

---

Aus dem Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung  
an der Universität Hamburg

---

**Untersuchung zur Apoptose von Thekazellen des  
Rinderovars**

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades einer Doktorin  
der Veterinärmedizin

(Dr. med. vet.)

durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von  
**Bettina Jörß**  
aus Hamburg

Hannover 2005

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Christiane Kirchhoff

1. Gutachterin: Prof. Dr. Christiane Kirchhoff

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Meinecke

Tag der mündlichen Prüfung: 01. Juni 2005

**Meiner Mutter und  
meinem Mann**



## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>15</b>
<b>3. Literaturübersicht</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1 Das bovine Ovar</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1.1 Anatomie und Follikulogenese</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1.2 Der Reproduktionszyklus und seine Hormone</b> .....	<b>20</b>
3.1.2.1 <i>Hormonelle Regulation</i> .....	20
3.1.2.2 <i>Follikelwellen</i> .....	20
3.1.2.3 <i>Ovulation</i> .....	24
<b>3.1.3 Follikelatresie</b> .....	<b>25</b>
3.1.3.1 <i>Morphologische Kriterien</i> .....	26
3.1.3.2 <i>Biochemische Kriterien</i> .....	28
<b>3.2 Apoptose</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2.1 Was ist Apoptose?</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2.2 Apoptose versus Nekrose</b> .....	<b>30</b>
<b>3.2.3 Apoptotische Vorgänge</b> .....	<b>34</b>
3.2.3.1 <i>Ultrastrukturelle und biochemische Veränderungen während der Apoptose</i> .....	34
3.2.3.2 <i>Molekulare Mechanismen der Apoptose</i> .....	36
<b>3.3 Lysophosphatidsäure</b> .....	<b>46</b>
<b>4. Material und Methoden</b> .....	<b>50</b>
<b>4.1 Isolierung und Reinigung der Thekazellen</b> .....	<b>50</b>
<b>4.2 Kultivierung der Thekazellen</b> .....	<b>53</b>
<b>4.3 Zellkulturen zur Herstellung von Kontrollen</b> .....	<b>54</b>
4.3.1 <b>Kultivierung von HL-60-Zellen</b> .....	<b>54</b>
<b>4.4 May-Grünwald/Giemsa-Färbung</b> .....	<b>55</b>
<b>4.5 Fluoreszenzmikroskopie</b> .....	<b>56</b>
4.5.1 <b>Kernfärbung</b> .....	<b>56</b>
<b>4.6 DNA-Leiterbildung</b> .....	<b>57</b>
4.6.1 <b>Präparation der genomischen DNA</b> .....	<b>58</b>
4.6.2 <b>Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren</b> .....	<b>59</b>
4.6.3 <b>Fällung der DNA</b> .....	<b>59</b>
4.6.4 <b>Herstellung des Agarosegels zur DNA-Elektrophorese</b> .....	<b>60</b>
4.6.5 <b>Elektrophoretische Auftrennung der DNA</b> .....	<b>61</b>

<b>4.7 Bestimmung der Konzentrationen von zyklischem AMP (cAMP) und Progesteron</b> .....	<b>62</b>
4.7.1 cAMP-TRFIA mit Acetylierung.....	62
4.7.2 Progesteron-Elisa .....	67
<b>4.8 Western-Blot Analyse der Zellproteine</b> .....	<b>71</b>
4.8.1 Herstellung von Zellhomogenaten .....	71
4.8.2 Gewinnung von Membran-, Kern- und Zytosolfraction .....	72
4.8.3 Proteinbestimmung .....	72
4.8.4 Natriumdodecylsulphat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	73
4.8.5 Durchführung des Western Blots .....	76
4.8.6 Primäre Antikörper .....	79
4.8.7 Sekundäre Antikörper .....	80
4.8.8 Ponceau-Färbung des Blots .....	80
4.8.9 Strippen eines Blots.....	80
<b>4.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)</b> .....	<b>81</b>
4.9.1 RNA-Isolierung .....	82
4.9.2 Bestimmung der Integrität der RNA.....	83
4.9.3 Konzentrationsbestimmung der RNA.....	84
4.9.4 Herstellung von cDNA aus RNA durch Reverse Transkription .....	84
4.9.5 Durchführung der RT-PCR .....	85
4.9.6 Sequenzen der Oligonukleotid-Primer für die RT-PCR.....	86
<b>4.10 Mathematische Auswertung und statistische Verfahren</b> .....	<b>87</b>
<b>5. Ergebnisse</b> .....	<b>88</b>
<b>5.1 Morphologie der Thekazellen „in vitro“</b> .....	<b>88</b>
<b>5.2 Morphologische Veränderungen</b> .....	<b>89</b>
5.2.1 Apoptoseinduktion für morphologische Veränderungen .....	91
<b>5.3 Nukleare Vorgänge</b> .....	<b>95</b>
5.3.1 DNA-Leiterbildung .....	95
5.3.1.1 Apoptoseinduktion für DNA-Leiterbildung .....	95
<b>5.4 Hormonelle Vorgänge</b> .....	<b>100</b>
5.4.1 cAMP-TRFIA und Progesteron-ELISA.....	100
<b>5.5 Apoptosespezifische Proteine</b> .....	<b>104</b>
<b>5.6 Wirkung von Lysophosphatidsäure auf die Apoptose der Rinderthekazellen</b> .....	<b>108</b>
5.6.1 Morphologische Veränderungen.....	108
5.6.2 DNA-Laddering .....	113
5.6.3 Western Blot-Analyse der LPA-Wirkung auf die Expression des Bax-Proteins .....	116

5.6.4	Wirkung von LPA auf die m-RNA-Menge von Bax.....	119
<b>6.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>120</b>
<b>6.1</b>	<b>Atresie .....</b>	<b>120</b>
<b>6.2</b>	<b>Etablierung der Methoden .....</b>	<b>122</b>
6.2.1	Morphologische Veränderungen.....	122
6.2.2	DNA-Leiterbildung .....	123
6.2.3	Produktion von cAMP und Progesteron durch Thekazellkulturen.....	125
6.2.4	Produktion von Apoptose-spezifischen Proteinen .....	125
6.2.5	Produktion der entsprechenden mRNAs .....	127
<b>6.3</b>	<b>Apoptoseeinleitung in Thekazellkulturen.....</b>	<b>128</b>
6.3.1	Serumentzug .....	128
6.3.2	Cytostatika .....	129
6.3.2.1	Paclitaxel .....	129
6.3.2.2	Etoposide.....	130
6.3.2.3	Cytocholasin B.....	130
6.3.3	TNF $\alpha$ und Ceramide .....	130
<b>6.4</b>	<b>Die Wirkung von LPA.....</b>	<b>131</b>
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>135</b>
<b>8.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>137</b>
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>139</b>





## **1. Abkürzungsverzeichnis**

Apaf	apoptosis protease-activating factor
ATP	Adenosintriphosphat
3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase
$\beta$ -NTA	Beta-Naphtoyltrifluoroacetone
Bad	BCL2-associated death promoter
Bak	BCL2-antagonist/killer
Bax	BCL2-associated X Protein
Bcl	B-cell lymphoma protein
BH	Bcl-Homologie
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bim	Bcl2-interacting mediator gamma
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAD	Caspase activated DNase
cAMP	cyclic Adenosin-Monophosphate
Caspase	cysteinyl aspartate-specific proteinases
CARD	caspase recruitment domain
cDNA	copy desoxy-ribonucleic acid
Cdk	Cyclin-dependent-kinase
CED	Caenorhabditis elegans death genes
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cps	counts per second
DAPI	4',6- Diamidino- 2- phenylindole Dihydrochlorid

dATP	2'-Deoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Deoxycytidin-5'-triphosphat
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destiliertes Wasser
DED	death effector domain
DD	death domain
dGTP	2'-Deoxyguanosin-5'-triphosphat
d.h.	das heißt
DNA	desoxy-ribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DFF	DNA fragmentation factor
DMEM	Dulbeccos minimum essential medium
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Deoxythymidine 5'-Triphosphate
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	ethylene-diamine-tetraascorbate
Edg	endothelial differentiation genes
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
Eu	Europium
FADD	Fas-associating death domain protein
FCS	fötales Kälberserum
FIA	Fluoro-Immunoassay
FSH	follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GTP	Guanosintriphosphat
HRP	Horseradish Peroxidase
IAP	inhibitor of apoptosis-protein

IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthine
ICAD	Inhibitor of caspase activated DNase
IgG	Immunglobulin G
IGF	Insulin-like growth factor
IGFBP	IGF – Bindungsproteine
JNK/SAPK	c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases
Kbp	Kilo-Basenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
LH	luteinisierendes Hormon
LPA	lysophosphatidic Acid
LPC	Lysophosphatilylcholin
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MBSS	Moscona`s balanced salt solution
μ	Mikro
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
n	Nano
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumphosphat
NaOH	Natronlauge
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NSB	nicht-spezifische Bindung

OD	optische Dichte
P450scc	P450side chain cleavage
PARP	Poly-Adenosindiphosphat-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphat-buffert saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Propidiumiodide
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PTP	Permeability Transition Pore
PVDF	Polyvinylidendifluorid-Membran
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
Smac/Diablo	Second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI
StAR-Protein	Steroidogenic acute regulatory protein
SDS	Sodiumdodecylsulphat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TOPO	Trioctylphosphinoxid
TRADD	TNF-R1-associated death domain protein
TUNEL	terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling
u.	und
Upm	Umdrehungen in der Minute

UV	Ultraviolett
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume



## **2. Einleitung**

Der Eierstock geschlechtsreifer Säugetiere dient der Bereitstellung befruchtungsfähiger Keimzellen und der Synthese von Steroidhormonen. Beide Funktionen sind strukturell und funktionell eng an Follikel gebunden und unterliegen einem zyklischen Geschehen. Unter dem Einfluss hypophysärer Hormone reifen im Ovar kontinuierlich Follikel heran, von denen nur ein sehr geringer Anteil ovuliert. Weniger als 0,5% der angelegten Gameten reifen innerhalb eines Follikels heran und stehen durch Ovulation der Befruchtung zur Verfügung. Die Mehrzahl der Follikel unterliegt einer Rückbildung, der sogenannten Follikelatresie (IRVING-RODGERS et al. 2001).

Das Gleichgewicht zwischen Proliferation, Differenzierung und Atresie wird durch eine Vielzahl intraovarieller Faktoren aufrechterhalten. Störungen des Gleichgewichtes können schwere Fertilitätsstörungen und Erkrankungen, wie zum Beispiel Neoplasien, zur Folge haben.

Die genauen Abläufe der Atresie sind komplex und noch nicht eindeutig geklärt. Es konnte nachgewiesen werden, dass Zellen atretischer Follikel, speziell Granulosazellen, den programmierten Zelltod, die sogenannte Apoptose, durchlaufen (TILLY et al. 1992b). Das Schicksal der Zellen der Theca interna war lange umstritten, da die Thekazellschicht im Verlauf der Follikelatresie bei einigen Spezies hypertrophiert (HSUEH et al. 1994). Einige Autoren vertraten die Hypothese, dass diese den Follikel von außen umgebenden Zellen im Verlauf der Follikelatresie nicht absterben, sondern in Zellen des umgebenden spinözellulären Gewebes umgewandelt werden. Inzwischen konnten jedoch apoptotische Vorgänge von Thekazellen bei einigen Tierarten, so zum Beispiel bei Ratten (FOGHI et al. 1998), beobachtet werden. Erste Hinweise auf apoptotische Vorgänge boviner Thekazellen wurden von VICKERS et al. (2000) erbracht.

Frühere Studien unserer Arbeitsgruppe am Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung (IHF) in Hamburg zeigten, dass lipoidale Faktoren die Ovarphysiologie beeinflussen können. So konnte auch ein Einfluß des Lipides Lysophosphatidsäure (LPA) auf ovarielle Zellen gezeigt werden (BUDNIK u. MUKHOPADHYAY 1997, 2002a, b; Budnik 2003a; Budnik et

al. 2003b). Dieses Lipid ist ein Bestandteil des Serums und der folliculären Flüssigkeit und wird vermutlich lokal im Ovar produziert (BUDNIK u. MUKHOPADHYAY 2002b; BUDNIK et al. 2003b). Vorläufige Daten ließen vermuten, dass LPA eine Rolle für die Regulation des Apoptoseprozesses spielen könnte. Eine solche Einflussnahme konnte tatsächlich im Verlauf dieser Studien bei Zellen anderer Genese festgestellt werden (YE et al. 2002).

In dieser Arbeit soll festgestellt werden, unter welchen Bedingungen bovine Thekazellen in Apoptose gehen. Es sollen Methoden etabliert werden, um Apoptose in diesen Zellen zu messen. Nach deren Etablierung sollen erste Versuche vorgenommen werden, um die molekularen und regulatorischen Mechanismen der Apoptose bei Thekazellen des Rindes zu bestimmen. Dabei soll im Besonderen festgestellt werden, ob und in welcher Hinsicht LPA den Verlauf der Apoptose von Thekazellen beeinflusst.

Da humane Ovarien nur sehr begrenzt zur Verfügung stehen, musste ein Tiermodell etabliert werden. Von der Verwendung der Eierstöcke des Nagers wurde abgesehen, da diese zur Erleichterung der Lokalisierung und Präparation der Follikel hormonell vorbehandelt werden müssen. Deshalb fiel die Wahl auf bovine Ovarien, die auf Grund ihrer Herkunft aus Schlachtmaterial zudem den Vorteil boten, auf Tierversuche verzichten zu können.



### **3. Literaturübersicht**

#### **3.1 Das bovine Ovar**

##### **3.1.1 Anatomie und Follikulogenese**

Die Ovarien sind die keimbereitenden Organe des weiblichen Körpers. Sie produzieren den weiblichen Gameten, die Eizelle, und stellen die für die Reproduktion wichtigen Hormone, Östrogen, Progesteron und Androgene, bereit (LIEBICH 1993). Während der embryonalen Entwicklung vollziehen die Ovarien des Rindes eine Wanderung innerhalb des Körpers von dem Ort ihrer Entstehung caudal der Niere bis auf halbe Höhe des Beckeneinganges. Diese Wanderung wird Descensus ovarii genannt.

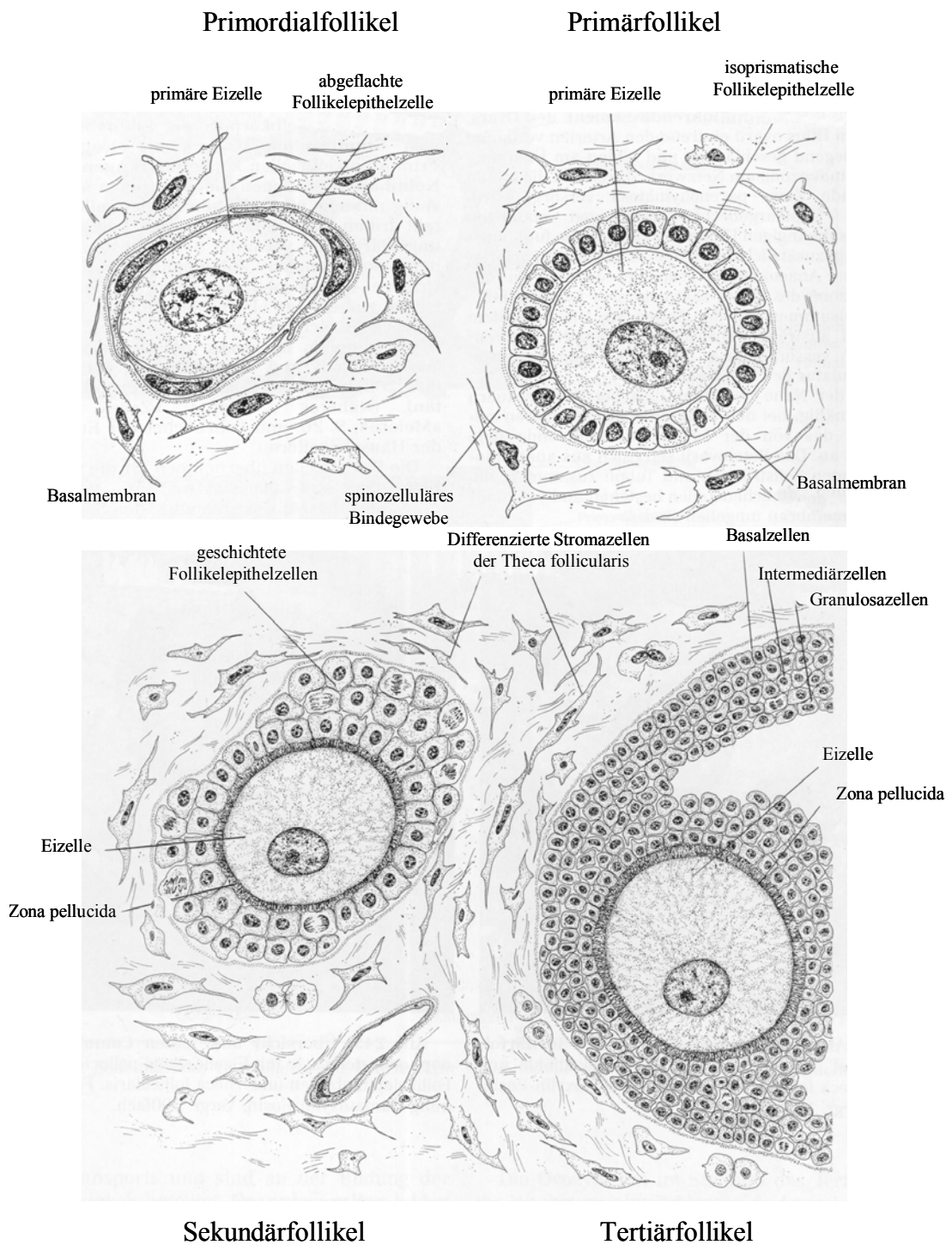
Ein Ovarium wird in zwei Zonen eingeteilt, die dichte Rindensubstanz, die Zona parenchymatosa, und die innen gelegene, lockere und gefäßreiche Marksubstanz, die Zona vasculosa. Diese Gewebeschichten werden von einer derben Bindegewebslage, der Tunica albuginea, umhüllt, auf der sich ein einschichtiges Keimdrüsenepithel befindet (NICKEL et al. 1987). In der Zona parenchymatosa des geschlechtsreifen weiblichen Rindes sind Follikel und Gelbkörper in unterschiedlichen Entwicklungsstadien eingebettet. Je weiter fortgeschritten das Entwicklungsstadium des Follikels ist, desto mehr nähert er sich der Tunica albuginea an.

Die einzelnen Stadien der Follikel werden Primordial-, Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Graaf'scher- oder präovulatorischer Follikel genannt (siehe Abb. 3.1.1). In ihnen befinden sich die weiblichen Keimzellen, die Oozyten, die in der Prophase der ersten Reifeteilung bis zur Ovulation verharren. Um die Oozyte formiert sich beim *Primordialfollikel* eine Schicht abgeplatteter, undifferenzierter Follikelzellen, die auch Progranulosazellen genannt werden. Bei einem *Primärfollikel* haben die Follikelzellen die typische, isoprismatische Form der Granulosazellen angenommen, während das Zytoplasma der Oozyte an Volumen zugenommen hat. Der sich nun entwickelnde *Sekundärfollikel* ist durch seine, über mitotische Teilung der Follikelepithelzellen entstandene, mehrschichtige Zelllage gekennzeichnet. Bei Wiederkäuern kann sie aus bis zu zehn Schichten bestehen. Die Eizelle wird von einer glykoproteinreichen Grenzschrift, der Zona pellucida, umgeben. Die direkt um die Eizelle

liegenden Zellen, die späteren Corona-Radiata-Zellen, sind durch diese Grenzschicht hindurch über Zellfortsätze mit der Eizelle verbunden. Ein weiteres Kennzeichen für einen Sekundärfollikel ist die sich erstmals formierende Thekazellschicht. Sie wird durch dem Follikel anliegende Stromazellen gebildet, die sich vergrößern und zirkulär um den Follikel anordnen. Es entsteht eine bindegewebige Schicht, die Theca follicularis.

Mit Entstehung einer Follikelhöhle hat sich aus dem Sekundärfollikel der *Tertiärfollikel* entwickelt (LIEBICH 1993). Die Follikelhöhle ist mit Flüssigkeit gefüllt, die hauptsächlich aus Plasmatrassudat und Produkten der Granulosazellen besteht. Die Menge der Flüssigkeit nimmt bis zum Zeitpunkt des Eisprunges, der Ovulation, zu (KNOBIL u. NEILL 1994). Die im Tertiärfollikel nur noch in lockerer Verbindung zueinander stehenden Follikelepithelzellen differenzieren sich. Sie werden, je nach ihrer Lage innerhalb der Follikelwand, in innere Granulosazellen, mittlere Intermediärzellen und außen gelegene Basalzellen eingeteilt. Ein Teil der Granulosazellen konzentriert sich in einem Bereich der Follikelwand und bildet den Eihügel, auch Cumulus oophorus genannt. In ihm wird die Eizelle eingeschlossen, wobei die um die Oozyte gelagerten, an die Zona pellucida grenzenden Zellen, als Corona-Radiata-Zellen bezeichnet werden.

Auch die Thekazellen des Tertiärfollikels haben sich differenziert und bilden nun zwei Schichten: Die innen gelegene Theca follicularis interna und die äußere Theca follicularis externa. Die Theca follicularis interna besteht aus epitheloid geformten Stromazellen und ist durch eine Basallamina von den bisher beschriebenen Strukturen des Follikels getrennt. Ihre Zellen produzieren Androgene und sind von einem dichten Kapillarnetz umgeben. Die Zellen der Theca follicularis externa haben eine spindelförmige Gestalt und sind in ein retikuläres Bindegewebsnetz eingelagert. Die Kapillarisation ist wesentlich geringer als die der inneren Thekaschicht. Das letzte Reifestadium der Follikulogenese wird Graaf'scher oder auch präovulatorischer Follikel genannt. Die Oozyte löst sich von der Follikelwand und ist nur noch von der Zona pellucida und den Zellen der Corona-Radiata umgeben. Sie vollendet beim Rind in dieser Phase die erste meiotische Teilung, die Reduktionsteilung, und beginnt die zweite meiotische Teilung, die Äquationsteilung. Letztere wird erst nach der Ovulation und Befruchtung abgeschlossen (LIEBICH 1993).



**Abb. 3.1.1 Follikelstadien**

Aufbau von Ovarfollikeln in den unterschiedlichen Stadien der Entwicklung: Primordial-, Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikel, modifiziert nach Liebich, 1993

### 3.1.2 Der Reproduktionszyklus und seine Hormone

#### 3.1.2.1 Hormonelle Regulation

Der im Durchschnitt einundzwanzigtägige Sexualzyklus des Rindes (HANSEL et al.1970) wird vom Hypothalamus gesteuert. Dort wird das **Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)** gebildet, welches pulsatil freigesetzt und über das Pfortadersystem dem Hypophysenvorderlappen zugeleitet wird. Dort bewirkt es die Produktion und Freisetzung von Gonadotropinen, dem **follikelstimulierenden Hormon (FSH)** und dem **luteinisierenden Hormon (LH)** (GRUNERT et al. 1999). Es besteht eine Notwendigkeit der pulsatilen Freisetzung von GnRH, um die Herabregulierung seines Rezeptors zu verhindern.

FSH und LH werden unterschiedlich reguliert. Während bei FSH die Produktion reguliert wird, die Freisetzung aber automatisch erfolgt, wird LH über seine Freisetzung gesteuert. Die Gonadotropine verursachen bei ihren Zielzellen im Ovar Proliferation und Produktion der Geschlechtshormone. Dies geschieht über Membranrezeptoren und Aktivierung der Adenylatzyklase. Die Geschlechtshormone sind die im Follikel gebildeten Hormone, **Östrogen**, **Androgene** und das Gelbkörperhormon **Progesteron**. Diese Hormone bilden zusammen mit dem Hypothalamus und dem Hypophysenvorderlappen einen Regelkreis mit negativem Feedback-Mechanismus. Progesteron hemmt die Freisetzung von GnRH und damit der Gonadotropine. Östrogen senkt die Produktion und Freisetzung von FSH, die Freisetzung von LH jedoch wird anfangs gehemmt, später allerdings gefördert. Dieser Regelkreis beeinflusst vor allem die Follikelbildung. Ist ein Follikel erst selektiert (s.u.), produziert er das Proteohormon **Inhibin**, welches die Produktion von FSH senkt, die von LH aber nicht beeinflusst (ROCHE 1996). Zur Luteolyse wird ein weiteres Hormon, das **Prostaglandin F2 $\alpha$**  benötigt, welches im Uterus gebildet wird (GRUNERT et al. 1999).

#### 3.1.2.2 Follikelwellen

Unter Einfluss der Gonadotropine findet die Follikulogenese statt. Diese wird in folgende Phasen eingeteilt: die Rekrutierungs-, die Selektions- und die Dominanzphase. Im Gegensatz

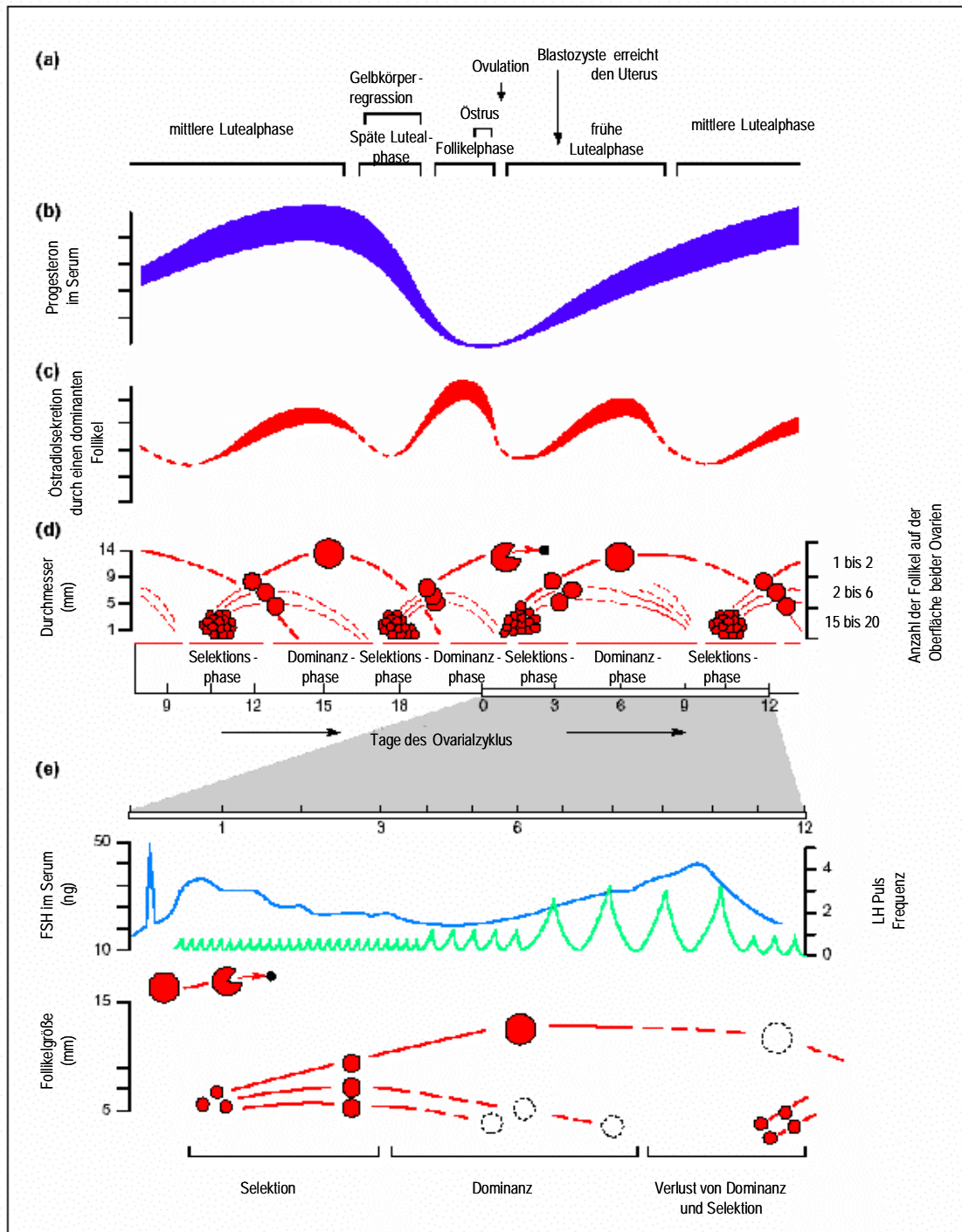
zu Primaten durchlaufen Rinder in mehr als 95% ihrer Brunstzyklen zwei bis drei Wellen der Follikelentwicklung (GINTHER et al. 1989; SAVIO et al. 1988). Daher ist der Zyklus von Rindern unterschiedlich lang, bei drei Wellen der Follikulogenese 23 Tage, bei zwei Wellen nur 20 Tage (siehe Abb. 3.1.2). Bei Färsen in der Pubertät und im ersten Brunstzyklus nach dem Kalben wurde nur eine Welle der Follikelentwicklung beobachtet (ROCHE 1996; ADAMS 1999).

### *a) Rekrutierungsphase*

Schon am Tag der Ovulation kommt es zur ersten Rekrutierung. Vor jeder der beschriebenen Wellen der Follikulogenese tritt ein Anstieg des zirkulierenden FSH auf. Dies kennzeichnet die Rekrutierungsphase. 8-41 kleine Follikel werden rekrutiert und wachsen unter dem Einfluß von FSH schnell und synchron auf eine Größe von bis zu ca. 5mm. Gleichzeitig produzieren sie die Hormone Östradiol und Inhibin A. Diese Substanzen reduzieren die Freisetzung von FSH im Hypophysenvorderlappen. 48-72 Stunden nach seinem Anstieg ist der Spiegel zirkulierenden FSHs auf seinen ursprünglichen Level zurückgefallen. Bei einem zweiwelligen Zyklus tritt am 9.-10. Tag des Zyklus das synchrone Wachstum von Follikeln erneut auf, bei dreiwelligen Zyklen am 8.-9. Tag. Die dritte Welle ist dann am 15.-16. Tag zu beobachten (ADAMS 1999).

Auf zellulärer Ebene konnte festgestellt werden, dass erst in der Rekrutierungsphase bestimmte messenger Ribonucleinsäuren (mRNAs) in Granulosazellen nachweisbar sind. Dabei handelt es sich um mRNAs, die folgende steroidogene Enzyme kodieren: P450side chain cleavage und P450aromatase. Diese Enzyme befähigen die Granulosazellen dazu, die von Thekazellen produzierten Androgene in Östradiol umzuwandeln. Die Androgene passieren die Basalmembran, so dass sie den Granulosazellen zur Verfügung stehen (XU et al. 1995). Dieser Prozeß wird von Gonadotropinen gesteuert. Thekazellen besitzen in dieser Phase nur Rezeptoren für das Gonadotropin LH, Granulosazellen nur für FSH (FORTUNE et al. 2001; WEBB et al. 1999).

# Untersuchung zur Apoptose von Thekazellen des Rinderovars



**Abb. 3.1.2** Schematische Darstellung der Follikelwellen eines Rinderzyklus in Verbindung mit den Hormonkonzentrationen der entsprechenden Follikelpphase. Modifiziert nach Roche, 1996

*b) Selektions- und Dominanzphase*

Die Selektionsphase ist definiert als jener Zeitraum, in dem das Größenwachstum der rekrutierten Follikel divergiert. Aus den rekrutierten Follikeln wird einer ausgewählt, der das Stadium der Dominanz erreicht, in welchem er sich schnell weiter entwickelt und die übrigen Follikel der aktuellen Follikelwelle in ihrem Wachstum unterdrückt. Die genauen Mechanismen des Selektionsprozesses sind Thema vieler Forschungsprojekte, konnten aber bisher nicht endgültig geklärt werden (FORTUNE et al. 2001). Der entscheidende Unterschied zwischen dem späteren dominanten und den untergeordneten Follikeln liegt nach Meinung einiger Autoren in der divergierenden Fähigkeit der Follikel, auf LH und FSH zu reagieren. Voraussetzung für die Selektion ist der Abfall von FSH. Der Follikel, dessen Granulosazellen in den zwei vorausgegangenen Tagen genügend LH-Rezeptoren entwickelt haben, ist LH responsiv und zeigt sich damit nicht abhängig von einem hohen FSH-Spiegel (ADAMS 1999). Der selektierte und später dominante Follikel produziert vermehrt Östradiol.

FORTUNE et al. (2001) vertreten eine andere Ansicht über die Rolle der LH-Rezeptoren der Granulosazellen. Sie stellten in ihren Versuchen fest, dass die erhöhte Östrogenproduktion der selektierten Follikel der vermehrten Expression von LH-Rezeptoren vorausgeht. Sie sprechen LH also keine Bedeutung für die Selektion des dominanten Follikels, sondern nur für das Überleben eines solchen Follikels zu. Dabei soll das Gonadotropin bei der Bereitstellung von Progesteron durch Granulosazellen eine entscheidende Rolle spielen. Das Progesteron wird durch Thekazellen in Androgene umgewandelt. Über die erhöhte Bereitstellung des Substrates beeinflusst LH indirekt die Östrogenproduktion. Entscheidend für die Selektion erscheint in der oben genannten Veröffentlichung das System der IGFs, der Insulin-like growth factors. Es besteht aus IGF-I, IGF-II, zwei Rezeptortypen und sechs IGF - Bindungsproteinen (IGFBP). IGF-I wird in der Leber gebildet und im Blut an IGFBP gebunden. So wird es unter anderem zu den Ovarien transportiert, um an die dort vorhandenen Rezeptoren zu binden. IGF-I wird auch von Granulosazellen gebildet, allerdings nur in kleinen Mengen. IGF-II wird in größeren Mengen von Thekazellen produziert. Es bewirkt die gleichen Reaktionen des ovariellen Follikels wie IGF-I, und beide wirken synergistisch mit den Gonadotropinen durch die Stimulation von cAMP (LUCY et al. 1999). Durch das IGF-System wird die Granulosazellproliferation stimuliert und die Differenzierung der Follikelzellen gefördert. In vitro konnte eine Stimulation der Östrogenproduktion von

Granulosazellen durch IGF-I nachgewiesen werden. Das System wird hauptsächlich über seine Bindungsproteine gesteuert, die die Bioverfügbarkeit von IGF-I und -II regulieren. Im Ovar spielen die Bindungsproteine mit niedrigem Molekulargewicht eine übergeordnete Rolle. Es handelt sich um IGF-Bindungsprotein 2 und 4. Ihre Produktion wird auf Transkriptionsebene hormonell reguliert, ihr Abbau über entsprechende Proteasen. Die Bindungsproteine sind in dominanten Follikeln im Vergleich zu untergeordneten Follikeln herunterreguliert.

Die Steroidproduktion verläuft in mehreren Schritten, wobei die Verfügbarkeit des Substrates, des Cholesterins, eine entscheidende Rolle spielt. Die mitochondriale Verfügbarkeit des Cholesterins wird durch das StAR-Protein sichergestellt (Steroidogenic acute regulatory protein). Thekazellen eines selektierten Follikels bilden vermehrt StAR-Protein (BAO et al. 1998). Das für die Bildung von Testosteron notwendige Enzym 3 $\beta$ -HSD (3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase) wird in höheren Konzentrationen ausgeschüttet. Granulosazellen produzieren in dieser Phase 3 $\beta$ -HSD erstmalig, während die Produktion aller anderen steroidogenen Enzyme dieser Zellen erhöht wird. Sowohl P450<sub>scc</sub> als auch P450Aromatase werden vermehrt gebildet. Diese Veränderungen in der Produktion steroidogener Enzyme werden ebenfalls auf Transkriptionsebene reguliert und sind verantwortlich für die steigende Östrogenproduktion (WEBB et al. 1999). Die übrigen Follikel verlieren ihre FSH-Rezeptoren, werden „Östrogen-Inaktiv“ und atretisch.

### ***3.1.2.3 Ovulation***

Ist noch ein Gelbkörper vorhanden, verhindert das von ihm freigesetzte Progesteron einen weiteren Anstieg von LH und damit die Ovulation (GRUNERT 1996; ADAMS 1999). Die Luteolyse bewirkt einen Abfall des Progesteronspiegels. Der letzte dominante Follikel eines Sexualzyklus kann auf den Abfall des Progesteronspiegels und den Anstieg von LH im Plasma mit einem Anstieg der steroidogenen Enzyme reagieren. Es wird vermehrt Östradiol produziert, wodurch der starke, präovulatorische Konzentrationsanstieg von LH, der sogenannte präovulatorische LH-Peak, und auch der von FSH ermöglicht wird. Dieser LH-Peak führt zur Ovulation des Follikels (FORTUNE et al. 2001). Kommt es aber aufgrund



eines noch vorhandenen Gelbkörpers und dessen Progesteron nicht zur Ovulation, geht auch der dominante Follikel den Weg der Atresie. Im Gegensatz zu der Situation bei Primaten können beim Rind auch Follikel, die schon das Stadium der Dominanz erreicht haben, der Atresie anheim fallen. Dabei handelt es sich um die Follikel, die während der Lutealphase ihre Entwicklung durchlaufen (IRELAND 1987). Dies sind die dominanten Follikel der ersten Welle der Follikulogenese, wenn in einem Zyklus nur zwei dieser Wellen vollzogen werden. Werden drei Entwicklungswellen durchlaufen, handelt es sich um die dominanten Follikel der ersten und der zweiten Welle (FORTUNE et al. 2001).

Die Follikulogenese innerhalb der Lutealphase ist ein ungewöhnliches Phänomen, eine womöglich unnötige Verschwendung von Oozyten. Aus diesem Grund versuchten IRELAND und ROCHE (1983) eine Ursache für diesen Vorgang zu entdecken. Sie konnten feststellen, dass der Anstieg von Östrogen, hervorgerufen durch die Produktion des dominanten Follikels, bei der ersten Follikelwelle die Implantation einer Blastozyste in die Uterusschleimhaut zu unterstützen scheint (IRELAND u. ROCHE, 1983).

### **3.1.3 Follikelatresie**

Nur weniger als 0,5% des gesamten Pools an Follikeln geht den Weg der Ovulation (IRVING-RODGERS et al. 2001). Das eigentliche Schicksal eines Follikels ist die Atresie. Der Ausdruck Atresie entstammt dem Griechischen. Es handelt sich um ein zusammengesetztes Wort. A bedeutet „nicht“, τρήσις „durchbohren“, bzw. „Loch“. Somit werden nur die Follikel als atretisch bezeichnet, die kurz vor der Ovulation degenerieren. Sie ovulieren nicht, werden also nicht durchbohrt. Inzwischen steht diese Bezeichnung in der Ovarphysiologie jedoch für alle degenerativen Prozesse in der Follikelentwicklung.

Die Degeneration von ovariellen Zellen findet bei Säugetieren in sechs verschiedenen Phasen der ovariellen Entwicklung statt. Drei dieser Phasen liegen vor der Entstehung von Follikeln, die übrigen drei danach (HSUEH et al. 1994).

Erstmals zeigen sich degenerative Prozesse der primordialen Keimzellen bei ihrer Wanderung aus dem Dottersack in die spätere Genitalregion. Eine weitere Welle der Atresie erfasst die inzwischen zu Oogonien gereiften Keimzellen während der Mitose. Die übrigen Oogonien treten in die Meiose ein, arretieren ihre Entwicklung in der Prophase der Meiose, dem

Diplotänstadium, und werden kurz nach der Geburt mit einer Schicht aus Follikelzellen umgeben. Alle Oozyten, die nicht mit einer solchen schützenden Schicht umgeben werden, fallen der Atresie anheim (HSUEH et al. 1994).

Ovarielle Follikel können in jeder Phase ihrer Entwicklung degenerieren. Man unterscheidet die Atresie von Follikeln vor der Ausbildung eines Antrums von Tertiär- und präovulatorischen Follikeln. Beim Rind wird eine größere Anzahl von Tertiärfollikeln nach der Selektion atretisch. Es handelt sich dabei um die nicht selektierten, untergeordneten Follikel. Präovulatorische Follikel degenerieren nur in der Lutealphase.

### ***3.1.3.1 Morphologische Kriterien***

Nach morphologischen Kriterien wird die Atresie in drei Stadien eingeteilt (HSUEH et al. 1994).

Follikel im *ersten Stadium* weisen Kernpyknose in weniger als zehn Prozent der Granulosazellen auf, die alle dicht an der antralen Follikelhöhle gelegen sind. Eine geringe Verminderung der Proliferationstätigkeit der Granulosazellen ist ebenfalls feststellbar, obwohl noch mehrere Zellen Mitose betreiben.

Das *zweite Stadium* ist durch eine größere Menge an Granulosazellen mit pyknotischem Kern charakterisiert. Bis zu 30 Prozent der Zellen weisen diese Besonderheit auf. Die Zellproliferation ist weiter abgesunken, nur sehr wenige Zellen befinden sich noch in der Mitose. Die Basalmembran des Follikels beginnt zu zerfallen, so dass Leukozyten in den Follikel eindringen können, um Zellreste zu beseitigen. In der Follikelflüssigkeit ist Zelldetritus nachweisbar. Auch die Oozyte zeigt Veränderungen, die denen während der Meiose ähneln.

Im *dritten Stadium* fällt der Follikel in sich zusammen. Es sind nur noch einige wenige Granulosazellen im Follikel nachzuweisen. Die, die noch vorhanden sind, haben sich von der fragmentierten Basalmembran gelöst, und es ist keine Proliferationstätigkeit mehr feststellbar.

Im Gegensatz zu den für alle Säugetiere generell geltenden Veränderungen der Granulosazellschicht entwickelt sich die Thekazellschicht artspezifisch unterschiedlich. Bei

Mensch, Ratte und Kaninchen wurde eine Hypertrophie dieser Zellschicht im Verlauf der Follikelatresie festgestellt. Hamsterfollikel zeigen keine morphologischen Veränderungen in ihren Thekazellen. Bei Schafen wurden ähnliche morphologische Degenerationserscheinungen der Thekazellen festgestellt, wie sie auch bei Granulosazellen zu finden sind (HSUEH et al. 1994).

Viele Organsysteme bedienen sich bei ihrer Entwicklung und Degeneration eines aktiven Prozesses, genannt Apoptose oder programmierter Zelltod, der im weiteren Verlauf der Arbeit noch definiert wird. Obwohl viele Hinweise darauf hindeuten, dass auch im Ovar, speziell bei der Luteolyse und der Follikelatresie, dieser Mechanismus Anwendung findet (TILLY et al. 1992), existieren kontroverse Studien diese Theorie betreffend. IRVING-RODGERS et al. (2001) beschreiben zwei unterschiedliche Formen der Atresie boviner Follikel. Die eine Form der Atresie ist nur bei antralen Follikeln über 0,5cm Durchmesser vorzufinden. Die Autoren nennen diese die „antrale Atresie“. Sie entspricht der oben schon beschriebenen Form der Atresie, bei der die am Antrum gelegenen Granulosazellen zuerst betroffen sind. Der Zelltod schreitet dann von außen nach innen fort. Dabei behaupten sie, dass die antral gelegenen, im Gegensatz zu den innerhalb der Granulosazellschicht gelegenen Granulosazellen, zwar pyknotische Kerne aufweisen, aber dennoch nicht durch Apoptose absterben, sondern dass es sich um eine Form der terminalen Differenzierung handelt. Die andere Form der Atresie wurde als „basale Atresie“ bezeichnet. Hierbei werden als erstes die der Basallamina anliegenden Granulosazellen betroffen, und der Zelltod greift weiter über auf die nächstgelegenen Zellen in Richtung Antrum. Makrophagen aus der Thekazellschicht dringen durch eine zerstörte Basalmembran in den Follikel ein und entfernen den Zelldetritus. Im Gegensatz zu der antralen Atresie werden bei dieser Form zwar sehr wenig pyknotische Zellkerne entdeckt, andere Zeichen, wie zum Beispiel apoptotische Körperchen, weisen allerdings auf ein apoptotisches Geschehen hin (IRVING-RODGERS et al. 2001).

Die auffälligen, speziesübergreifenden Veränderungen der Granulosazellen bei atretischen Vorgängen führten zu einer Intensivierung der Forschung an der Todesart dieser Zellen. Erst in letzter Zeit wird das Augenmerk auch vermehrt auf die Thekazellen gerichtet. Nur wenige Veröffentlichungen beschäftigen sich damit, auf welche Weise Thekazellen sterben, ob in den einzelnen Tierarten Unterschiede diesbezüglich bestehen oder ob diese Zellen während der

Atresie einfach wieder zu den interstitiellen Zellen werden, aus denen sie entstanden sind (HANSEL et al. 1972). Dabei handelt es sich meistens um Befunde, die im Zusammenhang mit Untersuchungen von Granulosazellen ermittelt wurden. Nur VICKERS et al. (2000) beschäftigten sich mit der Apoptose von Thekazellen des Rindes, wobei sich Ihre Untersuchungen auf Apoptoseeinleitung mit Fas-Ligand und damit auf den extrinsischen Weg der Apoptose konzentrierten (siehe Abschnitt 3.2.3.2).

### **3.1.3.2 Biochemische Kriterien**

Folgende biochemische Veränderungen atretischer Follikel wurden festgestellt:

Ein atretischer Follikel weist eine geringere Östrogenproduktion auf, wobei der Androgenspiegel ansteigt. Hinter dieser Beobachtung steht eine geringere Aktivität der Aromatase in Granulosazellen, bzw. eine Reduktion der Granulosazellen selbst. Bei mehreren Spezies wurde festgestellt, dass Östrogene im Gegensatz zu Androgenen einen hemmenden Effekt auf die folliculäre Atresie aufweisen (HSUEH et al. 1994). Eine erhöhte Progesteronproduktion ist ebenfalls feststellbar. YANG und RAJAMAHENDRAN (2000a) haben speziell beim Rind deutliche Hinweise für eine proatretische Funktion des Progesterons gefunden. IRVING-RODGERS et al. (2001) haben festgestellt, dass nur Follikel, die die basale Form der Atresie durchlaufen, Progesteron vermehrt produzieren. Damit stellen sie die Allgemeingültigkeit der biochemischen Meßmethoden zur Differenzierung von Follikeln in „atretisch“ und „gesund“ in Frage.

Es konnten auch Unterschiede in der Produktion anderer, nicht hormoneller Substanzen zwischen atretischen und nicht atretischen Follikeln festgestellt werden, die als biochemische Marker für die Atresie verstanden wurden. GREENWALD (1989) berichtet, dass Granulosazellen atretischer Follikel weniger DNA synthetisieren als Granulosazellen nicht atretischer Follikel.

Eine geringere Produktion bestimmter mRNAs ist ebenfalls ein typisches Merkmal für die Atresie von Follikeln. Speziell zu erwähnen sind vor allem die mRNAs für Aromatase und Gonadotropinrezeptoren (TILLY et al, 1992c). Ein Abfall der Bindungsfähigkeit für Gonadotropine wird auf die geringere Expression ihrer Rezeptoren zurückgeführt. Das Gap

Junktion-Protein Connexin 43 ist bei atretischen Follikeln in geringeren Mengen nachweisbar (WIESEN et al. 1994).

Andere mRNAs werden wiederum vermehrt abgelesen. So wurde in atretischen Follikeln eine erhöhte Menge an mRNAs der IGF-Bindungsproteine (NAKATANI et al. 1991), Clusterin (KAYNARD et al. 1992), Angiotensin-II-Rezeptoren (DAUD et al. 1988) und Prorenin (MUKHOPADHYAY et al. 1991) nachgewiesen. Durch die IGF-Bindungsproteine werden den Zellen IGF-I und-II entzogen (HSUEH et al. 1994).

## **3.2 Apoptose**

### **3.2.1 Was ist Apoptose?**

Der Begriff „Apoptose“ stammt von dem Griechischen Wort *απόπτωση*, Abfallen, welches das Fallen der Blätter im Herbst beschreibt. Kerr et al. verwendeten diesen Begriff erstmals im Jahre 1972, um eine bestimmte Form des Zelltodes zu beschreiben. In dieser Veröffentlichung beschäftigen sie sich mit den morphologischen Veränderungen der Zellen während dieses Vorganges. Dieser Prozeß erinnerte die Autoren visuell an herabfallende Blätter von herbstlichen Bäumen.

Apoptose lässt sich am besten beschreiben als ein „Selbstmord“ der Zelle. Sie spielt eine entscheidende Rolle in der embryonalen Entwicklung, der Aufrechterhaltung der Organhomöostase und der Abwehr mehrzelliger Organismen (CHANG und YANG, 2000). Dieser Begriff wurde als Synonym zu dem Terminus „Programmierter Zelltod“, den Lockshin und Williams 1964 erstmalig verwendeten, aufgefasst. Sie beschrieben hiermit einen in der Entwicklung eines Organismus stattfindenden und von der Aktivierung von Genen abhängigen Tod von Zellen. Inzwischen sind sich die Autoren nicht mehr einig darüber, ob die Begriffe synonym verwendet werden können. Streng genommen haben Kerr et al. die Apoptose über rein morphologische Kriterien definiert. Andere Autoren hingegen zeigten, dass der programmierte Zelltod nicht unbedingt bei allen Zellen die gleichen morphologischen Veränderungen hervorruft. SLOVITER (2002) beschäftigt sich ausschließlich mit diesem Definitionsproblem.

Um den Ablauf der Apoptose untersuchen zu können, wurde der Nematode *Caenorhabditis elegans* als Forschungsobjekt verwendet. In seiner Entwicklung müssen genau 131 Zellen sterben. Anhand dieser Untersuchungen wurde festgestellt, dass vier Genprodukte unerlässlich sind für die Ausführung der Apoptose, nämlich die der Gene *egl-1*, *ced-3*, *ced-4* und *ced-9*. Die Bezeichnung *ced* wurde als Abkürzung für „cell death“ gewählt, *egl* steht für *egg laying defective* (HENGARTNER 1999). In der Evolution sind diese Todesgene erhalten geblieben, vom Wurm bis zum Menschen. *Ced-3* stellt das ausführende Protein dar. Es handelt sich um eine Cystein-Aspartyl-Protease, eine sogenannte Caspase. Caspasen spalten eine Vielzahl von Proteinen, inaktivieren einige, die für das Überleben einer Zelle unerlässlich sind und aktivieren andere. *CED-4* ist notwendig, um das im Zytoplasma vorliegende Pro-*CED-3* zu aktivieren. *CED-9* ist ein antiapoptotisch wirkendes Protein. Es befindet sich in interzellulären Membranen und bindet an *CED-4*, wodurch es die Aktivierung von *CED-3* verhindern kann. Das Protein *EGL-1* wiederum verhindert durch Bindung an *CED-9* dessen antiapoptotische Wirkung.

Im Organismus von Säugetieren wurden Homologe für diese Proteine des Nematoden gefunden. *CED-3* wird hier von der Familie der Caspasen vertreten. *CED-4* wird beim Säugetier als *Apaf-1* (Apoptotic protease-activating factor 1) bezeichnet, *Ced-9* wird durch die Gruppe der antiapoptotischen Mitglieder der *Bcl-2*-(B-cell lymphoma 2) Familie vertreten. *EGL-1* steht für die proapoptotischen Mitglieder der *Bcl-2*-Familie (HETTS 1998; CHANG u. YANG 2000).

Auf den komplexen, molekularen Mechanismus beim Säugetier wird später noch näher eingegangen.

### **3.2.2 Apoptose versus Nekrose**

Kerr et al. definierten die Apoptose im Gegensatz zur Nekrose mit folgenden morphologischen Kriterien:

1. Zellschrumpfung
2. Kondensation (Pyknosis) und Fragmentierung des Zellkerns
3. Erhalt der Membranintegrität
4. Abschnürung von Vesikeln

Die Veränderungen, die eine Zelle während der Apoptose durchläuft, sind mikroskopisch erkennbar (FANG et al. 2000; SAUTIN et al. 2001). Apoptotische Zellen schrumpfen, werden aus dem Zellverband gelöst und runden sich ab (WILCOCK et al. 1988). Da die Reste der sterbenden Zelle während des gesamten Vorganges von einer intakten Zellmembran umgeben sind, kommt es nicht zu einer Freisetzung von Zytoplasmasubstanzen (WYLLIE et al. 1980). Dadurch können die entstandenen Vesikel nicht nur von Makrophagen, sondern auch von benachbarten Zellen aufgenommen werden. Ein inflammatorischer Prozess wird dadurch vermieden (KERR et al. 1994). Das Fehlen einer Entzündung stellt eines der wichtigsten Differenzierungsmerkmale zwischen Apoptose und der bis dahin bekannten Form des Zelltodes, der Nekrose, dar. Morphologisch zeigen nekrotische Zellen folgende Veränderungen:

1. Anschwellen von Zelle und Zellkern
2. Verlust von Zellstrukturen
3. Verlust der Membranintegrität aufgrund von Veränderungen der Membranpermeabilität

Durch diese Vorgänge liegt der Zelldetritus frei im Gewebe und provoziert eine inflammatorische Reaktion des Körpers (LEIST et al. 2001).

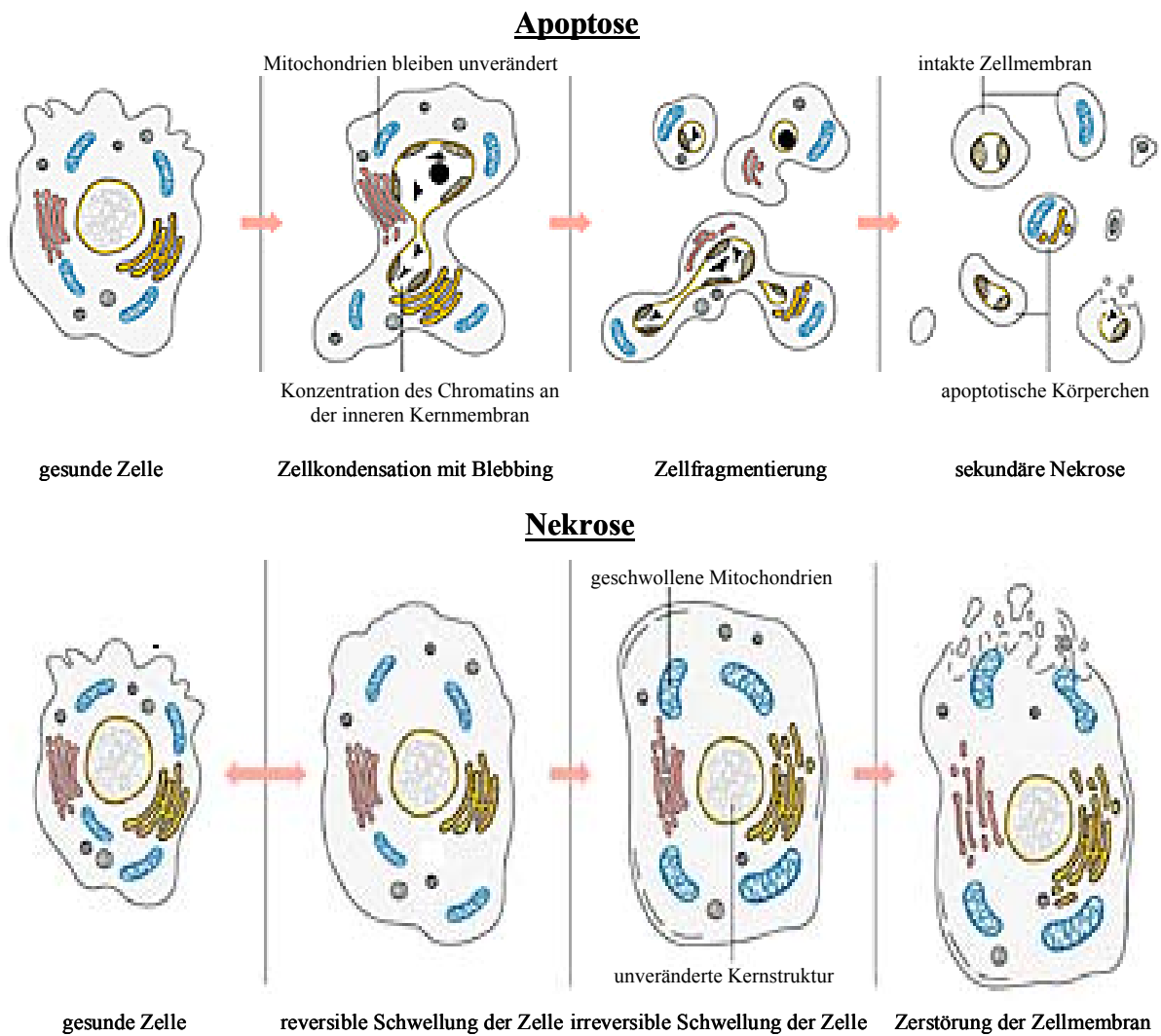
Abgesehen von morphologischen Merkmalen, werden auch andere Kriterien zur Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose herangezogen.

Im Gegensatz zur Apoptose, die vereinzelte Zellen treffen kann, findet die Nekrose bei einer Gruppe von benachbarten Zellen statt. Sie ist ein passiver Vorgang, der keine Energie verbraucht. Der ATP-Spiegel in einer nekrotischen Zelle sinkt zusehends ab. Es werden keine Proteine synthetisiert. Traumata sind die hauptsächliche Ursache für diese Form des Zelltodes. Die Apoptose hingegen ist ein aktiver, geregelter und rezeptorvermittelter Prozess, der als ein bewusster „Selbstmord“ der Zelle angesehen werden kann. Die einzelnen Zellen, die diesen „Selbstmord“ vollziehen, benötigen Energie, so dass ein ausreichender ATP-Spiegel vorhanden sein muß. Sie synthetisieren im Verlauf der Apoptose mRNA und Proteine (HSUEH et al. 1994).

Ein apoptotischer Zelltod verläuft bei den einzelnen Zellsystemen unterschiedlich schnell. Schon nach einer Stunde werden von einigen Zellen keine Reste mehr gefunden, andere Zellen reagieren sehr viel langsamer (EARNSHAW et al. 1999).

Im Gegensatz zur Nekrose ist der apoptotische Prozeß bis zu einem bestimmten Punkt reversibel, dem sogenannten „point of no return“. Jede Zelle durchläuft viele Kontrollpunkte, an denen die apoptotischen Vorgänge aufgehalten werden können. Zellen innerhalb einer Population beginnen den apoptotischen Prozess nicht zur gleichen Zeit nach der Induktion der Apoptose, und die Länge der einzelnen Stadien und morphologischen Veränderungen variiert von Zelle zu Zelle. In vitro endet der apoptotische Prozeß in einer sekundären Nekrose, da keine zur Phagozytose fähigen Zellen vorhanden sind, um die Apoptosekörperchen aufzunehmen (siehe Abb. 3.2.1) (SHERIDAN et al. 1981).





**Abb. 3.2.1 Apoptose versus Nekrose**

Morphologische Veränderungen einer Zelle im Verlauf der Apoptose im Vergleich zur Nekrose in vitro

Modifiziert nach ROCHE APPLIED SCIENCE, „Terminology of Cell Death“

Seite 1, Figure 1

2002/2003

### **3.2.3 Apoptotische Vorgänge**

#### ***3.2.3.1 Ultrastrukturelle und biochemische Veränderungen während der Apoptose***

##### *a) Veränderungen an der Zellmembran*

Ein weiteres Merkmal der apoptotischen Zellen ist ein Auftreten von Phosphatidylserin-Molekülen in den äußeren Zellmembranschichten. Phosphatidylserin ist ein Molekül der Zellmembran, welches bei nicht-apoptotischen Zellen in der inneren, dem Zytoplasma zugewandten Seite der Membran zu finden ist. Dieser asymmetrische Zustand wird durch eine ATP-abhängige Aminophospholipid-Translocase aufrechterhalten. Während der Apoptose wird die Aktivität dieses Enzyms herunterreguliert und die Asymmetrie zerstört (siehe Abb. 3.2.2) (SCHLEGEL et al. 1996; WILLIAMSON et al. 2002). Diese Veränderungen der Zellmembran dienen als sogenanntes „eat-me-Signal“ der schnellen Erkennung durch Makrophagen und deren Anbindung an die apoptotischen Zellen (WILLIAMSON et al. 2002). Im weiteren Verlauf des Zelltodes entstehen Membranausbuchtungen, die in der Literatur als „Blebbing“ bezeichnet werden. Teile der äußeren Zisternen des endoplasmatischen Reticulums der Zelle fusionieren mit der Zellwand.

Eine der letzten apoptotischen Veränderungen ist die Bildung der sogenannten Apoptosekörperchen. Es handelt sich dabei um die Reste der sich inzwischen auflösenden Zelle, die noch immer von der Zellwand umgeben sind (ALLEN et al. 1997).

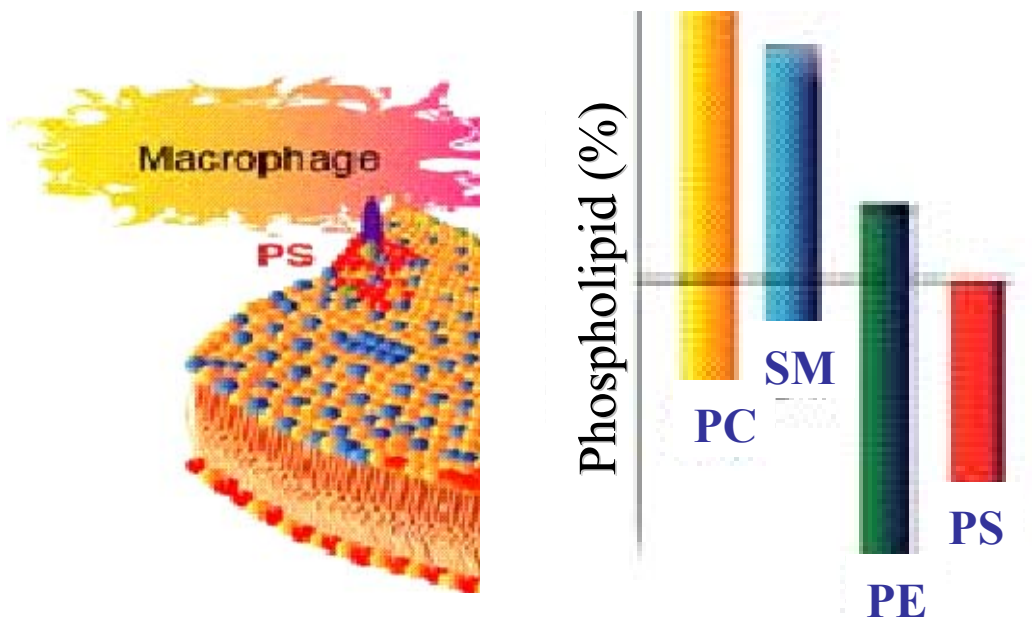


Abb. 3.2.2

PC:	Phosphatidylcholin
SM:	Sphingomyelin
PE:	Phosphatidylethanolamin
PS:	Phosphatidylserin

Im Verlauf der Apoptose wird Phosphatidylserin von der inneren auf die äußere Zellmembran verlagert. So ist die Zelle für Makrophagen zu erkennen. Sie können an die Zellmembran binden und sie phagozytieren.

b) *Veränderungen im Zellkern*

Im Zellkern sind auffällige Veränderungen aller Bereiche zu erkennen, der Membran, des Kernskeletts und der Desoxy-Ribonucleinsäure (DNA). Wie bei der Zellmembran kommt es auch in der Kernmembran zu Umstrukturierungen, ohne dass ein Verlust der Integrität entsteht. Auch hier sind die Mechanismen noch nicht vollständig geklärt. Es kommt zu einer Neuordnung der Poren der Kernmembran, vermutlich durch eine Proteolyse der Kernlamina. Das Chromatin kondensiert zu Beginn der Apoptose und lagert sich halbmondförmig an die Kernmembran an (WYLLIE et al. 1981). Es wird angenommen, dass die Spaltung einer Reihe von Proteinen, die mit dem Chromatin und der Skelettstruktur des Kerns verbundenen sind, für diese Umlagerungen verantwortlich ist. Viele Kernproteine werden während der Apoptose erwiesenermaßen gespalten: unter anderem Laminin, Poly-Adenosindiphosphat-Ribose-Polymerase (PARP), Topoisomerase, die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen

Proteinkinase und das U1-70 kD Protein (MARTELLI et al. 1997). Bei der Formung der Apoptosekörperchen zerfällt auch der Kern.

*c) Mitochondriale Veränderungen*

Das Mitochondrium spielt in der Apoptose eine zentrale Rolle, auf die später noch eingegangen wird. Zu den frühesten Veränderungen eines apoptotischen Prozesses gehört der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Dies geschieht noch vor der Umlagerung von Phosphatidylserin in der Zellmembran. Wie und warum dies geschieht, ist noch umstritten. Einigen konnte man sich lediglich darüber, welche Proteine für die Regulierung dieser mitochondrialen Mechanismen zuständig sind. Es handelt sich um Proteine der Bcl-2-Familie, die später noch Erwähnung finden werden.

**3.2.3.2 Molekulare Mechanismen der Apoptose**

*a) Wege der Apoptose*

Bisher sind zwei unterschiedliche Wege, die zur Apoptose führen, bekannt, der streßinduzierte und der über Rezeptorbindung induzierte Weg. Man nennt sie auch den intrinsischen und den extrinsischen Weg. Die Art der Apoptoseinduktion entscheidet, welcher Weg beschritten wird. Es kommt im Verlauf der Apoptose zu einer Überschneidung der beiden Wege (siehe Abb. 3.2.3). Unterschiedlich ist vor allem der anfängliche Verlauf der Apoptose (CORY u. ADAMS 2002).

Der rezeptorvermittelte, extrinsische Weg wird über Ligandenbindung an Rezeptoren erreicht, deren zytoplasmatischer Bereich eine Todesdomäne (DD = death domain) aufweist. Zu diesen Rezeptoren gehört beispielsweise die TNF-Rezeptorfamilie (TNF = Tumor-Nekrose-Faktor). Im Zytoplasma befinden sich Adapterproteine, die ebenfalls eine DD aufweisen und mit dieser an den Rezeptor binden. Eine weitere Domäne an den Adapterproteinen, die DED (death effector domain) genannt wird, ist für die Bindung, Aggregatbildung und damit die Aktivierung von Initiatorcaspasen, auf die im weiteren Verlauf eingegangen wird, verantwortlich. Als Adapterproteine des extrinsischen Weges sollen hier nur beispielhaft FADD (Fas-associating death domain protein) und TRADD (TNF-R1-associated death domain protein) genannt werden (SARTORIUS et al. 2001).

Der stressinduzierte Weg der Apoptose wird von Proteinen der Bcl-2 Familie reguliert. Als intrazellulärer Streß gilt zum Beispiel der Entzug von Zytokinen oder die Zerstörung von DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht. Dieser intrinsische, apoptotische Weg führt über das Mitochondrium, welches in seinem intermembranalen Raum ein Reservoir für proapoptotische Moleküle besitzt. Als erstes wurde Cytochrom c als wichtiges, aus dem Mitochondrium stammendes Molekül bekannt (GREEN et al. 1998). Nach Freisetzung in das Zytosol bindet es an Apaf-1, welches das Adaptermolekül des intrinsischen Weges darstellt (ZOU et al. 1999). Der Komplex von Apaf-1 und Cytochrom c ist in der Lage, proCaspase-9 zu binden (LI et al. 1997). Es kommt zu Aggregaten von proCaspase-9, was zu deren Spaltung, also zur Autoaktivierung führt. Den Komplex dieser Moleküle nennt man das Apoptosom (STRASSNER et al. 2000). Im weiteren Verlauf der Forschung wurde eine Vielzahl von Molekülen entdeckt, die die Apoptose regulieren. Sie sind ebenfalls im Mitochondrium beheimatet und finden erst bei apoptotischen Prozessen den Weg ins Zytosol. Dazu gehören Smac/Diablo, welche die antiapoptotische Funktion von sogenannten IAP's (inhibitor of apoptosis proteins) antagonisieren (DU et al. 2000; VERHAGEN et al. 2000). IAP's sind Proteine, die an mehrere Caspasen binden und so ihren enzymatischen Effekt inhibieren (ROY et al. 1997; DEVERAUX et al. 1998; DEVERAUX et al. 1999). Bei einigen Zellarten befinden sich auch Procaspasen, auf die im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird, im Mitochondrium (STRASSNER et al. 2000).

Beide Wege der Apoptose münden in der Aktivierung von Effektorcaspasen, bei denen vor allem die Caspase-3 als wichtigste ihrer Gruppe zu nennen ist.

### *b) Caspasen*

Zentrales Element der Apoptose ist die Proteolyse großer Teile von Zellproteinen. Hierfür verantwortlich sind die sogenannten Caspasen. Die Bezeichnung für diese Proteasen verrät einiges über ihre Funktionsweise. Der erste Buchstabe des Terminus „Caspase“ erklärt sich durch die Tatsache, dass es sich bei diesen Enzymen um Cysteinproteasen handelt. Sie spalten nur Proteine, deren C-Terminus an Aspartat gebunden ist. Darauf weist der zweite Teil des Wortes „aspase“ hin.

Die inzwischen bekannten 14 Caspasen des Säugetierorganismus liegen als Procaspasen meist im Zytoplasma vor und weisen eine Pro- und eine proteolytische Domäne auf. Letztere

besteht aus zwei Untereinheiten, einer großen von ca. 20 kDa und einer kleineren von ca. 10 kDa. Einige Procaspasen haben zwischen diesen beiden Untergruppen eine Linker-Domäne. Die Proteoenzyme werden nach ihrer Funktion und Sequenzhomologie in der proteolytischen Domäne in drei Gruppen eingeteilt: Die Apoptose-Initiatorcaspasen, die Apoptose-Effektorcaspasen und die inflammatorischen Caspasen. Zu den Initiatorcaspasen zählen die Caspasen 2, 8, 9 und 10, zu den Effektorcaspasen die Caspasen 3, 6 und 7. Im weiteren Kontext soll nicht näher auf die inflammatorischen Caspasen, zu denen die Caspasen 4, 5, 11, 12 und 13 gehören, eingegangen werden (EARNSHAW et al. 1999). Die N-terminal gelegene Prodomäne ist sehr unterschiedlich in ihrer Länge. Bei Initiator- und inflammatorischen Procaspasen ist sie sehr lang (über hundert Aminosäuren). Bei Effektorcaspasen besteht sie aus weniger als dreißig Aminosäuren. In den langen Prodomänen sind zwei funktionell wichtige Bereiche festgestellt worden, die als DED (death effector domain) und CARD (caspase recruitment domain) bezeichnet werden (CHINNAIYAN et al. 1995; HOFMANN et al. 1997). Beide sind verantwortlich für die Aktivierung der Procaspasen, da sie die Domänen sind, mit denen die Procaspasen eine Bindung zu den oben erwähnten Adaptermolekülen eingehen. Im Gegensatz dazu haben die kurzen Prodomänen der Effektorcaspasen eine hemmende Funktion. Nach ihrer Aktivierung bilden die Caspasen Tetramere, die aus einem Homodimer zweier Heterodimere zusammengesetzt sind. Die Heterodimere bestehen aus den beiden oben erwähnten Untereinheiten der proteolytischen Domäne (WALKER et al. 1994).

Effektorcaspasen werden vornehmlich von Initiatorcaspasen durch proteolytische Spaltung am Aspartat aktiviert. Aber auch einige andere Proteasen können eine Aktivierung erreichen. Dies wird trans-Aktivierung genannt. Granzyme B ist eine solche Protease. Die Transaktivierung geht in zwei Schritten vorstatten. Im ersten Schritt spaltet die Protease die Linkerregion von den Procaspasen. Dadurch können sich die Caspasen im zweiten Schritt selbst spalten und damit die Prodomäne entfernen (EARNSHAW et al. 1999).

Die Aktivierungsmechanismen der Initiatorcaspasen sind nicht eindeutig geklärt. Es bestehen Hinweise dafür, daß sie sich selbst aktivieren, wobei ihre Oligomerisation eine entscheidende Rolle spielt. Beobachtet wurde dieser Mechanismus zum Beispiel bei der Procaspase-8, die über den schon erwähnten extrinsischen Weg aktiviert wird. Im Anschluß an Ligandenbindung an einen Todesrezeptor aggregieren die Rezeptoren und ihre

Adaptermoleküle, so dass die daran gebundenen Procaspase-8-Moleküle in unmittelbare Nachbarschaft zueinander geraten. So können sie sich gegenseitig aktivieren (DENAULT et al. 2002). Ein ähnlicher Mechanismus konnte aber nicht für alle Initiatorcaspasen nachgewiesen werden, und es gibt auch Forschungsergebnisse, die im Widerspruch zu der erwähnten Hypothese stehen (CHANG u. YANG 2000). Die Procaspase-9 wird über Bindung an das Adaptermolekül Apaf-1 aktiviert, ist also in den intrinsischen Weg eingegliedert (STRASSER et al. 2000).

Bekannt sind auch einige Moleküle, die Caspasen regulieren können. Die Gruppe der IAPs (inhibitors of apoptosis-protein) stellen einige der wenigen, auch in Säugetierzellen vertretenen, bekannten Regulationsmoleküle dar. Ihre Funktionsweise ist allerdings noch nicht eindeutig geklärt. Viele der bekannten Regulatoren sind viraler Herkunft und sind Substrate für Caspasen. Mehrere Formen der Regulation werden diskutiert. Hierzu gehören Phosphorylierung, Nitrosylierung und Kompartimentalisation. Nach deren proteolytischer Spaltung haften sie aber an das Caspasmolekül an, so dass es zu weiteren Spaltungen nicht fähig ist.

Caspasen sind sehr spezifische Proteasen. Zu ihren Substraten gehört dennoch eine Vielzahl von Proteinen. Sie spalten ihre Substrate häufig in deren Zwischendomänen, was zu einer Inaktivierung, in einigen Fällen aber auch erst zu einer Aktivierung führen kann. Durch die proteolytische Spaltung einiger Substrate greifen die Caspasen in die Kondensation und Fragmentierung der DNA ein. Verantwortlich für die Fragmentierung ist ein DNase-Komplex, der DFF (DNA fragmentation factor) genannt wird. Er besteht aus der DNase CAD (Caspase activated DNase) und ihrem Inhibitor ICAD. Trotz seiner inhibitorischen Wirkung ist ICAD notwendig für die Aktivität von CAD. Das Protein wird schon als Heteromer vom Ribosom abgegeben, wobei ICAD für die korrekte Faltung von CAD verantwortlich ist. Dies bedeutet, dass CAD ohne seinen Inhibitor nicht funktionstüchtig sein kann. Für seine Aktivierung sind allerdings wieder die Caspasen unerlässlich. Caspase 3 und 7 spalten ICAD von dem Komplex ab und aktivieren so die DNase, indem die Bindungsstelle für die DNA freigesetzt wird. ICAD muss, um seine inhibitorische Wirkung vollständig zu verlieren, in drei Teile gespalten werden, wofür Caspase 3 notwendig ist (TANG et al. 1998). CAD nimmt zuerst die leicht erreichbaren Bereiche der DNA in Angriff, die sich am

Kerngerüst befinden. So entstehen große Teilstücke mit einer Größe von ca. 50-300kb. Dadurch entfaltet sich die chromosomale DNA und wird leichter für das Enzym zugänglich. Nun kann sie auch in kleinere Teile gespalten werden. Dabei wird die DNA immer in den Brückenbereichen zwischen den an Histone gebundenen DNA-Strängen getrennt, so dass nukleosomale Teilstücke in einer Größe von ca. 180bp entstehen. Da nicht alle Brückenbereiche gleichzeitig getrennt werden, entstehen DNA-Teilstücke von X mal 180bp unterschiedlicher Größe. Diese erscheinen bei der Elektrophorese der genomischen DNA apoptotischer Zellen in einem Agarosegel als Leiterformation (ALLEN et al. 1997). Die enzymatische Spaltung der DNA erfolgt zu einem Zeitpunkt, an dem die apoptotischen Prozesse nicht mehr reversibel sind. Der Nachweis einer Leiterbildung ist ein signifikantes Merkmal für Apoptose. Es kann eindeutig zwischen Apoptose und Nekrose unterschieden werden, da die DNA nekrotischer Zellen ungeordnet gespalten wird, so dass es zu keiner Leiterbildung kommen kann.

Der DFF-Komplex konnte bisher nur bei sechs verschiedenen Spezies nachgewiesen werden. Er ist auch nicht in allen Zellen gleichmäßig vorhanden. Embryonale Fibroblasten der Maus weisen zum Beispiel eine vergleichsweise geringe Konzentration an DFF auf und bei diesen Zellen konnte eine Fragmentierung der DNA noch nicht nachgewiesen werden. Ein weiteres, bisher ungelöstes Rätsel den DFF-Komplex betreffend, ist dessen Lokalisation innerhalb der Zelle (NAGATA et al. 2003). Es existieren noch andere Enzyme, die für die DNA-Spaltung verantwortlich gemacht werden, auch wenn deren Wirkung umstritten ist.

Proteine des Zytoskeletts sind weitere Ziele der Caspasen. In einigen Zellen wird zum Beispiel Aktin gespalten. Teile von Adhäsionskomplexen werden durch Spaltung inaktiviert und ermöglichen so die Ablösung apoptotischer Zellen aus dem Zellverband. Gelsolin, ein Aktin-depolymerisierendes Enzym, wird über Caspasen aktiviert und ist durch Reorganisation von Aktin für typische, morphologische Veränderungen wie Membranblebbing zuständig. Das Kerngerüstprotein, Laminin, wird durch Caspase-6 gespalten und inaktiviert, wodurch die spät eintretende Kernfragmentierung ermöglicht wird.

Eine weitere wichtige Gruppe von Proteinen, die durch Caspasen gespalten werden, ist die der Reparatur- und der sogenannten „housekeeping“-Enzyme. Am längsten bekannt aus dieser Gruppe als Substrat der Caspase 3 ist das DNA-Reparaturenzym PARP (Poly-ADP-Ribose-



Polymerase). Es wurde angenommen, dass die Spaltung dieses Enzyms die DNA-Fragmentierung zur Folge hätte, da Reparaturmechanismen verhindert werden. Da nun aber Mechanismen, wie der des oben erwähnten DFF-Komplexes, bekannt sind, scheint die Spaltung von PARP eher eine andere Bedeutung zu haben. Man nimmt an, dass die energieverbrauchenden Reparaturmechanismen ausgeschaltet werden sollen, damit die Energie dem Prozeß der Apoptose vorbehalten bleibt (STRASSNER et al. 2000).

Caspasen amplifizieren durch die Spaltung bestimmter Proteine ihre apoptotische Wirkung. So werden Proteine der Bcl-2 Familie, auf die später noch näher eingegangen wird, gespalten. Das antiapoptotische Bid ist eines dieser Proteine. Es wird durch die Spaltung nicht nur deaktiviert, sondern die Abspaltung der antiapoptotischen Domäne verändert es auf eine Weise, dass es einen proapoptotischen, also gegensätzlichen Charakter erhält.

Regulatoren des Zellzyklus sind ebenfalls Caspasensubstrate. Zu ihnen gehört die Cyclin-dependent-kinase (Cdk).

Ein in der letzten Zeit immer intensiver erforschtes Gebiet ist die Wirkung der Caspasen auf Moleküle der Signaltransduktion. In einer Vielzahl von Zellen wurde das Eingreifen von Caspasen in den MAP-Kinase (Mitogen-activated protein) Signaltransduktionsweg nachgewiesen (CHANG u. YANG 2000).

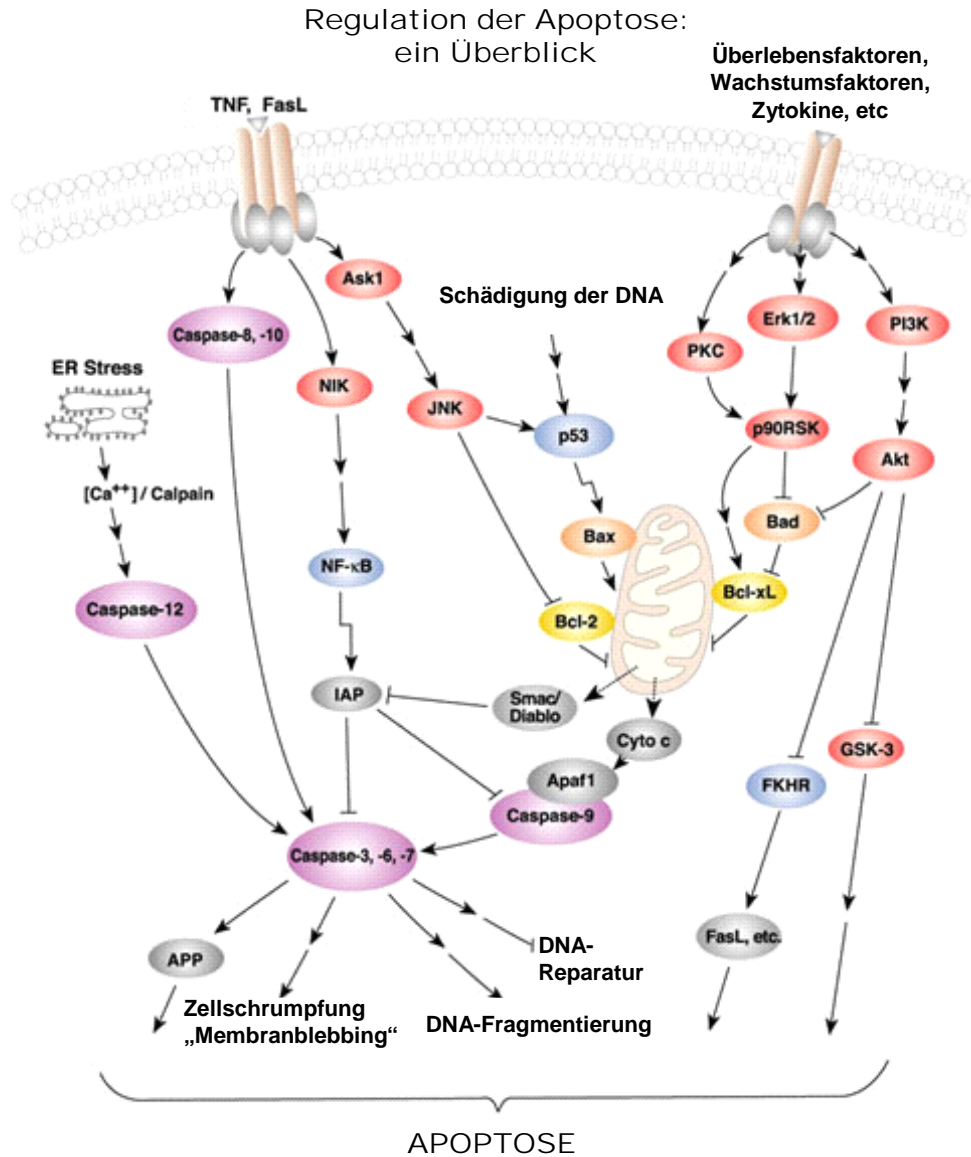


Abb. 3.2.3

Molekulare Regulationsmechanismen der Apoptose, wobei die Unterschiede zwischen intrinsischem und extrinsischem Apoptoseverlauf und die Unterschiede in deren Einleitung verdeutlicht werden. Der intrinsische Weg verläuft erst über das Mitochondrium und die Externalisierung von Cytochrom C, während der extrinsische, rezeptorvermittelte Weg auch unter Umgehung des Mitochondriums die Effektorcaspasen aktiviert.

Modifiziert nach CELL SIGNALING TECHNOLOGY, „Overview Regulation of Apoptosis“

1999-2004

c) *Bid, Bax, Bad, Bim...*, die Bcl-2 Familie und der intrinsische Weg

Die Proteine der Bcl-2 Familie sind sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirksam. Die bei Säugetieren bekannten 20 Mitglieder der Bcl-2-Familie werden nach ihrer Funktion und der Anzahl ihrer BH (Bcl-Homologie)-Domäne in drei Gruppen eingeteilt. Insgesamt existieren vier verschiedene BH-Domänen. Die Gruppe der antiapoptotischen Proteine (Gruppe 1), zu denen unter anderem Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-w gehören, weist alle vier Domänen auf. Zusätzlich sind noch zwei proapoptotische Gruppen zu differenzieren, die der Bax Familie (Gruppe 2) und der „BH3-only“ Familie (Gruppe 3). Wie der Name der letzten Gruppe deutlich macht, weisen ihre Mitglieder nur die BH3-Domäne auf, während den Mitgliedern der bax-ähnlichen Proteine nur die vierte Domäne fehlt. Die Gruppen 1 und 2 besitzen einen hydrophoben C-terminalen Bereich, mit dem sie in Membranen fixiert werden können. Eine Vielzahl von Versuchen weist darauf hin, dass die Proteine Bindungen miteinander eingehen können, wobei sowohl Homo- als auch Heterodimere oder Oligomere gebildet werden. Die Bildung von Heterodimeren zwischen pro- und antiapoptotischen Gruppenmitgliedern führt dabei zu einer Behinderung der biologischen Aktivität der Moleküle (LIM et al. 2002; CORY u. ADAMS 2002).

Die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> sind in Membranen innerhalb der Zellen integriert, d.h. man findet sie in der mitochondrialen Membran, der Kernmembran und der Membran des endoplasmatischen Retikulums mit Orientierung zum Zytoplasma. Jede Zelle benötigt mindestens eines der antiapoptotischen Proteine, allerdings ist es von Zellart zu Zellart unterschiedlich, welches das für sie entscheidende Protein dieser Bcl-2-Familie ist (CORY u. ADAMS 2002). Die anderen Proteine dieser Gruppe werden erst nach Aktivierung durch ein zytotoxisches Signal in das Mitochondrium internalisiert. Sie befinden sich sonst im Zytoplasma. Ihre Funktionsweise ist umstritten. Unumstritten ist die Tatsache, dass sie die proapoptotische Wirkung der Bax/Bak Gruppe antagonisieren und die Ausschüttung von Cytochrom c und anderen apoptotischen Molekülen aus dem Mitochondrium unterbinden. Sie verhindern unter anderem die Angliederung von Bax an das Mitochondrium und seine Oligomerisation. Einige Versuche weisen darauf hin, dass sie auch im weiteren Verlauf der Signaltransduktion eine antiapoptotische Rolle spielen. Wie dies geschieht, ist ungeklärt (LIM et al. 2002).

Die Gruppe der proapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder, die nur die BH3-Domäne besitzen, besteht aus mindestens acht unterschiedlichen Proteinen, die in unterschiedlichen

Gewebe weit verbreitet sind. Sie agieren als Inhibitoren der antiapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder, indem sie mit ihnen Heterodimere bilden. Dieses erklärt, warum für die Homöostase von Geweben das Mengenverhältnis von antiapoptotischen zu „BH3-only“ Bcl-2-Familienmitgliedern ausschlaggebend ist. Solange keine apoptotischen Signale vorhanden sind, werden die einzelnen Mitglieder dieser Gruppe auf sehr unterschiedliche Art und Weise in ihrem inaktiven Zustand gehalten. Einige binden an verschiedene Gerüstbestandteile der Zelle, andere müssen durch Caspasen aktiviert werden. So scheint es, dass die Moleküle der „BH3-only“-Familie alle die antiapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder antagonisieren, wenn auch alle bei unterschiedlichen Induktionsarten aktiviert werden. Besonders zu erwähnen ist Bid, da es eine Verbindung zwischen dem intrinsischen und dem extrinsischen Weg darstellt. Dieses Protein wird durch proteolytische Spaltung durch Caspase-8 aktiviert und animiert dann die bekanntesten Mitglieder der proapoptotischen, Bax ähnlichen Gruppe, nämlich Bax und Bak, zu oligomerisieren (CORY u. ADAMS 2002).

Wie die eigentliche Regulation der Apoptose durch die Proteine der Bcl-2-Familie vonstatten geht, ist noch immer nicht zweifelsfrei geklärt. Viele Hypothesen sind im Laufe der Zeit aufgestellt worden, doch keine konnte sich bisher durchsetzen (PARONE et al. 2002). Eine Hypothese besagt, dass sich die einzelnen Moleküle zu Homo- oder Heterodimeren zusammenlagern. Sie sind, je nach Zusammensetzung des Dimers, entweder funktionslos (Heterodimer zwischen pro- und antiapoptotischem Molekül), oder üben eine pro- (Homodimer aus proapoptotischen Molekülen) bzw. antiapoptotische Funktion (Homodimer zwischen antiapoptotischen Molekülen) aus. Damit wäre das Verhältnis zwischen diesen Molekülen zueinander ausschlaggebend und würde über Leben oder Tod der Zelle entscheiden. Diese Hypothese kann mit einigen der später entstandenen Thesen in Einklang gebracht werden, mit anderen jedoch nicht.

Neue Hypothesen setzen eine Bildung von Oligomeren aus Bak oder Bax für die Apoptose voraus. Diese Oligomere, so wird angenommen, bilden Poren in der äußeren mitochondrialen Membran, wodurch Cytochrom c und weitere proapoptotisch wirksame Moleküle in das Zytoplasma entlassen werden (KORSMEYER et al. 2000; NECHUSHTAN et al. 2001). Eine Bindung an antiapoptotische Bcl-2-Familienmitglieder verhindert die Porenbildung, eventuell durch die Unterbindung der Oligomerisierung.

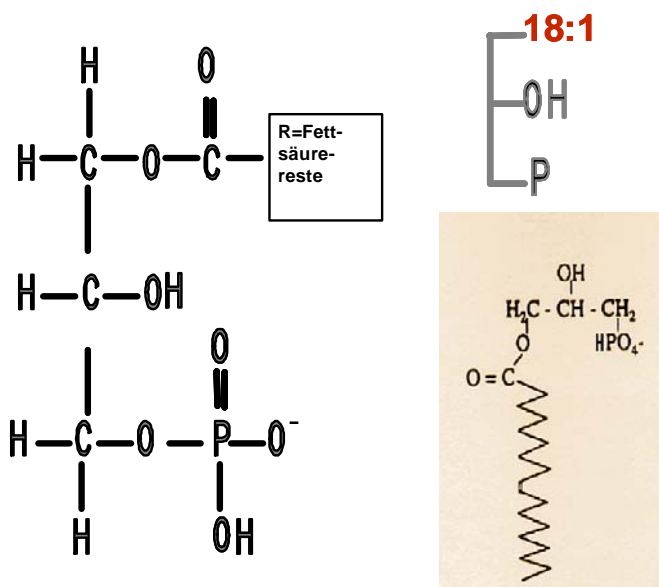
Ein weiteres Modell geht davon aus, dass die Regulierung über die direkte Bindung an den spannungsabhängigen Anionenkanal der Mitochondrien stattfindet. Proapoptotische Moleküle öffnen den Kanal, antiapoptotische schließen ihn (PARONE et al. 2002).

Andere Autoren meinen, dass weitere bekannte mitochondriale Poren reguliert werden. Sie nehmen an, dass die Bcl-2-Familie in die Funktion der sogenannten PTP (Permeability Transition Pore) eingreifen. Dieser sehr große Kanal wird soweit geöffnet, dass Wasser und gelöste Moleküle in das Mitochondrium eindringen können und es zum Anschwellen desselben kommt. Die äußere Membran zerreißt und die im intermembranalen Bereich befindlichen Moleküle treten aus (VANDER-HEIDEN et al. 1997; CROMPTON 1999). Andere Modelle besagen, dass die antiapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder durch Bindung an Apaf-1 die Bildung des Apoptosoms verhindern. Der regulatorische Schritt wird hier also erst nach der mitochondrialen Phase erreicht (STRASSNER et al. 2000). Strassner et al. stellen die Hypothese auf, dass die Bindung von einem proapoptotischen Molekül, wie zum Beispiel Bax, an Bcl-2 zu dessen Konformationsänderung und damit zu einer Umkehrung seiner Funktion führt. Bcl-2 wird proapoptotisch und ist in der Lage, sich an weitere Bcl-2-Moleküle anzulagern und deren Konformation, ähnlich wie es bei Prionen festgestellt wurde, zu verändern. Ob nun nur eine, alle oder keine dieser Hypothesen richtig ist, konnte noch nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden.

Die Möglichkeit des Auftretens atypischer Apoptosen, bei denen ein oder mehrere Charakteristika fehlen können, erschwert den Nachweis apoptotischer Vorgänge. Um in vitro die Spezifität des Apoptosenachweises zu erhöhen, sind immer mehrere Methoden in Kombination zu verwenden (WILLINGHAM 1999).

### 3.3 Lysophosphatidsäure

Es wurde festgestellt, dass einige Lipide in der Signaltransduktion eine Rolle spielen. Ein solches Lipid, für das Rezeptoren an der äußeren Zellmembran bei einer Vielfalt von Zellen gefunden wurden, ist Lysophosphatidsäure (LPA = lysophosphatidic acid). Es handelt sich dabei um Monoacyl-Glycerol-3-Phosphat (siehe Abb. 3.3.1), ein kleines Lysophospholipid, welches bei der Biosynthese von Zellmembranen entsteht. Die Vorläufer sind Phospholipide mit einem Glycerolmolekül als Kernstruktur, wie zum Beispiel Phosphatidylcholin (Lezithin). Diese Phospholipide werden durch die Lysophospholipasen A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> und D gespalten, so dass ein Molekül entsteht, das ein Glycerolgerüst, eine Phosphatgruppe und einen durch eine Acylgruppe verbundenen lipophilen Rest aufweist. Der genaue Mechanismus der Produktion wird noch erforscht (BUDNIK u. MUKHOPADHYAY 2002a).



Struktur von LPA am Beispiel von 18:1-LPA (1-Oleoyl -sn-Glycerol-3-Phosphat).

LPA ist eines der kleinsten Glycerophospholipide, bestehend aus drei strukturellen Domänen:

Ein Phosphatrest, eine Linker-Domäne (Diacylglyceringerüst) und einem lipophilen Terminus (R, Fettsäure, z.B. Ölsäure 18:1).

Lysophosphatidsäure, LPA ( 1-Oleoyl-sn Glycerol-3-Phosphat)

Abb. 3.3.1 Struktur von Lysophosphatidsäure

LPA ist im Serum an Albumin gebunden. Es kann extrazellulär von aktivierten Blutplättchen hergestellt werden. Auch andere Zellen können es lokal herstellen. Hinweise darauf liefern im Bereich der Reproduktionsphysiologie das Vorkommen von LPA in folliculärer Flüssigkeit (TOKUMURA et al. 1999a). Daraus resultiert die Annahme, dass LPA eine physiologische Rolle im Ovar spielen könnte. Bei cancerogenen Veränderungen des Ovars ist ebenfalls eine

Erhöhung der LPA-Konzentration in Bauchhöhlenflüssigkeit und Serum messbar. Für die Produktion durch ovarielle Zellen scheint insbesondere die Lysophospholipase D eine entscheidende Rolle zu spielen (BUDNIK u. MUKHOPADHYAY 2002a; Budnik 2003a). Das Enzym stellt LPA aus Lysophosphatidylcholin (LPC) her, welches in der äußeren Zellmembran zu finden ist (TOKUMURA et al. 1999b). Die molekulare Struktur von Lysophospholipase D konnte bestimmt werden. Es handelt sich um ein schon bekanntes Protein, das Autotaxin. Dieses Molekül wird mit dem Wachstum und der Metastasierung von Tumoren in Verbindung gebracht. Nun stellt sich die Frage, ob Autotaxin diese Vorgänge mit Hilfe der Bildung von LPA beeinflusst. Trotzdem ist der endgültige Produktionsmechanismus von LPA noch immer nicht aufgeklärt (MOOLENAAR 2002).

Die Rezeptoren von LPA entstammen der Gruppe der edg-Rezeptoren (endothelial differentiation genes). Es handelt sich dabei um Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen, die an mindestens drei unterschiedliche G-Proteine gekoppelt sind. So werden viele unterschiedliche Signaltransduktionswege beschrieben. Es konnten Einflüsse von LPA auf Zelldifferenzierung, -proliferation, Umstrukturierungen im Zytoskelett und Zelladhäsion festgestellt werden (YE et al. 2002).

Eine weitere Wirkung von LPA ist die Beeinflussung von apoptotischen Prozessen in mehreren Zellen. YE et al. (2002) fassten die Wirkung von LPA auf die Apoptose, in spezieller Hinsicht auf Schwann'sche Zellen zusammen. Bei diesen Zellen ist eine deutliche, antiapoptotische Wirkung feststellbar, deren Signaltransduktion über Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) und Akt über Proteinkinase B verläuft. Dieser Signaltransduktionsweg ist schon von anderen, für das Überleben der Zellen wichtigen Faktoren bekannt. Der genaue Mechanismus der antiapoptotischen Wirkung ist allerdings nicht geklärt.

LPA aktiviert noch einen weiteren Signaltransduktionsweg zur Verhinderung der Apoptose in Schwann'schen Zellen. Über Rho, eine kleine GTPase, wird eine Intensivierung der Adhäsion der Zellen an die extrazelluläre Matrix bewirkt. Dadurch wird die Apoptose verhindert, da ein Verlust der Adhäsion zur Apoptose führen würde. Eine auf diese Weise hervorgerufene Apoptose nennt man Anoikis. Der über Rho laufende Signaltransduktionsweg soll mit dem oben beschriebenen über PI3K kommunizieren. Ein solcher Zusammenhang konnte schon bei anderen Zellen festgestellt werden. LPA bedient sich bei Schwann'schen Zellen also vieler Wege, um Apoptose zu verhindern.

LPA-Rezeptoren der 3T3-Fibroblastenzellen vermitteln eine Signaltransduktion über spezielle Enzyme, die Mitogen-activated protein Kinasen (MAPK) genannt werden (YE et al. 2002).

Bei anderen Zellen wirkt LPA nachweislich proapoptotisch. Die Neuronen des Hippocampus (HOLTSBERG et al. 1998a), glatte Muskelzellen menschlicher Atemwege (EDIGER et al. 2001) und Myeloid-Vorläuferzellen (LAI et al. 2001) seien beispielhaft erwähnt. Bei letzteren wird der proapoptotische Effekt über die Aktivierung von RhoA ausgeführt, welche eine Verminderung der Zelladhäsion bewirkt. Das würde bedeuten, dass die Signaltransduktion über Rho sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirksam ist.

Andere Zellen wiederum, wie die T-Lymphoblasten, werden durch LPA gegensätzlich beeinflusst. In Anwesenheit von Apoptose induzierenden Molekülen, wie zum Beispiel dem Fas-Liganden, schützt LPA solche Zellen. Ohne derartige Substanzen wirkt LPA proapoptotisch (GOETZL et al. 1999). Der antiapoptotische Effekt bei diesen Zellen scheint über eine Verminderung der Konzentration von Bax erzielt zu werden. Ob das allerdings der entscheidende Faktor ist, ist umstritten, da auch geringe Konzentrationen von LPA, eine antiapoptotische Wirkung zeigen, ohne dabei Bax zu beeinflussen. Eine bei dem momentanen Forschungsstand nicht auszuschließende Möglichkeit, antiapoptotische Effekte zu erzielen, ist die Stimulation und Ausschüttung anderer, für das Überleben der Zelle notwendiger Faktoren. Möglich wären hier Wachstumsfaktoren oder Zytokine (YE et al. 2002).

LPA zeigt also eine gegensätzliche Wirkung auf verschiedene Zellarten, wobei festgestellt wurde, dass die Bindung des Lipides an die gleichen Rezeptoren bei verschiedenen Zellen nicht die gleichen Signaltransduktionswege aktiviert. Dabei sind diese Signaltransduktionswege alle nur teilweise bzw. noch gar nicht erforscht.

Proapoptotische Effekte von LPA werden ebenfalls über unterschiedliche, weitestgehend unbekannte Signaltransduktionswege erzielt. Der sowohl pro- als auch antiapoptotische Weg über Rho wurde schon erwähnt. Er konnte die Apoptose über das Mittel der Zelladhäsion beeinflussen. Einen anderen Weg, proapoptotisch wirksam zu werden, wählt LPA bei Neuronen des Hippocampus. Es wird die Caspasenkaskade über mitochondriale Prozesse aktiviert. LPA kann unter anderem die Ausschüttung von Stickoxid und anderen, reaktiven Sauerstoffverbindungen bewirken, welche zu Dysfunktionen im Mitochondrium führen (HOLTSBERG et al. 1998a, b).



Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Wirkung von LPA vom Zelltyp abhängig ist. Verschiedene Zellarten reagieren unterschiedlich, teilweise gegensätzlich auf das Phospholipid. Zellen verschiedener Art haben unterschiedliche Rezeptoren ungleich starker Ausprägung. Diese Rezeptoren aktivieren verschiedene Signaltransduktionswege, die untereinander noch kommunizieren können. Die äußeren Bedingungen, in denen die Zelle sich befindet, und deren Differenzierungsstadium spielen ebenfalls eine entscheidende Rolle, zumindest bei einigen Zellen (YE et al. 2002).

Es existieren viele Hinweise dafür, dass LPA in der Ovarphysiologie und –pathologie eine wichtige Rolle einnimmt. Abgesehen von den schon erwähnten Beobachtungen als Marker bei cancerogenen Veränderungen des Ovars und der Präsenz LPAs in folliculärer Flüssigkeit konnten die Autoren Budnik und Mukhopadhyay einen deutlichen Effekt sowohl auf normale, als auch auf luteinisierte Thekazellen nachweisen (BUDNIK u. MUKHOPADHYAY 2002b, 2003b). Die Annahme, dass LPA eventuell Einfluß auf apoptotische Geschehen der Thekazellen in der Follikulogenese nimmt, liegt nahe.

## **4. Material und Methoden**

### **4.1 Isolierung und Reinigung der Thekazellen**

#### Material

Die Reagenzien stammten, soweit nicht anders vermerkt, von Sigma, Taufkirchen.

#### Moscona's balanced salt solution (MBSS)

8 g/l NaCl	Merck, Darmstadt
0,3 g/l KCl	Merck, Darmstadt
0,05 g/l Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
0,025 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
1 g/l NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
2 g/l D(+)Glukose	Merck, Darmstadt

#### Kulturmedium

Dulbeccos minimum essential medium (Invitrogen, Karlsruhe) + Ham's F-12 (DMEM/HAM's-F12) im Verhältnis 1:1 versetzt mit:

2 mM Glutamin	
100 U/ml Penicillin	
100 µg/ml Streptomycin	
2,5 % Fötale Kälberserum	BioWhittacker

Enzymlösung

0,5 % Kollagenase Typ IA (w/v)  
0,1 % Hyaluronidase (Typ1-S) (w/v)  
0,1 % Pronase (Protease Typ XXV) (w/v)  
0,1 % Bovines Serumalbumin (w/v)  
in MBSS

Percoll – Lösung (Dichte von 1,07g/ml)

90 ml Percoll Pharmacia, Freiburg  
1,7 ml zehnfach konzentrierte, phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)  
ad 1 l ddH<sub>2</sub>O

Neubauer Zählkammer

Trypanblau

Die zur Gewinnung der Thekazellen verwendeten bovinen Ovarien wurden vom Schlachthof Lüneburg zur Verfügung gestellt. Sie wurden ausschließlich nicht tragenden, zyklischen Rindern entnommen. Nach der Entfernung anhaftender Gewebereste wurde eine erstmalige Reinigung des Materials mit Wasser vorgenommen. Um eine höchstmögliche Keimarmut der Ovarien zu erreichen, wurden diese für 20 Minuten in eine 3%ige Natriumhypochloritlösung verbracht und anschließend mit sterilem Wasser abgespült.

Die Selektion der Follikel erfolgte nach den folgenden Kriterien:

Die Follikel mussten einen Durchmesser von 0,5-2,5 cm aufweisen und die Follikelflüssigkeit klar und frei von Blutbeimengungen sein. Das Ovar durfte kein aktives Corpus luteum tragen.

Die Präparation der Thekazellen erfolgte nach der Methode von BRUNSWIG-SPICKENHEIER und MUKHOPADHYAY (1990), wie nachfolgend beschrieben:

Unter sterilen Bedingungen wurden die selektierten Follikel mit einer Kanüle punktiert und die Follikelflüssigkeit entfernt. Nach einer vollständigen Eröffnung des jeweiligen Follikels wurde die der Thekazellschicht locker aufliegende Granulosazellschicht durch mehrmaliges

Spülen mit Moscona's balanced salt solution (MBSS), unterstützt durch schabende Bewegungen einer Plastikpipette, entfernt. Die nun freiliegende Thekaschicht sollte rosafarben und zart vaskularisiert sein. Die Theka interna konnte mit einem Skalpell von der darunter liegenden Theca externa abpräpariert werden. Das auf diese Weise gewonnene Gewebe wurde nun in einem bereitgestellten Gefäß mit Kulturmedium (DMEM-F12) gesammelt und anschließend gewogen. Nach einer mindestens dreiminütigen Zentrifugation mit 90g, konnten die vereinigten Theca interna Schichten von dem Kulturmedium getrennt und zur Dissoziation der Einzelzellen mit 10ml Enzymlösung pro Gramm Gewebe versetzt werden. In dieser Enzymlösung wurde das Gewebe für 60 Minuten in einem Wasserbad von 37°C unter schüttelnden Bewegungen inkubiert. Um letzte Gewebereste aus der Thekazellsuspension zu entfernen, wurde diese über einen Nylonfilter gegeben. Es folgte ein zweiter Zentrifugationsschritt mit 90g für zehn Minuten, daran anschließend wurden zwei Waschgänge des Zellpellets mit MBSS zur Entfernung von Resten der Enzymlösung durchgeführt. Um die Thekazellen von anderen Zellen, wie z.B. Erythrozyten, und Zelldetritus zu befreien, fand eine Resuspension des Pellets in ca. 3ml Kulturmedium statt. Die Zellsuspension wurde auf einen Percollgradienten mit einer Dichte von 1,07g/ml aufgetragen und zwanzig Minuten bei 900g zentrifugiert. Die Thekazellen setzten sich auf dem Gradienten ab, während kleinere Partikel, wie z. B. Erythrozyten und Zelldetritus die Percolllösung durchdringen konnten und ein Pellet auf dem Gefäßboden bildeten. Die Thekazellschicht konnte abgenommen und in Kulturmedium resuspendiert werden. Darauf folgten zwei Waschgänge unter Verwendung von Kulturmedium. Für den zweiten Waschgang wurde eine definierte Menge Medium eingesetzt, um eine Zellzählung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer zu ermöglichen. So konnten die Zellen nach der Präparation in der entsprechenden Menge Medium aufgenommen und in der gewünschten Anzahl auf die Kulturplatten verteilt werden.

Eine anschließend durchgeführte Vitalitätsprüfung wurde mit der Trypanblau-Färbemethode durchgeführt, bei der sich nur tote Zellen anfärben. Sie ergab einen Anteil vitaler Zellen von 80-90%.

## 4.2 Kultivierung der Thekazellen

### Material

Die Reagenzien stammten, soweit nicht anders vermerkt, von Sigma, Taufkirchen.

Grundmedium:

DMEM/HAM's F-12

2,5% hitzedeaktiviertes, fötales Kälberserum (FCS)

2mM Glutamin

100U/ml Penicillin

100µg/ml Streptomycin

Bovines Hautkollagen

Cellon, Strassen, Luxemburg

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

### Kulturbehälter

Behälter	Eingesetzte Zellzahl	Bezugsquelle
TC-25-Kulturflaschen (Fläche von 25 cm <sup>2</sup> )	2,5 Mio.	LAB-TEK, Nunc, Wiesbaden
8-Well gekammerte Objektträger	50.000 pro Kammer	LAB-TEK, Nunc, Wiesbaden
6-Well-Platten	2 Mio. pro Kammer	LAB-TEK, Nunc, Wiesbaden
48-Well-Platten	25.000 pro Kammer	LAB-TEK, Nunc, Wiesbaden

**Tab. 4.2.1 Anzahl der eingesetzten Zellen**

Die Böden der Kulturbehälter wurden durch eine einstündige Inkubation mit 0,3%igem Cellon Kollagen bei 37°C beschichtet.

Die Zellen wurden im Grundmedium für 48h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert, um ihnen ein Absetzen auf der Kollagenschicht des Gefäßes zu ermöglichen. Je nach Art des verwendeten Kulturgefäßes wurden unterschiedliche Zellzahlen eingesetzt (siehe Tab. 4.2.1). Danach erfolgte ein Wechsel des Mediums. Das eingesetzte Medium wies eine geringere Konzentration fötalen Kälberserums auf (1.5%). Die Zellen wurden in diesem Medium für 72h belassen. Danach erfolgte ein weiterer Mediumwechsel, wobei die Zellen der gewünschten Stimulation ausgesetzt wurden. Die Dauer der Stimulation differierte, je nach

Versuchsaufbau, von 120 Minuten bis zu sieben Tagen. Einzelheiten zur Apoptoseeinleitung werden im Abschnitt „Ergebnisse“ besprochen.

Die stimulierten Zellen wurden, soweit sie in T-25-Kulturflaschen kultiviert waren, mit Hilfe eines Zellschabers von der Oberfläche entfernt und abzentrifugiert. Nach Durchführung eines Waschschrittes mit PBS wurde das Zellpellet bei  $-40^{\circ}\text{C}$  für kurze Zeit gelagert.

In gekammerten Objektträgern (=Chamber Slides) kultivierte Zellen wurden nach der Stimulation zur weiteren Behandlung fixiert.

Nach einigen ergebnislosen Versuchen zum Nachweis der Apoptose mit Hilfe einer DNA-Leiterbildung (siehe Kapitel 4.6) wurde die Stimulation der Zellen bei einigen Versuchen erst nach einem 24-48 stündigen Serumentzug vorgenommen. Hierdurch sollten die Zellen synchronisiert werden. Dann wurde die gewünschte Stimulation durchgeführt. Alle 48 Stunden wurde das Medium entnommen und zentrifugiert. Vom Zellrasen gelöste, apoptotische Zellen und deren vesikulären Reste sollten auf diese Weise im Pellet erfasst werden und durch Lagerung bei  $-40^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Behandlung erhalten bleiben, um dem Verlust durch sekundäre Nekrose vorzubeugen. Die dem Kulturbedeälter anhaftenden Zellen wurden erneut inkubiert.

Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen eines Kulturbedeälters gemeinsam mit den zuvor von dem entsprechenden Behälter gewonnenen Pellets verwendet.

### **4.3 Zellkulturen zur Herstellung von Kontrollen**

#### **4.3.1 Kultivierung von HL-60-Zellen**

##### Material

Die Reagenzien stammten, soweit nicht anders vermerkt, von Sigma, Taufkirchen.

*Grundmedium:*

DMEM/HAM's F-12

10 % FCS

2mM Glutamin

Flow Laboratories, Meckenheim

100U/ml Penicillin

Flow Laboratories, Meckenheim

100µg/ml Streptomycin

Flow Laboratories, Meckenheim

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

Die promyeloische Leukämie-Zelllinie HL-60 wurde als Kontrolle im Western Blot für das Protein Bax verwendet. Das in flüssigem Stickstoff aufbewahrte Aliquot wurde schnell aufgetaut und die Zellen abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal mit Grundmedium gewaschen und dann in 5 ml Grundmedium suspendiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> in T-25-Flaschen. Das Medium musste alle zwei Tage erneuert werden. Dafür wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, das alte Medium verworfen und das Zellpellet in neuem Grundmedium suspendiert. Ein Teil der Zellen diente dem Erhalt der Zelllinie. Die übrigen Zellen standen der Proteingewinnung zur Verfügung.

#### **4.4 May-Grünwald/Giemsa-Färbung**

##### Material

Die Reagenzien stammen, soweit nicht anders vermerkt, von Merck, Darmstadt.

PBS (s.o.)

Methanol

Giemsa-Pulver

May-Grünwald-Lösung

Um die May-Grünwald/Giemsa-Färbung der Zellen durchzuführen, verwendete ich ausschließlich Zellen, die auf 8-Well Mikroskopplatten inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal fünf Minuten mit PBS gewaschen. Danach fand eine Fixation mit Methanol statt. Die Zellen wurden für zehn Minuten mit verdünnter May-

Grünwald-Lösung (6,7% in Wasser) und danach zwanzig Minuten mit Giemsa-Lösung (0,25% w/v in Methanol) inkubiert und anschließend unverzüglich mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Zellen konnten nun unter dem Mikroskop mit Durchlicht betrachtet und die Bilder mit Hilfe einer Digitalkamera festgehalten werden.

Bei dieser Zellfärbung färbt die May-Grünwald-Lösung selektiv das Zytoskelett, die Giemsa-Lösung den Zellkern an.

## 4.5 Fluoreszenzmikroskopie

### 4.5.1 Kernfärbung

#### Material und Geräte

Die Reagenzien stammten, soweit nicht anders vermerkt, von Sigma, Taufkirchen.

PBS	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd, 3%ig	Merck, Darmstadt
Fluoreszenzmikroskop	Nikon
Digitalkamera	Leica

#### *DNA- Markierung:*

BisBenzimide H 33342, Hoechst-Farbstoff	Sigma, Taufkirchen
---	--------------------

Im Zuge der Apoptose findet eine Fragmentierung des Zellkerns statt. Die unversehrten Kerne oder aber die Kernfragmente können mit Hilfe von Kernfärbungen dargestellt werden (OLIVERA et al. 1999).

Die Zellen wurden für diese Methode in 8-Well Objektträgern kultiviert und nach der Stimulation dreimal fünf Minuten mit PBS gewaschen. So konnten alle Reste des Mediums entfernt werden. Es folgte eine Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd für 30 Minuten. Durch dreimaliges Waschen mit PBS für fünf Minuten konnten Reste von Paraformaldehyd aus den Kammern entfernt werden. Die Kernfärbung mit BisBenzimide erfolgte durch eine 60 minütige Inkubation der Zellen in dem Wirkstoff unter Ausschluss von Licht. BisBenzimide



lag in einer Konzentration von 5µg/ml in H<sub>2</sub>O vor. Um die Fluoreszenz zu erhalten, erfolgten alle darauf folgenden Schritte unter Ausschluss von Licht. Um den nicht angelagerten Wirkstoff vollständig zu entfernen, wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen.

Die Zellen konnten dann mit Hilfe der differentiellen Interferenzphasenkontrastmikroskopie (Nomarski-Optik) und der Fluoreszenzmikroskopie betrachtet und die Bilder mit der Digitalkamera festgehalten werden.

Zur Beobachtung der Fluoreszenz wurden Nikon Filterblocks verwendet. Um die Fluoreszenz von BisBenzimide betrachten zu können, wurde eine Excitationswellenlänge von 330-380 nm gewählt. Der Sperrfilter ließ eine Wellenlänge von 435-485 nm passieren.

Zur Auswertung wurden fünf unterschiedliche Bildausschnitte festgehalten. Dabei wurde darauf geachtet, sowohl die zellreichen, mittleren Bereiche einer Kammer als auch am Rand befindliche Bereiche zu dokumentieren (n=5). Die Zellen wurden gezählt. Danach wurden sie auf morphologische Kriterien hin betrachtet und in apoptotische und gesunde Zellen eingeteilt. Die als apoptotisch eingeschätzten Zellen hatten einen stärker leuchtenden, kleineren Zellkern, waren abgerundet, erschienen dadurch kleiner als die übrigen Zellen und waren abgehoben von der Unterlage. Einige der apoptotischen Zellen zeigten die typische Verlagerung der DNA an die Kernmembran oder hatten schon eine Kernfragmentierung vollzogen. Bei ihnen konnte man dicht aneinanderliegende, hell mit Hoechst angefarbte Fragmente erkennen, wobei die Zelle im Phasenkontrast das sogenannte „Blebbing“ zeigte.

### **4.6 DNA-Leiterbildung**

Wie schon in der Literaturübersicht (Kapitel 3.2.3.2 b) beschrieben, wird bei der Apoptose der meisten Zellen die genomische DNA in Teilstücke von X mal 180 bp geteilt. Da Nukleinsäuren Phosphatgruppen enthalten, wandern sie in einem elektrischen Feld in Richtung Anode. Dies kann man sich bei einer Gelelektrophorese zunutze machen. Je kürzer die DNA- Moleküle sind, desto schneller bewegen sie sich in einem Agarosegel in Richtung Anode. Die apoptotischen Fragmente stellen sich bei einer Gelelektrophorese in Form einer Leiter dar. Diese ist ein eindeutiges Zeichen für das Vorliegen eines apoptotischen Geschehens.

#### 4.6.1 Präparation der genomischen DNA

Die Präparation der genomischen DNA wurde mit Hilfe des „Apoptotic DNA Ladder Kit“ von Roche vorgenommen. Hierbei kamen folgende Materialien zum Einsatz:

Binding/Lysis Puffer: 6M Guanidinium-HCl, 20% TritonX-100 (v/v), pH 4,4

Wasch-Puffer: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5

Eluations-Puffer: 10mM Tris, pH 8,5

Glasfaserfilterröhrchen mit den entsprechenden Auffangröhrchen

RNAse, DNase frei Roche, Mannheim

Isopropanol Merck, Darmstadt

Nach Anweisung des Herstellers kamen ca.  $2 \times 10^6$  Zellen in 200 $\mu$ l PBS zum Einsatz. Sie wurden mit 200 $\mu$ l des „Binding/Lysis“ Puffers versetzt und 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert, um die Zellen zu zerstören und die DNA freizusetzen. Daraufhin wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 $\mu$ l Isopropanol gestoppt und die DNA präzipitiert. Die entstandene Mischung wurde durch eine einminütige Zentrifugation bei 5900g in einer Standard-Tischzentrifuge durch den Glasfaserfilter getrieben. Der Filter fing die genomische DNA ab und ließ die übrigen Substanzen passieren. Zwei weitere Zentrifugationsschritte unter Verwendung von 500 $\mu$ l des Waschpuffers reinigten den Filter von eventuell noch vorhandenen Zellbestandteilen. Es folgten 10 Sekunden Zentrifugation bei 15700 g in der Standard-Tischzentrifuge, um Reste des Waschpuffers aus dem Filter zu entfernen. Nun konnte die Eluation der genomischen DNA in einen frischen Auffangbehälter mit Hilfe des Eluations-Puffers erfolgen. Bei dieser Reaktion spielte die Temperatur eine entscheidende Rolle. Um die DNA aus dem Filter eluieren zu können, mußte der verwendete Puffer eine Temperatur von 70°C aufweisen.

Nach einigen Versuchen konnte ich feststellen, dass auch ein Anteil an RNA mit dem Kit isoliert wurde. Um diese RNA- Fragmente aus den Proben zu entfernen, habe ich die Proben der genomischen DNA mit 2  $\mu$ g/ml DNase freier RNAse versetzt und für 20 Minuten bei 15-20° C inkubiert.

#### 4.6.2 Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren

##### Material und Gerät

UV-Spektrophotometer (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Cambridge, UK)

10 mM Tris- Lösung, pH 7,4

Bei der auf die oben beschriebene Weise gewonnenen DNA konnte die Konzentrationsbestimmung mit Hilfe der Absorptionsspektrometrie bei 260 nm durchgeführt werden. Nach Einbringen der Probe ermittelte das oben genannte UV- Spektrophotometer die Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die optische Dichte von 1 ( $OD_{260} = 1$ ) entsprach dabei 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bei einer Küvette mit einer Schichtdicke von 10 mm.

Zur Konzentrationsbestimmung wurden 1 µl Probe mit 99 µl 10 mM Tris-Lösung verdünnt und in die vorgesehene Quarzküvette überführt. Zuvor fand ein Nullabgleich des Gerätes mit 100 µl Tris-Lösung statt.

Errechnung der Konzentration:

$OD_{260} \times 50$  (Faktor für DNA)  $\times 100$  (Verdünnungsfaktor) : 1000 = X µg DNA/µl

#### 4.6.3 Fällung der DNA

##### Material

Die Reagenzien stammen, soweit nicht anders vermerkt, von Merck, Darmstadt

3M Natriumacetat (NaAc), pH 4,9

Ethanol, absolut

10mM Tris, pH 7,4

Im weiteren Verlauf sollte die DNA in einer Endkonzentration von 0,3 µg/µl vorliegen. Da einige der Proben eine geringere Konzentration aufwiesen, musste hier eine Fällung der DNA vorgenommen werden.

Die Proben wurden mit 3M NaAc, pH = 4,9, in einem Verhältnis von 1:10 versetzt und das zweieinhalbfache an absolutem Ethanol hinzugegeben. Danach lagerten die Proben mindestens zwei Stunden, wenn möglich über Nacht, bei -20° C im Gefrierschrank. Nun konnte die DNA durch Zentrifugation in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 4° C und 16900 g über 40 Minuten gewonnen werden. Das Pellet wurde zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach sorgfältiger Entfernung des Ethanols in 10mM Tris-Lösung mit einem pH von 7,4 aufgenommen. Dabei konnte die gewünschte Endkonzentration der DNA eingestellt werden.

Eine Erhöhung der Konzentration der DNA war nicht in jedem Fall notwendig.

#### **4.6.4 Herstellung des Agarosegels zur DNA-Elektrophorese**

##### Material und Geräte

Die Reagenzien stammen, soweit nicht anders vermerkt, von Merck, Darmstadt

##### TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer)

5,4 g Tris  
2,8 g Borsäure  
800 ml H<sub>2</sub>O  
2 ml EDTA (0,5 M)  
pH 8,0  
ad 1000 ml

##### 50 x TAE (Tris-Acetat-EDTA)

121 g Tris  
28,55 ml Eisessig  
50 ml 0.5 M EDTA (pH 8,0)  
ad 500 ml H<sub>2</sub>O

Agarose (Ultra Pure)	Invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromidstammlösung (500µg/ml)	Sigma, Taufkirchen
Horizontales Gelsystem	AGS, Heidelberg
Gelkämme	AGS, Heidelberg
Mikrowellenofen	Sharp Electronics GmbH, Hamburg

Zur Auftrennung der genomischen DNA-Fragmente nach ihrer Größe diente ein 1%iges Gel. Ein Gramm Agarose wurde in 98 ml sterilem, deionisiertem Wasser durch zweimaliges Aufkochen in einer Mikrowelle bei ca. 600 W gelöst. Nach Abkühlung der Lösung auf eine Temperatur von ca. 60°C wurde sie mit 2 ml 50 x TAE und 5µl Ethidiumbromid versetzt. Alternativ erfolgte eine Pufferung mit TBE-Puffer. Es wurden 100 ml TBE Puffer eingesetzt. Nun konnte das Gel in die entsprechende Vorrichtung der Elektrophoresekammer gegossen und der Kamm zur Schaffung der Wells eingesetzt werden. Die Bildung von Luftblasen im Gel musste vermieden werden, um eine regionale Veränderung des Laufverhaltens der DNA-Proben zu verhindern.

Nach Abkühlung und damit erfolgter Verfestigung des Gels konnte der Kamm entfernt und das Gel in den Elektrophorese-Tank gelegt werden. Der Tank wurde mit 1 x TAE-, bzw. 1 x TBE-Laufpuffer so weit gefüllt, dass das Gel gerade mit Puffer bedeckt war.

#### **4.6.5 Elektrophoretische Auftrennung der DNA**

##### Material und Geräte

Die Reagenzien stammten, soweit nicht anders vermerkt, von Merck, Darmstadt

##### 10 x Ladepuffer

0,1 g Natriumdodecylsulfat  
25 mg Bromphenolblau  
ad 7 ml H<sub>2</sub>O  
3 ml Glycerin

DNA-Längenstandards III (0,12-21,2 kbp)	Roche, Mannheim
Horizontales Gelsystem	AGS, Heidelberg
Stromversorgung, Consort E122	AGS, Heidelberg
UV- Tisch	
Videodokumentationssystem	

Proben, Positivkontrolle und DNA-Längenstandard wurden unmittelbar vor dem Auftragen auf das Agarosegel mit Ladepuffer im Verhältnis 10:1 versetzt. Das hohe spezifische Gewicht des Ladepuffers verhinderte ein Aufschwimmen der Proben. Die Elektrophorese wurde daraufhin mit einer Spannung von 75 V für eineinhalb Stunden durchgeführt. Da Ethidiumbromid bei einer Elektrophorese in Richtung Kathode wandert, wurden in einigen Fällen die nahe der Anode befindlichen DNA-Fragmente nicht ausreichend angefärbt. Um diese Fragmente ebenfalls anzufärben, lagen die betroffenen Gele für 20-30 Minuten bei 4° C in einer Ethidiumbromidlösung (5 µl Stammlösung in 100 ml autoklaviertem H<sub>2</sub>O). Die niedrige Temperatur verminderte die Diffusion der DNA im Gel.

Ethidiumbromid lagert sich in die DNA-Stränge ein und fluoresziert unter Anregung mit UV-Licht. Die DNA konnte also auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht und photographiert werden.

## **4.7 Bestimmung der Konzentrationen von zyklischem AMP (cAMP) und Progesteron**

### **4.7.1 cAMP-TRFIA mit Acetylierung**

Der Meßbereich dieses Assays lag bei 2- 486 fmol/50 µl bzw 0,04-9,72 pmol/ml.

Die Reagenzien stammten, soweit nicht anders vermerkt, von Merck, Darmstadt.

Material

Mikrotiter-Platten (Lab-Tec, Nunc, Wiesbaden):

FluoroNunc™ Module inklusive Rahmen und Deckel

Beschichtet mit  $\gamma$ -Globulin gegen Kaninchen aus der Ziege

Probenpuffer

0,10 M Natriumphosphat

0,15 M NaCl

1,0 mM EDTA

0,2 % Bovines Serum Albumin (BSA) (w/v)

0,01 % Tween 20 (v/v)

0,01 % Thimerosal (v/v)

pH 7,0

cAMP-Antiserum

MS1, Kaninchen

1:300 verdünnt in Probenpuffer

0,0005% Methylorange (w/v)

cAMP-DTPA-Eu<sup>3+</sup> (Tracer)

Lyophilisiertes Stock, wird mit Indikatorpuffer auf ca. 60.000 cps/50 $\mu$ l eingestellt

Indikatorpuffer

0,1 M Tris/HCl

0,1 % NaN<sub>3</sub> (w/v)

0,9 % NaCl (w/v)

0,01 % Tween 20 (v/v)

0,1 % BSA (w/v)

0,0005 % Bromphenolblau (v/v)

pH 7,5

cAMP-Standard-Lösung (10 nmol/ml H<sub>2</sub>O)

Waschpuffer

0,02 % Tween 20 in H<sub>2</sub>O (v/v)

0,5 % NaCl (w/v)

Verstärkerlösung

15 µM Naphtoyltrifluoroacetone (β-NTA)

50 µM Trioctylphosphinoxid (TOPO)

0,1 M Acetylsäure

0,1 % Triton X-100

Mit Kalium Hydrogenphthalat auf pH 3,2 einstellen

Acetylierungsreagenz

Essigsäureanhydrid

Sigma, Taufkirchen

Triethylamin

Sigma, Taufkirchen

(im Verhältnis 1:2)



Die Abkürzung TRFIA steht für Time resolved Fluoro-Immunoassay. Dieses Assay beruht auf einem kompetitiven Doppelantikörper Immunoassay.

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit Antikörpern aus der Ziege, die gegen  $\gamma$ -Globuline des Kaninches gerichtet sind, beschichtet. 50  $\mu$ l der Proben und der Standards werden zuerst mit 100  $\mu$ l aus Kaninchen stammenden Antiserum gegen cAMP und 50  $\mu$ l cAMP-Europium-Chelat versetzt. Das cAMP in der Probe (bzw. Standard) konkurriert nun mit dem cAMP-Europium-Chelat um die Bindungsstellen der Antikörper. Hierbei handelt es sich um eine kompetitive Reaktion. Das Antiserum bindet an die gegen Kaninchen gerichteten Antikörper, mit denen die Wells der Platten beschichtet sind. Durch gründliche Waschschrte werden die nicht gebundenen Tracer-Anteile entfernt. Durch die nun zugegebene, saure Verstärkerlösung wird das Europium von dem Chelat dissoziiert. Dieses bildet mit den Komponenten der Verstärkerlösung einen stabilen Komplex und zeigt eine Fluoreszenz, die gemessen werden kann. Je geringer die Fluoreszenz also in einem Well ist, desto höher ist der cAMP-Anteil der Probe.

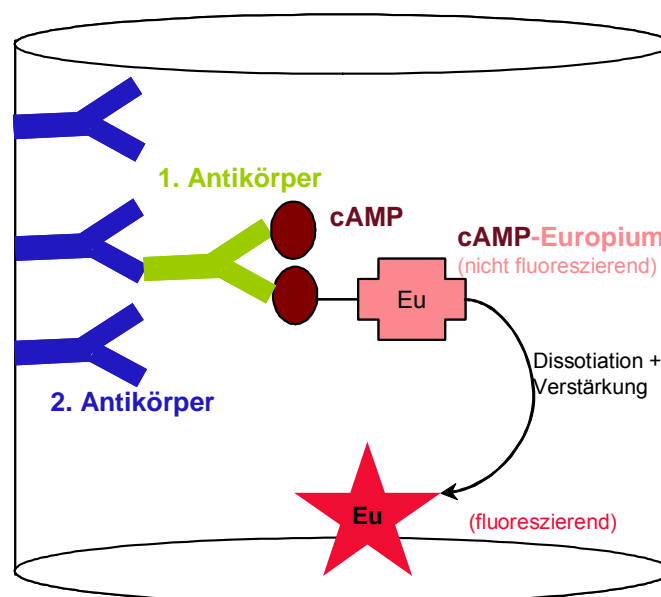


Abb. 4.7.1 cAMP-FIA: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips

Vorgehensweise:

Die Zellen wurden in einer 48-Well-Platte kultiviert und mit unterschiedlichen Konzentrationen von LH und Forskolin für 4, bzw. 26 Stunden inkubiert. All diese Inkubationen fanden in Anwesenheit von 0,2 mM 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (IBMX),

einem nicht spezifischen Phosphodiesterase (PDE)-Inhibitor, statt. Nach Verstreichen der Inkubationszeit wurde das Medium abgezogen und mit 2 ml 100%igem Ethanol versetzt und über Nacht zur Proteinfällung inkubiert. Die Proben wurden bei 1000 g für 30 Minuten zentrifugiert, unter Vakuum getrocknet und in 500 µl H<sub>2</sub>O rückgelöst. Es mussten die Standardlösungen für den Assay aus der oben genannten Stocklösung hergestellt werden:

Nr.	Konzentration (pmol/ml)	Ansatz
6	9,72	9,7 µl Stocklösung + 9,97ml Probenpuffer
5	3,24	1500 µl Nr. 6 + 3 ml Probenpuffer
4	1,08	500 µl Nr. 6 + 4 ml Probenpuffer
3	0,36	154 µl Nr. 6 + 4 ml Probenpuffer
2	0,12	50 µl Nr. 6 + 4 ml Probenpuffer
1	0,04	16,5 µl Nr. 6 + 4 ml Probenpuffer
0	0	4 ml Probenpuffer

**Tab. 4.7.1 Pipettierschema zur Herstellung der Standardlösungen**

Nun folgte die Acetylierung von Standards und Proben. 500 µl Probe (bzw. Standard) wurden dafür mit 25 µl Acetylierungsreagenz versetzt. Hierfür durften ausschließlich Glasgefäße verwendet werden. Die Lösungen wurden sofort nach der Vermengung für mindestens fünf Sekunden gevortext.

Danach wurden die Mikrotiterplatten mit 300 µl Probenpuffer je Well für eine Minute gewaschen. Die Versuchskomponenten wurden daraufhin vermengt, wie es in dem folgenden Pipettierschema verzeichnet ist.

Well	Standard	Probe	Medium	Probenpuffer	1. Antikörper	Tracer	Total
NSB	-	-	50 µl	100 µl	-	50 µl	200 µl
B <sub>0</sub>	-	-	50 µl	-	100 µl	50µl	200 µl
Standard	50 µl	-	-	-	100 µl	50 µl	200 µl
Probe (B)	-	50 µl	-	-	100 µl	50 µl	200 µl

**Tab. 4.7.2 Pipettierschema zur Detektion des cAMP-Gehaltes in Thekazellen**  
NSB = nicht-spezifische Bindung, B<sub>0</sub> = Nullstandard

Es fand eine zwanzigstündige Inkubation der Mikrotiterplatte bei 0-4° C unter Lichtausschluß statt. Danach wurden vier automatische Waschgänge mit Waschpuffer von jeweils einer Minute durchgeführt. Nach Zugabe von 200 µl Verstärker pro Well folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Die Fluoreszenz der einzelnen Wells konnte nun mit Hilfe eines Fluoreszenzphotometers als counts per second (cps) gemessen und mit der Software ausgewertet werden (Easy FIT, SLT-Labinstruments, Prism 3,0, Graph-Pad-Software). Dabei wurden zur Anregung der Fluoreszenz 340 nm verwendet und die Emission bei 615 nm gemessen.

Zur Auswertung diente die SLT-Easyfit-Software. Von allen Messwerten wurde die nicht-spezifische Bindung (NSB) abgezogen. Die so ermittelten Werte mussten dann durch die Fluoreszenz des NSB-korrigierten Nullstandards (Nullstandard = B<sub>0</sub>) dividiert werden. Dieser Quotient wurde mit 100 multipliziert:

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{CPS}_{\text{Standard/Probe}} - \text{CPS}_{\text{NSB}}}{\text{CPS}_{\text{Nullstandard}} - \text{CPS}_{\text{NSB}}}$$

Die linearen CPS-Werte der Standards wurden gegen die logarithmische Konzentration der Standards als Graph dargestellt.

#### 4.7.2 Progesteron-Elisa

##### Material

##### Mikrotiter-Platten:

FluoroNunc™ Module inklusive Rahmen und Deckel      Lab-Tec, Nunc, Wiesbaden  
Beschichtet mit γ-Globulin gegen Kaninchen aus der Ziege

E-NAP-Puffer

0,2 M Natriumacetat

0,9 % NaCl (w/v)

0,2 % BSA (w/v)

0,01 % Thimerosal (w/v)

pH 4,0

E-PBS-Puffer

0,1 M Natriumphosphat

0,15 M NaCl

0,005 M EDTA

0,2 % BSA (w/v)

0,01 % Thimerosal (w/v)

pH 7,0

Progesteron-Antiserum

1 : 50.000 in E-NAP- Puffer

0,0005 % Metanilgelb

Progesteron-11 $\alpha$ -Biotin (Tracer)

40 fMol/ml in E-NAP-Puffer

0,0005 % Bromphenolblau

Progesteronstandard (3,402  $\mu$ g/ml E-PBS-Puffer)

Substratpuffer (Lagerung unter Lichtausschluß)

4,8 M Natriumacetat

0,24 M Zitronensäure

0,2 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Horseradish Peroxidase (HRP)-Streptavidin-Stocklösung (167µg/ml)

HRP-Streptavidin-Lösung (150 ng/ml Endkonzentration)

20 µl HRP-Streptavidin-Stocklösung

22 ml kalte E-PBS-Puffer

HRP-Substratlösung

25 ml H<sub>2</sub>O

500 µl Substratpuffer

500 µl 0,2 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

500 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB, in Dimethylsulphoxid gelöst)

Waschpuffer

0,02 % Tween 20 (w/v) in H<sub>2</sub>O

0,5 % NaCl (w/v)

2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Nr.	Konzentration (ng/ml)	Ansatz
6	34,02	90 µl Stocklösung + 8910 µl Probenpuffer
5	11,34	3000 µl Nr. 6 + 6000 µl Probenpuffer
4	3,78	3000 µl Nr. 5 + 6000 µl Probenpuffer
3	1,26	3000 µl Nr. 4 + 6000 µl Probenpuffer
2	0,42	3000 µl Nr. 3 + 6000 µl Probenpuffer
1	0,14	3000 µl Nr. 2 + 6000 µl Probenpuffer
0	0	9000 µl Probenpuffer

**Tab. 4.7.3 Pipettierschema zur Herstellung von sechs Standard verdünnungen und Nullwert**

Der Progesteron-ELISA mit zwanzigstündiger Inkubation hat einen Messbereich von 0,14 – 34,02 ng/ml, was einem Progesterongehalt von 7-1701 pg/Well entspricht.

Er beruht, wie auch der oben genannte cAMP-FIA, auf einer kompetitiven Immunreaktion, wobei Tracer und Proben, bzw. Standards um die Bindungsstellen für Progesteron an dem Antiserum konkurrieren. Der entstandene Immunkomplex wird an die Antikörper gebunden, die die Oberfläche der Mikrotiterplatten beschichten. Ein Waschgang entfernt alle nicht gebundenen Komponenten. Der oben genannte HRP-Streptavidin-Komplex wird nun zugegeben und bindet an Biotin des Tracers. Dies bewirkt einen Farbumschlag des Tetramethylbenzidins von farblos in blau. Danach hinzugefügtes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bewirkt einen weiteren Farbumschlag von blau in gelb. Die Intensität der Farbe ist dabei negativ proportional zum Progesterongehalt im Well.

Die mit  $\gamma$ -Globulin beschichteten Immuno-Module wurden mit E-NAP-Puffer für zwei Minuten gewaschen. Nach gründlicher Entfernung aller Pufferreste wurde der Versuch angesetzt, wie in dem folgenden Pipettierschema beschrieben:

Wel	Standard	Probe	Medium	E-NAP-Puffer	1. Antikörper	Tracer	Total
NSB	-	-	50 µl	100 µl	-	50 µl	200 µl
B <sub>0</sub>	50 µl	-	-	-	100 µl	50 µl	200 µl
Standard	50 µl	-	-	-	100 µl	50 µl	200 µl
Probe (B)	-	50 µl	-	-	100 µl	50 µl	200 µl

**Tab. 4.7.4 Pipettierschema zur Detektion des Progesterongehaltes in Thekazellen**  
NSB = nicht-spezifische Bindung, B<sub>0</sub> = Nullstandard

Es folgte eine zwanzigstündige Inkubation bei Dunkelheit und 4° C. Danach wurde die Mikrotiterplatte entleert und gründlich ausgeklopft. 200 µl der neu angesetzten HRP-Streptavidin-Lösung wurden pro Well hinzugegeben und eine dreißigminütige Inkubation bei Dunkelheit und 4° C durchgeführt. Es folgten vier Waschgänge mit 400 µl Waschpuffer pro Well. Danach wurden 250 µl frisch angesetzte HRP-Substratlösung pro Well hinzugegeben und eine vierzigminütige Inkubation in einer feuchten Kammer bei Dunkelheit und Raumtemperatur durchgeführt. Es folgte eine Zugabe von 50 µl 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro Well.

Nun wurde die Farbintensität durch eine Messung der optischen Dichte mit Hilfe eines Photometers festgestellt (Easy FIT, SLT-Labinstruments). Dies erfolgte auf die gleiche Art, wie bei dem cAMP-TRFIA schon beschrieben. Das Photometer maß in diesem Fall die optische Dichte, und nicht die cps. Die linearen OD-Werte der Standards wurden gegen die logarithmische Konzentration der Standards als Graph dargestellt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Windows-EXEL-Software.

## **4.8 Western-Blot Analyse der Zellproteine**

### **4.8.1 Herstellung von Zellhomogenaten**

#### Material und Gerät

Die Reagenzien stammten, soweit nicht anders vermerkt, von Sigma, Taufkirchen.

#### Homogenisierungspuffer

410 mM Tris(hydroxymethyl-)aminomethan-HCl Merck, Darmstadt

1 mM Dithiothreitol

10 µg/ml Leupeptin

1 µg/ml Pepstatin

1 µg/ml Amastatin

pH 7,4

Saccharose

Ultraschallgerät, Typ B 12

Branson Sonic Power Co., Danbury, CT

Glasdouncer

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers gelöst und durch Zentrifugation vom Kulturmedium getrennt. Das Zellpellet wurde in 250 µl Homogenisierungspuffer in einem Glasdouncer homogenisiert. Danach erfolgte eine weitere Zerkleinerung des Homogenates mit dem Ultraschallstab, zweimal 10 Sekunden bei einer Einstellung der Stärke 2. Dem Homogenat wurde Saccharose in einer Endkonzentration von 0,25 mM zugefügt.

#### **4.8.2 Gewinnung von Membran-, Kern- und Zytosolfraktion**

##### Material

Centricon Zentrifugen-Filtereinheiten                      Amicon-Millipore, Eschborn  
mit einer nominalen Molekulargewichtsgrenze von 10.000 Da

Um die Zellproteine nach ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle differenzieren zu können, musste mit Hilfe der Ultrazentrifugation eine Aufteilung in Membran-, Kern- und Zytosolfraktion durchgeführt werden. Die Zellen wurden in 1 ml Homogenisierungspuffer mit dem Glasdouncer zerkleinert. Zur Gewinnung der Kernfraktion fand eine Zentrifugation der Zellfragmentlösung bei 200 x g und 4° C für 10 Minuten statt. Das entstandene Pellet stellte die Kernfraktion dar. Um die Membranfraktion von der Zytosolfraktion zu trennen, mußte der Überstand in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt und bei 40000 x g und 4° C für 60 Minuten zentrifugiert werden. Die die Membran- und Kernfraktion enthaltenden Pellets wurden in Homogenisierungspuffer mit 0,25 M Saccharose resuspendiert. Der Überstand stellte die Zytosolfraktion dar. Diese konnte mit Hilfe der Centricon Zentrifugen-Filtereinheiten konzentriert werden.

#### **4.8.3 Proteinbestimmung**

##### Material und Gerät

Ovalbumin	Sigma, Taufkirchen
Mikrotiterplatten, 96-well	Nunc, Wiesbaden
0,5M NaOH	Merck, Steinheim



ELISA-Reader  
4 x Probenpuffer Roti Load

SLB-Instruments, Easy Fit  
Roth, Karlsruhe

Proteinfärbe-Reagenz  
Bio Rad Protein Assay, Dye Reagent-Konzentrat

Bio Rad, München

Die Proteinbestimmung wurde nach der von Bradford 1976 beschriebenen Methode durchgeführt. Diese Methode bedient sich der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie brilliant blue G-250 bei Bindung an Proteine von 465 nm auf 595 nm.

Als Standard wurden Verdünnungen einer Stammlösung Ovalbumin erstellt, die Konzentrationen von 4, 8, 12 und 16 µg/100µl aufwiesen.

Sowohl für die Eichkurve als auch für die Proben fanden Doppelbestimmungen statt.

100 µl des Standards wurden mit 100 µl 0,5 M NaOH und 600 µl ddH<sub>2</sub>O versetzt. 5-10 µl der Proben wurden, je nach vermuteter Konzentration, mit 100 µl 0,5 M NaOH versetzt und danach auf 800 µl mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Als Nullwert wurden 700 µl ddH<sub>2</sub>O, mit 100 µl 0,5 M NaOH versetzt, verwendet. Zu allen Proben wurden daraufhin 200 µl Proteinfärbe-Reagenz hinzugefügt und vorsichtig gevortext. Je 350 µl der Standards und der Proben wurden auf eine Mikrotiterplatte pipettiert und die Extinktion bei 595 nm im oben genannten ELISA-Reader gemessen.

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proben mit 4x Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 99° C erhitzt. Die Proben konnten nun für den nachfolgenden Western-Blot bei -40° C verwahrt werden.

#### **4.8.4 Natriumdodecylsulphat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)**

##### Material und Gerät

Die Reagenzien stammten, soweit nicht anders vermerkt, von Merck, Darmstadt.

##### Gelpuffer

3 M Tris

0,3% Natriumdodecylsulphat = SDS (w/v)

pH 8,6

1,5 M Tris-Lösung

363,42 g Tris  
ad 2 l

Anodenpuffer

665 ml 1.5 M Tris  
ad 5 l  
pH 8,9

Kathodenpuffer

0,1 M Tris  
10% SDS (w/v)  
0,1 M Tricin  
pH stellt sich von selbst ein (ca. pH 10,4)

TEMED (N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin)	Sigma, Taufkirchen
Glycerin	Sigma, Taufkirchen
Acrylamid/Bisacrylamid	
Ammoniumpersulphat	
Proteinstandard, Kaleidoscope Prestained Standards	Bio-Rad, München
Elektrophoresekammer, vertikal	Hoefler, Amersham Pharmacia Biotech, Kalifornien, USA

Die Gelelektrophorese dient der Analyse von Proteingemischen. Die Proteine laufen in einem elektrischen Feld durch eine Gelmatrix aus Acrylamid und Bisacrylamid. Acrylamid bildet in Anwesenheit von Radikalen in einer Kettenreaktion lange Polymere. Bisacrylamid vernetzt diese Polymere. TEMED dient dabei als Katalysator, Ammoniumpersulphat als Radikalbildner. Bei der SDS-Gelelektrophorese werden die Proteine nach Molekulargewicht aufgetrennt. SDS ist eine Proteine bindende Seife. Durch Inkubation mit SDS und

Sulfidbrücken reduzierenden Mitteln werden Proteine vollständig denaturiert und dissoziiert. SDS bindet an hydrophobe Regionen der Proteine. Die stark negative Ladung von SDS nivelliert alle Ladungen der Proteine. Es entstehen also negativ geladene Protein-SDS-Komplexe mit konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis. Diese Komplexe wandern bei der Elektrophorese zur Anode durch das Polyacrylamidgel und werden entsprechend ihrer Größe aufgetrennt.

Die Gele wurden mit Hilfe der Vorrichtungen einer vertikalen Elektrophoresekammer gegossen, wobei das diskontinuierliche System nach Lämmli Verwendung fand.

Zuerst musste das Trenngel hergestellt werden. Zu Beginn der Arbeit wurden 10%ige Acrylamidgele verwendet, später 12%ige Gele, da die gesuchten Proteine ein niedriges Molekulargewicht besaßen.

Nachdem das Trenngel polymerisiert war, konnte das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm zur Herstellung der Probestaschen eingesetzt werden.

Prozent des Trenngels	10 %	12 %
Gelpuffer	10 ml	10 ml
Glycerin	4 g	4 g
ddH <sub>2</sub> O	9,9 ml	8,7 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	6,1 ml	7,3 ml
TEMED	25 µl	25 µl
10 %iges Ammoniumpersulphat	150 µl	150 µl

**Tab. 4.8.1 Trenngele**

25 ml der benötigten Lösung wurden für die Herstellung des Gels verwendet.

Prozent des Sammelgels	4 %
Gelpuffer	3,1 ml
ddH <sub>2</sub> O	12,5 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	1 ml
TEMED	25 µl
10 %iges Ammoniumpersulphat	150 µl

**Tab. 4.8.2 Sammelgel**

Nach Auspolymerisierung des Sammelgels wurden die Probenaschen zweimal mit Kathodenpuffer ausgespült, um eventuell entstandene Gelreste zu entfernen. Nun konnten die Proben aufgetragen werden, wobei auf eine gleiche Proteinmenge geachtet wurde. Es wurden, wenn die Konzentrationen der Proben es zuließen, 80 oder 100 µg Protein pro Well aufgetragen. Der zuvor angesetzte Proteinstandard wurde ebenfalls aufgetragen.

Die Gele mussten in die Elektrophoresekammer zwischen Anoden- und Kathodenpuffer eingebracht werden. Bei einer fest eingestellten Spannung von 55 V bei 10 %igen Gelen und 60 V bei 12 %igen Gelen wurde die Elektrophorese über Nacht vorgenommen.

#### **4.8.5 Durchführung des Western Blots**

##### Material und Geräte

Die Reagenzien stammen, soweit nicht anders vermerkt, von Merck, Darmstadt.

##### 10xTBS

1,37 M NaCl  
200 mM Tris  
pH 7,4

##### TBS-T

500 ml 10xTBS  
2,5 ml Tween 20  
ad 5 l

##### Kathodenpuffer für Semi-Dry-Blot

25 mM Tris  
40 mM 6-Aminocaprinsäure  
200 ml/l Methanol  
pH stellt sich ein



Röntgenfilme, RX Super

Fujifilm Photo Film Europe

GmbH, Düsseldorf

Röntgenfilmentwickler

Hyper processor, Amersham

Pharmacia, Freiburg

Beim Blotten werden die im Gel befindlichen Proteine elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Membranen sind sehr viel leichter zu handhaben als Gele und die Proteine sind auf der Membran fixiert. Eine Diffusion der Proteine wird verhindert.

Die geblotteten Antigene lassen sich anschließend mit entsprechenden Antikörpern selektiv sichtbar machen.

Es wurde das Semi Dry Blot Verfahren angewendet. Jeweils drei Lagen Filterpapier wurden in Kathodenpuffer und Anodenpuffer 1 und 2 gelegt. Die mit Kathodenpuffer getränkten Filterpapiere bildeten die erste Schicht auf der Kathode. Darauf wurde das Gel verbracht. Auf das Gel kam die Membran, die zuvor kurz in Methanol geschwenkt und danach mit Anodenpuffer 1 getränkt wurde. Danach folgten jeweils die drei Lagen mit Anodenpuffer 1 und 2 getränkten Filterpapiere. Die Apparatur wurde durch Aufsetzen der Anode geschlossen, und elektrischer Strom angelegt. Bei 10%igen Gelen wurde der Blot über 2 Stunden und 10 Minuten bei 245 mA durchgeführt, bei 12%igen Gelen 2 Stunden und 15 Minuten bei 255 mA.

Die Übertragung der Proteine und deren Gleichmäßigkeit konnte mit Hilfe einer Ponceau-Färbung überprüft werden. Um die noch freien Proteinbindungsstellen der PVDF-Membran zu blockieren, musste eine Inkubation der Membran in einem für die gefragte Immunreaktion optimalen Blockierungspuffer bei 4° C über Nacht durchgeführt werden. So sollten unspezifische Bindungen der später auf die Membran verbrachten Antikörper weitestgehend reduziert werden. Auf die Blockierung folgte eine Inkubation mit dem primären Antikörper gegen das gesuchte Protein, wiederum über Nacht bei 4° C. Um den nicht gebundenen Anteil an primärem Antikörper zu entfernen, wurde auf diese Inkubation ein Waschschrift in dem zuvor schon verwendeten Blockierungspuffer (4 x 5 Minuten) vorgenommen. Danach wurde die Membran für eine Stunde mit einem HRP (Meerrettich-Peroxidase)-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert und anschließend 8 x 15 Minuten mit TBS-T Puffer gewaschen, um alle nicht gebundenen Antikörpermoleküle zu entfernen.

Anschließend sollten die gebundenen Antikörperkomplexe auf der Membran sichtbar gemacht werden. Hierfür wurde das ECL-Reagenz (Enhanced Chemiluminescence Reagenz) verwendet. Bei der Reaktion dieses Reagenzes mit der Meerrettich-Peroxidase entstand Licht, welches ein Signal auf einem auf die Membran gelegten Röntgenfilm hinterließ. Der Film konnte maschinell entwickelt werden.

#### 4.8.6 Primäre Antikörper

- $\beta$ -Actin; monoklonal Maus gegen Mensch, Ratte, Maus Sigma, Taufkirchen
- Bax; monoklonal Maus gegen Maus und Ratte Oncogen Research Products, Boston, USA
- Bax; polyklonal Kaninchen gegen Maus und Mensch Upstate Biotechnology; Biomol GmbH, Hamburg
- Bak; polyklonal Kaninchen gegen Maus und Mensch Upstate Biotechnology; Biomol GmbH, Hamburg
- Bcl-2; polyklonal Kaninchen gegen Mensch, Maus und Opossum Oncogen Research Products, Boston, USA
- Bcl-2; polyklonal Kaninchen gegen Mensch, Ratte und Maus Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien
- Bcl-2; monoklonal Maus gegen Mensch und Maus Upstate Biotechnology; Biomol GmbH, Hamburg
- Cleaved Caspase 3; polyklonal Kaninchen gegen Mensch, Ratte und Maus Cell Signaling; New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
- Caspase 3; polyklonal Kaninchen gegen Mensch und Maus BD Biosciences, Pharmingen, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
- Poly-ADP-Ribose Polymerase; polyklonal Kaninchen gegen Primaten und Nagetiere Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

#### 4.8.7 Sekundäre Antikörper

Anti-mouse IgG	Jackson immunoresearch Laboratories Dianova, Hamburg
Anti-rabbit IgG	Jackson immunoresearch Laboratories Dianova, Hamburg

#### 4.8.8 Ponceau-Färbung des Blots

##### Material

##### Ponceau-Lösung

Ponceau-S-Konzentrat 20ml in 80 ml H <sub>2</sub> O	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt

Direkt nach Abschluss des ElektrobloTTings wurde zur Überprüfung des erfolgreichen Transfers der Proteine eine Proteinfärbung der Blotmembran durchgeführt. Dafür lag die Membran für fünf Minuten in der Ponceau-Lösung. Anschließend wurde sie so lange mit H<sub>2</sub>O gewaschen, bis die Proteinbanden deutlich zu differenzieren waren. Zur Dokumentation wurde die gefärbte Membran fotokopiert.

#### 4.8.9 Strippen eines Blots

##### Material

Die Reagenzien stammten, soweit nicht anders vermerkt, von Merck, Darmstadt.

##### Stripping Puffer

0,5 M NaCl  
0,5 M Eisessig  
ad ddH<sub>2</sub>O

Milchpulver (fettarm)



1,5 M Tris/HCl

Das Strippen einer Blotmembran dient dazu, die beim Western Blot verwendeten primären und sekundären Antikörper von der Membran soweit wie möglich zu lösen. Die Blotmembran steht daraufhin einer weiteren Untersuchung auf Proteine mit anderen Antikörpern zur Verfügung.

Die durch Methanol befeuchtete und mit ddH<sub>2</sub>O gewaschene Membran wurde 30 Minuten in 5 %igem Milchpulver inkubiert. Nach Spülen in ddH<sub>2</sub>O fand eine Inkubation von 10 Minuten in Stripping Puffer statt. Danach lag die Membran für 10 Minuten in 1,5 M Tris/HCl. Es folgten einige Waschgänge mit H<sub>2</sub>O. Nun konnte eine neue Untersuchung der Membran durch primäre Antikörper eingeleitet werden. Die freien Proteinbindungsstellen der Membran wurden mit Blockierungspuffer über Nacht blockiert usw. (s. Western Blot).

#### **4.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Mit Hilfe der PCR können spezifische Fragmente einer Ausgangs-DNA gezielt vervielfältigt werden. Die DNA wird durch eine ausreichend hohe Temperatur denaturiert (Standard-PCR: 94°C). Ihre beiden Stränge trennen sich aufgrund der Aufspaltung von Wasserstoffbrückenbindungen, so dass die zuvor im Überschuss zugegebenen Oligonukleotid-Primer der gesuchten Sequenz sich an die einzelnen Stränge anlagern können. Diese Primer sind sequenzhomolog zu den Abschnitten der Einzelstrang-DNA, die vor und hinter dem zu vervielfältigenden Abschnitt liegen. Für diese Hybridisierung muß die Temperatur gesenkt werden. In den hier durchgeführten Versuchen wurde eine Senkung der Temperatur auf 50° C durchgeführt. Eine ebenfalls zu Beginn zugegebene, hitzestabile Taq-Polymerase ermöglicht die Anlagerung der passenden Nukleotide an den Primer, so dass wieder doppelsträngige DNA entsteht. Das Temperaturoptimum dieser Polymerase liegt bei 72° C. Diese Zyklen aus Denaturierungs-, Annealing- (wie der Hybridisierungsschritt genannt wird) und Elongationsschritt werden nun mehrfach wiederholt, so dass ein Vielfaches der gesuchten DNA-Stränge, auch Template genannt, entsteht.

#### 4.9.1 RNA-Isolierung

##### Material

Die Reagenzien stammten, soweit nicht anders vermerkt, von Merck, Darmstadt

RNAClean-Lösung (PeqLab, Erlangen) PeqGold RNA Pure

Chloroform p.a.

Isopropanol p.a.

75 %iges Ethanol

##### Tris/EDTA (TE), pH 7,4

1 ml 1M Tris/HCl, pH 7,4

0,2 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

ad 100 ml H<sub>2</sub>O

Um die RNA aus den Zellen zu isolieren, mussten diese zuerst homogenisiert werden. Unter einem Abzug wurden die Zellen in der RNAClean-Lösung in der Konzentration von  $10^6$  Zellen pro 0,2 ml in einem Glasdouncer homogenisiert. Danach wurde ein Zehntel des Volumens an Chloroform hinzugegeben, mindestens fünfzehn Sekunden gevortext und die Probe danach fünf Minuten bei 4° C stehen gelassen. Nun folgte eine fünfzehnminütige Zentrifugation bei 13400g in der Minute und 4° C. So entstanden drei Phasen. Die RNA befand sich in der oberen, wässrigen Phase, die untere Phase bestand aus Phenol und Chloroform. Die Interphase enthielt Proteine und DNA. Die wässrige Phase wurde abgenommen und eine Fällung der darin enthaltenen RNA mit dem gleichen Volumen an eiskaltem Isopropanol durchgeführt. Die Lösung ruhte hierfür fünfzehn Minuten bei 4° C. Alternativ konnte die Ruhephase bei -20° C verlängert werden. Danach fand ein weiterer Zentrifugationsschritt zu den oben genannten Bedingungen statt. Der Überstand wurde entfernt und das RNA-Pellet mit eiskaltem, 75%igem Ethanol (-40° C) dreimal gewaschen. Um alle Ethanolreste zu entfernen, wurden die Proben bei 68° C weitestgehend getrocknet und danach in 20 µl TE aufgenommen.

#### 4.9.2 Bestimmung der Integrität der RNA

##### Material

##### Gelladepuffer

5ml 50% Glycerin

200 µl 0,5M EDTA

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

0,25 % (w/v) Xylenxylanol

ad 10 ml dd H<sub>2</sub>O

Alle übrigen Materialien wurden an anderer Stelle schon besprochen.

Die Herstellung eines Agarosegels wurde in dieser Arbeit schon besprochen (siehe Kapitel 4.6.4). Für die Gele zur Bestimmung der Integrität der RNA wurden jedoch immer 1,5%ige Gele hergestellt. Das bedeutet, dass 1,5 g Agarose auf 100 ml Puffer eingewogen wurden. Als Puffer diente immer TAE. 3 µl der Probe wurden mit 3 µl Gelladepuffer und 4 µl H<sub>2</sub>O versetzt und in die dafür vorgesehenen Wells gegeben. Es wurde eine Elektrophorese bei 90 V für ca. eine Stunde durchgeführt. Die RNA konnte danach unter UV-Licht betrachtet und ihre Integrität über die Digitalkamera dokumentiert werden.

Die RNA eukaryoter Zellen besteht zu 95% aus rRNA, die aus 28S, 18S und 5S RNA zusammengesetzt ist. Die beiden größeren RNA-Bestandteile lassen sich bei guter Integrität der RNA als zwei scharfe Banden bei 5,1 Kilobasen (kb) und 1,9 kb darstellen.



1-5 µg der RNA-Probe wurden fünf Minuten in einem Thermoblock bei 65° C erwärmt. Die Probe wurde mit H<sub>2</sub>O auf 11 µl aufgefüllt. Dieser Lösung wurden 1 µl der Oligo(dT)<sub>15</sub>-Lösung und 1 µl dNTP zugegeben und die Mischung durch vortexen sichergestellt. Aus 4 µl 5 x First Strand Buffer und 2 µl 0,1 M DTT-Lösung pro RNA-Probe wurde ein Premix hergestellt. 6 µl des Premixes wurden zu der Probe zugegeben, die Probe gevortext und bei 42° C 2 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl SuperscriptII-Enzymlösung wurde die Lösung vorsichtig mit Hilfe der Pipette gemischt und nach kurzer Zentrifugation eine Inkubation von 50 bis 60 Minuten bei 42° C durchgeführt. Die Enzymreaktion konnte dann durch eine fünfzehnminütige Inkubation bei 70° C gestoppt werden. Die entstandene cDNA-Lösung wurde nun mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und bei -20° C gelagert.

#### 4.9.5 Durchführung der RT-PCR

##### Material und Gerät

Die Reagenzien stammten, soweit nicht anders vermerkt, von Merck, Darmstadt.

Promega Taq-Polymerase-Puffer	Promega, Mannheim
PeqGold Leiter Mix (100 bp)	PeqLab, Erlangen
Biotherm, Taq-Polymerase	GeneCraft, Münster

##### Tris/EDTA (TE), pH 7,4

1 ml 1M Tris/HCl, pH 7,4  
0,2 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0  
ad 100 ml H<sub>2</sub>O

##### dNTP-Set

PeqLAB, Erlangen, Amersham Biosciences

Stammlösungen: dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 100 mM

Je 25 µl der Stammlösungen

150 µl H<sub>2</sub>O

10 mM von jedem Nukleotid

Ladepuffer

1,5 g Ficoll 400

20 ml H<sub>2</sub>O

Tatrazine zum Färben

**4.9.6 Sequenzen der Oligonukleotid-Primer für die RT-PCR**

Die Auswahl der Oligonucleotid-Primer erfolgte auf der Grundlage der in den öffentlichen Datenbanken zugänglichen Sequenzen.

Konzentration 100 pmol/μl:

NCBI-Accession No.

*Bos taurus apoptosis regulator bax-alpha mRNA (348bp):*

(gi:1938370)

sense 5'-AAG CTG AGC GAG TGT CTG AAG-3'

antisense 5'-CAA AGA TGG TCA CTG TCT GCC-3'

*Bos taurus bcl-2 mRNA (303bp und 285bp)*

(gi:2058667)

sense 5'-ACA GGC TAC GAT AAC CGA GAG-3'

und

sense 5'-GAG ATC GTG ATG AAG TAC ATC-3'

antisense 5'-ACT GGA CAT CTC GGC GAA GTC-3'

*Bos taurus glyceraldehyde-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) mRNA (198 bp)*

(gi:1841757)

sense 5'-GTCTTCACCACCATGGAG-3';

antisense 5'-GTCATGGATGACCTTGGC-3'

PCR-Maschine

Biometra, Göttingen

Die durch das oben beschriebene Verfahren hergestellte cDNA-Sequenz sollte nun vervielfältigt werden. Dies wurde mit Hilfe der oben beschriebenen Standard-RT-PCR durchgeführt. Um auf ein Volumen von 50  $\mu\text{l}$  pro Probe zu kommen, wurden 47  $\mu\text{l}$  eines vorher erstellten Premixes mit 3  $\mu\text{l}$  der cDNA Probe versetzt. Der Premix bestand aus jeweils 29  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 5  $\mu\text{l}$  des Taq-Polymerase-Puffers, 1  $\mu\text{l}$  der 10mM dNTP-Lösung, je 1  $\mu\text{l}$  der 3'- und 5'-Primer und 0,1  $\mu\text{l}$  der Taq-Polymerase. Da der verwendete Ladepuffer mit Ficoll hitzeresistent war, konnten auch je 10  $\mu\text{l}$  dieses Puffers vor der RT-PCR hinzugegeben werden, so dass die Proben gleich danach auf ein Agarosegel aufgetragen werden konnten.

Die Herstellung eines 1,5 prozentigen Agarosegels wurde schon beschrieben. Als Laufpuffer wurde TAE verwendet, als Standard 15  $\mu\text{l}$  des PeqGold Leiter Mixes. Die Elektrophorese wurde für ca. eine Stunde bei 90 V durchgeführt. Die cDNA konnte danach unter UV- Licht betrachtet und über die Digitalkamera dokumentiert werden. Dabei wurde die Größe der zu erwartenden Fragmente mit dem eingesetzten 100 bp Leiterstandard verglichen.

### **4.10 Mathematische Auswertung und statistische Verfahren**

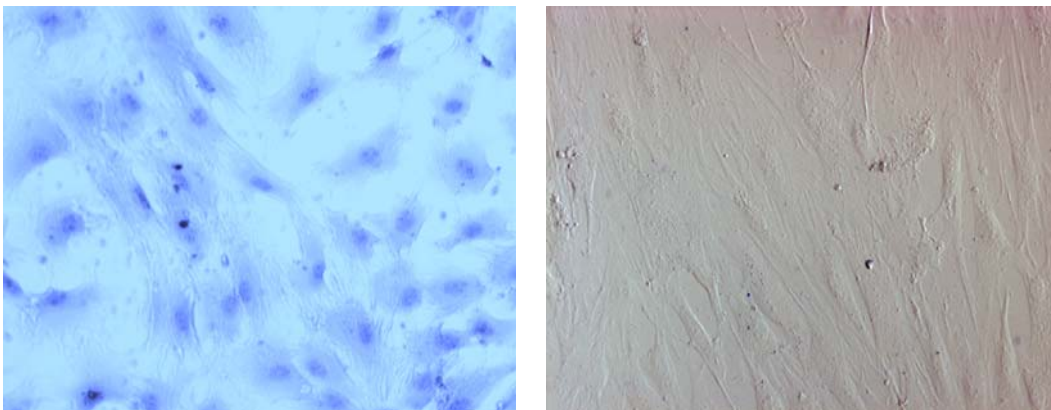
Die mathematische Auswertung erfolgte mittels der Microsoft-Excel-Software. Aus den Versuchsergebnissen wurden das arithmetische Mittel und der zugehörige Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) errechnet. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zweier Gruppen wurde mittels eines ungepaarten Student's t-Test ermittelt. Lag ein *P*-Wert unter oder gleich 0,05, so wurde die Differenz des Vergleichs als signifikant bewertet.

## **5. Ergebnisse**

### **5.1 Morphologie der Thekazellen „in vitro“**

Um apoptotisch bedingte, morphologische Abweichungen der Thekazellen erkennen zu können, wurden die Zellen zunächst ohne Einleitung der Apoptose betrachtet. Hierfür wurden die Zellen ungefärbt und nach Durchführung einer May-Grünwald/Giemsa-Färbung mit Hilfe differentieller Interferenzphasenkontrastmikroskopie betrachtet.

Ein konfluenter Zellrasen zeigte relativ kleine, spindelförmige, fibroblastenähnliche Zellen, die dicht aneinandergedrängt fischschwarmartig in der gleichen Ausrichtung nebeneinander lagen. Nicht konfluente Zellen stellten mit Hilfe mehrerer Zytoplasmaausläufer Kontakt zu benachbarten Zellen her (siehe Abb. 5.1.1).



**Abb. 5.1.1 Morphologie der Thekazellen „in vitro“**

Die linke Abbildung zeigt eine May-Grünwald/Giemsa-Färbung, die rechte ein ungefärbtes Präparat. Die hier gezeigten Zellen wurden 72 Stunden nach dem ersten Mediumwechsel fixiert. Sie wurden keiner Stimulation unterzogen. 1cm entspricht 24  $\mu\text{m}$ .

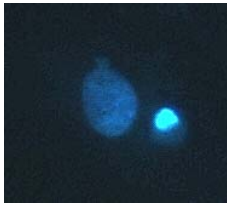


## **5.2 Morphologische Veränderungen**

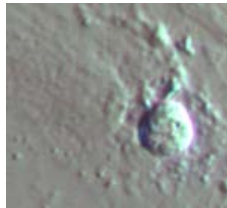
Durch DNA-Färbung mit Hilfe von BisBenzimid (Hoechst 33342) und deren Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop konnten apoptotische Zellen identifiziert werden. Es konnten Pyknosis, Anlagerung des Chromatins an die Kernmembran und die Fragmentierung des Kerns beobachtet werden. Mit Hilfe der differentiellen Interferenzphasenkontrastmikroskopie waren die Zellschrumpfung und –abrundung und das „Blebbing“ zu erkennen (siehe Abb. 5.2.1).

Die als apoptotisch beurteilten Zellen wurden gezählt und ausgewertet. So konnte der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen bei unterschiedlichen Kulturbedingungen festgestellt werden.

a:



**Hoechst-Färbung:**  
links der Zellkern einer intakten Zelle,  
rechts der Zellkern einer abgerundeten,  
apoptotischen Zelle



die oben gezeigten Zellen  
mit Hilfe der differentiellen  
Interferenz-  
phasenkontrastmikroskopie

b:



Zellkern einer  
„gesunden“ Zelle

Zellkern einer  
apoptotischen Zelle mit  
kernmembranständiger DNA

c:



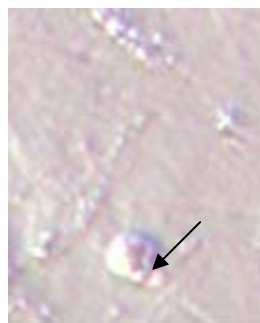
**Hoechst-Färbung:**  
zwei intakte Zellen über einer  
apoptotischen Zelle mit  
fragmentiertem Kern



Hoechst-Färbung:  
apoptotische Körperchen



differentielle Interferenzphasen-  
kontrastmikroskopie



differentielle  
Interferenzphasenkontrast-  
mikroskopie

**Abb. 5.2.1 Morphologische Veränderungen von Thekazellen im Verlauf der Apoptose**

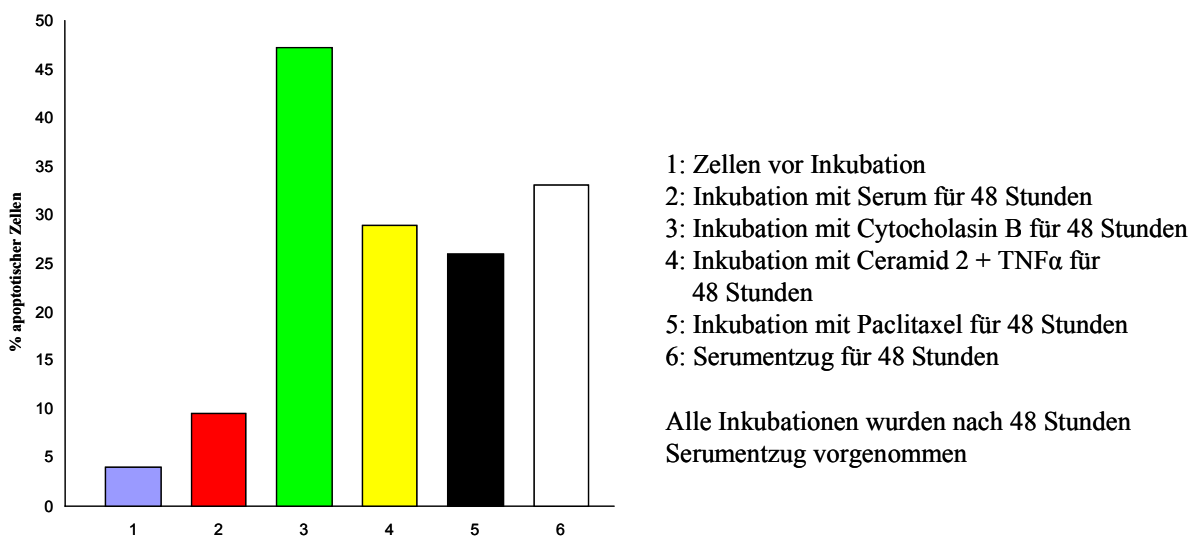
Es wurden mehrere morphologische Kennzeichen der Apoptose beurteilt. Abbildung a zeigt die Abrundung der apoptotischen Zelle und ihres Zellkerns im Vergleich zu einer gesunden Zelle. Im Phasenkontrast ist die Ablösung der apoptotischen Zelle aus dem Zellverband gut zu erkennen. Dies sind sehr frühe Kennzeichen der Apoptose. Abbildung b zeigt die Anlagerung der DNA an die innere Kernwand, ein eindeutiges Merkmal für den Ablauf einer Apoptose. In Abbildung c kann man besonders mit Hilfe der differentiellen Interferenzphasenkontrastmikroskopie die Abschnürung apoptotischer Körperchen erkennen (siehe Pfeil). Abbildung d zeigt apoptotische Körperchen.

1cm entspricht 12  $\mu$ m.

### **5.2.1 Apoptoseinduktion für morphologische Veränderungen**

Da die einzelnen Kriterien der Apoptose zu unterschiedlichen Zeitpunkten auftreten, ist die Induktion der Apoptose je nach Versuchsaufbau unterschiedlich. Serumentzug ist mit der in diesem Fall vorliegenden Zielsetzung vorausgesetzt, da LPA ein Serumbestandteil ist. Die Wirkung von LPA kann also nur unter Serumentzug ermittelt werden.

Unter Berücksichtigung von Ergebnissen, die durch die Methode der DNA-Leiterbildung ermittelt wurden (siehe Kapitel 5.3.1.1), wurden neben Serumentzug für die Einleitung des intrinsischen Weges und TNF $\alpha$  in Kombination mit Ceramid 2 für die Einleitung des extrinsischen Weges auch Chemotherapeutika verwendet. Bei Versuchen, bei denen diese Substanzen angewendet wurden, wurden die Zellen zuvor einem Serumentzug über 24-48 Stunden unterzogen. So wurde eine Unterbrechung des Zellzyklus und eine Synchronisation der Zellen bewirkt. Es konnte festgestellt werden, dass die apoptotische Wirkung von Cytocholasin B, Paclitaxel und Ceramid 2 in Verbindung mit TNF $\alpha$  deutlich zu erkennen war. Vor allem Cytocholasin B ist dazu in der Lage, nach 48 Stunden bei einem großen Anteil der Zellen Apoptose zu induzieren (siehe Abb. 5.2.2).

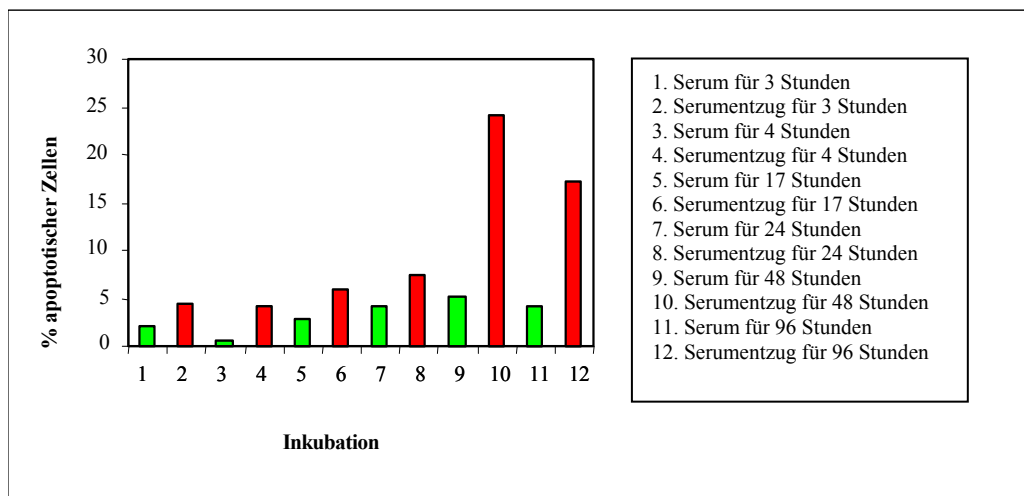


**Abb. 5.2.2** Prozentual unterschiedliche Anteile apoptotischer Zellen bei verschiedenen Kulturbedingungen

Thekazellen wurden auf zwei 8-Well-Chamberslides kultiviert und 1: der erste Chamberslide als Kontrolle ohne eine weitere Stimulation mit Paraformaldehyd fixiert. Bei den Zellen des zweiten Chamberslides wurde mit unterschiedlichen Methoden versucht, eine Apoptose einzuleiten. Die Zellen wurden über 48 Stunden stimuliert. 2: Die Zellen wurden als weitere Kontrolle mit 1,5% FCS inkubiert. Es wurden folgende Substanzen zur Einleitung der Apoptose verwendet. 3: Cytocholasin B (5  $\mu$ M); 4: Ceramid 2 (1  $\mu$ M) in Kombination mit TNF $\alpha$  (100 ng/ml); 5: Paclitaxel (0,05  $\mu$ M). Alle Zellen wurden ohne Zugabe von FCS inkubiert. Bei den Zellen der Nr. 6 wurde eine Apoptoseeinleitung durch reinen Serumentzug vorgenommen. Nach 48 Stunden wurden die Zellen fixiert und zusammen mit denen des ersten Chamberslides mit Bisbezimid gefärbt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes betrachtet. Die hier dargestellten Daten beziehen sich auf einen Versuch.

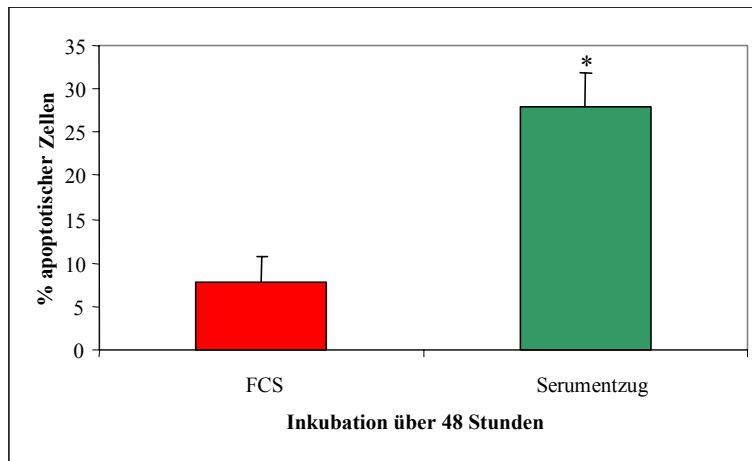
Um weitere Möglichkeiten der Apoptoseeinleitung zu ermitteln, wurden Thekazellen unter Serumentzug für fünf Minuten ultraviolettem Licht ausgesetzt und daraufhin für vier, bzw. sechs Stunden inkubiert. Die Zellen wurden vor deren Entnahme mikroskopisch betrachtet und zeigten starke morphologische Abweichungen. Viele der Zellen waren vom Boden des Behälters gelöst. Es wurde auf eine weitere Verwendung von UV-Licht verzichtet, da die Zellen im apoptotischen Prozess weit fortgeschritten oder sogar nekrotisch erschienen und somit für fortgesetzte Untersuchungen nicht geeignet waren.

Wasserstoffperoxid wurde aus den gleichen Gründen nur in wenigen Versuchen eingesetzt. Serumentzug ist eine gängige und einfach durchführbare Methode der Apoptoseeinleitung und wurde bevorzugt eingesetzt. Daher wurde diese Form der Apoptoseeinleitung eingehender untersucht. Sogar bei einer Inkubation von drei Stunden konnte die apoptotische Wirkung des Serumentzuges bestätigt werden, allerdings nur zu einem sehr geringen Prozentsatz (siehe Abb. 5.2.3 und 5.2.4).



**Abb. 5.2.3 Ansteigender Prozentsatz apoptotischer Zellen nach Serumentzug**

Thekazellen wurden auf zwei 8-Well-Chamberslides kultiviert und für unterschiedliche Zeiträume einer Apoptoseeinleitung durch Serumentzug ausgesetzt. Als weitere Kontrolle diente eine gleich lange Inkubation mit FCS. Nach Ablauf der Stimulation wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, mit Bisbenzimid gefärbt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes betrachtet. Dieser Versuch wurde einmal durchgeführt (n=1).



Serumentzug bewirkt einen signifikanten Anstieg des prozentualen Anteils Apoptotischer Thekazellen (\* =  $P < 0.02$  bei  $n = 4$ ).

**Abb. 5.2.4**      **Prozentsatz apoptotischer Zellen nach Serumentzug über 48 Stunden im Vergleich zu einer Inkubation mit Serum**

Thekazellen wurden auf einem 8-Well-Chamberslide kultiviert. Die Zellen des zweiten Chamberslides wurden für 48 Stunden einer Apoptoseeinleitung durch Serumentzug ausgesetzt. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, die Zellen beider Chamberslides mit Bisbenzimid gefärbt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes betrachtet.

## **5.3 Nukleare Vorgänge**

### **5.3.1 DNA-Leiterbildung**

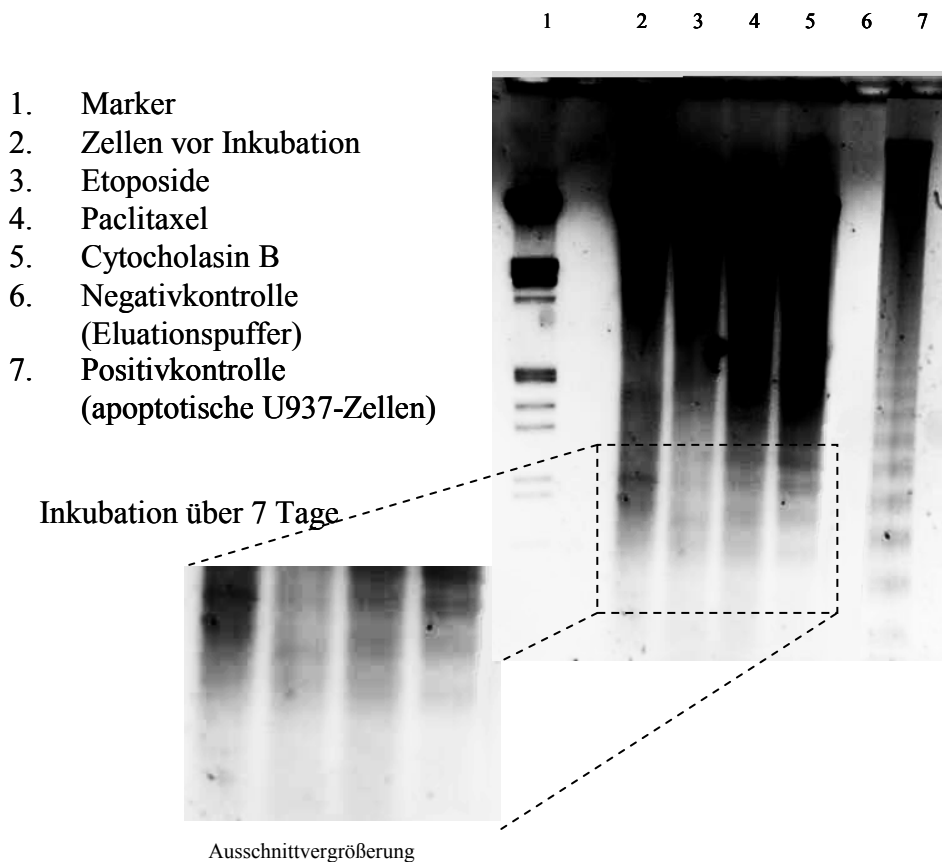
Es sollte festgestellt werden, ob die DNA von Thekazellen im Verlauf der Apoptose eine Leiterbildung zeigt.

#### ***5.3.1.1 Apoptoseinduktion für DNA-Leiterbildung***

Um die Apoptose einzuleiten, wurde zunächst die Methode des Serumentzuges verwendet, die schon bei Granulosazellen erfolgreich eingesetzt wurde (MARKSTRÖM et al. 2002). Inkubationszeiten zwischen sechs und 168 Stunden ergaben keine eindeutigen Ergebnisse. Zu Beginn als Erfolg interpretierte Banden stellten sich nach Einsatz von RNase a als mit der DNA isolierte RNA heraus.

Daraufhin wurde der Versuchsaufbau geändert (siehe Kapitel 4.2). Nach 48 Stunden Serumentzug wurden die Zellen mit den hoch apoptotisch wirkenden Substanzen Etoposide (5  $\mu\text{M}$ ), Paclitaxel (0,05  $\mu\text{M}$ ) und Cytocholasin B (5  $\mu\text{M}$ ) für sieben Tage inkubiert.

Es konnte erstmals eine eindeutige Leiterbildung festgestellt werden. Die Zellen zeigten sowohl bei Inkubation über sieben Tage mit Paclitaxel als auch mit Cytocholasin B eine deutliche Leiter. Bei der Apoptoseeinleitung mit Hilfe von Etoposide ist nur eine undeutliche Leiterbildung zu erahnen (siehe Abb. 5.3.1). Dieser Versuch wurde einmal durchgeführt.



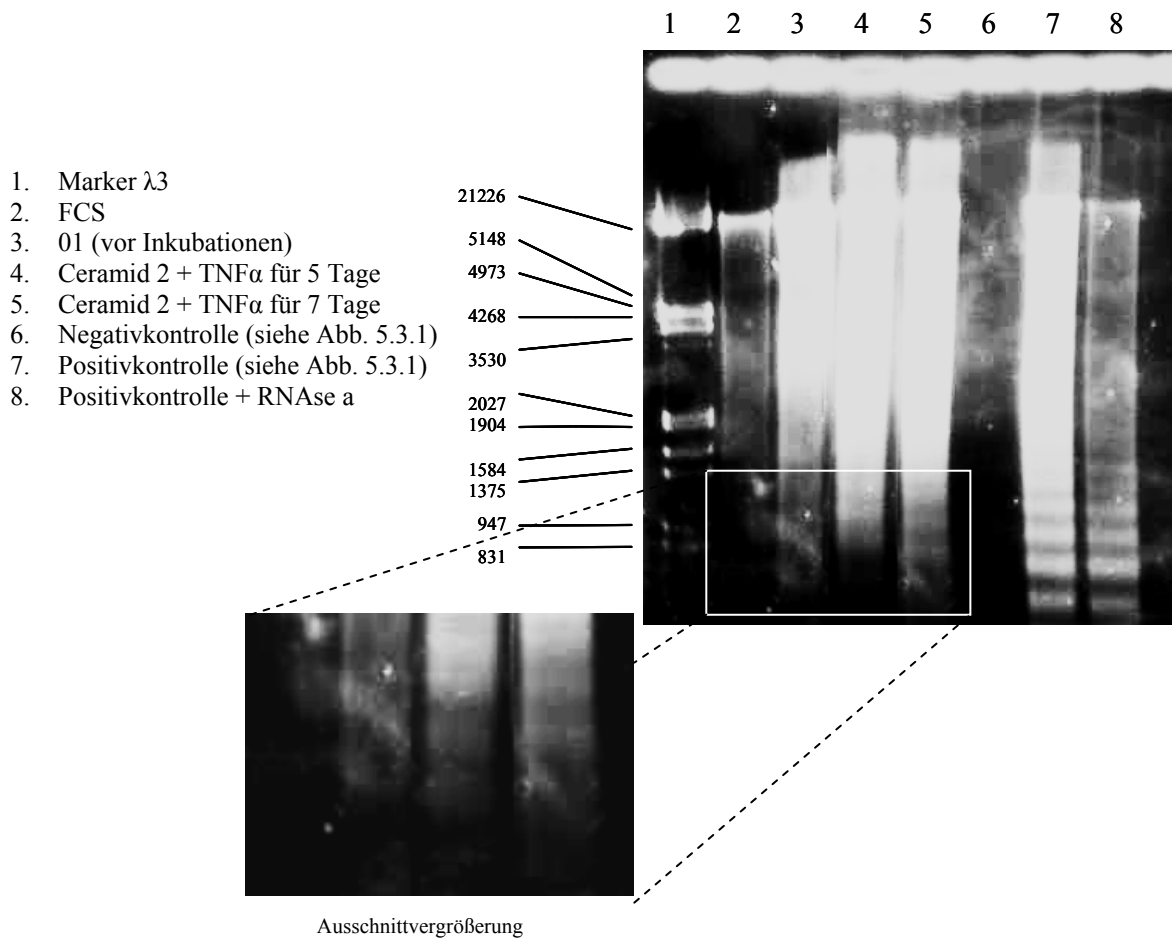
**Abb. 5.3.1 DNA-Leiterbildung bei Verwendung von Chemotherapeutika**

Thekazellen wurden kultiviert und für 48 Stunden einem Serumentzug unterzogen. Danach wurden die Zellen über sieben Tage mit 5  $\mu\text{M}$  Etoposide (3), 0,05  $\mu\text{M}$  Paclitaxel (4) und 5 $\mu\text{M}$  Cytocholasin B (5) inkubiert. Alle 48 Stunden wurde das Medium entnommen, abzentrifugiert und das Pellet aufbewahrt. Die adherenten Zellen wurden erneut inkubiert.

Damit ist erwiesen, dass bei bovinen Thekazellen im Verlauf der Apoptose eine Spaltung der DNA stattfindet. Sie gehören nicht zu den Zellen, die keine Leiterbildung aufweisen.



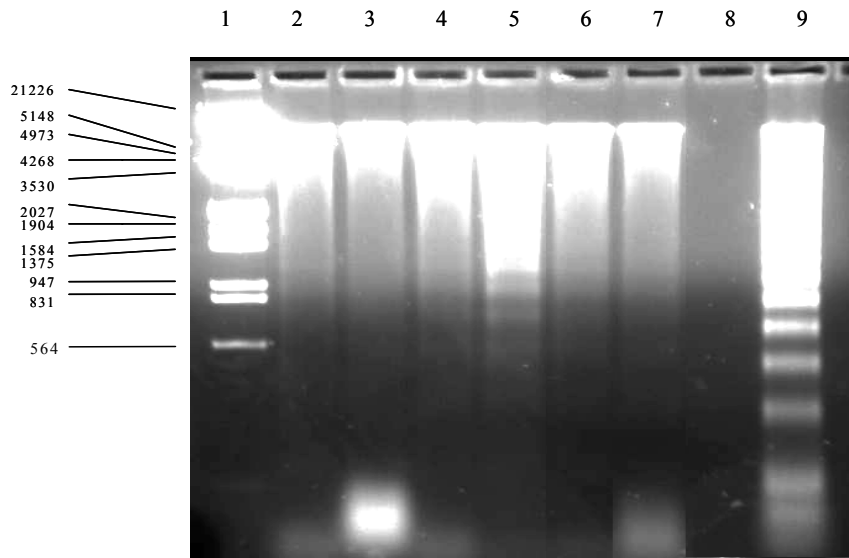
Weitere Versuche zielten darauf ab, Apoptose mit Hilfe von physiologischen Substanzen zu erreichen. Es wurde Ceramid 2 ( $1 \mu\text{M}$ ) zusammen mit  $\text{TNF}\alpha$  ( $100 \text{ ng/ml}$ ) für sieben und fünf Tage eingesetzt. Auch dieser Inkubation ging ein Serumentzug über 48 Stunden voraus. Die DNA wies eine eindeutige Leiterbildung auf (siehe Abb. 5.3.2). Dieser Versuch wurde dreimal durchgeführt.



**Abb. 5.3.2 Leiterbildung nach Apoptoseeinleitung durch Serumentzug,  $\text{TNF}\alpha$  und Ceramid 2**

Thekazellen wurden kultiviert und bis auf Nr. 2 und 3 für 48 Stunden einem Serumentzug unterzogen. Nr. 2 wurde über 9 Tage mit Serum inkubiert, Nr. 3 vor jeglicher Inkubation gestoppt. Die Zellen von Nr. 4 wurden nach den 48 Stunden Serumentzug mit  $1 \mu\text{M}$  Ceramid 2 und  $100 \text{ ng/ml}$   $\text{TNF}\alpha$  über 5 Tage inkubiert, Nr. 5 über 7 Tage. Alle 48 Stunden wurde das Medium entnommen, abzentrifugiert und das Pellet aufbewahrt. Die adherenten Zellen wurden erneut inkubiert.

Versuche, die eine geringere Inkubationszeit ermitteln sollten, ergaben, dass Cytocholasin B nach 48 Stunden Inkubation schon genügend Zellen in Apoptose versetzt hatte, während Ceramid 2 in Kombination mit TNF $\alpha$  in der kürzeren Zeit nicht dazu in der Lage war, eine Leiterbildung zu verursachen (siehe Abb. 5.3.3). Dieser Versuch wurde dreimal durchgeführt.



1. Marker  $\lambda$ 3
2. FCS über vier Tage
3. Ohne Inkubation
4. Serumentzug über 48 Std.
5. Cytocholasin B für 48 Std.
6. Ceramid 2 + TNF $\alpha$  für 24 Std.
7. Ceramid 2 + TNF $\alpha$  für 48 Std
8. Negativkontrolle (siehe Abb. 5.3.1)
9. Positivkontrolle (siehe Abb. 5.3.1)

**Abb. 5.3.3** Leiterbildung nach kürzeren Inkubationszeiten, ein Vergleich zwischen Serumentzug, Cytocholasin B und Ceramid 2 in Kombination mit TNF $\alpha$

Thekazellen wurden kultiviert und bis auf Nr. 2 und 3 für 48 Stunden einem Serumentzug unterzogen. Nr. 2 wurde über 4 Tage mit Serum inkubiert, Nr. 3 vor jeglicher Inkubation gestoppt. Die Inkubation von Nr. 4 wurde nach den 48 Stunden Serumentzug beendet. Die Zellen von Nr. 5 wurden nach den 48 Stunden Serumentzug mit 5  $\mu$ M Cytocholasin B über 5 Tage inkubiert. Bei Nr. 6 wurden nach 48 Stunden Serumentzug 1  $\mu$ M Ceramid 2 und 100 ng/ml TNF $\alpha$  über 24 Stunden eingesetzt. Die Zellen von Nr. 7 wurden wie die von Nr. 6 inkubiert. Die Inkubationszeit betrug aber 48 Stunden. Die genomische DNA der Zellen wurde elektrophoretisch aufgetrennt.

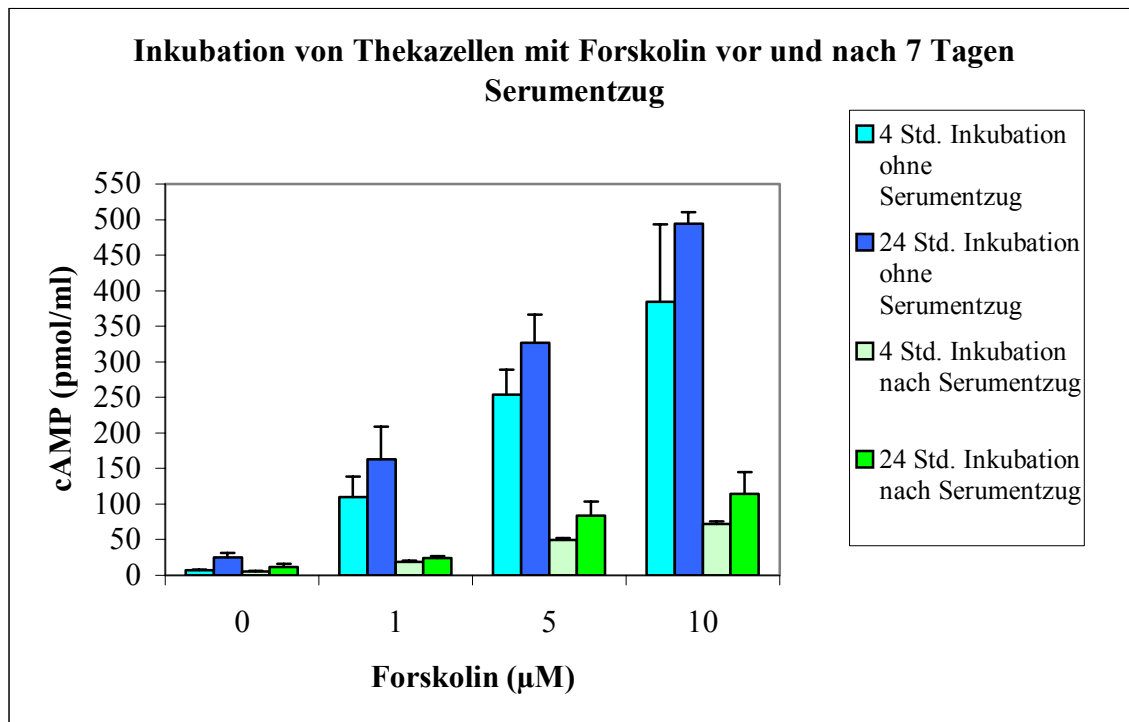
Auch bei der Apoptoseeinleitung durch Serumentzug konnten nun positive Ergebnisse erzielt werden. Dabei wurden bei einem Serumentzug über vier Tage unterschiedliche Ergebnisse erreicht. Bei einer dreimaligen Wiederholung konnte bei nur zwei Versuchen eine Leiter nachgewiesen werden. Nach sieben Tagen war allerdings ein wiederholbares, positives Ergebnis vorhanden.

## 5.4 Hormonelle Vorgänge

### 5.4.1 cAMP-TRFIA und Progesteron-ELISA

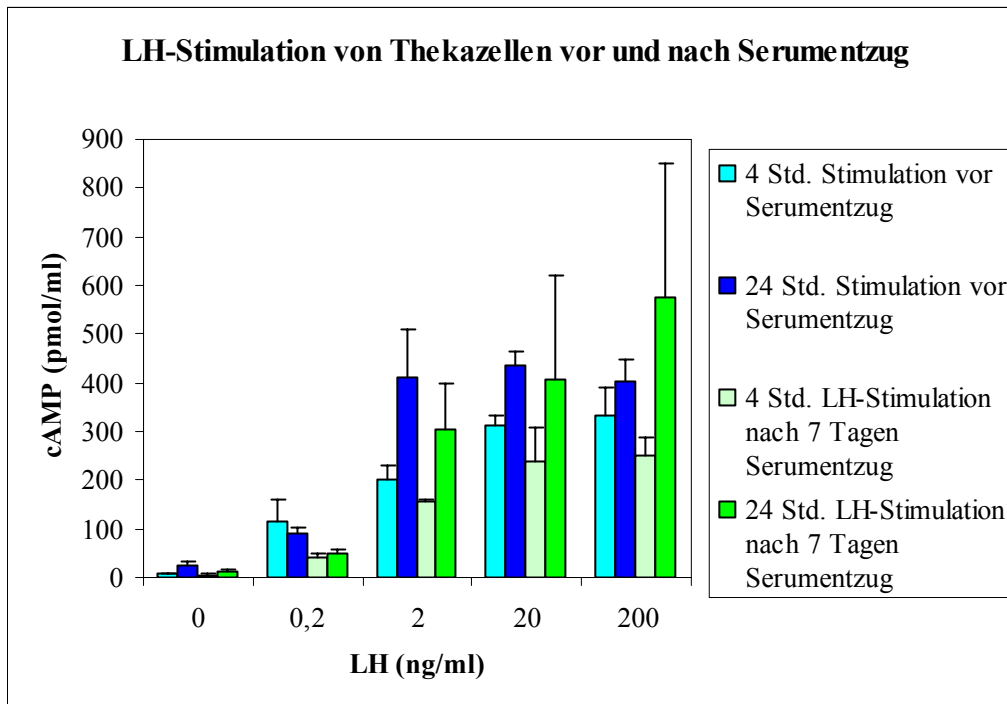
Durch die im folgenden beschriebenen Versuche sollte festgestellt werden, ob die Zellen nach einem derart langen Serumentzug noch die für Thekazellen typischen Eigenschaften besitzen. Thekazellen bilden nach Stimulation mit luteotropen Hormon (LH) über cAMP Progesteron (siehe Kapitel 3.1.2).

Daher wurden die Zellen vor und nach einem mehrtägigen Serumentzug mit Forskolin, einem cAMP-Stimulator, und LH stimuliert. Der cAMP- und der Progesteron-Gehalt des Mediums wurden gemessen (siehe Abb. 5.4.1, 5.4.2, 5.4.3 und 5.4.4).



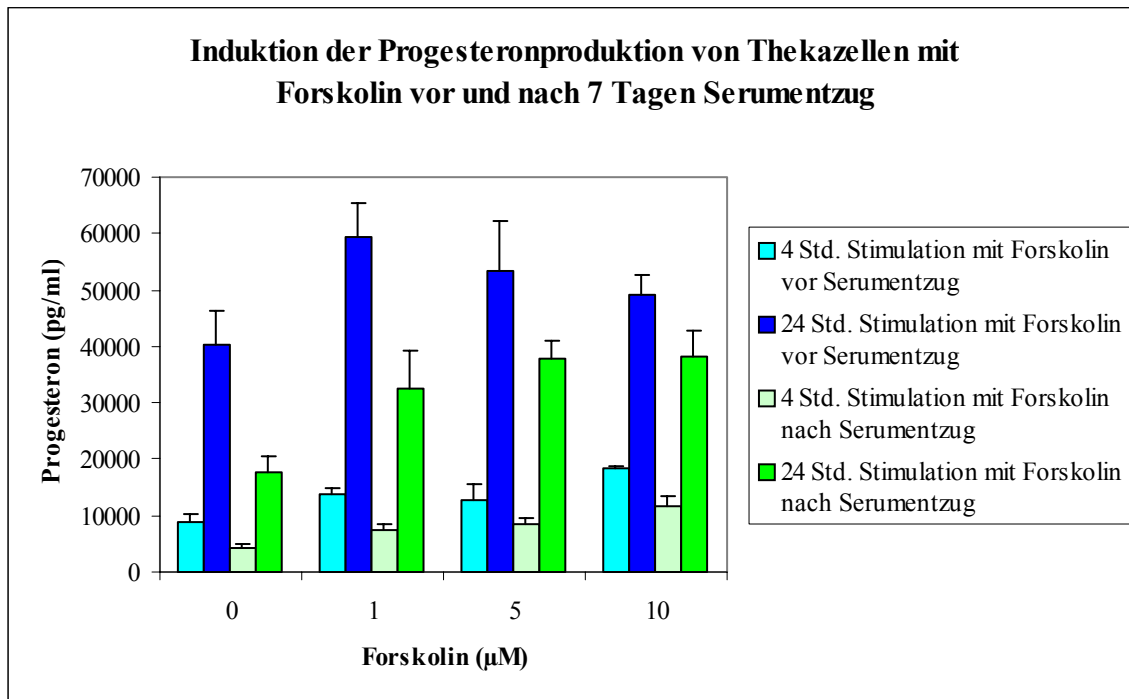
**Abb. 5.4.1**

Thekazellen wurden vor und nach Serumentzug von sieben Tagen mit unterschiedlichen Konzentrationen Forskolin für vier und für 24 Stunden inkubiert. Danach wurde die Konzentration der Zellen von cAMP gemessen. Es stellte sich heraus, dass Thekazellen nach sieben Tagen Serumentzug noch immer mit Produktion von cAMP auf die Stimulation mit Forskolin reagieren, auch wenn die Produktion geringer ist, als vor einem Serumentzug (n = 3).



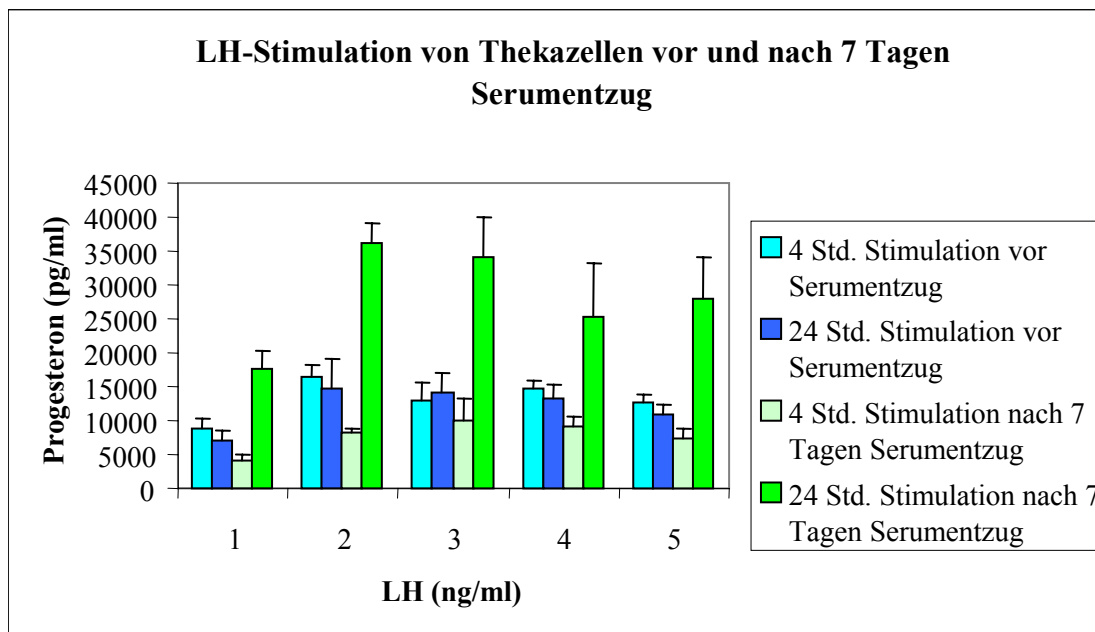
**Abb. 5.4.2**

Thekazellen wurden vor und nach Serumentzug von sieben Tagen mit unterschiedlichen Konzentrationen LH für vier und für 24 Stunden inkubiert. Danach wurde die Konzentration von cAMP im Medium der Zellen gemessen. Es wurde festgestellt, dass Thekazellen nach sieben Tagen Serumentzug noch immer mit Produktion von cAMP auf die Stimulation mit LH reagieren (n = 3).



**Abb. 5.4.3**

Thekazellen wurden vor und nach Serumentzug von sieben Tagen mit unterschiedlichen Konzentrationen Forskolin für vier und für 24 Stunden inkubiert. Danach wurde die Konzentration des Mediums von Progesteron gemessen. Es wurde festgestellt, dass Thekazellen nach sieben Tagen Serumentzug noch immer mit Produktion von Progesteron auf die Stimulation mit Forskolin reagieren, auch wenn die Produktion geringer ist als vor einem Serumentzug (n = 3).



**Abb. 5.4.4**

Thekazellen wurden vor und nach Serumentzug von sieben Tagen mit unterschiedlichen Konzentrationen von LH für vier und für 24 Stunden inkubiert. Danach wurde die Konzentration des Mediums von Progesteron gemessen. Es wurde festgestellt, dass Thekazellen nach sieben Tagen Serumentzug noch immer mit Produktion von Progesteron auf die Stimulation mit LH reagieren, auch wenn die Produktion geringer ist, als vor einem Serumentzug ( $n = 3$ ).

Die Ergebnisse zeigen, dass Thekazellen auch nach einer langen Inkubation ohne Serum noch immer ihre typischen Eigenschaften besitzen. Sie lassen sich nach sieben Tagen Serumentzug sowohl mit Forskolin als auch mit LH zu einer Produktion von cAMP stimulieren. Diese Erhöhung des cAMP in Thekazellen führt auch noch nach Serumentzug von sieben Tagen zu einer Produktion von Progesteron.

## 5.5 Apoptosespezifische Proteine

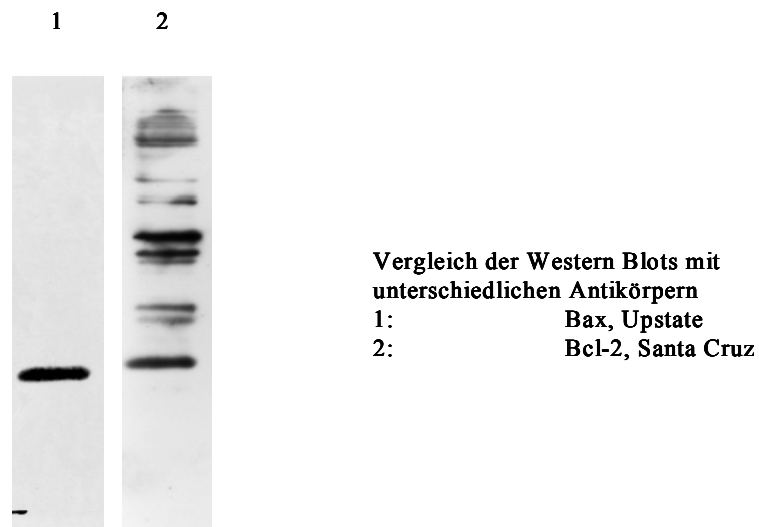
Es wurde versucht, mit Hilfe der Methode des Western-Blots Proteine nachzuweisen, die im apoptotischen Prozeß eine wichtige Rolle einnehmen.

Bei Versuchen mit Antikörpern gegen Caspase 3, PARP und Bak konnte kein Antikörper gefunden werden, der reagiert hat. Mit den fraglichen Antikörpern wurden mehrere Versuche mit unterschiedlichem Aufbau durchgeführt, um sicher zu gehen, dass kein methodischer Grund für das Ausbleiben der Ergebnisse verantwortlich war. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen des ersten und zweiten Antikörpers geprüft. Verschiedene Blockierungsreagenzien wurden verwendet, unterschiedliche Inkubationszeiten gewählt. Trotz all dieser Bemühungen stellte sich kein Signal ein.

Für das Protein Bcl-2 wurden drei unterschiedliche Antikörper getestet, bei denen nur der von Santa Cruz hergestellte Antikörper Signale hervorbrachte. Diese waren vielfältig und wurden daher nicht für eine Aussage herangezogen.

Ein Erfolg konnte bei dem ebenfalls in der Einleitung erwähnten Protein Bax verzeichnet werden. Auch hier wurde ein Antikörper erfolglos getestet, mit dem zweiten verwendeten Antikörper von Upstate, Biotechnology, konnte eine einzelne Bande mit der erwarteten Größe von 23 kDa gezeigt werden. Als Kontrolle wurde Protein von HL-60 Zellen verwendet. Die Banden der Thekazellen befanden sich auf gleicher Höhe.

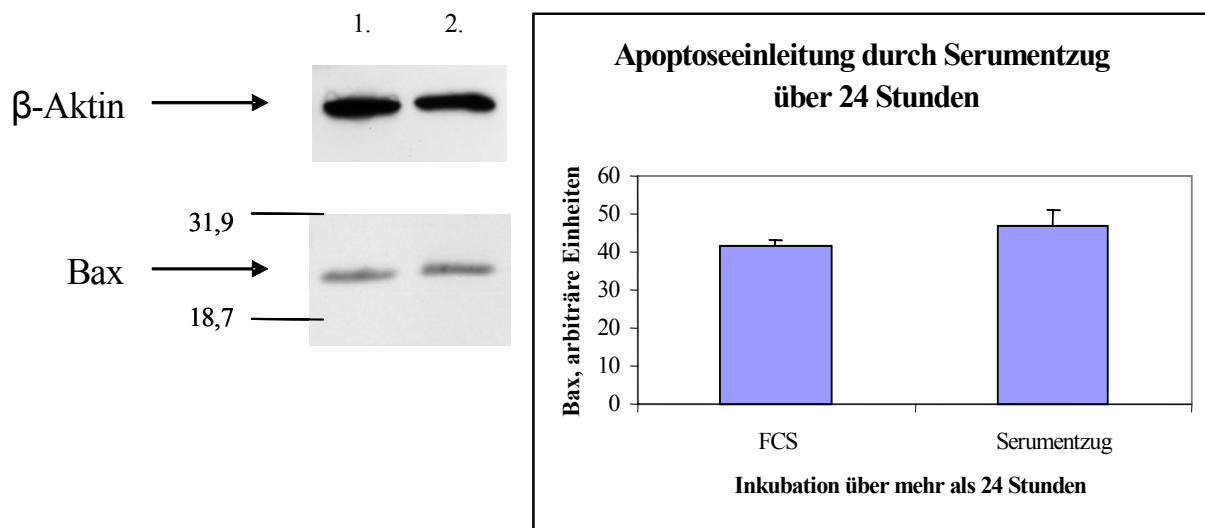




**Abb. 5.5.1 Vergleich der Qualität zweier Antikörper**

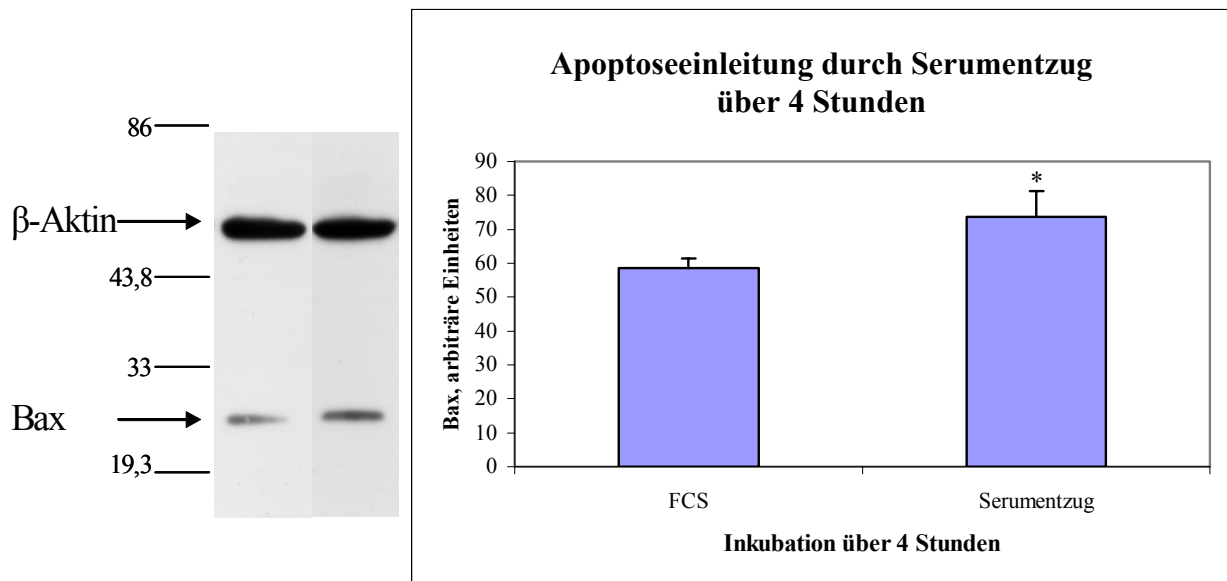
Während bei der Verwendung des Antikörpers gegen Bax nur eine Bande erscheint, zeigen sich multiple Banden bei der Verwendung des Antikörpers gegen Bcl-2.

Mit Hilfe dieses Proteins sollte nun die Apoptose der Thekazellen genauer untersucht werden. Zuerst wurde festgestellt, welche Inkubationen bei dieser Versuchsanordnung eine Steigerung von Bax verursachen, also proapoptotisch wirken. Unter Berücksichtigung der schon beschriebenen Versuche wurde Serumentzug zur Einleitung der Apoptose genutzt. Dabei wurden Inkubationszeiten zwischen zwei und 24 Stunden gewählt. Diese kurzen Zeitspannen wurden ausgesucht, da die Beeinflussung des apoptotischen Prozesses noch möglich sein sollte. Das Überschreiten des „Point of no Return“ sollte vermieden werden. Bei allen Versuchen wurde durch Serumentzug eine Erhöhung der Menge von Bax-Protein in Thekazellen im Vergleich zu der entsprechend langen Inkubation mit Serum erreicht (siehe Abb. 5.5.2 und 5.5.3).



**Abb. 5.5.2** Vergleich der Mengen an Bax-Protein in Thekazellen durch Western Blot vor und nach Einleitung der Apoptose

Thekazellen wurden mit 1. 1,5% Serum und 2. reinem Medium ohne Zugabe von Serum über 24 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen homogenisiert und deren Proteine extrahiert. Die Proteine wurden einer Gelelektrophorese unterzogen und auf eine Membran geblottet. Das Protein Bax wurde durch einen spezifischen Antikörper und darauf folgender Chemilumineszenz sichtbar gemacht (n = 3).

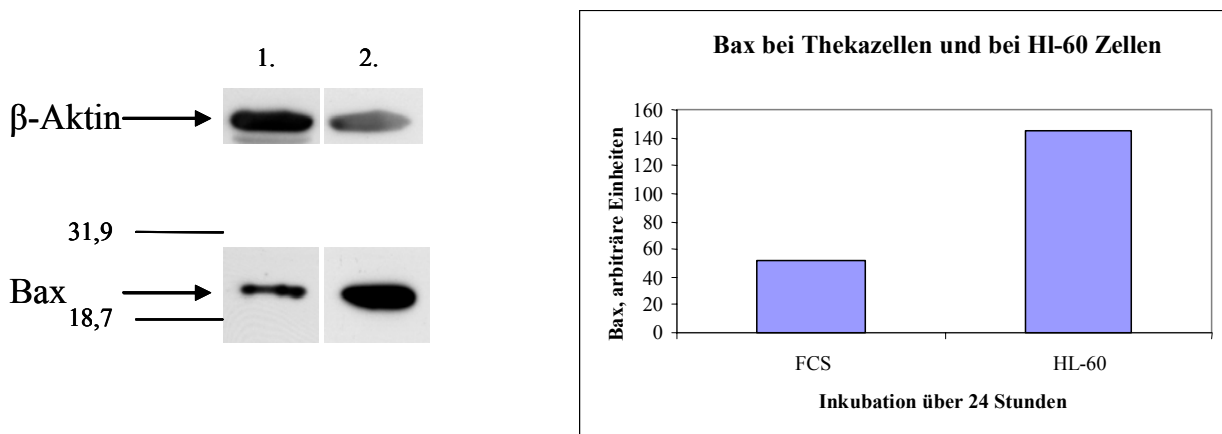


**Abb. 5.5.3** Vergleich der Mengen an Bax-Protein in Thekazellen durch Western Blot vor und nach Einleitung der Apoptose durch 4 Stunden Serumentzug

Thekazellen wurden mit 1. Medium mit 1,5% fetalem Kälberserum und 2. reinem Medium (Serumentzug) über 4 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen homogenisiert und deren Proteine extrahiert. Die Proteine wurden einer Gelelektrophorese unterzogen und auf eine Membran geblottet. Das Protein Bax wurde durch einen spezifischen Antikörper und darauf folgender Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Die Zellen zeigen nach 4 Stunden Serumentzug eine höhere Menge an Bax, als nach Inkubation mit Serum.

Um den Unterschied beziffern zu können, wurde die Dichte der Banden mit Hilfe des Programmes Scion Image gemessen und ausgewertet (\* =  $P < 0,02$  bei  $n = 4$ ).

Es konnte festgestellt werden, dass die Signale für Bax bei Thekazellen selbst nach Apoptoseeinleitung viel geringer waren, als bei der humanen promyeloischen Leukämie-Zelllinie HL-60, die als Kontrolle verwendet wurde (siehe Abb. 5.5.4). Der Unterschied war so groß, dass eine geringere Proteinmenge der HL-60 Zellen verwendet werden musste, um eine Überlagerung der angrenzenden Signale zu verhindern. Bei einem direkten Vergleich muß berücksichtigt werden, dass die Ausgangssituationen unterschiedlich sind. Bei der Kultivierung der HL-60 Zellen wurde eine wesentlich höhere Konzentration an fötalem Kälberserum verwendet, als bei Thekazellen.



**Abb. 5.5.4 Vergleich der Bax-Protein-Mengen in Theka- und HL-60-Zellen mittels Western Blot**

1: Thekazellen, für 24 Stunden mit 1,5% fetalem Kälberserum inkubiert.

2: HL-60 Zellen, mit 10% fetalem Kälberserum inkubiert.

Die Zellen wurden homogenisiert und deren Proteine extrahiert. Die Proteine wurden einer Gelelektrophorese unterzogen und auf eine Membran geblottet. Das Protein Bax wurde durch einen spezifischen Antikörper und darauf folgender Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Die Zellen zeigen einen großen Unterschied in der Bax-Proteinmenge.

Um diesen Unterschied beziffern zu können, wurde die Dichte der Banden mit Hilfe des Programmes Scion Image gemessen und ausgewertet (n = 5).

## **5.6 Wirkung von Lysophosphatidsäure auf die Apoptose der Rinderthekazellen**

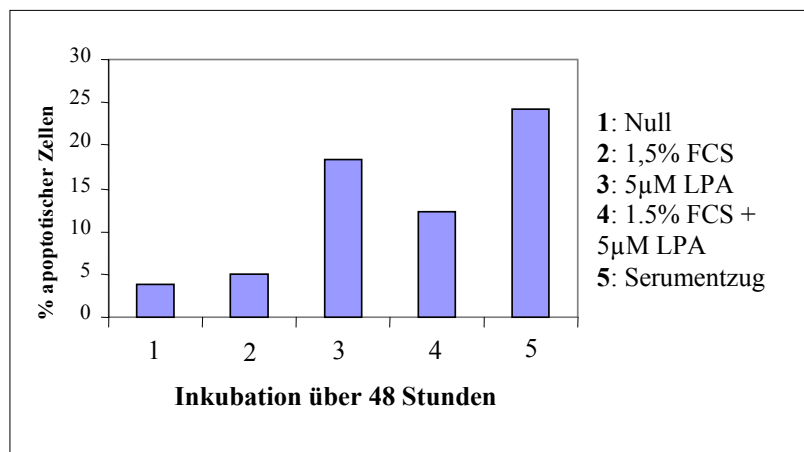
Im Folgenden sollte festgestellt werden, ob Lysophosphatidsäure (LPA) auf die Apoptose von Thekazellen einen Effekt zeigt.

Hierfür wurden alle bisher beschriebenen Methoden angewendet.

### **5.6.1 Morphologische Veränderungen**

Hier wurde die schon beschriebene Methode der morphologischen Beurteilung der Apoptose angewendet. Thekazellen wurden im Phasenkontrastmikroskop und nach DNA-Färbung mit Hoechst 33342 im Fluoreszenzmikroskop unter Anregung der Fluoreszenz betrachtet. Zur Beurteilung wurden die in Kapitel 5.2 beschriebenen Kriterien verwendet. Die Apoptoseeinleitung wurde durch Serumentzug unterschiedlicher Dauer eingeleitet. Es wurden Inkubationszeiten von vier bis 86 Stunden gewählt. Bei langen Inkubationen wurde nach 48 Stunden ein Wechsel des Mediums durchgeführt, bei dem entsprechend der bisherigen Inkubation die Zugabe von Serum und LPA erfolgte.

Alle durchgeführten Versuche bestätigten die antiapoptotische Wirkung von LPA nach Apoptoseeinleitung mit Serumentzug.

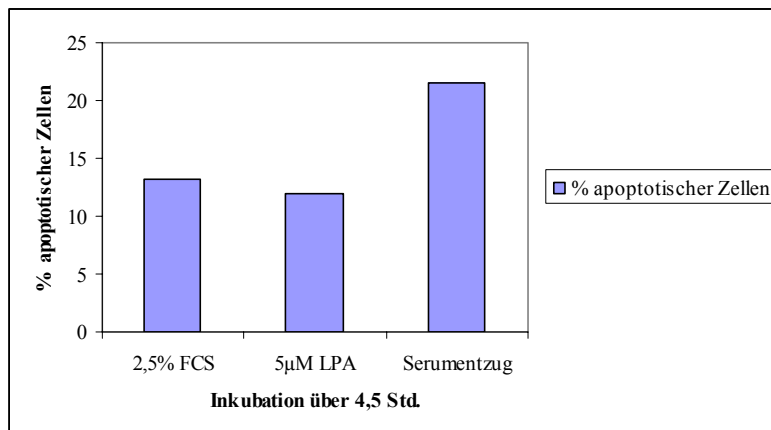


**Abb. 5.6.1 Wirkung von LPA auf die Apoptose von Thekazellen nach 48 Stunden Serumentzug**

Thekazellen wurden in zwei 8-Well Chamber Slides kultiviert. Vor einer Stimulation wurde einer der Chamber Slides fixiert, die DNA der Zellen mit Hoechst 33342 gefärbt und deren Morphologie mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops beurteilt (Null). Zur Beurteilung wurden fünf Abschnitte der Kammern zugezogen, um Unterschiede im Wachstumsverhalten der Zellen berücksichtigen zu können. Die Anzahl der Zellen in diesen fünf Bildabschnitten wurde addiert und der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen ermittelt.

Die Zellen des zweiten Chamber Slides wurden für 48 Stunden einer Stimulation mit 1,5 % fetalem Kälberserum (1,5% FCS), 5µM Lysophosphatidsäure (5 µM LPA), einer Kombination der beiden Stimulationen (1,5% FCS + 5 µM LPA) und reinem Medium ohne Zusatz von Serum (Serumentzug) unterzogen. Danach wurden auch diese Zellen fixiert, gefärbt und beurteilt (n = 1).

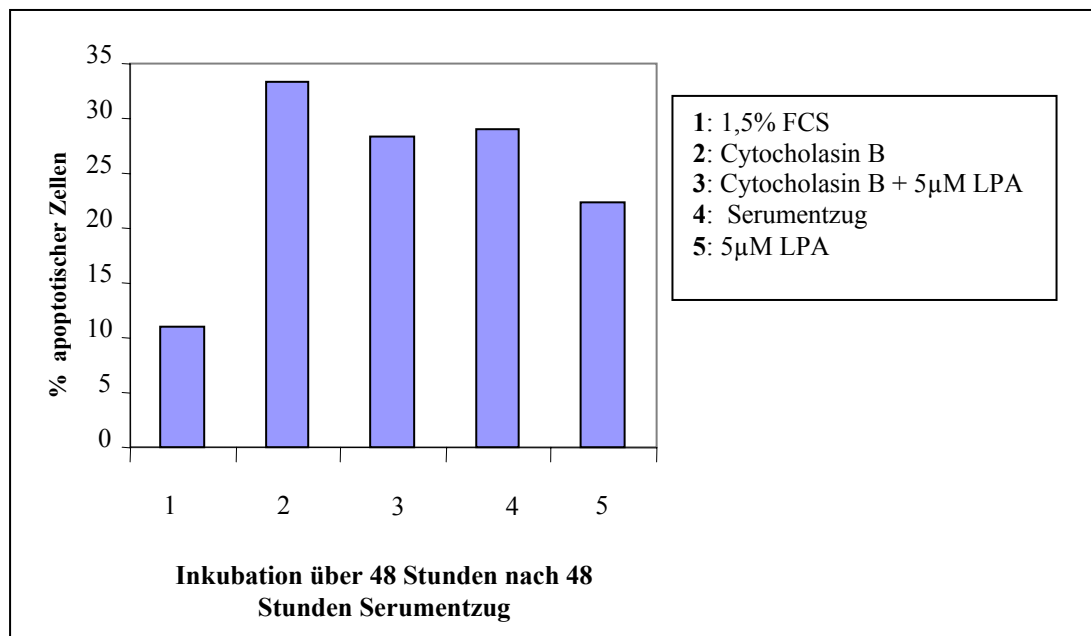
Der antiapoptotische Effekt ist sowohl bei längeren (siehe Abb. 5.6.1), als auch bei kurzen Inkubationszeiten erkennbar (siehe Abb. 5.6.2). Bei letzteren ist die Anzahl der apoptotischen Zellen sogar noch geringer als bei Verwendung von Serum. Dieser Effekt von LPA konnte bei längeren Inkubationszeiten allerdings nicht mehr festgestellt werden.



**Abb. 5.6.2 Wirkung von LPA auf die Apoptose von Thekazellen nach 4,5 Stunden Serumentzug**

Thekazellen wurden in einem 8-Well Chamber Slide kultiviert. Die Zellen wurden für viereinhalb Stunden einer Stimulation mit 1,5 % fetalem Kälberserum (1,5% FCS), 5  $\mu$ M Lysophosphatidsäure (5  $\mu$ M LPA) und reinem Medium ohne Zusatz von Serum (Serumentzug) unterzogen. Danach wurden die Zellen fixiert, die DNA der Zellen mit Hoechst 33342 gefärbt und deren Morphologie mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes beurteilt. Zur Beurteilung wurden fünf Abschnitte der Kammern zugezogen um Unterschiede im Wachstumsverhalten der Zellen berücksichtigen zu können. Die Anzahl der Zellen in diesen fünf Bildabschnitten wurde addiert und der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen ermittelt (n = 1).

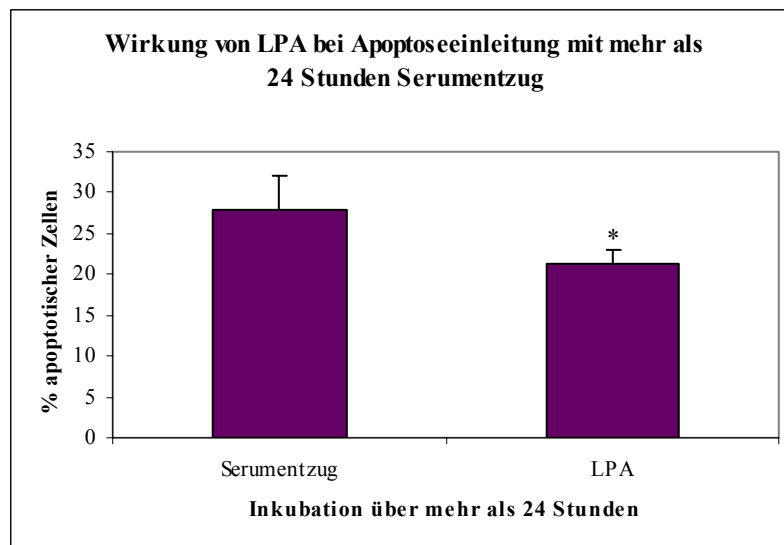
In Anlehnung an die Kulturbedingungen, die zu einer Leiterbildung nach elektrophoretischer Auftrennung der genomischen DNA geführt haben, wurden die Zellen einem 48 stündigen Serumentzug unterzogen und danach über 48 Stunden stimuliert durch Zugabe von Cytocholasin B, fortdauerndem Serumentzug und LPA. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die durchgehend mit Serum kultiviert wurden. LPA hatte einen nur geringfügigen, antiapoptotischen Effekt auf Thekazellen nach Einleitung der Apoptose mit Cytocholasin B (siehe Abb. 5.6.3).



**Abb. 5.6.3 Wirkung von LPA auf die Apoptose von Thekazellen nach Serumentzug und Verwendung von Cytocholasin B**

Thekazellen wurden in einem 8-Well Chamber Slide kultiviert. Die Zellen der ersten Kammer wurden als Kontrolle für 96 Stunden mit 1,5% fötalem Kälberserum kultiviert (1,5% FCS). Alle anderen Zellen wurden für 48 Stunden einem Serumentzug unterzogen. Danach erfolgte eine Stimulation über 48 Stunden mit 5 µM Cytocholasin B (Cytocholasin B), 5 µM Cytocholasin B und 5 µM Lysophosphatidsäure (Cytocholasin B + 5 µM LPA), reinem Medium (Serumentzug) und 5 µM Lysophosphatidsäure (5 µM LPA) unterzogen. All diese Stimulationen wurden unter Abwesenheit von Serum durchgeführt. Danach wurden die Zellen fixiert, die DNA der Zellen mit Hoechst 33342 gefärbt und deren Morphologie mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes beurteilt. Zur Beurteilung wurden fünf Abschnitte der Kammern hinzugezogen, um Unterschiede im Wachstumsverhalten der Zellen berücksichtigen zu können. Die Anzahl der Zellen in diesen fünf Bildabschnitten wurde addiert und der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen ermittelt (n = 1).

Die Statistische Auswertung der Versuche zeigt, dass die Verwendung von LPA bei Inkubationszeiten von mehr als 24 Stunden eine signifikante Reduktion von apoptotischen Zellen im Vergleich zum reinen Serumentzug bewirkt (siehe Abb. 5.6.4).



**Abb. 5.6.4 Statistische Auswertung**

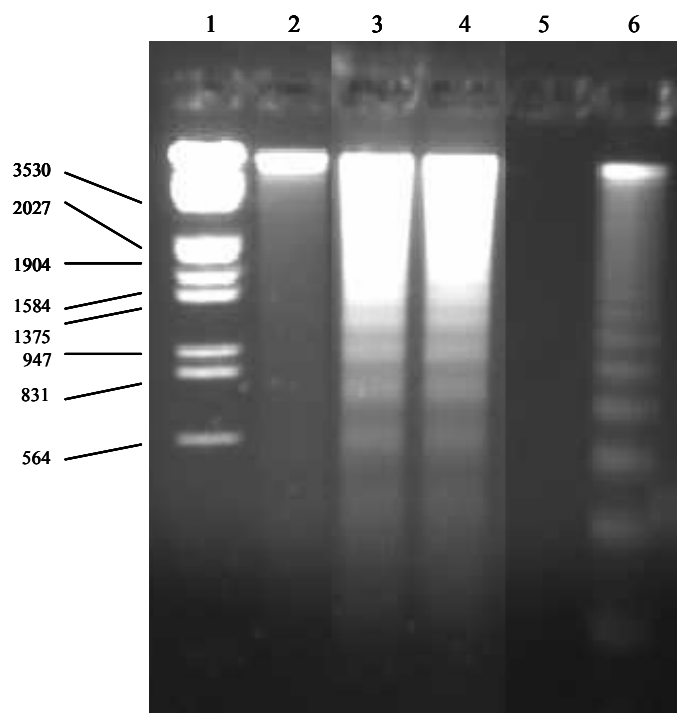
Thekazellen wurden in einem 8-Well Chamber Slide kultiviert. Die Zellen wurden für 24-50 Stunden einem Serumentzug unterzogen oder ohne Serum mit 5  $\mu$ M Lysophosphatidsäure (5  $\mu$ M LPA) versetzt. Danach wurden die Zellen fixiert, die DNA der Zellen mit Hoechst 33342 gefärbt und deren Morphologie mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes beurteilt. Zur Beurteilung wurden fünf Abschnitte der Kammern hinzugezogen, um Unterschiede im Wachstumsverhalten der Zellen berücksichtigen zu können. Die Anzahl der Zellen in diesen fünf Bildabschnitten wurde addiert und der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen ermittelt. Die antiapoptotische Wirkung ist hier signifikant. Bei kurzen Inkubationen konnte keine Signifikanz festgestellt werden (\* =  $P < 0,02$  bei  $n = 3$ ).



### 5.6.2 DNA-Laddering

Die Wirkung von LPA auf apoptotische Prozesse wurde auch mit Hilfe des DNA-Laddering überprüft.

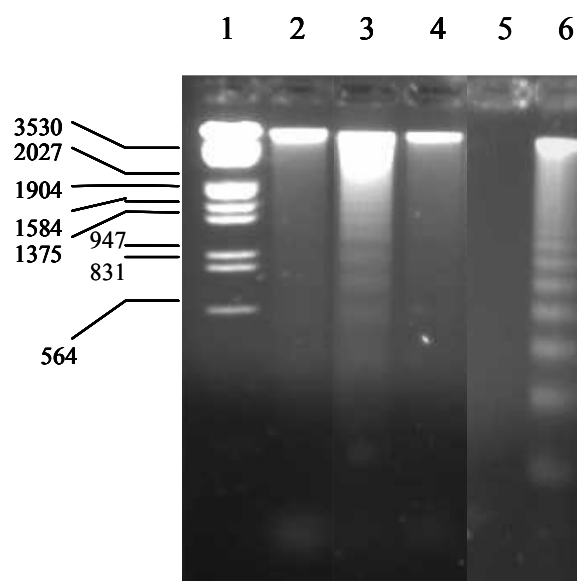
Legt man dieses Kriterium an, stellt sich heraus, dass LPA nicht dazu in der Lage ist, die apoptotische Wirkung von Cytocholasin B aufzuheben oder zu reduzieren (siehe Abb. 5.6.5). Bei Inkubationszeiten zwischen zwei und sieben Tagen konnte LPA die Bildung einer Leiter nach Einsatz von Cytocholasin B nicht verhindern. Diese Versuche wurden dreimal durchgeführt.



**Abb. 5.6.5 Wirkung von LPA auf die DNA-Leiterbildung nach Apoptoseeinleitung mit Cytocholasin B über 5 Tage**

Thekazellen wurden kultiviert und für 48 Stunden einem Serumentzug unterzogen. Danach wurden die Zellen über fünf Tage mit 1,5% FCS (2), 50  $\mu$ M Cytocholasin B (3), bzw. 5  $\mu$ M Cytocholasin B und 5  $\mu$ M LPA (4) inkubiert. Alle 48 Stunden wurde das Medium entnommen, abzentrifugiert und das Pellet aufbewahrt. Die adherenten Zellen wurden erneut inkubiert. Als Negativkontrolle diente Eluationspuffer (5). Die Positivkontrolle des Kits wurde verwendet (6). Als Marker (1) wurde  $\lambda$ 3 verwendet.

Die apoptotische Wirkung von Ceramid 2 in Kombination mit TNF $\alpha$  lässt sich durch Zugabe von LPA verzögern. Während nach fünf Tagen Inkubation noch eine Reduktion der apoptotischen Wirkung zu erkennen ist (siehe Abb. 5.6.6) die durch das Fehlen einer Leiterformation gekennzeichnet ist, kann die Leiterbildung nach sieben Tagen Stimulation mit Ceramid 2 und TNF $\alpha$  durch Zugabe von LPA nicht mehr verhindert werden. Die Versuche wurden dreimal durchgeführt.



**Abb. 5.6.6 Wirkung von LPA auf die DNA-Leiterbildung nach Apoptoseeinleitung mit Ceramid 2 und TNF $\alpha$  über 5 Tage**

1: Marker  $\lambda$ 3

Thekazellen wurden kultiviert und auf folgende Art stimuliert:

2: für 7 Tage mit 1,5% Serum

3: für 48 Stunden einem Serumentzug unterzogen und danach für 5 Tage mit 1  $\mu$ M Ceramid 2 und 100 ng/ml TNF $\alpha$  versetzt.

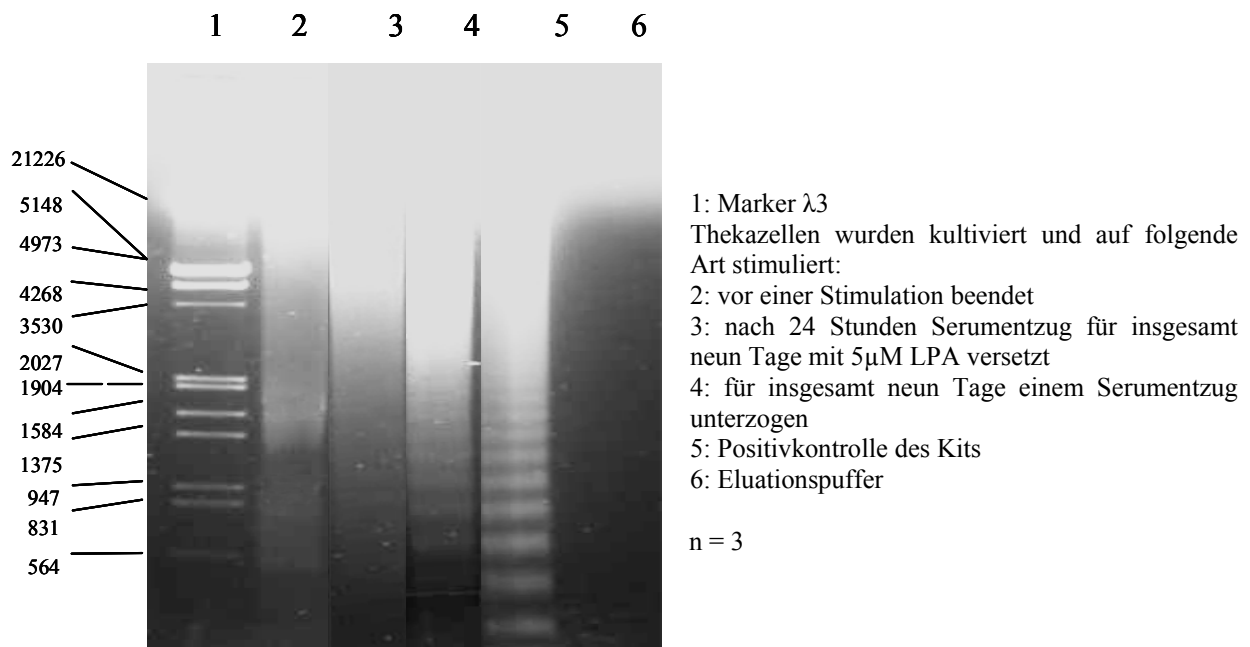
4: für 48 Stunden einem Serumentzug unterzogen und danach für 5 Tage mit 1  $\mu$ M Ceramid 2, 100 ng/ml TNF $\alpha$  und 5  $\mu$ M LPA versetzt.

5: Eluationspuffer

6: Positivkontrolle des Kits

Alle 48 Stunden wurde das Medium entnommen, abzentrifugiert und das Pellet aufbewahrt. Die adherenten Zellen wurden erneut inkubiert.

Auch die Apoptoseeinleitung durch Serumentzug wird mit Hilfe von LPA verzögert (siehe Abb. 5.6.7). Der Versuch wurde dreimal durchgeführt. Zeitliche Unterschiede wurden hier nicht berücksichtigt, da ein kurzzeitiger Serumentzug nicht zuverlässig zu einer Leiterbildung führte.



**Abb. 5.6.7** Wirkung von LPA auf die DNA-Leiterbildung nach Apoptoseeinleitung mit Serumentzug über 9 Tage

### 5.6.3 Western Blot-Analyse der LPA-Wirkung auf die Expression des Bax-Proteins

Die Zellen wurden mit und ohne Zugabe von LPA einem Serumentzug ausgesetzt. Dabei wurden Inkubationszeiten von zwei bis 24 Stunden gewählt. Bei allen durchgeführten Versuchen zeigte sich eine Verringerung der intrazellulären Menge des Bax-Proteins unter Anwesenheit von LPA im Vergleich zu dem reinen Serumentzug.

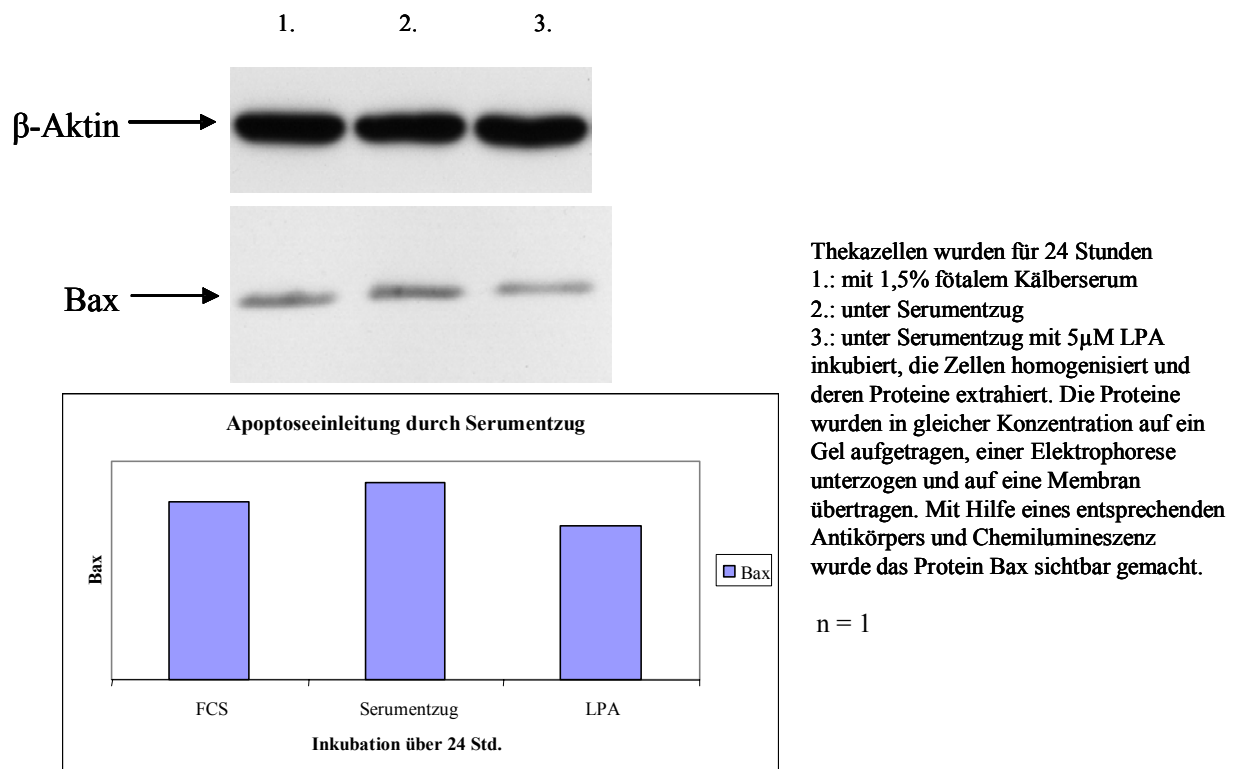
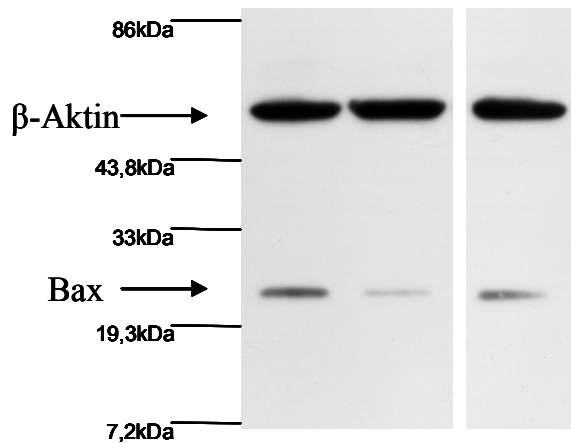


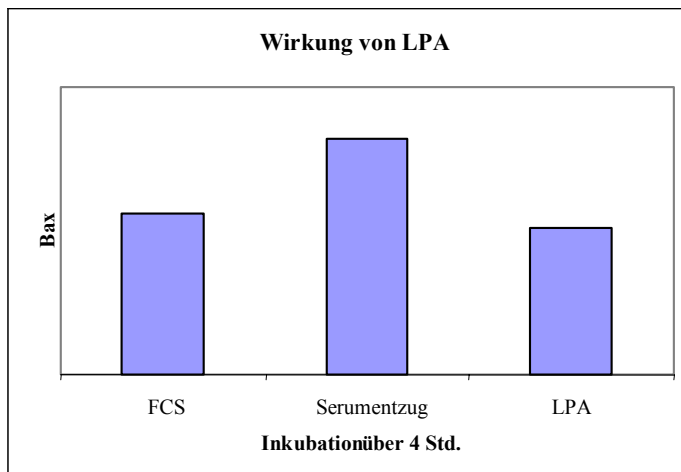
Abb. 5.6.8 Wirkung von LPA auf die Menge an Bax-Protein bei längeren Inkubationszeiten

Es ist zu erkennen, dass die Menge von Bax unter Serumentzug höher ist, als bei Zugabe von Serum. Unter Zugabe von LPA wird die Menge des Bax-Proteins trotz eines Serumentzuges nicht erhöht (siehe Abb. 5.6.8).



Thekazellen wurden für 4 Stunden  
1.: unter Serumentzug  
2.: mit 1,5% fötalem Kälberserum  
3.: unter Serumentzug mit 5  $\mu$ M LPA  
inkubiert, die Zellen homogenisiert und  
deren Proteine extrahiert. Die Proteine  
wurden in gleicher Konzentration auf ein  
Gel aufgetragen, einer Elektrophorese  
unterzogen und auf eine Membran  
übertragen. Mit Hilfe eines entsprechenden  
Antikörpers und Chemilumineszenz  
wurde das Protein Bax sichtbar gemacht.

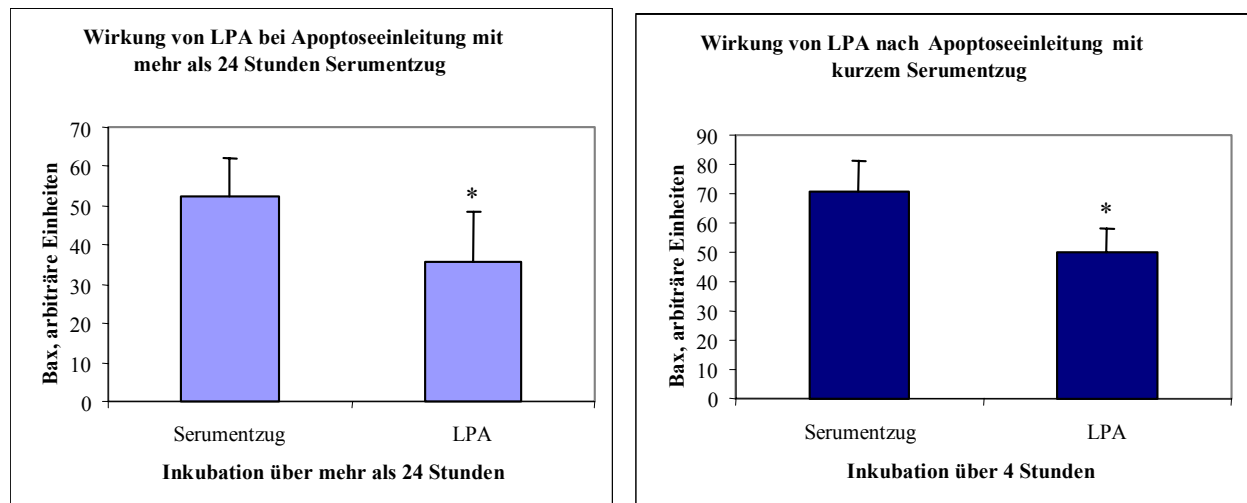
Als Kontrolle der gleichen Proteinmenge  
wurde  $\beta$ -Aktin sichtbar gemacht, welches in  
allen Zellen in der gleiche Konzentration  
vorhanden ist.



n = 1

Abb. 5.6.9 Wirkung von LPA auf die Menge an Bax-Protein bei kurzen Inkubationszeiten

Die Versuche zeigen, dass die Menge von Bax unter Serumentzug höher ist, als bei Zugabe von Serum. Unter Verwendung von LPA wird die Menge des Bax-Proteins trotz eines Serumentzuges nicht erhöht (siehe Abb. 5.6.9).



**Abb. 5.6.10 Statistische Auswertung**

Statistische Auswertung der antiapoptotischen Wirkung von LPA auf Thekazellen.

Links: Apoptoseeinleitung mit 24-48 Stunden Serumentzug

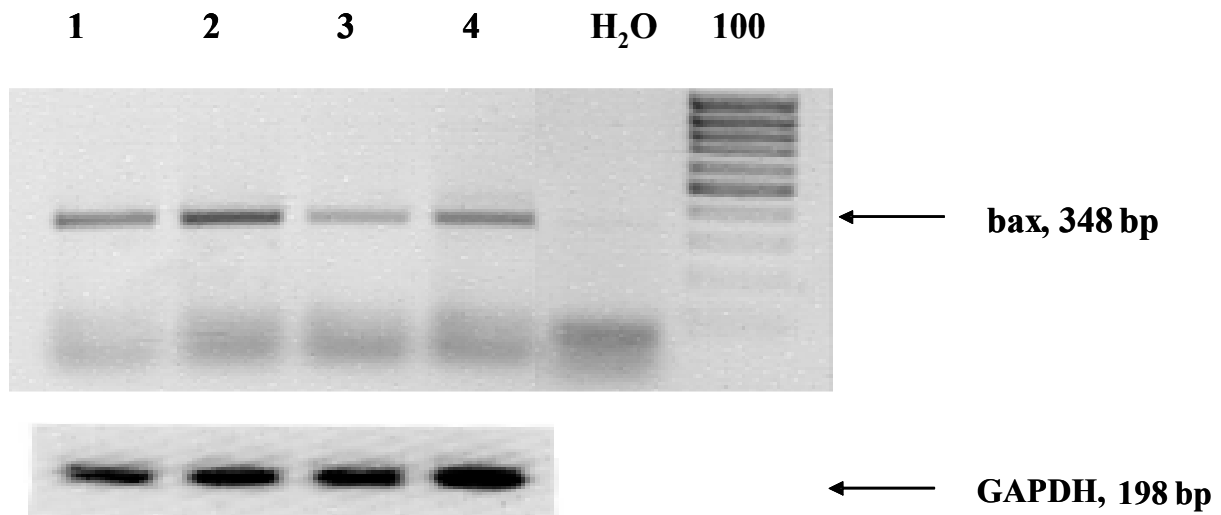
Rechts: Apoptoseeinleitung mit 4 Stunden Serumentzug

Thekazellen wurden 1.: unter Serumentzug, 2.: unter Serumentzug mit 5  $\mu$ M LPA inkubiert, die Zellen homogenisiert und deren Proteine extrahiert. Die Proteine wurden in gleicher Konzentration auf ein Gel aufgetragen, einer Elektrophorese unterzogen und auf eine Membran übertragen. Mit Hilfe eines entsprechenden Antikörpers und Chemilumineszenz wurde das Protein Bax sichtbar gemacht. (\* =  $P < 0,02$  bei  $n = 3$ ).

Die Statistische Auswertung der Versuche zeigt, dass die Verwendung von LPA sowohl bei kurzen Inkubationszeiten, als auch bei Inkubationszeiten von mehr als 24 Stunden eine signifikante Reduktion von Bax im Vergleich zum reinen Serumentzug bewirkt (siehe Abb. 5.6.10).

#### 5.6.4 Wirkung von LPA auf die m-RNA-Menge von Bax

Die proapoptotische Wirkung von Serumentzug auf Thekazellen und deren Verminderung durch den Einsatz von LPA konnte auch auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Dazu wurde eine RT-PCR für die bax-mRNA durchgeführt.



**Abb. 5.6.11 Wirkung von Serumentzug und LPA auf die mRNA-Konzentration von Bax**  
Thekazellen wurden

1. ohne weitere Stimulation als Kontrolle verwendet.
2. über 18 Stunden einem Serumentzug unterzogen.
3. für 18 Stunden ohne Serum aber mit 5 μM LPA stimuliert.
4. für 18 Stunden mit 1,5 % FCS inkubiert.

Die RNA der Zellen wurde isoliert und eine RT-PCR mit einem Primer für Bax durchgeführt. GAPDH dient als Nachweis der gleichmäßig aufgetragenen Menge (n = 1).

Es zeigte sich, dass die Menge der bax-mRNA, wie schon für das Bax-Protein festgestellt, von den Zellkulturbedingungen abhängig war (siehe Abb. 5.6.11). LPA hebt die apoptotische Wirkung eines Serumentzuges auf, indem es schon auf dieser Ebene eingreift.

Da erste Versuche mit Primern für die m-RNA von bovinem bcl-2 keine Ergebnisse zeigten, wurden diese Versuche nicht fortgeführt.

## **6. Diskussion**

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von Methoden zur Feststellung von Apoptose bei kultivierten Thekazellen. Es sollten Bedingungen ermittelt werden, die zur Apoptoseeinleitung der Zellen genutzt werden könnten. Sollte dies gelingen, könnte festgestellt werden, ob LPA einen Einfluß auf diese Prozesse ausübt. Das Zellkultursystem sollte als Modell für die im Ovar ablaufenden Apoptose-Vorgänge dienen, die die Grundlage der Atresie bilden.

### **6.1 Atresie**

Die Atresie ist ein physiologischer Prozess, der im Ovar regelmäßig und häufig stattfindet. Nur mit Hilfe der Atresie kann der natürliche Zyklus und damit die Ovarfunktion aufrechterhalten werden. Dass die Follikelatresie über apoptotische Vorgänge in den beteiligten Zellen des Ovars vollzogen wird, wurde schon häufig untersucht und für mehrere Spezies nachgewiesen, so zum Beispiel bei Ratten (DRAKE et al. 2003; HUGHES et al. 1991; PALUMBO et al. 1994), Schweinen (TILLY et al. 1991), Rindern (YANG et al. 2000; Van WEZEL et al. 1999), Pferden (PEDERSEN et al. 2003) und Menschen (YUAN et al. 1997). Dabei beschränkte sich das Interesse der Forschung aber hauptsächlich auf die Geschehnisse in Granulosazellen, da bei einigen Untersuchungen atretische Follikel eine große Anzahl apoptotischer Granulosazellen aufwiesen, Thekazellen aber keine Hinweise auf apoptotische Prozesse zeigten (TILLY et al. 1995). So konnte inzwischen ein breites Wissen über die Apoptose von Granulosazellen und die endo-, para- und autokrinen Faktoren, die diese beeinflussen, gesammelt werden (MARKSTRÖM et al. 2002; HSUEH et al. 1994; REYNAUD u. DRIANCOURT 2000). Apoptotische Vorgänge bei Thekazellen fanden hingegen bisher kaum Beachtung.

Es ist unbestritten, dass Thekazellen eine wichtige Rolle in der Regulation und Funktion eines Follikels spielen. Allein die Tatsache, dass die Östrogenproduktion durch Granulosazellen ohne die Bereitstellung von Androgenen durch Thekazellen nicht möglich wäre, verdeutlicht die große Bedeutung, die diese Zellen für den Follikel haben (FORTUNE et al. 2001). Auch andere von Thekazellen produzierte Substanzen, wie zum Beispiel Prorenin und Renin, haben



eine wichtige regulatorische Funktion im Ovar (BRUNSWIG-SPICKENHEIER et al. 2003). Die Vermutung liegt nahe, dass Thekazellen auch bei der Atresie eines Follikels von Bedeutung sind.

In neuester Zeit befassen sich einige Veröffentlichungen mit dem Verhalten von Thekazellen im Verlauf der Atresie boviner ovarialer Follikel (CLARK et al. 2004; EVANS et al. 2004). Sie untersuchen Thekazellen von atretischen im Vergleich zu nicht atretischen Follikeln. Im Gegensatz zu Untersuchungen von Thekazellen anderer Spezies, wie einer Untersuchung von porcinen Thekazellen (TILLY et al. 1992) und von Thekazellen der Ratte (FOGHI et al. 1998; PEHLIVAN et al. 2001; YACOBI et al. 2004), wurden bei Rinderthekazellen hauptsächlich Methoden angewendet, die keinen eindeutigen Nachweis für Apoptose geben. So verwendeten CLARK et al. (2004) die TUNEL-Methode zur Untersuchung des Todes von Thekazellen im Zusammenhang mit unterschiedlichen Entwicklungsstadien, in denen Follikelatresie stattfindet. Diese Methode kann jedoch nicht zwischen Apoptose und Nekrose unterscheiden. Auch bei der Nekrose wird die DNA einer Zelle gespalten. Im Unterschied dazu wird bei der Apoptose eine geordnete Spaltung der DNA vollzogen. Die Teilstücke der DNA entsprechen in ihrer Größe immer einem Vielfachen von 180 bp. EVANS et al. (2004) untersuchten Unterschiede bei der Expression von Genen bei Thekazellen atretischer Follikel im Vergleich zu dominanten Follikeln. Sie wiesen allerdings nicht nach, dass tatsächlich apoptotische Prozesse stattfanden. Die beiden oben erwähnten Veröffentlichungen beschäftigen sich mit dem Follikel als Gesamtstruktur. Welche Stoffe direkt auf Thekazellen einwirken und welche über den Einfluß der anderen Follikelzellen wirken, wurde nicht differenziert. TAJIMA et al. (2002) beschäftigten sich mit dem Einfluß von Thekazellen auf den programmierten Zelltod von Granulosazellen in Kokultur mit Thekazellen. Die Thekazellen fanden bei den beschriebenen Versuchen keine Beachtung. Nur VICKERS et al. (2000) fanden erste, eindeutige Hinweise auf apoptotische Vorgänge in bovinen Thekazellen. Sie leiteten die Apoptose auf dem Rezeptor-vermittelten Weg mit Fas-Ligand ein. Die Zellen zeigten sich resistent gegen die Apoptose. Nur nach einer Präinkubation über mehrere Tage mit Interferon- $\gamma$  und einer darauf folgenden, mehrtägigen Inkubation mit Fas-Ligand zeigten die Zellen erste Anzeichen einer beginnenden Apoptose.

Erkenntnisse über apoptotische Vorgänge von Thekazellen und deren Beeinflussung zu gewinnen, ist medizinisch von Interesse. So wurde zum Beispiel festgestellt, dass der Tod von

Thekazellen bei zystisch entarteten Follikeln reduziert ist, was die Regression der Follikel verhindert (ISOBE et al. 2000). Genauere Kenntnisse über die Apoptose von Rinderthekazellen könnten Möglichkeiten zur therapeutischen Beeinflussung der entarteten Zysten ergeben.

## **6.2 Etablierung der Methoden**

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Methoden zum Nachweis von Apoptose in Zellkultur erprobt. Insgesamt sollten mit Hilfe der Versuche unterschiedliche Stadien der Apoptose erfasst und ein eindeutiger, unwiderlegbarer Nachweis apoptotischer Vorgänge bei den Zellen erbracht werden. Früher wurde die Fähigkeit von Thekazellen zur Apoptose in Frage gestellt, da man annahm, dass diese Follikelzellen im Zuge der Atresie in das interstitielle Ovarialgewebe übergehen (PALUMBO et al. 1994).

Da bei Granulosazellen eine unterschiedliche Regulation atretischer Vorgänge je nach Entwicklungsstadium der Follikel festgestellt wurde (YUANG et al. 2000), musste bedacht werden, dass auch Thekazellen einer zyklischen Entwicklung unterliegen. Nach Abschluß dieser Arbeit erschien die Veröffentlichung von CLARK et al. (2004), in der eben diese Vermutung erneut geäußert wird. Um dieser Problematik zu entgehen, wurden Thekazellen von antralen Follikeln gewählt, die größer als 0,5 cm waren und an deren Ovar kein Corpus luteum vorhanden war. Es wurde dabei angenommen, dass es sich um dominante Follikel der letzten Follikelwelle handelte, die dazu bestimmt waren, zu ovulieren.

### **6.2.1 Morphologische Veränderungen**

Zunächst wurden Methoden zur Analyse der Morphologie der Zellen angewandt. Sie wurden im Phasenkontrastmikroskop und nach DNA-Färbung mit Hoechst 33342 Farbstoff im Fluoreszenzmikroskop unter Anregung der Fluoreszenz betrachtet. Dabei konnten eindeutige, morphologische Kriterien der Apoptose festgestellt werden. Die Zellen, die deutliche Anzeichen für einen apoptotischen Vorgang aufwiesen, wurden gezählt und prozentual zur Gesamtzahl der Zellen miteinander verglichen. Die Methode erwies sich als gut durchführbar und wiederholbar.

### 6.2.2 DNA-Leiterbildung

Bei der zweiten Methode, die zur Analyse der Apoptose durchgeführt wurde, stand ein molekularer Nachweis apoptotischer Vorgänge bei Thekazellen im Vordergrund. Dabei sollte festgestellt werden, ob die Zellen im Verlauf der Apoptose die DNA auf die typische, geordnete Weise spalten, wie es für diese Art des Zelltodes üblich ist. Obwohl es bereits Daten von anderen Spezies gibt, wurde die DNA-Leiterbildung bisher noch nie bei bovinen Thekazellen dargestellt (TILLY et al. 1992; FOGHI et al. 1998; PEHLIVAN et al. 2001). Da nicht alle Zellen bei Ablauf der Apoptose eine DNA-Leiterbildung zeigen (ALLEN et al. 1997; COHEN et al. 1992 ; COLLINS et al. 1992; NAGATA et al. 2003), war nicht mit Sicherheit zu erwarten, dass die Methode für Rinderthekazellen durchführbar ist.

Nach Apoptoseeinleitung wurde die genomische DNA der Zellen gewonnen und einer Gelelektrophorese unterzogen. Die DNA wurde dann mit Hilfe von Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht betrachtet.

Die Apoptose von Rinderthekazellen konnte mit dieser Methode eindeutig nachgewiesen werden. Die Zellen zeigten die typische Leiterstruktur der genomischen DNA.

Die Methode erwies sich in der Anfangsphase als schwierig, da zu Beginn meiner Versuche keine Leiterbildung nachgewiesen werden konnte. Zur Apoptoseeinleitung wurde, wie schon bei Granulosazellen erfolgreich durchgeführt (TILLY et al. 1992), ein 48-stündiger Serumentzug gewählt, was bei Thekazellen jedoch nicht ausreichte. Auch nach Verlängerung des Serumentzuges auf sieben Tage konnte keine DNA-Leiter dargestellt werden. Für dieses Ergebnis sind mehrere Erklärungen möglich:

1. Thekazellen sind nicht in der Lage, in Apoptose zu gehen. Gegen diese Möglichkeit sprachen allerdings die morphologischen Ergebnisse.
2. Die Zellen gehen in Apoptose, ohne die typische DNA-Fragmentierung zu durchlaufen. Da eine Leiterbildung schon bei Thekazellen anderer Tierarten nachgewiesen wurde, erschien diese Möglichkeit ebenfalls unwahrscheinlich (TILLY et al. 1992; FOGHI et al. 1998).

3. Die Zellen gehen zu so unterschiedlichen Zeitpunkten in Apoptose, dass nicht genügend fragmentierte DNA zur gleichen Zeit zur Verfügung steht. Schließlich gehen apoptotische Zellen *in vitro* letztendlich den Weg der sekundären Nekrose (siehe Abb. 3.2.1), so dass früh entstandene, apoptotische Zellen und deren DNA vernichtet werden. Dieses Problem wurde noch verstärkt durch die Tatsache, dass auf die Verwendung von radioaktiven Stoffen verzichtet werden sollte. Ethidiumbromid benötigt eine im Vergleich zu autoradiographischen Methoden große Menge an DNA, um die entstandene Leiter sichtbar werden zu lassen (TILLY et al. 1993). Diese Möglichkeit erschien sehr wahrscheinlich, da Follikelzellen bekanntlich je nach Follikelstadium unterschiedlich auf verschiedene apoptotische Stimuli reagieren (YANG et al. 2000; MARKSTRÖM et al. 2002). Die hier verwendeten Zellkulturen wurden aus einem Pool von Thekazellen mehrerer Ovarien erstellt. Trotz der schon beschriebenen Auswahl der verarbeiteten Follikel nach morphologischen Kriterien sind die verwendeten Zellen natürlich nicht alle an genau dem gleichen Tag des Zyklus entnommen.
4. Thekazellen sind möglicherweise in der Lage, angrenzende apoptotische Zellen und deren Apoptosekörperchen zu phagozytieren, so dass nachweisbare Zeichen der Apoptose vernichtet werden (SVENSSON et al. 1999). Diese Fähigkeit ist auch bei Granulosazellen nachgewiesen worden (MARKSTRÖM et al. 2002). Bei den langen Inkubationszeiten, die durchgeführt wurden, könnten Bestandteile von Zellen, die in einem fortgeschrittenen Stadium der Apoptose waren, nicht nur durch die immer stattfindende, sekundäre Nekrose vernichtet worden sein, sondern auch durch die angrenzenden Zellen. Dies erschwerte möglicherweise den Nachweis der Apoptose.
5. Thekazellen sind insgesamt oder besonders in der hier untersuchten dominanten Phase sehr apoptoseresistent, so dass zumindest der Serumentzug bei einer zu geringen Zahl von Zellen eine Apoptoseeinleitung bewirkt.

Um den oder die zutreffenden Gründe herauszufinden, wurde die Versuchsanordnung, wie schon beschrieben, verändert. Es wurde ein 24-48 stündiger Serumentzug durchgeführt, um die Zellen zu synchronisieren, d.h. in die gleiche Ausgangsposition, das Stadium G0, zu bringen. Dann wurden zusätzlich stark proapoptotisch wirksame Substanzen eingesetzt, wie Etoposide, Paclitaxel und Cytocholasin B. Zur Verhinderung des Verlustes von apoptotischen

Zellen oder Zellresten durch Phagozytose oder sekundäre Nekrose wurde alle 48 Stunden das Medium entnommen, abzentrifugiert und das Pellet bei  $-40^{\circ}\text{C}$  verwahrt bis zur Gewinnung der genomischen DNA.

Mit dem veränderten Versuchsaufbau konnte gezeigt werden, dass Rinderthekazellen in Apoptose gehen und die typische DNA-Leiterstruktur bilden können. Die Zellen sind jedoch sehr widerstandsfähig gegen jegliche Apoptoseeinleitung. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den von VICKERS et al. (2000) beschriebenen Befunden. Andere Zellen gehen bei einer Inkubation mit proapoptotischen Substanzen sehr viel früher und in großer Anzahl in Apoptose (TILLY et al. 1992).

Die Zellen der Theka interna bilden die äußeren Schichten eines Follikels. Sie umgeben die Granulosazellen und die Oozyte. Ihre große Apoptoseresistenz kann damit begründet werden, dass sie, zumindest in diesem Entwicklungsstadium, eine Schutzfunktion für die übrigen Follikelzellen erfüllen. Diese Annahme lässt sich durch die Ergebnisse von TAJIMA et al. (2002) bestätigen. Sie zeigten, dass die Anwesenheit von Thekazellen antiapoptotisch auf Granulosazellen wirkt. Ihre Untersuchungen beschränkten sich dabei nur auf die Entwicklung der Granulosazellen, die Thekazellen wurden nicht untersucht.

### **6.2.3 Produktion von cAMP und Progesteron durch Thekazellkulturen**

Kontrollversuche ergaben, dass die kultivierten Zellen noch immer typische Eigenschaften der Theca interna zeigten. Mit einer Stimulation mit luteotropem Hormon und Forskolin konnte nach mehreren Tagen des Serumentzuges eine Reaktion der Zellen mit cAMP- und Progesteronbildung nachgewiesen werden. Es wurde weniger cAMP und Progesteron gebildet als vor der Apoptoseeinleitung. Diese Reaktion ist nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, dass die Gesamtzahl der vitalen Zellen reduziert wurde.

### **6.2.4 Produktion von Apoptose-spezifischen Proteinen**

Während des apoptotischen Prozesses werden viele verschiedene Proteine freigesetzt, gespalten und verändert. Es gibt mehrere Apoptose-spezifische Markerproteine (siehe Kapitel 3.2.3.2). Dies bietet eine gute Möglichkeit, unterschiedliche Stadien der Apoptose und deren Regulation zu verfolgen.

Es stellte sich leider als schwierig heraus, Antikörper apoptosespezifischer Proteine zu finden, die für die Spezies Rind kreuzreagieren. Zuerst sollte das Protein Caspase 3 nachgewiesen werden. Es konnten keine Antikörper erworben werden, die auf ihre spezifische Reaktivität bei Rinderzellen getestet worden waren. Dennoch wurden mehrere Antikörper unter verschiedenen Versuchsbedingungen getestet. Es wurde kein Signal sichtbar. Obwohl das Protein Caspase 3 des Rindes eine hohe Sequenzhomologie zu dem des Menschen (86%), der Maus (84%) und der Ratte (86%) aufweist, war dieses Vorhaben nicht durchführbar.

Auch der Nachweis von PARP (Poly-Adenosindiphosphat-Ribose-Polymerase), einem während des apoptotischen Prozesses gespaltenen Kernproteins (siehe Kapitel 3.2.3.2), konnte nicht erbracht werden, da der verwendete Antikörper kein Signal hervorbrachte. Das bovine Protein PARP zeigt eine hohe Sequenzhomologie zu dem Protein des Menschen (83%), der Maus (81%) und der Ratte (89%).

RUEDA et al. (1997) beschrieben dieses Problem für das Protein p53 von bovinen Lutealzellen.

Ein in einigen Veröffentlichungen (GOODWIN et al. 2004; JORDAN et al. 2002) als geeignet beschriebener Antikörper für Bcl-2 der Firma Santa Cruz zeigte eine Vielzahl von Banden. Die Sequenzhomologie des Proteins Bcl-2 des Rindes zu dem entsprechenden Protein anderer Spezies ist weit geringer, als die der zuvor genannten Proteine. Sie liegt bei 69% im Vergleich zu den Spezies Mensch, Maus und Ratte. Ergebnisse aus Untersuchungen mit diesem Antikörper erschienen als nicht gesichert.

Nur ein Antikörper konnte ermittelt werden, der eindeutige Ergebnisse erbrachte. Mit dem Antikörper gegen Bax der Firma Upstate Biotechnology konnten verwertbare Blots mit einzelnen Banden erzeugt werden. Ein Vergleich der Homologie der Sequenz des Proteins Bax des Rindes mit der Sequenz anderer Spezies ergab eine prozentuale Homologie zu dem Protein des Menschen von 97%, dem der Maus von 93% und dem der Ratte von 94%.

Mit Hilfe des Proteins Bax konnte die proapoptotische Wirkung von Serumentzug auf Thekazellen bestätigt werden. Es konnte eine Erhöhung der Menge an Bax-Protein in Zellen festgestellt werden, die einem Serumentzug unterzogen wurden, im Vergleich zu Zellen, die entsprechend lange mit Serum inkubiert worden waren.

Die Wirkungsweise der Proteine der Bcl-2 Familie konnte bis heute noch nicht eindeutig geklärt werden. Das Verhältnis proapoptotischer zu antiapoptotischen Proteinen dieser Familie scheint allerdings relevant für das weitere Schicksal der einzelnen Zelle zu sein. Somit stellt sich in dieser Arbeit die Frage, ob Konzentrationsverschiebungen von Bax allein überhaupt für eine definitive Aussage über einen stattfindenden, apoptotischen Prozess ausreichen. Da keine Ergebnisse das Protein Bcl-2 betreffend in Rinderthekazellen erzielt werden konnten, fehlt die Möglichkeit, die Verschiebung des Mengenverhältnisses dieser beiden Proteine zueinander zu ermitteln. Mit diesem Thema beschäftigte sich die Veröffentlichung von TILLY et al. (1995). Die Autoren fanden heraus, dass keine nennenswerten Unterschiede der mRNA-Menge von bcl-2 und bcl-x bei apoptotischen Rattengranulosazellen im Vergleich zu vitalen Zellen vorhanden waren. Im Gegensatz dazu wurden deutliche Diskrepanzen in der mRNA-Menge von bax bei apoptotischen und vitalen Zellen festgestellt. Die Autoren schlossen daraus, dass das Protein Bax bei der Apoptose von Ovarialzellen die entscheidende Rolle einnimmt. RUEDA et al. (1997) zeigten ähnliche Ergebnisse. Sie konnten in Zellen des bovinen Corpus luteum unterschiedliche Mengen der mRNA von bax bei tragenden Rindern im Vergleich zu nicht tragenden feststellen, deren Gelbkörper sich in Rückbildung befanden. Die Zellen der tragenden Rinder zeigten deutlich weniger bax-mRNA als die Zellen nicht tragender Rinder. Sie konnten ebenfalls keine nennenswerten Unterschiede bei der mRNA von bcl-x ermitteln. Bei diesen Untersuchungen handelt es sich zwar nicht um Ergebnisse auf der Proteinebene, trotzdem unterstützen sie das Ergebnis dieser Arbeit, dass eine Erhöhung der Menge an Bax-Protein allein einen deutlichen Hinweis auf apoptotische Vorgänge in Thekazellen darstellt. Ob andere antiapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie eine Rolle spielen, bleibt zu untersuchen.

### **6.2.5 Produktion der entsprechenden mRNAs**

Die oben genannten Versuche ermutigten zu einer Untersuchung der bax-mRNA und bcl-2-mRNA boviner Thekazellen. Auch in dieser Arbeit konnte eine Erhöhung der mRNA von bax bei apoptotischen im Vergleich zu vitalen Zellen ermittelt werden. Dieses Ergebnis sollte allerdings nicht allein ausreichen, um apoptotische Vorgänge in Zellen nachzuweisen, da viele Hypothesen vermuten lassen, dass die Proteine der Bcl-2 Familie ihren Einfluß auf apoptotische Prozesse auf posttranslationaler Ebene ausüben. Eine Regulation auf

Proteinebene würde dem schnellen Ablauf der apoptotischen Mechanismen in anderen Zellen Rechnung tragen. Die hier erzielten Ergebnisse widersprechen diesen Hypothesen. Da Thekazellen sehr langsam in Apoptose gehen, besteht die Möglichkeit, dass die Regulation der Proteine der Bcl-2-Familie bei diesen Zellen anders als in anderen Zellsystemen verläuft. Wie auch bei RUEDA et al. (1997) konnten trotz Verwendung von Primern aus bovinen Sequenzen keine Fragmente amplifiziert werden.

Unter Berücksichtigung all dieser Befunde liegt die Vermutung nahe, dass das Protein Bax die entscheidende Rolle bei der Apoptose der Thekazellen spielt. Möglicherweise wird Bcl-2 in bovinen Thekazellen überhaupt nicht exprimiert. Das würde auch die vergeblichen Versuche mit Hilfe der Western Blot Methode erklären.

## **6.3 Apoptoseeinleitung in Thekazellkulturen**

### **6.3.1 Serumentzug**

Mit Hilfe aller durchgeführten Versuche konnte festgestellt werden, dass Serumentzug Apoptose bei Rinderthekazellen einleiten kann. Serumentzug bewirkt eine Apoptoseinduktion über den sogenannten intrinsischen Weg, der vor allem über das Mitochondrium verläuft (siehe Kapitel 3.2.3).

Diese Methode wurde schon bei vielen Zellen unterschiedlichsten Ursprungs erfolgreich angewendet, zum Beispiel bei verschiedenen neuronalen Zellen (AHLEMEYER et al. 1997; EVES et al. 1998), Beta-Zellen des Pankreas (MIZUNO et al. 1998), glatten Muskelzellen der Blutgefäße (AOKI et al. 1997), Endothelzellen (KARSAN et al. 1997) und Sertolizellen (POGNAN et al. 1997). Auch ovariale Zellen reagieren auf einen Serumentzug mit Apoptose, unter anderem Granulosazellen verschiedener Spezies (MARKSTRÖM et al. 2002; TILLY et al. 1992) auch von Rindern (TAJIMA et al. 2002). Diese Form der Apoptoseeinleitung ist sehr einfach durchzuführen. Im Gegensatz zu den weiteren Möglichkeiten, die hier aufgezeigt wurden, benötigt man keine teuren und für den Untersucher gesundheitsgefährdenden Substanzen.



Da LPA ein Serumbestandteil ist und die Wirkung von LPA auf die Apoptose von Thekazellen untersucht werden sollte, war Serumentzug die Methode der Wahl zur Apoptoseeinleitung.

Nur der Nachweis einer DNA-Leiterbildung nach Serumentzug erwies sich als weniger geeignet, da eine sehr lange Inkubationszeit und ein aufwendiger Versuchsaufbau notwendig waren. 48 Stunden Serumentzug bewirkten eine Apoptose bei 27% der Zellen. Ein derart niedriger Anteil von Zellen reicht nicht aus, um eine DNA-Leiter mit Ethidiumbromid sichtbar zu machen. Darum wurden zusätzlich apoptoseinduzierende Substanzen angewandt. Als geeignet erwiesen sich Cytostatika.

### **6.3.2 Cytostatika**

#### ***6.3.2.1 Paclitaxel***

Paclitaxel gehört zu der Gruppe der Taxane, Tubulin bindenden Substanzen, die die Festigkeit der Mikrotubuli einer Zelle erhöhen. Sie beenden den Zellzyklus in der Anaphase der Mitose. Diese Funktion wurde als Auslöser der Apoptose bei Zellen angesehen, die mit Paclitaxel versetzt wurden (DUMONTET et al. 1999). Inzwischen stellte sich heraus, dass Paclitaxel je nach Konzentration und Inkubationsdauer unterschiedliche Wege der Apoptoseeinleitung beschreitet. Der Mechanismus konnte noch nicht eindeutig geklärt werden. Hohe Konzentrationen wirken über die Zerstörung großer Mengen an Mikrotubuli, Genregulation von Bcl-2-Familienmitgliedern oder auch der Aktivierung von JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases), die eine proapoptotische Wirkung zeigen. Geringere Konzentrationen unter 200 nM, wie die hier verwendete, scheinen aber hauptsächlich über den Abbruch des Zellzyklus zu wirken. Dabei wird die Phosphorylierung von Bcl-2 gefördert, wobei noch keine Einigung darüber besteht, ob dies pro- oder antiapoptotische Konsequenzen nach sich zieht (WANG et al. 2000).

Tatsächlich konnte mit Hilfe von 0,05  $\mu\text{M}$  Paclitaxel eine DNA-Leiter erzeugt werden. Hier wurde eine siebentägige Inkubation mit 0,05  $\mu\text{M}$  Paclitaxel durchgeführt, wobei eine DNA-Leiter gebildet wurde. Interessanterweise ergab eine Überprüfung der Wirksamkeit von Paclitaxel nach 48 Stunden Inkubation mit Hilfe der morphologischen Kriterien keine stärkere Induktion der Apoptose mit Paclitaxel als mit Hilfe des Serumentzuges.

### **6.3.2.2 Etoposide**

Topoisomerase II ist ein Enzym, das die DNA zerschneiden kann. Es zerschneidet den DNA-Doppelstrang und kann ihn ebenfalls wieder miteinander verbinden. Die Teile der DNA liegen aber nicht einzeln im Zellkern, sondern werden von der Topoisomerase II durch Proteinbrücken miteinander verbunden. Dieser Topoisomerase II-DNA-Teilstück-Komplex existiert nur für eine kurze Zeit und wird so von der Zelle toleriert. Topoisomerase II ist ein wichtiges Enzym für die Transkription, Rekombination und Replikation. Etoposide reduziert die Fähigkeit von Topoisomerase II, die DNA-Teilstücke wieder miteinander zu verbinden. Es entstehen permanent existierende Teilstücke der DNA, Mutationen und Rekombinationsfehler. Die Zellen gehen in Apoptose.

Leider konnte eine siebentägige Inkubation mit Etoposide (5  $\mu\text{M}$ ) keine eindeutige Leiterbildung bei Thekazellen hervorrufen. Auf weitere Versuche mit der Substanz wurde verzichtet. Wieder wurde festgestellt, dass Thekazellen eine große Apoptoseresistenz aufweisen.

### **6.3.2.3 Cytocholasin B**

Cytocholasin B ist ein Pilzalkaloid, welches den Aufbau von Mikrofilamenten innerhalb einer Zelle verhindert. Es verhindert die Furchenbildung während der Zytokinese und bewirkt eine Blockade des Zellzyklus. Damit scheint es die Apoptose in ähnlicher Weise einzuleiten, wie Paclitaxel.

Eine Induktion der Apoptose mit Cytocholasin B (5  $\mu\text{M}$ ) führte schon nach 48 Stunden zu einer Leiterformation der DNA boviner Thekazellen.

### **6.3.3 TNF $\alpha$ und Ceramide**

Es gab mehrere Gründe, die Kombination dieser beiden proapoptotischen Substanzen in dieser Arbeit zu verwenden. Es sollte eine Methode der Apoptoseeinleitung über einen der sogenannten Todesrezeptoren durchgeführt werden (siehe Kapitel 3.2.3.2). Da TNF $\alpha$  aber in einigen Zellsystemen auch keine proapoptotischen Funktionen zeigte (RATH et al. 1999) und die Wirkung auf Thekazellen umstritten ist (FOGHI et al. 1998; PEHLIVAN et al. 2001),

sollte die Wirkung von TNF $\alpha$  noch verstärkt werden. Der rezeptorvermittelte Weg der Apoptose wird durch die Bildung von Ceramiden verstärkt (RATH et al. 1999).

Ceramide sind Moleküle, die an der Signaltransduktion beteiligt sind. Sie entstehen durch die Hydrolyse von Sphingomyelin, einem Membranphospholipid, durch das Enzym Sphingomyelinase (MORITA et al. 1998), welches durch TNF aktiviert wird. Ceramide werden in einigen Zellen auch de novo synthetisiert über die Ceramidsynthese, ein Vorgang, der auch durch TNF unterstützt wird (RATH et al. 1999). Wie genau Ceramide ihre proapoptotische Wirkung ausüben, ist noch nicht eindeutig geklärt. Sicher ist, dass Ceramide sehr vielfältige Wege der Apoptoseeinleitung beschreiten (KOLESNICK et al. 2003). Ihre proapoptotische Wirkung durch die Aktivierung von Kinasen wie SAPKs (stress activated protein kinases) und JNKs ist schon länger bekannt (GOMEZ-MUNOZ 1997). Allerdings kommen immer wieder neue Aspekte der Ceramidsignaltransduktion hinzu. Dabei scheint auch der mitochondriale Weg der Apoptoseeinleitung beschritten zu werden (PETAK et al. 2001).

Für die hier durchgeführten Versuche wurden kurzkettige Ceramide verwendet, um die Zellpermeabilität zu gewährleisten.

#### **6.4 Die Wirkung von LPA**

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, die Wirkung der Lysophosphatidsäure auf Thekazellen festzustellen. LPA ist eines der kleinsten Glycerophospholipide, und besteht aus einer Phosphatgruppe, einem Glycerolgerüst und einem lipophilen Rest. Die Phosphatgruppe ist für die Rezeptorbindung notwendig, der lipophile Rest für die biologische Aktivität verantwortlich (SANTOS et al. 2000).

Der lipophile Rest steht mit dem Glycerolgerüst durch eine Acyl-, eine Alkyl- oder eine Alkenylbindung in Verbindung. LPA ist ein Bestandteil des Blutserums, wo es in einer Konzentration von 2-20  $\mu$ M zu finden ist (BUDNIK et al. 2002a).

Dieses biologisch aktive Glycerolipid stimuliert die Zellen über spezifische Rezeptoren. Drei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit einer Siebentransmembrandomäne sind als LPA<sub>1,2,3</sub>-Rezeptoren bezeichnet worden, da sie eine hohe Affinität zu dem kleinen Phospholipid zeigen. Diese Rezeptoren sind schon bekannt unter der Bezeichnung edg-2, -4 und -7. Die

üblichen Signaltransduktionswege der drei LPA-Rezeptoren sind eingehend untersucht worden. Die Rezeptoren koppeln an mindestens drei verschiedene G-Proteine, die auf unterschiedlichen Wegen die multiplen Effekte von LPA auf die Zielzelle bewirken (YE et al. 2002).

Mehrere Zellen sind bekannt, die dazu in der Lage sind, LPA zu produzieren. Zu diesen gehören aktivierte Thrombozyten (EICHHOLTZ et al. 1993), Fettzellen (FANG et al. 2000b), Leukozyten (GOETZL et al. 1998), Fibroblasten (FUKAMI et al. 1992) und endotheliale Zellen (FANG et al. 2000). Die Relevanz von LPA für Ovarialgewebe wurde erstmalig dadurch erkannt, dass Aszites und Serum von Patienten, die an Ovarialkarzinomen litten, eine hohe Konzentration von LPA aufwies (FANG et al. 2000). Es konnte nachgewiesen werden, dass Ovarialkarzinomzellen in der Lage sind, LPA zu produzieren, das als Marker für diese Erkrankung fungiert (EDER et al. 2000). In diesem Zusammenhang wird LPA für die Cancerogenität und Resistenz gegenüber Chemotherapeutika verantwortlich gemacht (FANG et al. 2000).

In letzter Zeit ist das Interesse an LPA auch im physiologischen Bereich des weiblichen Genitaltraktes gestiegen. Eine Relevanz bei der Einleitung der Geburt wird vermutet (BUDNIK et al. 2002b; TOKUMURA et al. 2002) und es konnte ein Rezeptor für LPA bei Lutealzellen nachgewiesen werden (BUDNIK et al. 1997). Die Flüssigkeit gesunder Follikel beinhaltet LPA (BUDNIK et al. 2002a; GAITS et al. 2002). Inzwischen konnte auch bei bovinen Thekazellen der LPA-Rezeptor ( $LPA_1$ ) nachgewiesen werden (BUDNIK et al. 2003b). Es ist also sehr wahrscheinlich, dass LPA in dem weiblichen Genitaltrakt nicht nur die Rolle eines Tumormarkers spielt, sondern auch für physiologische Prozesse von Bedeutung ist (BUDNIK 2003a).

Bei dem Phospholipid ist schon an verschiedenen Zellarten eine proliferative und antiapoptotische Wirkung festgestellt worden. MORITA und TILLY (2000) wiesen schon darauf hin, dass die Erforschung der Auswirkungen von Glycero- und Sphingolipiden auf apoptotische Prozesse des Ovars Möglichkeiten für therapeutische Ansätze bieten könnte. Möglichkeiten der Nutzung bestünden im Bereich der Kontrazeptiva, der Prävention von Unfruchtbarkeit bei Krebspatienten oder bei der Verlängerung der Dauer der Fruchtbarkeit der Frau.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass LPA eindeutig einen antiapoptotischen Effekt auf bovine Thekazellen ausübt. Alle morphologischen Kriterien bestätigen dieses Ergebnis. Eine nach Serumentzug sichtbare Leiterbildung konnte bei zusätzlicher Inkubation mit dem Phospholipid nicht mehr festgestellt werden. Die Inkubation mit Cytocholasin B zeigte aber sowohl mit als auch ohne den Zusatz von LPA eine Leiter. Hier scheint der schützende Effekt von LPA nur geringgradig zu sein. Der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen konnte nicht so effektiv reduziert werden, dass die DNA-Fragmente nicht mehr sichtbar waren. Versuche über 48 Stunden mit morphologischen Kriterien zeigten einen geringgradigen antiapoptotischen Effekt von LPA nach Einleitung der Apoptose mit Cytocholasin B. Dieser Effekt könnte auf die Aufhebung der proapoptotischen Wirkung des Serumentzuges zurückzuführen sein.

Die Wirkung von LPA geht mit einer Verringerung der intrazellulären Menge an Bax einher. Das steht im Einklang mit den Ergebnissen von GOETZL et al. (1999), die einen entsprechenden Effekt von LPA auf T-Zellen feststellen konnten. Der protektive Effekt von LPA wird also möglicherweise durch eine Behinderung des intrinsischen Weges hervorgerufen. Da die Einleitung der Apoptose bei Rinderthekazellen eine Erhöhung der bax-mRNA-Menge zur Folge hatte, wurde auch der Effekt von LPA auf die mRNA-Menge überprüft. Auch hier konnte eine Modifikation auf Transskriptionsebene festgestellt werden.

Es gibt nur zwei Veröffentlichungen, die sich bisher mit dem Effekt von LPA auf Thekazellen beschäftigen (BUDNIK et al. 2002b, 2003b). Sie beschreiben auch mögliche Signaltransduktionswege, die von LPA in diesen Zellen besritten werden. LPA bewirkt in LH-stimulierten Thekazellen die Translokation von PKC $\delta$  vom Zytosol zum Zellkern. Dieses Protein ist in anderen Zellen schon für eine antiapoptotische Wirkung bekannt (BUDNIK et al. 2002b). Weiterhin wurde eine Aktivierung der MAP-Kinase ERK festgestellt (BUDNIK et al. 2003b). Ein antiapoptotischer Effekt einer Aktivierung von ERK-1 und ERK-2 wurde schon bei Fibroblasten festgestellt (CLARK et al. 1995; HANKS et al. 1997). Möglicherweise bedient sich LPA bei seiner Beeinflussung der Apoptose von Thekazellen des gleichen Signaltransduktionsweges.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass Thekazellen in Zellkultur die typische Form der Apoptose durchlaufen. Sie zeigen die morphologischen Erscheinungen eines apoptotischen Prozesses. Ihre genomische DNA wird in der bei Apoptose üblichen Form

zerstört. Während des apoptotischen Prozesses wird die Gesamtmenge des Proteins Bax und dessen mRNA erhöht. Die Apoptose kann mit Hilfe von Serumentzug, Cytocholasin B, Paclitaxel, Etoposide und TNF $\alpha$  in Kombination mit Ceramid 2 eingeleitet werden. Allerdings sind bovine Thekazellen sehr apoptoseresistent.

Das Phospholipid LPA hat einen antiapoptotischen Effekt auf Thekazellen. Dabei verringert es die Menge des Proteins Bax und die seiner mRNA.

(Bettina Jörß)

## **7. Zusammenfassung**

Obwohl der ovarielle Zyklus im wesentlichen aus einer Abfolge von Follikelreifung, Ovulation, Corpus luteum Bildung und Luteolyse besteht, darf nicht vergessen werden, dass das Schicksal der meisten Follikel der programmierte Zelltod, die Apoptose, ist. Störungen der Apoptose können nicht nur die Ovarfunktion und damit die Reproduktionsfähigkeit eines Organismus erheblich beeinflussen, sondern führen auch zu kanzerogenen Transformationen. Während man jedoch auf eine umfangreiche Literatur über apoptotische Vorgänge in Granulosa- und Lutealzellen verschiedener Spezies zurückgreifen kann, ist relativ wenig über die Apoptose in Thekazellen bekannt. Bei einigen Spezies wurde die Fähigkeit der Thekazellen, in Apoptose zu gehen, lange in Frage gestellt. Ziel dieser Arbeit war es, zunächst Methoden zu etablieren, die ermöglichen, Thekazellen gezielt in die Apoptose zu bringen und diese eindeutig nachzuweisen. Als Untersuchungsmaterial dienten Thekazellen des Rindes, da einerseits bereits Isolierungsmethoden und in vitro Zellkulturbedingungen etabliert sind, andererseits wenig über deren Apoptoseverhalten bekannt ist.

Nach erfolgreicher Etablierung der Methoden sollten Bedingungen untersucht werden, die die Apoptose in vitro beeinflussen können. Der Schwerpunkt sollte dabei auf der Untersuchung des Einflusses der Lysophosphatidsäure (LPA) liegen. Dieses Molekül ist bei Ovarkarzinomen in hoher Konzentration im Blut und im Aszites zu finden und wird somit als ein möglicher Marker für Ovarkarzinome angesehen. Da es jedoch in anderen Zellsystemen eine Resistenz gegen bestimmte, in der Krebstherapie verwendete Chemotherapeutika hervorzurufen scheint, war es interessant, zu untersuchen, ob LPA die Apoptose in Thekazellen in vitro beeinflussen kann.

Zunächst wurde ein geeignetes Zellkultursystem etabliert, das die Möglichkeit bot, die Vorgänge der Apoptose auf molekularer Ebene zu untersuchen. Es gelang der Aufbau primärer Zellkulturen boviner Thekazellen aus Schlachthofmaterial. Hierfür konnten am Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung gesammelte Erfahrungen in der Kultivierung dieser Zellen modifiziert werden.

Obwohl Thekazellen des Rindes *in vitro* sehr resistent gegen die Einleitung der Apoptose sind, ist es mir gelungen durch verschiedene Ansätze zumindest einen Teil der Zellen in die Apoptose zu bringen. Die Apoptose wurde durch verschiedene Methoden nachgewiesen, als da sind: morphologische Kriterien mit Hilfe von Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie nach Färbung der DNA mit BisBenzimid, Untersuchungen der Integrität der DNA nach elektrophoretischer Auftrennung und Färbung mit Ethidiumbromid („Laddering“), Bestimmung der Menge des Proteins Bax, das eine proapoptotische Funktion in dem intrinsischen Apoptoseweg spielt, durch Western Blot sowie den Nachweis der entsprechenden RNA mit Hilfe der Reverse-Transkriptase-PCR.

Es war möglich, die Apoptose in kultivierten Thekazellen durch langfristigen Serumentzug und durch Inkubation mit cytostatisch wirksamen Substanzen wie Cytocholasin B, Paclitaxel, Etoposide und TNF $\alpha$  in Kombination mit Ceramid 2 einzuleiten. Erste Ergebnisse deuten daraufhin, dass LPA die apoptotische Wirkung von Serumentzug teilweise aufheben kann.



(Bettina Jörß)

## **8. Summary**

While the normal ovarian cycle is the sequence of follicle maturation, ovulation, and corpus luteum formation, it should not be forgotten that the fate of most follicles in the ovary is the programmed cell death, the apoptosis. Disturbance of the apoptotic process can not only influence the ovarian function and the ability to reproduce of an organism considerably, but can also lead to cancerogenic transformation of cells. While one can go back to an extensive amount of literatur on apoptotic events in granulosa and luteal cells, little is known about the apoptosis of theca cells. The ability of theca cells of some species to undergo apoptosis has long been questioned.

The aim of this dissertation was first of all to establish methods to induce and to prove apoptotic processes in theca cells. Bovine theca cells served as material to be examined since, on the one hand methods of isolation and in vitro cultivation were already established, and on the other very little was known about apoptotic processes in these cells. After the successful establishment of the methods, conditions which could influence the apoptosis in vitro were examined. The main emphasis was placed on the examination of the influence of lysophosphatidic acid (LPA). This substance can be found in high concentrations in the blood and ascites fluid of patients with ovarian cancer and can therefore be taken as a possible marker for ovarian carcinoma. Since LPA appears to produce resistance to certain chemotherapeutic agents used in the cancer therapy of other cell systems, it was of greatest interest to examine whether it would influence the apoptosis in theca cells.

Initially a suitable cell culture system was established, with which the apoptotic processes on molecular level could be examined. A cell culture system of primary bovine theca cells from material from a slaughter house was successfully build up, using the experiences of the Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung in the cultivation of these cells in a modified form.

Although bovine theca cells are very resistant to the induction of apoptosis in vitro, it was possible to induce apoptosis at least in a part of the cells through different approaches.

That apoptosis had taken place was proved by various methods: 1) morphologically by examination through phase contrast and fluorescence microscopy after staining of DNA with bisbenzimidazole, 2) examination of DNA integrity after electrophoretic separation and DNA staining with ethidiumbromide (DNA-laddering) and 3) evaluation of the amount of bax-protein, which plays a proapoptotic role in the intrinsic apoptotic pathway by means of western blot and proof of the existence of the corresponding RNA by means of RT-PCR.

It was possible to induce apoptosis in cultured theca cells through long-term withdrawal of serum and by incubation with substances with a cytostatic effect, such as cytochalasin B, paclitaxel, etoposide and TNF $\alpha$  in combination with ceramid 2. First results indicate the ability of LPA to at least partly compensate the apoptotic effect of the withdrawal of serum.

## **9. Literaturverzeichnis**

- ADAMS, G.P. (1999):  
Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants.  
in: W.W. THEATCHER, E.K. INSKEEP, G.D. NISWENDER u. C. DOBERSKA  
Reproduction in Domestic Ruminants.  
J. Reprod. Fertil. **54**, 17-32
- AHLEMEYER, B., u. J. KRIEGLSTEIN (1997):  
Stimulation of 5-HT1A receptor inhibits apoptosis induced by serum deprivation in  
cultured neurons from chick embryo.  
Brain Res. **777**, 179-186
- ALLEN R.T., W.J. HUNTER III u. D.K. AGRAWAL (1997):  
Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis.  
J. Pharmacol. Toxicol. Methods **37**, 215-228
- AOKI, M., R. MORISHITA, H. MATSUSHITA, N. NAKANO, S. HAYASHI, N.  
TOMITA, K. YAMAMOTO, A. MORIGUCHI, J. HIGAKI u. T. Ogihara (1997):  
Serum deprivation-induced apoptosis accompanied by up-regulation of p53 and bax in  
human aortic vascular smooth muscle cells.  
Heart Vessels Suppl. **12**, 71-75
- BAO, B., M.D. CALDER, S. XIE, M.F. SMITH, B.E. SALFEN, R.S. YOUNGQUIST  
u. H.A. GARVERICK (1998):  
Expression of steroidogenic acute regulatory protein mRNA is limited to theca of  
healthy bovine follicles collected during recruitment, selection and dominance of  
follicles of the first follicular wave.  
Biol. Reprod. **59**, 953-959

- BRADFORD, M. (1976):  
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding.  
Annal. Biochem. **72**, 248-254
- BRUNSWIG-SPICKENHEIER, B., u. A.K. MUKHOPADHYAY (1990):  
Inhibitory effects of a tumor-promoting phorbol ester on luteinizing hormone-stimulated renin and prorenin production by cultured bovine theca cells.  
Endocrinology **127**, 2157-2165
- BRUNSWIG-SPICKENHEIER, B., u. A.K. MUKHOPADHYAY (2003):  
Local regulatory factors in regulation of ovarian function: Role of prorenin-renin-angiotensin-system.  
Indian J. Exp. Biol. **41**, 669-681
- BUDNIK, L.T., u. A.K. MUKHOPADHYAY (1997):  
Funktionale lysophosphatidic acid receptor in bovine luteal cells.  
FEBS Lett. **419**, 4-8
- BUDNIK, L.T., u. A.K. MUKHOPADHYAY (2002a):  
Lysophosphatidic acid and its role in reproduction.  
Biol. Reprod. **66**, 859-865
- BUDNIK, L.T., u. A.K. MUKHOPADHYAY (2002b):  
Lysophosphatidic acid-induced nuclear localization of protein kinase C  $\delta$  in bovine theca cells stimulated with luteinizing hormone.  
Biol. Reprod. **67**, 935-944
- BUDNIK, L.T. (2003a):  
Lysophosphatidic acid, LPA: A bad boy becomes a good.  
Reprod. Biol. Endocrinol. **1**, 37

- BUDNIK, L.T., B. BRUNSWIG-SPICKENHEIER u. A.K. MUKHOPADHYAY (2003b):  
Lysophosphatidic acid signals through mitogen-activated protein kinase –  
Extracellular signal regulated kinase in ovarian theca cells expressing the LPA<sub>1</sub>/edg2-  
Receptor: Involvement of a nonclassical pathway?  
Mol. Endocrinol. **17**, 1593-1606
- CELL SIGNALING TECHNOLOGY (1999-2004):  
Overview: Regulation of Apoptosis.  
[www.cellsignal.com/reference/pathway/Ovrvw\\_apop.asp](http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Ovrvw_apop.asp)
- CHANG, H.Y., u. X. YANG (2000):  
Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases.  
Microbiol. Mol. Biol. Rev. **64**, 821-846
- CHINNAIYAN A.M., K. O'ROURKE, M. TEWARI u. V.M. DIXIT (1995):  
FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of  
Fas and initiates apoptosis.  
Cell **81**, 505-512
- CLARK E.A., u. J.S. BRUGGE (1995):  
Integrins and signal transduction pathways: the road taken.  
Science **268**, 233-239
- CLARK, L.J., H.F. IRVING-RODGERS, A.M. DHARMARAJAN u. R.J. RODGERS (2004):  
Theca interna: the other side of bovine follicular atresia.  
Biol. Reprod. **71**, 1071-1078

- COHEN, G.M., X.M. SUN, R.T. SNOWDEN, D. DINSDALE u. D.N. SKILLETER (1992):  
Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation.  
Biochem. J. **286**, 331-334
- COLLINS, R.J., B.V. HARMON, G.C. GOBE u. J.F.R. KERR (1992):  
Internucleosomal DNA cleavage should not be used as the sole criterion for identifying apoptosis.  
Int. J. Radiat. Biol. **61**, 451-453
- CORY, S., u. J.M. ADAMS (2002):  
The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch.  
Nat. Rev. Cancer **2**, 647-656
- CROMPTON, M. (1999):  
The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death.  
Biochem. J. **341**, 233-249
- DAUD, A.I., F.M. BUMPUS u. A. HUSSAIN (1988):  
Evidence for selective expression of angiotensin II receptors on atretic follicles in the rat ovary: an autoradiographic study.  
Endocrinology **122**, 2727-2734
- DENAULT, J.B., u. G.S. SALVESEN (2002):  
Caspases: keys in the ignition of cell death.  
Chem. Rev. **102**, 4489-4500
- DEVERAUX, Q.L., u. J.C. REED (1999):  
IAP family proteins – suppressors of apoptosis.  
Genes Dev. **13**, 239-252

- DEVERAUX, Q.L., N. ROY, H.R. STENNICKE, T. VAN ARSDALE, Q. ZHOU, S.M. SRINIVASULA, E.S. ALNEMRI, G.S. SALVESEN, J.C. REED u. R. TAKAHASHI (1998):  
IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases.  
EMBO J. **17**, 2215-2223
- DRAKE, J.M., R.R. FRIIS u. A.M. DHARMARAJAN (2003):  
The role of sFRP4, a secreted frizzled-related protein, in ovulation.  
Apoptosis **8**, 389-397
- DU, C., M. FANG, Y. LI u. X. WANG (2000):  
Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition.  
Cell **102**, 33-42
- DUMONTET, C., u. B.I. SIKIC (1999):  
Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: Microtubule Dynamics, drug transport, and cell death.  
J. Clin. Oncol. **17**, 1061-1070
- EARNSHAW W.C., L.M. MARTINS u. S.H. KAUFMANN (1999):  
Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis.  
Annu. Rev. Biochem. **68**, 383-424
- EDER, A.M., T. SASAGAWA, M. MAO, J. AOKI u. G. B. MILLS (2000):  
Constitutive and lysophosphatidic acid (LPA)- induced LPA production: Role of phospholipase D and phospholipase A<sub>2</sub>.  
Clin. Cancer Res. **6**, 2482-2491

- EDIGER, T.L., u. M.L. TOEWS (2001):  
Dual effects of lysophosphatidic acid on human airway smooth muscle cell proliferation and survival.  
Biochim. Biophys. Acta **1531**, 59-67
- EICHHOLTZ T., K. JALINK, I. FAHRENFORT u. W.H. MOOLENAAR (1993):  
The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets.  
Biochem. J. **291**, 677-680
- EVANS, A.C.O., J.L.H. IRELAND, M.E. WINN, P. LONERGAN, G.W. SMITH, P.M. COUSSENS u. J.J. IRELAND (2004):  
Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle.  
Biol. Reprod. **70**, 1475-1484
- EVES, F.M., W. XIONG, A. BELLACOSA, S.G. KENNEDY, P.N. TSICHLIS, M.A. ROSNER u. N. HAY (1998):  
Akt, a target of phosphoinositol 3-kinase, inhibits apoptosis in a differentiating neuronal cell line.  
Mol. Cell Biol. **18**, 2143-2152
- FANG, X., S. YU, R. LAPUSCHIN, Y. LU, T. FURUI, L.Z. PENN, D. STOCKOE, J.R. ERICKSON, R.C. BAST u. G.B. MILLS (2000)  
Lysophosphatidic acid prevents apoptosis in fibroblasts via G<sub>i</sub>-protein-mediated activation of mitogen-activated protein kinase.  
Biochem. J. **352**, 135-143



- FANG, X., D. GAUDETTE, T. FURUI, M. MAO, V. ESTRELLA, A. EDER, T. PUSTILNIK, T. SASAGAWA, R. LAPUSHIN, S. YU, R.B. JAFFE, J.R. WIENER, J.R. ERICKSON u. G.B. MILLS (2000b):  
Lysophospholipid growth factors in the initiation, progression, metastases and management of ovarian cancer.  
Ann. NY Acad. Sci. **905**, 188-208
- FOGHI, A., K.J. TEERDS, D. VAN DER DONK, N.C. MOORE u. J. DORRINGTON (1998):  
Induction of apoptosis in thecal/interstitial cells: action of transforming growth factor (TGF)  $\alpha$  plus TGF $\beta$  on bcl-2 and interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme.  
J. Endocrinol. **157**, 489-494
- FORTUNE, J.E., G.M. RIVERA, A.C.O. EVANS u. A.M. TURZILLO (2001):  
Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle.  
Biol. Reprod. **65**, 648-654
- FUKAMI, K., u. T. TAKENAWA (1992):  
Phosphatidic acid that accumulates in platelet-derived growth factor-stimulated Balb/c3T3 cells is a potential mitogenic signal.  
J. Biol. Chem. **267**, 10988-10993
- GAITS, F., O. FOURCADE, F. Le BEALLE, G. GUEGUEN, B. GAIGE, A. GASSAME-DIAGNE, J. FAUVEL, J.P. SALLES, G. MAUCO, M.F. SIMON u. H. CHAP (1997) :  
Lysophosphatidic acid as a phospholipid mediator : Pathways of syntheses.  
FEBS Lett. **410**, 54-58

- GINTHER, O.J., L. KNOPF u. J.P. KASTELIC (1989):  
Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular waves.  
J. Reprod. Fertil. **87**, 223-230
- GOETZL, E.J., u. S. AN (1998):  
Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate.  
FASEB J. **12**, 1589-1598
- GOETZL, E.J., Y. KONG u. B. MEI (1999):  
Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate protection of T cells from apoptosis in association with suppression of bax.  
J. Immunol. **162**, 2049-2056
- GOMEZ-MUNOZ, A. (1998):  
Modulation of cell signaling by ceramides.  
Biochim. Biophys. Acta **1391**, 91-109
- GOODWIN, B.L., L.P. SOLOMONSON u. D.C. EICHLER (2004):  
Argininosuccinate synthase expression is required to maintain nitric oxide production and cell viability in aortic endothelial cells.  
J. Biol. Chem. **279**, 18353-18360
- GREEN, D.R., u. J.C. REED (1998):  
Mitochondria and apoptosis .  
Science **281**, 1309-1312

- GREENWALD, G.S. (1989):  
Temporal and topographic changes in DANN synthesis after induced follicular atresia.  
Biol. Reprod. 41, 175-181
- GRUNERT, L.A., u. H. ZERBE (1999):  
Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind.  
GRUNERT, E., u. M. BERCHTOLD (Hrsg.)  
2. Aufl. Verlag Parey, Berlin, Hamburg, S. 159-181
- HANKS, S.K., u. T.R. POLTE (1997):  
Signaling through focal adhesion kinase.  
Bioessays 19, 137-145
- HANSEL W., u. S. ECHTERNKAMP (1972):  
Control of ovarian function in domestic animals.  
American Zoologist 12, 225-243
- HANSEL, W., u. K. McENTREE (1970):  
Female reproductive processes.  
in: M.J. SWENSON (Hrsg.): Dukes` physiology of domestic animals.  
8. Aufl. Verlag Cornell University Press, Ithaca, London, S. 1253-1297
- HANSEN, C.A., A.G. SCHROERING, D.J. CAREY u. J.D. ROBISHAW (1994):  
Localisation of a heteromeric G protein  $\gamma$  subunit to focal adhesions and associated stress fibers.  
J. Cell Biol. 126, 811-819
- HENGARTNER, M.O. (1999):  
Programmed cell death in the nematode *C. elegans*.  
Recent Prog. Horm. Res. 54, 213-222

- HETTS, S.W. (1998):  
To Die or Not to Die.  
JAMA **279**, 300-307
- HOFMANN, K., P. BUCHER u. J. TSCHOPP (1997):  
The CARD domain: a new apoptotic signalling motif.  
Trends Biochem. Sci. **22**, 155-156
- HOLTSBERG, F.W., M.R. STEINER, J.N. KELLER, R.J. MARK, M.P. MATTSON  
u. S.M. STEINER (1998a):  
Lysophosphatidic acid induces necrosis and apoptosis in hippocampal neurons.  
J. Neurochem. **70**, 66-76
- HOLTSBERG, F.W., M.R. STEINER, A.J. BRUCE-KELLER, J.N. KELLER, M.P.  
MATTSON, J.C. MOYERS u. S.M. STEINER (1998b):  
Lysophosphatidic acid and apoptosis of nerve growth factor-differentiated PC12 cells.  
J. Neurosci. Res. **53**, 685-696
- HOMBURG, C.H.E., M. DE HAAS, A.E. VON DEM BORNE, A.J. VERHOEVEN,  
C.P. REUTLINGSPERGER u. D. ROOS (1995):  
Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding  
sites during apoptosis in vitro.  
Blood **85**, 532-540
- HSUEH, A.J.W., H. BILLIG u. A. TSAFRIRI (1994):  
Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process.  
Endocr. Rev. **15**, 6, 707-724

- HUGHES, F.M. Jr., u. W.C. GOROSPE (1991):  
Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia.  
Endocrinology **129**, 2415-2422
- IRELAND, J.J., R.L. MURPHEE u. P.B. COULSON (1980):  
Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum.  
J. Dairy Sci. **63**, 155-160
- IRELAND, J.J., u. J.F. ROCHE (1983):  
Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins.  
Endocrinology **112**, 150-156
- IRVING-RODGERS, H.F., I.L. van WEZEL, M.L. MUSSARD, J.E. KINDER u. R.J. RODGERS (2001):  
Atresia revisited: two basic patterns of atresia of bovine antral follicles.  
Reproduction **122**, 761-775
- ISOBE, N., u. Y. YOSHIMURA (2000) :  
Localization of apoptotic cells in the cystic ovarian follicles of cows: a DNA-end labeling histochemical study.  
Theriogenology **53**, 897-904
- JORDAN, R., L. WANG, T.M. GRACZYK, T.M. BLOCK u. P.R. ROMANO (2002):  
Replication of a cytopathic strain of bovine viral diarrhea virus activates PERK and induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of MDBK cells.  
J. Virol. **76**, 9588-9599

- KAINULAINEN, T., A. PENDER, M. D'ADDARIO, M. GLOGAUER, P. LEKIC u. C. A. McCULLOCH (2002):  
Cell death and mechanoprotection by filamin a in connective tissues after challenge by applied tensile forces.  
J. Biol. Chem. **277**, 21998-22009
- KARSAN, A., E. YEE, G.G. POIRIER, P. ZHOU, R. CRAIG u. J.M. HARLAN (1997):  
Fibroblast growth factor-2 inhibits endothelial cell apoptosis by bcl-2-dependent and independent mechanisms.  
Am. J. Pathol. **151**, 1775-1784
- KAYNARD, A.H., L.M. PERIMAN, J. SIMARD u. M.H. MELNER (1992):  
Ovarian 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and sulfated glycoprotein-2 gene expression are differentially regulated by the induction of ovulation, pseudopregnancy, and luteolysis in the immature rat.  
Endocrinology **130**, 2192-2200
- KERR, J.F.R., A.H. WYLLIE u. A.R. CURRIE (1972):  
Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.  
Br. J. Cancer **26**, 239-257
- KERR, J.F.R., C.M. WINTERFORD u. B.V. HARMON (1994):  
Morphological criteria for identifying apoptosis.  
in: J.E. CELIS (Hrsg.): Cell Biology: A Laboratory Handbook.  
2. Aufl. Verlag Academic Press, San Diego, S. 319-329
- KNOBIL, E. u. J.D. NEILL (Hrsg.) (1994):  
The physiology of reproduction.  
2. Aufl. Verlag Raven Press, Ltd., New York, S. 638

- KOLESNICK, R. u. Z. FUKS (2003):  
Radiation and ceramide-induced apoptosis.  
Oncogene **22**, 5897-5906
- KORSMEYER, S.J., M.C. WEI, M. SAITO, S. WEILER, K.J. OH u. P.H. SCHLESINGER (2000):  
Pro-apoptotic cascade activates bid, which oligomerizes bak or bax into pores that result in the release of cytochrome c.  
Cell Death Differ. **7**, 1166-1173
- LAI, J.M., C.Y. LU, H.F. YANG-YEN u. Z.F. CHANG (2001):  
Lysophosphatidic acid promotes phorbol-ester-induced apoptosis in TF-1 cells by interfering with adhesion.  
Biochem. J. **359**, 227-233
- LI, P., D. NIJHAWAN, I. BUDIHardJO, S.M. SRINIVASULA, M. AHMAD, E.S. ALNEMRI u. X. WANG (1997):  
Cytochrome c and dATP- dependent formation of Apaf-1/ caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade.  
Cell **91**, 479-489
- LÄMMLI, U.K. (1970):  
Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4.  
Nature **227**, 680-685
- LEIST, M., u. M. JAATTELA (2001):  
Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms.  
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **2**, 589-598

- LIEBICH, H.-G. (1993):  
Funktionelle Histologie.  
2. Aufl. Verlag Schattauer, Stuttgart, New York
- LIM, M.L.R., M.-G. LUM, T.M. HENSEN, X. ROUCOU u. P. NAGLEY (2002):  
On the release of cytochrome c from mitochondria during cell death signalling.  
J. Biomed. Sci. **9**, 488-506
- LOCKSHIN, R.A., u. A.H. WILLIAMS (1964):  
Programmed Cell death II. Endocrine potentiation of the breakdown of the  
intersegmental muscles of silk-moths.  
J. Insect Physiol. **10**, 643-649
- LUCY, M.C., C.R. BILBY, C.J. KIRBY, W. YUAN u. C.K. BOYD (1999):  
Role of Growth hormone in development and maintenance of follicles and corpora  
lutea.  
in: W.W. THEATCHER, E.K. INSKEEP, G.D. NISWENDER u. C. DOBERSKA  
Reproduction in Domestic Ruminants.  
J. Reprod. Fertil. Suppl. **54**, 49-59
- MARKSTRÖM, E., E.C. SVENSSON, R. SHAO, B. SVANBERG u. H. BILLIG  
(2002):  
Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation.  
Reproduction **123**, 23-30
- MARTELLI, A.M., R. BAREGGI, R. BORTUL, V. GRILL, P. NARDUCCI u. M.  
ZWEYER (1997):  
The nuclear matrix and apoptosis.  
Histochem. Cell Biol. **108**, 1-10



- MIZUNO, N. , H. YOSHITOMI, H. ISPIDA, H. KUROMI, J. KAWAKI, Y. SEINO u. S. SEINO (1998):  
Altered bcl-2 and bax expression in intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling in apoptosis of pancreatic cells and the impairment of glucose-induced insulin secretion.  
Endocrinology **139**, 1429-1439
- MOOLENAAR, W.H. (2002):  
Lysophospholipids in the limelight: autotaxin takes center stage.  
J. Cell Biol. **158**, 197-199
- MORITA, Y., u. J.L. TILLY (2000):  
Sphingolipid regulation of female gonadal cell apoptosis.  
Lysophospholipids and eicosanoids in biology and pathophysiology  
Ann. NY Acad. Sci. **905**, 209-220
- MUKHOPADHYAY, A.K., K. HOLSTEIN, M. SZKUDLINSKI, B. BRUNSWIG-SPICKENHEIER u. F.A. LEIDENBERGER (1991):  
The relationship between prorenin levels in follicular fluid and follicular atresia in bovine ovaries.  
Endocrinology **129**, 2367-1375
- NAGATA, S., H. NAGASE, K. KAWANE, N. MUKAE u. H. FUKUYAMA (2003):  
Degradation of chromosomal DNA during apoptosis.  
Cell Death Differ. **10**, 108-116
- NAKATANI, A., S. SHIMASAKI, G.F. ERICKSON u. N. LING (1991):  
Tissuespecific expression of four insulin-like growth factor-binding proteins (1, 2, 3 and 4) in the rat ovary.  
Endocrinology **129**, 1521-1529  
(Fehlerveröffentlichung in Endocrinology **131**, 2350, 1992)

- NECHUSHTAN, A., C.L. SMITH, I. LAMENSDORF, S.H. YOON u. R.J. YOULE (2001):  
Bax and bak coalescence into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis.  
J. Cell Biol. **153**, 1265-1276
- NICKEL, R., A. SCHUMMER u. E. SEIFERLE (1987):  
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Bd. 2  
6. Aufl. Verlag Parey, Berlin, Hamburg, S. 378
- OLIVERA, A., T. KOHAMA, L. EDSALL, V. NAVA, O. CUVILLIER, S. POULTON u. S. SPIEGEL (1999):  
Sphingosine kinase expression increases intercellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival.  
J. Cell Biol. **147**, 545-557
- PALUMBO, A., u. J. YEH (1994):  
In situ localization of apoptosis in the rat ovary during follicular atresia.  
Biol. Reprod. **51**, 888-895
- PARONE, P.A., D. JAMES u. J.C. MARTINOU (2002):  
Mitochondria: regulating the inevitable.  
Biochemie **84**, 105-111
- PEDERSEN, H.G., E.D. WATSON u. E.E. TELFER (2003):  
Analysis of atresia in equine follicles using histology, fresh granulosa cell morphology and detection of DNA fragmentation.  
Reproduction **125**, 417-423

- PEHLIVAN, T., A. MANSOUR, R.Z. SPACZINSKI u. A.J. DULEBA (2001):  
Effects of transforming growth factors- $\alpha$  and - $\beta$  on proliferation and apoptosis of rat theca-intestitial cells.  
J. Endocrinol. **170**, 639-645
- PETAK, I., u. J.A. HOUGHTON (2001):  
Shared pathways: death receptors and cytotoxic drugs in cancer therapy.  
Pathol. Oncol. Res. **7**, 95-106
- POGNAN, F., M.T. MASSON, F. LAGELLE u. C. CHARUEL (1997):  
Establishment of a rat sertoli cell line that displays the morphological and some of the functional characteristics of the native cell.  
Cell Biol. Toxicol. **13**, 453-463
- PORTER, D.A., S.L. VICKERS, R.G. COWAN, S.C. HUBER u. S.M. QUIRK (2000):  
Expression and function of Fas antigen vary in bovine granulosa and theca cells during ovarian follicular development and atresia.  
Biol. Reprod. **62**, 62-66
- RATH, C., u. B.B. AGGARWAL (1999):  
TNF-Induced signaling in apoptosis.  
J. Clin. Immunol. **19**, 350-364
- ROCHE, J.F. (1996):  
Control and regulation of folliculogenesis – a symposium in perspective.  
Rev. Reprod. **1**, 19-27

- ROCHE APPLIED SCIENCE (2002/2003):  
Terminology of Cell Death. Seite 1, Figure 1  
[www.roche-applied-science.com/PROD\\_INF/MANUALS/CELL\\_MAN/apoptosis\\_002.pdf](http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/CELL_MAN/apoptosis_002.pdf)
- ROY, N., Q.L. DEVERAUX, R. TAKAHASHI, G.S. SALVESEN u. J.C. REED (1997):  
The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases.  
EMBO J. **16**, 6914-6925
- RUEDA, B.R., K.I. TILLY, I. W. BOTROS, P. D. JOLLY, T.R. HANSEN, P. B. HOYER u. J.L. TILLY (1997):  
Increased bax and interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme messenger ribonucleic acid levels coincide with apoptosis in the bovine corpus luteum during structural regression.  
Biol. Reprod. **56**, 186-193
- SANTOS, W.L., J.A. ROSSI, S.D. BOGGS u. T.L. MACDONALD (2000):  
The molecular pharmacology of lysophosphatide signalling.  
Ann. NY Acad. Sci. **905**, 233-241
- SARTORIUS, U., I. SCHMITZ u. P.H. KRAMMER (2001):  
Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis.  
ChemBioChem **2**, 20-29
- SAUTIN, Y.Y., J.M. CRAWFORD u. S.I. SVETLOV (2001):  
Enhancement of survival by LPA via Erk1/Erk2 and PI 3-kinase/Akt pathways in a murine hepatocyte cell line.  
Am. J. Physiol., Cell Physiol. **281**, S. 2010-2019

- SAVIO, J.D., L. KEENAN, M.P. BOLAND u. J.F. ROCHE (1988):  
Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers.  
J. Reprod. Fertil. **83**, 663-671
- SCHLEGEL, R.A., M. CALLAHAN, S. KRAHLING, D. PRADHAN u. P. WILLIAMSON (1996):  
Mechanisms for recognition and phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages.  
Adv. Exp. Med. Biol. **406**, 21-28
- SHERIDAN, J.W., C.J. BISHOP u. R.J. SIMMONS (1981):  
Biophysical and morphological correlates of kinetic change and death in a starved human melanoma cell line.  
J. Cell Sci. **49**, 119-137
- SLOVITER, R.S. (2002):  
Apoptosis: a guide for the perplexed.  
Trends Pharmacol. Sci. **23** (1), 19-24
- STRASSNER, A., L. O'CONNOR u. V.M. DIXIT (2000):  
Apoptosis Signaling.  
Annu. Rev. Biochem. **69**, 217-245
- SVENSSON, P.-A., M.S.C. JOHNSON, C. LING, L.M.S. CARLSSON, H. BILLIG u. B. CARLSSON (1999):  
Scavenger Receptor Class B Type I in the Rat Ovary: Possible Role in High Density Lipoprotein Cholesterol Uptake and in the Recognition of Apoptotic Granulosa Cells.  
Endocrinology **140**, 6, 2494-2500

- TALJIMA, K., M. ORISAKA, K. HOSOKAWA, A. AMSTERDAM u. F. KOTSUJI (2002):  
Effects of the ovarian theca cells on apoptosis of granulosa cells: changes during bovine follicular maturation.  
Biol. Reprod. **66**, 1635-1639
- TANG, D., u. V.J. KIDD (1998):  
Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis.  
J. Biol. Chem. **273**, 28549-28552
- TILLY, J.L., H. BILLIG, K.I. KOWALSKI u. A.J.W. HSUEH (1992a):  
Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism.  
Mol. Endocrinol. **6**, 1942-1950
- TILLY, J.L., K.I. KOWALSKI, A.L. JOHNSON u. A.J.W. HSUEH (1992b):  
Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression.  
Endocrinology **129**, 2799-2801
- TILLY, J.L., K.I. KOWALSKI, D.W. SCHOMBERG u. A.J.W. HSUEH (1992c):  
Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome p450 aromatase.  
Endocrinology **131**, 1670-1676
- TILLY, J.L., u. A.J.W. HSUEH (1993):  
Microscale autoradiographic method for the qualitative and quantitative analysis of DNA fragmentation.

J. Cell. Physiol. **154**, 519-526

- TILLY, J.L., K.I. TILLY, M.L. KENTON u. A.L. JOHNSON (1995):  
Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: Equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-x<sub>long</sub> messenger ribonucleic acid levels.  
Endocrinology **136**, 232-241
- TOKUMURA, A., M. MIYAKE, Y. NISHIOKA, S. YAMANO, T. AONO u. K. FUKUZAWA (1999a):  
Production of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in human follicular fluids of in vitro fertilisation patients.  
Biol. Reprod. **61**, 195-199
- TOKUMURA, A., Y. NISHIOKA, O. YOSHIMOTO, J. SHNOMIYA u. K. FUKUZAWA (1999b):  
Substrate specificity of lysophospholipase D which produces bioactive lysophosphatidic acid in rat plasma.  
J. Cell Biol. **158**, 227-233
- VANDER-HEIDEN, M.G., N.S. CHANDEL, E.K. WILLIAMSON, P.T. SCHUMACKER u. C.B. THOMPSON (1997):  
Bcl-x<sub>(L)</sub> regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria.  
Cell **91**, 627-637
- Van WEZEL, I.L., A.M. DHARMARAJAN, T.C. LAVRANOS u. R.J. RODGERS (1999):  
Evidence for alternative pathways of granulosa cell death in healthy and slightly atretic bovine antral follicles.  
Endocrinology **140**, 2602-2612

- VERHAGEN, A.M., P.G. EKERT, M. PAKUSCH, J. SILKE, L.M. CONNOLLY, G.E. REID, R.L. MORITZ, R.J. SIMPSON u. D.L. VAUX (2000):  
Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins.  
Cell **102**, 43-53
- VICKERS, S.L., R.G. COWAN, R.M. HARMAN, D.A. PORTER u. S.M. QUIRK (2000):  
Expression and activity of the Fas antigen in bovine ovarian follicle cells.  
Biol. Reprod. **62**, 54-61
- WALKER, N.P., R.V. TALANIAN, K.D. BRADY, L.C. DANG, N.J. BUMP, C.R. FERENZ, S. FRANKLIN, T. GHAYUR, M.C. HACKETT, L.D. HAMMILL et al. (1994):  
Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)<sub>2</sub> homodimer.  
Cell **78**, 343-352
- WANG, T.-H., H.-S. WANG u. Y.K. SOONG (2000):  
Paclitaxel-induced cell death.  
Cancer **88**, 2619-2628
- WEBB, R., B.K. CAMPBELL, H.A. GARVERICK, J.G. GONG, C.G. GUTIERREZ u. D.G. ARMSTRONG (1999):  
Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection.  
J. Reprod. Fertil. Suppl. **54**, 33-48
- WIESEN, J.F., u. A.R.J. MIDGLAY (1994):  
Expression of connexin 43 gap junction messenger ribonucleic acid protein during follicular atresia.



Biol. Reprod. **50**, 336-348

- WILCOCK, C., u. J.A. HICKMAN (1988):  
Characterisation of a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> cotransporter in alkylating agent-sensitive L1210 murine leukemia cells.  
Biochim. biophys. Acta **946**, 359-369
- WILLIAMSON, P., u. R.A. SCHLEGEL (2002):  
Transbilayer phospholipid movement and the clearance of apoptotic cells.  
Biochim. Biophys. Acta **1585**, 53-63
- WILLINGHAM, M.C. (1999):  
Cytochemical methods for the detection of apoptosis.  
J. Histochem. Cytochem. **47**, 1101-1109
- WOODLE, E.S., u. S. KULKARNI (1998):  
Programmed cell death.  
Transplantation **66**, 681-91
- WYLLIE, A.H., G.J. BEATTIE u. A.D. HARGREAVES (1981):  
Chromatin changes in apoptosis.  
Histochem. J. **13**, 681-692
- WYLLIE, A.H., J.F.R. KERR u. A.R. CURRIE (1998):  
Cell death: the significance of apoptosis.  
Int. Rev. Cytol. **8**, 251-306

- XU, Z.Z., H.A. GARVERICK, G.W. SMITH, M.F. SMITH, S.A. HAMILTON u. R.S. YOUNGQUIST (1995)  
Expression of messenger RNA encoding cytochrome P450 side-chain cleavage, cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydrolase and cytochrome P450 aromatase in bovine follicles during the first follicular wave.  
Endocrinology **136**, 981-989
- YACOBI, K., A. WOJTOWICZ, A. TSAFRIRI u. A. GROSS (2004):  
Gonadotropins enhance Caspase-3 and -7 activity and apoptosis in the theca-intestitial cells of rat preovulatory follicles in culture.  
Endocrinology **145**, 1943-1951
- YANG, M.Y., u. R. RAJAMAHENDRAN (2000a):  
Involvement of apoptosis in the atresia of nonovulatory dominant follicle during the bovine estrus cycle.  
Biol. Reprod. **63**, 1313-1321
- YANG, M.Y., u. R. RAJAMAHENDRAN (2000b):  
Morphological and biochemical identification of apoptosis in small, medium, and large bovine follicles and the effect of follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cells.  
Biol. Reprod. **62**, 1209-1217
- YE, X., I. ISHII, M.A. KINGSBURY u. J. CHUN (2002):  
Lysophosphatidic acid as a novel cell survival/apoptotic factor.  
Biochim. Biophys. Acta **1585**, 108-113
- YUAN, W., u. L.C. GIUDICE (1997):  
Programmed cell death in human ovary is a function of follicle and corpus luteum status.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 3148-3155

- ZOU, H., Y. LI, X. LIU u. X. WANG (1999):  
An Apaf-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9.

J. Biol. Chem. 274, 11549-11556



## **Danksagung**

Frau Prof. Dr. C. Kirchhoff danke ich für die Übernahme der Arbeit, die gewährte Hilfestellung und die nützlichen Anregungen.

Herrn Prof. Dr. F. Leidenberger und allen Mitarbeitern des IHF, insbesondere Herrn Dr. A. Mukhopadhyay danke ich für die freundliche Aufnahme im Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung und die immer vorhandene Hilfsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Lygia T. Budnik und Dr. Bärbel Brunswig-Spickenheier für die interessante Themenstellung. Sie haben mich gut in das Themengebiet eingeführt und immer mit großem Einsatz betreut.

Für die Einarbeitung in Labortechniken und die Verbreitung guter Laune bedanke ich mich bei Ute Steuber.

Meiner Familie danke ich für die immerwährende Unterstützung, Aufmunterung und Geduld. Dabei danke ich insbesondere meiner Mutter und meinem Mann.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinen Freunden für Abwechslung und Durchhalteparolen.