



REGULATION DES
MAKROPHAGEN-MIGRATIONS-INHIBITIONS-FAKTORS
BEI AKUTER UND CHRONISCHER ENTZÜNDUNG DES
HODENS

Benjamin Schwab-Eckhardt

INAUGURALDISSERTATION

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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

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 2014

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 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**REGULATION DES
MAKROPHAGEN-MIGRATIONS-INHIBITIONS-FAKTORS
BEI AKUTER UND CHRONISCHER ENTZÜNDUNG DES
HODENS**

INAUGURALDISSERTATION

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

vorgelegt von

Benjamin Schwab-Eckhardt

geb. Schwab

aus Nürnberg

Gießen 2013

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. A. Meinhardt
Arbeitsgruppe Reproduktionsbiologie: Prof. Dr. A. Meinhardt

Gutachter: Prof. Dr. A. Meinhardt
Gutachter: Prof. Dr. H.-C. Schuppe

Tag der Disputation: 29.04.2014

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF).....	1
1.1.1 Entdeckung.....	1
1.1.2 Struktur und Sekretion	1
1.1.3 Vorkommen.....	3
1.1.4 Funktionen.....	5
1.1.4.1 Enzymaktivität und Wirkmechanismen	5
1.1.4.2 MIF als proinflammatorisches Zytokin	5
1.1.4.3 Entzündungsmediation in Anwesenheit von Glukokortikoiden.....	7
1.1.4.4 Testikuläre Wirkungen und Einfluss auf Spermien.....	8
1.1.5 Erste Therapiekonzepte	9
1.2 Hoden	11
1.2.1 Anatomie	11
1.2.1.1 Makroskopischer Aufbau	11
1.2.1.2 Mikroskopischer Aufbau	11
1.2.2 Immunprivileg.....	14
1.2.3 Orchitis	15
1.3 Infertilität.....	17
1.4 Proteinase-aktivierte Rezeptoren (PAR)	18
1.4.1 Struktur und Aktivierung	18
1.4.2 PAR ₂ und Inflammation	19
1.4.3 PAR ₂ im Hoden.....	20
1.5 Zielsetzung der Arbeit	21
2. MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 Material	22
2.1.1 Geräte	22
2.1.2 Reagenzien	23
2.1.3 Enzyme.....	25
2.1.4 Versuchsmaterial	25
2.1.5 Puffer und Lösungen	26
2.1.6 Antikörper	29

2.1.7	Primer	29
2.1.8	Versuchstiere	30
2.1.9	Programme	30
2.2	Methoden.....	31
2.2.1	Gewebepräparation und Probenvorbereitung.....	31
2.2.1.1	Entnahme der Hoden	31
2.2.1.2	Herstellung von Hodenhomogenat	31
2.2.1.3	Proteinbestimmung.....	31
2.2.2	Biochemische Methoden	32
2.2.2.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	32
2.2.2.2	NuPAGE® Novex Bis-Tris Gelelektrophorese mit Fertiggelen	32
2.2.2.3	Western-Blot.....	32
2.2.2.4	Ponceau-S-Färbung	33
2.2.2.5	Immunoblot-Analyse	33
2.2.3	Morphologische Methoden.....	34
2.2.3.1	Herstellung von Kryostatschnitten	34
2.2.3.2	Immunfluoreszenz	34
2.2.3.3	Doppelimmunfluoreszenz.....	35
2.2.4	Molekularbiologische Methoden.....	35
2.2.4.1	RNA-Isolierung	35
2.2.4.2	Spektralphotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren	36
2.2.4.3	Reinigung der RNA von genomischer DNA	36
2.2.4.4	Reverse Transkription	37
2.2.4.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	38
2.2.4.6	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	39
2.2.4.7	Quantitative real time PCR (qPCR)	39
3.	ERGEBNISSE	41
3.1	Abnahme des Proteingehalts von MIF in experimenteller Autoimmunorchitis (EAO)	41
3.2	Nachweis und Lokalisation von MIF in Kryostatschnitten.....	44
3.3	Abnehmende MIF-Expression in EAO	47
3.4	Co-Lokalisierung von MIF und Makrophagen im Hoden.....	47

3.5	Abnahme der Zahl der MIF-positiven Makrophagen im chronischen Entzündungsverlauf.....	48
3.6	Reinheit der isolierten RNA.....	49
3.7	Reverse Transkription und Überprüfung der cDNA-Synthese.....	50
3.8	Nachweis der MIF und β -actin mRNA-Expression mit real time PCR.....	50
3.9	Relative MIF-Expression bei Aktivierung von PAR ₂	52
4.	DISKUSSION.....	54
4.1	MIF bei chronischer EAO.....	55
4.2	Rolle von MIF bei PAR ₂ -Aktivierung im Hoden.....	57
4.3	MIF und Makrophagen.....	58
4.4	Bedeutung von MIF im Krankheitsgeschehen.....	60
4.5	MIF als Ziel antiinflammatorischer Therapien.....	63
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	66
6.	SUMMARY.....	68
7.	ABKÜRZUNGEN.....	69
8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	71
9.	TABELLENVERZEICHNIS.....	72
10.	LITERATURVERZEICHNIS.....	73
11.	DANKSAGUNGEN.....	88
12.	ABSTRACTS.....	89
13.	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....	90

1. EINLEITUNG

1.1 Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF)

1.1.1 Entdeckung

Bereits 1932 postulierten Rich und Lewis erstmals die Existenz migrationsinhibierender Faktoren als Ursache für Tuberkulin-induzierte Hypersensitivitätsreaktionen. 1966 wurde der Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor als eines der ersten Zytokine von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander beschrieben (Bloom und Bennett, 1966; David, 1966). Hierbei konnte gezeigt werden, dass aktivierte T-Lymphozyten nach Inkubation mit spezifischen Antigenen einen löslichen Mediator sezernierten, der eine Hemmung der Migration von Makrophagen bewirkte.

Erst 20 Jahre später gelang es die menschliche MIF-cDNA zu klonieren und rekombinantes Protein herzustellen. Dies ermöglichte die Entwicklung spezifischer Antikörper und somit weiterführende Untersuchungen zur Rolle von MIF als proinflammatorischem Mediator im Entzündungsgeschehen.

Lange galt MIF als Protein, das ausschließlich von Zellen der Immunabwehr produziert wird. Erst Anfang der 90er Jahre konnte gezeigt werden dass MIF von vielen unterschiedlichen Zelltypen synthetisiert werden kann. Beispielsweise enthalten die kortikotrophen Zellen des Hypophysenvorderlappens größere Mengen an MIF, welches in Sekretgranula gespeichert und Endotoxin-abhängig sezerniert wird (Bernhagen *et al*, 1993). Kurze Zeit später wurden auch Makrophagen, die bislang nur als Zielzellen der MIF-Wirkung galten, als wichtige Quelle identifiziert (Calandra *et al*, 1994).

1.1.2 Struktur und Sekretion

MIF ist ein aus 115 Aminosäuren aufgebautes Protein mit einer molekularen Masse von 12,5kD. Im menschlichen Genom existiert ein einziges funktionelles MIF-Gen, das auf Chromosom 22q11.2 lokalisiert ist (Budarf *et al*, 1997). Im Gegensatz dazu sind bei der Maus mehrere prozessierte (intronlose) Pseudogene beschrieben worden (Donn und Ray, 2004). Das menschliche MIF-Gen besteht aus drei Exons mit 205, 173 und 183bp,

welche von zwei Introns mit 189 und 95bp getrennt werden. Im Bereich der 5'-Promotorregion konnte die Mikrosatellitensequenz CATT nachgewiesen werden, die je nach Anzahl an Wiederholungen zu einer Aktivierung des Promotors und damit einer vermehrten MIF-Expression führen kann (Baugh *et al*, 2002).

MIF besitzt zwar zu keinem anderen menschlichen Protein eine Sequenzhomologie, jedoch stimmt die Abfolge der 115 Aminosäuren zu 90% mit murinem (Mäuse-) MIF überein. Ferner wurden auch in anderen Säugetierspezies (Ratte, Schwein, Rind) Gene mit einem hohen Grad an Homologie identifiziert (Renner *et al*, 2005). Doch nicht nur in Säugetieren, auch in Pflanzen, Bakterien und Parasiten wurden MIF-homologe Proteine gefunden (Jaworski *et al*, 2001; Cordery *et al*, 2007; Cote *et al*, 2013).

Die MIF-Struktur wurde sowohl röntgenologisch, magnetresonanztomographisch als auch kristallographisch untersucht (Mühlhahn *et al*, 1996; Sugimoto *et al*, 1996; Sun *et al*, 1996; Suzuki *et al*, 1996). MIF liegt physiologisch als Monomer, Dimer wie auch als Trimer vor, wobei Monomer und Dimer die wahrscheinlich vorherrschenden Strukturen sind (Mischke *et al*, 1998). Das Trimer bildet in seiner Struktur einen über die gesamte Länge des Moleküls verlaufenden Kanal aus, welcher vor allem mit hydrophilen Atomen ausgekleidet ist (Sun *et al*, 1996). Die Funktion dieses Kanals ist bislang jedoch noch unklar. Trotz der Existenz zweier potentieller N-Glykosylierungsstellen, welche sowohl beim Menschen als auch bei der Maus existieren, findet bei MIF keine posttranslationale Modifikation statt (Bernhagen *et al*, 1994).

Die Sekretion von MIF wird durch eine Vielzahl von Stimuli ausgelöst. Sowohl Entzündungsmediatoren wie TNF- α , IFN- γ oder LPS (Lipopolysaccharid, Endotoxin) (Bernhagen *et al*, 1993; Calandra *et al*, 1994) als auch Hormone wie Glukokortikoide (Calandra *et al*, 1995) oder CRH (Corticotropin-releasing Hormon) aus dem Hypothalamus spielen hierbei eine Rolle (Nishino *et al*, 1995). Dabei kann MIF innerhalb kürzester Zeit (etwa 30min) aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden (Bacher *et al*, 1997). Innerhalb von 24h kommt es anschließend zu einem Anstieg an MIF-mRNA und der Neusynthese von MIF.

Da MIF über keine N-terminale Signalsequenz zur Translokation in das endoplasmatische Retikulum (ER) verfügt, erfolgt die Freisetzung nicht über den klassischen ER/Golgi-abhängigen Weg, sondern über einen nicht-konventionellen Sekretionsvorgang (Flieger *et al*, 2003).

1.1.3 Vorkommen

Von den Erstbeschreibern Bloom und Bennett, sowie David (1966) wurde eine „MIF“-Aktivität aus aktivierten T-Lymphozyten isoliert. In den vergangenen Jahrzehnten konnte MIF auch in einer Reihe weiterer Immunzellen nachgewiesen werden, darunter Mastzellen, Granulozyten, NK- und dendritische Zellen (Rossi *et al*, 1998; Morelli *et al*, 2001; Riedemann *et al*, 2004; Wiener *et al*, 2004; Arcuri *et al*, 2006). Heute zählen Makrophagen zu den wichtigsten MIF-produzierenden Zellen *in vivo* (Calandra *et al*, 1994).

Ferner entdeckte man, dass Zellen des Hypophysenvorderlappens MIF nach Stimulation mit LPS in hohem Maße sezernieren. Mit 0,05% des Gesamtproteins der Hypophyse hat MIF damit einen nahezu ebenso großen Anteil wie die klassischen Hypophysenhormone ACTH (0,2%) und Prolaktin (0,08%) (Bernhagen *et al*, 1993).

Des Weiteren konnte MIF mit Hilfe von Immunhistochemie im Bronchialepithel sowie in Alveolarmakrophagen der Lunge nachgewiesen werden. MIF findet sich außerdem in Leber, Milz, Niere, Nebenniere, der Haut und dem Gastrointestinaltrakt (Bacher *et al*, 1997).

Im Hoden wurde MIF vorwiegend in Leydig-Zellen und deren Vorläufern nachgewiesen (Meinhardt *et al*, 1996). Nach Depletion der Leydig-Zellen durch EDS (Ethandimethansulfonat) übernehmen bis zu deren Regeneration aus Progenitorzellen die Sertoli-Zellen kompensatorisch die MIF-Produktion (Meinhardt *et al*, 1999).

In den Epithelzellen des Nebenhodens, vor allem im Bereich des Caput, konnte MIF sowohl immunhistochemisch, als auch durch mRNA-Analysen nachgewiesen werden (Eickhoff *et al*, 2001). Ferner findet sich MIF im Epithel der Prostata, im Prostata-Sekret, im Endometrium sowie im Trophoblast des ersten Schwangerschaftstrimesters (Arcuri *et al*, 1999). Während des weiblichen Zyklus scheint es im Endometrium zusätzlich einen periodischen Verlauf der MIF-Konzentration mit Höhepunkt zum Ende des Zyklus zu geben (Carli *et al*, 2007).

Eine Übersicht über die Verteilung von MIF in Geweben und Zellen gibt Tab. 1-1.

Organ(-system)	Zelltyp	Literatur
Gehirn	Astrozyten, Ependymzellen	Nishibori <i>et al</i> , 1996
	Großhirnrinde	Suzuki <i>et al</i> , 1999
	Hypothalamus, Kleinhirn, Pons, Hippocampus	Bacher <i>et al</i> , 1998
	Adenohypophyse	kortikotrophe Zellen
Auge	Cornea	Matsuda <i>et al</i> , 1996
	Linse	Wistow <i>et al</i> , 1993
Immunsystem	Makrophagen, B-/T-Lymphozyten	Calandra <i>et al</i> , 1994 Bacher <i>et al</i> , 1996; Wymann <i>et al</i> , 1999
	Dendritische Zellen	Morelli <i>et al</i> , 2001
	Granulozyten	Rossi <i>et al</i> , 1998; Riedemann <i>et al</i> , 2004
	Mastzellen	Wiener <i>et al</i> , 2004
	NK-Zellen	Arcuri, <i>et al</i> , 2006
	Thrombozyten	Strüßmann, <i>et al</i> , 2013
	Lunge	Alveolarmakrophagen, Bronchialepithel
Herz	Kardiomyozyten	Takahashi <i>et al</i> , 2001
Leber	Hepatozyten, Kupffer-Zellen	Bacher <i>et al</i> , 1997
Niere	Tubulusepithelzellen	Imamura <i>et al</i> , 1996; Bacher <i>et al</i> , 1997
	Mesangiumzellen	Tesch <i>et al</i> , 1998
Nebenniere	Zona glomerulosa, Zona fasciculata	Bacher <i>et al</i> , 1997
Gastrointestinaltrakt	Epithelzellen, glatte Muskulatur	Bacher <i>et al</i> , 1997
	Plexus submucosus, Plexus myentericus	
Pankreas	B-Zellen	Waeber <i>et al</i> , 1997
Uterus	Endometrium, Trophoblast	Suzuki <i>et al</i> , 1996; Arcuri <i>et al</i> , 1999
Ovar	Oozyten	Suzuki <i>et al</i> , 1996
Hoden	Leydig-Zellen	Meinhardt <i>et al</i> , 1996
Nebenhoden	Epithelzellen	Eickhoff <i>et al</i> , 2001
	Spermien	
Prostata	Epithelzellen, Prostatasekret	Arcuri <i>et al</i> , 1999
Fettgewebe	Adipozyten	Hirokawa <i>et al</i> , 1997
Haut	Keratinozyten, Talgdrüsen, Haarfollikel	Bacher <i>et al</i> , 1997
Knochen, Gelenke	Osteoblasten, Synovia	Onodera <i>et al</i> , 1996, 1999

Tab. 1-1 MIF-Expression im Körper (bearbeitet nach Filip, 2006).

Obwohl MIF in gewebsständigen Makrophagen von Lunge und Leber nachgewiesen wurde, konnte dies nicht für die Makrophagen der Haut gezeigt werden. In Thymus und Knochenmark wurden lediglich vereinzelt MIF-positive Zellen gefunden werden (Bacher *et al*, 1997), obwohl diese Organe Makrophagen oder deren direkte Vorläufer enthalten.

Weiterhin beinhaltet das Kammerwasser des Auges ein zu MIF mehr als 90% homologes Protein, welches die NK-vermittelte Lyse des Hornhautepithels hemmt und damit zum Teil das Immunprivileg des Auges bedingt (Apte *et al*, 1998).

1.1.4 Funktionen

Seitdem MIF bei Versuchen zu Hypersensitivitätsreaktionen beschrieben wurde, konnten viele weitere Funktionen des Proteins herausgestellt werden, so dass heute von einem „multifunktionalen“ Protein gesprochen werden kann (Sun *et al*, 1996).

1.1.4.1 Enzymaktivität und Wirkmechanismen

Für MIF wurden bislang zwei enzymatische Aktivitäten nachgewiesen. Im Rahmen von Experimenten zur Melanin-Biosynthese entdeckten Rosengren *et al* ein neuartiges Enzym, das die Reaktion von D-Dopachrom zu Dihydroxyindol über eine Tautomerisation und Decarboxylierung katalysierte. Die daraufhin durchgeführte Isolierung und Sequenzanalyse des Enzyms ergab, dass es sich um MIF handelte (Rosengren *et al*, 1996). Durch Untersuchung der Aminosäuresequenz wurde kurze Zeit später eine weitere enzymatische Funktion von MIF entdeckt. Eine Disulfidbrücke im Bereich der Aminosäuren 57-60 bildet das katalytische Zentrum einer Thiol-Protein-Oxidoreduktase (Kleemann *et al*, 1998). Aufgrund dieser Funktionen wird MIF als Zytokin mit enzymatischer Aktivität bezeichnet oder auch Zytozym genannt (Kleemann *et al*, 1998). Über die physiologische Relevanz dieser Reaktionen und inwieweit die enzymatischen Aktivitäten mit den immunmodulierenden Funktionen von MIF in Verbindung stehen, wird derzeit noch kontrovers diskutiert.

1.1.4.2 MIF als proinflammatorisches Zytokin

Die migrationshemmende Wirkung ist bei der Funktionsbetrachtung von MIF historisch zu sehen und mittlerweile für weitere Zytokine wie IFN- γ (Thurman *et al*, 1985) sowie IL-4 (McInnes und Rennick, 1988) nachgewiesen. Im Mittelpunkt steht heute die

proinflammatorische Funktion des Zytokins, die über unterschiedliche Mechanismen vermittelt wird.

Im Rahmen der Phagozytose von Fremdkörpern, beispielsweise bei der Endoprothesenlockerung, kommt es zu einer Neusynthese und Freisetzung von MIF durch Makrophagen. Dies führt zu einem vermehrten Einwandern mononukleärer Zellen in das Entzündungsgebiet (Onodera *et al*, 1997) sowie deren Aktivierung mit gesteigerter Sekretion des proinflammatorischen Zytokins TNF- α . Hierdurch kommt es zu einer weiteren Stimulation der MIF-Produktion und Polarisierung der Entzündungsreaktion. Daneben führen weitere Entzündungsmediatoren wie LPS und IFN- γ ebenfalls zu einer Steigerung der MIF-Sekretion durch Makrophagen (Calandra *et al*, 1994).

Ferner spielt MIF eine wichtige Rolle bei der Immunantwort von mononukleären Zellen auf gramnegative Bakterien durch Expression von Toll-like Rezeptor 4 (TLR4). Dieser bildet einen Teil des LPS-Rezeptor-Komplexes und führt über eine Aktivierung des NF κ B-Signalweges zu einer vermehrten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Bei MIF-Mangel kommt es zu einer verminderten Expression von TLR4, wodurch die Reaktion auf gramnegative Keime abgeschwächt wird (Roger *et al*, 2001).

Des Weiteren reguliert MIF die intrazelluläre Phospholipase A₂ über die Aktivierung von extrazellulär Signal-regulierten Kinasen (ERK) in Verbindung mit CD74, einer extrazellulären Domäne des MHC-II (major histocompatibility complex). Dies führt zur Ausschüttung von Arachidonsäure und nachfolgend Prostaglandin E₂ (Mitchell *et al*, 1999; Calandra und Roger, 2003). Außerdem hemmt MIF die Aktivitäts-induzierte und p53-abhängige Apoptose in Makrophagen und führt somit zu einer prolongierten Entzündungsreaktion (Mitchell *et al*, 2002). Diese Signalwege sind vereinfacht in Abb. 1-1 dargestellt.

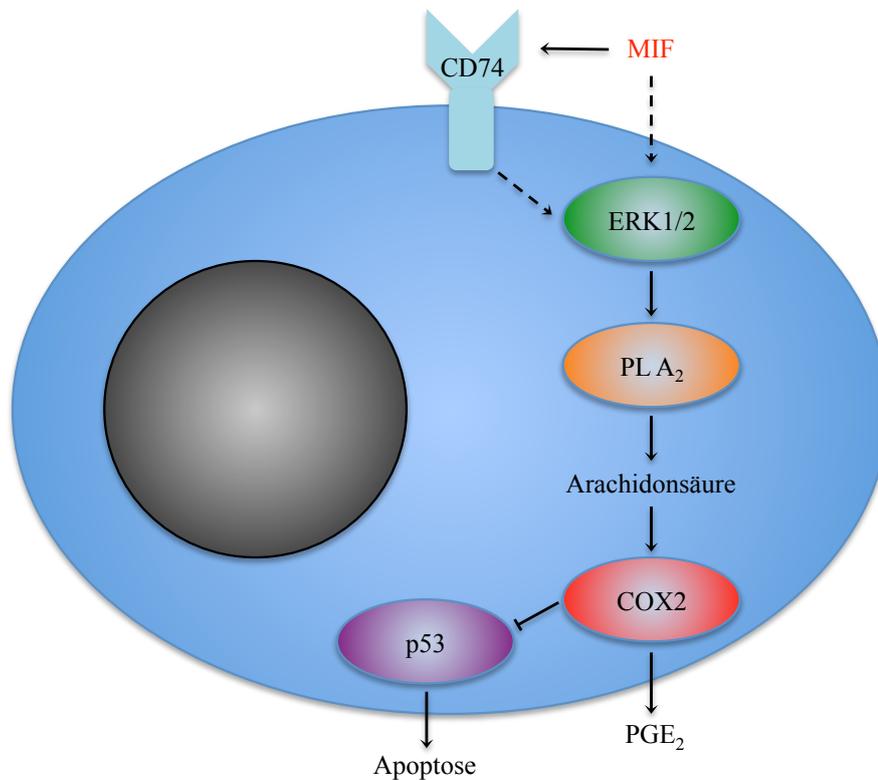


Abb. 1-1 Freisetzung von Prostaglandin und Hemmung der Apoptose durch MIF nach Calandra und Roger, 2003.

Durch Inhibierung der p53-abhängigen Apoptose kommt es jedoch nicht nur zu einer chronischen Inflammation, sondern auch zu einer vermehrten Proliferation. In diesem Zusammenhang wurde eine erhöhte Expression von MIF in einer Vielzahl unterschiedlicher Tumore nachgewiesen. Durch die verlängerte Überlebensdauer der Zellen kommt es zu einer Häufung an Genomschäden und onkogenen Mutationen, was einen Transformations- und Entartungsprozess zur Folge hat (Bucala *et al*, 2007). Zusätzlich induziert MIF durch Aktivierung von MAP Kinasen die Neoangiogenese und begünstigt somit ein Tumorwachstum (Conroy *et al*, 2010).

1.1.4.3 Entzündungsmediation in Anwesenheit von Glukokortikoiden

MIF gilt als erstes Zytokin, welches überraschenderweise von Immunzellen als Reaktion auf geringe Konzentrationen an Glukokortikoiden hin sezerniert wird (Calandra *et al*, 1995). Nach der Freisetzung stimuliert MIF die Sekretion von TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 *in vitro* und wirkt somit der Hemmung durch die Glukokortikoide entgegen. *In vivo* führt die Gabe von anti-MIF-Antikörpern zu einer deutlichen Zunahme der inhibitorischen Wirkung von Dexamethason auf die Freisetzung von Zytokinen. Zusammengefasst bewirkt MIF am Entzündungsort die Aufrechterhaltung

der Immunantwort in Gegenwart von endogenen oder exogenen Glukokortikoiden durch vermehrte Produktion von proinflammatorischen Mediatoren. Eine höhere Dosis von Steroiden führt jedoch zu einer Herabsetzung dieser Wirkung, was einer physiologischen Limitation gleichkommt, um den Körper vor einer überschießenden Entzündungsreaktion zu schützen. Dies bedeutet jedoch auch, dass therapeutisch eingesetzte Glukokortikoide aufgrund eines MIF-Anstiegs im Entzündungsfall nicht optimal wirken, da die pharmakologischen Effekte durch das Zytokin aufgehoben werden können (Aeberli *et al*, 2006).

Außerdem inhibiert MIF den Glukokortikoid-vermittelten intrazellulären Anstieg von I κ B α , welches den proinflammatorischen Transkriptionsfaktor NF κ B im Zytosol bindet. Dies führt dazu, dass NF κ B vermehrt in den Zellkern translozieren und dort die Transkription von weiteren Entzündungsmediatoren wie TNF- α und IL-1 β aktivieren kann (Daun und Cannon, 2000).

1.1.4.4 Testikuläre Wirkungen und Einfluss auf Spermien

Das von den Leydig-Zellen im Interstitium des Hodens sezernierte MIF hat keinen autokrinen Einfluss auf die Steroidsynthese. Es supprimiert hingegen die Inhibin-Produktion der Sertoli-Zellen im Keimepithel der Samenkanälchen (Meinhardt *et al*, 1996). Inhibin reguliert über einen Regelkreis die Freisetzung von FSH aus der Hypophyse und damit indirekt die Keimzellreifung und -Differenzierung (de Kretser und Robertson, 1989).

Die Konzentration von MIF im Hoden ist weitgehend unabhängig von LH, FSH und Testosteron (Meinhardt *et al*, 1998). Untersuchungen an MIF-Gen-Knockout-Mäusen zeigten jedoch eine Verminderung der intratestikulären Konzentrationen von Östradiol und Testosteron bei gleich bleibenden Serumspiegeln (Anahara *et al*, 2006). Hierbei wird jedoch davon ausgegangen, dass diese erniedrigten Sexualhormonspiegel durch systemische Veränderungen der Hypothalamus-Hypophysen-Achse und nicht durch lokale Prozesse im Hoden erfolgen. In testikulären Peritubulärzellen hemmt MIF die Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins TGF- β 2 *in vitro*, was eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten einer inflammatorischen Reaktion im Hoden zur Folge hat (Müller *et al*, 2005).

MIF wurde ferner im Seminalplasma sowie in Anteilen des Spermatozoenschwanzes nachgewiesen und spielt eine wichtige Rolle bei der Reifung der Keimzellen. In

Patienten mit eingeschränkter Spermienqualität (Oligo- und Azoospermie) fanden sich größere Mengen an MIF als in den Proben gesunder männlicher Probanden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass MIF mit steigender Konzentration die Motilität gesunder Spermien herabsetzt (Aljabari *et al*, 2007). MIF ist durch Phosphorylierungsprozesse der Spermatozoen im weiblichen Reproduktionstrakt an der Kapazitation, dem Reifungsprozess zu befruchtungsfähigen Spermien, beteiligt. Dies spielt besonders bei der Endometriose eine wichtige Rolle. Dabei handelt es sich um eine Erkrankung, bei der Endometrialgewebe außerhalb des Uterus gefunden werden kann, meist peritoneal, und das mit deutlich reduzierter Fertilität vergesellschaftet ist. Bei Patientinnen mit Endometriose wurden im Vergleich zu gesunden Frauen erhöhte MIF-Konzentrationen im Serum sowie intraperitoneal nachgewiesen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Fähigkeit der Spermien zur Befruchtung durch MIF beeinträchtigt werden kann (Carli *et al*, 2007). Sowohl durch eine Einschränkung der Motilität, als auch der Phosphorylierung der Spermien bei höheren MIF-Konzentrationen spielt MIF auch bei der vermeintlich weiblichen Unfruchtbarkeit durch Reaktion der Spermien im weiblichen Reproduktionstrakt eine wichtige Rolle.

1.1.5 Erste Therapiekonzepte

Bei Versuchen zum Endotoxin-bedingten Schock stellte sich heraus, dass die gleichzeitige Gabe von LPS und MIF eine erhöhte Letalität zur Folge hatte. Daraufhin wurde für MIF eine Rolle als „Mediator der systemischen Stressreaktion“ postuliert (Bucala, 1996). Versuche an MIF-Gen-Knockout-Mäusen zeigten, dass diese Tiere resistent gegen die letalen Auswirkungen von hochdosierten LPS-Injektionen waren (Bozza *et al*, 1999). Auch beim Menschen wurden erhöhte MIF-Konzentrationen im Serum von Patienten mit Sepsis, rheumatoider Arthritis (Leech *et al*, 1999; Bozza *et al*, 2004) oder lokalen Erkrankungen wie M. Crohn, Colitis ulcerosa, Diabetes und Pankreatitis (Yabunaka *et al*, 2000; Ohkawara *et al*, 2002; Sakai *et al*, 2003) nachgewiesen. Dies führte zur Entwicklung erster Therapiekonzepte, die auf der Antagonisierung von MIF basierten.

Einen experimentellen Ansatz zur Regulation von MIF stellt die Verwendung von anti-MIF-Antikörpern im Mausmodell dar (Bernhagen *et al*, 1993; Cvetkovic und Stosic-Grujicic, 2006). Die Antikörper bewirken eine Resistenz der Tiere gegenüber LPS und damit Schutz vor einer letalen Endotoxinämie (Calandra *et al*, 1994). Auch weitere

Versuchsreihen zu grampositiver Sepsis, Atherosklerose, Arthritis und Autoimmun-Diabetes verliefen aussichtsreich (Cvetkovic und Stosic-Grujicic, 2006). Neuere Studien mit monoklonalen Antikörpern versprechen eine höhere Spezifität und weniger Nebenwirkungen (Zhang *et al*, 2011) als andere MIF-Inhibitoren. Generelle Probleme der Antikörpertherapie wie die kurze Halbwertszeit *in vivo*, mögliche Nebenwirkungen, die parenterale Applikation sowie die hohen Kosten limitieren derzeit allerdings noch immer die Anwendung am Menschen.

Eine Möglichkeit, diese Hürden zu umgehen, stellt die Entwicklung eines Impfstoffs dar, der zur Bildung von autologen Antikörpern führt. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass die aktive Immunisierung gegen MIF einen neuartigen Ansatz zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis sowie Kolitis darstellen kann (Onodera *et al*, 2007; Ohkawara *et al*, 2010).

Neuere Studien arbeiten an der Entwicklung kleinmolekularer Verbindungen, welche die enzymatische Aktivität von MIF hemmen. Ein erster Vertreter dieser Gruppe war ISO-1, welches im aktiven Zentrum von MIF bindet. ISO-1 führt nicht nur zu einer Inhibierung der Tautomerase-Aktivität, sondern auch zu einer Verminderung der inflammatorischen Reaktion *in vivo* durch Hemmung der TNF- α -Freisetzung (Al-Abed *et al*, 2005). Untersuchungen mit ähnlichen oder weiterentwickelten kleinmolekularen Verbindungen wie ISO-1 zeigten ebenfalls positive Ergebnisse mit teils deutlich erhöhter Inhibierung der Tautomerase als die Ursprungssubstanz (Kithcart *et al*, 2010; Balachandran *et al*, 2011). Neben der Entwicklung neuer Tautomerase-Hemmstoffe sehen Ouertatani-Sakouhi *et al* eine neue Generation an MIF-Inhibitoren, welche an mehreren Stellen gleichzeitig ansetzen und so eine höhere Effektivität erreichen sollen (2010).

Jüngst konnte außerdem gezeigt werden, dass auch Thyroxin zu einer Hemmung der katalytischen Aktivität von MIF führt und eine therapeutische Rolle im Rahmen von Sepsis spielen könnte (Al-Abed *et al*, 2011).

1.2 Hoden

1.2.1 Anatomie

1.2.1.1 Makroskopischer Aufbau

Die Hoden (Testes) liegen zusammen mit den Nebenhoden (Epididymis) im Hodensack (Skrotum) und werden hierbei von mehreren Schichten, den Hodenhüllen, umgeben. Diese entsprechen in ihrem Aufbau der vorderen Bauchwand, welche den Hoden bei seinem entwicklungsgeschichtlichen Deszensus durch den Leistenkanal umgeben. Die innerste Schicht bildet die Tunica albuginea, die als Kapsel dem Hodengewebe direkt anliegt und aus derbem Bindegewebe und glatten Muskelzellen besteht. Darauf folgt das viszerale Blatt der Tunica vaginalis testis (Epiorchium), welches im Bereich des Abgangs des Samenleiters (Ductus deferens) in das parietale Blatt (Periorchium) übergeht. Als nächste Schichten finden sich die Fascia spermatica interna, eine Ausstülpung der Fascia transversalis der Bauchdecke, sowie begleitend der Musculus cremaster, der ursprünglich vom Musculus obliquus internus abdominis entstammt. Hierauf folgen die Fascia spermatica externa und schließlich die Tunica dartos des Skrotums.

Durch die Lage außerhalb der Bauchhöhle liegt die Temperatur im Hoden bei etwa 34-35°C. Dies ist für die Samenzellbildung von erheblicher Bedeutung, da bereits die kurzzeitige Erwärmung auf Körperkerntemperatur zu einer Schädigung der Keimzellen führen kann.

Beim Erwachsenen hat der Hoden ein Volumen von 20-25ml und wiegt zusammen mit dem Nebenhoden 20-30g. Der Nebenhoden liegt dem Hoden dorsal an und ist mit diesem über das Rete testis und die Ductuli efferentes verbunden (Holstein in Drenckhahn, 2003).

1.2.1.2 Mikroskopischer Aufbau

Das innerhalb der Tunica albuginea (s.o.) liegende Hodengewebe wird durch bindegewebige Septen (Septula testis) in etwa 370 Hodenläppchen (Lobuli testis) unterteilt. Diese Lobuli bestehen aus den vielfach gewundenen Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) sowie dem intertubulären Raum (Interstitium).

Im Interstitium finden sich Leydig-Zellen, Makrophagen, Kapillaren, Nerven sowie vereinzelt Bindegewebs- und Mastzellen. Die größten Zellen des Interstitiums sind die Leydig-Zellen. Ihre Aufgabe ist vor allem die Produktion von männlichen Sexualhormonen, wovon Testosteron das bedeutsamste ist. Testosteron wird direkt nach seiner Synthese sezerniert und erreicht parakrin das Keimepithel der Samenkanälchen, während sich seine endokrine Wirkung nach Dissemination über das Blut- und Lymphsystem im ganzen Körper entfaltet. Weiterhin werden in den Leydig-Zellen auch Katecholamine, Neuropeptide und Zytokine (Insulin like growth factor 1, Transforming growth factor β , MIF) gebildet (Cailleau *et al*, 1990; Meinhardt *et al*, 1996). Leydig-Zellen regulieren außerdem die Steroidbildung, Hodendurchblutung und Gefäßpermeabilität, sowie die Kontraktilität der peritubulären Myofibroblasten um die Tubuli seminiferi und den Spermatozoentransport zum Nebenhoden (Holstein in Drenckhahn, 2003).

Die Tubuli seminiferi enthalten bei einem Durchmesser von 180-280 μ m das Keimepithel und sind durch eine myofibröse Lamina propria vom Interstitium abgegrenzt. Das Keimepithel (vgl. Abb. 1-2) besteht aus Stützzellen, den so genannten Sertoli-Zellen, und Keimzellen, die sich durch Reifeteilungen zu Samenzellen differenzieren. Diesen Vorgang nennt man Spermatogenese. Sie beginnt im Keimepithel basal mit den Spermatogonien und schreitet zum Lumen hin fort. Es lassen sich Spermatogonien der Typen A und B unterscheiden, wobei Zellen des Typs A die Stammzellen der Spermatogenese darstellen. Spermatozyten I entstehen aus der mitotischen Teilung der B-Spermatogonien und bilden die größten Zellen des Keimepithels. Durch Meiose entstehen aus einem primären Spermatozyten zwei sekundäre Spermatozyten, aus welchen nach einer weiteren meiotischen Teilung die haploiden Spermatisden hervorgehen. Die Spermatisden stellen die kleinsten Zellen des Keimepithels dar und befinden sich in der Nähe des Lumens. Durch Differenzierung bilden sich reife elongierte Spermatisden, welche schließlich nach Kernkondensation, Akrosombildung und Ausbildung der Geißelstrukturen als Spermatozoen aus dem Keimepithel entlassen werden, was als Spermiation bezeichnet wird.

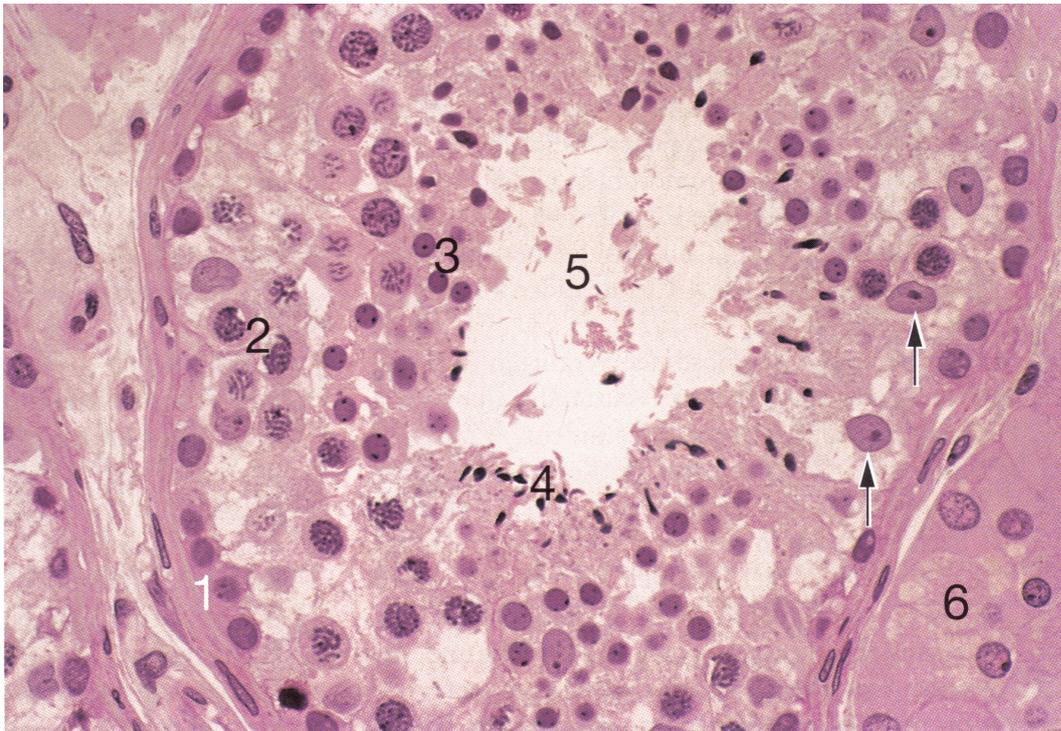


Abb. 1-2 Keimepithel des menschlichen Hodens (450-fache Vergrößerung). Spermatogonien (1), Spermatozyten 1. Ordnung (2), frühe (3) und späte (4) Spermatiden, Tubuluslumen (5), Leydig-Zellen (6) und Sertoli-Zellen (Pfeil), aus Welsch, 2006.

Sertoli-Zellen stellen die Stützzellen innerhalb der Tubuli seminiferi dar. Sie reichen von der Basallamina bis an das Lumen heran und umschließen alle Keimzellstadien. Im Gegensatz zu den Keimzellen sind die adulten Sertoli-Zellen teilungsunfähig. Mit ihren Fortsätzen stehen die Sertoli-Zellen untereinander in Kontakt und bilden durch Zonulae occludentes (Tight junctions) die Blut-Hoden-Schranke. Basal davon finden sich Spermatogonien und frühe primäre Spermatozyten (Proleptotän), luminal fortgeschrittene Spermatozyten (vor allem Pachytän-Spermatozyten) in der Meiose, sekundäre Spermatozyten und Spermatiden. Während ihrer Entwicklung passieren die Keimzellen die Blut-Hoden Schranke. Im Gegensatz dazu können interzelluläre Stoffwechselprodukte, mutagene Substanzen oder autoaggressive Antikörper diese nicht überwinden. Bei der Spermiation verbleiben Zytoplasmareste der Spermatiden in Form von Residualkörperchen zurück, welche von den Sertoli-Zellen phagozytiert und abgebaut werden. Des Weiteren bilden Sertoli-Zellen aus Testosteron durch die 5 α -Reduktase das in der Prostata stärker wirksame Dihydrotestosteron (DHT). DHT wird durch das FSH-abhängig sezernierte Androgen-bindende Protein in den Nebenhoden transportiert. Als endokrine Rückkopplung für FSH fungiert das Sertoli-Zellprodukt

Inhibin, welches die Bildung von FSH in der Hypophyse hemmt (Holstein in Drenckhahn, 2003).

Neben Makrophagen, die den Hauptanteil an Leukozyten im gesunden Hoden darstellen, finden sich vereinzelt Mastzellen und Lymphozyten (Niemi *et al*, 1986; Pöllänen und Niemi, 1987; el-Demiry *et al*, 1987). Bei etwa 80% der Makrophagen handelt es sich um gewebständige Zellen, die mit Hilfe von Antikörpern charakterisiert werden können (Wang *et al*, 1994).

1.2.2 Immunprivileg

In der Pubertät finden sich erstmals haploide Keimzellen im Hoden, die für den Körper einen bis dahin unbekanntem Zelltyp darstellen. Da die Ausbildung der Selbst-Toleranz bereits in der Perinatalperiode stattfindet, erfordert es spezifische Toleranzmechanismen, das so genannte Immunprivileg des Hodens, um autoimmunologische Reaktionen gegen die Keimzellen zu verhindern (Schuppe und Meinhardt, 2005).

Ursprünglich wurde die Separation der meiotischen und post-meiotischen Keimzellen von der Blutversorgung durch die Blut-Hoden-Schranke als entscheidender Mechanismus zur Etablierung und Aufrechterhaltung des Immunprivilegs gesehen (Pelletier *et al*, 1981). Bald schon wurde jedoch nachgewiesen, dass Spermatogonien und frühe Spermatozyten auch außerhalb der Blut-Hoden-Schranke Autoantigene exprimieren, die für Antikörper zugänglich sind (Yule *et al*, 1988; Saari *et al*, 1996). Dies lässt den Schluss zu, dass weitere, immunregulatorische Mechanismen bestehen müssen, um Toleranz gegenüber den Keimzellen zu gewährleisten.

So kommt es zu einer Nichtreaktivität von T-Lymphozyten auf antigenpräsentierende Zellen, da co-stimulierende Moleküle wie ICAM-1, CD80 oder CD86 fehlen (Hedger, 1997; Schuppe und Meinhardt, 2005). Dies kann sowohl zu einer Selbstzerstörung der Lymphozyten führen, als auch zu Anergie, das heißt, dass eine Reaktion auf weitere Antigene nicht mehr stattfinden kann. Außerdem können derart gehemmte T-Zellen weitere umgebende Lymphozyten in ihrer Aktivität hemmen (Hedger, 1997).

Auch gibt es Hinweise, dass lokal sezernierte Zytokine modulatorische Funktionen besitzen und die Aktivierung einer Immunreaktion unterdrücken (Filippini *et al*, 2001; Hedger und Meinhardt, 2003). Ferner induzieren verschiedene Zytokine, darunter

TNF- α , TGF- β , IFN- γ und IL-1, die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und sind somit an der Regulation der Blut-Hoden-Schranke beteiligt (Lui und Cheng, 2007).

Ein weiterer, jedoch umstrittener, Mechanismus des Immunprivilegs stellt die kombinierte Fas- und CD30-vermittelte Apoptose von T-Lymphozyten dar. Eine Studie mit Pankreas-Inselzell-Transplantationen an Mäusen zeigte, dass in den Hoden transplantiertes Gewebe signifikant langsamer abgestoßen wird als in der nicht immunologisch privilegierten Nierenkapsel. Grund hierfür ist eine durch T-Gedächtniszellen hervorgerufene Aktivierung von Fas und CD30, was zu einer vermehrten Apoptose der Lymphozyten und damit Immunprotektion im Hoden führt (Dai *et al*, 2005).

1.2.3 Orchitis

Die Orchitis ist eine entzündliche Veränderung des Hodens, bei der es durch interstitielle Leukozyteninfiltration, nachgeschaltet in den Samenkanälchen zu einer Schädigung und Sklerosierung der Tubuli und Zerstörung der Keimzellen kommt (Weidner *et al*, 1999; Mikuz in Böcker *et al*, 2008). Die häufigsten Ursachen stellen virale (Mumps) und bakterielle (*E. coli*, Enterobactericidae, Neisseria) Infektionen dar, wobei letztere häufig als kombinierte Epididymo-Orchitis imponieren. Zusätzlich können Traumen, chemische Noxen und granulomatöse Reaktionen zu einer Orchitis führen (Haag *et al*, 2007). Die Charakterisierung bezieht neben histopathologischen Merkmalen wie Typ und Ausdehnung entzündlicher Infiltrate auch die klinische Verlaufsform (akut versus chronisch) mit ein (Schuppe *et al*, 2008). Symptome einer akuten Orchitis sind Schmerz und Schwellung des Hodens mit Rötung der Skrotalhaut, sowie Fieber (Haag *et al*, 2007). Als Komplikation kann eine Orchitis durch die Zerstörung des Hodengewebes zu Hypogonadismus und Sterilität führen (Haag *et al*, 2007).

Eine Sonderstellung nimmt die experimentelle Autoimmunorchitis (EAO) ein. Sie stellt keine klinische Verlaufsform dar, sondern ein Modell zur Auslösung und weitergehenden Untersuchung einer chronischen Hodenentzündung sowie immunologisch bedingter Unfruchtbarkeit (Tung und Teuscher, 1995). Im Tiermodell wird den Versuchstieren (hier: Ratten) mehrmals eine Mischung aus Hodenhomogenat und komplettem Freund-Adjuvans injiziert, gefolgt von einer Gabe von inaktivierten *Bordetella pertussis* Bakterien (Kohno *et al*, 1983; Doncel *et al*, 1989). Hierauf

entwickeln die Ratten zu etwa 43% eine Orchitis (Suescun *et al*, 1994), in anderen Studien auch häufiger (Fijak *et al*, 2011). Fünfzig Tage nach der ersten Immunisierung treten erkennbare mittelgradige Schädigungen auf, die im Verlauf progressiv zunehmen. Nach 80 Tagen sind schließlich schwerste Hodenläsionen wie eine vollständige Tubulusdegeneration erkennbar (Doncel *et al*, 1989). In schwer geschädigten Bereichen des Hodens sind nur noch Sertoli-Zellen und Spermatogonien in den Tubuli zu finden. Im Gegensatz zur EAO im Mausmodell kommt es bei der Ratte zu keiner Infiltration von Entzündungszellen in die Tubuli seminiferi (Rival *et al*, 2008). Neben dem vermehrten Auftreten von Makrophagen, dendritischen Zellen und Mastzellen fällt auf, dass die absolute Zahl an Leydig-Zellen im Verlauf der EAO ebenfalls zunimmt, obwohl es insgesamt zu einer Abnahme des Hodenvolumens kommt (Suescun *et al*, 1994; Guazzone *et al*, 2009).

Entzündungsbegleitend kommt es zu einer gesteigerten Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, IFN- γ und TNF- α , die zur Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion sowie zu einer vermehrten Apoptose der Keimzellen beitragen. IL-1 wird im Hoden von Sertoli-Zellen sezerniert und reguliert einerseits die DNA-Replikation der Keimzellen sowie über parakrine Mechanismen die Steroidhormonsynthese der Leydig-Zellen (Guazzone *et al*, 2009). Außerdem bewirkt es eine Öffnung der zellulären Kontakte zwischen den Sertoli-Zellen, was zu einer Auflockerung der Blut-Hoden-Schranke führt (Lui und Cheng, 2007). Die intratestikuläre Applikation von LPS bewirkt in Makrophagen eine vermehrte Sekretion von IL-1 β , einer Isoform des IL-1, die im physiologischen Zustand nicht nachweisbar ist (Stéphan *et al*, 1997). Dies wiederum führt im Hoden zu einer verstärkten Entzündungsreaktion und Immunantwort (Guazzone *et al*, 2009). Bei IL-6 handelt es sich um ein Zytokin, das durch Aktivierung und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten sowie Induktion einer Akute-Phase-Reaktion an der Entstehung und Aufrechterhaltung von Entzündungsreaktionen beteiligt ist. *In vitro* führt es zu einer vermehrten Apoptose von Keimzellen in den Tubuli seminiferi. Im Hoden wird IL-6 von Makrophagen, Leydig-, Sertoli-, Peritubulär- und Keimzellen sezerniert. Im Rahmen der EAO kommt es zu einem Anstieg des IL-6 in entzündungsbedingt eingewanderten Makrophagen und einer Abnahme in Sertoli-Zellen. Außerdem zeigt sich mit zunehmender Hodenschädigung und Keimzellapoptose im Krankheitsverlauf eine Zunahme an Keimzellen mit Expression des IL-6-Rezeptors (Rival *et al*, 2006; Guazzone *et al*, 2009). Im normalen Hoden wird TNF- α überwiegend von Keimzellen

und interstitiellen Zellen synthetisiert und ist ein wichtiger Regulator der Spermatogenese. In Sertoli-Zellen bewirkt es eine vermehrte Expression des Androgen-Rezeptors. Daneben spielt TNF- α bei der Versorgung der Keimzellen und der Spermiation eine wichtige Rolle und ist über das Fas/FasL-System an der Apoptose der Keimzellen beteiligt. Dies zeigt sich im Verlauf der EAO durch eine vermehrte Anzahl apoptotischer Keimzellen mit positivem TNF- α -Rezeptor (Guazzone *et al*, 2009). Im Gegensatz zu IL-6 und TNF- α , die erst im chronischen Verlauf der EAO vermehrt nachgewiesen werden können, zeigt sich bei IFN- γ bereits ein früher Anstieg in Makrophagen. Neben antiviralen Funktionen führt IFN- γ zu einer vermehrten Expression von MHC-II-Molekülen auf Sertoli-Zellen und damit möglicherweise zu einer verminderten lokalen Immunantwort (Guazzone *et al*, 2009).

1.3 Infertilität

Infertilität ist definiert als „ungewollte Kinderlosigkeit eines Paares über 12 Monate trotz regelmäßiger ungeschützter Kohabitationen“ (Haag *et al*, 2007).

Sie stellt mit einer Häufigkeit von 15% (Niederberger *et al*, 1997) ein bedeutendes medizinisches und, aufgrund der teuren Verfahren zur assistierten Reproduktion, auch sozioökonomisches Problem dar. Die Ursachen liegen mit jeweils 40% zu gleichen Teilen bei Mann und Frau, wobei in 20% der Fälle beide Partner betroffen sind oder die Ursache nicht ermittelt werden kann (Haag *et al*, 2007).

Die Ätiologie der männlichen Unfruchtbarkeit ist vielfältig, jedoch kann die genaue Ursache zumeist nicht nachgewiesen werden und wird dann als idiopathische Sterilität bezeichnet. Die häufigsten primären Diagnosen sind die Varikozele, Infektionen, sowie die Unterfunktion (Hypogonadismus) und Lageanomalien (Kryptorchismus) der Hoden. Auch autoimmunologische Ursachen wie beispielsweise Antikörper gegen Spermien können eine Rolle spielen (Nieschlag, 1997). Eine Übersicht über die Ätiologie der Unfruchtbarkeit beim Mann zeigt Abb. 1-3.

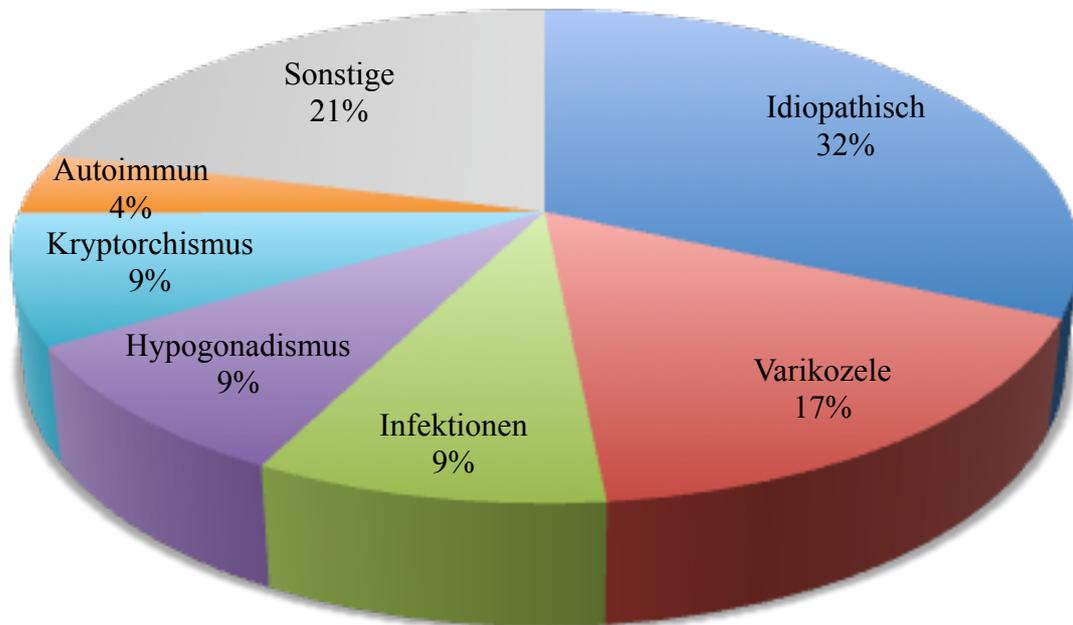


Abb. 1-3 Ursachen männlicher Unfruchtbarkeit nach Nieschlag, 1997.

Aufgrund der hohen Zahl an unklaren Ursachen sind die therapeutischen Möglichkeiten zur Behandlung männlicher Infertilität limitiert. Ein weiteres Problem besteht darin, dass Infektionen des männlichen Urogenitaltrakts lange Zeit asymptomatisch bleiben können, was die Diagnosestellung und damit den Therapiebeginn weiter hinauszögert und so zu einem chronischen Zustand führen kann (Schuppe *et al*, 2008).

1.4 Proteinase-aktivierte Rezeptoren (PAR)

1.4.1 Struktur und Aktivierung

PAR₁ - PAR₄ gehören zu einer Gruppe G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, die sich durch einen speziellen Aktivierungsmechanismus auszeichnen. Die proteolytische Spaltung des extrazellulären N-Terminus durch Serinproteasen führt zur Exposition eines verkürzten N-Terminus, der als gebundener (sog. tethered) Ligand nach Konformationsänderung an eine extrazelluläre Domäne des Rezeptors bindet und diesen aktiviert (s. Abb. 1-4). Ligand und Rezeptor sind folglich Teil desselben Moleküls (Déry *et al*, 1998; Steinhoff *et al*, 2005).

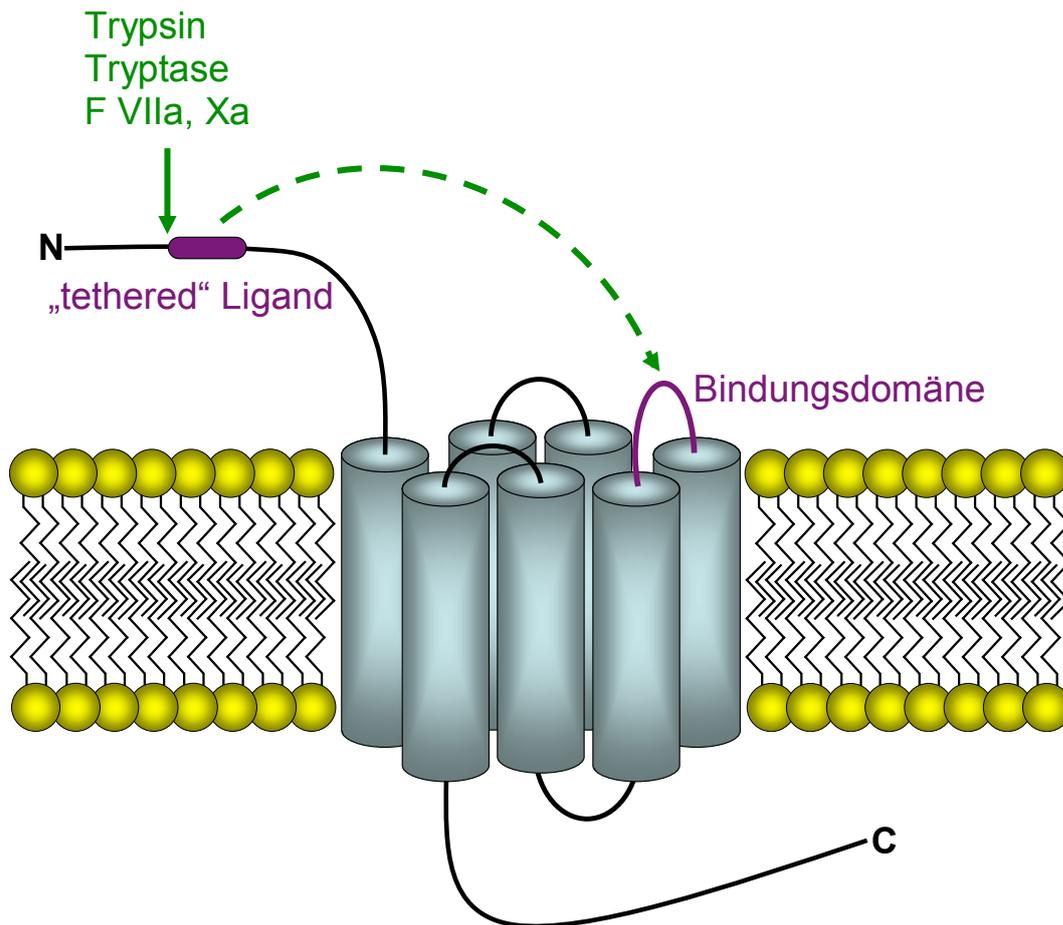


Abb. 1-4 Enzymatische Aktivierung von PAR₂. Die proteolytische Spaltung (durchgezogener Pfeil) legt einen vorher kryptischen N-Terminus frei, der als „tethered“ Ligand mit dem konservierten zweiten extrazellulären Loop (Bindungsdomäne) interagiert (unterbrochener Pfeil) und auf diese Weise den Rezeptor aktiviert (nach Steinhoff *et al*, 2005).

Daneben kann PAR₂ auch nicht-enzymatisch durch synthetisch hergestellte Peptide aktiviert werden. Diese aus nur wenigen Aminosäuren bestehenden Proteine, basierend auf der Sequenz des autogenen Liganden, bewirken eine direkte Aktivierung durch Bindung, ohne dass vorher eine Spaltung nötig wäre.

1.4.2 PAR₂ und Inflammation

Die Aktivierung der PARs erfolgt durch die Serin-Proteasen Thrombin, Trypsin, Tryptase, Gerinnungsfaktor VIIIa und Xa sowie Cathepsin. Diese werden im Rahmen entzündlicher Prozesse und Zerstörung freigesetzt und führen zu einer PAR-vermittelten Schmerz- und Entzündungsreaktion (Cottrell *et al*, 2003). PAR₁, PAR₃ und

PAR₄ werden hierbei vorwiegend von Thrombin, Trypsin oder Cathepsin aktiviert, PAR₂ hingegen zeigt keine Reaktion auf Thrombin. Dagegen stellt Tryptase einen starken PAR₂ Aktivator dar, welcher bei akuter Entzündung von Mastzellen sezerniert wird. Des Weiteren führen Trypsin, Faktor Xa, Acrosin und neuronale Serinproteasen zu einer PAR₂-Aktivierung (Steinhoff *et al*, 2005).

PAR₂ wurde in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen, unter anderem in Leber, Niere, Pankreas und Hoden (Nystedt *et al*, 1995) sowie in einer Reihe von Zellen, welche eine Rolle in der Vermittlung der Immunantwort spielen wie Endothelzellen, Makrophagen, Granulozyten und T-Lymphozyten (Nystedt *et al*, 1996; Déry *et al*, 1998). Proinflammatorische Entzündungsmediatoren wie TNF- α , IL-1 α und LPS führen hierbei zu einer vermehrten Expression von PAR₂ (Cottrell *et al*, 2003).

Die Stimulation von PAR₂ bewirkt *in vitro* eine gesteigerte Migration neutrophiler Granulozyten und die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und IL-8 (Shpacovitch *et al*, 2004). Im Rahmen allergisch-entzündlicher Reaktionen kommt es zu einer PAR₂-vermittelten Degranulation eosinophiler Granulozyten und Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren (Miike *et al*, 2001). Insgesamt führt die Aktivierung von PAR₂ zu einer lokalen Hyperämie, Vasodilatation und Ödembildung. Außerdem kommt es in Nervenzellen zu einer vermehrten Freisetzung von Substanz P und damit verbundenen Vermittlung von Schmerz (Cottrell *et al*, 2003).

1.4.3 PAR₂ im Hoden

Im Hoden wurde PAR₂ zunächst im Keimepithel nachgewiesen, nicht jedoch in Sertoli- und Leydig-Zellen (D'Andrea *et al*, 1998). Außerdem fand man PAR₂ in der Akrosomenmembran sowie der Plasmamembran menschlicher Spermatozoen. Nach Aktivierung durch die im weiblichen Genitaltrakt vorhandene Tryptase kommt es hier zu einer Herabsetzung der Spermienmotilität (Weidinger *et al*, 2003). Ferner führt die PAR₂-Aktivierung durch Mastzell-Tryptase innerhalb des Hodens durch Proliferation von Peritubulärzellen zu einer Fibrosierung der Tubuli seminiferi. Hierdurch bedingt kommt es zu einer Verminderung der Fertilität (Frungieri *et al*, 2002). Im Rahmen der EAO zeigt sich eine erhöhte Anzahl PAR₂-positiver Makrophagen und Peritubulärzellen, vorwiegend in und um Granulome orientiert (Iosub *et al*, 2006).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Obwohl MIF zu den ersten entdeckten Zytokinen gehört, sind trotz erkennbarer Fortschritte in der Beteiligung an verschiedenen Krankheiten noch viele Fragen hinsichtlich der zellulären Verteilung, Funktion, Regulation und Inhibition ungeklärt. Vor allem innerhalb der letzten Dekade trat die Inhibition von MIF als Therapiemöglichkeit bei entzündlich bedingten Erkrankungen in den Vordergrund. Durch eine Vielzahl verfügbarer MIF-Inhibitoren und neutralisierender Antikörper ist es heutzutage zumindest tierexperimentell möglich, den Krankheitsverlauf verschiedener chronisch-entzündlicher Erkrankungen positiv zu beeinflussen. Obwohl MIF bereits vor mehr als fünfzehn Jahren erstmals im Hoden nachgewiesen wurde, gibt es bisher noch keine Kenntnisse über dessen Funktion bei entzündlichen Erkrankungen des Hodens.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, wie MIF in der akuten und chronischen Orchitis reguliert wird, um die Rolle des Zytokins in der physiologischen und entzündlich-pathologischen Funktion der männlichen Gonade besser verstehen zu können. Hiermit sollen auch erste Erkenntnisse gesammelt werden, die als Ansatzpunkte zur Behandlung von Orchitiden dienen und somit zur kausalen Behandlung einer häufigen Ursachen für Fruchtbarkeitseinschränkungen beim Mann beitragen können.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Blot-Kammer	Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Direct-Q™ Reinstwasseraufbereitungssystem	Millipore Corporation	Billerica (USA)
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging	Carl Zeiss MicroImaging GmbH	Göttingen
Gel Jet Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH	Göttingen
Gelelektrophorese Zubehör	Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Heizblock DRI Block DB2A	Techne AG	Jansddorf
Heizblock HB 120 Thermolader	UniEquip GmbH	Martinsried
Homogenisator MM300	Retsch Technology GmbH	Haan
iCycler	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Kryostat CM 1900	Leica	Wetzlar
Molecular Imager ChemiDoc XRS System	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
MS2 Minishaker	IKA® Werke GmbH & Co. KG	Staufen
Orbitalschüttler 3017	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH	Burgwedel
PCR-Maschine Primus 96 advanced	Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen
PCR-Maschine PTC 200	Biozym Gesellschaft für Enzymtechnologie mbH	Hamburg
PerfectBlue Breitformat-Gelsystem	Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen
PerfectBlue Doppelgelsystem Twin L	Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen
PerfectBlue Gelsystem Mini S/M	Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen
pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG	Berlin
Potter S Gewebshomogenisator	B. Braun Melsungen AG	Melsungen

Quecksilberdampfcurzbogenlampe ebq 100	Leistungselektronik Jena GmbH	Jena
Reference-Pipetten	Eppendorf AG	Hamburg
Research-Pipetten	Eppendorf AG	Hamburg
Sonopuls Ultraschall-Homogenisator	Bandelin electronic GmbH & Co. KG	Berlin
Tischzentrifuge MC 6	Sarstedt AG & Co	Nümbrecht
Ultrospec 2100 pro Spektralphotometer	Amersham Biosciences Europe GmbH	Freiburg
UV-Systeme	Intas Science Imaging Instruments GmbH	Göttingen
X Cell Sure Lock Electrophoresis Cell	Invitrogen GmbH	Karlsruhe
Zentrifuge Heraeus® Biofuge fresco	Kendro Laboratory Products GmbH	Langenselbold

2.1.2 Reagenzien

0.24 - 9.5kb RNA-Marker	Invitrogen GmbH	Karlsruhe
100bp DNA-Marker	Promega	Madison (USA)
Aceton reinst	Merck KGaA	Darmstadt
Agarose	Invitrogen GmbH	Karlsruhe
Amino-n-Caprinsäure (= 6-Aminohexansäure)	Sigma-Aldrich Co.	Steinheim
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Co.	Steinheim
Ampuwa®	Fresenius Kabi Deutschland GmbH	Bad Homburg
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG	Melsungen
β-Mercaptoethanol	AppliChem GmbH	Darmstadt
Blotting Grade Blocker	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
CertiPUR Pufferlösungen (pH 4,7/9)	Merck KGaA	Darmstadt
Chloroform	Merck KGaA	Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Dulbecco's PBS (1×, steril)	PAA Laboratories GmbH	Pasching (A)
Essigsäure (Eisessig)	Merck KGaA	Darmstadt
Ethanol	Sigma-Aldrich Co.	Steinheim
Ethidiumbromidlösung	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Formaldehyd	Merck KGaA	Darmstadt
G138i Developer/Replenisher	Agfa Deutschland Vertriebsgesellschaft mbH & Cie. KG	Köln

G334i Rapid Fixer	Agfa Deutschland Vertriebsgesellschaft mbH & Cie. KG	Köln
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Isofluran	Baxter	Unterschleißheim
Isopentan (2-Methylbutan)	Sigma-Aldrich Co.	Steinheim
Isopropanol (2-Propanol)	Sigma-Aldrich Co.	Steinheim
di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Merck KGaA	Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA	Darmstadt
Magnesiumchloridlösung	Promega	Madison (USA)
Methanol	Sigma-Aldrich Co.	Steinheim
M-MLV RT 5× Reaktionspuffer	Promega	Madison (USA)
Morpholinethansulfonsäure (MES)	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich Co.	Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich Co.	Steinheim
Oligo (dT)15 Primer	Promega	Madison (USA)
PCR Nukleotid Mix	Promega	Madison (USA)
Pikrinsäure krist., reinst	Merck KGaA	Darmstadt
Ponceau S	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Protease-Inhibitor	Laborintern	
Rekombinanter RNasin® Ribonuklease Inhibitor	Promega	Madison (USA)
Roti®-Phenol/Chloroform	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Sodium n-Dodecyl Sulfat (SDS)	Merck KGaA	Darmstadt
iQ™ SYBR®Green Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Taq DNA Polymerase 10×Puffer mit 15mM MgCl ₂	Laborintern	
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg
Thermophiler DNA Polymerase 10×Puffer, Mg-frei	Promega	Madison (USA)
Trichloressigsäure, 20%	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Co.	Steinheim
Trizol®	Invitrogen GmbH	Karlsruhe

Tween 20	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30% (H ₂ O ₂)	Merck KGaA	Darmstadt

2.1.3 Enzyme

DNase I, RNase-frei	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim
M-MLV Reverse Transkriptase RNase H Minus, Punktmutante	Promega	Madison (USA)
Taq DNA Polymerase	Promega	Madison (USA)

2.1.4 Versuchsmaterial

Blotting Papier GB005	Whatman GmbH	Dassel
Chromatographiepapier MN214	Machery-Nagel GmbH & Co. KG	Düren
Deckgläser (24×60mm, Glasdicke 0,13-0,17mm)	R.Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik	Teningen
ECL Western blotting detection reagents and analysis system	Amersham Biosciences Europe GmbH	Freiburg
Faltenfilter	Whatman GmbH	Dassel
Hybond ECL Nitrozellulose Membran	Amersham Biosciences Europe GmbH	Freiburg
MILLEX®GP Syringe Driven Filter Unit 0,22µm	Millipore Corporation	Billerica (USA)
MultiMark Multi-Colored Standard	Invitrogen GmbH	Karlsruhe
NuPAGE® Antioxidanz	Invitrogen GmbH	Karlsruhe
NuPAGE® Novex Bis-Tris Gels	Invitrogen GmbH	Karlsruhe
Objektträger (25×75×1mm)	R.Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik	Teningen
Precellys-Keramik-Kit 2,8mm	Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Reaktionsgefäße PP, 0,2ml	Nerbe Plus GmbH	Winsen/Luhe
Tissue-Tek®	Sakura Finetek Europe B.V.	Zoeterwoude (NL)
Unstained SDS PAGE Protein Marker 6.5 – 200 kDa, Liquid Mix	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg
VECTASHIELD® Mounting Medium mit DAPI	Vector Laboratories	Burlingame (USA)

2.1.5 Puffer und Lösungen

- 50×TAE (1l)

242g	TRIS
57,1ml	Essigsäure
100ml	0,5M EDTA (pH 8,0)

- 10×MOPS-Puffer (pH 7,0)

0,2M	MOPS
50mM	Natriumacetat (wasserfrei)
10mM	EDTA (pH 8,0)

- 10× Elektrophoresepuffer (1l)

144g	Glycin
30,03g	Tris
10g	SDS

- 10× PBS (1l, pH 7,4)

87,6g	NaCl
22,8g	K ₂ HPO ₄
6,8g	KH ₂ PO ₄

- PBS-Tween (0,1%)

999ml	1×PBS
1ml	Tween

- Blocking-Lösung (5% MIPU, 100ml)

5g	Non-FatDryMilk
----	----------------

in PBS-Tween

- Kathodenpuffer (500ml)

40mM	Amino-n-Caprinsäure
25mM	TRIS (pH 9,4)
20% (v/v)	Methanol

- Anodenpuffer (500ml)

30mM	TRIS (pH 10,4)
20% (v/v)	Methanol

- Konzentrierter Anodenpuffer (500ml)

300mM	TRIS (pH 10,4)
20% (v/v)	Methanol

- Ponceau-Färbelösung

3% (v/v)	Trichloressigsäure
0,2% (w/v)	Ponceau S

- 20× MES-SDS-Puffer (200ml)

39,04g	MES
24,24g	TRIS
4g	SDS
1,2g	EDTA

- PBS (5l, pH 7,4)

28,75ml	0,2M NaH ₂ PO ₄ × 2 H ₂ O
96,20ml	0,2M Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O
22,4g	NaCl

- PBS+S (5l, pH 7,4)

28,75ml	0,2M NaH ₂ PO ₄ × 2 H ₂ O
96,20ml	0,2M Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O
44,8g	NaCl

- Zamboni-Fixativ (1l)

2% (v/v)	Formaldehyd
0,1M	Phosphatpuffer
15% (v/v)	Pikrinsäure (2-fach gefiltert)

- Absättigungslösung für Zamboni-Fixierung

10% (v/v)	NSS in PBS
0,5% (v/v)	Tween
0,1% (v/v)	BSA

- Absättigungslösung für Aceton-Fixierung

50% (v/v)	Horse-Serum
-----------	-------------

- Absättigungslösung für Isopropanol-Fixierung

3% (v/v)	BSA in PBS
5% (v/v)	Horse-Serum

- Phosphatpuffer (0,2M, pH 7,4)

31,2g	NaH ₂ PO ₄ × 2 H ₂ O (1l)	{Lsg.A}
35,6g	Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O (1l)	{Lsg.B}
230ml	Lsg.A	
770ml	Lsg.B	

- Fixationslösung (pH 7,2-7,4)

4% (w/v)	Paraformaldehyd
0,1M	Phosphatpuffer

- gepuffertes Glycerol (pH 8,6)

1,5M	Na ₂ CO ₃
1,5M	NaHCO ₃

in Glycerol (wasserfrei)

- 10×Reaktionspuffer mit 15mM MgCl₂ (steril filtriert)

100mM	Tris-HCl (pH 9,0)
500mM	KCl
15mM	MgCl ₂
1%	Triton®X-100

- 10×DNase-Reaktionspuffer

0,1M	TRIS (pH 8,3)
0,5M	KCl
15mM	MgCl ₂

- 10×DNA-Probenpuffer I

0,4% (w/v)	Xylen
0,4% (w/v)	Bromphenol
50% (v/v)	Glycerol in H ₂ O

- 10×DNA-Probenpuffer II

0,4% (w/v)	Xylen
50% (v/v)	Glycerol in H ₂ O

- RNA-Probenpuffer

750µl	Formamid
150µl	10xMOPS-Puffer
250µl	Formaldehyd
100µl	H ₂ O (steril)
100µl	Glycerin
80µl	1% Bromphenolblau

- 100bp DNA-Marker (pro lane)

5µl	100bp DNA-Marker
4µl	Aqua ad iniectabilia
1µl	10xDNA-Probenpuffer I

- RNA-Marker

3µl	RNA-Marker
2µl	Aqua ad iniectabilia
20µl	RNA-Probenpuffer

2.1.6 Antikörper

Kaninchen Anti-Ratten-MIF	Laborintern hergestellt	
Ziege Anti-Kaninchen-IgG, POD-konjugiert	ICN Pharmaceuticals Germany GmbH	Frankfurt
Monoklonaler Anti-β-actin, Clone AC-15	Sigma-Aldrich Co.	Steinheim
Ziege Anti-Maus-IgG, POD-konjugiert	Sigma-Aldrich Co.	Steinheim
Esel Anti-Kaninchen-IgG, Cy3-konjugiert	Chemicon	Hampshire (GB)
Esel Anti-Maus-IgG, FITC-konjugiert	Dianova	Hampshire (GB)
Maus Anti-Ratten-Makrophagen (ED1)	Serotec Ltd	Oxford (GB)
Maus Anti-Ratten-Makrophagen (ED2)	Serotec Ltd	Oxford (GB)

2.1.7 Primer

Gen	Sequenz	Annealing- Temperatur	Fragment- größe	Gene- Accession- Number
MIF	5'- GTG CCA GAG GGG TTT CTC TC -3'	61,4°C	198 bp	NM_031051
	5'- CAG CAG CTT GCT GTA GTT GC -3'	59,4°C		
GAPDH	5'- CAT TGT TGC CAT CAA CGA CC -3'	57,3°C	320 bp	NM_017008
	5'- TCA CAC CCA TCA CAA ACA TG -3'	55,3°C		

β-actin	5'- ATG GTG GGT	57,3°C	232 bp	NM_031144
	ATG GGT CAG AA -3'			
	5'- GGG TCA TCT	57,3°C		
	TTT CAC GGT TG -3'			

2.1.8 Versuchstiere

Für alle Experimente wurden männliche Wistar-Ratten von Charles River, Sulzfeld, verwendet. Die Organentnahme und Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt (Aktenzeichen VI 63 – 19 c 20/15 c GI 20/23, V 54 – 19 c 20/15 c GI 20/23).

Die Induktion der EAO erfolgte durch Immunisierung mit einer Kombination aus syngemem Hodenhomogenat und Freund's Adjuvans an den Tagen 0, 14 und 28 subkutan im Bereich der hinteren Fußsohlen sowie intradermal an mehreren Stellen des Rückens. Zusätzlich zu den Injektionen an den Tagen 0 und 14 wurden 10^{10} Zellen inaktiver Bordetella pertussis Bakterien intravenös verabreicht. Nach der dritten Immunisierung wurden 5×10^9 Bakterien intraperitoneal appliziert. In der Adjuvans-Kontrollgruppe erfolgten die Immunisierungen lediglich mit Adjuvans und Bordetella pertussis, jedoch ohne Hodenhomogenat. 50 bzw. 80 Tage nach erster Immunisierung wurden die Tiere mit einer Überdosis Isofluran getötet und die Hoden steril entnommen (Fijak *et al*, 2005; Iosub *et al*, 2006).

Zur PAR₂-Aktivierung wurde mit Heparin versetzte rekombinante Tryptase beidseits unter die Hodenkapsel injiziert. Für die Kontrollgruppen wurde entweder Kochsalz, Heparin, oder Heparin mit inaktiver Tryptase verwendet. Nach fünf Stunden wurden die Tiere getötet und die Hoden entnommen. Für die RNA-Isolierung wurde ausschließlich Gewebe im Bereich der Injektionsstelle verwendet (Iosub *et al*, 2006).

2.1.9 Programme

Axio Vision

Chemi Doc XRS

Gimp 2.2.13

Origin Pro 7.5 SR6

Quantity One V.4.4.0

2.2 Methoden

2.2.1 Gewebepräparation und Probenvorbereitung

2.2.1.1 Entnahme der Hoden

Zur Hodengewinnung der Kontrollgruppe wurden etwa 7 Wochen alte männliche Wistar-Ratten verwendet. Den Tieren wurden nach einer Überdosis Isofluran und Eintritt des Todes die Hoden unter sterilen Bedingungen entfernt, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Fragmente der Hodenkapsel oder des Nebenhodens an dem Präparat verblieben. Danach wurde das entnommene Gewebe in Stickstoff-gekühltes Isopentan getaucht und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die weitere Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

2.2.1.2 Herstellung von Hodenhomogenat

Die entnommenen Hoden wurden zunächst in flüssigen Stickstoff überführt und anschließend bei Raumtemperatur etwa 40mg schwere Fragmente mit Hilfe eines Skalpell abgetrennt. Nach Zugabe von 50µl sterilem PBS wurde jedes Fragment auf Eis mit einem Gewebshomogenisator (Potter S) für mehrere Minuten bei 700-1000rpm homogenisiert. Währenddessen wurden insgesamt 150µl steriles PBS hinzugefügt. Waren nach dem Homogenisieren noch solide Fragmente sichtbar, so wurden diese aus dem Probengefäß entfernt. Anschließend wurde den Proben sofort 0,5µl Protease-Inhibitor zugesetzt. Im folgenden Schritt wurden die Proben bei 4°C und 4000rpm für 10min zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde abpipettiert und in einem neuen Reaktionsgefäß nochmals 10min zentrifugiert, das Sediment verworfen. Nach dem zweiten Durchgang wurde abermals der Überstand abgenommen und als fertiges Hodenhomogenat bei -20°C gelagert.

2.2.1.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der Proben erfolgte mit Hilfe der Methode nach Bradford (1976). Diese beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 nach Proteinbindung in saurer Lösung von 465nm auf

595nm. Diese Änderung wurde photometrisch bestimmt. Als Proteinstandard wurde in 0,1M NaOH gelöstes Ovalbumin verwendet.

1ml Farbreagenz wurde in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 20µl Probelösung vermischt. Als Leerwert diente ein Ansatz mit 20µl PBS. Nach 8min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595nm photometrisch gemessen. Anhand der Eichkurve konnte aus der Extinktion die Proteinkonzentration der Probelösung ermittelt werden.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die ersten Experimente wurden mit selbst hergestellten SDS-Gelen durchgeführt, die jedoch auch nach weiterer Versuchsoptimierung nur eine mangelhafte Proteinauftrennung im niedermolekularen Bereich lieferten. Daher wurden für alle folgenden Versuchsreihen Bis-Tris-Fertiggele verwendet (siehe 2.2.2.2).

Die zu untersuchenden Proben wurden mit 1× Auftragspuffer (62,5mM TRIS-HCl, pH 6,8; 2% SDS; 5% Glycerol; 0,3% Bromophenolblau; 0,9% (v/v) β-Mercaptoethanol) versetzt und anschließend für 6 min bei 96°C denaturiert. Als Molekulargewichtsmarker diente der MultiMark Multi-Colored Standard.

2.2.2.2 NuPAGE® Novex Bis-Tris Gelelektrophorese mit Fertiggelen

Es wurden Bis-Tris-HCl-gepufferte Polyacrylamidgele (pH 6,4) mit einem Acrylamidgradienten von 4-12% im Trenngel verwendet. Nach dem Einspannen der Gele in die Elektrophoresekammer wurden die Kammern mit MES-SDS-Puffer gefüllt, wobei in die innere Kammer zusätzlich 500µl Anti-Oxidationsmittel pipettiert wurden. Anschließend wurden die Auftragstaschen vorsichtig mit Hilfe einer Spritze gespült und gereinigt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei pH 7 und konstant 200V für etwa 40 min.

2.2.2.3 Western-Blot

Die Western-Blot-Analyse wurde mittels Semi-dry-Blot-Technik in einer Horizontal-Blotkammer durchgeführt. Als Trägermatrix diente eine Nitrozellulosemembran mit

einer Porengröße von 0,2µm. Nacheinander wurden folgende Komponenten übereinander in die Blotkammer gelegt:

- 4 Lagen Filterpapier, getränkt in konzentriertem Anodenpuffer
- 4 Lagen Filterpapier, getränkt in Anodenpuffer
- Nitrozellulosemembran, getränkt in Anodenpuffer
- Gel, getränkt in Kathodenpuffer
- 4 Lagen Filterpapier, getränkt in Kathodenpuffer

Beim Versuchsaufbau wurde darauf geachtet, dass sich zwischen dem Filterpapier keine Luftblasen bildeten. Das Blotten erfolgte bei konstant 100mA pro Gel und Membran für 90min.

2.2.2.4 Ponceau-S-Färbung

Um die Vollständigkeit der Proteinübertragung auf die Nitrozellulosemembran zu überprüfen, wurde diese nach dem Blotten für etwa 2min mit Ponceau-S-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran mehrmals mit Aqua dest gespült und die angefärbten Proteinbanden optisch beurteilt. Nachdem die Membran schließlich 3×5min mit PBS-Tween gewaschen wurde, konnte mit der Immunoblot-Analyse begonnen werden.

2.2.2.5 Immunoblot-Analyse

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Kaninchen Anti-Ratten-MIF	1:20.000	Ziege Anti-Kaninchen-IgG, POD-konjugiert	1:10.000
Monoklonaler Anti- β-actin, Clone AC-15	1:5.000 - 1:10.000	Ziege Anti-Maus-IgG, POD- konjugiert	1:3.000

Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Orbitalschüttler mit Blocking-Lösung belassen. Danach wurde die Membran mit dem in Blocking-Lösung verdünnten Primärantikörper über Nacht bewegungsfrei bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3×10min Waschen mit PBS-Tween am nächsten Tag wurde die Membran mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper, der gegen den Fc-Teil des Erstantikörpers gerichtet ist, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Auch dieser Antikörper wurde mit Blocking-Lösung verdünnt. Vor Sichtbarmachung der Immunkomplexe mittels Enhanced Chemiluminescence (ECL) wurde die Membran abermals für 3×10min mit PBS-Tween

gewaschen. Anschließend wurden die ECL-Reagenzien 1:1 (v/v) gemischt, auf die Membran pipettiert und für 60s im Dunkeln inkubiert. Darauf folgte die Erfassung und Quantifizierung mittels ChemiDoc XRS.

Zur Darstellung der internen Auftragskontrolle β -actin wurde die Membran anschließend für eine Stunde bewegungsfrei mit dem Primärantikörper inkubiert und nach dem Waschen für eine weitere Stunde mit dem Sekundärantikörper versehen. Die Quantifizierung erfolgte ebenfalls mit dem ChemiDoc XRS.

2.2.3 Morphologische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Kryostatschnitten

Das folgende Procedere wurde in verschiedenen Abwandlungen durchgeführt, um die Versuchsbedingungen zu optimieren. Hierbei wurden mehrere Fixative wie Zamboni, Aceton, Methanol und Isopropanol getestet. Da Isopropanol die besten Ergebnisse lieferte, wurde es für alle weiteren Versuche verwendet. Ebenso wurden die Antikörperkonzentrationen in mehreren Vorversuchsreihen variiert, um unspezifische Bindungen und somit eine verstärkte Hintergrundfärbung zu minimieren und die Ergebnisse möglichst deutlich darstellen zu können. Im Folgenden sind lediglich die für die Auswertung relevanten Versuchsbedingungen aufgeführt.

In Tissue-Tek fixierte Hoden wurden bei -20°C in Kryosektionen von $10\mu\text{m}$ Schichtdicke geschnitten und auf einen Objektträger aufgebracht. Danach wurden die Schnitte für 10min in -20°C kaltem Isopropanol fixiert und anschließend je 10min mit PBS und Aqua dest gewaschen. Nachdem die Objektträger getrocknet waren, erfolgte zur Blockierung unspezifischer Bindungen die Inkubation mit Absättigungslösung für 1h bei Raumtemperatur.

2.2.3.2 Immunfluoreszenz

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Kaninchen Anti-Ratten-MIF	1:5.000	Esel Anti-Kaninchen-IgG, Cy3-konjugiert	1:2.000
Maus Anti-Ratten- Makrophagen (ED1)	1:500	Esel Anti-Maus-IgG, FITC-konjugiert	1:100
Maus Anti-Ratten- Makrophagen (ED2)	1:500	Esel Anti-Maus-IgG, FITC-konjugiert	1:100

Anschließend wurden die Objektträger mit dem in PBS verdünnten Primärantikörper überschichtet und über Nacht bewegungsfrei und lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger zweimal für je 10min im Dunkeln mit PBS gewaschen und danach der Sekundärantikörper aufgetragen und für 1h inkubiert. Nach zwei erneuten Waschvorgängen erfolgte die Nachfixation der Gewebeschnitte mit PFA 4% im Dunkeln, wodurch die Bindung der Antikörper verstärkt und die Qualität der Immunfluoreszenz verbessert wurde. Anschließend wurden die Objektträger nach nochmaligem Waschen für zweimal 10min mit DAPI-enthaltendem Medium eingedeckelt. DAPI bildet Komplexe mit der DNA und ermöglicht so die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Zellkerne.

Die Lagerung der fertigen Objektträger erfolgte lichtgeschützt bei 4°C. Die Auswertung konnte nach etwa einer Stunde begonnen werden und wurde mittels eines Fluoreszenzmikroskops durchgeführt, wobei die Ergebnisse fotografisch dokumentiert wurden.

2.2.3.3 Doppelimmunfluoreszenz

Im Gegensatz zur einfachen Antikörper-Inkubation wurden bei der Mehrfach-Immunfluoreszenz die Kryostatschnitte mit zwei (oder drei) Primärantikörpern gleichzeitig inkubiert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Antikörper von unterschiedlichen Spezies stammen, um eine Kreuzreaktion der Zweitantikörper auszuschließen. Die jeweiligen Verdünnungen wurden beibehalten und auch die Inkubationszeiten nicht verändert. Die jeweiligen Sekundärantikörper wurden ebenfalls zusammen aufgetragen.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus Hodengewebe erfolgte nach der Trizol-Methode. Hierbei wurden 100mg Hoden mit 1ml Trizol und zwei Keramikkügelchen für 3min und einer Frequenz von 30/s homogenisiert. Das Homogenisat wurde 5min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend 200µl Phenolchloroform dazu pipettiert und für 20s gevortext. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000rpm und 4°C für 10min, woraufhin drei

Phasen zu erkennen waren: Eine obere, klare, wässrige Phase, welche die RNA enthielt, eine mittlere, weißliche Phase mit Proteinen, sowie eine untere rötliche Phase mit DNA. Die obere Phase mit der darin enthaltenen RNA wurde vorsichtig abpipettiert und mit ca. 200µl Chloroform gut vermischt und erneut für 10min bei 13.000rpm und 4°C zentrifugiert. Danach wurde abermals die RNA-Phase abgenommen und mit ca. 500µl Chloroform vermischt und noch einmal zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase in einem Reaktionsgefäß mit 100% Isopropanol vermischt und der Ansatz für 30min bei Raumtemperatur gefällt. Nach dem erneuten Zentrifugieren für 30min mit 13.000rpm bei 4°C konnte der Überstand vorsichtig abgegossen und das Sediment mit 200µl eiskaltem, 70%igem Ethanol versetzt werden. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 6min, dann wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet im Reaktionsgefäß luftgetrocknet.

Schließlich wurden 50µl Aqua ad inj. und 0,5µl RNasin zugefügt und die Konzentration der RNA spektralphotometrisch bestimmt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

2.2.4.2 Spektralphotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Mit Hilfe eines Spektralphotometers lassen sich die Konzentration, sowie der Reinheitsgrad von RNA bestimmen. Gelöste RNA hat ihr Absorptionsmaximum bei $\lambda = 260\text{nm}$. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ($A = c \times d \times \epsilon$, wobei A die Absorption, c die Konzentration, d die Küvettendicke und ϵ den molaren Extinktionskoeffizienten darstellen) lässt sich die Konzentration der RNA berechnen. Die Bestimmung des Quotienten OD_{260}/OD_{280} (Extinktion bei 260nm bzw. 280nm) lässt auf den Reinheitsgrad der isolierten RNA schließen. Hierbei lässt ein Wert von 1,8 - 2,0 auf eine saubere RNA-Isolierung schließen, wohingegen Werte $< 1,8$ auf Verunreinigungen mit Proteinen hindeuten. Für die Messung wurde die RNA im Verhältnis 1:50 mit Aqua ad inj. verdünnt.

2.2.4.3 Reinigung der RNA von genomischer DNA

Um nach der Isolierung Verunreinigungen mit DNA zu eliminieren, wurde ein DNase-Verdau nach folgendem Schema durchgeführt:

X μ l	RNA (für 5 μ g)
3 μ l	10 \times DNase-Puffer
2,5 μ l	DNase I (10U/ μ l)
Y μ l	Aqua ad inj.
30 μ l	Endvolumen

Dieser Ansatz wurde zunächst 60min bei 37°C inkubiert, um die DNase zu aktivieren. Zur Inaktivierung der DNase wurden die Reaktionsgefäße anschließend für 10min bei 72°C inkubiert. Danach wurden die Proben für ca. 2min auf Eis überführt, anzentrifugiert und schließlich bei -80°C aufbewahrt.

Die Effizienz des DNase-Verdau wurde im Anschluss mittels einer GAPDH-PCR überprüft. Kam es zu keiner Amplifikation des sogenannten housekeeping Gens, so war die Reinigung vollständig. Da es bei zwei Proben noch zu einer geringen Amplifikation von GAPDH kam, wurde der DNase-Verdau wiederholt. Danach waren alle Proben frei von genomischer DNA.

2.2.4.4 Reverse Transkription

Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde die Reverse Transkriptase des Moloney-Leukämie-Virus der Maus (M-MLV) verwendet. Die cDNA wird hierbei als Matrize in der PCR verwendet, womit die Expression eines oder mehrerer Gene auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden kann.

15 μ l der Probe nach DNase-Verdau (entsprechend 2,5 μ g Total-RNA) wurden mit 2 μ l Oligo dT Primer und 5 μ l Aqua ad inj. für 10min bei 70°C denaturiert und auf Eis gesetzt. Dann wurde folgender Ansatz hinzugefügt:

8 μ l	5 \times M-MLV-Puffer
2 μ l	dNTPs (10mM)
1 μ l	RNasin (40U/ μ l)
7 μ l	Aqua ad inj.
18 μ l	Endvolumen

Der Gesamtansatz wurde für 2min bei 42°C vorgewärmt und dann 1 μ l M-MLV-Reverse Transkriptase (200U/ μ l) hinzugefügt. Zur Aktivierung wurde das Reaktionsgemisch für 50min bei 42°C inkubiert, bevor die reverse Transkriptase im Anschluss für 10min bei 70°C denaturiert wurde. Danach wurde das Reaktionsgefäß auf Eis überführt, kurz anzentrifugiert und die cDNA-Proben bei -20°C gelagert.

Zur Kontrolle des Vorgangs der reversen Transkription wurde eine GAPDH-PCR durchgeführt, wobei ein Nachweis von GAPDH den Erfolg der Umschreibung zeigte.

2.2.4.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur enzymatischen, exponentiellen Vervielfältigung (Amplifikation) einer bestimmten DNA-Sequenz, welche von zwei definierten Oligonukleotidabschnitten begrenzt wird. Primer lagern sich diesen Abschnitten auf der cDNA an und eine DNA-Polymerase verlängert diese unter Verwendung von dNTPs. Das Verfahren stellt ein zyklisches Vorgehen dar, welches durch Denaturierung und die erneute Anlagerung von Primern (Annealing) die Verlängerung (Elongation) des DNA-Fragments zur Folge hat.

Folgender Reaktionsansatz wurde hergestellt:

1µl	Template-cDNA
2,5µl	10× Reaktionspuffer
0,5µl	dNTPs (10mM)
1µl	MgCl ₂ (25mM)
0,25µl (0,5µl bei MIF)	3'-Primer (100pmol/µl)
0,25µl (0,5µl bei MIF)	5'-Primer (100pmol/µl)
0,2µl	Taq Polymerase (2,5U)
19,3µl (18,8µl bei MIF)	Aqua ad inj.
25µl	Endvolumen

Folgende Temperaturprofile wurden verwendet:

GAPDH und β-actin

95°C	2min	
95°C	40s	
55°C	30s	26-30 Zyklen
72°C	30s	
72°C	10min	

MIF

94°C	3min	
94°C	40s	
40°C	40s	35 Zyklen
72°C	40s	
94°C	40s	
72°C	10min	

2.2.4.6 *DNA-Agarose-Gelelektrophorese*

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde standardmäßig zur Auftrennung von DNA-Fragmenten im Anschluss an eine PCR durchgeführt. Hierbei wurden Gele in den Konzentrationen von 1% bis 2% verwendet. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose mit 1× TAE-Puffer vermischt und anschließend in der Mikrowelle erhitzt, so dass diese vollständig gelöst war. Nach Zugabe von Ethidiumbromid wurde das Gel in die mit einem Kamm vorbereitete Gelkammer gegossen. Innerhalb von etwa 45min war das Gel ausgehärtet, der Kamm konnte gezogen und das Gel in eine Elektrophoresekammer gesetzt werden. Als Laufpuffer diente ebenfalls 1× TAE.

Die zu analysierenden Proben wurden vor dem Einbringen in die Geltaschen mit 10% (v/v) DNA-Probenpuffer II versetzt. Als Standard wurde stets 100bp DNA-Marker verwendet.

Nach der Auftrennung bei 80V - 100V erfolgte die Dokumentation mit Hilfe des Gel Jet Imagers.

2.2.4.7 *Quantitative real time PCR (qPCR)*

Die real time PCR ist ein Verfahren zur Erfassung der Expression von Genen und deren Quantifizierung. Dabei wird ein Fluoreszenzfarbstoff wie zum Beispiel SYBR Green verwendet, der sich bei der Elongation der DNA-Fragmente in der kleinen Furche anlagert. Die Intensität der Fluoreszenz wird am Ende jedes Zyklus gemessen und steigt mit der Amplifikation der DNA an. Dabei zeigt sich initial eine langsame lineare Zunahme, gefolgt von einer exponentiellen Phase, die schließlich aufgrund der Limitation an PCR-Komponenten in eine Plateauphase übergeht.

Folgender Reaktionsansatz wurde hierbei verwendet, wobei der SYBR Green Supermix bereits Taq-Polymerase, Puffer, dNTPs sowie Fluorescein enthielt. Fluorescein dient dem internen Fluoreszenzabgleich des Geräts vor Beginn der Reaktion.

1,5µl	Template-cDNA
12,5µl	2× SYBR Green Supermix
0,5µl	3'-Primer (100pmol/µl)
0,5µl	5'-Primer (100pmol/µl)
10µl	Ampuwa
25µl	Endvolumen

Zur Quantifizierung wird ein Schwellenwert (Threshold) vor Beginn der exponentiellen Phase festgelegt. Der Schnittpunkt der einzelnen Graphen mit diesem Grenzwert gibt den Ct-Wert an, welcher die Anzahl der Zyklen bis zur Erreichung des Schwellenwertes darstellt. Die Ct-Werte sind ein Maß für die in der Probe enthaltene cDNA-Konzentration und können anschließend miteinander verglichen werden.

Nach Beendigung jeder qPCR wurde, zur Überprüfung, dass durch die Primer nur ein spezifisches Amplifikat gebildet wurde, eine Schmelzkurve erstellt. Hierbei wird kontinuierlich bei ansteigenden Temperaturen (T) von 50°C bis 100°C die Fluoreszenzintensität (F) aller Proben gemessen. Durch die Temperaturerhöhung bedingt denaturieren die Amplifikate und die Fluoreszenz nimmt ab. Trägt man $-dF/dT$ (delta = Ableitung) gegen T auf, so erhält man die Schmelzkurve. Bei Spezifität der Primer und damit Amplifikation nur eines Produktes zeigt die Schmelzkurve auch nur einen Scheitelpunkt. Durch die Überlagerung der Graphen verschiedener Proben kann man überprüfen, ob dasselbe PCR-Produkt amplifiziert wurde.

Da es sich bei den Versuchsproben um Material von verschiedenen Tieren handelt, ist es wichtig innerhalb des Experiments eine Kontrolle über den Gehalt an RNA zu haben, um fehlerhafte Aussagen durch eine Variation hierbei zu verhindern. Eine ideale Kontrolle sollte auf einem konstanten Niveau exprimiert werden und durch die experimentelle Behandlung der Probe unbeeinflusst bleiben. Die am häufigsten verwendeten internen Kontrollen sind GAPDH, β -actin und ribosomale RNA (rRNA). Sowohl GAPDH als auch β -actin wurden ausgetestet, wobei sich ähnliche Ergebnisse mit beiden internen Standards zeigten. Aufgrund konstanterer Resultate wurde in der endgültigen Versuchsreihe schließlich β -actin als Kontrolle verwendet.

Zur Überprüfung der Pippetiergenauigkeit wurden zusätzlich zu den in Doppelbestimmung durchgeführten Experimenten Verdünnungsreihen (1:1, 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000) durchgeführt. Zur Kontrolle der Amplifikation in der real time PCR wurde eine DNA-Agarose-Gelelektrophorese der Verdünnungsreihe durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

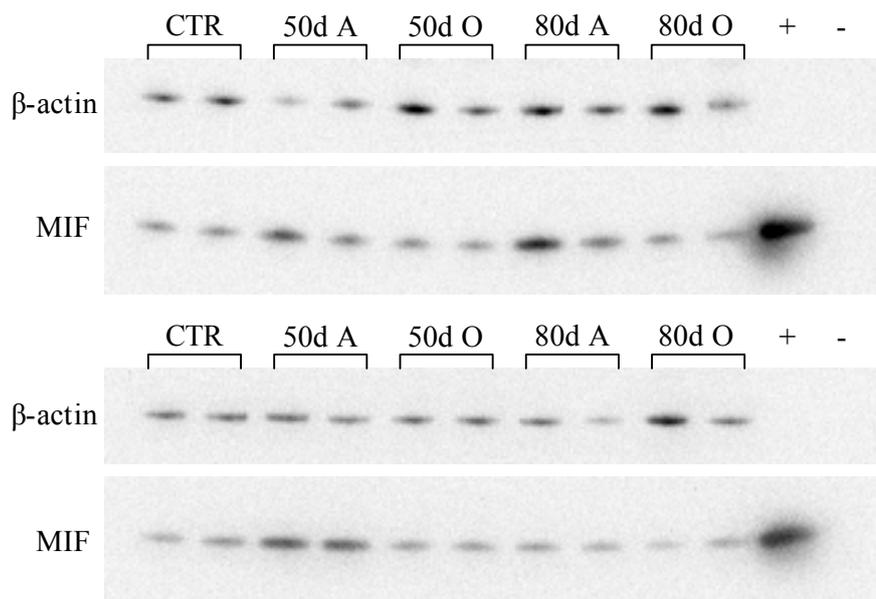
Für die im Folgenden aufgelisteten Abbildungen und Tabellen gelten bezüglich der untersuchten Versuchsgruppen nachstehende Abkürzungen:

CTR	Unbehandelte Kontrollhoden
50d A	Adjuvans-Hoden 50 Tage nach Behandlung
50d O	EAO-Hoden 50 Tage nach Induktion
80d A	Adjuvans-Hoden 80 Tage nach Behandlung
80d O	EAO-Hoden 80 Tage nach Induktion

Tab. 3-1 Verwendete Abkürzungen der untersuchten Versuchsgruppen.

3.1 Abnahme des Proteingehalts von MIF in experimenteller Autoimmunorchitis (EAO)

Nach Auswertung der Immunoblots für MIF und β -actin (siehe Abb. 3-1) mit ChemiDoc XRS erfolgte die Normalisierung der erhobenen Intensitäten. Hierzu wurden zunächst die Werte der β -actin-Kontrollen zur Probe CTR1 in Relation gesetzt. Danach konnten die MIF-Werte, normalisiert zur jeweiligen Ladungskontrolle, ermittelt werden.



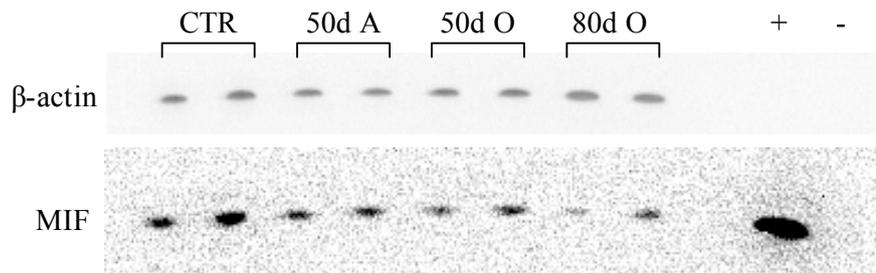


Abb. 3-1 Nachweis von MIF und β -actin mittels Immunoblot. Homogenat von unterschiedlichen Kontroll-, Adjuvans- und Orchitis-Hoden wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern für MIF und β -actin inkubiert. Durch die interne β -actin-Kontrolle festgestellte Ladungsunterschiede wurden bei der Auswertung berücksichtigt und in Bezug auf CTR1 normalisiert. Positivkontrolle rMIF.

Bei der Analyse ergeben sich Unterschiede des MIF-Gehalts zwischen Adjuvans- und Orchitisproben (Abb. 3-2). Überraschenderweise ist in EAO eine Abnahme von MIF im Vergleich zu den Adjuvans-Proben zu beobachten, wobei die Unterschiede bei 50 Tagen bereits deutlich, bei 80 Tagen signifikant sind (s. Abb. 3-2). Vergleicht man den MIF-Gehalt der beiden Orchitis-Gruppen miteinander, so ist eine Verringerung von 50 zu 80 Tagen erkennbar. Die unbehandelten Kontrollen zeigen zu den Adjuvans-Proben keine Unterschiede, vergleicht man sie jedoch mit 80d O, so fällt eine signifikante Verminderung des MIF-Anteils in Orchitis auf.

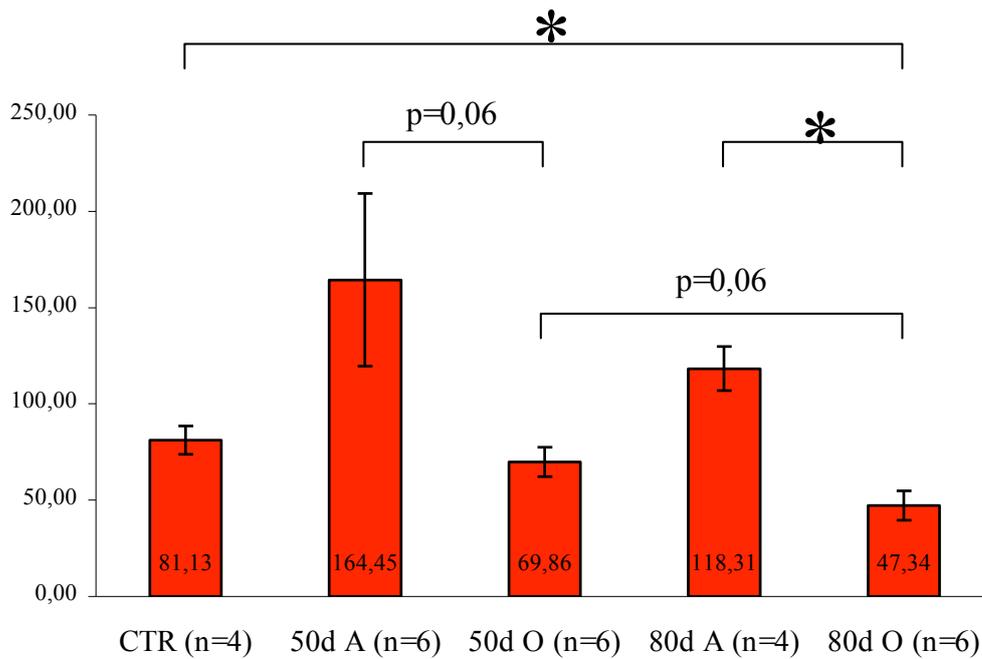


Abb. 3-2 Quantitative Analyse der MIF-Expression in Kontroll-, Adjuvans- und Orchitis-Hoden. Auswertung der Immunoblot-Ergebnisse. Im Vergleich zu den Adjuvans-Proben nimmt der MIF-Gehalt in Orchitis deutlich, bei 80 Tagen signifikant, ab. Ebenfalls signifikant ist die Verminderung von 80d O im Gegensatz zur Kontrollgruppe. Die Unterschiede zwischen 50 und 80 Tagen nach Orchitis-Induktion sind erkennbar, jedoch nicht signifikant. Standardfehler, n = Anzahl der Tiere.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem t-Test für zwei unabhängige Stichproben des Programms Microcal Origin. Das Signifikanzniveau α betrug 5%. Die Ergebnisse sind in Tab. 3-2 aufgeführt.

Stichproben	zum Signifikanzniveau $\alpha=5\%$	p-Wert
50d A, 50d O	nicht signifikant	0,06408
80d A, 80d O	signifikant	0,00065
50d O, 80d O	nicht signifikant	0,06233
CTR, 80d O	signifikant	0,01678

Tab. 3-2 Statistische Auswertung der Immunoblot-Ergebnisse bezüglich des MIF-Gehalts.

3.2 Nachweis und Lokalisation von MIF in Kryostatschnitten

Zur Darstellung von MIF mittels Immunfluoreszenz wurde ein Cy3-gekoppelter Zweitantikörper verwendet, der nach Anregung orange fluoresziert.

Als Positivkontrolle diente das Bronchialepithel der Lunge (Abb. 3-3), welches von Bacher *et al* bereits 1997 als positiv für MIF beschrieben worden war.

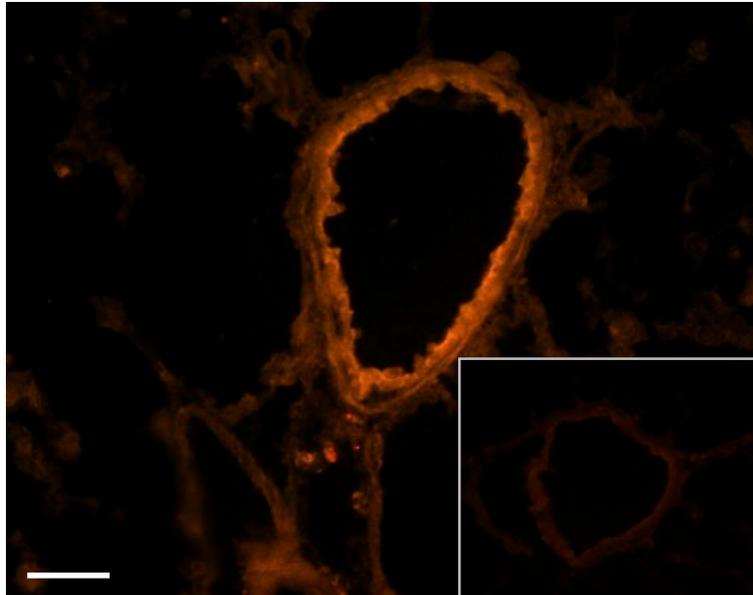


Abb. 3-3 MIF-Immunfluoreszenz, Lunge, Ratte. Positiv- und Negativkontrolle. Das Bronchialepithel ist eindeutig MIF-positiv. Zum Vergleich ist im Inlay die Negativkontrolle dargestellt. Maßstab 50µm.

Für die Präabsorptionskontrolle wurden 75µl des MIF-Primärantikörpers in der eingesetzten Verdünnung mit 15µg rMIF vermischt und 6min bei 13.000rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Kontrollschnitte mit 70µl des Überstands inkubiert und weiterhin wie mit den restlichen Proben verfahren. Die Präabsorptionskontrolle ist in Abb. 3-4 im Vergleich zu einer regulären Immunfluoreszenz dargestellt.

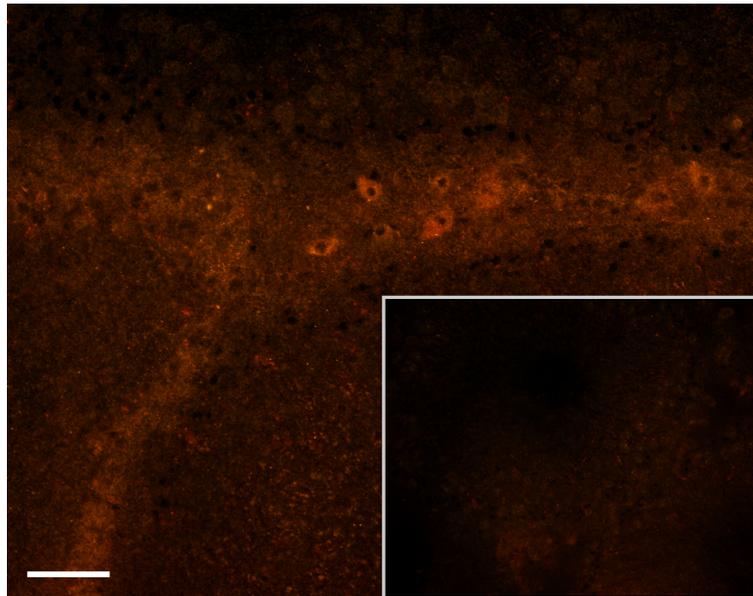


Abb. 3-4 Präabsorptionskontrolle (Inlay) für MIF im Vergleich mit Kontrollprobe. Hoden, Ratte, Maßstab 50µm.

Das Interstitium der unbehandelten Kontrollhoden ist deutlich positiv für MIF, wobei einige Zellen durch eine besonders starke Fluoreszenz hervorgehoben sind (s. Abb. 3-5). Die Tubuli seminiferi hingegen stellen sich nahezu negativ dar. Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden bei jedem Versuchsablauf Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

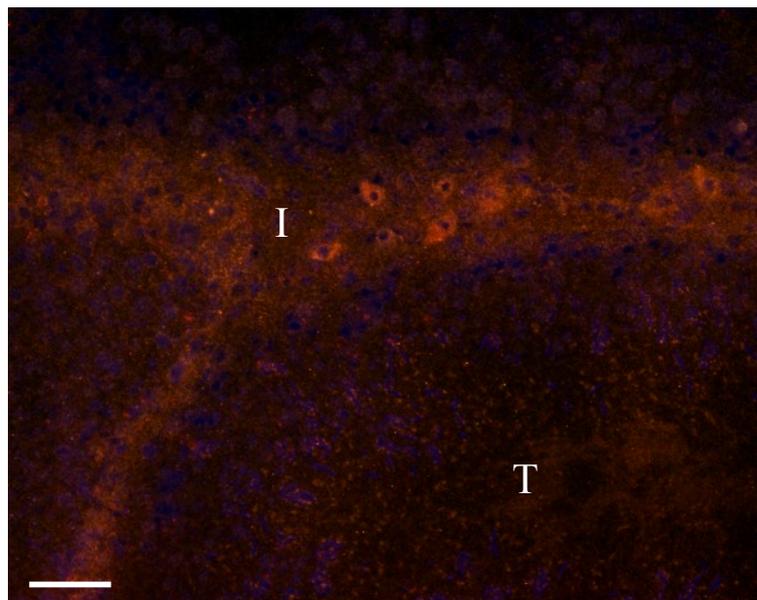


Abb. 3-5 Immunfluoreszenz für MIF im Kontrollhoden, DAPI Kernfärbung. Das Interstitium ist positiv, einzelne Zellen deutlich abgrenzbar. T=Tubulus, I=Interstitium. Maßstab 50µm.

Gelegentlich finden sich im Kontrollhoden Kerne der primären Spermatozyten, die eine schwach positive Reaktion für MIF aufweisen. Diese Reaktion ist jedoch nur vereinzelt nachweisbar und wird daher als unspezifisch bewertet (vgl. Abb. 3-6).

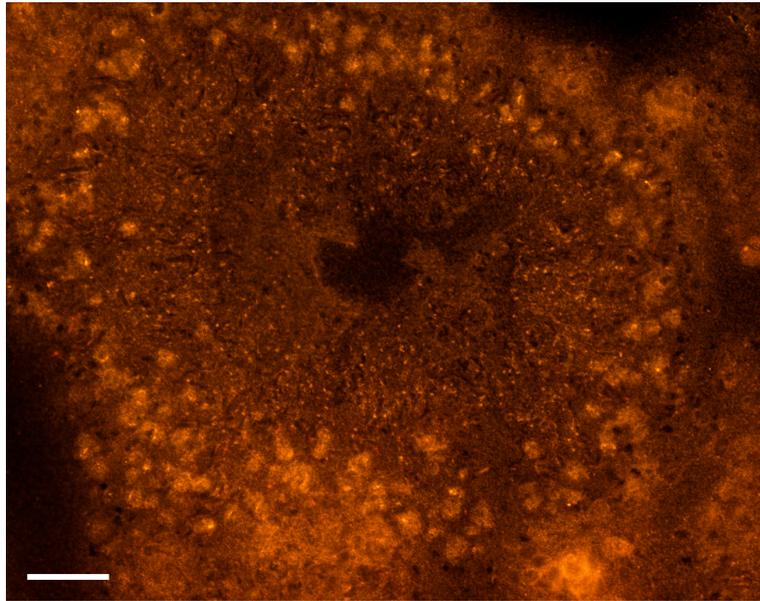


Abb. 3-6 Immunfluoreszenz für MIF im Kontrollhoden mit Kernfärbung primärer Spermatozyten. Vermutlich handelt es sich hierbei um eine unspezifische Reaktion. Maßstab 50µm.

Granulome, die sich sowohl 50 als auch 80 Tage nach Induktion der Orchitis finden, zeigen ebenfalls eine deutlich positive Reaktion für MIF, wobei einzelne Zellen hierbei nicht abgrenzbar waren (s. Abb. 3-7).

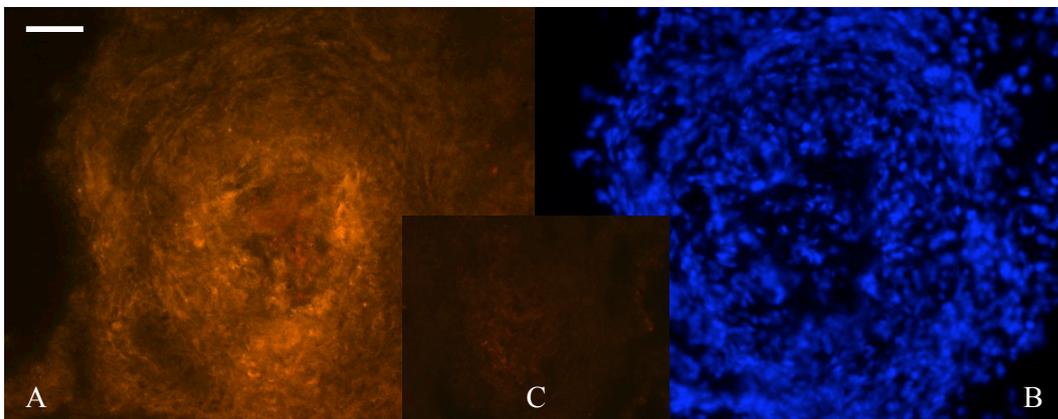


Abb. 3-7 Granulom des Hodens, 80 Tage nach Induktion der Orchitis. MIF (A), DAPI (B) und Negativkontrolle (C). Die sowohl bei 50 als auch 80 Tagen Orchitis auftretenden Granulome zeigen eine starke Immunreaktion für MIF. Maßstab 50µm.

3.3 Abnehmende MIF-Expression in EAO

Im Vergleich zu den Kontroll- und Adjuvans-Hoden zeigt sich in EAO sowohl bei 50d O als auch bei 80d O eine deutlich verminderte Immunreaktion für MIF. Es finden sich lediglich MIF-positive Zellen in der Umgebung von Granulomen (s.o.). Ansonsten stellen sich weder das Interstitium noch einzelne abgrenzbare Zellen positiv für MIF dar. Die Immunfluoreszenz-Analyse bestätigt somit die semi-quantitativen Western-Blot-Ergebnisse.

3.4 Co-Lokalisierung von MIF und Makrophagen im Hoden

Um zu untersuchen, ob die prominente MIF-Expression im Interstitium Makrophagen zuzuordnen ist, wurden Co-Lokalisationsexperimente mit Antikörpern gegen MIF und die Makrophagenmarker ED1 und ED2 durchgeführt. MIF-positive Zellen wurden mit Cy3, ED1+ und ED2+ Zellen wurden mit FITC-konjugierten Sekundärantikörpern markiert.

Sowohl in den unbehandelten Kontrollen, als auch den Adjuvans-Hoden sind vereinzelt entzündliche Makrophagen (ED1-positiv) im Interstitium nachweisbar, wobei sich die Mehrheit davon ebenfalls positiv für MIF darstellt.

Diese Beobachtung gilt auch für die ED2-positiven, residenten testikulären Makrophagen. In Kontroll- und Adjuvans-Proben sind viele der ED2-positiven Zellen ebenfalls positiv für MIF (siehe Abb. 3-8).

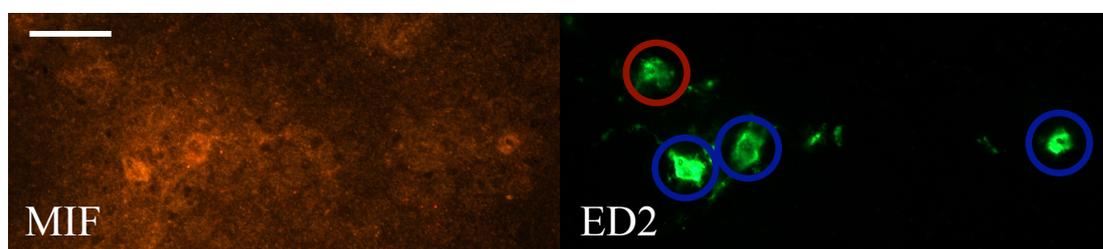


Abb. 3-8 Doppelimmunfluoreszenz für MIF und ED2 (gewebsständige Makrophagen) im Kontrollhoden. Nicht alle der ED2-positiven Makrophagen (blau) zeigen eine positive Reaktion für MIF (rot). Maßstab 50µm.

Die Experimente zeigen bei EAO eine Zunahme der Gesamt-Makrophagen-Population, wobei der Anstieg der ED1-positiven Zellen besonders deutlich ist.

3.5 Abnahme der Zahl der MIF-positiven Makrophagen im chronischen Entzündungsverlauf

Während die Gesamtzahl aller Makrophagen in EAO deutlich zunimmt (s. Abb. 3-9), reduziert sich der Anteil der MIF-positiven Makrophagen bei 50 Tagen Orchitis auf nur noch einzelne markierte Zellen. 80 Tage nach Induktion der Erkrankung sind schließlich keine MIF-positiven Makrophagen mehr nachweisbar.

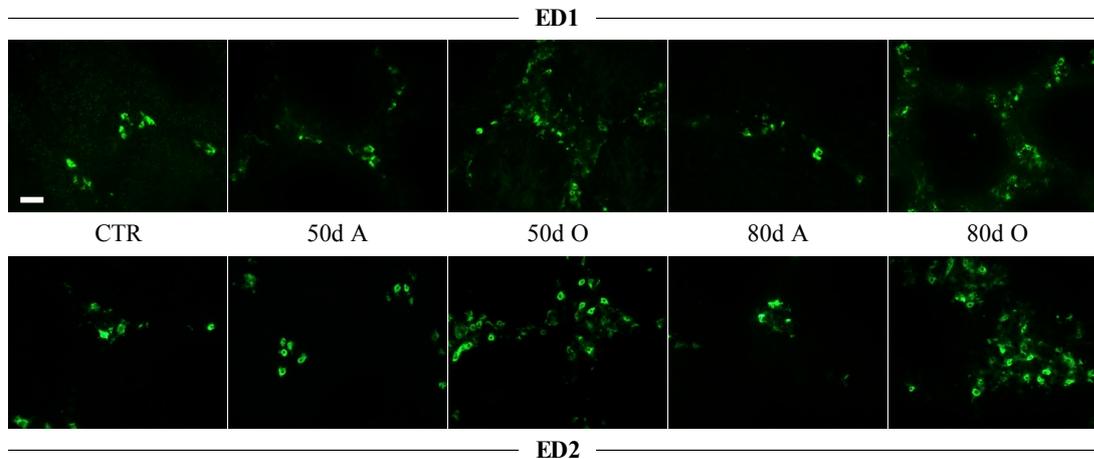


Abb. 3-9 Zunahme der Makrophagen/Monozyten-Population im Krankheitsverlauf der EAO. Sowohl die eingewanderten ED1-positiven Makrophagen vom inflammatorischen Phänotyp, als auch die residenten ED2-positiven Gewebsmakrophagen sind in EAO im Vergleich zu den Kontrollen (Adjuvans und unbehandelt) vermehrt nachweisbar. Maßstab 50µm.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass MIF sowohl im unbehandelten Hoden als auch den Adjuvans-Kontrollen in Leydig-Zellen sowie ED1- und ED2-positiven testikulären Makrophagen nachweisbar ist. In EAO zeigt sich neben einer Abnahme MIF-positiver Leydig-Zellen eine im Krankheitsverlauf fortschreitende Reduktion von MIF-positiven Makrophagen. Trotz der erheblichen Zunahme der Makrophagenzahl im entzündlich veränderten Hoden, stellen sich diese 80 Tage nach EAO-Auslösung vollständig negativ dar. Die Ergebnisse sind in Abb. 3-10 zusammengestellt.

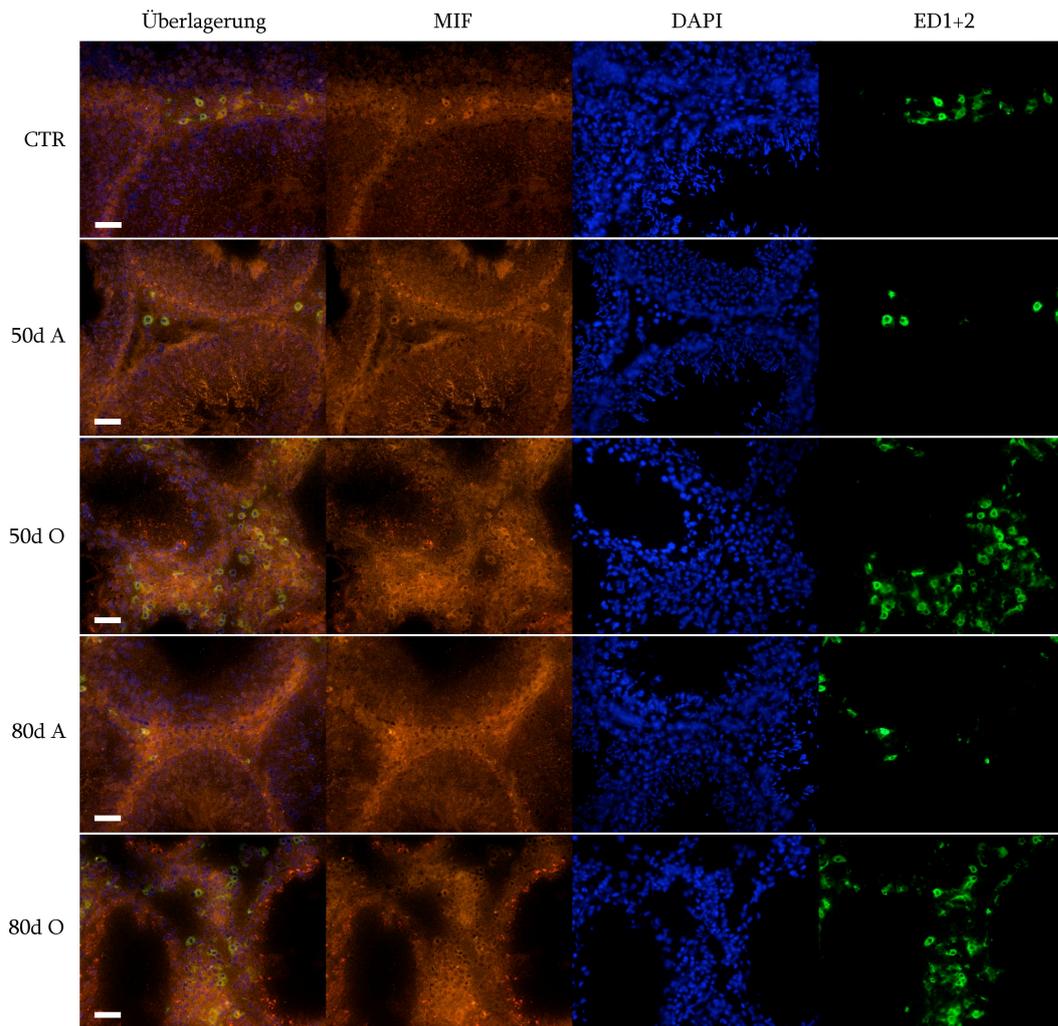


Abb. 3-10 Doppelimmunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von MIF und den kombinierten Makrophagenmarkern ED1 und ED2 im Hoden der Ratte. Das Interstitium der Kontroll- und Adjuvans-Hoden stellt sich deutlich positiv für MIF dar. Hierbei lassen sich auch vereinzelt MIF-positive Makrophagen erkennen. In EAO ist die Zunahme der Makrophagen deutlich erkennbar, wobei der Anteil MIF-positiver Zellen stark abnimmt. Maßstab 50µm.

3.6 Reinheit der isolierten RNA

Um ein geeignetes Protokoll für die Evaluierung der MIF-mRNA-Expression während des Krankheitsverlaufes zu etablieren, wurde zunächst Gesamt-RNA aus unbehandelten Kontrollhoden isoliert.

Bei der Bestimmung des OD_{260}/OD_{280} -Quotient wiesen die isolierten Proben Werte zwischen 1,5 und 2,0 auf, was auf eine RNA ohne Verunreinigungen schließen lässt.

3.7 Reverse Transkription und Überprüfung der cDNA-Synthese

Die aus den Hoden der Kontrolltiere isolierte RNA wurde anschließend über eine Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Zur Überprüfung der cDNA-Synthese wurde eine PCR für GAPDH als Kontrollgen durchgeführt. Da diese Proben anschließend zur Etablierung der quantitativen Real-Time-PCR dienen sollten, war es außerdem wichtig, dass vergleichbare Mengen RNA in cDNA umgeschrieben wurden. Nach Auftrennung der RT-PCR-Produkte im Agarosegel zeigen alle Proben eine GAPDH-positive Reaktion vergleichbarer Intensität (s. Abb. 3-11).

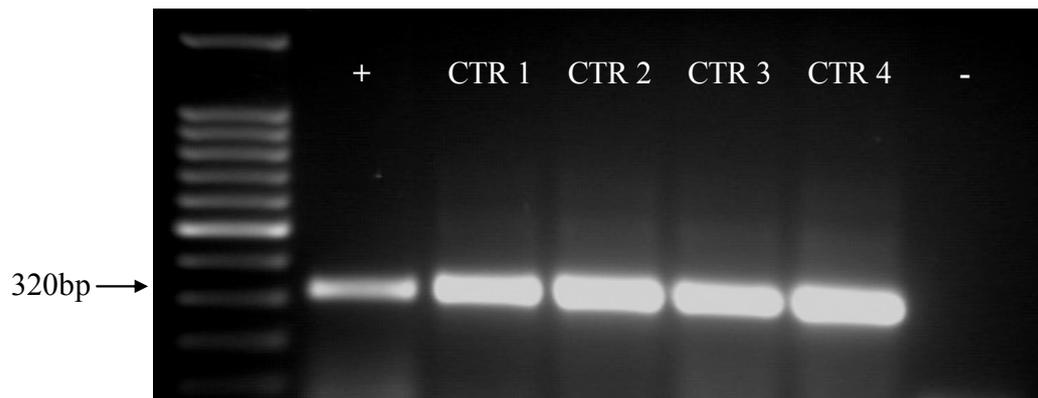


Abb. 3-11 Überprüfung der reversen Transkription mittels GAPDH-PCR. Die Intensität der Banden ist in allen Proben vergleichbar. Positivkontrolle (+), Negativkontrolle (-) und 100bp-Marker.

3.8 Nachweis der MIF und β -actin mRNA-Expression mit real time PCR

Mit Hilfe der quantitativen real time PCR wurde die Expression von MIF im Hoden nach Aktivierung von PAR₂ untersucht.

In der Standardkurve (s. Abb. 3-12) sind die Ct-Werte (s.u.) gegen den log₁₀ der cDNA-Konzentration in der jeweiligen Verdünnung aufgetragen. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,993 und die PCR-Effizienz 98,4%. Idealerweise sollte die Korrelation bei 1,0 und die Effizienz bei 100% liegen.



Abb. 3-12 Standardkurve für β -actin. In logarithmischer Darstellung ist gegen die Verdünnung (1:1 bis 1:100.000) der Ct-Wert als Maß für die Amplifikation aufgetragen. Je höher die Verdünnung, desto größer ist auch der Ct-Wert (desto später ist also ein bestimmter Grenzwert an amplifiziertem Material erreicht). Der Korrelationskoeffizient, ein Maß für die Pipettiergenauigkeit, beträgt 0,993 und die berechnete PCR-Effizienz liegt bei 98,4%.

Zur Überprüfung der Spezifität des Amplifikats wurde im Anschluss an die real time PCR eine Schmelzkurve erstellt (s. Abb. 3-13). Diese zeigt ausschließlich einen Gipfel für das untersuchte Produkt, die Negativkontrolle weist keine Erhöhung auf.

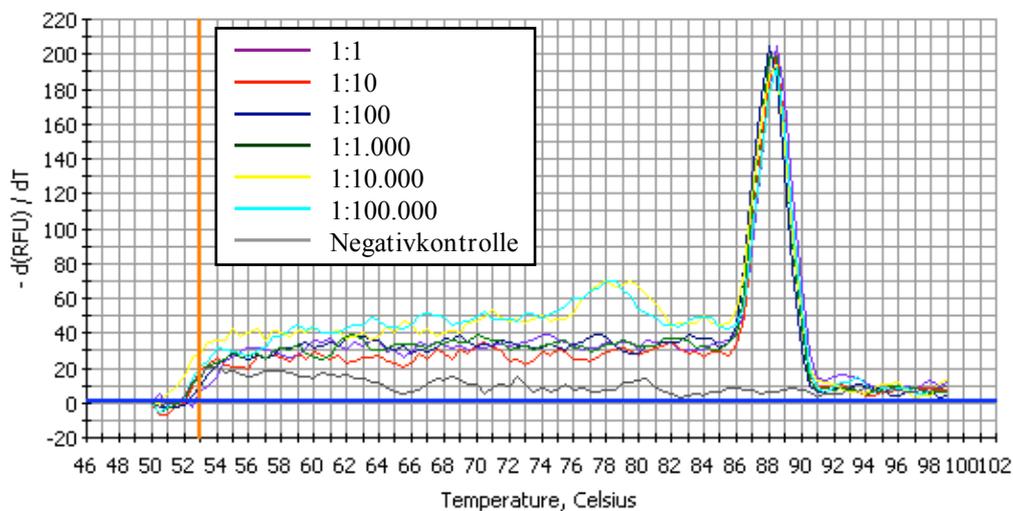


Abb. 3-13 Schmelzkurve der amplifizierten PCR-Produkte. Die sechs Graphen der Versuchsproben weisen einen spezifischen Gipfel auf und zeigen somit, dass in allen Reaktionen das gleiche Produkt amplifiziert wurde. Der Graph der Negativkontrolle (grau) weist kein Amplifikat auf.

Zur Vermeidung von Fehlinterpretationen der Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher Ausgangsmengen an RNA wurde als Kontrolle das konstitutiv exprimierte (housekeeping) Gen β -actin mitgeführt. In jedem PCR-Durchgang wurde somit für die einzelnen Proben parallel die Expression von β -actin bestimmt. Anhand dieser konnte schließlich die relative Expression von MIF berechnet werden.

Hierzu wurde zunächst ΔCt [Ct (MIF) – Ct (β -actin)] bestimmt. Anschließend wurde die Differenz von ΔCt der behandelten Proben ($S\Delta Ct$) und ΔCt der Kontrollen ($C\Delta Ct$) berechnet und gleich X gesetzt. Die relative Expression von MIF schließlich lässt sich mithilfe der Funktion 2^{-X} ableiten (s. Tab. 3-3).

$$\Delta Ct = Ct \text{ (MIF)} - Ct \text{ (\beta-actin)}$$

$$X = S\Delta Ct - C\Delta Ct$$

$$\text{Relative Expression} = 2^{-X}$$

Tab. 3-3 Berechnung der relativen Expression. Erläuterungen im Text.

3.9 Relative MIF-Expression bei Aktivierung von PAR₂

Nach den überraschenden Ergebnissen, dass MIF in chronischer Orchitis herunterreguliert wird, stellte sich die Frage, ob dies auch im akuten entzündlichen Geschehen der Fall ist.

Aufgrund vorangegangener Experimente der Arbeitsgruppe stand zu diesem Zweck noch Material zur Verfügung, welches mit Hilfe der quantitativen real time PCR untersucht werden konnte. Hierbei handelte es sich um cDNA von Rattenhoden, welchen *in vivo* je 50µl eines der folgenden Reagenzien unter die Hodenkapsel injiziert worden war, zum Zeitpunkt 5h nach Verabreichung (Iosub, 2006):

Isotone NaCl-Lösung

Isotone NaCl-Lösung + 30µg/ml Heparin

100nM rekombinante β -Tryptase in NaCl mit 30µg/ml Heparin

100nM inaktivierte β -Tryptase in NaCl mit 30µg/ml Heparin

Die Tryptase bewirkt dabei die enzymatische Aktivierung von PAR₂, Heparin stellt einen Tryptase-Stabilisator dar. Mittels Pefabloc SC wurde die Tryptaseaktivität irreversibel inaktiviert, wobei die verbleibende Enzymaktivität unter 0,1% lag. Fünf Stunden nach der Injektion wurden die Tiere getötet und die Hoden zur RNA-Isolierung entnommen.

Die Analyse der Daten nach quantitativer real time PCR zeigten aufgrund der hohen Standardabweichungen keine signifikante Veränderung der MIF-Expression (s. Abb. 3-14). Angedeutet ist zwar eine Abnahme von MIF nach PAR₂-Aktivierung durch

Tryptase, jedoch ist die zugehörige Kontrolle mit Heparin ebenfalls erniedrigt, so dass nicht von einer spezifischen Reaktion ausgegangen werden kann.

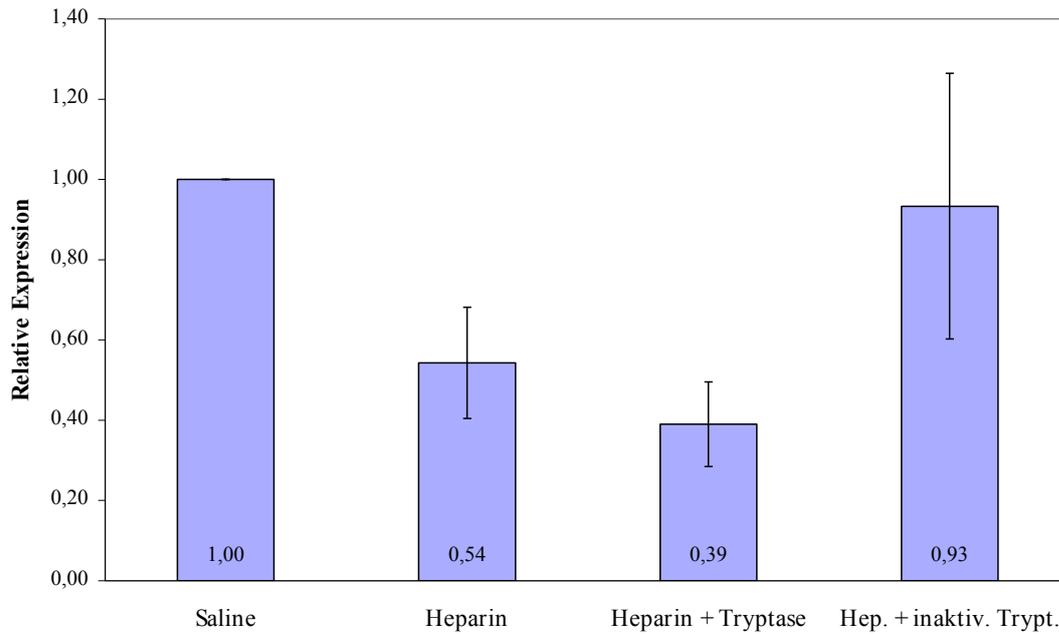


Abb. 3-14 MIF-Expression nach Aktivierung von PAR₂. Ergebnisse der quantitativen real time PCR-Analyse mit cDNA aus stimulierten Hoden. Tryptase bewirkt eine Aktivierung von PAR₂, Heparin stabilisiert die Tryptase. Berechnung der relativen Expression von MIF in Bezug auf die Saline-Kontrollgruppe mit Hilfe des housekeeping Gens β -actin. Es können keine statistisch signifikanten Veränderungen beobachtet werden, tendenziell ist jedoch eine Abnahme der MIF-mRNA-Expression nach PAR₂-Aktivierung durch Tryptase erkennbar, die aber auch ausschließlich bei dem Tryptase-Stabilisator Heparin auffällt. Standardfehler, n = 6.

4. DISKUSSION

Der Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF) ist eines der wohl am längsten bekannten Zytokine überhaupt. Ursprünglich wurde er als eine von aktivierten Lymphozyten freigesetzte Substanz beschrieben, die Makrophagen an der Migration hindert (Bloom und Bennett, 1966; David, 1966). Bis heute wurde MIF in einer Vielzahl von Zelltypen und unterschiedlichen Geweben nachgewiesen, was dessen Stellenwert aufzeigt. Andererseits fällt es schwer, MIF eben aufgrund seiner Multifunktionalität in seinen physiologischen Auswirkungen klar einzuordnen.

Im Hoden wurde MIF in den Leydig-Zellen nachgewiesen. Dort entfaltet es eine parakrine Wirkung auf die Inhibin-Sekretion der Tubuli seminiferi (Meinhardt *et al*, 1996). Überraschenderweise konnten Meinhardt *et al* (1999) zeigen, dass die MIF-Produktion nach experimenteller Ablation der Leydig-Zellen von den sonst MIF-negativen Sertoli-Zellen übernommen werden kann, so dass die intratestikuläre Konzentration durch diese Kompensation stabil bleibt (Hedger *et al*, 2005). Dies deutet darauf hin, dass MIF eine übergeordnete Rolle in der Hodenfunktion spielt. Daneben führt MIF in den testikulären Peritubulärzellen zu einer verminderten Sekretion von TGF- β 2, was wiederum eine Proliferationshemmung der Leydig-Zellen bewirken kann (Khan *et al*, 1999; Müller *et al*, 2005). Ein hypothetisches Schema über die Rolle von MIF im Hoden bietet Abb. 4-1.

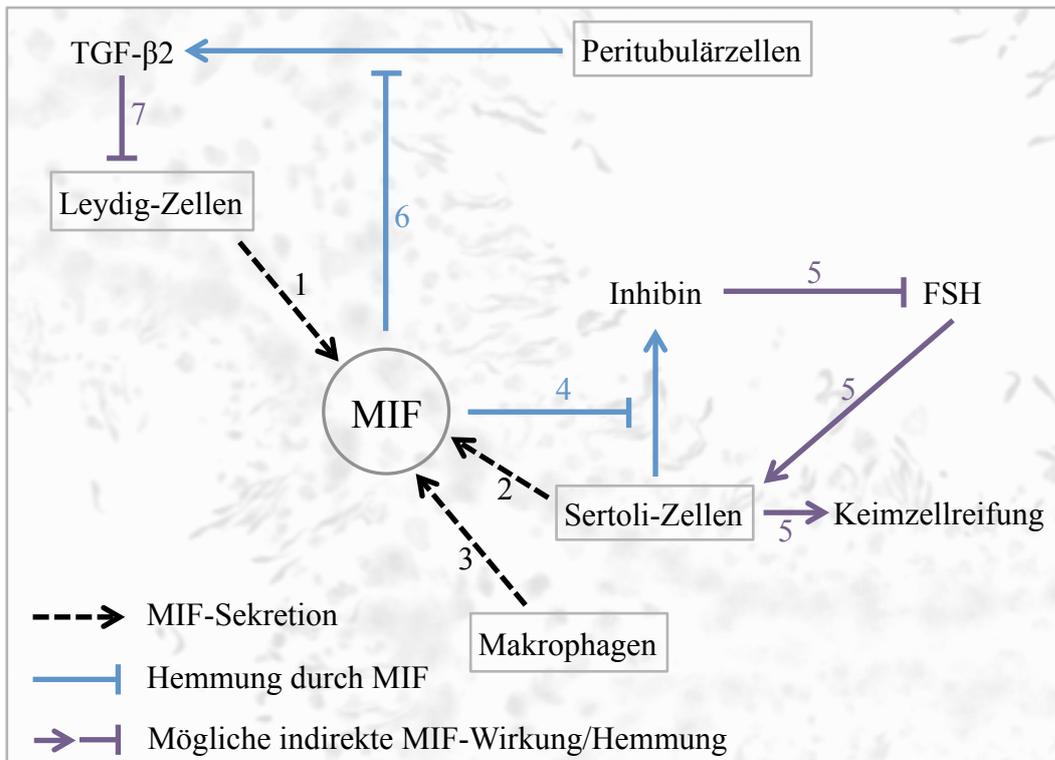


Abb. 4-1 Hypothetisches Schema zur Rolle von MIF im Hoden. Das von Leydig-Zellen (1; Meinhardt *et al*, 1996) – bei Ablation auch von Sertoli-Zellen (2; Meinhardt *et al*, 1999) – und Makrophagen (3; Bacher *et al*, 1997) sezernierte MIF kann die Inhibin-Ausschüttung der Sertoli-Zellen inhibieren (4; Meinhardt *et al*, 1996). Inhibin wiederum kann die hypophysäre FSH-Freisetzung hemmen und somit rückkoppelnd auf die Sertoli-Zellen und die Spermatogenese wirken (5; de Kretser und Robertson, 1989). Außerdem inhibiert MIF die TGF- β 2-Sekretion der Peritubulärzellen (6; Müller *et al*, 2005), was nachfolgend zu einer Hemmung der Proliferation von Leydig-Zellen führen kann (7; Khan *et al*, 1999).

Die vorliegende Arbeit soll die Regulation der MIF-Synthese bei testikulären Entzündungsprozessen untersuchen sowie Parallelen und Gegensätze zu anderen Krankheitsbildern aufzeigen.

4.1 MIF bei chronischer EAO

Die experimentelle Autoimmunorchitis (EAO) stellt eine etablierte Methode zur Untersuchung chronischer Entzündungen des Hodens dar (Tung und Teuscher, 1995). Sie zeichnet sich histopathologisch durch die Zunahme an Immunzellen (Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen) im Interstitium, Degeneration des Keimepithels sowie Granulombildung aus (Kohno *et al*, 1983; Doncel *et al*, 1989; Lustig *et al*, 1993; Iosub *et al*, 2006). Des Weiteren kommt es zu einer Zunahme an Leydig-Zellen (Suescun *et*

al, 1994) sowie der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und IFN- γ (Rival *et al*, 2008). Die im Verlauf der EAO beobachtete vermehrte TNF- α -Sekretion durch Makrophagen führt zu einer Steigerung der Apoptoserate von Keimzellen (Suescun *et al*, 2003; Theas *et al*, 2008). Ferner kommt es zu einer Maturation dendritischer Zellen mit konsekutiv vermehrter Produktion von IL-10 und IL-12. Reife dendritische Zellen regulieren eine spezifische T-Zell-Antwort gegen unterschiedliche Auto-Antigene, wohingegen unreife Zellen eine gewisse Immuntoleranz vermitteln (Rival *et al*, 2007).

Auch bei den Gonadotropinen werden im Verlauf der EAO charakteristische Veränderungen beobachtet. So wurde gezeigt, dass es zu einem Anstieg des FSH im Serum bei gleichbleibendem LH kommt. Außerdem wurde in Rattenhoden mit EAO eine Erhöhung des testikulären Testosterons nachgewiesen, wohingegen das Testosteron im Serum erniedrigt ist (Suescun *et al*, 1994). Durch eine Hormonersatztherapie mit subkutan implantierbaren Testosteronpräparaten kann die Entwicklung einer EAO gehemmt bzw. der Krankheitsverlauf deutlich gemildert werden. Hierbei kommt es zu einer reduzierten Expression der Entzündungsmediatoren TNF- α , IL-2, IL-6 und IFN- γ , sowie zu einer ausbleibenden Granulombildung und fehlender Akkumulation von Makrophagen (Fijak *et al*, 2011), die ansonsten typische histopathologische Erscheinungen der EAO darstellen.

Auch bei anderen Formen von Hodenentzündungen wurde nach Veränderungen im Zell- und Zytokinspektrum gesucht. Untersuchungen an testikulärem Biopsiematerial von Patienten mit Azoospermie sowie chronischer Entzündung zeigten eine Zunahme der T-Helfer-Zellen-Subpopulation Th17 (Duan *et al*, 2011). Diese stellt eine Untergruppe von Lymphozyten dar, die sich durch Stimulation mit IL-6, TGF- β und IL-23 differenziert und deren Rolle bei Infektionen, Autoimmunreaktionen und der Tumorentstehung immer mehr Bedeutung erlangt. Bei Aktivierung kommt es zu einer vermehrten Expression der Zytokine IL-17A, IL-21 und IL-22, was zu einer antimikrobiellen Abwehrreaktion mittels Antigenpräsentation, Einwanderung von Neutrophilen und Reparationsvorgängen führt. Im Rahmen von Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis, Psoriasis und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnte eine Dysregulation der T-Lymphozyten zugunsten der Th17-Zellen beobachtet werden (Rendon und Choudhry *et al*, 2012). Im chronisch entzündeten Hoden wurde neben der Beteiligung der Th17-Zellen eine deutliche Expression von IL-23 in Makrophagen und dendritischen Zellen nachgewiesen, was Ausdruck einer regulatorischen Dysfunktion sein könnte (Duan *et*

al, 2011). Inwieweit das Zytokinspektrum der Th17-Zellen jedoch die Integrität des Hodens sowie die Spermatogenese und Differenzierung beeinflusst ist noch unklar. Berichte über erhöhte MIF-Konzentrationen bei Immunpathologien wie dem septischen Schock, rheumatoider Arthritis, entzündlichen Lungen- und Tumorerkrankungen (Lue *et al*, 2002) sowie die erfolgreichen Therapien durch Neutralisation der überschießenden MIF-Expression implizieren auch eine Rolle des Zytokins bei chronischer Orchitis. In unserem Modell der EAO zeigte sich jedoch überraschenderweise eine signifikante Verminderung des MIF-Gehalts bei Progression der Erkrankung. Während im physiologischen Zustand überwiegend die Leydig-Zellen den Anteil des testikulären MIF bestimmen (Meinhardt *et al*, 1996), nimmt die MIF-Sekretion im Verlauf der chronischen Entzündung ab. In der Immunfluoreszenz zeigte sich auch keine kompensatorische MIF-Synthese durch andere Zellen, wie sie bei der Leydig-Zell-Depletion durch EDS beschrieben ist (Meinhardt *et al*, 1999).

4.2 Rolle von MIF bei PAR₂-Aktivierung im Hoden

Neben der Regulation von MIF in einer chronischen testikulären Entzündung (EAO) sollte durch die Aktivierung von PAR₂ auch die Wirkung eines akut entzündlichen Stimulus auf die MIF-Produktion untersucht werden. In den hierzu durchgeführten real time PCR Experimenten zeigte sich im Gegensatz zu den Ergebnissen im EAO-Modell jedoch keine signifikante Veränderung der MIF-Menge auf RNA-Ebene. Bei den untersuchten testikulären Gewebeproben fiel auf, dass nur eine geringe Menge an MIF-mRNA überhaupt nachweisbar war und sich große interindividuelle Unterschiede feststellen ließen.

In Endothelzellen führt die Aktivierung von PAR₂ mit Hilfe eines synthetischen Peptids hingegen zu einer vermehrten Expression von MIF *in vitro* (Shimizu *et al*, 2004). Umgekehrt stimuliert rekombinantes MIF Keratinozyten zu einer gesteigerten Produktion von PAR₂-mRNA (Enomoto *et al*, 2011). Ferner konnte eine amerikanische Arbeitsgruppe kürzlich nachweisen, dass MIF bei einer Aktivierung von PAR₁ durch Thrombin in Urothelzellen vermehrt freigesetzt wird (Vera *et al*, 2010). Diese Ergebnisse deuten auf eine vielfältige und eventuell auch zell- bzw. organspezifische Abhängigkeit der MIF-Expression von Proteinase-aktivierten Rezeptoren hin. Weiterhin konnten Malamud *et al* bereits 2003 zeigen, dass es deutliche Unterschiede in der

Sekretion einzelner Zytokine bei PAR₂-Aktivierung gibt. So kommt es zwar zu einer dosisabhängigen Sekretionssteigerung von TNF- α , IL-6 und IL-1 β , nicht jedoch von IL-10, IL-4, IL-12 und IFN- γ (Malamud *et al*, 2003). Vorstellbar ist daher auch, dass MIF im Hoden nicht durch eine PAR₂-Aktivierung beeinflusst wird.

Daneben gilt PAR₂ als Mediator bei chronischen Entzündungen z.B. der adjuvanten Monoarthritis, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder der interstitiellen Nierenfibrose (Vergnolle, 2009). Die hierbei beobachteten klinischen Entzündungszeichen persistierten über einen Zeitraum von 2-3 Wochen nach Induktion (Ferrell *et al*, 2003). Die für unsere Versuche vorhandenen Proben wurden bereits fünf Stunden nach Aktivierung durch Tryptase gewonnen. Deshalb kann eine Regulation der MIF-Expression durch PAR₂-Aktivierung bei einem länger andauernden inflammatorischen Prozess nicht ausgeschlossen werden, vor allem auch weil sich die zelluläre Komposition des Organs bei persistierender Entzündung gegenüber dem Kurzzeitmodell verändert.

4.3 MIF und Makrophagen

Im Hoden der Ratte gibt es zwei verschiedene Populationen von Makrophagen, die sich anhand ihrer Oberflächenantigene unterscheiden lassen. ED1 ist ein Antikörper gegen CD68 und ein Marker für zirkulierende Makrophagen vom inflammatorischen Typ. ED2 hingegen ist gegen das Oberflächenantigen CD163 gerichtet und kennzeichnet gewebständige Makrophagen im Rattenhoden (Dijkstra *et al*, 1985; Meinhardt *et al*, 1998).

Makrophagen sind wichtige Zytokin-produzierende Zellen, die aufgrund ihrer weiten Verbreitung im Körper lokale Abwehrreaktionen in nahezu allen Organen bewirken können. Dabei ist das Zytokinspektrum ausgesprochen breit, wie die Beispiele IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- α , IFN- γ , TGF- β , sowie CSF-Isoformen (colony stimulating factors) zeigen (Cavaillon, 1994). Bei der Aktivierung von Makrophagen kann es sowohl zu einer gesteigerten Zytokinausschüttung durch Re-Aktivierung als auch zu hemmenden Wirkungen durch antiinflammatorische Zytokine kommen.

Calandra *et al* konnten bereits 1994 zeigen, dass Makrophagen wichtige MIF-Produzenten sind, die bis zu diesem Zeitpunkt lediglich als Zielzelle des Migrations-inhibierenden Faktors bekannt waren. Die Stimulation von Makrophagen mit LPS,

TNF- α und IFN- γ bewirkt die Synthese und Sekretion von MIF. Dies führt wiederum zur genannten Re-Aktivierung der Makrophagen, die daraufhin IL-1 und TNF- α ausschütten und so z.B. eine zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen und Leishmania (Pozzi und Weiser, 1992; Jüttner *et al*, 1998) sowie vermehrte Phagozytoseaktivität entfalten können (Onodera *et al*, 1997).

Obwohl im Rahmen der EAO eine massive Zunahme der Zahl an Makrophagen beobachtet werden kann, zeigt sich in der Immunfluoreszenz ein deutlich verringerter MIF-Nachweis in diesen Zellen. Zusammen mit einer reduzierten MIF-Immunreaktivität in den Leydig-Zellen bestätigen diese histopathologischen Befunde die bereits in Gesamtorganhomogenaten beobachtete Abnahme von MIF im Verlauf der EAO. Ähnliche Befunde wurden bei der bakteriellen Orchitis der Maus gefunden. Auch hier ist nach experimenteller Infektion mit uropathogenen *E. coli* Bakterien eine deutliche Abnahme der MIF-Expression zu verzeichnen (unveröffentlichte Daten AG Meinhardt). Da die Einwanderung von Makrophagen (sog. recruitment) ebenfalls durch MIF induziert werden kann (Gregory *et al*, 2006), könnte die Abnahme von MIF im Verlauf auch mit einer abgesättigten oder inhibierten Makrophagenreaktion erklärt werden. Denkbar wäre also, dass sich die Abwehrreaktion ab einer bestimmten Menge an Makrophagen nicht mehr steigern ließe.

Suescun *et al* zeigten im Gegensatz dazu, dass es zu einer signifikanten Zunahme an TNF- α -positiven Makrophagen kommt, die durch Induktion der Apoptose eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der EAO spielen (Suescun *et al*, 2003). Außerdem kommt es zu einer vermehrten Sekretion von IFN- γ durch testikuläre Makrophagen, was ebenfalls zu einer verstärkten Immunreaktion führt (Rival *et al*, 2008). Zusammengenommen könnten sowohl die reduzierten MIF-Spiegel als auch der Überschuss an IFN- γ und TNF- α gemeinsam an der Keimzelldegeneration beteiligt sein. Weitere Untersuchungen am Rattenmodell liefern ebenfalls Hinweise darauf, dass Makrophagen an der Entwicklung der EAO beteiligt und notwendig sind. Hierbei zeigt sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl an Makrophagen und dem Schweregrad der zellulären Schädigungen des Hodens. Die Zunahme der Zellzahl ist dabei durch die Subpopulationen ED1- und ED2-positiver Makrophagen bedingt, welche den Übergang von zirkulierenden hin zu gewebsständigen Abwehrzellen darstellen. Die Depletion von Makrophagen durch Injektion von Clodronat-enthaltenden Liposomen hingegen führte zu einer signifikanten Verminderung des Schweregrades der EAO (Rival *et al*, 2008).

Insgesamt finden sich in der Literatur sehr variable Expressionsmuster für MIF in unterschiedlichen Makrophagenpopulationen (Meinhardt *et al.*, 1996; Bacher *et al.*, 1997). In den jetzigen Untersuchungen zeigte sich jedoch wiederholt, dass ein Großteil sowohl zirkulierender, als auch gewebsständiger Makrophagen MIF positiv ist und dass die MIF-Reaktivität im entzündeten Hoden nicht mehr erkennbar ist. Ähnlich fanden Theas *et al.* bei Untersuchungen zur Expression von TNF- α durch testikuläre Makrophagen in EAO eine deutliche Abnahme der TNF- α -Freisetzung pro Zelle im Vergleich zur Kontrollgruppe (2008).

4.4 Bedeutung von MIF im Krankheitsgeschehen

Aufgrund seiner vielfältigen regulatorischen Fähigkeiten spielt MIF eine wichtige Rolle in einer Reihe von immunologischen und inflammatorischen Krankheitsprozessen (Lue *et al.*, 2002). So wurde MIF vor 20 Jahren als Produkt des Hypophysenvorderlappens identifiziert, das als Reaktion auf LPS hin sezerniert wird (Bernhagen *et al.*, 1993). Daraufhin durchgeführte Studien zeigten, dass MIF entscheidend an der Entstehung der sowohl von gramnegativen als auch grampositiven Bakterien ausgelösten Sepsis beteiligt ist (Calandra *et al.*, 2000). Dabei ist die MIF-Konzentration im Rahmen einer Sepsis systemisch erhöht. Im Gegensatz zu TNF- α wird MIF bereits bei einer geringeren Konzentration an LPS freigesetzt und scheint daher eine Frühantwort auf Bakterien darzustellen (Morand, 2005).

Auch beim ARDS (acute respiratory distress syndrome) konnte eine Regulation von MIF nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um ein entzündlich bedingtes Lungenversagen aufgrund eines schweren systemischen Traumas. Infolgedessen kommt es im Vergleich zu gesunden Probanden zu einem Anstieg der MIF-Konzentration innerhalb der Alveolen (Donnelly und Bucala, 1997).

Nachdem Leech bereits 1999 zeigen konnte, dass MIF in Makrophagen und Synoviozyten der Gelenkinnenhaut von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) exprimiert wird und im Serum erhöht ist, wurde bereits über die regulatorische Funktion des proinflammatorischen Zytokins im Krankheitsbild der RA spekuliert. Die MIF-Konzentration korreliert mit dem Aktivitätsgrad der Krankheit und sorgt nachgeschaltet für die Freisetzung von TNF- α aus Monozyten, weshalb MIF bereits früh als potentiell Ziel für neuartige Therapieansätze betrachtet wurde (Morand, 2005).

Allerdings ist bereits aufgrund des MIF-Genpolymorphismus eine gewisse Prädisposition für die RA zu erkennen. Die Anzahl der repetitiven Mikrosatellitensequenz CATT im Bereich der Promotorregion des MIF-Gens korreliert mit der MIF-Expression. Je mehr Wiederholungen vorhanden sind (sogenannte high expresser), desto höher schließlich auch das Risiko für eine schwere RA (Baugh *et al*, 2002).

Dieser Zusammenhang zwischen MIF-Expression und Krankheitsverlauf konnte mittlerweile für verschiedene entzündliche, autoimmunologische und Tumorerkrankungen nachgewiesen werden (Bucala, 2013). MIF-Gen-Knockout-Mäuse zeigten sich zum Beispiel im Vergleich zum Wildtyp anfälliger gegenüber einer Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* und im Verlauf konnten schwerere histopathologische Veränderungen beobachtet werden. Dies scheint durch eine mangelnde MIF-abhängige Aktivierung des angeborenen Immunsystems und Ausschüttung der Zytokine IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- α bedingt. Die erworbene Immunantwort, die vorwiegend durch IFN- γ vermittelt wird, bleibt hingegen unbeeinträchtigt (Bucala, 2013; Das *et al*, unveröffentlichte Arbeit). Andererseits wurden auch Krankheiten beschrieben, bei denen eine verminderte Expression von MIF (low expresser) den Verlauf negativ beeinflusst. So konnten Renner *et al* zeigen, dass Kinder mit einer niedrigeren CATT-Wiederholungsrate und damit einer geringeren MIF-Expression eine höhere Mortalität im Rahmen einer Meningitis aufwiesen (Renner *et al*, 2012). Der Einfluss von MIF auf den Verlauf einer Infektion scheint somit nicht nur vom MIF-Genotyp, sondern auch von dem Pathomechanismus beziehungsweise dem Erreger der Erkrankung abzuhängen (Das *et al*, unveröffentlichte Arbeit). Eine Übersicht über die mit MIF assoziierten Krankheitsbildern gibt Tab. 4-1.

Organ(-system)	Pathologie
Immunsystem	Sepsis, Transplantatabstoßung
Lunge	ARDS, Asthma, Tuberkulose, Zystische Fibrose, Wegener-Granulomatose, Sarkoidose, Bronchopulmonale Dysplasie
Niere	Glomerulonephritis
Knochen und Gelenke	Rheumatoide Arthritis, Polychondritis
Gastrointestinaltrakt	Colitis, Morbus Crohn
Haut	Atopische Dermatitis, Psoriasis, Sklerodermie
Endokrines System	Pankreatitis, Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2
Gehirn	Multiple Sklerose
Auge	Uveitis, Iridozyklitis
Herz-/Gefäßsystem	Atherosklerose, Ischämie, Myokardinfarkt, Aneurysma
Ohr	Otitis

Tab. 4-1 Erkrankungen beim Menschen, die mit einer erhöhten MIF-Menge einhergehen (überarbeitet nach Calandra und Roger, 2003; Pan *et al*, 2003; Plant *et al*, 2007; Kleemann und Bucala, 2010; Prencipe *et al*, 2011).

Aufgrund der Beobachtung, dass chronische Entzündungen häufig mit dem erhöhten Risiko einer malignen Entartung einhergehen, wurde die Rolle von MIF auf dem Gebiet der Tumorentstehung in den letzten Jahren vermehrt untersucht. Hierbei konnte MIF über verschiedene Mechanismen mit einer Reihe von Tumoren in Verbindung gebracht werden (Bucala und Donnelly, 2007; Cooke *et al*, 2009) und in einer Pilotstudie bereits als Biomarker zur Unterscheidung von benignen und malignen Ovarialtumoren herangezogen werden (He *et al*, 2012). Unter anderem inhibiert MIF das Tumorsuppressorgen p53 und verhindert dadurch eine zielgerichtete Apoptose (Fingerle-Rowson *et al*, 2003). Außerdem begünstigt MIF in Brustkrebszellen die Ausbildung neuer Blutgefäße über eine Induktion der proangiogenetischen Faktoren VEGF (vascular endothelial growth factor) und IL-8 (Xu *et al*, 2008). Im Magen führt das Bakterium *Helicobacter pylori* zu einer vermehrten Expression von CD74 und MIF. Sowohl *H. pylori* als auch MIF können über den Rezeptor CD74 an Epithelzellen des Magens binden und die Proliferationsrate der Zellen erhöhen (Beswick *et al*, 2006). Zusätzlich konnte kürzlich gezeigt werden, dass HSP90 (heat shock protein 90), das als sogenanntes Chaperon der korrekten Faltung von Proteinen dient, eine Rolle in der MIF-vermittelten Tumorpheriferation spielt. In verschiedenen Tumorzellreihen kann HSP90 den Abbau von MIF hemmen und somit zu einer vermehrten Zellproliferation führen (Schulz *et al*, 2012).

MIF spielt jedoch nicht nur bei der Entstehung und im Verlauf entzündlicher Prozesse und Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle, sondern ist auch physiologischerweise im menschlichen Serum nachzuweisen (Gregersen und Bucala, 2003). Aufgrund der variablen MIF-Expression verschiedener Gewebe gibt es für die MIF-Konzentration allerdings keinen Normwert.

Bislang gibt es keine Untersuchungen zur Regulation von MIF im Rahmen entzündlicher Prozesse des Hodens. Im Gegensatz zu anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen (s.o.) nimmt der MIF-Gehalt im Verlauf der experimentellen Autoimmunorchitis über 80 Tage signifikant ab. Ähnlich der rheumatoiden Arthritis kommt es in einem relativ abgegrenzten Kompartiment des Körpers zu einer entzündlichen Reaktion mit Zunahme an Makrophagen und Zerstörung lokaler Gewebestrukturen. Jedoch fehlt die im Rahmen der RA so ausgeprägte MIF-Reaktion durch Makrophagen gefolgt von einer massiven Freisetzung von TNF- α , die bereits heute durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern wie Adalimumab therapeutisch angegangen werden kann.

Neuere Untersuchungen an Brustkrebs-Zellreihen ergaben eine deutlich erhöhte MIF-Expression in nicht-invasiven Krebszellen im Vergleich zum benignen Gewebe. Eine hoch invasive Zellreihe zeigte hingegen eine überraschend niedrigere MIF-Expression (Verjans *et al*, 2009). Dies verdeutlicht erneut die Komplexität und Uneinheitlichkeit bezüglich der Regulation und des Expressionsmusters, die dieses Molekül im Rahmen chronischer Krankheitsprozesse aufweist.

Auch im Rahmen von Infertilitätsdiagnostik wurde MIF bereits zu Untersuchungen herangezogen. Hierbei entdeckte man, dass der Serumspiegel im Verlauf der normalen Schwangerschaft ansteigt. Bei Frauen mit wiederholten Aborten hingegen fehlt ein solcher Anstieg (Yamada *et al*, 2003). Auch hier scheint der Mangel an MIF zu einer gestörten Schwangerschaftsentwicklung beizutragen oder diese zumindest zu indizieren.

4.5 MIF als Ziel antiinflammatorischer Therapien

Bereits Anfang der 90er Jahre wurden die ersten Experimente durchgeführt, die in die MIF-Homöostase eingriffen, um einen bestimmten Krankheitsverlauf therapeutisch zu beeinflussen. Anti-MIF-Serum schützte Mäuse vor einem sonst tödlichen septischen Schock ausgelöst durch LPS-Gabe (Bernhagen *et al*, 1993). Ferner führte die

Behandlung mit MIF-Antikörpern im Mausmodell mit tödlichem Toxic-Shock-Syndrom-Toxin zu einer Steigerung der Überlebensrate von 8% auf 54%. Dies führte dazu, dass MIF als bedeutendes Zytokin der körpereigenen Immunantwort gegen grampositive und -negative Infektionen bewertet wurde (Calandra *et al*, 1998). Der zeitliche Rahmen, in dem die Applikation solcher Antikörper stattfinden muss um therapeutisch wirksam zu sein, wurde in einer weiteren Arbeit von Calandra *et al* mit acht Stunden angegeben. Untersucht wurde dies an einem Maus-Modell zur Peritonitis durch Ligatur und Punktion des Zäkums. Hierbei kam es zu einer letalen Entzündung des Bauchfells, wenn MIF-Antikörper nicht innerhalb der ersten acht Stunden verabreicht wurden (Calandra *et al*, 2000). Mit ISO-1, einem kleinmolekularen synthetischen Tautomerase-Inhibitor, der am katalytischen Zentrum von MIF ansetzt, stand ein erster experimenteller Wirkstoff zur Verfügung, der die proinflammatorische Aktivität von MIF hemmen konnte (Al-Abed *et al*, 2005). Weitere Inhibitoren wurden vor allem durch Computer-basiertes Design entwickelt und sind in präklinischer Erprobung. Folgende MIF-Inhibitoren sind hierbei zu nennen:

Dopachrom

Acetaminophen (Paracetamol)

Phenylpyruvat

Phenylacrylsäure

Acetylen

Aminosäureester

Diketone

Isoxazoline

Curcumin

Tab. 4-2 Grundstruktur verschiedener

MIF-Inhibitoren (nach Garai und Lorand, 2009)

Am besten erforscht ist die Antagonisierung von MIF zur Therapie der rheumatoiden Arthritis, eine der häufigsten chronisch-entzündlichen Erkrankungen überhaupt (Morand, 2005). Grund dafür sind die einzigartigen Wechselwirkungen von MIF mit Glukokortikoiden, welche die Basis der antirheumatischen Therapie darstellen. Die Behandlung mit monoklonalen Anti-MIF-Antikörpern im Mausmodell beugt einer Antigen-induzierten-Arthritis vor, wohingegen die Applikation von MIF tendenziell zu einer Aggravation führt. Demgegenüber führt die Gabe von Dexamethason zu einem

Rückgang der entzündlichen Veränderungen. Bei der Kombination aus Glukokortikoid und rekombinantem MIF kommt es jedoch zu einem weiteren Fortschreiten der Arthritis (Santos *et al*, 2001). Weitere Untersuchungen weisen außerdem auf einen Zusammenhang mit dem Apoptose-Regulator p53 hin. MIF-Gen-Knockout-Mäuse zeigen demnach eine gegenüber dem Wildtyp vermehrte Expression von p53. Dies hat eine erhöhte Apoptoserate zur Folge, was der bei der RA auftretenden Proliferation von Synoviozyten entgegen wirkt. Im Gegensatz dazu führt MIF zu einer Hemmung der p53-Expression, wodurch es zu einer verminderten Apoptoserate und damit zu einem Fortschreiten des Krankheitsgeschehens kommt (Leech *et al*, 2003).

Daneben gibt es noch eine Vielzahl an Krankheitsbildern, in denen die Antagonisierung von MIF als therapeutische Option möglich scheint. Neuere Studien zeigen zum Teil vielversprechende Ansätze unter anderem in der Therapie der Kolitis (Dagia *et al*, 2009), Atherosklerose (Verschuren *et al*, 2009), des Diabetes (Sanchez-Zamora *et al*, 2010), Asthma (Chen *et al*, 2010), der Angiogenese, Leukämien und Tumoren (Chesney *et al*, 1999; Bach *et al*, 2009; Shachar und Haran, 2011).

Aufgrund der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse und Beobachtungen scheint MIF bei der Entwicklung der EAO nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Auch im Rahmen akuter entzündlicher Prozesse des Hodens, untersucht am Modell der PAR₂-Aktivierung, ist MIF wahrscheinlich nicht ursächlich beteiligt. Vielmehr scheint es, dass MIF ein Regulator der Homöostase des Hodens ist. Daher zeigen sich unmittelbar keine neuen, MIF-basierten Ansatzpunkte zur Behandlung entzündlich bedingter männlicher Unfruchtbarkeit auf.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF) ist eines der ersten entdeckten Zytokine überhaupt. Bei MIF handelt es sich um einen pleiotropen Faktor mit breitem Expressions- und Wirkspektrum. Als Reaktion auf Endotoxin wird es hormonartig aus der Hypophyse freigesetzt und kann systemisch die antiinflammatorische Wirkung von Glukokortikoiden konterkarieren. Im Krankheitsgeschehen konnte für MIF eine Rolle bei der Sepsis und vielen akut und chronisch entzündlichen Erkrankungen sowie der Tumorentstehung gezeigt werden. Im Hoden wird MIF von den interstitiellen Leydig-Zellen synthetisiert. Welche Rolle das Zytokin jedoch bei akuten und chronischen Entzündungen des Hodens spielt, die eine wesentliche Ursache männlicher Fertilitätsstörungen darstellen, ist bislang ungeklärt. Aufgrund seiner vielfältigen Wirkungen steht MIF derzeit bei der Entwicklung neuer Behandlungsstrategien unterschiedlicher Krankheitsbilder im Mittelpunkt. Die experimentell ausgelöste Autoimmunorchitis (EAO) bietet ein Modell zur Untersuchung chronisch-entzündlicher Unfruchtbarkeit. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob und wie die MIF-Synthese im Rahmen der EAO in der Wistar-Ratte beeinflusst wird. Ergänzend sollte durch die Aktivierung des Proteinase-aktivierten Rezeptors 2 (PAR₂) *in vivo* der Einfluss eines akut entzündlichen Prozesses im Rattenhoden untersucht werden. Eine erhöhte Expression könnte dann als Grundlage für neue Therapieansätze zur Behandlung männlicher Infertilität dienen.

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass der testikuläre MIF-Proteingehalt im Verlauf der EAO im Vergleich zu unbehandelten sowie nur mit Adjuvans behandelten Kontrollen signifikant abnimmt. Diese Western-Blot-Ergebnisse konnten durch immunhistochemische Versuche an Kryostatschnitten mit semiquantitativen Analyseverfahren verifiziert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Makrophagen neben den Leydig-Zellen einen Großteil der MIF-positiven Zelltypen des Hodens darstellen. Im Krankheitsverlauf der EAO nimmt der MIF-Gehalt der Leydig-Zellen jedoch deutlich ab. Auch die testikulären Makrophagen stellen sich 80 Tage nach Auslösung der EAO vollständig immunonegativ für MIF dar, wobei es insgesamt zu einer deutlichen Zunahme der Zahl der Makrophagen kommt. Die Aktivierung von PAR₂ als Modell einer akuten testikulären Entzündung zeigte keinen regulativen Effekt auf die MIF-Expression.

Aufgrund der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen sich, im Gegensatz zu anderen entzündlichen Erkrankungen, in Bezug auf MIF keine begründeten Anhaltspunkte für neue Therapieansätze zur Behandlung inflammatorisch bedingter männlicher Unfruchtbarkeit.

6. SUMMARY

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is one of the first cytokines discovered. It is a multifunctional protein expressed by a large array of cells and tissues. It is secreted like a hormone in considerable amounts by the pituitary gland in response to endotoxemia. MIF has been implicated in the pathogenesis of sepsis and several acute and chronic inflammatory diseases as well as tumor development. MIF antagonists are therefore suggested as a therapeutic approach to inflammatory disease. In the testis MIF is localized to interstitial Leydig cells, but its role in testicular inflammation remains vague. Experimental autoimmune orchitis (EAO) in rodents serves as a model to investigate chronic testicular inflammation, an important etiological factor of male infertility. Aim of the study was to determine the effect of EAO on MIF levels in rat testis. Moreover, stimulation of proteinase-activated receptor 2 (PAR₂), which induces an acute testicular inflammatory response, was also examined.

The present study demonstrates that MIF protein levels are significantly reduced in EAO compared to both adjuvant treated and untreated controls. These results were verified by semi-quantitative immunohistochemistry on cryosections. Beside Leydig cells MIF was also localized to testicular macrophages. Surprisingly, in the development of EAO a clear reduction of MIF was evident in Leydig cells. Testicular macrophages were MIF-negative 80 days after induction of EAO, albeit the total number of macrophages drastically increased in inflamed testis. No regulation of MIF levels was detected in the model of acute testicular inflammation.

Based on the results presented in this thesis and in contrast to many other diseases MIF appears not to be a promising therapeutical target in the treatment of inflammatory based male infertility.

7. ABKÜRZUNGEN

A	Ampere
A. dest.	Aqua destillata
Aqua ad inj.	Aqua ad injectabilia
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EAO	Experimentelle Autoimmunorchitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
g	Gramm
h	Stunde(n)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
kD	Kilo-Dalton
LPS	Lipopolysaccharid (Endotoxin)
M	Molar (mol/l)
m/v	Masse pro Volumen
MES	Morpholinethansulfonsäure
MIF	Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor
min	Minute(n)
NSS	Normales Schweineserum
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase Kettenreaktion
qPCR	Quantitative real time PCR
PAR ₂	Proteinase-aktivierter Rezeptor 2

PFA	Paraformaldehyd
POD	Peroxidase
rMIF	Ratten-MIF
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen

8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1-1 Freisetzung von Prostaglandin und Hemmung der Apoptose durch MIF.....	7
Abb. 1-2 Keimepithel des menschlichen Hodens	13
Abb. 1-3 Ursachen männlicher Unfruchtbarkeit	18
Abb. 1-4 Enzymatische Aktivierung von PAR ₂	19
Abb. 3-1 Nachweis von MIF und β -actin mittels Immunoblot	42
Abb. 3-2 Quantitative Analyse der MIF-Expression in Kontroll-, Adjuvans- und Orchitis-Hoden	43
Abb. 3-3 MIF-Immunfluoreszenz, Lunge, Ratte.....	44
Abb. 3-4 Präabsorptionskontrolle (Inlay) für MIF	45
Abb. 3-5 Immunfluoreszenz für MIF im Kontrollhoden	45
Abb. 3-6 Immunfluoreszenz für MIF im Kontrollhoden mit Kernfärbung primärer Spermatozyten	46
Abb. 3-7 Granulom des Hodens, 80 Tage nach Induktion der Orchitis.....	46
Abb. 3-8 Doppelimmunfluoreszenz für MIF und ED2 im Kontrollhoden.....	47
Abb. 3-9 Zunahme der Makrophagen/Monozyten-Population im Krankheitsverlauf der EAO.....	48
Abb. 3-10 Doppelimmunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von MIF und den kombinierten Makrophagenmarkern ED1 und ED2 im Hoden der Ratte	49
Abb. 3-11 Überprüfung der reversen Transkription mittels GAPDH-PCR.....	50
Abb. 3-12 Standardkurve für β -actin.....	51
Abb. 3-13 Schmelzkurve der amplifizierten PCR-Produkte	51
Abb. 3-14 MIF-Expression nach Aktivierung von PAR ₂	53
Abb. 4-1 Hypothetisches Schema zur Rolle von MIF im Hoden.....	55

9. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1-1 MIF-Expression im Körper.....	4
Tab. 3-1 Verwendete Abkürzungen der untersuchten Versuchsgruppen.....	41
Tab. 3-2 Statistische Auswertung der Immunoblot-Ergebnisse bezüglich des MIF- Gehalts.....	43
Tab. 3-3 Berechnung der relativen Expression	52
Tab. 4-1 Erkrankungen beim Menschen, die mit einer erhöhten MIF-Menge einhergehen	62
Tab. 4-2 Grundstruktur verschiedener MIF-Inhibitoren	64

10. LITERATURVERZEICHNIS

- Aeberli D, Leech M, Morand EF (2006) Macrophage migration inhibitory factor and glucocorticoid sensitivity. *Rheumatology (Oxford)* 45(8):937-43
- Al-Abed Y, Dabideen D, Aljabari B, Valster A, Messmer D, Ochani M, Tanovic M, Ochani K, Bacher M, Nicoletti F, Metz C, Pavlov VA, Miller EJ, Tracey KJ (2005) ISO-1 binding to the tautomerase active site of MIF inhibits its pro-inflammatory activity and increases survival in severe sepsis. *J Biol Chem* 280(44):36541-4
- Al-Abed Y, Metz CN, Cheng KF, Aljabari B, VanPatten S, Blau S, Lee H, Ochani M, Pavlov VA, Coleman T, Meurice N, Tracey KJ, Miller EJ (2011) Thyroxine is a potential endogenous antagonist of macrophage migration inhibitory factor (MIF) activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(20):8224-7
- Aljabari B, Calogero AE, Perdichizzi A, Vicari E, Karaki R, Lahloub T, Zatari R, El-Abed K, Nicoletti F, Miller EJ, Pavlov VA, Al-Abed Y (2007) Imbalance in seminal fluid MIF indicates male infertility. *Mol Med* 13(3-4):199-202
- Anahara R, Toyama Y, Koda M, Honma S, Nishihira J, Toshimori K, Mori C (2006) Deletion of macrophage migration inhibitory factor gene induces down regulation of sex hormones and ultrastructural abnormalities in mouse testes. *Reprod Toxicol* 21(2):167-70
- Apte RS, Sinha D, Mayhew E, Wistow GJ, Niederkorn JY (1998) Cutting edge: role of macrophage migration inhibitory factor in inhibiting NK cell activity and preserving immune privilege. *J Immunol* 160(12):5693-6
- Arcuri F, del Vecchio MT, de Santi MM, Lalinga AV, Pallini V, Bini L, Bartolommei S, Parigi S, Cintorino M (1999) Macrophage migration inhibitory factor in the human prostate: identification and immunocytochemical localization. *Prostate* 39(3):159-65
- Arcuri F, Cintorino M, Vatti R, Carducci A, Liberatori S, Paulesu L (1999) Expression of macrophage migration inhibitory factor transcript and protein by first-trimester human trophoblasts. *Biol Reprod* 60(6):1299-303
- Arcuri F, Cintorino M, Carducci A, Papa S, Riparbelli MG, Mangioni S, Di Blasio AM, Tosi P, Vigano P (2006) Human decidual natural killer cells as a source and target of macrophage migration inhibitory factor. *Reproduction* 131(1):175-82
- Bach JP, Deuster O, Balzer-Geldsetzer M, Meyer B, Dodel R, Bacher M (2009) The role of macrophage inhibitory factor in tumorigenesis and central nervous system tumors. *Cancer* 115(10):2031-40
- 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 U S A* 93(15):7849-54

- Bacher M, Meinhardt A, Lan HY, Mu W, Metz CN, Chesney JA, Calandra T, Gemsa D, Donnelly T, Atkins RC, Bucala R (1997) Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Am J Pathol* 150(1):235-46
- Bacher M, Meinhardt A, Lan HY, Dhabhar FS, Mu W, Metz CN, Chesney JA, Gemsa D, Donnelly T, Atkins RC, Bucala R (1998) MIF expression in the rat brain: implications for neuronal function. *Mol Med* 4(4):217-30
- Balachandran S, Gadekar PK, Parkale S, Yadav VN, Kamath D, Ramaswamy S, Sharma S, Vishwakarma RA, Dagia NM (2011) Synthesis and biological activity of novel MIF antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* 21(5):1508-11
- Baugh JA, Chitnis S, Donnelly SC, Monteiro J, Lin X, Plant BJ, Wolfe F, Gregersen PK, Bucala R (2002) A functional promoter polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene associated with disease severity in rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 3(3):170-6
- Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter W, Manogue KR, Cerami A, Bucala R (1993) MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* 365(6448):756-9
- 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
- Beswick EJ, Pinchuk IV, Suarez G, Sierra JC, Reyes VE (2006) Helicobacter pylori CagA-dependent macrophage migration inhibitory factor produced by gastric epithelial cells binds to CD74 and stimulates procarcinogenic events. *J Immunol* 176(11):6794-801
- Bloom BR, Bennett B (1966) Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 153(731):80-2
- Bozza M, Satoskar AR, Lin G, Lu B, Humbles AA, Gerard C, David JR (1999) Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med* 189(2):341-6
- Bozza FA, Gomes RN, Japiassu AM, Soares M, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Bozza MT (2004) Macrophage migration inhibitory factor levels correlate with fatal outcome in sepsis. *Shock* 22(4):309-13
- Böcker W, Heitz PU, Aguzzi A, Böcker Denk Heitz M (2008) Pathologie : mit über 200 Tabellen. München [u.a.], Elsevier, Urban & Fischer
- 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
- Bucala R (1996) MIF rediscovered: cytokine, pituitary hormone, and glucocorticoid-induced regulator of the immune response. *FASEB J* 10(14):1607-13

- Bucala R, Donnelly SC (2007) Macrophage migration inhibitory factor: a probable link between inflammation and cancer. *Immunity* 26(3):281-5
- Bucala R (2013) MIF, MIF alleles, and prospects for therapeutic intervention in autoimmunity. *J Clin Immunol* 33 (Suppl 1):72-8
- Budarf M, McDonald T, Sellinger B, Kozak C, Graham C, Wistow G (1997) Localization of the human gene for macrophage migration inhibitory factor (MIF) to chromosome 22q11.2. *Genomics* 39(2):235-6
- Cailleau J, Vermeire S, Verhoeven G (1990) Independent control of the production of insulin-like growth factor I and its binding protein by cultured testicular cells. *Mol Cell Endocrinol* 69(1):79-89
- Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R (1994) The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med* 179(6):1895-902
- 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(6544):68-71
- Calandra T, Spiegel LA, Metz CN, Bucala R (1998) Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(19):11383-8
- 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(2):164-70
- Calandra T, Roger T (2003) Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3(10):791-800
- Carli C, Leclerc P, Metz CN, Akoum A (2007) Direct effect of macrophage migration inhibitory factor on sperm function: possible involvement in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril* 88(4 Suppl):1240-7
- Cavaillon JM (1994) Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother* 48(10):445-53
- Chen PF, Luo YL, Wang W, Wang JX, Lai WY, Hu SM, Cheng KF, Al-Abed Y (2010) ISO-1, a macrophage migration inhibitory factor antagonist, inhibits airway remodeling in a murine model of chronic asthma. *Mol Med* 16(9-10):400-8
- Chesney J, Metz C, Bacher M, Peng T, Meinhardt A, Bucala R (1999) An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol Med* 5(3):181-91
- Conroy H, Mawhinney L, Donnelly SC (2010) Inflammation and cancer: macrophage migration inhibitory factor (MIF)--the potential missing link. *Qjm* 103(11):831-6

- Cooke G, Armstrong ME, Donnelly SC (2009) Macrophage migration inhibitory factor (MIF), enzymatic activity and the inflammatory response. *Biofactors* 35(2):165-8
- Cordery DV, Kishore U, Kyes S, Shafi MJ, Watkins KR, Williams TN, Marsh K, Urban BC (2007) Characterization of a Plasmodium falciparum macrophage-migration inhibitory factor homologue. *J Infect Dis* 195(6):905-12
- Cote NM, Jaworski DC, Wasala NB, Morgan MS, Arlian LG (2013) Identification and expression of macrophage migration inhibitory factor in *Sarcoptes scabiei*. *Exp Parasitol* Jul 4. pii: S0014-4894(13)00170-7
- Cottrell GS, Amadesi S, Schmidlin F, Bunnett N (2003) Protease-activated receptor 2: activation, signalling and function. *Biochem Soc Trans* 31(Pt 6):1191-7
- Cvetkovic I, Stosic-Grujicic S (2006) Neutralization of macrophage migration inhibitory factor-novel approach for the treatment of immunoinflammatory disorders. *Int Immunopharmacol* 6(10):1527-34
- D'Andrea MR, Derian CK, Leturcq D, Baker SM, Brunmark A, Ling P, Darrow AL, Santulli RJ, Brass LF, Andrade-Gordon P (1998) Characterization of protease-activated receptor-2 immunoreactivity in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 46(2):157-64
- Dagia NM, Kamath DV, Bhatt P, Gupte RD, Dadarkar SS, Fonseca L, Agarwal G, Chetrapal-Kunwar A, Balachandran S, Srinivasan S, Bose J, Pari K, C BR, Parkale SS, Gadekar PK, Rodge AH, Mandrekar N, Vishwakarma RA, Sharma S (2009) A fluorinated analog of ISO-1 blocks the recognition and biological function of MIF and is orally efficacious in a murine model of colitis. *Eur J Pharmacol* 607(1-3):201-12
- Dai Z, Nasr IW, Reel M, Deng S, Diggs L, Larsen CP, Rothstein DM, Lakkis FG (2005) Impaired recall of CD8 memory T cells in immunologically privileged tissue. *J Immunol* 174(3):1165-70
- Das R, Koo MS, Kim BH, Jacob ST, Yao J, Leng L, Levy R, Murchison C, Burmann WJ, Moore C, Scheld WM, Kaplan G, MacMicking JD, Bucala R (unpublished) MIF is a critical mediator of the innate immune response to *M. tuberculosis*.
- Daun JM, Cannon JG (2000) Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic IkappaBalpha. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279(3):R1043-9
- David JR (1966) Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 56(1):72-7
- de Kretser DM, Robertson DM (1989) The isolation and physiology of inhibin and related proteins. *Biol Reprod* 40(1):33-47

- Dery O, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnett NW (1998) Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol* 274(6 Pt 1):C1429-52
- Dijkstra CD, Dopp EA, Joling P, Kraal G (1985) The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 54(3):589-99
- Doncel GF, Di Paola JA, Lustig L (1989) Sequential study of the histopathology and cellular and humoral immune response during the development of an autoimmune orchitis in Wistar rats. *Am J Reprod Immunol* 20(2):44-51
- Donn RP, Ray DW (2004) Macrophage migration inhibitory factor: molecular, cellular and genetic aspects of a key neuroendocrine molecule. *J Endocrinol* 182(1):1-9
- Donnelly SC, Bucala R (1997) Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of glucocorticoid activity with a critical role in inflammatory disease. *Mol Med Today* 3(11):502-7
- Drenckhahn D, Christ B, Benninghoff A, Benninghoff D (2003) Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem. München [u.a.], Urban & Fischer
- Duan YG, Yu CF, Novak N, Bieber T, Zhu CH, Schuppe HC, Haidl G, Allam JP (2011) Immunodeviation towards a Th17 immune response associated with testicular damage in azoospermic men. *Int J Androl* 34(6 Pt 2):e536-45
- 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
- el-Demiry MI, Hargreave TB, Busuttill A, Elton R, James K, Chisholm GD (1987) Immunocompetent cells in human testis in health and disease. *Fertil Steril* 48(3):470-9
- Enomoto A, Yoshihisa Y, Yamakoshi T, Ur Rehman M, Norisugi O, Hara H, Matsunaga K, Makino T, Nishihira J, Shimizu T (2011) UV-B radiation induces macrophage migration inhibitory factor-mediated melanogenesis through activation of protease-activated receptor-2 and stem cell factor in keratinocytes. *Am J Pathol* 178(2):679-87
- Ferrell WR, Lockhart JC, Kelso EB, Dunning L, Plevin R, Meek SE, Smith AJ, Hunter GD, McLean JS, McGarry F, Ramage R, Jiang L, Kanke T, Kawagoe J (2003) Essential role for proteinase-activated receptor-2 in arthritis. *J Clin Invest* 111(1):35-41
- Fijak M, Iosub R, Schneider E, Linder M, Respondek K, Klug J, Meinhardt A (2005) Identification of immunodominant autoantigens in rat autoimmune orchitis. *J Pathol* 207(2):127-38

- Fijak M, Schneider E, Klug J, Bhushan S, Hackstein H, Schuler G, Wygrecka M, Gromoll J, Meinhardt A (2011) Testosterone replacement effectively inhibits the development of experimental autoimmune orchitis in rats: evidence for a direct role of testosterone on regulatory T cell expansion. *J Immunol* 186(9):5162-72
- Filip AM (2006) Ribosomal Protein S19 interacts with Macrophage Migration Inhibitory Factor and modulates its pro-inflammatory function. *Institut für Anatomie und Zellbiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen*
- Filippini A, Riccioli A, Padula F, Lauretti P, D'Alessio A, De Cesaris P, Gandini L, Lenzi A, Ziparo E (2001) Control and impairment of immune privilege in the testis and in semen. *Hum Reprod Update* 7(5):444-9
- Fingerle-Rowson G, Petrenko O, Metz CN, Forsthuber TG, Mitchell R, Huss R, Moll U, Muller W, Bucala R (2003) The p53-dependent effects of macrophage migration inhibitory factor revealed by gene targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(16):9354-9
- 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
- Frungieri MB, Weidinger S, Meineke V, Kohn FM, Mayerhofer A (2002) Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPARgamma : Possible relevance to human fibrotic disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(23):15072-7
- Garai J, Lorand T (2009) Macrophage migration inhibitory factor (MIF) tautomerase inhibitors as potential novel anti-inflammatory agents: current developments. *Curr Med Chem* 16(9):1091-114
- Gregersen PK, Bucala R (2003) Macrophage migration inhibitory factor, MIF alleles, and the genetics of inflammatory disorders: incorporating disease outcome into the definition of phenotype. *Arthritis Rheum* 48(5):1171-6
- Gregory JL, Morand EF, McKeown SJ, Ralph JA, Hall P, Yang YH, McColl SR, Hickey MJ (2006) Macrophage migration inhibitory factor induces macrophage recruitment via CC chemokine ligand 2. *J Immunol* 177(11):8072-9
- Guazzone VA, Jacobo P, Theas MS, Lustig L (2009) Cytokines and chemokines in testicular inflammation: A brief review. *Microsc Res Tech* 72(8):620-8
- Haag P, Hanhart N, Müller M (2006) Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis: inkl. Geburtshilfe, Reproduktionsmedizin, Sexualmedizin, Andrologie u. Venerologie ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges und der mündlichen Examina in den ärztlichen Prüfungen 2007/08. Breisach am Rhein, Medizinische Verlags- u. Informationsdienste
- He G, Holcroft CA, Beauchamp MC, Yasmeen A, Ferenczy A, Kendall-Dupont J, Mes-Masson AM, Provencher D, Gotlieb WH (2012) Combination of serum biomarkers to differentiate malignant from benign ovarian tumours. *J Obstet Gynaecol Can* 34(6):567-74

- Hedger MP (1997) Testicular leukocytes: what are they doing? *Rev Reprod* 2(1):38-47
- Hedger MP, Meinhardt A (2003) Cytokines and the immune-testicular axis. *J Reprod Immunol* 58(1):1-26
- Hedger M, Klug J, Frohlich S, Muller R, Meinhardt A (2005) Regulatory cytokine expression and interstitial fluid formation in the normal and inflamed rat testis are under leydig cell control. *J Androl* 26(3):379-86
- Hirokawa J, Sakaue S, Tagami S, Kawakami Y, Sakai M, Nishi S, Nishihira J (1997) Identification of macrophage migration inhibitory factor in adipose tissue and its induction by tumor necrosis factor-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 235(1):94-8
- Imamura K, Nishihira J, Suzuki M, Yasuda K, Sasaki S, Kusunoki Y, Tochimaru H, Takekoshi Y (1996) Identification and immunohistochemical localization of macrophage migration inhibitory factor in human kidney. *Biochem Mol Biol Int* 40(6):1233-42
- Iosub R, Klug J, Fijak M, Schneider E, Frohlich S, Blumbach K, Wennemuth G, Sommerhoff CP, Steinhoff M, Meinhardt A (2006) Development of testicular inflammation in the rat involves activation of proteinase-activated receptor-2. *J Pathol* 208(5):686-98
- Jaworski DC, Jasinskas A, Metz CN, Bucala R, Barbour AG (2001) Identification and characterization of a homologue of the pro-inflammatory cytokine Macrophage Migration Inhibitory Factor in the tick, *Amblyomma americanum*. *Insect Mol Biol* 10(4):323-31
- Juttner S, Bernhagen J, Metz CN, Rollinghoff M, Bucala R, Gessner A (1998) Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF-alpha. *J Immunol* 161(5):2383-90
- Khan SA, Mirsafian M, Howdeshell K, Dorrington JH (1999) Transforming growth factor-beta inhibits DNA synthesis in immature rat Leydig cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 148(1-2):21-8
- Kithcart AP, Cox GM, Sielecki T, Short A, Pruitt J, Papenfuss T, Shawler T, Gienapp I, Satoskar AR, Whitacre CC (2010) A small-molecule inhibitor of macrophage migration inhibitory factor for the treatment of inflammatory disease. *FASEB J* 24(11):4459-66
- Kleemann R, Kapurniotu A, Frank RW, Gessner A, Mischke R, Flieger O, Juttner S, Brunner H, Bernhagen J (1998) Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase. *J Mol Biol* 280(1):85-102
- Kleemann R, Bucala R (2010) Macrophage migration inhibitory factor: critical role in obesity, insulin resistance, and associated comorbidities. *Mediators Inflamm* 2010:610479

- Kohno S, Munoz JA, Williams TM, Teuscher C, Bernard CC, Tung KS (1983) Immunopathology of murine experimental allergic orchitis. *J Immunol* 130(6):2675-82
- Leech M, Metz C, Hall P, Hutchinson P, Gianis K, Smith M, Weedon H, Holdsworth SR, Bucala R, Morand EF (1999) Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheum* 42(8):1601-8
- Leech M, Lacey D, Xue JR, Santos L, Hutchinson P, Wolvetang E, David JR, Bucala R, Morand EF (2003) Regulation of p53 by macrophage migration inhibitory factor in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 48(7):1881-9
- 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
- Lui WY, Cheng CY (2007) Regulation of cell junction dynamics by cytokines in the testis: a molecular and biochemical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev* 18(3-4):299-311
- Lustig L, Lourtau L, Perez R, Doncel GF (1993) Phenotypic characterization of lymphocytic cell infiltrates into the testes of rats undergoing autoimmune orchitis. *Int J Androl* 16(4):279-84
- Malamud V, Vaaknin A, Abramsky O, Mor M, Burgess LE, Ben-Yehudah A, Lorberboum-Galski H (2003) Tryptase activates peripheral blood mononuclear cells causing the synthesis and release of TNF-alpha, IL-6 and IL-1 beta: possible relevance to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 138(1-2):115-22
- Matsuda A, Tagawa Y, Matsuda H, Nishihira J (1996) Identification and immunohistochemical localization of macrophage migration inhibitory factor in human cornea. *FEBS Lett* 385(3):225-8
- McInnes A, Rennick DM (1988) Interleukin 4 induces cultured monocytes/macrophages to form giant multinucleated cells. *J Exp Med* 167(2):598-611
- Meinhardt A, Bacher M, McFarlane JR, Metz CN, Seitz J, Hedger MP, de Kretser DM, Bucala R (1996) Macrophage migration inhibitory factor production by Leydig cells: evidence for a role in the regulation of testicular function. *Endocrinology* 137(11):5090-5
- Meinhardt A, Bacher M, Metz C, Bucala R, Wreford N, Lan H, Atkins R, Hedger M (1998) Local regulation of macrophage subsets in the adult rat testis: examination of the roles of the seminiferous tubules, testosterone, and macrophage-migration inhibitory factor. *Biol Reprod* 59(2):371-8
- Meinhardt A, Bacher M, O'Bryan MK, McFarlane 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* 112 (Pt 9):1337-44

- Miike S, McWilliam AS, Kita H (2001) Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor-2. *J Immunol* 167(11):6615-22
- Mischke R, Kleemann R, Brunner H, Bernhagen J (1998) Cross-linking and mutational analysis of the oligomerization state of the cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF). *FEBS Lett* 427(1):85-90
- 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
- Mitchell RA, Liao H, Chesney J, Fingerle-Rowson G, Baugh J, David J, Bucala R (2002) Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(1):345-50
- Morand EF (2005) New therapeutic target in inflammatory disease: macrophage migration inhibitory factor. *Intern Med J* 35(7):419-26
- Morelli AE, Zahorchak AF, Larregina AT, Colvin BL, Logar AJ, Takayama T, Falo LD, Thomson AW (2001) Cytokine production by mouse myeloid dendritic cells in relation to differentiation and terminal maturation induced by lipopolysaccharide or CD40 ligation. *Blood* 98(5):1512-23
- Muhlhahn P, Bernhagen J, Czisch M, Georgescu J, Renner C, Ross A, Bucala R, Holak TA (1996) NMR characterization of structure, backbone dynamics, and glutathione binding of the human macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Protein Sci* 5(10):2095-103
- Muller R, Klug J, Rodewald M, Meinhardt A (2005) Macrophage migration inhibitory factor suppresses transforming growth factor-beta2 secretion in cultured rat testicular peritubular cells. *Reprod Fertil Dev* 17(4):435-8
- Niederberger C, Joyce GF, Wise M, Meacham RB (2007) Male Infertility. *Urologic Diseases in America*:459-482
- Niemi M, Sharpe RM, Brown WR (1986) Macrophages in the interstitial tissue of the rat testis. *Cell Tissue Res* 243(2):337-44
- Nieschlag E (1997) Classification of andrological disorders. In Nieschlag, E und Behre, H (Hrsg.) *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. Springer Verlag, Berlin, 81-83
- Nishibori M, Nakaya N, Tahara A, Kawabata M, Mori S, Saeki K (1996) Presence of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in ependyma, astrocytes and neurons in the bovine brain. *Neurosci Lett* 213(3):193-6
- Nishino T, Bernhagen J, Shiiki H, Calandra T, Dohi K, Bucala R (1995) Localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotrophic and thyrotrophic cells of the pituitary gland. *Mol Med* 1(7):781-8

- Nystedt S, Emilsson K, Larsson AK, Strombeck B, Sundelin J (1995) Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2. *Eur J Biochem* 232(1):84-9
- Nystedt S, Ramakrishnan V, Sundelin J (1996) The proteinase-activated receptor 2 is induced by inflammatory mediators in human endothelial cells. Comparison with the thrombin receptor. *J Biol Chem* 271(25):14910-5
- Ohkawara T, Nishihira J, Takeda H, Hige S, Kato M, Sugiyama T, Iwanaga T, Nakamura H, Mizue Y, Asaka M (2002) Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis by anti-macrophage migration inhibitory factor antibody in mice. *Gastroenterology* 123(1):256-70
- Ohkawara T, Koyama Y, Onodera S, Takeda H, Kato M, Asaka M, Nishihira J (2011) DNA vaccination targeting macrophage migration inhibitory factor prevents murine experimental colitis. *Clin Exp Immunol* 163(1):113-22
- Onodera S, Suzuki K, Matsuno T, Kaneda K, Kuriyama T, Nishihira J (1996) Identification of macrophage migration inhibitory factor in murine neonatal calvariae and osteoblasts. *Immunology* 89(3):430-5
- Onodera S, Suzuki K, Matsuno T, Kaneda K, Takagi M, Nishihira J (1997) Macrophage migration inhibitory factor induces phagocytosis of foreign particles by macrophages in autocrine and paracrine fashion. *Immunology* 92(1):131-7
- 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
- Onodera S, Ohshima S, Tohyama H, Yasuda K, Nishihira J, Iwakura Y, Matsuda I, Minami A, Koyama Y (2007) A novel DNA vaccine targeting macrophage migration inhibitory factor protects joints from inflammation and destruction in murine models of arthritis. *Arthritis Rheum* 56(2):521-30
- Ouertatani-Sakouhi H, El-Turk F, Fauvet B, Cho MK, Pinar Karpinar D, Le Roy D, Dewor M, Roger T, Bernhagen J, Calandra T, Zweckstetter M, Lashuel HA (2010) Identification and characterization of novel classes of macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibitors with distinct mechanisms of action. *J Biol Chem* 285(34):26581-98
- Pan JH, Lindholt JS, Sukhova GK, Baugh JA, Henneberg EW, Bucala R, Donnelly SC, Libby P, Metz C, Shi GP (2003) Macrophage migration inhibitory factor is associated with aneurysmal expansion. *J Vasc Surg* 37(3):628-35
- Pelletier RM, Nemirovsky MS, Calvert R, Hugon JS (1981) Effects of immunization with Freund's complete adjuvant and isologous spermatozoa on the seminiferous epithelium and blood-testis barrier in guinea pigs. *Anat Rec* 199(2):197-211
- Plant BJ, Ghani S, O'Mahony MJ, Morgan L, O'Connor CM, Morgan K, Baugh JA, Donnelly SC (2007) Sarcoidosis and MIF gene polymorphism: a case-control study in an Irish population. *Eur Respir J* 29(2):325-9

- Pozzi LA, Weiser WY (1992) Human recombinant migration inhibitory factor activates human macrophages to kill tumor cells. *Cell Immunol* 145(2):372-9
- Pöllänen P, Niemi M (1987) Immunohistochemical identification of macrophages, lymphoid cells and HLA antigens in the human testis. *Int J Androl* 10(1):37-42
- Prencipe G, Auriti C, Inglese R, Devito R, Ronchetti MP, Seganti G, Rava L, Orzalesi M, De Benedetti F (2011) A polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor promoter is associated with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res* 69(2):142-7
- Rendon JL, Choudhry MA (2012) Th17 cells: critical mediators of host responses to burn injury and sepsis. *J Leukoc Biol* 92(3):529-38
- Renner P, Roger T, Calandra T (2005) Macrophage migration inhibitory factor: gene polymorphisms and susceptibility to inflammatory diseases. *Clin Infect Dis* 41 Suppl 7:S513-9
- Renner P, Roger T, Bochud PY, Sprong T, Sweep FC, Bochud M, Faust SN, Haralambous E, Betts H, Chanson AL, Reymond MK, Mermel E, Erard V, van Deuren M, Read RC, Levin M, Calandra T (2012) A functional microsatellite of the macrophage migration inhibitory factor gene associated with meningococcal disease. *FASEB J* 26(2):907-16
- Rich A, Lewis M (1932) Migration of neutrophils and macrophages. *Bull. John Hopkins Hosp.*(50):115-31
- Riedemann NC, Guo RF, Gao H, Sun L, Hoesel M, Hollmann TJ, Wetsel RA, Zetoune FS, Ward PA (2004) Regulatory role of C5a on macrophage migration inhibitory factor release from neutrophils. *J Immunol* 173(2):1355-9
- Rival C, Theas MS, Guazzone VA, Lustig L (2006) Interleukin-6 and IL-6 receptor cell expression in testis of rats with autoimmune orchitis. *J Reprod Immunol* 70(1-2):43-58
- Rival C, Guazzone VA, von Wulffen W, Hackstein H, Schneider E, Lustig L, Meinhardt A, Fijak M (2007) Expression of co-stimulatory molecules, chemokine receptors and proinflammatory cytokines in dendritic cells from normal and chronically inflamed rat testis. *Mol Hum Reprod* 13(12):853-61
- Rival C, Theas MS, Suescun MO, Jacobo P, Guazzone V, van Rooijen N, Lustig L (2008) Functional and phenotypic characteristics of testicular macrophages in experimental autoimmune orchitis. *J Pathol* 215(2):108-17
- Roger T, David J, Glauser MP, Calandra T (2001) MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature* 414(6866):920-4
- 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

- Rossi AG, Haslett C, Hirani N, Greening AP, Rahman I, Metz CN, Bucala R, Donnelly SC (1998) Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in asthma. *J Clin Invest* 101(12):2869-74
- Saari T, Jahnukainen K, Pollanen P (1996) Autoantigenicity of the basal compartment of seminiferous tubules in the rat. *J Reprod Immunol* 31(1-2):65-79
- Sakai Y, Masamune A, Satoh A, Nishihira J, Yamagiwa T, Shimosegawa T (2003) Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of severe acute pancreatitis. *Gastroenterology* 124(3):725-36
- Sanchez-Zamora Y, Terrazas LI, Vilches-Flores A, Leal E, Juarez I, Whitacre C, Kithcart A, Pruitt J, Sielecki T, Satoskar AR, Rodriguez-Sosa M (2010) Macrophage migration inhibitory factor is a therapeutic target in treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *FASEB J* 24(7):2583-90
- Santos L, Hall P, Metz C, Bucala R, Morand EF (2001) Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in murine antigen-induced arthritis: interaction with glucocorticoids. *Clin Exp Immunol* 123(2):309-14
- Schulz R, Marchenko ND, Holembowski L, Fingerle-Rowson G, Pesic M, Zender L, Dobbstein M, Moll UM Inhibiting the HSP90 chaperone destabilizes macrophage migration inhibitory factor and thereby inhibits breast tumor progression. *J Exp Med* 209(2):275-89
- Schuppe HC, Meinhardt A (2005) Immune privilege and inflammation of the testis. *Chem Immunol Allergy* 88:1-14
- Schuppe HC, Meinhardt A, Allam JP, Bergmann M, Weidner W, Haidl G (2008) Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility? *Andrologia* 40(2):84-91
- Shachar I, Haran M (2011) The secret second life of an innocent chaperone: the story of CD74 and B cell/chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Leuk Lymphoma* 52(8):1446-54
- Shimizu T, Nishihira J, Watanabe H, Abe R, Honda A, Ishibashi T, Shimizu H (2004) Macrophage migration inhibitory factor is induced by thrombin and factor Xa in endothelial cells. *J Biol Chem* 279(14):13729-37
- Shpacovitch VM, Varga G, Strey A, Gunzer M, Mooren F, Buddenkotte J, Vergnolle N, Sommerhoff CP, Grabbe S, Gerke V, Homey B, Hollenberg M, Luger TA, Steinhoff M (2004) Agonists of proteinase-activated receptor-2 modulate human neutrophil cytokine secretion, expression of cell adhesion molecules, and migration within 3-D collagen lattices. *J Leukoc Biol* 76(2):388-98
- Steinhoff M, Buddenkotte J, Shpacovitch V, Rattenholl A, Moormann C, Vergnolle N, Luger TA, Hollenberg MD (2005) Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev* 26(1):1-43
- Stéphan JP, Syed V, Jegou B (1997) Regulation of Sertoli cell IL-1 and IL-6 production in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 134(2):109-18

- Strüßmann T, Tillmann S, Wirtz T, Bucala R, von Hundelshausen P, Bernhagen J (2013) Platelets are a previously unrecognised source of MIF. *Thromb Haemost* 110(3)
- Suescun MO, Calandra RS, Lustig L (1994) Alterations of testicular function after induced autoimmune orchitis in rats. *J Androl* 15(5):442-8
- Suescun MO, Rival C, Theas MS, Calandra RS, Lustig L (2003) Involvement of tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis of autoimmune orchitis in rats. *Biol Reprod* 68(6):2114-21
- Sugimoto H, Suzuki M, Nakagawa A, Tanaka I, Nishihira J (1996) Crystal structure of macrophage migration inhibitory factor from human lymphocyte at 2.1 Å resolution. *FEBS Lett* 389(2):145-8
- Sun HW, Swope M, Cinquina C, Bedarkar S, Bernhagen J, Bucala R, Lolis E (1996) The subunit structure of human macrophage migration inhibitory factor: evidence for a trimer. *Protein Eng* 9(8):631-5
- Sun HW, Bernhagen J, Bucala R, Lolis E (1996) Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(11):5191-6
- Suzuki M, Sugimoto H, Nakagawa A, Tanaka I, Nishihira J, Sakai M (1996) Crystal structure of the macrophage migration inhibitory factor from rat liver. *Nat Struct Biol* 3(3):259-66
- Suzuki T, Ogata A, Tashiro K, Nagashima K, Tamura M, Nishihira J (1999) Augmented expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the telencephalon of the developing rat brain. *Brain Res* 816(2):457-62
- Takahashi M, Nishihira J, Shimpo M, Mizue Y, Ueno S, Mano H, Kobayashi E, Ikeda U, Shimada K (2001) Macrophage migration inhibitory factor as a redox-sensitive cytokine in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 52(3):438-45
- Tesch GH, Nikolic-Paterson DJ, Metz CN, Mu W, Bacher M, Bucala R, Atkins RC, Lan HY (1998) Rat mesangial cells express macrophage migration inhibitory factor in vitro and in vivo. *J Am Soc Nephrol* 9(3):417-24
- Theas MS, Rival C, Jarazo-Dietrich S, Jacobo P, Guazzone VA, Lustig L (2008) Tumour necrosis factor-alpha released by testicular macrophages induces apoptosis of germ cells in autoimmune orchitis. *Hum Reprod* 23(8):1865-72
- Thurman GB, Braude IA, Gray PW, Oldham RK, Stevenson HC (1985) MIF-like activity of natural and recombinant human interferon-gamma and their neutralization by monoclonal antibody. *J Immunol* 134(1):305-9
- Tung KS, Teuscher C (1995) Mechanisms of autoimmune disease in the testis and ovary. *Hum Reprod Update* 1(1):35-50

- Vera PL, Wolfe TE, Braley AE, Meyer-Siegler KL (2010) Thrombin induces macrophage migration inhibitory factor release and upregulation in urothelium: a possible contribution to bladder inflammation. *PLoS One* 5(12):e15904
- Vergnolle N (2009) Protease-activated receptors as drug targets in inflammation and pain. *Pharmacol Ther* 123(3):292-309
- Verjans E, Noetzel E, Bektas N, Schutz AK, Lue H, Lennartz B, Hartmann A, Dahl E, Bernhagen J (2009) Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human breast cancer. *BMC Cancer* 9:230
- Verschuren L, Kooistra T, Bernhagen J, Voshol PJ, Ouwens DM, van Erk M, de Vries-van der Weij J, Leng L, van Bockel JH, van Dijk KW, Fingerle-Rowson G, Bucala R, Kleemann R (2009) MIF deficiency reduces chronic inflammation in white adipose tissue and impairs the development of insulin resistance, glucose intolerance, and associated atherosclerotic disease. *Circ Res* 105(1):99-107
- Waeber G, Calandra T, Roduit R, Haefliger JA, Bonny C, Thompson N, Thorens B, Temler E, Meinhardt A, Bacher M, Metz CN, Nicod P, Bucala R (1997) Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9):4782-7
- Wang J, Wreford NG, Lan HY, Atkins R, Hedger MP (1994) Leukocyte populations of the adult rat testis following removal of the Leydig cells by treatment with ethane dimethane sulfonate and subcutaneous testosterone implants. *Biol Reprod* 51(3):551-61
- Weidinger S, Mayerhofer A, Frungieri MB, Meineke V, Ring J, Kohn FM (2003) Mast cell-sperm interaction: evidence for tryptase and proteinase-activated receptors in the regulation of sperm motility. *Hum Reprod* 18(12):2519-24
- Weidner W, Krause W, Ludwig M (1999) Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis. *Hum Reprod Update* 5(5):421-32
- Welsch U, Sobotta J (2006) Sobotta Lehrbuch Histologie Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. München, Urban & Fischer
- Wiener Z, Falus A, Toth S (2004) IL-9 increases the expression of several cytokines in activated mast cells, while the IL-9-induced IL-9 production is inhibited in mast cells of histamine-free transgenic mice. *Cytokine* 26(3):122-30
- Wistow GJ, Shaughnessy MP, Lee DC, Hodin J, Zelenka PS (1993) A macrophage migration inhibitory factor is expressed in the differentiating cells of the eye lens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(4):1272-5
- Wymann D, Bluggel M, Kalbacher H, Blesken T, Akdis CA, Meyer HE, Blaser K (1999) Human B cells secrete migration inhibition factor (MIF) and present a naturally processed MIF peptide on HLA-DRB1*0405 by a FXXL motif. *Immunology* 96(1):1-9

- Xu X, Wang B, Ye C, Yao C, Lin Y, Huang X, Zhang Y, Wang S (2008) Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis in human breast cancer. *Cancer Lett* 261(2):147-57
- Yabunaka N, Nishihira J, Mizue Y, Tsuji M, Kumagai M, Ohtsuka Y, Imamura M, Asaka M (2000) Elevated serum content of macrophage migration inhibitory factor in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 23(2):256-8
- Yamada H, Kato EH, Morikawa M, Shimada S, Saito H, Watari M, Minakami H, Nishihira J (2003) Decreased serum levels of macrophage migration inhibition factor in miscarriages with normal chromosome karyotype. *Hum Reprod* 18(3):616-20
- Yule TD, Montoya GD, Russell LD, Williams TM, Tung KS (1988) Autoantigenic germ cells exist outside the blood testis barrier. *J Immunol* 141(4):1161-7
- Zhang Y, Zeng X, Chen S, Zhang Z, Li P, Yi W, Huang H, Yao J, Li S, Hu C (2011) Characterization, epitope identification and mechanisms of the anti-septic capacity of monoclonal antibodies against macrophage migration inhibitory factor. *Int Immunopharmacol* 11(9):1333-40

11. DANKSAGUNGEN

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Andreas Meinhardt meinen Dank aussprechen für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe mit einem hervorragenden Team zusammenarbeiten zu können und für das Vertrauen, dass es eines Tages soweit sein würde.

Ein spezieller Dank geht an Ana-Maria „Anca“ Filip, die meine ersten Schritte im Labor begleitete und mich immer unterstützte.

Ich möchte Suada Fröhlich und Eva Schneider ganz besonders danken für die stimmungsvolle Zeit im Labor.

Ich danke Martin Bodenbenner und Tamara Papadakis für Ihre Geduld mit mir.

Für die finanzielle Unterstützung möchte ich der FAZit-Stiftung danken, die mir eine konzentrierte Arbeit während meiner Versuchsphase ermöglichte.

Ich möchte allen meinen Kollegen aus dem Labor danken: Dr. Jörg Klug für die kritischen Anmerkungen, Dr. Monika Fijak für ihre fachliche Unterstützung, Radu Iosub für die geleistete Vorarbeit, Sevil Cayli und Sudhanshu Bhushan.

Es gibt noch so viele Menschen, die mich über diesen langen Zeitraum hin immer wieder aufgebaut haben und denen mein ganz besonderer Dank gilt.

Nicht genug danken kann ich Iris Eckhardt, die -wie niemand sonst- nachvollziehen kann, was alles in dieser Arbeit steckt. Du hast mich auf diesem Weg begleitet und warst immer für mich da. DANKE!

12. ABSTRACTS

Benjamin SCHWAB, Andreas Meinhardt. Regulation of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Chronic Inflammation of the Testis. *Workshop Molecular Andrology, Gießen, Germany, 8. - 10. Mai 2009.*

Benjamin SCHWAB, Johanna Jud, Karl Bodenschatz. Falldarstellung: Ösophagotracheale H-Fistel mit thorakoskopischer Klippung. *129. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Berlin, Germany, 24. - 27. April 2012.*

Benjamin SCHWAB, Karl Bodenschatz. Kindliche Pfählungsverletzungen des Abdomens - Diagnostik und Therapie anhand von Fallbeispielen. *130. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, München, Germany, 30. April - 3. Mai 2013.*

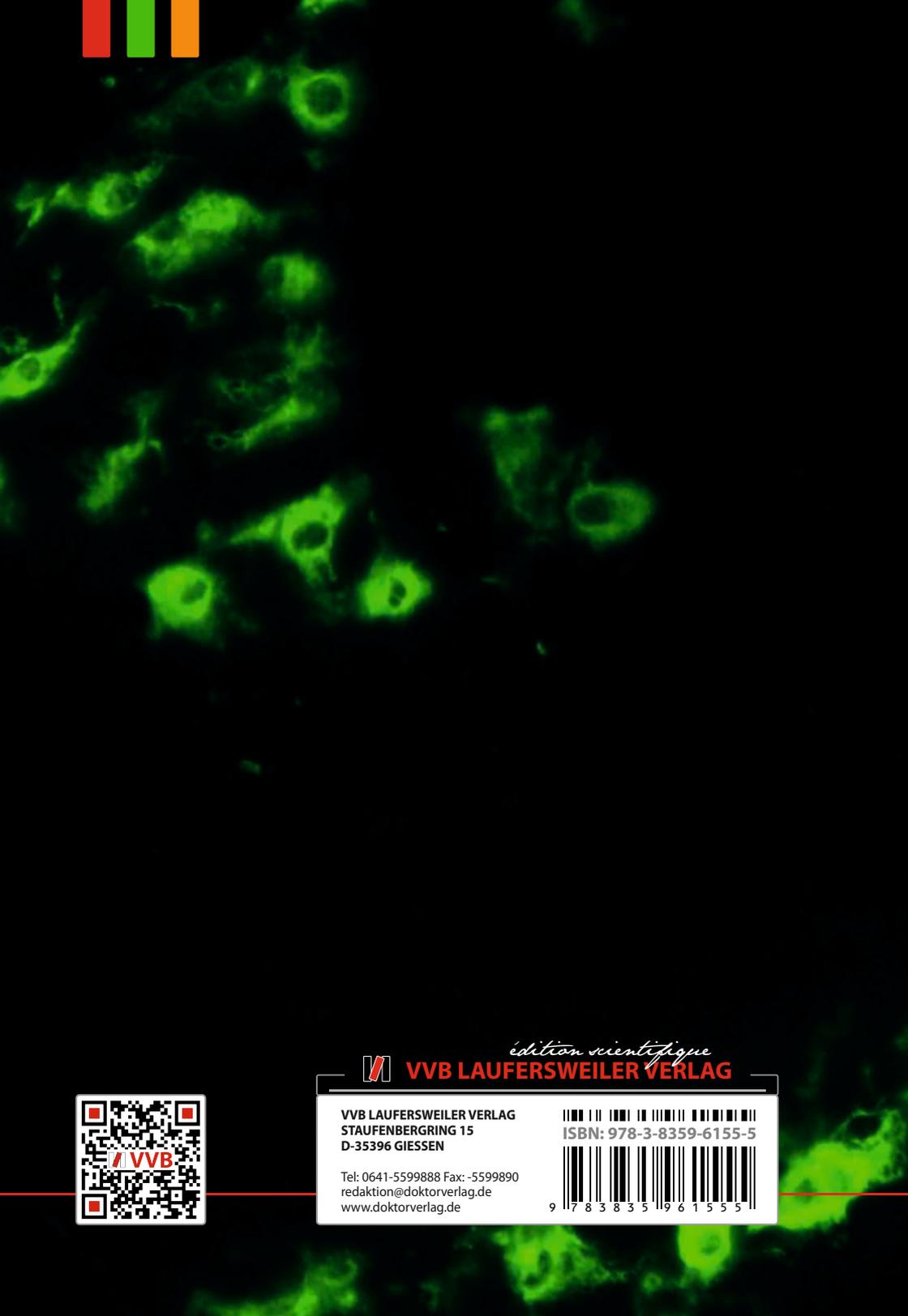
Benjamin SCHWAB. Die Generation Y in der Kinderchirurgie – Möglichkeiten und Probleme. *109. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrie, Düsseldorf, Germany, 12. - 15. September 2013.*

13. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Nürnberg, den 22.07.2013

Benjamin Schwab-Eckhardt



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6155-5



9 783835 196155