

**Aus dem Institut für Anatomie III
des Zentrums für Experimentelle Medizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor Prof. Dr. med. Z. Halata**

**Der NO/cGMP-Signalweg in testikulären Zellen und
seine Bedeutung für Zellteilung und –differenzierung**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von**

**Oliver Bargheer
geboren in Stadthagen**

Hamburg 2006

**Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 21.02.2007**

**Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. R. Middendorff

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. M. Davidoff

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. G. Mayr

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
1 ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	5
2 EINLEITUNG	6
2.1 Entwicklung und Aufbau des Hodens	6
2.2 Spermatogenese und Spermientransport	9
2.3 Bösartige Hodentumore: Inzidenz und Klassifikation	11
2.4 Der NO/cGMP-Signalweg	14
2.4.1 NO-Synthasen	14
2.4.2 Regulation der NO-Synthasen.....	15
2.4.3 NO-Effekte durch cGMP-Produktion.....	16
2.4.4 Partikuläre Guanylatzyklasen (pGCs).....	18
2.4.5 cGMP-unabhängige NO-Effekte	19
2.5 Schnittstellen der RNS/ROS-Signalwege	22
2.6 Probleme bei der Charakterisierung cGMP-unabhängiger NO- Effekte ...25	
2.7 Die Leydig-Zelllinie MA-10 als ein Modell zur Untersuchung cGMP-unabhängiger NO-Effekte	25
3 MATERIAL UND METHODEN	27
3.1 Material	27
3.1.1 Alphabetische Liste der verwendeten Chemikalien	27
3.1.2 Antikörper	30
3.2 Methoden	31
3.2.1 Immunhistochemie (konventionell)	31
3.2.2 Zellkultur	33
3.2.3 Proteinpräparation aus Geweben und Zellen	35
3.2.4 Western-Blot.....	37
3.2.5 Proliferationsassay XTT	39
3.2.6 cGMP-Elisa	41
3.2.7 Progesteron-Elisa	43
4 ERGEBNISSE	45
4.1 Immunhistochemische Untersuchungen des NO/cGMP- Signalweges in Keimzelltumoren des menschlichen Hodens	45
4.1.1 Seminome:	45

4.1.2	Nicht-Seminome	46
4.1.3	Teratome	46
4.1.4	Stromatumoren.....	48
4.1.5	Zusammenfassung der immunhistochemischen Untersuchung an Biopsaten menschlicher Hodentumoren	49
4.2	Der NO/cGMP-Signalweg in MA-10 Zellen	50
4.2.1	Einfluss von cGMP auf das Wachstum von MA-10 Zellen.....	50
4.2.2	Der wachstumsfördernde Effekt von 8-Br-cGMP auf MA-10 Zellen beruht am ehesten auf einem cGMP-/cAMP- Crosstalk	52
4.2.3	Einfluss von NO auf das Wachstum von MA-10 Zellen	53
4.2.4	NO hemmt die Vitamin C-induzierte H ₂ O ₂ -Produktion in MA-10 Zellen ...	55
4.3	MA-10 Zellen zeigen unter Serumentzug Zeichen stärkerer Differenzierung	58
4.3.1	Wachstum	58
4.3.2	Phänotyp	59
4.3.3	Expression spezifischer Proteine.....	60
4.3.4	Syntheseleistung	60
4.4	Verhalten des NO/cGMP-Signalweges unter Differenzierung.....	61
4.4.1	Unter Differenzierung steigt in MA-10 Zellen die ANP-induzierte cGMP- Produktion	61
4.4.2	Unter Differenzierung hat NO einen fördernden Effekt auf das Wachstum von MA-10 Zellen	62
4.4.3	Unter Differenzierung steigt in MA-10 Zellen die zytoprotektive Potenz von NO gegenüber der Vitamin C-induzierten H ₂ O ₂ -Produktion.....	63
5	DISKUSSION.....	65
5.1	Der NO/cGMP-Signalweg im adulten menschlichen Hoden	65
5.2	Immunhistochemische Untersuchungen des NO/cGMP-Signalweges an menschlichen Biopsaten bösartiger Hodentumore.....	68
5.2.1	Keimzelltumore.....	68
5.2.2	Stromatumore.....	69
5.3	NO-Signalwege in MA-10 Zellen	70
6	ZUSAMMENFASSUNG	78
7	LITERATURVERZEICHNIS	79
8	DANKSAGUNG	88
9	LEBENS LAUF	90
10	ERKLÄRUNG.....	91

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Der Einfluss von Stickstoffmonoxid (NO) auf zelluläre Proliferations- und Differenzierungsvorgänge ist Gegenstand zahlreicher Arbeiten. Die beobachteten Effekte werden zum einen über Aktivierung des zytosolischen NO-Rezeptors, die lösliche Guanylatcyclase (sGC), und transiente Produktion von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP), zum anderen über cGMP-unabhängige NO-Effekte vermittelt.

Mit Hilfe verschiedener Modellsysteme (Keimzelltumoren, Zelllinien) sollte geklärt werden, ob eine Modulation der zellulären Teilungsaktivität und Differenzierungstendenz mit einer Veränderung der Expression von Komponenten des NO/cGMP-Signalweges einhergeht und ob NO eine cGMP-unabhängige Wirkung auf das Wachstum von Zellen ausübt, die zwar NO-Synthasen besitzen und zur cGMP-Produktion über partikuläre Guanylatcyclasen befähigt sind, aber keine sGC als NO-Rezeptor exprimieren.

Im Einzelnen sollten Keimzelltumore mittels immunhistochemischer Analysen von humanen Biopsaten auf die Expression von Komponenten des NO/cGMP-Signalweges untersucht werden. Einen Schwerpunkt sollten hier die Teratome bilden, da es bei diesem Keimzelltumor zu spezifischen Differenzierungsvorgängen innerhalb der Zellpopulation kommt.

Im Weiteren sollten funktionelle Untersuchungen insbesondere an MA-10 Leydig-Tumorzellen durchgeführt werden, die zwar über eine spezifische NO-Synthase Stickstoffmonoxid produzieren, jedoch, im Unterschied zur ANP-vermittelten, nicht zur NO-vermittelten cGMP-Produktion befähigt sind, was zu einer Dissoziation von cGMP-vermittelten und cGMP-unabhängigen NO-Effekten führt.

2 Einleitung

2.1 Entwicklung und Aufbau des Hodens

Bei der Entwicklung der männlichen Keimdrüse wachsen im fünf Wochen alten Embryo die Zölomepithelzellen strangförmig in das mesenchymale Stroma der Keimdrüsenanlage ein und bilden mit den eingewanderten Gonozyten, den Urgeschlechtszellen, im weiteren Verlauf die Hodenkanälchen, die Tubuli seminiferi (Abbildung 1, T). Sie beinhalten ab der Adoleszenz die Keimzellen in allen Stufen der Spermatogenese (Abbildung 1, 1-4) sowie die Stütz- oder Ammenzellen, die Sertoli-Zellen (Abbildung 1, S), welche trophische Funktionen erfüllen und die Spermatogenese beeinflussen. Außerdem sind sie an der Bildung der Blut-Hoden-Schranke beteiligt, welche die Keimzellen vor immunologischen Prozessen schützt. Die Hodenkanälchen sind von Schichten von Myofibroblasten und Bindegewebszellen umgeben, welche die Lamina propria bilden (Abbildung 1, LP), die die Hodenkanälchen vom testikulären Interstitium (Abbildung 1, I) trennt.

Am Ende der Fetalentwicklung treten die Hoden an der Rückwand einer Bauchfelltasche aus dem Leistenkanal in den Hodensack. Dieser Vorgang wird auch Descensus testis genannt, und hat physiologisch eine überaus große Bedeutung, da eine ausreichende Spermatozoenproduktion und Reifung nur bei Temperaturen $<35^{\circ}\text{C}$ stattfindet. Verbleibt der Hoden in der Bauchhöhle oder im Leistenkanal, spricht man von einem Hodenhochstand, dem Maldescensus testis. Bei zu später Korrektur des Maldescensus testis atrophieren die Hoden narbig, und es entsteht das Bild eines sog. Kryptorchismus.

Der Descensus testis ist, wie auch die Ausbildung männlicher Geschlechtsorgane, unmittelbar abhängig von einer ausreichenden fetalen Testosteronproduktion und

Die männliche Testosteronproduktion findet vornehmlich im Interstitium (Abbildung 1, I) zwischen den Tubuli seminiferi statt. Die Zellen, welche das männliche Geschlechtshormon produzieren, heißen nach ihrem Entdecker Leydig-Zellen (Abbildung 1, LZ) und synthetisieren und sezernieren unter dem Einfluss von Luteinisierendem Hormon (LH) im Neugeborenenalter und in der Adoleszenz das Testosteron. In den Jahren bis zur Pubertät ist ihre Zahl deutlich reduziert. Obwohl adulte Leydig-Zellen postmitotische Zellen sind, welche sich nicht mehr teilen können, ist der Säugerorganismus in der Lage, Leydig-Zellen aus Progenitorzellen nachzubilden (s. Mendis-Handagama et Ariyaratne 2001). Bis dato ist auch der Ursprung dieser Vorläuferzellen nicht eindeutig geklärt. Neuere Untersuchungen an Tiermodellen legen eine neuroektodermale Abstammung nahe, wobei die Progenitorzellen aus Perizyten und glatten Muskelzellen interstitieller Gefäße erwachsen (Davidoff et al. 2004). In der Adoleszenz reguliert Testosteron die Spermato- und Spermiogenese (s. Lombardo et al 2005). In humanen Biopsaten finden sich darüber hinaus bei fehlender oder gestörter Spermatogenese regelmäßig Leydig-Zell-Hyperplasien (Abbildung 2), was eine fein regulierte Interaktion zwischen den verschiedenen testikulären Zellpopulationen impliziert.

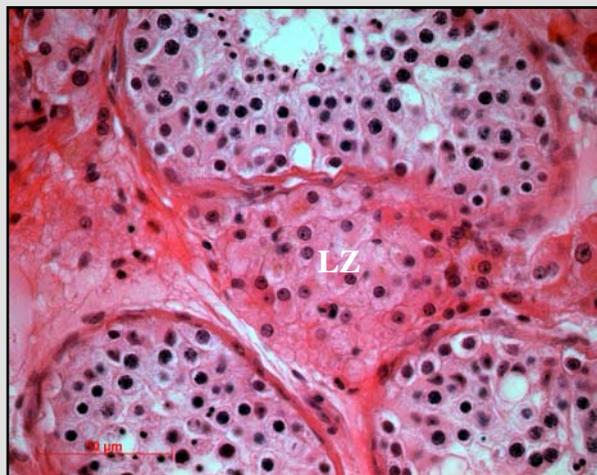


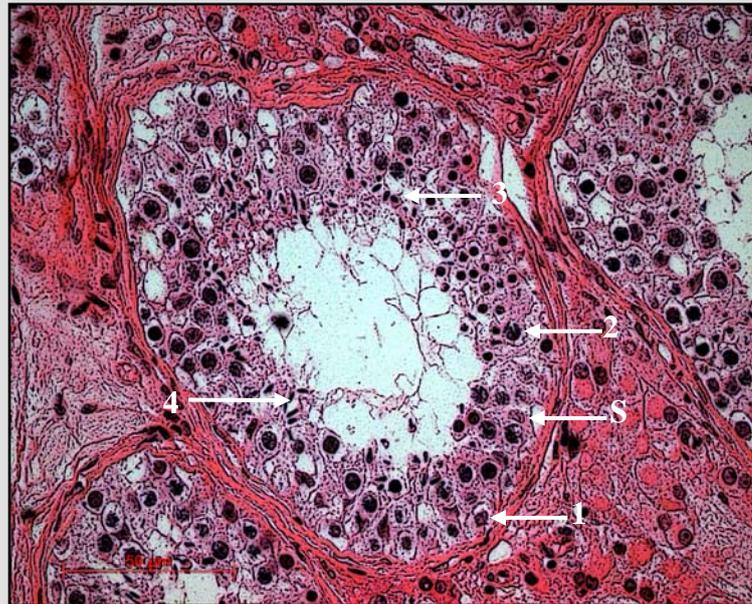
Abbildung 2: Leydig-Zell-Hyperplasie bei gestörter Spermatogenese, Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Deutlich sieht man die Leydig-Zellen (LZ), die das Interstitium zwischen den Hödenkanälchen fast vollständig füllen.

2.2 Spermatogenese und Spermientransport

Während präpubertär keine reifen Keimzellen in den Tubuli seminiferi vorkommen, beginnt mit Eintritt in die Pubertät die kontinuierliche Spermatozoen-Produktion. Sie verläuft in drei Stadien, die sich im adulten Hoden immer gleichzeitig finden:

1. Vermehrungsperiode (mitotische Teilung)
2. Reifungsperiode (Meiose)
3. Differenzierungsperiode (Spermiogenese)

In der Vermehrungsperiode teilen sich die basal gelegenen Spermatogonien (Abbildung 3, 1) und bilden die Spermatogonien A und B. Als Typ A werden die Stamm- und Reserve Stammzellen bezeichnet, da Sie ihre Teilungsfähigkeit nicht verlieren und so das Reservoir der Stammzellen bilden. Als Typ B-Spermatogonien werden die Stammzellen bezeichnet, die sich abermals mitotisch teilen und so die sog. Spermatozyten I (Abbildung 3, 2) bilden. In der Reifungsperiode treten die gebildeten großen Spermatozyten I nach Verdopplung ihrer DNA in die erste Reifeteilung ein und bilden dadurch die deutlich kleineren diploiden Spermatozyten II, aus denen während der zweiten Reifeteilung die haploiden Spermatischen (Abbildung 3, 3+4) entstehen.



1: Spermatogonie 2: Spermatozyt I 3: unreife Spermide
4: Spermide S: Sertoli-Zelle

Abbildung 3 : Stadien der Spermatogenese. Erläuterungen s. Text.

In der Differenzierungsphase reifen die Spermide zu beweglichen Spermatozoen und werden über das Lumen der tubuli seminiferi und das Rete testis zum Nebenhoden geleitet (Abbildung 4). Dieser ist sowohl Speicher- als auch Reifungsort der Spermatozoen und garantiert durch seine fein regulierte Transportfunktion ein vollständiges Ausreifen der Spermatozoen.

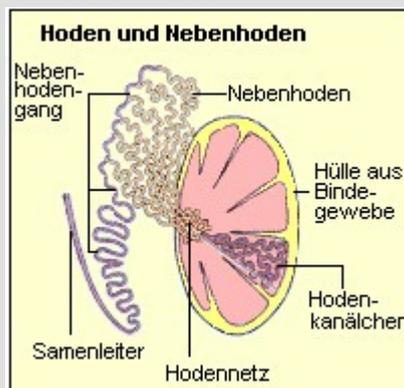


Abbildung 4: Aufbau des Hodens und Spermientransport. Erläuterungen s. Text.

2.3 Bösartige Hodentumore: Inzidenz und Klassifikation

Laut WHO erkrankten im Jahre 2001 3900 Männer in Deutschland an einem bösartigen Hodentumor. Damit ist die deutsche absolute Neuerkrankungsrate die weltweit dritthöchste nach den USA und Russland.

Die Inzidenz der bösartigen Hodentumoren beträgt z.Zt. etwa 8/100.000 Männer/ Jahr bei einer Mortalität von 0,8/100.000 Männer/ Jahr. Der Altersgipfel liegt je nach Typ bei 26 Jahren für das Nicht-Seminom und bei 36 Jahren für das Seminom. Obwohl die Inzidenz der Hodentumore in den letzten Jahren stetig stieg, konnten epidemiologische Studien zeigen, dass es zu einer Stadiendrift bei Erstdiagnose in Richtung früherer Stadien kommt. Dieses Phänomen wird als „stage migration“ bezeichnet. Zurzeit werden ca. 90% der Patienten in einem Frühstadium diagnostiziert. Als Risikofaktoren zur Entwicklung eines Hodentumors gelten Kryptorchismus oder ein Hodentumor in der Familien- oder Eigenanamnese, was eine genetische Disposition nahe legt.

Die histopathologische Klassifikation der Hodentumoren richtet sich nach der WHO-Klassifikation von 1998 (Mostofi et Sesterhenn 1998). Eine klinische Einteilung erfolgt über die sonst übliche TNM Klassifikation hinaus nach der Indiana Klassifikation (v.a. USA) bzw. der Lugano Klassifikation (s. Gerl et al. 2003).

Je nach Ursprung der Hodentumore unterscheidet man Keimzelltumore von den Tumoren des Stromagewebes. Die Keimzelltumore entstammen der Keimzelllinie, vermutlich entstehen sie aus transformierten, sich mitotisch teilenden Spermatogonien. Sie sind mit ca. 90% Anteil die häufigsten malignen Hodentumore.

Sie untergliedern sich weiter in Seminome, Teratome, Embryonale Karzinome, Dottersacktumore und Chorionkarzinome. Seminome sind mit ca. 50 % die häufigsten Keimzelltumore, gefolgt von den Teratomen (ca. 30%) und den Mischtumoren (ca. 15%). Das Teratom, der zweithäufigste Keimzelltumor, besitzt als

einzigster Hodentumor Anteil aus allen drei Keimblättern. Er ist durch seine pluripotenten Eigenschaften in der Lage, hoch differenzierte Strukturen, wie Haut, Haare, Knorpel und selbst komplett entwickelte Zähne auszubilden. Deshalb wird zwischen einem reifem und einem unreifem Teratom und dessen Anteilen unterschieden. Mit Ausdifferenzierung verlieren Teratomzellen ihre Teilungsfähigkeit und Malignität (s. Gonzales-Crussi 1982). Damit könnten sie ein bisher nicht etabliertes Modell zur Untersuchung von Differenzierungsvorgängen darstellen.

Bei den insgesamt seltenen testikulären Stromatumoren (ca. 4% aller Hodentumore) ist der Ledig-Zell-Tumor der häufigste. Dieser endokrin aktive Tumor produziert im Kindesalter bevorzugt Testosteron und Östradiol, was bei den erkrankten Kindern zu einer Pubertas praecox und Hirsutismus führen kann (s. Papatsoris et al. 2004). Bei Erkrankung im Erwachsenenalter überwiegt zumeist die Östradiolproduktion, die häufig zu einer Gynäkomastie bei den Patienten führt. Durch seine zumeist geringe Teilungsaktivität hat er eine gute Prognose. Granulosa- und Sertoli-Zell-Tumore, Gonadoblastom sowie Androblastom sind äußerst seltene testikuläre Stromatumore und werden hier lediglich der Vollständigkeit halber erwähnt.

Anm.: Bei ca. 6% der Hodentumore handelt es sich um maligne Lymphome, die neben testikulärer Metastasierung auch primär im Hoden entstehen können.

Keimzelltumore (90%)	Seminome (50%)	klassisches Seminom spermatozytäres Seminom Seminom mit Riesenzellen
	Teratome (30%)	reifes Teratom unreifes Teratom Teratom mit maligner Transformation
	Embryonales Karzinom	
	Dottersacktumore	
	Chorionkarzinome	
	Mischtumore (15%)	
	Stromatumore (4%)	
	Leydig-Zell-Tumor	
	Granulosazelltumor	
	Sertoli-Zell-Tumor	
maligne Lymphome 6%		

Tabelle 1: Histopathologische Einteilung der Hodentumore nach WHO.

2.4 Der NO/cGMP-Signalweg

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein sehr reaktives Molekül mit einer Halbwertszeit von wenigen Sekunden (s. Ignarro 1989). Da NO die Zellmembran ungehindert passieren kann, ist es in der Lage, eine sowohl auto- als auch parakrine Wirkung zu entfalten. Obwohl die Diffusionsstrecke von freiem NO nur wenige μM beträgt, kann es, gebunden an Proteine auch weiter entfernt vom Entstehungsort wirken (s. Stamler et al. 1992). Endogenes NO entsteht bei der Konversion von L-Arginin zu Citrullin. Diese Reaktion wird durch spezifische zelluläre NO-Synthasen (NOSs) katalysiert (s. Knowles et Moncada 1994).

2.4.1 NO-Synthasen

Bis dato sind drei Isoformen sowie eine zusätzlich Splicevariante, die in humanen Leydig-Zellen vorkommt (s. Wang et al. 2002), beschrieben. Die NO-Synthasen sind in Mammalierzellen weit verbreitet (s. Ignarro 2000).

Die NOS I oder auch neuronale NO-Synthase (nNOS) findet sich regelmäßig in neuronalen Geweben (s. Boissel et al. 1998). Weiterhin konnte sie in Leydig-Zellen nachgewiesen werden (Davidoff et al 1995). Darüber hinaus wurde eine zusätzliche testikuläre Splicevariante des Enzyms identifiziert (Wang et al. 1997), welche ausschließlich in Leydig-Zellen des menschlichen Hodens exprimiert wird (Wang et al. 2002).

Die NOS II ist die induzierbare Form der NO-Synthasen (iNOS). Sie wird in Zellen des Immunsystems regelmäßig exprimiert, kann aber durch Induktion via Cytokine und Lipopolysaccharide vermutlich in einer Vielzahl an Zelltypen exprimiert werden (s. Korhonen et al. 2005).

Die NOS III oder endotheliale NO-Synthase (eNOS) konnte in vaskulären Endothelzellen, aber auch in einer Reihe epithelialer Zelltypen nachgewiesen werden (s. Shaul 2002). Ihr zugrunde liegt die bahnbrechende Arbeit von Furchgott

und Zawadzki (1980), welche zeigten, dass der relaxierende Effekt von Acetylcholin auf die aortale Gefäßmuskulatur durch das Endothel vermittelt wird. Der „Endothelial Derived Relaxing Factor“ (EDRF) wurde im Weiteren als Stickstoffmonoxid identifiziert (Palmer et al. 1987, Ignarro et al. 1987, Furchgott et Vanhoutte 1989).

2.4.2 Regulation der NO-Synthasen

Obwohl alle drei Isoformen dieselbe Reaktion katalysieren, unterscheiden sie sich erheblich in ihrer Aktivität und Regulation. Die konstitutiv exprimierten Isoformen nNOS und eNOS produzieren moderate Mengen Stickstoffmonoxid und sind in ihrer Aktivität abhängig von der intrazellulären Kalzium-Konzentration und Calmodulin Bindung (s. Stuehr 1999). Verschiedene Proteinkinasen regulieren die Aktivität der konstitutiven NO-Synthasen (cNOS) durch Phosphorylierung. Für die endotheliale NO-Synthase konnten Phosphorylierungsstellen identifiziert werden, die die Aktivität des Enzyms effektiv beeinflussen (Dimmler et al 1999, Michell et al. 2001, Hurt et al. 2002). So phosphoryliert die Serin/Threonin-Proteinkinase Akt (PKB) die eNOS an Ser-1179 und kann so deren Aktivität erheblich steigern (Fulton et al. 1999). Dieser Mechanismus besitzt große physiologische Bedeutung, insbesondere für unsere Fortpflanzung, bei der die Phosphorylierung der eNOS in den penilen Blutgefäßen für eine intakte Erektionsfähigkeit notwendig ist (s. Burnett 2004). Auch für die neuronale NOS wurden Phosphorylierungsstellen gefunden (Hayashi et al. 1999, Komeima et Watanabe 2001, Song et al. 2005), deren physiologische Bedeutung jedoch noch unklar ist. Durch die spezifischen Phosphorylierungen ist der NO/cGMP-Signalweg mit Signalwegen, die Wachstum und Differenzierung regulieren, integrativ vernetzt (Abbildung 5).

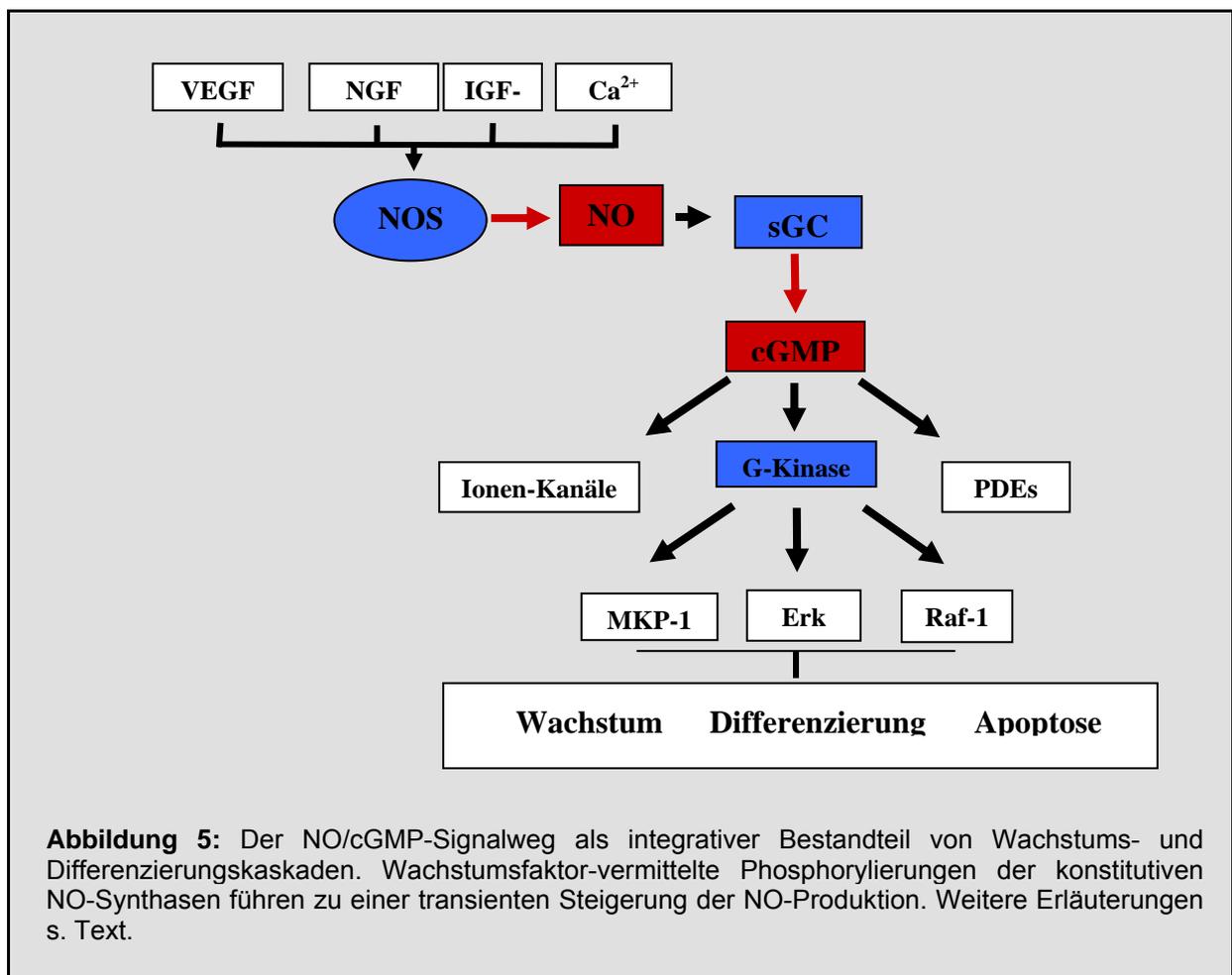
Die induzierbare Form der NO-Synthasen (iNOS) produziert im Gegensatz zu den konstitutiven Isoformen große Mengen an Stickstoffmonoxid (s. Stuehr 1999). Ihre Regulation erfolgt vornehmlich auf transkriptioneller Ebene (s. Korhonen et al 2005).

Zytokine und andere Proteine, aber auch Lipopolysaccharide können via Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF-kappa B die Expression von iNOS induzieren. Dieser Mechanismus spielt eine entscheidende Rolle bei der Immunabwehr und Pathogenese chronisch entzündlicher Erkrankungen. Bei den lokal hohen Konzentrationen an NO, die durch die Expression der iNOS produziert werden, überwiegen jedoch die cGMP-unabhängigen NO-Effekte, da der zelluläre NO-Rezeptor, die lösliche Guanylatzyklase (sGC), zur Aktivierung nur geringe Mengen Stickstoffmonoxid benötigt (s. Friebe et Koesling 2003).

2.4.3 NO-Effekte durch cGMP-Produktion

Stickstoffmonoxid kann innerhalb der Zelle an seinen zytosolischen Rezeptor, die lösliche Guanylatzyklase (sGC) binden, welche dadurch transient Guanosintriphosphat (5'-GTP) in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) umwandelt (Abbildung 5). Die aktive Form der sGC ist ein Heterodimer und besitzt eine prosthetische Häm-Gruppe, an der NO bindet und so eine bis zu 200-fache Steigerung der Enzymaktivität bewirkt (s. Friebe et Koesling 2003). Für cGMP wurden zahlreiche Bindungsstellen gefunden. Neben Ionen-Kanälen und einer Vielzahl cGMP/cAMP-abbauender Phosphodiesterasen existieren zwei cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKGs) (s. Hofmann 2005). Die PKGs sind Serin/Threonin-Proteinkinasen und phosphorylieren verschiedene Enzyme wie Ionenkanäle, aber auch andere Proteinkinasen wie die MAP Kinasen. Es existieren zwei Isoformen dieses Enzyms. PKG I ist die verbreitetste Isoform und findet sich unter anderem im Zytosol glatter Muskelzellen, Thrombozyten, Tubulusepithelien der Nieren und Chondrozyten. Durch spezifische Substratphosphorylierung kann cGMP via PKG Einfluss auf Muskelzellrelaxation, Thrombozytenaggregation, Neurotransmission und Natriumausscheidung der Nieren ausüben sowie das Wachstum und die Differenzierung von Zellen modulieren (Abbildung 5) (s. Pilz et

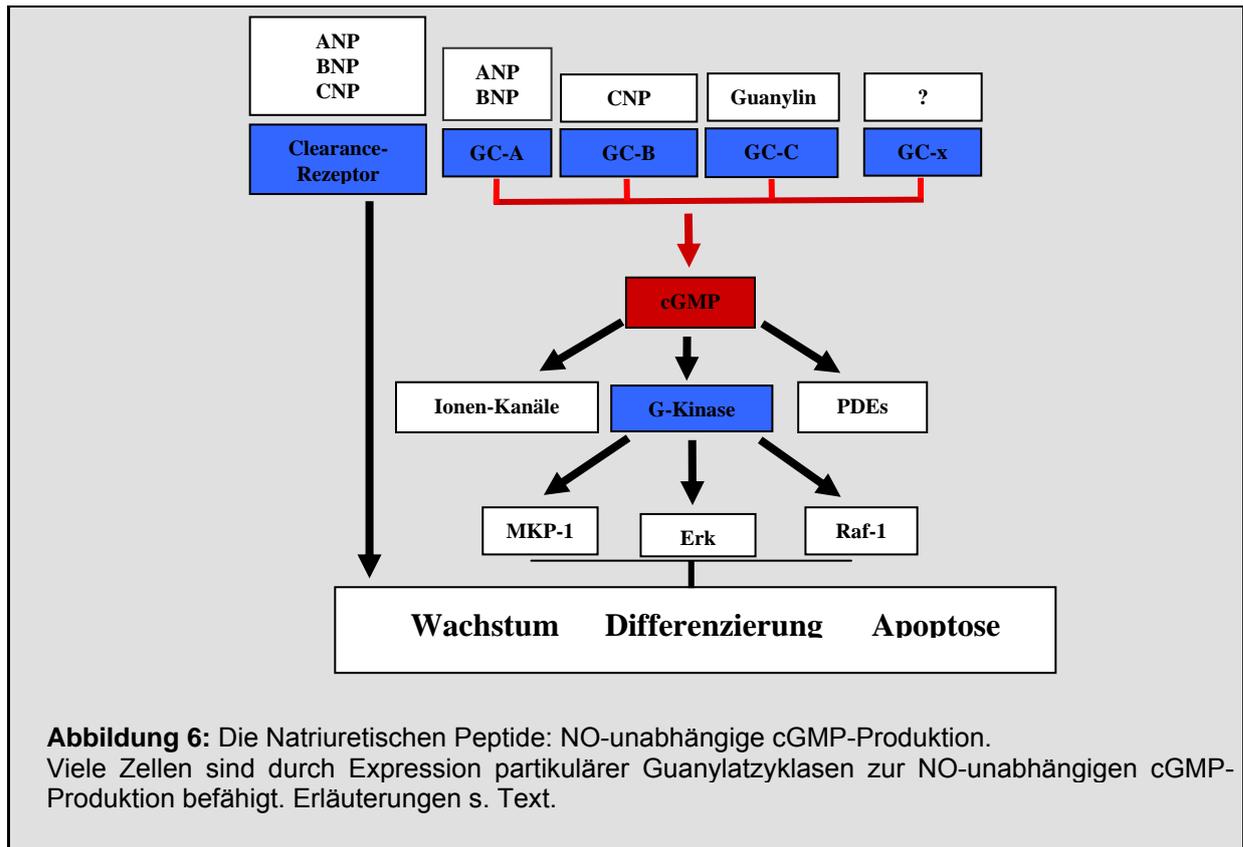
Broderick 2005, Hofmann et al. 2006). Die meisten der bisher beobachteten cGMP-abhängigen Effekte auf das Wachstum und die Differenzierung von Zellen scheinen G-Kinase-vermittelt und wurden unter anderem an glatten Muskelzellen, Neuronen, vaskulären Endothelzellen, Chondrozyten, renalen Mesangiumzellen beschrieben. PKG II wurde bis dato vornehmlich in Neuronen und Dünndarmepithelien nachgewiesen. Sie ist im Gegensatz zur zytosolisch lokalisierten PKG I membrangebunden. Obwohl wenig über Ihre physiologische Rolle bekannt ist, ist ihr Einfluss auf die intestinale Sekretion durch Kontrolle eines Chloridkanals in der apikalen Membran der Enterozyten des Dünndarms hinreichend belegt. Weiterhin scheint Sie Knochenwachstum und zirkadiane Rhythmik zu regulieren.



2.4.4 Partikuläre Guanylatzyklen (pGCs)

Neben der cytosolischen sGC existieren weitere, sog. partikuläre Guanylatzyklen, welche in der Zellmembran verankert sind und eine extrazelluläre Domäne mit Rezeptorfunktion besitzen (Abbildung 6). An dieser können spezifische Agonisten binden und eine transiente cGMP-Produktion induzieren (s. Kuhn 2003). Zu den Agonisten zählen die Natriuretischen Peptide (NP), Atriales Natriuretisches Peptid (ANP), B(rain)-Natriuretisches Peptid (BNP), C-Natriuretische Peptid (CNP) sowie das endogen produzierte Guanylin, dessen physiologische Bedeutung noch nicht eindeutig geklärt ist. Sie alle besitzen unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen Guanylatzyklen (Abbildung 6). ANP und BNP binden vornehmlich an der GC-A, CNP an der GC-B. Guanylin bindet, wie auch das Escherichia Coli Enterotoxin, an der GC-C. Neuere Untersuchungen liefern darüber hinaus Hinweise auf einen spezifischen BNP-Rezeptor, der auch eine Guanylatzyklase-Aktivität besitzt (Goy et al. 2001). Die Expression der unterschiedlichen partikulären Guanylatzyklen und Konzentration der Natriuretischen Peptide im Plasma variiert stark zwischen verschiedenen Zelltypen und dem Entwicklungsstatus des Organismus, was einen Einfluss auf Wachstums- und Differenzierungsmechanismen nahe legt (s. Waschek 2004). Neben den o.g. GCs existieren weitere Guanylatzyklen, die zum Teil hochspezifische Funktionen besitzen (s. Kuhn 2003).

Weiterhin existiert für die NPs ein Rezeptor ohne Guanylatzyklase-Aktivität, der sog. Clearance-Rezeptor (Abbildung 6). Verstand man seine Aufgabe bislang in der Unterdrückung der NP-vermittelten cGMP-Produktion durch Bindung, Inkorporation und Abbau der NPs, zeigen neuere Studien auch einen cGMP-unabhängigen Einfluss auf das Wachstum bestimmter Zelllinien. (s. Anand-Srivastava 2005).



2.4.5 cGMP-unabhängige NO-Effekte

Durch sein unpaares Elektron ist Stickstoffmonoxid ein äußerst reaktionsfreudiges Molekül. Die chemischen Reaktionszustände und –partner von Stickstoffmonoxid sind vielfältig. Für ein besseres Verständnis muss deshalb zwischen direkten und indirekten NO-Effekten unterschieden werden (Abbildung 7).

2.4.5.1 Direkte NO-Effekte

Bei niedrigen NO-Konzentrationen (<1µM) überwiegen die direkten NO-Effekte. Direkte NO-Effekte beinhalten die Interaktion von NO mit eisen- und zinkhaltigen Proteinen. Die Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Häm-Proteinen wie dem Cytochrom P450 (Wink et al. 1993), aber auch der sGC ist seit langem bekannt. In diesem Zusammenhang deuten neuere Untersuchungen auch auf eine cGMP-unabhängige Modulation der Steroidbiosynthese von murinen Leydig-Zellen durch NO, vermittelt durch die Hemmung eines Häm-Proteins (Del Punta et al. 1996).

2.4.5.2 Indirekte NO-Effekte

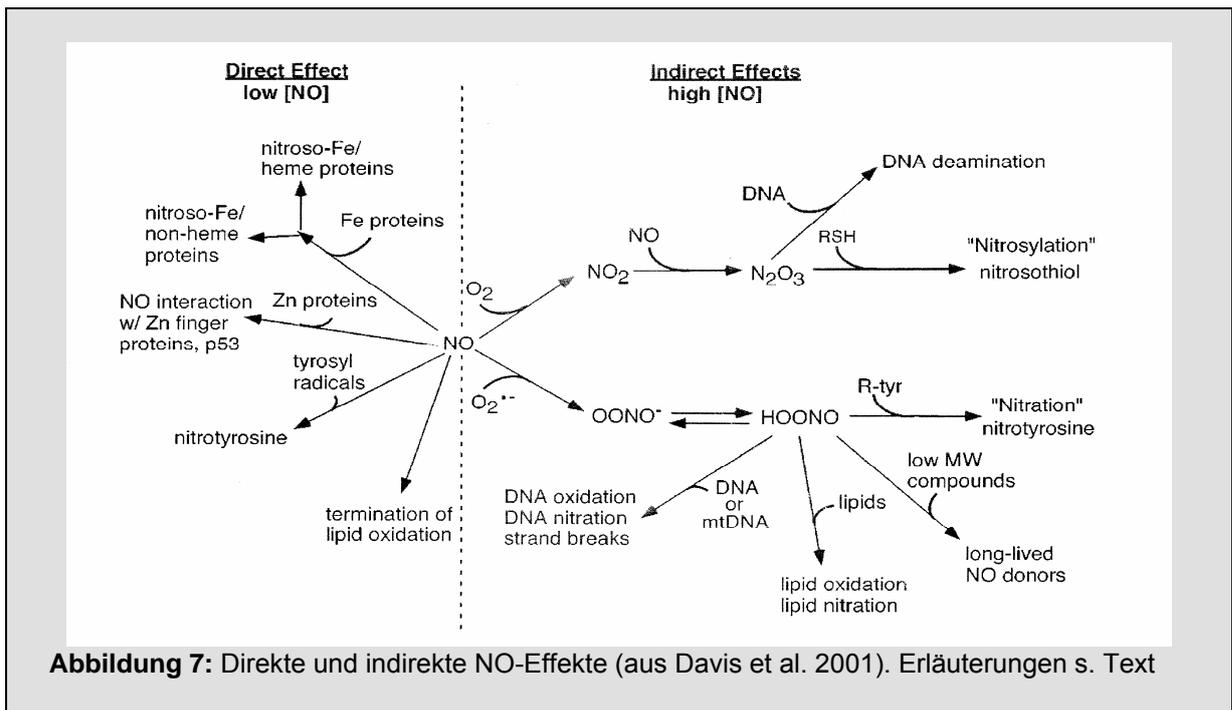
Mit zunehmender NO-Konzentration steigt auch der Einfluß der indirekten NO-Effekte (s. Wink et Mitchell 1998), welche durch die Reaktionsprodukte von NO mediiert werden. Diese werden, in Analogie zu den Reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS), unter dem Namen Reaktive Nitrogen Spezies (RNS) zusammengefasst. Reaktionsprodukte von Stickstoffmonoxyd interagieren mit Zellproteinen oder Lipiden der Zellmembran (Abbildung 7).

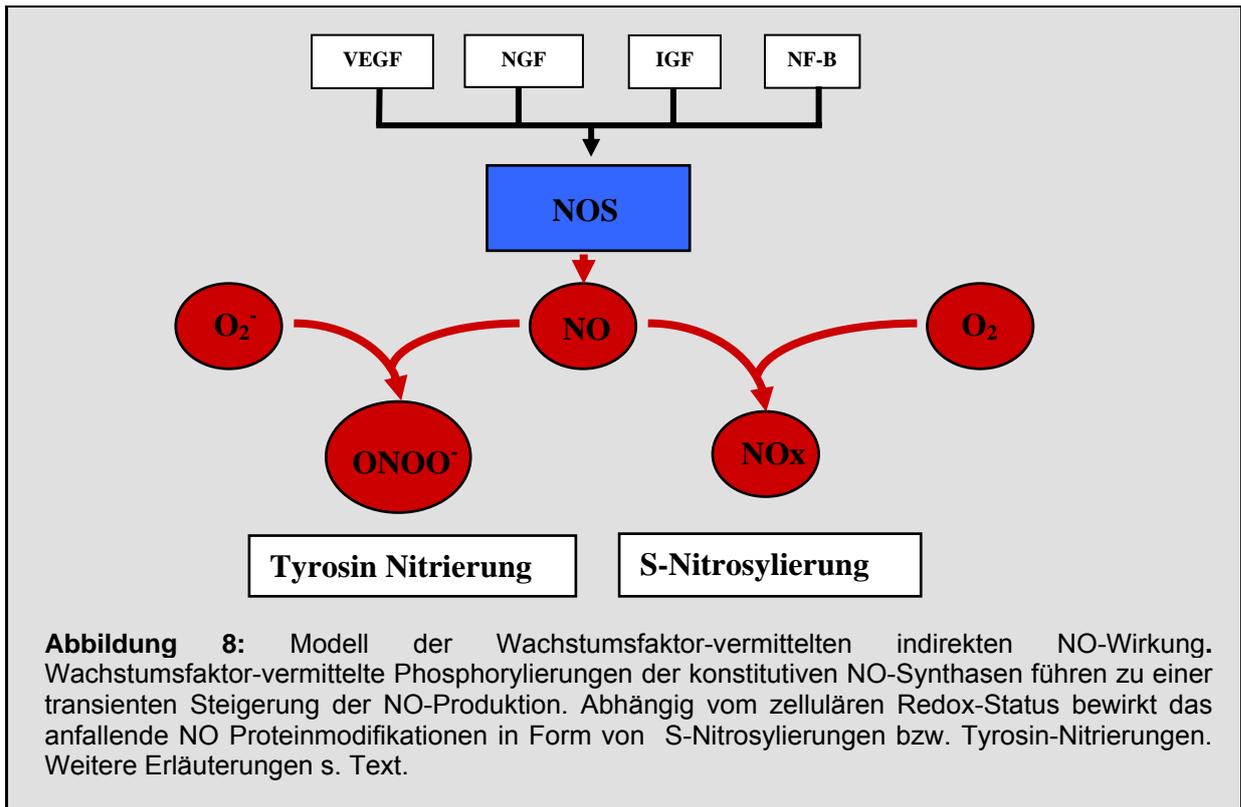
S-Nitrosylierung

Durch Autooxidation mit molekularem Sauerstoff entsteht in der Zelle Stickstoffdioxid (NO_2) bzw. Distickstofftrioxid (N_2O_3). Diese sind in der Lage, bestimmte Proteine an Cystein-Resten zu S-nitrosylieren und dadurch deren Aktivität zu beeinflussen. Solch ein Mechanismus wurde unter anderem für H-ras, Ionenkanäle oder Procaspase-3 beschrieben (s. Stamler et al. 2001, Hess et al. 2005). Obwohl es sich hierbei um rein chemische Reaktionen handelt, scheint eine gewisse Spezifität zu existieren, denn nicht jedes Protein mit Cystein-Resten bzw. jeder Cystein-Rest in einem Protein unterliegt einer S-Nitrosylierung. So wird z.B. beim $\text{p}21^{\text{Ras}}$ nur ein Cystein-Rest der vorhandenen fünf nitrosyliert (Lander et al. 1995, 1997). Die so gebildeten Nitrosothiole sind äusserst labil, auf Grund ihrer hohen Reaktivität mit intrazellulär vorhandenen reduzierenden Substanzen (s. Hess et al. 2005). Als ein reduzierendes Agens für die Denitrosylierung wurde unlängst Vitamin C identifiziert (Jaffrey et al. 2001). Der zelluläre Vitamin C-Gehalt unterliegt einer fein abgestimmten Regulation (s. Wilson 2005). Obwohl es auch per diffusionem in die Zellen gelangt, wird der größte Teil über aktive Mechanismen in die Zelle transportiert. Somit stellt Vitamin C eine Verbindung dar, die entscheidenden Einfluß auf den zellulären Redox-Status ausübt.

Tyrosin-Nitrierung

Durch Reaktion von NO mit Superoxid (O_2^-) entsteht Peroxynitrit ($ONOO^-$), ein äußerst reaktives Oxidans, welches in wässrigen Lösungen spontan Peroxynitrosäure ($HOONO$) bildet (Abbildung 7). Dieses kann Proteine irreversibel an Tyrosin-Resten nitrieren. Lange Zeit wurde die Peroxynitrit-Bildung in Zusammenhang mit apoptotischen Signalwegen, z.B. im Rahmen inflammatorischer Prozesse gebracht (s. Beckman et Koppelol 1996). Neuere Untersuchungen identifizieren Peroxynitrit auch als Mediator von Rezeptor-vermittelten Wachstumssignalen (Cappelletti et al. 2003, s. auch Monteiro 2002) (Abbildung 8). Die Menge an gebildetem Peroxynitrit hängt dabei stark von der Konzentration der Substrate NO und O_2^- ab (s. Davis et al. 2001).





2.5 Schnittstellen der RNS/ROS-Signalwege

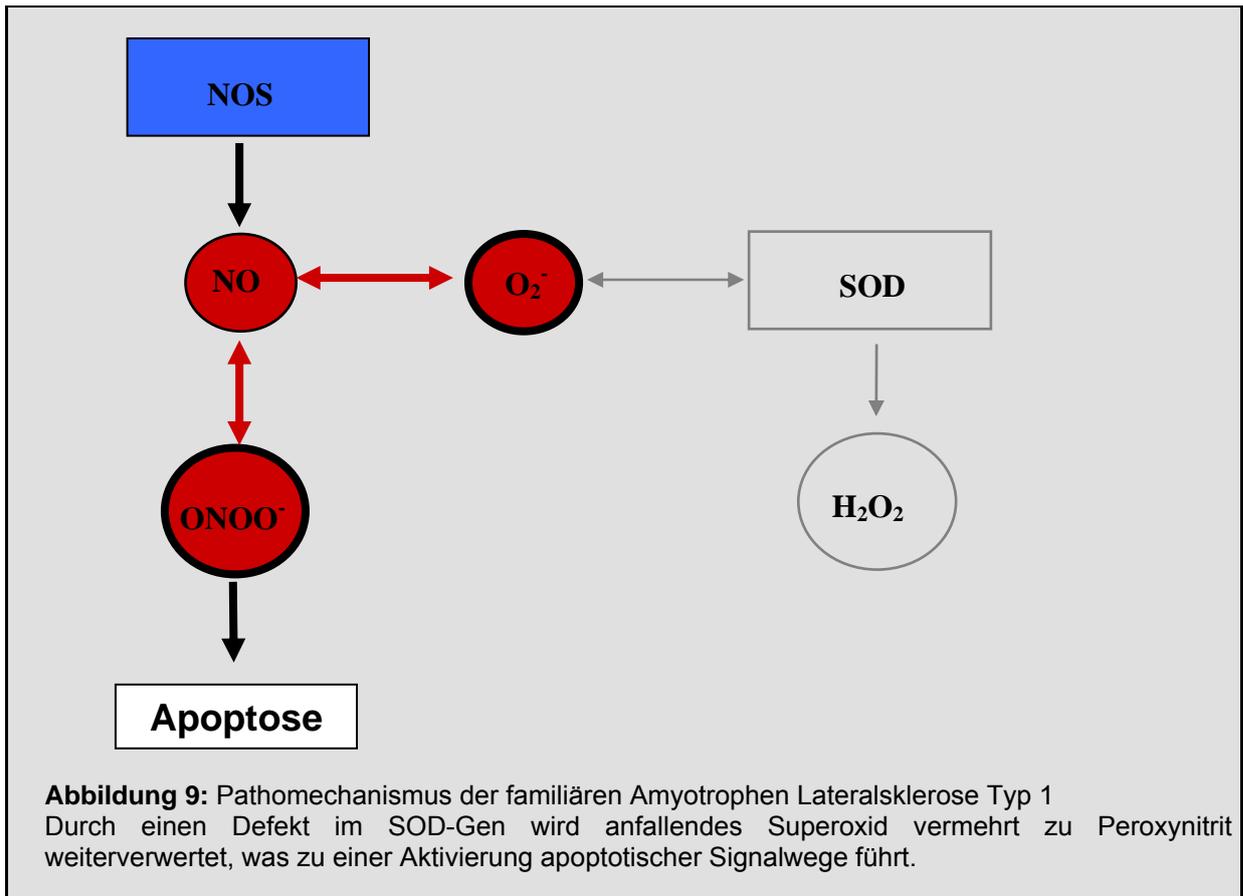
Der NO/RNS- und ROS-Stoffwechsel stehen über das Superoxid-Ion in einem engen Verhältnis zueinander (Abbildung 9). Superoxid entsteht zellulär im Rahmen mitochondrialer Prozesse wie der oxidativen Phosphorylierung. Aber auch via NADPH-Oxidase oder Xanthin-Oxidase können erhebliche Mengen Superoxids entstehen. Bei Prozessen im Rahmen der zellulären Immunantwort sind immunkompetente Zellen wie Makrophagen der O_2^- Entstehungsort, welches dann per diffusionem in die Zellen gelangt.

Stickstoffmonoxid konkurriert mit der Superoxid-Dismutase (SOD), welche Superoxid in Wasserstoffperoxid umwandelt, um das O_2^- Ion. Die Bildung von Peroxynitrit und die Wasserstoffperoxid-Produktion stehen über die SOD in einem Fließgleichgewicht. Mikromolare Konzentrationen an SOD reichen unter physiologischen Bedingungen aus, um das entstehende O_2^- nahezu vollständig zu verwerten und die Peroxynitritbildung zu verhindern (s. Davis et al. 2001). Steigt jedoch die NO- oder

die O_2^- -Produktion, verschiebt sich das Gleichgewicht, so dass große Mengen $ONOO^-$ entstehen können. Dieser Vorgang besitzt eine überaus große Bedeutung im Rahmen der zellulären Immunantwort. Aktivierte Makrophagen bilden erhebliche Mengen an NO und O_2^- , was in den Zielzellen zu einer gesteigerten Peroxynitrit-Bildung führt und apoptotische Signalwege aktiviert (s. Beckman et Koppenol 1996). Auch bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen wird die exzessive Peroxynitrit-Bildung als zugrunde liegender Pathomechanismus diskutiert (s. Floyd 1999, Berg et al. 2004).

Bei der autosomal dominant vererbten familiären Amyotrophen Lateralsklerose Typ 1 (FALS 1) konnte eine Mutation im SOD1 Gen nachgewiesen werden. Die dadurch verminderte SOD Aktivität führt zu einer verstärkten Peroxynitrit-Bildung und Apoptose der betroffenen Neuronen (s. Beckman et al 1993). Abbildung 9 verdeutlicht noch einmal diesen Zusammenhang. Auch wenn die Details der pathochemischen Vorgänge im Rahmen der FALS nicht vollständig geklärt sind, scheint die Bildung von Nitrotyrosin ein entscheidender proapoptotischer Faktor zu sein (s. Bruijn et al. 1997).

Aber auch beim Morbus Parkinson oder der Alzheimer-Erkrankung werden Veränderungen in der Aktivität der NO/Peroxynitrit- und SOD/Wasserstoffperoxid-Signalwege als pathogenetischer Faktor diskutiert (s. Ishiropoulos et Beckman 2003).



Interessanter Weise identifizierten neuere Studien, in Analogie zu Stickstoffmonoxid, auch H_2O_2 als einen Mediator wachstumsvermittelter Signalwege (Colavitti et al. 2002, DeYulia et al. 2005). Ein Crosstalk zwischen dem NO/RNS- und H_2O_2 /ROS-Signalweg scheint somit im Rahmen einer fein regulierten Kontrolle von Zellwachstum und -differenzierung durchaus sinnvoll.

2.6 Probleme bei der Charakterisierung cGMP-unabhängiger NO-Effekte

Die o.g. Beobachtungen implizieren einen erheblichen Einfluß der cGMP-unabhängigen NO-Effekte. Da in vielen Zellmodellen jedoch eine cGMP-Produktion die cGMP-unabhängigen NO-Effekte überlagert, ist deren Untersuchung zumeist diffizil (Abbildung 10). Somit würde eine Zelllinie, die keine sGC exprimiert ein interessantes Modell zur Untersuchung von cGMP-unabhängigen NO-Effekten darstellen.

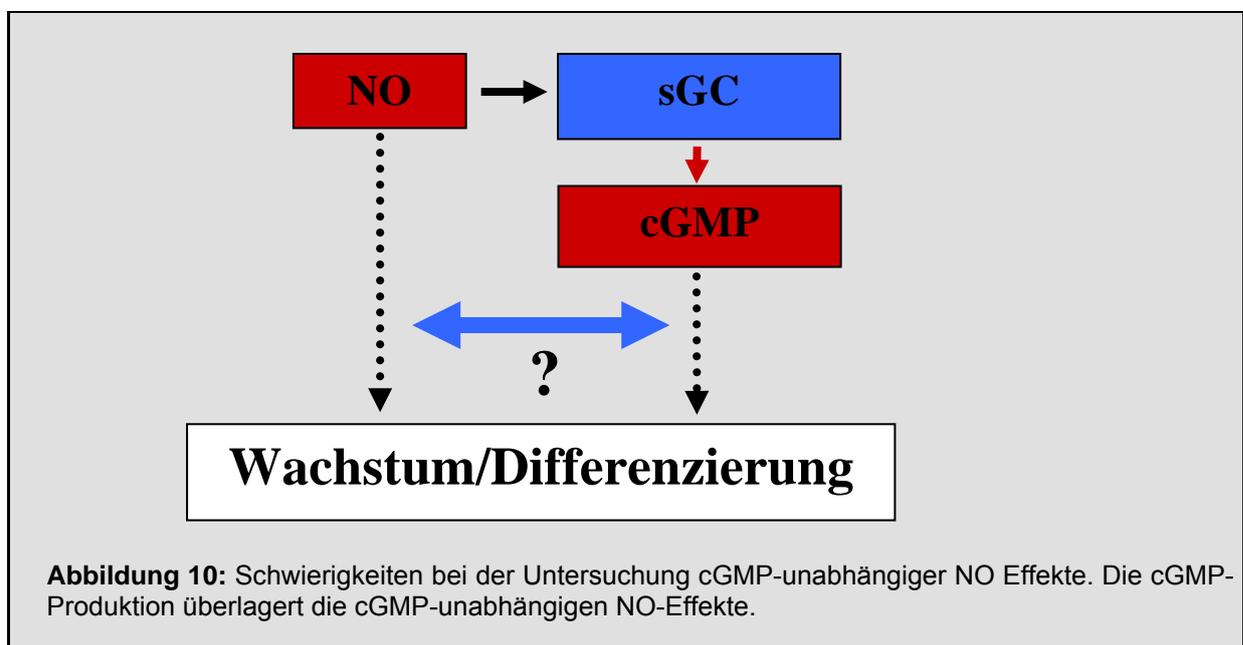


Abbildung 10: Schwierigkeiten bei der Untersuchung cGMP-unabhängiger NO Effekte. Die cGMP-Produktion überlagert die cGMP-unabhängigen NO-Effekte.

2.7 Die Leydig-Zelllinie MA-10 als ein Modell zur Untersuchung cGMP-unabhängiger NO-Effekte

Adulte Leydig-Zellen exprimieren neben der neuronalen NO-Synthase auch den NO-Rezeptor, die lösliche Guanylatzyklase sGC und sind somit zu einer NO-induzierten cGMP-Produktion befähigt. Weiterhin exprimieren adulte Leydig-Zellen die partikulären Guanylatzyklasen GC-A und GC-B, deren Expression stark vom Entwicklungsstand der Leydig-Zellen abhängt. Reife Leydig-Zellen haben ihre Teilungsfähigkeit während ihrer Differenzierung verloren. Die Beobachtung, dass proliferative Leydig-Tumorzellen nicht zur NO-induzierten cGMP-Produktion befähigt

sind, da sie keine sGC mehr exprimieren (Middendorff et al. 1997), legt einen Einfluß von NO/cGMP auf das Wachstum und die Differenzierung von Leydig-Zellen nahe. Bislang konnte in zahlreichen Studien ein Einfluß des NO/cGMP-Signalweges auf die Steroidogenese gezeigt werden. Ein Einfluß von NO und cGMP auf das Wachstum und die Differenzierung von Leydig-Zellen wurde bislang jedoch kaum untersucht.

Die MA-10 Leydig-Tumorzelllinie ist eine seit 1981 existierende Zelllinie (Ascoli 1981) und wurde aus Mäuse-Leydig-Tumorzellen generiert. Sie besitzt zahlreiche Charakteristika adulter Leydig-Zellen und ist ein etabliertes Modell zur Untersuchung der Steroidogenese. Da sie, im Gegensatz zu adulten Leydig-Zellen das Enzym 17 α Hydroxylase nicht exprimieren, produzieren sie vornehmlich Progesteron (s. Payne 1990).

Als weitere Besonderheit sind MA-10 Leydig-Tumorzellen nicht zur NO-vermittelten cGMP-Produktion befähigt (Davidoff et al. 1995, Del Punta et al. 1997). Sie stellen somit ein ideales Modell zur Untersuchung cGMP-unabhängiger NO-Effekte dar. Über den ANP-Rezeptor GC-A können MA-10 Zellen trotzdem erhebliche Mengen an cGMP produzieren. Deshalb kann in MA-10 Zellen die NO- und cGMP-Wirkung unabhängig voneinander untersucht werden.

Die TM3 Leydig-Zelllinie wurde aus präpubertären Leydig-Zellen der Maus generiert und ist nicht-tumorösen Ursprungs. Sie ist ein weiteres etabliertes Leydig-Zellmodell und wurde zum Vergleich der Ergebnisse an MA-10 Zellen herangezogen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Alphabetische Liste der verwendeten Chemikalien

8-Br-cGMP, Biolog life science institute, Bremen, Deutschland

8-Br-cAMP, Biolog life science institute, Bremen, Deutschland

ABC-Komplex (Vectastain Elite), Fa. Vector, Burlingame, CA

Acrylamid/Bis (37,5:1), Serva GmbH&Co KG, Heidelberg, Deutschland

Albumin, bovines Serum-, Sigma, St Louis, MO

Ammoniumchlorid, Sigma, St Louis, MO

Ammoniumpersulfat, Bio-Rad, München, Deutschland

ANP, Bachem Biochemica, Heidelberg, Deutschland

L-Ascorbinsäure, Sigma, St Louis, MO

BCA-Kit, Pierce, Rockford, IL

Blotmembran-Nitrocellulose (Protran®), Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland

Blotmembran-PVDF (Hybond-P), Amersham Pharmacia Buckinghamshire, UK

Bromphenolblau, Merck, Darmstadt, Deutschland

CaCl₂, Merck, Darmstadt, Deutschland

cGMP-Elisa, IHF, Hamburg, Deutschland

DAB (Enhanced DAB Substrate Kit), Pierce ImmunoPure, Rockford, IL

DMEM/HAM's F12, Gibco, Eggenstein, Deutschland

DMSO, Merck, Darmstadt, Deutschland

Dithiothreitol (DTT), Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK

Dulbeccos-PBS, Gibco, Eggenstein, Deutschland

ECL, Amersham, Buckinghamshire, UK

ECL-Plus, Amersham, Buckinghamshire, UK

EGTA, Sigma, St Louis, MO

Essigsäure, Riedel de Haen, Seelze, Deutschland

Ethanol absolut, Riedel de Haen, Seelze, Deutschland

FCS, Sigma, St Louis, MO

Formalin, Merck, Darmstadt, Deutschland

Glucose (D-+), Merck, Darmstadt, Deutschland

Glucose-Oxidase, Sigma, St Louis, MO

Glutamin, Sigma, St Louis, MO

Glycin, Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe, Deutschland

H₂O₂, Merck, Darmstadt, Deutschland

β-hCG, Sigma, St Louis, MO

HCl, Merck, Darmstadt, Deutschland

HEPES, Serva GmbH&Co KG, Heidelberg, Deutschland

IBMX, Sigma, St Louis, MO

KCl, Merck, Darmstadt, Deutschland

KH₂PO₄, Merck, Darmstadt, Deutschland

Methanol, Merck, Darmstadt, Deutschland

MgCl₂, Merck, Darmstadt, Deutschland

Mowiol, 4-88 Polyscience Inc., Warrington, PA

Na₂HPO₄, Merck, Darmstadt, Deutschland

NaCl, Mallinckrodt Baker B.v., Deventer, Niederlande

NaF, Sigma, St Louis, MO

NaH₂PO₄, Merck, Darmstadt, Deutschland

NaHCO₃, Merck, Darmstadt, Deutschland

NaN₃, Sigma, St Louis, MO

Nickelsulfat, Merck, Darmstadt, Deutschland

Ponceau-Rot, Serva Feinchemikalien GmbH&Co KG, Heidelberg, Deutschland

PAP-Maus, Linaris, Bettingen

PAP-Kaninchen, Linaris, Bettingen

Paraformaldehyd, Merck, Darmstadt, Deutschland

Penicillin/Streptomycin, Gibco, Eggenstein, Deutschland

Pikrinsäure (gesättigt), Merck, Darmstadt, Deutschland

PMSF, Amersham Buckinghamshire, UK

Polyvinylpyrrolidon K25, Sigma, St Louis, MO

Progesteron-Elisa, IHF, Hamburg, Deutschland

Protein Standard, gefärbt, Gibco, Eggenstein, Deutschland

PTIO, Axxora, Grünberg, Deutschland

Rp-cAMPS, Biolog, Bremen, Deutschland

SDS (Natriumdodecylsulfat), Sigma, St Louis, MO

Serum Kaninchen, Sigma, St Louis, MO

Serum Schwein, Sigma, St Louis, MO

Serum Pferd, Sigma, St Louis, MO

SNP (Nitroprussid-Natrium), Fluka AG, Buchs, Schweiz

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin), Sigma, St Louis, MO

Tris, Merck, Darmstadt, Deutschland

Trypsin/EDTA, Gibco, Eggenstein, Deutschland

Trypan Blau, Sigma, St Louis, MO

Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaureat), Sigma, St Louis, MO

Waymouth MB 752/1 Medium, Gibco, Eggenstein, Deutschland

Western Blocking Reagent, Roche, Penzberg, Deutschland

XTT-Kit II, Roche, Penzberg, Deutschland

Xylolersatz XEM-200 Vogel GmbH&Co KG, Gießen, Deutschland

3.1.2 Antikörper

3.1.2.1 Primärantikörper

- eNOS Biomol polykl. Kaninchen
Verdünnung: 1:100 (IHC), 1:2500 (WB)
- nNOS Transduction polykl. Kaninchen
Verdünnung: 1:100 (IHC), 1:500 (WB)
- iNOS Biomol polykl. Kaninchen
Verdünnung: 1:500 (IHC), 1:2500 (WB)
- sGC Calbiochem polykl. Kaninchen
Verdünnung: 1:500 (IHC), 1:1000 (WB)
- PKG (C-Terminal) Stressgen polykl. Kaninchen
Verdünnung: 1: 1000 (IHC), 1:4000 (WB)
- Cytochrom P450scc Chemicon polykl. Kaninchen
Verdünnung: 1:1000 (WB)

3.1.2.2 Sekundärantikörper IHC

- Bei polyklonalem Primärantikörper:
Schwein-anti-Kaninchen-IgG-Biotin, Dako
Verdünnung: 1:250
- Bei monoklonalem Primärantikörper:
Kaninchen-anti-Maus-IgG-Biotin, Dako
Verdünnung: 1:250

3.1.2.3 Sekundärantikörper WB

- Bei polyklonalem Primärantikörper:
Esel anti-Kaninchen IgG-Peroxidase, Pierce, Rockford, IL
Verdünnung: 1:5000
- Bei monoklonalem Primärantikörper:
Ziege anti-Maus IgG-Peroxidase, Pierce, Rockford, IL
Verdünnung: 1:2000

3.2 Methoden

3.2.1 Immunhistochemie (konventionell)

3.2.1.1 Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen

- Bouin-Fixierungslösung (70 Vol.% ges. Pikrinsäure, 25 Vol.% Formalin 37%; 5% Essigsäure)
- Chromalaun-Gelatine zur Objektträgerbeschichtung
- Alkoholreihe (Xylolersatz; 100% Ethanol; 96% Ethanol; 80% Ethanol; 70% Ethanol; Aqua dest., PBS)
- 1,2% H₂O₂ in Methanol
- PBS (0,136M NaCl; 0,05M Na₂HPO₄; mit HCl pH 7,4 eingestellt)
- PB (0,018M KH₂PO₄; 0,082M Na₂HPO₄)
- PBS-BSA-NaN₃ (200mg BSA; 100mg NaN₃ in 100ml PBS)
- Normalseren verschiedener Spezies (2% Schweineserum in PBS bei polyklonalem (Kaninchen-)Erstantikörper, 2% Kaninchenserum in PBS bei monoklonalem (Maus-)Erstantikörper)
- Primärantikörper (s. Kap. 3.1.2.1)
- Sekundärantikörper (s. Kap. 3.1.2.2)
- Peroxidase-anti-Peroxidase-Komplex (PAP)
Maus-PAP 1:100 bei Maus-Erstantikörper
Kaninchen-PAP 1:200 bei Kaninchen-Erstantikörper
- ABC-Komplex
- Entwicklungslösung (PB 0,1M, pH 7,4; DAB 0,47mg/ml; Ammoniumchlorid 3,75 mg/ml; Nickelsulfat 1mM; Glucose 0,2%; Glucose-Oxidase 3,75mg/l)
- Eukitt-Eindeckelungsmedium

3.2.1.2 Durchführung

Von dem in Bouin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica) 5µm dicke Schnitte angefertigt und auf Chromalaun-Gelatine beschichtete Objektträger oder Histo-Bond Objektträger aufgelegt und bei 36°C getrocknet.

Zunächst wurden die Präparate durch Alkohol entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe (s.o.) rehydriert.

Im Folgenden ist der weitere Ablauf schematisch dargestellt:

- Blockierung für 30 Minuten mit 2% Normalserum (s.o.) in PBS
- Zugabe des in PBS-BSA-Na₃ verdünnten Erstantikörpers, Inkubation bei 4°C über Nacht
- Spülen in PBS für 3x 10 Minuten
- Inkubation mit dem biotinylierten Zweitantikörper (s.o.) für 1h
- Spülen in PBS für 2x 10 Minuten
- Inkubation mit dem entsprechenden PAP-Komplex (s.o.) für 30 Minuten
- Spülen in PBS für 2x 10 Minuten
- Inkubation mit dem ABC-Komplex für 30 Minuten
- Spülen in PBS für 10 Minuten
- Spülen in PB für 10 Minuten
- Entwickeln der Peroxidase-Aktivität unter Sichtkontrolle für 10-30 Minuten
- Spülen in PBS für 3x 5 Minuten
- Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe
- Eindeckeln in Eukitt

3.2.2 Zellkultur

3.2.2.1 Verwendete Zellen:

MA-10 Zellen

Die MA-10 Zelllinie ist eine Leydig-Tumorzelllinie, die uns freundlicherweise von Herrn Mario Ascoli, University of Iowa, Iowa City, zur Verfügung gestellt wurde (Ascoli 1981).

TM3 Zellen

Die TM3 Zelllinie ist eine präpubertale Maus-Leydig-Zelllinie und wurde über die American Type Culture Collection (ATCC) in Rockville, Maryland, USA bezogen.

3.2.2.2 Kulturbedingungen

Die Zellen wurden bei 37°C Umgebungstemperatur und 4% CO₂ kultiviert.

3.2.2.3 Kulturmedien:

MA-10

Waymouth's Medium mit 100IU Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 10mM HEPES, 15% Pferdeserum.

TM3

DMEM/HAM's F12 Medium mit 100IU Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 4mM Glutamin, 4,5g/l Glukose, 5% Pferdeserum, 2,5% fetales Kälberserum.

3.2.2.4 Kultivierung:

MA-10

Die Zellen wurden in 75 cm² Flaschen mit einer Dichte von 3x10⁵ Zellen/Flasche und 15 ml Medium kultiviert.

Alle 4 Tage wurden die Zellen durch Trypsinierung mit 2 ml Trypsin/EDTA gelöst, gezählt und erneut auf mehrere Flaschen verteilt oder für Versuche auf Multiwell-Platten, bzw. Objektträger ausgesät. Zur Verwendung kamen die Passagen 5 bis 25.

TM3

Die Zellen wurden in 75 cm² Flaschen in 15 ml Medium kultiviert. Bei Erreichen von nahezu vollständiger Konfluenz wurden die Zellen durch Trypsinierung mit 2 ml Trypsin/EDTA gelöst, gezählt und erneut auf mehrere Flaschen verteilt oder für Versuche auf Multiwell-Platten bzw. Objektträger ausgesät. Zur Verwendung kamen die Passagen 5 bis 25.

3.2.2.5 Trypsinierung der Zellen:

Zum Lösen der Zellen wurde nach 4 Tagen Kultivierung das Kulturmedium abgezogen, die Zellen in 5 ml PBS (37°C) gespült und anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA durch Schwenken und Beklopfen vom Boden der Kulturflasche gelöst. Zur Neutralisation der Protease wurden der so gewonnenen Zellsuspension 6ml serumhaltiges Medium hinzu gegeben. Die Zellen wurden nun 5 min bei 240g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 5 ml Kulturmedium gelöst. Die Ermittlung der Zellkonzentration erfolgte durch Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer. Die so gewonnene Zellsuspension diente zur weiteren Kultivierung und zur Durchführung der Versuche.

3.2.3 Proteinpräparation aus Geweben und Zellen

3.2.3.1 Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen:

- Homogenisierungspuffer (25mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer pH 7,2, 5mM EGTA, 0,1mM DTT, 1,0mM PMSF)
- PBS (0,136M NaCl, 0,05M Na_2HPO_4 , mit HCl auf pH 7,4 eingestellt)
- BCA-Kit

3.2.3.2 Proteinpräparation aus Geweben

Das in flüssigem Stickstoff tiefgekühlte Gewebe wurde zuerst grob mechanisch in kleinere Stücke zerschlagen und anschließend in einem Mikro-Dismembrator (Mikro-Dismembrator U, B.Braun) bei 1200rpm 1 Minute lang pulverisiert. Das Pulver wurde zusammen mit einer adäquaten Menge Homogenisierungspuffer in einen Glashomogenisator (B. Braun) überführt und dort homogenisiert. Während des gesamten Vorgangs wurde auf eine sorgfältige Kühlung geachtet.

Die so hergestellten Proben wurden für 8 Minuten bei 3000g (4°C) zentrifugiert, um Kerne und Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde als Probe verwendet.

Die Proteinkonzentration der Probe wurde mittels der Bichinonsäure-Methode (s. Smith et al. 1985) mit einem kommerziellen Kit nach den Herstellerangaben unter Verwendung eines Ultrospec 3000 Photometers (Pharmacia) bestimmt.

3.2.3.3 Proteinpräparation aus MA-10 Zellen:

Zur Gewinnung von Proteinhomogenaten wurde 24 Stunden nach Aussaat ein Medienwechsel durchgeführt, wobei das verwendete Kulturmedium Serum-haltig bzw. -frei war oder angegebene Substanzen (DMSO) enthielt. Nach weiteren 24 Stunden Kultivierung wurden die Zellen zweimal in 10 ml PBS (4°C) gespült und in 10 ml kaltem PBS mittels Zellscraper vom Flaschenboden gelöst. Nachdem die Zellsuspension für 10 Minuten bei 240g zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde, konnte das Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Zur Herstellung von Zellhomogenaten wurde das Zellpellet in einer adäquaten Menge

Homogenisierungspuffer gelöst und als Suspension in den Glashomogenisator überführt und homogenisiert.

Die so hergestellten Proben wurden für 8 Minuten bei 3000g (4°C) zentrifugiert, um Kerne und Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde als Probe verwendet.

Die Proteinkonzentration der Probe wurde mittels der Bichinonsäure-Methode (s. Smith et al 1985) mit einem kommerziellen Kit nach den Herstellerangaben unter Verwendung eines Ultrospec 3000 Photometers (Pharmacia) bestimmt.

3.2.4 Western-Blot

3.2.4.1 Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen:

- 30% Acrylamid/Bis (37,5:1)
- 4x Trenngelpuffer (1,5M Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS)
- 4x Sammelgelpuffer (0,5M Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS)
- 10% Ammoniumpersulfat (APS)
- TEMED (N,N,N,N-Tetramethyl-ethylendiamin)
- Trenngel: 8% (5ml 4x Trenngelpuffer, 5,4ml 30% Acrylamid / Bis, 9,7ml Aqua dest, 100 μ l APS, 20 μ l TEMED)
12% (5ml 4x Trenngelpuffer, 8ml 30% Acrylamid / Bis, 7ml Aqua dest, 100 μ l APS, 20 μ l TEMED)
- Sammelgel (2,5 ml 4x Sammelgelpuffer; 1,4 ml 30% Acrylamid / Bis; 6,2 ml Aqua dest.; 50 μ l APS; 12,5 μ l TEMED)
- 3x Stopp-Mix (0,375M Tris-HCl pH 6,8; 0,2M DTT; 15% SDS; 20% Glycerin; 0,6mg/dl Bromphenolblau)
- Protein-Standard, gefärbt (Gibco)
- PAGE-Puffer (25mM Tris-HCl pH 8,4; 193mM Glycin; 0,1% SDS)
- Transferpuffer (100mM Tris; 193 mM Glycin)
- 0,2% Ponceau-Rot (Sigma)
- TBST (20mM Tris; 137mM NaCl; 0,05% Tween 20)
- Blotmembranen, Blottingpapier
- Blockierungslösungen (5% Magermilchpulver in TBST, alternativ für Nitrocellulose-Membranen Roche-Blockierungspuffer)
- Antikörper-Inkubationspuffer (10% der verwendeten Blockierungslösung in TBST, 0,005% Thimerosal)
- Primärantikörper (s. Kap. 3.1.2.1), Sekundärantikörper (s. Kap. 3.1.2.3)
- ECL bzw. ECL-Plus (Bei Verwendung von PVDF-Membranen)

3.2.4.2 Durchführung

Von den verwendeten Proteinhomogenaten wurden jeweils 20µg mit 3x Stopp-Mix im Verhältnis 2:1 gemischt und für 5 Minuten bei 95°C im Heizblock bzw. alternativ 2 Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert. Verwendet wurde für alle Western-Blot-Untersuchungen das Elektrophoresesystem SE 600 der Firma Hoefer Scientific Instruments (Spannungsquelle Hoefer, PS 500XT-230V). Nach Auftragen der Proben erfolgte eine Elektrophorese in der mit PAGE-Puffer gefüllten Kammer (TE 42, Hoefer Scientific Instruments) bei 25mA, bis die Lauffront das ca. 4cm breite Sammelgel durchwandert hatte. Die Auftrennung im Trenngel wurde bei einer Stromstärke von 60mA durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine bei einer Spannung von 14V über Nacht bei Raumtemperatur auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen (Cytochrom P450scc) transferiert. Im Folgenden ist die Behandlung der Membranen nach erfolgtem Transfer schematisch dargestellt:

- 10 Min. Färbung in Ponceau-Rot und Überprüfung des Proteinmusters
- Spülen in Aqua dest.
- 2h Blockieren in Blockierungslösung
- 5 Min spülen in TBST
- 1h Inkubation mit dem Primärantikörper, verdünnt in Antikörper-Inkubationspuffer
- 3x 5 Min Spülen in TBST
- 1h Stunde Inkubation mit dem Sekundärantikörper
- 2x5 Min und anschließend 20 Min spülen in TBST
- Spülen in Aqua det.
- 2 Min Inkubation mit ECL bzw. 5 Min mit ECL-plus, lt. Herstellerangaben
- In der Dunkelkammer Auflegen eines Röntgenfilmes in einer Röntgenkassette, Entwicklung des Filmes.

3.2.5 Proliferationsassay XTT

3.2.5.1 Prinzip:

Das Tetrazolium-Salz XTT wird von metabolisch aktiven Zellen mitochondrial zu einem Formazan-Farbstoff umgewandelt. Da es sich, ähnlich wie beim Alkoholabbau in der Leber, um eine Reaktion mit relativ konstanter Enzymkinetik handelt, kann anhand der spektrophotometrischen Absorption, welche in einem Photometer bei 450-500nm Wellenlänge gemessen wird, die Zellzahl innerhalb der Probe indirekt semiquantitativ bestimmt werden (s. Paull et al 1988, Scuderio et al. 1988).

3.2.5.2 Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen:

- XTT labeling Reagenz A
- Electron-coupling Reagenz B

3.2.5.3 Durchführung :

Ermittlung der geeigneten Zellzahl und Inkubationsdauer

Die MA-10 bzw. TM3 Zellen wurden mit abnehmender Zellzahl auf 96-Well Platten aufgetragen. Nach 72 Stunden, entsprechend der späteren Versuchsdauer, wurde dem Medium 50µl/Well des XTT-Assays, bestehend aus 5 ml Reagent A und 100µl Reagent B, zugegeben und die spektrophotometrische Absorption zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1h, 2h, 4h, 6h, 8h) gemessen. Die Steigung der sigmoiden Kurve, welche aus den unterschiedlichen Zellzahlen resultierte, nahm mit zunehmender Inkubationsdauer zu. Für die Versuche wurde daraufhin eine Zellzahl und Inkubationsdauer gewählt, bei der die Sensitivität des Assays am größten ist, i.e. im mittleren, annähernd linearen Teil der Kurve bei mäßiger Steigung.

Versuchsdurchführung:

Die Versuche wurden auf 96-Well Platten durchgeführt mit 2×10^4 Zellen/Well (MA-10) und einem Probenvolumen von 100µl/Well. Nachdem die Zellen 24h nach Aussaat ruhten, wurde ein Wechsel des Kulturmediums durchgeführt, wobei das Medium

entweder Serum enthielt oder serumfrei war, bzw. weitere Substanzen (NGF, cAMP, cGMP, etc.) beinhaltete. Nach weiteren 48 Stunden wurde dem Kulturmedium 50 μ l/Well des Assay-Reagenz zugegeben. Nach sechs Stunden Inkubation im Brutschrank (37°C, 4% CO₂) wurde die Extinktion, die sich annähernd proportional zur Zellzahl verhält, im Photometer Dynex Revelation bei 450 nm Wellenlänge gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen Software nach Subtraktion der Leerwert-Extinktion. Angabe als OD %, i.e. Verhältnis der Probenextinktion der zu untersuchenden Probe zu einer für 72 Stunden in serumhaltigen Medium kultivierten Kontroll-Probe, bei der nach 24 Stunden ein Medienwechsel durchgeführt wurde. Alle Versuche wurden in Vierfachansätzen durchgeführt. Die Abbildungen sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Versuche und zeigen den Mittelwert +/- Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte durch das Programm GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, Ca) mittels t-Test. Das Quantil der maximal zulässigen geschätzten Irrtumswahrscheinlichkeit α betrug 0,05.

3.2.6 cGMP-Elisa

3.2.6.1 Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen:

- PBS (0,136M NaCl; 0,05M Na₂HPO₄; mit HCl pH 7,4 eingestellt)
- Lockes Salzlösung (LSS) (154mM NaCl, 5,6mM KCl, 2,2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 6 mM NaHCO₃, 10mM Glucose, 2mM HEPES in Aqua dest.)
- E-PBS-Puffer (0,1M Na₂PO₄, 0,15M NaCl, 0,005M EDTA, 0,2% BSA, 0,01% Thimerosal. pH 7,0)
- Ethanol absolut
- Immuno-Module, i.e. mit Goat-Anti-Rabbit IgG beschichtete Microwells (NUNC 469949), in dazu passendem Rahmen (NUNC 460348) mit Deckel (NUNC 263339)
- cGMP-Antiserum (1:80000 in E-PBS-Puffer, 0,0005% Metanilgelb)
- cGMP-Biotin (170 fmol/ml in E-PBS-Puffer, 0,0005% Bromphenolblau)
- cGMP-Standards in LSS bzw. verwendete Probenmatrix)
- HRP-Streptavidin-Lösung (150ng/ml Streptavidin-gekoppelte Meerrettichperoxidase in E-PBS-Puffer)
- Substratpuffer(4,8 M Na-Acetat, 0,24M Citronensäure, 0,2%H₂O₂)
- HRP-Substratlösung (500µl Substratpuffer, 500µl 0,2% H₂O₂, 500µl 0,5% TMB, mit H₂O auf 25 ml auffüllen)
- 2M H₂SO₄
- Waschpuffer (0,5% NaCl; 0,02 % Tween20 in H₂O)

3.2.6.2 Durchführung

Die Versuche wurden auf 48-Well Platten mit einer Zellzahl von 1×10^5 Zellen/Well (MA-10) durchgeführt. Nachdem die Zellen 24h nach Aussaat ruhten, wurde ein Medienwechsel durchgeführt, wobei das Medium entweder Serum enthielt oder serumfrei war. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Medium abgezogen und die Zellen mit PBS gespült.

Zur Stimulation wurden die Zellen in 150 µl LSS/Well in An- oder Abwesenheit (Kontrolle) von ANP, bzw. SNP für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde

durch Zugabe von 500µl absolutem Ethanol (-20°C) gestoppt. Nach 30 min wurden 600µl des Überstandes abgezogen, bei 2000g für 10 min zentrifugiert und wiederum 500µl abgezogen. Die gewonnenen Proben wurden evaporiert, in 300µl LSS/H₂O (3:2) rehydriert und im ELISA eingesetzt. Alle Versuche wurden in Doppelansätzen durchgeführt. Die Abbildungen repräsentieren vier voneinander unabhängige Versuche in Form von Mittelwert +/- Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte durch das Programm GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, Ca) mittels t-Test. Das Quantil der maximal zulässigen geschätzten Irrtumswahrscheinlichkeit α betrug 0,05.

Im Folgenden ist der weitere Ablauf schematisch dargestellt:

- Wells mit jeweils 375µl E-PBS füllen, 2Min stehen lassen, vollständig entleeren.
- Pipettieren von 50µl Probe bzw. Standard, 50µl cGMP-Biotin und 100µl cGMP-Antiserum
- Inkubation bei 4°C über Nacht (18-24h) im Dunkeln
- Wells durch Ausklopfen vollständig entleeren
- Zugabe von 200µl HRP-Streptavidin-Lösung
- Inkubation bei 4°C für 30 Minuten im Dunkeln
- Wells viermal für eine Minute mit je 375µl kaltem Waschpuffer spülen, vollständig entleeren, anschließend 3-5 Minuten temperieren lassen.
- Zugabe von 250µl HRP-Substratlösung
- Inkubation bei Raumtemperatur für 40 Minuten, Dunkelheit
- Abstoppen der Reaktion durch Zugaben von 50µl 2M H₂SO₄
- Auslesen des ELISAs bei 450nm im Photometer Dynex Revelation, die Auswertung der Daten erfolgte mit der dazugehörigen Software.

3.2.7 Progesteron-Elisa

3.2.7.1 Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen:

- PBS (0,136M NaCl; 0,05M Na₂HPO₄; mit HCl pH 7,4 eingestellt)
- Lockes Salzlösung (LSS) (154mM NaCl, 5,6mM KCl, 2,2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 6mM NaHCO₃, 10mM Glucose, 2mM HEPES in Aqua dest.)
- Ethanol absolut
- Immuno-Module, i.e. mit Goat-Anti-Rabbit IgG beschichtete Microwells (NUNC 469949), in dazu passendem Rahmen (NUNC 460348) mit Deckel (NUNC 263339)
- E-PBS-Puffer (0,1M Na₂PO₄, 0,15M NaCl, 0,005M EDTA, 0,2% BSA, 0,01% Thimerosal. pH 7,0)
- E-NAP-Puffer (0,2M Natriumacetat, 0,9% NaCl, 0,2% BSA, 0,01% Thimerosal. pH 4,0)
- Progesteron-Antiserum (1:90000 in E-NAP-Puffer, 0,0005% Metanilgelb)
- Progesteron-Biotin (20 fmol/ml in E-NAP-Puffer, 0,0005% Bromphenolblau)
- Progesteron-Standards (34,02pmol/ml, 11,34pmol/ml, 3,78pmol/ml, 1,26pmol/ml, 0,42pmol/ml, 0,14pmol/ml in LSS bzw. verwendete Probenmatrix)
- HRP-Streptavidin-Lösung (150ng/ml Streptavidin-gekoppelte Meerrettichperoxidase in E-PBS-Puffer)
- Substratpuffer(4,8 M Na-Acetat, 0,24M Citronensäure, 0,2%H₂O₂)
- HRP-Substratlösung (500µl Substratpuffer, 500µl 0,2% H₂O₂, 500µl 0,5% TMB, mit H₂O auf 25 ml auffüllen)
- 2M H₂SO₄
- Waschpuffer (0,5% NaCl; 0,02 % Tween20 in H₂O)

3.2.7.2 Durchführung

Die Versuche wurden auf 48-Well Platten durchgeführt mit 1x10⁵ Zellen/Well MA-10).

Nachdem die Zellen 24h nach Aussaat ruhten, wurde ein Medienwechsel durchgeführt, wobei das Medium entweder serumhaltig oder serumfrei war. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Medium abgezogen, die Zellen mit PBS gespült.

Zur Stimulation wurden die Zellen in 150 μ l LSS/Well mit oder ohne (Kontrolle) β -hCG (10nM) für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde nach 30 min durch Zugabe von 500 μ l absolutem Ethanol (-20°C) gestoppt, 600 μ l des Überstandes abgezogen, bei 2000g für 10 min zentrifugiert (4°C) und wiederum 500 μ l des Überstandes entnommen. Die gewonnenen Proben wurden evaporiert, mit LSS/H₂O (3:2) in 300 μ l rehydriert und im ELISA eingesetzt. Alle Versuche wurden in Doppelansätzen durchgeführt. Die Abbildungen repräsentieren vier voneinander unabhängige Versuche in Form von Mittelwert +/- Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte durch das Programm GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, Ca) mittels t-Test. Das Quantil der maximal zulässigen geschätzten Irrtumswahrscheinlichkeit α betrug 0,05.

Im Folgenden ist der weitere Ablauf schematisch dargestellt:

- Wells mit jeweils 375 μ l E-NAP-Puffer füllen, 2Min stehen lassen, vollständig entleeren.
- Pipettieren von 50 μ l Probe bzw. Standard, 50 μ l Progesteron-Biotin und 100 μ l Progesteron-Antiserum
- Inkubation bei 4°C über Nacht (18-24h) im Dunkeln
- Wells durch Ausklopfen vollständig entleeren
- Zugabe von 200 μ l HRP-Streptavidin-Lösung
- Inkubation bei 4°C für 30 Minuten im Dunkeln
- Wells viermal für eine Minute mit je 375 μ l kaltem Waschpuffer spülen, vollständig entleeren, anschließend 3-5 Minuten temperieren lassen.
- Zugabe von 250 μ l HRP-Substratlösung
- Inkubation bei Raumtemperatur für 40 Minuten, Dunkelheit
- Abstoppen der Reaktion durch Zugaben von 50 μ l 2M H₂SO₄
- Auslesen des ELISAs bei 450nm im Photometer Dynex Revelation, die Auswertung der Daten erfolgte mit der dazugehörigen Software.

4 Ergebnisse

4.1 Immunhistochemische Untersuchungen des NO/cGMP-Signalweges in Keimzelltumoren des menschlichen Hodens

Keimzelltumore, also Gewebe mit veränderter Teilungs- und Differenzierungsaktivität, wurden auf die Expression von NO-Synthasen, der löslichen Guanylatzyklase sowie der cGMP-abhängigen Proteinkinase I untersucht.

4.1.1 Seminome:

Seminome besaßen für keine der untersuchten Proteine eine Immunreaktivität (s. Tabelle 2 und Abbildung 11). Lediglich in eingewanderten Makrophagen konnte eine vereinzelte iNOS Immunreaktivität nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

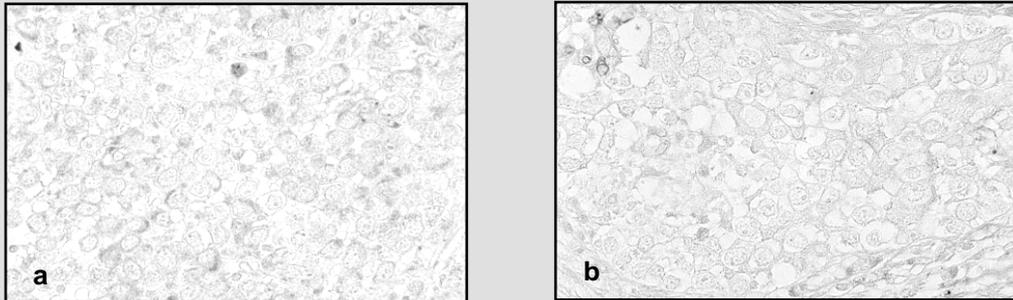
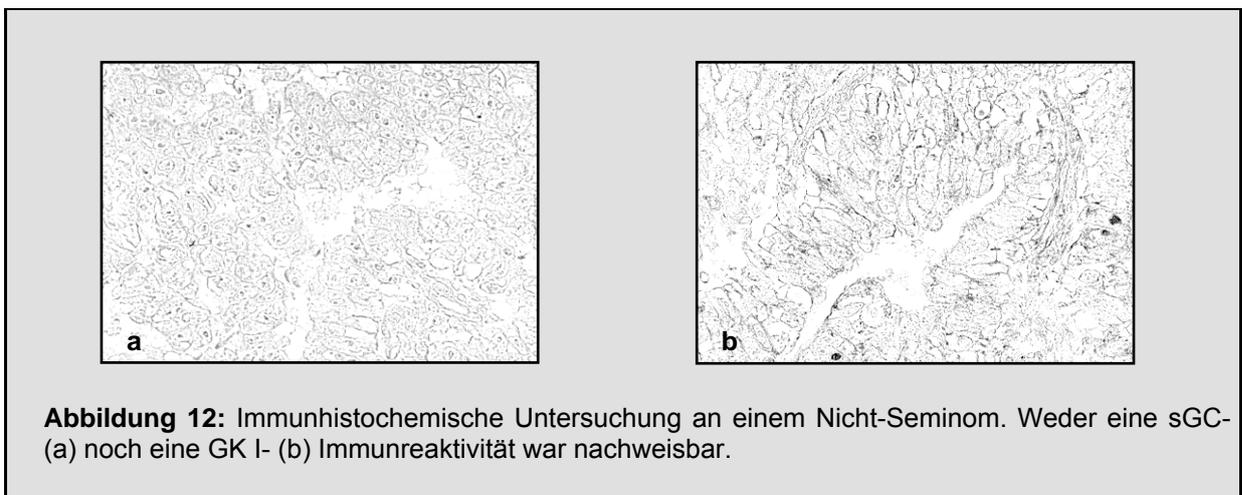


Abbildung 11: Immunhistochemische Untersuchungen an einem Seminom. Weder eine GK I- (a) noch eine eNOS-(b) Immunreaktivität war nachweisbar.

4.1.2 Nicht-Seminome

Zu dieser Gruppe zählen das Embryonale Karzinom, der Dottersacktumor, das Chorionkarzinom und neben Mischformen der nach dem Seminom zweithäufigste Keimzelltumor, das Teratom.

Keines der untersuchten Karzinome oder Dottersacktumore zeigte eine Immunreaktivität für die von uns untersuchten Komponenten des NO/cGMP-Signalweges (s. Tabelle 2 und Abbildung 12).



4.1.3 Teratome

Diese Gruppe der Keimzelltumore zeigte regelmäßig eine starke Immunreaktivität für Komponenten des NO/cGMP-Signalweges, jedoch ausschließlich in den differenzierten, tumorösen Anteilen. So fand sich eine Immunreaktivität für eNOS, nNOS, sGC sowie die GK I.

Diese finden sich vornehmlich in Tumoranteilen, welche Knorpel bilden, sowie in epithelialen Tumoranteilen, insbesondere verhornendes und nicht-verhornendes mehrschichtiges Plattenepithel sowie in muskelähnlichen Zellverbänden (Abbildung 13-Abbildung 16).

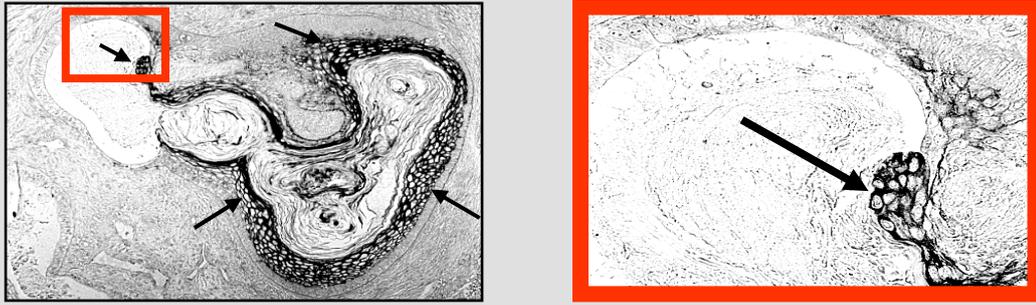


Abbildung 13: Immunhistochemische Untersuchungen an einem Teratom mit einem sGC-spezifischen Antikörper (a+b), b zeigt einem Ausschnitt aus a (s. Kasten). Die Tumorzellen bilden einen Zellverband aus mehrschichtig verhornendem Plattenepithel mit ausgeprägter sGC-Immunreaktivität (Pfeile).

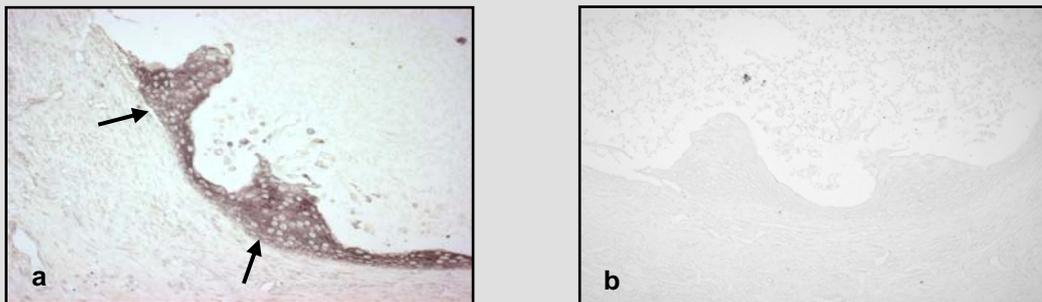


Abbildung 14: Immunhistochemische Untersuchungen an einem Teratom mit einem nNOS-spezifischen Antikörper (a), b zeigt die Kontrollinkubation ohne Antikörper. Die immunpositiven Tumorzellen bilden ein mehrschichtiges, nicht-verhornendes Plattenepithel (Pfeile).

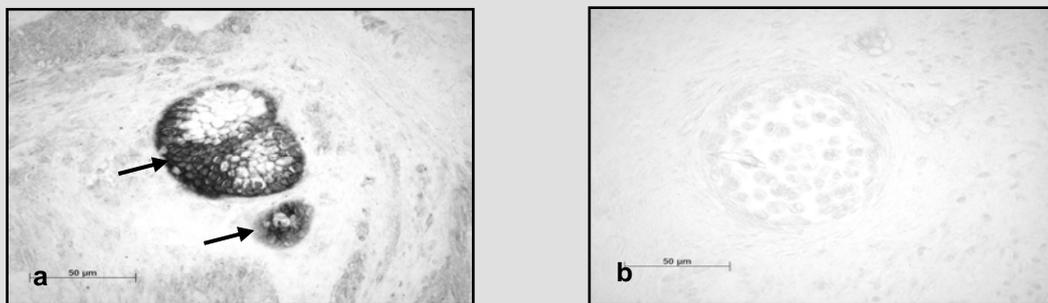


Abbildung 15: Immunhistochemische Untersuchungen an einem Teratom mit einem GK I-spezifischen Antikörper (a), b zeigt die Kontrollinkubation ohne Antikörper. Die immunpositiven Tumorzellen bilden Knorpelinseln (Pfeile).

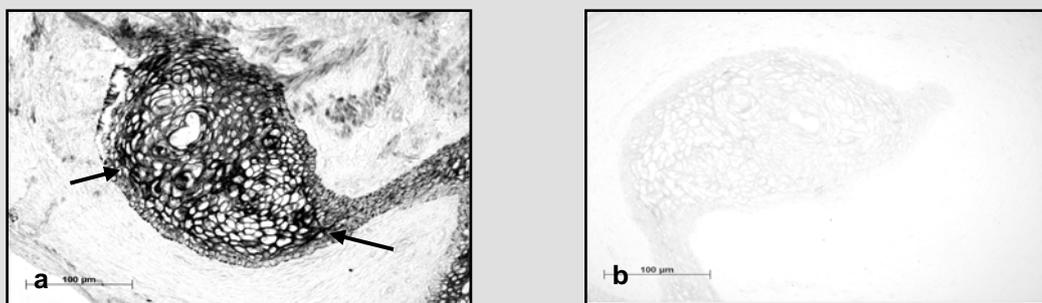


Abbildung 16: Immunhistochemische Untersuchungen an einem Teratom mit einem eNOS-spezifischen Antikörper (a), b zeigt die Kontrollinkubation ohne Antikörper. Die immunpositiven Tumorzellen bilden Knorpelinseln (Pfeile).

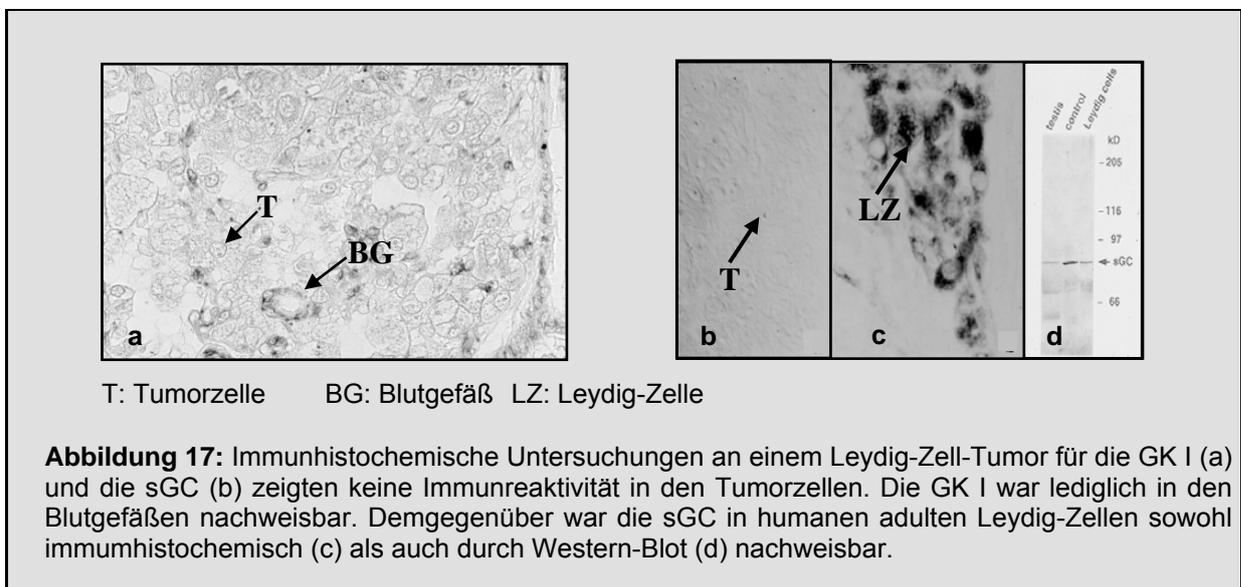
Die undifferenzierten Anteile der Teratome zeigten ebenso wie die anderen Typen der Nicht-Seminome und die Seminome keine Immunreaktivität auf Komponenten des NO/cGMP-Signalweges (Abbildung 13-Abbildung 16).

4.1.4 Stromatumoren

Zu den Stromatumoren zählen neben den Leydig-Zell-Tumoren noch die äußerst seltenen Granulosazelltumore und Sertoli-Zell-Tumore. In dieser Arbeit wurden die Leydig-Zell-Tumore berücksichtigt, welche den größten Anteil an den Stromatumoren besitzen.

Die Zellen der untersuchten Leydig-Zell-Tumore besaßen keine Immunreaktivität für die untersuchten Komponenten des NO/cGMP-Signalweges (Abbildung 17a+b).

Im Gegensatz zu den Leydig-Tumorzellen zeigten menschliche adulte Leydig-Zellen regelmäßig eine Immunreaktivität für den NO Rezeptor, die lösliche Guanylatzyklase (Abbildung 17c+d).



4.1.5 Zusammenfassung der immunhistochemischen Untersuchung an Biopsaten menschlicher Hodentumoren

Nachfolgend sind die Ergebnisse tabellarisch aufgeführt.

	eNOS	nNOS	iNOS	sGC	GKI I
Seminom	-	-	-	-	-
Teratom unreif	-	-	-	-	-
Teratom reif	+	+	-	+	+
Nicht-Seminom*	-	-	-	-	-
Leydig-Zell-Tumor	-	-	-	-	-

***außer Teratom**

+: Immunreaktivität vorhanden **-: Keine Immunreaktivität detektierbar**

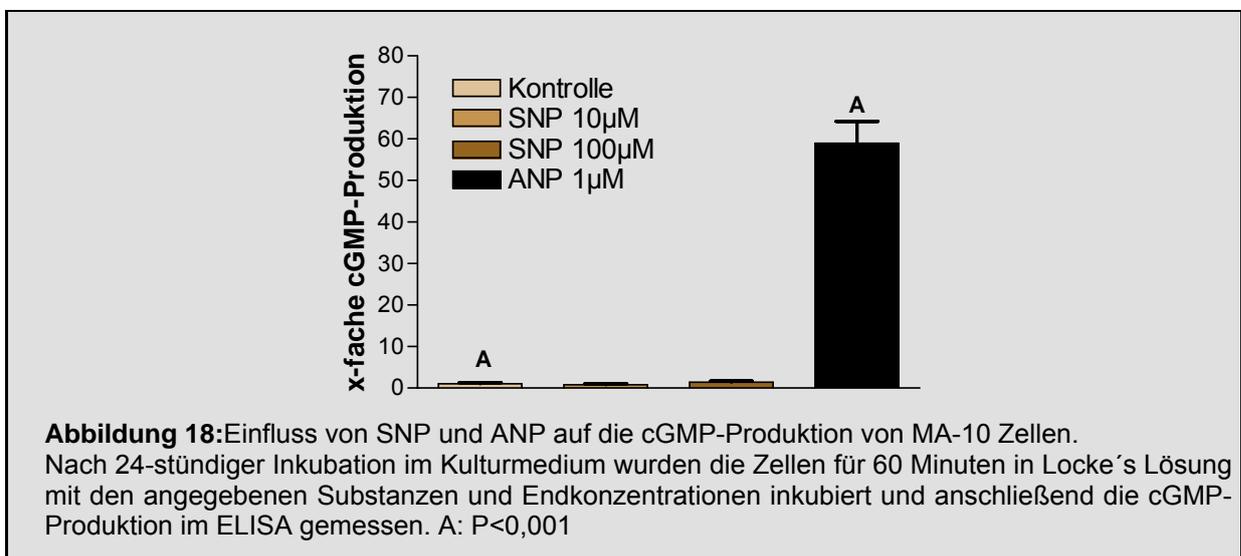
Tabelle 2: Zusammenfassung der immunhistochemischen Untersuchungen des NO/cGMP-Signalweges an Biopsaten humaner Hodentumoren.

4.2 Der NO/cGMP-Signalweg in MA-10 Zellen

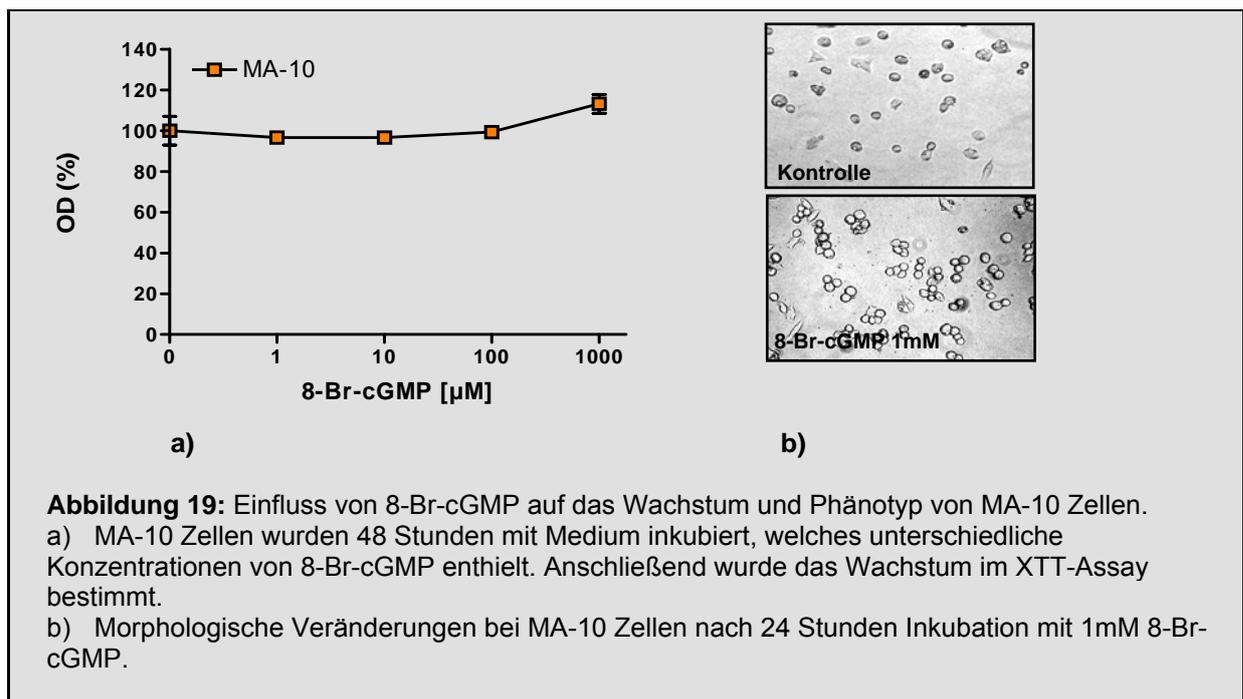
Zur näheren Charakterisierung des NO/cGMP-Signalweges in Zusammenhang von Zellteilung und –differenzierung wurden MA-10 Leydig-Tumorzellen untersucht. Initial wurde die NO-abhängige cGMP-Produktion überprüft. Hierfür wurden die Zellen 60 Minuten mit unterschiedlichen Endkonzentrationen SNP in LSS, welches 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), einen unspezifischen Phosphodiesterase-Hemmer, enthielt, inkubiert und die cGMP Produktion anschließend im ELISA gemessen (Abbildung 18). Als Kontrolle diente eine 60 minütige Inkubation in LSS+IBMX, bzw. 1µM ANP+IBMX. Des Weiteren wurden MA-10 Zellen 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von 8-Br-cGMP inkubiert und die Zellzahl mittels XTT-Assay bestimmt (Abbildung 19).

4.2.1 Einfluss von cGMP auf das Wachstum von MA-10 Zellen

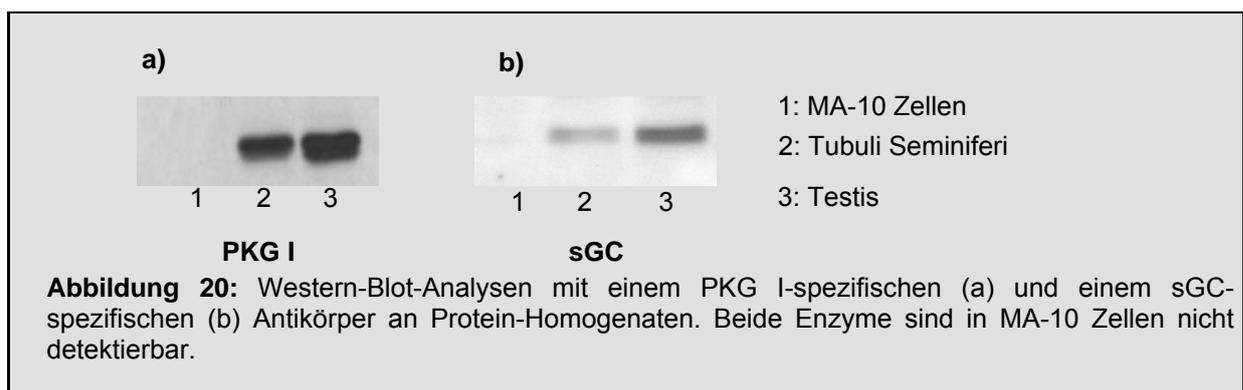
Aus Abbildung 18 wird ersichtlich, dass die MA-10 Zellen unter NO-Einfluss keine wesentlichen Mengen an cGMP produzieren, was darauf hindeutet, dass sie den NO Rezeptor, die lösliche Guanylatzyklase nicht exprimieren. In Analogie zeigten MA-10 Zellen in Western-Blot-Untersuchungen keine Immunreaktivität für den NO-Rezeptor, die sGC (Abbildung 20b). Trotzdem sind die MA-10 Zellen zur ANP-induzierten cGMP-Produktion befähigt (Abbildung 18).



In niedrigen Konzentrationen ($<100\mu\text{M}$) besaß 8-Br-cGMP keinen Einfluß auf das Wachstum der Zellen, jedoch beobachteten wir regelmäßig bei hohen 8-Br-cGMP Konzentrationen ($\geq 1\text{mM}$) eine Steigerung der Zellteilung (Abbildung 19a), welche von Veränderungen der Zellmorphologie begleitet wurde (Abbildung 19b). Die so behandelten Zellen waren sphärisch, lagen traubenförmig in Nestern zusammen und zeigten eine deutlich geringere Neigung zur Konfluenz als die unbehandelten Zellen.



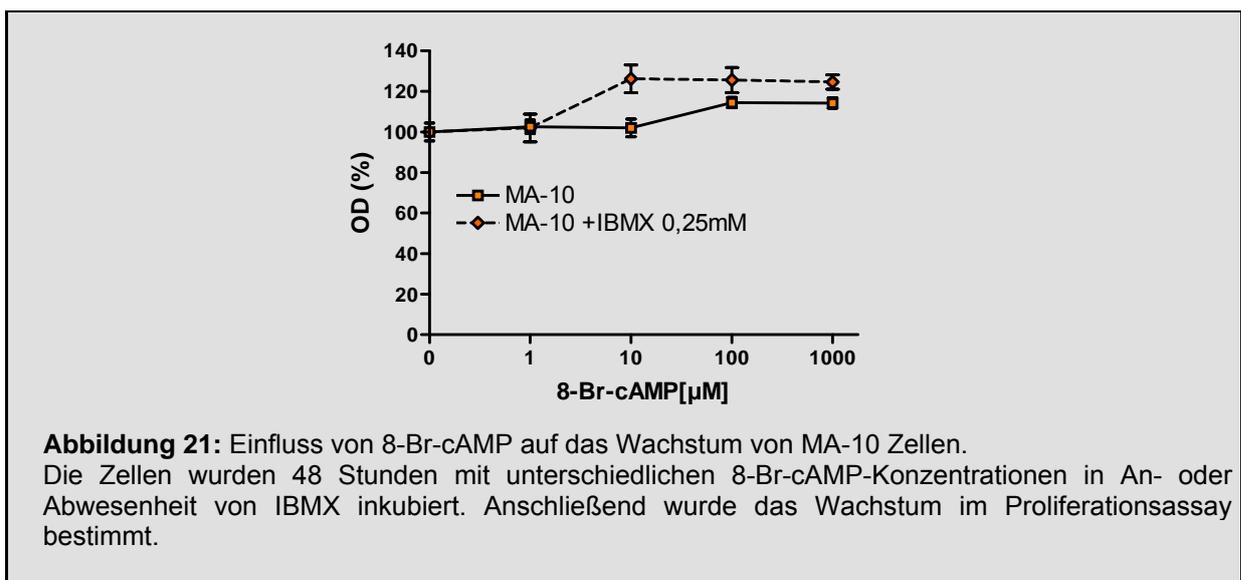
Interessanterweise zeigen Western-Blot-Analysen, dass in MA-10 Zellen die cGMP-abhängige Proteinkinase I (PKG I) nicht detektierbar ist (Abbildung 20), das Enzym, welches die meisten bisher beschriebenen cGMP-abhängigen Effekte auf Wachstum und Differenzierung vermittelt (s. Kap. 2.4.3).



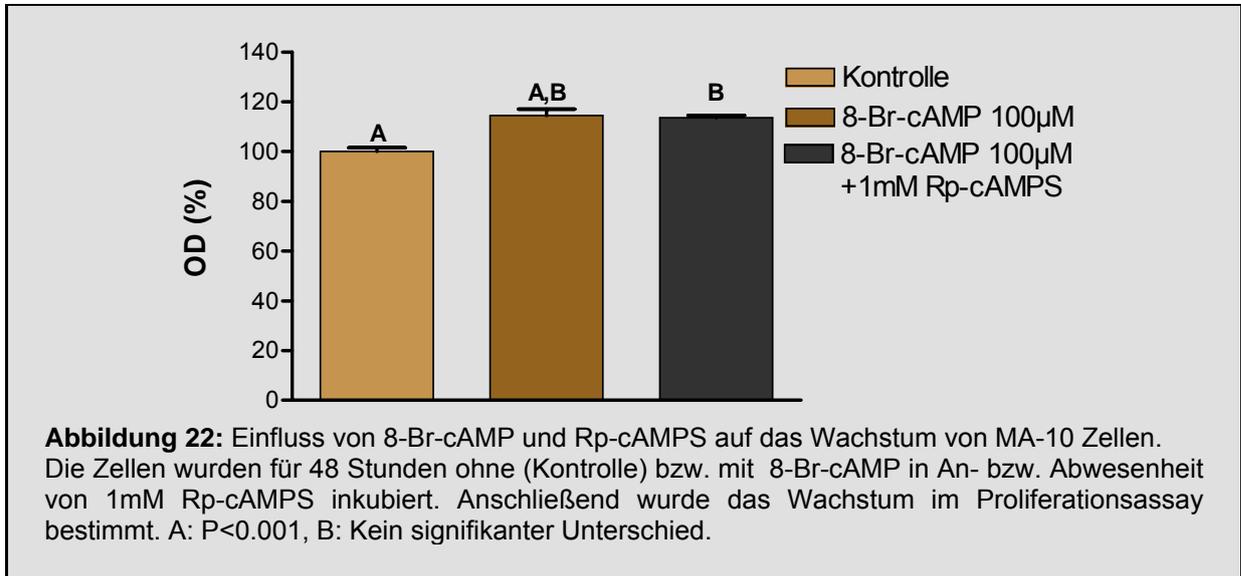
4.2.2 Der wachstumsfördernde Effekt von 8-Br-cGMP auf MA-10 Zellen beruht am ehesten auf einem cGMP-/cAMP- Crosstalk

Hohe cGMP-Konzentrationen können ob der Strukturähnlichkeit der zyklischen Nukleotide zu einer Queraktivierung von cAMP-Signalwegen führen (Schumacher et al. 1992). Um zu zeigen, dass es sich bei dem beobachteten proliferationssteigernden 8-Br-cGMP-Effekt um einen solchen Crosstalk beider Signalwege handeln kann, wurden verschiedene Konzentrationen an 8-Br-cAMP in unserem Proliferationsassay eingesetzt. Zusätzlich wurden die Versuche unter der Zugabe von IBMX, bzw. Rp-cAMPS, einem spezifischen PKA-Inhibitor, durchgeführt (Abbildung 21, Abbildung 22).

Schon bei Konzentrationen von $100\mu\text{M}$ besaß 8-Br-cAMP eine proliferationssteigernde Wirkung auf die MA-10 Zellen, bei Koinkubation mit IBMX, einem unspezifischen Phosphodiesterasehemmer konnten bereits $10\mu\text{M}$ 8-Br-cAMP eine Wachstumssteigerung bewirken, welche regelmäßig durch identische morphologische Veränderungen begleitet wurde (nicht gezeigt), wie wir sie bei hohen 8-Br-cGMP beobachteten (s. Abbildung 19 b).



Dieser Effekt war jedoch durch die Zugabe von 1mM Rp-cAMPS, einem PKA-Inhibitor, nicht antagonisierbar (Abbildung 22), was auf einen PKA-unabhängigen Signalweg schließen lässt.



4.2.3 Einfluss von NO auf das Wachstum von MA-10 Zellen

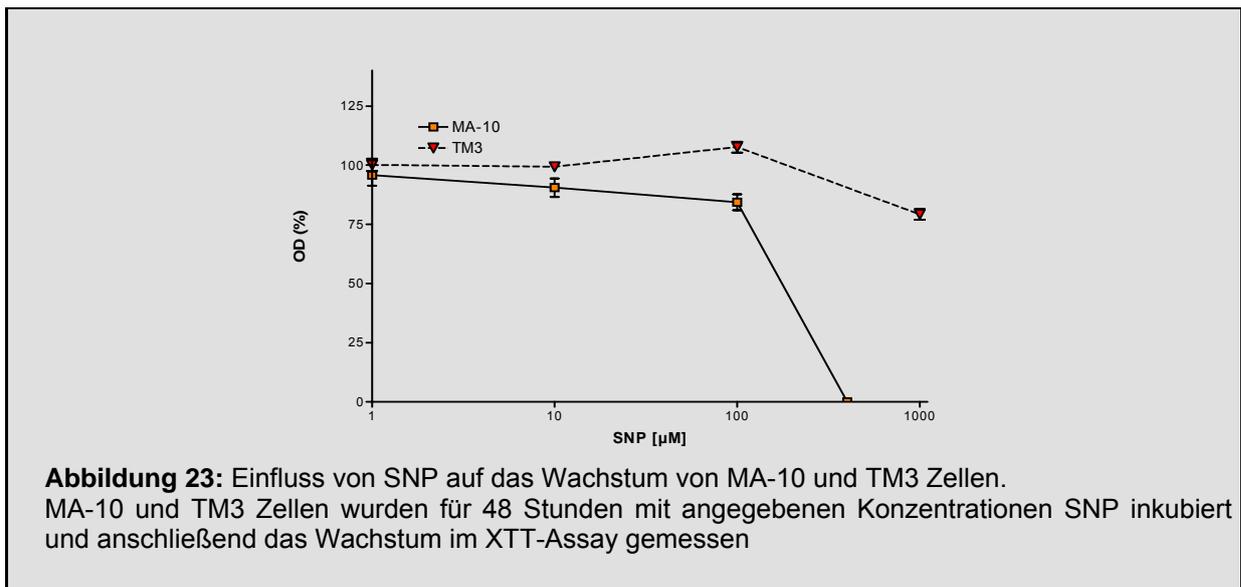
Zur Untersuchung von NO-Effekten auf das Wachstum von MA-10 Zellen, die ja bei fehlender sGC (s.o.) als cGMP-unabhängig charakterisiert werden können, wurden diese für 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von SNP, einem NO-Donor, inkubiert und das Wachstum im XTT-Assay bestimmt (Abbildung 23).

Eine 48-stündige SNP-Exposition der MA-10 Zellen in serumhaltigen Vollmedium führte konzentrationsabhängig zu einer deutlich verminderten Zellzahl bis hin zum völligen Zellverlust. Während im Trypan-Blau-Exklusions-Test bei SNP-Konzentrationen $\leq 100 \mu\text{M}$ keine vermehrten avitalen Zellen nachweisbar waren, fanden sich bei lichtmikroskopischen Untersuchungen bei Konzentrationen $> 100 \mu\text{M}$ vermehrt avitale Zellen mit kondensierten Zellkernen. Bei einer Konzentration von $\geq 400 \mu\text{M}$ SNP im Medium waren nach 48 Stunden praktisch keine vitalen Zellen mehr nachweisbar. Dies lässt auf einen antiproliferativen Effekt bei niedrigen, auf einen apoptotischen Effekt bei hohen SNP-Konzentrationen schließen.

Dass SNP nicht grundsätzlich auf Leydig-Zellen toxisch wirkt, zeigen die Untersuchungen an TM3-Zellen, einer weiteren Leydig-Zelllinie (Abbildung 23).

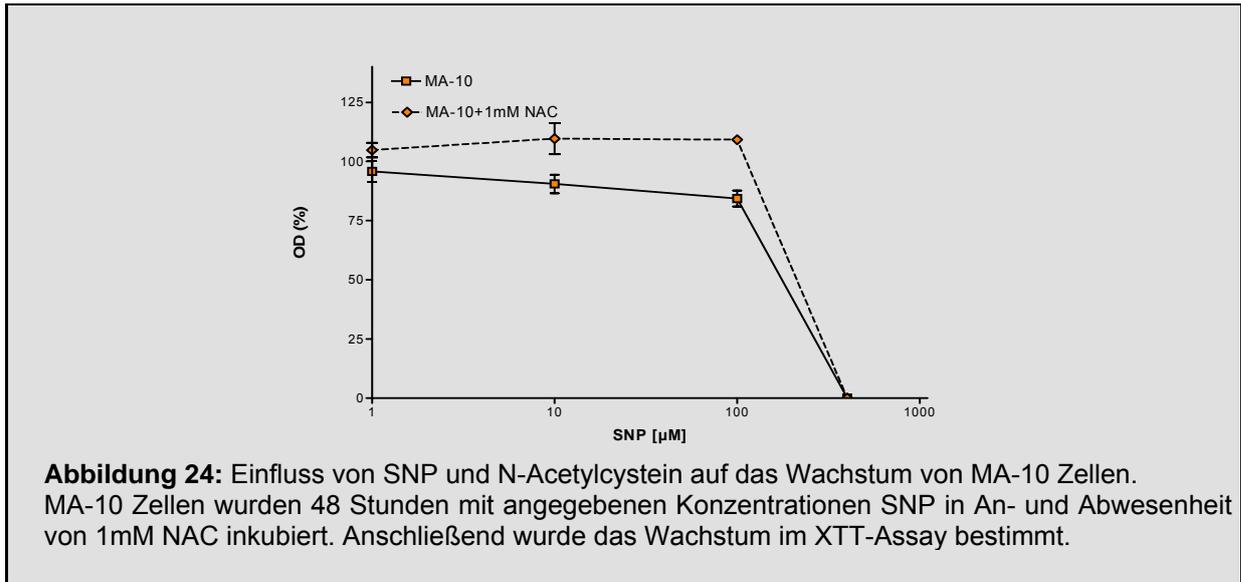
Diese zeigten sich nach 48 Stunden resistenter gegenüber SNP als MA-10 Zellen.

Bei SNP-Konzentrationen von 10 bis 100 μM beschleunigten die TM3 Zellen sogar ihr Wachstum. Erst Hohe Konzentrationen ($>100\mu\text{M}$ SNP) führten zu einem Zelluntergang, der weitaus milder war als bei MA-10 Zellen.



Eine Koinkubation mit N-Acetylcystein (NAC), einem NO-Scavenger und potentem Antioxidans, konnte den antiproliferativen Effekt von SNP in niedrigen Konzentrationen $<100\mu\text{M}$ effektiv antagonisieren (Abbildung 24), beeinflusste jedoch nicht den zytotoxischen Effekt bei hohen SNP-Konzentrationen $>100\mu\text{M}$.

Somit besitzt SNP einen NO-spezifischen und NO-unabhängigen Effekt auf das Wachstum von MA-10 Zellen, wobei letzterer am ehesten über den Eisenanteil von SNP vermittelt ist, wie Experimente mit dem Chelatbildner Deferoxamin nahe legen (nicht gezeigt).



4.2.4 NO hemmt die Vitamin C-induzierte H_2O_2 -Produktion in MA-10 Zellen

Um den Einfluss von Stickstoffmonoxid auf den Redox-Status der MA-10 Zellen näher zu charakterisieren, wurde dem Medium 1mM Ascorbinsäure hinzu gegeben, welches in der Lage ist, S-nitrosylierte Bindungen in vitro zu reduzieren (Jaffrey et al. 2001). Eine 48-stündige Vitamin C-Exposition führte zu einem massiven Zelluntergang der MA-10 Zellen (Abbildung 25). Dieser zytotoxische Effekt von Vitamin C ist Wasserstoffperoxid-vermittelt, da eine Koinkubation mit Catalase, dem physiologischen Inaktivator von Wasserstoffperoxid, den Effekt von Vitamin C auf das Zellwachstum nahezu vollständig aufheben konnte (Abbildung 25). Interessanterweise ist die Zytotoxizität von Vitamin C nicht durch eine vermehrte Bildung von Hydroxyl-Ionen bedingt, da eine Koinkubation mit Dimethylsulfoxid (DMSO), einem potenten Hydroxyl-Ionen Scavenger, die Wirkung von Vitamin C nicht antagonisieren konnte (Abbildung 25).

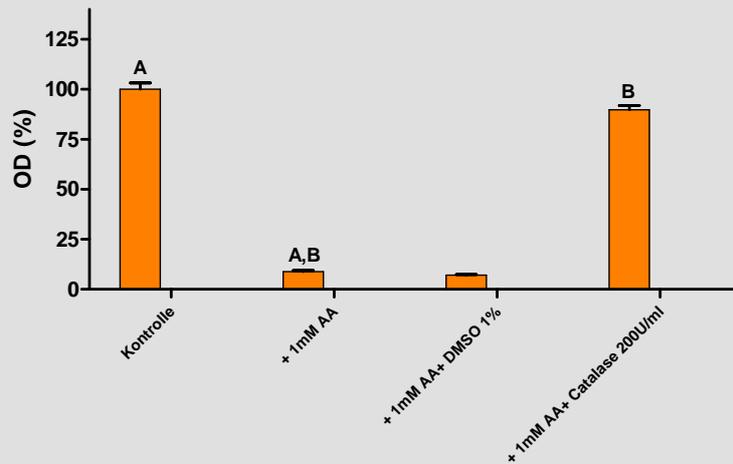


Abbildung 25: Einfluss von Vitamin C auf das Wachstum von MA-10 Zellen. MA-10 Zellen wurden für 48 Stunden mit den entsprechenden Substanzen inkubiert. Anschließend wurde das Wachstum im XTT-Assay bestimmt. A, B: $P < 0,001$

In Analogie führte auch eine Inkubation der MA-10 Zellen mit exogenem H_2O_2 zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Zellzahl (Abbildung 26).

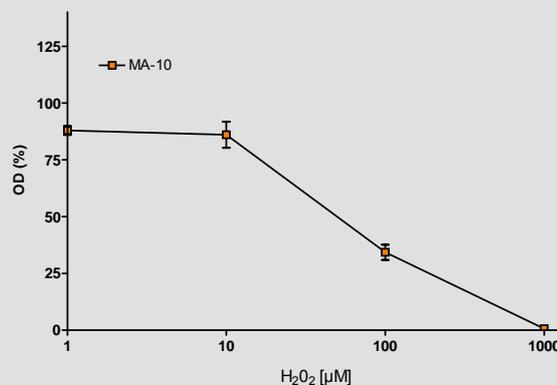
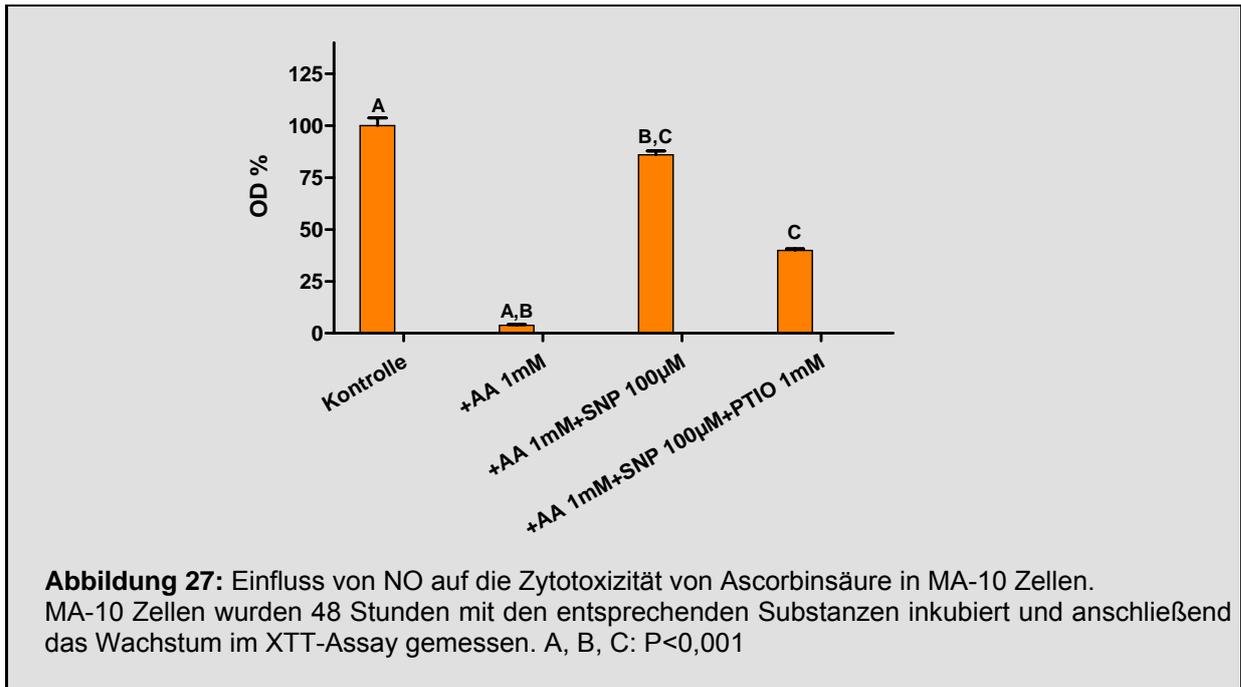


Abbildung 26: Einfluss von exogenem H_2O_2 auf das Wachstum von MA-10 Zellen. MA-10 Zellen wurden 48 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen H_2O_2 inkubiert. Anschließend wurde das Wachstum im XTT-Assay bestimmt.

Erstaunlicherweise war auch der NO Donor SNP, ähnlich wie Catalase, in der Lage, die Wasserstoffperoxid vermittelte Zytotoxizität von Vitamin C zu unterdrücken (Abbildung 27). Eine Koinkubation mit PTIO, einem spezifischen NO-Scavenger, verminderte den zytoprotektiven Effekt von SNP signifikant (Abbildung 27), so dass es sich um einen NO-vermittelten Effekt handeln muss.



4.3 MA-10 Zellen zeigen unter Serumentzug Zeichen stärkerer Differenzierung

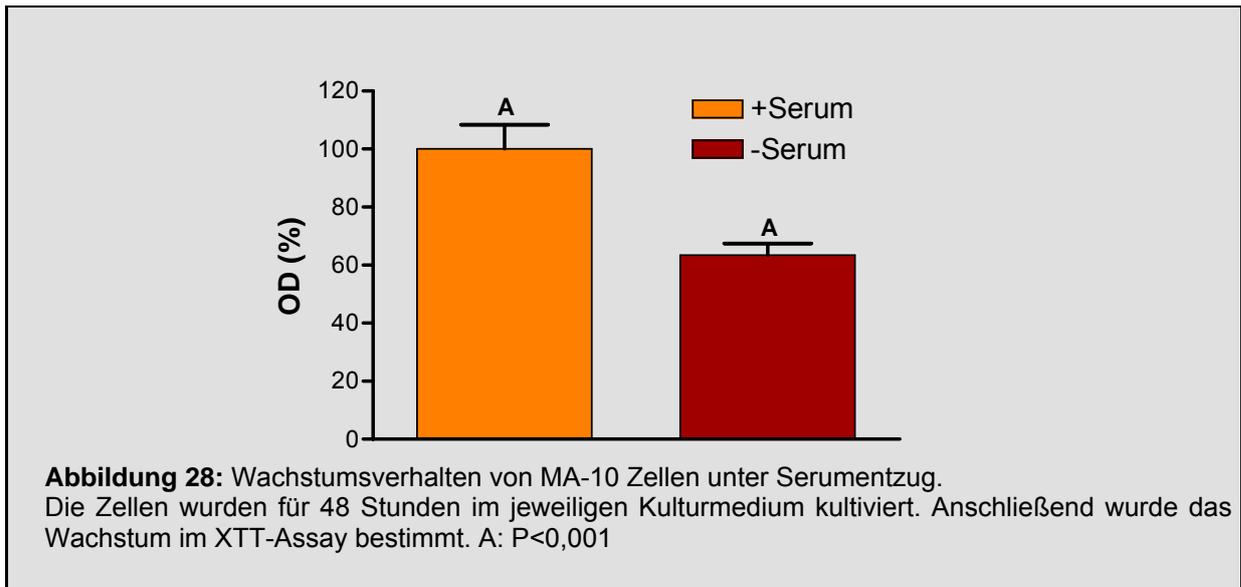
Um den Einfluss von NO auf Wachstum und Differenzierung näher zu charakterisieren, untersuchten wir das Verhalten der MA-10 Zellen unter serumfreien Kulturbedingungen, einem etablierten Differenzierungsmodell (s. Howard et al. 1993, Qi et al. 1997, Ma et al. 1998, Kameshwar-Rao et al.1999). Dabei wurden die MA-10 Zellen zunächst für 24 Stunden ausschließlich in serumhaltigen Medium kultiviert und anschließend ein Mediumwechsel durchgeführt, wobei das Medium kein Pferdeserum (-Serum) bzw. Pferdeserum (+Serum) enthielt.

Als Marker für Differenzierung wurden

1. das Wachstum,
 2. der Phänotyp,
 3. die Expression zellspezifischer Proteine und
 4. die Syntheseleistung
- der Zellen untersucht.

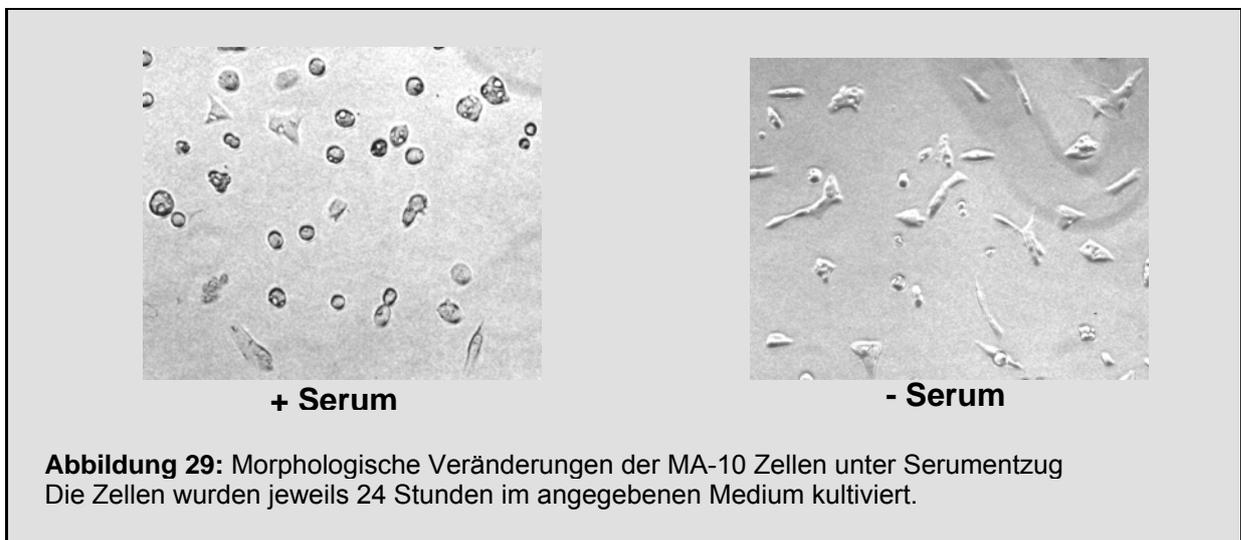
4.3.1 Wachstum

Der XTT-Assay zeigte, dass nach 48 Stunden Kultivierung in serumfreiem Medium signifikant weniger Zellen vorhanden waren, als in der Kontrollgruppe, die weiterhin mit serumhaltigem Medium kultiviert wurde (Abbildung 28). Im Trypan-Blau-Exklusions-Test fanden sich in beiden Gruppen keine nennenswerte Anzahl avitaler Zellen (nicht gezeigt).



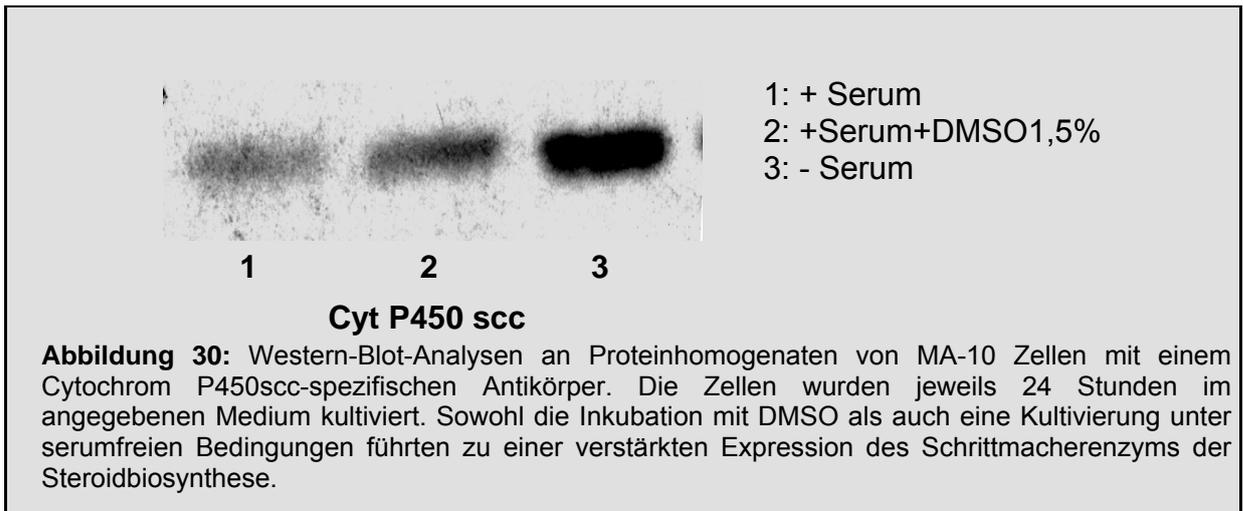
4.3.2 Phänotyp

Die mit Serum kultivierten MA-10 Zellen besaßen eine eher abgerundete, plumpe Form. Unter Serumentzug bildeten die Zellen zarte Fortsätze und zeigten einen elongierten Phänotyp (Abbildung 29).



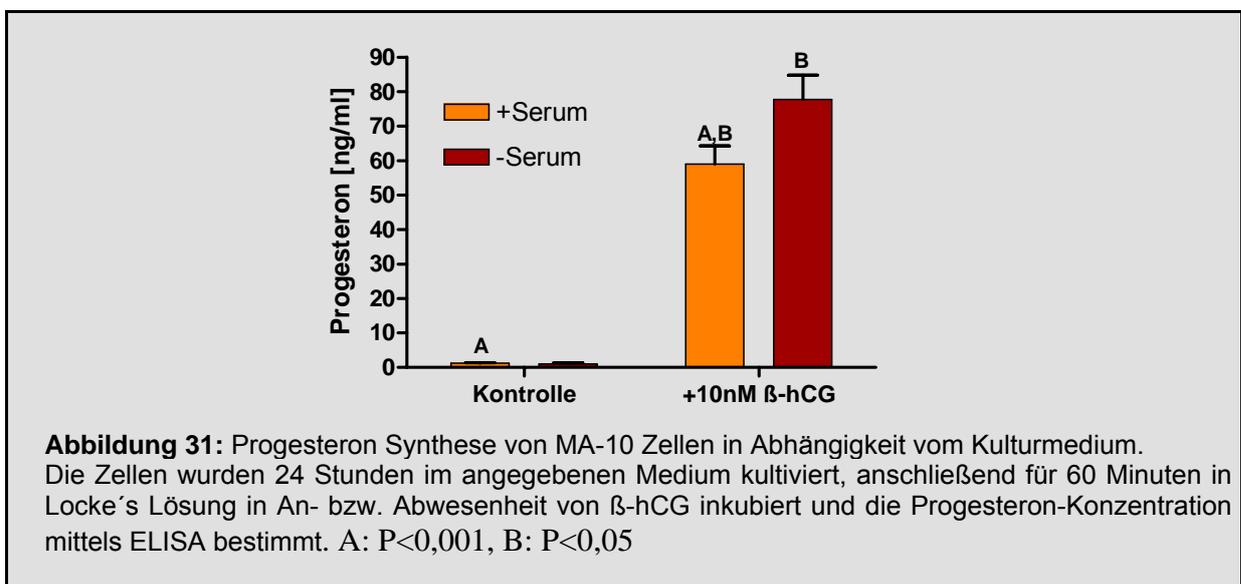
4.3.3 Expression spezifischer Proteine

Western-Blot-Analysen zeigten, dass in den MA-10 Zellen unter Serumentzug der Gehalt an Cytochrom P450_{scc} anstieg (Abbildung 30), das Schrittmacherenzym der Steroidbiosynthese, welches regelmäßig in reifen, adulten Leydig-Zellen vorkommt (s. Abney and Zhai 1998).



4.3.4 Syntheseleistung

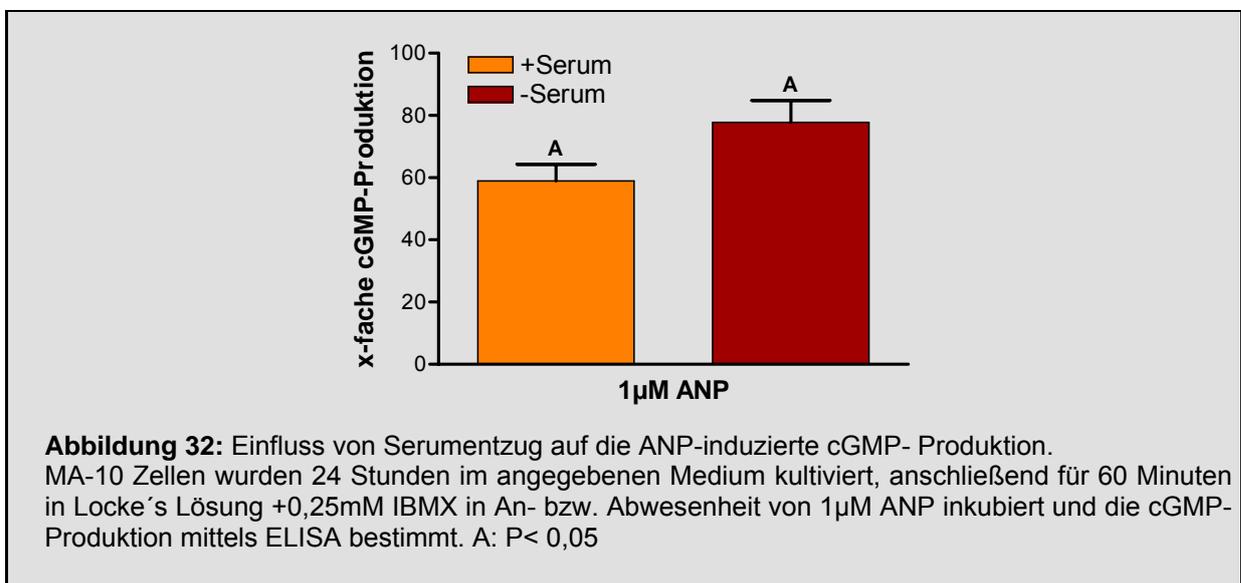
Unter Serumentzug kultivierte Zellen besaßen zwar niedrigere Progesteron-Basalwerte, unter β -hCG-Stimulation produzierten sie aber größere Mengen an Progesteron (Abbildung 31).



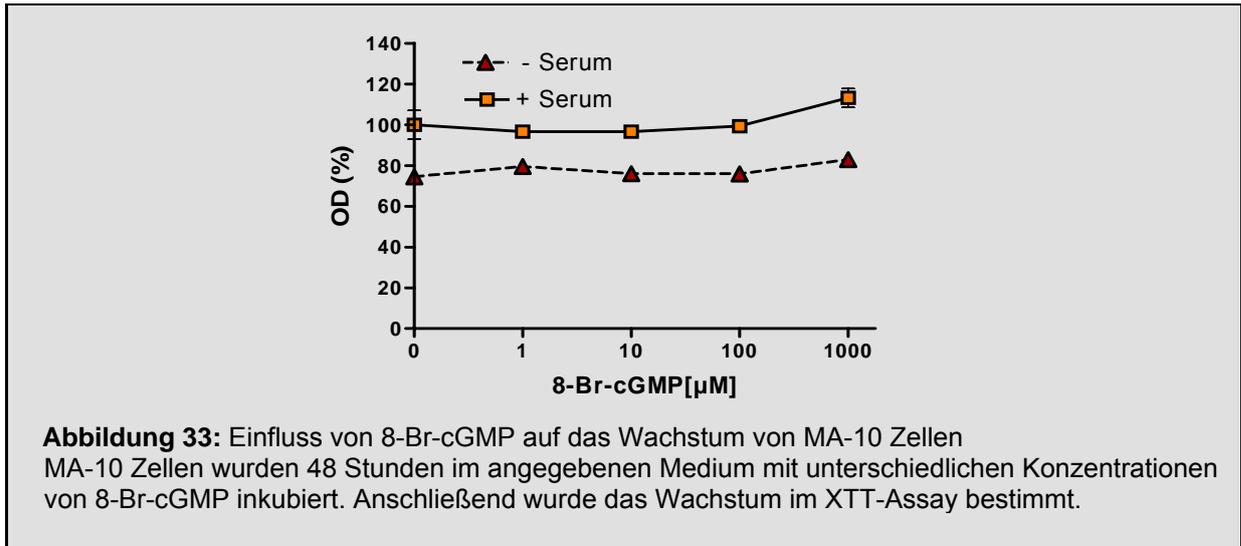
4.4 Verhalten des NO/cGMP-Signalweges unter Differenzierung

4.4.1 Unter Differenzierung steigt in MA-10 Zellen die ANP-induzierte cGMP-Produktion

Um das Verhalten des cGMP-Signalweges in MA-10 Leydig-Tumorzellen unter Differenzierung zu untersuchen, wurden diese 24 Stunden nach Mediumwechsel für 60 Minuten mit $1\mu\text{M}$ ANP+IBMX inkubiert und anschließend die cGMP-Konzentration im Überstand gemessen. Unter Serumentzug stieg die ANP-induzierte cGMP-Produktion signifikant an (Abbildung 32).



Eine NO-abhängige cGMP-Produktion konnten wir jedoch in unserem Modell zu keinem Zeitpunkt nachweisen (s.Kap.4.2). Obwohl der wachstumsfördernde Effekt von 8-Br-cGMP auf die serumfrei kultivierten MA-10 Zellen geringer ausgeprägt war (Abbildung 33), traten in beiden Gruppen identische Veränderungen der Zellmorphologie auf (nicht gezeigt).



4.4.2 Unter Differenzierung hat NO einen fördernden Effekt auf das Wachstum von MA-10 Zellen

Um den Einfluss von NO auf das Wachstum unter Differenzierung zu untersuchen, wurden die MA-10 Zellen für 48 Stunden in serumfreiem Medium, dem unterschiedliche Konzentrationen SNP zugegeben wurden, kultiviert (Abbildung 34).

SNP hatte im Gegensatz zu den undifferenzierten, d.h. mit Serum kultivierten, Zellen in niedrigen Konzentrationen ($\leq 100 \mu\text{M}$) einen fördernden Effekt auf das Wachstum von MA-10 Zellen. In höheren Konzentrationen führte SNP zu massivem Zellverlust.

Da es sich hierbei nach unseren Untersuchungen (s. Kap. 4.2.3) um einen NO-unabhängigen SNP-Effekt handeln muss, wurden im Weiteren lediglich SNP-Konzentrationen $\leq 100 \mu\text{M}$ verwendet.

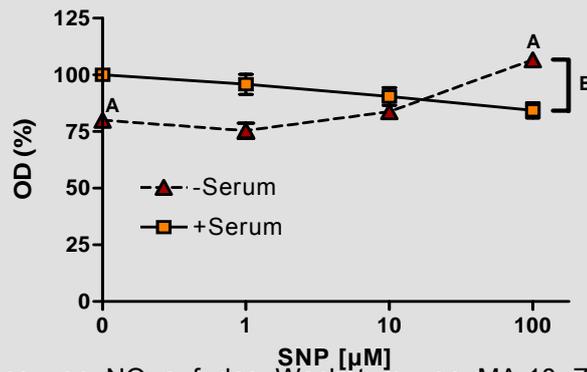


Abbildung 34: Einfluss von NO auf das Wachstum von MA-10 Zellen in Abhängigkeit vom verwendeten Kulturmedium. MA-10 Zellen wurden für 48 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen an SNP im Medium inkubiert, wobei das Medium Serum enthielt, bzw. serumfrei war. Anschließend wurde das Wachstum im XTT-Assay gemessen. A, B: $P < 0.001$

Der SNP-Effekt war in niedrigen Konzentrationen $\leq 100 \mu\text{M}$ durch Zugabe von 1mM N-Acetylcystein effektiv antagonisierbar (Abbildung 35).

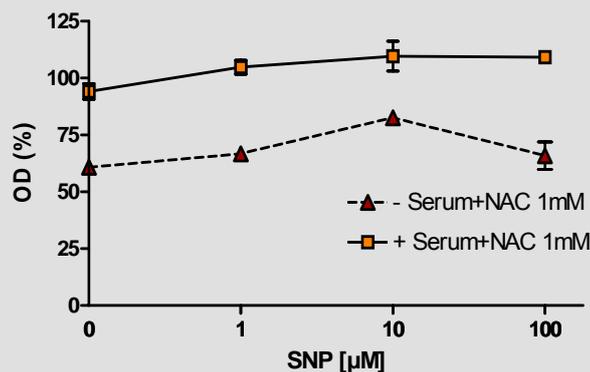
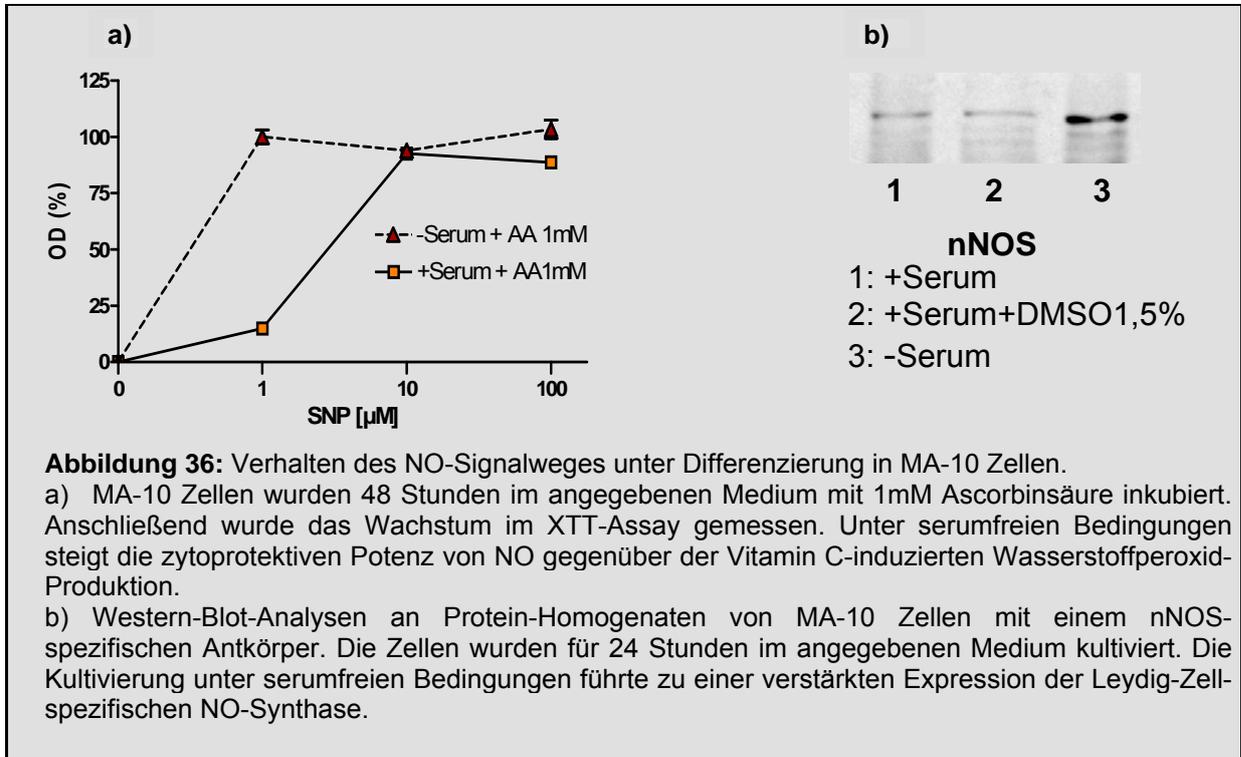


Abbildung 35: Einfluss von N-Acetylcystein (NAC) und SNP auf das Wachstum von MA-10 Zellen
MA-10 Zellen wurden 48 Stunden im angegebenen Medium mit verschiedenen Konzentrationen SNP inkubiert. Anschließend wurde das Wachstum im XTT-Assay gemessen.

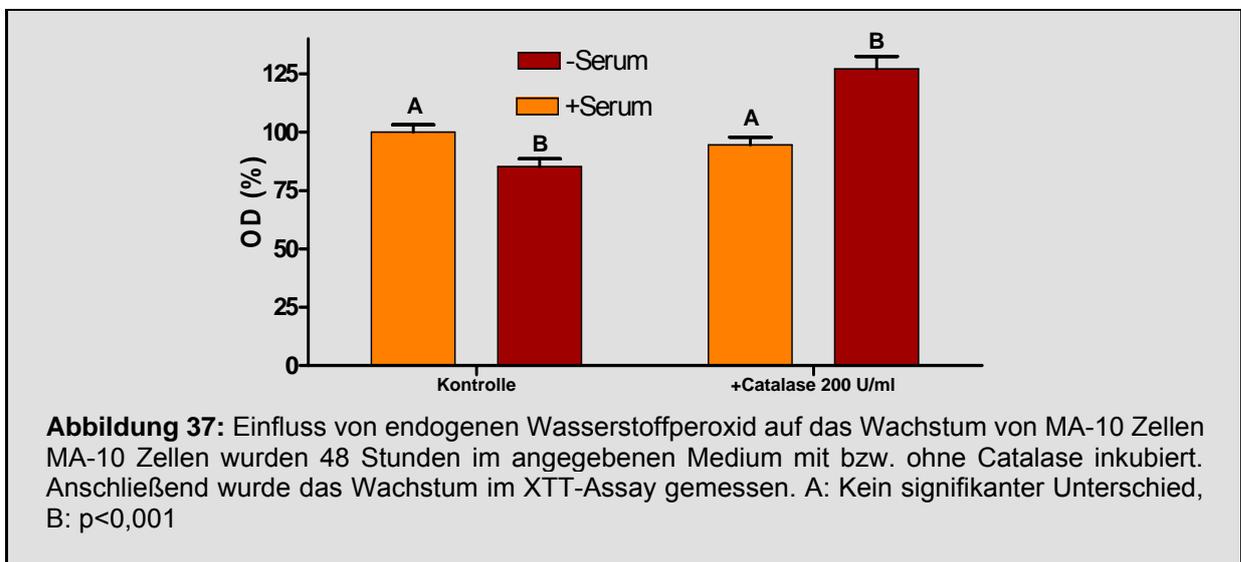
4.4.3 Unter Differenzierung steigt in MA-10 Zellen die zytoprotektive Potenz von NO gegenüber der Vitamin C-induzierten H_2O_2 -Produktion

Unter serumfreien Kulturbedingungen stieg die zytoprotektive Potenz von exogenem NO gegenüber Vitamin C deutlich, d.h. um etwa eine Zehnerpotenz, an (Abbildung 36a). SNP-Konzentrationen von $1 \mu\text{M}$ reichten aus, um die Zytotoxizität von 1mM Vitamin C effektiv zu antagonisieren. In Analogie zeigten Western-Blot-Analysen unter serumfreien Kulturbedingungen eine vermehrte Expression der Leydig-Zell-

spezifischen neuronalen NO-Synthase (Abbildung 36b), was mit der Schaffung eines zytotoxischen Milieus einhergehen dürfte. Bei Zellen, die mittels DMSO differenziert wurden, fehlte die Hochregulation der nNOS (Abbildung 36b).



Die Inkubation mit Catalase führte lediglich bei den serumfrei kultivierten MA-10 Zellen zu einer deutlichen Wachstumssteigerung (Abbildung 37), was für eine besondere Rolle von endogenem Wasserstoffperoxid für das Wachstum von sich differenzierenden Zellen spricht.



5 Diskussion

5.1 Der NO/cGMP-Signalweg im adulten menschlichen Hoden

Der NO/cGMP-Signalweg kommt in den somatischen Zellen des menschlichen adulten Hodens ubiquitär vor und ist in diesen testikulären Zellen hinreichend belegt (s. Middendorff et al. 2000). Über das Vorkommen des NO/cGMP-Signalweges in menschlichen Keimzellen gibt es bislang jedoch nur wenige und teilweise auch widersprüchliche Daten. Da NO via Diffusion in benachbarte Zellen eindringen kann, entfaltet es sowohl autokrine als auch parakrine Wirkung. Die parakrine Wirkung von NO auf den cGMP-Signalweg wurde erstmalig bei der Vasorelaxation beschrieben, wo die vaskulären Endothelzellen via eNOS-Aktivierung und NO Produktion die PKG-abhängige Relaxation der Gefäßmuskelzellen induzieren (s. Ignarro 2002). Aus Tabelle 3 wird ersichtlich, dass im Hoden neben den Gefäßen auch Sertoli-Zellen, Leydig-Zellen sowie Myoidzellen über die Bildung von NO miteinander kommunizieren können und so ein zellpopulationsübergreifendes Netzwerk zur Modulation testikulärer Funktionen bilden. Diesbezüglich besitzt NO einen cGMP-abhängigen Einfluss auf die Kontraktilität testikulärer Gefäße, die Steroidproduktion in Leydig-Zellen (Valenti et al. 1999), moduliert tight junctions der Sertoli-Zellen (Lee et al. 2003) sowie die Kontraktilität der Tunica albuginea (Middendorff et al. 2002) und scheint so auch Einfluss auf die Spermio-genese zu nehmen.

	eNOS	nNOS	iNOS	sGC	GK I
Keimzellen	-	-	-	-	-
Sertoli-Zellen	(+)	(+)	+/-	+	(+)
Lamina propria	+	+	-	+	+
Gefäße					
Endothel	+	-	-	-	-
Myozyten	-	-	-	+	+
Leydig-Zellen	(+)	+	-	+	-

Tabelle 3: Vorkommen von Komponenten des NO/cGMP-Signalweges im humanen adulten Hoden. Erläuterungen s. Text.

Interessanterweise ließen sich in menschlichen Keimzellen während keines Stadiums der Spermatogenese Komponenten des NO/cGMP-Signalweges nachweisen, die reifen Spermatozoen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht, jedoch gibt es mittlerweile Hinweise auf die Expression von Komponenten des NO/cGMP-Signalweges in reifen Spermatozoen, deren Motilität und Akrosomen-Reaktion via cGMP moduliert wird (s. Herrero et al 2003, Borchert 2005). In Hinblick auf den Stellenwert der cGMP-Signalwege in Spermatozoen scheint es jedoch gravierende Spezies-spezifische Unterschiede zu geben. Während beim Rind ein funktionell aktiver cGMP-Ionenkanal nachgewiesen wurde (Wiesner et al. 1998) und cGMP die Motilität beeinflusst (Borchert 2005), scheint der Stellenwert von cGMP im Vergleich zum cAMP-System beim Menschen nur äußerst gering zu sein (Willipinski-Stapelfeldt et al. 2004).

Zini et al. (1996) fanden keine eNOS Immunreaktivität in intakten menschlichen Keimzellen. In degenerierenden oder apoptotischen Keimzellen konnten sie jedoch eine vereinzelte eNOS-Immunreaktivität nachweisen.

Lue et al. (2003) fanden bei ihren Untersuchungen an iNOS-Knockout-Mäusen eine relative und absolute Zunahme an Spermatozyten und unreifen Spermatischen in den Tubuli seminiferi. Die Zellen dieses Stadiums der Spermatogenese zeigten in

Biopsaten weniger spontane Apoptosen und waren resistenter gegenüber Stress-induzierter Apoptose als die Spermatozyten und Spermatiden der Wildtyp-Maus. Dies legt einen Einfluss der iNOS auf die Keimzellteilung und -selektion nahe. In den Serum-Analysen der iNOS-Knockout-Mäuse fanden sich interessanterweise im Vergleich zum Wildtyp keine Unterschiede der mittleren Testosteron- und LH-Konzentrationen, was ein generelles Vorkommen der iNOS, zumindest in Leydig-Zellen der Maus, unwahrscheinlich macht. Fujisawa et al. (2000) zeigten an einem in vitro Rattenmodell, dass ein von Spermatiden gebildeter Faktor die NO-Produktion und iNOS-Expression in Sertoli-Zellen induzieren kann. Durch diese interzelluläre Kommunikation könnten auch die Sertoli-Zellen eine Apoptose der Keimzellen bewirken. Die großen Mengen Stickstoffmonoxids, die von der iNOS produziert werden, sprechen hierbei für eine vorwiegend cGMP-unabhängige NO-Wirkung. Eine Bedeutung der iNOS im humanen adulten Hoden ist jedoch fraglich. So fanden auch Kasahara et al. (2002) keine iNOS Expression in Keimzellen oder Stromazellen von menschlichen Biopsaten. Yuasa et al. (2000) entdeckten im adulten menschlichen Hoden ein Ankerprotein für die cGMP-abhängige Proteinkinase I (GK I), namentlich GKAP-42, welches ausschließlich in Spermatozyten und unreifen Spermatiden exprimiert wurde. Die aus den sich teilenden Spermatozyten II entstehenden Spermatiden haben die Fähigkeit zur Zellteilung verloren und reifen im Verlauf zu motilen Spermatozoen. Durch die zeitliche Restriktion der Expression von GKAP-42 wurde ein Einfluss der GK I auf die Keimzellteilung und -differenzierung diskutiert. Der Beweis einer Ko-Expression der G-Kinase wurde jedoch nicht geführt und gelang auch in eigenen Untersuchungen nicht.

Die Untersuchungen des NO/cGMP-Signalweges am menschlichen, adulten Hoden lieferten die Grundlage für die eigenen Untersuchungen an menschlichen Keimzell- und Stromatumoren.

5.2 Immunhistochemische Untersuchungen des NO/cGMP-Signalweges an menschlichen Biopsaten bösartiger Hodentumore

5.2.1 Keimzelltumore

Während bislang lediglich die iNOS-Expression in menschlichen Keimzelltumoren untersucht wurde (Kasahara et al., 2002), liefert die vorliegende Arbeit erstmalig Hinweise auf das Fehlen des kompletten NO/cGMP-Signalweges in undifferenzierten humanen Keimzelltumoren sowie auf eine Expression bzw. Hochregulation des Signalweges unter Differenzierung und Reifung eines humanen Keimzelltumors in vivo (s. Kap. 4.1.3). Dabei deckt sich die fehlende iNOS-Immunreaktivität der untersuchten Keimzelltumore mit den Ergebnissen von Kasahara et al. . Die Ergebnisse sprechen für einen Einfluss NO/cGMP-Signalweges auf die Differenzierung der Zellen bzw. zumindest auf eine Korrelation von Differenzierungsvorgängen und Expression von Komponenten des NO/cGMP-Signalweges.

Teratome finden mittlerweile auch in der embryonalen Stammzellforschung Beachtung. Die pluripotenten Teratomzellen mit Anteilen aus allen drei Keimblättern können in vitro eine Vielzahl von Geweben bilden. Mit zunehmender Differenzierung verlieren Teratome ihre Malignität. Teratome mit einem Anteil von mehr als 50% an reifen Strukturen werden als benigne eingestuft (s. Gonzales-Crussi 1982).

Auch wenn ein klinischer Einsatz solcher Tumorzellen dem Autor höchst unwahrscheinlich erscheint, sind sie doch ein interessantes Modell zur weiteren Grundlagenforschung, denn anders als embryonale Stammzellen (ES) und embryonale Keimzellen (EG) können Teratomzellen mühelos kultiviert und vermehrt werden.

	eNOS	nNOS	iNOS	sGC	GK I
Seminom	-	-	-	-	-
Teratom unreif	-	-	-	-	-
Teratom reif	+	+	-	+	+
Nicht-Seminom*	-	-	-	-	-
Leydig-Zell-Tumor	-	-	-	-	-

*außer Teratom

Tabelle 4: Zusammenfassung der immunhistochemischen Untersuchungen des NO/cGMP-Signalweges am humanen testikulären Keimzell- und Stromatumoren.

Teratokarzinom-Zelllinien wie F-9 (Maus) oder NT2 (Mensch) werden seit vielen Jahren zur Untersuchung von Differenzierungsvorgängen herangezogen (s. Andrews 1984, Grabe et Casanova 1986). Jedoch existierten bislang weder deskriptive noch funktionelle Daten zum Vorkommen des NO/cGMP-Signalweges in diesen Zelllinien. Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten zeigen, dass Teratome ein interessantes Modell zur Untersuchung des NO/cGMP-Signalweges darstellen. Oben genannte Zelllinien könnten weitere wichtige funktionelle Daten zur Bedeutung des NO/cGMP-Signalweges bei der Stammzelldifferenzierung liefern.

5.2.2 Stromatumore

Die vorliegende Arbeit bestätigt die Ergebnisse von Middendorff et al. (1995), die bereits zeigten, dass in humanen adulten Leydig-Zellen mit maligner Entartung die nNOS- sowie die sGC-Expression abnimmt (s. Kap. 4.1.4).

Zusammenfassend konnte der NO/cGMP-Signalweg im Hoden und in Keimzelltumoren ausschließlich in reifen, teilungsunfähigen Zellpopulationen nachgewiesen werden. Die teilungsaktiven Keimzellen und Keimzelltumore besaßen keine Immunreaktivität für Komponenten des NO/cGMP-Signalweges.

Somit korreliert, zumindest bei Keim- und Leydig-Zellen, die Expression dieses Signalweges mit dem Differenzierungsgrad (s. Tabelle 5).

	eNOS	nNOS	iNOS	sGC	GK I
Seminom	-	-	-	-	-
Teratom unreif	-	-	-	-	-
Teratom reif	+	+	-	+	+
Ledig-Zelle reif	+	+	-	+	-
Leydig-Zell-Tumor	-	-	-	-	-

Tabelle 5: Korrelation der Expression des NO/cGMP-Signalweges mit dem Differenzierungsgrad

5.3 NO-Signalwege in MA-10 Zellen

Die Arbeit beschreibt erstmals ein neues Modell zur Untersuchung von cGMP-unabhängigen NO Effekten. Diese Zelllinie eignet sich hierzu besonders gut, da sie nicht zur NO-stimulierten cGMP-Produktion befähigt ist (Davidoff et al. 1995). Tatsächlich zeigen die eigenen Untersuchungen mit dem NO-Donor Natriumnitroprussid (SNP), dass MA-10 Zellen unter dem Einfluss von Stickstoffmonoxid keine wesentlichen Mengen cGMP generieren und die beobachteten Effekte von SNP auf das Zellwachstum cGMP unabhängig waren (s.Kap. 4.2). Passend dazu war die lösliche Guanylatzyklase in den durchgeführten Western-Blot-Analysen nicht detektierbar (s. Kap. 4.2.1). Im Gegensatz zu Khurana et al. (1996), welche unter ANP Einfluss eine cGMP- und PKG-vermittelte Hemmung der Bildung von Phosphoinositolen in MA-10 Zellen vermuteten und Kumar et al. (1997), welche einen hemmenden PKG-vermittelten Einfluss von cGMP auf die Aktivierung der Protein Kinase C beschrieben, zeigen die vorgestellten Western-Blot-Analysen, dass in MA-10 Leydig-Zellen die cGMP-abhängige Proteinkinase I ebenfalls nicht detektierbar war (s.Kap. 4.2.1). Übereinstimmend fanden auch Shi et al. (2005) keine PKG-Immunreaktivität in adulten Leydig-Zellen der Ratte. Die PKG I

ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase und gilt als wichtiges Effektorprotein der cGMP-vermittelten Modulation von Wachstum und Differenzierung (s. Hofmann 2005). In Analogie zu den Expressionsdaten hatten moderate Mengen des cGMP Analogs 8-Br-cGMP keinen Einfluss auf das Wachstum von MA-10 Zellen (s.Kap. 4.2.1). Lediglich hohe Konzentrationen führten zu einer Proliferationssteigerung. Hierbei dürfte es sich um einen cGMP-Effekt, welcher über cAMP-Bindungsstellen vermittelt wird, handeln. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass identische Effekte durch weitaus niedrigere Konzentrationen des cAMP-Analogons 8-Br-cAMP erzielt werden konnten und dass diese durch Reduzierung des cAMP-Abbaus, z.B. durch Zugabe des Phosphodiesterase-Hemmers IBMX, verstärkt wurden (s.Kap. 4.2.2).

Mukhopadhyay et al. (1986) beobachteten in adulten Leydig-Zellen der Maus einen synergistischen Crosstalk zwischen cGMP- und cAMP-abhängigen Signalwegen, welcher die Steroidbiosynthese von adulten Leydig-Zellen der Maus stimulierte. Hipkin et al. (1991) postulierten und Schumacher et al. (1992) belegten, dass der steroidogene Effekt von cGMP auf der Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) beruht, welche die meisten der beobachteten cAMP-Effekte bedingt (s. Skalhegg et al. 2000). Im Unterschied zum steroidogenen Effekt in primären Leydig-Zellen der Maus ist jedoch die proliferationssteigernde Wirkung von cGMP und cAMP in unserem Modell durch einen spezifischen PKA-Inhibitor nicht unterdrückbar (s.Kap 4.2.2). Neuere Studien haben zusätzliche cAMP-Bindungsstellen identifiziert, die einen PKA-unabhängigen Effekt von cAMP beschreiben. Die vorliegende Arbeit liefert die Grundlage für weitere Untersuchungen, z.B. mittels cAMP-Crosslinking-Experimenten, um cAMP-Bindungsstellen zu identifizieren und den Einfluss von cAMP auf das Zellwachstum näher zu charakterisieren.

Neben der direkten Bindung von cGMP an cAMP-Bindungsstellen nehmen die zyklischen Nukleotide via Phosphodiesterasen Einfluss auf ihren eigenen Abbau (s. Beavo et al. 1994). Die PDEs werden in ihrer Aktivität und Expression auch durch unterschiedlichste Hormone und posttranslationale Modifikation beeinflusst (s. Conti et al. 1999). Sie bilden ein fein austariertes System und sind in einen komplexen Regulationsmechanismus eingebettet. Eine strukturierte Studie, die das Vorkommen bestimmter PDEs in Leydig- oder MA-10 Zellen untersucht, existiert bis dato nicht. Eigene, noch nicht publizierte Untersuchungen zeigen einen hemmenden Einfluss von ANP auf die hCG-induzierte Steroidogenese von MA-10 Zellen, welche durch EHNA, einem spezifischen PDE2-Inhibitor, antagonisierbar war. Das Vorkommen dieser cGMP-stimulierten, cAMP-spezifischen PDE gerade in MA-10 Zellen kann die Diskrepanz zu den Studien von Mukhopadhyay et al. (1986), Hipkin et al. (1991) sowie Schumacher et al. (1992) erklären, welche einen stimulatorischen Einfluss von ANP und cGMP auf die Steroidbiosynthese und -exkretion bei primär kultivierten adulten Leydig-Zellen der Maus beschrieben.

Die prooxidativen Eigenschaften von Stickstoffmonoxid durch Bildung zytotoxischer Mengen Peroxynitrits sind seit langem bekannt (s. Radi 2004). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass NO das zelluläre Redox-Potential von MA-10 Zellen entscheidend moduliert (s.Kap. 4.2.3) und die Vitamin C-induzierte H₂O₂-Produktion unterdrückt (s. Kap. 4.2.4). Frühere Studien dokumentieren den modulatorischen Einfluss von NO auf die zelluläre ROS-Produktion. Svegliati-Baroni et al. (2001) beschrieben an einem in vitro Modell, dass NO den Einfluss von ROS auf das Wachstum von hepatischen Sternzellen der Ratte effektiv antagonisieren konnte. Colavitti et al. (2002) identifizierten H₂O₂ als einen downstream-Mediator von VEGF-Signalen in Endothelzellen. Eine Hemmung der zellulären NO-Synthasen führte in dieser Studie

interessanterweise zu einer erhöhten zellulären ROS-Konzentration, was einen modulatorischen Einfluß von NO auf den zellulären Redox-Status von Endothelzellen nahe legt. Die genauen Mechanismen dieser beschriebenen Interaktionen sind jedoch bis dato nicht detailliert untersucht. Der NO Donor SNP besaß in hoher Konzentration (>100 µM) neben den NO-spezifischen auch einen NO-unabhängigen, zytotoxischen Effekt auf das Wachstum von MA-10 Zellen. Bei der Dekomposition von SNP wird neben Stickstoffmonoxid Ferrocyanid in äquimolaren Mengen freigesetzt. Eigene Untersuchungen mit einem Eisen Chelator lassen auf einen Einfluss der Eisenkomponente schließen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden in dieser Arbeit aber nicht weiter vertieft.

Vitamin C moduliert durch seine weithin bekannten reduzierenden Eigenschaften den zellulären Redox-Status. Neuere Studien belegen, dass Ascorbinsäure in der Lage ist, S-nitrosylierte Bindungen an Proteinen in vitro zu reduzieren (Jaffrey et al. 2001). Vitamin C ist ein wichtiger Kofaktor der Kollagensynthese und Steroidbiosynthese und besitzt entscheidenden Einfluss auf testikuläre Funktionen (s. Luck et al. 1995). Neuere Untersuchungen zeigen, dass Vitamin C vornehmlich durch ein spezifisches Transportersystem aktiv in Zellen aufgenommen wird (s. Wilson 2004). Moger (1987) konnte in seinen Untersuchungen an adulten Leydig-Zellen der Ratte eine aktive, Natrium-abhängige Vitamin C-Aufnahme nachweisen, was das Vorkommen eines Transportersystems, wie zum Beispiel des Natrium-abhängigen Vitamin C-Transporters (SVCT), in Leydig-Zellen wahrscheinlich macht.

Neben den bekannten antioxidativen Eigenschaften von Ascorbinsäure zeigen die hier präsentierten Daten, dass Vitamin C auf MA-10 Zellen zytotoxisch wirkt (s.Kap. 4.2.4). Die prooxidativen Eigenschaften von Vitamin C wurden bereits in früheren Studien beschrieben (s. Stadtman 1991). Jüngst zeigten Chen et al. (2005), dass

pharmakologische Ascorbinsäure-Konzentrationen zu einem selektiven Untergang von Tumorzellen führten. Auch diese Effekte waren Wasserstoffperoxid-vermittelt. Dies korreliert mit den eigenen Daten, die ja ebenfalls an Tumorzellen erhoben wurden. Die vorliegende Arbeit beschreibt darüber hinaus erstmals die zytoprotektive Potenz von NO gegenüber dem prooxidativen Potenzial von Vitamin C (s.Kap. 4.2.4). Obwohl die genauen Mechanismen dieser Interaktion nicht eindeutig geklärt sind, etablieren die hier präsentierten Daten Wasserstoffperoxid als Mediator der zytotoxischen Wirkung von Ascorbinsäure (s.Kap. 4.2.4). Eine Beteiligung von H_2O_2 an der Zytotoxizität von Vitamin C wurde bereits in verschiedenen Zelltypen, wie Fibroblasten (Peterkofsky and Prather 1977) oder myeloischen Blutzellen (Park et al. 2005), beschrieben. Park et al. charakterisierten den Effekt von H_2O_2 als einen ERK-vermittelten, apoptotischen Signalweg. Interessanterweise konnten wir eine Beteiligung von Hydroxylionen an den zytotoxischen Effekten von H_2O_2 ausschließen (s.Kap. 4.2.4), welches eine direkte Wirkung von Wasserstoffperoxid wahrscheinlich macht. Neuere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass NO die zytotoxische Wirkung von exogenem H_2O_2 nicht antagonisiert. Somit scheint NO nicht die Wirkung, sondern die Bildung von H_2O_2 zu beeinflussen, z.B. durch Verbrauch von Superoxidionen und Peroxynitrit-Bildung (s. Sarti et al. 2002).

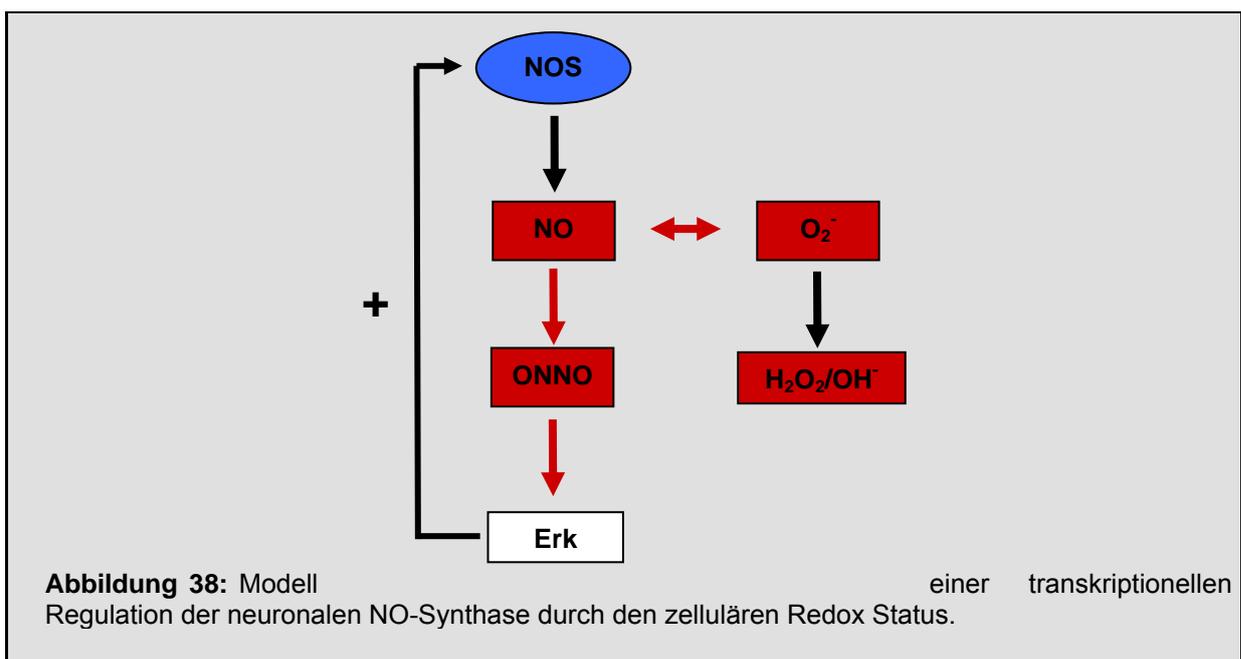
Serumentzug, ein etabliertes Modell zur Untersuchung von Differenzierungsvorgängen (s. Howard et al. 1993, Qi et al. 1997, Ma et al. 1998, Kameshwar-Rao et al.1999) führte auch in MA-10 Zellen zu einer beschleunigten Differenzierung (s. Kap. 4.3). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass mit zunehmend differenziertem Phänotyp auch die Expression von Komponenten des cGMP-Systems in MA-10 Zellen zunimmt (s. Kap. 4.4). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der Untersuchungen an humanen Keimzelltumoren, in denen der

NO/cGMP-Signalweg ausschließlich in differenzierten Anteilen der Teratome detektierbar war (s. Kap. 4.1.3). Darüber hinaus dokumentierten Middendorff et al. (1997) eine verminderte Expression von cGMP-produzierenden Enzymen in humanen Leydig-Tumorzellen gegenüber reifen Leydig-Zellpopulationen. Somit korreliert, zumindest in Leydig-Zellen und Keimzelltumoren, die Expression des cGMP-Signalweges mit dem Differenzierungsgrad.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass in differenzierten MA-10 Zellen auch der Gehalt an NO-produzierenden Enzymen steigt (s. Kap. 4.4.3), was mit einer vermehrten Synthese von NO einhergehen dürfte. In diesem Zusammenhang scheint NO einen zytoprotektiven Effekt gegenüber wachstumshemmenden Faktoren zu besitzen. Gleichzeitig nimmt im Rahmen der Zelldifferenzierung der wachstumshemmende Einfluss von reaktiven Sauerstoff-Spezies wie H_2O_2 zu (s. Kap. 4.4.3). Es ist also wahrscheinlich, dass eine vermehrte NO-Produktion mit einer verstärkten Modulation des zellulären Gehalts an ROS einhergeht. Passend hierzu stieg die zytoprotektive Potenz von NO gegenüber der Vitamin C-induzierten Bildung von Wasserstoffperoxid ($1\mu M$ vs. $10\mu M$ SNP, s. Kap. 4.4.3). In diesem Zusammenhang stimmen die hier präsentierten Daten mit den Untersuchungen von Kameshwar-Rao et al. (1999) an Oligodendrogliomzellen überein, welche eine vermehrte Zytotoxizität von H_2O_2 in differenzierten Zellen beobachteten. Verschiedene downstream-Mediatoren cGMP-unabhängiger NO-Effekte auf Zellwachstum und -differenzierung wurden bereits identifiziert, darunter die Tumorsuppressorgene p53 und Rb oder der zyklin-abhängige Kinase-Inhibitor p21 (s. Gibbs 2003, Contestabile and Ciani 2004). Darüber hinaus wurde eine direkte Interaktion von NO mit bestimmten Enzymen, wie H-ras oder Caspase 3, durch S-Nitrosylierung an Cystein-Resten beschrieben (s. Jaffrey et al. 2001). Mannick et al.

(1999) beschrieben in ihren Studien eine Fas-abhängige Denitrosylierung der Caspase 3, was zu einer gesteigerten Aktivität des Enzyms und Apoptose der Zellen führte. Dies macht das Vorkommen von Nitrosylierungen auch in vivo wahrscheinlich. Jedoch sind Nitrosothiole labile Verbindungen, was auf ihrer hohen Reaktivität mit reduzierenden Substanzen wie Vitamin C oder Gluthation beruht (Kashiba-Iwatsuki et al. 1997). Caspase 3 repräsentiert somit ein mögliches Zielprotein, welches die beobachteten Effekte von NO (Nitrosylierung), aber auch von Ascorbinsäure (Denitrosylierung) hinreichend erklären könnte. Jedoch müssen ebenfalls bisher unbekannte Interaktionen zwischen Vitamin C, Wasserstoffperoxid und NO in Betracht gezogen werden. Der modulatorische Einfluss von Stickstoffmonoxid auf den zellulären Redox-Status wird durch die Verwendung eines weiteren Modells zur Untersuchung von Differenzierungsvorgängen unterstrichen. Die Zugabe von 1,5% Dimethylsulfoxid (DMSO), welches eine Differenzierung in verschiedenen Zellpopulationen induziert (s. Seidman et al. 1996), führte zu vergleichbaren Veränderungen der Zellmorphologie und Proteinkomposition wie Serumentzug bei kultivierten MA-10 Zellen (s.Kap. 4.3.3). Interessanterweise zeigten Western Blot Analysen, dass die Applikation von DMSO, anders als bei Serumentzug, zu keiner vermehrten Expression der neuronalen NOS führte (s. Kap. 4.4.3). Die Diskrepanz lässt sich durch die antioxidativen Eigenschaften von DMSO, einem bekannten Hydroxylionen-Scavenger, erklären. Somit ist möglich, dass eine erhöhte zelluläre ROS-Konzentration das Signal für eine kompensatorisch vermehrte NOS-Expression darstellt. Die Bedeutung von NO als Modulator von Wachstum und Differenzierung ist insbesondere bei neuronalen Zellpopulationen gut untersucht (s. Peunova et Enikolopov 1995, Contestabile et Ciani 2004). Wie bei Leydig-Zellen mit ihren neuronalen Charakteristika (Davidoff et al. 1993, 2004, Middendorff et al. 1993) beschrieben Cheng et al (2003) eine verstärkte Expression der neuronalen NO-

Synthese in differenzierten neuronalen Progenitorzellen. Darüber hinaus zeigten Schonhoff et al. (2001), dass die vermehrte Expression der nNOS in mit NGF differenzierten PC12 Zellen durch Aktivierung des Ras/ERK-Signalwegs vermittelt wird. Diese vermehrte Expression der nNOS in PC12 Zellen geht mit einem steigenden Gehalt an nitrierten Tyrosin-Residuen (Cappelletti et al. 2003) einher, was die Beteiligung von Peroxynitrit impliziert. In diesem Zusammenhang fanden Cerioni et al. (2003), dass Hemmung des Raf-MEK-Signalweges zu einer vermehrten Generation von mitochondrialen ROS und Peroxynitrit führt, welches in der Lage ist, den ERK-Signalweg zu aktivieren, was zu einer gesteigerten Expression NO-produzierender Enzyme führen sollte. In Analogie zeigten Mills et al. (1998) dass in NGF-stimulierten PC12 Zellen die EGF-induzierte ROS-Akkumulation abnimmt und dieser Effekt NO-vermittelt ist. Somit erfüllt das NO-System alle erforderlichen Bedingungen, um den zellulären Redox-Status adäquat zu modulieren (s. Abbildung 38). Die exakten Mechanismen der cGMP-unabhängigen Wirkung von NO sind im Detail noch nicht endgültig geklärt, jedoch repräsentieren die MA-10 Zellen ein exzellentes Modell für weitere Untersuchungen.



6 Zusammenfassung

Der Einfluss von Stickstoffmonoxid (NO) auf zelluläre Proliferations- und Differenzierungsvorgänge ist wiederholt beschrieben worden. Die vorliegende Arbeit untersucht die Mechanismen derartiger NO-Effekte am Modell testikulärer Tumoren und Tumorzelllinien.

Die immunhistochemischen Untersuchungen an Biopsaten humaner Keimzell- und Stromatumore zeigen eine Expression des NO/cGMP-Signalweges ausschließlich in den differenzierten Anteilen von Teratomen, pluripotenten Keimzelltumoren mit ausgeprägter Differenzierungstendenz. Die Expression des NO/cGMP-Signalweges korreliert somit bei Hodentumoren mit dem zellulären Differenzierungsgrad. Zur näheren Charakterisierung des Einflusses von NO auf Differenzierungsvorgänge wurden MA-10 Leydig-Tumorzellen als Modell benutzt. Der NO-Donor SNP besaß bereits in mikromolaren Konzentrationen einen positiven Einfluss auf das Wachstum differenzierender Zellen. Da MA-10 Zellen nicht zur NO-vermittelten Produktion nennenswerter Mengen von cGMP befähigt waren und der NO-Rezeptor, die lösliche Guanylatcyclase (sGC), nicht nachweisbar war, handelt es sich um einen cGMP-unabhängigen NO-Effekt. In diesen Zellen übt Vitamin C, vermittelt über H₂O₂, einen cytotoxischen Effekt aus. NO war in der Lage diesen Vitamin C-Effekt zu antagonisieren. Darüber hinaus war in differenzierenden Zellen die Expression der Leydig-Zell-spezifischen NO-Synthase, die nNOS, hochreguliert und die zytoprotektive Potenz von NO gegenüber Vitamin C 10-mal stärker als in den undifferenzierten Kontrollen.

Die vorliegende Arbeit beschreibt somit erstmalig eine Interaktion von NO, H₂O₂ und Vitamin C bei der Regulation des zellulären Redox-Potentials mit entscheidendem Einfluss auf Wachstum und Differenzierung.

7 Literaturverzeichnis

Abney TO, Zhai J. (1998) Gene expression of luteinizing hormone receptor and steroidogenic enzymes during Leydig cell development. *J Mol Endocrinol.* 20:119-27.

Anand-Srivastava MB. (2005) Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation. *Peptides.* 26:1044-59.

Andrews PW. (1984) Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev Biol.* 103:285-93.

Ascoli M. (1981) Characterization of several clonal lines of cultured Leydig tumor cells: gonadotropin receptors and steroidogenic responses. *Endocrinology.* 108:88-95.

Beavo JA, Conti M, Heaslip RJ. (1994) Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Mol Pharmacol.* 46:399-405.

Beckman JS, Carson M, Smith CD, Koppenol W H. (1993) ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature.* 364, 584

Beckman JS, Koppenol WH.(1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 271:C1424-37.

Berg D, Youdim MB, Riederer P. (2004) Redox imbalance. *Cell Tissue Res.* 318:201-13.

Boissel JP, Schwarz PM, Forstermann U. (1998) Neuronal-type NO synthase: transcript diversity and expressional regulation. *Nitric Oxide.* 2:337-49.

Borchert O. (2005) cGMP-abhängige Signalwege in Spermatozoen des Rindes. *Dissertationsschrift, Universität Hamburg, Fachbereich Medizin*

Bruijn LI, Beal MF, Becher MW, Schulz JB, Wong PC, Price DL, Cleveland DW. (1997) Elevated free nitrotyrosine levels, but not protein-bound nitrotyrosine or hydroxyl radicals, throughout amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-like disease implicate tyrosine nitration as an aberrant in vivo property of one familial ALS-linked superoxide dismutase 1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:7606-11.

Burnett AL. (2004) Novel nitric oxide signaling mechanisms regulate the erectile response. *Int J Impot Res.* 16 Suppl 1:S15-9.

Cappelletti G, Maggioni MG, Tedeschi G, Maci R. (2003) Protein tyrosine nitration is triggered by nerve growth factor during neuronal differentiation of PC12 cells. *Exp Cell Res.* 288:9-20.

Cerioni L, Palomba L, Cantoni O. (2003) The Raf/MEK inhibitor PD98059 enhances ERK1/2 phosphorylation mediated by peroxynitrite via enforced mitochondrial formation of reactive oxygen species. *FEBS Lett.* 547:92-6.

- Chen Q, Espey MG, Krishna MC, Mitchell JB, Corpe CP, Buettner GR, Shacter E, Levine M. (2005) Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:13604-9.
- Cheng A, Wang S, Cai J, Rao MS, Mattson MP. (1993) Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. *Dev Biol.* 258:319-33.
- Colavitti R, Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Borrello S, Waltenberger J, Galeotti T. (2002) Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR. *J Biol Chem.* 277:3101-8.
- Contestabile A, Ciani E. (2004) Role of nitric oxide in the regulation of neuronal proliferation, survival and differentiation. *Neurochem Int.* 45:903-14.
- Conti M, Jin SL. (1999) The molecular biology of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.*63:1-38.
- Davidoff MS, Schulze W, Middendorff R, Holstein AF. (1993) The Leydig cell of the human testis--a new member of the diffuse neuroendocrine system. *Cell Tissue Res.* 271:429-39.
- Del Punta K, Charreau EH, Pignataro OP. (1996) Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology*137:5337-43.
- Davidoff MS, Middendorff R, Mayer B, Holstein AF. (1995) Nitric oxide synthase (NOS-I) in Leydig cells of the human testis. *Arch Histol Cytol.* 58:17-30.
- Davidoff MS, Middendorff R, Enikolopov G, Riethmacher D, Holstein AF, Muller D. (2004) Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *J Cell Biol.* 167:935-44.
- Davis KL, Martin E, Turko IV, Murad F. (2001) Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41:203-36.
- DeYulia GJ Jr, Carcamo JM.(2005) EGF receptor-ligand interaction generates extracellular hydrogen peroxide that inhibits EGFR-associated protein tyrosine phosphatases. *Biochem Biophys Res Commun.*334:38-42.
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. (1999)Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 399:601-5.
- Floyd RA. (1999) Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: an hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. *Free Radic Biol Med.* 26:1346-55.

- Friebe A, Koesling D. (2003) Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res.* 93:96-105.
- Fujisawa M, Tatsumi N, Fujioka H, Kanzaki M, Okuda Y, Arakawa S, Kamidono S. (2000) Nitric oxide production of rat Leydig and Sertoli cells is stimulated by round spermatid factor(s). *Mol Cell Endocrinol.* 160:99-105.
- Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 399:597-601.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288:373-6.
- Furchgott RF, Vanhoutte PM. (1989) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 3:2007-18.
- Gerl A, Barba M, Weiss M, Liedl B, Zimmermann F, Clemm Ch. (2003) Manual Urogenitale Tumoren. Tumorzentrum München. 98-126
- Gonzales-Crussi F. (1982) Extragonadal teratomas. Atlas of tumor pathology, second series, fascicle 18, Washington D.C. Armed Forces Inst of Pathology I 44:129.
- Goy MF, Oliver PM, Purdy KE, Knowles JW, Fox JE, Mohler PJ, Qian X, Smithies O, Maeda N. (2001) Evidence for a novel natriuretic peptide receptor that prefers brain natriuretic peptide over atrial natriuretic peptide. *Biochem J.* 358:379-87.
- Gibbs SM. (2003) Regulation of neuronal proliferation and differentiation by nitric oxide. *Mol Neurobiol.* 27:107-20.
- Grabel LB, Casanova JE. (1986) The outgrowth of parietal endoderm from mouse teratocarcinoma stem-cell embryoid bodies. *Differentiation.* 32:67-73.
- Herrero MB, de Lamirande E, Gagnon C (2003) Nitric oxide is a signaling molecule in spermatozoa. *Curr Pharm Des.* 9:419-25.
- Hayashi Y, Nishio M, Naito Y, Yokokura H, Nimura Y, Hidaka H, Watanabe Y. (1999) Regulation of neuronal nitric-oxide synthase by calmodulin kinases. *J Biol Chem.* 274:20597-602.
- Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.O., Marshall, H.E., and Stamler, J.S. (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 150-166
- Hipkin RW, Moger WH. (1991) Interaction between cyclic nucleotide second messenger systems in murine Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol.* 82:251-7.
- Hofmann F. (2005) The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem.* 280:1-4.
- Hofmann F, Feil R, Kleppisch T, Schlossmann J. (2006) Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev.* 86:1 - 23.

- Howard MK, Burke LC, Mailhos C, Pizzey A, Gilbert CS, Lawson WD, Collins MK, Thomas NS, Latchman DS. (1993) Cell cycle arrest of proliferating neuronal cells by serum deprivation can result in either apoptosis or differentiation. *J Neurochem.* 60:1783-91.
- Huhtaniemi IT, Korenbrot CC, Jaffe RB. (1977) HCG binding and stimulation of testosterone biosynthesis in the human fetal testis. *J Clin Endocrinol Metab.* 44:963-7.
- Hurt KJ, Musicki B, Palese MA, Crone JK, Becker RE, Moriarity JL, Snyder SH, Burnett AL. (2002) Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:4061-6.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:9265-9.
- Ignarro JL. (1989) Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ Res.* 65:1-21.
- Ignarro JL. (2000) *Nitric Oxide Biology and Pathobiology.* Academic, San Diego, CA, pp. 3-19.
- Ignarro LJ. (2002) Wei Lun Visiting Professorial Lecture: Nitric oxide in the regulation of vascular function: an historical overview. *J Card Surg.* 17:301-6.
- Ischiropoulos H, Beckman JS. (2003) Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J Clin Invest.* 111:163-9.
- Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH. (2001) Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol.* 3:193-7.
- Kameshwar-Rao AS, Gil S, Richter-Landsberg C, Givol D, Yavin E. (1999) H₂O₂-induced apoptotic death in serum-deprived cultures of oligodendroglia origin is linked to cell differentiation. *J Neurosci Res.* 56:447-56.
- Kasahara T, Hara N, Bilim V, Tomita Y, Tsutsui T, Takahashi K. (2002) Immunohistochemical studies of caveolin-3 in germ cell tumors of the testis. *Urol Int.* 69:63-8.
- Kashiba-Iwatsuki M, Kitoh K, Kasahara E, Yu H, Nisikawa M, Matsuo M, Inoue M. (1997) Ascorbic acid and reducing agents regulate the fates and functions of S-nitrosothiols. *J Biochem (Tokyo).* 122:1208-14.
- Khurana ML, Pandey KN. (1996) Atrial natriuretic peptide inhibits the phosphoinositide hydrolysis in murine Leydig tumor cells. *Mol Cell Biochem.* 158:97-105.
- Knowles R.G. and Moncada S. (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 298, 249-258.

- Komeima K, Watanabe Y. (2001) Dephosphorylation of nNOS at Ser(847) by protein phosphatase 2A. *FEBS Lett.* 497:65-6.
- Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. (2005) Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 4:471-9.
- Kuhn M. (2003) Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ. Res.* 93:700 -709.
- Kumar R, von Geldern TW, Calle RA, Pandey KN. (1997) Stimulation of atrial natriuretic peptide receptor/guanylyl cyclase- A signaling pathway antagonizes the activation of protein kinase C-alpha in murine Leydig cells. *Biochim Biophys Acta.*1356:221-8.
- Lander HM, Ogiste JS, Pearce SF, Levi R, Novogrodsky A. (1995) Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras. *J Biol Chem.* 270:7017-20.
- Lander HM, Hajjar DP, Hempstead BL, Mirza UA, Chait BT, Campbell S, Quilliam LA. (1997) A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction. *J Biol Chem.* 272:4323-6.
- Lee NP, Yan Cheng C. (2003) Regulation of Sertoli cell tight junction dynamics in the rat testis via the nitric oxide synthase/soluble guanylate cyclase/3',5'-cyclic guanosine monophosphate/protein kinase G signaling pathway: an in vitro study. *Endocrinology.* 144:3114-29.
- Lombardo F, Sgro P, Salacone P, Gilio B, Gandini L, Dondero F, Jannini EA, Lenzi A. (2005) Androgens and fertility. *J Endocrinol Invest.* 28(3 Suppl):51-5.
- Luck MR, Jeyaseelan I, Scholes RA. (1995) Ascorbic acid and fertility. *Biol Reprod.* 52:262-6.
- Lue Y, Sinha Hikim AP, Wang C, Leung A, Swerdloff RS. (2003) Functional role of inducible nitric oxide synthase in the induction of male germ cell apoptosis, regulation of sperm number, and determination of testes size: evidence from null mutant mice. *Endocrinology.* 144:3092-100.
- Ma X, Wang Y, Stephens NL. (1998) Serum deprivation induces a unique hypercontractile phenotype of cultured smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 274:C1206-14.
- Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ, Stamler JS. (2003) Fas-induced caspase denitrosylation. *Science.* 284:651-4.
- Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HB. (2001) Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod.* 65:660-71.
- Michell BJ, Chen Zp, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, Sim AT, Kemp BE. (2001) Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 276:17625-8.

- Middendorff R, Davidoff M, Holstein AF. (1993) Neuroendocrine marker substances in human Leydig cells--changes by disturbances of testicular function. *Andrologia*.25:257-62.
- Middendorff R, Muller D, Paust HJ, Holstein AF, Davidoff MS. (1997) New aspects of Leydig cell function. *Adv Exp Med Biol*. 424:125-38.
- Middendorff R, Davidoff MS, Behrends S, Mewe M, Miethens A, Muller D. (2000) Multiple roles of the messenger molecule cGMP in testicular function. *Andrologia*. 32:55-9.
- Middendorff R, Muller D, Mewe M, Mukhopadhyay AK, Holstein AF, Davidoff MS. (2002) The tunica albuginea of the human testis is characterized by complex contraction and relaxation activities regulated by cyclic GMP. *J Clin Endocrinol Metab*. 87:3486-99.
- Mills EM, Takeda K, Yu ZX, Ferrans V, Katagiri Y, Jiang H, Lavigne MC, Leto TL, Guroff G. (2003) Nerve growth factor treatment prevents the increase in superoxide produced by epidermal growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem*. 273:22165-8.
- Moger WH. (1987) Uptake and release of ascorbic acid by rat Leydig cells in vitro. *J Androl*. 8:398-402.
- Monteiro HP. (2002) Signal transduction by protein tyrosine nitration: competition or cooperation with tyrosine phosphorylation-dependent signaling events? *Free Radic Biol Med*. 33:765-73.
- Mostofi FK, Sesterhenn IA (1998) Histological typing of testis tumors, 2nd ed. WHO International. *Histological Classification of Tumors*. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokio
- Mukhopadhyay AK, Bohnet HG, Leidenberger FA. (1986) Testosterone production by mouse Leydig cells is stimulated in vitro by atrial natriuretic factor. *FEBS Lett*. 202:111-6.
- Mukhopadhyay AK, Schumacher M, Leidenberger FA. (1986) Steroidogenic effect of atrial natriuretic factor in isolated mouse Leydig cells is mediated by cyclic GMP. *Biochem J*. 239:463-7.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 327:524-6.
- Papatsoris AG, Triantafyllidis A, Gekas A, Karamouzis MV, Rosenbaum T. (2004) Leydig cell tumor of the testis. New cases and review of the current literature. *Tumori*. 90:422-3.
- Park S, Han SS, Park CH, Hahm ER, Lee SJ, Park HK, Lee SH, Kim WS, Jung CW, Park K, Riordan HD, Kimler BF, Kim K, Lee JH. (2004). L-Ascorbic acid induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells via hydrogen peroxide-mediated mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol*. 36:2180-95.

Paull KD, Shoemaker RH, Boyd MR, Parsons JL, Risbood PA, Barbera W, Sharma MN, Baker DC, Hand E, Scudiero DA, and others. (1988) The synthesis of XTT: a new tetrazolium reagent that is bio-reducible to a water-soluble formazan. *J Heterocycl Chem* 25: 911-914

Payne AH. (1990) Hormonal regulation of cytochrome P450 enzymes, cholesterol side-chain cleavage and 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase in Leydig cells. *Biol Reprod.* 42:399-404.

Peterkofsky B, Prather W. (1977). Cytotoxicity of ascorbate and other reducing agents towards cultured fibroblasts as a result of hydrogen peroxide formation. *J Cell Physiol.* 90:61-70.

Peunova N, Enikolopov G. (1995) Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature.* 375:68-73.

Qi Y, Wang JK, McMillian M, Chikaraishi DM. (1997) Characterization of a CNS cell line, CAD, in which morphological differentiation is initiated by serum deprivation. *Neurosci.* 17:1217-25.

Radi R. (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:4003-8.

Rübber H, Goepel M. (1998). Leitlinien zur Kinderchirurgie Teil 2. *Urologe [A]* 36: 666 – 667

Sarti P, Avigliano L, Grolach A, Brune B. (2002) Superoxide and nitric oxide--participation in cell communication. *Cell Death Differ.* 9:1160-2.

Schonhoff CM, Bulseco DA, Branchio DM, Parada LF, Ross AH. (2001) The Ras-ERK pathway is required for the induction of neuronal nitric oxide synthase in differentiating PC12 cells. *J Neurochem.* 78:631-9.

Schumacher H, Muller D, Mukhopadhyay AK. (1992) Stimulation of testosterone production by atrial natriuretic peptide in isolated mouse Leydig cells results from a promiscuous activation of cyclic AMP-dependent protein kinase by cyclic GMP. *Mol Cell Endocrinol.* 90:47-52.

Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. (1988) Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 48:4827-33.

Seidman KJ, Barsuk JH, Johnson RF, Weyhenmeyer JA. (1996) Differentiation of NG108-15 neuroblastoma cells by serum starvation or dimethyl sulfoxide results in marked differences in angiotensin II receptor subtype expression. *J Neurochem.* 66:1011-8.

Shaul PW. (2002) Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol.* 64:749-74.

- Shi F, Wang T. (2005) Stage- and Cell-Specific Expression of Soluble Guanylyl Cyclase Alpha and Beta Subunits, cGMP-Dependent Protein Kinase I Alpha and Beta, and Cyclic Nucleotide-Gated Channel Subunit 1 in the Rat Testis. *J Androl.* 26:258-63.
- Skalhegg BS, Tasken K. (2000) Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci.* 5:D678-93.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- Song T, Hatano N, Kume K, Sugimoto K, Yamaguchi F, Tokuda M, Watanabe Y. (2005) Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by phosphorylation at Threonine1296 in NG108-15 neuronal cells. *FEBS Lett.* 579:5658-62.
- Stadtman ER. (1991) Ascorbic acid and oxidative inactivation of proteins. *Am J Clin Nutr.* 54:1125S-1128S.
- Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J. (1992) S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:444-8.
- Stamler JS, Lamas S, and Fang FC (2001) Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106, 675-683
- Stuehr DJ. (1999) Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta.* 1411:217-30.
- Svegliati-Baroni G, Saccomanno S, van Goor H, Jansen P, Benedetti A, Moshage H. (2001) Involvement of reactive oxygen species and nitric oxide radicals in activation and proliferation of rat hepatic stellate cells. *Liver.* 21:1-12.
- Valenti S, Cuttica CM, Fazzuoli L, Giordano G, Giusti M. (1999) Biphasic effect of nitric oxide on testosterone and cyclic GMP production by purified rat Leydig cells cultured in vitro. *Int J Androl.* 22:336-41.
- Wang Y, Goligorsky MS, Lin M, Wilcox JN, Marsden PA. (1997) A novel, testis-specific mRNA transcript encoding an NH₂-terminal truncated nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 272:11392-401.
- Wang Y, Newton DC, Miller TL, Teichert AM, Phillips MJ, Davidoff MS, Marsden PA. (2002) An alternative promoter of the human neuronal nitric oxide synthase gene is expressed specifically in Leydig cells. *Am J Pathol.* 160:369-80.
- Waschek JA. (2004) Developmental actions of natriuretic peptides in the brain and skeleton. *Cell Mol Life Sci.* 61:2332-42.

WHO Daten (2001) [www.globocan](http://www.globocan.org), [www.iarc](http://www.iarc.org)

Wiesner B, Weiner J, Middendorff R, Hagen V, Kaupp UB, Weyand I. (1998) Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca^{2+} entry into sperm. *J Cell Biol.* 142:473-84.

Willipinski-Stapelfeldt B, Lubberstedt J, Stelter S, Vogt K, Mukhopadhyay AK, Muller D. (2004) Comparative analysis between cyclic GMP and cyclic AMP signalling in human sperm. *Mol Hum Reprod.* 10:543-52.

Wilson JX. (2005) Regulation of Vitamin C Transport. *Annu Rev Nutr.* 2004 [Epub ahead of print]

Wink DA, Osawa Y, Darbyshire JF, Jones CR, Eshenaur SC, Nims RW. (1993) Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. *Arch Biochem Biophys.* 300:115-23.

Wink DA, Mitchell JB. (1998) Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 25:434-56.

Yuasa K, Omori K, Yanaka N. (2000) Binding and phosphorylation of a novel male germ cell-specific cGMP-dependent protein kinase-anchoring protein by cGMP-dependent protein kinase I alpha. *J Biol Chem.* 275:4897-905.

Zini A, O'Bryan MK, Magid MS, Schlegel PN. (1996) Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol Reprod.* 55:935-41.

8 Danksagung

Der praktische Teil der Arbeit wurde in der Zeit von April 2000 bis April 2004 am Anatomischen Institut der Universität Hamburg im Rahmen des DFG-Graduiertenkollegs 336 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. R. Middendorff angefertigt. An erster Stelle möchte ich mich von ganzem Herzen bei Herrn Prof. Dr. med. Ralf Middendorff für die intensive und ausdauernde fachliche und seelische Betreuung bedanken. Er hat entscheidende Verbesserungen an der Struktur der Arbeit bewirkt. Durch seine Art der Leitung und seine Offenheit für neue Ideen war die Durchführung dieses Forschungsvorhabens erst möglich. Insbesondere Herrn Prof. Dr. med. M. Davidoff möchte ich für den regen Gedankenaustausch und für wesentliche Ergänzungen danken, die diese Arbeit durch seine Anmerkungen erhalten hat. Dem DFG-Graduiertenkolleg 336 und dessen Sprecher Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Seitz danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projektes. Herrn Dr. rer. nat. Dieter Müller danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft und regelmäßige fachliche Unterstützung, welche die experimentelle Umsetzung der inhaltlichen Fragestellung ermöglichte. Frau Dr. med. H. Lauke danke ich für viele fruchtbare Diskussionen gerade zu Beginn meiner Arbeit. Weiterhin gilt mein Dank Frau Prof. Dr. med. G. Rune, in deren Räumlichkeiten wichtige Untersuchungen des letzten Teils der Arbeit durchgeführt wurden. Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Anatomischen Instituts der Universität Hamburg für das angenehme und produktive Arbeitsklima und für die Hilfestellungen bei der praktischen Umsetzung der Arbeit. Darüber hinaus danke ich meinen Mitstreitern und Kollegen Dr. Marco Mewe, Dr. Oliver Borchert, Dr. Andrea Mietens, Dr. Holger Kappes für ihr unermüdliches Engagement und Interesse am Gelingen dieser Arbeit.

Die Arbeit widme ich meinen geliebten Eltern, die mich zu jeder Zeit meines Lebens unterstützten und mir bei der Verwirklichung meiner Ziele stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

9 Lebenslauf

Name:		Oliver Bargheer
Geburtsdatum:		25.06.1974
Geburtsort:		Stadthagen
Schulausbildung:	5/93	Allgemeine Hochschulreife am Neuen Gymnasium Stadthagen
Zivildienst:	8/93-10/94	Rettungswache des Deutschen Roten Kreuzes in Stadthagen
Studium:	4/95-11/02	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg.
	3/98	Ärztliche Vorprüfung
	3/99	1. Staatsexamen
	3/01	2. Staatsexamen
	11/02	3. Staatsexamen
Doktorarbeit :	04/00	Beginn am Institut für Anatomie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.
	04/01-10/01	Stipendiat des Graduiertenkollegs 336 (Molekulare Endokrinologie/Molekularer Stoffwechsel) am Institut für Anatomie III des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.
Beruflicher Werdegang:		
Arzt im Praktikum	01/03-08/03	Stipendiat des Graduiertenkollegs 336 (Molekulare Endokrinologie/Molekularer Stoffwechsel) am Institut für Anatomie III des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.
	09/03-08/04	Krankenhaus Bethanien Abt. Diabetologie und Stoffwechselkrankheiten
Weiterbildung	09/04-12/05	Assistenzarzt im Krankenhaus Bethanien Abt. für Diabetologie und Stoffwechselkrankheiten.
	Seit 01/06	Assistenzarzt der Asklepios Klinik Altona Abt. für Kardiologie und Pneumologie

10 Erklärung

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: