

**Untersuchung der Apoptose und der regulierenden Faktoren
Fas/Fas-Ligand, p53 und bcl-2
in der normalen menschlichen Spermatogenese und
in der Genese von Keimzelltumoren**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.)

vorgelegt der

**Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Fachbereich Biologie**

von

TEMUJIN DANSRANJAVIN

geb. am 24.08.1970 in Ulan-Bator

Halle (Saale), 07. 12. 2000

Gutachter:

1. **Prof. Dr. M. Bergmann**
2. **Prof. Dr. Dr. B. Fischer**
3. **Prof. Dr. M. Behre**

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Spermatogenese beim Menschen	1
1.1.1. Keimzellentwicklung	1
1.1.2. Sertolizell-Funktion im Keimepithel	2
1.1.3. Hormonelle Steuerung der Spermatogenese	3
1.1.4. Effizienz der Spermatogenese	4
1.2. Apoptose	5
1.2.1. Charakterisierung der Apoptose	5
1.2.2. Apoptose in physiologischen Prozessen	6
1.3. Apoptose in der Spermatogenese bei Säugern	7
1.3.1. Apoptose in der Ontogenese des Hodens	7
1.3.2. Hormonelle Regulation der Apoptose im Keimepithel	7
1.3.3. Umwelteinflüsse auf die Apoptose im Keimepithel	8
1.3.4. Apoptose in der Spermatogenese des Menschen	8
1.4. Apoptose in der Hodentumorgengese	9
1.4.1. Apoptose in der Entwicklung maligner Tumore	9
1.4.2. Genese der Keimzelltumore	9
1.5. Regulation der Apoptose	10
1.5.1. Fas-Rezeptor/Ligand-Interaktion in der Apoptoseinduktion	11
1.5.1.1. Fas-Rezeptor	11
1.5.1.2. Fas-Ligand	12
1.5.1.3. Apoptoseinduktion durch das Fas-System	12
1.5.1.4. Fas/Fas-Ligand im Hodengewebe	13
1.5.2. p53-Protein in der Apoptoseregulation	14
1.5.2.1. Biochemische Eigenschaften von p53	14
1.5.2.2. Funktionen von p53	14
1.5.2.2.1. DNA-Reparatur	14
1.5.2.2.2. Rolle von p53 in der Apoptose	15
1.5.3. bcl-2 in der Apoptoseregulation	16
1.5.3.1. Biochemische Eigenschaften	16
1.5.3.2. bcl-2 und Apoptose	17
1.6. Zielsetzung der Arbeit	18

2.	Material und Methoden	20
2.1.	Biopsiematerial	20
2.2.	Apoptosenachweis (TUNEL)	20
2.2.1.	Fixierung und Einbettung der Gewebeprobe	20
2.2.2.	TUNEL-Reaktion	20
2.2.3.	Kontrollen	21
2.3.	RT-PCR Analyse (Fas/Fas-Ligand)	21
2.3.1.	RNA-Präparation	21
2.3.2.	cDNA-Synthese	22
2.3.3.	RT-PCR	22
2.3.4.	Identifikation der RT-PCR-Produkte	23
2.4.	Protein-Analyse	23
2.4.1.	Westernblot	23
2.4.1.1.	Proteinisolierung	23
2.4.1.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
2.4.1.3.	Proteinblot	25
2.4.1.4.	Immundetektion	25
2.5.	Immunhistochemie	26
3.	Ergebnisse	28
3.1.	Apoptose im Hoden mit normaler Spermatogenese	28
3.1.1.	Apoptosehäufigkeit und das Verteilungsmuster im Keimepithel	28
3.1.2.	Apoptoseregulatoren im Keimepithel	33
3.1.2.1.	Fas-Rezeptor/Ligand-Expression im Hoden	33
3.1.2.1.1.	Fas-Rezeptor	33
3.1.2.1.2.	Fas-Ligand	33
3.1.2.2.	p53	36
3.1.2.3.	bcl-2	37
3.2.	Apoptosehäufigkeit und deren Regulation in Hodentumoren	38
3.2.1.	Apoptose	38
3.3.	Apoptoseregulatoren in Hodentumoren	41
3.3.1.	p53	41
3.3.2.	bcl-2	44

4.	Diskussion	45
4.1.	Apoptose in der Spermatogenese beim Mann	45
4.1.1.	Apoptoserate und Apoptoseverteilung im normalen Keimepithel	45
4.1.2.	Bedeutung der Apoptose in der Spermatogenese	46
4.1.2.1.	Schutz vor defekten Keimzellen	46
4.1.2.2.	Apoptose in der Aufrechterhaltung der Zellzahlhomöostase	48
4.1.3.	Assoziation der Apoptose mit Spermatogenesedefekten	48
4.1.4.	Apoptose-Regulatoren im menschlichen Keimepithel	49
4.1.4.1.	Fas/Fas-Ligand	49
4.1.4.1.1.	Fas-Ligand	49
4.1.4.1.2.	Fas-Rezeptor	50
4.1.4.2.	p53-Protein	52
4.1.4.3.	bcl-2-Protein	53
4.2.	Apoptose in Hodentumoren	54
4.2.1.	Apoptose in der Genese der Hodentumore	54
4.2.2.	p53-Protein in Hodentumoren	55
4.2.3.	bcl-2-Protein in Hodentumoren	57
5.	Zusammenfassung	59
6.	Literaturverzeichnis	61

Abkürzungsverzeichnis

ABP	androgenbindendes Protein
APS	Ammoniumpersulfat
bcl-2	B-cell-leukemia/lymphom2
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CIS	Carzinoma in-situ
CREM	cAMP responsive element modulator
DAB	Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-Triphosphat
DED	death effector domain
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
EDS	Ethan Dimethan Sulfonat
ER	endoplasmatisches Retikulum
FADD	Fas-associating death domain
FLIC	FADD-like ICE
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GnRH	gonadotropin releasing hormon
HRP	horseradish peroxidase
ICE	interleukin-1beta-converting enzyme
LH	luteinisierendes Hormon
MAA	2-methoxyacetic acid
MEHP	Mono-2 Ethylhexyl Phtalat
NGF	nerve growth factor
PBS	phosphate buffered saline
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	polymerase chain reaction

PLAP	plazentale alkalische Phosphatase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse transkription
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF	tumor necrosis factor
TSP	tägliche Spermienproduktion

1. Einleitung

1.1. Spermatogenese beim Menschen

1.1.1. Keimzellentwicklung

Die Keimzellentwicklung beim Menschen kann in eine pränatale, eine postnatal-präpuberale und eine adulte Phase unterteilt werden (Holstein and Wartenberg, 1970).

In der pränatalen Phase sind die primordialen Keimzellen beim menschlichen Embryo ab der dritten Woche im Endoderm der kaudalen Region des Dottersacks nahe der Allantois sichtbar. Sie können anhand ihres hohen Glykogengehalts und ihrer Phosphataseaktivität identifiziert werden (McKay et al. 1953). Gegen Ende der vierten Woche wandern sie in die Gonadenanlage ein. Die primordialen Keimzellen sind von den undifferenzierten somatischen Stützzellen, den Vorläuferzellen der Sertolizellen, umgeben (siehe Kap. 1.1.2.). Beide Zelltypen teilen sich mitotisch und bilden die Keimstränge im fetalen Hoden. In der achten Woche der Embryonalentwicklung kann man im Hoden eine starke Proliferation der Keimzellen nachweisen. Diese proliferierenden Zellen werden als M (multiplying)-Prospermatogonien bezeichnet. Nach dieser Proliferationsphase gehen die M-Prospermatogonien in eine Ruhephase über und werden nun als T1 (transitorische)-Prospermatogonien bezeichnet (Holstein and Wartenberg, 1970).

Unmittelbar vor der Pubertät teilen sich die ruhenden T1-Prospermatogonien zu T2-Prospermatogonien. Diese differenzieren sich weiter zu A-Spermatogonien, den Stammzellen der Spermatogenese im adulten Hoden.

Zum Zeitpunkt der Pubertät bildet sich im Zentrum des Keimstranges ein Lumen, das einerseits durch Migration der Keimzellen zur Peripherie des Keimepithels und andererseits durch selektive Degeneration der Keimzellen in der Mitte des Keimstranges entsteht. Die Lumenbildung wird durch die intratubuläre Flüssigkeit der Sertolizellen initiiert. Dadurch wandelt sich der Keimstrang in ein Hodenkanälchen um.

Nach der Pubertät differenzieren sich die A- zu B-Spermatogonien. Als nächstes differenzieren sich die B-Spermatogonien zu primären Spermatozyten. Nach einer

längeren meiotischen Prophase erfolgt die erste Reifeteilung des primären Spermatozyten. Die daraus entstandenen beiden sekundären Spermatozyten treten unmittelbar danach ohne erneute S-Phase in die zweite Reifeteilung ein. Es entstehen je zwei Spermatiden mit einem haploiden Chromosomensatz. In der anschließenden Spermio-genese differenzieren sich die frühen runden Spermatiden zu reifen elongierten Spermatiden. Dieser Vorgang umfaßt die Ausbildung einer Akrosomenkappe, die Verkleinerung des Zellkerns durch Kondensation des Chromatins, sowie die Ausbildung des Spermienflagellums (Vilar et al. 1970). Die reifen Spermatiden werden zunächst in das Tubuluslumen entlassen und gelangen über das *Rete testis* und die *Ductuli efferentes* in den Nebenhoden, wo sie zu beweglichen Spermien reifen und bis zur Ejakulation gespeichert werden.

1.1.2. Sertolizell-Funktion im Keimepithel

Zum Zeitpunkt der Pubertät entwickeln sich die Stützzellen zu reifen Sertolizellen, die von nun an teilungsunfähig sind. Die ausdifferenzierten Sertolizellen besitzen einen hellen, euchromatinreichen Kern mit großem Nukleolus, große Mengen von glattem endoplasmatischen Retikulum (ER) und reichlich lysosomale Einschlüsse. Das Zytoplasma der Sertolizelle erstreckt sich mit lamellenartigen Zellfortsätzen durch das gesamte Keimepithel. Die Zellfortsätze bilden zahlreiche Zellkontakte sowohl untereinander als auch zu den Keimzellen (tight und gap junctions) (Russel and Peterson, 1985). Die Zellverbindungen zwischen den Sertolizellen (tight junctions) bilden das morphologische Äquivalent der Blut-Hodenschranke. Sie trennen den basalen Bereich mit Spermatogonien und präleptotänen (primären) Spermatozyten von dem adluminalen Kompartiment mit den restlichen Keimzellen (Dym and Fawcett, 1970, Bergmann et al. 1989).

Neben der Stützfunktion sind die Sertolizellen für die Eliminierung der degenerierenden Keimzellen und der Zellreste durch Phagozytose verantwortlich.

Die Sertolizellen spielen bei der Initiierung und der Steuerung der Spermatogenese durch Beteiligung an der Hormonregulation des Keimepithels und durch Synthese von Proteinen, die die Keimzellentwicklung steuern, eine wichtige Rolle (Spiteri-Grech and Nieschlag, 1993, Kierszenbaum, 1994).

Die Sertolizelle ist an der hormonellen Steuerung der Spermatogenese durch die Synthese des androgenbindenden Proteins (ABP) und des Inhibins maßgeblich

beteiligt. Das ABP ist für den Transport des Testosterons in das Lumen der Tubuli verantwortlich. Das Inhibin ist der negative Rückkopplungsfaktor des Hypothalamus-Hypophysen-Hoden-Systems. Darüber hinaus besitzen die Sertolizellen FSH-Rezeptoren, über die die Aktivität der Sertolizellen durch FSH gesteuert wird. Auf diese Weise werden FSH-abhängige Funktionen der Keimzellen durch Sertolizellen vermittelt (siehe Kap. 1.1.3.).

In den Sertolizellen werden Wachstumsfaktoren, wie z.B. Somatomedin, synthetisiert, die eine mitogene Wirkung auf die Keimzellen haben (Hall et al. 1983, Holmes et al. 1986). Weiterhin sind die Sertolizellen an der Migration der Keimzellen durch die Blut-Hoden-Schranke und an der Spermiation durch Synthese von Serinproteasen verantwortlich. Die Serinproteasen bewirken die Aktivierung von Metalloproteasen, die ihrerseits die Zellmigration bewirken (Lacroix et al. 1977, Russel, 1977).

1.1.3. Hormonelle Steuerung der Spermatogenese

Die Funktion des Hodens unterliegt der parakrinen Kontrolle durch das Testosteron und der endokrinen Kontrolle durch die Gonadotropine, das luteinisierende Hormon (LH) und das follikelstimulierende Hormon (FSH). Das Testosteron wird in Leydig-Zellen, die im Interstitium zwischen den Hodenkanälchen liegen, gebildet. Die Freisetzung von LH und FSH aus der Hypophyse wird durch das „Gonadotropin Releasing Hormon“ (GnRH) aus dem Hypothalamus gesteuert (Sharpe, 1994).

LH wirkt im Hoden über die Leydig-Zellen auf das Keimepithel. Es löst über die membranständigen Rezeptoren cAMP-abhängige Signaltransduktionskaskaden aus, die zu einer erhöhten Sekretion von Testosteron führen. Gebunden an das ABP in der Sertolizelle gelangt das Testosteron in das Tubuluslumen. Hier beeinflusst es direkt oder über den aktiven Metabolit Dihydrotestosteron, der in den Sertolizellen entsteht, die Spermatogenese. Das Testosteron ist für die Initiierung der Spermatogenese in der Pubertät und für ihr lebenslanges Bestehen verantwortlich (Sharpe, 1994).

Das FSH reguliert die Keimzellentwicklung über spezifische Rezeptoren an den Sertolizellen, in denen die Synthese weiterer Proteine ausgelöst wird, die die Spermatogenese regulieren.

Der Hoden kann seinerseits die Hypophysenaktivität durch Abgabe von Rückkopplungsfaktoren negativ beeinflussen. So wird in Sertolizellen das Inhibin

synthetisiert, welches die Ausschüttung von GnRH hemmt und dadurch die Abgabe der Hypophysenhormone verhindert. Weiterhin kann die Freisetzung von LH und FSH durch das Testosteron oder durch seine aktiven Metabolite Östradiol und Dihydrotestosteron blockiert werden (Sharpe, 1994).

1.1.4. Effizienz der Spermatogenese

Die Effektivität der menschlichen Spermatogenese findet ihren Ausdruck in der von Johnson et al. (1984) definierten „Daily Sperm Production“, der Täglichen Spermien-Produktion (TSP), welche bei einem adulten Mann $0,02-0,27 \times 10^9$ Spermien beträgt. Zwei limitierende Faktoren bestimmen den Höchstwert der TSP: 1. die Zahl der Sertolizellen; 2. das Ausmaß der Keimzelldegeneration während der Spermatogenese.

Die Sertolizellen können nur eine begrenzte Anzahl von Keimzellen versorgen. Beim Menschen versorgt eine Sertolizelle etwa zwei bis vier elongierte Spermatiden (Skakkebaek et al. 1973, Paniagua et al. 1987). Die Zahl der Sertolizellen wird durch die Proliferation der unreifen Sertolizellen im fetalen und neonatalen Hoden unter der Kontrolle von FSH determiniert und variiert im adulten menschlichen Hoden zwischen $25-900 \times 10^6$ (Johnson et al. 1984 a, b, Cortes et al. 1987). Bei der Ratte führt die Abnahme der Sertolizellzahl, bedingt durch eine Inhibierung der Proliferation durch Blockierung von FSH, im neonatalen Hoden zu einer verringerten Spermienproduktion (Huhtaniemi et al. 1986, Orth et al. 1990). Die Erhöhung der Sertolizellzahl durch eine Verlängerung ihrer Proliferationsphase, z.B. bei der Hypothyreose, führt zu einer 80%-igen Steigerung der TSP im Vergleich zur Kontrolle (Cooke et al. 1991).

Das Ausmaß der Degeneration von Keimzellen stellt einen weiteren limitierenden Faktor für die Effizienz der Spermatogenese dar. Während der Mitose geht ein erheblicher Teil der Spermatogonien durch spontane Degeneration verloren. Dies führt beispielsweise bei der Ratte zum Verlust von etwa 75% der theoretisch möglichen reifen Spermatiden (Russel et al. 1977). Auch ein Teil der Spermatozyten degeneriert während der Metaphase gegen Ende der Meiose. Dies führt zu einem Verlust von ca. 39% der potentiell möglichen Spermatiden (Johnson et al. 1987). In der Spermio-genese degeneriert ein Teil der Spermatiden während der nukleären Kondensation (Roosen-Runge, 1973). Dies hat eine wichtige Bedeutung hinsichtlich

der Selektion der "gesunden" Keimzellen mit intaktem Genom und der Aufrechterhaltung eines optimalen Zahlenverhältnisses zwischen Keimzellen und Sertolizellen (Russel, 1977, Hilscher and Engelmann, 1991).

Ferner wird die Effizienz der Spermatogenese durch das Alter beeinflusst. So beträgt die Zahl reifer elongierter Spermatozyten bei älteren Männern (Mittel: 71 Jahre) ca. 71% der von jüngeren Männern (Mittel: 34 Jahre) (Johnson et al. 1984 b). Die verminderte Produktion der reifen Spermatozyten hängt primär mit der Abnahme der Sertolizellpopulation bei älteren Männern zusammen (Johnson et al. 1984 a). Eine erhöhte Degeneration der primären Spermatozyten mit zunehmendem Alter trägt ebenfalls zur Senkung der TSP bei (Johnson et al. 1987).

Die Untersuchungen der molekularen Mechanismen der Keimzelldegeneration zeigen, daß der Keimzelltod hinsichtlich der Morphologie und der Erscheinungsformen kein einheitliches Bild liefert. In einigen Studien konnte nachgewiesen werden, daß die zwei Zelltodformen, Apoptose und Nekrose, in Abhängigkeit von der Ursache nebeneinander bzw. vereinzelt im Keimtubulus vorkommen können (Allan et al. 1987, Russel et al. 1990, Hikim et al. 1995, Hasegawa et al. 1997) (siehe Kap. 1.2. und 1.3.).

1.2. Apoptose

1.2.1. Charakterisierung der Apoptose

Die Apoptose ist eine Form des Zelltodes, die sich durch ihren genetisch gesteuerten und geordneten Ablauf von der Nekrose, dem unkontrollierten Zelltod, unterscheidet. Bei der Nekrose geht die Membranintegrität verloren, was zur Freisetzung des Zytoplasmahaltes führt. Dies ruft Entzündungsreaktionen im umgebenden Gewebe hervor (Allison and Sarraf, 1994). Bei der Apoptose hingegen, ist die Zellmembran intakt und die Zelle zerfällt in membranumschlossene Apoptosevesikel mit Zytoplasma, die von den Nachbarzellen oder von Makrophagen phagozytiert werden (Savill et al. 1990).

Typische morphologische Merkmale einer apoptotischen Zelle sind Chromatin-kondensation, Zellschrumpfung und Bildung von charakteristischen Ausstülpungen an der Zellmembran. Auf DNA-Ebene zeichnet sich dieser Prozeß durch eine Fragmentierung der DNA in ca. 200 bp große Bruchstücke aus, welche durch Restriktion der DNA zwischen den einzelnen Nukleosomen entstehen.

1.2.2. Apoptose in physiologischen Prozessen

Die normalen physiologischen Prozesse kann man, bezogen auf die Bedeutung der Apoptose, in drei Gruppen unterteilen:

1. Bei den Differenzierungsprozessen während der Embryonal- und Fetalentwicklung ist die Apoptose bei der Ausbildung der Gliedmaßen, des Knorpelgewebes, des Knochens und bei der Entwicklung der Eingeweide maßgeblich durch eine selektive Eliminierung der Zellen beteiligt (Furtwangler et al. 1985, Antalikova et al. 1989, Williams et al. 1991, Lewinson et al. 1992).
2. Bei der Aufrechterhaltung der numerischen Zellhomöostase spielt die Apoptose neben der Zellproliferation eine wichtige Rolle. So wird z.B. eine ausbalancierte Lymphozytenzahl im gesunden Organismus durch die Apoptose geregelt (Golstein et al. 1991, Rothenberg, 1992).
3. Bei der Immunabwehr gegen bestimmte virale Infekte induzieren die T-Zellen in den infizierten Zellen die Apoptose wie z.B. in mononukleären Blutzellen nach einer Infektion mit dem Herpesvirus I (Clouston and Kerr 1985, Cohen et al. 1992, Hanon et al. 1996). Die Apoptose ist maßgeblich an der Eliminierung der aberranten und geschädigten Zellen beteiligt. Zytotoxische Umwelteinflüsse, wie UV- oder Gamma- Bestrahlung, Hitze-Stress und Chemotoxika, sind häufige Ursachen für die Entstehung solcher Zellen mit Schäden in der chromosomalen DNA (Smith et al. 1996, Hasegawa et al. 1997).

Eine Fehlregulation der Apoptose ist mit der Pathogenese vieler Erkrankungen assoziiert. So kann eine verminderte oder fehlende Apoptose zu Autoimmun- bzw. Tumorerkrankungen führen (Rathmel et al. 1995, Borgerson et al. 1999, Tang et al. 1998). So z.B. weisen Kolontumorzellen und Prostatakarzinome eine im Vergleich zu Normalgewebe verminderte Expression der potentiellen Apoptoseinduktoren wie der Fas-Ligand oder Inaktivierung des p53-Proteins auf (Tang et al. 1998). Eine unerwünschte Aktivierung der Apoptose ist andererseits mit neurodegenerativen Erscheinungen bei der Alzheimererkrankung assoziiert (Smale et al. 1995).

1.3. Apoptose in der Spermatogenese bei Säugern

1.3.1. Apoptose in der Ontogenese des Hodens

Die Häufigkeit und das Verteilungsmuster von apoptotischen Zellen weisen während der verschiedenen Differenzierungsphasen der Keimzellen eine Abhängigkeit vom ontogenetischen Entwicklungsstadium der jeweiligen Spezies auf.

In der Säugetierentwicklung ist die Apoptoserate im präpuberalen Hoden am höchsten. So ist das Ausmaß der Apoptose im Keimepithel vom 8.-22. Tag postnatal bei der Maus (Mori et al. 1997) und vom 16.-28. Tag postnatal bei der Ratte (Billig et al. 1995) doppelt so hoch wie im adulten Tier. Im präpuberalen Hoden gehört die Apoptose bei den Spermatogonien zur normalen Entwicklung des Keimepithels und ist im Zusammenspiel mit der Proliferation an der Ausbildung der Population von Stammspermatogonien beteiligt (Heiskanen et al. 1996).

Beim adulten Tier ist die Zahl der apoptotischen Spermatogonien deutlich geringer. Den überwiegenden Teil der apoptotischen Zellen machen nun die Spermatozyten und Spermatisiden aus (Billig et al. 1995, Ohta et al. 1996, Mori et al. 1997). Die Bedeutung der Apoptose besteht hier anscheinend in der Eliminierung der geschädigten Keimzellen und in der Regulierung der Keimzellzahl, die durch Sertolizellen optimal versorgt werden können (Blanco-Rodriguez et al. 1996).

1.3.2. Hormonelle Regulation der Apoptose im Keimepithel

Studien an Maus und Ratte zeigen, daß die Apoptose im Keimepithel durch den Serumspiegel der Gonadotropine LH und FSH, sowie Testosteron beeinflussbar sind. Der Entzug von FSH (Billig et al. 1995, Shetty et al. 1996), LH (Billig et al. 1995) und Testosteron (Troiano et al. 1994, Henriksen et al. 1995) beeinflusst die Apoptoserate im Keimepithel in Abhängigkeit vom Keimepithelzyklus und vom Alter der Spezies. So löst der Testosteronentzug in den Stadien II-XI im Rattenhoden Apoptose aus, während sie im Stadium XII gehemmt wird (Henriksen et al. 1995). Die Blockierung von FSH bei der Ratte verursacht nur bei 16-32 Tage alten Tieren eine Erhöhung der Apoptoserate im Keimepithel, während jüngere und ältere Tiere weitgehend unempfindlich erscheinen (Billig et al. 1995). Der Einsatz von einem LH-Antagonisten, TX54, bewirkt bei Ratten eine Senkung der Anzahl an elongierten Spermatisiden sowie einen Anstieg der Apoptoserate (Wang et al. 1997).

1.3.3. Umwelteinflüsse auf die Apoptose im Keimepithel

Auf zytotoxische Umwelteinflüsse, radioaktive Strahlung, Chemotoxika und Hitzestress reagieren die Keimzellen mit einer erhöhten Apoptoserate. Dabei zeigt sich, daß die einzelnen apoptoseauslösenden Faktoren auf die Keimzellen stadienspezifisch wirken. Im Rattenhoden zeigen die B-Spermatogonien und Spermatozyten nach einer X-Bestrahlung eine erhöhte Apoptoserate (Henriksen et al. 1996). Die Einwirkung von "2-Methoxy-Acetic Acid" (MAA), ein aktiver Metabolit des organischen Lösungsmittels Ethylenglykol, spricht selektiv die Spermatozyten an (Li et al. 1996). Bei einem experimentell induzierten unilateralem Kryptorchismus verursacht der Hitzestress im adulten Maushoden bei den primären Spermatozyten und runden Spermatiden eine erhöhte Apoptoserate (Yin et al. 1997).

1.3.4. Apoptose in der Spermatogenese des Menschen

Bisherige Untersuchungen am adulten menschlichen Hoden befaßten sich mit der Beteiligung der Apoptose an der Genese von Spermatogenesedefekten. So zeigten Brinkworth et al. (1997), daß die Apoptose im Hoden älterer Männer (Mittel: 71 Jahre) bei der Keimzelldegeneration mit verschiedenen Formen von Spermatogenesestörungen beteiligt ist. Dabei wurde kein Zusammenhang zwischen der Apoptoserate und dem Hodengewicht bzw. dem Alter der einzelnen Patienten festgestellt.

Im Hoden infertiler Männer konnte im Vergleich zu Hoden mit normaler Spermatogenese eine erhöhte Apoptoserate mit Spermatogenese-arresten nachgewiesen werden (Lin et al. 1997 a, b). Jedoch bleibt noch offen, ob es ein charakteristisches Profil gibt, das einer Normalverteilung der Apoptose bei den einzelnen Entwicklungsstufen der Spermatogenese entspricht. Es ist weiterhin nicht geklärt, ob und in wieweit sich diese Verteilung bei pathologischen Veränderungen im Keimepithel verschiebt, was möglicherweise für die frühe Diagnostik eine Bedeutung haben könnte, da die einzelnen Entwicklungsstadien in der Spermatogenese erhebliche Unterschiede hinsichtlich ihrer zellphysiologischen Eigenschaften und ihrer Ansprechbarkeit auf apoptoseauslösende Parakrine bzw. Umweltsignale aufweisen.

Weitere Studien erscheinen in diesem Zusammenhang notwendig, um die

molekularen Mechanismen der Apoptoseregulation während der Spermatogenese aufzuklären.

1.4. Apoptose in der Hodentumorgenese

1.4.1. Apoptose in der Entwicklung maligner Tumore

Die Genese vieler maligner Neoplasien ist mit einer verminderten Apoptose in den Tumorzellen assoziiert. So korreliert die Senkung der Apoptoserate bei den Kopf/Hals-Tumoren mit dem Differenzierungsgrad und dem Grad der Malignität der Tumore (Mundle et al. 1996). In den transgenen Mäusen, die das T-Antigen des SV40-Virus exprimieren (C3(1)/SV40 TAG), ist die Inhibierung der Apoptose beim Übergang von atypischen Hyperplasien zu einem soliden Adenokarzinom ein Schlüsselereignis (Shibata et al. 1996).

Die Ursache für die verminderte Fähigkeit der Tumorzellen zur Apoptose liegt oft an der Inaktivierung potentieller Apoptoseinduktoren (z.B. p53) oder an der Überexpression von Apoptoseinhibitoren (z.B. bcl-2) (Chresta et al. 1996). Das Tumorsuppressorprotein p53 liegt bei mehr als der Hälfte aller malignen Tumore in einer mutierten Form vor (Greenblatt et al. 1994). Eine Überexpression des Apoptoseinhibitors bcl-2 wurde bei vielen menschlichen Tumoren nachgewiesen, wie Adenokarzinomen, Neuroblastomen, Lungentumoren und Melanomen, und korreliert oft mit einer schlechten Prognose und einer schwierigen Therapierbarkeit (Reed, 1994).

Andererseits spielt die Apoptose in der Regression und Heilung der Tumore eine wichtige Rolle. Die Heilbarkeit durch Chemo- oder Strahlentherapie steht in direkter Abhängigkeit von der Fähigkeit der Tumorzellen Apoptose zu induzieren (O'Connor et al. 1991, Dive et al. 1991, Lowe et al. 1993).

1.4.2. Genese der Keimzelltumore

Die Hodentumore machen etwa 1% aller Neoplasien bei Männern aus. In der Altersgruppe von 18 bis 35 Jahren sind sie die häufigste maligne Tumorerkrankung (Pugh et al. 1981). Die Keimzelltumore werden in Seminome und Nicht-Seminome unterteilt. Die Nicht-Seminome werden in differenzierte, undifferenzierte und mäßig differenzierte Teratome unterteilt.

Die Genese der Keimzelltumore nimmt ihren Ursprung in den intratubulären Keimzellneoplasien, die als „Carzinoma In Situ“ (CIS) bezeichnet werden (Skakkebaek et al. 1972, von der Maase et al. 1986). Die CIS-Zellen treten als präinvasive Vorstufe solider Keimzelltumore vermehrt in deren Peripherie auf. So weisen bis zu 88% aller Patienten mit einem soliden Seminom im kontralateralen Hoden oder in den tumorfernen Arealen CIS-Zellen im Keimepithel auf (Koide et al. 1987). Histologisch sind die CIS-Zellen entlang der Tubuluswand nachweisbar. Einen bewährten Marker für die Identifizierung der präinvasiven CIS-Zellen stellt die Plazentale Alkalische Phosphatase (PLAP) dar, die normalerweise an der Zellmembran primitiver embryonaler Keimzellen zu finden ist (Koide et al. 1987, Hustin et al. 1990).

1.5. Regulation der Apoptose

Die Apoptose kann in einer Zelle, in Abhängigkeit von ihren Eigenschaften wie Zelltyp, Entwicklungsstadium oder Alter, als Antwort auf Außensignale stattfinden. Der Entzug oder die Applikation von Wachstumsfaktoren und Hormonen, Veränderung der Interaktionen zwischen den Zellen oder die DNA-Schädigung, z.B. durch Bestrahlung, bewirken in den Zellen die Apoptoseinduktion.

Auf molekularer Ebene sind eine Reihe von onkogenen Proteinen, die normalerweise als Signaltransduktoren, Transkriptionsfaktoren oder als virale Onkoproteine bekannt sind, in die Induktion und Regulation der Apoptose involviert. Diese Proteine beeinflussen unter speziellen Bedingungen in Zellkulturen die Apoptose zelltypspezifisch. Hinsichtlich ihrer Bedeutung bei der Apoptose nehmen die Fas/Fas-Ligand-Oberflächenproteine, die Proteine der bcl-2-Familie und das p53-Tumorsuppressorprotein eine zentrale Rolle ein. Der Ausfall oder die Überexpression dieser Regulatoren führt bei den meisten Zellen zu einer massiven Störung in der Wachstumskinetik. Die daraus resultierende Anhäufung der Zellen oder der verstärkte Zellschwund bildet eine Grundlage für pathogene Veränderungen wie z.B. Tumorentstehung oder Autoimmunerkrankung im Organismus (s.a. Kap. 1.5.).

In der Tabelle 1 sind weitere Onkoproteine zusammengefaßt, die sich ebenfalls als Apoptose-modulierend erwiesen haben (Hale et al. 1996). So löst z.B. das c-myc Onkoprotein, das normalerweise bei Überexpression eine verstärkte Zellproliferation induziert, bei einer kontinuierlichen Expression durch den Entzug von Wachstums-

faktoren in myeloiden Zellen die Apoptose aus (Askew et al. 1991).

Tabelle 1: Apoptose-assoziierte Onkoproteine (modifiziert nach Hale et al. 1996).

Funktion	Protein	Apoptose-induzierend	Apoptose-hemmend
Signaltransduktoren	RAS		+
	RAF		+
	ABL		+
Transkriptionsfaktoren	MYC	+	
	REL	+	+
	MYB	+	+
	AP-1	+	
	E2F	+	
	NUR77	+	
Virale Onkoproteine	E1A		+
	E1B		+
	LMP-1		+
	TAX	+	+
	E7	+	
	E6		+

1.5.1. Fas-Rezeptor/Ligand-Interaktion in der Apoptoseinduktion

Im Jahre 1989 haben deutsche und japanische Wissenschaftler unabhängig voneinander einen Antikörper entdeckt, der bei Tumorzellen Apoptose auslöste und dadurch das Tumorwachstum hemmte (Traut et al. 1989, Yonehara et al. 1989). Das Antigen, gegen das der Antikörper gerichtet war, wurde von der deutschen Gruppe APO1 und von der japanischen Gruppe Fas genannt. Die internationale Bezeichnung des Antigens ist CD95.

1.5.1.1. Fas-Rezeptor

Das Fas-Rezeptor-Gen ist 25 kb groß und ist auf dem Chromosom 10 lokalisiert. Das Protein ist ein 45 kD großes Zelloberflächenprotein, das aus drei Teilen besteht, einem intrazellulären, einem transmembranen und einem extrazellulären Teil. Aufgrund der Eigenschaften des extrazellulären Teils wird Fas der Tumor Necrosis

Factor/Nerve Growth Factor-Rezeptor-Familie (TNF/NGF-Rezeptor-Familie) zugeordnet (Nagata and Golstein 1995). Die Aminosäuresequenz des extrazellulären Abschnitts ist bei den Mitgliedern der TNF/NGF-Rezeptor-Familie hoch konserviert (20-30% Homologie) und besteht überwiegend aus Zystein-Resten (Smith et al. 1994).

Für die Initiierung der Apoptose ist ein Abschnitt von etwa 80 Aminosäuren, die "Todesdomäne", die sich im intrazellulären Bereich von Fas befindet, verantwortlich (Itoh et al. 1993, Tartaglia et al. 1993).

1.5.1.2. Fas-Ligand

Der Fas-Ligand löst durch die Bindung an den Fas-Rezeptor die Apoptose der Zellen aus. Das menschliche Fas-Ligand-Gen ist 8 kb groß und ist auf dem Chromosom 1q23 lokalisiert. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 37 kD und ist ein Mitglied der TNF-Familie (Nagata, 1997). Es besteht aus einem intrazellulären N-Terminus, einem transmembranen Abschnitt und einem extrazellulären C-Terminus. Der Fas-Ligand (FasL) gehört zu den TypII-Membranproteinen (Tanaka et al. 1995).

1.5.1.3. Apoptoseinduktion durch das Fas-System

Bei der Apoptoseinduktion binden sich drei FasL-Moleküle in Form eines Trimers gleichzeitig an drei Rezeptormoleküle. Die anschließende Signaltransduktion besteht aus zwei Phasen.

Die erste Phase besteht in der Wechselwirkung der zytoplasmatischen "Todesdomäne" von Fas mit dem entsprechenden zellulären Effektor-Protein. Ein Protein, das sich mit der "Todesdomäne" interagieren und binden kann, ist „Fas-Associating Death Domain“ (FADD) (Boldin et al.1995, Chinnaiyan et al. 1995). Dieses 23 kD große Protein besitzt an seinem C-Terminus einen zur "Todesdomäne" von Fas homologen Abschnitt und an seinem N-Terminus den sogenannten Todeseffektor „Death-Effector Domain“ (DED). Es konnte nachgewiesen werden, daß sich unmittelbar nach der Bindung von FasL an Fas ein FADD/Fas-Komplex bildet (Kischkel et al. 1995) (Abb. 1).

In der zweiten Phase findet als Ergebnis der FADD/Fas-Wechselwirkung die Aktivierung von Enzym-Kaskaden statt. Als Bindeglied zwischen der Signal-

transduktionskette und der proteolytischen Aktivität fungiert ein Enzym, das sogenannte FLIC (FADD-like ICE), das den Zysteinproteasen der „Interleukin-1beta-Converting Enzyme“-Familie (ICE-Familie) zugeordnet wird, (Boldin et al. 1996, Muzio et al. 1996).

Das FLIC ist ein 55kD großes Protein, das am N-Terminus zwei Domänen besitzt, die für die Bindung an den "Todeseffektor" von FADD verantwortlich sind. Durch die Bindung an das FADD kommt es zur Oligomerisierung des FLIC. Dies führt weiterhin zu einer Autokatalyse des Enzyms. Das aktivierte FLIC ist in der Lage andere Caspasen katalytisch zu aktivieren und setzt damit proteolytische Kaskaden in Gang (Nagata, 1996) (Abb.1).

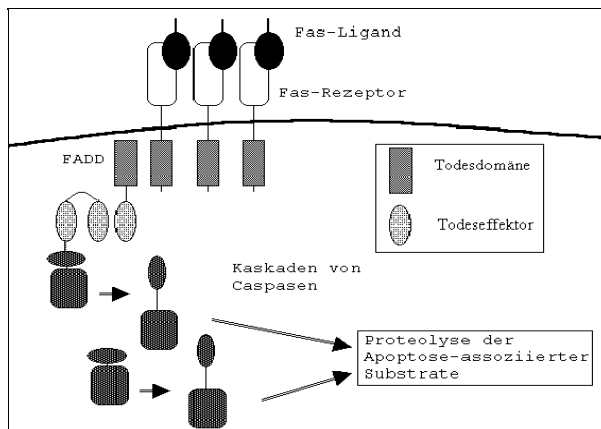


Abbildung 1: Signaltransduktionsweg bei der Fas-vermittelten Apoptose (modifiziert nach Nagata, 1996).

1.5.1.4. Fas/Fas-Ligand im Hodengewebe

Die Tatsache, daß sowohl Fas als auch Fas-Ligand im Hoden nachgewiesen werden konnte, deutet auf eine zentrale Rolle des Fas-Systems in der Apoptoseregulation bei Keimzellen. Der derzeitige Wissensstand hinsichtlich der Rolle des Fas-Systems in der Spermatogenese weist einige offene Fragen auf. So zeigen viele Untersuchungen kein einheitliches Bild über die Lokalisation der Fas- und Fas-Ligand-Antigene im Keimtubulus. Im Maushoden exprimieren die Sertolizellen den Fas-Liganden und die Keimzellen des Fas-Rezeptors (Lee et al. 1997). Im Unterschied dazu zeigen im Rattenhoden die pachytänen Spermatozyten, Spermatisden und die Sertolizellen gleichermaßen den Fas-Rezeptor und den Fas-Liganden (Woolveridge et al. 1999).

Über die Expression der Fas-/Fas-Ligand-Proteine im menschlichen Hoden gibt es derzeit zwei Studien, die zum Teil unterschiedliche Erkenntnisse über die Lokalisation des Fas-Proteins liefern. So berichteten Sugihara et al. (1997) über die Lokalisation von Fas und Fas-Liganden in allen Keimzelltypen, sowohl bei den Sertoli- als auch bei den Leydig-Zellen, während Pentikainen et al. (1999) über Fas-Proteinexpression nur in den Spermatozyten und Spermatischen berichtet. Der derzeitige Kenntnisstand hinsichtlich des Expressionsprofils von Fas/Fas-Ligand-Proteinen und deren Stellenwert in der Regulation der Keimzellapoptose erlaubt noch keine genaueren Aussagen.

1.5.2. p53-Protein in der Apoptoseregulation

1.5.2.1. Biochemische Eigenschaften von p53

Das humane p53-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 lokalisiert. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 53kD und besteht aus 393 Aminosäuren (Caron et al. 1992). Das p53-Protein besteht aus einem Prolin-reichen N-Terminus, einem hydrophilen C-Terminus und einer hydrophoben zentralen Region.

Im N-Terminus befindet sich die Transaktivierungsdomäne des p53-Proteins. Der C-Terminus beinhaltet die Oligomerisierungsdomänen, die vorwiegend die Bildung von Tetrameren ermöglichen. Die zentrale Region ist für die sequenzspezifische DNA-Bindung verantwortlich (Hollstein et al. 1996).

1.5.2.2. Funktion von p53

Die Hauptaufgabe des p53-Proteins besteht während der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung in der Sicherung der Genomintegrität in geschädigten Zellen durch Einleiten des G1-Arrestes oder der Apoptose.

1.5.2.2.1. DNA-Reparatur

Der Verlust der normalen Funktion des p53-Proteins, der durch Mutationen oder durch Komplexbildung mit viralen oder zellulären Proteinen hervorgerufen werden kann, führt häufig zu einer unkontrollierten Proliferation der Zelle. Die Funktion des p53-Proteins beruht auf der Fähigkeit des Proteins sich sequenzspezifisch an doppel-

strängige DNA zu binden. Dadurch ist es in der Lage, die DNA-Replikation und die DNA-Transkription von Genen zu regulieren (Donehower et al. 1993).

Nach einer DNA-Schädigung kommt es zum Anstieg des intrazellulären p53-Spiegels. Beim Übergang von der Ruhe (G1)- in die Synthese (S)-Phase greift das p53-Protein in den Zellzyklus ein. Am Ende der G1-Phase wird der Zellzyklus gestoppt, so daß eine DNA-Reparatur vor einer DNA-Replikation möglich ist. Dies geschieht unter anderem durch Blockierung von PCNA-Expression (Proliferating Cell Nuclear Antigen), von Polymerase- α und von Histon H3 (Mercer et al. 1991). Bei irreparablen Schäden löst das p53-Protein in Zellen die Apoptose aus.

1.5.2.2.2. Rolle von p53 in der Apoptose

Eine entscheidende Rolle von p53 bei der Apoptoseinduzierung konnte in Versuchen demonstriert werden, in denen sich der Verlust, die Zugabe oder die Aktivierung von p53 unmittelbar auf das Apoptoseverhalten der Zellen auswirkte. So löst eine radioaktive Bestrahlung von Thymozyten der Maus die Apoptose aus. Die Deletion des p53-Gens verursacht jedoch bei diesen Zellen den Verlust der Fähigkeit zur Apoptose (Lowe et al. 1993). Die Aktivierung des p53-Gens in Kolonkarzinomen bei Nacktmäusen, die durch Injektion der Kolontumorzellen entstanden ist, führte zur vollständigen Regression der Tumore. Die gezielte Aktivierung des p53-Gens erfolgte durch Ausstattung des Gens in Tumorzellen mit einem Metallothionin-Promotor, der durch Zugabe von Zinkchlorid aktiviert wird (Shaw et al. 1992). Die Transfektion des mutierten und des normalen p53-Gens in die myeloiden Leukämiezellen, die kein p53-Gen haben, verursachte verstärkt die Apoptose nur bei Zellen mit normalem Wildtyp p53-Gen (Yonish-Rouach et al. 1991).

Der Funktionsverlust von p53 begünstigt somit das Tumorwachstum. In etwa der Hälfte aller malignen Neoplasien liegt das p53-Gen inaktiviert vor. Der Mutationsstatus des Gens ist oft mit einer schlechten Prognose bei der Tumorerkrankung assoziiert (Greenblatt et al. 1994).

Die vorwiegend aus den Untersuchungen an Maus und Ratten stammenden Erkenntnisse über die p53-Expression im Hoden, weisen kein einheitliches Bild auf. Rotter et al. (1993) fanden hohe Mengen von p53-mRNA in Spermatiden und Spermatozyten. Im Gegensatz dazu, wurde auf der Proteinebene p53 ausschließlich in Spermatozyten nachgewiesen, was auf eine Spermatozyten-spezifische Rolle

von p53 im Keimepithel deutet (Beumer et al. 1998).

Beim menschlichen Hoden unterscheiden sich die Erkenntnisse über die p53 Expression je nach Untersuchungsansatz. Die Westernblot-Untersuchungen von Woolveridge et al. (1998) in Hodenhomogenaten zeigen eine konstante Expression des p53-Proteins, die jedoch nicht mit der Apoptose assoziiert ist. Im Gegensatz dazu wiesen die immunhistochemischen Untersuchungen von Lin et al. (1999) keine p53 Markierung in den Keimtubuli auf. Kuczyk et al. (1994) wiederum konnten in Tumor-fernen Arealen eine Einzelzellexpression von p53, ohne den Zelltyp zu spezifizieren, zeigen. Es bleibt jedoch unklar, in wieweit diese widersprüchlichen Aussagen methodisch bedingt sind. Die Aussage von Woolveridge et al. (1998) beruht ausschließlich auf der Westernblotanalyse, mit der auch geringe Mengen des Antigens nachweisbar sind. Ergänzend wäre jedoch eine immunhistochemische Spezifizierung der p53 exprimierenden Zellen sinnvoll. Die Ermittlung des p53-Expressionsprofils im menschlichen Hoden ist für das Verständnis der molekularen Zusammenhänge zwischen der Apoptoseregulation und der Spermatogenese sowie der Genese der Keimzellkarzinome von Bedeutung.

1.5.3. B-Cell-Leukemia/Lymphom-2 (bcl-2) in der Apoptose

1.5.3.1. Biochemische Eigenschaften

Das 230 kb große humane bcl-2-Gen ist auf dem q-Arm des Chromosoms 18 lokalisiert. Das bcl-2-Protein umfaßt 239 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 26kD. In der Nähe des C-terminalen Endes befindet sich ein Abschnitt von 19 hydrophoben Aminosäuren, der für die Verankerung des Proteins an der Membran verantwortlich ist (Hockenbery et al. 1990). Funktionell wichtig sind die Protein-Domänen BH1 und BH2, die durch Bildung von Heterodimeren mit anderen Mitgliedern der bcl-2 Familie interagieren.

Das bcl-2-Protein ist ein Onkoprotein, das für die Zellproliferation verantwortlich ist. Im adulten Organismus ist die bcl-2-Expression auf Areale langlebiger und proliferierender Zellen beschränkt (Hockenbery et al. 1991, Lu et al. 1993). Das sind in erster Linie duktale Zellen aller exokrinen Drüsen (Pankreas, Speichel- und Schweißdrüsen), Stammzellen (basale Keratinozyten) und hormon-sensible Zellen (glatte Muskulatur, Drüsen des Uterus, duktales Brustdrüsenepithel) (Lu et al. 1993).

1.5.3.2. bcl-2 und Apoptose

In der Signaltransduktionsphase der Apoptose spielen die Proteine der bcl-2 Familie eine zentrale Rolle. Ein Teil der Mitglieder der bcl-2 Familie, wie bcl-2, bcl-xL und mcl-1, können die Apoptose inhibieren. Die anderen Mitglieder dagegen begünstigen die Apoptose (bax, bcl-xS, bak). Für die Apoptose-blockierende oder -fördernde Wirkung sind auch die Interaktionen (Hetero- und Homodimerisierung) zwischen den Mitgliedern der bcl-2 Familie entscheidend. Die Wirkung von bcl-2 als Inhibitor der Apoptose ist von dem Verhältnis zwischen den bcl-2/bcl-2-Homodimeren und den bcl-2/bax-Heterodimeren abhängig (McDonnell et al. 1996).

Die Apoptose-inhibierende Funktion des bcl-2-Proteins konnte an Zellkulturen nachgewiesen werden, die normalerweise beim Entzug von Zytokinen, z.B. Interleukinen 3 und 4 (IL-3, IL-4), oder durch Überexpression oder Aktivierung von Apoptoseinduktoren (Fas, p53) durch Apoptose absterben. Diese „normale“ Reaktion der Zellen bleibt häufig aus, wenn das bcl-2-Protein überexprimiert wird.

Auf den Entzug von IL-3 und IL-4 reagieren die interleukinabhängigen hämatopoetischen Zelllinien mit einer erhöhten Apoptoserate. Jedoch bleibt dieser Effekt aus, wenn die Zellen das bcl-2-Protein überexprimieren, was durch Transfektion des bcl-2-Gens erzielt werden kann (Nunez et al. 1990, Bary et al. 1993).

Die Fas/FasL-induzierte Apoptose bei malignen Gliomzelllinien (LN-18, LN-229, T98G) konnte durch die Überexpression von bcl-2 blockiert werden (Schlapbach et al. 1997). Die Erythroleukämiezellen (DP16-1), die kein p53 Gen haben, reagierten auf eine radioaktive Bestrahlung bei einer Transfektion des p53-Gens mit Apoptose. Gleichzeitige Transfektion des bcl-2 Gens blockiert die Apoptose-induzierende Wirkung von p53 (Fukunaga-Johnson et al. 1995).

Die Untersuchungen der Expression des bcl-2-Proteins in der Spermatogenese an Tiermodellen und an Menschen liefern zum Teil ein widersprüchliches Bild. Untersuchungen an transgenen Mäusen, die kein bcl-2 exprimieren, weisen einen Spermatogonienarrest auf, was auf die Bedeutung von bcl-2 in der normalen Spermatogenese hinweist (Furuchi et al. 1996). Im Gegensatz dazu konnte Rodriguez et al. (1997) kein bcl-2-Protein im Maushoden nachweisen. Im Rattenhoden reagieren die Keimzellen auf den Testosteronentzug mit einer erhöhten bcl-2 Expression (Woolveridge et al. 1999).

Im menschlichen Hoden konnte Lin et al. (1999) immunhistochemisch kein bcl-2 im Keimepithel nachweisen. Mit Hilfe der Proteinblotanalyse konnten Woolveridge et al. (1998) in menschlichen Hodenhomogenaten nach einer Langzeit-Antiandrogebehandlung eine Überexpression des bcl-2 Proteins feststellen. Jedoch fehlen in den Untersuchungen von Woolveridge et al. (1998) immunhistochemische Daten zur bcl-2-Expression, sowie bei Lin et al. (1999) eine ergänzende Proteinblotanalyse. In diesem Zusammenhang wäre für die Klärung der Rolle des bcl-2-Proteins in der normalen Spermatogenese im menschlichen Hoden die Kombination von Westernblotanalyse mit einer immunhistochemischen Lokalisation des Antigens sinnvoll.

Weiterhin konnte in den Keimzellkarzinomzelllinien eine erhöhte bcl-2-Proteinexpression nachgewiesen werden, was auf die Rolle des bcl-2 in der Entwicklung der Keimzelltumore hindeutet (Chresta et al. 1996, Burger et al. 1997). Um die Rolle des bcl-2-Proteins in der Hodentumorgenese festzustellen, wäre eine Erstellung des Expressionsprofils des bcl-2 Proteins in den einzelnen Phasen der Hodentumorgenese, von normalem Gewebe über Tumorvorläuferlesionen zu soliden Tumoren, notwendig.

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Die Erkenntnisse über die Apoptose im männlichen Keimepithel, die hauptsächlich durch Untersuchungen an Tiermodellen erzielt wurden, zeigen deutlich die bedeutende Rolle der Apoptose in der Spermatogenese sowie in der Genese krankhafter Veränderungen der Keimzellen. Gleichzeitig erweist sich die Apoptose als ein komplexes Zusammenspiel vieler Faktoren (z.B. die Spezies-spezifischen Unterschiede, die verschiedenen Auslösemechanismen der Apoptose und die vielfältige physiologische Funktionen der Apoptose in den einzelnen Stadien der Spermatogenese), welche bei allen Untersuchungen zu berücksichtigen sind. Die bisherigen Daten aus der Literatur über die Apoptose und deren Regulatoren Fas/Fas-Ligand, p53 und bcl-2 im menschlichen Hoden geben kein umfassendes Bild über diese Problematik. Die zum Teil uneinheitlichen und widersprüchlichen Erkenntnisse erfordern weitere Aufklärungen zur Rolle der Apoptose und deren Regulation in der menschlichen Spermatogenese und Genese der Keimzelltumore.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden folgende Schwerpunkte abgehandelt:

- I** Um eine Korrelation zwischen der Lokalisation der Apoptoseregulatoren wie Fas/Fas-Ligand, p53 bzw. bcl-2 und der räumlichen Verteilung der apoptotischen Zellen im menschlichen Keimepithel herauszufinden, wurde:
 - I a** das menschliche Keimepithel mit normaler Spermatogenese hinsichtlich der Apoptoseverteilung und der Apoptoserate charakterisiert;
 - I b** ein genaues Expressionsprofil der einzelnen Regulatoren (Fas, Fas-Ligand, p53 und bcl-2) auf der Protein- und/oder mRNA-Ebene ermittelt.

- II** Um festzustellen inwieweit eine Dysregulation der Apoptose mit der Tumorprogression im Hoden assoziiert ist, wurden:
 - II a** die präinvasiven Keimzellularlesionen „Carcinoma In Situ“ (CIS) und die invasiv wachsenden Seminome hinsichtlich der Apoptosehäufigkeit charakterisiert;
 - II b** die Expression der Apoptose-Regulatoren p53 und bcl-2 in den präinvasiven CIS sowie in soliden Seminomen und deren Rolle in der Apoptose-Regulation in der Hodentumorgenese untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Biopsiematerial

Es wurden 25 Biopsien von 14 Patienten, die wegen eines Prostatakarzinoms orchiektomiert wurden (Alter: 52-74 Jahre, Mittel: 64 Jahre), untersucht. Die lichtmikroskopische Beurteilung (Prof. M. Bergmann) zeigte eine normale Spermatogenese (Score=8) (Holstein und Schirren, 1983).

Für die Untersuchung der Apoptose bei präinvasiven CIS-Zellen im Vergleich zu invasiv wachsenden Tumorzellen wurden 9 Proben mit präinvasivem CIS und 12 Seminome im fortgeschrittenen Stadium ausgewertet. Die Gewebeproben wurden von der Klinik und Poliklinik für Urologie in Münster zur Verfügung gestellt.

Für die Westernblot-Untersuchungen mit Antikörpern gegen den Fas-Liganden und den Fas-Rezeptor stand ein Proteinlysate aus Jurkatzellen (Zelllinie aus T-Lymphozyten) von der Firma Dianova als Positivkontrolle zur Verfügung. Als Positivkontrolle für die immunhistochemischen Untersuchungen dienten Bouin-fixierte Gewebeschnitte von der Tonsille, die aus der Hals-Nasen-Ohren Klinik, Halle, zur Verfügung gestellt wurden.

2.2. Apoptosenachweis (TUNEL)

2.2.1. Fixierung und Einbettung der Gewebeproben

Unmittelbar nach der Entnahme wurde ein Teil der Gewebeproben im flüssigen Stickstoff asserviert und anschließend bei -80°C gelagert.

Von jedem Gewebeblock wurde ein weiterer Teil in einer Bouin'schen Lösung (5 ml 96%-ige Essigsäure, 75 ml gesättigte wässrige Pikrinsäure, 25 ml 37%-iges Formalin) fixiert und in Paraffin eingebettet.

2.2.2. TUNEL-Reaktion

Die Paraffinschnitte (7 μm) wurden zunächst in Xylol (2x15 min) entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (96%, 80%, 70%, 50% Aqua. bidest.) je 5 min rehydriert. Die nachfolgenden Inkubationsschritte wurden in

feuchten Kammern wie folgt durchgeführt:

1. Inkubation im 1%-igen H₂O₂ in Methanol bei Raumtemperatur (20 min).
2. Spülen der Objektträger im 0,2M Tris-Puffer, pH 7,4 (2x10 min).
3. Vorinkubation der Schnitte mit dem Reaktionspuffer (200 mM Kaliumkacodylat; 25mM Tris-HCl; 1,25 mg/ml Rinderserumalbumin, pH 6,6; 0,75 mM Kobaltchloridlösung) bei 37° (30 min).
4. Terminale Transferase-Reaktion bei 37°C (1 Stunde).
Der Reaktionsansatz enthielt 0,03 U/μl terminale-Transferase (Boehringer Mannheim), 5μM Biotin-16-dUTP und 45μM dATP (Boehringer Mannheim).
5. Spülen der Objektträger im 0,2M Tris- Puffer, pH 7,4 (2x10 min).
6. Vorinkubation mit dem Blockpuffer (5% Milchpulver im 0,2M Tris-Puffer, pH 7,4) bei Raumtemperatur (30 min).
7. Inkubation mit dem Standard ABC-Elite-Kit (Vector Burlingame) bei Raumtemperatur (30 min).
8. Spülen wie im Schritt 2.
9. Entwickeln im 0,5 mg/ml Diaminobenzidin (DAB, Sigma).
10. Spülen wie im Schritt 2.
11. Gegenfärben im Hämalaun (1 min).
12. Bläuen im Leitungswasser (20 sec).
13. Dehydrieren und Eindecken mit DePeX.

2.2.3. Kontrollen

Positivkontrolle: Es wurde ein Gewebeschnitt für 1 Stunde bei 37 °C mit DNase (200 U/μl) in DNase Puffer behandelt (3M NaOAc, pH 5,4; 1M MgSO₄).

Negativkontrolle: Das Protokoll (s. oben) wurde ohne das Enzym terminale-Transferase durchgeführt.

2.3. RT-PCR Analyse (Fas/Fas-Ligand)

2.3.1. RNA-Präparation

Für die RNA-Präparation wurden 10 bis 50 mg Kryogewebe in 1 ml TRIZOL-Lösung (Life Technologies) homogenisiert und nach dem Protokoll des Herstellers aufgearbeitet. Anschließend wurde die präparierte Gesamt-RNA 1 Stunde bei 37°C

einer DNase Behandlung (1U/1µg-RNA) unterzogen. Nach anschließender Fällung und dem Waschen im 75%-igen Ethanol wurde die RNA in DEPC-Wasser aufgenommen. Durch Absorptionsmessungen bei 260 nm konnte die Konzentration der RNA bestimmt werden. Die RNA wurde bei -70°C gelagert.

2.3.2. cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA wurde an einem Oligo-dT-Primer wie folgt durchgeführt: 3µg Gesamt-RNA wurden zunächst mit 0,5 µg Oligo-dT-Primer bei 68°C 10 min lang denaturiert und anschließend auf Eis (4°C) gestellt. Danach wurde dem RNA-Oligo-dT-Primer-Mix 1µl reverse Transkriptase (Superscript II, BRL), 4µl RT-Puffer, 2µl dNTP Mix (enthält je 10mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP) und 2µl 0,1%-iges DTT hinzugefügt und auf 20µl Endvolumen mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde 10 min bei Raumtemperatur und danach 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 80°C 10 min lang denaturiert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C .

2.3.3. RT-PCR

Für die Amplifikation des gesuchten cDNA-Abschnittes wurden spezifische Primer (GibcoBRL) eingesetzt (Schumann et al. 1997):

FAS sense: 5'- ATG CTG GGC ATC TGG ACC -3'

FAS antisense: 5'- CTG TTC TGC TGT GTC TTG G -3'

Fas L sense: 5'- GGA TTG GGC CTG GGG ATG TTT CA -3'

Fas L antisense: 5'- TTG TGG CTC AGG GGC AGG TTG TTG -3'

PCR-Ansatz (50 µl):

10xPCR-Puffer	5µl
dNTP-Mix (10 mM)	1µl
Fas-Primer-Mix (0,25 mM)	1µl
FasL-Primer-Mix (0,25 mM)	1µl
Taq-DNA Polymerase (4U/µl)	0,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl
c-DNA (s. 2.3.2.)	5µl

anschließend auf 50 µl Endvolumen mit Aqua.bidest. auffüllen.

PCR-Protokoll:

1 min	95°C
30 sec	94°C
30 sec	Annealingtemperatur (s.u.)
30 sec	72 °C (Rücksprung auf Schritt 2, Zyklus-Wiederholung)
5 min	72 °C

Annealingtemperatur und Zykluszahl:

Fas	58°C, 39 Zyklen
FasL	64°C, 39 Zyklen

Zur Identifikation wurde das RT-PCR-Produkt in einem 1,8%-igen Agarosegel mit Ethidiumbromid in 1xTAE bei 90V 2 Stunden aufgetrennt.

2.3.4. Identifikation der RT-PCR-Produkte

Das RT-PCR-Produkt kann zusätzlich mit Hilfe von Restriktionsenzymen sequenzspezifisch in definierte DNA-Fragmente gespalten und dadurch identifiziert werden. Für den Nachweis der Fas- und FasL-PCR-Produkte wurde das Enzym *DdoI*, das in beiden RT-PCR-Produkten mindestens 2 Schnittstellen hat, ausgewählt. Das Enzym *DdoI* und die entstehenden DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des Programms DNAsis, Version 6.0 (Pharmacia) ermittelt.

Restriktionsansatz (20 µl):

PCR-Produkt	10µg
10xReaktionspuffer	1/10 Vol. %
Restriktionsenzym (<i>DdoI</i>)	5 U/µg DNA

anschließend auf 20 µl Endvolumen mit Aqua.bidest. auffüllen.

Der Verdau erfolgte 1 Stunde bei 37°C. Zur Auswertung wurde das Restriktionsprodukt in einem 1,8%-igen Agarose-Gel mit Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend fotodokumentiert.

2.4. Protein-Analyse**2.4.1. Westernblot****2.4.1.1. Proteinisolierung**

50 bis 100 mg des bei -70°C gelagerten Gewebestückes wurden in tief gefrorenem Zustand pulverisiert, in ca. 5 Vol. des Extraktionspuffers (1% SDS, 1 mM Natrium-

vanadat und 10 mM Tris, pH 7,4) homogenisiert und 10 min lang gekocht. Anschließend wurden die Proben bei 7500 Upm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Systems (BCA Protein Assay Kit, PIERCE) bei 570nm photometrisch bestimmt.

2.4.1.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Entsprechend dem Gewichtsbereich der untersuchten Proteine (10-100 kD) wurde ein 12%-iges PAA-Gel verwendet (Tab. 2.).

Tabelle 2: Zusammensetzung des 12%-igen PAA-Gels

Lösung	Trenngel (12%) 15 ml	Sammelgel 5 ml
Acrylamid 40%	4,5 ml	0,62 ml
Aqua. bidest.	6,4 ml	3,6 ml
Tris-HCl-Puffer 1,5 M, pH 8,8	3,8 ml	-
Tris-HCl-Puffer 1 M, pH 6,8	-	0,63 ml
Natriumdodecylsulfat (SDS) 10%	0,15 ml	0,05 ml
Ammoniumpersulfat (APS) 10%	0,15 ml	0,05 ml

Zusammensetzung von 10 x Laufpuffer:

Tris-HCl-Puffer 250 mM M, pH8,3
 Glycin 192 mM
 SDS 1%
 Mit Aqua. bidest. auf 1 Liter auffüllen.

Zusammensetzung von 2 x Proben-Puffer:

Tris-HCl-Puffer 125 mM, pH 6,8
 SDS 4% Gew %
 Glycerol 20% Gew %
 β -Mercaptoethanol 10% Vol %
 Bromphenolblau 2% Gew %
 Aqua. bidest. 17,5% Vol %

Die elektrophoretische Trennung erfolgte 2 Stunden bei 30 mA.

2.4.1.3. Proteinblot

Die PVDF-Membran, das PAA-Gel mit Proteinproben, die Filterpapiere getränkt in einem der 3 Blotpuffer (Tab. 3) wurden zwischen den Elektroden angeordnet.

Bei einer PAA-Gelfläche von ca. 54 cm² wurde der Proteintransfer mit einer Stromstärke von 240 mA (45 min, bei 16°C) durchgeführt. Das geblottete Protein auf der PVDF-Membran konnte mit 0,1%-gem Ponceau Rot und 7%-ger Trichloressigsäure reversibel gefärbt und dadurch sichtbar gemacht werden. Anschließend wurde die Membran luftgetrocknet. In eine Frischhaltefolie geschweißt konnte die Membran bei 4°C gelagert werden. Die Effizienz des Blots wurde durch das Färben des Gels mit Coomassieblau festgestellt.

Tabelle 3: Pufferzusammensetzung.

	Puffer 1	Puffer 2	Puffer 3
Tris-HCl	0,3 M	25 mM	25mM
Methanol	20%	20%	20%
Amino-Caprionsäure	-	-	4mM

Coomassieblau-Färbelösung (1 l):

Coomassieblau (Serva)	2,5 g
Essigsäure	100 ml
Methanol	450 ml
Aqua. bidest.	450 ml

Coomassieblau-Entfärber (1 l):

Methanol	450 ml
Essigsäure	75 ml
Aqua. bidest.	475 ml

2.4.1.4. Immundetektion

Die folgenden Inkubations- und Waschschrte der Immundetektion wurden in einer T-PBS-Lösung (PBS mit 0,1% TWEEN) durchgeführt:

1. Inkubation mit der Blocklösung (5% BSA, 5% Milchpulver in T-PBS) (1 Stunde).
2. Inkubation mit dem 1. Antikörper (1 Stunde).
3. Waschen im Schüttelbad (4x5 min).

4. Inkubation mit Nonimmunserum (5% in T-PBS) aus der Ziege (30 min).
5. Inkubation mit dem 2. Antikörper, Ziege-Anti-Maus, HRP-Konjugiert (30 min).
6. Waschen im Schüttelbad (4x5 min).

Die Antikörperreaktion wurde durch eine Chemilumineszenzreaktion (ECL, Amersham) auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

Die für die Immunreaktion benutzten Antikörper und die eingesetzten Mengen sind in der Tabelle 4 aufgeführt.

2.5. Immunhistochemie (ABC-Methode)

Die entparaffinierten und rehydrierten Paraffinschnitte wurden in Citratpuffer (pH 6) einer Mikrowellenbehandlung unterzogen (4x5min bei 600W). Die anschließenden Inkubationen wurden bei Raumtemperatur in feuchten Kammern wie folgt durchgeführt:

1. Inkubation in Methanol mit 1% H₂O₂ (20 min).
2. Waschen in PBS-Puffer (4x5min).
3. Inkubation mit 5% BSA im PBS-Puffer (1 Stunde).
4. Waschen in PBS-Puffer (4x5min).
5. Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper (Tab. 4) in 1% BSA im PBS-Puffer (1 Stunde).
6. Waschen in PBS-Puffer (4x5min).
7. Inkubation mit Nonimmunserum (5% in PBS) von der Ziege (30 min).
8. Inkubation mit dem 2. Antikörper (30 min).
9. Waschen in PBS-Puffer (4x5min).
10. Inkubation mit dem Standard ABC-Elite-Kit (Vector Lab) (30 min).
11. Waschen in PBS- Puffer (4x5min).
12. Entwickeln mit Diaminobenzidin (Sigma) (7 min).
13. Gegenfärben mit Hämalaun (1 min).
14. Dehydrieren und Eindecken mit DePeX.

Tabelle 4: Charakterisierung der verwendeten Antikörper

Antikörper	Quelle	Bezeichnung	Verdünnung	
			ICH	WB
p53	medac diag.	Klon Do-7	1/500	1/500
bcl-2	DAKO	Klon 124	1/200	1/500
Fas	DIANOVA	Klon 13	1/200	1/500
FasL	DIANOVA	Klon 33	1/400	1/500
PLAP	DAKO	PL8-F6	1/100	-
2.AK Biotin-Konj.	SBAI	IgG (H+L)	1/300	-
2.AK HRP-Konj.	SBAI	IgG (H+L)	-	1/500

3. Ergebnisse

3.1. Apoptose im Hoden mit normaler Spermatogenese

3.1.1. Apoptosehäufigkeit und das Verteilungsmuster im Keimepithel

Es wurden insgesamt 6946 Keimtubuli mit der normalen Spermatogenese in den Hoden mit Score 8-10 ausgewertet. Die Ergebnisse der Apoptoseuntersuchung in den adulten menschlichen Hoden mit normaler Spermatogenese sind in der Tabelle 5 dargestellt. In 25 Hodenbiopsien wurde in $8,8\% \pm 3,7\%$ aller Keimtubuli mindestens eine apoptotische Keimzelle nachgewiesen (Tab. 5; Abb. 2). Der Mittelwert der apoptotischen Zellen, bezogen auf die Zahl der Keimtubuli, lag bei $0,127 \pm 0,057$ ($n=25$) (Tab. 5; Abb. 3).

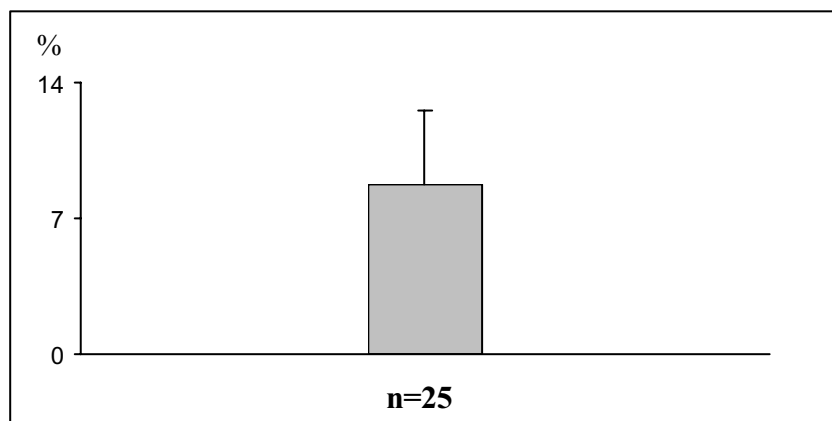


Abbildung 2: Der Mittelwert der Keimtubuli mit apoptotischen Keimzellen.

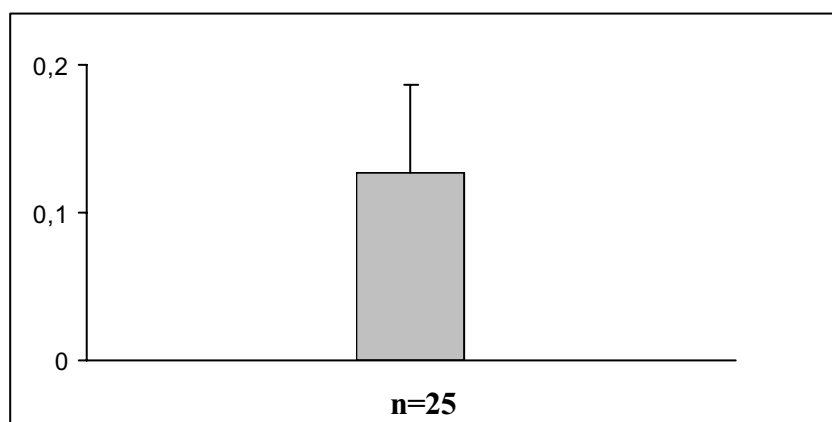


Abbildung 3: Der Mittelwert der apoptotischen Zellen bezogen auf die Zahl der Keimtubuli.

Apoptotische Zellen fanden sich in allen Stadien der Spermatogenese. Dabei beträgt der Anteil der Spermatozyten $63\% \pm 9\%$, der Spermatischen $30\% \pm 8\%$ und der Spermato gonien $7\% \pm 6\%$ in den untersuchten Hodenbiopsien (Tab. 5; Abb. 4; Abb. 5 a-c).

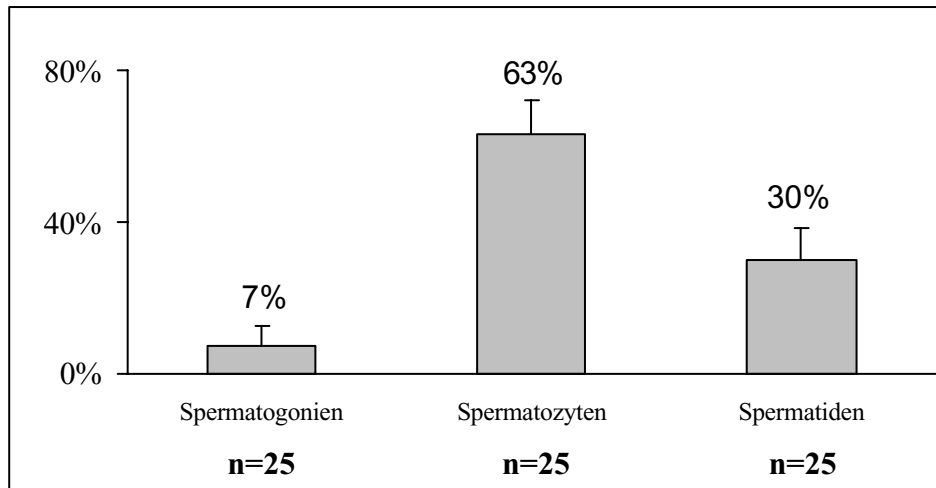


Abbildung 4: Verteilung der apoptotischen Zellen in den einzelnen Differenzierungsstadien der Spermatogenese.

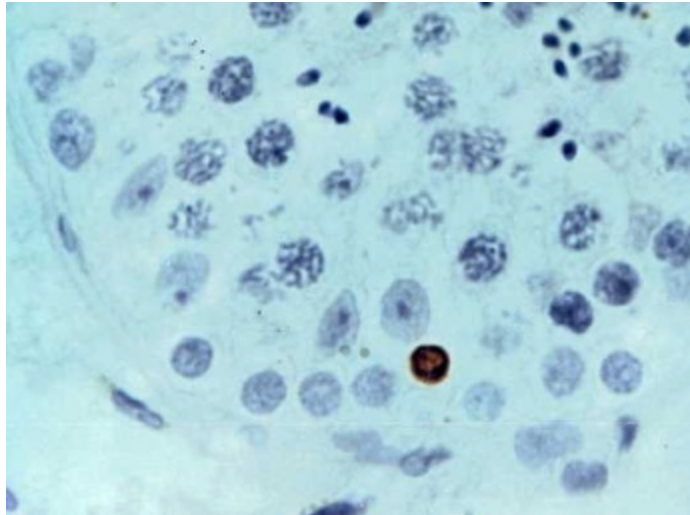
Bei der Positivkontrolle haben mindestens 70% aller Zellen auf dem Gewebeschnitt eine positive TUNEL-Reaktion gezeigt (Abb. 6a). Bei der Negativkontrolle war keine Markierung sichtbar (Abb. 6b).

Tabelle 5: Verteilung und Häufigkeit der apoptotischen Zellen im normalen menschlichen Keimepithel.

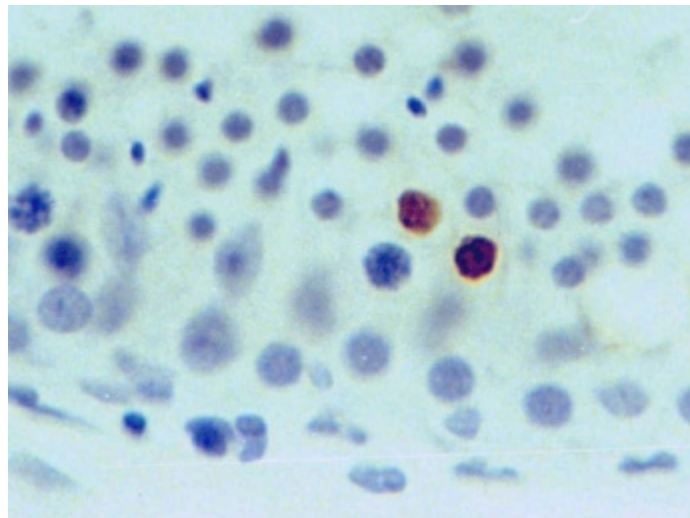
PNr	N	MW	TB/N (%)	SG (%)	SZ (%)	SD (%)
1	53	0,0566	6	0	67	33
2	294	0,1088	9	0	75	25
3	260	0,1577	12	2	54	44
4	370	0,1189	9	7	55	38
5	202	0,1683	13	6	59	35
6	377	0,1034	6	5	69	26
7	362	0,0773	7	14	61	25
8	412	0,1262	7	21	65	14
9	141	0,1348	9	0	74	26
10	182	0,0824	4	7	67	26
11	279	0,0896	7	12	60	28
12	310	0,0581	4	11	72	17
13	107	0,0748	5	12	63	25
14	156	0,1346	11	14	43	43
15	151	0,2185	15	3	82	15
16	242	0,2190	14	2	70	28
17	299	0,0970	7	10	66	24
18	196	0,0714	7	14	50	36
19	221	0,2036	12	2	69	29
20	206	0,2282	14	4	51	45
21	208	0,2548	17	4	64	32
22	93	0,0538	4	0	60	40
23	796	0,1080	6	11	59	30
24	648	0,0926	6	12	53	35
25	381	0,1391	10	7	70	23

Abkürzungen: **PNr** (Patientennummer), **N** (Gesamtzahl der Tubuli), **TB** (% Anteil von Keimtubuli mit apoptotischen Keimzellen), **MW** (Mittelwert der apoptotischen Keimzellen pro Tubulusquerschnitt), **SG** (% Anteil der Spermatogonien), **SZ** (% Anteil der apoptotischen Spermatozyten), **SD** (% Anteil der Spermatischen).

a)



b)



c)

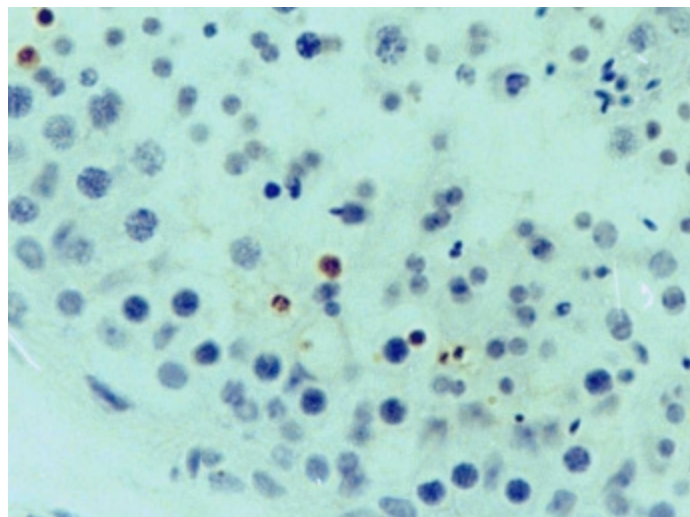
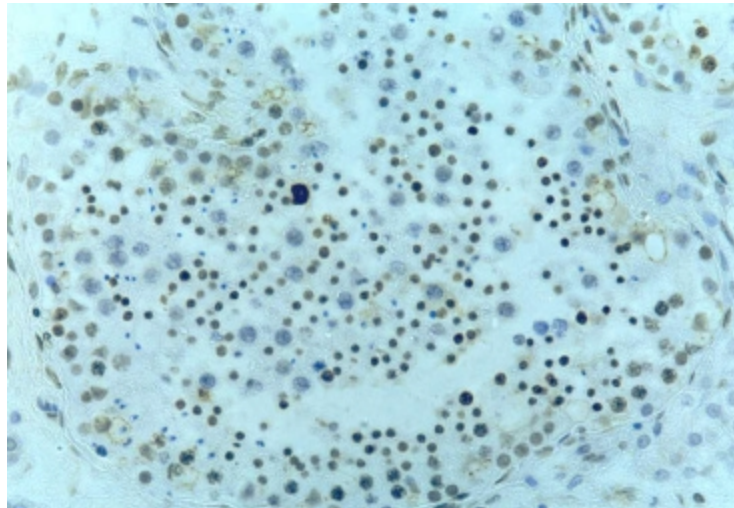


Abbildung 5: Apoptosenachweis im Keimepithel mit normaler Spermatogenese:
a) Spermatogonien (Vergrößerung x250);
b) primäre Spermatozyten (Vergrößerung x300);
c) runde Spermatiden (Vergrößerung x200).

a)



b)

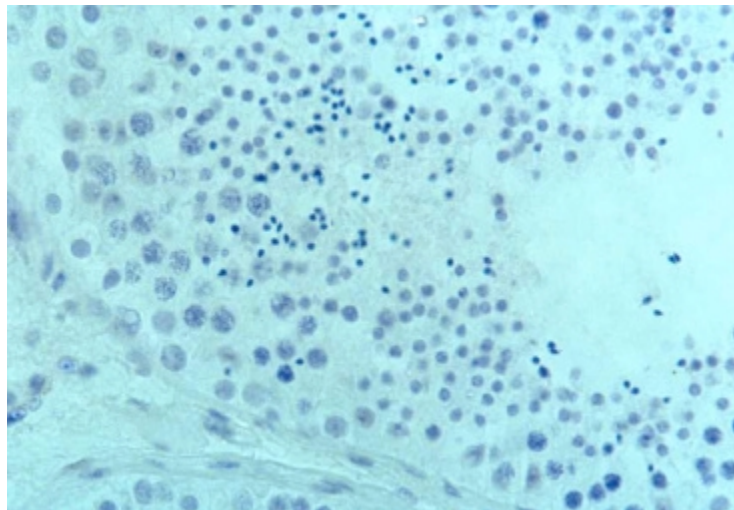


Abbildung 6: Kontrollen für den TUNEL-Test:
a) Positivkontrolle: Dnase behandeltes Gewebeschnitt (Vergrößerung x75);
b) Negativkontrolle: TUNEL-Reaktion ohne terminale Transferase (Vergrößerung x100).

3.1.2. Apoptoseregulatoren im Keimepithel

3.1.2.1. Fas-Rezeptor/Ligand-Expression im Hoden

3.1.2.1.1. Fas-Rezeptor

Mit spezifischen Primern wurde im Hodengewebe mit normaler Spermatogenese ein 819 bp großes RT-PCR-Produkt für den Fas-Rezeptor nachgewiesen (Abb. 7). Das cDNA-Produkt wurde mittels einer Restriktionsanalyse auf seine Identität überprüft. Das Restriktionsenzym *DdoI* schneidet die Fas-Rezeptor-cDNA an drei Stellen, wobei vier DNA-Fragmente von 388 bp, 199 bp, 139 bp und 95 bp entstehen (Abb. 7).

Der Antikörper gegen den Fas-Rezeptor zeigte in den untersuchten Hodenhomogenaten bei Westernblotanalyse keine Immunreaktion. In den Proteinproben aus den Jurkat-Zellen (Positivkontrolle) war eine 45kD große immunreaktive Bande nachweisbar (Abb. 8a). In der Immunhistochemie wies der monoklonale Antikörper gegen den Fas-Rezeptor keine positive Markierung auf (Abb. 8c). In Gewebeschnitten aus der Tonsille (Positivkontrolle) waren hingegen einzelne Makrophagen und Plasmazellen positiv markiert (Abb. 8b).

3.1.2.1.2. Fas-Ligand

Dem Fas-Liganden entsprach ein cDNA-Produkt von 344 bp (Abb. 9), das im Hoden nachgewiesen wurde. Das cDNA-Produkt wurde mittels einer Restriktionsanalyse auf seine Identität überprüft. Das Restriktionsenzym *DdoI* erkennt in der Fas-Ligand-cDNA zwei Schnittstellen bei 142 bp und 334 bp, wodurch beim Verdau 3 Fragmente von der Größe 192 bp, 144 bp und 10 bp entstehen (Abb. 9).

Die Westernblotanalyse mit dem monoklonalen Antikörper gegen den Fas-Liganden ergab in den Hodenhomogenaten und in den Jurkat-Zellen (Positivkontrolle) eine immunreaktive Bande bei 37 kD (Abb. 10a). In der Immunhistochemie wurde der Fas-Ligand in den Sertolizellen nachgewiesen (Abb. 10b). In der Tonsille (Positivkontrolle), waren einzelne Plasmazellen und Makrophagen ebenfalls positiv markiert (Abb. 10c).

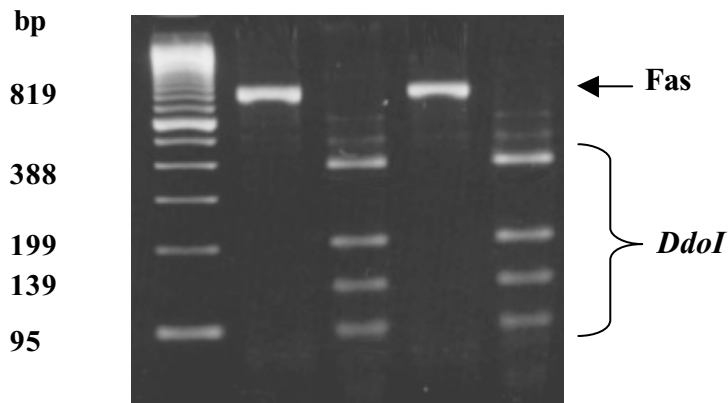


Abbildung 7: Nachweis des 819 bp großen Fas-mRNA-Produktes in Hoden mit normaler Spermatogenese. Das Ergebnis der Restriktionsanalyse des Fas-cDNA-Produktes mit dem Enzym *DdoI*, wobei 388, 199, 139 und 95 bp große DNA-Fragmente entstehen.

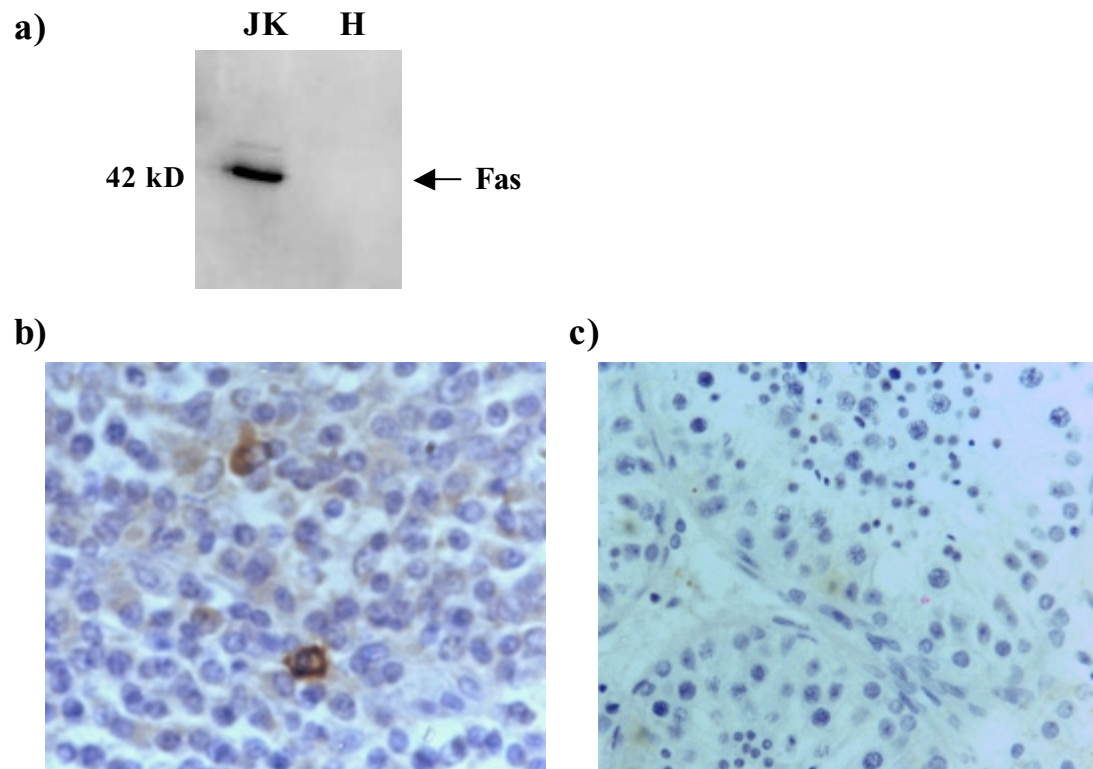


Abbildung 8: Nachweis des Fas-Proteins:
 a) Westernblot in Homogenaten von Hoden (H) und Jurkatt-Zellen (JK). Nachweis einer 42 kD großen Immunobande in Jurkatt-Zellen. Keine nachweisbaren Banden im Hodenhomogenat (H);
 b) Immunhistochemie: Markierung einzelner Makrophagen in der Tonsille (Vergrößerung x200);
 c) Im Hodengewebe ist keine Markeirung nachweisbar (Vergrößerung x100).

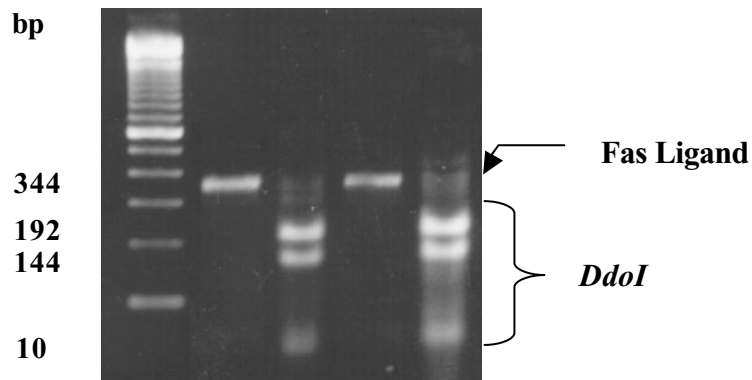


Abbildung 9: Nachweis eines 344 bp großen Fas-Ligand-cDNA-Produktes im Hoden mit normaler Spermatogenese. Nachweis von 192 bp, 144 bp und 10 bp großen DNA-Fragmenten bei der Restriktionsanalyse des Fas-Ligand-cDNA-Produktes mit dem Enzym *DdoI*.

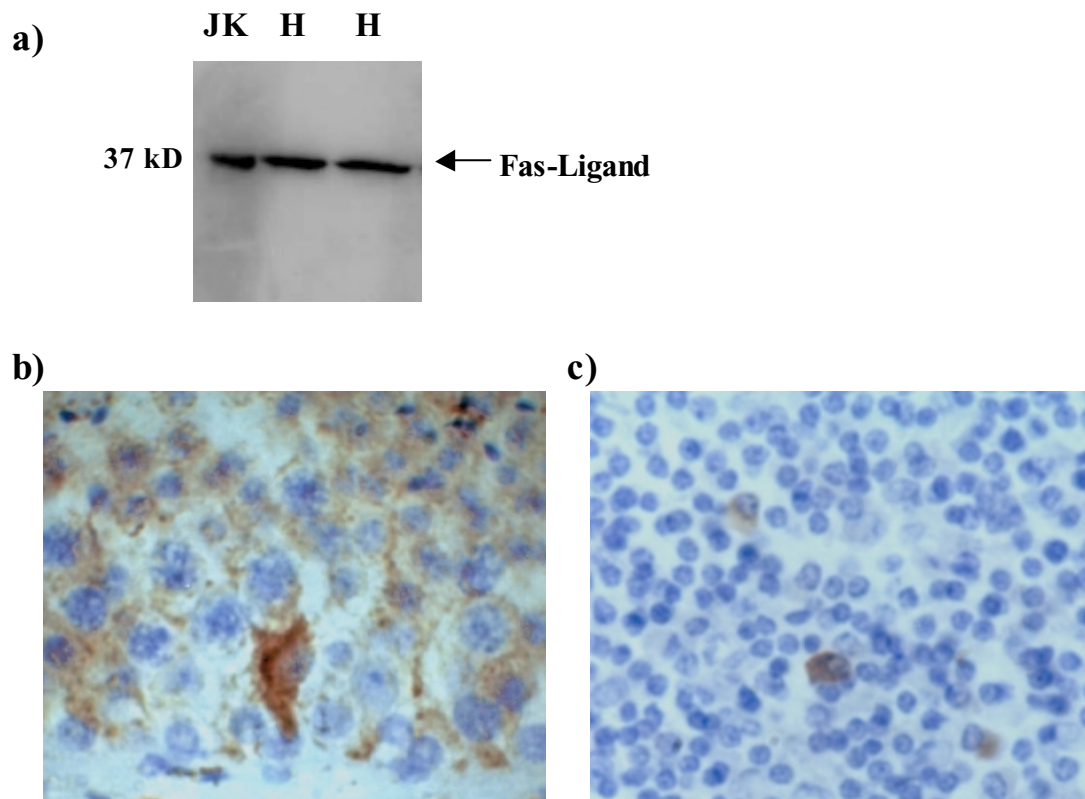


Abbildung 10: Nachweis des Fas-Ligand-Proteins:
 a) Westernblot in Homogenaten von Hoden (H) und Jurkatt-Zellen (JK). Nachweis einer 37 kD großen immunreaktiven Bande bei Jurkatt-Zellen und im Hodenhomogenat;
 b) Immunhistochemischer Nachweis: Markierung einer Sertolizelle im Keimepithel (Vergrößerung x300);
 c) Immunhistochemie: Markierung einzelner Makrophagen in der Tonsille (Vergrößerung x200).

3.1.2.2. p53

Bei der Westernblotanalyse konnte im normalen Hodenhomogenat eine immunreaktive Bande bei 53 kD nachgewiesen werden (Abb.11a). Mit den gleichen Antikörpern wurde auf dem Gewebeschnitt immunhistochemisch das p53-Protein nachgewiesen. Eine positive Markierung wiesen nur einzelne Spermato gonien auf (Abb. 11b).

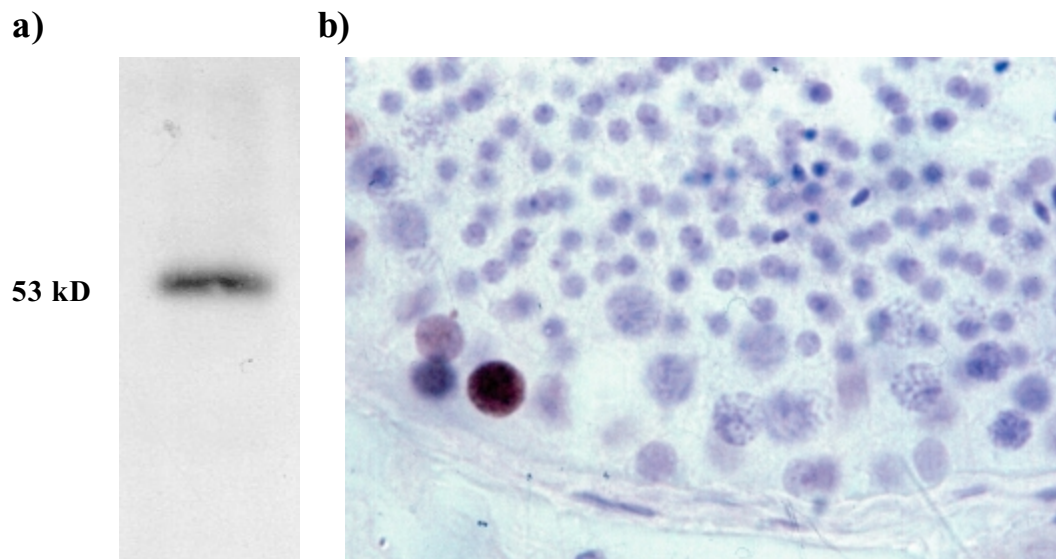


Abbildung 11: Nachweis des p53-Proteins im Hoden:
a) Westernblotanalyse: Nachweis einer 53 kD großen immunreaktiven Bande im Proteinhomogenat von Hoden;
b) Immunhistochemischer Nachweis: Positive Markierung einzelner Spermato gonien im Keimepithel (Vergrößerung x250).

3.1.2.3. bcl-2

Das Hodengewebe wurde auf bcl-2-Protein-Expression mittels Westernblotanalyse und Immunhistochemie untersucht. Eine immunreaktive Bande bei 26 kD konnte in den Gewebehomogenaten nachgewiesen werden (Abb. 12a).

Die immunhistochemische Färbung der Gewebeschnitte ergab, daß bcl-2 nur lymphozytäre Infiltrate eine Immunreaktion zeigten (Abb. 12b). Das Keimepithel wies keine Markierung auf.

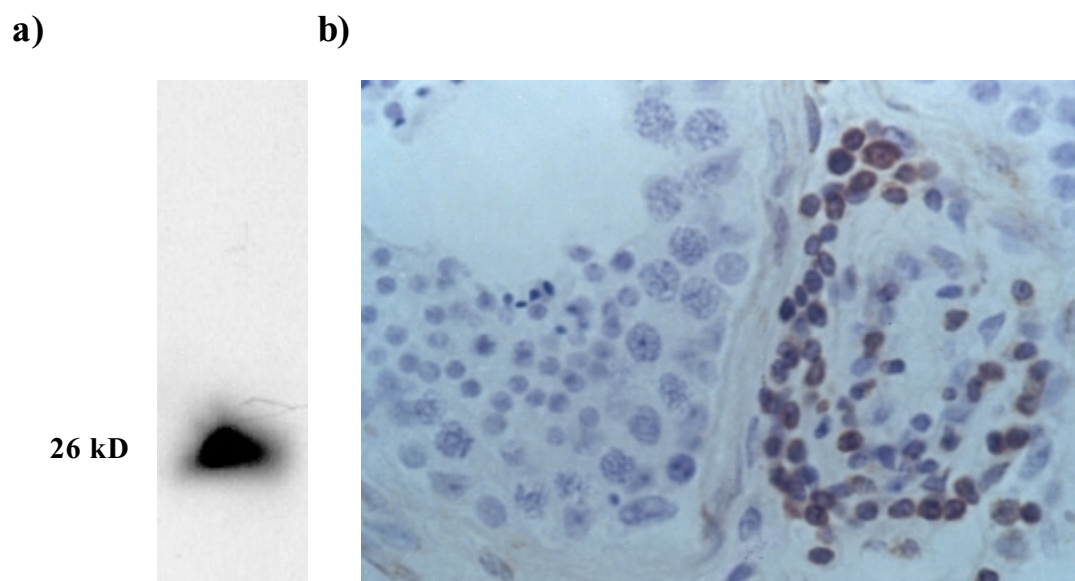


Abbildung 12: Nachweis des bcl-2-Proteins im Hoden:
a) Westernblotanalyse: Nachweis einer 26 kD großen Bande im Hodenhomogenat;
b) Immunhistochemischer Nachweis: bcl-2-Markierung ausschließlich in lymphozytären Infiltraten (Vergrößerung x200).

3.2. Apoptosehäufigkeit und deren Regulation in Hodentumoren

3.2.1. Apoptose

Die CIS-Zellen wurden mit Hilfe der plazentalen alkalischen Phosphatase (PLAP) identifiziert (Abb. 14a).

In Hodenbiopsien, die CIS-Zellen enthielten, wurde von insgesamt 1166 Tubuli in ca. 12% eine positive TUNEL-Markierung nachgewiesen (Tab. 6; Abb. 14b). In diesen Gewebeproben waren etwa $3,3\% \pm 3,4\%$ ($n=12$) aller CIS-Zellen apoptotisch (Tab. 6; Abb. 13; Abb. 14b).

In den untersuchten 10 Seminomen wiesen etwa $1,2\% \pm 0,5\%$ ($n=10$) der Tumorzellen eine positive Apoptosemarkierung auf (Tab. 7; Abb. 13; Abb. 15).

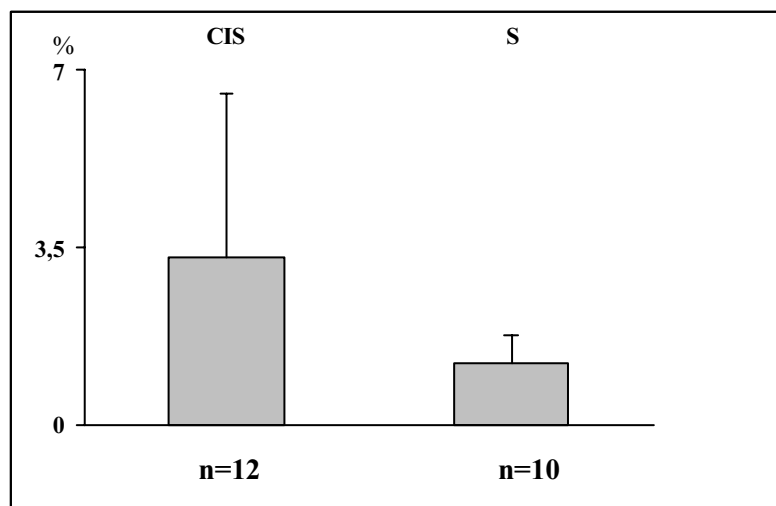


Abbildung 13: Apoptose in präinvasiven CIS und in den Tumorzellen in soliden Seminomen. CIS- Carcinoma in situ, S-Seminom.

Tabelle 6: Apoptosevorkommen in präinvasiven CIS-Zellen.

Probe	Z. Tubuli	Apop. Tubuli	Z. CIS	Apop. CIS	Apop. CIS (%)
1	92	6	346	9	2,60
2	59	8	146	4	2,74
3	40	0	74	0	0,00
4	24	0	58	0	0,00
5	213	26	345	15	4,34
6	126	30	157	14	8,92
7	21	1	54	1	1,85
8	6	0	81	0	0,00
9	256	16	1257	9	0,72
10	152	36	78	7	8,97
11	79	18	265	16	6,04
12	98	0	39	0	0,00

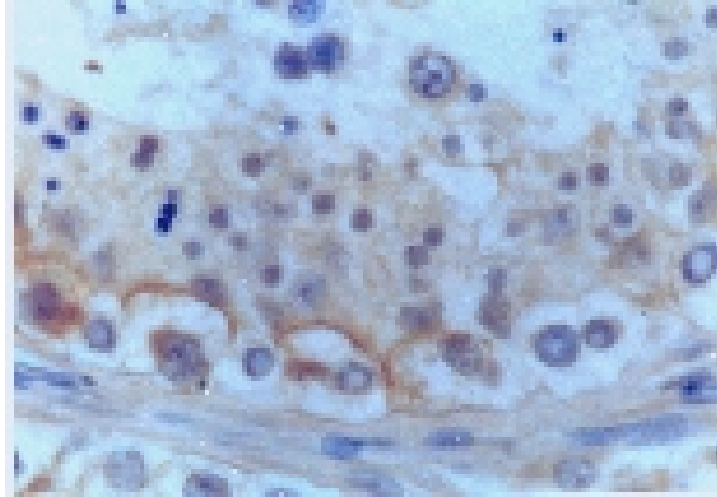
Abkürzungen: **Z. Tubuli** (Gesamtzahl der Keimtubuli mit CIS-Zellen), **Apop. Tubuli** (Zahl der Apoptose-positiven Tubuli auf dem Schnitt), **Z. CIS** (Gesamtzahl der CIS-Zellen auf dem Schnitt), **Apop. CIS** (Zahl der Apoptose-positiven CIS-Zellen), **Apop. CIS (%)** (Anteil der positiven CIS-Zellen).

Tabelle 7: Apoptosevorkommen in Tumorzellen in soliden Seminomen.

Probe	Apop. TZ	TZ	Apop. TZ (%)
1	6	476	1,26
2	3	326	0,92
3	4	261	1,53
4	3	615	0,49
5	6	504	1,19
6	5	624	0,80
7	6	295	2,03
8	4	354	1,13
9	8	367	2,18
10	3	457	0,66

Abkürzungen: **TZ** (Gesamtzahl der Tumorzellen auf dem Schnitt), **Apop. TZ** (Zahl der Apoptose-positiven Tumorzellen), **Apop. TZ (%)** (Anteil der positiven Tumorzellen).

a)



b)

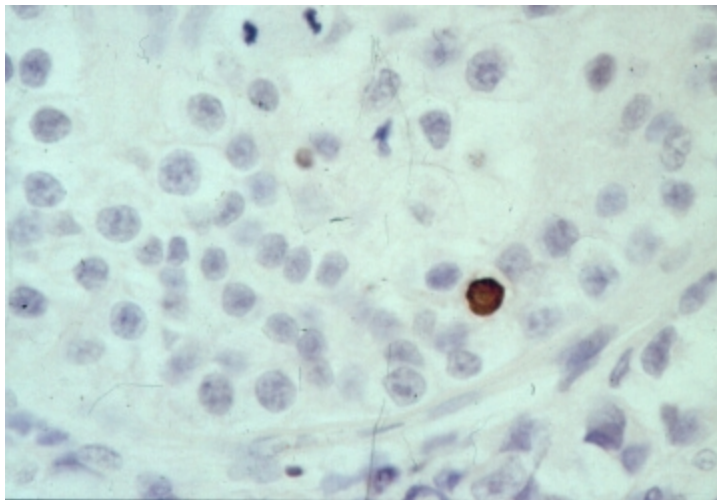


Abbildung 14: Carcinoma in situ (CIS):
a) Nachweis der CIS-Zellen durch Markierung mit der plazentalen alkalischen Phosphatase (Vergrößerung x250);
b) Apoptosenachweis in präinvasiven CIS-Zellen. (Vergrößerung x250).

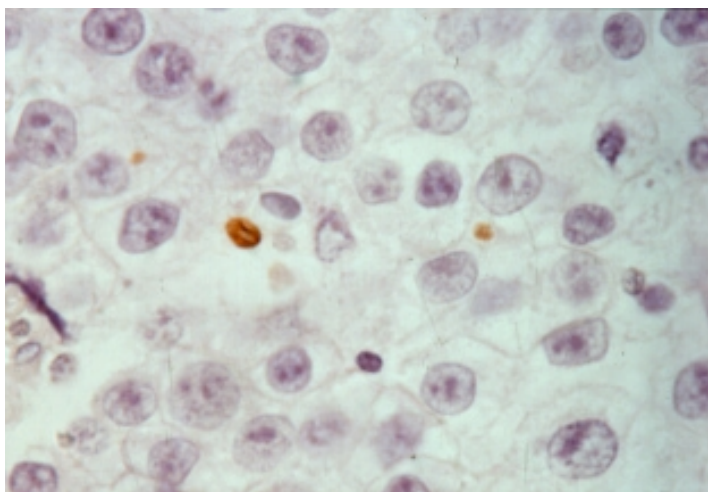


Abbildung 15: Apoptosenachweis im soliden Seminom (Vergrößerung x250).

3.3. Apoptoseregulatoren in Hodentumoren

3.3.1. p53

Die Tumorzellen in soliden Seminomen und die CIS-Zellen zeigten eine Überexpression des p53-Proteins (Abb. 17a-c). Der Durchschnitt der p53-positiven CIS-Zellen lag bei $15,5\% \pm 11,1\%$ ($n=12$) und der Tumorzellen bei $7,5\% \pm 3,9\%$ ($n=10$). Die Ergebnisse sind in den Tabellen 8 und 9 sowie in der Abbildung 16 dargestellt.

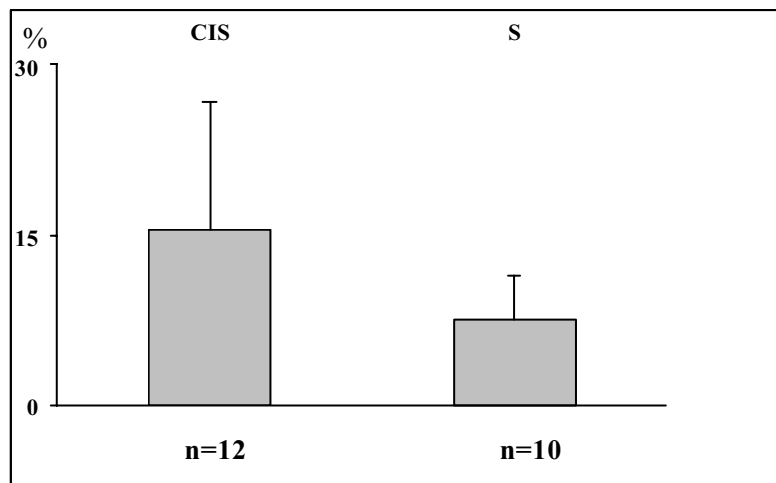


Abbildung 6: p53-Expression in präinvasiven CIS-Zellen und invasiven Tumorzellen in soliden Seminomen. **CIS-** Carcinoma in situ, **S-**Seminom.

Tabelle 8: p53-Expression in präinvasiven CIS-Zellen.

Probe	Z. CIS	p53 pos.	p53 pos. (%)
1	177	46	25,99
2	73	3	4,11
3	1619	320	19,77
4	750	125	16,67
5	242	12	4,96
6	31	4	12,90
7	321	87	27,10
8	469	71	15,14
9	539	33	6,12
10	238	44	18,49
11	361	153	42,38
12	119	10	8,40

Abkürzungen: **Z. CIS** (Gesamtzahl der CIS-Zellen auf dem Schnitt), **p53 pos.** (Zahl der p53-positiven CIS-Zellen), **p53 pos. (%)** (Anteil der p53-positiven Zellen).

Tabelle 9: p53-Expression in Tumorzellen in soliden Seminomen.

Probe	TZ	p53 pos.	p53 pos. (%)
1	344	12	3,49
2	582	50	8,59
3	607	29	4,78
4	469	71	15,14
5	882	106	12,02
6	857	49	5,72
7	238	21	8,82
8	512	25	4,88
9	298	13	4,36
10	387	16	4,10

Abkürzungen: **TZ** (Gesamtzahl der Tumorzellen auf dem Schnitt), **p53 pos.** (Zahl der p53-positiven Tumorzellen), **p53 pos. (%)** (Anteil der p53-positiven Zellen).

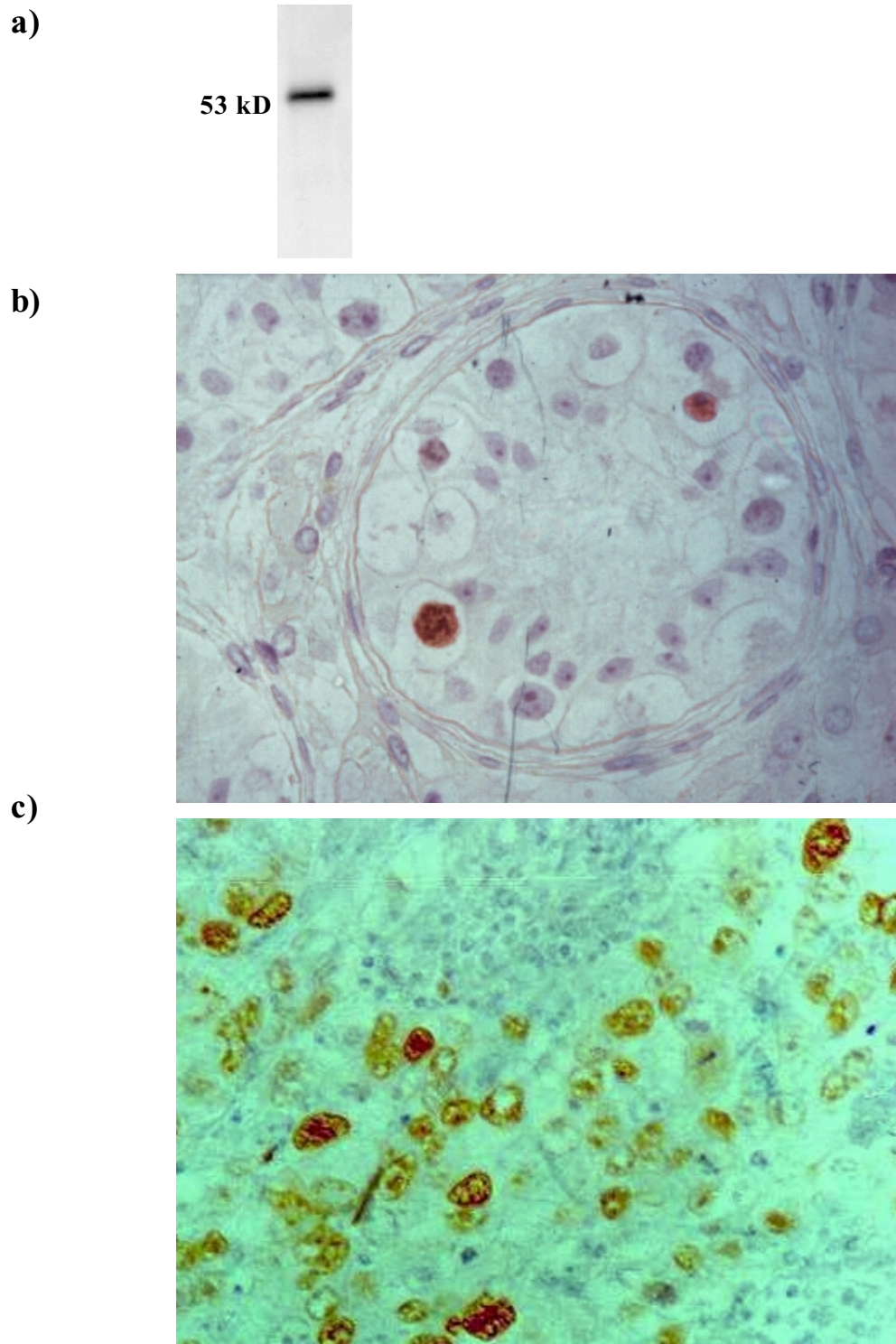


Abbildung 17: Nachweis des p53-Proteins in präinvasiven CIS und invasiven Tumorzellen:
a) Westernblotanalyse: Nachweis einer p53 immunreaktiven Bande im Proteinhomogenat eines soliden Seminoms;
b) Immunhistochemie: p53-Markierung in präinvasiven CIS-Zellen (Vergrößerung x200);
c) p53-Markierung in Tumorzellen (Vergrößerung x200).

3.3.2. bcl-2

Die Proteinhomogenate von Hodentumoren wiesen eine Immunbande bei 26 kD auf (Abb. 18a). Die nachfolgende immunhistochemische Untersuchung zeigte eine positive bcl-2-Markierung ausschließlich in lymphozytären Infiltraten in den Gewebeschnitten (Abb. 18b). Die Tumorzellen und die CIS-Zellen wiesen keine Immunreaktion auf bcl-2-Antikörper auf.

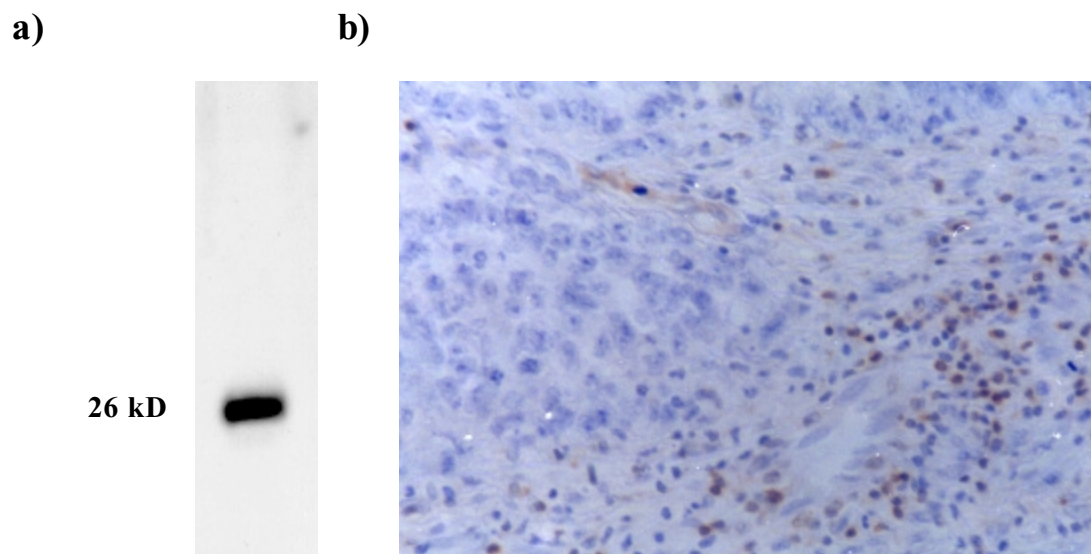


Abbildung 18: Nachweis des bcl-2-Proteins im soliden Seminom:
a) Westernblotanalyse: Nachweis einer 26 kD großen immunreaktiven Bande im Proteinhomogenat;
b) Immunhistochemie: positive bcl-2-Markierung in lymphozytären Infiltraten (Vergrößerung x100).

4. Diskussion

4.1. Apoptose in der Spermatogenese beim Mann

4.1.1. Apoptoserate und Verteilung im normalen Keimepithel

In der vorliegenden Arbeit wurden im menschlichen Hoden mit intakter Spermatogenese (Score: 8-10) in ca. 8,8% der Keimtubuli apoptotische Zellen nachgewiesen. Mit einem Anteil von ca. 63% hatten die Spermatozyten die häufigste Apoptoserate. Ca. 30% der apoptotischen Zellen machten die Spermatiden und ca. 7% die Spermatogonien aus. Aus der Literatur kann man derzeit keine vergleichbaren Zahlen entnehmen, die die Häufigkeit und das Verteilungsmuster der Apoptose in der Spermatogenese im adulten menschlichen Hoden beschreiben. Jedoch deuten die Untersuchungen an Tiermodellen darauf hin, daß das Verhältnis der apoptotischen Zellen in verschiedenen Stadien der Spermatogenese ein charakteristisches Merkmal für das ontogenetische Entwicklungsstadium der jeweiligen Spezies sowie einen empfindlichen Indikator für die Veränderungen der parakrinen und endokrinen Faktoren und für die toxischen Umwelteinflüsse darstellt. So z.B. nimmt die Apoptosehäufigkeit bei den Spermatogonien vom präpuberalen zum adulten Hoden drastisch ab und spielt in letzterem zahlenmäßig im Vergleich zu den Spermatiden und Spermatozyten eine untergeordnete Rolle (Ohta et al. 1996, Mori et al. 1997). Der Mangel an für die Spermatogenese wichtigen parakrinen und endokrinen Faktoren wirkt auf die Apoptosehäufigkeit und auf das Verteilungsmuster im Keimepithel in einer stadienspezifischen Art und Weise. Der Entzug von Gonadotropinen LH und FSH, wie die Untersuchungen an Maus- und Rattenhoden zeigen, verursacht selektiv vorwiegend bei Spermatozyten und Spermatiden einen Anstieg der Apoptoserate (Marathe et al. 1996, Billig et al. 1995). Die Hemmung des Testosterons durch den Einsatz eines Leydigzell-Toxins Ethan-Dimethan-Sulfonat (EDS) verursacht bei Spermatozyten und Spermatiden ebenfalls eine Erhöhung der Apoptoserate (Henriksen et al. 1995 b).

Das Verteilungsmuster der Apoptose im Keimepithel weist weiterhin eine Abhängigkeit der Apoptose von den Eigenschaften der auslösenden Außenfaktoren auf. Eine radioaktive Strahlung spricht vorwiegend B-Spermatogonien und

Spermatozyten an, wogegen ein Hitzestress zum größten Teil bei Spermatiden und teilweise bei Spermatozyten die Apoptose auslöst (Henriksen et al. 1995 a, Yin et al. 1997).

Die Untersuchungen an Tiermodellen deuten darauf hin, daß die Apoptosehäufigkeit und das Verteilungsmuster ein empfindliches Gleichgewicht der Spermatogenesebeeinflussenden Faktoren widerspiegelt. Weitere differenziertere Untersuchungen bezüglich der genauen Zusammenhänge zwischen der Keimzellapoptose und den oben genannten Faktoren sind für das Verständnis der molekularen Regulationsmechanismen der Apoptose in der Spermatogenese notwendig.

4.1.2. Bedeutung der Apoptose in der Spermatogenese

4.1.2.1. Schutz vor defekten Keimzellen

Eine wesentliche Bedeutung der Apoptose in der Spermatogenese besteht darin, daß sie ein wichtiger Bestandteil im Selektionsapparat der gesunden Keimzellen durch die Eliminierung von fehlerhaften Mitose- bzw. Meiose-Produkten darstellt. In den einzelnen Entwicklungsstadien durchlaufen die Keimzellen aufeinander folgende Prozesse der Differenzierung und der Proliferation und weisen dabei morphologisch und funktionell stadienspezifische Unterschiede auf. Über Auslösemechanismen, die in den einzelnen Spermatogenesestadien eine apoptotische Reaktion hervorrufen, ist wenig bekannt. Es stellt sich dabei die Frage nach potentiellen apoptoseauslösenden "Sensoren", die für die einzelnen Differenzierungsstadien der Keimzellen spezifisch sein müssen. Die bisherigen Untersuchungsergebnisse an Tiermodellen gewähren jedoch diesbezüglich nur einen hypothetischen Einblick.

In der vorliegenden Studie wurden die meisten apoptotischen Zellen (ca. 63%) bei den Spermatozyten gefunden. In dieser Phase der Spermatogenese kommen die in der Meiose auftretenden "Paarungs-Sensoren" (meiotic pairing sites) als mögliche apoptoseauslösende "Sensoren" in Frage. Diese auf den Chromosomen auftretenden Sensoren sind für die Kontrolle der korrekten Paarung der homologen Chromosome zuständig. Das Ausbleiben der homologen Paarung an diesen "Paarungssensoren" führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einem Keimzelltod, welcher zu einem kompletten Spermatozytenarrest in der Metaphase führen kann. Schon 1974 von Miklos beschrieben, konnte später diese Tatsache experimentell in einer Studie an der Maus von Burgoyne et al. (1992) bestätigt werden. Durch die Zufügung der

homologen Paarungspartner an die "Paarungssensoren", die auf dem X-Chromosom lokalisiert sind, konnte der Spermatozytenarrest bei den $XSxr^2/O$ -Mäusen überbrückt werden. In einer weiteren Studie von Everett et al. (1996) wurde eine signifikante Korrelation der Häufigkeit der fehlerhaften Paarung während des Pachytäns sowie der Nondisjunction in der Anaphase mit spontanem Zelltod nachgewiesen. Hinsichtlich der molekularen Signaltransduktionswege, die von Chromosomenpaarungsstellen zur Keimzellapoptose führen, liegen jedoch keine genaueren Erkenntnisse vor.

Mit ca. 30% der apoptotischen Zellen stellen die Spermatiden in dieser Arbeit die zweitgrößte Gruppe dar. Die Spermiogenese unterliegt wie die Meiose einem genauen Kontrollmechanismus, in dem die Apoptoseinduzierung einen wichtigen Stellenwert einnimmt.

Die Spermiogenese ist ein komplexer Differenzierungsprozeß, in dem die Kondensierung der DNA ein zentrales Ereignis darstellt. Der Ausfall von Genprodukten, die in der Spermiogenese involviert sind, führt häufig zu einer verstärkten Apoptose im Keimepithel und zu einem Arrest der Spermatogenese, wie an CREM-mutanten (Cyclic AMP-Responsive Element Modulator) Mäusen demonstriert wurde (Nantel et al. 1996). Dieses Protein tritt im adulten Hoden in frühen runden Spermatiden auf und ist unter anderem für die Aktivierung der Protamine und der Transitionsproteine verantwortlich. Ein Defizit an CREM-Protein ist mit einer zehnfachen Erhöhung der Apoptoserate im Keimepithel assoziiert (Nantel et al. 1996). Weiterhin hat sich in der Spermiogenese eine genaue Abfolge der einzelnen Differenzierungsschritte als entscheidend erwiesen, wie der zeitlich genau geregelte Prozeß des Austausches der Histone durch Protamine im Chromatin zeigt (Lee et al. 1995). Eine vorzeitige Translation der Protamine führt zu einer vorzeitigen Kondensation der Spermatiden und zum Arrest der Spermatogenese in dieser Phase.

Die oben aufgeführten Studien belegen eine enge Assoziation zwischen den „Checkpoints“ während der einzelnen Spermatogenesestadien und der Apoptose. Über die molekularen Signaltransduktionswege, die diese Prozesse verbinden, ist wenig bekannt. Deshalb stellen sie einen wichtigen Untersuchungsschwerpunkt dar, dessen Ergebnis zum besseren Verständnis der Apoptoseregulation während der Spermatogenese beitragen würde.

4.1.2.2. Apoptose in der Aufrechterhaltung der Zellzahlhomöostase

Ein weiterer Aspekt, der in Verbindung mit der Apoptose betrachtet werden muß, ist ihre Bedeutung hinsichtlich der Aufrechterhaltung der Zellzahlhomöostase im männlichen Keimepithel. In dieser Studie wurden die meisten apoptotischen Zellen im adulten menschlichen Hoden bei den Spermatozyten (ca. 63% der apoptotischen Keimzellen) und den Spermatiden (ca. 30%) nachgewiesen. Dies ist ein Hinweis dafür, daß die Apoptose einen wesentlichen Beitrag zur Zellzahlhomöostase durch Eliminierung von Spermatozyten und Spermatiden leistet. In diesem Zusammenhang könnte den Sertolizellen eine wichtige Rolle in der Regulation der Apoptose bei den Spermatozyten und Spermatiden zustehen. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß die Kapazität des männlichen Keimepithels durch die Sertolizellzahl begrenzt ist. Die Sertolizellen können nur eine bestimmte Höchstzahl von Keimzellen versorgen. So besteht eine direkte Abhängigkeit der Menge der leptotänen Spermatozyten, die vom basalen zum adluminalen Kompartiment des Keimepithels passieren, von der Sertolizellzahl (Russel, 1977).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit am menschlichen Hoden und die Untersuchungen an Maus und Ratte weisen darauf hin, daß die Sertolizellen nicht nur passiv in der Regulation der Keimzellzahl als limitierender Faktor, sondern auch aktiv durch Apoptoseinduktion beteiligt sind. Hierzu wird im Kapitel 4.2.1. näher diskutiert.

Es bleibt jedoch nach wie vor fraglich, welchen Stellenwert die Apoptose bei Degenerationserscheinungen einnimmt. Neben der Apoptose werden im Keimepithel auch andere Mechanismen, wie z.B. Nekrose oder Formen des Keimzelltodes, die keine typischen morphologischen Merkmale der Apoptose aufweisen, beschrieben (Hikim et al. 1997, Hasegawa et al. 1997, Harrison et al. 1998). Die Tatsache, daß die Apoptoserate mit den degenerativen Erscheinungen im Keimepithel signifikant korreliert (Lin et al. 1997 a, b), deutet jedoch auf eine indikative Rolle der Apoptose für pathogene Veränderungen im Hoden hin.

4.1.3. Assoziation der Apoptose mit Spermatogenesedefekten

Der Mittelwert der apoptotischen Zellen bezogen auf die Zahl der Keimtubuli lag in der vorliegenden Studie bei ca. 0,127. Die Angaben in der Literatur weisen darauf

hin, daß sich die Höhe der Apoptoserate zunehmend als Indikator für die Effizienz der Spermatogenese erweist. Häufig werden in den Hodenbiopsien mit Spermatogenese-arresten oder Hypospermatogenese eine im Vergleich zu gesunden Hoden erhöhte Anzahl von apoptotischen Keimzellen nachgewiesen. In einer Studie von Lin et al. (1997 b) wurde in den Hodenbiopsien mit Spermatogenese-arresten und Hypospermatogenese im Vergleich zu verschlußazoospermen Hoden mit normaler Spermatogenese eine erhöhte Apoptoserate festgestellt. Die noch nicht publizierten Daten einer in der Arbeitsgruppe durchgeführten Studie belegen, daß die Apoptoserate im Hoden mit Hypospermatogenese (Mittelwert: ca. 0,316) mindestens um das Doppelte höher als bei denen mit normaler Spermatogenese (Mittelwert: ca. 0,127) ist. Ein Vergleich der Zahlen einer Studie von Brinkworth et al. (1997), in der der Großteil der Hodenbiopsien (19 von 20) Spermatogenese-arreste oder eine "bunte Atrophie" aufweisen, mit den Daten aus der vorliegenden Studie deutet ebenfalls auf eine Assoziation der Erhöhung der Apoptoserate mit Spermatogenesedefekten. Die Apoptoserate bei den Keimzellen war in solchen Hodenbiopsien mit Spermatogenese-arresten oder mit einer "bunten Atrophie" (Mittelwert von jeweils ca. 0,565 und ca. 1,03) um das vier bis siebenfache höher als in den Hodenbiopsien mit intakter Spermatogenese (Mittelwert: ca. 0,127), die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

Die oben aufgeführten Ergebnisse weisen auf eine enge Korrelation zwischen den pathogenen Veränderungen, die der männlichen Infertilität zu Grunde liegen, und der Erhöhung der Apoptoserate hin. Der Frage nach potentiellen apoptoseregulierenden Faktoren und ihrer Rolle bei derartigen Veränderungen in Keimzellen in menschlichen Hoden muß noch im Detail nachgegangen werden.

4.1.4. Apoptose-Regulatoren im menschlichen Keimepithel

4.1.4.1. Fas/Fas-Ligand

4.1.4.1.1. Fas-Ligand

Der Fas-Ligand wurde innerhalb des Keimepithels im adulten menschlichen Hoden in den Sertolizellen nachgewiesen. Dieser Befund ist übereinstimmend mit den Untersuchungsergebnissen an Maus- und Rattenhoden, in denen eine gewebespezifische Expression der Fas-Ligand mRNA im Hoden beschrieben wird (Bellgrau et al. 1995, Suda et al. 1995). Der hohe Expressionslevel des Fas-Liganden

in den Hoden wird dabei für die Immuntoleranz des Hodens gegenüber Allo- und Xeno-Transplantaten verantwortlich gemacht (Bellgrau et al. 1995). Das Abschalten der Immunantwort geschieht dabei offenbar durch Eliminierung der reaktiven T-Lymphozyten mittels Apoptoseinduzierung durch den Fas-Liganden (Griffith et al. 1995). Neuere Untersuchungen der menschlichen Keimzellkulturen belegen, daß die Blockierung der Fas-Signaltransduktionskaskade zu einer deutlichen Senkung der Apoptose bei den Keimzellen führt (Pentikainen et al. 1999).

Die Erkenntnisse bezüglich der Expression des Fas-Liganden im Keimepithel ergänzen und bestätigen frühere Arbeiten über die Rolle der Sertolizellen in der Apoptoseinduktion in Keimzellen. Bereits 1996 haben Mizuno und Mitarbeiter an einem Zell-Zell-System von Sertolizellen und Spermatogonien demonstriert, daß die Differenzierung und die Apoptose der Spermatogonien erst in der Anwesenheit von Sertolizellen stattfindet. Die Abnahme der Keimzellzahl in den Kulturen konnte gestoppt werden, indem ein direkter Kontakt der Keimzellen mit Sertolizellen vermieden wurde. Auf gleiche Schlußfolgerung kamen Richburg et al. (1996) bei ihren *in vitro* Untersuchungen am Rattenhoden, bei denen Sertolizellen mit dem Toxin MEHP (Mono-2-Ethylhexyl Phthalat) selektiv eliminiert wurden. Der Zusammenbruch des Sertolizell-Keimzell-Kontaktes führte dabei zu einer Abnahme der Apoptose im Keimepithel. Weiterhin deuten die Studien von Richburg et al. (2000) auf eine Schlüsselfunktion des Fas-Liganden in der Sertolizell-vermittelten Apoptose hin. Transgene Mäuse mit einer defekten Fas/Fas-Ligand-Signaltransduktion wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Zunahme des Hodengewichtes und eine signifikant erhöhte Menge an reifen Spermatozoen auf.

Die Lokalisation des Fas-Liganden in den Sertolizellen weist darauf hin, daß Fas-Ligand bei der sertolizellvermittelten Apoptoseinduktion im Keimepithel eine wichtige Rolle spielen kann, und fügt sich somit plausibel in die morphologischen und funktionellen Eigenschaften der Sertolizellen ein.

4.1.4.1.2. Fas-Rezeptor

Die mRNA-Expression wurde im Hodengewebe mit Hilfe von RT-PCR nachgewiesen. In der vorliegenden Studie konnte jedoch kein Fas-Protein im Hodengewebe nachgewiesen werden. Inwieweit dieses Ergebnis methodische Ursachen hat, läßt sich derzeit nicht abschätzen, da bislang nur wenige und zum Teil

widersprüchliche Angaben hinsichtlich der Antikörperspezifität und Lokalisation des Fas-Antigens im adulten menschlichen Hoden vorliegen. So wurde z.B. in einer Studie von Sugihara et al. (1997) das Fas-Antigen in allen Keimzelltypen sowie in den Sertoli- und Leydig-Zellen gleichermaßen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnten Pentikainen et al. (1999) das Fas-Antigen nur in den Spermatozyten und Spermatiden lokalisieren. Braendstrup et al. (1999) berichten nur von gelegentlicher Expression von Fas in menschlichen Keimtubuli. Aus den Untersuchungen an Tiermodellen liegen ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse zur Lokalisation des Fas-Antigens vor. Während in Untersuchungen von Richburg et al. (1999) an Rattenhoden Fas ausschließlich in Keimzellen detektiert wurde, konnte Woolveridge et al. (1999) Fas-Expression sowohl in Sertolizellen als auch in Spermatiden und Spermatozyten im Rattenhoden nachweisen.

Eine weitere mögliche Ursache dafür, daß kein Fas im menschlichen Hoden nachgewiesen werden konnte, könnten die geringe Menge des Fas-Antigens und der rasche Verlauf der Fas-induzierten Apoptose darstellen. Die Tatsache, daß das Fas-Rezeptor-Transkript nur in geringen Mengen im Hodengewebe vorliegt, wurde auch in früheren Untersuchungen bei der Maus festgestellt (Suda et al. 1995). Dabei konnte eine Fas-Rezeptor-Northernblot Bande ubiquitär in beinahe jedem Gewebe nachgewiesen werden, mit Ausnahme des Hodens, wo die geringste Menge von der Fas-mRNA gefunden wurde (Suda et al. 1995). Ein weiterer Aspekt, der in diesem Zusammenhang berücksichtigt werden muß, ist der rasche Ablauf der Fas-induzierten Apoptose. Der kurze Signaltransduktionsweg von der Ligand-Bindung bis zur Aktivierung der Caspasen gilt zur Zeit als plausible Erklärung für das rapide Fortschreiten der Fas-Ligand-induzierten Apoptose (Nagata, 1996). Unmittelbar nach der FasL-Bindung an Fas kommt es zu einer intrazellulären FADD/Fas-Komplexbildung (Kischkel et al. 1995). Das FADD interagiert im Zytoplasma mit einer Caspase (FLIC), die dadurch oligomerisiert wird. Dies führt zu einer Autokatalyse des Enzyms, die eine Aktivierungskaskade von anderen Proteasen auslöst (Boldin et al. 1996). Die Effektivität der Apoptoseinduzierung durch den Fas-Liganden wird auch dadurch gewährleistet, daß der Vorgang ohne Proteinsyntheseleistungen der Zelle abläuft (Nagata, 1996).

Einige Untersuchungen sprechen wiederum dafür, daß das Fas-System nicht unentbehrlich für die Induktion der Apoptose bei Keimzellen ist. In transgenen Mäusen, die keinen funktionsfähigen Fas bzw. Fas-Liganden haben, war eine

künstliche Induktion von Kryptorchismus mit einer erhöhten Apoptoserate im Keimepithel assoziiert (Ohta et al. 1996). Weiterhin deuten die Untersuchungsergebnisse von Richburg et al. (2000) an transgenen Mäusen darauf hin, daß die Involvierung des Fas-Systems in der Apoptoseregulation bei den Keimzellen von der Art der auslösenden Mechanismen abhängig ist. So war Fas nur in der Apoptoseinduzierung beteiligt, die nicht durch MEHP sondern durch radioaktive Bestrahlung ausgelöst war.

4.1.4.2. p53-Protein

In Hodenbiopsien mit normaler Spermatogenese wurde die Expression des p53-Proteins untersucht. In allen Hodenhomogenaten war eine immunreaktive Bande bei 53 kD nachweisbar. Auf dem histologischen Gewebeschnitt zeigten nur einzelne Spermatogonien eine p53-Immunreaktion.

Die aus den Untersuchungen an Hodentumoren stammenden Hinweise über die Expression des p53-Proteins im normalen menschlichen Hoden geben keinen endgültigen Aufschluß zur Rolle von p53 in der Spermatogenese. Kuczyk et al. (1994) berichteten in tumorfernen Arealen von einer p53-Einzelzellmarkierung in den gesunden Keimtubuli, ohne auf die Differenzierungsstadien der markierten Keimzellen einzugehen. Dagegen haben Bartkova et al. (1991) in Keimtubuli, die das Tumorgewebe angrenzen, keine positive p53-Markierung nachweisen können.

Bisherige Studien an Ratte und Maus zeigen ebenfalls kein einheitliches Bild bezüglich der Expression des p53-Proteins im Hoden. So berichten Sjoblom et al. (1996) über eine massive p53-Expression in den Spermatozyten im Rattenhoden und gleichzeitig über alternative Spliceprodukte in der Westernblot-Analyse. Im Gegensatz dazu wurde in Untersuchungen an normalen und p53-Knockout Mäusen die Expression von p53 selektiv in Spermatogonien nachgewiesen (Beumer et al. 1998). In wieweit es sich bei diesen auseinandergehenden Erkenntnissen um speziespezifische Unterschiede handelt, konnte bis jetzt nicht eindeutig belegt werden.

Die p53-Expressionsanalyse der vorliegenden Studie deutet darauf hin, daß die Ursache für die oben erwähnten Widersprüche anscheinend nicht zuletzt an der geringen Häufigkeit der nachweisbaren Expression in Verbindung mit kurzer Halbwertszeit (ca. 20 min) des p53-Proteins liegt. Dennoch ist trotz der geringen

Expressionsrate für p53 in den Spermatogonien eine funktionelle Aktivität denkbar. Die DNA-schützende Aktivität von p53 setzt keine Proteinakkumulierung bzw. keine erhöhte Expression voraus (Janus et al. 1999 a, b). Die Aussage, daß das nicht aktivierte p53 gleichzeitig funktionelle Aktivität besitzen kann, stützt sich vor allem auf Erkenntnisse über die 3'→5'-Exonukleaseaktivität auf dem C-terminalen Ende des Proteins. Auf dem C-terminalen Ende ist auch die DNA-Bindungsdomäne lokalisiert, so daß nach dem Modell von Janus et al. (1999 b) das p53-Protein zwei funktionelle Aktivitäten aufweist: 1. DNA-Bindungsaktivität nach exogenen DNA-Schäden; 2. 3'→5'- Exonukleaseaktivität im Normalzustand bzw. nach endogenen DNA-Schäden.

Die geringe Häufigkeit und die Lokalisation des p53-Proteins in Spermatogonien korreliert in der vorliegenden Studie nicht mit der Verteilung und Häufigkeit des Apoptosevorkommens im Keimepithel. Das p53-Expressionsmuster in menschlichen Keimtubuli und Hinweise aus den Untersuchungen an Maushoden von Beumer et al. (1998) deuten auf eine Involvierung von p53 in die DNA-Reparaturprozesse bei den Spermatogonien.

4.1.4.3. bcl-2-Protein

Durch Westernblot-Untersuchungen wurde in den Hodenhomogenaten eine immunreaktive Bande bei 26 kD nachgewiesen. Auf dem Gewebeschnitt konnte das Antigen jedoch ausschließlich in den lymphozytären Infiltraten lokalisiert werden. Der Keimtubulus wies in der immunhistochemischen Untersuchung keine Markierung auf. Dieses Ergebnis steht teilweise im Widerspruch zu den meist aus tierexperimentellen Untersuchungen stammenden Erkenntnissen, welche kein einheitliches und eindeutiges Bild über die Expression und die Rolle des bcl-2-Proteins in der Spermatogenese liefern.

Die Studien an transgenen Mäusen belegen eine Beteiligung von bcl-2 in der Apoptose von Spermatogonien, wobei eine bcl-2-Überexpression in den Spermatogonien zu einer Apoptoseblockierung und einer Spermatogonienakkumulierung führt (Furuchi et al. 1996). Eine hohe bcl-2-mRNA-Expression in der Spermatogoniogenese konnte im fetalen und postnatalen Hoden von Hahn erzielt werden, die jedoch mit dem Übergang zum adulten Hoden schwand (Vilagrasa et al. 1997). Untersuchungen an Rattenhoden weisen ebenfalls auf eine intratubuläre bcl-2-

Expression hin (Taylor et al. 1998).

Im menschlichen Hoden wurde über eine Erhöhung des bcl-2-Proteins und Senkung des Apoptoselevels, die durch eine anti-Androgen-Langzeitbehandlung verursacht wurden, berichtet (Woolveridge et al. 1998). Jedoch beruhen diese Aussagen ausschließlich auf Immunoblotanalysen, ohne auf den bcl-2-exprimierenden Zelltyp histologisch einzugehen. In den immunhistochemischen Untersuchungen dieser Studien konnte das bcl-2-Protein ausschließlich in lymphozytären Infiltraten nachgewiesen werden.

Die unterschiedlichen Befunde in Tiermodellen (Furuchi et al. 1996, Vilagrasa et al. 1997) und in der vorliegenden Studie rufen neue Fragen über die Expression von bcl-2, deren Spezifität sowie über die Abhängigkeit der bcl-2-Expression vom ontogenetischen Entwicklungsstadium hervor. In diesem Zusammenhang wäre eine bcl-2-Expressionsanalyse im menschlichen präpuberalen Hoden zur Aufklärung der Rolle des bcl-2-Proteins wichtig.

4.2. Apoptose in Hodentumoren

4.2.1. Apoptose in der Genese der Hodentumore

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Studie bestand in der Feststellung, ob die Apoptose in die Genese der Hodentumore involviert ist. Dafür wurde normales Hodengewebe, sowie Gewebe mit präinvasiven CIS (Carzinoma In-Situ)-Zellen und Tumorzellen aus invasiven Seminomen bezüglich ihrer Apoptoserate verglichen.

Ca. 12% der Hodentubuli mit CIS zeigten mindestens eine apoptotische Zelle. Im Vergleich dazu zeigten ca. 8,8% der Keimtubuli in normalen Gewebeproben eine positive TUNEL-Reaktion. Der Anteil der apoptotischen Zellen betrug bei den präinvasiven CIS-Zellen ca. 3,3% und bei den invasiven Seminomzellen ca. 1,2%. In den Tubuli mit intakter Spermatogenese waren weniger als 1% der Keimzellen apoptotisch.

Die höhere Apoptoserate bei den CIS-Zellen im Vergleich zu Keimzellen ist möglicherweise auf eine erhöhte Fehlerrate bei der DNA-Replikation zurückzuführen. Ein weiterer Aspekt, der in diesem Zusammenhang berücksichtigt werden muß, ist die Tatsache, daß die CIS-Zellen bzw. Tumorzellen generell eine höhere Proliferationsaktivität als die normalen Keimzellen aufweisen und die Apoptose eine homöostatische Antwort darstellt. Dabei hat es sich gezeigt, daß beim

Übergang von präinvasiven CIS-Zellen zu invasiven Tumorzellen keine wesentliche Änderung der Proliferationsaktivität nachweisbar ist (Deschler et al. 1997). Im Unterschied dazu wurde eine Abnahme der Apoptoserate von präinvasiven CIS zu invasiven Seminomen (von ca. 3,3% bei CIS auf ca. 1,2% bei Seminomzellen) beobachtet.

Wie bei *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen an verschiedenen Tumoren gezeigt wurde, trägt die positive Korrelation zwischen dem Anstieg der Proliferationsaktivität und der Erhöhung der Apoptoserate einen gewebespezifischen Charakter. So wurde beim Cholangiokarzinomgewebe im Vergleich zum normalen Gallenblasengewebe eine Erhöhung der Proliferationsaktivität um mehr als 20-fache und der Apoptoserate um nahezu das Vierfache nachgewiesen (Terada et al. 1996). Hingegen wurde in der gleichen Studie bei hepatozellulären Karzinomen, die einen viel geringeren Proliferationsanstieg zeigten (um das Vierfache gegenüber den normalen Hepatozyten), eine Abnahme der Apoptoserate festgestellt.

Ein weiterer Faktor, der zur Steigerung der Apoptoserate bei transformierten Zellen beiträgt, ist eine höhere Fehlerrate bei der DNA-Replikation, so daß die Zellen mit letalen DNA-Schäden durch Apoptose eliminiert werden.

Die Apoptoserate ist bei den transformierten CIS- und Tumorzellen im Vergleich zu intakten Keimzellen erhöht. Jedoch deutet eine Abnahme der Apoptoserate von den präinvasiven CIS-Zellen zu den invasiv wachsenden Tumorzellen darauf hin, daß die Apoptose ein wichtiger Faktor in der Wachstumskinetik der Hodentumore ist. Um die Bedeutung dieses Ergebnisses hinsichtlich der Prävention und Therapie der Keimzelltumore herauszustellen, sind weitere Studien notwendig, die sich mit der Apoptoseinduktion in Tumorzellen befassen.

4.2.2. p53-Protein in Hodentumoren

Im Vergleich zu normalem Hodengewebe ist bei Hodentumoren eine deutliche Erhöhung der p53-Expression nachweisbar. Während weniger als 1% der Spermato gonien eine positive Markierung für p53-Protein aufweisen, zeigten ca. 15,5% der CIS-Zellen und ca. 7,5% der Tumorzellen eine positive Markierung für das p53-Protein. Die erhöhte p53-Expression kann zweierlei interpretiert werden:

1. Abbauverzögerung eines defekten Proteins; 2. Überexpression des Proteins als Antwort auf exogene bzw. endogene DNA-Schädigungen.

Der Funktionsverlust des p53-Proteins ist oft mit einer Akkumulation des Proteins assoziiert (Lane, 1992). Die Inaktivierung des p53-Proteins kann durch Mutationen im Gen, durch virale oder zelleigene Onkoproteine oder posttranslationelle Modifizierungen (z.B. Phosphorylierung) verursacht werden. Dies hat gleichzeitig eine Verlängerung der Halbwertszeit und eine Akkumulation des p53-Proteins zur Folge. Eine derartige Akkumulation von mutiertem p53 ist bekannt aus Untersuchungen an Mammakarzinom, Lungen- und Kolontumoren (Iggo et al. 1990, Rodrigues et al. 1990, Bartek et al. 1991).

Die Untersuchungen von Peng et al. (1993) und von Fleischhacker et al. (1994) zeigen jedoch, daß für einen erhöhten p53-Proteinlevel in Hodentumoren keine Mutationen im kodierenden Abschnitt des Gen verantwortlich sind.

Der Mechanismus, der den erhöhten p53-Proteinlevel in Hodentumoren verursacht, hängt möglicherweise mit gehäuften endogenen DNA-Aberrationen in neoplastischen Zellen zusammen. Als Antwort auf endogene DNA-Schädigungen reagieren Zellen häufig mit einer Überexpression von p53, die entweder Apoptose oder G1-Arrest von Zellen zur Folge hat (Janus et al. 1999 a, b). Dafür spricht die Tatsache, daß in der vorliegenden Studie zur gleichen Zeit CIS- und Tumor-Zellen im Vergleich zu Keimzellen eine vielfach erhöhte Apoptoserate aufwiesen.

Ein weiterer Aspekt, der im Zusammenhang mit der p53-Überexpression berücksichtigt werden muß, ist die Funktionalität des p53-Proteins. Eine p53-Überexpression weist unterschiedliche Aktivitäten auf, die entweder G1-Arrest (DNA-Reparatur) oder Apoptose auslösen. Welche von beiden Funktionen inaktiv bzw. aktiv ist, hängt in erster Linie von den einzelnen Tumorzelllinien und von der Natur der DNA-Schädigung ab. So löst z.B. eine durch radioaktive Bestrahlung induzierte p53-Überexpression bei normalen menschlichen Fibroblasten den G1-Arrest und bei Thymozyten Apoptose aus (Lowe et al. 1993, Clarke et al. 1993, Di Leonardo et al. 1994). Die Hodentumorzelllinien GH, GCT27 und 833K reagieren auf eine chemotherapeutische Etoposid-Behandlung mit einer p53-Überexpression, die eine Erhöhung der Apoptoserate und keinen G1-Arrest zur Folge hat (Chresta et al. 1996). Im Gegensatz dazu weist die Keimzelltumorzelllinie SuSa bei gleichem Versuchsansatz häufiger einen G1-Arrest und eine niedrigere Apoptoserate auf (Koberle et al. 1997). Die Tatsache, daß eine intakte DNA-Reparaturfähigkeit von p53 bei den Tumorzellen mit einer geringeren und eine defekte mit einer höheren Apoptoserate assoziiert ist, hat eine wichtige Bedeutung für die Ansprechbarkeit der

Tumorzellen auf Chemotherapeutika. Die Hodentumore zeichnen sich durch eine hohe Kurabilität bei Einsatz von Chemotherapeutika aus. Die Tatsache, daß in der vorliegenden Studie eine p53-Überexpression mit dem Anstieg der Apoptoserate assoziiert war, deutet darauf hin, daß in den Hodentumoren Apoptose durch p53 reguliert wird. Ein weiterer Aspekt, der bei den Hodentumoren berücksichtigt werden muß, ist die Existenz eines alternativen Apoptoseauslösemechanismus zur p53-induzierten Apoptose. So zeigten einige Hodentumorzelllinien, die kein p53-Protein exprimieren können (Zelllinie S2) oder ein mutiertes p53-Gen (NCCIT) besitzen, bei einer Cisplatinbehandlung eine vierfach höhere Apoptoserate als Zelllinien mit intaktem p53-Gen (NT2, 2102EP) (Burger et al. 1997). Weiterhin ungeklärt ist die Rolle der zelleigenen und viralen Onkoproteine bei der p53-Akkumulierung. Hierbei bedarf es weiterer Studien.

4.2.3. bcl-2-Protein in Hodentumoren

Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen der Apoptose in den Tumorzellen und der Expression des bcl-2-Proteins festgestellt werden. Das bcl-2-Protein war nur in lymphozytären Infiltraten nachweisbar. Die Tumorzellen waren für den bcl-2-Antikörper negativ.

Viele Tumorarten profitieren von der immortalisierenden Wirkung einer Überexpression des bcl-2-Proteins, wie erstmals im zentroblastisch-zentrozytischen Lymphom nachgewiesen werden konnte (Tsujimoto et al. 1985). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sprechen jedoch für einen gewebespezifischen Charakter bei Beteiligung von bcl-2 in den Tumorgenese Prozessen und stimmen mit den Untersuchungen an Hodentumorzelllinien überein, in denen ebenfalls kein Zusammenhang zwischen einer Tumorprogression und der bcl-2-Expression nachgewiesen wurde (Burger et al. 1997). Die Bedeutung dieser Befunde wird deutlicher, wenn man die Wirkungsweise des bcl-2-Proteins auf das Zellwachstum und die Proliferation näher betrachtet. Einerseits kann das bcl-2-Protein die Tumorzellen immortalisieren und dadurch den natürlichen Zelltod verhindern, andererseits kann bcl-2 einer bereits induzierten Apoptose in der Zelle entgegenwirken. Normalerweise führt eine Behandlung der menschlichen Lymphomzelllinien (CEM-C7-H2) und T-Zell-Hybridoma-Zellen (2B4.11) mit Ceramiden (second Messenger-Proteinen) zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen

Transmembranpotentials, der ein frühes Ereignis der Apoptose darstellt. Eine durch Transfektion verursachte Überexpression des bcl-2-Proteins wirkte gegen diesen Effekt von Ceramiden und verhinderte das Fortschreiten der Apoptose (Decaudin et al. 1997).

Die Fähigkeit des bcl-2-Proteins, der Apoptose entgegenzuwirken, ist für die Resistenz vieler Tumore gegen Chemo- und Strahlentherapie verantwortlich (Volm and Mattern, 1995). Die Tatsache, daß in Hodentumoren kein bcl-2 exprimiert wird, stellt möglicherweise eine begünstigende Voraussetzung für die hohe Kurabilität der Hodentumore gegenüber Chemotherapeutika dar (Gerl, 1996).

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Verteilungsmuster apoptotischer Keimzellen sowie die Expression der apoptoseassoziierten Proteine Fas/Fas-Ligand, p53 und bcl-2, in der Spermatogenese und in der Genese der Hodentumore beim Menschen näher zu untersuchen, um die Rolle der Apoptose in diesen Prozessen aufzuzeigen.

In der vorliegenden Studie wurde in etwa 8,8% der untersuchten Keimtubuli apoptotische Keimzellen nachgewiesen. Die Keimzellen im menschlichen Hoden wiesen hinsichtlich des Apoptosevorkommens eine Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium auf. Den größten Anteil der apoptotischen Zellen machten die Spermatozyten mit ca. 63% und die Spermatozyten mit ca. 30% aus. Hingegen waren nur ca. 7% der apoptotischen Keimzellen Spermatozyten.

Von den untersuchten Apoptoseregulatoren wurde der Fas-Ligand in Sertolizellen nachgewiesen. Diese Tatsache unterstützt die Untersuchungsergebnisse am Maus Hoden, wo der Fas-Ligand in den Sertolizellen exprimiert wird und ein wichtiges Bindeglied in der parakrinen Kontrolle der Keimzellapoptose darstellt.

Die Häufigkeit und das Expressionsmuster vom p53-Protein waren nicht mit der Apoptose assoziiert. Die Tatsache, daß p53 ausschließlich in den Spermatozyten nachgewiesen wurde, läßt eine Bedeutung für die DNA-Reparatur während der Mitose vermuten.

Das bcl-2-Protein konnte nur in lymphozytären Infiltraten von Keimzellen im menschlichen Hoden nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, daß bcl-2 an der Regulation der Apoptose in Keimzellen nicht beteiligt ist.

Die Untersuchung der Hodentumore ergab, daß die Apoptosehäufigkeit bei präinvasiven CIS-Zellen höher als bei normalen Keimzellen ist. Die hohe Apoptoserate könnte einen indirekten Hinweis auf eine Häufung von Zellen mit irreparablen DNA-Schäden darstellen. Die Apoptoserate in invasiven Seminomen war im Vergleich zu präinvasiven CIS signifikant niedriger. Dies deutet darauf hin, daß eine Verschiebung des homöostatischen Gleichgewichts auf Kosten der Apoptose einen wichtigen Aspekt im Wachstum solider Seminome darstellt.

Die präinvasiven CIS-Zellen und Tumorzellen in soliden Seminomen wiesen eine Überexpression des p53-Proteins im Vergleich zu den Spermatozyten in normalen

Hodengewebe auf. Die Abnahme der Apoptoserate in soliden Seminomen im Vergleich zu den CIS-Zellen war mit einer Senkung der p53-Expression assoziiert. Im Unterschied zu normalen Keimzellen war die p53-Expression in neoplastischen Zellen mit der Apoptosehäufigkeit assoziiert. Dies könnte ein Hinweis auf dessen Rolle als Apoptoseinduktor in Keimzelltumoren sein.

Das bcl-2-Protein konnte ausschließlich in lymphozytären Infiltraten nachgewiesen werden. Es war keine Assoziation zwischen der bcl-2-Expression und Apoptose in Keimzelltumoren nachweisbar.

6. Literaturverzeichnis

Adami HO, Bergstrom R, Mohner M, Zatonski W, Storm H, Ekblom A, Tretli S, Teppo L, Ziegler H, Rahu M (1994) Testicular cancer in nine northern European countries. *Int J Cancer* 59: 33-38

Akao Y, Otsuki Y, Kataoka S, Ito Y, Tsujimoto Y (1994) Multiple subcellular localisation of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane and mitochondrial membranes. *Cancer Res* 54: 2468-2471

Allan DJ, Harmon BV, Kerr JFR (1987) Cell death in spermatogenesis. Potten CS, ed. *Perspectives on Mammalian Cell Death*. London: Oxford University Press: 229-258

Allan DJ, Harmon BV, Roberts SA (1992) Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat. *Cell Prolif* 25: 241-250

Allison MR and Sarraf CE (1994) Liver cell death: patterns and mechanisms. *Gut* 35: 577-581

Alnermi ES, Livingstone DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996) Human ICE/Ced-3 proteases nomenclature. *Cell* 87:171-184

Antalikova L, Kren V, Kasperek R, Bila V (1989) Patterns of physiological cell death and mitoses in the apical ectodermal ridge in normodactylous and polydactylous rat limb buds. A quantitative evaluation. *Folia Biol Praha* 35: 339-346

Askew DS; Ashmun RA, Simmons BC, Cleveland JL (1991) Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene* 6: 1915-1922

Aumuller G, Schulze C, Viebahn C (1992) Intermediate filaments in sertoli cells. *Microsc Res Tech* 20: 50-72

Bartek J, Bartkova J, Vojtesek B, Staskova Z, Lukas J, Rejthar A, Kovarik J, Midgley CA, Gannon JV, Lane DP (1991) Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* 6: 1699-1703

Bartkova J, Bartek J, Lukas J, Vojtesek B, Staskova Z, Rejthar A, Kovarik J, Midgley CA, Lane DP (1991) p53 protein alterations in human testicular cancer including pre-invasive intratubular germ-cell neoplasia. *Int J Cancer* 49: 196-202

Bary G, Myashita J, Williamson R, Reed JC (1993) Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *J Biol Chem* 268: 6511-6519

Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC (1995) A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 377: 630-632

Bently KS and Working PK (1988) Use of seminiferous tubule segments to study specificity of unsheduled DNA synthesis in rat spermatogenic cells. *Environ Mol Mutagenesis* 12: 285-297

Bergmann M, Nashan D, Nieschlag E (1989) Pattern of compartmentation in human seminiferous tubules showing dislocation of spermatogonia. *Cell Tissue Res* 256: 183-190

Beumer TL, Roepers Gajadien HL, Gademian IS, van Buul PP, Gil Gomez G, Rutgers DH, de Rooij DG (1998) The role of the tumor suppressor p53 in spermatogenesis. *Cell Death Differ* 5: 669-677

- Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M, Hsueh A J (1995) Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 136: 5-12
- Bladou F, Vessella RL, Buhler KR, Ellis WJ, True LD, Lange PH (1996) Cell proliferation and apoptosis during prostatic tumor xenograft involution and regrowth after castration. *Int J Cancer* 67: 785-790
- Blanco- Rodriguez J and Martinez- Garcia C (1996) Induction of apoptotic cell death in the seminiferous tubule of the adult rat testis: assessment of the germ cell types that exhibit the ability to enter apoptosis after hormone suppression by oestradiol treatment. *Int J Androl* 19: 237-247
- Blanco-Rodriguez J and Martinez-Garcia C (1996) Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: re-evaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. *Cell Prolif* 29: 13-31
- Boekelheide K, Lee J, Shipp EB, Richburg JH, Li G (1998) Expression of Fas system-related genes in the testis during development and after toxicant exposure. *Toxicol Lett* 102-103: 503-508
- Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D (1995) A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 270: 7795-7798
- Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D (1996) Involvement of MACH, a novel MORTY1/FADD-interacting protease, in Fas/APO1 and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85: 803-815
- Borgerson KL, Bretz JD, Baker JR Jr (1999) The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid autoimmune disease. *Autoimmunity* 30: 251-264
- Braendstrup O, Bols B, Jensen L (1999) Fas and Fas-ligand expression in seminomatous testes. *APMIS* 107: 431-436
- Brinkworth MH, Weinbauer GF, Bergmann M, Nieschlag E (1997) Apoptosis as a mechanism of germ cell loss in elderly men. *Int J Androl* 20: 222-228
- Burger H, Nooter K, Boersma AW, Kortland CJ, Stoter G (1997) Lack of correlation between cisplatin-induced apoptosis, p53 status and expression of Bcl-2 family proteins in testicular germ cell tumour cell lines. *Int J Cancer* 73: 592-599
- Burgoyne PS, Mahadevaiha SK, Sutcliffe MJ and Palmer SJ (1992) Fertility in mice requires X-Y pairing and a Y-chromosomal "spermatogenesis" gene mapping to the long arm. *Cell* 71: 391-398
- Caron de Fromental C, Soussi T (1992) the p53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes, Chromosome Cancer* 4: 1-15
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81: 505-512
- Chiou SK, Rao L, White E (1994) Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis. *Mol Cell Biol* 14: 2556-2563
- Chresta CM, Masters JRW, Hickman JA (1996) Hypersensitivity of human testicular tumors to etoposide-induced apoptosis is associated with functional p53 and a high Bax/Bcl-2 ratio. *Cancer Res* 56: 1834-1841
- Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, Wyllie AH (1993) Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 362: 849-852

- Clermont Y, Morgentaler H (1955) Quantitative study of spermatogenesis in the hypophysectomized rat. *Endocrinology* 57: 369-382
- Clermont Y (1962) Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat: A revised model for the renewal of spermatogonia. *Am J Anat* 111: 111-129
- Clermont Y (1966) Spermatogenesis in man. A study of the spermatogonial population. *Fertil Steril* 17: 705-721
- Cleveland JL, Troppmair J, Packham G, Askew DS, Lloyd P, Gonzalez-Garcia M; Nunez G, Ihle JN, Rapp UR (1994) v-raf suppresses apoptosis and promotes growth of interleukin-3-dependent myeloid cells. *Oncogene* 9: 2217-2226
- Clouston WM, Kerr J F (1985) Apoptosis, lymphocytotoxicity and the containment of viral infections. *Med Hypotheses* 18: 399-404
- Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS (1992) Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* 10: 267-293
- Cooke PS, Hess RA, Porcelli J, Meisami E (1991) Increased sperm production in adult rats indicates that spermatid numbers in adult rats after transient neonatal hypothyroidism. *Endocrinology* 129: 244-248
- Cortes D, Müller D, Skakkebaek NE (1987) Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods. *In J Androl* 10: 589-596
- Creissen D, Shall S (1992) Regulation of DNA ligase activity by poly (ADP-ribose). *Nature* 296: 269-271
- Dansranjavin T, Bergmann M (1997) The distribution pattern of p53 and bcl-2 protein and the possible involvement in apoptosis of adult human testis. *Eur J Cell Biol (Suppl)* 42: 270
- Decaudin D, Geley S, Hirsch T, Castedo M, Marchetti P, Macho A, Kofler R, Kroemer G (1997) Bcl-2 and Bcl-X(L) antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 57: 62-67
- Deschler B, Dansranjavin T, Kliesch S, Bergmann M (1998) Untersuchung zur Proliferation und Apoptose bei der Genese menschlicher Keimzelltumore. *Ann Anat (Suppl.)* 180: 249
- Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM (1994) DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* 8: 2540-2551
- Dive C, Hickman JA (1991) Drug-target interactions: only the first step in the commitment to a programmed cell death? *Br J Cancer* 64: 192-196
- Donehower LA and Bradley A (1993) The tumor suppressor p53. *Biochem Biophys Acta* 1155: 181-205
- Dym M and Fawcett DW (1970) The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 3: 308-326
- Ellis HM and Horvitz HR (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44: 817-829
- Ellis RE, Jakobson DM, Horvitz HR (1991) Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 129: 79-94
- Enari M, Hug H, Nagata S (1995) Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature* 375: 78-81

- Evans CA, Owen-Lynch JP, Whetton AD, Dive C (1993) Activation of the Abelson tyrosine kinase-activity is associated with suppression of apoptosis in hemopoetic cells. *Cancer Res* 53:1755-1738
- Everett CA, Searle JB, and Wallace MN (1996) A study of meiotic pairing, nondisjunction and germ cell death in laboratory mice carrying Robertsonian translocation. *Genet Res Camb* 67: 239-247
- Fleischhacker M, Strohmeyer T, Imai Y, Slamon DJ, Koeffler HP (1994) Mutations of the p53 gene are not detectable in human testicular tumors. *Mod Pathol* 7: 435-439
- Fraser A, Evan G (1996) A licence to kill. *Cell* 85: 781-784
- Fukunaga Johnson N, Ryan JJ, Wicha M, Nunez G, Clarke MF (1995) Bcl-2 protects murine erythroleukemia cells from p53-dependent and -independent radiation-induced cell death. *Carcinogenesis* 16: 1761-1767
- Furtwangler JA, Hall SH, Koskinen Moffett K (1985) Sutural morphogenesis in the mouse calvaria: the role of apoptosis. *Acta Anat Basel* 124: 74-80
- Furuchi T, Masuko K, Nishimune Y, Obinata M, Matsui Y (1996) Inhibition of testicular germ cell apoptosis and differentiation in mice misexpressing Bcl-2 in spermatogonia. *Development* 122: 1703-1709
- Gerl A. (1996) Therapie von Hodentumoren. *Onkologie Forum*, Frankfurt am Main
- Geurts van Kessel A, Suijkerbuijk RF, Sinke RJ, Looijenga L, Oosterhuis JW, de Jong B (1993) Molecular cytogenetics of human germ cell tumours: i(12p) and related chromosomal anomalies. *Eur Urol* 23: 23-29
- Giannoni P, Scarabelli L, Orunesu M, Cesarone CF (1995) *In vitro* effect of 3,5,3'-Triiodothyronine on poly (ADP-Ribosyl)ation of DNA Topoisomerase I. *Italian J Biochem* 44: 129-136
- Golstein P, Ojcius DM, Young JD (1991) Cell death mechanisms and the immune system *Immunol Rev* 121: 29-65
- Green DR, Bissonette RP Cotter TG (1994) Apoptosis and cancer Important advances in oncology. Lippincort Co., Philadelphia: 37-52
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54: 4855-4878
- Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Fergusson TA (1995) Fas ligand induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270: 1189-1192
- Guillou L, Estreicher A, Chaubert P, Hurlimann J, Kurt AM, Mathez G, Iggo R, Gray AC, Jichlinski P, Leisinger HJ, Benhatar J (1996) Germ cell tumors of the testis overexpress wild -type p53. *Am J Pathol* 149: 1221-1228
- Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VE, Longthorne VL, Culhane AC, Williams GT (1996) Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem* 236: 1-26
- Hall K, Ritzen Em, Johnsonbaugh RE, Parvinen M (1983) Secretion of somatomedin-like compound from sertoli cells in vitro. *Insulin-Like Growth Factors/ Somatomedins*, edited by Spencer EM, New York: Walter de Cruyter: 611-614
- Hanon E, Vanderplasschen A, Lyaku J, Keil G, Denis M, Pastoret PP (1996) Inactivated bovine herpesvirus 1 induces apoptotic cell death of mitogen stimulated bovine peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 70: 4116-4120

- Hanada M, Aime-Sempe C, Sato T, Reed J (1995) Structure-function analysis of Bcl-2 protein: identification of conserved domains for homodimerisation with Bcl-2 and heterodimerisation with Bax. *J Biol Chem* 270: 11962-11969
- Harris CC, Holstein M (1993) Clinical implications of the p53 tumor suppressor gene. *N Engl J Med* 329: 1318-1327
- Harrison SM, Roffler Tarlov SK (1998) Cell death during development of testis and cerebellum in the mutant mouse weaver. *Dev Biol* 195: 174-186
- Hasegawa M, Lonnie GW, Russel D, Meistrich ML (1997) Radiation-induced cell death in the mouse testis: relationship to apoptosis. *Radiat Res* 147: 457-467
- Heiskanen P, Billig H, Toppari J, Kaleva M, Arsalio A, Rapola J, Dunkel L (1996) Apoptotic cell death in the normal and cryptorchid human testis: The effect of human chorionic gonadotropin on testicular cell survival. *Pediatr Res* 40: 351-356
- Hengartner MO and Hrovitz HR (1994) *C.elegans* cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell* 76: 665-676
- Henriksen K, Hakovirta H, Parvinen M (1995 a) In-situ quantification of stage-specific apoptosis in the rat seminiferous epithelium: effects of short-term experimental cryptorchidism. *Int J Androl* 18: 256-262
- Henriksen K, Hakovirta H, Parvinen M (1995 b) Testosterone inhibits and induces apoptosis in rat seminiferous tubules in a stage-specific manner: in situ quantification in squash preparations after administration of ethane dimethane sulfonate. *Endocrinology* 136: 3285-3291
- Henriksen K, Kangasniemi M, Parvinen M, Kaipia A, Hakovirta H (1996) In vitro, follicle-stimulating hormone prevents apoptosis and stimulates deoxyribonucleic acid synthesis in the rat seminiferous epithelium in a stage-specific fashion. *Endocrinology* 137: 2141-2149
- Hikim APS, Wang C, Leung A, Swerdloff RS (1995) Involvement of apoptosis in the induction of the germ cell degeneration and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 136: 2770-2775
- Hikim AP, Lue Y, Swerdloff RS (1997) Separation of germ cell apoptosis from toxin-induced cell death by necrosis using in situ end-labeling histochemistry after glutaraldehyde fixation. *Tissue Cell* 29: 487-493
- Hilscher B and Engelman A (1991) Histological and morphometric studies on the kinetics of germ cells and immature Sertoli cells during the human spermatogenesis. *Werner-Hilscher-Symposium on Keimbahn and the male fertility*, Novotel Neuss
- Hockenbery D, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348: 334-336
- Hockenbery DM, Oltvai Z, Yin XM, Millman C, Korsmeyer SJ (1991) Bcl-2 is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6961-6965
- Hockenbery DM, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 362: 334-336
- Holmes SD, Spotts G, Smith RG (1986) Characterization of a growth factor secreted by rat Sertoli cells in culture. *Prog Clin Biol Res* 217A: 389-392
- Holstein AF and Wartenberg H (1970) On the cytomorphology of human spermatogenesis. *Fortschritte der Andrologie, Vol.1 Morphological aspects of andrology*, Berlin: Grosse
- Holstein AF and Schirren C (1983) Histological evaluation of testicular biopsies. *Fortsch Androl* 8: 108-117

- Hollstein M, Shomer B, Greenblatt M, Soussi T, Hovig E, Montesano R, Harris CC (1996) Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Res* 24: 141-146
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV (1995) The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81: 495-504
- Huckins C (1978) The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat Rec* 190: 905-926
- Huhtaniemi IT, Nevo N, Amsterdam A, Naoe Z (1986) Effect of postnatal treatment with a gonadotropin-releasing hormone antagonist on sexual maturation of male rats 35: 501-509
- Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL (1990) Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335: 675-679
- Itoh N, Nagata S (1993) A novel protein domain required for apoptosis mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 268: 10932-10937
- Janus F, Albrechtsen N, Knippschild U, Wiesmuller L, Grosse F, Deppert W (1999 a) Different regulation of the p53 core domain activities 3'-to-5' exonuclease and sequence-specific DNA binding. *Mol Cell Biol* 19: 2155-2168
- Janus F, Albrechtsen N, Dornreiter I, Wiesmuller L, Grosse F, Deppert W (1999 b) The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cell Mol Life Sci* 55: 12-27
- Johnson L, Petty CS, Neaves WB (1983) Further quantification of human spermatogenesis: germ cell loss during postprophase of meiosis and its relationship to daily sperm production. *Biol Reprod* 29: 207-215
- Johnson L, Zane RS, Petty CS, Neaves WB (1984 a) Quantification of the human sertoli cell population, relation to germ cell numbers and age-related decline. *Biol Reprod* 31: 785-795
- Johnson L, Petty CS, Neaves WB (1984 b) Influence of age on sperm production and testicular weights in men. *J Reprod Fertil* 70: 211-218
- Johnson L, Nguyen HB, Petty CS, Neaves WB (1987) Quantification of human spermatogenesis: germ cell degeneration during spermatocytogenesis and meiosis in testes from younger and older adult men. *Biol Reprod* 37: 739-747
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51: 6304-6311
- Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG (1993) Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 53: 3976-3985
- Kierszenbaum A (1994) Mammalian spermatogenesis *in vivo* and *in vitro*: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. *Endocr Rev* 15: 116-134
- Kinoshita T, Yokota T, Arai K, Miyajima A (1995 a) Suppression of apoptotic cell death in hematopoietic-cells by signalling through the IL3/GM-CSF receptors. *EMBO J* 14: 266-275
- Kinoshita T, Yokota T, Arai K, Miyajima A (1995 b) Regulation of bcl-2 expression by oncogenic ras protein in hematopoietic cells. *Ocogene* 10: 2207-2212
- Kischkel F, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer P, Peter M (1995) Cytotoxicity-dependent APO1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death inducing signaling complex (DISC with the receptor. *EMBO J* 14: 5579-5588

Koberle B, Grimaldi KA, Sunter A, Hartley JA, Kelland LR, Masters JR (1997) DNA repair capacity and cisplatin sensitivity of human testis tumour cells. *Int J Cancer* 70: 551-555

Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed J (1993) Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 53: 4701-4714

Kumar S, Harvey NL (1995) Role of multiple cellular proteases in the execution of programmed cell death. *FEBS Lett* 375:169-173

Kuczyk MA, Serth J, Bokemeyer , Allhoff EP, Jonassen J, Kuczyk S, Jonas U (1994) Overexpression of the p53 oncoprotein in carcinoma in situ of the testis. *Path Res Pract* 190: 993-998

Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB (1992) Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7491-7495

Lacroix M, Smith FE, Fritz IB (1977) Secretion of plasminogenactivator by sertoli cell enriched cultures. *Mol Cell Endocrinol* 9: 227-236

Lane DP (1992) Cancer p53 guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16

Lane DP, Crawford LV (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278: 261-263

Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG Earnshaw WC (1994) *Nature* 371: 346-347

Lee K, Haugen HS, Clegg CH, Braun RE (1995) Premature translation of protamine 1 mRNA causes precocious nuclear condensation and arrests spermatid differentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 12451-12455

Lee J, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheide K (1997) The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 5: 2081-2088

Lee J, Richburg JH, Shipp EB, Meistrich ML, Boekelheide K (1999) The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up-regulated in Sertoli cell versus germ cell injury of the testis. *Endocrinology* 140: 852-858

Lewinson D, Cohen M, Silbermann JJ, Duke RC, V Fadok A, Sellins KS (1992) Chondroclasts and endothelial cells collaborate in the process of cartilage resorption Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Anat Rec* 233: 504-514

Li LH, Wine RN, Chapin RE (1996) 2 methoxyacetic acid (maa) induced spermatocyte apoptosis in human and rat testes: an in vitro comparison. *Journal of andrology* 17: 538-549

Lin Y and Benchimol S (1995) Cytokines inhibit p53-mediated apoptosis but not p53-mediated G1 arrest. *Mol Cell Biol* 15: 6045-6054

Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM, Lipshultz LI, Kim ED (1997 a) In situ end-labeling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril* 68: 1065-1069

Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM, Abrams J, Lipshultz LI, Kim ED (1997 b) Apoptotic frequency is increased in spermatogenic maturation arrest and hypospermatogenic states. *J Urol* 158: 1791-1793

Lin WW, Lamb DJ, Lipshultz LI, Kim ED (1998) Absence of cyclic adenosine 3':5' monophosphate responsive element modulator expression at the spermatocyte arrest stage. *Fertil Steril* 69: 533-538

Lin WW, Lamb DJ, Lipshultz LI, Kim ED (1999) The role of autosomal cell apoptosis regulator genes in human spermatogenesis. *Int Urol Nephrol* 31: 237-246

- Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Huosman DE (1993) p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74: 957-967
- Lu QL, Poulson R, Wong L, Hanby AM (1993) Bcl-2 expression in adult and embryonic non-hematopoietic tissues. *J Pathol* 169: 431-437
- Lutzker SG, Levine AJ (1996) A functionally inactive p53 protein in teratocarcinoma cells is activated by either DNA damage or cellular differentiation. *Nat Med* 2: 804-810
- Manivel JC, Reinberg Y, Niehaus G, Fraley EE (1989) Intratubular germ cell neoplasia in testicular teratoma and epidermoid cysts. *Cancer* 64: 715-720
- Marathe GK, Shetty J, Dighe RR (1996) Specific immunoneutralization of FSH leads to apoptotic cell death of the pachytene spermatocytes and spermatogonial cells in the rat. *Endocrinology* 137: 2179-2182
- Matsuda Y, Hirobe T and Chapman VM (1991) Genetic basis of X-Y chromosome dissociation and male sterility in interspecific hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4850-4854
- McDonnell TJ, Beham A, Sarkiss M, Andersen MM, Lo P (1996) Importance of the Bcl-2 family in cell death regulation. *Experientia* 52: 1008-1017
- McKay DG, Hertig AT, Adams EC, Danziger S (1953) Histochemical observations on the germ cells of human embryos. *Anat Rec* 117: 201-219
- Mercer WE, Shields MT, Lin D, Appella E, Ulrich SJ (1991) Growth suppression induced by wild-type p53 protein is accompanied by selective down-regulation of proliferating-cell nuclear antigen expression. *Proc Natl Acad sci USA* 88: 1958-1962
- Miklos GLG (1974) Sex-chromosome pairing and male fertility. *Cytogenet Cell Genet* 13: 558-577
- Mizuno K, Shiratsuchi A, Masamune Y, Nakanishi Y (1996) The role of sertoli cells in the differentiation and exclusion of rat testicular germ cells in primary culture. *Cell Death Differ* 3: 119-123
- Mori C, Nakamura N, Dix DJ, Fujioka M, Nakagawa S, Shiota K, Eddy EM (1997) Morphological analysis of germ cell apoptosis during postnatal testis development in normal and hsp 70-2 knockout mice. *Dev Dyn* 208: 125-136
- Mostofi FK, Sobin LH (1977) Histological typing of testis tumors. Geneva, Switzerland: World Health Organization (International histological classification of tumors no. 16)
- Mundle SD, Kotelnikov VM, Wood NB, Coon JS, Horvath E, Taylor SG, Lafollette S, Caldarelli DD, Hutchinson JC, Panje WR, Preisler HD, Raza A (1996) Assessment of apoptosis in relation to proliferation and mutational status of p53 gene in head and neck cancers. *Int J Oncol* 8: 1257-1264
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Scaffidi J Ni C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85: 817-827
- Nagata S & Golstein P (1995) The Fas death factor. *Science* 267: 1449-1456
- Nagata S (1996) Fas ligand and immune evasion. *Nat Med* 2: 1306-1307
- Nagata S (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* 88:355-365

- Nantel F, Monaco L, Foulkes NS, Masquilier D, LeMeur M, Henriksen K, Dierich A, Parvinen M, Sassone Corsi P (1996) Spermiogenesis deficiency and germ-cell apoptosis in CREM-mutant mice. *Nature* 380: 159-162
- Nicholson DW, Ambereen A, Thornberry NA; Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, Munday NA, Raju SM, Smulson ME, Yamin TT, Yu VL, Miller DK (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376: 37-43
- Nunez G, London L, Hockenbery D, Alexander M, McKearn JP, Korsmeyer SJ (1990) Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J Immunol* 144: 3602-3610
- O'Connor PM, Wassermann K, Sarang M, Magrath I, Bohr VA, Kohn KW (1991) Relationship between DNA cross-links, cell cycle, and apoptosis in Burkitt's lymphoma cell lines differing in sensitivity to nitrogen mustard. *Cancer Res* 51: 6550-6557
- Oakberg E (1956) A description of spermatogenesis in hypophysectomized adult rats. *Am J Anat* 99: 391-413
- Ohta Y, Nishikawa A, Fukazawa Y, Urushitani H, Matsuzawa A, Nishina Y, Iguchi T (1996) Apoptosis in adult mouse testis induced by experimental cryptorchidism. *Acta Anat Basel* 157: 195-204
- Oliver RTD (1990) Atrophy. Hormones, genes and viruses in aetiology germ cell tumours. *Cancer Surv* 9: 263-286
- Oren M, Maltzman W, Levine AJ (1981) Post-translational regulation of the 53 K cellular tumor antigen in normal and transformed cells. *Mol Cell Biol* 1: 101-110
- Orlando P, Grippo P and Geremia R (1984) DNA repair synthesis related enzymes during spermatogenesis in the mouse. *Exp Cell Res* 153: 499-506
- Orth JM, Gunsalus GM, Lamperti AA (1990) Evidence from sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid numbers in adults depends on numbers of sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 122: 787-794
- Orth K, O'Rourke K, Salvesen GS, Dixit VM (1996) Molecular ordering of apoptotic mammalian ced-3/ICE-like proteases. *J Biol Chem* 271: 20977-20980
- Paniagua R, Codesal J, Nistal M, Rodriguez MC, Santamaria L (1987) Quantification of cell types throughout the cycle of the human seminiferous epithelium and their DNA content. *Anat Embryol* 176: 225-230
- Peng HQ, Hogg D, Malkin D, Bailey D, Gallie BL, Bulbul M, Jewett M, Buchanan J, Goss PE (1993) Mutations of the p53 gene do not occur in testis cancer. *Cancer Res* 53: 3574-3578
- Pentikainen V, Erkkila K, Dunkel L (1999) Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *Am J Physiol* 276: 310-316
- Pietenpol JA, Vogelstein B (1993) No room at the p53 inn. *Nature* 365: 17-18
- Pike MC, Chivers CED, Bobrow LG (1987) Classification of testicular cancer in incidence and mortality statistics. *Br J Cancer* 56: 83-85
- Pugh RCB, Parkinson C (1981) The origin and classification of testicular germ cell tumours. *Int J Androl* 4: 15-25
- Raff MC (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356: 397-400

- Raina V, Shukla NK, Gupta NP, Deo S, Rath GK (1995) Germ cell tumours in uncorrected cryptorchid testis at Institute Rotary Cancer Hospital New Delhi. *Br J Cancer* 71: 380-382
- Rathmell JC, Cooke MP, Ho WY, Grein J, Townsend SE, Davis MM, Goodnow CC (1995) CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4+ T cells. *Nature* 376: 181-184
- Ray CA, Black RA, Kronheim SR, Greenstreet TA, Sleath PR, Salvesen GS, Pickup DJ (1992) Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 converting enzyme. *Cell* 69: 597-604
- Reed JC (1994) Bcl-2 and the regulation of cell death. *J Cell Biol* 124: 1-6
- Richburg JH, Boekelheide K (1996) Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicol Appl Pharmacol* 137: 42-50
- Richburg JH, Nanez A, Gao H (1999) Participation of the Fas-signaling system in the initiation of germ cell apoptosis in young rat testes after exposure to mono-(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol Appl Pharmacol* 160: 271-278
- Richburg JH, Nanez A, Williams LR, Embree ME, Boekelheide K (2000) Sensitivity of testicular germ cells to toxicant-induced apoptosis in gld mice that express a nonfunctional form of Fas ligand. *Endocrinology* 141: 787-793
- Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, Lane DP (1990) p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 7555-7559
- Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P (1997) An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* 16: 2262-2270
- Roosen-Runge EC (1955) Untersuchungen über die Degeneration samenbildender Zellen in der normalen Spermatogenese der Ratte. *Zellforschung* 41: 221-225
- Roosen-Runge EC (1973) Germinal cell loss in normal metazoan spermatogenesis. *J Reprod Fertil* 35: 339-348
- Roosen-Runge EC (1977) *The process of spermatogenesis in animals: 145-153* New-York: Cambridge University Press
- Rothenberg EV (1992) The development of functionally responsive T cells. *Adv Immunol* 51: 85-214
- Rotter V, Schwartz D, Almon E, Goldfinger N, Kapon A, Meshorer A, Donehower LA, Levine AJ (1993) Mice with reduced levels of p53 protein exhibit the testicular giant-cell degenerative syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 9075-9079
- Russell LD (1977) Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *Am J Anat* 148: 313-328
- Russell LD, Clermont Y (1977) Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *Anat Rec* 187: 347-366
- Russell LD and Peterson RN (1985) Sertoli cell junctions: Morphological and functional correlates. *Rev Cytol* 94: 177-211
- Russell LD, Alger LE, Nequin LG (1987) Hormonal control of pubertal spermatogenesis. *Endocrinology* 120: 1615-1632
- Russell LD, Ettlin RA, Hikim PS, Clegg ED (1990) *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Cache River Press, Clearwater, FL.

- Sassone Corsi P (1995) Transcription factors responsive to cAMP. *Ann Rev Cell Dev Biol* 11: 355-377
- Savill J, Dransfield I, Hogg N, Haslett C (1990) Vitronectin receptor mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 343:170-173
- Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C (1993) Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 14: 131-136
- Sharpe RM (1994) Regulation of spermatogenesis. Knobil E Neil JD (eds) *The Physiology of Reproduction*, ed 2. Raven Press, New York, pp 1363-1434.
- Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B, Costa J (1992) Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4495-4499
- Shetty J, Marathe GK, Dighe RR (1996) Specific immunoneutralization of FSH leads to apoptotic cell death of the pachytene spermatocytes and spermatogonial cells in the rat. *Endocrinology* 137: 2179-2182
- Schlapbach R, Fontana A (1997) Differential activity of bcl-2 and ICE enzyme family protease inhibitors on Fas and puromycin-induced apoptosis of glioma cells. *Bba Mol Cell Res* 1359: 174-180
- Shi L, Nishioka WK, Thang J, Bradbury EM, Litchfield DW, Greenberg AH (1994) Premature p34^{cdc2} activation required for apoptosis. *Science* 263: 1143-1145
- Shibata MA, Maroulakou IG, Jorcyk CL, Gold LG, Ward JM, Green JE (1996) p53 independent apoptosis during mammary tumor progression in c3(1)/sv40 large t antigen transgenic mice: suppression of apoptosis during the transition from preneoplasia to carcinoma. *Cancer Res* 56: 2998-3003
- Schumann H, Morawietz H, Hakim H, Zerkowski HR, Eschenhagen J, Holtz J, Darmer D (1997) Alternative Splicing of the Primary Fas Transcript Generating Soluble Fas Antagonists Is Suppressed in the Failing Human Ventricular Myocardium. *Biochem Biophys Res Com* 239: 794-798
- Sinha Hikim AP, Swerdloff RS (1999) Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 4: 38-47
- Skakkabaek NE (1972) Possible carcinoma in situ of the testis. *Lancet* 2: 516-517
- Skakkabaek NE, Hulten M, Jakobsen P, Mikkelsen M (1973) Quantification of human seminiferous epithelium. II. Histological studies in eight 47, XYY men. *J Reprod Fertil* 32: 391-401
- Sigg C (1979) Klassifizierung tubulärer Hodenatrophien bei Sterilitätsabklärungen. Bedeutung der sogenannten bunten Atrophie. *Schweizerische medizinische Wochenschrift* 109: 1284-1293
- Sjoblom T, Lahdetie J (1996) Expression of p53 in normal and gamma irradiated rat testis suggests a role for p53 in meiotic recombination and repair. *Oncogene* 12: 2499-2505
- Smale G, Nichols NR, Brady DR, Finch CE, Horton WE (1995) Evidence of apoptotic cell death in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 133:225-230
- Smith CA, Farrah T, Goodwin RG (1994) The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation and death. *Cell* 76: 959-962
- Smith ML, Fornace AJ (1996) Mammalian DNA damage inducible genes associated with growth arrest and apoptosis. *Mutation Res Rev Genet Toxicol* 340: 109-124
- Soini Y, Paakko P (1996) Extent of apoptosis in relation to p53 and bcl-2 expression in germ cell tumours. *Hum Pathol* 27: 1221-1226

- Spiteri-Grech J and Nieschlag E (1993) Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis - a review. *J Reprod Fertil* 98: 1-14
- Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, Seed B (1995) RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* 81: 513-523
- Stanley HP (1966) The structure and development of the seminiferous follicle in *Scyliorhinus caniculus* and *Torpedo marmorata*. *Z Zellforsch Mikroskop Anat* 75: (453-462)
- Starzynska T, Bromley M, Ghosh A, Stern PL (1992) Prognostic significance of p53 overexpression in gastric and colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 66: 558-562
- Strasser A, O'Connor L (1998) Fas ligand--caught between Scylla and Charybdis. *Nat Med* 4: 21-22
- Stubbs L, Stern H (1986) DNA synthesis at selective sites during pachytene in mouse spermatocytes. *Chromosoma* 93: 529-536
- Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S, Nakao K, Nagata S (1995) Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol* 154: 3806-3813
- Sugihara A, Saiki S, Tsuji M, Tsujimura T, Nakata Y, Kubota A, Kotake T, Terada N (1997) Expression of Fas and Fas ligand in the testes and testicular germ cell tumors: an immunohistochemical study. *Anticancer Res* 17: 3861-3865
- Sutcliffe MJ, Darling SM and Burgoyne PS (1991) Spermatogenesis in XY, XYSxr and XOSxr² mice: A quantitative analysis of spermatogenesis throughout puberty. *Mol Reprod Dev* 30: 81-89
- Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, Nagata S (1994) Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76: 969-976
- Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S (1995) Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J* 14: 1129-1135
- Tang DG, Li L, Chopra DP, Porter AT (1998) Extended survivability of prostate cancer cells in the absence of trophic factors: increased proliferation, evasion of apoptosis, and the role of apoptosis proteins. *Cancer Res* 58: 3466-3479
- Tanaka S, Saito K, Reed J (1993) Structure-function analysis of Bcl-2 oncoprotein: addition of a heterologous transmembrane domain to portions of the Bcl-2 beta protein restores function as a regulator of cell survival. *J Biol Chem* 268: 10920-10926
- Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GHW, Goeddel DV (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74: 845-853
- Taylor MF, Woolveridge I, Metcalfe AD, Streuli CH, Hickman JA, Morris ID (1998) Leydig cell apoptosis in the rat testes after administration of the cytotoxin ethane dimethanesulphonate: role of the Bcl-2 family members. *J Endocrinol* 157: 317-326
- Taylor MF, de Boer Brouwer M, Woolveridge I, Teerds KJ, Morris ID (1999) Leydig cell apoptosis after the administration of ethane dimethanesulfonate to the adult male rat is a Fas-mediated process. *Endocrinology* 140: 3797-3804
- Terada T, Nakanuma Y (1996) Expression of apoptosis, proliferating cell nuclear antigen, and apoptosis related antigens (bcl 2, c myc, fas, lewis(y) and p53) in human cholangiocarcinomas and hepatocellular carcinomas. *Pathol Int* 46: 764-770
- Tewari M, Quan LT, O'rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler D, Poirier GG, Dixit VM (1995) Yama/ CPP32 β , a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-Inhibitible Protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81: 801-809

- Thor AD, Moore DH, Edgerton SM, Kawasak ES, Reihaus E, Lynch HAT, Marcus JN, Schwartz L, Chen LC, Mayal BH, Smith HS (1992) Accumulation of p53 tumorsuppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 84: 845-854
- Trauth BC, Klas C, Peters AM Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH (1989) Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245: 301-305
- Troiano L, Fustini MF, Lovato E, Frasoldati A, Malorni W, Capri M, Grassilli E, Marrama P, Franceschi C (1994) Apoptosis and spermatogenesis: evidence from an in vivo model of testosterone withdrawal in the adult rat. *Biochem Biophys Res Commun* 202: 1315-1321
- Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228: 1440-1443
- Uckun FM, Tuel-Ahlgren L, Song CW, Waddick K, Myers DE, Kirihara J, Ledbetter JA, Schieven GI (1992) Ionizing radiation stimulates unidentified tyrosine-specific protein-kinases in human B-lymphocyte precursors, triggering apoptosis and clonogenic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9005-9009
- Van Haaster LH, De Jong FH, Docter R, De Rooij DG (1992) The effect of hypothyroidism on sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. *Endocrinology* 131: 1574-1576
- Vaux DL, Weissman IL, Kim SK (1992) Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 258: 1955-1957
- Vilagrasa X, Mezquita C, Mezquita J (1997) Differential expression of bcl-2 and bcl-x during chicken spermatogenesis. *Mol Reprod Dev* 47: 26-29
- Vilar O (1970) Histology of the human testis from neonatal period to adolescence. *Human Testis*: 95-111 Plenum Press New York, London
- Vilar O, Paulsen CA, Moore DJ (1970) Electron microscopy of the human seminiferous tubules. *Advances in Experimental Medicine and Biology. The Human Testis* 10:63-74. New York Plenum
- Volm M and Mattern J (1995) Increased expression of bcl-2 in drug-resistant squamous cell lung carcinomas. *Int J Oncol* 7: 1333-1338
- Von der Maase H, Rorth M, Walbom Jorgensen S, Sorensen BL, Christophersen IS, Hald T, Jacobsen GK, Berthelsen JG, Skakkebaek NE (1986) Carcinoma in situ of contralateral testis in patients with testicular germ cell cancer: study of 27 cases in 500 patients. *Br Med J Clin Res Ed* 293: 1398-1401
- Walker NPC, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferez CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett CR, Hamill LD, Herzog L, Hugunin M, Houy M, Mankovich JA, McGuinness L, Orlewicz E, Paskind M, Pratt CA, Reis P, Summani A, Terravova M, Welch JP, Xiong L, Möller A, Tracey DE, Kamen R, Wong WW (1994) Crystal structure of the cysteine proteinase interleukin-1 β -converting enzyme: A (p20/p10)₂ heterodimer. *Cell* 78: 343-352
- Wang Y, Xia Q, Qiu J, Sun Y, Xiao S (1997) Study on antifertility effect of a novel LHRH antagonist in male rats. *Contraception* 55: 369-372
- Watanabe Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S (1992) Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356: 314-317
- Weinbauer GF and Nieschlag E (1993) Hormonal control of spermatogenesis. Academic Press *Molecular Biology of the Male Reproductive System*: 99-133

- Williams GT (1991) Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 65: 1097-1098
- Williams L, Bell L (1991) Asynchronous development of the rat colon. *Anat Embryol Berl* 183: 573-578
- Woolveridge I, Bryden AA, Taylor MF, George NJ, Wu FC, Morris ID (1998) Apoptosis and expression of apoptotic regulators in the human testis following short- and long-term anti-androgen treatment. *Mol Hum Reprod* 4: 701-707
- Woolveridge I, de Boer Brouwer M, Taylor MF, Teerds KJ, Wu FC, Morris ID (1999) Apoptosis in the rat spermatogenic epithelium following androgen withdrawal: changes in apoptosis-related genes. *Biol Reprod* 60: 461-470
- Wyllie AH (1992) Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metast Rev* 11: 95-103
- Yin Y, Hawkins KL, DeWolf WC, Morgentaler A (1997) Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl* 18: 159-165
- Yonehara S, Ishii A, Yonehara M (1989) A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 169: 1747-1756
- Yonehara N, Saito K, Ohishi S, Katori M, Inoki R (1995) Contribution of bradykinin to heat-induced substance P release in the hind instep of rats. *Life Sci* 56: 1679-168
- Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M (1991) wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352: 345-347
- Yonish-Rouach E, Grunwald D, Wilder S, Kimchi A, May E, P, Oren M (1993) p53-mediated cell death: relationship to cell cycle control. *Mol Cell Biol* 13: 1415-1423

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, 2000

Temuujin Dansranjavın

Lebenslauf

Name: Temuujin Dansranjavin
Geburtstag: 24.08.1970
Geburtsort: Ulan-Bator, Mongolei
Familienstand: Verheiratet

Schulbildung:

1978-1988 Besuch der Oberschule Nr.3 in Ulan-Bator mit Abschluß der allgemeinen Hochschulreife

Studienzeiten:

1988-1989 Deutsch-Sprachkurs an der Mongolischen National Universität in Ulan-Bator

1989-1990 Deutsch-Fachsprachkurs am Herder-Institut in Leipzig

1990-1996 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

1995-1996 Diplomarbeit am Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Titel der Arbeit: "Immunhistochemische Untersuchungen der Katepsin-Expression an humanen Weichteilsarkomen"
Betreuer: Dr. Taubert

1996-1998 Arbeit am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Bergmann am DFG-Projekt "Untersuchungen zur Differenzierung der Sertoli-Zellpopulation".

seit 1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Experimentelle Chirurgie am LSA-Projekt "Regulation der G1-/S-Phasen-Transition beim HNPCC-Syndrom".

Halle, 2000

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Martin Bergmann für die Überlassung des Themas sowie für die kompetente und sachliche Betreuung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt dem Institutsdirektor Herrn Prof. Dr. Bernd Fischer für die gebotenen Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Anatomie und Zellbiologie. Allen Mitarbeitern des Instituts möchte ich für ihr freundliches und kollegiales Verhalten und gute Zusammenarbeit danken.

Für die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft möchte ich mich bei Herrn Dr. K. Steger und bei Frau Dipl.-Biochem. A. Navarrete-Santos bedanken.

Herzlichen Dank auch an Frau Dr. S. Kliesch aus der Universitätsklinik für Urologie in Münster für die Bereitstellung der Gewebeprobe.

Für sein freundliches Entgegenkommen und seine Hilfsbereitschaft möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. C Hoang-Vu, dem Leiter des Labors für experimentelle und chirurgische Onkologie an der Universitätsklinik für Allgemeinchirurgie, bedanken.