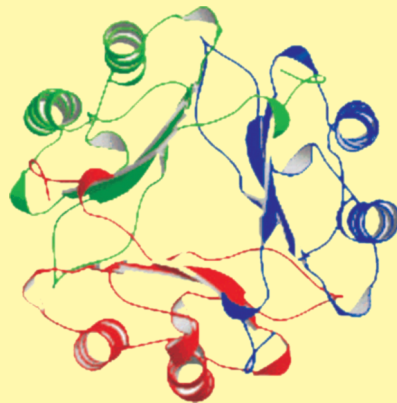


**MOLEKULARE WIRKMECHANISMEN DES ZYTOKINS
MAKROPHAGEN-MIGRATIONS-INHIBITIONS-FAKTOR
BEI DER INTERAKTION TESTIKULÄRER ZELLEN**

MIRIAM ELISABETH RODEWALD
geb. WIEGAND



INAUGURALDISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES
DOKTORS DER MEDIZIN
DES FACHBEREICHES MEDIZIN DER
JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIESSEN

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2005

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Wettenberg
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Molekulare Wirkmechanismen des Zytokins Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor bei der Interaktion testikulärer Zellen

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

vorgelegt von
Miriam Elisabeth Rodewald, geb. Wiegand
aus Essen

Giessen 2005

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. W. Kummer
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

Gutachter:	Prof. Dr. A. Meinhardt
Gutachter:	PD Dr. E. Hauck
Vorsitzender der Prüfungskommission:	Prof. Dr. R Geyer
Prüfungsmitglied:	Prof. Dr. J. Kießling

Tag der Disputation:	16.09.2005
----------------------	------------

Meiner Familie in Liebe gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungen	4
2. Einleitung.....	7
2.1. Hoden	7
2.1.1. Mikroskopischer Aufbau des Hodens	7
2.1.2. Struktur und Funktion der Peritubulärzellen	8
2.1.3. Endokrine und parakrine Regulation im Hoden	10
2.2. Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF)	12
2.2.1. Entdeckung	12
2.2.2. Struktur	12
2.2.3. Funktion, Wirkung und Lokalisation des Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktors	13
2.2.3. Der Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor im Hoden	15
2.3. Signalkaskaden	16
2.3.1. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	16
2.3.2. Rezeptoren mit assoziierter Tyrosinkinase	19
2.3.3. Ionenkanal-gekoppelte Rezeptoren	20
2.3.4. Rezeptoren mit intrinsischer Aktivität.....	21
2.4. Zielsetzung der Arbeit	22
3.1. Material.....	23
3.1.1 Zellkultur	23
3.1.2. Reagenzien, Chemikalien.....	24
3.1.3 Vektoren und Kits	25
3.1.4 Geräte	25
4. Methoden.....	26
4.1. Zellbiologische Methoden.....	26
4.1.1. Isolierung von testikulären Peritubulärzellen	26
4.1.2. Kultivierung von Peritubulärzellen	27
4.1.3. Abtrypsinieren von Peritubulärzellen	28
4.1.4. Einfrieren von Peritubulärzellen.....	28
4.1.5. Auftauen von Peritubulärzellen.....	28
4.1.6. Zählen von Zellen	29

4.1.7. Transfektion der Peritubulärzellen	29
4.1.8. Untersuchungen zur Lokalisation der Proteinkinase C- β nach Stimulation mit MIF	30
4.1.9. Fixierung der Peritubulärzellen	31
4.1.10. Luciferase-Assay	31
4.2. Biochemische Methoden	32
4.2.1. Extraktion der Luciferase	32
4.2.2. Luciferase-Messung	32
4.2.3. Amidoblack- Proliferationsassay.....	32
4.2.4. Messung des zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP)	33
4.2.5. Proteinbestimmung.....	34
4.3. Molekularbiologische Methoden	35
4.3.1. Herstellung kompetenter Zellen.....	35
4.3.2. Bakterientransformation	35
4.3.3. Plasmidpräparation.....	36
4.3.4. Minipräparation.....	36
4.3.5. Spektrophotometrische Bestimmung der Nukleinsäure- Konzentration.....	37
4.3.6. Restriktionsanalyse	38
4.3.7. DNA-Gelelektrophorese (Agarose-Gel)	38
4.3.8. RNA-Gewinnung.....	40
4.3.9. RNA-Gelelektrophorese	40
4.3.10. Atlas Array	41
4.3.10.1. Sonden-Synthese	41
4.3.10.2. Säulen-Chromatographie	42
4.3.12. Hybridisierung.....	42
5. Ergebnisse	44
5.1. Zellkulturexperimente	44
5.1.1. Kultivierung von Peritubulärzellen.....	44
5.1.2. Transfektion der Peritubulärzellen	44
5.1.3. Untersuchung zur Lokalisation der Proteinkinase C- β (PKC β) in Peritubulärzellen	45
5.2. Einfluß von MIF auf die intrazelluläre cAMP- Konzentration der Peritubulärzellen	48

5.3. Proliferative Wirkung von MIF auf Peritubulärzellen	50
5.4. Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP1 und ELK-1.....	51
5.7. DNA-Anreicherung	54
5.8. cDNA-Array	54
6. Diskussion	58
6.1. Signaltransduktion des Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktors	58
6.1.1. Untersuchungen zur molekularen Wirkungsweise von MIF auf Zellen	58
6.1.2. Untersuchungen zur Aktivierung des MAP-Kinase- Signaltransduktionsweges durch MIF.....	60
6.1.3. Untersuchungen zur Aktivierung der Proteinkinase C β durch MIF	63
6.1.4. Untersuchungen zur Steigerung der Zellproliferation durch MIF	64
6.2. Hypothese zur molekularen und biologischen Wirkung von MIF in Peritubulärzellen	65
6.3. Diskussion der Methodik	68
6.3.1. Zellkultur primärer Peritubulärzellen	68
6.3.2. Transfektion der Peritubulärzellen	68
6.3.3. Amidoblack-Assay	69
6.4. Ausblick.....	70
7. Zusammenfassung.....	71
7.1. Zusammenfassung	71
7.2. Summary	72
8. Literaturverzeichnis	74
9. Anhang.....	86
9.1. Lebenslauf.....	86
9.2. Danksagung	89
9.3. Ehrenwörtliche Erklärung	90

1. Abkürzungen

Å	Ångström
Abb.	Abbildung
ABP	androgenbindendes Protein
A. dest.	destilliertes Wasser
ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
bp	base pairs (Basenpaare)
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CL-	Chlorid
cm ²	Quadratzentimeter
DAG	Diacylglycerol
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
dNTPs	Desoxyribonucleotide
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDS	Ethan-Dimethan-Sulfonat
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	extracellular signal-regulated kinase
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FKS	fetales Kälberserum

FSH	follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Green-fluorescent protein (Grün-fluoreszierendes Protein)
GnRH	gonadotropinfreisetzendes Hormon
GTP	Guanosintriphosphat
h	hour(s) [Stunde(n)]
IgG	Immunglobulin G
IP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
K ⁺	Kalium
K-Ac	Kalium-Acetat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
l	Liter
LH	luteinisierendes Hormon
m	Meter
M	molar
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
Mg ²⁺	Magnesium
mg	Milligramm
MIF	Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	messenger ribonucleic acid
msek	Millisekunden
MW	molecular weight (Molekulargewicht)
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
Na ⁺	Natrium
nm	Nanometer

OD _n	optische Dichte (Index n gibt Wellenlänge an, bei der gemessen wurde)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PTC	Peritubulärzellen
rek. MIF	rekombinantes MIF
RNA	ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde(n)
TCA	Trichlor-acetic-acid (Trichloressigsäure)
TGF	Transforming Growth Factor
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Units
üN	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen

2. Einleitung

2.1. Hoden

Die Hoden (Testes) stellen den Anteil der männlichen Fortpflanzungsorgane dar, welcher die Keimzellen und die männlichen Geschlechtshormone (Androgene) produziert (Weinbauer et al., 1996). Bei Säugetieren liegen die Hoden immer paarweise vor und werden von einer Bindegewebskapsel, der Tunica albuginea, umgeben (Setchell et al., 1994).

2.1.1. Mikroskopischer Aufbau des Hodens

Der Hoden besteht aus den Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) und dem sie umgebenden interstitiellen Gewebe, welches neben den Blut- und Lymphgefäßen auch die Nerven des Hodenparenchyms enthält. In dem aus lockerem Bindegewebe aufgebauten Interstitium befinden sich auch die Testosteron-produzierenden Leydig-Zellen und die Leukozyten, vor allem Makrophagen, Lymphozyten und Monozyten (Hedger MP, 1997; Setchell et al., 1994; Weinbauer et al., 1996). Es wird vermutet, dass die Makrophagen im Hoden Zytokine sezernieren, welche die Entwicklung der Leydig-Zellen beeinflussen und deren Steroidproduktion regulieren. Die immunologische Relevanz der interstitiellen Makrophagen im Hoden ist dagegen noch weitgehend unklar (Weinbauer et al., 1996).

Die Tubuli seminiferi enthalten das Keimepithel und bilden stark gewundene Schlingen, deren beiden Enden in das Rete testis übergehen (Setchell et al., 1994). Von dort gelangen die Spermatozoen in den Nebenhoden (Epididymis), über den sie dann den Samenleiter (Ductus deferens) erreichen.

Das Keimepithel besteht aus Keimzellen und Sertoli-Zellen. Die Sertoli-Zellen liegen der Basalmembran auf und reichen bis an das Tubuluslumen. Sie bilden das Stützgerüst des Keimepithels und sorgen für die Erhaltung eines speziellen Milieus, das für den Ablauf der Meiose und die Spermienentwicklung notwendig ist. Außerdem sezernieren sie Flüssigkeit, durch die das Tubuluslumen

aufrechterhalten wird (Weinbauer et al., 1996). Die Keimzellen sind haploide Zellen. Da sie vom Immunsystem als Fremd-Antigene erkannt werden würden, ist das Vorhandensein einer Barriere notwendig, die die Keimzellen vor den Zugriffen des Immunsystems schützt. Diese Barriere, auch Blut-Hoden-Schranke genannt, wird durch die benachbarten Sertoli-Zellen gebildet, indem diese „tight-junctions“ untereinander ausbilden (Weinbauer et al., 1996).

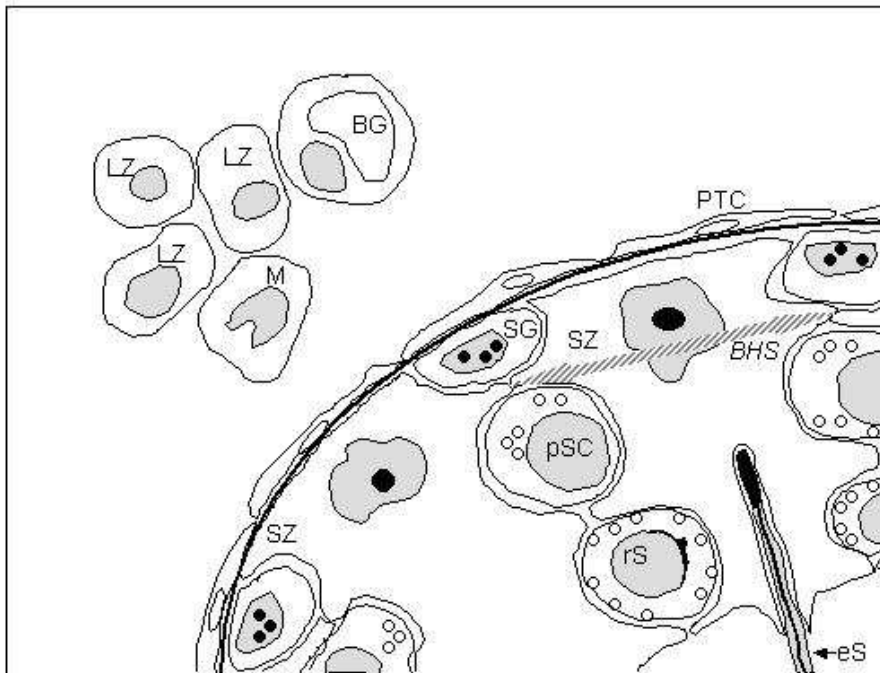


Abb.2.1.1.: Schema eines Tubulusanschnittes mit Interstitium. Im interstitiellen Bindegewebe befinden sich Leydig-Zellen (LZ), Makrophagen (M) und Blutgefäße (BG). Die Peritubulärzellen (PTC) umgeben die Tubuli. In den Tubuli befindet sich das Keimepithel mit Sertoli-Zellen (SZ), Spermatogonien (SG), primären Spermatozyten, runden Spermatotiden (rS) und elongierten Spermatiden (eS). Die Sertoli-Zellen bilden die Blut-Hoden-Schranke (BHS) (nach Schlatt et al., 1997).

2.1.2. Struktur und Funktion der Peritubulärzellen

Die Wand der Samenkanälchen besteht aus einer Basalmembran mit einer Kollagenfaserschicht und den Peritubulärzellen (PTC) (Weinbauer et al., 1996). Während die Peritubulärzellschicht bei Nagern einschichtig ist, kommen beim Menschen und Affen 5-7 Schichten vor, wobei die inneren 3-4 Schichten aus

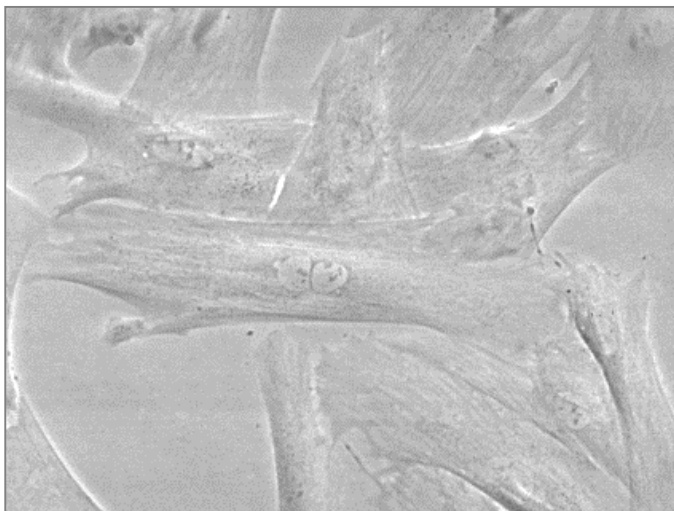
Myofibroblasten und die äußeren 2-3 Schichten aus Fibroblasten bestehen (Setchell et al., 1994; Galdieri et al., 1998).

Die myoiden Zellen sind in der Lage, sich spontan zu kontrahieren und dadurch peristaltische Bewegungen der Tubuli seminiferi zu bewirken, durch welche die Samenfäden in die Richtung der Ausführungsgänge befördert werden (Weinbauer et al., 1996). Eine Funktion der PTC als Stoffwechselbarriere konnte bei der Laborratte nachgewiesen werden, scheint beim Menschen aber aufgrund von Untersuchungen an Primaten eher unwahrscheinlich (Weinbauer et al., 1996).

PTC sind mesenchymaler Herkunft und bilden eine polygonale Form mit ausgestrecktem Zytoplasma, in dessen Zentrum sich der Kern hervorwölbt (Anthony et al., 1989). In Kultur bilden sie flache Monolayer.

PTC enthalten α -Aktin, welches Aktinfasern bildet, die bei lichtmikroskopischer Betrachtung erkennbar sind. Sie sezernieren unter anderem extrazelluläre Matrixkomponenten und Wachstumsfaktoren (Tung et al., 1984; Skinner et al., 1985 a/b; Skinner et al., 1989 a/b; Maekawa et al., 1996).

Bei den Ratten nimmt die Proliferation der PTC drei Wochen nach der Geburt rapide ab (Palombi et al., 1992). Aus diesem Grunde werden die PTC zur Kultivierung aus immaturren Ratten vor dem 21. Lebenstag isoliert.



*Abb.2.1.2.:
Phasenkontrastmikroskopische
Darstellung von Peritubulärzellen
in Kultur. Die PTC haben eine
polygonale Gestalt. In ihrem
Zytoplasma sind die
charakteristischen Aktin-Fasern
zu erkennen.*

2.1.3. Endokrine und parakrine Regulation im Hoden

Die Spermatogenese ist ein komplexer Vorgang, welcher durch endokrine und parakrine Mechanismen reguliert wird (de Kretser DM, 1998). Während endokrine Faktoren über die Blutbahn zu ihrem Zielgewebe gelangen, diffundieren parakrine Faktoren durch das Gewebe zu ihren Zielzellen.

Die endokrine Steuerung des Hodens erfolgt über den Hypothalamus und die Hypophyse. In den Neuronen des Hypothalamus wird das gonadotropinreisetzende Hormon (GnRH) gebildet und pulsatil in das hypophysäre Pfortadersystem sezerniert (Weinbauer et al., 1999). GnRH bewirkt eine ebenfalls pulsatile Freisetzung des luteinisierenden Hormons (LH) und des follikelstimulierenden Hormons (FSH) aus der Adenohypophyse (Conn et al., 1991).

Über den Blutweg erreichen LH und FSH den Hoden. Hier induziert LH die Testosteronsynthese in den Leydig-Zellen und stimuliert dessen Freisetzung, während FSH über die Sertoli-Zellen die Spermatogenese trophisch beeinflusst. Sowohl LH und Testosteron als auch FSH sind notwendig für die Entwicklung und den Erhalt einer normalen Spermatogenese (Weinbauer et al., 1999). Da Keimzellen weder Testosteron- noch FSH-Rezeptoren besitzen, müssen sie über parakrine Faktoren mit den Sertoli- und Peritubulärzellen kommunizieren (França et al., 1998). Als parakrine testikuläre Regulatoren werden eine Vielzahl von Substanzen diskutiert, die an der lokalen Regulation der Spermatogenese beteiligt sind.

Einer der am besten untersuchten Faktoren, der sowohl parakrin als auch endokrin wirksam ist, ist das Testosteron. Endokrin wirkt es sowohl auf den Hypothalamus, indem es die GnRH-Pulsfrequenz und -amplitude senkt, als auch auf die Hypophyse, in der es die LH- und in hohen Dosen auch die FSH-Freisetzung hemmt. Testikulär wirkt es autokrin auf die Leydig-Zellen, in denen es die weitere Testosteron-Freisetzung hemmt, und parakrin auf Sertoli- und Peritubulärzellen. Die Sertoli-Zellen synthetisieren das Androgen-bindende Protein (ABP) und regulieren hierdurch den Transport von Testosteron und seinem ebenfalls wirksamen Metaboliten, dem Dihydrotestosteron (DHT), in die Tubulusflüssigkeit. In den Tubuli beeinflusst Testosteron die Proteinsynthese

und -freisetzung (Sharpe et al., 1992 ; Keck et al., 1997 ; Weinbauer et al., 1999).

Zu den die Spermatogenese regulierenden Wachstumsfaktoren gehören unter anderen auch Inhibin und Aktivin, beides Mitglieder der Transforming Growth Factor (TGF)- β -Familie, die sowohl von den Leydig-Zellen, als auch von den Sertoli- und Peritubulärzellen gebildet werden. Aktivin fördert die FSH-Ausschüttung (Weinbauer et al., 1999). FSH stimuliert wiederum die Inhibin-Produktion, was über einen negativen Rückkopplungsmechanismus zu einer verminderten FSH-Produktion in der Hypophyse führt (Spiteri-Grech et al., 1993). Die Inhibin-Sekretion wird unter anderem durch das Zytokin Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF) gehemmt (Meinhardt et al., 1996/2000) (siehe auch: 2.2.3.).

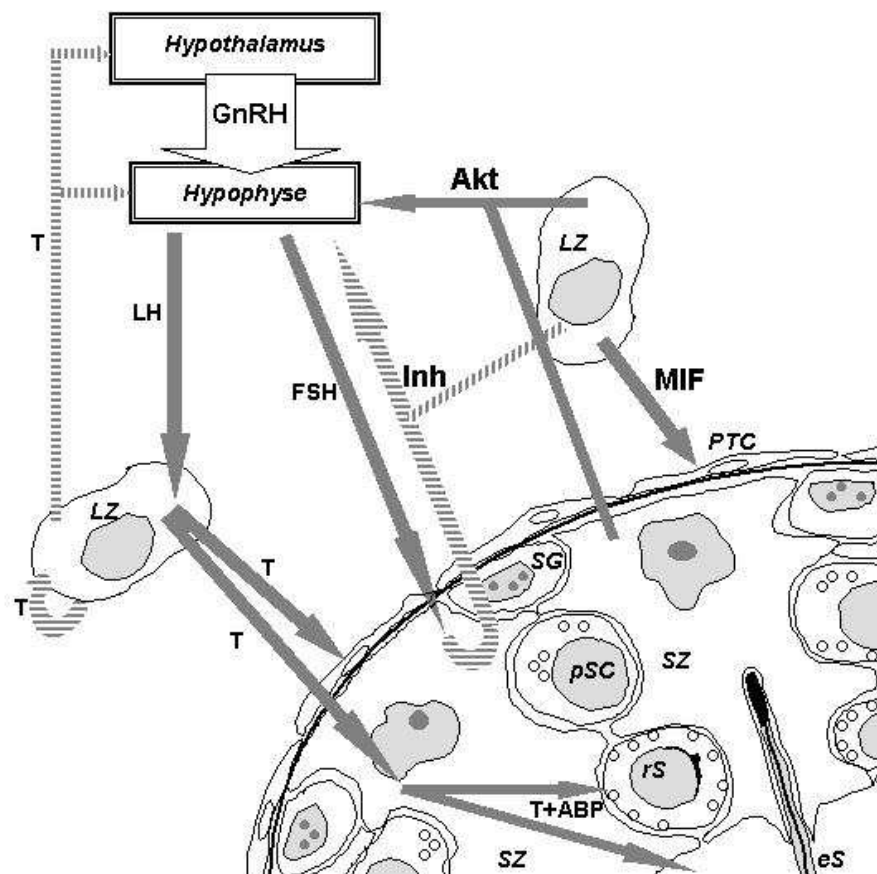


Abb.2.1.3.: Schematische Darstellung der wichtigsten endokrinen und parakrinen Hormone im Hoden. GnRH: Gonadotropin-Releasing-Hormon; LH: Luteinisierendes Hormon; FSH: Follikel-stimulierendes Hormon; T: Testosteron; ABP: Androgen-bindendes-Protein; Inh: Inhibin; Akt: Aktivin; MIF: Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor; LZ: Leydig-Zelle; PTC: Peritubulärzelle; SZ: Sertoli-Zelle; SG: Spermatogonie; pSC: primäre Spermatozyte; rS: runde Spermatoide; eS: elongierte Spermatoide. GnRH bewirkt die LH- und FSH-Ausschüttung aus der Hypophyse. Zu näheren Erläuterung s. Text 2.1.3.

2.2. Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF)

2.2.1. Entdeckung

Schon in den frühen 60er Jahren wurde beschrieben, daß Zellen aus dem Peritonealexsudat von sensitivierten Meerschweinchen nach Zugabe eines spezifischen Antigens in ihrer Migration inhibiert werden (George et al., 1962). Wie später festgestellt wurde, wird dieser Effekt durch ein Protein hervorgerufen, welches von aktivierten T-Lymphozyten abgegeben wird und die Migration von Makrophagen, die 75% des Peritonealexsudates bilden, hemmt (David, 1966; Bloom et al., 1966).

Obwohl der Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF) somit eines der ersten beschriebenen Zytokine ist, wurde die cDNA erst 1989 kloniert (Weiser et al., 1989).

2.2.2. Struktur

MIF ist ein aus 115 AS bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 12,5 kDa (Weiser et al., 1989; Bernhagen et al., 1994). Es bildet ein aus identischen Untereinheiten bestehendes Trimer, wobei jede Untereinheit aus einem β -Faltblatt besteht, welches von zwei antiparallelen α -Helices umgeben wird. Die drei β -Faltblätter bilden in ihrer Mitte einen Kanal, der für Lösungsmittel durchgängig ist und an seiner engsten Stelle einen Durchmesser von 3-4 Å hat. Die Region um den Kanal besitzt ein positives Potential, was vermuten läßt, daß er mit negativ geladenen Molekülen interagiert (Sun et al., 1996 a/b).

Bislang ist noch nicht geklärt, ob das Trimer eine biologische Funktion hat, oder ob die MIF-Wirkung durch das Dimer oder Monomer ausgeübt wird (Lue et al., 2002).

Die Primärsequenzhomologie von MIF-Molekülen verschiedener Spezies liegt bei über 80%, wobei die zwischen Maus und Ratte (99%) und zwischen Maus und Mensch (90%) am höchsten sind. Sequenzhomologien zwischen MIF und anderen bekannten Proteinen konnten bislang allerdings nicht gefunden werden (Bernhagen et al., 1994/1997). Die MIF-Struktur ähnelt jedoch denen der bakteriellen Enzyme 4-Oxalocrotonat-Tautomerase, 5-Carboxymethyl-2-Hydroxymuconat-Isomerase und Chorismat-Mutase (Chook et al., 1994; Subramanya et al., 1996).

MIF besitzt keine Signalsequenz für den Transport in das endoplasmatische Retikulum (ER). Es wird daher vermutet, dass es ebenso wie Interleukin-1 und der basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) auf nicht-klassischem Weg von den Zellen freigesetzt wird (Rubartelli et al, 1990; Mignatti et al, 1992; Eickhoff et al., 2001, Flieger et al., 2003).



Abb.2.2.1: Schematische Darstellung der trimeren Raumstruktur von MIF (Tan et al., 2001)

2.2.3. Funktion, Wirkung und Lokalisation des Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktors

MIF unterscheidet sich von anderen Zytokinen nicht nur wie in 2.2.2. beschrieben durch das Fehlen der N-terminalen Signalsequenz von anderen Zytokinen, sondern auch durch sein Expressionsmuster. Während Zytokine

normalerweise erst nach Induktion exprimiert werden, wird dieser Faktor konstitutiv produziert und kommt ubiquitär in fast allen Organen des Körpers vor (Lue et al., 2002).

MIF ist an der Entstehung einer Vielzahl von Krankheiten beteiligt. Im Entzündungsgeschehen besitzt es eine pro-inflammatorische Rolle, indem es den inhibitorischen Effekt von Glukokortikoiden auf die Zytokinproduktion und den Hydrocortison-induzierten Anstieg des Transkriptionsfaktors $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ antagonisiert (Calandra et al., 1995; Daun et al., 2000). Auch Autoimmunerkrankungen wie z.B. die rheumatoide Arthritis, Glomerulonephritis und Diabetes mellitus Typ I gehen mit erhöhten MIF-Konzentrationen einher (Lan et al., 1996; Onodera et al., 1999; Bojunga et al., 2003)

MIF besitzt einen proliferativen Effekt auf T-Lymphozyten, Zellen der Augenlinse, Kolon-Karzinom-Zelllinien und der murinen Fibroblastenzelllinie NIH/3T3 (Bacher et al., 1996; Wen et al., 1996; Takahashi et al., 1998; Mitchell et al., 1999) und spielt eine Rolle bei der Tumorentstehung, indem es die Angiogenese in Tumoren fördert und das Tumor-Suppressor-Gen p53 inaktiviert (Chesney et al., 1998; Hudson et al., 1999). Eine erhöhte MIF-Expression wurde in Metastasen des Prostata-Adenokarzinoms, Kolon-Karzinomzellen und bei Leukämie gefunden (Meyer-Siegler et al., 1996; Nishihira et al., 1996; Takahashi et al., 1998; zur Übersicht: Nishihira, 2000).

Die molekularen Mechanismen, über welche MIF auf zellulärer Ebene wirkt, werden bislang noch kontrovers diskutiert. Eine Funktion des Faktors besteht in der enzymatischen Aktivität als Gluthathion-S-Transferase (Blocki et al., 1993), Tautomerase (Rosengren et al., 1996) und Oxidoreduktase (Kleemann et al., 1998).

Trotz langer Suche nach einem membranständigen Rezeptor für MIF, konnte erst vor kurzem ein Zelloberflächen-Interaktionspartner beschrieben werden. CD74, ein Typ II Transmembranprotein, welches zu 2-5% auf der Zelloberfläche exprimiert wird, wirkt als Ligand für MIF. Mittels Blockade der Bindung von MIF an CD74 durch einen Antikörper wurde eine MIF-induzierte Aktivierung der MAP-Kinase (mitogen-activated protein kinase) verhindert (Leng et al., 2003).

Eine Aktivierung der MAP-Kinase durch MIF wurde bereits zuvor von Mitchell et al. (1999) beschrieben. In der murinen Fibroblastenzelllinie NIH/3T3 bewirkt MIF eine Phosphorylierung der ERK1/2-Kinase (extracellular signal-regulated

kinase), einem Protein des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges. Die Phosphorylierung der ERK-Kinase folgt auf eine Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) durch MIF und führt zur Stimulation der zytoplasmatischen Phospholipase A2 (cPLA₂) und Freisetzung von Arachidonsäure (Mitchell et al., 1999). Eine Wirkung von MIF über MAP-Kinase-abhängige Signaltransduktionswege wurde auch für Fibroblastenähnliche-Synoviozyten (Santos et al., 2004) und Neuroblastomzellen (Ren et al., 2004) beschrieben. Für die Makrophagen-Zelllinie Raw 264.7 und HeLa-Zellen wurde eine Rezeptor-unabhängige Aufnahme von MIF mit konsekutiver Bindung an Jab1 (Jun-activation domain-binding protein 1) im Zytosol beschrieben (Kleemann et al., 2000). Die AP-1-Aktivierung durch Jab1 wurde durch MIF dosisabhängig inhibiert. MIF zeigte in dieser Studie auch eine hemmende Wirkung auf den Jab1-abhängigen Abbau des Zellzyklus-Inhibitors p27^{Kip1}, was im Gegensatz zu den proliferativen Effekten von MIF auf NIH/3T3-Zellen steht (Mitchell et al., 1999).

2.2.3. Der Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor im Hoden

Im Hoden wird MIF von den Leydig-Zellen exprimiert. Nach experimenteller Depletion der Leydig-Zellen durch das Leydig-Zell-spezifische Toxin Ethan-Dimethan-Sulfonat (EDS) wird MIF von den Sertoli-Zellen gebildet. Auch in Peritubulärzellen und perivaskulären Zellen konnte MIF nach EDS-Behandlung lokalisiert werden. Die kompensatorische Expression läßt vermuten, daß MIF im Hoden eine wichtige Rolle spielt. In residenten Makrophagen des Hodens konnte im Gegensatz zu den zirkulierenden Makrophagen kein MIF nachgewiesen werden (Meinhardt et al., 1996; Meinhardt et al., 1999).

Das von den Leydig-Zellen sezernierte MIF bewirkt in Peritubulärzellen einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration (Wennemuth et al., 2000). Dieser Effekt tritt dosisabhängig auf. Untersuchungen mit Thapsigargin, einem Inhibitor der Ca²⁺-abhängigen ATPase des endoplasmatischen Retikulums (ER), zeigten, daß das Calcium zunächst aus dem ER rekrutiert wird und dann

zu einem kapazitativen Calcium-Einstrom aus dem Extrazellulärraum führt (Wennemuth et al., 2000).

Der Anstieg der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration in PTC konnte durch Pertussistoxin, einen Inhibitor des G_i -Proteins, verhindert werden (Schwarz, 2003). Dies war ein erster Hinweis auf eine mögliche Bindung von MIF an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor.

2.3. Signalkaskaden

Die einzelnen Zellen eines Organismus können über eine Vielzahl von Molekülen miteinander kommunizieren. Zu diesen Molekülen zählen neben Proteinen, Peptiden, Aminosäuren, Nucleotiden und Steroiden auch Fettsäurederivate und gelöste Gase. Diese Botenstoffe binden an Rezeptoren, die sich entweder auf der Zellmembran oder im Zytoplasma befinden. Durch die Rezeptorproteine werden daraufhin neue, intrazelluläre Signale erzeugt, die solange kaskadenartig weitergeleitet werden, bis eine Antwort der Zelle auf das Signal erfolgt. Diese Übertragungsketten werden Signalkaskaden genannt.

Membranständige Rezeptoren werden in vier Hauptklassen unterteilt: G-Protein-, Tyrosinkinase- und Ionenkanal-gekoppelte Rezeptoren sowie Rezeptoren mit intrinsischer Aktivität (Lodish et al., 1999).

2.3.1. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bestehen aus einer die Membran siebenfach durchspannenden Polypeptidkette, bei der das N-terminale Ende exoplasmatisch und das C-terminale Ende intraplasmatisch liegt. Zu ihren Liganden gehören unter anderem biogene Amine, Peptide und Glykoproteine (Krauss, 1997; Lodish et al., 1999).

Eine Stimulation des Rezeptors führt zur Aktivierung des gekoppelten G-Proteins, welches aus den Untereinheiten α , β und γ besteht. Nach der Sequenzähnlichkeit ihrer $G\alpha$ -Untereinheit und ihren Effektorproteinen lassen

sich die G-Proteine in 4 Familien einteilen: $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_{12/13}$ (Neves et al., 2002).

Die Aktivierung eines G-Proteins erfolgt, indem die α -Untereinheit, welche im Ruhezustand Guanosindiphosphat (GDP) gebunden hat, das GDP entläßt und Guanosintriphosphat (GTP) bindet. Hierauf zerfällt das G-Protein in einen α -GTP- und einen β - γ -Komplex. Die β - γ -Untereinheit des G-Proteins scheint eine Verbindung zu Rezeptortyrosinkinase-gekoppelten Kaskaden darzustellen (Inglese et al., 1995).

Die Proteine der $G\alpha_s$ -Familie aktivieren die Adenylylcyclase, während Mitglieder der $G\alpha_i$ -Familie die Adenylylcyclase hemmen. Andere Mitglieder der G_i -Familie haben ebenso wie die Proteine der $G\alpha_q$ -Familie die Phospholipase C als Effektormolekül. Proteine der $G\alpha_{12}$ -Familie sollen über noch nicht identifizierte Mechanismen die Phospholipase D, c-Src und die PKC stimulieren. Auch wenn die physiologischen Endpunkte noch nicht geklärt sind, scheinen verschiedene Mitglieder des MAP-Kinase-Weges durch $G\alpha_{12}$ -Proteine aktiviert zu werden (Neves et al., 2002).

Die Adenylylcyclase synthetisiert cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP). Cyclisches AMP aktiviert dann die cAMP-abhängige Proteinkinase (Proteinkinase A, PKA), welche die Phosphorylierung von Serinen und Threoninen an bestimmten, je nach Zelltyp unterschiedlichen, intrazellulären Proteinen katalysiert. Unter anderem kann die PKA über das Raf-Protein das Ras-Protein inhibieren und damit die „mitogen-activated Protein Kinase“ (MAP-Kinase) negativ regulieren. Als MAP-Kinasen werden eine Familie von Serin- oder Threonin-Kinasen bezeichnet, deren komplexes Netzwerk von Signalkaskaden eine Vielzahl von zellulären Antworten hervorruft. Drei Klassen von MAP-Kinasen werden unterschieden: Extrazelluläre Signal-regulierte Kinasen (ERK), c-Jun N-terminale Proteinkinasen (JNK) und p38. Die unterschiedlichen MAP-Kinasen werden jeweils durch spezifische MAP-Kinase-Kinasen (MKK) aktiviert. Die MKK-1 und -2 aktivieren die ERK1/2; die MKK-3, -4 und -6 aktivieren p38 und die MKK-4 und -7 aktivieren JNK. Die MKK werden wiederum durch MKK-Kinasen reguliert. Die MAP-Kinasen können die Aktivität verschiedener Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren oder Enzyme regulieren und darüber eine Reihe verschiedener biologischer Prozesse wie z.B.

Zellproliferation, -differenzierung, -kontraktion oder Sekretion beeinflussen (Bogatcheva et al., 2003; zur Übersicht: Krauss, 1997; Alberts et al., 1999).

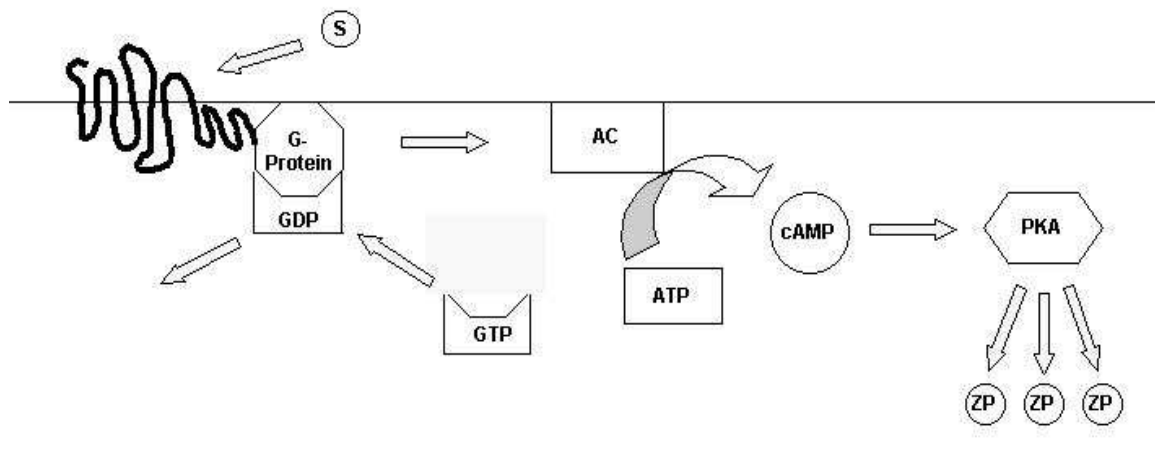


Abb.2.3.1. : S: Signal; AC: Adenylylcyclase; PKA: cAMP-abhängige Proteinkinase; ZP: Zielprotein (z.B. MAP-Kinase) (nach Krauss, 1997). Zur näheren Erläuterung s. 2.3.1.

Eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) dagegen führt zu einer Spaltung des membranständigen Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat in das ebenfalls membrangebundene Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP_3). Das hydrophile IP_3 bewirkt eine Öffnung von Calcium-Kanälen des endoplasmatischen Retikulums und somit eine Erhöhung des zyttoplasmatischen Calciums.

DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), nachdem diese durch elektrostatische Interaktionen an Phosphatidylserin in der Plasmamembran gebunden wurde. Die Bindung der PKC an die Plasmamembran wird durch Calcium in einem dosisabhängigen Effekt verstärkt. Ohne DAG kann die PKC nur aktiviert werden, wenn die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration um das 100-fache ansteigt. Ebenso wie die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) phosphoryliert auch die PKC eine Reihe intrazellulärer Proteine. Unter anderem kann sie auch das Raf-Protein und damit das nachfolgende Ras-Protein und die MAP-Kinase aktivieren (zur Übersicht siehe Liu et al., 1996; Krauss, 1997).

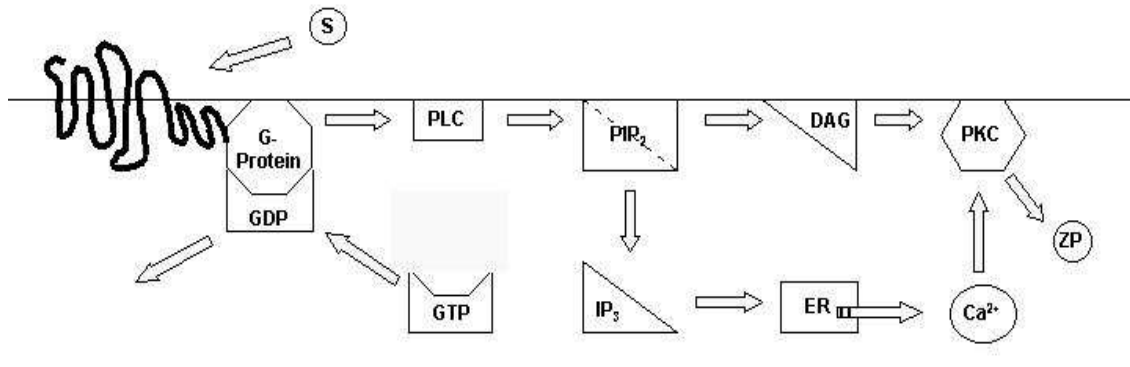


Abb.2.3.2.: S: Signal; PLC: Phospholipase C; PIP₂: Phosphatidyl-Inosit-4,5-Bisphosphat; DAG: Diacylglycerol; IP₃: Inosit-1,4,5-Trisphosphat; PKC: Proteinkinase C; ZP: Zielprotein; ER: Endoplasmatisches Retikulum (nach Krauss, 1997). Zur näheren Erläuterung s. 2.3.1.

2.3.2. Rezeptoren mit assoziierter Tyrosinkinase

Bei Rezeptoren mit assoziierter Tyrosinkinase-Aktivität sind Rezeptor und Tyrosinkinase nicht Teil desselben Proteins. Die Tyrosinkinase liegt entweder permanent an den Rezeptor gebunden vor, oder sie assoziiert erst nach Ligandenbindung mit dem Rezeptor. Nach Aktivierung der Tyrosinkinase phosphoryliert diese ihre Zielproteine, zu denen unter anderem die Phospholipase C γ und Proteine des Ras-Weges gehören (Krauss, 1997).

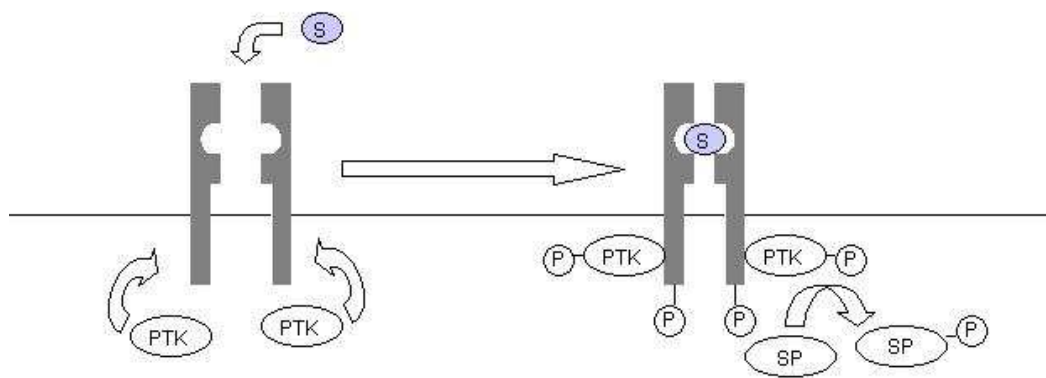


Abb.2.3.3.: Tyrosinkinase-assoziiierter Rezeptor. S: Signal; PTK: Protein-Tyrosin-Kinase; SP: Substrat-Protein; P: Phosphat (nach Lodish et al.,1999). Zur näheren Erläuterung s. 2.3.2.

2.3.3. Ionenkanal-gekoppelte Rezeptoren

Rezeptoren mit intrinsischer Ionenkanalfunktion sind vor allem an der schnellen Signalübertragung im Nervensystem beteiligt. Bindet das Signalmolekül an den Rezeptor, so ändert sich dessen Konformation, wodurch sich ein für spezifische Ionen durchgängiger Kanal öffnet oder schließt. Es gibt Na^+ -, K^+ -, Ca^{2+} - und Cl^- -spezifische Ionenkanäle. Entlang ihrem elektrochemischen Gradienten fließen die Ionen durch die Öffnung des Kanals entweder in die Zelle hinein, oder aus ihr heraus, wodurch ein elektrisches Signal entsteht, welches sich an der Membran weiterleitet. Es können auch Sekundärreaktionen wie beispielsweise die Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle entstehen.

Ionenkanäle können auch von der intrazellulären Seite durch „Second-Messenger“-Moleküle wie cAMP, cGMP oder IP_3 geöffnet werden. Aktivierte G-Proteine können ebenfalls Ionenkanäle öffnen. Der genaue Mechanismus ist hierbei noch unbekannt (Krauss, 1997; Alberts et al., 1999).

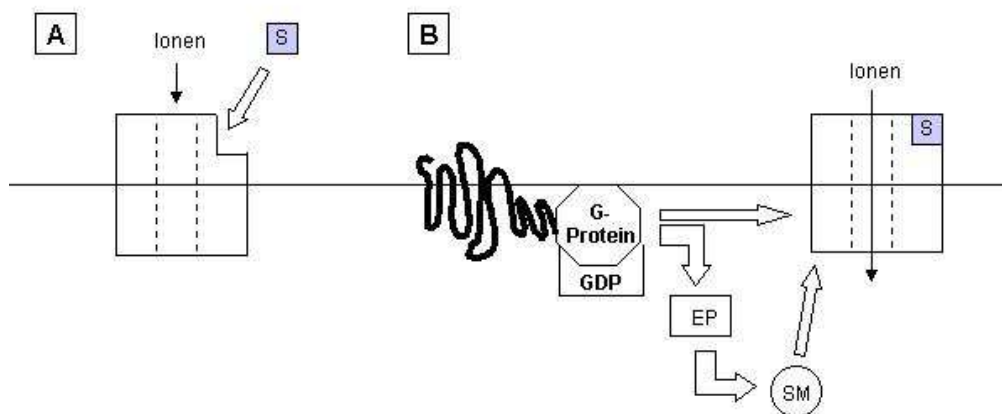


Abb.2.3.4.: Ionenkanal-gekoppelte Rezeptoren. S: Signal; EP: Effektorproteine; SM: Second Messenger (nach Krauss, 1997). Zur näheren Erläuterung s. 2.3.3.

2.3.4. Rezeptoren mit intrinsischer Aktivität

Es existieren verschiedene Rezeptoren mit intrinsischer enzymatischer Aktivität, die durch Ligandenbindung aktiviert werden. So sind Rezeptoren bekannt, die die Konversion von GTP zu cGMP katalysieren oder auch als Proteinphosphatasen wirken. Viele Wachstumsfaktoren wirken über Rezeptoren mit Serin/Threonin-Kinase-Aktivität oder über Rezeptortyrosinkinasen.

Bindet ein Ligand an die extrazelluläre Domäne der Rezeptortyrosinkinase, dimerisiert diese, wodurch anschließend die intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne aktiviert wird und somit sowohl Effektorproteine als auch sich selbst phosphorylieren kann. Die Autophosphorylierung dient der Aufhebung der Autoinhibition und der Schaffung von Bindungsstellen für nachgeschaltete Effektormoleküle. Zu den Effektormolekülen der Rezeptortyrosinkinasen gehören unter anderem Moleküle des Phospholipase C-Weges wie die Phospholipase C γ und die p85-Untereinheit der Phosphoinositid-3-Kinase, und Proteine der Ras-Signalübertragung (Krauss, 1997; Lodish et al., 1999).

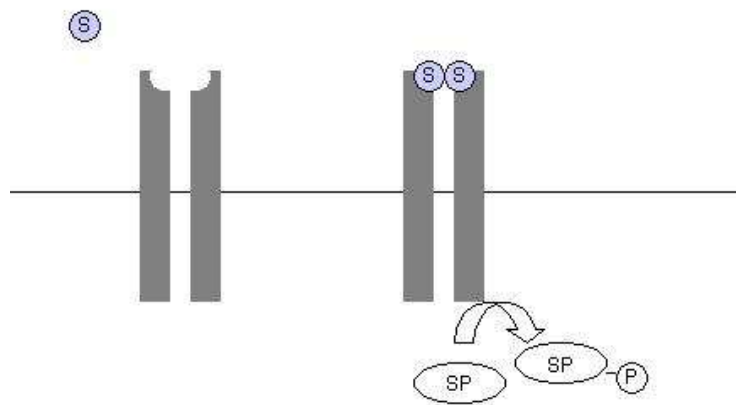


Abb.2.3.5.: Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität. S: Signal; SP: Substrat-Protein; P: Phosphat (nach Lodish et al.,1999). Zur näheren Erläuterung s. 2.3.4.

2.4. Zielsetzung der Arbeit

Die konstitutive Expression von MIF im Hoden läßt eine wichtige Rolle dieses proinflammatorischen Zytokins im Reproduktionsgeschehen vermuten. Dabei sind jedoch die genaue Funktion sowie der molekulare Wirkmechanismus dieses Proteins noch nicht näher bekannt.

Zentrales Anliegen dieser Arbeit war es, anhand von Peritubulärzellkulturen mögliche Signaltransduktionswege von MIF in vitro näher zu charakterisieren und damit Hinweise auf die Rolle von MIF im Hoden zu bekommen. Hierzu sollte zunächst mit Hilfe eines cDNA-Arrays ein Überblick geschaffen werden, welche Gene in den PTC nach Stimulation mit MIF differentiell exprimiert werden. Basierend auf diesen Ergebnissen und des bereits für PTC beschriebenen erhöhten Calcium-Influx nach MIF-Stimulation sollte die Aktivierung der Proteinkinase C, einem wichtigen Signalmolekül von kalziumvermittelten Signaltransduktionswegen, näher untersucht werden.

Da bereits in früheren Untersuchungen an anderen Zelltypen eine Aktivierung des MAP-Kinase-Weges durch MIF beschrieben worden war, sollte eine mögliche Aktivierung dieses Signaltransduktionsweges in PTC einerseits durch die Messung der Konzentration des second-messengers cAMP, andererseits durch den Nachweis einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP1 und ELK-1 als Zielproteine der MAP-Kinase, überprüft werden.

In abschließenden Untersuchungen sollte die Frage nach einem proliferativen Effekt von MIF auf die PTC geklärt werden.

3.1. Material

3.1.1 Zellkultur

Wistar-Ratten:	Charles River, Sulzfeld
RPMI 1640	PAA, Cölbe
Dulbecco's PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}	PAA, Cölbe
Trypsin/EDTA	PAA, Cölbe
Fetales Kälberserum	PAA, Cölbe
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe
Ultrasaline A	Bio-Whittaker, Verviers, Belgien
Optimem	Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA
Lipofectamin	Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA
Lipofectamin Plus	Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA
Lipotaxi	Stratagene, La Jolla, CA, USA
GenePorter	Peqlab Biotechnologies GmbH, Erlangen
GenePorter 2	Peqlab Biotechnologies GmbH, Erlangen
Vectashield	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA

Sämtliche Zellkulturmaterialien außer den Enzymen waren steril.

3.1.2. Reagenzien, Chemikalien

Die verwendeten Reagenzien waren von höchstmöglichem Reinheitsgrad und wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham-Buchler, Braunschweig

Fluka, Buchs, Schweiz

Gibco BRL - Bethesda Research Laboratories, Eggenstein

E. Merck, Darmstadt

Pharmacia, Freiburg

Roche, Mannheim

Roth, Karlsruhe

Serva, Heidelberg

Sigma, Taufkirchen

Steriles Wasser wurde mit Hilfe einer MilliQ-Reinstwasseranlage der Fa. Millipore (Eschborn) mit einer vorgeschalteten Ionenaustauscherbombe (Ministil P21) der Fa. Christ (Osterode/Harz) hergestellt.

Die verwendeten thermostabilen Lösungen wurden durch Autoklavieren bei 120°C, 1 atü, Dauer je nach Volumen mind. 15 min, sterilisiert. Die Entkeimung der thermolabilen Lösungen erfolgte durch Sterilfiltration (Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm).

Fotomaterial wurde von den Firmen Fuji Film (Düsseldorf), Kodak (Braunschweig) und Polaroid (Besier, Mainz) bezogen.

3.1.3 Vektoren und Kits

Proteinkinase C β -EGFP-Vektor	Clontech, Heidelberg
Luciferase-Vektoren	Stratagene, La Jolla, USA
Direct Cyclic AMP Enzyme Immunoassay Kit	Biotrend, Köln
TA Cloning Kit	Invitrogen

3.1.4 Geräte

Invertmikroskop	Axiovert 135, Zeiss, Jena,
Fluoreszenzmikroskop	DMR und DMRD, Leica, Wetzlar Olympus Fluoview, Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg
Photometer	Ultraspec K, Pharmacia, Freiburg
Luminometer	Lumistar, BMG Lab Technologies, Offenburg
Phosphorimager	Fujifilm FLA 3000
Elisa-Reader	MR 5000, Acterna GmbH & Co. KG, Eningen u. A.

4. Methoden

4.1. Zellbiologische Methoden

4.1.1. Isolierung von testikulären Peritubulärzellen

Die Präparation der testikulären Peritubulärzellen wurde nach Hoebe et al. (1995) durchgeführt.

Folgende Medien wurden verwendet:

<u>PBS-A:</u>	500 ml	Dulbecco's ohne Ca^{2+} , ohne Mg^{2+}
	6 ml	Penicillin/ Streptomycin
	750 mg	D- Glucose
<u>Kulturmedium:</u>	450 ml	RPMI 1640
	50 ml	FKS
	6 ml	Penicillin/ Streptomycin
	13 ml	Hepes-Puffer

Folgende Enzyme wurden abgewogen, unmittelbar vor Gebrauch in PBS-A gelöst und durch einen Sterilfilter (0,2 µg) filtriert. Im Folgenden beziehen sich die Mengenangaben und die Zeiten immer auf 20 Tiere (19 Tage alt).

1.	<u>DNase I</u>		1 mg/ml (stock)
2.	<u>Trypsin-DNAse</u>	Trypsin(BM Nr. 109819)	2,5 mg/ml
		Dnase I (stock) (BM Nr. 104159)	0,01 mg/ml
3.	<u>Trypsin-Inhibitor</u>	(BM Nr. 109894)	10 mg/ml
4.	<u>Trypsin-Inhibitor</u>	(BM Nr. 109894)	2,5 mg/ml
5.	<u>Kollagenase</u>		1 mg/ml
	<u>Hyaluronidase</u>		1 mg/ml
	<u>DNase</u> (stock)		0,01 mg/ml

Die Wistar-Ratten wurden durch CO_2 -Asphyxiation getötet und zum Ausbluten seitlich am Kopf aufgeschnitten. Die Abdominalhaut wurde mit 70% EtOH gespült und eröffnet. Die Hoden wurden entnommen, in PBS-A überführt, kurz in Jodalkohol (1%) inkubiert und in frisches PBS-A transferiert, welches nach 1-2 min gewechselt wurde. Danach wurden die Hoden eröffnet, die Tubuli seminiferi aus der Tunica albuginea herausgedrückt und in frisches PBS-A überführt.

Enzymatische Schritte:

In eine sterile Flasche wurden 20 ml der steril-filtrierte Trypsin/DNase-Lösung vorgelegt, die Hoden überführt und im Schüttel-Wasserbad bei 32°C und 140 rpm 50-60 min inkubiert. Mit diesem Schritt wurden die Tubuli aus ihrem Gewebeverband gelöst und lagen danach fragmentiert vor. 10 ml Trypsin-Inhibitor (10 mg/ml) wurde zugegeben, gemischt und alles in ein 50 ml Röhrchen überführt. Nachdem sich die Tubuli abgesetzt hatten, wurde der Überstand entfernt. 20 ml Trypsin-Inhibitor (2,5 mg/ml) wurde zugegeben und gemischt. Nach Abschwimmen der Tubuli wurde der Überstand wieder entfernt. Diese Waschungen wurden 8x mit je 25 ml PBS-A wiederholt.

Danach wurden die Tubuli in 20 ml Kollagenase/Hyaluronidase/DNase-Lösung (steril filtriert) bei 32°C und ca. 140 rpm im Wasserbad 15-20 min verdaut, um die Peritubulärzellen von der Tubuliwand zu lösen. Nach dem Verdau finden sich die Peritubulärzellen im Überstand, während die Tubuli eine irreguläre Oberfläche aufweisen.

Die Peritubulärzellen wurden nach 5-10 min bei 500 xg 10 min pelletiert, in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in 11 Zellkulturflaschen (75-cm²) ausgesät. Die so erhaltene Peritubulärzellkultur enthielt noch Sertolizellen, die durch mehrmaliges Antrysinieren entfernt wurden. Die Reinheit der Kultur wurde vor den Versuchen mittels Phasenkontrast-Mikroskopie überprüft und lag stets bei über 95%.

4.1.2. Kultivierung von Peritubulärzellen

Die Zellen wurden bei 32°C und 5% CO₂ kultiviert. Alle 3-4 Tage erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums. Wenn die Zellen konfluent gewachsen waren, wurden sie mit Trypsin/EDTA gelöst und passagiert.

4.1.3. Abtrypsinieren von Peritubulärzellen

Die Zellen wurden zunächst 2-3 mal mit je 10 ml PBS gewaschen. Nach vollständigem Abziehen der Saline-Lösung wurde 1 ml Trypsin/EDTA (0,05% (w/o) Trypsin; 0,02% (w/o) EDTA in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS zugegeben und 2-3 min bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Wenn die Peritubulärzellen nur antrypsiniert werden sollten, dauerte diese Inkubation ca. 1 min. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 7 ml Kulturmedium inaktiviert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Röhrchen überführt und bei 500 xg 10 min (RT) zentrifugiert.

Zum erneuten Aussäen der Peritubulärzellen wurde das Pellet in 1 ml Kulturmedium resuspendiert und in zwei neue Kulturflaschen mit je ca. 20 ml Medium verteilt.

4.1.4. Einfrieren von Peritubulärzellen

Einfriermedium

RPMI-B + 20% DMSO

Zum Einfrieren wurde das nach dem Trypsinieren erhaltene Pellet in 900 µl Medium resuspendiert und für 2-4 h im Kühlschrank gelagert. Dann wurden 900 µl Einfriermedium (auf 4°C vorgekühlt) dazugegeben und die Suspension in Kryoröhrchen überführt.

Die Kryoröhrchen wurden zunächst 1-2 Tage bei –80°C aufbewahrt und danach in flüssigem Stickstoff bei –196°C gelagert.

4.1.5. Auftauen von Peritubulärzellen

Die Peritubulärzellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff sofort in ein 37°C warmes Wasserbad überführt. Nachdem sie aufgetaut waren (3-5 min), wurden sie in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und für 10 min bei 500 xg pelletiert, in 1 ml Kulturmedium aufgenommen und in einer Kulturflasche (75 cm²) mit 20 ml Kulturmedium ausgesät.

4.1.6. Zählen von Zellen

10 µl der Zellsuspension wurden zu 90 µl Trypanblau gegeben, gemischt und mit Hilfe einer Burker-Zählkammer ausgezählt.

4.1.7. Transfektion der Peritubulärzellen

Um die für PTC schonendste und effizienteste Transfektionsmethode zu etablieren, wurden zwei Strategien erprobt. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde ein Plasmid transfiziert, welches die DNA für das Green-Fluorescent-Protein (GFP) enthielt. Bei erfolgreicher Transfektion wurde das GFP in den Zellen exprimiert und konnte anschließend fluoreszenzmikroskopisch nach Anregung mit einer Wellenlänge von 450 nm detektiert werden.

Elektroporation: Bei dieser Methode wird die Zellsuspension mit der Plasmid-DNA vermischt und einem elektrischen Hochspannungsschock ausgesetzt, wodurch Poren in der Zellmembran entstehen, durch die die zirkuläre DNA zunächst in das Zytoplasma und dann in den Zellkern gelangt (Neurath et al., 1997). Peritubulärzellen wurden zunächst abtrypsiniert und in kaltem PBS auf eine Konzentration von $1,1 \times 10^6$ Zellen/ml verdünnt. Pro Ansatz wurden 0,5 ml Zellsuspension mit 5 µg Plasmid in eine Elektroporationskuvette gegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen dem elektrischen Impuls ausgesetzt.

Folgende Einstellungen wurden getestet:

A: 1,1 kV	B: 0,2 kV
25 µF	975 µF
0,78 msec Zeitkonstante	32,3 msec Zeitkonstante

Danach wurden die Zellen 15 min auf Eis inkubiert und anschließend ausgesät.

Lipofektion: Transfektionsmedien, die neutrale und kationische Lipide enthalten, bilden mit anionischen Makromoleküle wie der DNA einen vesikulären Komplex, der ein Einschleusen in Zellen erlaubt (Neurath et al.,

1997). Das Vesikel fusioniert mit der aus negativ geladenen Phospholipiden bestehenden Zellmembran und entlässt das Plasmid in das Zytoplasma der Zelle.

Es wurden folgende Transfektionsmedien ausgetestet: Lipofektamin, Lipofektamin Plus, Lipotaxi, Gene Porter und Gene Porter 2. Die Transfektionsmedien wurden jeweils unter verschiedenen Bedingungen getestet. Variiert wurden sowohl die Menge der DNA und des Transfektionsmediums, als auch die Inkubationszeiten.

Folgendes Protokoll erwies sich als am effektivsten und wurde deshalb beibehalten:

Je cm^2 Fläche der Kulturschale wurden ca. 40.000 Zellen ausgesät. Nach 2 Tagen erfolgte die Transfektion. Pro cm^2 Kulturfläche wurden zunächst $0,2 \mu\text{g}$ DNA mit $10 \mu\text{l}$ Opti-Mem inkubiert. Wenn eine Doppeltransfektion (Positivkontrolle für den Luciferase-Assay) erfolgen sollte, wurden noch 20 ng des zweiten Plasmids hinzugefügt. In einem weiteren Ansatz wurden $1,25 \mu\text{l}$ Lipofektamin zu $10 \mu\text{l}$ Opti-Mem gegeben.

Nun wurden beide Ansätze miteinander vermischt und für 40 min inkubiert, so dass sich die DNA enthaltenden Vesikel bilden konnten. Danach wurden zu dem Transfektionsansatz $80 \mu\text{l}$ RPMI 1640 + 1% FKS gegeben. Die Zellen wurden mit RPMI 1640 + 1% FKS gewaschen. Das Transfektionsmedium wurde zu den Zellen gegeben. Nach 6 h wurde die Transfektion mit Kulturmedium gestoppt. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Stimulationsversuche durchgeführt. Vor jeder Stimulation wurden die Zellen mindestens eine Stunde in serumfreiem Medium gehalten.

4.1.8. Untersuchungen zur Lokalisation der Proteinkinase C- β nach Stimulation mit MIF

Die Peritubulärzellen wurden mit folgendem Proteinkinase C- β -EGFP-Plasmid wie in 4.1.7. beschrieben transfiziert:

Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mit MIF in den Konzentrationen 50 ng/ml und 100 ng/ml stimuliert.

Phorbol-ester können Diacylglycerol als Aktivator der Proteinkinase C ersetzen (Oberdisse et al., 1999), weshalb Phorbol-12-Myristat-13-Acetat in einer Konzentration von 3 µg/ml als Positivkontrolle eingesetzt wurde. Alle Ansätze wurden in RPMI 1640 verdünnt. Als Negativkontrolle diente RPMI 1640 ohne jegliche Zusätze. Nach der Stimulation wurden die Zellen fixiert.

4.1.9. Fixierung der Peritubulärzellen

Die Peritubulärzellen wurden mit Paraformaldehyd (4% in PBS) 5 min fixiert, dann 2x mit PBS und einmal mit A. dest. gewaschen und mit Vectashield eingedeckt.

4.1.10. Luciferase-Assay

Der Luciferase-Assay erfolgte mit den Vektoren und nach dem Protokoll der Firma Stratagene. Eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP1 und ELK-1 wurde untersucht, indem die Peritubulärzellen mit Vektoren transfiziert wurden, die die Leuchtkäfer-Luciferase als Reportergen enthielten. Für die Untersuchung von AP1 enthielt der Vektor das Enhancer-Element AP1, für die Untersuchung von ELK-1 enthielt der Vektor das Enhancer-Element SRE. Als Positivkontrolle wurde ein weiterer Vektor (pFc) transfiziert, der eine Expression der Luciferase hervorrief.

Die Peritubulärzellen wurden in 6-well-Zellkulturplatten ausgesät und 48 h später nach dem in 4.1.7. beschriebenen Protokoll transfiziert. Nach 3 Tagen wurden die Peritubulärzellen mit MIF in Konzentrationen von 50 ng/ml und 100 ng/ml (verdünnt in RPMI 1640) stimuliert, als Negativkontrolle diente RPMI 1640 alleine. Nach 6 h wurde die Luciferase extrahiert und anschließend quantifiziert (s. 4.2.1. und 4.2.2.).

4.2. Biochemische Methoden

4.2.1. Extraktion der Luciferase

Die Zellen wurden 2x mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gewaschen. Dann wurden je well 400 μl Lysis-Puffer zugegeben und 15 min inkubiert.

<u>Lysis-Puffer (5x)</u>	40 mM	Tricine (pH 7.8)
	50 mM	NaCl
	2 mM	EDTA
	1 mM	MgSO_4
	5 mM	DTT
	1%	Triton [®] X-100

Danach wurden die Lysate bei 4°C und 12.000 rpm 3 min zentrifugiert. Die Überstände wurden für die Luciferase-Messung eingesetzt.

4.2.2. Luciferase-Messung

Für die Quantifizierung der exprimierten Luciferase wurden zu 20 μl des Überstandes 100 μl Luciferase-Substrat-Puffer zugegeben. Die Messung erfolgte mit einem Luminometer (BMG Lab Technologies).

<u>Luciferase-Substrat-Puffer:</u>	40 mM	Tricine (pH7,8)
	0,5 mM	ATP
	10 mM	MgSO_4
	0,5 mM	EDTA
	10 mM	DTT
	0,5 mM	Coenzym A
	0,5 mM	Luciferin

4.2.3. Amidoblack- Proliferationsassay

Der Amidoblack- Proliferationsassay wurde nach Schulz et al. (1994) durchgeführt.

<u>Fixierlösung</u>	10% Formalin mit 9% Essigsäure und 0,1 M Na-Acetat
<u>Färbelösung</u>	10% Eisessig mit 8,2 g/l Na-Acetat + 1 g Amidoschwarz (NBB)
<u>Waschlösung</u>	7 Tropfen 10 M HCL auf 500 ml A. dest.

Elutionslösung

50 mM NaOH

Alle Assays wurden in 96- well Mikrotiterplatten durchgeführt. Das Medium wurde von den Zellen entfernt. Es erfolgte eine Zugabe von 100 µl Fixierlösung pro well und eine 15-minütige Inkubation bei RT. Die Fixierlösung wurde entfernt und durch 100 µl Färbelösung pro well ersetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurde die Färbelösung entfernt. Die wells wurden zweimal mit Waschlösung gespült und bei Raumtemperatur für mindestens 24 h getrocknet. Der proteingebundene Farbstoff wurde durch Zugabe von 200 µl Elutionslösung gelöst. Dabei wurden die Platten 30 min geschüttelt. Die Quantifizierung der Absorption erfolgte mit dem ELISA- Reader bei 620 nm Meßwellenlänge und 490 nm Referenzwellenlänge. Die statistische Überprüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mit dem Programm SigmaStat (One-Way Anova).

4.2.4. Messung des zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP)

Die cAMP-Messungen wurden mit Hilfe eines ELISA-Kit der Firma Biotrend durchgeführt. Ein cAMP-Antikörper, mit dem die ELISA-Platte beschichtet wurde, bindet hierbei kompetitiv entweder das in der Probe enthaltene cAMP oder an alkalische Phosphatase gebundenes cAMP. Die alkalische Phosphatase erzeugt in einer enzymatischen Reaktion nach Zugabe des Substrates einen gelben Farbton. Die Intensität des Gelbtönen ist umgekehrt proportional zu der in der Probe enthaltenen cAMP-Konzentration.

Die Peritubulärzellen wurden für die cAMP-Messungen in 6-well-Platten kultiviert, bis sie zu 90-95% konfluent gewachsen waren. Der FKS-Gehalt im Medium wurde langsam herabgesetzt. Die Zellen wurden vor der Stimulation mit MIF mindestens eine Stunde in FKS-freiem Medium inkubiert. Die Stimulation mit MIF erfolgte in RPMI 1640, als Negativkontrolle wurde RPMI 1640 ohne MIF verwendet. Als Positivkontrolle wurden die Peritubulärzellen in 100 µM Forskolin, einem Aktivator der Adenylatcyclase, in RPMI 1640 stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Peritubulärzellen durch eine 30

minütige Inkubation mit 0.1 M HCl lysiert. Die Zelllysate wurden dann bei 700 x g 10 min zentrifugiert und die Überstände weiterverwendet.

Zu je 200 µl Lysat bzw. Standard wurden 10 µl Acetylierungsreagenz zugegeben. Die Standards hatten somit cAMP-Konzentrationen von 20, 5, 1.25, 0.312 und 0.078 pmol/ml. 50 µl Neutralisierungsreagenz wurden vorgelegt und anschließend je 100 µl der Standards bzw. Proben zugegeben. Die Standards wurden in Doppelbestimmungen gemessen. Je well wurden 50 µl der Lösung zugegeben, die das an alkalische Phosphatase gekoppelte cAMP enthielt, und 2 h unter Schütteln bei ca. 150 rpm inkubiert. Danach wurden die wells 3x mit 200 µl Waschpuffer gewaschen und getrocknet. Die enzymatische Reaktion erfolgte nun durch Zugabe von 200 µl einer p-Nitrophenylphosphat-Lösung. Nach einer Stunde wurde die Reaktion mit 50 µl Trisodiumphosphat gestoppt. Die Farbintensität wurde in einem ELISA-Reader (Acterna GmbH & Co. KG) bei 405 nm Meßwellenlänge und 590 nm Referenzwellenlänge bestimmt.

4.2.5. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach der Bradford-Methode durchgeführt. Der Test beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums einer sauren Lösung des Farbstoffes "Coomassie Brilliant Blau G 250" nach Proteinbindung von 465 nm auf 595 nm (Bradford, 1976). Als Proteinstandard wurde in 0,1 N NaOH gelöstes Ovalbumin verwendet.

20 µl Probe wurden in einem Eppendorf-Gefäß vorgelegt, mit 1 ml Farbreagenz versetzt und gut durchmischt. Als Leerwert diente ein Ansatz mit 20 µl Puffer. Das Gemisch wurde 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm jeweils in Doppelbestimmung photometrisch gegen den Leerwert bestimmt. Mit Hilfe der Eichkurve konnte aus der Extinktion die Proteinkonzentration ermittelt werden. Die Messung erfolgte mit einem Photometer Modell Ultrospec K (Pharmacia, Freiburg).

<u>Farbreagenz</u>	Serva Blau G	100 mg
	Ethanol	50 ml
	<u>H₃PO₄ 85%</u>	<u>100 ml</u>
	ad 1000 ml A. dest.	

4.3. Molekularbiologische Methoden

4.3.1. Herstellung kompetenter Zellen

Um Plasmid-DNA für den Luciferase-Assay und den Proteinkinase C-Versuch zu amplifizieren, mußte sie in Bakterienzellen eingebracht werden, in denen sie *in vivo* repliziert werden konnte. Zu diesem Zweck mussten Bakterien in die Lage versetzt werden, spontan und effizient Plasmide aufzunehmen: die Zellen mussten kompetent gemacht werden.

Die in dem TA Cloning Kit von Invitrogen enthaltenen Bakterien ("One shot™ kompetente Zellen") lagen bereits als kompetente Zellen vor.

4.3.2. Bakterientransformation

Zur Transformation wurden jeweils 50 µl eingefrorene kompetente Zellen auf Eis innerhalb von 10 min aufgetaut. Jeweils 10-100 ng Plasmid-DNA wurden der Bakteriensuspension zugegeben und mit dieser gut vermischt. Nach 20 min Inkubation auf Eis folgte eine 1,5-minütige Inkubation bei 42°C. Anschließend wurden jeweils 500 µl LB-Medium zugesetzt, die Zellen 90 min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert und 1 min bei ca. 12.000 x g zentrifugiert. Die Bakterien wurden in 50 µl frischem LB-Medium resuspendiert und 50 µl der unverdünnten Suspension auf Antibiotika-haltigen Agar-Platten ausgestrichen. Bakterien, die durch erfolgreiche Transformation mit dem Plasmid eine entsprechende Antibiotikaresistenz erworben hatten, konnten auf diese Weise selektiert werden. Entsprechend des verwendeten Plasmids wurde Ampicillin (Luciferase-Plasmid) oder Kanamycin (EGFP-PKCβ-Plasmid) zur Selektion eingesetzt.

<u>LB-Medium:</u>	Caseinhydrolysat	10 g
(Luria-Bertani Medium;	Hefeextrakt	5 g
pH 7,0)	<u>NaCl</u>	<u>10 g</u>
	in 1000 ml A. dest. gelöst	
	Der pH-Wert wurde mit NaOH eingestellt.	
	Das Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert.	

<u>LB-Agar-Platten:</u>	Zu 1000 ml LB-Medium wurden 15 g Agar gegeben; die Mischung wurde autoklaviert, auf ca. 50°C (Wasserbad) abgekühlt und mit Antibiotika versetzt. In einer Sterilbank wurden die Agar-Platten gegossen (30-35 ml pro 90-mm-Platte).
<u>Ampicillin-Stammlösung:</u>	25 mg/ml Ampicillin in A. bidest. gelöst
<u>Kanamycin-Stammlösung:</u>	25 mg/ml Kanamycin in A. bidest. gelöst

Zur Identifizierung der transformierten Bakterien wurden Mini-Plasmidpräparationen (siehe 4.3.3.) von Bakterien-Übernachtskulturen durchgeführt, die mit den antibiotikaresistenten Bakterienkolonien angeimpft wurden. Die so erhaltenen Plasmide wurden auf das Vorkommen des zu erwartenden DNA-Fragments beim Einsatz bestimmter Restriktionsendonukleasen (siehe 4.3.6.) untersucht.

4.3.3. Plasmidpräparation

Die Präparation von Plasmiden kann entsprechend den Anforderungen in unterschiedlichen Maßstäben erfolgen. Für geringe Mengen an Plasmid-DNA (bis zu 20 µg) sind Minipräparationen aus einer 1-3 ml umfassenden Bakterien-Kultur ausreichend. Für größere Mengen Plasmid-DNA müssen Kulturen mit einem Volumen von bis zu 500 ml aufgearbeitet werden (Maxipräparationen).

4.3.4. Minipräparation

Die Minipräparation wurde nach einem von der Fa. Qiagen modifizierten Protokoll der alkalischen SDS-Methode durchgeführt.

1-3 ml einer Bakterien-Übernachtskultur wurden bei ca. 12.000 x g in einem Eppendorfgefäß zentrifugiert und die Zellen anschließend in 300 µl Puffer 1 resuspendiert. 300 µl Puffer 2 wurden zugesetzt und vorsichtig durchmischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 300 µl Puffer 3 zugesetzt und ebenfalls

vorsichtig untergemischt. Das durch die eintretende pH-Verschiebung ausgefallene Gemisch aus Protein und chromosomaler DNA wurde durch Zentrifugation (ca. 12.000 x g, 4°C, 15 min) abgetrennt. Der Überstand wurde mit 1 Volumen Phenyl-Chloroform-Isoamylalkohol (im Verhältnis 25:24:1) extrahiert. Reste von Phenol wurden durch zweimaliges Extrahieren mit jeweils einem Volumen reinem Chloroform entfernt. Aus der wässrigen Phase wurde durch Zugabe von 2 Volumen Ethanol die DNA ausgefällt. Die Fällung erfolgte 2 h bei -20°C. Durch Zentrifugation (12.000 x g, 4°C, 30 min) wurde die DNA sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend für ca. 15 min getrocknet. Die DNA wurde in 50 µl sterilem A. bidest. oder TE-Puffer aufgenommen.

<u>Puffer 1</u>	Tris-HCl, pH 8,0 EDTA RNase A (aus Stammlösung)	50 mM 10 mM 100 µg/ml
<u>Puffer 2</u>	NaOH SDS	200 mM 1,0 %
<u>Puffer 3</u>	K-Ac, pH 5,5	3 M
<u>RNase-Stammlösung</u>	100 mg lyophilisierte RNase A wurden in 10 ml Lösung A (DNase-frei) gelöst, 15 min auf 100°C erhitzt, langsam auf RT abgekühlt, portioniert und bei -20°C gelagert.	
<u>Lösung A</u>	Tris-HCl, pH 7,5 NaCl	10 mM 15 mM
<u>TE-Puffer</u>	Tris-HCl, pH 7,5-7,8 EDTA	10 mM 1,0 mM

4.3.5. Spektrophotometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Eine Quantifizierung von DNA und RNA in Lösungen war durch photometrische Messungen bei 260 nm und 280 nm möglich. Die Messung bei 260 nm erlaubte eine Kalkulation der Nukleinsäurekonzentration in der Probe. Einer OD von 1 entspricht etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml einzelsträngiger DNA und RNA und ungefähr 20 µg/ml einzelsträngiger Oligonucleotide. Da

Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm haben, Proteine hingegen bei 280 nm, überlagern sich die Absorptionsspektren der beiden Substanzklassen. Aus dem Verhältnis der Extinktionswerte bei 260 und 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) kann auf den Reinheitsgrad einer Nukleinsäure-Präparation (bzw. einer Proteinpräparation) geschlossen werden. Saubere Präparationen von DNA und RNA weisen ein OD_{260}/OD_{280} -Verhältnis von 1,8 bis 2,0 auf. Für die Messung wurden je 1 ml Wasser und 1 µl DNA- bzw. Total-RNA-Lösung in einer Quarzküvette gemischt und bei 260 nm und 280 nm gemessen.

4.3.6. Restriktionsanalyse

Restriktionsendonukleasen werden von vielen Prokaryonten gebildet und nehmen zusammen mit Methylasen eine Schutzfunktion gegen fremde Nukleinsäuren wahr. Die Restriktionsenzyme erkennen meist palindromische Sequenzen aus 4 bis 8 Basenpaaren und spalten in jedem Strang die Phosphodiesterbindungen auf der 3'- oder 5'-Seite der Symmetrieachse. Man kann dies in der experimentellen Molekularbiologie ausnutzen, um DNA zu fragmentisieren, die dann elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert werden kann. Die aus Minipräparationen gewonnene Plasmid-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI (Pharmacia, Freiburg; für Luciferase-Plasmid) oder Kpn I (für EGFP-PKCβ-Plasmid) geschnitten. Für den Restriktionsverdau wurden ungefähr 2,5 µg Plasmid-DNA mit 10 units des entsprechenden Restriktionsenzymes 2 h bei 37°C nach den Angaben des Restriktionsprotokolls System OPA (one phor all) von Pharmacia inkubiert. Mittels Gelelektrophorese wurde die Größe des inklonierten Fragments bestimmt.

4.3.7. DNA-Gelelektrophorese (Agarose-Gel)

Die gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen beruht auf der Ausrichtung linearer Doppelstrang-DNA zu einer gestreckten Form im elektrischen Feld. Wegen der negativen Ladungen an ihren

Phosphatresten wandert die DNA in leicht alkalischer Lösung immer zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl der Basenpaare. Die Mobilität der aufzutrennenden DNA-Fragmente hängt von der Agarosekonzentration, der Stromstärke, der Ionenstärke des Puffers und der Dichte der superhelikalen Windungen ab. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid bei der Gelherstellung können die planaren Ethidiumbromid-Moleküle zwischen die Basenpaare des DNA-Doppelstranges interkalieren. Kurzwelliges UV-Licht (260 nm) wird von der DNA absorbiert und durch Ethidiumbromid mit orange-rotem Fluoreszenzlicht (590 nm) wieder abgegeben.

<u>Agarose</u>	lyophilisiert (ultra pure; Gibco BRL)	
<u>10 x TBE</u> (Tris-Borat/EDTA)	Tris-HCl, pH 8,0	108 g
	Borsäure	53 g
	<u>EDTA 0,5 M</u>	<u>20 ml</u>
	ad 1000 ml A. dest.	
<u>Elektrodenpuffer</u>	1x TBE	
<u>DNA-Probenpuffer</u> (6 x)	Xylencyanol FF	0,25% (w/v)
	<u>Glycerin</u>	<u>30,0% (w/v)</u>
	ad 100 ml A. dest.	

0,7% Agarose wurden in 1x TBE durch Kochen gelöst. Nach Abkühlen auf 50°C wurden pro 100 ml Gellösung 10 µl 0,3% Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe) zugegeben. Anschließend wurde die Gellösung in den Geltrog gegossen. Dann wurde der Probenkamm zur Aussparung der Probentaschen eingesetzt. Nach Erstarren des Gels folgte das Einsetzen in die Elektrophoresekammer (Pharmacia, Freiburg oder Stratagene, Heidelberg), die vorsichtige Entnahme des Probenkamms und die Übersichtung des Gels mit 1x TBE-Puffer. Die DNA-Proben wurden 1:5 mit DNA-Probenpuffer versetzt, kurz zentrifugiert und in die Probentaschen einpipettiert. Die Gelelektrophorese lief bei etwa 90 Volt Spannung für eine Dauer von 90 bis 120 min. Das von unten mit UV-Licht (Transilluminator, MAGV GmbH, Rabenau-Londorf) bestrahlte Gel wurde mit einer Sofortbildkamera (Polaroid MP-4 Land Camera) photographiert (Film Polaroid 667 ohne Negativ).

4.3.8. RNA-Gewinnung

Die RNA wurde über Säulen (RNeasy Mini Kit, Qiagen) nach dem Protokoll der Firma gereinigt.

Nach der Stimulation der Peritubulärzellen mit MIF wurde das Medium abgenommen, 600 µl RLT-Puffer zugefügt und die Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturflasche abgelöst.

Um die Zellen aufzubrechen, wurden sie 5x mit einer Spritze durch eine Kanüle (20-G) aufgezogen. Die Zellsuspension wurde nun in ein Eppendorf-Cup überführt, 600 µl Ethanol dazugegeben und gut gemischt.

Je 700 µl einer Probe wurden auf eine RNeasy-Mini-Spin-Säule in einem 2 ml Röhrchen aufgetragen. Das Röhrchen wurde dann 15 sec bei 10000 rpm zentrifugiert. In diesem Schritt wurde die RNA an die Membran in der Säule gebunden. Um die Säule von den restlichen Zellbestandteilen zu reinigen, wurden 700 µl RW1-Puffer auf die Säule aufgetragen und 15 sec bei 10000 rpm zentrifugiert. Dann wurde die RNeasy-Säule in ein neues 2 ml Röhrchen überführt, 500 µl RPE-Puffer dazugegeben und bei 10000 rpm 15 sec zentrifugiert. Es wurden wiederum 500 µl RPE-Puffer zugefügt und 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert.

Die Säule wurde in ein 1,5 ml Röhrchen überführt, 50 µl Millipore-Wasser auf die RNeasy-Membran gegeben und 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Durch diesen Schritt wurde die RNA wieder von der Membran eluiert.

4.3.9. RNA-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Qualität der Total-RNA-Aufarbeitung erfolgte die Gelelektrophorese der RNA in einem Agarosegel nach dem gleichen Prinzip wie die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA (siehe 4.3.7.). Allerdings wurde ein anderes Puffersystem verwendet als bei DNA-Agarosegelen. Bei der Auftrennung von Gesamt-RNA dienten die auftretenden 28 S rRNA (= 3,950 kb), 18 S rRNA (= 1,990 kb) und 5,8 S rRNA (= 0,123 kb) als Größen-Marker.

Gelkammer (Gelkammer mit Breite von 1 cm/Bahn), Trog und Kamm wurden für 30 min in 3% (v/v) H₂O₂ eingelegt (Durchführung unter dem Abzug) und anschließend mehrere Male mit autoklaviertem Wasser gespült. Agarose [1-1,5% (w/v)] wurde durch Kochen in autoklaviertem Wasser gelöst und nach Abkühlen auf ca. 60°C mit 3,06 ml 37% Formaldehyd und 6 ml 5 x MOPS (pH 7,0) versetzt. Zur Probenvorbereitung wurden 5 µg RNA mit Wasser auf 5 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und 25 µl Probenpuffer zugeben. Anschließend wurden die Proben 15 min bei 65°C erhitzt, dann auf Eis gekühlt, mit 1,5 µl EtBr-Stammlösung (1mg/ml) versetzt, kurz zentrifugiert und in die Geltaschen geladen. Der Gellauf erfolgte mit konstant 80 Volt, Laufpuffer war 1 x MOPS. Nach etwa 2 h wurde der Gellauf beendet und unter UV-Licht photographisch dokumentiert.

<u>10 x MOPS, pH 7,0</u>	3-Morpholino-propansulfonsäure	0,2 M
	Na-Acetat	50 mM
	<u>EDTA, pH 8,0</u>	<u>10 mM</u>
	Der pH-Wert wurde mit 2 M NaOH eingestellt	
<u>RNA-Probenpuffer</u>	10 x MOPS	0,15 ml
	Formaldehyd (37%)	0,24 ml
	Formamid (deionisiert)	0,75 ml
	autoklaviertes Wasser	100 µl
	Glycerol	100 µl
	Bromphenolblau (10% w/v)	0,08 ml

4.3.10. Atlas Array

Der Atlas-Array wurde wie im Protokoll der Firma Clontech (Heidelberg) beschrieben durchgeführt:

4.3.10.1. Sonden-Synthese

Bei der folgenden Reaktion entstand aus der in 4.3.8. gewonnenen RNA ³²P-markierte cDNA.

Mastermix

5 µl [α -³²P]dATP
3 µl 10x dNTP-Mix
6 µl 5x Super-Script 1st Strand Buffer
1,5 µl DTT (100 mM)

Es wurden je Ansatz 5 µg RNA mit 1,5 µl Primer Mix (Clontech, Heidelberg) gemischt. Die Ansätze wurden kurz anzentrifugiert, zunächst 2 min bei 70°C und dann 2 min bei 48°C inkubiert. Während der letzten Inkubation wurden 6 µl Super Script (Gibco) zum Mastermix gegeben. Nachdem die Ansätze wieder auf RT abgekühlt waren, wurden je 16,5 µl Master Mix zugegeben und 25 min bei 48°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 3 µl 10 x Terminations-Mix (Clontech, Heidelberg) beendet.

4.3.10.2. Säulen-Chromatographie

Um die Ansätze von kleineren cDNA-Fragmenten zu reinigen, wurden sie mit Puffer NT2 auf 200 µl Gesamtvolumen gebracht und in NucleoSpin-Säulen gegeben. Die Säulen wurden bei 14.000 rpm für 1 min zentrifugiert, in frische Reaktionsgefäße überführt und 400 µl Puffer NT3 (vorher wurden dem Puffer 15 ml 95 % Ethanol hinzugefügt) zugegeben. Dann wurde wieder bei 14000 rpm 1 min zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde 2 x wiederholt. Die Säulen wurden wieder in frische Reaktionsgefäße überführt und 100 µl NE-Puffer dazugegeben. Nach 2 min Inkubation wurde bei 14.000 rpm für 1 min zentrifugiert, um die gereinigte Probe zu eluieren.

Die Markierungseffizienz der Ansätze bzw. Einbaurate der radioaktiven Nucleotide wurde geprüft, indem 2 µl der gereinigten Probe in 5 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben wurden und die counts pro Minute (cpm) gemessen wurden.

4.3.12. Hybridisierung

Die Atlas Array-Membran wurde zunächst mit 5 ml der Hybridisierungslösung bei 68°C für 30 min prähybridisiert.

Die markierte cDNA wurde anschließend für 2 min bei 95°C denaturiert, dann 2 min auf Eis inkubiert und der Hybridisierungslösung zugefügt. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 68°C. Sämtliche Inkubationen fanden im Hybridisierungssofen unter ständiger Rotation statt.

<u>Waschlösung 1</u>	2 x SSC 1% SDS	auf 68°C erhitzt
<u>Waschlösung 2</u>	0,1 x SSC 0,5% SDS	auf 68°C erhitzt

Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungs-Lösung durch 200 ml Waschlösung 1 ersetzt. Die Membran wurde bei 68°C 30 min geschüttelt. Dieser Vorgang wurde drei mal mit Waschlösung 1 und einmal mit Waschlösung 2 wiederholt. Die Membran wurde 5 min bei RT mit 200 ml 2x SSC geschüttelt. Danach wurde sie in Plastikfolie verpackt und über Nacht bei 68 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit einem Scintillation Counter.

5. Ergebnisse

5.1. Zellkulturexperimente

5.1.1. Kultivierung von Peritubulärzellen

Die Peritubulärzellen (PTC) wurden über einen enzymatischen Verdau aus den Rattenhoden isoliert und erreichten ca. 7 Tage nach der Isolierung die gewünschte Reinheit (> 95%). Bis zu der 2.-3. Passage zeigten die Zellen ein gutes Wachstum, welches danach stark abnahm. Aus diesem Grund wurden für die Versuche ausschließlich die Passagen 2 und 3 verwendet.

5.1.2. Transfektion der Peritubulärzellen

Die Transfektion der PTC wurde mit Lipofektamin nach dem unter 4.1.7. beschriebenen Protokoll durchgeführt, da mit diesem die höchste Überlebensrate und beste Transfektionseffizienz erzielt wurde. Großer Wert wurde darauf gelegt, daß die PTC nach der Behandlung morphologisch unverändert aussahen. Um dies zu erreichen, wurde die Transfektion mit 1% FKS-haltigem Medium durchgeführt und auf eine höhere Transfektionseffizienz, die ohne FKS-Zusatz erreicht worden wäre, verzichtet. Die Effizienz der Transfektion lag bei ca. 20%.

Zwei Tage nach erfolgter Transfektion wurden die Versuche fortgesetzt, da zu diesem Zeitpunkt die Fluoreszenz des GFP am stärksten war.

Durch Elektroporation konnte keine effiziente Transfektion der PTC erreicht werden. Die meisten PTC starben bei der Behandlung.

5.1.3. Untersuchung zur Lokalisation der Proteinkinase C- β (PKC β) in Peritubulärzellen

Nach Transfektion der PTC mit dem PKC β -EGFP-Vektor wurde in den Zellen die PKC β gekoppelt an das Green-fluorescent Protein (GFP) exprimiert. Durch das Reporterprotein wurde somit die PKC β fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht.

Nach Stimulation mit rekombinantem MIF in den Konzentrationen 50 ng/ml und 100 ng/ml konnte bei der überwiegenden Zahl der PTC eine Lokalisation der PKC β an der Zellmembran festgestellt werden (Abb.5.1., Abb.5.2.). Diese Membranständigkeit war schon nach 1 min sichtbar und persistierte für mindestens 30 min. Die Positivkontrolle mit PMA zeigte den gleichen Effekt wie eine Stimulation mit MIF. Bei der Negativkontrolle konnte keine Translokation der PKC β zur Zellmembran beobachtet werden. Die Stimulationen wurden mit MIF in RPMI 1640 mit 10% FKS, 1% FKS oder ohne FKS durchgeführt, wobei Unterschiede im FKS-Gehalt keine differierenden Ergebnisse zeigten.

Nach Fixierung der Zellen mit 4% Paraformaldehyd (w/v) und dem Eindecken des Präparates in DAPI[®] erfolgte die Betrachtung der Zellen mittels eines Fluoreszenzmikroskopes (Leica, Wetzlar) und eines Laser-Scanning-Mikroskopes (Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg). Die Laser-Scanning-Mikroskopie machte eine Betrachtung der Zelle in genau definierten Ebenen möglich, so daß Überlagerungseffekte der Fluoreszenz, welche durch die Dreidimensionalität der Zelle zustande kamen, ausgeschlossen werden konnten.

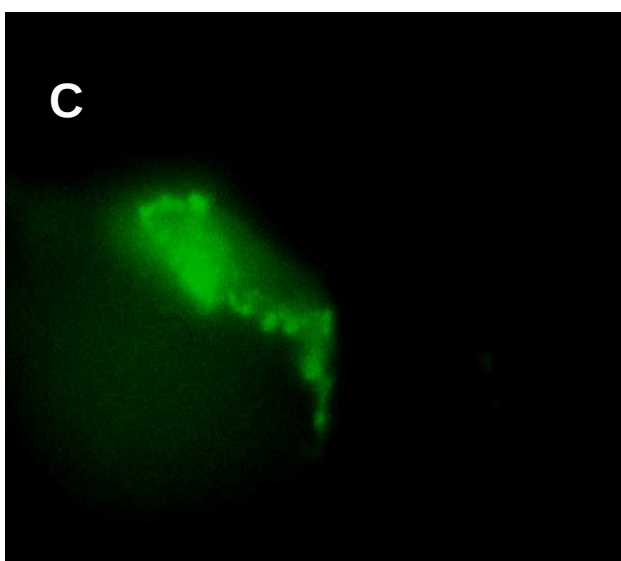
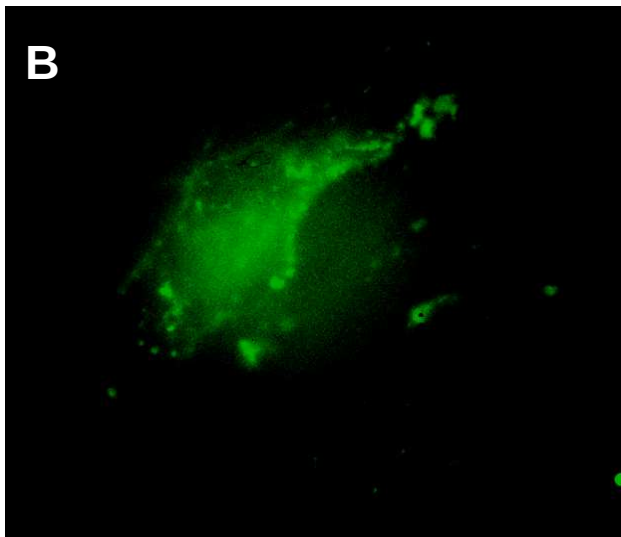
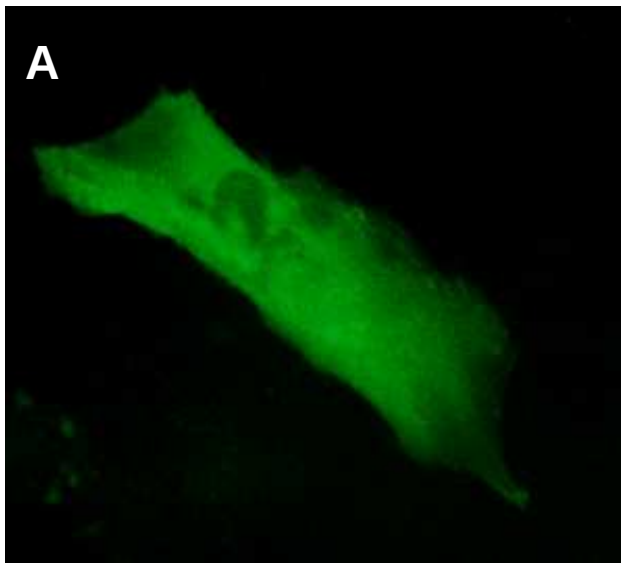


Abb.5.1.:
Fluoreszenzmikroskopische
Aufnahmen der mit dem PKC β -
EGFP-Plasmid transfizierten und
anschließend mit PFA fixierten
Zellen.

A: Unstimulierte PTC.

B: Positivkontrolle:

Nach Stimulation mit PMA (3
 $\mu\text{g/ml}$; 5 min) ist eine
verstärkte Fluoreszenz der
Zellmembran zu beobachten.

C: PTC nach Stimulation mit
rek. MIF (100 ng/ml; 30 min).
Auch hier ist die PKC β
vorwiegend an der
Zellmembran lokalisiert.

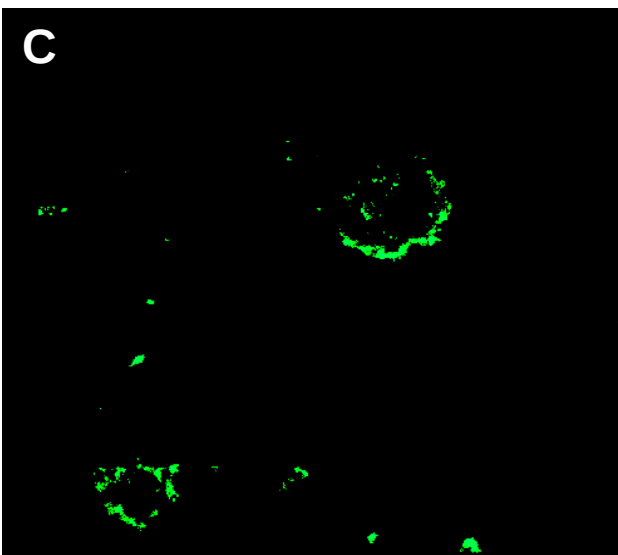
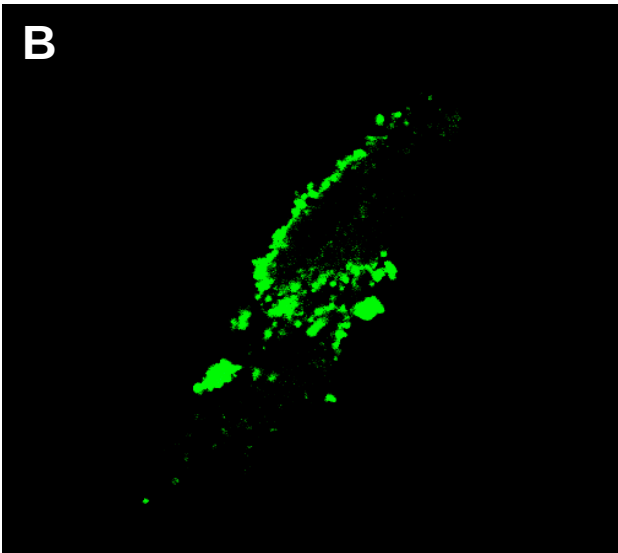
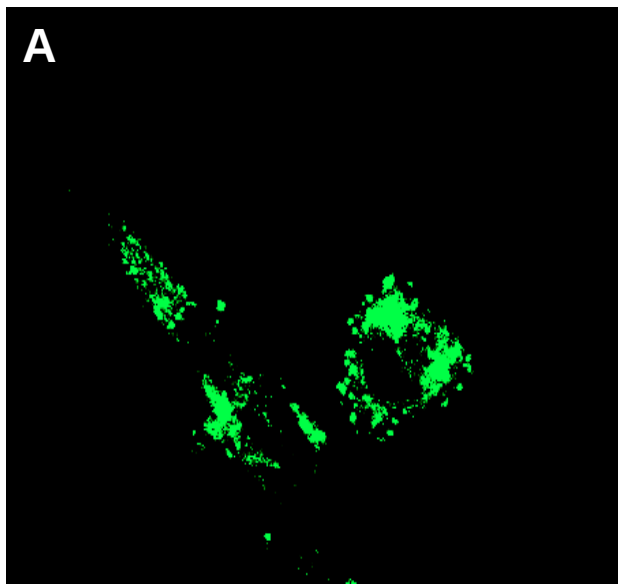


Abb.5.2.:
Aufnahmen der PTC mit dem
Laser-Scanning-Mikroskop.

A: Unstimulierte PTC. Die PKC β
ist homogen im Zytoplasma
verteilt.

B: Positivkontrolle:
Nach Stimulation mit PMA (3
 $\mu\text{g/ml}$; 5 min) ist die PKC β an
der Zellmembran lokalisiert.

C: PTC nach Stimulation mit rek.
MIF (100 ng/ml; 5 min). Hier
ist die PKC β ebenfalls an der
Zellmembran lokalisiert, das
Zytoplasma ist überwiegend
negativ.

5.2. Einfluß von MIF auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration der Peritubulärzellen

Um eine Erhöhung des intrazellulären Gehaltes an zyklischem Adenosin-Monophosphat (cAMP) nach Stimulation der PTC mit rek. MIF zu überprüfen, wurde ein kompetitiver ELISA durchgeführt. Durch Acetylierung der Proben konnten cAMP-Standard-Konzentrationen von 0,078 pmol/ml bis 20 pmol/ml gemessen werden.

Als Positivkontrolle diente eine Stimulation mit 100 mM Forskolin. Die Positivkontrolle zeigte einen Anstieg der cAMP-Konzentration über 20 pmol/ml und lag somit außerhalb des Maximalbereichs der Standardkurve. Die übrigen Messungen lagen alle im Bereich der Standardmeßwerte.

Nach 15-minütiger, 1-stündiger und 3-stündiger Stimulation mit MIF in den Konzentrationen 50 ng/ml und 100 ng/ml konnte kein Anstieg des intrazellulären cAMP in PTC festgestellt werden (Abb.5.3.).

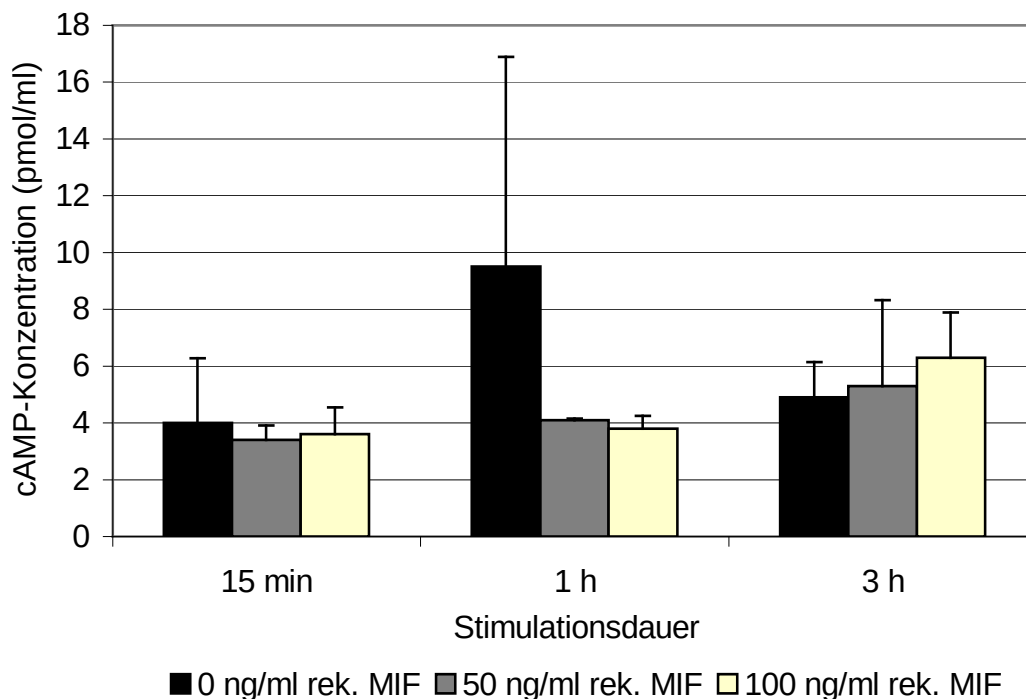


Abb.5.3.: Messung der cAMP-Konzentration mittels ELISA. Die PTC wurden mit MIF in den Konzentrationen 50 ng/ml und 100 ng/ml (in RPMI 1640) oder mit RPMI 1640 ohne Zusätze stimuliert. Nach 15 min, 1 h und 3 h wurden die cAMP-Konzentrationen gemessen.

Stimulations- dauer	MIF-Konzentration			Positiv- kontrolle 100 mM Forskolin
	0 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	
15 min	2,3	3,2	4,2	>> 20
	2	3,6	4,5	
	2,9	3,2	1,6	
	2,5	2	2,9	
	3,4	2,4	3,2	
	7,5	3	3	
1 h	16	3,9	2,7	>> 20
	4,4	3,8	3,4	
	3,8	3,8	4,2	
3 h	4,75	3,9	6,5	>> 20
	4,75	8	4,5	
	5	3,2	6,5	
	7	3	7,5	
	4,1	5,4	4,3	
	3,3	3,4	4,5	

Tab. 5.1.: cAMP-Konzentrationen (pmol/ml), die nach Anleitung der Firma Biotrend durch Bestimmung der optischen Dichte berechnet wurden.

5.3. Proliferative Wirkung von MIF auf Peritubulärzellen

Die Proliferation der PTC wurde mit Hilfe des Amidoblack-Proliferationsassays bestimmt. Die PTC wurden mit verschiedenen Konzentrationen von rek. MIF über mehrere Tage stimuliert. Obwohl bekannt ist, dass fetales Kälberserum (FKS) allein auf Zellen eine mitogene Wirkung hat, war in dem Stimulationsmedium FKS enthalten, da die PTC ohne Serum eine Stimulationsdauer von mehreren Tagen nicht überlebt hätten. Um eine Abhängigkeit vom FKS-Gehalt zu überprüfen, wurde der Versuch mit 2% FKS-, 4% FKS- und 10% FKS-haltigem Medium durchgeführt. Bei Stimulation mit 2% FKS-haltigem und 4% FKS-haltigem Medium wurde als Positivkontrolle eine Stimulation mit 10% FKS-haltigem Medium durchgeführt, um die Proliferationsfähigkeit der Zellen zu kontrollieren.

Die Proliferationsrate der PTC zeigte eine Abhängigkeit vom FKS-Gehalt des Mediums (Abb.5.4.).

Es konnte hingegen keine Wirkung von MIF auf die Proliferation der PTC festgestellt werden. Eingesetzt wurden MIF-Konzentrationen von 50 ng/ml, 100 ng/ml und 500 ng/ml. Abb. 5.4. zeigt die Abhängigkeit der Proliferation vom FKS-Gehalt. Abb. 5.5. zeigt eine beispielhafte Messung, die nach 3 Tagen Stimulationsdauer erfolgte. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS.

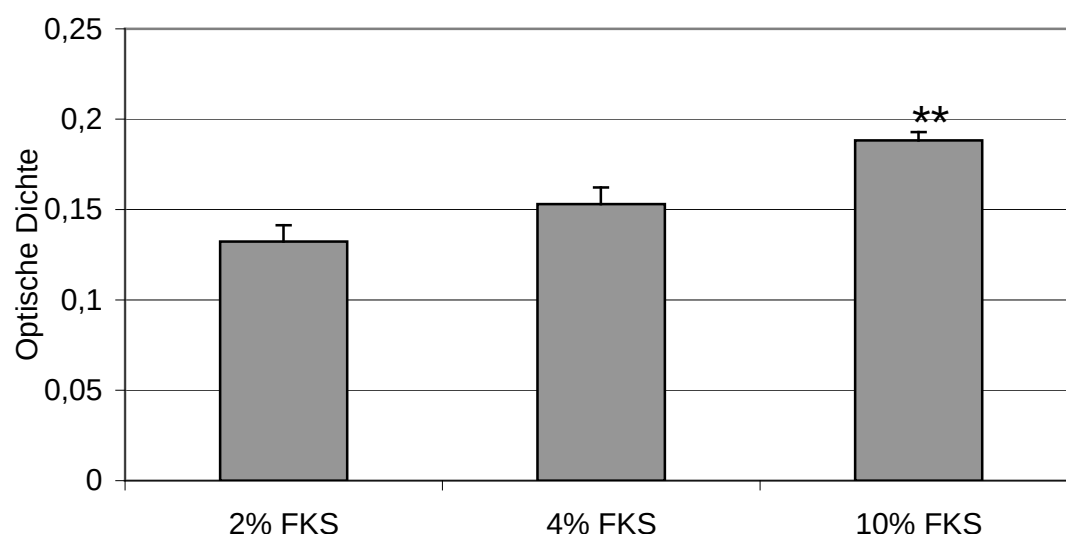


Abb.5.4.: Erhöhung des FKS-Gehaltes im Medium führt zu einem signifikanten Anstieg der Proliferation ($p < 0,01$). Die Messung erfolgte mit dem Amidoblack-Assay ($n=8$).

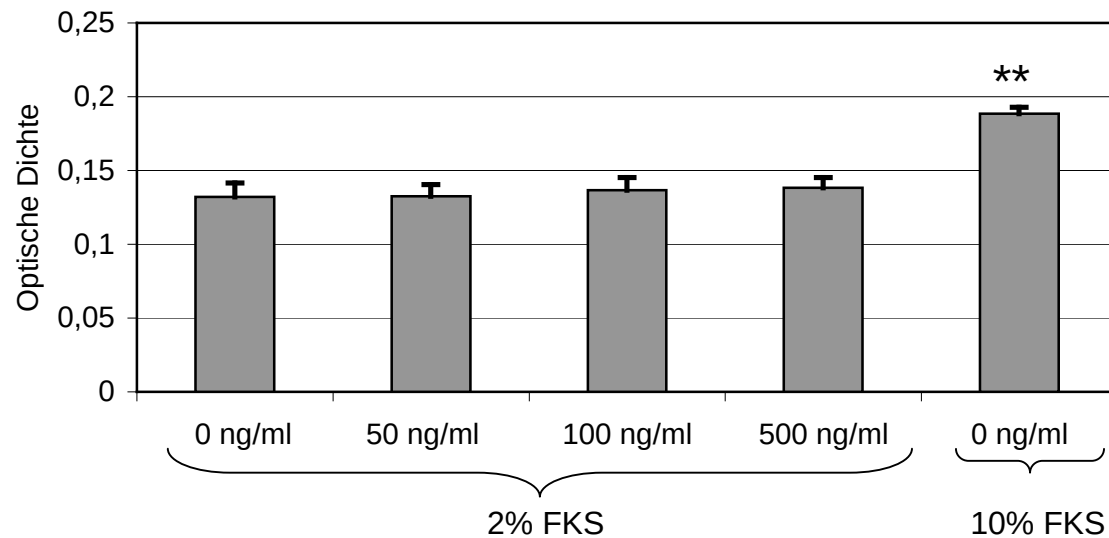


Abb.5.5.: Messung der Proliferation der PTC mittels eines Amidoblack-Assays nach 3-tägiger Stimulation mit MIF in RPMI 1640 mit 2% FKS. Stimuliert wurde mit MIF in den Konzentrationen 0, 50 und 100 ng/ml. Als Positivkontrolle diente eine Stimulation mit RPMI 1640 mit 10% FKS. Nur bei der Positivkontrolle war ein signifikanter Anstieg der Proliferation zu beobachten ($p < 0,01$ / $n=8$).

5.4. Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP1 und ELK-1

Eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP1 und ELK-1 in den PTC wurde mit Hilfe des Luciferase-Assays überprüft.

Die PTC wurden mit Reportergenvektoren transfiziert, die die entsprechenden Promotorsequenzen enthielten. Für AP1 war dies der Vektor AP1, für ELK-1 der Vektor SRE. Als Positivkontrolle diente eine Doppeltransfektion mit dem zu untersuchenden Plasmid und dem Positivkontroll-Plasmid FC.

Nach 6-stündiger Stimulation der PTC mit MIF in den Konzentrationen 50 ng/ml und 100 ng/ml konnte bei keinem der Vektoren eine vermehrte Luciferase-Aktivität und somit keine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP1 und ELK-1 nachgewiesen werden.

Bei dem Vektor SRE gab es bei einer von 5 Versuchsreihen einen signifikanten Anstieg nach Stimulation mit 50 ng/ml, der allerdings nicht reproduziert werden

konnte. Bei dem Plasmid AP1 konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Für die Diagramme wurden exemplarisch Ergebnisse von je einer einzelnen Messung dargestellt.

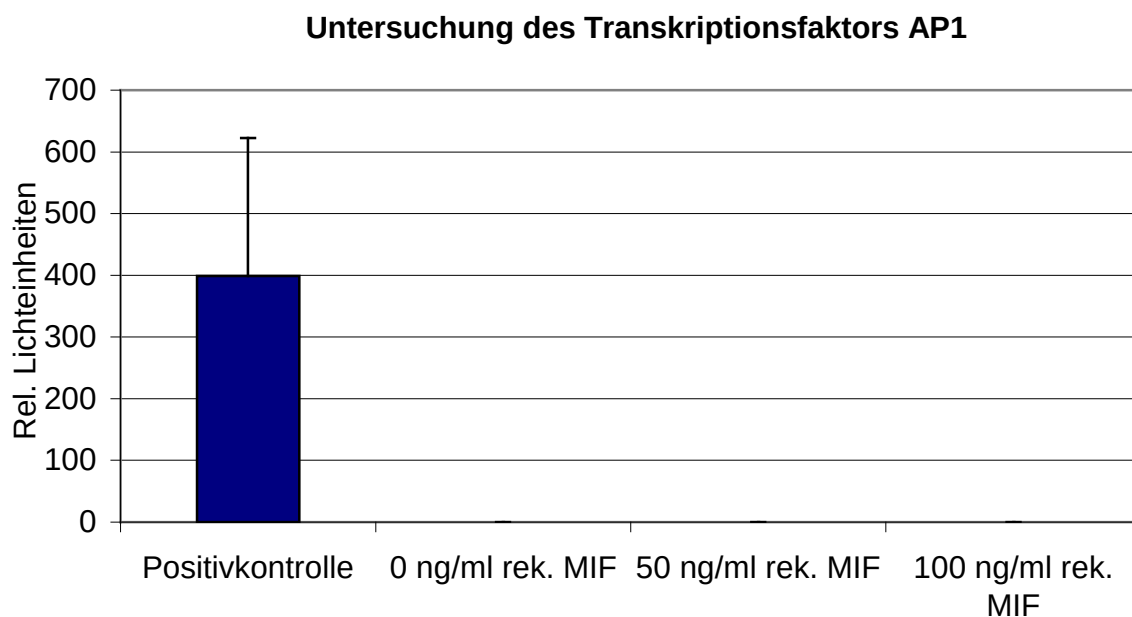


Abb.5.6.: Messung der Lumineszenz 2 Tage nach Transfektion der PTC mit dem Vektor AP1. Als Positivkontrolle wurde eine Doppeltransfektion zusätzlich mit dem Positivkontrollplasmid durchgeführt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne MIF. Mit rek. MIF wurde in den Konzentrationen 50 ng/ml und 100 ng/ml stimuliert. Die Stimulationsdauer betrug 6h. Bei der Negativkontrolle und bei den Stimulationen mit MIF konnte keine Lumineszenz gemessen werden. Das Diagramm zeigt exemplarisch die Ergebnisse einer einzelnen Messreihe.

Untersuchung des Transkriptionsfaktors ELK-1

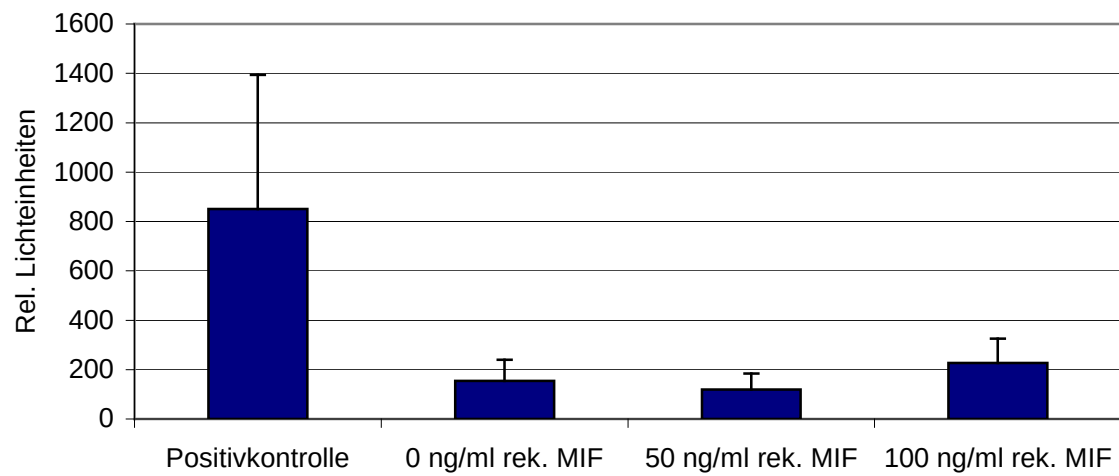


Abb.5.7.: Messung der Lumineszenz 2 Tage nach Transfektion der PTC mit dem Vektor SRE. Bei der Positivkontrolle wurde eine Doppeltransfektion mit einem Positivkontrollplasmid durchgeführt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne MIF-Zugabe. Stimulationen wurden mit rek. MIF in den Konzentrationen 50 ng/ml und 100 ng/ml durchgeführt. Die Stimulationsdauer betrug 6h. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse einer einzelnen Messreihe.

5.7. DNA-Anreicherung

Die verwendeten Plasmide wurden zunächst durch Transformation kompetenter Bakterien und anschließender Plasmidpräparation angereichert. Der Erfolg der Plasmidpräparation wurde mittels analytischem Restriktionsverdau und anschließender Gelelektrophorese überprüft. Die Banden in der erwarteten Höhe zeigten, dass die Vektoren erfolgreich amplifiziert werden konnten.

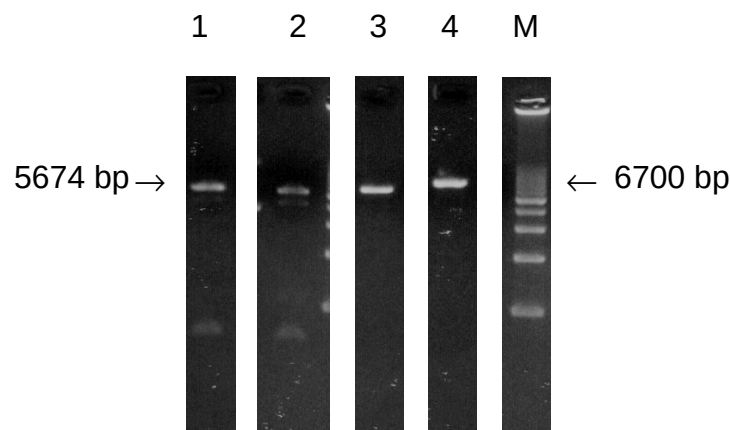


Abb.5.8.: Auftrennung und Ethidiumbromid-Färbung der durch Restriktionsverdau linearisierten Vektor-DNA. Spur 1: Vektor AP1, Spur 2: Vektor SRE, Spur 3: Positivkontrollvektor (FC), Spur 4: PKC β -EGFP-Vektor. Als Größenmarker wurde ein 1kb-Marker eingesetzt.

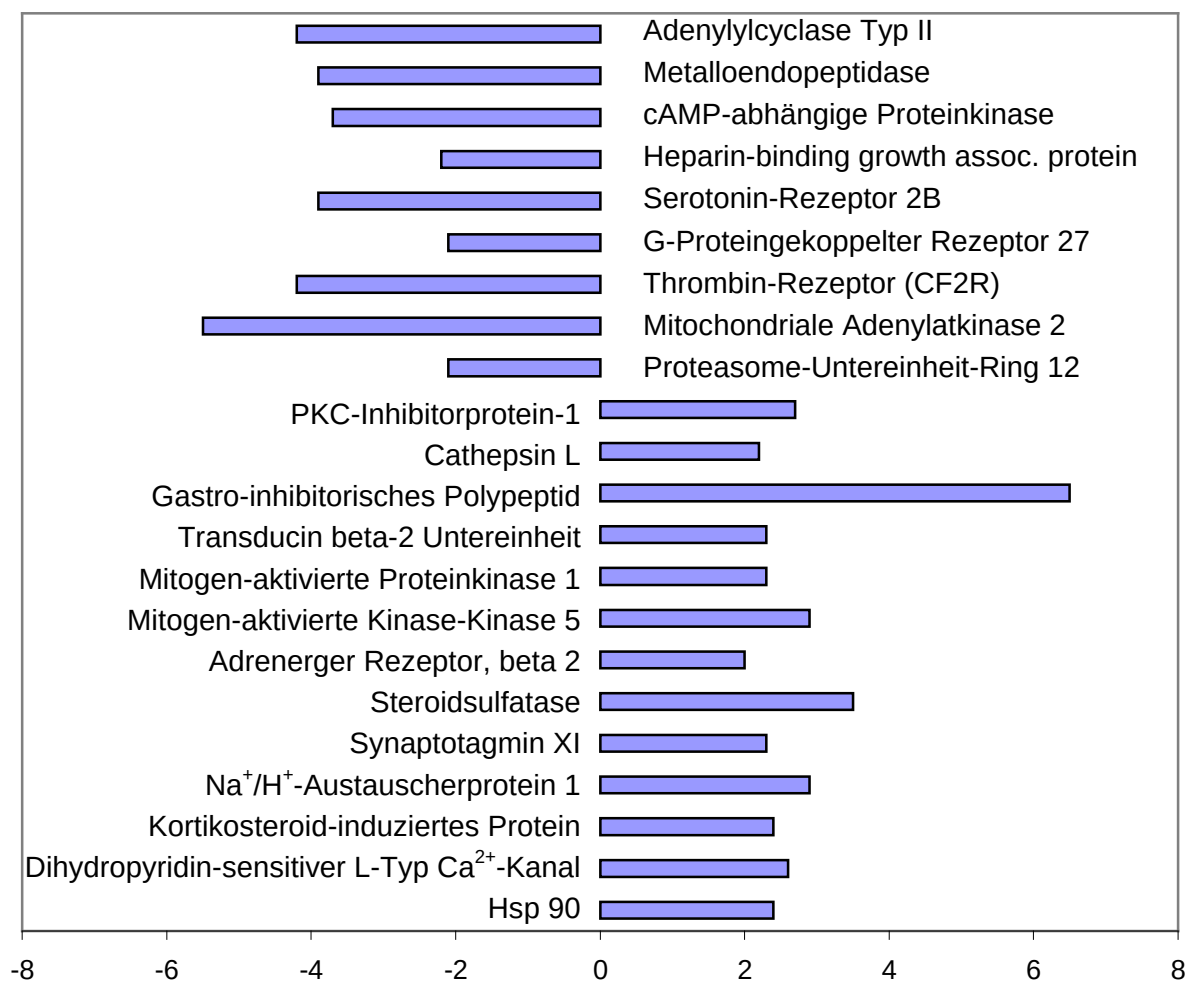
5.8. cDNA-Array

Die differentielle Expression verschiedener Gene nach MIF-Stimulation wurde mit einem cDNA-Array überprüft.

Nach 1-stündiger Inkubation der PTC mit rek. MIF (50 ng/ml) konnte eine differentielle Expression von insgesamt 26 Genen beobachtet werden (siehe Tab.5.4., Abb.5.9.a+b). Gene des MAP-Kinase-Weges (MAP-Kinase-Kinase 5 und MAP-Kinase 1) wurden verstärkt exprimiert, während die Gene der cAMP-abhängigen Proteinkinase und der Adenylcyclase Typ II vermindert transkribiert wurden. Bei sechs Rezeptortypen konnte ein verändertes Expressionsmuster festgestellt werden. Der β_2 -adrenerge-Rezeptor wurde

hochreguliert, während der Thrombin-Rezeptor, der G-Proteingekoppelte Rezeptor 27 und der Serotonin-Rezeptor 2B eine geringere Expression im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen. Das antiapoptotisch-wirkende Heat-shock-protein hsp 90 wurde vermehrt exprimiert.

Den stärksten Anstieg (6,5-fach) zeigte das Gastroinhibitorische Peptid. Die Enzyme Steroid-Sulfatase und Cathepsin L wurden ebenso wie das Kortikosteroid-induzierte Protein, Synaptogamin XI, das Na^+/H^+ -Austauscherprotein 1 und der Dihydropyridin-sensitiver L-Typ Calcium-Kanal verstärkt exprimiert. Auch die Expressionsintensitäten des PKC-Inhibitorproteins, der Transducin β_2 -Untereinheit und des Hitze-Schock-Proteins Hsp90 stiegen an. Vermindert exprimiert wurden dagegen das Heparin-binding growth associated protein, die Metalloendopeptidase meprin β -Untereinheit, die mitochondriale Adenylatkinase und die Proteasom-Untereinheit-Ring12.



Tab. 5.4.: Differentielle Genexpression in PTC nach 1-stündiger Stimulation mit rek. MIF (50 ng/ml).

<u>Nr</u>	<u>Transkripte hochreguliert durch MIF</u>	<u>Gen Bank Accession-Nr.</u>	<u>Gesteigerte Expression um den Faktor</u>
1	Hsp90 –beta	S45392	2.4
2	Dihydropyridin-sensitiver L-Typ Calcium-Kanal beta 3 Untereinheit	M88751	2.6
3	Kortikosteroid-induziertes Protein	L41254	2.4
4	Na ⁺ /H ⁺ - Austauscher 1	P26431	2.9
5	Synaptotagmin XI; membrane protein trafficking	AF000423	2.3
6	Steroidsulfatase	U37138	3.5
7	Adrenerger Rezeptor, beta 2	J03024	2.0
8	MAP-Kinase-Kinase 5	U37462	2.9
9	MAP-Kinase 1 (ERK1)	M61177	2.3
10	Transducin beta2-Untereinheit	U34959	2.3
11	Gastro-inhibitorisches Polypeptid; Vorläufer (GIP)	L08831	6.5
12	Cathepsin L	Y00697	2.2
13	PKC-Inhibitorprotein 1	M84416	2.7

<u>Nr</u>	<u>Transkripte herabreguliert durch MIF</u>	<u>Gen Bank Accession-Nr.</u>	<u>Verminderte Expression um den Faktor</u>
14	Adenylylcyclase Typ II	M80550	4.2
15	Metalloendopeptidase; Meprin beta Untereinheit	M88601	3.9
16	cAMP-abhängige Proteinkinase; katalytische Untereinheit	X57986	3.7
17	Heparin-binding growth associated Protein	M55601	2.2
18	Serotonin-Rezeptor 2B	X66842	3.9
19	G-Proteingekoppelter Rezeptor 27	D12820	2.1
20	Thrombin-Rezeptor (CF2R)	M81642	4.2
21	Mitochondriale Adenylatkinase 2	D13061	5.5
22	Proteasome Untereinheit-Ring 12	D10757	2.1

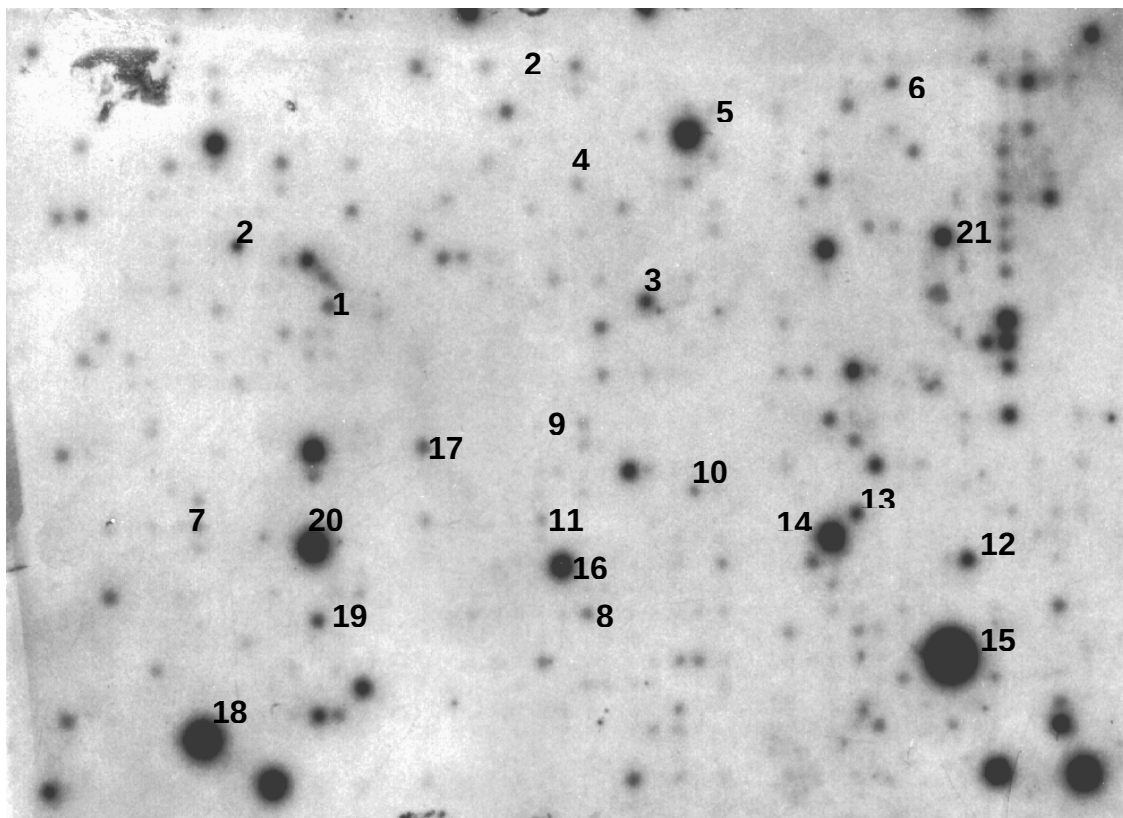


Abb.5.9.a: Genexpressionsmuster der unstimulierten PTC.

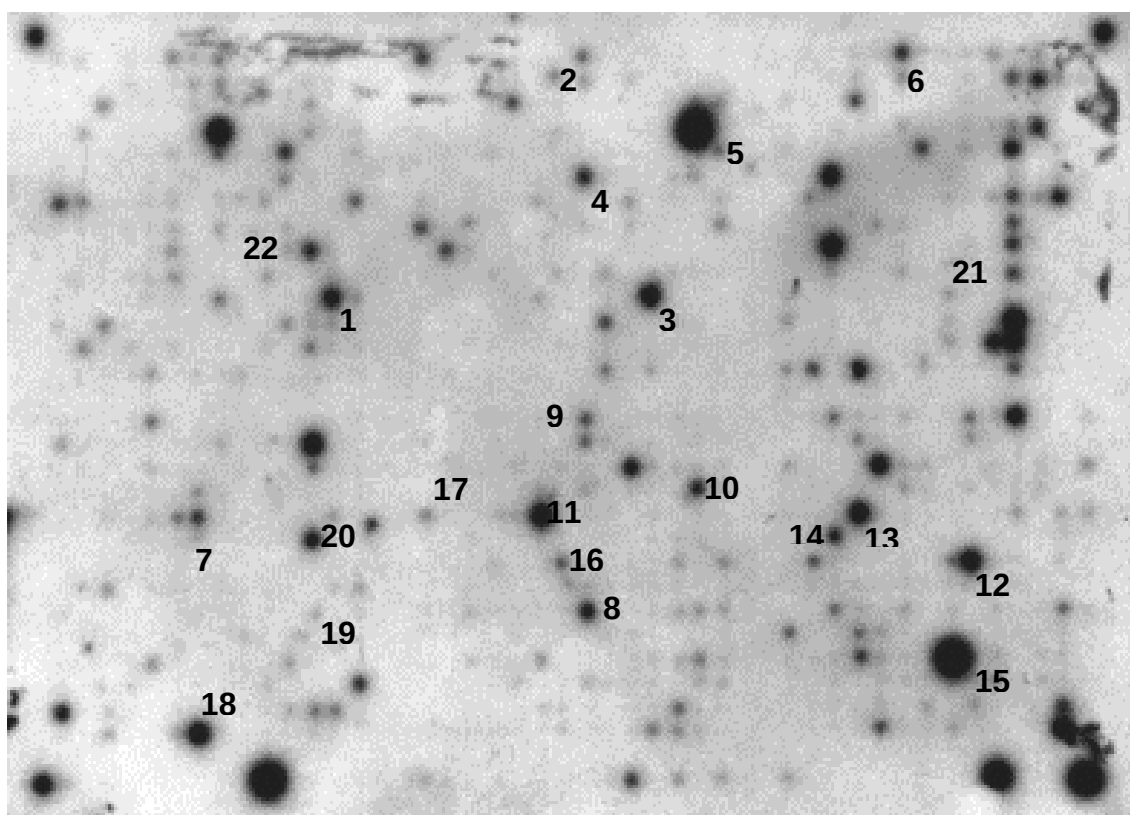


Abb.5.9.b: Genexpressionsmuster der PTC nach 1-stündiger Stimulation mit MIF (50 ng/ml).

6. Diskussion

In den letzten Jahren wurden für das Zytokin MIF neben seiner ursprünglichen Rolle als proinflammatorischem Faktor eine Reihe weiterer Funktionen beschrieben. Dazu zählen unter anderem eine Beteiligung an der Tumorentstehung und regulative Eigenschaften in endokrinen Organen. Trotz dieser Fortschritte ist der molekulare Wirkmechanismus von MIF noch weitgehend unverstanden. Obwohl die MIF-Aktivität bereits in den 60er Jahren entdeckt worden war, konnte erst vor kurzem ein membranständiges Bindungsprotein für MIF identifiziert werden. Auch die molekularen Signaltransduktionswege, die durch MIF aktiviert werden, zeigen in den beschriebenen Untersuchungen eine Vielzahl von konträren Ergebnissen.

Im Hoden zeigt MIF wichtige regulatorische Eigenschaften. Nach Depletion der MIF-produzierenden Leydig-Zellen wird es kompensatorisch von den Sertoli-Zellen gebildet und konnte auch in den Peritubulärzellen nachgewiesen werden (Meinhardt et. al, 1999).

Untersuchungen zur Wirkung von MIF auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration zeigten in Sertoli-Zellen keine Veränderungen, während die PTC mit einer deutlichen, dosisabhängigen Erhöhung des intrazellulären Calciums reagierten (Wennemuth et al., 2000).

Basierend auf diesen Ergebnissen sollte in der vorliegenden Arbeit der molekulare Wirkmechanismus von MIF an PTC-Kulturen näher charakterisiert werden.

6.1. Signaltransduktion des Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktors

6.1.1. Untersuchungen zur molekularen Wirkungsweise von MIF auf Zellen

Da MIF ein hydrophiles Zytokin ist und somit nicht zu erwarten ist, dass es frei durch die Zellmembran diffundiert, basiert die vorliegende Arbeit auf der

Hypothese, dass MIF mittels eines membranständigen Rezeptors an PTC bindet und dadurch die von Wennemuth et al. (2000) beschriebene Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration in diesen Zellen bewirkt.

Jüngste Untersuchungen an humanen Monozyten, murinen Makrophagen und der humanen Raji B-Zell-Linie zeigten eine Bindung von MIF an CD74, der Zelloberflächenform der MHC-Klasse-II-assoziierten unveränderlichen Kette (Leng et al., 2003). CD74 spielt eine Rolle beim Transport von MHC Klasse II-Proteinen vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Komplex und bei der B-Zell-Reifung (Cresswell, 1994; Matza et al., 2001). Zu beachten ist, dass nur 2-5% des zellulären CD74 auf der Zelloberfläche exprimiert werden (Wraight et al., 1990). Wichtig ist außerdem, dass für CD74 keine intrazelluläre Signaltransduktionsdomäne bekannt ist. Möglicherweise wird MIF somit durch die Bindung an CD74 seinem eigentlichen, noch unbekannten Rezeptor präsentiert.

Untersuchungen an humanen Transitionalzellkarzinom-Zellen (HT1376) bestätigten eine Assoziation von MIF mit CD74 (Meyer-Siegler et al., 2004). In dieser Studie wurde jedoch auch eine Assoziation mit CD44 gezeigt, welche sich als wesentlich stärker als die mit CD74 erwies. CD44 stellt ein Adhäsionsmolekül dar, welches für die Aktivierung von CD74 benötigt wird. Diese Ergebnisse ließen die Vermutung aufkommen, dass der MIF-CD44-Komplex mit CD-74 interagiert und durch Aktivierung der ERK1/2 die Zytokinproduktion und Zellproliferation induziert (Meyer-Siegler et al., 2004).

Ein weiterer Wirkungsmechanismus wurde in einer Rezeptor-unabhängigen endozytotischen Aufnahme von MIF in Raw 264.7-Makrophagen und HeLa-Zellen beschrieben (Kleemann et al., 2000). Allerdings ist hierbei unklar, wie MIF aus den endozytotischen Vesikeln in das Zytosol gelangt.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Aktivierung der Proteinkinase C durch MIF gezeigt werden. Zusammen mit der bereits beschriebenen Erhöhung des intrazellulären Calciums in MIF-stimulierten PTC, weist dieses Ergebnis auf eine Bindung von MIF an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor auf PTC hin. Die Hypothese wird gestützt durch Untersuchungen von Schwarz (2003), welche eine Hemmung des MIF-induzierten Calcium-Anstiegs durch den G_i-Protein-Inhibitor Pertussis-Toxin zeigten. Diese Versuche wurden jedoch mit hohen Dosen des Inhibitors (5 µg/ml) durchgeführt, so dass eine unspezifische

Hemmung anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren nicht auszuschließen ist. Der klassische, durch Calcium-mobilisierende Hormone aktivierte G-Protein-gekoppelte Signaltransduktionsweg, der auch die Phospholipase C- β und somit den Inositoltriphosphat-Weg aktiviert, ist der G_q -Weg (Neves et al., 2002). Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, daß MIF auf PTC an einen G_q -Protein-gekoppelten Rezeptor bindet und dadurch die intrazelluläre Calciumerhöhung induziert.

6.1.2. Untersuchungen zur Aktivierung des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges durch MIF

Eine Aktivierung des MAP-Kinase (mitogen activated protein kinase)-Signaltransduktionsweges durch MIF ist bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen berichtet worden.

Mitchell et al. (1999) gaben bei Untersuchungen der murinen Fibroblastenzelllinie NIH/3T3 erste Hinweise für eine Aktivierung des MAP-Kinase-Weges. Dabei stand die Wirkung von MIF im Zusammenhang mit der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) und induzierte eine Aktivierung der Phospholipase A2 mit nachfolgender Arachidonsäure-Freisetzung aus der Zelle. Durch Inhibition der PKA mittels H-89 konnte keine ERK-Aktivierung mehr hervorgerufen werden, wogegen eine Inhibition der PKC keinen Einfluß zeigte. Auch konnte in den MIF-stimulierten NIH/3T3-Zellen keine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration festgestellt werden (Mitchell et al., 1999).

In humanen Fibroblasten, welche aus der Synovia des Kniegelenkes von Patienten mit rheumatoider Arthritis gewonnen wurden, stimulierte MIF die Bildung von Matrixmetalloproteinase-1 (MMP-1) und -3 (MMP-3). Die Tyrosinkinase-Inhibitoren Genistein und Herbimycin A sowie der Proteinkinase C-Inhibitor Staurosporin waren in der Lage, die MIF-induzierte MMP-1- und MMP-3-Expression zu supprimieren, wogegen hier eine Inhibition der PKA durch den Inhibitor H-8 keine Wirkung zeigte. Die erhöhte MMP-1 und -3 Expression waren abhängig von der Aktivität des Transkriptionsfaktors AP1, was sich in einer Verminderung der Expression durch Curcumin, einem AP1-Inhibitor darstellte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass MIF in diesen

Fibroblasten eine Src-Tyrosinkinase-, PKC- und AP1-abhängige Signaltransduktion auslöst (Onodera et al., 2000). Dabei ist jedoch zu beachten, dass MIF in dieser Studie in unphysiologisch hoher Konzentration (1µg/ml) eingesetzt wurde. In der Synovialflüssigkeit bei rheumatoider Arthritis werden MIF-Konzentrationen um 85 ng/ml erreicht (Onodera et al., 1999) und selbst unter septischen Bedingungen steigt die MIF-Konzentration auf maximal 150 ng/ml (Calandra et al., 2000).

Spätere Untersuchungen der gleichen Arbeitsgruppe zeigten eine erhöhte Expression von MMP-13 in Osteoblasten der Ratte nach Stimulation durch MIF. Auch in dieser Studie wurde die gesteigerte Expression der MMP-13 durch Genistein, Herbimycin A und Curcumin unterdrückt. Der MAP-Kinase-selektive Inhibitor PD98059 verhinderte die vermehrte MMP-13-, *c-jun*- und *c-fos*-Expression. C-Jun und c-Fos können durch die Bildung eines Heterodimers den Transkriptionsfaktor AP1 aktivieren. Die Daten dieser Arbeit weisen auf eine Beeinflussung der MMP-13-Expression durch einen Src-, ERK1/2- und AP1-abhängigen Signaltransduktionsweg hin (Onodera et al., 2002). Jedoch waren diese Effekte wiederum nur mit extrem hohen MIF-Konzentrationen (10µg/ml) induzierbar, was an der Relevanz dieses Mechanismus *in vivo* zweifeln lässt.

Eine spätere Studie an dermalen Fibroblasten zeigte ähnliche Effekte schon bei einer MIF-Konzentration von nur 100 ng/ml. In dieser Studie wurde die MMP-1 mRNA-Hochregulation durch MIF durch Herbimycin A, Genistein, einen PKC-Inhibitor GF109203X, einen PKA-Inhibitor (H89), einen MEK-Inhibitor (PD98089) und einen JNK-Inhibitor (SP600125) verhindert. Außerdem führte MIF zur Phosphorylierung von Raf, der PKC und der MAP-Kinase (Watanabe et al., 2004).

Kardiomyozyten reagierten in einer Studie von Fukuzawa et al. (2002) auf oxidativen Streß mit einer Proteinkinase C-abhängigen Sekretion von MIF, welche daraufhin über die MEK1/2 (MAP/ERK-Kinase) eine Aktivierung der ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase), einem klassischen Molekül der MAPK-Familie, bewirkte.

Für die angiogenetischen Eigenschaften von MIF scheint die Aktivierung zweier voneinander unabhängiger Signaltransduktionswege, nämlich des PI3K-Akt-Weges und der MAP-Kinase-Kaskade, wichtig zu sein. Eine Studie an HMVEC (humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen) zeigte, dass die PI3-Akt-

Aktivierung antiapoptotisch wirkt, während die MAPK-Kaskade auf diesen Parameter keinen Einfluß nimmt. Die ERK1/2-Aktivierung induzierte die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ELK-1 und war bedeutend für die Proliferation der Endothelzellen. Die Src-Tyrosinkinase und c-Jun spielten bei diesen Zellen allerdings keine Rolle als Signalmolekül für MIF (Amin et al., 2003).

Eine Aktivierung des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges in Peritubulärzellen konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Im cDNA-Array konnte nach MIF-Stimulation von PTC zwar eine vermehrte Expression von Molekülen des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges, nämlich der ERK1 und MKK5, gezeigt werden, aufgrund der gesteigerten Expression allein kann allerdings nicht auf eine tatsächliche Aktivierung geschlossen werden. Weitere Ergebnisse (s.u.) der vorliegenden Arbeit lassen eine MAP-Kinase-Aktivierung in PTC unwahrscheinlich erscheinen, doch könnte eine Untersuchung der MAP-Kinase-Phosphorylierung mittels Westernblot in zukünftigen Studien sinnvoll sein.

In NIH/3T3-Zellen und dermalen Fibroblasten war die cAMP-abhängige PKA bei der MAP-Kinase-Aktivierung involviert (Mitchell et al., 1999; Watanabe et al., 2004). Doch auch eine PKA-Aktivierung in PTC erscheint nach den Untersuchungen zu dieser Arbeit unwahrscheinlich. So wurde im cDNA-Array nicht nur eine verminderte Expression der Adenylatcyclase, welche die cAMP-Synthese aus Adenosintriphosphat (ATP) induziert, nachgewiesen, sondern es konnte zudem gezeigt werden, dass die cAMP-abhängige PKA selbst vermindert exprimiert wird. Im Einklang dazu konnten im cAMP-ELISA nach Stimulation mit MIF keine erhöhten cAMP-Konzentrationen nachgewiesen werden. Auch der bereits beschriebene Calcium-Anstieg und die Aktivierung der Proteinkinase C stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen an NIH/3T3-Zellen. Die Studie an synovialen Fibroblasten unterstützt die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit insofern, dass die molekulare Wirkung von MIF nicht in allen Zellen über die PKA vermittelt wird (Onodera et al., 2000).

Reporterassays mit Luciferase als Reporter wurden durchgeführt, um eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP1 und Elk-1 zu untersuchen. AP1 und Elk-1 sind mögliche Zielproteine der MAP-Kinase-Signaltransduktion. Eine Aktivierung von AP1 oder Elk-1 durch MIF wurde in einer Vielzahl von Studien

beschrieben (Onodera et al., 2000; Onodera et al., 2002; Amin et al., 2003). Kleemann et al. (2000) zeigten hingegen, daß MIF in der Makrophagen-Zelllinie Raw 264.7 und in HeLa-Zellen an das zytoplasmatische Protein Jab1 bindet, welches den Transkriptionsfaktors AP1 (activating protein-1) aktiviert. In dieser Arbeit wurde durch die Bindung an MIF die Aktivierung von AP1 durch Jab1 inhibiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte in PTC keine Aktivierung von AP1 und Elk-1 festgestellt werden. Eine Inaktivierung der Transkriptionsfaktoren AP1 und Elk-1 wurde nicht untersucht und ist Inhalt zukünftiger Experimente.

6.1.3. Untersuchungen zur Aktivierung der Proteinkinase C β durch MIF

Die Proteinkinase C wurde bereits in synovialen und dermalen Fibroblasten als Signaltransduktionsmolekül für MIF beschrieben (Onodera et al., 1999; Watanabe et al., 2004). Ihre Aktivierung wurde in diesen Arbeiten jedoch nur indirekt nachgewiesen, indem gezeigt wurde, dass die Expression der MMP durch MIF nach Inhibition der PKC supprimiert wurde.

Die PKC ist eine Serin- und Threoninkinase und existiert in verschiedenen Subtypen. Zu den konventionellen Subtypen, die Calcium und DAG binden, gehören die Isoformen α , β und γ . Die PKC γ tritt nur im Gehirn auf, während die PKC α und β in vielen verschiedenen Organen vorkommen (Azzi et al., 1992). In der vorliegenden Arbeit konnte an Peritubulärzellen, die mit einem Plasmid transfiziert worden waren, welches die PKC β gekoppelt an das Green-fluorescent-protein (GFP) enthielt, eine Aktivierung der Proteinkinase C β in vivo gezeigt werden. Mittels Fluoreszenz- und Laserscanning-Mikroskopie konnte in Peritubulärzellen nach Stimulation mit MIF eine Translokation der zuvor zytoplasmatisch vorliegenden PKC β an die Zellmembran nachgewiesen werden. Diese Translokation an die Membran gilt als Beweis für die Aktivierung der PKC (Liu et al., 1996).

Im cDNA-Array konnte nach Inkubation der PTC mit MIF eine gesteigerte Expression des Proteinkinase C-Inhibitors KCIP-1 um den Faktor 2,7 nachgewiesen werden. Dieser bildet ein Substrat der Proteinkinase C (Toker et

al., 1992) und könnte ein weiterer Hinweis für eine vorausgegangene PKC-Aktivierung sein.

Die PKC wird im Inositoltriphosphat-Weg über die Aktivierung der Phospholipase C mit konsekutiver Spaltung von Phosphatidyl-Inosit-4,5-Bisphosphat in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP_3) durch DAG aktiviert. Das hydrophile IP_3 bewirkt eine Öffnung von Calcium-Kanälen des endoplasmatischen Retikulums und somit eine Erhöhung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration. Die Aktivierung der PKC steht somit im Einklang mit der von Wennemuth et al. (2000) beschriebenen Erhöhung des intrazellulären Calciums und lässt eine Involvierung des Inositoltriphosphat-Weges für die MIF-Signaltransduktion in PTC vermuten.

6.1.4. Untersuchungen zur Steigerung der Zellproliferation durch MIF

Die durch MIF hervorgerufenen biologischen Effekte sind ebenso mannigfaltig wie seine molekularen Wirkmechanismen. In NIH/3T3-Fibroblasten und Endothelzellen (HMVECs) steigert MIF die Zellproliferation (Mitchell et al. 1999; Amin et al., 2003). Im Gegensatz dazu zeigte eine Studie an NIH/3T3- und Jurkat T-Zellen, dass MIF über eine Bindung an Jab1 den Abbau des Zellzyklus-Inhibitors $p27^{Kip1}$ inhibiert und somit anti-proliferativ wirkt (Kleemann et al., 2000).

In eigenen Untersuchungen konnten mittels Amidoblack-Assay keine Hinweise auf eine vermehrte Proliferation der PTC durch MIF festgestellt werden. Auch konnte keine Aktivierung der wachstumsfördernden MAP-Kinase festgestellt werden. Diese Daten lassen vermuten, dass MIF keinen Effekt auf das Zellwachstum ausübt. Hier wäre jedoch eine wiederholte Untersuchung mit vorheriger Stimulation von AP1 durch Jab1 lohnenswert, um eine mögliche anti-proliferative Wirkung von MIF, wie sie von Kleemann et al. (2000) beschrieben worden ist, auszuschließen.

6.2. Hypothese zur molekularen und biologischen Wirkung von MIF in Peritubulärzellen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten eine Aktivierung der Proteinkinase C in testikulären Peritubulärzellen nach Stimulation mit MIF. Die von Wennemuth und Schwarz beschriebene intrazelluläre Calciumerhöhung durch MIF und deren Abhängigkeit von einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor stehen im Einklang mit dieser Beobachtung und deuten auf eine Aktivierung des Inositol-Triphosphat-Weges durch MIF hin.

Die Kontraktion der myoiden Peritubulärzellen wird über endokrine, parakrine und autokrine Mechanismen reguliert (Gnessi et al., 1997). Endothelin-1 ist als ein Faktor beschrieben worden, welcher einen vorübergehenden Calcium-Anstieg in PTC induziert und dort über die PKC eine Kontraktion der PTC hervorruft (Santemma et al., 1996). Möglicherweise bewirkt auch der Calcium-Anstieg und die Aktivierung der PKC durch MIF eine Kontraktion in den PTC.

Auch ein regulatorischer Einfluß von MIF auf die Sekretion ist denkbar. Peritubulärzellen sezernieren neben extrazellulären Matrixkomponenten auch Wachstumsfaktoren und Zytokine (Skinner and Moses, 1989; Tung and Fritz, 1994). Dazu gehört unter anderen der Transforming Growth Factor- β (TGF β), der von den PTC sowohl exprimiert als auch sezerniert wird (Mullaney et al., 1993). Die Sekretion von TGF β 2 aus PTC wird durch Dexamethason gesteigert (Konrad et al., 2000). Eine Verminderung der Sekretion durch Aktivierung der PKC ist in Osteoblasten-ähnlichen Zellen beschrieben worden, in denen eine Aktivierung der PKC in einer verminderten IGF-I-Sekretion resultierte (Kozawa et al., 1992). Möglicherweise supprimiert in PTC die durch MIF aktivierte PKC die Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins TGF β , so daß MIF auch im Hoden als Gegenregulator der Glukokortikoide wirkt.

Um eine Rolle von MIF in der Entwicklung des Hodens zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein möglicher Einfluß des Zytokins MIF auf die Proliferation von PTC getestet, wobei jedoch kein Effekt erkennbar war.

Mittels cDNA-Array konnte eine vermehrte Expression der Steroid-Sulfatase in den PTC nach MIF-Stimulation gezeigt werden. Dies könnte auf eine

regulatorische Eigenschaft von MIF auf den Hormonhaushalt des Hodens hinweisen.

Außerdem war auch eine gesteigerte Expression des Na^+/H^+ -Austauschers zu beobachten. Dieser stellt ein plasmamembranständiges Phosphoglykoprotein dar, welches den intrazellulären pH reguliert und auch als Substrat der PKC beschrieben worden ist (Azzi et al., 1992). In einer Studie von Harvey et al. (2000) wurden eine Aktivierung der PKC und eine Erhöhung des intrazellulären Calciumgehaltes durch Aldosteron-Stimulation beschrieben, die zu einem Na^+/H^+ -Austausch und einer pH-Wert-Erhöhung führten. Da MIF ein pro-inflammatorischer Faktor ist und Entzündungsreaktionen mit Änderungen des pH-Wertes im Gewebe einhergehen, wäre es denkbar, dass MIF in PTC den intrazellulären pH beeinflusst. Diese aus den Ergebnissen des cDNA-Arrays aufgestellten Hypothesen müssten jedoch durch weitere Untersuchungen überprüft werden.

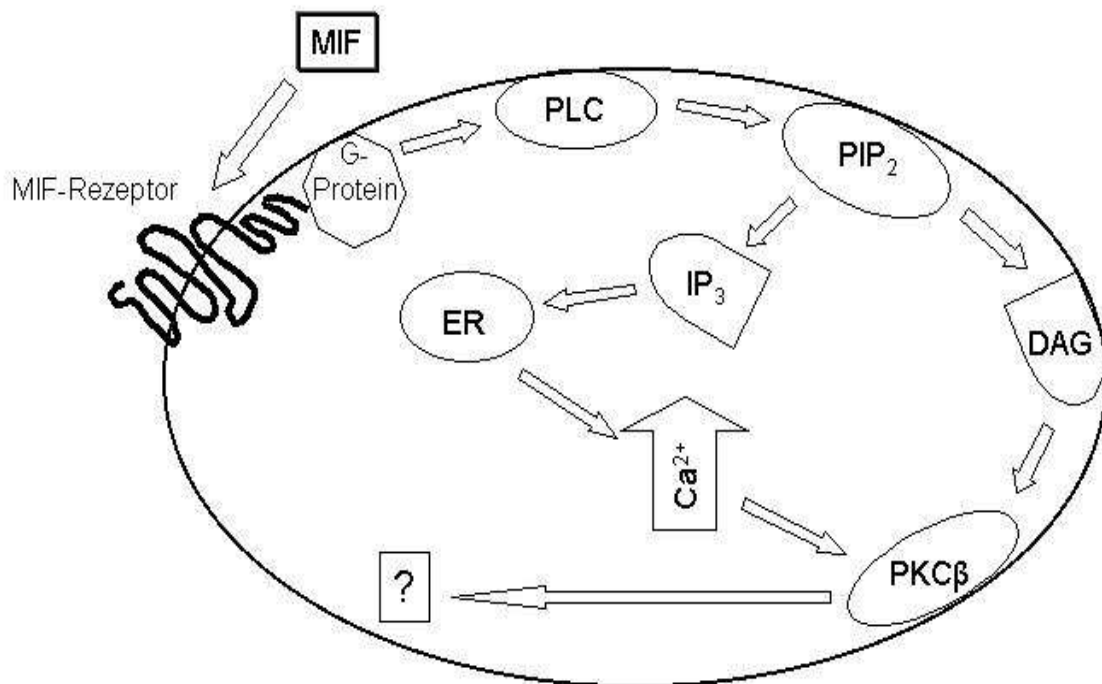


Abb.6.1.: Hypothetisches Schema der molekularen Wirkungsweise von MIF auf PTC. MIF aktiviert über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor die Phospholipase C (PLC), wodurch Phosphatidyl-Inosit-4,5-Bisphosphat (PIP_2) in Inosit-1,4,5-Trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) gespalten wird. IP_3 bindet an IP_3 -Rezeptoren am endoplasmatischen Retikulum (ER) woraufhin dieses Calcium (Ca^{2+}) in das Zytoplasma entläßt. Die Proteinkinase $\text{C}\beta$ ($\text{PKC}\beta$) wandert hierauf an die Zellmembran und wird durch Diacylglycerol (DAG) aktiviert. Die aktivierte $\text{PKC}\beta$ könnte Effekte wie z.B. Kontraktion oder veränderte Sekretionsaktivität der Zelle bewirken.

6.3. Diskussion der Methodik

6.3.1. Zellkultur primärer Peritubulärzellen

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden an Peritubulärzellkulturen durchgeführt. Die Isolierung und Kultivierung von Zellen bietet eine hervorragende Möglichkeit, um die Reaktion von Zellen auf bestimmte Reize *in vitro* zu untersuchen. Es ist hierbei möglich, die Zellen zu immortalisieren und damit Zelllinien zu erzeugen, die theoretisch unbegrenzt kultivierbar sind. Problematisch ist hierbei, dass die Zellen sich in ihren Eigenschaften verändern können. Aus diesem Grunde wurden für die vorliegenden Untersuchungen primäre Zellen verwendet. Das bedeutet, dass die Peritubulärzellen, nachdem sie aus dem Rattenhoden isoliert wurden, nur eine begrenzte Anzahl an Zellteilungen durchliefen. Vergleiche zwischen primären und subkultivierten PTC haben gezeigt, dass Subkultivierung von Peritubulärzellen keine grundlegenden Veränderungen in der zellulären Funktion bewirken (Anthony and Skinner, 1989). Nach der Isolierung der PTC durch enzymatischen Verdau waren in der Kultur noch vereinzelt Sertoli-Zellen und Keimzellen vorhanden. Bei der Subkultivierung starben diese allerdings ab, da sie andere Kulturbedingungen als PTC benötigen. Ab der zweiten Passage besaßen die PTC die gewünschte Reinheit von >95%. Für die Experimente wurden PTC der Passagen 2 und 3 verwendet, um zu gewährleisten, dass die Zellen noch die typischen Eigenschaften der PTC aufwiesen, aber auch die gewünschte Reinheit besaßen.

6.3.2. Transfektion der Peritubulärzellen

Das Einschleusen von Fremd-DNA in Zellen ist mittels verschiedener Methoden wie viraler Transfektion, Mikroinjektion, Lipofektion, Transfektion mit Calciumphosphat oder DEAE-Dextran und schließlich mittels Elektroporation möglich. Da durch Lipofektion 5-100-fach höhere Transfektionseffizienzen erreicht werden können, als mit der Calciumphosphat oder DEAE-Dextran vermittelten Methode, wurde in der vorliegenden Arbeit die Transfektion der PTC durch Lipofektion und Elektroporation durchgeführt (Teifel et al, 1997). Elektroporation ist ein bequemes Verfahren der

Transfektion, da zum einen keine Lipofektionsmedien gebraucht werden und sie zum anderen wesentlich weniger zeitintensiv ist. Allerdings ist es für die Elektroporation günstiger, wenn die DNA in linearisierter Form vorliegt, während die Lipofektion auch mit zirkulärer Plasmid-DNA durchführbar ist (Neurath et al., 1997).

Für Peritubulärzellen konnten in der vorliegenden Arbeit keine zufriedenstellenden Transfektionsergebnisse mittels Elektroporation erzielt werden. Auch die in der Literatur bereits beschriebene Transfektionsmethode für Peritubulärzellen zeigte eine wesentlich geringere Effizienz als die Lipofektion (Ku et al., 1994).

Da großer Wert darauf gelegt wurde, daß die Peritubulärzellen nach der Transfektion eine hohe Integrität aufwiesen und morphologisch unverändert aussahen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Transfektion der Peritubulärzellen mit Lipofektamin durchgeführt. Die Transfektionseffizienz kann gesteigert werden, wenn mit serumfreiem Medium gearbeitet wird. Da jedoch der Unversehrtheit der Zellen gegenüber einer höheren Transfektionseffizienz der Vorrang gegeben wurde, wurde das schonendere Verfahren mit 1%-serumhaltigem Medium gewählt.

6.3.3. Amidoblack-Assay

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Proliferationsstudien zeigten keine vermehrte Wachstumsrate der PTC durch MIF. Die Proliferationsrate wurde mit dem Amidoblack-Assay bestimmt. Der Nachteil dieser Methode ist, daß durch den proteinbindenden Farbstoff nicht direkt die Zellzahl gemessen wird, sondern der Proteingehalt der Zellen. Ein vermehrter Proteingehalt der einzelnen Zellen könnte also fälschlicherweise auf eine gesteigerte Zellproliferation schließen lassen. Ebenso wäre es möglich, daß eine Zellproliferation stattgefunden hat und nicht erkannt wird, weil die Zellen weniger Protein enthielten. Die Proliferationsstudien dieser Arbeit wurden allerdings über mehrere Tage durchgeführt, so daß die Zellen in der Lage gewesen sein müßten, ihren Proteingehalt wieder auf das normale Niveau zu bringen. Außerdem zeigte die Stimulation mit fetalem Kälberserum als Positivkontrolle im Amidoblack-Assay eine deutliche Steigerung der optischen Dichte, was eine Zunahme der Proteinmenge nachweist und eine Proliferationssteigerung der PTC vermuten läßt.

6.4. Ausblick

Die vorliegende Arbeit läßt aufgrund der MIF-induzierten Aktivierung der PKC β auf eine Aktivierung des Inositoltriphosphat-Weges durch MIF schließen. Diese Ergebnisse sollen durch Untersuchungen mit Inhibitoren gesichert werden. Dies kann mittels Inhibition des IP₃-Rezeptors, z.B. durch 2-Aminoethoxydiphenyl-Borat (2-APB), oder der PLC, z.B. durch U-73112, geschehen und sollte einen intrazellulären Calciumanstieg sowie eine Aktivierung der Proteinkinase C verhindern.

Mögliche Zielproteine der PKC sollen mit Hilfe der Westernblot-Analyse charakterisiert werden. Da die PKC eine Serin/Threonin-spezifische Kinase ist, sollen mittels Anti-Phospho-Serin- und Anti-Phospho-Threonin-Antikörpern phosphorylierte Zielproteine detektiert und anhand ihres Molekulargewichtes und durch spezifische Antikörper charakterisiert werden.

Auch soll überprüft werden, ob eine vorherige Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP1 und der Zellproliferation, z.B. durch Jab1, durch MIF-Stimulation inhibiert werden kann.

Möglicherweise kann MIF auch Einfluß auf Sekretionsvorgänge nehmen. Die TGF β -Sekretion wird in PTC durch die anti-entzündlich wirkenden Glukokortikoide gesteigert (Konrad et al., 2000). Da MIF entzündungsfördernd wirkt und als Gegenspieler der Glukokortikoide bekannt ist, soll eine Inhibition dieser TGF β -Sekretion durch MIF untersucht werden.

Zuletzt ist auch eine kontraktile Wirkung von MIF auf die PTC möglich. Diese Kontraktion kann überprüft werden, indem die PTC in einem Kollagengel kultiviert werden und dann nach Stimulation mit MIF eine Größenänderung des Kollagengels gemessen wird.

Sind erst einmal die molekularen Reaktionen der PTC auf MIF-Stimulation erkannt, so könnte mit einem selektiven PKC-Inhibitor, wie z.B. 7-Hydroxy-Staurosporin, die Relevanz der PKC-Aktivierung für diese Vorgänge überprüft werden.

7. Zusammenfassung

7.1. Zusammenfassung

Der Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor wurde erstmals 1966 als ein pro-inflammatorisches Zytokin beschrieben, welches von aktivierten T-Zellen sezerniert wird. In den letzten zehn Jahren wurden zahlreiche neue biologische Eigenschaften von MIF entdeckt, wie z.B. eine Rolle in der Tumorgenese und regulatorische Wirkungen in endokrinen Geweben. Trotz dieser fortschreitenden Erkenntnisse sind die molekularen Wirkmechanismen dieses Zytokins jedoch bis heute nur sehr wenig verstanden.

Im Hoden wird MIF von den Leydig-Zellen exprimiert und löst in Peritubulärzellen (PTC) eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration aus. Ziel dieser Arbeit war es, die Signaltransduktionsmechanismen, welche MIF in PTC aktiviert, näher zu charakterisieren.

Mittels cDNA-Array konnte nach MIF-Stimulation der PTC eine differentielle Genexpression von mindestens 26 Genen festgestellt werden. So zeigten Gene des MAP-Kinase-Weges eine erhöhte Expression, während Elemente des Proteinkinase A-Signalweges herunterreguliert wurden. Die Signaltransduktion von MIF über den PKA-Signalweg konnte ausgeschlossen werden, da neben der inhibitorischen Wirkung auf Schlüsselenzyme des PKA-Weges auch kein Einfluß von MIF auf die cAMP-Konzentration dokumentiert werden konnte. Zur Überprüfung einer MAP-Kinase-Aktivierung wurden mit Reporter-Gen-Assays die Transkriptionsfaktoren AP1 und Elk-1, beide mögliche Zielproteine der MAP-Kinase, untersucht. Hier konnte eine Aktivierung durch MIF ausgeschlossen werden. Auch Proliferationsstudien ergaben, dass MIF die Wachstumsrate der PTC nicht steigert und somit eine MAP-Kinase-Aktivierung trotz Erhöhung der Genexpression dieser Faktoren unwahrscheinlich ist. Vermutlich werden andere Reaktionen der PTC über die MAP-Kinase reguliert.

Eine Aktivierung der Proteinkinase C β (PKC β) durch MIF konnte in transfizierten PTC gezeigt werden. Nach MIF-Stimulation wurde die für die Aktivierung essentielle Translokation der PKC β mittels eines PKC β -Green-Fluorescent-Protein-Konstruktes aus dem Zytoplasma an die Plasmamembran beobachtet.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, daß MIF in den Peritubulärzellen die Phospholipase C aktiviert, welche dann über IP_3 und DAG eine Aktivierung der PKC bewirkt. Die Untersuchung der Phospholipase C-Aktivierung und die Charakterisierung von Zielproteinen der PKC bleiben Ziel zukünftiger Studien.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse können dazu beitragen, die molekularen Wirkmechanismen von MIF im Hoden besser zu definieren, um Erkenntnisse über mögliche Therapieansätze bei testikulären Erkrankungen, in denen MIF eine Rolle spielt, zu gewinnen.

7.2. Summary

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) was first described in 1966 as a pro-inflammatory cytokine secreted by activated T-lymphocytes. Lately, new biological roles have been described for MIF, as for example a role in tumor growth and endocrine systems. Despite these progresses, still little is known about the molecular mechanism of MIF action on target cells.

In the testis, MIF is expressed in Leydig cells and increases the intracellular calcium concentration in peritubular cells (PTC). The aim of this study was to further characterize the signal transduction pathway that MIF is eliciting in PTC.

Using cDNA-arrays, differential gene expression of at least 26 genes was found after MIF stimulation in PTC. Expression was up-regulated in genes of the MAP-kinase pathway, whereas down-regulation was noticed in those of the protein kinase A (PKA) pathway. Measurement of the intracellular cAMP concentration did not show any increase after MIF stimulation, therefore activation of the PKA-pathway could be excluded. Studies on the transcription factors AP1 and ELK-1, both potential targets of the MAP-Kinase pathway, did not show any activation of these factors. Also, MIF did not show an effect on cell proliferation in PTC, which makes a MAP-kinase activation unlikely. Possibly, other PTC reactions are regulated by the MAP-kinases.

Transfection studies showed activation of the protein kinase $C\beta$ (PKC β). MIF stimulation led to the translocation of a PKC β -green-fluorescent-protein from the cytoplasm to the cell membrane. This translocation is an essential step in PKC activation.

In conclusion, MIF seems to activate phospholipase C in PTC which leads to activation of the PKC β through IP₃ and DAG. In the future, studies on phospholipase C activation and possible target proteins of the PKC β should be done.

The results of this study should help to define the molecular effects of MIF in the testis and to find therapies for testicular diseases in which MIF is involved.

8. Literaturverzeichnis

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (1999).
Lehrbuch der molekularen Zellbiologie. Wiley-VCH

Amin MA, Volpert OV, Woods JM, Kumar P, Harlow LA, Koch AE (2003).
Migration inhibitory factor mediates angiogenesis via mitogen-activated
protein kinase and phosphatidylinositol kinase. *Circ Res*, 93:321-329

Anthony CT and Skinner MK (1989). Cytochemical and biochemical
characterization of testicular peritubular myoid cells. *Biol Reprod*, 40:811-823

Azzi A, Boscoboinik D, Hensey C (1992). The protein kinase C family. *Eur J
Biochem*, 208(3):547-57

Bacher M, Metz CN, Calandra T, Mayer K, Chesney J, Lohoff M, Gemsa D,
Donnelly T, Bucala R (1996). An essential regulatory role for macrophage
migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA*,
93:7849-7854

Bernhagen J, Calandra T, Bucala R (1997). Regulation of the immune
response by macrophage migration inhibitory factor: biological and structural
features. *J Mol Med*, 76:151-161

Bernhagen J, Mitchell RA, Calandra T, Voelter W, Cerami A, Bucala R
(1994). Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse
and human macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Biochemistry*,
33(47):14144-55.

Blocki FA, Ellis LB, Wackett LP (1993). MIF protein are theta-class
glutathione S-transferase homologs. *Protein Sci* 2:2095-2102.

Bloom BR, Bennett B (1966). Mechanism of a reaction in vitro associated
with delayed-type hypersensitivity. *Science*, 153:80-82

Bogatcheva NV, Dudek SM, Garcia JGN, Verin AD (2003). mitogen-activated protein kinases in endothelial pathophysiology. *Journal of Investigative medicine*, 51(6):341-

Bojunga J, Kusterer K, Bacher M, Kurek R, Usadel K-H, Renneberg H (2003). Macrophage migration inhibitory factor and development of type-1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Cytokine*, 21: 179-186

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-54

Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A, Bucala R (1995). MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature*, 377:68-71

Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, Hultner L, Heumann D, Mannel D, Bucala R, Glauser MP (2000). Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor *Nat Med* 6, 164-170.

Chesney J, Metz C, Bacher M, Peng T, Meinhardt A, Bucala R (1998). An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma.

Chook YM, Gray JV, Ke H, Lipscomb WN (1994). The monofunctional chorismate mutase from *Bacillus subtilis*. Structure determination of chorismate mutase and its complexes with a transition state analog and prephenate, and implications for the mechanism of the enzymatic reaction. *J Mol Biol* 240:476-500

Conn PM, Crowley WF (1991). Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *New Engl J Med*, 324:93-103

Cresswell P (1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.*, 12: 259-293

Daun JM, Cannon JG (2000). Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic I κ B α . *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279(3):R1043-9

David J (1966). Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci*, 56:72-77

De Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N (1998). Spermatogenesis. *Hum Reprod*, 1:1-8

Eickhoff R, Wilhelm B, Renneberg H, Wennemuth G, Bacher M, Linder D, Bucala R, Seitz J, Meinhardt A (2001). Purification and characterization of macrophage migration inhibitory factor as a secretory protein from rat epididymis: evidences for alternative release and transfer to spermatozoa. *Mol Med*, 7(1):27-35

Flieger O, Engling A, Bucala R, Lue H, Nickel W, Bernhagen J (2003). Regulated secretion of macrophage migration inhibitory factor is mediated by a non-classical pathway involving an ABC transporter. *FEBS Lett*, 551(1-3):78-86

França LR, Ogawa T, Avarbock M, Brinster RL, Russell LD (1998). Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol Reprod*, 59:1371-1377

Fukuzawa J, Nishihira J, Hasebe N, Haneda T, Osaki J, Saito T, Nomura T, Fujino T, Wakamiya N, Kikuchi K (2002). Contribution of macrophage migration inhibitory factor to extracellular signal-regulated kinase activation by oxidative stress in cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 277(28):24889-95

Galdieri M, Ricci G (1998). Characterization of different cell populations isolated from rat testis peritubular cells. *Differentiation*, 63(1):13-9

George M, Vaughan JH (1962). *In vitro* cell migration as a model for delayed hypersensitivity. *Proc Soc Exp Biol Med*, 111:514-21

Gnessi L, Fabbri A, Spera G (1997). Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. *Endocr Rev*, 18:541-608

Harvey BJ, Higgins M (2000). Nongenomic effects of aldosterone on Ca²⁺ in M-1 cortical collecting duct cells. *Kidney Int*, 57(4):1395-403

Hedger MP (1997). Testicular leukocytes: what are they doing? *Rev Reprod*, 2(1):38-47

Hoeben E, Briers T, Vanderstichele H, De Smet W, Heyns W, Deboel L, Vanderhoydonck F, Verhoeven G (1995). Characterization of newly established testicular peritubular and prostatic stromal cell lines: potential use in the study of mesenchymal-epithelial interactions. *Endocrinology* 136:2862-2873.

Hudson JD, Shoaibi MA, Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Beach DH (1999). A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med*, 190:1375-1382

Inglese J, Koch WJ, Touhara K, Lefkowitz RJ (1995). G beta gamma interactions with PH domains and Ras-MAPK signaling pathways. *Trends Biochem Sci*, 20:151-6

Keck C, Neulen J, Breckwoldt M (Hrsg.) (1997). Endokrinologie, Reproduktionsmedizin, Andrologie. Thieme-Verlag

Kleemann R, Hausser A, Geiger G, Mischke R, Burger-Kentischer A, Flieger O, Johannes F-J, Roger T, Calandra T, Kapurniotu A, Grell M, Finkelmeier D, Brunner H, Bernhagen J (2000). Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature*, 408:211-6

Kleemann R, Mischke R, Kapurniotu A, Brunner H, Bernhagen J (1998). Specific reduction of insulin disulfides by macrophage migration inhibitory factor (MIF) with glutathione and dihydrolipoamide: potential role in cellular redox process. *FEBS Letter*, 430(3):191-6

Konrad L, Albrecht M, Renneberg H, Aumüller G (2000). Transforming growth factor- β 2 mediates mesenchymal-epithelial interactions of testicular somatic cells. *Endocrinology*, 141(10):3679-3686

Kozawa O, Miwa M, Tokuda H, Kotoyori J, Oiso Y (1992). Activation of protein kinase C inhibits ^{45}Ca -accumulation in cultures of osteoblast-like cells: possible involvement of insulin-like growth factor-I. *Bone Miner*, 19(3):235-243

Krauss G (1997). Biochemie der Regulation und Signaltransduktion. Wiley-VCH

Ku C-Y, Loose-Mitchell DS, Sanborn BM (1994). Both Sertoli and peritubular cells respond to androgens with increased expression of an androgen response element reporter. *Biol Reprod*, 51:319-326

Lan HY, Mu W, Yang N, Meinhardt A, Nikolic PD, Ng YY, Bacher M, Atkins RC, Bucala R (1996). *De novo* renal expression of macrophage migration inhibitory factor during the development of rat crescentic glomerulonephritis. *Am J Pathol*, 149:1119-1127

Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, Delohery T, Chen Y, Mitchell RA und Bucala R (2003). MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med*, 197:1467-1476.

Liu JP (1996). Protein kinase C and its substrates. *Mol Cell Endocrinol*, 116(1):1-29

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (1999). Molecular cell biology. Fourth Edition, W.H. Freeman and Company

Lue H, Kleemann R, Calandra T, Roger T, Bernhagen J (2002). Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect*, 4(4):449-60

Maekawa M, Kamimura K, Nagano T (1996). Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch Histol Cytol*, 59(1):1-13

Matza D, Wolstein O, Dikstein R, Shachar I (2001). Invariant chain induces B cell maturation by activating a TAF_{II}105-NF- κ B-dependent transcription program. *J. Biol. Chem.*, 276:27203-27206

Meinhardt A, Bacher M, Mc Farlane JR, Metz CN, Seitz J, Hedger MP, de Kretser DM, Bucala R (1996). The macrophage migration inhibitory factor (MIF) production by Leydig cells: evidence for a role in regulation of testicular function. *Endocrinology*, 137:5090-5095

Meinhardt A, Bacher M, O'Brian MK, Mc Farlane JR, Mallidis C, Lehmann C, Metz CN, de Kretser DM, Bucala R, Hedger MP (1999). A switch in the cellular localization of macrophage migration inhibitory factor in the rat testis after ethane dimethane sulfonate treatment. *J Cell Sci*, 122:1337-1344

Meinhardt A, Bacher M, Wennemuth G, Eickhoff R, Hedger M (2000). Macrophage migration inhibitory factor as a paracrine mediator in the interaction of testicular somatic cells. *Andrologia*, 32(1):46-8

Meyer-Siegler K, Hudson PB (1996). Enhanced expression of macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma metastases. *Urology*, 48(3):448-52

Meyer-Siegler K, Leifheit EC, Vera PL (2004). Inhibition of macrophage migration inhibitory factor decreases proliferation and cytokine expression in bladder cells. *BMC Cancer*, 4 (1):34

Mignatti P, Morimoto T, Rifkin DB (1992). Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic-reticulum-Golgi complex. *J Cell Physiol*, 151(1):81-93

Mikulowska A, Metz CN, Bucala R, Holmdahl R (1997). Macrophage migration inhibitory factor is involved in the pathogenesis of collagen type II-induced arthritis in mice. *J Immunol*, 158:5514-5517

Mitchell RA, Metz CN, Peng T, Bucala R (1999). Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J Biol Chem*, 274(25):18100-6

Mullaney BP, Skinner MK (1993). Transforming growth factor- β (β 1, β 2, and β 3) gene expression and action during pubertal development of the seminiferous tubule: potential role at the onset of spermatogenesis. *Mol Endocrinol*, 7:67-76

Neurath M, Ma X, Petterson S (1997). DNA/Protein-Interaktionen. Spektrum Akademischer Verlag

Neves SR, Ram PT, Iyengar R (2002). G Protein Pathways. *Science*, 296: 1636-1639.

Nishihira J (2000). Macrophage migration inhibitory factor (MIF): its essential role in the immune system and cell growth. *J Interferon Cytokine Res*, 20(9):751-62

Nishihira J, Koyama Y, Mizue Y (1996). Identification of macrophage migration inhibitory factor in human leukaemia HL-60 cells and its induction by lipopolysaccharide. *Biochem Mol Biol Int*, 53(1):1-5

Onodera S, Kaneda K, Mizue Y, Koyama Y, Fujinaga M, Nishihira J (2000). Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis. *J Biol Chem*, 275(1):444-50

Onodera S, Nishihira J, Iwabuchi K, Koyama Y, Yoshida K, Tanaka S, Minami A (2002). Macrophage migration inhibitory factor up-regulates matrix metalloproteinase-9 and -13 in rat osteoblasts. Relevance to intracellular signaling pathways. *J Biol Chem*, 277(10):7865-74

Onodera S, Tanji H, Suzuki K, Kaneda K, Mizue Y, Sagawa A, Nishihira J (1999). High expression of macrophage migration inhibitory factor in the synovial tissues of rheumatoid joints. *Cytokine*, 11(2):163-7

Palombi F, Farini D, Salanova M, de Grossi S, Stefanini M (1992). Development and cytodifferentiation of peritubular myoid cells in the rat testis. *Anat Rec*, 233:32-40

Ren Y, Chan HM, Li Z, Lin C, Nicholls J, Chen CF, Lee PY, Lui V, Bacher M, Tam PK (2004). Upregulation of macrophage migration inhibitory factor contributes to induced N-Myc expression by the activation of ERK signalling pathway and increased expression of interleukin-8 and VEGF in neuroblastoma. *Oncogene*, 23 (23):4146-54

Rosengren E, Bucala R, Aman P, Jacobsson L, Odh G, Metz CN, Rorsman H (1996). The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction. *Mol Med*, 2(1):143-9

Rubartelli A, Cozzolino F, Talio M, Sitia R (1990). A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *EMBO J*, 9 (5):1503-10

Santos LL, Lacey D, Yang Y, Leech M, Morand EF (2004). Activation of synovial cell p38 MAP kinase by macrophage migration inhibitory factor. *J Rheumatol*, 31(6):1038-43

Santemma V, Beligotti F, Magnanti M, Palleschi S, Silvestroni L, Fabbrini A (1996). Endothelin-1 stimulates deoxyribonucleic acid synthesis and contraction in testicular peritubular myoid cells. *Biol Reprod*, 54:583-590

Schlatt S, Meinhardt A, Nieschlag E (1997). Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *Europ J Endocrinol*, 137:107-117

Schulz J, Dettlaff S, Fritzsche U, Harms U, Schiebel H, Derer W, Fusenig NE, Hulsén A, Böhm M (1994). The amido black assay: a simple and quantitative multipurpose test of adhesion, proliferation, and cytotoxicity in microplate cultures of keratinocytes (HaCaT) and other cell types growing adherently or in suspension. *J Immunol Methods*, 167(1-2):1-13

Schwarz K (2003). MIF-vermittelte Signaltransduktionsmechanismen an primären und immortalen Zellen des Rattenhodens. Dissertation an der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Humanmedizin.

Setchell BP, Maddocks S, Brooks DE (1994). Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. *The Physiology of Reproduction*. Verlag Raven Press; Knobil E and Neill JD (Editors-in-Chief)

Sharpe RM, Maddocks S, Millar M, Kerr JB, Saunders PTK, McKinnell C (1992). Testosterone and spermatogenesis: identification of stage-specific, androgen-regulated proteins secreted by adult rat seminiferous tubules. *Journal of Andrology*, 13:172-184

Skinner MK, Fritz IB (1985,a). Structural characterization of proteoglycans produced by testicular peritubular cells and Sertoli cells. *J Biol Chem*, 260(21):11874-83

Skinner MK and Moses HL (1989,a). Transforming growth factor-alpha gene expression and action in the seminiferous tubule: peritubular cell-Sertoli cell interactions. *Mol Endocrinol*, 3:625-634

Skinner MK, Tung PS, Fritz IB (1985,b). Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *J Cell Biol*, 100:1941-1947

Skinner MK, Takacs K, Coffey RJ (1989,b). Cellular localization of transforming growth factor-alpha gene expression and action in the seminiferous tubule: peritubular cell-Sertoli cell interactions. *Endocrinology*, 124:845-854

Spiteri-Grech J, Nieschlag E (1993). Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis- a review. *J Reprod and Fertil*, 98:1-14

Subramanya HS, Roper DI, Dauter Z, Dodson EJ, Davies GJ, Wilson KS, Wigley DB (1996). Enzymatic ketonization of 2-hydroxymuconate: specificity and mechanism investigated by the crystal structures of two isomerases. *Biochemistry* 35:792-802

Sun HW, Bernhagen J, Bucala R, Lolis E (1996 a). Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:5191-5196

Sun HW, Swope M, Cinquina C, Bedarkar S, Bernhagen J, Bucala R, Lolis E (1996 b). The subunit structure of human macrophage migration inhibitory factor: evidence for a trimer. *Protein Eng*, 9(8):631-5

Takahashi N, Nishihira J, Sato Y, Kondo M, Ogawa H, Oshima T, Une Y, Todo S (1998). Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth. *Mol Med*, 4:707-714

Tan, T. H., Edgerton, S. A., Kumari, R., McAlister, M. S., Roe, S. M., Nagl, S., Pearl, L. H., Selkirk, M. E., Bianco, A. E., Totty, N. F., Engwerda, C., Gray, C. A., Meyer, D. J. und Rowe, S. M. (2001) Macrophage migration inhibitory factor of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Biochem J* 357:373-383.

Teifel M, Heine LT, Milbredt S, Friedl P (1997). Optimization of transfection of human endothelial cells. *Endothelium*, 5(1):21-35

Toker A, Sellers LA, Amess B, Patel Y, Harris A, Aitken A (1992). Multiple isoforms of a protein kinase C inhibitor (KCIP-1/143) from sheep brain. Amino acid sequence of phosphorylated forms. *Eur J Biochem*, 206(2):453-61

Tung PS, Skinner MB, Fritz IB (1984). Fibronectin is a marker for peritubular cell contaminants in Sertoli cell-enriched cultures. *Biol Reprod*, 30(1):199-211

Tung PS and Fritz IB (1994). Role of laminin in the morphogenetic cascade during coculture of Sertoli cells with peritubular cells. *J Cell Physiol* 161:77-88

Watanabe H, Shimizu T, Nishihira J, Abe R, Nakayama T, Taniguchi M, Sabe H, Ishibashi T, Shimizu H (2004). Ultraviolet A-induced production of matrix-metalloproteinase-1 is mediated by macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human dermal fibroblasts. *J Biol Chem* 279 (3):1676-1683

Weinbauer GF, Gromoll J, Simoni M, Nieschlag E (1996). Physiologie der Hodenfunktion. *Andrologie- Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*, 29-61. Springer Verlag; Nieschlag E und Behre HM (Hrsg.)

Weinbauer GF, Wessels J (1999). ‚Paracrine‘ control of spermatogenesis. *Andrologia*, 31:249-262

Weiser WY, Temple PA, Witek-Giannotti JS, Remold HG, Clark SC, David JR (1989). Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(19):7522-6

Wen Y, Li GW, Bekhor I (1996). Lens epithelial cell mRNA.III. Elevated expression of macrophage migration inhibitory factor mRNA in galactose cataracts. *Curr Eye Res*, 15:125-130

Wennemuth G, Aumüller G, Bacher M, Meinhardt A (2000). Macrophage migration inhibitory factor-induced Ca^{2+} response in rat testicular peritubular cells. *Biol Reprod*, 62:1632-1639

Wraight C, van Endert P, Möller P, Lipp J, Ling N, MacLennan CKN, Moldenhauer G (1990). Human major histocompatibility class II invariant chain is expressed on the cell surface. *J. Biol. Chem.*, 265: 5787-5792

9. Anhang

9.1. Lebenslauf

Name und Anschrift: Miriam Rodewald
Glaubrechtstraße 1
35392 Giessen

Geburtsdatum: 26.01.1978

Geburtsort: Essen

Familienstand: verheiratet

Schul Ausbildung:

1984-1988	Grundschule Angerstein
1988-1990	Orientierungsstufe der Bonifatiuschule Göttingen
1990-1997	Max-Planck-Gymnasium Göttingen
Jan.-Mai 1995	Immaculate-Heart-Central-High School, Watertown, NY, USA
Juni 1997	Abitur

Hochschulausbildung:

WS 1997/98	Psychologiestudium an der Georg-August-Universität Göttingen
SS 1998	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Justus- Liebig-Universität Giessen
April 2000	Ärztliche Vorprüfung
Juni 2000- Sept. 2002	Mitglied des DFG-Graduiertenkollegs „Zell-Zell-Interaktion im Reproduktionsgeschehen“
August 2002	Erster Teil der Ärztlichen Prüfung

März 2003	Erster Teil des amerikanischen Staatsexamens (USMLE)
April 2004	Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung
April 2004-März 2005	Praktisches Jahr: Wahlfach Gynäkologie
Mai 2005	Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung

Praktika und Famulaturen:

Aug.- Sept. 1998	Pflegepraktikum im Evangelischen Krankenhaus Göttingen, Abteilung Urologie
Feb.- März 1999	Pflegepraktikum am Universitätsklinikum Göttingen, Abteilung Augenheilkunde
März-April 2002	Famulatur in der gynäkologischen Gemeinschaftspraxis Dr. Müller, Dr. Barthel, Dr. Stertkamp, in Giessen
Sept.- Okt. 2002	Famulatur in der Gynäkologie am Royal Hallamshire Hospital, Sheffield, GB
Aug.- Sept. 2003	Famulatur in der Pulmonologie an der University of Illinois at Chicago, USA
Sept.- Okt. 2003	Famulatur in der Pädiatrie an der University of Illinois at Chicago, USA

Kongreßpräsentationen:

- **Wiegand M**, Gränz S, Seitz J, Meinhardt A (2001). Die Signaltransduktion des Migrations-Inhibitions-Faktors (MIF) wird in den Peritubulärzellen des Hodens über die Proteinkinase C vermittelt. Vortrag auf der 13. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Andrologie vom 6.-8. September in Berlin. Auszeichnung mit dem Ferring-Preis.
- **Rodewald M**, Eickhoff R, Gränz S, Lewen A, Seitz J, Meinhardt A (2002). Signalling Pathways of the Cytokine Macrophage Migration Inhibitory Factor in Testicular Peritubular Cells. Poster auf der 35. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung und 27. Veterinär-

Humanmedizinische Gemeinschaftstagung am 14. und 15. Februar 2002 in Leipzig.

- Müller R, **Rodewald M**, Aires V, Meinhardt A (2003). Signal Transduction of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) involves Protein Phosphorylation in Rat Testicular Cells. Jahrestagung der Gesellschaft für Zellbiologie und Entwicklungsbiologie (Cell Biology and Development) in Bonn, 26.-29.03.2003.

9.2. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. Andreas Meinhardt** für die Bereitstellung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit und seine fortwährende Unterstützung. Des weiteren möchte ich ihm besonders für die stete Bereitschaft danken, Ideen zu dieser Arbeit zu diskutieren und zu verwirklichen.

Ich danke Herrn **Professor Dr. J. Seitz** für seine Ideen und Ratschläge, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herzlichen Dank auch an Frau **Dr. Regina Eickhoff**, die mich in das methodisch-wissenschaftliche Arbeiten einwies, immer für Fragen offen und mir stets eine große Hilfe war. Außerdem danke ich Ihr für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Danken möchte ich weiterhin allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Seitz und Aumüller, die meine experimentelle Arbeit begleitet haben: **Frau Dr. Regina Wiche, Frau Dr. Beate Wilhelm, Frau Simone Gränz, Frau Anja Lewen, Frau Dr. Ruth Müller, Frau Andrea Dersch, Frau Suada Fröhlich, Frau Claudia Keppler, Frau Anne Henkeler, Frau Elke Völk-Badouin und Herrn Dr. M. Albrecht.**

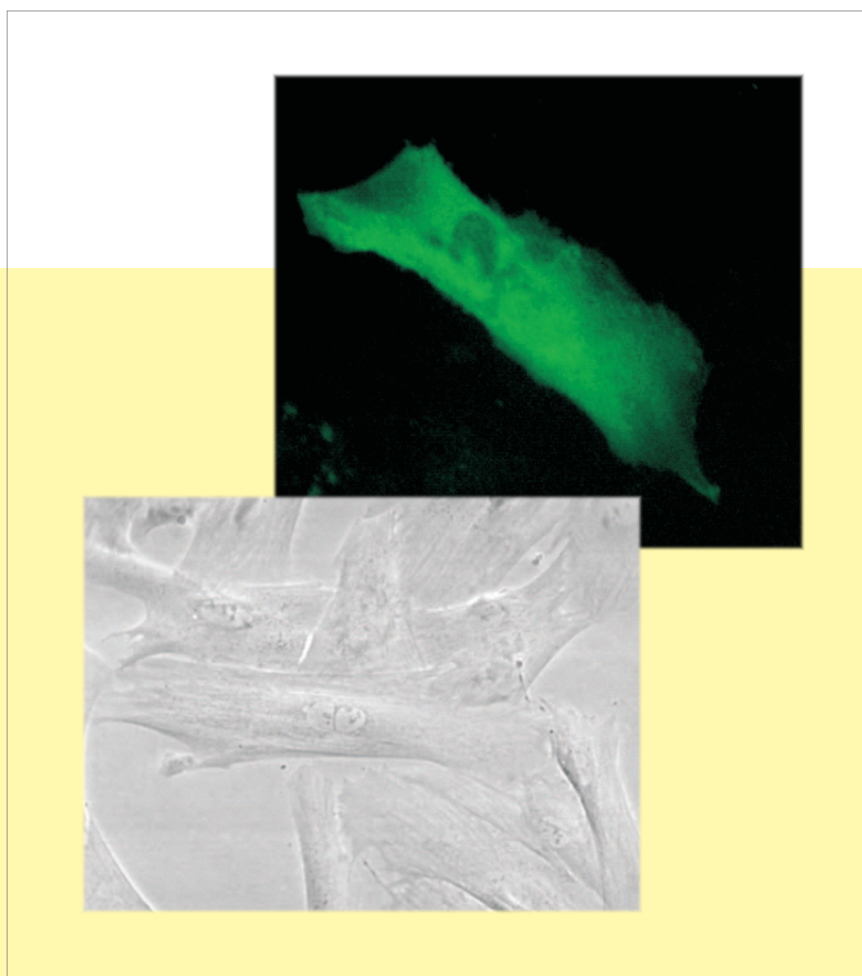
Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit im Rahmen eines Graduiertenkollegs mit finanzieller Unterstützung durchzuführen. Besonderer Dank gilt Frau **Prof. Dr. Hinsch** und Herrn **Prof. Dr. Hinsch** für ihre engagierte Leitung des DFG-Graduiertenkollegs „Zell-Zell-Interaktion im Reproduktionsgeschehen“. Außerdem danke ich allen Graduierten des Kollegs „Zell-Zell-Interaktion im Reproduktionsgeschehen“ für eine schöne und interessante gemeinsame Zeit.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie: Meinen Eltern **Helga und Volker Wiegand**, die mir immer die Freiheit gaben meinen Interessen nachzugehen und meine Grenzen auszuloten, und meinem Bruder **Timothy Wiegand** und seiner Frau **Irina Burggraf-Wiegand**, die mir das Selbstvertrauen gaben nach neuen Grenzen zu suchen.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Mann **Christoph Rodewald** danken für seine ständige Unterstützung und Geduld.

9.3. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-087-4

