ₂ die Vitalität von Progenitor-Leydigzellen vermindert und den programmierten Zelltod, die Apoptose, auslöst. Über die beteiligten Transmittervorgänge wurden neue Erkenntnisse gewonnen. Die Frage, ob sich diese Apoptose therapeutisch beeinflussen lässt, war von besonderem Interesse.

Zunächst musste geklärt werden, ob es sich bei dem durch 15d-PGJ₂ angestoßenen Prozeß um eine Apoptose oder um eine Nekrose handelt. Zahlreiche toxische Substanzen oder auch physikalische Einflüsse (Hitze, Strahlung etc.) können zur Nekrose in verschiedenen Zellen oder Geweben führen. Im Falle einer Zellkultur, wie in den für diese Studie kultivierten Progenitor-Leydigzellen, würde sich eine vermehrte Nekrose ebenfalls als Vitalitätsänderung z.B. in der Durchflusszytometrie zeigen. Die Unterscheidung zwischen Nekrose und Apoptose ist somit experimentell nicht einfach und erfordert den biochemischen Nachweis von verschiedenen für die Apoptose typischen zellulären Reaktionen. Im Folgenden soll erläutert werden, warum es sich bei der 15d-PGJ₂-induzierten Vitalitätsminderung der PLCs um einen apoptotischen und nicht um einen nekrotischen Prozess handelt.

In der Immunoblotanalyse wurde eine Aktivierung verschiedener Caspase-Proteine durch Behandlung mit 15d-PGJ₂ beobachtet. Die proteolytische Kaskade der Caspasen ist, wie bereits in der Einleitung beschrieben, von zentraler Bedeutung in der Apoptose. Das System der Regulation dieser Caspasen-Kaskade wird in seiner Komplexität oft mit den Proteasen des Gerinnungssystems verglichen. In zahlreichen Zelltypen wirkt Caspase 3 als die „klassische“ Effektor-Caspase in der Induktion der Apoptose. Erstmals haben Omezzi et al. eine durch Caspasen vermittelte Apoptose im Hoden von Ratten unter einer Behandlung mit dem Antiandrogen Flutamid beschrieben (155). In der hier vorgestellten Studie zeigte sich eine deutliche Aktivierung von Caspase 3 nach Behandlung der PLCs mit 15d-PGJ₂ (Abbildung 12).

In der Literatur wurde im Zusammenhang mit Caspase 3-Aktivierung in der Apoptose der Begriff der sogenannten „death substrates“ geprägt, für die der Androgen-Rezeptor ein typisches Beispiel darstellt (113, 156). Es konnte gezeigt werden, dass die Caspase 3 den Androgen-Rezeptor spezifisch an der Aminosäure Aspartat in Position 148

schneidet (113). Diese Proteolyse tritt bei der Apoptose vermehrt auf. Unter der Behandlung von PLCs mit 15d-PGJ₂ fand sich im Westernblot eine Akkumulation der proteolytischen Spaltprodukte des Androgen-Rezeptors (Abbildung 12). Diese Beobachtung bestätigt die zuvor gezeigte Aktivierung von Caspase-3 und ist ein weiterer Hinweis, dass 15d-PGJ₂ in PLCs den spezifischen Prozess des programmierten Zelltods (Apoptose) auslöst.

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass sich durch Behandlung mit dem Pan-Caspasen-Inhibitor Zvad-fmk die Caspasen-induzierte Apoptose in verschiedenen Zelltypen hemmen lässt. In der hier vorgestellten Arbeit vermochte Zvad-fmk die Apoptose in den Progenitor-Leydigzellen nur partiell zu verhindern (Abbildung 13). In vielen Fällen korrelierte das Ausmaß der Caspase-3 Aktivierung mit dem Maß der Apoptose. Um sicherzustellen, dass die hier beobachtete, nur partielle Hemmung der Apoptose nicht durch eine zu niedrige Konzentration des Pan-Caspase-Inhibitors bedingt war, wurde ein Dosis/Wirkungsexperiment mit Zvad-fmk durchgeführt. Dieses zeigte, dass auch unter der maximalen Konzentration von 300 µM der Inhibitor Zvad-fmk die durch 15d-PGJ₂ vermittelte Apoptose nicht komplett verhindern konnte (Abbildung 14). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass im Falle der mit 15d-PGJ₂ behandelten PLCs die Apoptose nicht ausschließlich durch Caspasen verursacht sein kann und dass noch weitere Mechanismen eine Rolle spielen müssen.

Neben den Caspasen konnte die Aktivierung verschiedener anderer für Stress und Apoptose charakteristischer Proteine nachgewiesen werden (Abbildung 10). Dabei ist zu beachten, dass eine gesteigerte Expression eines Proteins nicht in allen Fällen auch einer Aktivierung entspricht. Bei einigen Proteasen, wie beispielsweise den Caspasen 3 und 9, besteht die aktive Form des Proteins aus proteolytischen Spaltprodukten, welche ein geringeres Molekulargewicht besitzen als das ursprüngliche Protein. Bei anderen Proteinen kommt es durch Phosphorylierung an bestimmten Aminosäuren zu einer Aktivierung. Im Falle dieser Studie wurden Antikörper verwendet, die die phosphorylierte, aktive Fraktion der Proteine pBad und pJNK erkennen (Abbildung 10).

Mit Hilfe eines solchen Antikörpers konnte im Immunoblot nach 3 Stunden Behandlung mit 15d-PGJ₂ eine signifikante Zunahme der phosphorylierten Fraktion von JNK nachgewiesen werden (Abbildung 10). Für eine Aktivierung von MAP-Kinasen durch

15d-PGJ₂ finden sich in der Literatur zahlreiche Beispiele. Mehrere Studien beschreiben eine Aktivierung der MAP-Kinase ERK durch Behandlung mit 15d-PGJ₂ (67, 157). Zwei Arbeiten aus jüngster Zeit beschreiben eine Aktivierung der MAP-Kinase JNK im Zusammenhang mit durch 15d-PGJ₂ hervorgerufener Apoptose in verschiedenen Karzinom-Zelllinien (68, 158). Der Nachweis einer Aktivierung der MAP-Kinase JNK nach Behandlung der Progenitor-Leydigzellen mit 15d-PGJ₂ ist somit in Übereinstimmung mit der Literatur.

Durch Aktivierung der MAP-Kinasen beeinflusst 15d-PGJ₂ Signaltransduktionsmechanismen und kann Einfluss auf die Transkription von verschiedenen für Apoptose und Zellstress verantwortlichen Genen nehmen.

Ein Beispiel für die Aktivität eines solchen Gens ist beispielsweise das Hitzeschock-Protein HSP-70. In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele für eine gesteigerte Transkription von Hitzeschock-Proteinen im Zusammenhang mit der Aktivierung der MAP-Kinase JNK im Rahmen der Apoptose (159). In der vorgelegten Studie zeigte sich unter der Behandlung der PLCs mit 15d-PGJ₂ eine zeitabhängige, signifikante Zunahme der HSP-70-Expression als Ausdruck von zunehmendem zellulären Stress. Ein Einfluss der Aktivierung von JNK auf die Transkription von HSP-70 wurde in dieser Studie nicht weiter untersucht, erscheint aber möglich.

Ein weiteres Protein, welches durch Behandlung von Progenitor-Leydigzellen mit 15d-PGJ₂ aktiviert wird, ist der sogenannte „Bcl-2-Antagonist des Zelltodes“ (Bad). Mit Hilfe eines für die phosphorylierte Fraktion des Proteins spezifischen Antikörpers konnte unter Behandlung mit 15d-PGJ₂ eine signifikante Zunahme der Bad-Phosphorylierung nach einer Stunde gemessen werden (Abbildung 10). Es wird vermutet, dass die Phosphorylierung von Bad eine Translokation des Proteins in das Mitochondrium verhindert. Im Mitochondrium bindet Bad normalerweise an Bcl-2 und Bcl-xl und verhindert die anti-apoptotische Aktivität dieser Proteine (103). In der hier beschriebenen Situation hemmt die Phosphorylierung von Bad die Apoptose, indem es anti-apoptotische Faktoren im Mitochondrium walten lässt. Eine zeitgleiche Aktivierung sowohl pro- (z.B. Caspasen, JNK) als auch anti-apoptotischer (pBad) (Abbildung 10) Faktoren gibt dabei ein realistisches Bild des komplexen Systems der Apoptose wieder, in dem das Verhältnis von pro- zu anti-apoptotischen Faktoren über das Schicksal der Zelle entscheidet.

Die in den Progenitor-Leydigzellen durch 15d-PGJ₂ induzierte Apoptose erwies sich als zeit- und dosisabhängig. Das Wirkmaximum lag bei einer 15d-PGJ₂-Konzentration von

10 μM . Konzentrationen von 0.1–5 μM hatten keinen messbaren Effekt auf die Apoptose, während Konzentrationen weit oberhalb von 10 μM vor allem eine zunehmende Zytotoxizität bewirkten (Daten nicht gezeigt). Vergleicht man die einzelnen Marker der Apoptose, welche im Westernblot oder in der Durchflusszytometrie bestimmt wurden, so zeigte sich das Wirkmaximum jeweils nach unterschiedlicher Behandlungsdauer. Beispielsweise zeigte sich eine Phosphorylierung von Bad nach einstündiger Inkubation mit 15d-PGJ₂ (Abbildung 10), wohingegen ein signifikanter Anstieg der ROS-Konzentration schon nach nur 15 Minuten messbar war (Abbildung 20). Diese unterschiedlichen Aktivierungszeitpunkte reflektieren unterschiedliche Funktionen und Stellungen der einzelnen Komponenten in der komplexen Kaskade der Apoptose.

Verschiedene Autoren vermuten, dass 15d-PGJ₂ als endogener Ligand von PPAR γ wirken könnte (9, 10). 15d-PGJ₂ wäre somit der einzige bisher identifizierte endogene Ligand dieses wichtigen nukleären Rezeptors und Transkriptionsfaktors. Zahlreiche in vitro-Studien haben eine Aktivierung von PPAR γ durch 15d-PGJ₂ gezeigt, womit jedoch keinesfalls seine in vivo-Rolle geklärt ist (160). Die Studien, die eine durch 15d-PGJ₂ induzierte Apoptose beschreiben, lassen sich grob einteilen in solche, bei denen dieser Effekt durch PPAR γ vermittelt wurde, und solche, in denen die Apoptose unabhängig von einer PPAR γ -Aktivierung eintrat.

Für die hier vorgelegte Studie galt es daher zu klären, ob die pro-apoptotische Wirkung von 15d-PGJ₂ in PLCs über PPAR γ vermittelt wird oder nicht. Dazu bediente sie sich einer „positiven“ und einer „negativen“ Probe, wobei als „positiv“ der potente, selektive PPAR γ -Agonist Rosiglitazone und als „negativ“ Probe der selektive PPAR γ -Antagonist GW 9662 Verwendung fanden (Abbildung 15). Der PPAR γ -Ligand Rosiglitazone (BRL 49653) zählt zur Substanzgruppe der Thiazolidinedione, welche inzwischen weitverbreiteten klinischen Einsatz vor allem als Antidiabetika finden. Rosiglitazone wird häufig als Referenzsubstanz für diese Substanzgruppe herangezogen. In verschiedenen Studien zum pro-apoptotischen Effekt von 15d-PGJ₂ wurde Rosiglitazone parallel zu 15d-PGJ₂ als PPAR γ -Agonist verwendet und vermochte ähnlich wie 15d-PGJ₂ in bestimmten Zelltypen Apoptose auszulösen (15-18, 66). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen schränkte Rosiglitazone in der vorgelegten Studie weder die Vitalität der PLCs ein (Abbildung 15) noch verursachte es einen Anstieg der

phosphorylierten Fraktion der für Apoptose charakteristischen Proteine (pJNK, pBad) (Daten nicht gezeigt).

Umgekehrt müsste sich im Falle einer über PPAR γ vermittelten Apoptose durch den PPAR γ -Antagonisten GW 9662 der pro-apoptotische Effekt von 15d-PGJ₂ verhindern lassen. Passend zu den zuvor beschriebenen Ergebnissen hatte jedoch eine Vorbehandlung mit GW 9662 keinerlei schützenden Effekt auf die mit 15d-PGJ₂ behandelten PLCs (Abbildung 15). Aus diesen Beobachtungen wurde gefolgert, dass es sich in den Progenitor-Leydigzellen um einen PPAR γ -unabhängigen Mechanismus der durch 15d-PGJ₂ induzierten Apoptose handeln muß (Abbildung 15).

Da 15d-PGJ₂ in hohen Konzentrationen (>10 μ M) (9, 10) auch als PPAR α -Ligand wirkt, wurde ebenfalls der Effekt eines α -spezifischen PPAR-Agonisten (WY 14643) untersucht. Auch dieser hatte keinen Effekt auf die Vitalität der PLCs.

Nach dem Ausschluss von PPAR γ als Vermittler des programmierten Zelltods in Progenitor-Leydigzellen wurden daher weitere Versuche unternommen, um zu verstehen, wie die 15d-PGJ₂ induzierte Apoptose auf zellulärer Ebene vermittelt wird.

Als nächstes wurde der Tumorsuppressor p53 untersucht. Zahlreiche Beispiele zeigen, dass dieses Protein in vielen Zellen und Geweben Apoptose vermittelt. Im Hoden spielt p53 eine Rolle bei der Apoptose von Keimzellen, wie anhand von p53 Knockout-Mäusen bewiesen werden konnte (161). Kondo und Mitarbeiter zeigten in neuronalen Zellen nach Behandlung mit 15d-PGJ₂ eine Akkumulation und vermehrte Phosphorylierung von p53. Darüber hinaus beschrieben sie eine Anreicherung von p53 im Zellkern und einen Anstieg der p53 DNA-Bindungsaktivität im Gel-shift Assay (152). Sie beobachteten ferner eine Induktion der Caspase-3-Expression, wodurch sich der Kreis zur Apoptose schließt.

Ähnlich wie in den zitierten Studien zeigte sich auch in den Progenitor-Leydigzellen unter Behandlung mit 15d-PGJ₂ eine signifikante Zunahme der p53-Proteinkonzentration (Abbildung 16). Weitergehende Untersuchungen zur Aktivierung von p53 wurden jedoch nicht durchgeführt. Es bleibt daher noch zu klären, über welchen Weg p53 aktiviert wird und ob durch Aktivierung von p53 vermehrt pro-apoptotische Gene transkribiert werden. Nach aktuellen Schätzungen unterliegen mehrere hundert Gene der Kontrolle durch p53, darunter neben Caspase 3 auch die pro-

apoptotischen Faktoren Bax, Bcl-xl und weitere (118). Zum Verständnis des Zusammenhangs zwischen dem p53-Protein und durch 15d-PGJ₂ induzierter Apoptose sind weitergehende Untersuchungen nötig.

Die Substanzklasse der „Reactive Oxygen Species“ (ROS) unterscheidet sich erheblich von den bisher besprochenen Proteinen. Zu den ROS zählen Moleküle wie beispielsweise Hydrogenperoxid (H₂O₂), Hydroxylion (OH[·]), Superoxidanion (O₂^{·-}) oder auch das Hypochloridion (OCL⁻). ROS werden von tierischen Zellen als physiologische Nebenprodukte von Stoffwechselwegen wie z.B. der Atmungskette in den Mitochondrien gebildet. Zahlreiche Untersuchungen haben ergeben, dass es in apoptotischen Zellen zu einer vermehrten Konzentration von ROS kommt (162, 163). Mehrere Studien zeigen ferner, dass es im Zusammenhang mit durch 15d-PGJ₂ induzierter Apoptose zu einer Akkumulation von ROS kommt (13, 71, 164-166). Offenbar handelt es sich jedoch nicht nur um einen sekundären Effekt eines veränderten Stoffwechsels unter Bedingungen des Zellstress, sondern ROS können offenbar auch als endogene Signalmoleküle auf intrazellulärer Ebene wirken. Passend hierzu lässt sich durch Behandlung von Zellen mit einem Anti-Oxidant wie beispielsweise N-Acetylcystein (NAC) in vielen Fällen die Apoptose hemmen.

Erst kürzlich zeigten Vergleiche der pro-oxidativen Profile von einzelnen Prostaglandin-Derivaten, dass die Induktion von intrazellulärem oxidativen Stress hauptsächlich durch die Metaboliten von PGD₂ vermittelt wird, und hier insbesondere durch den aktivsten dieser Metabolite, das 15d-PGJ₂ (167). Tatsächlich fand sich auch in der hier vorgelegten Arbeit eine nahezu vollständige Hemmung der durch 15d-PGJ₂ induzierten Apoptose nach Vorbehandlung der Progenitor-Leydigzellen mit NAC (Abbildung 17). Dieses überraschende Resultat lässt vermuten, dass Reactive Oxygen Species in der Kaskade, die nach 15d-PGJ₂ -Behandlung zur Apoptose führt, eine übergeordnete Rolle spielt. NAC blockiert in diesem Versuch spezifisch die Wirkung der ROS, so dass es nicht zur Aktivierung von möglicherweise nachgeordneten Faktoren, wie z.B. den Caspasen oder JNK, kommt (Abbildung 19). Der massive Effekt der NAC-Behandlung auf die Apoptose könnte jedoch auch durch die chemischen Konjugationseigenschaften des N-Acetylcysteins bedingt sein. NAC ist auf Grund seiner chemischen Struktur in der Lage mit zahlreichen Substanzen Komplexe zu bilden. Somit könnte unter Umständen NAC einen Komplex mit 15d-PGJ₂ gebildet

haben, was zur Inaktivierung des Prostaglandins führte. Ähnliche Beispiele sind in der Literatur beschrieben (168).

Neben der Hemmung der durch 15d-PGJ₂ vermittelten Apoptose durch Zugabe von NAC wurde daher auch der direkte Nachweis einer vermehrten Bildung von ROS in den Progenitor-Leydigzellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Färbung der Progenitor-Leydigzellen mit Dichlorodihydrofluoreszein-Diacetat (H₂DCFH-DA) zeigte einen raschen Anstieg der ROS-Konzentration nach Behandlung mit 15d-PGJ₂ (Abbildung 20). Dieser lässt vermuten, daß ROS als früher Initiator der Apoptose wirkt. Die durchflusszytometrische Messung mittels H₂DCFH-DA - Färbung gilt als eine der sensitivsten und genauesten Methoden zum Nachweis von ROS (11), jedoch bleibt sie, wie alle bisher verfügbaren Nachweismethoden für Reactive Oxygen Species, aufgrund der Instabilität dieser Stoffe schwierig.

Besonders interessant im Vergleich mit der hier vorgelegten Arbeit ist die von Lennon und Mitarbeitern publizierte Studie (169). Die Autoren beobachteten eine PPAR γ -unabhängige Induktion der Apoptose nach Behandlung von Prä-Adipozyten und Astrozyten mit 15d-PGJ₂. Die Autoren zeigten ferner durch Behandlung mit 15d-PGJ₂ eine Induktion verschiedener MAP-Kinasen, darunter auch JNK. Unter gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit NAC und 15d-PGJ₂ verschwand der apoptotische Effekt vollständig. Interessanterweise konnte unter Vorbehandlung mit NAC auch keine Aktivierung der MAP-Kinasen mehr beobachtet werden, woraus die Autoren folgerten, dass ROS den Effekt von 15d-PGJ₂ auf die MAP-Kinasen übertragen, worauf dann nachfolgend Apoptose ausgelöst wird (166). In der vorgelegten Arbeit konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden (Abbildung 10, 17, 19). Progenitor-Leydigzellen wurden unter der Behandlung mit exogen zugeführtem H₂O₂ apoptotisch und zeigten ähnliche Reaktionen wie unter der Behandlung mit 15d-PGJ₂ (Daten nicht gezeigt). Das Antioxidant NAC vermochte die Apoptose dosisabhängig (maximaler Effekt bei 100 mM) vollständig zu verhindern (Abbildung 18).

Zusammenfassend ist somit, ähnlich wie in der Studie von Lennon und Mitarbeitern, in den Progenitor-Leydigzellen die folgende Kaskade von Ereignissen denkbar, die schließlich zur Apoptose führt: Unter Behandlung mit 15d-PGJ₂ tritt zunächst eine Akkumulation bzw. Freisetzung von ROS aus den Mitochondrien ein. Im nächsten Schritt kommt es zu einer Aktivierung von Signaltransduktions-Mechanismen wie den

MAP-Kinasen (Phosphorylierung von JNK), zur Phosphorylierung von Bad bzw. zur Induktion des Tumorsuppressors p53. Diese Signalmoleküle führen dann in der nächsten Stufe zu einer gesteigerten Transkription von Zielgenen wie z.B. Caspase 3, Caspase 9 und HSP-70, wodurch das Gleichgewicht der Progenitorzelle vom Überlebensmodus in Richtung programmierter Zelltod (Apoptose) verschoben wird. Abbildung 21 fasst dieses Modell als vereinfachtes Schema zusammen. Es muss jedoch betont werden, dass es sich hierbei lediglich um eine Spekulation bzw. einen Erklärungsversuch für die beobachteten Phänomene handelt. Die genauen Wirkbeziehungen und Verbindungen der einzelnen Proteine bzw. Signaltransduktionsmechanismen untereinander lassen sich aus den bisher gewonnenen Daten nicht hinreichend erfassen. Im Vergleich mit ähnlichen Arbeiten in der Literatur lassen sich lediglich Vermutungen anstellen, auf welche Weise 15d-PGJ₂ in den Progenitor-Leydigzellen Apoptose vermittelt.

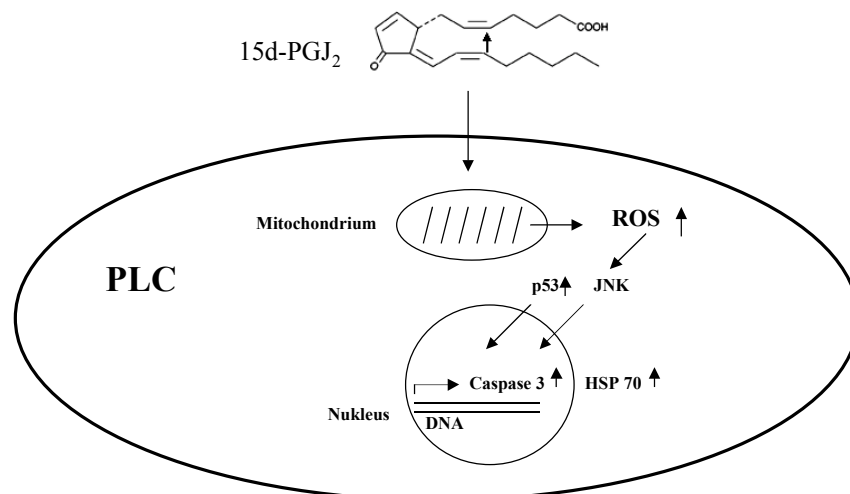


Abbildung 22: Modell für die durch 15d-PGJ₂ induzierte Apoptose in PLCs.

5.1 Kritische Würdigung dieser Studie

Die in dieser Studie vorgestellten Ergebnisse basieren auf mehreren Untersuchungstechniken oder experimentellen Ansätzen, die in der Literatur bzw. aktuellen Diskussion kontrovers behandelt werden.

Hier ist zunächst die Untersuchung bzw. Messung der Apoptose in Zellpopulationen zu nennen. Zum Nachweis der Apoptose steht heute eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung, wie beispielsweise die Durchflusszytometrie mit der Möglichkeit für

verschiedene Apoptose-typische Marker zu färben, der TUNEL-Test sowie der Nachweis von Apoptose-typischen biochemischen Veränderungen, z.B. im Westernblot. Viele Autoren fordern inzwischen, dass der Nachweis von Apoptose mit Hilfe von mindestens 3 verschiedenen Methoden erfolgen sollte (170).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte der Nachweis der Apoptose auf mehreren Ebenen: Durchflusszytometrisch wurden verschiedene etablierte Apoptose-Marker untersucht (Annexin V, 7-AAD, Propidiumjodid) (Abbildung 16). Darüber hinaus erfolgte ein biochemischer Nachweis der Aktivierung verschiedener Apoptose-typischer Stoffwechselwege (Caspase 3, pJNK und pBad) (Abbildung 10,12). Somit wurde der Forderung nach mehreren unabhängigen Nachweismethoden Rechnung getragen.

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit einer schnellen quantitativen Analyse von großen Zellpopulationen. Außerdem können verschiedene Parameter gleichzeitig bestimmt werden. Die rasche Untersuchung und gleichzeitige Messung mehrerer Parameter sind von großer Bedeutung für die korrekte Messung der Apoptose, da manipulierte Zellen extrem störanfällig sind und z.B. bei unsachgemäßer Handhabung unabhängig vom untersuchten Agens selbst bereits die Apoptose einleiten können. Wichtig sind daher eine rasche Messung und Verarbeitung der Zellen nach der Behandlung mit 15d-PGJ₂.

Eine weitere Schwierigkeit liegt in der Abgrenzung zwischen Apoptose und Nekrose. Auch hier bietet die Durchflusszytometrie Vorteile, da mehrere Parameter gleichzeitig gemessen und die Ergebnisse miteinander verglichen werden können. In der hier vorgestellten Studie wurde als Marker der Apoptose eine Färbung der PLCs mit Annexin-V durchgeführt. Die Färbung und durchflusszytometrische Messung von adhären wachsenden Zellen mit Annexin-V wird kontrovers diskutiert, da nach Meinung einzelner Autoren bereits die Ablösung der Zellen von der Kulturschale mittels Trypsin zur Exposition von Phosphatidylserin auf der äußeren Plasmamembran führt, also falsch positive Signale erzeugt. Aus diesem Grunde wurde in der hier vorgestellten Studie ein schonenderes Reagenz angewandt (Accutase®), welches nach Angaben des Herstellers nicht mit der Annexin V Färbung interveniert (Dr. Willis, Beckton Dickinson, persönliche Mitteilung).

Parallel zur Annexin V-Messung wurde eine Färbung und Messung für 7-AAD durchgeführt. Für 7-AAD sind keine Unterschiede zwischen adhären und nicht-adhären wachsenden Zellen beschrieben worden. Die Färbung und Messung für 7-

AAD bestätigte die für Annexin-V gewonnenen Resultate, ohne dass größere Abweichungen beobachtet wurden.

Ein weitere Schwierigkeit in der Bewertung der Ergebnisse liegt in der Abschätzung der Konzentration des Prostaglandinderivats 15d-PGJ₂, welche zur Induktion der Apoptose verwendet wurde. Inzwischen existiert eine umfangreiche Literatur zu 15d-PGJ₂ und in einem großen Teil der veröffentlichten Studien werden biologische Effekte von 15d-PGJ₂ unter Verwendung von mikromolaren Konzentrationen in vitro beschrieben. Unklarheit herrscht bisher über die in vivo vorkommenden Konzentrationen von 15d-PGJ₂. Manche Autoren vermuten, dass mikromolare Spiegel von 15d-PGJ₂ zu unphysiologisch hohe Konzentrationen dieses Prostaglandins darstellen. Als Begründung wird insbesondere angeführt, dass andere Eicosanoide, wie die Leukotriene und Lipoxine, normalerweise in nanomolaren oder subnanomolaren Konzentrationen wirken (167).

Von besonderer Bedeutung sind in diesem Zusammenhang die Konzentrationen von 15d-PGJ₂, die vermutlich in vivo in den jeweiligen Geweben vorkommen. Während 15d-PGJ₂ in verschiedenen Körperflüssigkeiten und Geweben nachgewiesen wurde (171, 172), bleiben die physiologischen Gewebekonzentrationen unklar. Einige Autoren argumentieren, dass die niedrigen (nanomolaren) Konzentrationen von 15d-PGJ₂, wie sie in einigen Geweben vermutet werden, möglicherweise nur einen Bruchteil der im Rahmen von Entzündungen auftretenden Gewebespiegel darstellen (173, 174).

Eine Messung der 15d-PGJ₂-Konzentrationen wird bisher durch die mangelnde Verfügbarkeit von zuverlässigen Immunoassays erschwert. Da unter physiologischen Bedingungen 15d-PGJ₂ spontan konjugiert, ist es schwer abzuschätzen, wieviel des immunoreaktiven Materials ungebunden vorliegt und daher mit Hilfe eines Antikörpers erfaßt werden kann. Ein kommerziell erhältlicher Immunoassay (Cayman, Chemical Cooperation, Ann Arbor, Michigan, USA) wurde erst kürzlich vom Markt genommen, nachdem festgestellt wurde, dass er fälschlicherweise zu hohe Konzentrationen erfasste. Bell-Parikh und Mitarbeiter (175) veröffentlichten vor kurzem einen massenspektroskopischen Nachweis von 15d-PGJ₂. In Ihren Untersuchungen im Medium von 3T3-L1-Fibroblasten beschreiben die Autoren picomolare Konzentrationen von 15d-PGJ₂. Diese Konzentrationen sind somit deutlich niedriger als die Konzentrationen im micromolaren Bereich, welche in der Mehrzahl der bisherigen Veröffentlichungen verwendet wurde. Einschränkend ist jedoch auch hierzu anzumerken, dass auch dieser Nachweis der weiteren Validierung bedarf und die

Ergebnisse ebenfalls keinen Rückschluss auf die in-vivo Spiegel von 15d-PGJ₂ zulassen.

Bei Untersuchungen an 2-8 Wochen alten Mäusen wurden hohe Spiegel an Prostaglandinen im männlichen Reproduktionstrakt festgestellt. Insbesondere Hoden und Nebenhoden sowie der Samenleiter sind reich an unterschiedlichen Prostaglandinen der Gruppen D, E und F (176). Mit zunehmender sexueller Reifung kommt es im Tiermodell zu einer Abnahme der testikulären Prostaglandinkonzentrationen, ebenso wie nach Behandlung der Mäuse mit Androgenen (176). Werden umgekehrt Prostaglandine in die Hoden injiziert, so führt dies zu einer verminderten Fertilität bei Ratten (177). Somit scheint ein funktioneller Zusammenhang zwischen Prostaglandinspiegel im Hoden und sexueller Reifung bzw. Testosteronsekretion zu bestehen. Nach wie vor ist jedoch die funktionelle Bedeutung von Prostaglandinen im männlichen Reproduktionstrakt nur unzureichend erfasst. Insbesondere über die Wirkung von Prostaglandinen auf die Testosteron produzierenden Leydigzellen ist nur wenig bekannt.

In jüngster Zeit wurde mit Hilfe von verschiedenen Knockout-Maus-Modellen versucht, die Bedeutung von Prostaglandinen für die männliche Fertilität besser zu verstehen. Knockout-Mäuse für PPAR γ (115), den Prostaglandin D₂-Rezeptor (178) und die Prostaglandin D-Synthase (179) zeigten jeweils keinen Phänotyp, der auf eine testikuläre Entwicklungsstörung oder Infertilität schließen lässt. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten liefern dafür eine mögliche Erklärung, da nämlich 15d-PGJ₂, der Hauptmetabolit von PGD₂, nicht über die in den Knockout-Modellen genetisch deletierten Rezeptoren wirkt, sondern, wie hier beschrieben, über einen PPAR γ -unabhängigen Mechanismus, der zu einer Produktion von ROS führt.

In Knockout-Mäusen wurden die Gene für COX-1^{-/-} und COX-2^{-/-} deletiert, die essentiell für die Synthese der Prostaglandine sind. Die gezüchteten Mäuse wiesen daher keine endogene Prostaglandinproduktion mehr auf und verstarben bereits perinatal. In der Pathologie fand sich ein offener Ductus arteriosus Botalli, jedoch keine testikuläre Entwicklungsstörung (180). Da die COX-1^{-/-}/COX-2^{-/-}-Knockout-Mäuse jedoch bereits perinatal verstarben, war eine Aussage über mögliche Auswirkungen auf die postnatale Entwicklung des Hodens nicht möglich. Die hier vorgelegte Studie soll durch ihre Untersuchungen einen weiteren Beitrag zum Verständnis der physiologischen Funktion von Prostaglandinen in der testikulären Entwicklung leisten.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wird kontrovers diskutiert, ob 15d-PGJ₂ ein endogener Botenstoff, z.B. der lang gesuchte PPAR γ -Ligand, oder lediglich ein Abbauprodukt von Prostaglandinen ohne wirkliche physiologische Relevanz ist (160). Nach wie vor ist unbekannt, welcher Stoffwechselweg der 15d-PGJ₂-Entstehung in vivo zu Grunde liegt, denn bisher wurde kein Enzym gefunden, welches die Bildung von 15d-PGJ₂ in vivo katalysiert. Weitgehende Einigkeit besteht in der Literatur jedoch darüber, dass die von PGD₂ abstammenden J-Klasse-Cyclopentenon-Prostaglandine in vivo produziert werden. Dies basiert auf der Beobachtung, dass 15d-PGJ₂ eine natürlich vorkommende Komponente der menschlichen Körperflüssigkeiten darstellt. So konnten verschiedene Wissenschaftler 15d-PGJ₂ im Urin gesunder menschlicher Probanden nachweisen (171, 172). Hirata und Mitarbeiter zeigten, dass PGD₂ der natürliche Vorläufer der J-Klasse Prostaglandine ist. Dazu maßen sie die Zunahme der J-Klasse-Prostaglandine im Urin von Affen nach PGD₂-Infusion (171). Die Autoren zeigten ferner, dass nach Gabe des Cyclooxygenase-Hemmers Indomethacin die Konzentration der J-Klasse-Prostaglandine im Urin abnimmt.

Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAID) wie Indomethacin, die die Cyclooxygenasen inhibieren, gehören zu den am weitesten verbreiteten Pharmaka überhaupt. Es ist bekannt, dass bei chronischer Einnahme von NSAID Nebenwirkungen auftreten, die in direktem Zusammenhang mit der Hemmung der Prostaglandinsynthese stehen, wie z.B. die Entstehung von gastrointestinalen Ulzera und die Einschränkung der Nierenfunktion durch den Mangel von Prostaglandin E₂. Über mögliche Nebenwirkungen auf den männlichen Reproduktionstrakt bzw. die Fertilität hingegen ist wenig bekannt. Mit dem Cyclooxygenase-Inhibitor Indomethacin beschichtete Implantate führten in männlichen Ratten zu einer reduzierten Fertilität (181).

Versucht man nun, die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse in das Gesamtbild der bisherigen Erkenntnisse über die Bedeutung von Prostaglandinen für den männlichen Reproduktionstrakt einzuordnen, so wird deutlich, dass es noch viele ungeklärte Fragen gibt. Vermutlich kommt es unter bestimmten Bedingungen im Interstitium des Hodens, in dem sich die Leydigzellen befinden, zu Veränderungen der 15d-PGJ₂-Konzentration. Entzündungen (Orchitis) könnten eine Erhöhung der lokalen 15d-PGJ₂-Spiegel bewirken. Erniedrigte 15d-PGJ₂-Spiegel im Hoden könnten hingegen z.B. unter NSAID-Therapie auftreten.

Ferner stellt sich die Frage, ob es altersabhängig, z.B. im Rahmen der Pubertätsentwicklung, zu physiologischen Veränderungen der lokalen 15d-PGJ₂ Konzentrationen kommt. Auf Grund des Fehlens von etablierten Nachweismethoden für 15d-PGJ₂ in Geweben ist diese Frage immer noch schwer zu beantworten.

Es lässt sich vermuten, dass Veränderungen der 15d-PGJ₂-Spiegel im Hoden Auswirkungen auf die physiologische Funktion der Leydigzellen haben. Unter Umständen tritt also die in dieser Arbeit in vitro beobachtete Apoptose der Progenitor-Leydigzellen auch in vivo auf, mit möglichen Konsequenzen zum Beispiel für die Testosteron-Sekretion oder die Hodenentwicklung.

In Hodenbiopsien infertiler Männer konnte im Vergleich zu Männern mit normaler Spermatogenese eine erhöhte Apoptoserate mit Arrest der Spermatogenese nachgewiesen werden (182). Inwiefern jegliche Apoptose im Hoden als pathologisch einzustufen ist, bleibt jedoch fraglich, da ja die Apoptose ebenfalls ein physiologischer Prozess ist, der wichtig für die Gewebs-Homöostase und zur Beseitigung geschädigter Zellen ist. Insbesondere ist unklar, welche Auswirkungen die Apoptose der Leydigzellen bzw. ihrer Vorläufer auf die Funktion des Hodens und der Spermatogenese hat. Denkbar wäre hier, dass es zu einem Androgenmangel bzw. Hypogonadismus kommen könnte. Dies deutet sich in vorläufigen Ergebnissen an, welche eine Down-Regulation des Steroid-Biosynthese-Markers Star zeigen. Die Progenitor-Leydigzellen könnten in diesem Zusammenhang spezielle Bedeutung haben, da sie die physiologische Reserve für die Regeneration der Leydigzellen im adulten Hoden darstellen. Darüber hinaus könnten Sie zu Beginn der Pubertät eine wichtige Rolle spielen könnten (5).

Wie in dieser Arbeit gezeigt, lässt sich die Apoptose der Progenitor-Leydigzellen durch Zugabe von Anti-Oxidantien vollständig unterdrücken. Es ist bekannt, dass sich im Sperma infertiler Männer erhöhte Konzentrationen von ROS finden (136, 137). Es stellt sich daher die Frage, ob die Behandlung mit Anti-Oxidantien eine therapeutische Option zur Behandlung von Fertilitätsstörungen und eventuell auch Androgen-Mangelzuständen eröffnet.

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit lassen vermuten, dass das Prostaglandinderivat 15d-PGJ₂ eine Rolle als physiologischer Regulator der Leydig-Zellfunktion besitzt. Weiterführende Untersuchungen in vivo sind notwendig, um diese Vermutung zu bestätigen.

6 Zusammenfassung

Im Zusammenhang mit Fertilitätsstudien wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des Prostaglandinderivates 15d-PGJ₂ auf Progenitor-Leydigzellen der Ratte untersucht. Es zeigte sich eine deutliche Vitalitätsminderung nach Behandlung mit 15d-PGJ₂. Bei der Analyse mittels Durchflusszytometrie und Western-Immunoblot konnte nachgewiesen werden, dass 15d-PGJ₂ Apoptose induziert.

Durchflusszytometrisch wurde mittels Färbung mit Annexin-V eine vermehrte Externalisierung von Phosphatidylserin nachgewiesen. In der Westernblotanalyse fand sich eine Aktivierung der Caspasen 3 und 9 sowie des proapoptotischen BADs. Außerdem wurde eine generelle Stressreaktion beobachtet, die sich in der Aktivierung von HSP zeigte.

Durch Verwendung von Agonisten und Antagonisten für den nukleären Rezeptor PPAR γ , wurde festgestellt, dass die vermittelte Apoptose unabhängig von diesem PPAR-Rezeptor ist. Über den Westernblot wurde eine Aktivierung der MAP-Kinase JNK und des Tumorsuppressors p53 nachgewiesen.

Im Medium der mit 15d-PGJ₂ behandelten Zellen wurde ein rascher Anstieg der Konzentration von Reactive Oxygen Species (ROS) gemessen. Gleichzeitige Behandlung der Zellen mit 15d-PGJ₂ und dem Antioxidant N-Acetylcystein hemmten den apoptotischen Effekt.

Aus diesen Befunden wurde gefolgert, dass zunächst Reactive Oxygen Species freigesetzt werden, welche nachfolgend die MAP-Kinase JNK und den Tumorsuppressor p53 aktivieren. Hierüber ausgelöst wird die Kaskade der Caspasen und anderer pro-apoptotischer Faktoren.

Da in der Literatur ein Zusammenhang zwischen den Prostaglandin-Konzentrationen im Hoden und der Testosteron-Sekretion vermutet wird, ist 15d-PGJ₂ ein möglicher Kandidat für die parakrine Regulation der Testosteron-produzierenden Leydigzellen.

Genauere Kenntnisse über die Funktion der Prostaglandine im Hoden, über ihre Effekte und die Kontrolle ihrer Fluktuationen, wie sie bei entzündlichen oder kanzerogenen Prozessen auftreten, dienen der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien.

7 Literaturverzeichnis

1. Steinberger, A., and Klinefelter, G. 1993. Sensitivity of Sertoli and Leydig cells to xenobiotics in in vitro models. *Reprod Toxicol* 7 Suppl 1:23-37.
2. Bundschu, H.D., Rager, K., Heller, S., and Hayduk, K. 1977. [Toxic Leydig cell damage in uremia]. *Verh Dtsch Ges Inn Med* 83:1319-1323.
3. al Kadri, H., Lancelot, J.C., Drosdowsky, M.A., al Quirbi, A., al-Safadi, M., Hernandez, C., Robba, M., Rault, S., and Carreau, S. 1997. In vitro effects of Celiptium and MR 14504 on mature rat Leydig cell testosterone production. *Cell Biol Toxicol* 13:83-94.
4. Anderson, R.A., Jr., Phillips, J.F., Berryman, S.H., and Zaneveld, L.J. 1989. Ethanol-induced delayed male puberty in mice is not due to impaired Leydig cell function. *Reprod Toxicol* 3:101-113.
5. Chemes, H.E. 2001. Infancy is not a quiescent period of testicular development. *Int J Androl* 24:2-7.
6. Marshall, W.A., and Tanner, J.M. 1970. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child* 45:13-23.
7. Rivarola, M.A., Pasqualini, T., and Chemes, H.E. 1983. Testicular testosterone and dihydrotestosterone during sexual development in humans. *J Steroid Biochem* 19:961-964.
8. Rey, R.A., Nagle, C.A., and Chemes, H. 1996. Morphometric study of the testicular interstitial tissue of the monkey *Cebus apella* during postnatal development. *Tissue Cell* 28:31-42.
9. Kliewer, S.A., Lenhard, J.M., Willson, T.M., Patel, I., Morris, D.C., and Lehmann, J.M. 1995. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83:813-819.
10. Forman, B.M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M., and Evans, R.M. 1995. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83:803-812.
11. Brubacher, J.L., and Bols, N.C. 2001. Chemically de-acetylated 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate as a probe of respiratory burst activity in mononuclear phagocytes. *J Immunol Methods* 251:81-91.
12. Chinetti, G., Griglio, S., Antonucci, M., Torra, I.P., Delerive, P., Majd, Z., Fruchart, J.C., Chapman, J., Najib, J., and Staels, B. 1998. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 273:25573-25580.
13. Hortelano, S., Castrillo, A., Alvarez, A.M., and Bosca, L. 2000. Contribution of cyclopentenone prostaglandins to the resolution of inflammation through the potentiation of apoptosis in activated macrophages. *J Immunol* 165:6525-6531.

14. Castrillo, A., Traves, P.G., Martin-Sanz, P., Parkinson, S., Parker, P.J., and Bosca, L. 2003. Potentiation of protein kinase C zeta activity by 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) induces an imbalance between mitogen-activated protein kinases and NF-kappa B that promotes apoptosis in macrophages. *Mol Cell Biol* 23:1196-1208.
15. Bishop-Bailey, D.a.H., Timothy. 1999. Endothelial Cell Apoptosis Induced by the Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) Ligand 15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2. *J. Biol. Chem.* 274:17042-17048.
16. Padilla, J., Kaur, K., and Phipps, R.P. 2000. Effects of 15-deoxy-delta 12,14-PGJ2 on B lineage cells. *Ann N Y Acad Sci* 905:322-325.
17. Kawahito, Y., Kondo, M., Tsubouchi, Y., Hashiramoto, A., Bishop-Bailey, D., Inoue, K., Kohno, M., Yamada, R., Hla, T., and Sano, H. 2000. 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ(2) induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J Clin Invest* 106:189-197.
18. Harris + PhippsHarris, S.G., and Phipps, R.P. 2002. Prostaglandin D(2), its metabolite 15-d-PGJ(2), and peroxisome proliferator activated receptor-gamma agonists induce apoptosis in transformed, but not normal, human T lineage cells. *Immunology* 105:23-34.
19. Frungieri, M.B., Weidinger, S., Meineke, V., Kohn, F.M., and Mayerhofer, A. 2002. Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPARgamma : Possible relevance to human fibrotic disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15072-15077.
20. Meineke, V., Frungieri, M.B., Jessberger, B., Vogt, H., and Mayerhofer, A. 2000. Human testicular mast cells contain tryptase: increased mast cell number and altered distribution in the testes of infertile men. *Fertil Steril* 74:239-244.
21. Tishler, P.V. 1971. Diameter of testicles. *N Engl J Med* 285:1489.
22. Winter, J.S., and Faiman, C. 1972. Pituitary-gonadal relations in male children and adolescents. *Pediatr Res* 6:126-135.
23. Prader, A. 1966. Testicular size: assessment and clinical importance. *Triangle* 7:240-243.
24. McLaren, A. 1998. Gonadal development: assembling the mammalian testis. *Curr Biol* 8:1-3.
25. Kaler, L.W., and Neaves, W.B. 1978. Attrition of the human Leydig cell population with advancing age. *Anat Rec* 192:513-518.
26. Neaves, W.B. 1975. Leydig cells. *Contraception* 11:571-606.
27. Ewing, L., Brown, B., Irby, D.C., and Jardine, I. 1975. Testosterone and 5alpha-reduced androgen secretion by rabbit testes-epididymides perfused in vitro. *Endocrinology* 96:610-617.

28. Ewing, L., and Brown, B. 1975. Formation and secretion of 5alpha-androstan-17beta-ol-3-one, 5alpha-androstan-3alpha,17beta-diol and 5alpha-androstan-3beta,17beta-diol by the perfused rabbit testis epididymis. *Endocrinology* 96:479-485.
29. Miller, W.L. 2002. Disorders of androgen biosynthesis. *Semin Reprod Med* 20:205-216.
30. Sharpe, R.M., Kerr, J.B., McKinnell, C., and Millar, M. 1994. Temporal relationship between androgen-dependent changes in the volume of seminiferous tubule fluid, lumen size and seminiferous tubule protein secretion in rats. *J Reprod Fertil* 101:193-198.
31. Hiort, O. 2002. Androgens and puberty. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 16:31-41.
32. Franchimont, P. 1983. Regulation of gonadal androgen secretion. *Horm Res* 18:7-17.
33. Lejeune, H., Chuzel, F., Thomas, T., Avallet, O., Habert, R., Durand, P., and Saez, J. 1996. [Paracrine regulation of Leydig cells]. *Ann Endocrinol (Paris)* 57:55-63.
34. Saez, J.M., Perrard-Sapori, M.H., Chatelain, P.G., Tabone, E., and Rivarola, M.A. 1987. Paracrine regulation of testicular function. *J Steroid Biochem* 27:317-329.
35. Huhtaniemi, I., and Pelliniemi, L.J. 1992. Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proc Soc Exp Biol Med* 201:125-140.
36. Hardy, M.P., Gelber, S.J., Zhou, Z.F., Penning, T.M., Ricigliano, J.W., Ganjam, V.K., Nonneman, D., and Ewing, L.L. 1991. Hormonal control of Leydig cell differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 637:152-163.
37. Mendis-Handagama, S.M., and Ariyaratne, H.B. 2001. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod* 65:660-671.
38. Ge, R.S., and Hardy, M.P. 1998. Variation in the end products of androgen biosynthesis and metabolism during postnatal differentiation of rat Leydig cells. *Endocrinology* 139:3787-3795.
39. Ariyaratne, H.B., and Chamindrani Mendis-Handagama, S. 2000. Changes in the testis interstitium of Sprague Dawley rats from birth to sexual maturity. *Biol Reprod* 62:680-690.
40. Shan, L., Hardy, D.O., Catterall, J.F., and Hardy, M.P. 1995. Effects of luteinizing hormone (LH) and androgen on steady state levels of messenger ribonucleic acid for LH receptors, androgen receptors, and steroidogenic enzymes in rat Leydig cell progenitors in vivo. *Endocrinology* 136:1686-1693.
41. Smith, W. 1989. Eicosanoid nomenclature. *Prostaglandins* 38:125-133.
42. Bygdeman, M. 2003. Pharmacokinetics of prostaglandins. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 17:707-716.
43. Pickles, V.R. 1969. Prostaglandins. *Nature* 224:221-225.

44. Vane, J.R., Mitchell, J.A., Appleton, I., Tomlinson, A., Bishop-Bailey, D., Croxtall, J., and Willoughby, D.A. 1994. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2046-2050.
45. Smith, W.L., DeWitt, D.L., and Garavito, R.M. 2000. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 69:145-182.
46. DeWitt, D.L., and Smith, W.L. 1990. Cloning of sheep and mouse prostaglandin endoperoxide synthases. *Methods Enzymol* 187:469-479.
47. Smith, W.L., and Langenbach, R. 2001. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest* 107:1491-1495.
48. Fitzpatrick, F.A., and Wynalda, M.A. 1983. Albumin-catalyzed metabolism of prostaglandin D2. Identification of products formed in vitro. *J Biol Chem* 258:11713-11718.
49. Harris, S.G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D., and Phipps, R.P. 2002. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 23:144-150.
50. Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J., and Glass, C.K. 1998. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391:79-82.
51. Kwon, G., Xu, G., Marshall, C.A., and McDaniel, M.L. 1999. Tumor necrosis factor alpha-induced pancreatic beta-cell insulin resistance is mediated by nitric oxide and prevented by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 and aminoguanidine. A role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation and inos expression. *J Biol Chem* 274:18702-18708.
52. Xin, X., Yang, S., Kowalski, J., and Gerritsen, M.E. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 274:9116-9121.
53. Daynes, R.A., and Jones, D.C. 2002. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2:748-759.
54. Zingarelli, B., Sheehan, M., Hake, P.W., O'Connor, M., Denenberg, A., and Cook, J.A. 2003. Peroxisome proliferator activator receptor-gamma ligands, 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 and ciglitazone, reduce systemic inflammation in polymicrobial sepsis by modulation of signal transduction pathways. *J Immunol* 171:6827-6837.
55. Rossi, A., Kapahi, P., Natoli, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M., and Santoro, M.G. 2000. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkkappaB kinase. *Nature* 403:103-108.
56. Nakajima, A., Wada, K., Miki, H., Kubota, N., Nakajima, N., Terauchi, Y., Ohnishi, S., Saubermann, L.J., Kadowaki, T., Blumberg, R.S., et al. 2001. Endogenous PPAR gamma mediates anti-inflammatory activity in murine ischemia-reperfusion injury. *Gastroenterology* 120:460-469.

57. Thieringer, R., Fenyk-Melody, J.E., Le Grand, C.B., Shelton, B.A., Detmers, P.A., Somers, E.P., Carbin, L., Moller, D.E., Wright, S.D., and Berger, J. 2000. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma does not inhibit IL-6 or TNF-alpha responses of macrophages to lipopolysaccharide in vitro or in vivo. *J Immunol* 164:1046-1054.
58. Couturier, C., Brouillet, A., Couriaud, C., Koumanov, K., Bereziat, G., and Andreani, M. 1999. Interleukin 1beta induces type II-secreted phospholipase A(2) gene in vascular smooth muscle cells by a nuclear factor kappaB and peroxisome proliferator-activated receptor-mediated process. *J Biol Chem* 274:23085-23093.
59. Meade, E.A., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A., and Prescott, S.M. 1999. Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *J Biol Chem* 274:8328.
60. Zhang, X., Wang, J.M., Gong, W.H., Mukaida, N., and Young, H.A. 2001. Differential regulation of chemokine gene expression by 15-deoxy-delta 12,14 prostaglandin J2. *J Immunol* 166:7104-7111.
61. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.
62. Steller, H. 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267:1445-1449.
63. Liu, H., Zang, C., Fenner, M.H., Possinger, K., and Elstner, E. 2003. PPARgamma ligands and ATRA inhibit the invasion of human breast cancer cells in vitro. *Breast Cancer Res Treat* 79:63-74.
64. Chinetti, G., Griglio, S., Antonucci, M., Torra, I.P., Delerive, P., Majd, Z., Fruchart, J.-C., Chapman, J., Najib, J., and Staels, B. 1998. Activation of Proliferator-activated Receptors alpha and gamma induces Apoptosis of Human Monocyte-derived Macrophages. *J. Biol. Chem.* 273:25573-25580.
65. Hortelano, S., Castrillo, A., Alvarez, A.M., and Bosca, L. 2000. Contribution of Cyclopentenone Prostaglandins to the Resolution of Inflammation Through the Potentiation of Apoptosis in Activated Macrophages. *J Immunol* 165:6525-6531.
66. Keelan, J.A., Sato, T.A., Marvin, K.W., Lander, J., Gilmour, R.S., and Mitchell, M.D. 1999. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2), a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, induces apoptosis in JEG3 choriocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 262:579-585.
67. Wilmer, W.A., Dixon, C., Lu, L., Hilbelink, T., and Rovin, B.H. 2001. A cyclopentenone prostaglandin activates mesangial MAP kinase independently of PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun* 281:57-62.
68. Liu, J.D., Lin, S.Y., Ho, Y.S., Pan, S., Hung, L.F., Tsai, S.H., Lin, J.K., and Liang, Y.C. 2003. Involvement of c-jun N-terminal kinase activation in 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2-and prostaglandin A1-induced apoptosis in AGS gastric epithelial cells. *Mol Carcinog* 37:16-24.

69. Ward, C., Dransfield, I., Murray, J., Farrow, S.N., Haslett, C., and Rossi, A.G. 2002. Prostaglandin D2 and its metabolites induce caspase-dependent granulocyte apoptosis that is mediated via inhibition of I kappa B alpha degradation using a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent mechanism. *J Immunol* 168:6232-6243.
70. Okano, H., Shiraki, K., Inoue, H., Yamanaka, Y., Kawakita, T., Saitou, Y., Yamaguchi, Y., Enokimura, N., Yamamoto, N., Sugimoto, K., et al. 2003. 15-deoxy-delta-12-14-PGJ2 regulates apoptosis induction and nuclear factor-kappaB activation via a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent mechanism in hepatocellular carcinoma. *Lab Invest* 83:1529-1539.
71. Li, L., Tao, J., Davaille, J., Feral, C., Mallat, A., Rieusset, J., Vidal, H., and Lotersztajn, S. 2001. 15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 Induces Apoptosis of Human Hepatic Myofibroblasts. A Pathway Involving Oxidative Stress Independent of Peroxisome-Proliferator-Activated Receptors. *J. Biol. Chem.* 276:38152-38158.
72. Eibl, G., Wente, M.N., Reber, H.A., and Hines, O.J. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces pancreatic cancer cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 287:522-529.
73. Thompson, C.B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462.
74. Hacker, G. 2000. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* 301:5-17.
75. Schwartz, L.M., and Osborne, B.A. 1995. Cell death. *Methods Cell Biol* 46:xv-xviii.
76. Linez, L.F. 1998. Deciphering the apoptotic pathway: all roads lead to death. *Immunol Cell Biol* 76:1-19.
77. Wyllie, A.H., Kerr, J.F., and Currie, A.R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251-306.
78. Alison, M.R., and Sarraf, C.E. 1994. Liver cell death: patterns and mechanisms. *Gut* 35:577-581.
79. Vaux, D.L., and Strasser, A. 1996. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2239-2244.
80. Horvitz, H.R., Shaham, S., and Hengartner, M.O. 1994. The genetics of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59:377-385.
81. Hengartner, M.O., and Horvitz, H.R. 1994. *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 76:665-676.
82. Xue, D., Shaham, S., and Horvitz, H.R. 1996. The *Caenorhabditis elegans* cell-death protein CED-3 is a cysteine protease with substrate specificities similar to those of the human CPP32 protease. *Genes Dev* 10:1073-1083.

83. Shaham, S., and Horvitz, H.R. 1996. An alternatively spliced *C. elegans* ced-4 RNA encodes a novel cell death inhibitor. *Cell* 86:201-208.
84. Wu, Y.C., and Horvitz, H.R. 1998. *C. elegans* phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK180. *Nature* 392:501-504.
85. Xue, D., and Horvitz, H.R. 1997. *Caenorhabditis elegans* CED-9 protein is a bifunctional cell-death inhibitor. *Nature* 390:305-308.
86. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., and Horvitz, H.R. 1993. The *C. elegans* cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75:641-652.
87. Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281:1312-1316.
88. Cohen, G.M. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 (Pt 1):1-16.
89. Nunez, G., Benedict, M.A., Hu, Y., and Inohara, N. 1998. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17:3237-3245.
90. Xiang, J., Chao, D.T., and Korsmeyer, S.J. 1996. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14559-14563.
91. Kobayashi, Y., Miwa, S., Merry, D.E., Kume, A., Mei, L., Doyu, M., and Sobue, G. 1998. Caspase-3 cleaves the expanded androgen receptor protein of spinal and bulbar muscular atrophy in a polyglutamine repeat length-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 252:145-150.
92. Rohn, T.T., Wong, S.M., Cotman, C.W., and Cribbs, D.H. 2001. 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2, a specific ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, induces neuronal apoptosis. *Neuroreport* 12:839-843.
93. Schuler, M., and Green, D.R. 2001. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* 29:684-688.
94. Chang, L., and Karin, M. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410:37-40.
95. Rincon, M. 2001. MAP-kinase signaling pathways in T cells. *Curr Opin Immunol* 13:339-345.
96. Rincon, M., and Pedraza-Alva, G. 2003. JNK and p38 MAP kinases in CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol Rev* 192:131-142.
97. Sanchez-Beato, M., Sanchez-Aguilera, A., and Piris, M.A. 2003. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood* 101:1220-1235.
98. Show, M.D., Folmer, J.S., Anway, M.D., and Zirkin, B.R. 2004. Testicular expression and distribution of the rat bcl2 modifying factor in response to reduced intratesticular testosterone. *Biol Reprod* 70:1153-1161.

99. Kitada, S., Krajewska, M., Zhang, X., Scudiero, D., Zapata, J.M., Wang, H.G., Shabaik, A., Tudor, G., Krajewski, S., Myers, T.G., et al. 1998. Expression and location of pro-apoptotic Bcl-2 family protein BAD in normal human tissues and tumor cell lines. *Am J Pathol* 152:51-61.
100. Knudson, C.M., Tung, K.S., Tourtellotte, W.G., Brown, G.A., and Korsmeyer, S.J. 1995. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 270:96-99.
101. Rodriguez, I., Ody, C., Araki, K., Garcia, I., and Vassalli, P. 1997. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *Embo J* 16:2262-2270.
102. McDonnell, J.M., Fushman, D., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., and Cowburn, D. 1999. Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell* 96:625-634.
103. Adams, J.M., and Cory, S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281:1322-1326.
104. Adams, J.M., and Cory, S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281:1322-1326.
105. Muslin, A.J., and Xing, H. 2000. 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell Signal* 12:703-709.
106. Blink, E.J., Trapani, J.A., and Jans, D.A. 1999. Perforin-dependent nuclear targeting of granzymes: A central role in the nuclear events of granule-exocytosis-mediated apoptosis? *Immunol Cell Biol* 77:206-215.
107. Feder, M.E., and Hofmann, G.E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 61:243-282.
108. Hartl, F.U. 1991. Heat shock proteins in protein folding and membrane translocation. *Semin Immunol* 3:5-16.
109. Endo, T. 1991. Co-operative binding of hsp60 may promote transfer from hsp70 and correct folding of imported proteins in mitochondria [corrected]. *FEBS Lett* 293:1-3.
110. McKay, D.B. 1993. Structure and mechanism of 70-kDa heat-shock-related proteins. *Adv Protein Chem* 44:67-98.
111. Tenbaum, S., and Baniahmad, A. 1997. Nuclear receptors: structure, function and involvement in disease. *Int J Biochem Cell Biol* 29:1325-1341.
112. Green, S., and Wahli, W. 1994. Peroxisome proliferator-activated receptors: finding the orphan a home. *Mol Cell Endocrinol* 100:149-153.
113. Kobayashi, Y., Miwa, S., Merry, D.E., Kume, A., Mei, L., Doyu, M., and Sobue, G. 1998. Caspase-3 cleaves the expanded androgen receptor protein of spinal and bulbar muscular atrophy in a polyglutamine repeat length-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 252:145-150.

114. Schoonjans, K., Martin, G., Staels, B., and Auwerx, J. 1997. Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. *Curr Opin Lipidol* 8:159-166.
115. Barak, Y., Nelson, M.C., Ong, E.S., Jones, Y.Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K.R., Koder, A., and Evans, R.M. 1999. PPAR γ is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4:585-595.
116. Spiegelman, B.M. 1997. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: A key regulator of adipogenesis and systemic insulin sensitivity. *Eur J Med Res* 2:457-464.
117. Raskin, P., Rendell, M., Riddle, M.C., Dole, J.F., Freed, M.I., and Rosenstock, J. 2001. A randomized trial of rosiglitazone therapy in patients with inadequately controlled insulin-treated type 2 diabetes. *Diabetes Care* 24:1226-1232.
118. Ryan, K.M., Phillips, A.C., and Vousden, K.H. 2001. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* 13:332-337.
119. Lane, D.P. 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358:15-16.
120. el-Deiry, W.S. 1998. Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol* 8:345-357.
121. Sigal, A., and Rotter, V. 2000. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* 60:6788-6793.
122. Aitken, J., and Fisher, H. 1994. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays* 16:259-267.
123. Warren, D.L., Hyde, D.M., and Last, J.A. 1988. Synergistic interaction of ozone and respirable aerosols on rat lungs. IV. Protection by quenchers of reactive oxygen species. *Toxicology* 53:113-133.
124. Chapple, I.L. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol* 24:287-296.
125. Jaeschke, H. 2000. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 15:718-724.
126. Raha, S., and Robinson, B.H. 2000. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci* 25:502-508.
127. Zini, A., and Schlegel, P.N. 1997. Cu/Zn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase mRNA expression in the rat testis after surgical cryptorchidism and efferent duct ligation. *J Urol* 158:659-663.
128. Hensley, K., and Floyd, R.A. 2002. Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: a look back, a look ahead. *Arch Biochem Biophys* 397:377-383.
129. Stocco, D.M., Wells, J., and Clark, B.J. 1993. The effects of hydrogen peroxide on steroidogenesis in mouse Leydig tumor cells. *Endocrinology* 133:2827-2832.
130. Roos, D. 1991. The involvement of oxygen radicals in microbicidal mechanisms of leukocytes and macrophages. *Klin Wochenschr* 69:975-980.

131. Wei, R.Q., Yee, J.B., Straus, D.C., and Hutson, J.C. 1988. Bactericidal activity of testicular macrophages. *Biol Reprod* 38:830-835.
132. Quinn, P.G., and Payne, A.H. 1984. Microsomal cytochrome P-450 enzyme damage in cultured Leydig cells: relation to steroidogenic desensitization. *Ann N Y Acad Sci* 438:649-651.
133. Ikeda, M., Kodama, H., Fukuda, J., Shimizu, Y., Murata, M., Kumagai, J., and Tanaka, T. 1999. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol Reprod* 61:393-399.
134. Oishi, S. 1986. Testicular atrophy induced by di(2-ethylhexyl)phthalate: changes in histology, cell specific enzyme activities and zinc concentrations in rat testis. *Arch Toxicol* 59:290-295.
135. Kasahara, E., Sato, E.F., Miyoshi, M., Konaka, R., Hiramoto, K., Sasaki, J., Tokuda, M., Nakano, Y., and Inoue, M. 2002. Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biochem J* 365:849-856.
136. de Lamirande, E., and Gagnon, C. 1995. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* 10 Suppl 1:15-21.
137. Padron, O.F., Brackett, N.L., Sharma, R.K., Lynne, C.M., Thomas, A.J., Jr., and Agarwal, A. 1997. Seminal reactive oxygen species and sperm motility and morphology in men with spinal cord injury. *Fertil Steril* 67:1115-1120.
138. Kanzaki, M., and Morris, P.L. 1998. Lactogenic hormone-inducible phosphorylation and gamma-activated site-binding activities of Stat5b in primary rat Leydig cells and MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Endocrinology* 139:1872-1882.
139. Walch, L., and Morris, P.L. 2002. Cyclooxygenase 2 pathway mediates IL-1beta regulation of IL-1alpha, -1beta, and IL-6 mRNA levels in Leydig cell progenitors. *Endocrinology* 143:3276-3283.
140. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
141. Zachowski, A. 1993. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J* 294 (Pt 1):1-14.
142. Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Rader, J.A., van Schie, R.C., LaFace, D.M., and Green, D.R. 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182:1545-1556.
143. Fadok, V.A., Savill, J.S., Haslett, C., Bratton, D.L., Doherty, D.E., Campbell, P.A., and Henson, P.M. 1992. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 149:4029-4035.

144. van Engeland, M., Ramaekers, F.C., Schutte, B., and Reutelingsperger, C.P. 1996. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 24:131-139.
145. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184:39-51.
146. van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B., and Reutelingsperger, C.P. 1998. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31:1-9.
147. Philpott, N.J., Turner, A.J., Scopes, J., Westby, M., Marsh, J.C., Gordon-Smith, E.C., Dalgleish, A.G., and Gibson, F.M. 1996. The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood* 87:2244-2251.
148. Wright, H.M., Clish, C.B., Mikami, T., Hauser, S., Yanagi, K., Hiramatsu, R., Serhan, C.N., and Spiegelman, B.M. 2000. A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 275:1873-1877.
149. Lehmann, J.M., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W.O., Willson, T.M., and Kliewer, S.A. 1995. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 270:12953-12956.
150. Teruel, T., Clapham, J.C., and Smith, S.A. 1999. PPARalpha activation by Wy 14643 induces transactivation of the rat UCP-1 promoter without increasing UCP-1 mRNA levels and attenuates PPARgamma-mediated increases in UCP-1 mRNA levels induced by rosiglitazone in fetal rat brown adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 264:311-315.
151. Schaiff, W.T., Carlson, M.G., Smith, S.D., Levy, R., Nelson, D.M., and Sadovsky, Y. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma modulates differentiation of human trophoblast in a ligand-specific manner. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3874-3881.
152. Kondo, M., Shibata, T., Kumagai, T., Osawa, T., Shibata, N., Kobayashi, M., Sasaki, S., Iwata, M., Noguchi, N., and Uchida, K. 2002. 15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J₂: The endogenous electrophile that induces neuronal apoptosis. *PNAS* 99:7367-7372.
153. Shibata, T., Yamada, T., Kondo, M., Tanahashi, N., Tanaka, K., Nakamura, H., Masutani, H., Yodoi, J., and Uchida, K. 2003. An endogenous electrophile that modulates the regulatory mechanism of protein turnover: inhibitory effects of 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J₂ on proteasome. *Biochemistry* 42:13960-13968.
154. Yim, C.Y., Hibbs, J.B., Jr., McGregor, J.R., Galinsky, R.E., and Samlowski, W.E. 1994. Use of N-acetyl cysteine to increase intracellular glutathione during the induction of antitumor responses by IL-2. *J Immunol* 152:5796-5805.

155. Omezzine, A., Chater, S., Mauduit, C., Florin, A., Tabone, E., Chuzel, F., Bars, R., and Benahmed, M. 2003. Long-term apoptotic cell death process with increased expression and activation of caspase-3 and -6 in adult rat germ cells exposed in utero to flutamide. *Endocrinology* 144:648-661.
156. Ellerby, L.M., Hackam, A.S., Propp, S.S., Ellerby, H.M., Rabizadeh, S., Cashman, N.R., Trifiro, M.A., Pinsky, L., Wellington, C.L., Salvesen, G.S., et al. 1999. Kennedy's disease: caspase cleavage of the androgen receptor is a crucial event in cytotoxicity. *J Neurochem* 72:185-195.
157. Takeda, K., Ichiki, T., Tokunou, T., Iino, N., and Takeshita, A. 2001. 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 and thiazolidinediones activate the MEK/ERK pathway through phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 276:48950-48955.
158. Hashimoto, K., Farrow, B.J., and Evers, B.M. 2004. Activation and role of MAP kinases in 15d-PGJ2-induced apoptosis in the human pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2. *Pancreas* 28:153-159.
159. Nakagomi, S., Suzuki, Y., Namikawa, K., Kiryu-Seo, S., and Kiyama, H. 2003. Expression of the activating transcription factor 3 prevents c-Jun N-terminal kinase-induced neuronal death by promoting heat shock protein 27 expression and Akt activation. *J Neurosci* 23:5187-5196.
160. Powell, W.S. 2003. 15-Deoxy-delta12,14-PGJ2: endogenous PPARgamma ligand or minor eicosanoid degradation product? *J Clin Invest* 112:828-830.
161. Ohta, H., Aizawa, S., and Nishimune, Y. 2003. Functional analysis of the p53 gene in apoptosis induced by heat stress or loss of stem cell factor signaling in mouse male germ cells. *Biol Reprod* 68:2249-2254.
162. Heussler, V.T., Fernandez, P.C., Machado, J., Jr., Botteron, C., and Dobbelaere, D.A. 1999. N-acetylcysteine blocks apoptosis induced by N-alpha-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone in transformed T-cells. *Cell Death Differ* 6:342-350.
163. Kelso, G.F., Porteous, C.M., Coulter, C.V., Hughes, G., Porteous, W.K., Ledgerwood, E.C., Smith, R.A., and Murphy, M.P. 2001. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *J Biol Chem* 276:4588-4596.
164. Chen, S.Y., Lu, F.J., Gau, R.J., Yang, M.L., and Huang, T.S. 2002. 15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 induces apoptosis of a thyroid papillary cancer cell line (CG3 cells) through increasing intracellular iron and oxidative stress. *Anticancer Drugs* 13:759-765.
165. Huang, W.C., Chio, C.C., Chi, K.H., Wu, H.M., and Lin, W.W. 2002. Superoxide anion-dependent Raf/MEK/ERK activation by peroxisome proliferator activated receptor gamma agonists 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2), ciglitazone, and GW1929. *Exp Cell Res* 277:192-200.
166. Lennon, A.M., Ramage, M., Dessouroux, A., and Pierre, M. 2002. MAP kinase cascades are activated in astrocytes and preadipocytes by 15-deoxy-Delta(12-14)-prostaglandin J(2) and the thiazolidinedione ciglitazone through peroxisome

- proliferator activator receptor gamma-independent mechanisms involving reactive oxygenated species. *J Biol Chem* 277:29681-29685.
167. Kondo, M., Oya-Ito, T., Kumagai, T., Osawa, T., and Uchida, K. 2001. Cyclopentenone prostaglandins as potential inducers of intracellular oxidative stress. *J Biol Chem* 276:12076-12083.
 168. Maxey, K.M., Hessler, E., MacDonald, J., and Hitchingham, L. 2000. The nature and composition of 15-deoxy-Delta(12,14)PGJ(2). *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 62:15-21.
 169. Lennon, A.M., Ramauge, M., Dessouroux, A., and Pierre, M. 2002. MAP kinase cascades are activated in astrocytes and preadipocytes by 15-deoxy-Delta(12-14)-prostaglandin J(2) and the thiazolidinedione ciglitazone through peroxisome proliferator activator receptor gamma-independent mechanisms involving reactive oxygenated species. *J Biol Chem* 277:29681-29685.
 170. Sgonc, R., and Wick, G. 1994. Methods for the detection of apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol* 105:327-332.
 171. Hirata, Y., Hayashi, H., Ito, S., Kiwawa, Y., Ishibashi, M., Sudo, M., Miyazaki, H., Fukushima, M., Narumiya, S., and Hayaishi, O. 1988. Occurrence of 9-deoxy-delta 9,delta 12-13,14-dihydroprostaglandin D2 in human urine *J Biol Chem* 263: 16619-2516619-25.
 172. Thevenon, C., Guichardant, M., and Lagarde, M. 2001. Gas chromatographic-mass spectrometric measurement of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2), the peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, in urine. *Clin Chem* 47:768-770.
 173. Miwa, Y., Sasaguri, T., Inoue, H., Taba, Y., Ishida, A., and Abumiya, T. 2000. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) induces G(1) arrest and differentiation marker expression in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 58:837-844.
 174. Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M.J., and Willoughby, D.A. 1999. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* 5:698-701.
 175. Bell-Parikh, L.C., Ide, T., Lawson, J.A., McNamara, P., Reilly, M., and FitzGerald, G.A. 2003. Biosynthesis of 15-deoxy-delta12,14-PGJ2 and the ligation of PPARgamma. *J Clin Invest* 112:945-955.
 176. Badr, F.M. 1976. Effect of sexual maturation and androgens on prostaglandin levels in tissues of the male reproductive system in mice. *Endocrinology* 98:1523-1527.
 177. Rej, S.K., and Chatterjee, A. 1980. The possible mode of action of prostaglandins: XVI. A study to assess the local effect of prostaglandins E1, E2 or F2 alpha in the regulation of male fertility. *Prostaglandins Med* 4:465-470.
 178. Matsuoka, T., Hirata, Y., Tanaka, T., Takahashi, Y., Murata, K., Kabashima, K., Sugimoto, Y., Kobayashi, T., Ushikubi, F., and Aze, Y. 2000. Prostaglandin D2... *Science* 287:2013-2017.

179. Eguchi, N., Minami, T., Shirafuji, N., Kanaoka, Y., Tanaka, T., Nagata, A., Yoshida, N., Urade, Y., Ito, S., and Hayaishi, O. 1999. Lack of tactile pain (allodynia), in lipocain-type prostaglandin D synthase-deficient mice. *PNAS* 96:726-730.
180. Loftin, C.D., Trivedi, D.B., Tiano, H.F., Clark, J.A., Lee, C.A., Epstein, J.A., Morham, S.G., Breyer, M.D., Nguyen, M., Hawkins, B.M., Goulet, J. L., Smithies, O., Koller B.H., Langenbach, R. 2001. Failure of ductus arteriosus closure and remodeling in neonatal mice deficient in cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 *PNAS* 98:1059-1064.
181. Ratnasooriya, W.D., and Wadsworth, R.M. 1987. Effect on fertility in rats of epididymal administration of indomethacin. *Int J Fertil* 32:152-156.
182. Lin, W.W., Lamb, D.J., Wheeler, T.M., Abrams, J., Lipshultz, L.I., and Kim, E.D. 1997. Apoptotic frequency is increased in spermatogenic maturation arrest and hypospermatogenic states. *J Urol* 158:1791-1793.

8 Anhänge

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALC	adulte Leydigzellen
AIDS	Acquired Immune deficiency Syndrom
cm	Zentimeter
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclo-AMP
COX	Cylooxygenase
Ct	Kontrolle
°C	Grad Celsius
cyPG	cyclopentenone Prostaglandine
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ERK	extrazelluläre Signal-regulierte Protein Linase
et al.	und Mitarbeiter
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GW 9662	2-Chloro-5-nitro-N-phenylbenzamide
h	Stunde
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazin-1-Ethansulfonsäure
HSD	Hydroxysteroid Dehydrogenase
JNK	Jun-N-terminale-Kinase
IGF	Insulin like growth factor
IL	Interleukin
IκB	Inhibitor von kappaB
KDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
LH	Luteinisierendes Hormon
M1-2	Marker 1-2
M	Molar
μg	Microgramm
mg	Milligramm

ml	Milliliter
NAC	N-acetylcystein
NfκB	Nuclear faktor kappaB
P	phosphoryliert
PBS	phoshat buffered saline= Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PG	Prostaglandine
PLC	Progenitor-Leydigzellen
PJ	Propidiumjodid
PPAR	Peroxisome-Proliferator-aktivierter Rezeptor
ROS	reactive oxygen species= freie Radikale
Rosi	Rosiglitazone
s	Sekunde
SAPK	stress-activated protein kinase
Star	Steroid transcription activated regulator
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TGF	Tumor growth factor
TSH	Thyroidea Stimulierendes Hormon
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Zvad	N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(Ome)-fluoromethylketone
15d-PGJ ₂	15-deoxy-Δ ^{12,14} -prostaglandin J ₂
7-AAD	7-Actino-Aminomycin D

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Postnatale Differenzierung der Leydig-Zelllinie (aus: Mendis-Handagama 2001 (37)).	9
Abbildung 2:	Entstehung von 15d-PGJ ₂ (aus Harris 2002 (49)).	12
Abbildung 3:	18 Tage alte Sprague-Dawley-Ratte nach Eröffnung der Peritonealhöhle.	24
Abbildung 4:	Umverteilung des Phosphatidylserins in der Plasmamembran während der Apoptose.	28
Abbildung 5:	Zwei Farben Dot-Plot-Histogramm (Färbung von PLCs mit Annexin V-FITC und Propidiumjodid).	29
Abbildung 6:	15d-PGJ ₂ verringert die Vitalität von PLCs.	31
Abbildung 7:	Der Effekt von 15d-PGJ ₂ auf PLCs ist konzentrationsabhängig.	33
Abbildung 8:	15d-PGJ ₂ induziert dosisabhängig verschiedene Zellstress charakteristische Proteine.	34
Abbildung 9:	15d-PGJ ₂ vermittelt Apoptose in PLCs. Apoptosemessung mittels Durchflusszytometrie.	35
Abbildung 10:	15d-PGJ ₂ aktiviert JNK und BAD.	36
Abbildung 11:	15d-PGJ ₂ bewirkt eine Spaltung des Androgen-Rezeptors und Glukokortikoid-Rezeptors.	37
Abbildung 12:	15d-PGJ ₂ aktiviert Caspase 3.	38
Abbildung 13:	Zvad-fmk verhindert teilweise die durch 15d-PGJ ₂ ausgelöste Apoptose.	39
Abbildung 14:	Zvad-fmk verhindert auch bei höherer Dosis die 15d-PGJ ₂ vermittelte Apoptose nicht komplett.	40
Abbildung 15:	PPAR γ - und α -Agonisten haben keine Auswirkung auf die Vitalität der PLCs.	41
Abbildung 16:	Die Behandlung mit 15d-PGJ ₂ induziert die Expression von p53.	43
Abbildung 17:	NAC verhindert vollständig die durch 15d-PGJ ₂ vermittelte Apoptose.	44
Abbildung 18:	NAC inhibiert die durch 15d-PGJ ₂ ausgelöste	45

	Apoptose dosisabhängig.	
Abbildung 19:	NAC verhindert den Anstieg von p53 und pJNK in mit 15d-PGJ ₂ behandelten PLCs.	46
Abbildung 20:	15d-PGJ ₂ führt zu einem Anstieg des intrazellulären ROS.	46
Abbildung 21:	Modell für die durch 15d-PGJ ₂ induzierte Apoptose in PLCs.	55

Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Herrn Professor Küpker, der mich noch während meines Studiums unterstützte und zu einem Forschungsaufenthalt an der Rockefeller University ermutigte. Herrn Prof. Diedrich möchte ich für die Annahme des Themas und seine Förderung danken.

Zu besonderem Dank bin ich auch meiner amerikanischen Chefin, Frau Dr. Patricia Morris, verpflichtet, die mich in die molekularbiologische Forschung einführte. In ihrem Labor ist der experimentelle Teil dieser Arbeit entstanden. Ich danke ihr sehr herzlich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, der Materialien und Gerätschaften.

Meine Arbeit wurde gefördert mit Forschungsgeldern des National Institute of Health (USA) (NIH grant HD39024 an Dr. P. Morris) und des National Institute of Health and Child Development (NIHCD grant R01 39024 and Dr. P. Morris). Anzuerkennen sind auch die Reisekosten-Gelder aus dem NIH grant HD39024, die es mir ermöglichten, Teile dieser Forschungsergebnisse auf dem American Congress of Molecular Biology (2002) sowie dem Testis Workshop der American Society for Andrology (2003) vorzustellen. Dem Population Council danke ich für die Vergabe eines „Reproductive Biomedicine Fellowships“ für 18 Monate, das die finanzielle Basis für meinen Aufenthalt am Population Council der Rockefeller University in New York schuf.

Während meiner Arbeit wurde mir vielfältige Hilfe und Unterstützung zuteil, für die ich mich sehr herzlich bedanken möchte. Meine amerikanische Kollegin Frau KeumSil Huang half mir im Labor und arbeitete mich in verschiedene molekularbiologische Techniken ein. Von Frau Lyan Mitchell erlernte ich die Technik der PLC-Préparation sowie die Arbeitstechniken der Zellkultur. Frau Dr. Laurence Walch hatte in lehrreichen Diskussionen viel Zeit für mich und gab mir fachliche Hilfe auf dem Gebiet der Prostaglandine. Frau Dr. Emanuela Clavarino unterstützte mich bei den Proteinarbeiten. Mein Bruder Herr Dr. Jan Diemert leistete transatlantischen IT-Support.

Mein Dank gilt besonders auch Herrn Dr. Patrick Linsel-Nitschke, der mir über die Jahre meines Studiums und meiner Forschung persönlich und fachlich zur Seite gestanden hat. Meinen Eltern Lieselotte und Dr. Klaus Diemert danke ich für ihre unermüdliche Unterstützung und Förderung. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

Lebenslauf

Name **Anke Maike Anneliese Diemert**
Geburtsdatum 19.05.1976
Geburtsort Düsseldorf
Eltern Vater: Dr. rer. nat. Klaus Diemert, Chemiker
Mutter: Lieselotte Diemert, geb. Koch, Lehrerin

Schulausbildung

08/1986-06/1995 Gymnasium Gerresheim, Düsseldorf
08/1988-11/1988 Austausch mit dem Lycée Bilingue, Lyon, Frankreich und dem
08/1991-10/1991 Ecole Louis Pasteur, Paris, Frankreich
06/1993-12/1993 Bishop-Redding High School, Milton, Ontario, Canada
06/1995 Abitur

Studium der Humanmedizin

03/1998 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
03/1999 1. ABSCHNITT der Ärztlichen Prüfung
03/1999-09/1999 Auslandssemester Universität Wien, Österreich
09/2001 2. ABSCHNITT der Ärztlichen Prüfung
04/2003-04/2004 Praktisches Jahr
05/2004 3. ABSCHNITT der Ärztlichen Prüfung
seit 12/2004 Assistenzärztin an der Frauenklinik
des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

Forschungsaufenthalt

09/2001-04/2003 Population Council, Rockefeller University, New York, USA
Biomedicine Fellowship

Dissertation

Doktorvater: Prof. Dr. med. W. Küpker
Direktor der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
Zentralkrankenhaus Bremen Nord
05/2002-12/2002 Durchführung der experimentellen Untersuchungen am
Population Council, Rockefeller University, New York, USA