

Aus der Anatomischen Anstalt der Universität München

Lehrstuhl Anatomie III – Zellbiologie

Vorstand: Prof. Dr. Michael Kiebler

Untersuchungen zur Rolle von H_2O_2 in ovariellen Zellen



Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Carsten Theo Hack aus
Ingolstadt

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Artur Mayerhofer
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Enrico De Toni
	Prof. Dr. Sabine Marten-Steffens
	Prof. Dr. Irmela Jeremias
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	19.01.2023

*Es ist Gottes Ehre, eine Sache zu verbergen,
aber der Könige Ehre, eine Sache zu erforschen.*

Meinen Eltern

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Doktorarbeit mit dem Thema

Untersuchungen zur Rolle von H₂O₂ in ovariellen Zellen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 28.01.2023

gezeichnet Carsten Theo Hack

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Publikationsliste.....	IX
Einleitung.....	1
Eigenanteil an den Publikationen.....	6
Zusammenfassung.....	7
Summary.....	9
Literaturverzeichnis.....	11
Danksagungen.....	13

AbkürzungsverzeichnisAbkürzungen im deutschen Text

ACA	N-(p-Amylcinnamoyl)anthranilsäure
AQP	Aquaporin
clCASP3	aktivierte Caspase 3
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
GC	Granulosazelle
GCT	Granulosazelltumor
GLC	Granulosa-Lutein-Zelle
hCG	humanes Choriongonadotropin
LH	lutinisierendes Hormon
NOX	NADPH Oxidase
PO1	Peroxy Orange 1
PS	Phosphatidylserin
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
TRPM2	Transient receptor potential melastatin 2
WB	Western blot

Abkürzungen im englischen Text

ACA	N-(p-Amylcinnamoyl)anthranilic acid
AQP	aquaporin
ART	assisted reproductive techniques
clCASP3	cleaved caspase 3
DCF	2',7'-dichlorofluorescein
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
Drp1	dynamamin-related protein 1
DUOX	dual oxidase
EGF	epidermal growth factor
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FF	follicular fluid
FSH	follicle stimulating hormone
GC	granulosa cell
GCT	granulosa cell tumor
H ₂ DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
hCG	human choriongonadotropin
IVF	in-vitro-fertilization
LGC	luteinized granulosa cell
LH	lactate dehydrogenase

LTC	luteinized theca cell
MAPK	mitogen-activated protein kinase
NOX	NADPH oxidase
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PLA ₂	phospholipase A ₂
PO1	peroxy orange 1
ROI	region of interest
ROS	reactive oxygen species
TAC	total antioxidant capacity
TC	theca cell
TMA	tissue microarray
TRPM2	transient receptor potential melastatin 2
WB	Western blot

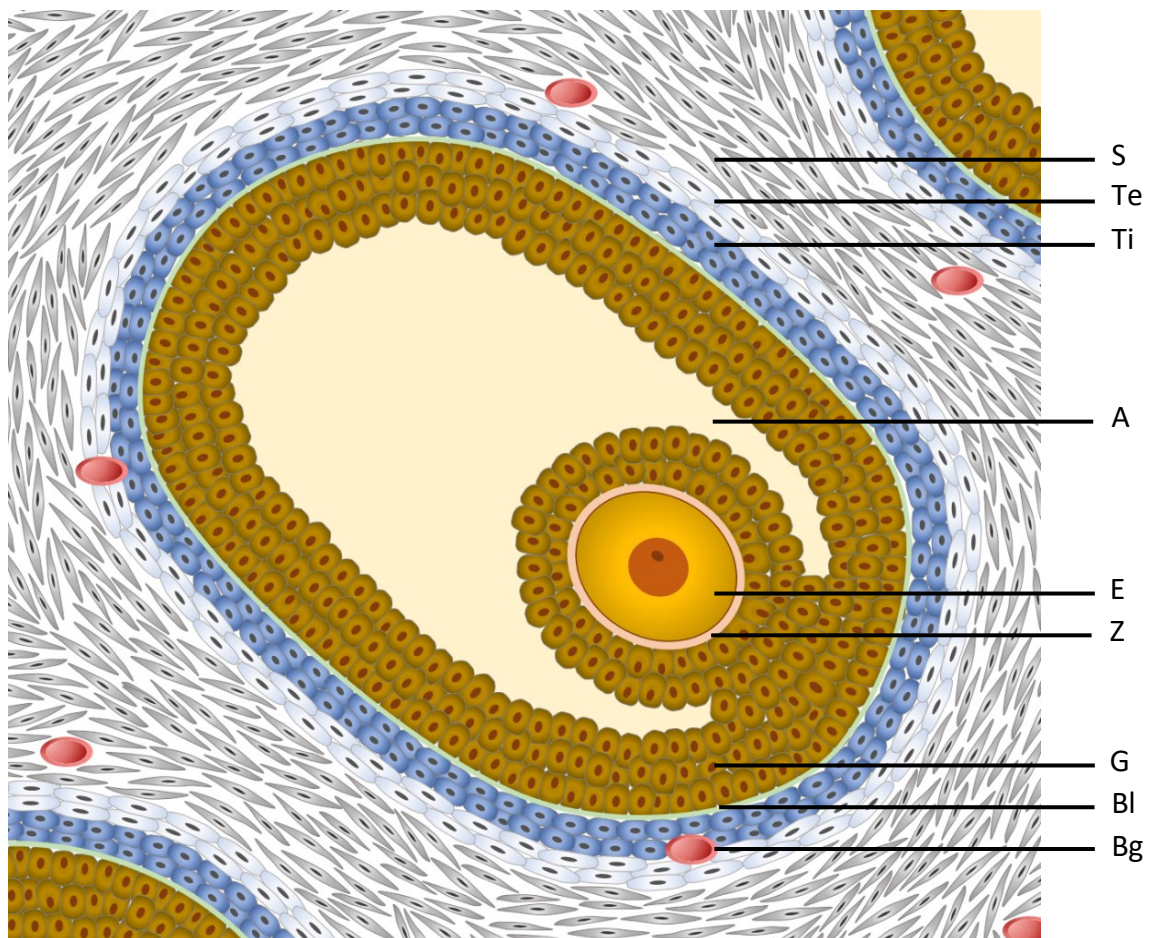
Publikationsliste

- 1) Buck T, Hack CT, Berg D, Berg U, Kunz L, Mayerhofer A.
The NADPH oxidase 4 is a major source of hydrogen peroxide in human granulosa-lutein and granulosa tumor cells.
Sci Rep. 2019 Mar 5;9(1):3585.
doi: 10.1038/s41598-019-40329-8. PubMed PMID: 30837663;
PubMed Central PMCID: PMC6400953.

- 2) Hack CT, Buck T, Bagnjuk K, Eubler K, Kunz L, Mayr D, Mayerhofer A.
A Role for H₂O₂ and TRPM2 in the Induction of Cell Death: Studies in KGN Cells.
Antioxidants (Basel). 2019 Oct 29;8(11). pii: E518.
doi: 10.3390/antiox8110518. PubMed PMID: 31671815;
PubMed Central PMCID: PMC6912327.

Einleitung

Die Hauptfunktionen der weiblichen Gonaden sind die Bereitstellung von befruchtungsfähigen Eizellen und die Produktion von Hormonen. In beiden Fällen spielen Granulosazellen (GCs) eine wesentliche Rolle. Während Keimzellvorläufer im Rahmen der Embryonalentwicklung von der Wand des Dottersacks her einwandern, leiten sich GCs direkt aus den Keimsträngen ab. GCs bilden das Follikelepithel, das sich im Laufe der Entwicklung vom ruhenden Primordialfollikel bis hin zum sprungreifen Follikel zunächst als flaches, einschichtiges Epithel, später als mehrschichtiges Epithel präsentiert. Eine Basalmembran trennt die GCs von den umgebenden Thekazellen.



Ovarieller Follikel. S: spinozelluläres Bindegewebe, Te: Theka externa, Ti: Theka interna, A: Antrum mit Follikelflüssigkeit, E: Eizelle, Z: Zona pellucida, G: Granulosazelle, Bl: Basallamina, Bg: Blutgefäß

GCs liegen damit in einem avaskulären Kompartiment des Follikels und bilden über Gap Junctions ein funktionelles Synzytium, das sowohl die Versorgung der Eizelle als auch den Austausch wichtiger Faktoren zur Reifung und Differenzierung des Follikelepithels gewährleistet. In Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden (Cecconi et al., 2004), dass die für die Ausbildung von Gap Junctions im Ovar wichtigen Connexine 43 und 37 notwendig sind, damit es zu einer ordnungsgemäßen Reifung von Follikeln und Eizellen kommen kann. GCs exprimieren das Enzym Aromatase und sind dadurch in der Lage, Androgene zu Östrogenen umzusetzen. Die Vorläufer werden von den Thekazellen aus Cholesterol synthetisiert und dann von den GCs in FSH-abhängiger Weise weiter zu Östrogenen verarbeitet, die unter anderem für das Voranschreiten des weiblichen Zyklus, Follikelselektion, Proliferation des Endometriums und schließlich die Auslösung der LH-Spitze und damit des Eisprungs verantwortlich sind.

Mit dem Eisprung setzt auch die Gelbkörperbildung (Luteinisierung) ein, wobei sich die Zellen der Theca interna und die im rupturierten Follikel verbliebenen GCs zu Theka- bzw. Granulosa-Luteinzellen (GLCs) differenzieren. Gefäße sprossen in das zuvor avaskuläre Follikelepithel ein und die ehemaligen GCs exprimieren jetzt selbst das gesamte enzymatische Arsenal, um aus Cholesterin Progesteron synthetisieren zu können.

Zur Durchführung von Studien an humanen GCs werden in der Regel Zellen verwendet, die nach der Eizellentnahme im Rahmen der In-Vitro-Fertilisation aus dem Follikelpunktat isoliert werden können. Die hormonelle Stimulation im Vorfeld der Entnahme bedingt, dass die zur Verfügung stehenden GCs bereits anfangen, sich zu GLCs zu differenzieren. Sie proliferieren kaum noch und sterben innerhalb weniger Tage (Bagnjuk & Mayerhofer, 2019). Oft lässt sich die dadurch begrenzte Anzahl an GLCs nur durch das Zusammenführen von Zellen unterschiedlicher Patientinnen auf ein für verschiedene Experimente genügend hohes Maß anheben.

Abhilfe schafft hier die Tumorzelllinie KGN, die das Rezidiv eines Granulosazelltumors (GCT) aus dem Jahr 1994 bei einer Patientin aus Japan zugrunde liegt (Nishi et al., 2001). KGN-Kulturen ermöglichen Untersuchungen an einer homogenen Zellpopulation, die sich stabil kultivieren lässt. Dass die

Zellen in wesentlichen Punkten ähnliche Eigenschaften aufweisen wie gesunde GCs (Nishi et al., 2001), macht sie zu einem nützlichen Modell, das auch Rückschlüsse auf die Physiologie des Follikelepithels zulässt.

Während reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in der Vergangenheit vor allem als Noxen galten, die im Rahmen von oxidativem Stress vermehrt in Erscheinung treten, wurde ihre Bedeutung für physiologische Prozesse in den letzten Jahren immer deutlicher. Sie sind für viele zelluläre Funktionen unerlässlich und erhalten eine lebenswichtige Redox-Homöostase aufrecht (Finkel, 2011; Reczek & Chandel, 2015; Schröder, 2019). Insbesondere H_2O_2 spielt eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, Zellmigration und im Metabolismus (Gough & Cotter, 2011; Rhee, 2006; Sies, 2017). Auch im Ovar scheinen ROS eine entscheidende Rolle zu spielen (Shkolnik et al., 2011). Bei H_2O_2 handelt es sich um einen vergleichsweise langlebigen Vertreter, der beim Menschen in der Follikelflüssigkeit nachgewiesen werden konnte (Elizur et al., 2014) und somit als lokales Signalmolekül in Frage kommt.

Als Quellen für endogene ROS spielen insbesondere NADPH Oxidasen (NOX) eine Rolle. NOX4 ist ein Membranprotein das H_2O_2 produziert und bereits in GLCs nachgewiesen werden konnte (Kampfer et al., 2014). In der Publikation „*The NADPH oxidase 4 is a major source of hydrogen peroxide in human granulosa-lutein and granulosa tumor cells*“ konnte dies bestätigt und die Bedeutung von NOX4 durch den Einsatz eines bekannten Blockers verdeutlicht werden. Bestimmte Aquaporine (AQP3, 8 und 9), die die Aufnahme von H_2O_2 begünstigen können (Bienert et al., 2007), konnten ebenfalls nachgewiesen werden. Durch Peroxy Orange 1 (PO1), einen zellpermeablen Fluoreszenzfarbstoff, der durch H_2O_2 aktiviert wird (Dickinson et al., 2010), konnte nach Stimulation ein Anstieg von intrazellulärem H_2O_2 nachgewiesen werden. Der Einsatz eines AQP-Blockers verringerte die Aufnahme von exogenem H_2O_2 . Die Ergebnisse der Arbeit liefern Hinweise dafür, dass H_2O_2 ein wichtiger und auto- und parakriner Botenstoff in der Physiologie von GCs sein könnte.

Trotzdem bleibt die Tatsache, dass ROS in höheren Konzentrationen zellschädigend sind, weshalb speziell H_2O_2 bereits als „Jekyll and Hyde Signalmolekül“ bezeichnet wurde (Gough & Cotter, 2011). Da sich aus GCs in

selteneren Fällen Tumore entwickeln können, stellt auch der schädigende und damit für Patienten potentiell günstige Effekt einen möglicherweise medizinisch relevanten Aspekt der Wirkung von H₂O₂ dar.

GCTs wachsen meist langsam und indolent. Rezidive sind häufig, auch wenn sie in der Regel erst in großem Abstand zur Resektion auftreten (Jamieson & Fuller, 2012). Aktuelle epidemiologische Daten sind nur schwer zu finden, da der Anteil von GCTs an allen ovariellen Tumoren nur sehr gering ist. Dieser wird in der Literatur mit bis zu 5% beziffert (Jamieson & Fuller, 2012; Li et al., 2018; Seagle et al., 2017). Eine Anfrage beim Tumorregister München (<https://tumorregister-muenchen.de/>), dessen Einzugsgebiet sich über Oberbayern und Landshut (insgesamt 4,94 Mio. Einwohner) erstreckt, ergab für den Zeitraum von 2008 bis 2019 einen Anteil von 2,8% (178 aus 6266) für das gesamte Einzugsgebiet und von 2,4% (27 aus 1107) für Fälle aus dem Pathologischen Institut der LMU München. In der Therapie gilt die vollständige Resektion als Mittel der Wahl, eine adjuvante Chemotherapie scheint keinen großen Effekt auf die Überlebensrate zu haben (Seagle et al., 2017).

Mit dem Transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) ist ein Kationenkanal bekannt, der durch H₂O₂ aktiviert werden kann und einerseits bei physiologischen Prozessen, andererseits aber auch in der Induktion des Zelltods eine wichtige Rolle spielt (An et al., 2019; Jiang et al., 2010; Kang et al., 2018; Miller, 2006). Bei der Apoptose handelt es sich um eine Form von programmiertem Zelltod, der durch unterschiedliche intra- und extrazelluläre Faktoren ausgelöst werden kann. Die Effektor-Caspasen 3,6 und 7 bilden die gemeinsame Endstrecke für den intrinsischen und den extrinsischen Weg der Apoptose. Ihre aktiven Formen spalten lebenswichtige Proteine der Zelle und initiieren die Fragmentierung der DNA, sodass es zu einem geordneten Absterben der Zelle kommt. Neben dem Nachweis von aktivierter Caspase 3 gibt es noch andere Indikatoren, die auf apoptotischen Zelltod hinweisen. Bei der Apoptose werden Phosphatidylserine (PS), die normalerweise nur auf der Innenseite von Zellmembranen vorkommen, nach außen transloziert und können so mittels fluoreszenzmarkiertem Annexin V detektiert werden (Telford et al., 2016). Außerdem verändert sich das mitochondriale Netzwerk im Rahmen der Apoptose. Auch wenn eine Fragmentierung der Mitochondrien durch viele verschiedene Umstände

ausgelöst werden kann, tritt sie insbesondere im Rahmen der Apoptose immer auf und kann so einen weiteren Hinweis für diese Zelltodform liefern (Suen et al., 2008).

In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, dass der durch die Aktivierung von TRPM2 bedingte Einstrom von Ca^{2+} Apoptose auslösen kann (An et al., 2019; Kang et al., 2018; Miller, 2006). Auch wenn der genaue Mechanismus der Aktivierung durch H_2O_2 noch nicht bekannt ist, stehen mit dem gut beschriebenen Blocker ACA und Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen Hilfsmittel zur Verfügung, um die Funktionalität des Kanals zu untersuchen. TRPM2 taucht in Zusammenhang mit GCs in der Literatur nur in den Einzelzell- RNA-Sequencing-Daten einer Arbeit an humanen GCs *in situ* auf (Zhang et al., 2018). Die Expression des Kanals in GCTs wurde nach unserer Kenntnis bisher noch nicht nachgewiesen.

In der Arbeit „*A Role for H_2O_2 and TRPM2 in the Induction of Cell Death: Studies in KGN cells*“ wurden der Effekt und ein möglicher Wirkmechanismus von supraphysiologischen H_2O_2 Konzentrationen auf GCTs genauer untersucht. Dabei zeigten sich sowohl bei Akkumulation von endogenem H_2O_2 als auch bei exogener Zufuhr Hinweise dafür, dass die Aktivierung von TRPM2 eine wichtige Rolle spielt. Der Akkumulation und Wirkung von endogenem H_2O_2 konnte durch das bekannte Antioxidans Trolox entgegengewirkt werden, bei exogener Zugabe zeigten sich konzentrationsabhängige H_2O_2 -Effekte. Die Ergebnisse der Arbeit liefern Hinweise dafür, dass GCTs mit einem System ausgestattet sind, das die Tumorzellen über Induktion von oxidativem Stress oder durch medikamentöse Aktivierung von TRPM2 in den Zelltod treiben könnte.

Die beiden vorliegenden Arbeiten sollen dazu beitragen, die Rolle von H_2O_2 in GCs und GCTs besser zu verstehen:

In der Publikation „*The NADPH oxidase 4 is a major source of hydrogen peroxide in human granulosa-lutein and granulosa tumor cells*“ liegt dabei das Augenmerk auf physiologischen Wirkungen und Mechanismen, in „*A Role for H_2O_2 and TRPM2 in the Induction of Cell Death: Studies in KGN cells*“ auf den Mechanismen, die H_2O_2 mit Zelltod verbinden.

Eigenanteil an den Publikationen

Publikation 1: The NADPH oxidase 4 is a major source of hydrogen peroxide in human granulosa-lutein and granulosa tumor cells.

Mein Beitrag zu dieser Arbeit war die Konzeption und Durchführung der Experimente im Zusammenhang mit Aquaporinen und der zellulären Aufnahme von H₂O₂. Sämtliche AQP-Primer wurden von mir entworfen, getestet und zur Identifizierung der verschiedenen AQPs in GLCs eingesetzt. Die Experimente zum Nachweis der H₂O₂-Aufnahme mittels PO1 und der Einsatz des AQP-Blockers Silbernitrat wurden von mir etabliert und durchgeführt. Zur Erstellung des Manuskripts habe ich durch die Beschreibung dieser Experimente sowie durch Korrekturlesen und Verbesserungsvorschläge beigetragen.

Publikation 2: A Role for H₂O₂ and TRPM2 in the Induction of Cell Death: Studies in KGN Cells.

Überlegungen zu den Ergebnissen verschiedener Vorversuche zur zweiten Arbeit mündeten in meiner Hypothese, dass ein durch H₂O₂ aktivierbarer Ionenkanal eine Erklärung liefern könnte. In der Literatur stieß ich auf TRPM2. Die Expression des Kanals konnte ich mittels eines von mir designten Primers nachweisen. Zellkulturarbeiten und Messungen von Zellzahlen, Viabilität und Konfluenz sowie von H₂O₂ in Überständen wurden von mir durchgeführt. Für die FACS-Analyse bereitete ich die Zellen vor, Vorversuche und Messungen zu den veröffentlichten Ergebnissen machte ich in Zusammenarbeit mit der Core Facility Flow Cytometry des Biomedizinischen Centrums der LMU. Das Calcium Imaging etablierte ich auf Grundlage von Erfahrungen, die Katja Eubler mit dem Einsatz des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes in Zellen aus humanen Hoden gesammelt hatte. Die entsprechenden Messungen sowie die Experimente zur Untersuchung der mitochondrialen Netzwerke von KGNs wurden von mir durchgeführt. Alle immunhistologisch gefärbten Schnitte auf den Tissue-Microarrays wurden von mir aufgenommen und ausgewertet. Sämtliche Abbildungen wurden von mir erstellt. Das Manuskript schrieb ich zusammen mit Prof. Dr. med. Artur Mayerhofer, wobei wir durch das Korrekturlesen und hilfreiches Feedback aller Ko-Autoren unterstützt wurden.

Zusammenfassung

Für die Publikation *“The NADPH oxidase 4 is a major source of hydrogen peroxide in human granulosa-lutein and granulosa tumor cells“* (Buck et al., 2019) wurden Herkunft und Auswirkungen von H₂O₂ in humanen luteinisierten Granulosazellen (GLCs) und der humanen Granulosazelltumorzelle KGN untersucht. Dabei konnte mittels PCR, Western blot (WB) und Immunhistochemie gezeigt werden, dass NADPH Oxidase 4 (NOX4) sowohl *in vitro* in GLCs und KGN als auch *in vivo* in Granulosazellen (GCs) von präantralen und antralen ovariellen Follikeln exprimiert wird. Eine Stimulation von GLCs mit FSH oder hCG hatte keine Auswirkung auf die Expressionslevels von NOX4, was auf eine konstitutive Aktivität dieses Enzyms hinweist. Die Behandlung von GLCs und KGN mit dem NOX4-Blocker GKT137831 führte zu verminderten H₂O₂-Konzentrationen in den Überständen. Bei den KGN zeigte der Einsatz des Blockers eine anti-proliferative Wirkung. Eine Stimulation mit H₂O₂ führte zu einer verstärkten Phosphorylierung der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) in GLCs. Die auch als Peroxiporine bezeichneten Aquaporine (AQPs) 3, 8 und 9 können die Aufnahme von H₂O₂ in Zellen begünstigen. GLCs exprimieren diese Kanäle und die Aufnahme von H₂O₂ konnte durch den AQP-Blocker AgNO₃ verringert werden. Die Versuchsergebnisse weisen auf eine wichtige Funktion von NOX4 und ihrem Produkt H₂O₂ in der Regulation von GCs hin. H₂O₂ könnte dabei als auto- und parakrines Signalmolekül dienen.

In der Publikation *„A Role for H₂O₂ and TRPM2 in the Induction of Cell Death: Studies in KGN Cells“* (Hack et al., 2019) wurde beschrieben, dass sowohl die Akkumulation von endogenem H₂O₂ als auch die Zugabe von H₂O₂ Zelltod in KGN auslösen können. Die Expression von NOX4 sowie die endogene Produktion von H₂O₂ durch KGN konnten bestätigt werden. Fetales Kälberserum ist ein gebräuchlicher Zusatz für Kulturmedien, das neben einer Vielzahl günstiger Faktoren auch antioxidative Kapazität aufweist (Lewinska et al., 2007). Bei Kultivierung von KGN in serumfreiem Medium fiel nach etwa 40 Stunden die Konfluenz deutlich ab, während sie unter der antioxidativen Wirkung von Trolox weiter anstieg. Nach 72 Stunden zeigten sich bei den mit Trolox behandelten Zellen neben deutlich höherer Zellzahl und Viabilität auch eine verringerte H₂O₂-Konzentration im Überstand. In der FACS-Analyse war der Anteil an Zellen, die

Marker für die Apoptose (PS/Annexin V, s. Einleitung) aufwiesen, nach 72 Stunden 4,1-fach höher als nach 24 Stunden. War das Medium mit Trolox versetzt, so fiel der Anteil nach 72 Stunden im Vergleich zu unbehandelten Zellen um 37,9% niedriger aus. Auch bei der Messung eines anderen Apoptosemarkers (clCASP3) mittels WB zeigte sich eine signifikante Reduktion durch das Antioxidans. Stimulation der Zellen mit exogenem H₂O₂ führte innerhalb von 24 Stunden zu einer im Vergleich zur Kontrolle 11,4-fachen Erhöhung des Anteils an apoptotischen Zellen (FACS). Daneben konnte nach Zugabe von H₂O₂ auch eine Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks von KGN beobachtet werden, ein weiterer Hinweis auf Apoptose. Der Transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) ist ein Ca²⁺-permeabler Kationenkanal, der von H₂O₂ aktiviert werden kann. Mittels PCR wurde die Expression von TRPM2 in KGN nachgewiesen. Die Funktionalität des Kanals konnte anhand eines reversiblen und blockierbaren Anstiegs von intrazellulärem Ca²⁺ (Fluoforte®) gezeigt werden. Schließlich wurden auch 73 primäre GCTs auf Tissue-Microarrays aus dem Pathologischen Institut der LMU immunhistochemisch untersucht. Sie exprimierten allesamt sowohl NOX4, als auch TRPM2. Die Ergebnisse der Arbeit deuten darauf hin, dass GCTs mit einem System ausgestattet sind, das von therapeutischer Relevanz sein könnte. Sie legen TRPM2 als ein mögliches Ziel medikamentöser Behandlung nahe. Sowohl die Aktivierung von TRPM2 als auch die Induktion von oxidativem Stress könnten zum Absterben von GCT Zellen führen und sich deshalb in der Tumorthherapie als günstig erweisen.

Summary

For the publication “*The NADPH oxidase 4 is a major source of hydrogen peroxide in human granulosa-lutein and granulosa tumor cells*” (Buck et al., 2019), origin and effects of H₂O₂ in luteinizing human granulosa cells (GLCs) and the human granulosa tumor cell line KGN were examined. By employing PCR, Western blot (WB) and immunohistochemistry, expression of NADPH oxidase 4 (NOX4) could be detected *in vitro* in GLCs and KGN and *in vivo* in granulosa cells (GCs) of preantral and antral ovarian follicles. Stimulation of GLCs with FSH or hCG did not affect NOX4 expression levels, suggesting a constitutive activity of this enzyme. Treatment of GLCs and KGN with NOX4 blocker GKT137831 resulted in lower H₂O₂ concentrations in the supernatants. The blocker showed an anti-proliferative effect on KGN. Stimulation with H₂O₂ lead to an increase in phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPK) in GLCs. Aquaporins (AQPs) 3, 8 and 9, also known as peroxiporins, are able to facilitate uptake of extracellular H₂O₂. GLCs express these channels and H₂O₂ uptake could be reduced by AQP blocker AgNO₃. These observations suggest that NOX4 and its product H₂O₂, which may serve as an auto- and paracrine signaling molecule, could play an important physiological role in GC regulation.

The publication „*A Role for H₂O₂ and TRPM2 in the Induction of Cell Death: Studies in KGN Cells*“ (Hack et al., 2019) describes that both accumulation of endogenous H₂O₂ and addition of H₂O₂ can cause cell death in KGN. Expression of NOX4 and endogenous production of H₂O₂ by KGN were confirmed. Fetal calf serum is a commonly used additive to culture media which, besides many other beneficial factors, has antioxidative capacity (Lewinska et al., 2007). When KGN were cultivated in serum-free medium, confluence markedly dropped after 40 hours while it kept increasing under the antioxidative effect of Trolox. After 72 hours cells that were treated with Trolox showed higher cell counts and viability and lower concentrations of H₂O₂ in the supernatants. FACS-analysis revealed a 4.1-fold higher share of cells presenting markers of apoptosis (PS/Annexin V, see introduction) after 72 hours compared to 24 hours. When the medium was supplemented with Trolox, the share after 72 hours was 37.9% lower than the one of untreated cells. Quantification of another marker of apoptosis (cIcASP3) by WB showed a significant reduction by the antioxidant, as well. Stimulation with

exogenous H₂O₂ resulted in a 11.4-fold higher share of apoptotic cells (FACS) after 24 hours compared to control. Furthermore, fragmentation of the mitochondrial network could be observed after addition of H₂O₂, which is another indicator for apoptosis. Transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) is a Ca²⁺-permeable cation channel that can be activated by H₂O₂. TRPM2 expression was detected by PCR. Functionality could be proven by a transient and blockable increase of intracellular Ca²⁺ (Fluoforte®). Finally, 73 primary GCTs on tissue microarrays from the LMU Institute for Pathology were examined immunohistochemically. All of them expressed both NOX4 and TRPM2. The results presented in this publication provide evidence that GCTs are endowed with a system that could be of therapeutic relevance. They propose TRPM2 as a potential drug target. Both activation of TRPM2 and induction of oxidative stress could result in death of GCT cells and therefore be beneficial in tumor therapy.

Literaturverzeichnis

- An, X., Fu, Z., Mai, C., Wang, W., Wei, L., Li, D., . . . Jiang, L. H. (2019). Increasing the TRPM2 Channel Expression in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells Augments the Susceptibility to ROS-Induced Cell Death. *Cells*, *8*(1). doi:10.3390/cells8010028
- Bagnjuk, K., & Mayerhofer, A. (2019). Human Luteinized Granulosa Cells-A Cellular Model for the Human Corpus Luteum. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *10*, 452. doi:10.3389/fendo.2019.00452
- Bienert, G. P., Moller, A. L., Kristiansen, K. A., Schulz, A., Moller, I. M., Schjoerring, J. K., & Jahn, T. P. (2007). Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem*, *282*(2), 1183-1192. doi:10.1074/jbc.M603761200
- Buck, T., Hack, C. T., Berg, D., Berg, U., Kunz, L., & Mayerhofer, A. (2019). The NADPH oxidase 4 is a major source of hydrogen peroxide in human granulosa-lutein and granulosa tumor cells. *Sci Rep*, *9*(1), 3585. doi:10.1038/s41598-019-40329-8
- Cecconi, S., Ciccarelli, C., Barberi, M., Macchiarelli, G., & Canipari, R. (2004). Granulosa cell-oocyte interactions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, *115 Suppl 1*, S19-22. doi:10.1016/j.ejogrb.2004.01.010
- Dickinson, B. C., Huynh, C., & Chang, C. J. (2010). A palette of fluorescent probes with varying emission colors for imaging hydrogen peroxide signaling in living cells. *J Am Chem Soc*, *132*(16), 5906-5915. doi:10.1021/ja1014103
- Elizur, S. E., Lebovitz, O., Orvieto, R., Dor, J., & Zan-Bar, T. (2014). Reactive oxygen species in follicular fluid may serve as biochemical markers to determine ovarian aging and follicular metabolic age. *Gynecol Endocrinol*, *30*(10), 705-707. doi:10.3109/09513590.2014.924100
- Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol*, *194*(1), 7-15. doi:10.1083/jcb.201102095
- Gough, D. R., & Cotter, T. G. (2011). Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell Death Dis*, *2*, e213. doi:10.1038/cddis.2011.96
- Hack, C. T., Buck, T., Bagnjuk, K., Eubler, K., Kunz, L., Mayr, D., & Mayerhofer, A. (2019). A Role for H₂O₂ and TRPM2 in the Induction of Cell Death: Studies in KGN Cells. *Antioxidants (Basel)*, *8*(11). doi:10.3390/antiox8110518
- Jamieson, S., & Fuller, P. J. (2012). Molecular pathogenesis of granulosa cell tumors of the ovary. *Endocr Rev*, *33*(1), 109-144. doi:10.1210/er.2011-0014
- Jiang, L. H., Yang, W., Zou, J., & Beech, D. J. (2010). TRPM2 channel properties, functions and therapeutic potentials. *Expert Opin Ther Targets*, *14*(9), 973-988. doi:10.1517/14728222.2010.510135
- Kampfer, C., Saller, S., Windschuttl, S., Berg, D., Berg, U., & Mayerhofer, A. (2014). Pigment-Epithelium Derived Factor (PEDF) and the human ovary: a role in the generation of ROS in granulosa cells. *Life Sci*, *97*(2), 129-136. doi:10.1016/j.lfs.2013.12.007
- Kang, P., Zhang, W., Chen, X., Yi, X., Song, P., Chang, Y., . . . Li, S. (2018). TRPM2 mediates mitochondria-dependent apoptosis of melanocytes under oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, *126*, 259-268. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.022

- Lewinska, A., Wnuk, M., Slota, E., & Bartosz, G. (2007). Total anti-oxidant capacity of cell culture media. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, *34*(8), 781-786. doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04637.x
- Li, J., Bao, R., Peng, S., & Zhang, C. (2018). The molecular mechanism of ovarian granulosa cell tumors. *J Ovarian Res*, *11*(1), 13. doi:10.1186/s13048-018-0384-1
- Miller, B. A. (2006). The role of TRP channels in oxidative stress-induced cell death. *J Membr Biol*, *209*(1), 31-41. doi:10.1007/s00232-005-0839-3
- Nishi, Y., Yanase, T., Mu, Y., Oba, K., Ichino, I., Saito, M., . . . Nawata, H. (2001). Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN, that expresses functional follicle-stimulating hormone receptor. *Endocrinology*, *142*(1), 437-445. doi:10.1210/endo.142.1.7862
- Reczek, C. R., & Chandel, N. S. (2015). ROS-dependent signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*, *33*, 8-13. doi:10.1016/j.ceb.2014.09.010
- Rhee, S. G. (2006). Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*, *312*(5782), 1882-1883. doi:10.1126/science.1130481
- Schröder, K. (2019). NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: Dosis facit venenum. *Exp Physiol*, *104*(4), 447-452. doi:10.1113/EP087125
- Seagle, B. L., Ann, P., Butler, S., & Shahabi, S. (2017). Ovarian granulosa cell tumor: A National Cancer Database study. *Gynecol Oncol*, *146*(2), 285-291. doi:10.1016/j.ygyno.2017.05.020
- Shkolnik, K., Tadmor, A., Ben-Dor, S., Nevo, N., Galiani, D., & Dekel, N. (2011). Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(4), 1462-1467. doi:10.1073/pnas.1017213108
- Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol*, *11*, 613-619. doi:10.1016/j.redox.2016.12.035
- Suen, D. F., Norris, K. L., & Youle, R. J. (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev*, *22*(12), 1577-1590. doi:10.1101/gad.1658508
- Telford, W., Tamul, K., & Bradford, J. (2016). Measurement and Characterization of Apoptosis by Flow Cytometry. *Curr Protoc Cytom*, *77*, 9 49 41-49 49 28. doi:10.1002/cpcy.1
- Zhang, Y., Yan, Z., Qin, Q., Nisenblat, V., Chang, H. M., Yu, Y., . . . Yan, L. (2018). Transcriptome Landscape of Human Folliculogenesis Reveals Oocyte and Granulosa Cell Interactions. *Mol Cell*, *72*(6), 1021-1034 e1024. doi:10.1016/j.molcel.2018.10.029

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Artur Mayerhofer und PD Dr. Lars Kunz für die Überlassung des Themas bedanken. Obwohl ich kaum wissenschaftliche Erfahrung mitgebracht habe, wurde mir die Möglichkeit geboten, eine „richtige“ Doktorarbeit zu schreiben. Ich durfte verschiedene Methoden erlernen, mit der Zeit immer selbständiger arbeiten und auch eigene Ideen entwickeln und verfolgen. Auf Ihre Unterstützung und Expertise konnte ich mich immer verlassen. Vielen Dank!

Ohne das wundervolle Team der AG Mayerhofer wäre die Arbeit nicht möglich gewesen. Ich kann mir keine bessere Arbeitsumgebung vorstellen, was sicher maßgeblich an Prof. Dr. Mayerhofer liegt, aber auch an jedem einzelnen Mitarbeiter. Ich bedanke mich für die Zeit, die Ihr in meine Einarbeitung investiert habt und dafür, dass Ihr mir immer mit Rat und Tat zur Seite standet. Insbesondere Dr. Theresa Buck, Dr. Konstantin Bagnjuk, Katja Eubler und Kim Dietrich haben mir sehr viel beigebracht und mich so vielseitig unterstützt, dass ein paar wenige Zeilen das gar nicht abbilden könnten. Durch Kim Dietrich kam der Kontakt zu Prof. Dr. Mayerhofer überhaupt erst zustande, sodass ich dafür hier noch einmal gesondert meinen Dank ausdrücken möchte. Für ihre großartige Hilfe möchte ich auch Karin Metzrath, Astrid Tiefenbacher, Annika Missel, Verena Kast, Melanie Kaseder, Carola Hermann, Dr. Nina Schmid, Dr. Lena Walenta und Dr. Harald Welter danken.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Dieter Berg, Dr. Ulrike Berg und dem Team des A.R.T. Bogenhausen für die Bereitstellung von Granulosazellen und bei Prof. Dr. Doris Mayr für die Tissue Microarrays bedanken. Vielen Dank auch an Dr. Toshihiko Yanase für die Genehmigung, die KGN Tumorzelllinie verwenden zu dürfen.

Der Weg zur Promotion beginnt bekanntlich nicht erst mit dem Beginn der Forschungsarbeit und so möchte ich hier ganz besonders den Menschen danken, die wirklich von Anfang an dabei waren: meinen Eltern, Walter und Dagmar Hack. Danke für all die Kraft und Zeit, die Ihr aufgewendet habt, um mir

diesen Weg zu ermöglichen. Ich kann mich noch gut daran erinnern, wie Du, Mama, dich mit mir an den Tisch gesetzt hast, weil ich meine Hausaufgaben sonst nie gemacht hätte. Du, Papa, hast hart gearbeitet, damit es uns an nichts mangelt und Ihr habt mich beide in jeder Hinsicht voll unterstützt – Ihr habt sogar selbst Rudern gelernt, weil Ihr ohnehin fast jeden Tag mit mir beim Ruderclub wart! Ob in Schule und Studium, beim Sport oder in großen Lebensfragen, immer standet Ihr liebevoll hinter mir.

Wie Ihr euch in meinen kleinen Bruder investiert, bestätigt mich umso mehr in der Überzeugung, dass es keine besseren Eltern geben kann. Jonathan, auch wenn du jetzt mit 11 Jahren die Buchstaben nur einzeln lesen kannst, sollst Du trotzdem wissen, dass Du unser Goldschatz bist und eine Bereicherung für uns als Familie und alle, die Dich kennen. Ich könnte mir keinen lieberen Bruder vorstellen!

Danke an meine lieben Freunde und Glaubensgeschwister, die mein Leben so bereichern und die Arbeit im Gebet mitgetragen haben. Ein besonderer Dank gilt auch allen meinen WG- und fast-WG-Kollegen, Benedikt und Johanna, Tobi, Raphi, Ferdi, Basti, Tiffy, Johannes, Hanso, Christopher, Markus, Tim und Aaron, die eine so wichtige Rolle in meiner Zeit in München gespielt haben und spielen. Ohne Euch wäre mir sicher so manches Mal die Decke auf den Kopf gefallen.

Mein besonderer Dank gilt auch Dir, liebe Miri, die Du die Arbeit zwar noch nicht ganz so lange begleitest, mir aber nochmal einen großen Motivationsschub zur Fertigstellung gegeben und so manches überflüssige Komma und fehlende r entdeckt hast =)

Danke auch an den Deutschen Staat, der durch sein Bundesausbildungsförderungsgesetz (BAföG) Chancengleichheit im Bildungsweg ermöglichen will und auch mein Studium mitfinanziert hat. Wo in anderen Ländern hohe Gebühren für das Studium zu entrichten sind, bekommt man hierzulande sogar Unterstützung für den Lebensunterhalt, damit zusätzliche Kosten, die etwa durch einen Wohnortwechsel entstehen, den Bildungszielen nicht entgegenstehen.

Danke, Gott, für die wunderbare Familie und die lieben Freunde, die Du mir geschenkt hast. Danke, dass ich in einem Land aufwachsen darf, in dem jeder Menschen zählt und in dem Frieden herrscht. Danke, dass ich gesund sein darf, dass Du mir eine gute Auffassungsgabe gegeben und bis hierher geholfen hast. Danke, dass ich mich aufgrund von Jesus nicht vor Dir fürchten muss, sondern Dich Vater nennen darf. Danke, dass Du Frieden und Freude und Hoffnung gibst, die nicht von Umständen abhängig sind