

**Signaltransduktion des Zytokins
Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor
(MIF) im Hoden der Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Ruth Müller

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2004

© 2004 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen
Printed in Germany

ISBN 3-936815-94-1

Verlag: DVG Service GmbH
Frankfurter Straße 89
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@divg.net
www.divg.net

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und
-Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. R. Leiser

und

aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-
Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. A. Meinhardt

**Signaltransduktion des Zytokins
Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor
(MIF) im Hoden der Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Ruth Müller
Tierärztin aus Limburg a. d. Lahn

Gießen 2004

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. h.c. R. Leiser

Prof. Dr. A. Meinhardt

PD Dr. G. Schuler

Tag der Disputation: 26. 04. 2004

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Der Hoden	1
1.1.1	Lage und Morphologie des humanen Hodens	1
1.1.2	Funktionelle Organisation des Hodens	1
1.1.2.1	Das interstitielle Kompartiment	2
1.1.2.2	Das tubuläre Kompartiment	2
1.1.3	Struktur und Funktion der Peritubulärzellen	3
1.1.4	Struktur und Funktion der Sertoli-Zellen	4
1.1.5	Die endokrine und parakrine Steuerung der Hodenfunktion	6
1.2	Immunologie des Hodens	7
	<i>Der Hoden als immunprivilegiertes Organ</i>	7
1.2.1	Rolle von Zytokinen im Immunprivileg des Hodens	8
1.2.2	Der Transforming-Growth-Faktor- β im Hoden	9
1.2.3	Der Tumornekrose-Faktor- α im Hoden	10
1.3	Der Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF)	10
1.3.1	Struktur und enzymatische Aktivität von MIF	10
1.3.2	Funktion und Lokalisation von MIF	12
1.3.2.1	MIF als Hormon	12
1.3.2.2	Pro-inflammatorische Eigenschaften von MIF	12
1.3.2.3	Rolle von MIF in der Zellproliferation, Angiogenese und Tumorgenese	14
1.3.3	Der molekulare Wirkungsmechanismus von MIF	14
1.3.4	MIF im Hoden	16
1.3.5	Signaltransduktion von MIF in testikulären Zellen	17
1.4	Zielsetzung der Arbeit	18

2	MATERIAL	19
2.1	Reagenzien und Versuchsmaterial	19
2.2	Verwendete Zellkultur-Medien.....	20
2.3	Versuchstiere.....	20
2.4	Verwendete Lösungen	21
3	METHODEN	25
3.1	Zellkultur-Methoden	25
3.1.1	Präparation und Kultivierung von Peritubulärzellen	25
3.1.2	Präparation und Kultivierung von Sertoli-Zellen.....	27
3.1.3	Bestimmung der Zellzahl	27
3.1.4	Stimulation der Zellen mit Makrophagen-Migrations- Inhibitions-Faktor	28
3.2	Morphologische Nachweisverfahren	28
3.2.1	Immunzytochemie an kultivierten Peritubulär- und Sertoli- Zellen	28
3.2.2	Öl-Rot-O-Färbung von kultivierten Sertoli-Zellen (SCs)	29
3.3	Biochemische Methoden	30
3.3.1	Western-Blot-Analyse	30
3.3.1.1	Gewinnung der Proben für die Western-Blot-Analyse	30
3.3.1.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
3.3.1.3	NuPAGE® BIS-TRIS Gelelektrophorese mit Fertiggelelektrophoren.....	31
3.3.1.4	Coomassie-Blau-Färbung.....	31
3.3.1.5	Western-Blot-Analyse	32
3.3.1.6	Ponceau-S-Färbung	33
3.3.1.7	Immunoblot-Analyse	33
3.3.1.8	Nitrozellulose-Membran-Stripping.....	35
3.3.2	Enzyme-linked-immunosorbent-Assay.....	36

3.3.2.1	Messung des zyklischen AMP in MIF-stimulierten Sertoli-Zellen.....	36
3.3.2.2	Bestimmung des TGF- β 2-Proteingehaltes in Kulturüberständen MIF-stimulierter Peritubulärzellen.....	36
3.3.2.3	Bestimmung des TNF- α -Proteingehaltes in Kulturüberständen MIF-stimulierter Peritubulärzellen	38
3.3	Molekularbiologische Methoden	39
3.3.1	Nukleinsäureanalytik.....	39
3.3.1.1	Arbeiten mit RNA	39
3.3.1.2	RNA-Isolierung aus Kulturzellen	39
3.3.1.3	Spektrophotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	40
3.3.1.4	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	40
3.3.1.5	Real-time-PCR.....	44
4.	ERGEBNISSE	46
4.1	Zellkultur	46
4.1.1	Isolierung von Peritubulärzellen.....	46
4.1.2	Isolierung von Sertoli-Zellen	47
4.2	Untersuchungen zur Signaltransduktion	49
4.2.1	Rolle von cAMP am MIF-induzierten-Signaltransduktionsweg in Sertoli-Zellen	49
4.2.2	Phosphorylierung von Signalmolekülen	50
4.2.2.1	Probengewinnung.....	51
4.2.2.2	Tyrosinphosphorylierungsmuster MIF-stimulierter Peritubulär- bzw. Sertoli-Zellen	51
4.2.2.3	Threoninphosphorylierungsmuster MIF-stimulierter Peritubulär- bzw. Sertoli-Zellen	53
4.2.2.4	Serinphosphorylierungsmuster MIF-stimulierter Peritubulär- bzw. Sertoli-Zellen	54
4.2.3	Aktivierung der p44/p42-MAPK (ERK-1/2).....	55

4.3	Untersuchungen zur biologischen Wirkung von MIF auf Peritubulärzellen	57
4.3.1	Sekretion von TGF- β 2	57
4.3.2	Expression von TGF- β 2.....	58
4.3.2.1	Kontrolle der RNA-Isolierung	59
4.3.2.2	Kontrolle der Reinheit der isolierten RNA	59
4.3.2.3	Kontrolle der cDNA-Synthese.....	60
4.3.2.4	Durchführung und Auswertung der Real-Time-PCR.....	60
4.3.2.5	Expression von TGF- β 2 in Peritubulärzellen nach MIF- Stimulation.....	65
4.3.3	Sekretion von TNF- α	66
5.	DISKUSSION.....	67
5.1	Untersuchungen zur Signaltransduktion	67
5.1.1	Untersuchungen zu einer Beteiligung des Proteinkinase A- Weges an der MIF-Signaltransduktion in Sertoli-Zellen.....	67
5.1.2	Untersuchungen zum Tyrosin-, Threonin- und Serin- Phosphorylierungsmuster MIF-stimulierter Peritubulär- und Sertoli-Zellen.....	68
5.1.3	Untersuchungen zu einer Aktivierung der ERK-1/2-MAPK in MIF-stimulierten Peritubulär- und Sertoli-Zellen.....	69
5.1.4	Untersuchungen zu einer Rezeptor-vermittelten Wirkung von MIF in Peritubulärzellen	72
5.1.5	Aktivierung der ERK-1/2 durch Mediumwechsel bei Peritubulär- und Sertoli-Zellen	74
5.2	Die Rolle von MIF im Immunprivileg des Hodens.....	76
5.2.1	Aufbau des Immunprivilegs des Hodens.....	76
5.2.2	Untersuchungen zu einem Einfluss von MIF auf die TGF- β 2-Sekretion in Peritubulärzellen.....	78
5.2.3	Beteiligung der Proteinkinase C an der Vermittlung des Effektes von MIF auf die TGF- β 2-Sekretion.....	79

5.2.4	Untersuchungen zum Effekt von MIF auf die TNF- α -Sekretion von Peritubulärzellen	81
5.2.5	Einfluss von MIF auf die Zytokinbalance des Hodens.....	81
5.3	Ausblick	82
6.	ZUSAMMENFASSUNG	83
6.1	Zusammenfassung.....	83
6.2	Summary.....	84
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	85
8.	ANHANG	100
8.1	Danksagung.....	100
8.2	Ehrenwörtliche Erklärung.....	102

Abkürzungen

Å	Angström
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ABP	Androgen-Bindendes-Protein
A. dest.	Aqua destillata
Ak	Antikörper
AP-1	Aktivator-Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
bFGF	basic-Fibroblast-Growth-Factor
BMP	Bone-Morphogenetic-Protein
bp	base pairs (Basenpaare)
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
Ca²⁺	Calciumionen
cAMP	cyclic Adenosine-3'5'-Monophosphate
CD74	Cluster of Differentiation 74
cDNA	DNA-Kopie der RNA, komplementäre DNA
CO₂	Kohlendioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRF	Corticotropin-Releasing-Factor
CSN5	COP9 Signalosom Untereinheit 5
Cy3	Indocarbocyanid
DAPI	Diamidin-2'-Phenylindol-dihydrochlorid
d.h.	dass heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
ECL	enhanced chemiluminescence system
EDS	Ethan-Dimethan-Sulfonat

EDTA	E thylendiamintetraacetat
EGF	E pidermal- G rowth- F actor
ELISA	E nzyme- L inked- I mmunosorbent- A ssay
ER	E ndoplasmatisches R eticulum
ERK	E xtrazellulär Signal-regulierte K inase
et al.	und Mitarbeiter
FKS	F oetales K älberserum
FSH	F ollikelstimulierendes H ormon
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GAPDH	G lycerin- A ldehyd- P hosphat- D ehydrogenase
GnRH	G onadotropin- R eleasing- H ormone
h	hour(s) [Stunde(n)]
HMVEC	H uman- M icrovascular- E ndothelial- C ells
HVL	H ypophysenvorderlappen
IgG	I mmunglobulin G
IgM	I mmunglobulin M
IL	I nterleukin
Jab-1	J un activation domain b inding protein- 1
JNK	J un- N -terminale K inase (J anuskinase)
kb	K ilobasenpaare
KCl	K aliumchlorid
l	L iter
LH	L uteinisierendes H ormon
LIF	L eucaemia- I nhibiting- F actor
LPS	L ipopolysaccharide
Lsg.	L ösung
m-	m illi-
M	m olar
MAPK	m itogen aktivierte P roteinkinase
MEK	M APK/ E RK K inase
MgCl₂	M agnesiumchlorid
MIF	M akrophagen- M igrations- I nhibitions- F aktor
min	M inute(n)
Mio	M illionen

MOPS	3-(N- Morpholino) Propan-Sulfon-Säure
mRNA	messenger RNA
μ	Mikro-
μg	Mikrogramm
NaCl	Natriumchlorid
NGF	Nerve-Growth-Factor
nm	Nanometer
OD_{nm}	optische Dichte (Index nm gibt Meßwellenlänge an)
PBS	phosphate buffered saline (Natriumphosphat-Puffer)
PCs	peritubular cells (Peritubulärzellen)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	Platelet-Derived-Growth-Factor
PK	Proteinase K
PKC	Proteinkinase C
PmodS	Peritubular cell factor that modulates Sertoli-cell function
RA	Rheumatoide Arthritis
rec MIF	rekombinantes in E. coli exprimiertes MIF
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Chain-Reaktion
SCs	Sertoli-cell (Sertoli-Zelle)
SCF	Stem-Cell-Factor
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
sec	Sekunde(n)
SGF	Seminiferous-Growth-Factor
Tab.	Tabelle
TEMED	N',N',N',N'- Tetramethylethylendiamin
TGF-β	Transforming-Growth-Factor-β
TLR	Toll-Like-Receptor
TNF-α	Tumor-Nekrosis-Faktor-α
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan

U	Unit (Enzymeinheit)
u.a.	und andere
unverd.	unverdünnt
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
z.B.	zum Beispiel
∅	Durchmesser

1 Einleitung

1.1 *Der Hoden*

1.1.1 Lage und Morphologie des humanen Hodens

Die paarig angelegten Hoden (Testes) befinden sich außerhalb der Bauchhöhle im Hodensack (Skrotum). Sie werden von der Tunica albuginea, einer weißen Bindegewebskapsel, umgeben. Diese verdickt sich dorsal zum Hodenmediastinum und entsendet ca. 250 bindegewebige Septen in das Innere des Hodens, wodurch dieser in zahlreiche Läppchen (Lobuli testis) untergliedert wird. Jedes Hoden-Läppchen enthält 1-4 gewundene Kanälchen (Tubuli seminiferi contorti), die mit dem Keimepithel ausgekleidet sind. Das mehrschichtige Keimepithel besteht aus Keimzellen unterschiedlicher Differenzierungsgrade und aus Sertoli-Zellen. Das tubuläre Kompartiment wird durch die Peritubulärzellen morphologisch vom interstitiellen Kompartiment abgegrenzt. Das Interstitium, welches die Tubuli umgibt, besteht aus lockerem Bindegewebe, in das Leydig-Zellen, Nerven, Blutgefäße und Leukozyten eingebettet sind. Am Mediastinum testis münden die Samenkanälchen über die kurzen Tubuli seminiferi recti in ein Netzwerk aus feinen Kanälchen, das Rete testis. Dieses steht über 10-12 Ductuli efferentes testis mit dem Nebenhodengang (Ductus epididymidis) in Verbindung, welcher in den Samenleiter (Ductus deferens) übergeht (Seitz und Meinhardt, 2002).

1.1.2 Funktionelle Organisation des Hodens

Die Hoden erfüllen zwei wesentliche Aufgaben: die Produktion der Spermatozoen und die Synthese und Sekretion von Hormonen (Androgene, Östrogene, Inhibin, Activin, Gewebshormone) (Weinbauer et al., 1996; Seitz und Meinhardt, 2002). Während die Bildung der Samenzellen in den Tubuli seminiferi abläuft, findet die Produktion der Geschlechtshormone im Interstitium statt. Diese beiden morphologisch voneinander getrennten Kompartimente stehen funktionell in enger Beziehung zueinander (Weinbauer et al., 1996).

1.1.2.1 Das interstitielle Kompartiment

Das Interstitium umgibt das tubuläre Kompartiment und nimmt bei Labortieren 2-6%, bei Menschen 12-15% des Hodenvolumens ein (Weinbauer et al., 1996). Es ist der Ort der Testosteronproduktion, die in den Leydig-Zellen stattfindet. Neben Leydig-Zellen, die mit 10-20% nur in geringem Ausmaß vertreten sind, besteht das Interstitium aus lockerem Bindegewebe, Nervenfasern, Blut-, Lymphgefäßen und Leukozyten (Weinbauer et al., 1996). Die Leukozyten bestehen hauptsächlich aus residenten Makrophagen, aber auch Lymphozyten und subkapsulär gelegenen Monozyten (Hedger, 1997). Die testikulären Makrophagen sind meist in enger Nachbarschaft zu Leydig-Zellen zu finden. Ihre Aktivität wird durch die Entwicklung der Leydig-Zellen aus Vorläuferzellen und durch die Steroidproduktion beeinflusst. Sie unterscheiden sich von Makrophagen anderer Gewebe in einer verminderten Fähigkeit zur Sekretion von IL-1 und TNF- α (Hedger, 1997; Hales, 2002; Hedger, 2002).

1.1.2.2 Das tubuläre Kompartiment

Das tubuläre Kompartiment wird beim Menschen von ca. 600 Samenkanälchen gebildet, die jeweils eine Länge von 30-80 cm besitzen. Sie sind mit dem Keimepithel ausgekleidet und werden von Peritubulärzellen umgeben, einer Myofibroblasten-Zelle. Diese bilden zusammen mit der Basalmembran und einer Kollagenfaserschicht die Lamina propria des Tubulus und stellen somit eine morphologische Grenze zum Interstitium dar (Weinbauer et al., 1996). Der Lamina propria sitzen die Sertoli-Zellen auf, deren tight junctions die Blut-Hoden-Schranke bilden. Zwischen den bis zum Lumen der Tubuli reichenden Sertoli-Zellen liegen unterschiedliche Generationen von Keimzellen. Die Sertoli-Zellen besitzen für die Keimzellen eine Stütz- und Nährfunktion. Die verschiedenen Keimzellstufen sind im Keimepithel in konzentrischen Schichten angeordnet, wobei man von außen nach innen die Spermatogonien, Spermatozyten, runde und elongierte Spermatischen sowie die Spermatozoen unterscheidet. Die Spermatogenese, d.h. die Entwicklung der Spermatozoen aus den Spermatogonien, läuft in drei Schritten ab. Zunächst findet eine

Proliferation der Spermatogonien statt. Die dabei entstehenden primären Spermatozyten treten dann in die *Meiose* ein, wobei ihr Chromosomensatz halbiert wird. Die meiotischen und post-meiotischen Zellen werden durch die tight junctions der Sertolizellen räumlich von einander getrennt. Im letzten Schritt kommt es in einem komplizierten Umgestaltungsprozess zur vollständigen Differenzierung der Spermatozoen. Diese Entwicklung wird auch als *Spermiogenese* bezeichnet (Seitz und Meinhardt, 2002).

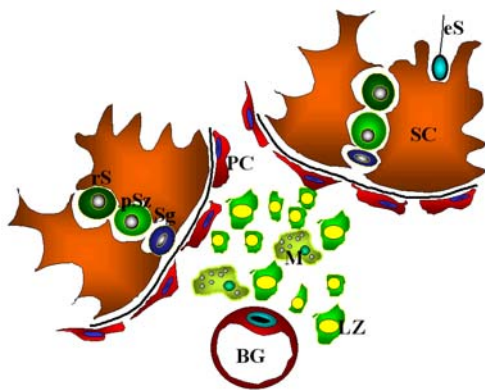


Abb. A: Schema zweier Tubulusanschnitte mit dem dazwischen liegendem Interstitium. BG: Blutgefäß; LZ: Leydig-Zelle; M: Makrophage; PC: Peritubulärzelle; SC: Sertoli-Zelle; Sg: Spermatogonie; pSz: primäre Spermatozyte; rS: runde Spermatoide; eS: elongierte Spermatoide.

1.1.3 Struktur und Funktion der Peritubulärzellen

Die Peritubulärzellen umgeben die Tubuli seminiferi des Hodens. Die Anzahl der Peritubulärzellschichten variiert artspezifisch. Während bei Labornagern (Ratte, Hamster, Maus) nur eine Zellschicht vorhanden ist (Maekawa et al., 1996), wurden beim Menschen 5-7 Schichten gefunden (Setchell et al., 1994). Die Peritubulärzellen sind mesenchymaler Herkunft und besitzen eine polygonale Form mit ausgestrecktem Zytoplasma (Anthony und Skinner, 1989). In Kultur bilden sie flache Monolayer. Es gibt zwei verschiedene Typen von humanen Peritubulärzellen: die myoiden Zellen, die direkt dem Keimepithel angelagert sind, und die nicht-myoiden Zellen, welche die myoiden Zellen umgeben (Galdieri und Ricci, 1998). Die myoiden Peritubulärzellen exprimieren die typischen glatten Muskelzellmarker α -Isoaktin, F-Aktin und Myosin (Virtanen et al., 1986; Rossi et al., 2002), sowie Desmin/ Vimentin. Im Rattenhoden verläuft die Anordnung der Aktinfilamente sowohl longitudinal als auch zirkulär um die Tubuli seminiferi (Maekawa et al., 1996). Die Peritubulärzellen bilden so einen kontraktilen Ring um die Samenkanälchen (Chiarenza et al., 2000) und fördern den Transport der noch immotilen Spermien und der testikulären

Flüssigkeit durch peristaltische Kontraktionen (Rossi et al., 2002). Die Kontraktionen werden durch verschiedene Substanzen, wie Vasopressin, Transforming-Growth-Factor- β (TGF- β), Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF), Oxitocin, Endothelin-1, Prostaglandinen und Angiotensin II in endokriner, parakriner und autokriner Weise beeinflusst (Tung und Fritz, 1991; Santemma et al., 1996; Harris und Nicholson, 1998; Tripiciano et al., 1999; Barone et al., 2002; Rossi et al., 2002).

Neben ihrer kontraktile Eigenschaft exprimieren und sezernieren Peritubulärzellen extrazelluläre-Matrixkomponenten, wie Fibronektine, Laminin, Kollagen Typ I und IV, Proteoglycane (Tung und Fritz, 1994; Ricci et al., 1999; Rossi et al., 2002), sowie Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, wie Aktivin-A, TGF- β , Insulin-like-Growth-Factor-I (IGF-I) und den PmodS („Peritubular cell factor that modulates Sertoli cell function) (Skinner et al., 1989; Skinner und Moses, 1989; de Winter et al., 1994; Gnessi et al., 1997; Rossi et al., 2002). Einige dieser Faktoren nehmen Einfluss auf die Sertoli-Zellen (Gnessi et al., 1997), wodurch die Peritubulärzellen nicht nur für die Integrität der tubulären Struktur, sondern auch bei der Regulation der Spermatogenese und anderen Hodenfunktionen eine wichtige Rolle spielen.

1.1.4 Struktur und Funktion der Sertoli-Zellen

Die nach ihrem Erstbeschreiber Enrico Sertoli benannten somatischen, polymorphen Zellen sitzen mit breiter Basis der Basalmembran der Tubuli seminiferi auf und reichen bis zum Lumen der Tubuli. Die Sertoli-Zellen besitzen einen ovalen bis birnenförmigen Zellkern. Ihr Zytoplasma bildet ein kompliziertes Netzwerk aus lappen- und fingerförmigen Fortsätzen (Schnorr, 1996). Mit dem Auftreten der ersten meiotischen Keimzelle stellen die Sertoli-Zellen ihre Zellteilung ein, so dass die adulte Sertoli-Zelle teilungsinaktiv ist. Die Anzahl der Sertoli-Zellen bestimmt sowohl die Hodengröße als auch das Ausmaß der Spermienproduktion, was darauf beruht, dass eine Sertoli-Zelle nur eine bestimmte Anzahl von Keimzellen ernähren kann. Die Sertoli-Zellen stehen mit den Keimzellen über spezielle ektoplasmatische Strukturen in Verbindung. Hierzu zählen die auf Aktin basierenden Adherens-Zell-zu-Zell-Verbindungen (Adherens junctions) sowie ektoplasmatische Spezialisierungen, Tubulotubular-

Komplexe, Desmosomen und Gap junctions (McGinley et al., 1979; Russell, 1979; Grove et al., 1990; Weinbauer et al., 1996).

Diese zur Ausrichtung, Orientierung und Stützung der Keimzellen dienenden Zell-Zell-Verbindungen unterliegen ständigen Auf- und Abbauvorgängen (Lui et al., 2003) und können für einen direkten Austausch von Substanzen zwischen den Zellen sorgen (Ziparo et al., 1980).

Im basolateralen Bereich bilden benachbarte Sertoli-Zellen leistenförmige Membranspezialisierungen (occluding tight junctions) aus und verschließen so den Interzellularraum (Weinbauer et al., 1996). Dadurch behindert die als Blut-Hoden-Schranke bezeichnete Barriere die freie Diffusion von Flüssigkeiten über den parazellulären Weg (Mitic und Anderson, 1998) und führt zu einer Kompartimentierung der Tubuli in einen basalen und adluminalen Bereich. Im basalen Kompartiment findet die Proliferation der Spermatogonien statt, während im adluminalen Bereich die Meiose der zygotänen Spermatozyten abgeschlossen wird und die Spermio-genese abläuft. Um den präleptotänen und leptotänen Spermatozyten den Durchtritt in das adluminale Kompartiment zu gewähren, unterliegen die tight junctions der Sertoli-Zellen ständigen Lösungs- und Verschlussvorgängen (Cheng und Mruk, 2002; Hedger und Meinhardt, 2003; Lui et al., 2003). Hierfür werden u.a. von Sertoli-Zellen sezernierte Proteasen und Proteaseinhibitoren, wie der Plasminogenaktivator und der Plasminogenaktivator-Inhibitor benötigt (Ailenberg und Fritz, 1989; Fritz et al., 1993). Sertoli-Zellen sezernieren außerdem Transport- und bioaktive Proteine (Androgen-bindendes-Protein, Transferrin, Ceruloplasmin), extrazelluläre Matrixproteine (Kollagen Typ IV, Laminin), Wachstumsfaktoren, Zytokine [Aktivin, Inhibin, Insulin Like Growth Factor (IGF), Interleukin-1 (IL-1), Transforming Growth Factor (TGF- α , TGF- β), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Seminiferous Growth Factor (SGF), Müller inhibiting substance] (Sylvester und Griswold, 1984; Skinner, 1991) und Energiemetaboliten (Laktat und Pyruvat) (Jutte et al., 1983). Diese Faktoren, zusammen mit der Barrierefunktion der Blut-Hoden-Schranke, führen zur Erzeugung eines spezialisierten Milieus, welches wichtig für das Überleben der Keimzellen, den Ablauf der Meiose und die Spermienentwicklung ist (Weinbauer et al., 1996; Lui et al., 2003).

1.1.5 Die endokrine und parakrine Steuerung der Hodenfunktion

Die endokrine Steuerung der Spermatogenese und Steroidsynthese wird systemisch über das Hypothalamus-Hypophysen-System reguliert. Im Hypothalamus wird das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) pulsatil in ein Pfortadersystem freigesetzt, über welches es die Adenohypophyse (HVL) erreicht. Dort bewirkt es die Sekretion der Gonadotropine Luteinisierendes Hormon (LH) und Follikel-stimulierendes-Hormon (FSH), die über die Blutbahn ihr Effektororgan, den Hoden, erreichen (Conn und Crowley, 1991). Die Gonadotropine stellen die Schlüsselhormone in der Regulation der Spermatogenese und Steroidogenese dar. LH führt in den Leydig-Zellen zu der Synthese und Sekretion von Testosteron, welches dann über die Sertoli-Zellen die Spermatogenese beeinflusst. FSH nimmt durch die direkte Wirkung auf die Sertoli-Zellen Einfluss auf die Spermatogenese und fördert die Sekretion von Inhibin, Follistatin und Androgen-bindendem-Protein (ABP) (Seitz und Meinhardt, 2002).

Die hormonelle Steuerung wird durch folgende Rückkopplungsmechanismen reguliert: Testosteron übt einen negativen Rückkopplungseffekt auf GnRH, LH und FSH aus, während Inhibin hemmend auf die FSH-Produktion wirkt. Aktivin hingegen stimuliert die Sekretion von FSH. Seine Wirkung kann durch die Bindung an Follistatin neutralisiert werden (de Kretser und Phillips, 1998).

Obwohl die hormonelle Steuerung essentiell für die Spermatogenese ist, wird die Feinsteuerung der Hodenfunktion von lokal produzierten, parakrin wirkenden Zellfaktoren übernommen, die die Kommunikation der Zellen untereinander bewerkstelligen. Testosteron wirkt nicht nur systemisch, sondern auch lokal. Autokrin beeinflusst es seine eigene Synthese sowie parakrin die Proliferation und Differenzierung von Peritubulär- und Sertoli-Zellen (Arslan et al., 1993; Schlatt et al., 1993). Das von den Sertoli-Zellen gebildete ABP bindet Testosteron, welches nach Passage durch die Sertoli-Zellen ins Tubuluslumen gelangt. Dieser Komplex wird mit der Lumenflüssigkeit in den Nebenhodengang transportiert, wo er nach Aufnahme durch androgenabhängige Epithelzellen seine Wirkung entfaltet (Seitz und Meinhardt, 2003). Neben den Androgenen sind auch Wachstumsfaktoren und Zytokine an der parakrinen Regulation der Hodenfunktionen beteiligt. Wachstumsfaktoren, für die parakrine Wirkungen im

Hoden nachgewiesen wurden, sind der Transforming-Growth-Factor (TGF)- α und - β , der Insulin-like-Growth-Factor-I (IGF-I) und der Epidermal-Growth-Factor (EGF) (Weinbauer et al., 1996; Schlatt et al., 1997).

Für das Zytokin „Stem-Cell-Factor“ (SCF) und seinen Rezeptor c-Kit wird ein Einfluss bei der Spermatogonien-Proliferation angenommen. Anderen Zytokinen, wie dem Tumor-Necrosis-Factor (TNF), Nerve-Growth-Factor (NGF) und Leucemia-Inhibiting-Factor (LIF) wird eine Rolle bei der Sertoli-Keimzell-Interaktion zugesprochen (Schlatt et al., 1997). Für den Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF) gibt es Belege für eine Funktion bei der Leydig-Zell-Tubulus-Interaktion, da MIF die Inhibin-Sekretion in Sertoli-Zellen hemmen kann (Meinhardt et al., 2000).

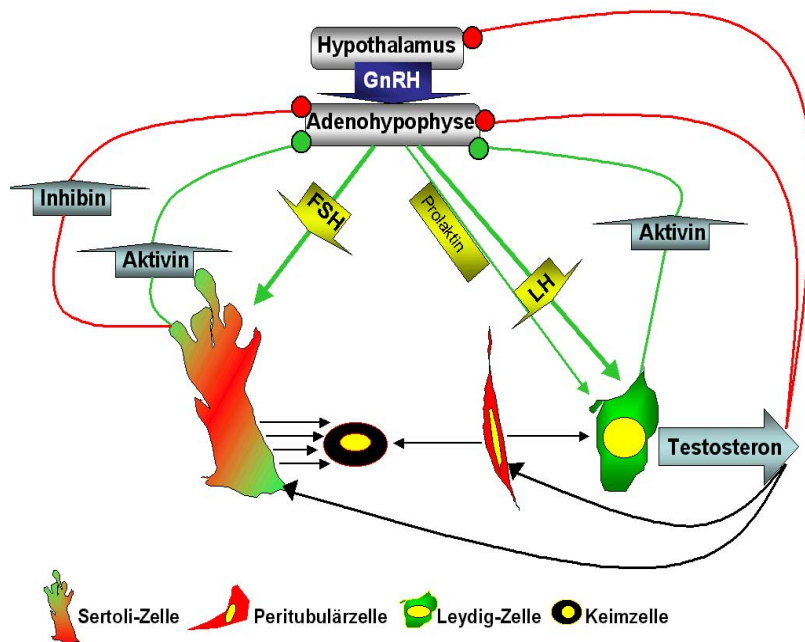


Abb. B: Hormonelle Regulation des Hodens. GnRH: Gonadotropin-Releasing-Hormon; FSH: Follikel-stimulierendes Hormon; LH: Luteinisierendes Hormon. Stimulierende Wirkungen sind durch grüne Pfeile, inhibierende Effekte durch rote Pfeile gekennzeichnet. Zur näheren Erläuterung siehe Kapitel 1.1.5.

1.2 Immunologie des Hodens

Der Hoden als immunprivilegiertes Organ

Der Hoden stellt ein immunprivilegiertes Organ dar. Hier werden Xenotransplantate nur sehr langsam oder gar nicht abgestossen (Head et al., 1983). Dieses Immunprivileg findet man neben dem Hoden noch in Auge, Gehirn und Plazenta (Janeway et al., 2002).

Die physiologische Bedeutung dieser besonderen Immunsituation des Hodens liegt in dem Eintreten der Urkeimzellen in eine lange Ruhephase begründet. Diese findet nach der Einwanderung der Urkeimzellen in die Keimstränge der Gonadenanlage statt. Die Ruhephase endet in der Pubertät, während der es zur Differenzierung meiotischer und post-meiotischer Keimzellen und damit zur Entstehung keimzellspezifischer Neo-Antigene kommt. Obwohl die keimzellspezifischen Antigene nicht wie ubiquitär vorkommende Selbstantigene an der bereits perinatal erfolgenden klonalen Deletion autoreaktiver T-Lymphozyten im Thymus beteiligt sind und somit als „nicht-körperigen“ eingestuft werden müssen, besteht ihnen gegenüber eine immunologische Toleranz.

Das Ausbleiben der keimzellspezifischen Immunantwort im adulten Hoden ist nach neuesten Erkenntnissen nicht alleine durch die mechanische Abschirmung der Keimzellen durch die Blut-Hoden-Schranke zu erklären. Zusätzlich wird ein lokaler zellulärer Mechanismus postuliert, der die Immunantwort reguliert bzw. blockiert (Hedger, 2002).

Teil des Regelmechanismus sind die im Hoden vorkommenden, residenten Makrophagen, Mastzellen und Lymphozyten, deren Immunantwort auf inflammatorische Reize insgesamt unterdrückt ist. Residente, testikuläre Makrophagen weisen z.B. eine reduzierte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine auf. Daher werden diesen Zellen anti-inflammatorische und regulatorische Eigenschaften zugeschrieben, während bei einem testikulären Entzündungsgeschehen erst kürzlich eingewanderte Immunzellen für die pro-inflammatorische Immunantwort verantwortlich sind. Diese haben ihren „inflammatorischen Phänotyp“ zunächst erhalten (Hedger, 2002; Hedger und Meinhardt, 2003).

1.2.1 Rolle von Zytokinen im Immunprivileg des Hodens

Eine weitere immunologische Besonderheit des Hodens liegt darin, dass Zytokine, die im Entzündungsgeschehen eine zentrale Rolle einnehmen, im Hoden auch unter nicht-entzündlichen Bedingungen produziert werden und dort über parakrine und autokrine Mechanismen an der Regulation testikulärer Funktionen beteiligt sind (Hales et al., 1999). Die Rolle dieser Zytokine im

Hoden könnte der Schlüssel für das Phänomen des Immunprivilegs im gesunden Hoden bzw. der entzündungsbedingten Störung der Hodenfunktion im pathologischen Fall sein.

Im Allgemeinen handelt es sich bei Zytokinen um monomere bis multimere Proteine mit einem Molekulargewicht unter 35 kDa, deren primäre Aufgabe die Kontrolle der Immunantwort bei Entzündungsprozessen sowie die Regulation von Hämatopoese und Immunzellentwicklung ist. Eine Vielzahl der Zytokine zirkulieren im Blut (Hedger und Meinhardt, 2003). Die Synthese regulatorischer Zytokine ist jedoch nicht auf Immunzellen beschränkt. Im Hoden treten die Leydig-, Sertoli- und Peritubulärzellen als Hauptproduzenten von Zytokinen, wie z.B. IL-1, IL-6, Aktivin und TGF- β auf.

1.2.2 Der Transforming-Growth-Faktor- β im Hoden

Die Transforming-Growth-Faktor- β (TGF- β)-Familie besteht aus einer Vielzahl von Zytokinen, zu denen auch die Unterfamilie der Aktivine und „Bone-Morphogenetic-Proteins“ (BMP) zählt. Es konnten drei TGF- β Isoformen (TGF- β 1, - β 2, und - β 3) identifiziert werden, bei denen es sich um 25-kDa schwere Homodimere handelt. Allgemein besteht ihre Funktion in: 1) der Inhibition der Proliferation verschiedener Epithelzellen; 2) immunsuppressiven Effekten und 3) der Stimulation der Produktion der extrazellulären Matrix (Roberts, 1998).

TGF- β 2 ist die vorherrschende Isoform im Hoden und wird wie die anderen Isoformen von Peritubulär- und Sertoli-Zellen exprimiert und sezerniert (Mullaney und Skinner, 1993). Die mRNA für die drei TGF- β -Rezeptortypen wurde in isolierten Leydig-, Sertoli-, Peritubulär- und Keimzellen lokalisiert (Le Magueresse-Battistoni et al., 1995). Alle TGF- β -Isoformen sind an der Regulation der Leydig-Zell- und TGF- β 2 an der Tubuli-seminiferi-Entwicklung beteiligt (Khan et al., 1992; Konrad et al., 2000). Im adulten Hoden unterstützt TGF- β als anti-inflammatorisches Zytokin die testikuläre Immunsuppression (Pöllänen et al., 1993). Neuere Untersuchungen zeigten, dass TGF- β 1 zudem an der immun-protectiven Aktivität der Sertoli-Zellen in Co-Transplantations-Studien beteiligt ist (Suarez-Pinzon et al., 2000).

1.2.3 Der Tumornekrose-Faktor- α im Hoden

Bei dem Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) handelt es sich um ein glykosyliertes 17-kDa Polypeptid mit einer trimeren Struktur. Der Faktor wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen und Monozyten sezerniert. Es entfaltet seine zytotoxischen Eigenschaften über Bindung an einen Rezeptor, wodurch die Apoptose der Zielzelle eingeleitet wird.

Im Hoden wird TNF- α von pachytänen Spermatozyten, runden Spermatiden und interstitiellen Makrophagen exprimiert. *In vitro* wird TNF- α von runden Spermatiden (De et al., 1993), *in vivo* von aktivierten, testikulären Makrophagen sezerniert (Moore und Hutson, 1994). *In vitro* konnte im Zellkultur-Überstand kultivierter Sertoli-, Leydig- und Peritubulärzellen kein TNF- α nachgewiesen werden (Hutson, 1993). Mögliche Effektorzellen für TNF- α stellen die Leydig- und Sertoli-Zellen dar (De et al., 1993). In Leydig-Zellen bewirkt TNF- α eine Hemmung der Testosteronsynthese, die vermutlich auf einer verminderten Expression steroidogener Enzyme beruht (Xiong und Hales, 1993).

1.3 Der Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF)

Der Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor wurde 1966 als eines der ersten Zytokine überhaupt entdeckt. Dabei wurde der Faktor als ein von aktivierten T-Lymphozyten sezerniertes Molekül beschrieben, welches in der Lage ist, die ungerichtete Migration von Makrophagen zu hemmen (Bloom und Bennett, 1966; David, 1966). 1989 wurde die humane MIF-cDNA kloniert (Weiser et al., 1989). Es folgte die Produktion von rekombinantem MIF und anti-MIF-Antikörpern. 1999 ergab die Entwicklung einer MIF-Knockout-Maus neue Möglichkeiten zur Untersuchung der MIF-Funktion *in vivo* (Bozza et al., 1999).

1.3.1 Struktur und enzymatische Aktivität von MIF

Die dreidimensionale Struktur von humanem MIF wurde von Sun et al. (1996) durch Röntgenkristallographie untersucht. Die Raumstruktur ist die eines Homotrimers, bei welchem jedes Monomer aus zwei antiparallelen α -Helices besteht, die gegen eine β -Faltblattstruktur aus vier β -Strängen angeordnet sind.

Zusätzlich sind pro Monomer zwei β -Stränge für die Interaktion mit den benachbarten Monomeren vorhanden. Ein MIF-Monomer besitzt eine molekulare Masse von 12,5 kDa und besteht aus 115 Aminosäuren, wobei eine 90%ige Sequenzhomologie zwischen humanem und murinem MIF besteht. Die Sequenzen von Ratte und Maus unterscheiden sich hingegen nur in einer einzigen Aminosäure (Bernhagen et al., 1994; Bernhagen et al., 1998). In dem trimeren Proteinkomplex bilden die β -Faltblätter der drei Untereinheiten eine zylindrische Struktur, deren Zentrum ein Kanal mit positiv geladenem Potential darstellt und dessen Durchmesser von 4-15 Å variiert. Es ist somit denkbar, dass negativ geladene, lösliche Moleküle dort binden könnten.

Die Struktur von MIF ist unter den bisher bekannten Zytokinen einzigartig, so dass MIF sich keiner Zytokinfamilie zuordnen lässt. Strukturhomologien konnten allerdings zwischen MIF und drei mikrobiellen Enzymen gefunden werden. Hierzu zählen die Oxalocrotonat-Tautomerase, die 5-Carboxymethyl-2-Hydroxymuconat-Isomerase und die Chorismat-Mutase (Chook et al., 1994; Subramanya et al., 1996). Neben den Homologien zu Enzymen konnte für MIF auch Enzymaktivität nachgewiesen werden. So wurden eine Gluthathion-S-Transferase-Aktivität (Blocki et al., 1993), eine Tautomerase-Aktivität (Rosengren et al., 1996) und eine Oxidoreduktase-Aktivität (Kleemann et al., 1998b) für MIF dokumentiert.



Abb. C: Schematische Darstellung der trimeren Raumstruktur von MIF basierend auf röntgenkristallografischen Untersuchungen (Tan et al., 2001)

1.3.2 Funktion und Lokalisation von MIF

1.3.2.1 MIF als Hormon

Bernhagen et al. (1993) entdeckten MIF als ein von corticotropen Zellen der Hypophyse freigesetztes Hormon. Die Sekretion wird durch den Corticotropin-Releasing-Faktor (CRF) aktiviert (Nishino et al., 1995; Waeber et al., 1998). Weitere Studien zeigten, dass MIF vom Hypothalamus (Bacher et al., 1998) und dem Nebennierenrinden-Cortex exprimiert wird (Bacher et al., 1997). Das dort intrazellulär präformiert vorliegende MIF wird nach LPS-Stimulation ausgeschüttet, die intrazelluläre MIF-Konzentration sinkt und eine MIF-Resynthese ist die Folge. Dieses Phänomen wurde auch in zahlreichen anderen Organen wie der Lunge, der Leber, der Niere, der Milz und der Haut beobachtet (Bacher et al., 1997).

1.3.2.2 Pro-inflammatorische Eigenschaften von MIF

Neben systemischen Aufgaben kommen MIF wichtige Funktionen als Zytokin bei der erworbenen Immunität zu. Nach Behandlung mit mitogenen oder antigenen Stimuli exprimieren und sezernieren T-Zellen vermehrt MIF, welches in einem autokrinen Wirkmechanismus diese Zellen wiederum aktiviert, indem es ihre Proliferation und IL-2 Produktion steigert (Bacher et al., 1996).

Eine bedeutende Rolle von MIF bei der angeborenen Immunität konnte durch *in vivo*-Untersuchungen beim endotoxischen Schock (Bernhagen et al., 1993; Bacher et al., 1997), der gram-negativen bakteriellen Sepsis (Calandra et al., 2000) und beim gram-positiven septischen Schock (Calandra et al., 1998) gezeigt werden. Bei Neutralisation von MIF wiesen die Erkrankungen eine wesentlich mildere Verlaufsform auf. Es zeigte sich, dass nicht nur das von der Hypophyse freigesetzte MIF, sondern auch das lokal von Monozyten und Makrophagen produzierte MIF von Bedeutung ist. Die MIF-Sekretion der Makrophagen wird hierbei sowohl durch pro-inflammatorische Stimuli wie LPS, TNF- α und Interferon- γ gesteigert. Außerdem führt MIF bei Makrophagen zu

einer erhöhten TNF- α -Sekretion und einer verlängerten Lebensdauer (Calandra et al., 1994; Mitchell et al., 2002).

Im Gegensatz zur Pathogenese der Sepsis, bei der MIF an der Entgleisung der immunologischen Antwort beteiligt ist, konnte bei bestimmten Parasitosen (Leishmaniose und Zystizerkose) durch externe MIF-Applikation eine Milderung der Symptome herbeigeführt werden (Juttner et al., 1998; Rodriguez-Sosa et al., 2003).

Eine weitere entzündungsfördernde Eigenschaft von MIF besteht in seiner einzigartigen Fähigkeit, der immunsuppressiven Wirkung von Glucocorticoiden entgegenzuwirken. Dabei ist die Hemmung der TNF- α -, IL-1 β -, IL-6- und IL-8-Sekretion von Makrophagen entscheidend. Verstärkt wird dieser Effekt durch die Glucocorticoid-bedingte Steigerung der MIF-Sekretion in Makrophagen. Somit sorgt MIF für eine Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Effekten des Immunsystems, in dem es der immunsuppressiven Wirkung der Glucocorticoide entgegenwirkt (Calandra et al., 1995).

Bei chronisch-inflammatorischen sowie autoimmunen Erkrankungen ist MIF ebenfalls am Krankheitsgeschehen beteiligt. Am besten untersucht ist dies für die Rheumatoide Arthritis (RA). So konnte gezeigt werden, dass die Gabe von anti-MIF-Antikörpern die Entzündungsreaktion bei der experimentell induzierten RA unterdrückt (Mikulowska et al., 1997; Leech et al., 1998; Santos et al., 2001). In einigen Fällen der RA führte der mangelnde Effekt der üblichen anti-inflammatorischen Glucocorticoidtherapie zu der Vermutung, dass MIF als Gegenspieler der Glucocorticoidwirkung die Therapie beeinflussen könnte. Santos et al. (2001) belegten diese Hypothese, indem sie zeigten, dass die Applikation von MIF die durch Glucocorticoidbehandlung bedingte Inhibition der Antigen-induzierten Arthritis aufheben konnte. In der RA wird des weiteren eine Rolle von MIF bei der Bindegewebszerstörung durch Matrixmetalloproteinasen diskutiert, deren Expression in Synovialfibroblasten durch MIF gesteigert werden konnte (Onodera et al., 2000).

Eine Milderung des Krankheitsverlaufs durch Gabe von neutralisierenden MIF-Antikörpern konnte für das akute-Respiratorische-Distress-Syndrom, Asthma, die autoimmune Glomerulonephritis und die Arteriosklerose beobachtet werden (Donnelly et al., 1997; Lan et al., 1997; Rossi et al., 1998; Lin et al., 2000). Es

muss aber angemerkt werden, dass die Wirkung von MIF besonders bei der Glomerulonephritis umstritten ist.

1.3.2.3 Rolle von MIF in der Zellproliferation, Angiogenese und Tumorgenese

Wistow et al. (1993) zeigten erstmalig eine Rolle von MIF bei der Entwicklung der Augenlinse. In nachfolgenden Experimenten konnte ein positiver Einfluss von MIF auf die Proliferation von T-Lymphozyten (Bacher et al., 1996), NIH/3T3-Fibroblasten (Mitchell et al., 1999) und Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten (Lacey et al., 2003) dargestellt werden. Da bei der Tumorentwicklung die Entgleisung der Zellproliferationskontrolle essentiell ist, wurde nach Entdeckung der pro-proliferativen Wirkung von MIF ein Einfluss dieses Faktors auch auf die Tumorgenese postuliert. Eine erhöhte MIF-Expression in prostatistischen Adenokarzinom-Metastasen (Meyer-Siegler und Hudson, 1996), murinen Colon-Karzinom-Zellen (Takahashi et al., 1998), Melanomzellen (Shimizu et al., 1999) und Zellen des Hypophysenadenoms (Pyle et al., 2003) gaben erste Hinweise auf eine mögliche Rolle von MIF bei der Tumorentstehung. Die Gabe von neutralisierenden MIF-Antikörpern hemmte das Tumorwachstum und die Angiogenese bei 38C13B-Zell-Lymphomen und Adenokarzinomen (Chesney et al., 1999; Ogawa et al., 2000). Außerdem konnte für MIF eine negative Rolle in der Regulation des p53 gezeigt werden (Hudson et al., 1999).

1.3.3 Der molekulare Wirkungsmechanismus von MIF

Zytokine vermitteln in der Regel ihre Informationen durch die Bindung an ihre Rezeptoren auf den Effektorzellen und setzen damit eine Signaltransduktionskaskade und die Expression von Effektormolekülen in Gang (zur Übersicht: Calandra und Roger, 2003).

Für MIF konnte lange Zeit kein Rezeptor identifiziert werden. Erst in jüngsten Studien konnte die Bindung von MIF an die extrazelluläre Domäne von CD74, der Zelloberflächenform der MHC-Klasse-II-assoziierten unveränderlichen

Kette, auf humanen Monozyten, murinen Makrophagen und der humanen Raji B-Zell-Linie beschrieben werden (Leng et al., 2003). Die Zelloberflächenbindung von MIF an die Immunzellen löst die Phosphorylierung der extrazellulär-Signal-regulierten Kinase (ERK-1/2) aus, deren Aktivierung durch MIF bereits in früheren Studien an NIH/3T3-Zellen nachgewiesen werden konnte. In NIH/3T3-Zellen erwies sich die Aktivierung von ERK-1/2 als Proteinkinase A-abhängig und führte zu einem Anstieg des intrazellulären Phospholipase A2-Gehaltes (Mitchell et al., 1999). Eine Phosphorylierung der ERK-1/2 nach MIF-Stimulation konnte für Kardiomyozyten (Fukuzawa et al., 2002), Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten (Lacey et al., 2003) und humane-mikrovaskuläre-Endothel-Zellen (HMVECs) (Amin et al., 2003) in den Zusammenhang mit einer gesteigerten Proliferation dieser Zellen gebracht werden. In HMVECs wurde mit der Aktivierung der ERK-1/2 auch eine erhöhte Phosphorylierung der MAPKK MEK-1/2 und des Transkriptionsfaktors Elk-1 initiiert. Elk-1 ist ein in der Signalkaskade distal gelegenes Signalmolekül im ERK-1/2-MAPK-Weg. Diese Ergebnisse stellen starke Belege für den Einfluss von MIF auf die Zelldifferenzierung und auf Wachstumsvorgänge über eine Aktivierung des ERK-1/2-MAPK- Weges dar.

Weiterhin kann MIF den Tumorsuppressor p53 inaktivieren und damit den Wachstumsarrest und die Apoptose aufheben (Hudson et al., 1999; Fingerle-Rowson et al., 2003). Entsprechend zeigten MIF-defiziente Makrophagen eine deutlich geringere Lebensdauer, höhere Apoptoseraten und eine reduzierte Fähigkeit zur Immunantwort. Erklärt wurde dies durch eine erhöhte zelluläre Akkumulation von p53, eine gesteigerte p53-abhängige Apoptose, einen herabgesetzten Arachidonsäure-Metabolismus und eine reduzierte Cyclooxygenase 2 (Cox 2)-Expression (Mitchell et al., 2002).

Roger et al. (2001) brachten die reduzierte Abwehrfunktion MIF-defizienter Makrophagen in Zusammenhang mit einer Herunterregulation des Toll-like-Rezeptor-4 (TLR-4). TLR-4 stellt das Signalmolekül des LPS-Rezeptors CD 14 dar, dessen Aktivierung zu einer vermehrten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine führt. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis stehen die ebenfalls reduzierte Aktivität des Transkriptionsfaktors PU.1 und die verringerten NF- κ B-Konzentrationen als Folge der Wirkung von MIF.

Kleemann et al. (2000) stellten an 293T-Zellen eine Aufnahme von extrazellulärem, rekombinanten MIF durch eine Nicht-Rezeptor-vermittelte Endozytose dar. Sie zeigten die Interaktion von MIF mit dem zytoplasmatischen-Protein Jab-1 (Jun-activation domain-binding protein 1), welches auch als CSN5 (COP9 Signalosom Untereinheit 5) bezeichnet wird. Jab-1 aktiviert die Jun N-terminale Kinase (JNK), welche Jun phosphoryliert. Somit besitzt Jab-1 eine Funktion als Co-Aktivator des Transkriptionsfaktors Aktivator-Protein-1 (AP-1), der an Zellwachstumsvorgängen, Transformation und Zelltod beteiligt ist. Durch die Bindung von MIF an Jab-1 wird die durch TNF- α erhöhte Transkriptionsrate von AP-1 gehemmt. Zudem konnte festgestellt werden, dass die Jab-1-abhängige Degradation des Zell-Zyklus-Inhibitors p27^{Kip1} durch die Bindung von MIF an Jab-1 abnimmt. In Folge steigt die Konzentration von p27^{Kip1} in der Zelle an und führt einen Wachstumsarrest herbei (Kleemann et al., 2000). Dieser beobachtete, durch MIF herbeigeführte Wachstumsarrest steht im Widerspruch zur pro-proliferativen MIF-Wirkung aus vorangegangenen Arbeiten (Mitchell et al., 1999).

1.3.4 MIF im Hoden

1996 entdeckten Meinhardt et al., dass MIF im humanen Hoden und im Hoden der Ratte von Leydig-Zellen exprimiert wird. Die MIF-Expression in Leydig-Zellen blieb auch in hypophysectomierten Ratten unverändert. Ein Einfluss von MIF auf die basale und LH-induzierte Testosteron-Produktion in Leydig-Zellen konnte nicht gezeigt werden. Es war jedoch *in vitro* eine dosisabhängige Reduktion der Inhibin-Sekretion der Sertoli-Zellen durch MIF zu beobachten. Einen weiteren Hinweis auf eine wichtige regulatorische Rolle von MIF in der normalen Hodenfunktion ergaben folgende Experimente: sieben Tage nach Depletion der Leydig-Zellen mit dem spezifischen Toxin Ethan-Dimethan-Sulfonat (EDS) konnte in den zuvor MIF-negativen Sertoli-Zellen MIF-mRNA und -Protein-Expression nachgewiesen werden (Meinhardt et al., 1999). Dieser Prozess erwies sich nach Repopulation der Leydig-Zellen als reversibel. Zusammen mit der Hemmung der Inhibin-Sekretion durch MIF sprechen diese Ergebnisse für eine Rolle des Zytokins MIF bei der Leydig-Zell-Tubulus-Interaktion (Nishihira, 1998).

1.3.5 Signaltransduktion von MIF in testikulären Zellen

Wennemuth et al. (2000) zeigten, dass die Inkubation von isolierten Peritubulärzellen mit rec MIF einen Anstieg des intrazellulären Kalziums bewirkt. Dabei handelt es sich um einen kapazitiven Kalzium-Einstrom, bei welchem es zunächst zur Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher kommt. Die dadurch verursachte Spannungsänderung führt zur Öffnung der membranständigen Kalziumkanäle und ermöglicht so den Einstrom von Kalzium aus dem Extrazellulärraum. Jüngste Ergebnisse zeigten, dass MIF in Peritubulärzellen eine Aktivierung der Proteinkinase C bewirkt. Eine Beteiligung des Phospholipase A-Weges bei der MIF-Signaltransduktion war hingegen nicht zu beobachten (Wiegand et al, 2001).

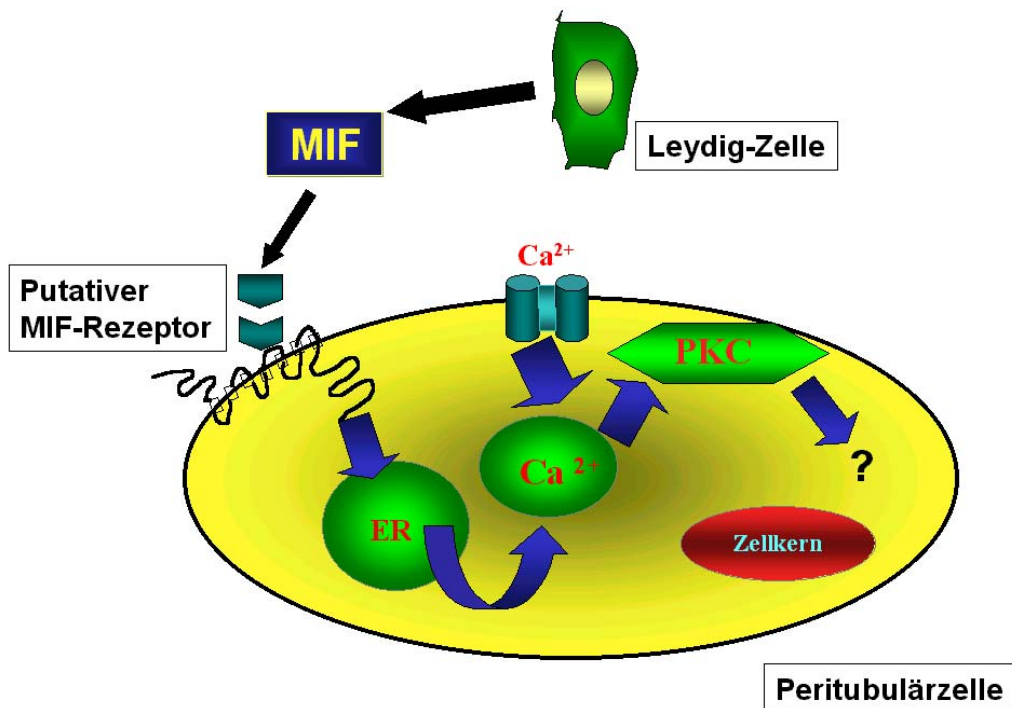


Abb. D: Schematische Darstellung der MIF-Signaltransduktion in Peritubulärzellen. ER: Endoplasmatisches Retikulum; Ca²⁺: Kalzium-Ionen; PKC: Proteinkinase C.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

MIF wurde ursprünglich als ein von aktivierten T-Lymphozyten sezerniertes Zytokin entdeckt (Bloom und Bennett, 1966; David, 1966; Meinhardt et al., 1996). Neben zahlreichen anderen Geweben wurde MIF auch im Hoden lokalisiert, wo der Faktor von Leydig-Zellen produziert wird (Meinhardt et al., 1996). Die Hemmung der Inhibin-Sekretion von Sertoli-Zellen durch MIF (Meinhardt et al., 1996) sowie die kompensatorische MIF-Expression der Sertoli-Zellen nach Leydig-Zell-Depletion (Meinhardt et al., 1999), weisen auf eine wichtige Rolle von MIF bei der Leydig-Zell-Tubulus-Interaktion hin. Eigene Befunde der Arbeitsgruppe konnten nach MIF-Stimulation einen kapazitiven Kalziumeinstrom in Peritubulärzellen nachweisen (Wennemuth et al., 2000). Neuere Erkenntnisse zeigten eine Aktivierung der Proteinkinase C durch MIF (Wiegand et al., 2001). Insgesamt ist über den molekularen Wirkungsmechanismus von MIF aber nur sehr wenig bekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation weiterer Signalmoleküle, die bei der MIF-Signaltransduktion in testikulären Zielzellen (Peritubulär-, Sertoli-Zellen) von Bedeutung sind. Zahlreiche Signalmoleküle werden durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung an Tyrosin-, Threonin- oder Serinresten aktiviert oder deaktiviert. Daher wurden von der Untersuchung der Tyrosin-, Serin- und Threoninphosphorylierungsmuster MIF-stimulierter Peritubulär- und Sertoli-Zellen Hinweise auf weitere Signalmoleküle der MIF-Signaltransduktion vermutet.

Ein zweiter Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Untersuchung einer möglichen Wirkung von MIF auf die Balance pro- und anti-inflammatorischer Zytokine. Zytokinen kommt eine duale Funktion bei der Aufrechterhaltung der normalen Hodenfunktion und dem Erhalt des immunprivilegierten Status zu (Hedger und Meinhardt, 2003). In diesem Zusammenhang sollte die Wirkung von MIF auf die Sekretion von TGF- β 2 und TNF- α in Peritubulärzellen analysiert werden.

2 Material

2.1 Reagenzien und Versuchsmaterial

Die verwendeten *Chemikalien* waren von höchstmöglichem Reinheitsgrad und wurden, falls nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Biosciences (Braunschweig), Fluka (Buchs, Schweiz), Gibco BRL-Bethesda Research Laboratories (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Taufkirchen).

Die *Enzyme* wurden von Amersham Biosciences (Freiburg), Promega (Heidelberg), Pan Systems (Nürnberg), New England Biolabs (Frankfurt), Takara (Japan) und Roche (Mannheim),

die verwendeten *Antikörper* von Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg), Biomol (Hamburg), Sigma (Taufkirchen), Cell Signaling (Massachusetts), Perbio Science (Bonn) und Serotec (Düsseldorf) bezogen.

Das *Plastikverbrauchsmaterial* lieferte Greiner (Nürnberg), Eppendorf (Hamburg), Applied Biosystems (California, USA), Biozym (Oldendorf), Falcon-Becton Dickinson Labware (Heidelberg) und Sarstedt (Nümbrecht).

Folgende *Kits* wurden benutzt:

Direct Cyclic AMP Enzyme Immunoassay Kit (Biotrend, Köln),

TGF β_2 E_{max}[®] ImmunoAssay System (Promega, Heidelberg).

Das *rekombinante MIF* stellte freundlicherweise das Picower Institute for Medical Research (Manhasset, New York) zur Verfügung.

Die Herstellung des *sterilen Wassers* erfolgte sowohl mit Hilfe einer Optipure-Reinstwasseranlage der Fa. MembraPure (Bodenheim) mit einer vorgeschalteten Ionenaustauscherkartusche (Ministil P21) der Fa. Christ (Osterode/Harz), einer UV-Lampe und Ultrafiltration, als auch mit Hilfe einer MilliQ-Reinstwasseranlage der Fa. Millipore (Eschborn) mit einer vorgeschalteten Ionenaustauscherkartusche (Ministil P21) der Fa. Christ (Osterode/Harz).

Die verwendeten *thermostabilen Lösungen* wurden durch Autoklavieren bei 120°C, 1 atü und einer das Volumen der Lösung berücksichtigenden

Zeitspanne autoklaviert. Die Entkeimung der *thermolabilen Lösungen* erfolgte durch Sterilfiltration unter Verwendung von Sterilfiltern der Fa. Millipore (Eschborn) mit einer Porengröße von 0,2 µm für die Verwendung in der Zellkultur und 0,4 µm für die Verwendung in anderen Bereichen.

Das Photomaterial zur Dokumentation stammte von Amersham Biosciences (Freiburg), Fuji (Düsseldorf) und Mitsubishi Electric Europe (Hatfield, UK).

2.2 *Verwendete Zellkultur-Medien*

Medium für Peritubulärzellen:

RPMI 1640 mit 10% FKS:

RPMI 1640	500 ml
Foetales Kälberserum (FKS)	55 ml
Penicillin/ Streptomycin (10 000U/ 10mg/ml)	6 ml
Ultrasaline A	13,5 ml

Medium für Sertoli Zellen:

RPMI 1640 ohne FKS:

RPMI 1640	500 ml
Penicillin/ Streptomycin (10 000U/ 10mg/ml)	6 ml
Ultrasaline A	13,5 ml

Bis auf die Ultrasaline A (BioWhittaker, Verviers, Belgien) wurden die Medien und Zusätze von PAA Laboratories GmbH (Cölbe) bezogen.

2.3 *Versuchstiere*

Als Versuchstiere dienten 18-19 Tage alte, immature, männliche Wistar-Ratten von Charles River (Sulzfeld).

2.4 *Verwendete Lösungen*

Gelelektrophorese

Probenpuffer:

0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1 ml
10% SDS-Lösung	1,6 ml
Glycerin	0,8 ml
DTT	0,64 g
0,05 % ige Bromphenolblau-Lösung	0,2 ml
A. dest.	4 ml

Trenngelpuffer:

Tris-HCl (pH 8,8)	1,5 M
-------------------	-------

10%-iges Trenngel:

	Für 2 Gele (10ml)
A. dest.	4,1 ml
30% Acrylamid-Bis-Lsg. (w/v)	3,3 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml
10% SDS	100 µl
10% APS	100 µl
Temed	10 µl

Sammelgelpuffer:

Tris-HCl (pH 6,8)	0,5 M
-------------------	-------

4%-iges Sammelgel:

	Für 2 Gele (3ml)
A. dest.	1,8 ml
30% Acrylamid-Bis-Lsg. (w/v)	0,39 ml
Sammelgelpuffer	0,9 ml
10% SDS	30 µl
10% APS	15 µl
TEMED	3 µl

10x Elektrophoresepuffer:

Glycin	192 mM
Tris	25 mM
SDS	0,1% (w/v)

20x MOPS-SDS Laufpuffer für NuPAGE-Fertiggele:

MOPS	1 M
Tris	1 M
SDS	69,3 mM
EDTA	20,5 mM
	1x Puffer = pH 7,7

Coomassie-Färbelösung:

Commassie Brilliant Blau R	0,1% (w/v)
Methanol	40% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)

Coomassie-Entfärbelösung:

Methanol	40% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)

Proteintransfer**Semidry blot:**Kathoden-Puffer:

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

Anoden-Puffer:

Tris-HCl (pH 10,4)	30 mM
Methanol	20% (v/v)

Konzentrierter Anoden-Puffer:

Tris-HCl (pH 10,4)	300 mM
Methanol	20% (v/v)

NuPAGE Nassblot:20x NuPAGE Transfer Puffer:

Bicine	500 mM
Bis-Tris	500 mM
EDTA	20,5 mM
Chlorobutanol	1 mM

1x NuPAGE Transfer Puffer:

20x NuPAGE Transfer Puffer	5% (v/v)
Methanol	20% (v/v)
A. dest.	ad 1000 ml

Ponceau S:

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

5x TTBS-Waschpuffer:

Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM
NaCl	100 mM
Tween®20	0,1% (v/v)

Nitrozellulose-Membran-StrippingStripping-Puffer:

Tris-HCl (pH 6,8)	62,5 mM
SDS	2% (w/v)
2-Mercaptoethanol	100 mM

Reinigung der RNA-Präparation von genomischer DNA:10x DNase-Puffer:

Tris-HCl (pH 8,3)	0,1 M
KCl	0,5 M
MgCl ₂	15 mM

DNA-Gelelektrophorese:50x TAE:

Tris - Base	242 g
Eisessig (mind. 98% Säure)	57,1 ml
Millipore Wasser	ad 900ml
0,5 M EDTA Lösung (pH 8,0)	100ml

10x DNA-Probenpuffer:

Glycerol	30% (v/v)
Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Xylencyanol FF	0,25% (w/v)

TGF β ₂-ELISAKarbonat-Beschichtungspuffer:

Natrium-Bikarbonat	25 mM
Natrium-Karbonat	25 mM
	pH: 9,6

TBST-Waschpuffer:

Tris-HCl (pH 7,6)	20 mM
NaCl	150 mM
Tween®20	0,05 % (v/v)

3 Methoden

3.1 Zellkultur-Methoden

3.1.1 Präparation und Kultivierung von Peritubulärzellen

Die Peritubulärzellen wurden nach dem Protokoll von Hoeben et al. (1995) aus den Hoden von 19 Tage alten Wistar-Ratten (Charles River, Sulzfeld) enzymatisch isoliert. Zwanzig Ratten wurden mit einer Überdosis CO₂ getötet und nach Durchtrennen der Arteria carotis teilweise entblutet.

Das Abdomen der Tiere wurde mit 70%igem Ethanol desinfiziert, die Hoden durch die geöffnete Bauchdecke steril entnommen und in 50 ml Zentrifugenröhrchen, in die Dulbecco's PBS (DPBS) vorgelegt wurde, überführt. Alle weiteren Arbeiten wurden in der sterilen Werkbank durchgeführt. Die Hoden wurden kurz in einer Petrischale mit Jodalkohol (1% Jod in 70%igem Ethanol) inkubiert und sofort in eine weitere Petrischale mit DPBS gegeben. Nach einer zweiten Waschung in einer Petrischale mit DPBS wurden die Hoden dekapsuliert und nochmals in DPBS überführt.

50 mg Trypsin wurden in 20 ml DPBS gelöst und zusammen mit 0,2 ml DNase I-Lösung (1 mg/ml) durch einen 0,4 µm Filter steril filtriert. Die mit einer Pinzette zerkleinerten Hoden wurden 30-50 min in der Trypsin/DNase I-Lösung in einer 100 ml Glasflasche bei 32°C und 140 rpm im Schüttel-Wasserbad inkubiert. Die Dauer der Inkubation richtete sich nach dem Verdauungszustand der Tubuli und wurde beendet, wenn diese nach der mikroskopischen Kontrolle (Axiovert 135, Zeiss, Oberkochen; CKX41, Olympus, Hamburg) verkürzt und gestreckt vorlagen.

Der enzymatische Verdau wurde durch die Zugabe von Trypsin-Inhibitor (Endkonzentration 10 mg/ml DPBS) gestoppt. Das verdaute Gewebematerial wurde für 10-20 min der Schwerkraft überlassen. Danach wurde der Überstand abgenommen und weitere 50 mg Trypsin-Inhibitor in 20 ml DPBS zu dem Sediment gegeben. Anschließend folgten 6-8 Waschschrte mit jeweils 25 ml DPBS, wobei nach Zugabe des DPBS jeweils 10 min bis zum Sedimentieren der Tubuli gewartet wurde, um anschließend den Überstand zu verwerfen.

Die nächste enzymatische Inkubation mit 20 mg Hyaluronidase und 20 mg Collagenase, gelöst in steril filtrierten 10 ml DPBS mit 0,2 ml DNase I-Lösung, erfolgte für 10-20 min im Wasser-Schüttelbad bei 32°C und 140 rpm. Die Inkubation wurde nach mikroskopischer Kontrolle beendet, wenn die Tubuli als Zeichen für die Ablösung der Peritubulärzellen eine irreguläre Oberfläche aufwiesen.

Die Tubuli wurden für 10 min der Schwerkraft überlassen. Anschließend wurde der tubulusfreie Überstand mit den Peritubulärzellen abgenommen und mit Medium für Peritubulärzellen (RPMI 1640 mit 10% FKS) versetzt.

Die Tubuli wurden für die Gewinnung der Sertoli-Zellen weiterverwendet (s.u.).

Die Peritubulärzellen wurden für 10 min der Schwerkraft überlassen und dann für 10 min bei 500 rpm zentrifugiert. Die Peritubulärzellen wurden in 10 ml Medium resuspendiert und in 10 Kulturflaschen (75 cm²) ausgesät.

Durch zweimaliges Trypsinieren der Zellen an Tag 3 und Tag 5 nach der Präparation wurden die kontaminierenden Zellen (z.B. Sertoli-Zellen, Makrophagen) eliminiert, so dass die Reinheit der Peritubulärzellkultur mindestens 95 % betrug. Dies wurde vor den Inkubationsversuchen mittels Phasenkontrast-Mikroskopie an Hand der typischen Morphologie der Peritubulärzellen verifiziert.

Die Zellen wurden bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert (Hera Cell, Heraeus Instruments GmbH, Hanau; CB Serie, Binder GmbH, Tuttlingen). Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle 3-4 Tage. Sobald die Zellen 100% Konfluenz erreicht hatten, wurden sie passagiert.

Dazu wurden die Zellen zunächst zweimal mit je 10 ml DPBS gewaschen, bevor 1 ml Trypsin/EDTA (0,5 g Trypsin; 0,2 g EDTA/ DPBS) pro Kulturflasche zu den Zellen gegeben und 2-3 min bei 37°C inkubiert wurde. Sobald sich die Zellen vom Boden gelöst hatten (mikroskopische Kontrolle), wurde das Trypsin durch die Zugabe von Medium inaktiviert. Die Zellen wurden für 10 min bei 500 rpm zentrifugiert und in Medium resuspendiert. Die Zellen einer Kulturflasche wurden anschließend auf zwei Gefäße verteilt.

Für die Versuche wurden die Peritubulärzellen zur Ausdifferenzierung mindestens 24 h bei 32°C und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert.

3.1.2 Präparation und Kultivierung von Sertoli-Zellen

Im Anschluss an die Präparation der Peritubulärzellen wurden die dabei anfallenden Tubuli zur Gewinnung von Sertoli-Zellen nach dem modifizierten Protokoll von Hoeben et al. (1995) verwendet.

Die Tubuli wurden mit 20 mg Hyaluronidase in 20 ml DPBS bei 32°C und 140 rpm im Schüttel-Wasserbad für 50-60 min inkubiert.

Danach wurde Sertoli-Zell-Medium (RPMI 1640 ohne FKS) zugegeben und die Tubuli für 10 min der Schwerkraft überlassen. Der Tubulus-freie Überstand wurde verworfen und das Sediment in 12 ml Medium resuspendiert. Durch mehrmaliges Aspirieren der Tubuli durch eine 18 Gauge Kanüle (1,2 x 40 mm) wurden die Sertoli-Zellen herausgelöst und anschließend auf 6 Zellkulturflaschen (75 cm²) aufgeteilt.

Die so gewonnene unreine Sertoli-Zell-Kultur wurde durch einen hypotonen Schock an Tag 2 nach der Präparation von kontaminierenden Zellen (z.B. Peritubulärzellen) befreit.

Dafür wurde nach dem Entfernen des Mediums der Boden der Zellkulturflasche mit einer steril filtrierten 20 mM Tris-Lösung für 2-2½ min bedeckt. Nach der Inkubation wurde die Tris-Lösung abgenommen und die Zellen zweimal mit Medium gewaschen.

Die Sertoli-Zellen teilen sich in Kultur nicht mehr und lassen sich daher nicht passagieren. Kultiviert wurden die Sertoli-Zellen bei einer Temperatur von 32°C und einem CO₂-Gehalt von 5% (Hera Cell, Heraeus Instruments GmbH, Hanau; CB Serie, Binder GmbH, Tuttlingen). Das Medium wurde alle 2-3 Tage erneuert.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Mit Hilfe der Bürker-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt. Bei sehr hohen Zellzahlen wurde die Zellsuspension 1/10 mit Trypanblau (Gibco BRL, Berlin) verdünnt und dann auf die Zählkammer gegeben.

Es wurden unter dem Mikroskop 25 Kleinstquadrate unter zu Hilfenahme der L-Regel ausgezählt und die Zellzahl mit folgender Formel berechnet:

Zellzahl/ml = Anzahl der gezählten Zellen x Verdünnungsfaktor x Kammerfaktor
Der Kammerfaktor beträgt 10⁴.

3.1.4 Stimulation der Zellen mit Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor

Bei den Peritubulärzellen wurde vor Beginn der Stimulation der FKS-Gehalt des Mediums von 10% auf 1% reduziert, da im Serum enthaltene Substanzen den Versuch hätten beeinflussen können. Außerdem diene der reduzierte FKS-Gehalt der Erreichung einer verminderten Grundaktivität der Zellen, so dass mögliche Effekte besser dargestellt werden konnten. Zur Verringerung des FKS-Gehaltes wurden die Zellen für jeweils 1 h mit Medium in absteigender FKS-Konzentration (5%, 2,5%, und 1%) bei 32°C inkubiert.

Die Stimulation der Zellen erfolgte durch Zugabe des rec MIF zum Medium in den Kulturgefäßen. Stimuliert wurde über unterschiedliche Zeiträume und mit unterschiedlichen MIF-Konzentrationen bei einer Temperatur von 32°C und einem CO₂-Gehalt von 5%. Als Kontrolle wurden die Zellen nur mit Medium inkubiert.

Die Aufbereitung der stimulierten Zellen erfolgte versuchsspezifisch.

3.2 Morphologische Nachweisverfahren

3.2.1 Immunzytochemie an kultivierten Peritubulär- und Sertoli-Zellen

Die auf Glasplättchen in 24-Well-Platten ausgesäten Peritubulär- und Sertoli-Zellen wurden mit DPBS gewaschen und dann mit -20°C kaltem Methanol für 10 min bei 4°C fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit DPBS konnten die mit DPBS bedeckten Zellen bei 4°C bis zur Durchführung der Immunzytochemie gelagert werden.

Tab.1 Verwendete Primär- und Sekundär-Antikörper (AK):

Primär-AK	Firma	Sekundär-AK	Firma
Smooth muscle α -actin (Mouse monoclonal IgG)	DAKO, Dänemark	Cy3-conjugated goat-anti-mouse IgG	Dianova, Hamburg

Der Primär-Antikörper wurde in verschiedenen Verdünnungen (1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:500) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach dreimaligem Waschen mit DPBS der Sekundär-Antikörper 1:1000 in Roti-Block (Firma Roth) verdünnt für 1 h bei 37°C auf den Zellen belassen. Bei dem Detektions-Antikörper handelte es sich um einen mit dem Fluorochrom Cy3 (Indocarbocyanin) gekoppeltes Immunoglobulin.

Danach wurde erneut dreimal mit DPBS gewaschen, die Glasplättchen aus den Vertiefungen entfernt und mit einem Tropfen flüssigem Eindeckmittel (Vectashild, Vector Laboratories, Burlingame, USA) auf einen Objektträger gelegt. Der im Eindeckmittel enthaltene Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4,6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid $C_{16}H_{15}N_5$) bildet DNA-DAPI-Komplexe, wodurch sich die Zellkerne fluoreszenzmikroskopisch nachweisen lassen.

Die lichtgeschützt gelagerten Objektträger wurden anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop (Leica, Bensheim) betrachtet und photographisch dokumentiert.

3.2.2 Öl-Rot-O-Färbung von kultivierten Sertoli-Zellen (SCs)

Die in 6-Well-Platten auf Glasplättchen ausgesäten Sertoli-Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 30 min mit 10%igem Formalin fixiert. Nach Entfernung der Formalinlösung, folgte ein Waschschrift mit A. dest.. Anschließend wurden die Zellen 5 min mit 60%igem Isopropanol inkubiert. Es folgte die Färbung mit der Öl-Rot-O-Arbeitslösung für 5 min bei Raumtemperatur, die durch einen Waschschrift mit Leitungswasser gestoppt wurde. Danach wurden die Zellkerne durch eine einminütige Inkubation mit Hämatoxylin gegengefärbt und die Zellen erneut mit Leitungswasser gewaschen. Die Glasplättchen wurden mit einem Tropfen Eindeckmittel (Crystal MountTM, Sigma) auf einem Objektträger fixiert und lichtmikroskopisch (Leica, Bensheim) betrachtet.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Western-Blot-Analyse

3.3.1.1 Gewinnung der Proben für die Western-Blot-Analyse

Die über unterschiedliche Zeiträume stimulierten Zellen wurden dreimal mit kaltem DPBS gewaschen, bevor der Probenpuffer direkt auf die Zellen gegeben wurde. Die Menge des Puffers richtete sich nach der Wachstumsfläche der Zellen. Nach einer kurzen Inkubationszeit wurden die lysierten Zellen mit dem Zellschaber abgelöst und mit einer 1 ml Spritze durch eine Kanüle (27G = 0,4 x 20 mm) in ein Reaktionsgefäß überführt, wobei die Zellbestandteile zerkleinert wurden. Anschließend wurden die Proteine für 10 min bei 95°C denaturiert und bei -20°C gelagert.

3.3.1.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Herstellung der Gele und die Elektrophorese wurden nach dem Prinzip der von Laemmli (Laemmli, 1970) beschriebenen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in einer Slab-Gel-Kammer (Keutz, Reiskirchen) durchgeführt. SDS-Gele (Acrylamidkonzentration 12%) von 1 mm Dicke wurden mit Hilfe einer 30%igen AA-/2%Bis-Stammlösung (Rotiphorese Gel 30, Roth, Karlsruhe) hergestellt (Schagger und von Jagow, 1987). Das Sammelgel besaß eine Acrylamidkonzentration von 4%. 5 ml der SDS-Gel-Lösung wurden mit 50 µl 10%iger Ammoniumpersulfatlösung und 5 µl Tetramethyldiamin (TEMED) als Polymerisationsstarter versetzt und in die Gelkammer gegossen. Um einen geraden Abschluss des Gels zu erhalten, wurden die Gele mit A. dest. überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren erfolgte die Herstellung des Sammelgels. Dafür wurde 1 ml Sammelgel-Lösung mit 5 µl 10%iger APS-Lösung und 1 µl TEMED versetzt und damit das Trenngel überschichtet. Nach der Polymerisation wurden die Probenaschen mit der Probe beladen. Die Kammer wurde innen und außen mit 1x Elektrophorese-Puffer befüllt. Die durch Bindung des anionischen Detergens SDS sämtlich

negativ geladenen Proteine wurden mit Laufrichtung zur Anode für 1 h bei 200 V aufgetrennt.

Als Molekulargewichtsmarker wurde der „Prestained SDS-PAGE Standard (Broad Range)“ der Firma BIO-RAD (Herkules) verwendet:

Myosin	206,6 kDa
α -Galactosidase	115,7 kDa
Bovines Serum Albumin	98 kDa
Ovalbumin	54,6 kDa
Corboanhydrase	37,4 kDa
Sojabohnen Trypsininhibitor	29,6 kDa
Lysozym	20 kDa
Aprotinin	6,8 kDa

Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele entweder zur Analyse des Proteinmusters gefärbt oder die Proteine zur Durchführung eines Immunoblots auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

3.3.1.3 NuPAGE® BIS-TRIS Gelelektrophorese mit Fertiggelen

Hierbei wurden Bis-Tris-HCl-gepufferte Polyacrylamid-Gele (pH 6,4) mit einem Acrylamidgradienten von 4–12 % der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit Hilfe eines MOPS-SDS-Laufpuffers bei 200 V für 56 min.

3.3.1.4 Coomassie-Blau-Färbung

Im Anschluss an die Gelelektrophorese folgte eine Färbung des Gels in Coomassie-Färbelösung bei 50°C für 30 min. Nach kurzem Spülen mit Leitungswasser wurde die Entfärbung des Gels unter mehrmaligem Wechseln der Entfärbelösung fortgesetzt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren (ca. 60-120 min). Das Ergebnis wurde mit dem Gel-Jet-Imager der Firma Intas (Göttingen) dokumentiert.

3.3.1.5 Western-Blot-Analyse

Bei der Western-Blot-Analyse werden die negativ geladenen Proteine nach einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese im elektrischen Feld aus dem Gel auf eine Trägermatrix mit hoher Proteinaffinität übertragen. Als Trägerfolie diente die Nitrozellulosemembran Hybond ECL (Amersham Biosciences, Braunschweig) mit einer Porengröße von 0,2 μm .

Semi-Dry-Blot

Die Semi-dry Technik (Kyhse-Andersen, 1984) wurde mittels einer Horizontal-Blot-Kammer (PEQLAB, Erlangen) durchgeführt. Sie stellt eine Methode dar, bei der die Filterpapiere in Puffer getränkt werden und die Übertragung der Proteine zwischen zwei horizontalen Graphitplatten stattfindet.

Der Blot wurde folgendermaßen zusammen gefügt:

Kathode (-)

- 4 Lagen Filterpapier, getränkt in Kathodenpuffer
- Gel, getränkt in Kathodenpuffer
- Nitrozellulose-Membran, getränkt in Anodenpuffer
- 4 Lagen Filterpapier, getränkt in Anodenpuffer
- 4 Lagen Filterpapier, getränkt in konzentriertem Anodenpuffer

Anode (+)

Die luftblasenfrei aufeinander gelegten Blot-Komponenten wurden bei 100 mA pro Gel für 1 h geblottet.

Nassblot-Verfahren

Das Nassblot-Verfahren, oder auch Tankblot genannt, wurde mit dem XCell SureLock™ Blot Modul (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Bei dieser Methode werden Gel und Membran zwischen Filterpapier und Schwammtüchern in eine mit Puffer gefüllte vertikale Blotkammer integriert.

Die in NuPAGE Transferpuffer getränkten Blotkomponenten wurden folgendermaßen in der Kammer zusammengefügt:

Anode (+)

- Blotting Pad
- Blotting Pad
- 3 Lagen Filterpapier
- Nitrozellulose-Membran
- Gel
- 3 Lagen Filterpapier
- Blotting Pad
- Blotting Pad

Kathode (-)

Danach wurde die innere Blotkammer mit NuPage Transferpuffer und die äußere Kammer zur Kühlung mit A. dest. gefüllt. Die Proteine wurden bei 30 V für 1 h auf die Membran übertragen.

3.3.1.6 Ponceau-S-Färbung

Nach dem Blotten wurde die Membran zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung der Taschen mit Protein und zur Kontrolle der Proteinübertragung für 2 min in Ponceau S-Färbelösung gefärbt. Nach Spülen mit A. dest. wurde das Proteinmuster sichtbar.

3.3.1.7 Immunoblot-Analyse

Die auf die Membran übertragenen Proteine lassen sich mit spezifischen Antikörpern nachweisen.

Die Membran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit dem Blocking Reagenz (s. Tab. 2) 1 h bei RT unter ständigem Schütteln inkubiert, dann mit dem Primär-Antikörper (Tabelle 2) in einer feuchten Kammer für 1 h bei RT belassen und im Anschluss für 1 h unter viermaligem Wechseln des TTBS-Puffers gewaschen.

Tab. 2: Verwendete Primär-Antikörper (AK):

Primär-AK	Firma	Verdünnung	Blocking Reagenz
Anti-Phosphotyrosin, clone 4G10 (mouse monoclonal IgG _{2bκ})	Upstate Biotechnology, Lake Placid (USA)	1 : 1000 in 5% BSA in TTBS	5% Gelatine gelöst in TTBS
Anti-Phosphothreonin, clone 1E11 (mouse monoclonal IgG)	Upstate Biotechnology, Lake Placid (USA)	1 : 500 in 5% BSA in TTBS	5% Gelatine gelöst in TTBS
Anti-Phosphoserin, clone 16B4 (mouse monoclonal IgM)	Upstate Biotechnology, Lake Placid (USA)	1: 500 in 1x Roti-Block	1x Roti-Block (Roth, Karlsruhe)
Anti-Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204); clone E10 (mouse monoclonal IgG)	Cell Signaling (Massachusetts)	1:2000 in 5% Milchpulver in TTBS	5% Milchpulver gelöst in TTBS
Anti-p44/42 MAP Kinase, (rabbit polyclonal IgG)	Cell Signaling (Massachusetts)	1:1000 in 5% BSA in TTBS	5% Milchpulver gelöst in TTBS

Es folgte die Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur mit einem Peroxidasegekoppelten Sekundär-Antikörper, der gegen den Fc-Teil des Primär-Antikörpers gerichtet ist.

Tab. 3: Für die genannten Primär-Antikörper wurden folgende Sekundär-Antikörper verwendet:

Primär-AK	Sekundär-AK	Firma	Verdünnung
Anti-Phosphotyrosine, clone 4G10 (mouse monoclonal IgG _{2bκ})	sheep-anti-mouse IgG (Peroxidase gekoppelt)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	1 : 3000 in 5% BSA gelöst in TTBS
Anti-Phosphothreonine, clone 1E11 (mouse monoclonal IgG)	sheep-anti-mouse IgG (Peroxidase gekoppelt)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	1 : 3000 in 5% BSA gelöst in TTBS
Anti-Phosphoserine, clone 16B4 (mouse monoclonal IgM)	goat-anti-mouse IgM (Peroxidase gekoppelt)	Rockland, Gilbertsville	1: 3000 in 1x Roti-Block
Anti-Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204); clone E10 (mouse monoclonal IgG)	goat-anti-mouse IgG (Peroxidase gekoppelt)	Perbio Science, Bonn	1:3000 in 5% Milchpulver gelöst in TTBS

Anti-p44/42 MAP Kinase, (rabbit polyclonal IgG)	goat-anti-rabbit IgG (Peroxidase gekoppelt)	Perbio Science, Bonn	1:3000 in 5% Milchpulver gelöst in TTBS
---	---	----------------------	---

Anschließend wurde die Membran für 1 h unter viermaligem Wechseln des TTBS-Puffers gewaschen.

Die Detektion des Immunkomplexes erfolgte mit Hilfe des „enhanced chemiluminescence system“ (ECL, Amersham-Biosciences, Braunschweig). Dabei reagiert das in der Peroxidase-Reaktion frei gewordene Sauerstoffradikal (O_2^{2-}) mit Luminol, welches in einen angeregten Zustand übergeht. Anschließend wird unter Energieverlust Licht (428 nm) abgestrahlt, wobei ein Phenolderivat als Verstärker (Enhancer) der Lichtemission dient.

Durch die Abstrahlung des Lichtes entstehen bei der Exposition eines Röntgenfilms Verschattungen. Die Detektion der Lichtemission erfolgte in Dunkelheit auf einem Hyperfilm ECL von Amersham-Biosciences (Freiburg) für 1-60 min.

Nach Detektion der p44/42-MAP-Kinase, wurde der Antikörper-Komplex abgelöst (stripping), um im Anschluss eine Immunoblot-Analyse derselben Membran mit dem anti-p44/42-MAPK-Kinase-Antikörper (rabbit polyclonal IgG) durchzuführen.

3.3.1.8 Nitrozellulose-Membran-Stripping

Um eine bereits mit Western-Blot untersuchte Nitrozellulose-Membran (siehe 3.3.1.7) ein weiteres Mal mit einem Antikörper zu analysieren, wurde die Membran 30 min bei 55°C unter Bewegung in Stripping-Puffer inkubiert. Dabei lösen sich die Antigen-Antikörper-Bindungen durch die reduzierende und denaturierende Einwirkung von DTT und SDS. Durch zwei Waschschrte von je 10 min bei RT in TTBS wurden die gelösten Substanzen entfernt. Alle weiteren Schritte entsprachen dem Vorgehen bei der Western-Blot-Analyse (siehe 3.3.1.7).

3.3.2 Enzyme-linked-immunosorbent-Assay

3.3.2.1 Messung des zyklischen AMP in MIF-stimulierten Sertoli-Zellen

Die Messungen wurden mit Hilfe des Direct Cyclic AMP Enzyme Immunoassay Kit der Firma Assay Designs (Ann Arbor, USA) durchgeführt. Es handelt sich hierbei um einen kompetitiven ELISA. Die ELISA-Platte liegt bereits mit einem polyklonalen Antikörper gegen cAMP beschichtet vor. An diesen Antikörper binden kompetitiv entweder das in der Probe enthaltene cAMP, oder ein an eine alkalische Phosphatase gekoppeltes cAMP. Der von der alkalischen Phosphatase erzeugte Gelbton nach Zugabe des Substrats ist daher umgekehrt proportional zu dem Gehalt an cAMP in der Probe.

Die für 15 min, 30 min und 60 min mit Medium alleine, 50 ng/ml oder 100 ng/ml rec MIF oder 10 mmol Forskolin in 6-Well-Platten kultivierten Sertoli-Zellen wurden mit 600 µl 0,1 M HCl für 20 min lysiert. Anschließend wurden die Lysate für 10 min bei +4°C und 700 rpm zentrifugiert. Zu je 200 µl des abgenommen Überstands bzw. der Standards wurden 10 µl Acetylierungsreagenz hinzugegeben. Die Standards besaßen cAMP-Konzentrationen von 20, 5, 1.25, 0.312 und 0.078 pmol/ml.

Je 100 µl der Standards oder der Proben wurden zusammen mit 50 µl Neutralisierungsreagenz und 50 µl Konjugat (= Lösung, die das an alkalische Phosphatase gekoppelte cAMP enthielt) in die Wells der ELISA-Platte pipettiert und für 2 h bei RT und 500 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Wells mit 200 µl Waschpuffer folgte die Zugabe von 200 µl Substrat (p-Nitrophenylphosphat-Lösung). Die Reaktion wurde nach 1 h bei RT und 500 rpm mit 50 µl 1 M Trisnatriumphosphat gestoppt und die Farbintensität in einem ELISA-Reader (Acterna GmbH & Co. KG) bei 405 nm Messwellenlänge und 590 nm Referenzwellenlänge gemessen.

3.3.2.2 Bestimmung des TGF-β2-Proteingehaltes in Kulturüberständen MIF-stimulierter Peritubulärzellen

Zur Bestimmung des biologisch aktiven TGF-β2 wurde das TGF-β2 Emax®ImmunoAssay System der Firma Promega (Madison, USA) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen „Sandwich“-ELISA. Eine 96-Well-Platte wurde mit einem TGF-β2-Antikörper beschichtet, der das freie TGF-β2 bindet. Ein

zweiter TGF- β 2-Antikörper bindet wiederum an das bereits gebundene TGF- β 2. Nach einem Waschschrift wird ein Antikörper-Konjugat mit Meerettich-Peroxidase zugefügt, welches an den AK-TGF- β 2-AK-Komplex bindet und das Substrat Tetramethylbenzidine (TMB) umsetzt. Somit ist die Farbintensität proportional zu dem gebundenen TGF- β 2.

Peritubulärzellen wurden für 2 h, 24 h, 48 h und 72 h mit jeweils 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml rec MIF im Medium oder Medium alleine bei 32°C in 6-Well-Platten inkubiert. Die Kulturüberstände wurden für 10 min bei 500 rpm zentrifugiert. Zu 1 ml Kulturüberstand wurde zur Säureaktivierung des biologisch inaktiven TGF- β 2 1 M HCl hinzugegeben, bis der pH 2-3 betrug. Nach 15 minütiger Inkubation bei RT wurde mittels 1 M NaOH der pH wieder auf 7-8 eingestellt und die Proben bei -80°C bis zur Durchführung des ELISAs aufbewahrt. Die in den 6-Well-Platten verbliebenen Zellen wurden mit 600 μ l Trypsin/EDTA für 2 min bei 37°C abgelöst, die Reaktion mit 4 ml Peritubulärzellmedium gestoppt und die Zellen für 10 min bei 500 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden bis auf 0,5 ml entfernt, die Zellen in dem verbliebenen Medium resuspendiert und ausgezählt.

Eine ELISA-Platte Nunc-Immuno Modul C8 Maxisorb (Nunc GmbH & CO. KG, Wiesbaden) wurde zunächst mit einem TGF- β 2-Beschichtungsantikörper in Karbonatbeschichtungspuffer für 16-20 h bei 4°C beschichtet.

Nach einer 15 min Anwärmphase der Platte bei Raumtemperatur wurde der Inhalt entfernt und die unspezifischen Bindungsstellen durch eine Inkubation mit 270 μ l des Blockierungspuffers pro Vertiefung für 35 min bei 37°C blockiert. 100 μ l Probe und Standard wurden nach Entfernung des Blockierungspuffers für 1,5 h bei RT auf einem Schüttler (100 - 500 rpm) inkubiert. Die Standards besaßen Konzentrationen von 1000, 500, 250, 125, 62, 31, 15.6 und 0 pg/ml.

Dem viermaligen Waschen der Platte mit Waschpuffer folgte die Inkubation mit 100 μ l des in Probenpuffer verdünnten anti-TGF- β 2-Antikörper für 2 h bei RT und 100-500 rpm. Nach erneutem viermaligem Waschen wurde mit 100 μ l Meerettich-Peroxidase-Konjugat pro Well für 2 h bei Raumtemperatur und 100-500 rpm inkubiert. 100 μ l der TMB Lösung wurden für 15 min bei RT inkubiert und die Farbreaktion dann durch die Zugabe von 100 μ l 1 M Salzsäure gestoppt. Die Absorption wurde anschließend in einem ELISA Reader (Acterna, GmbH & CO.KG) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

3.3.2.3 Bestimmung des TNF- α -Proteingehaltes in Kulturüberständen MIF-stimulierter Peritubulärzellen

Zur Bestimmung des TNF- α -Gehaltes im Zellkulturüberstand MIF-stimulierter Peritubulärzellen wurde der „rat TNF- α Enzyme Immunometric Assay Kit“ der Firma Assay Designs (Ann Arbor, USA) verwendet.

Hierbei handelt es sich um einen „Sandwich“-ELISA, bei welchem die 96-Well-Platte bereits mit einem polyklonalen Anti-TNF- α -Antikörper beschichtet vorliegt, der das freie TNF- α bindet. Ein zweiter Meerrettich-Peroxidase gekoppelter anti-TNF- α -Antikörper bindet wiederum an das immobilisierte TNF- α . Die Peroxidase setzt das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) um, so dass die Farbintensität proportional zu dem gebundenen TNF- α ist.

Peritubulärzellen wurden für 2 h, 24 h, 48 h und 72 h mit jeweils 50 ng/ml rec MIF im Medium oder Medium alleine bei 32°C in 6-Well-Platten inkubiert. Die Kulturüberstände wurden für 10 min bei 500 rpm zentrifugiert und die Überstände bis zur Durchführung des ELISAs bei -80°C aufbewahrt. Die in den 6-Well-Platten verbliebenen Zellen wurden mit 600 μ l Trypsin/EDTA für 2 min bei 37°C abgelöst. Die Reaktion wurde mit 4 ml Peritubulärzellmedium gestoppt und die Zellen für 10 min bei 500 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden bis auf 0,5 ml entfernt, die Zellen in dem verbleibenden Medium resuspendiert und ausgezählt.

In die Vertiefungen der vorbeschichteten ELISA-Platte wurden 100 μ l Probe oder Standard gegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Standards besaßen TNF- α -Konzentrationen von 25.000, 12.500, 6.250, 3.125, 1.562,5, 781,25, 390,63 und 0 pg/ml.

Dem siebenmaligen Waschen der Platte mit Waschpuffer folgte die Inkubation mit 100 μ l des Peroxidase-gekoppelten anti-TNF- α -Antikörpers für 30 min bei 4°C. Nach erneutem neunmaligem Waschen wurden 100 μ l der TMB-Lösung zugegeben und für 30 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch die Zugabe von 100 μ l 1 M Schwefelsäure gestoppt und die Absorption anschließend in einem ELISA Reader (Acterna, GmbH & Co KG) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Nukleinsäureanalytik

3.3.1.1 Arbeiten mit RNA

Beim Arbeiten mit RNA ist es auf Grund des ubiquitären Auftretens von RNasen notwendig, Vorkehrungen zu treffen, die ein RNase-freies Arbeiten gewährleisten. Sämtliche Arbeiten wurden daher mit sterilen, autoklavierten Einmalgeräten bzw. hitzesterilisierten Glaswaren durchgeführt. Alternativ wurden die Geräte vor Gebrauch für mindestens 30 min mit 3% H₂O₂ behandelt. Während des Arbeitens wurden Handschuhe getragen.

3.3.1.2 RNA-Isolierung aus Kulturzellen

Die Isolierung der Total-RNA erfolgte nach der TRIzolTM-Methode (GibcoBRL, Grand Island NY).

In eine 75 cm²-Zellkulturflasche wurde 1 ml TRIzolTM gegeben und die Zellen nach kurzer Inkubation mit einem Zellschaber abgelöst. Die Zellsuspension wurde in Eppendorf-Gefäße überführt, wo die Zellen zur Homogenisierung mehrmals durch die Kanüle (0,55 x 25 mm) einer Spritze gepresst und anschließend für 10 min bei RT inkubiert wurden.

Das Zell-Lysat wurde nach Zugabe von 1 ml Chloroform für 5 min bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert, wonach drei Phasen zu unterscheiden waren: Eine untere rötliche Phase mit der genomischen DNA, eine mittlere weißliche Phase mit den Proteinen und eine obere wässrige Phase mit der Total-RNA.

Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, mit der gleichen Menge Chloroform versetzt und erneut 15 min bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach einer erneuten Wiederholung dieses Reinigungsschrittes wurde die obere wässrige Phase mit 0,5 ml Isopropanol versetzt und 30 min bei RT gefällt. Nach der Sedimentierung für 30 min bei 12.000 rpm und 4°C wurde die RNA mit 100 µl eiskaltem, 70%igem Ethanol gewaschen. Das Ethanol wurde nach 15 min Zentrifugation bei 12.000 rpm und 4°C vorsichtig abgenommen. Das RNA-Pellet wurde luftgetrocknet und dann in 50 µl Wasser mit 0,5 µl RNase Inhibitor (RNasin Ribonuclease Inhibitor, 40U/µl, Promega, Heidelberg) gelöst. Die RNA-

Konzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt und die Proben bei -80°C gelagert.

3.3.1.3 Spektrophotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Das Spektralphotometer misst die Lichtabsorption von Proben bei einem bestimmten Längenwellenbereich. Die gelöste RNA absorbiert UV-Licht bei einem Absorptionsmaximum von $\lambda = 260$ nm. Die RNA-Konzentration kann nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ($A = c \times l \times \varepsilon$; c = Konzentration der Substanz, A = gemessene Absorption, l = Küvettenbreite, ε = Extinktionskoeffizient) berechnet werden. Nach der RNA-Aufreinigung wurde die RNA-Konzentration photometrisch (Ultrospec 2100 pro, Amersham, Braunschweig) bestimmt. Dabei gab der Quotient von OD_{260}/OD_{280} einen Hinweis auf den Reinheitsgrad der Präparation, wobei eine gute Präparation Werte von 1,8-2,0 aufweisen sollte. Werte kleiner als 1,8 zeigen Protein- bzw. Phenol-Verunreinigungen an.

3.3.1.4 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Reinigung der RNA-Präparation von genomischer DNA

Nach der RNA-Isolierung erfolgte ein Verdau vorhandener DNA mit DNase I (Roche Diagnostics, Mannheim), wodurch Verunreinigungen mit DNA eliminiert wurden.

Folgender Ansatz wurde für 40 min bei 37°C inkubiert:

x μ l RNA (4 μ g)

2 μ l DNase I 10x Puffer

2 μ l RNase frei DNase I (10 U/ μ l, Roche Diagnostics, Mannheim)

ad 20 μ l mit Millipore-Wasser

Die Reaktion wurde durch eine 10minütige Inkubation bei 72°C gestoppt. Anschließend wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Reverse-Transkription (cDNA-Synthese)

Die gereinigte Total-RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Ein Oligo(dT) Primer kann hierbei mit Hilfe der reversen Transkriptase des Moloney-Leukämie-Virus der Maus (M-MLV) einen zu der RNA komplementären DNA-Strang (cDNA) herstellen, welcher dann als Matrize in der PCR dient. Somit kann durch die RT-PCR die Expression eines Genes auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden.

Der folgende Ansatz wurde für 10 min bei 70°C auf dem Heizblock denaturiert und dann auf Eis gestellt:

2,5 µg RNA

2 µl Oligo dT (12-18) Primer (Promega, Heidelberg)

ad 20 µl mit Millipore-Wasser

Danach wurde der zwischenzeitlich pipettierte Ansatz:

8 µl 5x RT-Puffer (Promega)

2 µl dNTP Mix (ACGT, je 10 mM, Pomega)

0,5 µl RNAsin® (40 U/µl, Promega)

6 µl Millipore-Wasser

zu den Proben auf einen 42°C warmen Heizblock gegeben und für 2 min inkubiert, bevor 1 µl reverse Transkriptase (200 U/µl, Promega, M-MLV RNase H Minus) hinzugefügt wurde.

Es folgte eine Inkubation für 50 min bei 42°C, während dessen die cDNA-Synthese stattfand. Anschließend wurde die reverse Transkriptase für 10 min bei 70°C denaturiert. Die cDNA-Proben wurden bei -20°C gelagert.

Verwendete Oligonukleotid-Primer

Die Sequenzen der Oligonukleotid-Primer wurden mit Hilfe des Programms Primer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) ermittelt. Anschließend wurden sie auf ihre Sequenzspezifität überprüft und über MWG-Biotech AG (Ebersberg) bezogen.

Die lyophilisierten Primer wurden durch Zugabe von Millipore-Wasser auf eine Konzentration von 500 pmol/µl gebracht und bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch wurden sie mit Millipore-Wasser 1:5 verdünnt, so dass sie in einer Endkonzentration von 100 pmol/µl eingesetzt wurden.

Tab 4: Verwendete Oligonukleotid-Primer:

Gen	Primer-Sequenz	Fragmentgröße	Annealing-Temp.
GAPDH (Glycerinaldehyd-phosphat-Dehydrogenase), Ratte	5'-CAT TGT TGC CAT CAA CGA CC-3' 5'-TCA CAC CCA TCA CAA ACA TG-3'	320 bp	55°C

Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase-Chain-Reaction, PCR)

Zur Überprüfung der Reinheit der RNA-Präparation und der Präsenz von cDNA wurde eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) durchgeführt, bei der das in allen eukaryotischen Zellen etwa gleich stark synthetisierte Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase-„housekeeping“ Gen (GAPDH) nachgewiesen wurde.

Die PCR dient zur Vervielfältigung (= Amplifizierung) eines bestimmten, von zwei bekannten DNA-Sequenzen begrenzten, DNA-Abschnitts. Dazu lagern sich Oligonukleotidprimer, an eine definierte Sequenz der DNA-Matrize komplementär an. Diese Oligonukleotidprimer werden von einer DNA-Polymerase in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) verlängert. Die Amplifizierung einer bestimmten DNA-Sequenz verläuft in einer zyklischen Abfolge von Denaturierung der DNA-Matrize in Einzelstränge, Anlagerung der Primer (= Annealing) an die Vorlage und die folgende Verlängerung des DNA-Fragments (= Elongation).

Folgender Reaktionsansatz wurde hergestellt:

cDNA-Vorlage (Probe)	1 µl
10x PCR Puffer (20 mM MgSO ₄)	2,5 µl
PCR-Nucleotid Mix (dNTP-Mix)	0,5 µl
3'-GAPDH-Primer (100 pmol/µl)	0,5 µl
5'-GAPDH-Primer (100 pmol/µl)	0,5 µl
Pfu-DNA-Polymerase (3U/µl)	0,25 µl
Millipore Wasser	ad 25 µl

Dieser Ansatz wurde im PCR-Thermocycler (Cyclone Gradient, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) in 27 Zyklen folgendem Temperaturprofil unterzogen:

Initiale Denaturierung	2 min	98°C
Denaturierung	30 sec	94°C
Annealing	30 sec	55°C
Elongation	45 sec	72°C
Terminale Elongation	10 min	72°C

Die PCR-Produkte wurden bei -20°C gelagert oder direkt auf einem Agarose-Gel zur Analyse aufgetrennt.

Agarose-Gelelektrophorese für DNA

Zur Herstellung eines Agarose-Gels wurden abhängig von der gewünschten Konzentration die entsprechende Menge Agarose (Gibco BRL, Berlin) in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und anschließend in einen Gelschlitten mit eingesetztem Kamm gegossen. Die Dichte des Gels nach dem Erhärten wird von der Menge der eingewogenen Agarose bestimmt. Die in neutralem Milieu negativ geladene DNA wandert bei Anlegung eines elektrischen Feldes zur Anode. Die Probe wurde mit Gel-Ladepuffer versetzt und dann in die Taschen des Gels aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 15-30 min in einer 1:10.000 Verdünnung der „Sybr®Green I Nucleic Acid Gel Stain Lösung“ (Molecular Probes, Inc., Leiden, Niederlande) unter Lichtausschluss und ständigem Schütteln gefärbt. Sybr-Green bindet an die kleine Furche von doppelsträngiger DNA. Dieser Komplex wird nach Anregung mit ultraviolettem Licht sichtbar. Die Dokumentation der im Gel aufgetrennten DNA wurde mit Hilfe des Gel-Jet-Imager der Firma Intas (Göttingen) durchgeführt.

Tab. 5: Optimale Agarosekonzentrationen zur Auftrennung von Proben mit unterschiedlichen Fragmentlängen

Agarosekonzentration (w/v)	Optimale Trennung bei folgender Fragmentlänge
0,5 %	1 bis 30 kb
0,7 %	0,8 bis 12 kb
1,0 %	0,5 bis 7 kb
1,2 %	0,4 bis 6 kb
1,5 %	0,2 bis 3 kb
2,0 %	0,1 bis 2 kb

3.3.1.5 Real-time-RT-PCR

Die Real-time-PCR dient der quantitativen Expressions-Analyse von Genen. Dabei wird die unterschiedliche Emission von freiem und an DNA gebundenem Sybr-Green ausgenutzt. Bei der Elongation lagert sich kontinuierlich SYBR Green in die kleine Furche der doppelsträngigen DNA ein, wodurch die Gesamt-Fluoreszenz-Intensität ansteigt. Die Fluoreszenz-Messung am Ende jedes Zyklus der PCR dokumentiert den Mengenzuwachs an amplifizierter DNA. Je mehr cDNA in der Probe vorliegt, desto weniger Zyklen sind nötig, bis sich das Fluoreszenzsignal statistisch signifikant gegenüber dem Hintergrund abhebt und ein bestimmter Amplifikations-Schwellenwert C_t erreicht wird (Gibson et al., 1996; Freeman et al., 1999). Da die DNA während der exponentiellen Phase der PCR quantifiziert wird, in der keine limitierenden Reaktionskomponenten vorliegen, kann im Gegensatz zu anderen Verfahren eine wesentlich höhere Präzision erzielt werden.

Zu dem Ansatz einer gewöhnlichen PCR werden die Farbstoffe Sybr-Green und Fluoreszin zugesetzt. Fluorescein dient dem Gerät (iCycler, BIO-RAD, München) zum internen Fluoreszenzabgleich vor Beginn der PCR. Das beschriebene Verfahren ist eine von mehreren Methoden der Real-Time-RT-PCR.

Folgender Ansatz wurde hergestellt:

2x Reaktionspuffer	12,5 µl
Forward Primer (100 pmol/µl)	0,6 µl
Revers Primer (100 pmol/µl)	0,6 µl
Fluorescein	1 µl
Millipore-Wasser	ad 24 µl
cDNA-Vorlage	1 µl

Tab. 6: In der Real-time-PCR wurden folgende Oligonukleotid-Primer verwendet:

Gen	Primer-Sequenz	Fragmentgröße	Annealing-Temp.
GAPDH (Glycerinaldehyd-phosphat-Dehydrogenase), Ratte	5'-CAT TGT TGC CAT CAA CGA CC-3' 5'-TCA CAC CCA TCA CAA ACA TG-3'	320 bp	55°C
TGF-β2 (Transforming growth factor β2), Ratte	5'-CCG GAG GTG ATT TCC ATC TA-3' 5'-GCG GAC GAT TCT GAA GTA GG-3'	201 bp	61°C

Um Ungenauigkeiten beim Pipettieren auszugleichen, wurde eine Vierfach-Bestimmung jeder Probe durchgeführt. Am Ende der Amplifikation wurde durch den iCycler eine Schmelzkurve der PCR-Produkte erstellt, womit überprüft werden konnte, ob ausschließlich das gewünschte Produkt amplifiziert worden war.

4. Ergebnisse

4.1 Zellkultur

4.1.1 Isolierung von Peritubulärzellen

Die aus Hoden von 18 Tage alten Ratten gewonnenen Peritubulärzellen wiesen eine hohe Teilungsrate auf, so dass bereits nach 5-6 Tagen in der zweiten Passage ein hoher Reinheitsgrad beobachtet wurde (Abb. 1A und 1B).

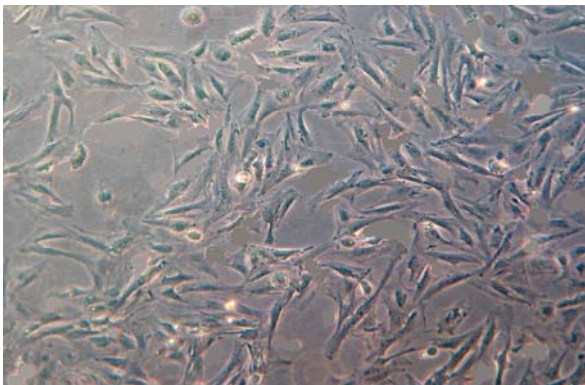


Abb. 1A: Peritubulärzellen, Passage 2 im Phasenkontrastmikroskop, x 10.



Abb. 1B: Peritubulärzelle, Passage 2 im Phasenkontrastmikroskop, x 40. Die platte, gestreckte Form der Peritubulärzelle ist gut zu erkennen.

Zur Überprüfung der Reinheit der Primärkultur wurde der Peritubulärzellmarker α -Glattmuskel-Aktin eingesetzt. In Abb. 2 sind die rot fluoreszierenden α -Glattmuskel-Aktin-Fasern der Peritubulärzellen zu erkennen. Die mit DAPI gefärbten Zellkerne erscheinen blau. Um die Zellkerne den gefärbten Zellen zuordnen zu können, wurden die individuell aufgenommenen Mikrofotografien der α -Glattmuskel-Aktin- und der DAPI-Färbung mittels Bildbearbeitung übereinander projiziert. Der Vergleich der Aktin-Färbung mit der DAPI-Gegenfärbung zeigt, dass die Passage 2 einen nahezu 100%igen Reinheitsgrad aufweist.

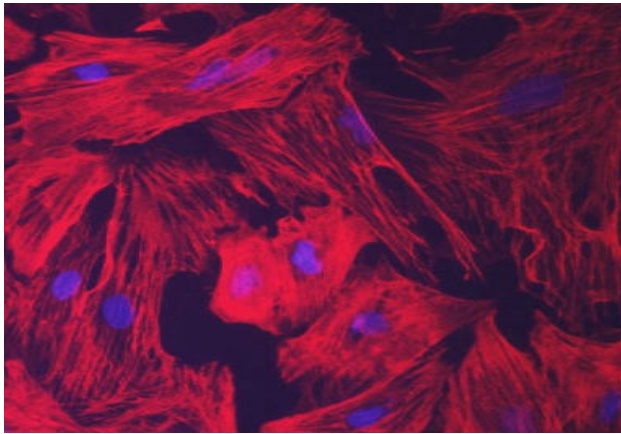


Abb. 2: Immunfluoreszenzfärbung von α -Glattenmuskel-Aktin in isolierten Hoden-Peritubulärzellen (Passage 2). DAPI-markierte Zellkerne erscheinen blau und F-Aktin-Fasern rot. x 40.

4.1.2 Isolierung von Sertoli-Zellen

Die bei der Präparation von 18 Tage alten männlichen Wistar Ratten gewonnenen Sertoli-Zellen zeigten in Kultur keine Fähigkeit zur Teilung mehr. Um einen möglichst hohen Reinheitsgrad zu erreichen, wurden die Sertoli-Zellen an Tag 2 nach der Präparation mit einer hypotonen Lösung behandelt, was zum Absterben kontaminierender Zellarten führte, da diese im Gegensatz zu den Sertoli-Zellen empfindlich auf Volumenschwankungen reagierten. Abb. 3.1 zeigt die kultivierten Sertoli-Zellen im Phasenkontrastmikroskop an Tag 5 nach der Präparation.



Abb. 3.1: Sertoli-Zellen im Phasenkontrastmikroskop an Tag 5 nach der Präparation, x 10.

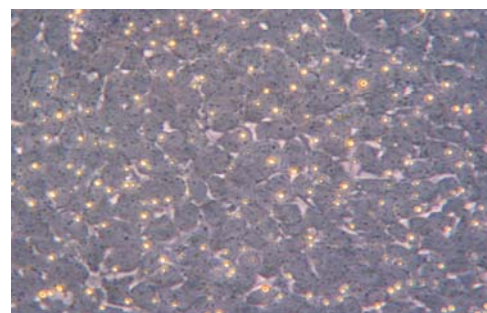


Abb. 3.2: Sertoli-Zellen im Phasenkontrastmikroskop an Tag 5 nach der Präparation, x 40. Man erkennt die kopfsteinpflasterartige Morphologie der Sertoli-Zellen

Zur Überprüfung des Reinheitsgrades der Sertoli-Zell-Kultur wurden die Zellen an Tag 5 nach der Aussaat mittels Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung eines Antikörpers gegen α -Glattmuskel-Aktin getestet. Damit sollte eine mögliche Kontamination der Sertoli-Zell-Kultur mit Peritubulärzellen erkannt werden. Insgesamt wurde ein hoher Reinheitsgrad (ca. 92%) der Sertoli-Zell-Kultur mit einer geringen Zahl kontaminierender Peritubulärzellen beobachtet (Abb. 4).

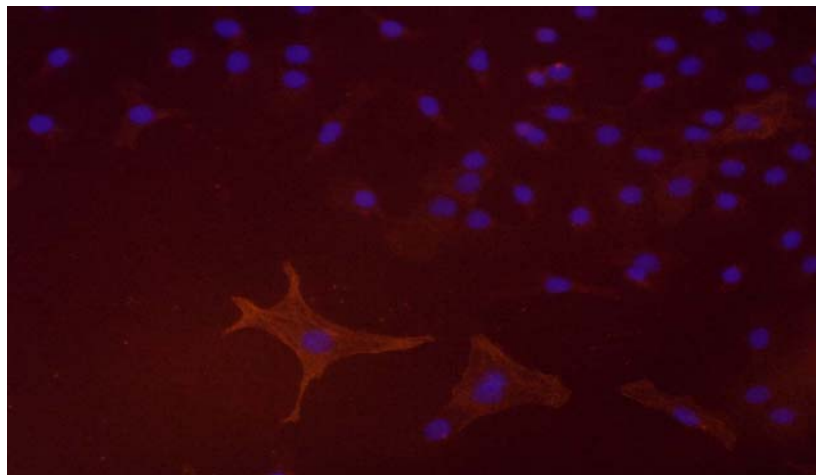


Abb. 4: Immunfluoreszenzfärbung einer Primärkultur isolierter Sertoli-Zellen mit α -Glattmuskel-Aktin. Individuelle Aufnahmen der α -Glattmuskel-Aktin- und der DAPI-Färbung wurden durch Bildverarbeitung übereinander projiziert. DAPI-markierte Zellkerne erscheinen blau und α -Glattmuskel-Aktin-Fasern der PCs rot. x 40.

Zusätzlich zu der Immunfluoreszenz wurde die Reinheit der Zellkultur mit Hilfe einer Öl Rot-O-Färbung getestet. Dadurch wurden die in Sertoli-Zellen lokalisierten Lipidtröpfchen leuchtend rot angefärbt (Abb. 5A). Als Negativkontrolle wurden Peritubulärzellen, die keine Lipidtröpfchen enthalten, mit Öl-Rot-O behandelt (Abb. 5B). Der geschätzte Reinheitsgrad der Sertoli-Zell-Kultur betrug ca. 92%.

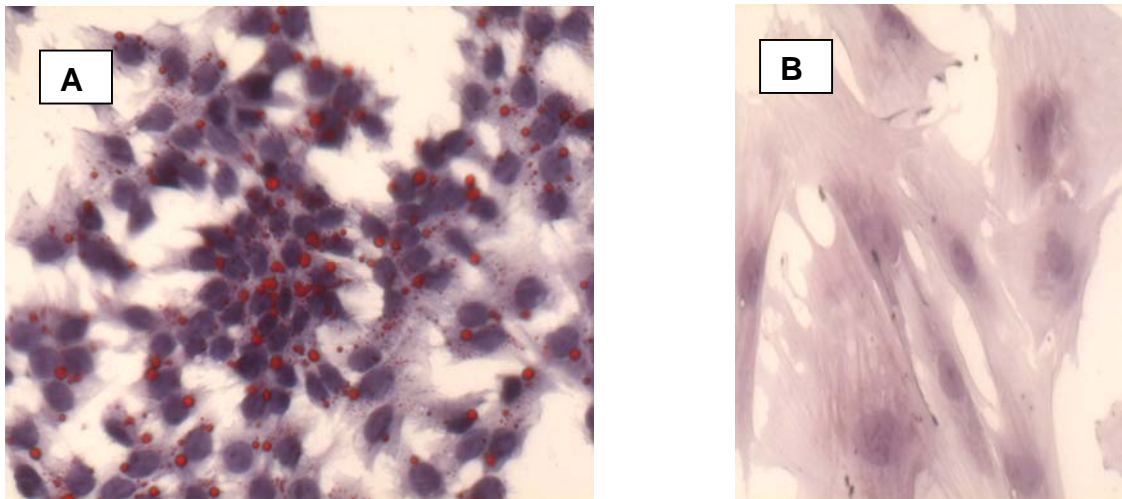


Abb. 5. Öl-Rot-O und Hämalaun gefärbte Sertoli-Zellen (A) und Peritubulärzellen (B). Lipidtröpfchen erscheinen leuchtend rot, Zellkerne sind mit Hämatoxylin dunkel violett gegengefärbt, Zellplasma blassviolett. Sertoli-Zellen fallen durch ihren hohen Gehalt an unterschiedlich großen Lipidtröpfchen auf. x 40. Der geschätzte Reinheitsgrad der Sertoli-Zell-Kultur beträgt 98%

4.2 Untersuchungen zur Signaltransduktion

4.2.1 Rolle von cAMP am MIF-induzierten-Signaltransduktionsweg in Sertoli-Zellen

Die Sertoli-Zellen wurden für jeweils 15 min, 30 min und 60 min mit rec MIF in verschiedenen Konzentrationen (50 ng/ml, 100 ng/ml in Medium) inkubiert und mit einem kommerziellen ELISA auf ihren intrazellulären cAMP-Gehalt getestet. Sertoli-Zellen, die mit 10 μ M des irreversiblen Adenylatzyklase-Aktivators Forskolin stimuliert wurden, dienten als Positivkontrolle. Das Ergebnis wurde in fünf voneinander unabhängigen Versuchen bestätigt (Abb. 6). Bei keinem der untersuchten Zeitpunkte ließ sich ein MIF-abhängiger Anstieg von cAMP nachweisen, wohingegen die mit Forskolin behandelten Sertoli-Zellen mit einem deutlichen Anstieg des cAMP-Gehaltes (im Maximum 14 pmol/ml nach 15 min) reagierten.

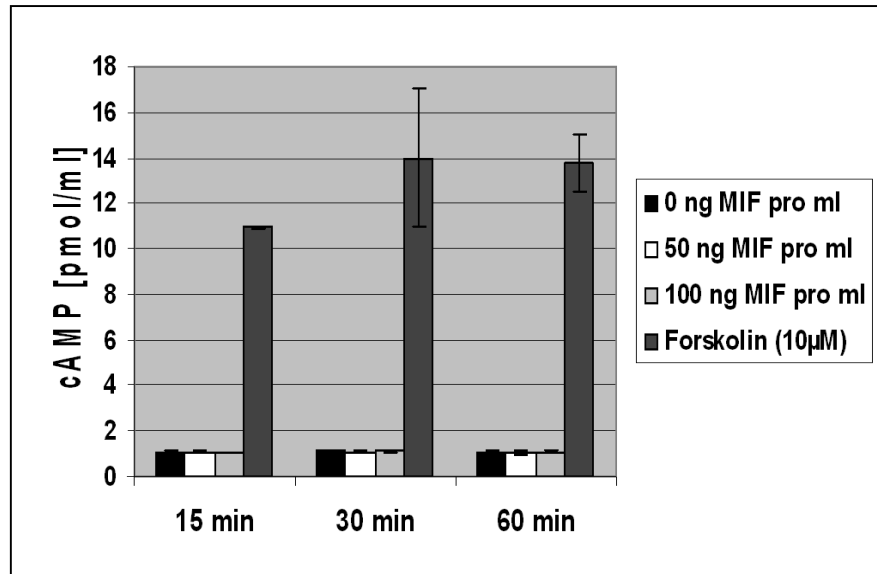


Abb. 6: cAMP-Konzentration in MIF-stimulierten Sertoli-Zellen (SCs):

Die cAMP-Konzentration wurde mittels ELISA in Lysaten MIF-stimulierter SCs gemessen. Dabei war keine Veränderung der cAMP-Konzentration nach Stimulation zu erkennen. Forskolin-stimulierte SCs dienen als Positivkontrolle.

4.2.2 Phosphorylierung von Signalmolekülen

Im Ablauf von Signalkaskaden spielen Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von Signalproteinen, die durch diesen Vorgang aktiviert bzw. deaktiviert werden, eine entscheidende Rolle. Die Phosphorylierungen bzw. Dephosphorylierungen finden an Tyrosin-, Threonin- und Serinresten statt. Beispielsweise stellt die im Laufe der MIF-Signaltransduktion in Peritubulärzellen aktivierte Proteinkinase C eine Serin-/Threoninkinase dar, welche ihre Substrate durch Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten aktiviert bzw. deaktiviert.

Zur Untersuchung des Phosphorylierungszustandes von Proteinen nach MIF-Stimulation wurden die Tyrosin-, Threonin- und Serinphosphorylierungsmuster von Sertoli- und Peritubulärzellen mit Hilfe der Western-Blot-Analyse untersucht. Dabei wurden spezifische anti-Phospho-Tyrosin-, anti-Phospho-Threonin- und anti-Phospho-Serin-Antikörper verwendet.

4.2.2.1 Probengewinnung

Die Sertoli- bzw. Peritubulärzellen wurden für 5 min und 15 min durch Zugabe von rec MIF zu dem bereits auf den Zellen befindlichen Medium (Endkonzentration von MIF: 50ng/ml) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe des Probenpuffers lysiert. Als Kontrolle dienten Zellen, welche für die gleiche Zeitdauer nur mit Medium ohne MIF inkubiert wurden.

Um nach der Western-Blot-Analyse eine Quantifizierung der phosphorylierten Proteine durchführen zu können, mussten gleiche Proteinmengen auf das SDS-Gel aufgetragen werden. Dieses wurde sowohl durch Vergleich der Banden nach Coomassie-Färbung des Gels (Abb. 7) als auch durch die Ponceau S-Färbung der Blotmembran verifiziert.

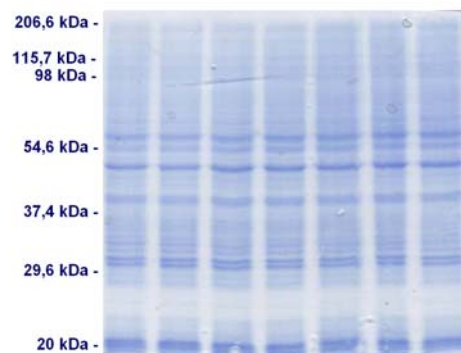


Abb. 7: Coomassie-Färbung elektrophoretisch aufgetrennter Sertoli-Zell-Lysate

4.2.2.2 Tyrosinphosphorylierungsmuster MIF-stimulierter Peritubulär- bzw. Sertoli-Zellen

Die Tyrosinphosphorylierungsmuster der Peritubulär- (Abb. 8B) und der Sertoli-Zellen (Abb. 9B) weisen keinen Unterschied zwischen den stimulierten und unstimulierten Zellen auf. Die in Spur 8 dargestellte Zweitantikörperkontrolle lässt keine unspezifischen Bindungen erkennen.

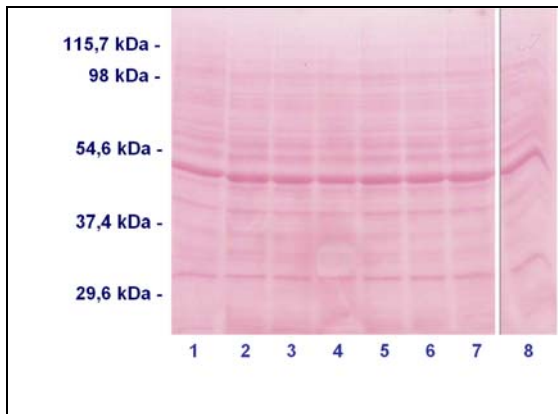


Abb. 8A:
Ponceau S-Färbung der transferierten Proteine

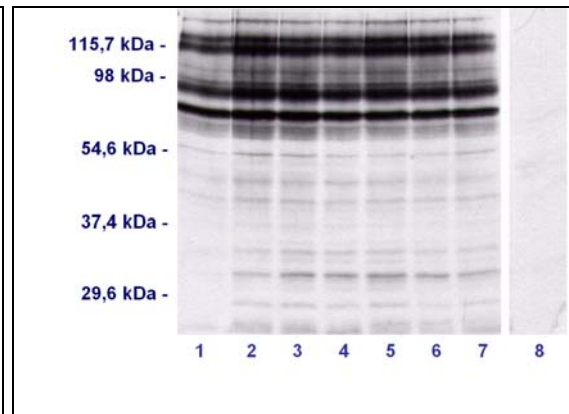


Abb. 8B:
Tyrosinphosphorylierungsmuster
MIF-stimulierter PCs dargestellt mit
einem anti-Phospho-Tyrosin-
Antikörper

1= unstimulierte PCs zum Zeitpunkt 0; 2= für 5 min mit Medium inkubierte PCs; 3 = für 5 min mit rec MIF stimulierte PCs; 4 = für 15 min mit Medium inkubierte PCs; 5 = für 15 min mit rec MIF inkubierte PCs; 6 = für 30 min mit Medium inkubierte PCs; 7 = für 30 min mit rec MIF inkubierte PCs; 8 = Negativkontrolle. Konzentration des rec MIF jeweils 50 ng/ml.

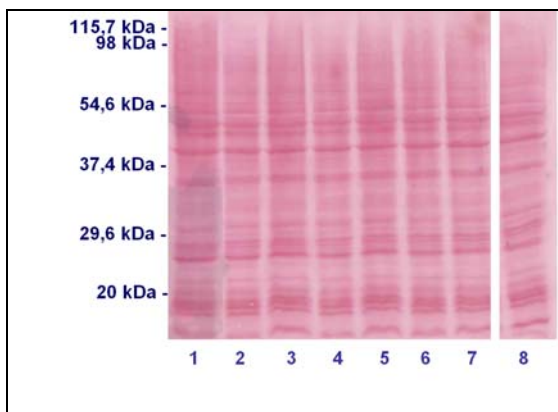


Abb. 9A:
Ponceau S-Färbung der transferierten Proteine

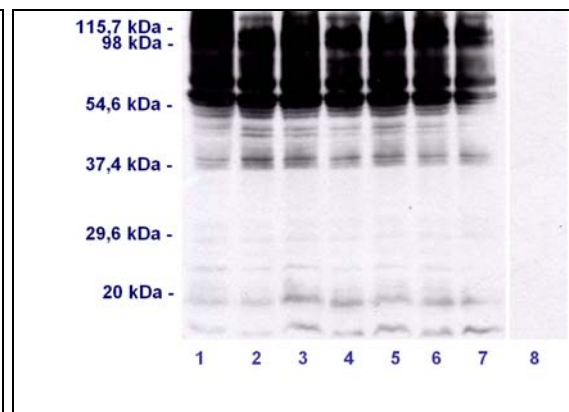


Abb. 9B:
Tyrosinphosphorylierungsmuster
MIF-stimulierter SCs dargestellt mit
einem anti-Phospho-Tyrosin-
Antikörper

1= unstimulierte SCs zum Zeitpunkt 0; 2= für 5 min mit Medium inkubierte SCs; 3 = für 5 min mit rec MIF stimulierte SCs; 4 = für 15 min mit Medium inkubierte SCs; 5 = für 15 min mit rec MIF inkubierte SCs; 6 = für 30 min mit Medium inkubierte SCs; 7 = für 30 min mit rec MIF inkubierte SCs; 8 = Negativkontrolle. Konzentration des rec MIF jeweils 50 ng/ml.

Als Nebenbefund wurde die Phosphorylierung eines ca. 44 kDa und eines ca. 42 kDa Proteins festgestellt. Diese trat 5 min nach einem Mediumwechsel mit vorangegangenen Waschschrift sowohl in Peritubulär- als auch in Sertoli-Zellen auf (Abb. 10A und 10B, Spur 6). Diese Phosphorylierungsänderung war vor allem bei den Sertoli-Zellen sehr stark ausgeprägt (Abb. 10B).

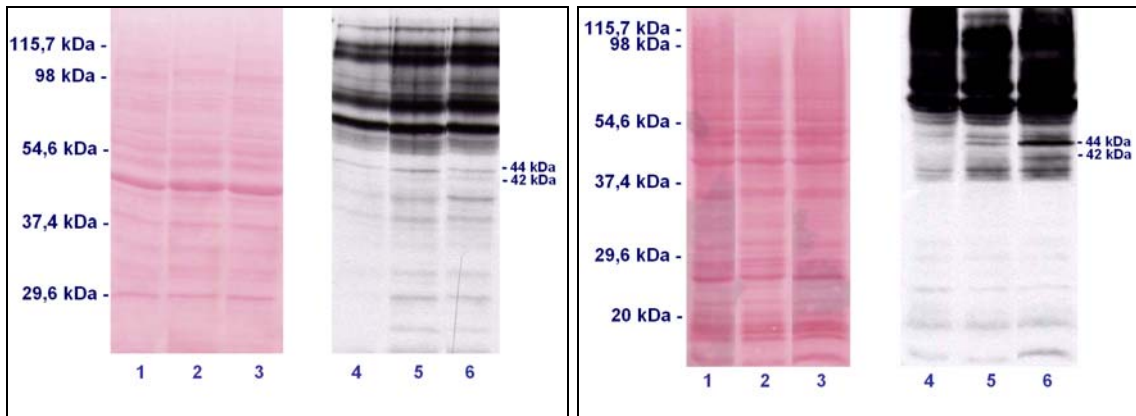


Abb. 10A:
Tyrosinphosphorylierungsmuster
MIF-stimulierter PCs dargestellt mit
einem anti-Phospho-Tyrosin-Antikörper

Abb. 10B:
Tyrosinphosphorylierungsmuster
MIF-stimulierter SCs dargestellt mit
einem anti-Phospho-Tyrosin-
Antikörper

1-3 = Ponceau S-Färbung der transferierten Proteine
1/ 4= unstimulierte PCs/SCs zum Zeitpunkt 0; 2/ 5= unstimulierte PCs/SCs zum Zeitpunkt 5
min; 3/ 6 = PCs/SCs 5 min nach Mediumwechsel

4.2.2.3 Threoninphosphorylierungsmuster MIF-stimulierter Peritubulär- bzw. Sertoli-Zellen

Die Threoninphosphorylierungsmuster der Peritubulär- (Abb. 11B) und der Sertoli-Zellen (Abb. 12B) weisen keinen Unterschied zwischen den stimulierten und unstimulierten Zellen auf. Die in Spur 8 dargestellte Kontrolle zeigt keine unspezifische Bindung des Sekundär-Antikörpers.

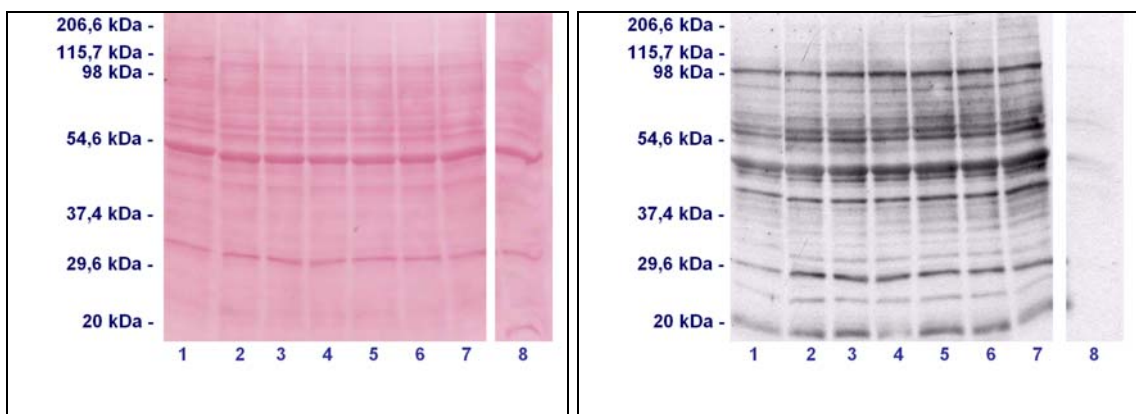


Abb. 11A:
Ponceau S-Färbung der transferierten
Proteine

Abb. 11B:
Threoninphosphorylierungsmuster
MIF-stimulierter PCs dargestellt mit
einem anti-Phospho-Threonin-
Antikörper

1= unstimulierte PCs zum Zeitpunkt 0; 2= für 5 min mit Medium inkubierte PCs; 3 = für 5 min mit rec MIF stimulierte PCs; 4 = für 15 min mit Medium inkubierte PCs; 5 = für 15 min mit rec MIF inkubierte PCs; 6 = für 30 min mit Medium inkubierte PCs; 7 = für 30 min mit rec MIF inkubierte PCs; 8 = Negativkontrolle. Konzentration des rec MIF jeweils 50 ng/ml.

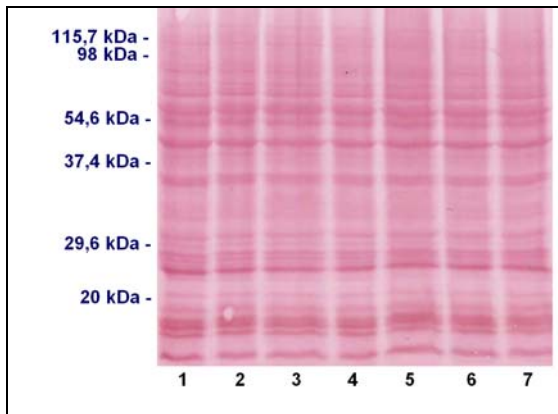


Abb. 12A:
Ponceau S-Färbung der transferierten
Proteine

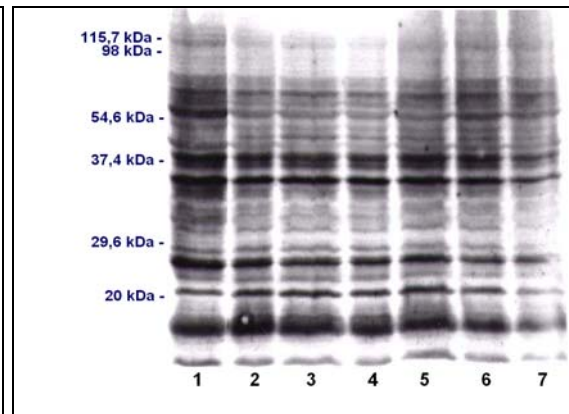


Abb. 12B:
Threoninphosphorylierungsmuster
MIF-stimulierter SCs dargestellt mit
einem anti-Phospho-Threonin-
Antikörper

1= unstimulierte SCs zum Zeitpunkt 0; 2= für 5 min mit Medium inkubierte SCs; 3 = für 5 min mit rec MIF stimulierte SCs; 4 = für 15 min mit Medium inkubierte SCs; 5 = für 15 min mit rec MIF inkubierte SCs; 6 = für 30 min mit Medium inkubierte SCs; 7 = für 30 min mit rec MIF inkubierte SCs; 8 = Negativkontrolle. Konzentration des rec MIF jeweils 50 ng/ml.

4.2.2.4 Serinphosphorylierungsmuster MIF-stimulierter Peritubulär- bzw. Sertoli-Zellen

Die Serinphosphorylierungsmuster der Peritubulär- (Abb. 13B) und der Sertoli-Zellen (Abb. 14B) weisen keinen Unterschied zwischen den stimulierten und unstimulierten Zellen auf.

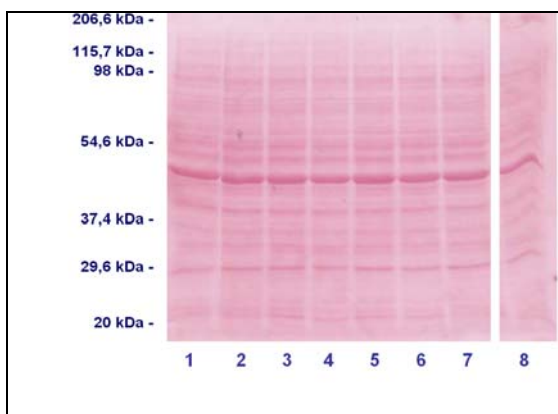


Abb. 13A:
Ponceau S-Färbung der transferierten
Proteine

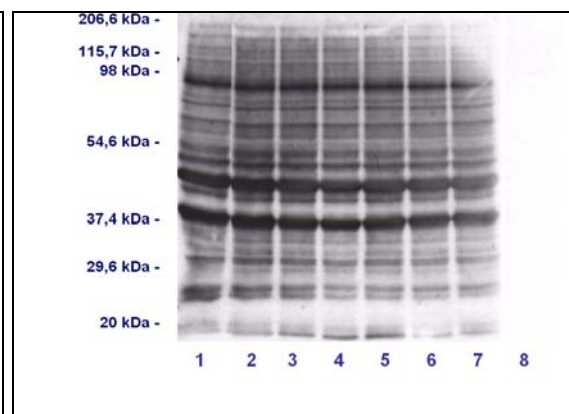


Abb. 13B:
Serinphosphorylierungsmuster
MIF-stimulierter PCs dargestellt mit
einem anti-Phospho-Serin-
Antikörper

1= unstimulierte PCs zum Zeitpunkt 0; 2= für 5 min mit Medium inkubierte PCs; 3 = für 5 min mit rec MIF stimulierte PCs; 4 = für 15 min mit Medium inkubierte PCs; 5 = für 15 min mit rec MIF inkubierte PCs; 6 = für 30 min mit Medium inkubierte PCs; 7 = für 30 min mit rec MIF inkubierte PCs; 8 = Negativkontrolle. Konzentration des rec MIF jeweils 50 ng/ml.

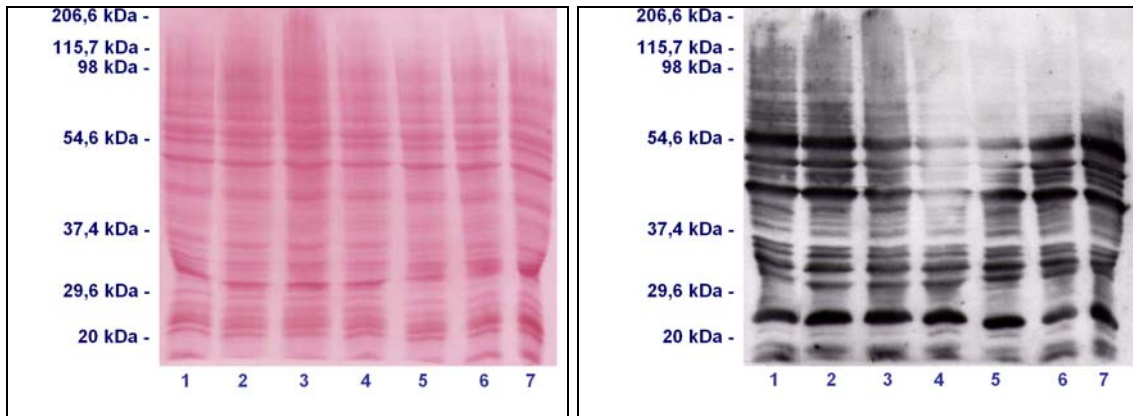


Abb. 14A:
Ponceau S-Färbung der transferierten Proteine

Abb. 14B:
Serinphosphorylierungsmuster MIF-stimulierter SCs dargestellt mit einem anti-Phospho-Serin-Antikörper

1= unstimulierte SCs zum Zeitpunkt 0; 2= für 5 min mit Medium inkubierte SCs; 3 = für 5 min mit rec MIF stimulierte SCs; 4 = für 15 min mit Medium inkubierte SCs; 5 = für 15 min mit rec MIF inkubierte SCs; 6 = für 30 min mit Medium inkubierte SCs; 7 = für 30 min mit rec MIF inkubierte SCs; 8 = Negativkontrolle. Konzentration des rec MIF jeweils 50 ng/ml.

4.2.3 Aktivierung der p44/p42-MAPK (ERK-1/2)

Die Extrazellulär-Signal-regulierte Kinase (ERK-1/2, p44/42-MAPK) stellt die mitogen-aktivierte Kinase (MAPK) des Erk-1/2-MAPK-Weges dar. Sie wird von der MAPKK durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert. 1996 wurde von Mitchell et al. in NIH/3T3-Fibroblasten eine Phosphorylierung der p44/42-MAPK nach MIF-Stimulation beschrieben.

Basierend auf diesem Ergebnis wurde in der vorliegenden Arbeit eine mögliche Phosphorylierung der p44/42-MAPK in MIF-stimulierten Peritubulär- bzw. Sertoli-Zellen untersucht. Hierfür wurden Peritubulärzellen für 2 min (Spur 3), 5 min (Spur 5), 15 min (Spur 8) und 5 h (Spur 10) mit 50 ng/ml rec MIF stimuliert. Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse wurde mit einem monoklonalen anti-Phospho-p44/42-MAPK-Antikörpers eine Quantifizierung der phosphorylierten ERK-1/2 durchgeführt (Abb. 15A). Nach dem Strippen der Membran folgte ein Immunnachweis der gesamten vom Phosphorylierungszustand unabhängigen p44/42-MAPK unter Verwendung eines weiteren Antikörpers (Abb. 15B). Es konnte jedoch kein induzierender Effekt von MIF auf die Phosphorylierung der p44/42-MAPK beobachtet werden.

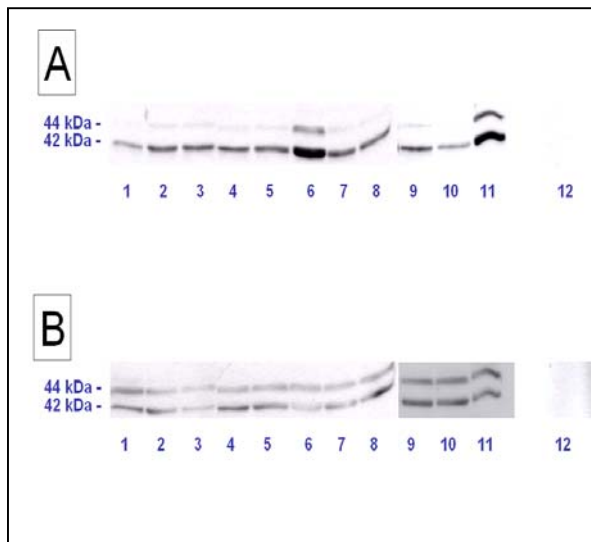


Abb. 15: Western-Blot-Analyse MIF-stimulierter PCs:

A: Nachweis der Phospho-44/p42-MAPK

B: Nachweis der Gesamt-p44/42-MAPK

1 = unbehandelte PCs zum Zeitpunkt 0; **2** = für 2 min mit Medium inkubierte PCs; **3** = für 2 min mit rec MIF inkubierte PCs; **4** = für 5 in mit Medium inkubierte PCs; **5** = für 5 min mit rec MIF stimulierte PCs; **6** = für 5 min mit 10% FKS inkubierte PCs; **7** = für 15 min mit Medium inkubierte PCs; **8** = für 15 min mit rec MIF inkubierte PCs; **9** = für 5 h in Medium inkubierte PCs; **10** = für 5 h mit rec MIF inkubierte PCs; **11** = für 5 h mit 10% FKS inkubierte PCs; **12** = Negativkontrolle. Konzentration des rec MIF jeweils 50 ng/ml.

In Abb. 16 wurde mit Hilfe der Western-Blot-Analyse die phosphorylierte Form der p44/42-MAPK bzw. Gesamt-p44/42-MAPK der für 2 min (Spur 2), 5 min (Spur 4) und 15 min (Spur 6) mit 50 ng/ml rec MIF stimulierten Sertoli-Zellen dargestellt. Anhand der Bandenintensität der Gesamt-p44/42-MAPK in Abb. 16B konnte gezeigt werden, dass, abgesehen von Spur 2, gleiche Proteinmengen auf das SDS-Gel aufgetragen wurden. Nach MIF-Stimulation konnte kein Unterschied in der p44/42-MAPK-Phosphorylierung in Sertoli-Zellen festgestellt werden (Abb. 16A). Die leichte Zunahme der Bandenintensität in Spur 2 war auf eine größere Menge von aufgetragenem Protein zurückzuführen (Abb. 16B).

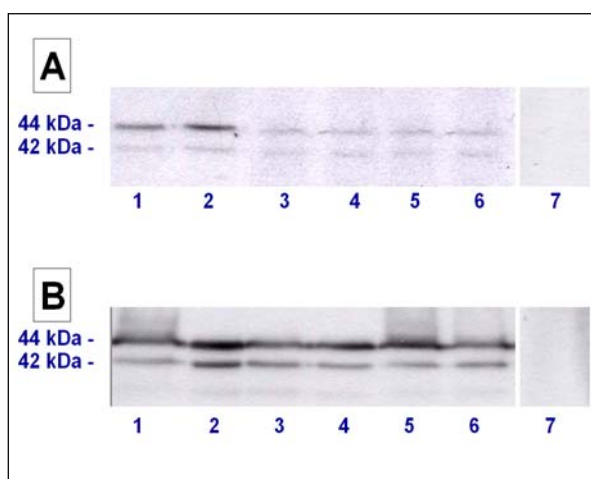


Abb. 16: Western-Blot-Analyse MIF-stimulierter SCs:

A: Nachweis der Phospho-p44/42-MAPK

B: Nachweis der Gesamt-p44/42-MAPK

1 = für 2 min mit Medium inkubierte SCs; **2** = für 2 min mit rec MIF inkubierte SCs; **3** = für 5 in mit Medium inkubierte SCs; **4** = für 5 min mit rec MIF stimulierte SCs; **5** = für 15 min mit Medium inkubierte SCs; **6** = für 15 min mit rec MIF inkubierte SCs; **7** = Negativkontrolle. Konzentration des rec MIF jeweils 50 ng/ml.

Eine vermehrte Phosphorylierung der p44/p42-MAPK war nur festzustellen, wenn ein Mediumwechsel vorausgegangen war. Diese Phosphorylierungsänderung nach Mediumwechsel war vor allem bei den Sertoli-Zellen sehr stark ausgeprägt (Abb. 16A und 16B) und korrespondiert mit dem in 4.2.2.2 festgestellten Nebenbefund.

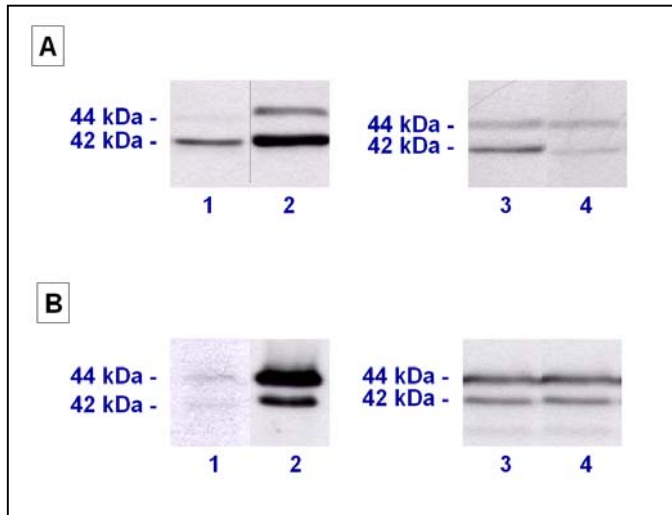


Abb. 17A: Western-Blot-Analyse MIF-stimulierter PCs;

Abb. 17B: Western-Blot-Analyse MIF-stimulierter SCs:

1-2 = Nachweis der Phospho-p44/42-MAPK

3-4 = Nachweis der Gesamt-p44/42-MAPK

1/3 = unstimulierte PCs/SCs zum Zeitpunkt 0;

2/4 = PCs/SCs 5 min nach Mediumwechsel

4.3 *Untersuchungen zur biologischen Wirkung von MIF auf Peritubulärzellen*

4.3.1 Sekretion von TGF- β 2

Peritubulärzellen sezernieren neben zahlreichen anderen Substanzen auch den Wachstumsfaktor TGF- β 2 (Konrad et al., 2000). Um zu untersuchen, ob das pro-inflammatorische Zytokin MIF einen regulatorischen Einfluss auf die Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins TGF- β 2 bei Peritubulärzellen nimmt, wurde die TGF- β 2-Konzentration in den Zellkultur-Überständen MIF-stimulierter Peritubulärzellen bestimmt. Die Peritubulärzellen wurden für 24 h, 48 h und 72 h mit jeweils 10 ng/ml, 50 ng/ml bzw. 100 ng/ml rec MIF inkubiert. Die Änderung der TGF- β 2-Konzentration nach MIF-Stimulation wurde in Abb. 18 prozentual dargestellt. Ein signifikanter, kontinuierlicher Anstieg der TGF- β 2-Sekretion der unstimulierten Peritubulärzellen über die Zeit wurde gefunden.

Eine Stimulation mit MIF in einer Konzentration von 50 ng/ml bewirkte nach 24 h eine signifikante Reduktion der TGF- β 2-Konzentration im Kultur-Überstand. Bei allen eingesetzten MIF-Konzentrationen zeigte sich nach 48 h derselbe inhibierende Effekt. Nach 72 h allerdings war die Reduktion der TGF- β 2-Konzentration im Überstand nur noch bei der höchsten MIF-Konzentration (100 ng/ml) zu beobachten.

Zum Nachweis der Signifikanz wurde ein beidseitiger T-Test durchgeführt ($p < 0,05$).

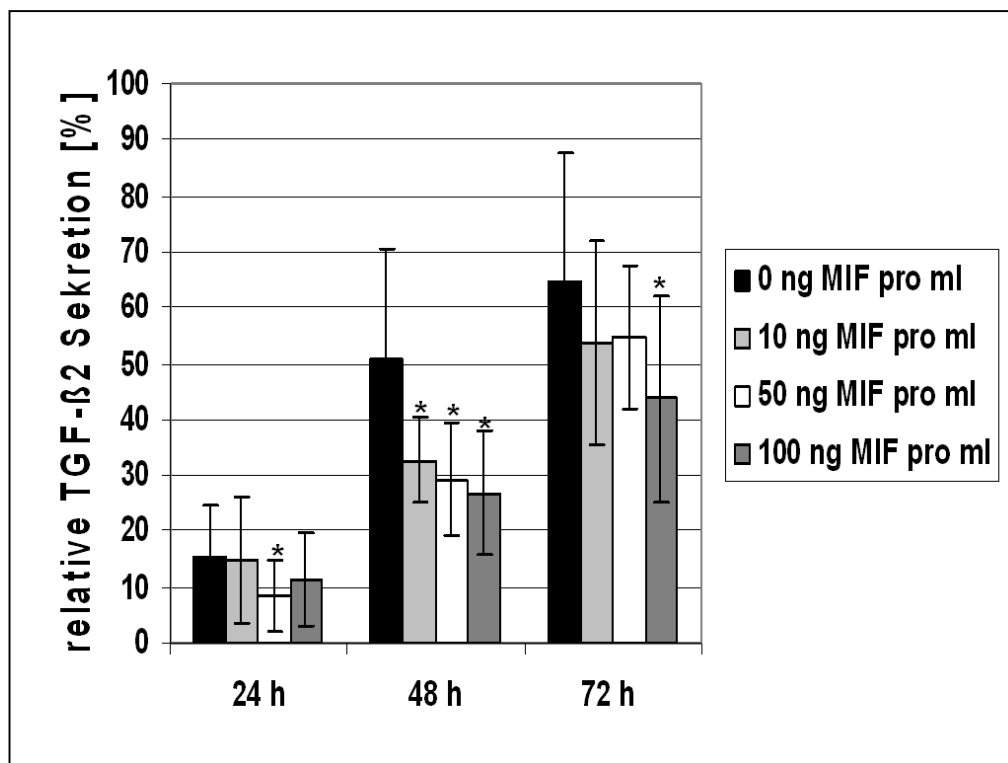


Abb. 18: TGF- β 2-Sekretion von Peritubulärzellen nach MIF-Stimulation:

Die TGF- β 2-Konzentration im Medium wurde mit Hilfe eines kommerziellen ELISAs nach Stimulation mit rec MIF (0 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml in Medium) bestimmt. Es konnte eine signifikante Hemmung der Sekretion von TGF- β 2 nach MIF-Stimulation festgestellt werden. Die Sternchen zeigen die signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) an. Der Versuch wurde in drei von einander unabhängigen Experimenten wiederholt und die höchste gemessene TGF- β 2 Konzentration pro Versuch auf 100% gesetzt.

4.3.2 Expression von TGF- β 2

Zur Kontrolle, ob der in Kapitel 4.3.1 beobachtete hemmende Effekt von MIF auf die TGF- β 2-Sekretion der Peritubulärzellen über die Regulation der mRNA-Expression stattfindet, wurde die TGF- β 2-Expression mittels Real-Time-PCR quantifiziert.

4.3.2.1 Kontrolle der RNA-Isolierung

Die RNA wurde wie in 3.3.1.2 beschrieben isoliert und durch Ermittlung des Quotienten aus $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ auf Verunreinigungen überprüft. Die Werte lagen bei allen durchgeführten Extraktionen zwischen 1,7 und 2,0. Somit war keine der Proben durch Proteine oder Phenol verunreinigt.

4.3.2.2 Kontrolle der Reinheit der isolierten RNA

Um eine mögliche DNA-Verunreinigung der isolierten RNA zu eliminieren, wurde die isolierte RNA einem DNase-I-Verdau unterzogen. Zur Kontrolle der Effizienz dieses Vorgangs wurde eine PCR mit GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase)-Primern durchgeführt. Da RNA von Taq-Polymerasen nicht als Matrize erkannt werden kann, sollten hier keine PCR-Produkte entstehen. Bei den RNA-Proben zeigte sich keine für GAPDH charakteristische Bande bei 320 bp. Somit lag keine Verunreinigung mit genomischer DNA vor (Abb. 19). Als Positivkontrolle diente Hoden cDNA. Eine Amplifikation dieser cDNA resultierte in einem Fragment der Größe von 320 bp.

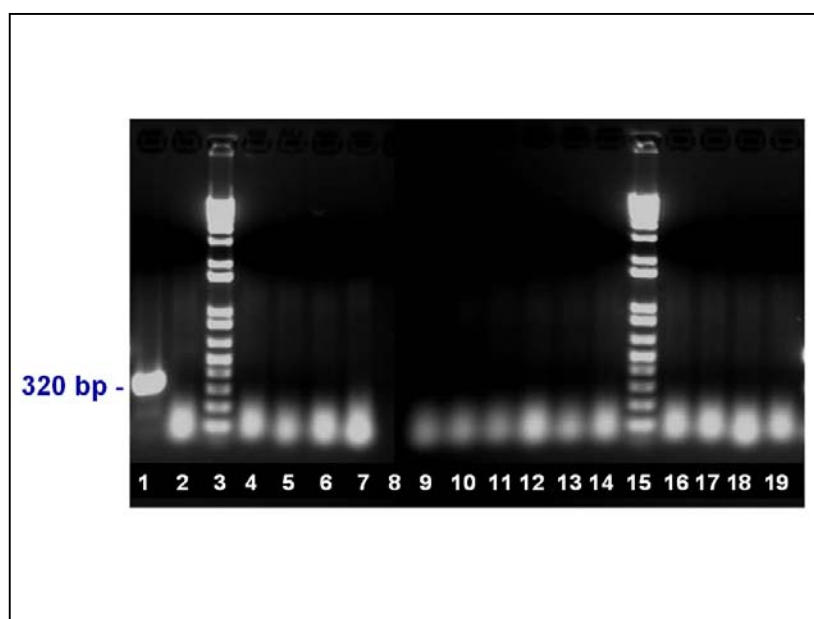


Abb. 19: GAPDH-PCR nach DNase-I-Verdau der RNA.

1 = Hoden cDNA; 2 = Kontrolle ohne cDNA/RNA; 3 = 100 bp-Marker; 4-7 = DNase-I verdaute RNA-Proben; 8 = leer; 9-14 = DNase-I verdaute RNA-Proben; 15 = 100 bp-Marker; 16-19 = DNase-I verdaute RNA-Proben. Die niedermolekularen Banden stellen Primerdimere dar.

4.3.2.3 Kontrolle der cDNA-Synthese

Die aus den Peritubulärzellen isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Zur Kontrolle der cDNA-Synthese wurde erneut eine GAPDH-PCR durchgeführt. Bei allen Proben war die erwartete Bande von 320 bp zu erkennen (Abb. 20). Somit war die cDNA-Synthese bei allen Proben erfolgreich. Als Positivkontrolle diente Hoden-cDNA.

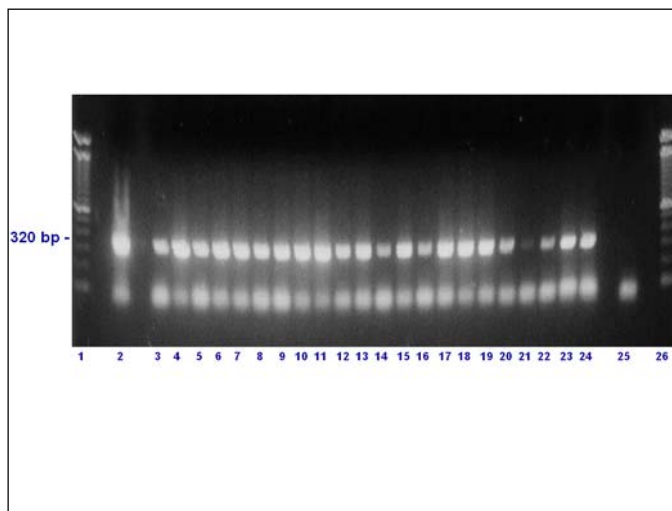


Abb. 20: GAPDH-PCR nach cDNA-Synthese.

Auftrennung der Amplifikationsprodukte in einem 1%igen Agarose-Gel.

1/26 = 100 bp-Marker, 2 = Hoden cDNA; 3-24 = cDNA der PCs; 25 = Negativkontrolle ohne cDNA und ohne RNA.

4.3.2.4 Durchführung und Auswertung der Real-Time-PCR

Mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR wurde das TGF- β 2-Expressionsmuster in Peritubulärzellen nach MIF-Stimulation untersucht.

Bei der Durchführung der Real-Time-PCR wurden zum Ausschluss eventueller Pipettierfehler für jede Probe entweder eine Verdünnungsreihe mitgeführt oder eine Vierfachbestimmung durchgeführt. Die Kurven dokumentieren den Anstieg der Fluoreszenzemission des kontinuierlich an die neu amplifizierten DNA-Fragmente bindenden Sybr-Greens. Dabei ist der charakteristische Verlauf einer PCR-Reaktion zu erkennen: Zunächst liegt ein linearer Anstieg vor, in dem die PCR-Reaktion unter optimalen Bedingungen abläuft, das heißt pro Zyklus kommt es zur Verdopplung der Matrizenstränge. Durch Limitation der PCR-Komponenten geht die Kurve später in eine Plateauphase über. Wie die Kurvenverläufe bei verschiedenen Verdünnungen zeigen, lassen sich in dieser Phase die ursprünglichen Ausgangsmengen einer eingesetzten Matrizen-DNA nicht mehr bestimmen. Deshalb ist es unabdingbar, jegliche Quantifizierung innerhalb des linearen Bereiches vorzunehmen.

Die Anzahl der Zyklen, die notwendig waren, bis das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert erreicht hatte, wird als C_T -Wert bezeichnet. Die C_T -Werte der einzelnen Proben können miteinander verglichen werden. Dabei ist eine Aussage über die in den Proben vorhandene Ausgangsmenge an Matrizen-DNA möglich.

In Abb. 21 ist eine nahezu gleichbleibende Differenz zwischen den C_T -Werten einer unterschiedlich verdünnten cDNA-Probe zu erkennen, was auf eine hohe Pipettiergenauigkeit hinweist.

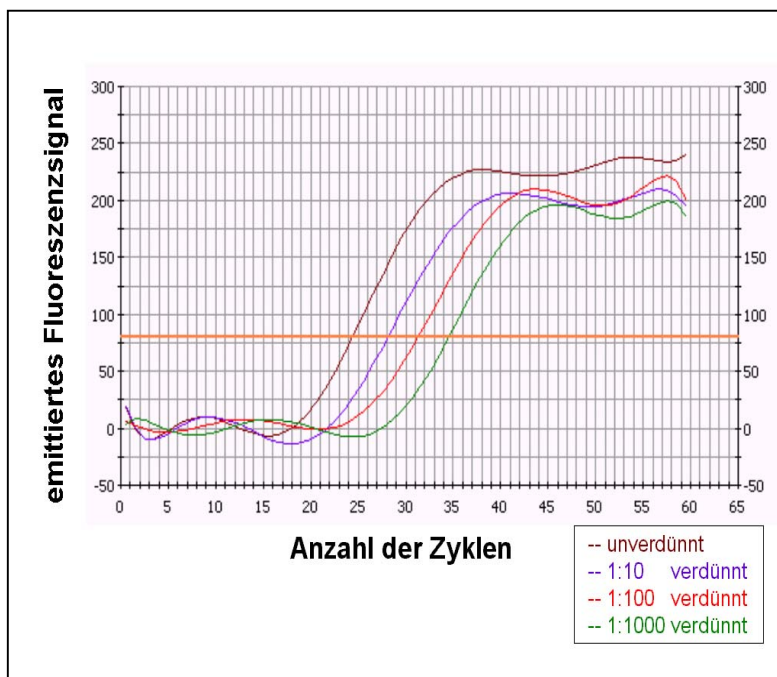


Abb. 21: Verlauf einer PCR-Reaktion in linearer Darstellung.

Die Graphen zeigen den typischen Verlauf einer PCR-Reaktion. Die orange horizontale Linie stellt den Schwellenwert dar.

Abb. 22 zeigt die Kurven der Abb. 21 in logarithmischer Darstellung. Diese Darstellungsform ermöglicht eine optimale Bestimmung der C_T -Werte, da der Schwellenwert so niedrig wie möglich gesetzt werden kann, ohne dass dabei die Fluoreszenzsignale zu Beginn der Reaktion diesen Schwellenwert überschreiten. Für einen Vergleich verschiedener Proben ist es wichtig, dass der Schwellenwert bei allen Reaktionen auf denselben Wert festgesetzt wird. Ansonsten wären keinerlei Aussagen über die Expressionsveränderungen von TGF- β 2 nach Stimulation mit rec MIF möglich.

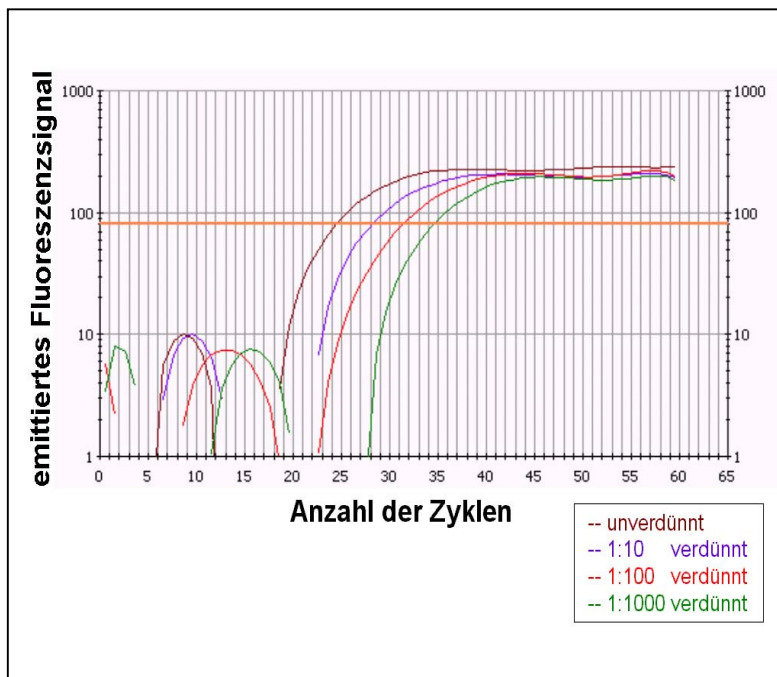


Abb. 22: Verlauf einer PCR-Reaktion in logarithmischer Darstellung
Die Graphen zeigen den typischen Verlauf einer PCR-Reaktion. Die orange horizontale Linie stellt den Schwellenwert dar.

Trägt man die dem C_t -Wert entsprechende Zyklanzahl der verdünnten Proben gegen den Logarithmus der Ausgangsmenge graphisch auf und generiert anschließend eine Ausgleichsgerade, so lässt sich anhand des Korrelationskoeffizienten erneut die Genauigkeit des Pipettierens bestimmen. Dieser sollte möglichst nahe an 1 liegen. Weiterhin errechnet das Gerät die PCR-Effizienz der jeweiligen Reaktion, die möglichst nahe an 100% liegen sollte. Dabei werden nicht nur die Verdünnungsreihen mit einbezogen, sondern es wird ebenfalls die eventuelle Anlagerung von Sybr-Green an andere Produkte als das Ziel-Amplifikat berücksichtigt. Die in Abb. 23 gezeigte Ausgleichsgerade der in Abb. 21 und 22 abgebildeten Graphen, ergab eine PCR-Effizienz von 103,5 und einen Korrelationskoeffizient von 0,998.

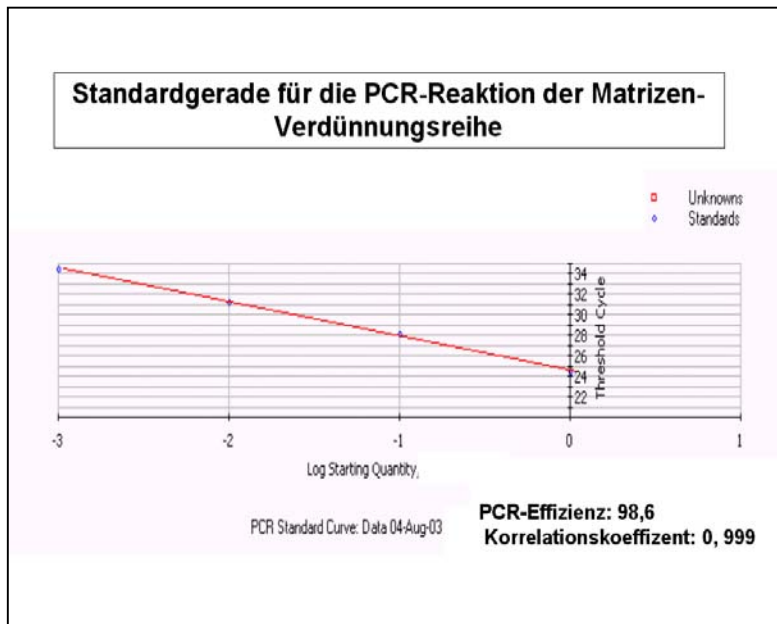


Abb. 23: Standardgerade einer Verdünnungsreihe. Der Korrelationskoeffizient, ein Maß für die Pipettiergenauigkeit, liegt bei 0,998 und die PCR-Effizienz, die neben der Pipettiergenauigkeit die eventuelle Anlagerung von Sybr-Green an andere doppelsträngige Produkte berücksichtigt, bei 98,6.

Zur Kontrolle, ob nur das Ziel-Gen oder fälschlicherweise auch weitere DNA-Fragmente amplifiziert wurden, wurde zu Ende eines jeden PCR-Laufes eine Schmelzkurve durch die kontinuierliche Erhöhung der Temperatur von 50°C auf 100°C generiert. Parallel wird die Fluoreszenzemission dokumentiert, die sich mit steigender Temperatur beim Aufschmelzen der Amplifikate verringert. Trägt man $-dF/dT$ (delta Fluoreszenz/ delta Temperatur) gegen die Temperatur auf, sollte ein einziger Maximalwert zu erkennen sein. Liegen noch andere Maxima vor, weist dies auf die Amplifikation weiterer Produkte hin. Die Schmelzkurven der PCR-Produkte, für die dasselbe Primerpaar eingesetzt wurde, sollten sich überlagern.

Abb. 24 zeigt die Schmelzkurven der TGF- β 2-Real-Time-PCR. Jede Kurve enthält nur ein Maximum, wobei sich die Maxima der einzelnen Kurven überlagern. Somit ist in allen Proben ausschließlich das gleiche PCR-Fragment amplifiziert worden.

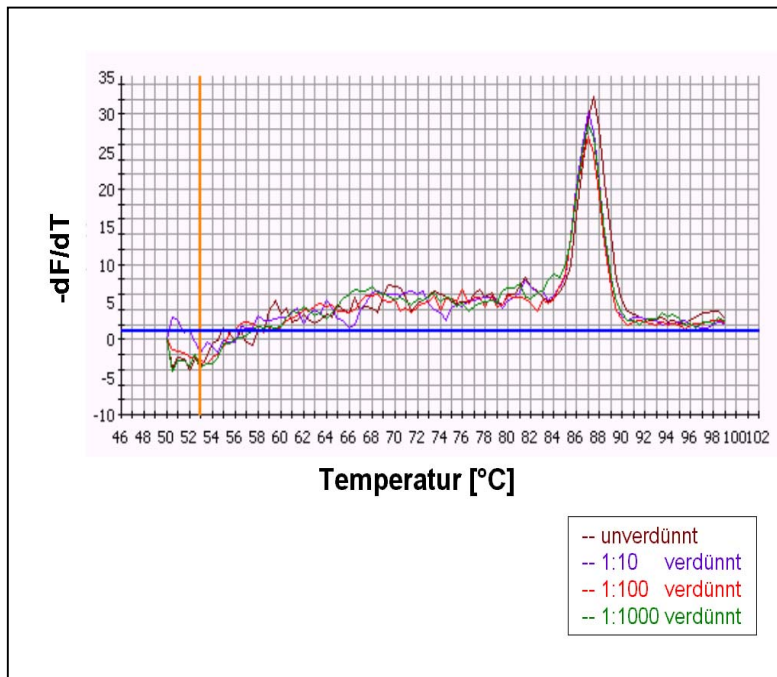


Abb. 24: Schmelzkurven der TGF- β 2-PCR

Jede Kurve zeigt nur ein deutliches Maximum, wobei sich die Maxima überlagern.

Um zu verhindern, dass unterschiedliche Ausgangsmengen an Gesamt-RNA zu Fehlinterpretationen bei der Analyse der einzelnen Proben führen, wurden die Daten der TGF- β 2-PCR mit dem konstitutiv gleichmäßig exprimierten (house-keeping) Gen GAPDH, in Relation gesetzt. Dazu wurde für jede Probe und jede Verdünnung eine eigene parallele GAPDH-PCR im gleichen iCycler-Lauf mitgeführt.

Um die Daten anschließend miteinander vergleichen zu können, musste zunächst die Differenz von C_t -TGF- β 2 und C_t -GAPDH (ΔC_t) gebildet werden. Als nächstes musste die Differenz der ΔC_t -Werte von unbehandelten Zellen und stimulierten sowie unstimulierten Zellen (X) gebildet werden. In einem letzten Schritt wurde aus X mit Hilfe der Funktion 2^{-X} die relative Expression berechnet, wodurch die Änderung der TGF- β 2-Expression nach MIF-Stimulation dargestellt werden konnte (Abb. 25).

Abgleich der Proben gegen GAPDH:

$$C_T\text{-Gen} - C_T\text{-GAPDH} = \Delta C_T$$

Berechnung der Differenz aus den C_T -Werten der Proben (S, sample) und denen der Kontrolle (c, control: unbehandelte Zellen):

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

Berechnung der relativen Expression:

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

Abb. 25: Berechnung der relativen Expression von TGF- β 2 in mit MIF-stimulierten PCs.

4.3.2.5 Expression von TGF- β 2 in Peritubulärzellen nach MIF-Stimulation

Die in Abb. 26 dargestellte TGF- β 2-Expression von PCs, die über einen Zeitraum von 3 h, 6 h, 9 h, 24 h, 48 h und 72 h mit MIF in einer Konzentration von 50 ng/ml in Medium stimuliert worden waren, zeigten auf Grund der hohen Standardabweichung keine signifikanten Änderungen des Expressionsmusters. Eine Reduktion in der TGF- β 2-Expression ist andeutungsweise nach 6 h und 9 h zu erkennen.

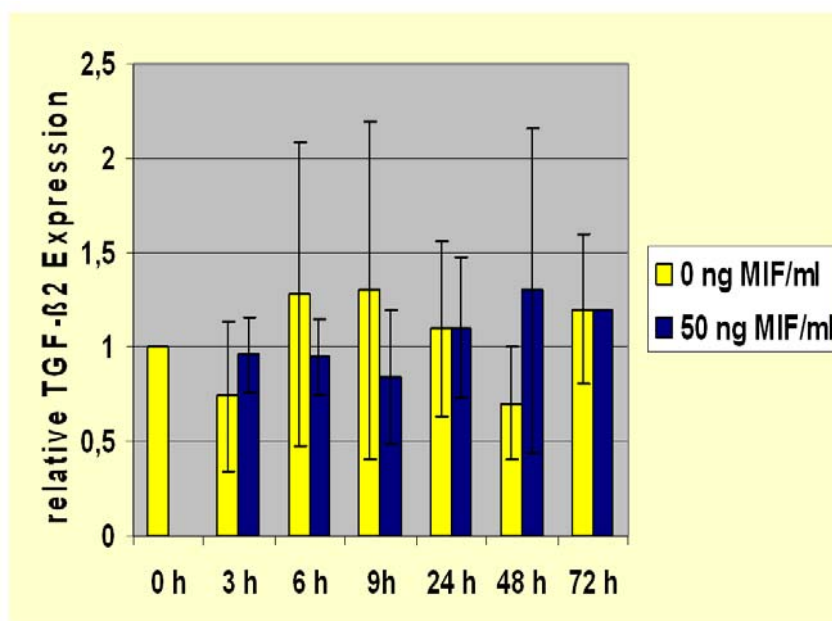


Abb. 26: Relative TGF- β 2-Expression in PCs nach MIF-Stimulation: Die Quantifizierung der TGF- β 2-Expression erfolgte mit Hilfe der Real-Time-PCR. Zu keinem Stimulationszeitpunkt ließ sich eine signifikante Änderung der TGF- β 2-Expression nachweisen.

4.3.3 Sekretion von TNF- α

TNF- α ist ein zytotoxisches, pro-inflammatorisches Zytokin, welches im Hoden von aktivierten Makrophagen sezerniert wird. In Mediumüberständen von Sertoli-, Peritubulär- und Leydig-Zellen wurde TNF- α bisher nicht nachgewiesen (Hutson et al., 1993). Allerdings zeigten Untersuchungen an testikulären Makrophagen eine Zunahme der TNF- α -Sekretion nach MIF-Stimulation (Hutson et al., 1993). Um zu testen, ob MIF einen ähnlichen Effekt auf die Peritubulärzellen ausüben kann, wurde der TNF- α -Gehalt in Zellkultur-Überständen MIF-stimulierter Peritubulärzellen mittels eines kommerziellen ELISAs untersucht.

In sechs von einander unabhängigen Versuchsansätzen wurden Peritubulärzellen über verschiedene Zeiträume mit rec MIF stimuliert. In einer Doppelbestimmung wurden die TNF- α -Konzentrationen im Zellkultur-Überstand gemessen, wobei ein mit rec TNF- α versetzter Puffer als Positivkontrolle für die Messung diente. Die Nachweisgrenze des ELISAs lag bei 420 pg TNF- α /ml. Die Stimulation der Peritubulärzellen mit rec MIF zeigte keine Induktion der TNF- α -Sekretion in Peritubulärzellen (Abb. 27).

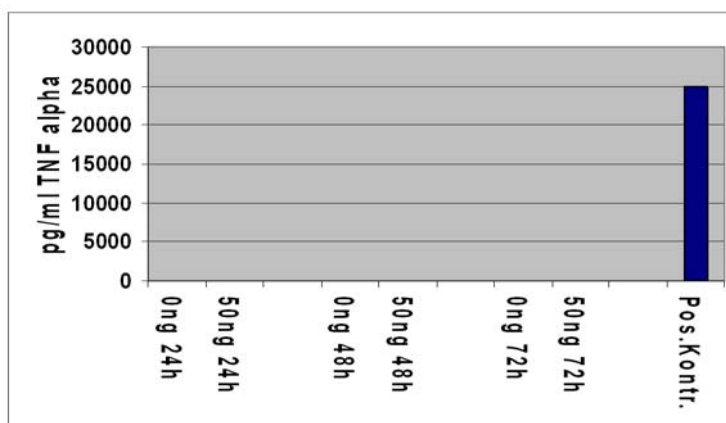


Abb. 27: TNF- α -Sekretion von PCs nach MIF-Stimulation:

Die TNF- α -Konzentration im Zellkultur-Überstand wurde mit Hilfe eines kommerziellen ELISAs gemessen. PCs wurden hierzu mit rec MIF (50ng/ml in Medium) bzw. ohne MIF für 24 h, 48 h und 72 h stimuliert. Als Positivkontrolle diente ein mit rec TNF- α versetzter Puffer.

5. Diskussion

Ursprünglich wurde MIF als ein von aktivierten T-Lymphozyten sezerniertes Zytokin beschrieben (Bloom und Bennett, 1966; David, 1966). Spätere Untersuchungen zeigten für MIF auch eine Rolle als Hypophysenhormon und Enzym (Bernhagen et al., 1993; Blocki et al., 1993; Rosengren et al., 1996; Kleemann et al., 1998a). MIF besitzt zahlreiche pro-inflammatorische (Calandra et al., 1994; Calandra et al., 1995; Bacher et al., 1996) und wachstumsregulatorische Eigenschaften (Bacher et al., 1996; Mitchell et al., 1999; Lacey et al., 2003). Unter anderem wird dem Faktor eine Beteiligung bei der Tumorentstehung (Chesney et al., 1999) sowie regulative Eigenschaften in endokrinen Organen (Meinhardt et al., 2000) zugeschrieben. Trotz dieser zahlreichen Erkenntnisse ist der molekulare Wirkungsmechanismus von MIF noch nahezu unbekannt.

5.1 Untersuchungen zur Signaltransduktion

5.1.1 Untersuchungen zu einer Beteiligung des Proteinkinase A-Weges an der MIF-Signaltransduktion in Sertoli-Zellen

Meinhardt et al. (1996) lieferten erste Evidenzen für eine parakrine Regulation der Sertoli-Zell-Funktion durch MIF. In initialen Untersuchungen konnte eine dosisabhängige Reduktion der Inhibin-Sekretion von Sertoli-Zellen durch rekombinantes MIF demonstriert werden. Die kompensatorische MIF-Produktion von Sertoli-Zellen nach Depletion der Leydig-Zellen, dem ursprünglichen Syntheseort, wies auf eine weitere mögliche Funktion von MIF in der Zell-Zell-Interaktion im Hoden hin (Meinhardt et al., 1999).

Durch welchen molekularen Mechanismus MIF den hemmenden Effekt auf die Inhibin-Sekretion ausübt, bzw. wodurch die MIF-Expression in den Sertoli-Zellen unterdrückt wird, ist bislang nicht bekannt. Eine Beteiligung von Kalzium als Botenstoff konnte durch Messungen des intrazellulären Kalziumgehaltes in MIF-stimulierten Sertoli-Zellen ausgeschlossen werden (Wennemuth et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche Beteiligung des „second

messenger“ zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat (cAMP) und damit eine Beteiligung des Proteinkinase A (PKA)-Weges an der MIF-Signaltransduktion in Sertoli-Zellen untersucht. Mitchell et al. (1999) konnten zeigen, dass MIF in NIH/3T3-Fibroblasten über eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration die Phosphorylierung der ERK bewirkt. Zudem konnte ein Zusammenhang dieser Signalkaskade mit der pro-proliferativen Wirkung von MIF auf die NIH/3T3-Fibroblasten in Verbindung gebracht werden (Mitchell et al. 1999). Einen weiteren Beleg für die Beteiligung von cAMP an dem MIF-Signaltransduktionsweg konnten Watanabe et al. (2004) erbringen. Sie konnten eine Inhibition der MIF-induzierten Matrix-Metalloproteinase-1-Expression in humanen, dermalen Fibroblasten durch einen PKA-Inhibitor (H89) darstellen. Die in der vorliegenden Studie durchgeführte Untersuchung an Sertoli-Zellen, zeigte keinen intrazellulären Anstieg des cAMP-Spiegels nach MIF-Stimulation. Somit kann eine Beteiligung des Proteinkinase A-Weges an der MIF-Signaltransduktion, wie es für NIH/3T3-Fibroblasten und humane, dermale Fibroblasten bewiesen wurde (Mitchell et al., 1999; Watanabe et al., 2004), für Sertoli-Zellen ausgeschlossen werden.

5.1.2 Untersuchungen zum Tyrosin-, Threonin- und Serin-Phosphorylierungsmuster MIF-stimulierter Peritubulär- und Sertoli-Zellen

Bei Signalkaskaden spielen Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsvorgänge bei der Aktivierung bzw. Deaktivierung von Signalmolekülen eine große Rolle. So führt z.B. eine Ligandenbindung an Membran-Rezeptoren (z.B. G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren) zur Aktivierung von Proteinkinasen und damit zu Veränderungen in der Proteinphosphorylierung. Die Proteinkinasen können als Bestandteil des Rezeptors, als Zellmembran-gebundene oder als im Zytosol lokalisierte Proteine vorkommen. In tierischen Zellen treten zwei Klassen von Proteinkinasen auf, nämlich die Tyrosinkinase und die Serin-/Threoninkinasen. Proteinphosphatasen stellen die Gegenspieler der Proteinkinasen dar und entfernen die zuvor angehängten Phosphatreste von spezifischen Substratproteinen (Lodish et al., 1999). Auch in der Signaltransduktion von Zytokinen spielen Tyrosin- sowie Serin-/

Threoninkinasen eine wichtige Rolle (zur Übersicht: McCubrey et al., 2000). Somit ist die Untersuchung der Phosphorylierungsmuster von MIF-stimulierten Zellen mit Hilfe der Western-Blot-Analyse prinzipiell eine erfolgversprechende Möglichkeit, Signalmoleküle des MIF-Signaltransduktionsweges zu entdecken. Für die Darstellung der Phosphorylierungsmuster wurden in der vorliegenden Studie anti-Phospho-Tyrosin-, -Threonin- und -Serin-Antikörper verwendet. Die mit rec MIF stimulierten Peritubulär- bzw. Sertoli-Zellen, ließen jedoch keinen Effekt von MIF auf eine Veränderung der Tyrosin-, Threonin- bzw. Serin-Phosphorylierung erkennen.

Wiegand et al. (2001) zeigten in Peritubulärzellen eine Marginalisierung der Proteinkinase C vom Zytosol an die Plasmamembran nach MIF-Stimulation. Dies ist eindeutig als Aktivierung der Proteinkinase C zu deuten (zur Übersicht: Liu, 1996). Somit ist trotz der nicht nachweisbaren Änderungen der Phosphorylierungsmuster in Peritubulärzellen dennoch davon auszugehen, dass es zu nicht erkannten Phosphorylierungen von Proteinkinase C-Substraten im Laufe der MIF-Signaltransduktion kommt. Dies kann daran liegen, dass die verwendeten Antikörper laut Herstellerangaben nur einen Teil der gesamten zellulären Phosphoproteine detektieren.

Die Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von Signalmolekülen im Laufe der MIF-Signaltransduktion in Peritubulär- bzw. in Sertoli-Zellen kann daher trotz der negativ ausgefallenen Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden und sollte unter Verwendung einer anderen Methode überprüft werden.

5.1.3 Untersuchungen zu einer Aktivierung der ERK-1/2-MAPK in MIF-stimulierten Peritubulär- und Sertoli-Zellen

Die extrazellulär-Signal-regulierte Kinase (ERK-1/2) stellt eine Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) dar. Der MAPK-Weg wird durch die Aktivierung eines G-Proteins initiiert. Dadurch wird eine Proteinkinase-Kaskade ausgelöst, an der in folgender Reihenfolge eine MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK), eine MAPK-Kinase (MAPKK) und eine MAPK beteiligt sind. Diese Kinasen aktivieren sich durch Phosphorylierung. Der ERK-Weg beinhaltet Ras als G-Protein, Raf als MAPKKK, MEK (MAPK/ERK-Kinase) als MAPKK sowie ERK als MAPK und

steuert zelluläre Prozesse, wie Proliferation und Zell-Differenzierung. Proteine des Zytoskeletts, Kinasen, Phosphatasen, viele Enzyme und Ets-Transkriptionsfaktoren (Elk-1, Sap-1, Net) stellen potentielle Substrate der ERK dar (Kolch, 2000; Peyssonnaud und Eychene, 2001; Johnson und Lapadat, 2002; Chang et al., 2003). Neben der klassischen Aktivierung von G-Proteinen durch Mitogene (z.B. Wachstumsfaktoren) wurde auch die Aktivierung des ERK-Weges durch die Proteinkinase C (PKC) beschrieben (Marais et al., 1998). Untersuchungen zeigten, dass sowohl die klassische (durch Kalzium aktivierbare) PKC-Isoform- α , als auch die nicht-klassische (nicht durch Kalzium aktivierbare) PKC-Isoform- ε eine Aktivierung des ERK-Weges bewirken können (Kolch et al., 1993; Cai et al., 1997; Cheng et al., 2001), welche auf einer direkten Phosphorylierung der MAPKKK Raf-1 beruht. Diese Daten führten zur Hypothese, dass in MIF-stimulierten Peritubulärzellen die durch Kalzium aktivierte klassische PKC α über eine direkte Phosphorylierung von Raf-1 den Erk-Weg aktiviert. Bestätigt wurde diese Annahme durch die in der Literatur beschriebenen zahlreichen Nachweise einer Beteiligung der ERK-1/2 an der MIF-Signaltransduktion in verschiedenen Zellarten (Mitchell et al., 1999; Fukuzawa et al., 2002; Amin et al., 2003; Lacey et al., 2003). Ebenso bestand die Möglichkeit, dass die MIF-Signaltransduktion in Sertoli-Zellen auf dem ERK-Weg beruht, welcher zur Differenzierung der Sertoli-Zellen führt, wodurch sie ihre Teilungsfähigkeit verlieren. So wurde in NIH/3T3-Fibroblasten eine Phosphorylierung der ERK-1/2 2 h nach Stimulation mit rec MIF beobachtet, die für 24 h anhielt (Mitchell et al., 1999). Außerdem konnte in diesem Zusammenhang eine proliferationssteigernde Wirkung von MIF auf die NIH/3T3-Fibroblasten festgestellt werden. Diese wurde über einen Anstieg von cAMP, gefolgt von einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und des ERK-1/2-MAPK-Weges mit Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 vermittelt. Sowohl in Peritubulärzellen als auch in Sertoli-Zellen ist jedoch davon auszugehen, dass die Aktivierung des ERK-Weges nicht PKA-vermittelt abläuft, da ein Anstieg von cAMP in Peritubulärzellen bereits ausgeschlossen wurde (Wiegand et al., 2001) und die vorliegende Studie auch keinen Anstieg von cAMP in MIF-stimulierten Sertoli-Zellen zeigen konnte. Dies steht im Widerspruch zu der von Mitchell et al. (1999) beschriebenen Aktivierung des ERK-Weges durch die PKA und lässt somit eine alternative Aktivierung des

ERK-Weges vermuten. Lacey et al. (2003) zeigten an MIF-stimulierten Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten nach 4 h eine Phosphorylierung der ERK-1/2, verbunden mit einer proliferationssteigernden Wirkung von MIF. In Kardiomyozyten wurde bereits nach 7 min eine gesteigerte Phosphorylierung der ERK-1/2 beobachtet (Fukuzawa et al., 2002). Bei dieser Studie wurden jedoch die adäquaten Kontrollexperimente nicht durchgeführt. Außerdem lag die eingesetzte MIF-Konzentration mit 1 µg/ml um ein Vielfaches über dem physiologischen Bereich, so dass die Aussagekraft dieser Studie in Frage gestellt werden muss. Eine weitere Aktivierung des ERK-Weges wurde in MIF-stimulierten humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HMVECs) beobachtet. Amin et al. (2003) zeigten in diesen Zellen die Phosphorylierung von MEK-1/2, ERK-1/2 und Elk-1, deren Aktivierung Voraussetzung für die Induktion der Angiogenese ist. Es blieb jedoch die Frage offen, ob die Aktivierung des ERK-Weges über das G-Protein Ras oder über andere Mediatoren erfolgte.

In der vorliegenden Arbeit war in den mit MIF inkubierten Peritubulär- bzw. Sertoli-Zellen keine Phosphorylierung der ERK-1/2 zu beobachten. Der in der Positivkontrolle aufgetretene Anstieg der ERK-1/2-Phosphorylierung zeigte, dass die durch 24 h Mediumentzug synchronisierten Zellen in der Lage waren, auf das Stimulans zu reagieren.

Somit konnte weder in Peritubulärzellen noch in Sertoli-Zellen eine Aktivierung der ERK-1/2 während der MIF-Signaltransduktion nachgewiesen werden. Damit ist ausgeschlossen, dass die in Peritubulärzellen aktivierte Proteinkinase C (Wiegand et al., 2001) zu einer Induktion des ERK-Weges führt. Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen früheren Befunde von Wiegand et al. (2001). Hier konnte in MIF-stimulierten Peritubulärzellen weder eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk-1, noch eine Steigerung der Proliferation nachgewiesen werden, welche als Merkmale einer Aktivierung des ERK-Weges hätten gedeutet werden können. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammen mit der Studie von Wiegand et al. (2001) lassen somit die Schlussfolgerung zu, dass die Signaltransduktion in Peritubulärzellen und Sertoli-Zellen einen anderen Weg als den von Mitchell et al. (1999), Fukuzawa et al. (2002), Lacey et al. (2002) und Amin et al. (2003) beschriebenen ERK-Weg nimmt. MIF wirkt somit zellspezifisch auf die Signaltransduktion.

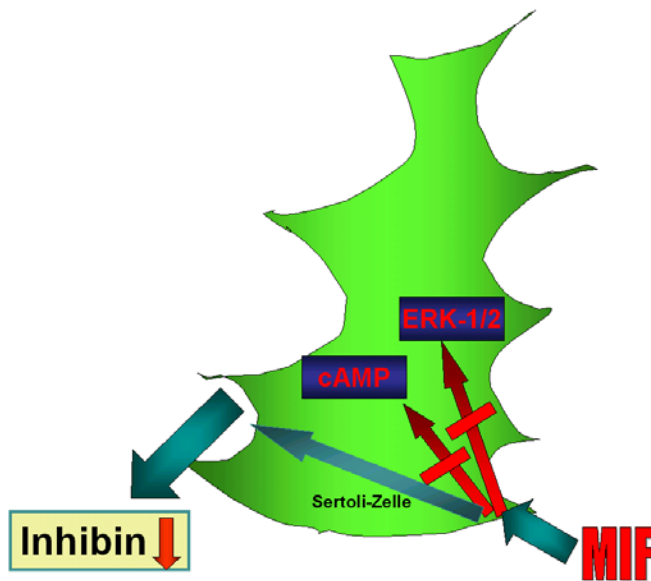


Abb. 5.1:
Schematische Darstellung
der Untersuchungen zur MIF-Signaltrans-
duktion in Sertoli-Zellen
 In Sertoli-Zellen erfolgt die
 Übermittlung der Reduk-
 tion der Inhibin-Sekretion
 weder über den PKA-Weg
 (cAMP) noch über den
 ERK-Weg.

5.1.4 Untersuchungen zu einer Rezeptor-vermittelten Wirkung von MIF in Peritubulärzellen

Obwohl seit der Entdeckung von MIF vor über 35 Jahren eine Vielzahl von Informationen über die Rolle des Faktors in der Zellphysiologie und Immunität gesammelt wurden, ist bis vor kurzem noch kein Kandidatenprotein für einen MIF-Rezeptor identifiziert worden. Es bestehen grundsätzlich zwei unterschiedliche Hypothesen über die Wirkungsweise von MIF. Einerseits wird ein klassischer Membran-Rezeptor für MIF postuliert, andererseits eine Aufnahme von MIF in die Zelle durch eine Nicht-Rezeptor-vermittelte Endozytose (Kleemann et al., 2000; Leng et al., 2003). Für die erste Hypothese spricht eine Vielzahl von Untersuchungen (Calandra et al., 1994; Hudson et al., 1999; Mitchell et al., 1999; Wennemuth et al., 2000). Dennoch gelang es erst kürzlich, ein integrales Membranprotein zu charakterisieren, das als Bindungspartner von MIF fungieren kann (Leng et al., 2003). Es handelt sich um die invariable Kette des MHC II-Komplexes (CD74 oder Ii). Eine Bindung von MIF an die extrazelluläre Domäne von CD74 löste direkt oder indirekt eine Phosphorylierung der ERK-1/2 und die Proliferation in Raji B-Zellen und CCL210 humanen Lungenfibroblasten aus. CD74 besitzt die Aufgabe den MHC

II-Komplex vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat zu transportieren. Zudem verhindert CD74, dass Peptide schon im ER an die Peptidbindungs-Furche des MHC II-Komplexes binden. Eine weitere Funktion besteht in der Umleitung des MHC II-Moleküls vom merokrinen Sekretionsweg ins endosomale/lysosomale System. Diese drei Aufgaben werden auch als klassische Wirkungsweisen bezeichnet (zur Übersicht: Matza et al., 2001). Nur einige wenige Untersuchungen konnten eine Lokalisation von CD74 in der Zellmembran zeigen. Die Halbwertszeit betrug dort allerdings nur 3-4 min (Wraight et al., 1990; Henne et al., 1995). Das Fehlen einer für die Interaktion mit Signalmolekülen notwendigen intrazellulären Sequenzdomäne von CD74 lässt aber die Frage offen, wie CD74 nach der Bindung von MIF das Signal an intrazelluläre Signalmoleküle transduzieren soll. Die Entdeckung von CD74 als möglicher Rezeptor von MIF ist jedoch ein weiterer Hinweis auf eine nicht-klassische Wirkung für CD74, wie sie auch in der Literatur schon beschrieben wurde (Aktivierung eines TAF(II)105-NF- κ B-abhängigen Transkriptionsprogramms, welches die B-Zell-Maturierung induziert) (Naujokas et al., 1993; Matza et al., 2001).

Die Annahme, dass die MIF-Wirkung nicht rezeptorvermittelt, sondern über einen alternativen Weg abläuft, stützt sich auf die enzymatische Aktivität des Moleküls (Rosengren et al., 1996; Kleemann et al., 1998a) und das konstitutive Expressionsprofil. Noch bevor CD74 als ein möglicher Rezeptor für MIF gefunden wurde, konnten Kleemann et al. (2000) eine intrazelluläre Bindung von MIF an Jab-1 zeigen. Sowohl für endogenes als auch exogen zugegebenes MIF konnte im Zytosol von Raw 264.7-Makrophagen und HeLa-Zellen eine Co-Lokalisation mit Jab-1 nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen belegten, dass MIF durch Bindung an Jab-1, die TNF- α -induzierte AP-1-Stimulation von 293T-Zellen reduzieren kann (Kleemann et al., 2000). MIF repräsentiert somit einen Gegenregulator zum AP-1-Signalweg. Da aktives AP-1 die Expression pro-inflammatorischer Zytokine induziert, stehen diese Daten der in der Literatur vielfältig beschriebenen pro-inflammatorischen Wirkung von MIF (Calandra et al., 1994) entgegen. Ebenso stehen die Erhöhung der intrazellulären Konzentration des Zell-Zyklus-Inhibitors p27^{Kip1} durch MIF und die damit verbundene Inhibition der Zellproliferation im Widerspruch zu den publizierten proliferationssteigernden Effekten (Mitchell et al., 1999). Bei der

Aufnahme von MIF in die Zelle durch Nicht-Rezeptor-vermittelte Endozytose ist der Transfer von MIF aus den endozytotischen Vesikeln in das Zytosol völlig ungeklärt. Kritisch anzumerken ist des Weiteren, die in dieser Studie eingesetzten extrem hohen MIF-Konzentrationen von bis zu 12,5 µg/ml. Die physiologische MIF-Konzentration im Serum liegt bei ca. 4 ng/ml und steigert sich unter den Bedingungen eines septischen Schocks nur auf ca. 150 ng/ml (Calandra et al., 2000).

Frühere Ergebnisse zur MIF-Signaltransduktion in Peritubulärzellen, die einen kapazitiven Kalziumeinstrom und eine Aktivierung der Proteinkinase C beschreiben (Wennemuth et al., 2000; Wiegand et al., 2001), lassen hingegen die Vermutung zu, dass MIF seine Wirkung in Peritubulärzellen über einen Rezeptor vermittelt. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Phosphorylierungsmuster in Peritubulärzellen geben jedoch keinen Hinweis auf die Art der Signalübertragung von MIF in diesem Zelltyp. Eine Untersuchung der Peritubulärzellen auf das Vorhandensein von CD74 in der Zellmembran in zukünftigen Studien wäre hilfreich, um eine Beteiligung von CD74 an der MIF-Signaltransduktion abzuklären.

In Sertoli-Zellen konnten die durchgeführten Untersuchungen keinen Hinweis geben, ob die MIF-Signaltransduktion rezeptorvermittelt ist oder durch einen alternativen Weg aktiviert wird. Da aber auch in dieser Zellart weder eine Aktivierung der ERK-1/2 noch eine Beteiligung des Proteinkinase A-Weges bei der MIF-Signaltransduktion nachgewiesen werden konnte, ist eine Endozytose von MIF in die Zelle mit anschließender Bindung an ein intrazelluläres Bindungsprotein wie Jab-1 durchaus möglich.

5.1.5 Aktivierung der ERK-1/2 durch Mediumwechsel bei Peritubulär- und Sertoli-Zellen

Es ist bekannt, dass eine Vielzahl von Stimuli, wie Hormone, Wachstumsfaktoren, Differenzierungsfaktoren, Zytokine und Karzinogene, den ERK-Weg aktivieren und entsprechend Wachstum, Differenzierung oder Mitogenese bewirken (zur Übersicht: Kolch, 2000; Peyssonnaud et al., 2001; Johnson et al., 2002; Chang et al., 2003). Außerdem führt die Aktivierung des

ERK-Weges zu einer Inhibition der durch Hypoxie (Buckley et al., 1999), Wachstumshormonentzug (Erhardt et al., 1999; Apati et al., 2003; Lambeng et al., 2003), Wasserstoffperoxyd (Wang et al., 1998) und Chemotherapeutika (Anderson und Tolkovsky, 1999) induzierten Apoptose. In Sertoli-Zellen ist bekannt, dass FSH in neonatalen Sertoli-Zellen die Proliferation über den ERK-Weg induziert und die Differenzierung kontrolliert. Diese FSH-Effekte sind in Sertoli-Zellen 19 Tage alter Ratten nicht mehr zu beobachten, da die Sertoli-Zellen bereits in die terminale Differenzierung eingetreten sind (Crepieux et al., 2001). Eine Aktivierung des ERK-Weges konnte in Peritubulärzellen nach Angiotensin-II-Stimulation und Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels beobachtet werden. Nachfolgend wurde sowohl eine Kontraktion wie auch Proliferation der Zellen beobachtet (Rossi et al., 2002).

In der vorliegenden Studie zeigte die Untersuchung der Phosphorylierungsmuster bei bloßer Zugabe von rec MIF zu dem bereits über Nacht auf den Zellen befindlichem Medium keine sichtbaren Veränderungen bei der Tyrosin-, Threonin- sowie Serin-Phosphorylierung. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass ein Austausch des Mediums mit voran gegangenem Waschschrift mit PBS zu einer Änderung des Tyrosin-Phosphorylierungsmusters führte. Dabei wurden die Zellen über Nacht in FKS-freiem RPMI 1640 kultiviert, danach wurde das Medium entfernt, mit Dulbecco's PBS gewaschen und wiederum FKS-freies RPMI 1640 zu den Zellen gegeben. Hierbei war 5 min nach Austausch des Mediums eine deutliche Phosphorylierung eines ca. 44 kDa und eines ca. 42 kDa Proteins zu beobachten. Dieser Effekt trat am markantesten bei den Sertoli-Zellen auf, war jedoch in den Peritubulärzellen ebenfalls zu beobachten. Da die Molekulargewichte mit denen von ERK-1 (p44-MAPK) und ERK-2 (p42-MAPK) korrespondierten, wurde anschließend überprüft, ob durch den Austausch des Mediums oder das Waschen der Zellen mit PBS eine Aktivierung des ERK-Weges durch Phosphorylierung der ERK-1/2 erfolgte. Es zeigte sich in Peritubulär- und in Sertoli-Zellen 5 min nach dem Mediumwechsel mit vorangegangenem PBS-Waschschrift eine deutliche Zunahme der Phosphop44- und p42-MAPK. Eine mögliche Erklärung für das beobachtete Phänomen stellten Mechanismen dar, die der Apoptose durch Entzug von Wachstumsfaktoren entgegenwirken (Erhardt et al., 1999; Apati et al., 2003;

Lambeng et al., 2003). Die eingeleitete Apoptose kann durch die Aktivierung des ERK-Weges gehemmt werden (Erhardt et al., 1999; Apati et al., 2003; Lambeng et al., 2003). Ein physiologischer Mechanismus zur Aktivierung des ERK-Weges wurde aber bislang noch nicht beschrieben. Apati et al. (2003) konnten durch eine experimentelle Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels mit Ionomycin eine biphasische ERK-1/2-Phosphorylierung bewirken, welcher die induzierte Apoptose hemmte. Erhardt et al. (1999) erzielten den gleichen Effekt durch eine Überexpression von B-Raf in Ratten-Fibroblasten, die einem Wachstumsfaktorentzug ausgesetzt waren. Zudem reagierten glomeruläre Podozyten, beta-Zellen des Pankreas und glatte Muskelzellen der Coronararterien mit einer Aktivierung der ERK-1/2 nach Erhöhung der Glukosekonzentration (Hoshi et al., 2002; Sakuma et al., 2002; Briaud et al., 2003). Sakuma et al. (2002) zeigten in diesem Zusammenhang auch eine Inhibition der Apoptose in glatten Muskelzellen aus humanen Coronar-Arterien. So kann vermutlich die Aktivierung der ERK-1/2 Kinase in Peritubulär- und Sertoli-Zellen auf den Anstieg der Glukosekonzentration von 0 mM auf 11,1 mM nach dem Mediumwechsel zurückgeführt werden. Die durch den Entzug der Wachstumshormone ausgelöste Apoptose der Zellen könnte dabei verhindert werden.

5.2 Die Rolle von MIF im Immunprivileg des Hodens

5.2.1 Aufbau des Immunprivilegs des Hodens

Die Blut-Hoden-Schranke ist nur ein unzureichender Mechanismus, die post-meiotischen Keimzellen vor den Attacken der Immunzellen zuschützen. So wurde das Vorkommen von testikulären Autoantigenen auch außerhalb dieser Barriere gezeigt (Yule et al., 1988). Zudem befindet sich die Blut-Hoden-Schranke in einem ständigen Auf- und Abbau, wodurch die Barrierefunktion zeitlich und räumlich Lücken aufweist, die den Kontakt von Immunzellen mit post-meiotischen Keimzellen prinzipiell ermöglichen (Cheng und Mruk, 2002; Hedger und Meinhardt, 2003; Liu et al., 2003). Während der saisonalen

Regression wird sogar ein kompletter Zusammenbruch der Blut-Hoden-Schranke beschrieben (z.B. Nerz) (Pelletier, 1986).

Vermutlich ist das Immunsystem des Hodens unter physiologischen Bedingungen nicht in der Lage, Fremd-Antigene zu erkennen und eine Immunantwort auszulösen. Diese Annahme wird durch Untersuchungen unterstützt, die eine Abstoßung von Xenotransplantaten im Hoden nach aktiver Immunisierung oder Sensitivierung zeigten (Head et al., 1983). Von Hedger (2002) wird ein lokaler organspezifischer Mechanismus postuliert, der die Immunantwort im Hoden über lösliche niedermolekulare Faktoren negativ reguliert und somit für die ausbleibende Immunantwort des Hodens mitverantwortlich ist.

Hauptanteil der Immunzellen des Hodens stellen Makrophagen dar, die sich in die größere Gruppe der residenten und in die in geringerer Anzahl vorkommender Makrophagen vom „inflammatorischen“ Typ untergliedern, (Hedger, 2002). Es kommen jedoch auch Mastzellen, Dendritische Zellen, T-Zellen und „natural killer (NK)“ Zellen vor (Nistal et al., 1984; Niemi et al., 1986; Itoh et al., 1995; Tompkins et al., 1998). Als Besonderheit fiel auf, dass residente testikuläre Makrophagen im Vergleich zu Makrophagen aus anderen Geweben eine geringere Stimulierbarkeit und eine reduzierte Fähigkeit zur Freisetzung von Zytokinen aufwiesen, so dass ihnen unter physiologischen Bedingungen eine anti-inflammatorische Aktivität zugeschrieben wurde (Kern et al., 1995). Als weiterer Mechanismus zur Aufrechterhaltung des Immunprivilegs wird die funktionelle Inaktivierung (Anergie) in den Hoden einwandernder Lymphozyten diskutiert (Filippini et al., 2001; Janeway et al., 2002). Dies würde bedeuten, dass die von den testikulären T-Zellen erkannten Autoantigene auf Grund fehlender ko-stimulatorischer Signale keine Aktivierung erfahren.

Aller Voraussicht nach wird das Immunprivileg ebenfalls durch ein Überwiegen der Funktion anti-inflammatorischer Zytokine vermittelt. Neben ihrer primären Funktion in der Kontrolle der Immunantwort, spielen sie im Hoden aber auch eine wichtige Rolle bei der Entwicklung, Steroidogenese und Spermatogenese. Neben den pro-inflammatorischen Zytokinen IL-1 α , IL-6, TNF- α und MIF wurde diese duale Rolle im Hoden auch für anti-inflammatorische Zytokine, wie die Aktivine, IFN- γ und TGF- β beschrieben (Lee et al., 1989; Mather et al., 1990; Boockfor und Schwarz, 1991; Khan und Nieschlag, 1991; Parvinen et al., 1991;

Khan et al., 1992; De et al., 1993; de Winter et al., 1993; Hakovirta et al., 1993; Pöllänen et al., 1993; Xiong und Hales, 1993; Boockfor et al., 1994; de Winter et al., 1994; Paul und Seder, 1994; Hakovirta et al., 1995; Okuda et al., 1995; Hoeben et al., 1996; Stephan et al., 1997; Dejuq et al., 1998; Nehar et al., 1998; Konrad et al., 2000; Suarez-Pinzon et al., 2000; Pentikainen et al., 2001; Svechnikov et al., 2001).

Da die genannten Zytokine sowohl im Immunsystem als auch bei der parakrinen Interaktion testikulärer Zellen eine Rolle spielen, kann eine Hochregulation der Zytokine durch Aktivierung des Immunsystems bei Entzündung zu einer Störung der normalen Hodenfunktion führen.

5.2.2 Untersuchungen zu einem Einfluss von MIF auf die TGF- β 2-Sekretion in Peritubulärzellen

Im Hoden sind nicht nur aktivierte Immunzellen in der Lage Zytokine zu sezernieren, sondern auch somatische Zellen, die diese konstitutiv freisetzen. So sezernieren auch Peritubulärzellen, neben extrazellulären-Matrixproteinen, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sowie Zytokine (Skinner und Moses, 1989; Tung und Fritz, 1994). Eines dieser Zytokine ist TGF- β . Die Peritubulärzellen exprimieren und sezernieren im Laufe der Pubertät alle drei Isoformen der TGF- β -Familie (Mullaney und Skinner, 1993). TGF- β besitzt stark immunsuppressive Eigenschaften (Pöllänen et al., 1993). In ihrer Studie zeigten Pöllänen et al. (1993), dass die durch abdominal appliziertes Hodenhomogenat hervorgerufene Proliferation von peripheren Lymphozyten durch neutralisierende TGF- β -Antikörper gesteigert wird. Weller et al. (1994) belegten, dass auch TGF- β 2 allein immunsuppressive Wirkung besitzt, indem es die T-Zell-Proliferation hemmt.

Um einen möglichen Einfluss von MIF auf die Balance von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt von MIF auf die TGF- β 2-Sekretion in Peritubulärzellen untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass rec MIF in Peritubulärzellen eine Reduktion der TGF- β 2-Sekretion hervorruft. Als Gegenspieler dieser reduzierenden MIF-Wirkung können Glucocorticoide und TGF- β 2 selbst angesehen werden, die in der Lage sind, die basale TGF- β 2-Sekretion zu

steigern (Konrad et al., 2000). Dies bestätigt die bereits beschriebene Funktion von MIF als Gegenregulator der Glucocorticoide (Calandra et al., 1994). Neben dem Einfluss von MIF auf die TGF- β 2-Sekretion wurde auch ein Effekt auf die TGF- β 2-mRNA-Expression in Peritubulärzellen untersucht. Dabei war jedoch keine signifikante Veränderung des Expressionsmusters nach MIF-Stimulation zu beobachten. Die alleinige Einflussnahme eines Faktors auf die Proteinsekretion ohne Änderung der mRNA-Expression wurde auch für den „basic fibroblast growth factor“ (bFGF) beschrieben, der die Sekretion von TGF- β 1 in HPTC („human renal proximal tubular cells“) aus präformierten Speichern induziert, ohne die de novo-Synthese zu beeinflussen (Phillips et al., 1997). Für TGF- β 2 konnte in PC12-Zellen („pheochromocytoma cell line“) die Speicherung in sekretorischen Granula durch Koloalisation mit spezifischen Markermolekülen für sekretorische Granula (Chromogranin B) bzw. das trans-Golgi-Netzwerk (TGN38) bewiesen werden. Des Weiteren konnte eine kalziumabhängige TGF- β 2-Sekretion aus präformierten Speichern gezeigt werden, so dass sowohl eine konstitutive TGF- β 2-Sekretion als auch eine regulierte TGF- β 2-Sekretion in den PC12-Zellen zu finden ist (Specht et al., 2003). Somit ist eine Inhibition der TGF- β 2-Sekretion in Peritubulärzellen durch MIF ohne Beeinflussung der TGF- β 2-Expression durchaus möglich und kann als ein Effekt auf die regulierte Sekretion aus existierenden Speichern gesehen werden. Für TNF- α in Adipozyten wurde interessanterweise sogar ein stimulierender Effekt auf die Leptin-Sekretion mit einer gleichzeitigen Hemmung der Leptin-Synthese beobachtet (Zhang et al., 2000).

5.2.3 Beteiligung der Proteinkinase C an der Vermittlung des Effektes von MIF auf die TGF- β 2-Sekretion

In Anbetracht der in der vorliegenden Arbeit dargestellten inhibitorischen Wirkung von rec MIF auf die TGF- β 2-Sekretion in Peritubulärzellen wurde die Frage gestellt, ob der beobachtete Effekt von MIF auf die von Wiegand et al. (2001) beschriebene Aktivierung der Proteinkinase C zurückzuführen ist. In der Literatur ist die gesteigerte Sekretion aus Speichergranula durch einen Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels nach Aktivierung der Proteinkinase C gut

etabliert. In Zona-fasciculata-Zellen der Nebenniere wird dieser Mechanismus bei der Sphingosine-1-Phosphat-stimulierten Cortisol-Sekretion (Rábano et al., 2003) und in der Glandula lacrimalis nach Stimulation der Proteinsekretion beschrieben (Tepavcevic et al., 2003). Aber auch der gegenteilige Effekt ist bekannt. Für Parietalzellen wurde eine Reduktion der cholinerg-stimulierten H^+ -Sekretion über eine Aktivierung der Proteinkinase $C\alpha$ gezeigt (Fährmann et al., 2002; Fährmann et al., 2003). Ebenso konnte eine Proteinkinase C-abhängige Inhibition der Carbachol-stimulierten Säuresekretion durch IL-1 für Parietalzellen gefunden (Beales und Calam, 2001).

Diese Daten stützen die Vermutung, dass die in Peritubulärzellen beobachtete, MIF-bedingte Reduktion der TGF- β 2-Sekretion einer Steuerung durch die Proteinkinase C unterliegt. In weiterführenden Studien ist geplant, diese Hypothese unter Verwendung von Proteinkinase C-Inhibitoren zu prüfen.

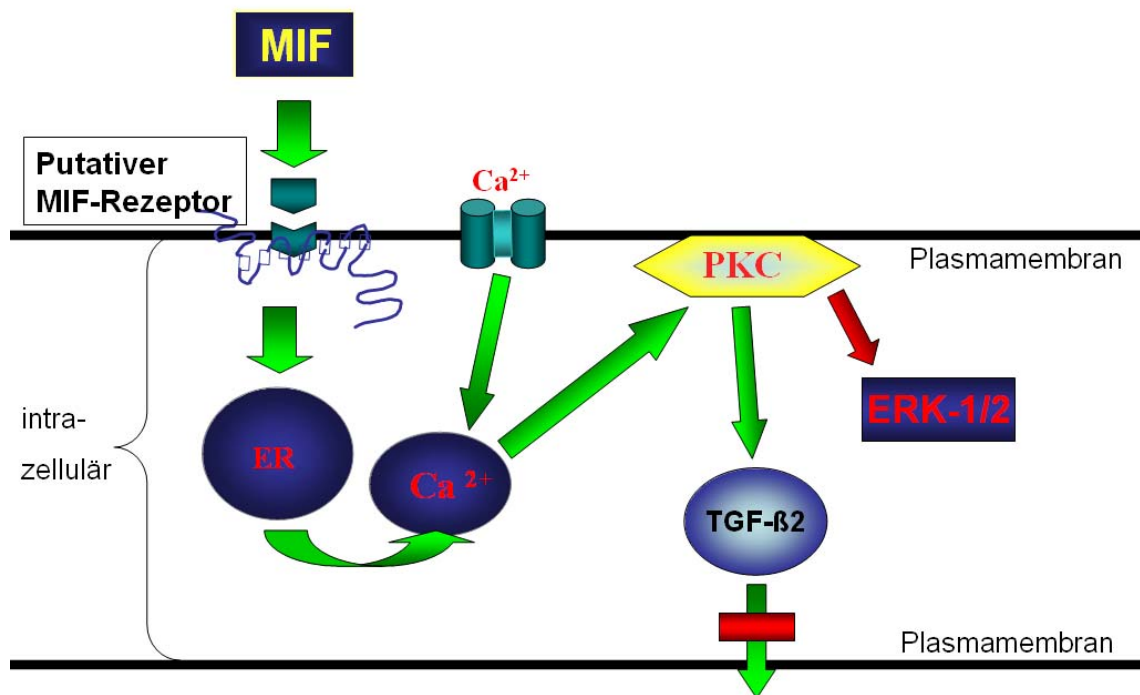


Abb. 5.2:

Schematische Darstellung des molekularen Wirkungsmechanismus von MIF in Peritubulärzellen. MIF bewirkt in Peritubulärzellen einen kapazitativen Kalziumeinstrom, der von einer Aktivierung der Proteinkinase C gefolgt wird, die alternativ zum ERK-Weg zu einer Hemmung der TGF- β 2-Sekretion führt. ER = Endoplasmatisches Retikulum.

5.2.4 Untersuchungen zum Effekt von MIF auf die TNF- α -Sekretion von Peritubulärzellen

TNF- α gehört zu den potentesten pro-inflammatorischen Zytokinen. Der Faktor wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen sezerniert und löst pleiotrope biologische Antworten in Zielzellen aus. Dies beinhaltet die namensgebende hämorrhagische Nekrose bei Tumoren, Zytotoxizität, eine wichtige Rolle beim endotoxischen Schock sowie bei inflammatorischen, immunregulatorischen, proliferativen und antiviralen Immunreaktionen (zur Übersicht: Fiers, 1991).

Im Hoden wurde die mRNA für TNF- α bislang nur in pachytänen Spermatozyten, runden Spermatisden und testikulären Makrophagen lokalisiert. Die Sekretion von TNF- α -Protein konnte nur nach Aktivierung der testikulären Makrophagen beobachtet werden (De et al., 1993; Hutson, 1993).

Obwohl speziell die TNF- α -mRNA-Expression in Peritubulärzellen nicht nachgewiesen wurde (Hutson, 1993), spielen sie dennoch eine Rolle durch die Produktion anderer Zytokine bei inflammatorischen Reaktionen. So wurde nach Stimulation mit pro-inflammatorischen Agentien eine gesteigerte Expression und Sekretion von MCP-1 („monocyte chemoattractant protein-1) in Peritubulärzellen gezeigt (Aubry et al., 2000). Deshalb wurde geprüft, ob die TNF- α -Sekretion in Peritubulärzellen durch MIF induziert werden kann. Diese Hypothese konnte nicht bestätigt werden. MIF ist nicht in der Lage die Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α in Peritubulärzellen zu induzieren.

5.2.5 Einfluss von MIF auf die Zytokinbalance des Hodens

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten deuten auf eine biologische Relevanz von MIF bei der Aufrechterhaltung der Zytokinbalance des Hodens hin. Durch die Regulation der Freisetzung des anti-inflammatorischen Mediators TGF- β 2 kann das pro-inflammatorische Zytokin MIF das Zytokingleichgewicht des Hodens vom immunsuppressiven Status („Immunprivileg“) hin zu einer inflammatorischen Immunantwort verschieben. Neben der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Inhibition der TGF- β 2-Sekretion in Peritubulärzellen kann hier

auch eine Hochregulation der TNF- α Sekretion in Makrophagen (Hutson, 1993) beitragen.

5.3 Ausblick

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit erhobenen Daten schließen eine Beteiligung des Proteinkinase A- und MAPK-ERK-Wegs an der MIF-Signaltransduktion aus. Daher sollten weiterführende Untersuchungen unter Verwendung eines Inhibitors klären, ob der in Peritubulärzellen beobachtete Effekt von MIF auf die TGF- β 2-Sekretion durch die PKC vermittelt wird.

Der Ausschluss einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen, lässt die Vermittlung der molekularen Wirkung von MIF über die intrinsische Enzymaktivität möglich erscheinen. Basierend auf der Tatsache, dass das N-terminale Prolin ebenso essentiell für die Tautomerase-Aktivität (Swope et al., 1998) wie das Cys-X-X-Cys-Motiv für die Oxidoreduktase-Aktivität ist (Kleemann et al., 1998), sollte mit Hilfe von MIF-Mutanten diese Form der Wirkungsweise von MIF geprüft werden.

Ein weiterer MIF-Einfluss auf die Zytokinbalance im Hoden sollte durch die Untersuchung möglicher Änderungen der Expression und Sekretion des pro-inflammatorischen Chemokins MCP-1 und des anti-inflammatorischen Zytokins Aktivin nach MIF-Stimulation in Peritubulärzellen erfolgen (de Winter et al., 1994; Aubry et al., 2000).

6. Zusammenfassung

6.1 Zusammenfassung

Der Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF) wurde erstmals 1966 als ein von T-Lymphozyten sezerniertes Zytokin beschrieben, mit der Fähigkeit die ungerichtete Migration von Makrophagen zu hemmen. Folgestudien zeigten das Vorkommen von MIF in vielen Organsystemen. Im Hoden wird MIF von den Leydig-Zellen exprimiert und sezerniert. Es hemmt u.a. die Inhibin-Sekretion der Sertoli-Zellen *in vitro* und wurde als parakriner Faktor bei der Leydig-Zell-Tubulus-Interaktion gefunden.

Im Hoden entscheidet die Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen, ob der immunprivilegierte Status aufrecht erhalten oder eine entzündliche Reaktion ausgelöst wird. Peritubulärzellen sezernieren das immunsupprimierende Molekül TGF- β 2 und andere regulatorische Zytokine, die sowohl im Immunsystem des Hodens als auch bei der lokalen Interaktion testikulärer Nicht-Immunezellen eine wesentliche Rolle spielen. Die vorliegende Arbeit zeigte, dass MIF die Sekretion von TGF- β 2 in Peritubulärzellen signifikant hemmt, wohingegen eine Beeinflussung der Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α nicht beobachtet wurde.

Frühere Studien zur MIF-Signaltransduktion in Peritubulärzellen zeigten einen kapazitativen Kalziumeinstrom, der von einer Aktivierung der Proteinkinase C gefolgt wurde. Da bislang nur wenig über den molekularen Wirkmechanismus von MIF bekannt ist, sollten in der vorliegenden Arbeit mögliche MIF-Signaltransduktionswege in testikulären Zielzellen untersucht werden. Die Untersuchung der MIF-Signaltransduktion in Sertoli-Zellen zeigte keine Beteiligung des „second messenger“ cAMP. Ebenso konnte keine Veränderung der Phosphorylierungsmuster in Peritubulärzellen und Sertoli-Zellen inklusive einer Aktivierung der ERK-1/2 durch MIF beobachtet werden. Man kann folglich davon ausgehen, dass die MIF-Signalübertragung weder über den ERK-Weg abläuft noch über den Proteinkinase A-Weg vermittelt wird.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass MIF über eine Inhibition der Sekretion des anti-inflammatorischen Mediators TGF- β 2 eine Verlagerung der Zytokinbalance vom immunsupprimierten Zustand hin zu einer Entzündungsreaktion vermitteln kann.

6.2 Summary

Macrophage migration inhibitory factor was discovered in 1966 as a cytokine secreted by activated T-lymphocytes, which was able to inhibit the random migration of macrophages. Further investigations showed a wide tissue distribution for this cytokine. In the testis, MIF is expressed and secreted by the Leydig cells. The factor suppresses the inhibin secretion of the Sertoli cells *in vitro* and was found to be involved in the paracrine modulation of Leydig cell-seminiferous tubule interaction.

In the testis, the balance between pro- and anti-inflammatory cytokines determines whether the immunprivileged status is maintained or an inflammatory reaction is initiated. Peritubular cells secrete the immunosuppressive molecule TGF- β 2 and other regulatory cytokines. Many cytokines play a dual role both in testicular immune regulation and in normal testicular function. Our work shows that MIF significantly suppresses the TGF- β 2 secretion in peritubular cells, whereas the pro-inflammatory cytokine TNF- α was unaffected.

Former studies on the MIF-signal transduction in peritubular cells showed a capacitative calcium influx, followed by an activation of the protein kinase C. As relatively little is known about the molecular mechanism of MIF, this study was aimed to investigate the mechanism of MIF-signal transduction in testicular target cells (peritubular and Sertoli cells). Sertoli cells showed no involvement of the second messenger cAMP in the MIF-signal transduction pathway. Furthermore, no changes in the phosphorylation pattern of MIF-stimulated peritubular and Sertoli cells including ERK-1/2 activation could be recorded. Therefore, MIF-signal transduction in peritubular and Sertoli cells is not mediated via the ERK or PKA pathway.

In summary, it can be concluded that the pro-inflammatory cytokine MIF can shift the cytokine balance from the immunosuppressive state towards an inflammatory reaction through the inhibition of TGF- β 2 secretion.

7. Literaturverzeichnis

Ailenberg, M. und Fritz, I. B. (1989) Influences of follicle-stimulating hormone, proteases, and antiproteases on permeability of the barrier generated by Sertoli cells in a two-chambered assembly *Endocrinology* 124, 1399-1407.

Amin, M. A., Volpert, O. V., Woods, J. M., Kumar, P., Harlow, L. A. und Koch, A. E. (2003) Migration inhibitory factor mediates angiogenesis via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol kinase *Circ Res* 93, 321-329.

Anderson, C. N. und Tolkovsky, A. M. (1999) A role for MAPK/ERK in sympathetic neuron survival: protection against a p53-dependent, JNK-independent induction of apoptosis by cytosine arabinoside *J Neurosci* 19, 664-673.

Anthony, C. T. und Skinner, M. K. (1989) Cytochemical and biochemical characterization of testicular peritubular myoid cells *Biol Reprod* 40, 811-823.

Apati, A., Janossy, J., Brozik, A., Bauer, P. und Magocsi, M. (2003) Calcium induces cell survival and proliferation through the activation of MAPK pathway in a human hormone-dependent leukaemia cell line (TF-1) *J Biol Chem*.

Arslan, M., Weinbauer, G. F., Schlatt, S., Shahab, M. und Nieschlag, E. (1993) FSH and testosterone, alone or in combination, initiate testicular growth and increase the number of spermatogonia and Sertoli cells in a juvenile non-human primate (*Macaca mulatta*) *J Endocrinol* 136, 235-243.

Aubry, F., Habasque, C., Satie, A. P., Jegou, B. und Samson, M. (2000) Expression and regulation of the CC-chemokine monocyte chemoattractant protein-1 in rat testicular cells in primary culture *Biol Reprod* 62, 1427-1435.

Bacher, M., Meinhardt, A., Lan, H. Y., Dhabhar, F. S., Mu, W., Metz, C. N., Chesney, J. A., Gemsa, D., Donnelly, T., Atkins, R. C. und Bucala, R. (1998) MIF expression in the rat brain: implications for neuronal function *Mol Med* 4, 217-230.

Bacher, M., Meinhardt, A., Lan, H. Y., Mu, W., Metz, C. N., Chesney, J. A., Calandra, T., Gemsa, D., Donnelly, T., Atkins, R. C. und Bucala, R. (1997) Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia *Am J Pathol* 150, 235-246.

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

Barone, F., Genazzani, A. A., Conti, A., Churchill, G. C., Palombi, F., Ziparo, E., Sorrentino, V., Galione, A. und Filippini, A. (2002) A pivotal role for cADPR-

- mediated Ca²⁺ signaling: regulation of endothelin-induced contraction in peritubular smooth muscle cells *Faseb J* 16, 697-705.
- Beales, I. L. und Calam, J. (2001) Inhibition of carbachol stimulated acid secretion by interleukin 1beta in rabbit parietal cells requires protein kinase C *Gut* 48, 782-789.
- Bernhagen, J., Calandra, T. und Bucala, R. (1998) Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor: biological and structural features *J Mol Med* 76, 151-161.
- Bernhagen, J., Calandra, T., Mitchell, R. A., Martin, S. B., Tracey, K. J., Voelter, W., Manogue, K. R., Cerami, A. und Bucala, R. (1993) MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia *Nature* 365, 756-759.
- Bernhagen, J., Mitchell, R. A., Calandra, T., Voelter, W., Cerami, A. und Bucala, R. (1994) Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human macrophage migration inhibitory factor (MIF) *Biochemistry* 33, 14144-14155.
- Blocki, F. A., Ellis, L. B. und Wackett, L. P. (1993) MIF protein are theta-class glutathione S-transferase homologs *Protein Sci* 2, 2095-2102.
- Bloom, B. R. und Bennett, B. (1966) Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity *Science* 153, 80-82.
- Boockfor, F. R. und Schwarz, L. K. (1991) Effects of interleukin-6, interleukin-2, and tumor necrosis factor alpha on transferrin release from Sertoli cells in culture *Endocrinology* 129, 256-262.
- Boockfor, F. R., Wang, D., Lin, T., Nagpal, M. L. und Spangelo, B. L. (1994) Interleukin-6 secretion from rat Leydig cells in culture *Endocrinology* 134, 2150-2155.
- Bozza, M., Satoskar, A. R., Lin, G., Lu, B., Humbles, A. A., Gerard, C. und David, J. R. (1999) Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis *J Exp Med* 189, 341-346.
- Briaud, I., Lingohr, M. K., Dickson, L. M., Wrede, C. E. und Rhodes, C. J. (2003) Differential activation mechanisms of Erk-1/2 and p70(S6K) by glucose in pancreatic beta-cells *Diabetes* 52, 974-983.
- Buckley, S., Driscoll, B., Barsky, L., Weinberg, K., Anderson, K. und Warburton, D. (1999) ERK activation protects against DNA damage and apoptosis in hyperoxic rat AEC2 *Am J Physiol* 277, L159-166.
- Cai, H., Smola, U., Wixler, V., Eisenmann-Tappe, I., Diaz-Meco, M. T., Moscat, J., Rapp, U. und Cooper, G. M. (1997) Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isoforms in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase *Mol Cell Biol* 17, 732-741.

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

Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R. A. und Bucala, R. (1994) The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor *J Exp Med* 179, 1895-1902.

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

Calandra, T. und Roger, T. (2003) Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity *Nat Rev Immunol* 3, 791-800.

Calandra, T., Spiegel, L. A., Metz, C. N. und 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, 11383-11388.

Chang, F., Steelman, L. S., Lee, J. T., Shelton, J. G., Navolanic, P. M., Blalock, W. L., Franklin, R. A. und McCubrey, J. A. (2003) Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention *Leukemia* 17, 1263-1293.

Cheng, C. Y. und Mruk, D. D. (2002) Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development *Physiol Rev* 82, 825-874.

Cheng, J. J., Wung, B. S., Chao, Y. J. und Wang, D. L. (2001) Sequential activation of protein kinase C (PKC)-alpha and PKC-epsilon contributes to sustained Raf/ERK1/2 activation in endothelial cells under mechanical strain *J Biol Chem* 276, 31368-31375.

Chesney, J., Metz, C., Bacher, M., Peng, T., Meinhardt, A. und Bucala, R. (1999) An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma *Mol Med* 5, 181-191.

Chiarenza, C., Filippini, A., Tripiciano, A., Beccari, E. und Palombi, F. (2000) Platelet-derived growth factor-BB stimulates hypertrophy of peritubular smooth muscle cells from rat testis in primary cultures *Endocrinology* 141, 2971-2981.

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

Conn, P. M. und Crowley, W. F., Jr. (1991) Gonadotropin-releasing hormone and its analogues *N Engl J Med* 324, 93-103.

Crepieux, P., Marion, S., Martinat, N., Fafeur, V., Vern, Y. L., Kerboeuf, D., Guillou, F. und Reiter, E. (2001) The ERK-dependent signalling is stage-specifically modulated by FSH, during primary Sertoli cell maturation *Oncogene* 20, 4696-4709.

David, J. R. (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, 72-77.

de Kretser, D. M. und Phillips, D. J. (1998) Mechanisms of protein feedback on gonadotropin secretion *J Reprod Immunol* 39, 1-12.

De, S. K., Chen, H. L., Pace, J. L., Hunt, J. S., Terranova, P. F. und Enders, G. C. (1993) Expression of tumor necrosis factor-alpha in mouse spermatogenic cells *Endocrinology* 133, 389-396.

de Winter, J. P., Vanderstichele, H. M., Timmerman, M. A., Blok, L. J., Themmen, A. P. und de Jong, F. H. (1993) Activin is produced by rat Sertoli cells in vitro and can act as an autocrine regulator of Sertoli cell function *Endocrinology* 132, 975-982.

de Winter, J. P., Vanderstichele, H. M., Verhoeven, G., Timmerman, M. A., Wesseling, J. G. und de Jong, F. H. (1994) Peritubular myoid cells from immature rat testes secrete activin-A and express activin receptor type II in vitro *Endocrinology* 135, 759-767.

Dejucq, N., Lienard, M. O., Guillaume, E., Dorval, I. und Jegou, B. (1998) Expression of interferons-alpha and -gamma in testicular interstitial tissue and spermatogonia of the rat *Endocrinology* 139, 3081-3087.

Donnelly, S. C., Haslett, C., Reid, P. T., Grant, I. S., Wallace, W. A., Metz, C. N., Bruce, L. J. und Bucala, R. (1997) Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome *Nat Med* 3, 320-323.

Erhardt, P., Schremser, E. J. und Cooper, G. M. (1999) B-Raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrome c release from mitochondria by activating the MEK/Erk pathway *Mol Cell Biol* 19, 5308-5315.

Fährmann, M., Kaufhold, M., Pfeiffer, A. F. und Seidler, U. (2003) Protein kinase C-alpha attenuates cholinergically stimulated gastric acid secretion of rabbit parietal cells *Br J Pharmacol* 139, 545-554.

Fährmann, M., Kaufhold, M., Rieg, T. und Seidler, U. (2002) Different actions of protein kinase C isoforms alpha and epsilon on gastric acid secretion *Br J Pharmacol* 136, 938-946.

Fiers, W. (1991) Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level *FEBS Lett* 285, 199-212.

- Filippini, A., Riccioli, A., Padula, F., Lauretti, P., D'Alessio, A., De Cesaris, P., Gandini, L., Lenzi, A. und Ziparo, E. (2001) Control and impairment of immune privilege in the testis and in semen *Hum Reprod Update* 7, 444-449.
- Fingerle-Rowson, G., Petrenko, O., Metz, C. N., Forsthuber, T. G., Mitchell, R., Huss, R., Moll, U., Muller, W. und Bucala, R. (2003) The p53-dependent effects of macrophage migration inhibitory factor revealed by gene targeting *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9354-9359.
- Freeman, W. M., Walker, S. J. und Vrana, K. E. (1999) Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential *Biotechniques* 26, 112-122, 124-115.
- Fritz, I. B., Tung, P. S. und Ailenberg, M. (1993) Proteases and anti-proteases in the seminiferous tubule. In: *The Sertoli Cell* (Eds, Russell, L. D. und Griswold, M. D.) Clearwater. 217 - 235.
- Fukuzawa, J., Nishihira, J., Hasebe, N., Haneda, T., Osaki, J., Saito, T., Nomura, T., Fujino, T., Wakamiya, N. und Kikuchi, K. (2002) Contribution of macrophage migration inhibitory factor to extracellular signal-regulated kinase activation by oxidative stress in cardiomyocytes *J Biol Chem* 277, 24889-24895.
- Galdieri, M. und Ricci, G. (1998) Characterization of different cell populations isolated from rat testis peritubular cells *Differentiation* 63, 13-19.
- Gibson, U. E., Heid, C. A. und Williams, P. M. (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR *Genome Res* 6, 995-1001.
- Gnessi, L., Fabbri, A. und Spera, G. (1997) Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment *Endocr Rev* 18, 541-609.
- Grove, B. D., Pfeiffer, D. C., Allen, S. und Vogl, A. W. (1990) Immunofluorescence localization of vinculin in ectoplasmic ("junctional") specializations of rat Sertoli cells *Am J Anat* 188, 44-56.
- Hakovirta, H., Kaipia, A., Soder, O. und Parvinen, M. (1993) Effects of activin-A, inhibin-A, and transforming growth factor-beta 1 on stage-specific deoxyribonucleic acid synthesis during rat seminiferous epithelial cycle *Endocrinology* 133, 1664-1668.
- Hakovirta, H., Syed, V., Jegou, B. und Parvinen, M. (1995) Function of interleukin-6 as an inhibitor of meiotic DNA synthesis in the rat seminiferous epithelium *Mol Cell Endocrinol* 108, 193-198.
- Hales, D. B. (2002) Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis *J Reprod Immunol* 57, 3-18.
- Hales, D. B., Diemer, T. und Hales, K. H. (1999) Role of cytokines in testicular function *Endocrine* 10, 201-217.

- Harris, G. C. und Nicholson, H. D. (1998) Stage-related differences in rat seminiferous tubule contractility in vitro and their response to oxytocin *J Endocrinol* 157, 251-257.
- Head, J. R., Neaves, W. B. und Billingham, R. E. (1983) Immune privilege in the testis. I. Basic parameters of allograft survival *Transplantation* 36, 423-431.
- Hedger, M. P. (1997) Testicular leukocytes: what are they doing? *Rev Reprod* 2, 38-47.
- Hedger, M. P. (2002) Macrophages and the immune responsiveness of the testis *J Reprod Immunol* 57, 19-34.
- Hedger, M. P. und Meinhardt, A. (2003) Cytokines and the immune-testicular axis *J Reprod Immunol* 58, 1-26.
- Henne, C., Schwenk, F., Koch, N. und Moller, P. (1995) Surface expression of the invariant chain (CD74) is independent of concomitant expression of major histocompatibility complex class II antigens *Immunology* 84, 177-182.
- Hoeben, E., Briers, T., Vanderstichele, H., De Smet, W., Heyns, W., Deboel, L., Vanderhoydonck, F. und Verhoeven, G. (1995) Characterization of newly established testicular peritubular and prostatic stromal cell lines: potential use in the study of mesenchymal-epithelial interactions *Endocrinology* 136, 2862-2873.
- Hoeben, E., Van Damme, J., Put, W., Swinnen, J. V. und Verhoeven, G. (1996) Cytokines derived from activated human mononuclear cells markedly stimulate transferrin secretion by cultured Sertoli cells *Endocrinology* 137, 514-521.
- Hoshi, S., Nomoto, K., Kuromitsu, J., Tomari, S. und Nagata, M. (2002) High glucose induced VEGF expression via PKC and ERK in glomerular podocytes *Biochem Biophys Res Commun* 290, 177-184.
- Hudson, J. D., Shoaibi, M. A., Maestro, R., Carnero, A., Hannon, G. J. und Beach, D. H. (1999) A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity *J Exp Med* 190, 1375-1382.
- Hutson, J. C. (1993) Secretion of tumor necrosis factor alpha by testicular macrophages *J Reprod Immunol* 23, 63-72.
- Itoh, M., De Rooij, D. G., Jansen, A. und Drexhage, H. A. (1995) Phenotypical heterogeneity of testicular macrophages/dendritic cells in normal adult mice: an immunohistochemical study *J Reprod Immunol* 28, 217-232.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. und Shlomchik, M. (2002) Autoimmunität und Transplantationen. In: *Immunologie*, Vol. 5 (Hrsg, Janeway, C. A.) Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg/Berlin. 537-591.

- Johnson, G. L. und Lapadat, R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases *Science* 298, 1911-1912.
- Jutte, N. H., Jansen, R., Grootegoed, J. A., Rommerts, F. F. und van der Molen, H. J. (1983) FSH stimulation of the production of pyruvate and lactate by rat Sertoli cells may be involved in hormonal regulation of spermatogenesis *J Reprod Fertil* 68, 219-226.
- Juttner, S., Bernhagen, J., Metz, C. N., Rollinghoff, M., Bucala, R. und 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, 2383-2390.
- Kern, S., Robertson, S. A., Mau, V. J. und Maddocks, S. (1995) Cytokine secretion by macrophages in the rat testis *Biol Reprod* 53, 1407-1416.
- Khan, S., Teerds, K. und Dorrington, J. (1992) Growth factor requirements for DNA synthesis by Leydig cells from the immature rat *Biol Reprod* 46, 335-341.
- Khan, S. A. und Nieschlag, E. (1991) Interleukin-1 inhibits follitropin-induced aromatase activity in immature rat Sertoli cells in vitro *Mol Cell Endocrinol* 75, 1-7.
- Kleemann, R., Hausser, A., Geiger, G., Mischke, R., Burger-Kentischer, A., Flieger, O., Johannes, F. J., Roger, T., Calandra, T., Kapurniotu, A., Grell, M., Finkelmeier, D., Brunner, H. und Bernhagen, J. (2000) Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1 *Nature* 408, 211-216.
- Kleemann, R., Kapurniotu, A., Frank, R. W., Gessner, A., Mischke, R., Flieger, O., Juttner, S., Brunner, H. und Bernhagen, J. (1998a) Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase *J Mol Biol* 280, 85-102.
- Kleemann, R., Mischke, R., Kapurniotu, A., Brunner, H. und Bernhagen, J. (1998b) Specific reduction of insulin disulfides by macrophage migration inhibitory factor (MIF) with glutathione and dihydrolipoamide: potential role in cellular redox processes *FEBS Lett* 430, 191-196.
- Kolch, W. (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions *Biochem J* 351 Pt 2, 289-305.
- Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme, D. und Rapp, U. R. (1993) Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation *Nature* 364, 249-252.
- Konrad, L., Albrecht, M., Renneberg, H. und Aumuller, G. (2000) Transforming growth factor-beta2 mediates mesenchymal-epithelial interactions of testicular somatic cells *Endocrinology* 141, 3679-3686.

- Kyhse-Andersen, I. (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose *J Biochem Biophys Methods*, 203-209.
- Lacey, D., Sampey, A., Mitchell, R., Bucala, R., Santos, L., Leech, M. und Morand, E. (2003) Control of fibroblast-like synoviocyte proliferation by macrophage migration inhibitory factor *Arthritis Rheum* 48, 103-109.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* 227, 680-685.
- Lambeng, N., Willaime-Morawek, S., Mariani, J., Ruberg, M. und Brugg, B. (2003) Activation of mitogen-activated protein kinase pathways during the death of PC12 cells is dependent on the state of differentiation *Brain Res Mol Brain Res* 111, 52-60.
- Lan, H. Y., Bacher, M., Yang, N., Mu, W., Nikolic-Paterson, D. J., Metz, C., Meinhardt, A., Bucala, R. und Atkins, R. C. (1997) The pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in immunologically induced kidney disease in the rat *J Exp Med* 185, 1455-1465.
- Le Magueresse-Battistoni, B., Morera, A. M., Goddard, I. und Benahmed, M. (1995) Expression of mRNAs for transforming growth factor-beta receptors in the rat testis *Endocrinology* 136, 2788-2791.
- Lee, W., Mason, A. J., Schwall, R., Szonyi, E. und Mather, J. P. (1989) Secretion of activin by interstitial cells in the testis *Science* 243, 396-398.
- Leech, M., Metz, C., Santos, L., Peng, T., Holdsworth, S. R., Bucala, R. und Morand, E. F. (1998) Involvement of macrophage migration inhibitory factor in the evolution of rat adjuvant arthritis *Arthritis Rheum* 41, 910-917.
- Leng, L., Metz, C. N., Fang, Y., Xu, J., Donnelly, S., Baugh, J., Delohery, T., Chen, Y., Mitchell, R. A. und Bucala, R. (2003) MIF signal transduction initiated by binding to CD74 *J Exp Med* 197, 1467-1476.
- Lin, S. G., Yu, X. Y., Chen, Y. X., Huang, X. R., Metz, C., Bucala, R., Lau, C. P. und Lan, H. Y. (2000) De novo expression of macrophage migration inhibitory factor in atherogenesis in rabbits *Circ Res* 87, 1202-1208.
- Liu, J. P. (1996) Protein kinase C and its substrates *Mol Cell Endocrinol* 116, 1-29.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. und Darnell, J. E. (1999) Cell-to-Cell Signaling: Hormones and Receptors. In: *Molecular Cell Biology*, Vol. 1 (Hrsg, Lodish, H.) W.H. Freeman and Company, New York. 848-909.

- Lui, W. Y., Lee, W. M. und Cheng, C. Y. (2003) TGF-betas: their role in testicular function and Sertoli cell tight junction dynamics *Int J Androl* 26, 147-160.
- Maekawa, M., Kamimura, K. und Nagano, T. (1996) Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function *Arch Histol Cytol* 59, 1-13.
- Marais, R., Light, Y., Mason, C., Paterson, H., Olson, M. F. und Marshall, C. J. (1998) Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C *Science* 280, 109-112.
- Mather, J. P., Attie, K. M., Woodruff, T. K., Rice, G. C. und Phillips, D. M. (1990) Activin stimulates spermatogonial proliferation in germ-Sertoli cell cocultures from immature rat testis *Endocrinology* 127, 3206-3214.
- Matza, D., Wolstein, O., Dikstein, R. und Shachar, I. (2001) Invariant chain induces B cell maturation by activating a TAF(II)105-NF-kappaB-dependent transcription program *J Biol Chem* 276, 27203-27206.
- McCubrey, J. A., May, W. S., Duronio, V. und Mufson, A. (2000) Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction *Leukemia* 14, 9-21.
- McGinley, D. M., Posalaky, Z., Porvaznik, M. und Russell, L. (1979) Gap junctions between Sertoli and germ cells of rat seminiferous tubules *Tissue Cell* 11, 741-754.
- Meinhardt, A., Bacher, M., McFarlane, J. R., Metz, C. N., Seitz, J., Hedger, M. P., de Kretser, D. M. und Bucala, R. (1996) Macrophage migration inhibitory factor production by Leydig cells: evidence for a role in the regulation of testicular function *Endocrinology* 137, 5090-5095.
- Meinhardt, A., Bacher, M., O'Bryan, M. K., McFarlane, J. R., Mallidis, C., Lehmann, C., Metz, C. N., de Kretser, D. M., Bucala, R. und Hedger, M. P. (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), 1337-1344.
- Meinhardt, A., Bacher, M., Wennemuth, G., Eickhoff, R. und Hedger, M. (2000) Macrophage migration inhibitory factor (MIF) as a paracrine mediator in the interaction of testicular somatic cells *Andrologia* 32, 46-48.
- Meyer-Siegler, K. und Hudson, P. B. (1996) Enhanced expression of macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma metastases *Urology* 48, 448-452.
- Mikulowska, A., Metz, C. N., Bucala, R. und Holmdahl, R. (1997) Macrophage migration inhibitory factor is involved in the pathogenesis of collagen type II-induced arthritis in mice *J Immunol* 158, 5514-5517.

- Mitchell, R. A., Liao, H., Chesney, J., Fingerle-Rowson, G., Baugh, J., David, J. und 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, 345-350.
- Mitchell, R. A., Metz, C. N., Peng, T. und 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, 18100-18106.
- Mitic, L. L. und Anderson, J. M. (1998) Molecular architecture of tight junctions *Annu Rev Physiol* 60, 121-142.
- Moore, C. und Hutson, J. C. (1994) Physiological relevance of tumor necrosis factor in mediating macrophage-Leydig cell interactions *Endocrinology* 134, 63-69.
- Mullaney, B. P. und Skinner, M. K. (1993) Transforming growth factor-beta (beta 1, beta 2, and beta 3) gene expression and action during pubertal development of the seminiferous tubule: potential role at the onset of spermatogenesis *Mol Endocrinol* 7, 67-76.
- Naujokas, M. F., Morin, M., Anderson, M. S., Peterson, M. und Miller, J. (1993) The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44 *Cell* 74, 257-268.
- Nehar, D., Mauduit, C., Boussouar, F. und Benahmed, M. (1998) Interleukin 1alpha stimulates lactate dehydrogenase A expression and lactate production in cultured porcine sertoli cells *Biol Reprod* 59, 1425-1432.
- Niemi, M., Sharpe, R. M. und Brown, W. R. (1986) Macrophages in the interstitial tissue of the rat testis *Cell Tissue Res* 243, 337-344.
- Nishihira, J. (1998) Novel pathophysiological aspects of macrophage migration inhibitory factor (review) *Int J Mol Med* 2, 17-28.
- Nishino, T., Bernhagen, J., Shiiki, H., Calandra, T., Dohi, K. und 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, 781-788.
- Nistal, M., Santamaria, L. und Paniagua, R. (1984) Mast cells in the human testis and epididymis from birth to adulthood *Acta Anat (Basel)* 119, 155-160.
- Ogawa, H., Nishihira, J., Sato, Y., Kondo, M., Takahashi, N., Oshima, T. und Todo, S. (2000) An antibody for macrophage migration inhibitory factor suppresses tumour growth and inhibits tumour-associated angiogenesis *Cytokine* 12, 309-314.

- Okuda, Y., Bardin, C. W., Hodgskin, L. R. und Morris, P. L. (1995) Interleukins-1 alpha and -1 beta regulate interleukin-6 expression in Leydig and Sertoli cells *Recent Prog Horm Res* 50, 367-372.
- Onodera, S., Kaneda, K., Mizue, Y., Koyama, Y., Fujinaga, M. und Nishihira, J. (2000) Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis *J Biol Chem* 275, 444-450.
- Parvinen, M., Soder, O., Mali, P., Froysa, B. und Ritzen, E. M. (1991) In vitro stimulation of stage-specific deoxyribonucleic acid synthesis in rat seminiferous tubule segments by interleukin-1 alpha *Endocrinology* 129, 1614-1620.
- Paul, W. E. und Seder, R. A. (1994) Lymphocyte responses and cytokines *Cell* 76, 241-251.
- Pelletier, R. M. (1986) Cyclic formation and decay of the blood-testis barrier in the mink (*Mustela vison*), a seasonal breeder *Am J Anat* 175, 91-117.
- Pentikainen, V., Erkkila, K., Suomalainen, L., Ojala, M., Pentikainen, M. O., Parvinen, M. und Dunkel, L. (2001) TNFalpha down-regulates the Fas ligand and inhibits germ cell apoptosis in the human testis *J Clin Endocrinol Metab* 86, 4480-4488.
- Peyssonnaud, C. und Eychene, A. (2001) The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation *Biol Cell* 93, 53-62.
- Phillips, A. O., Topley, N., Morrisey, K., Williams, J. D. und Steadman, R. (1997) Basic fibroblast growth factor stimulates the release of preformed transforming growth factor beta 1 from human proximal tubular cells in the absence of de novo gene transcription or mRNA translation *Lab Invest* 76, 591-600.
- Pöllänen, P., von Euler, M., Jahnukainen, K., Saari, T., Parvinen, M., Sainio-Pollanen, S. und Soder, O. (1993) Role of transforming growth factor beta in testicular immunosuppression *J Reprod Immunol* 24, 123-137.
- Pyle, M. E., Korbonits, M., Gueorguiev, M., Jordan, S., Kola, B., Morris, D. G., Meinhardt, A., Powell, M. P., Claret, F. X., Zhang, Q., Metz, C., Bucala, R. und Grossman, A. B. (2003) Macrophage migration inhibitory factor expression is increased in pituitary adenoma cell nuclei *J Endocrinol* 176, 103-110.
- Rábano, M., Pena, A., Brizuela, L., Marino, A., Macarulla, J. M., Trueba, M. und Gomez-Munoz, A. (2003) Sphingosine-1-phosphate stimulates cortisol secretion *FEBS Lett* 535, 101-105.
- Ricci, G., Catizone, A., Scarcella, M. F. und Galdieri, M. (1999) Vitamin A modulation of basement membrane production by purified testicular myoid cells *Exp Cell Res* 249, 102-108.
- Roberts, A. B. (1998) Molecular and cell biology of TGF-beta *Miner Electrolyte Metab* 24, 111-119.

- Rodriguez-Sosa, M., Rosas, L. E., David, J. R., Bojalil, R., Satoskar, A. R. und Terrazas, L. I. (2003) Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps* *Infect Immun* 71, 1247-1254.
- Roger, T., David, J., Glauser, M. P. und Calandra, T. (2001) MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4 *Nature* 414, 920-924.
- Rosengren, E., Bucala, R., Aman, P., Jacobsson, L., Odh, G., Metz, C. N. und Rorsman, H. (1996) The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction *Mol Med* 2, 143-149.
- Rossi, A. G., Haslett, C., Hirani, N., Greening, A. P., Rahman, I., Metz, C. N., Bucala, R. und Donnelly, S. C. (1998) Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in asthma *J Clin Invest* 101, 2869-2874.
- Rossi, F., Ferraresi, A., Romagni, P., Silvestroni, L. und Santiemma, V. (2002) Angiotensin II stimulates contraction and growth of testicular peritubular myoid cells in vitro *Endocrinology* 143, 3096-3104.
- Russell, L. D. (1979) Further observations on tubulobulbar complexes formed by late spermatids and Sertoli cells in the rat testis *Anat Rec* 194, 213-232.
- Sakuma, H., Yamamoto, M., Okumura, M., Kojima, T., Maruyama, T. und Yasuda, K. (2002) High glucose inhibits apoptosis in human coronary artery smooth muscle cells by increasing bcl-xL and bfl-1/A1 *Am J Physiol Cell Physiol* 283, C422-428.
- Santiemma, V., Beligotti, F., Magnanti, M., Palleschi, S., Silvestroni, L. und Fabbrini, A. (1996) Endothelin-1 stimulates deoxyribonucleic acid synthesis and contraction in testicular peritubular myoid cells *Biol Reprod* 54, 583-590.
- Santos, L., Hall, P., Metz, C., Bucala, R. und Morand, E. F. (2001) Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in murine antigen-induced arthritis: interaction with glucocorticoids *Clin Exp Immunol* 123, 309-314.
- Schagger, H. und von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa *Anal Biochem* 166, 368-379.
- Schlatt, S., Meinhardt, A. und Nieschlag, E. (1997) Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function *Eur J Endocrinol* 137, 107-117.
- Schlatt, S., Weinbauer, G. F., Arslan, M. und Nieschlag, E. (1993) Appearance of alpha-smooth muscle actin in peritubular cells of monkey testes is induced by androgens, modulated by follicle-stimulating hormone, and maintained after hormonal withdrawal *J Androl* 14, 340-350.

- Schnorr, B. (1996) *Embryologie der Haustiere: ein Kurzlehrbuch*, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- Seitz, J. und Meinhardt, A. (2002) Fortpflanzung. In: *Lehrbuch Vorklinik*, Vol. 3 (Hrsg, Schmidt R, U. K.) Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, Köln. 503-532.
- Setchell, B., Maddocks, S. und DE, B. (1994) Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. In: *The Physiology of Reproduction* (Eds, Knobil, E. und Neill, J.) Raven Press.
- Shimizu, T., Abe, R., Nakamura, H., Ohkawara, A., Suzuki, M. und Nishihira, J. (1999) High expression of macrophage migration inhibitory factor in human melanoma cells and its role in tumor cell growth and angiogenesis *Biochem Biophys Res Commun* 264, 751-758.
- Skinner, M. K. (1991) Cell-cell interactions in the testis *Endocr Rev* 12, 45-77.
- Skinner, M. K., McLachlan, R. I. und Bremner, W. J. (1989) Stimulation of Sertoli cell inhibin secretion by the testicular paracrine factor PModS *Mol Cell Endocrinol* 66, 239-249.
- Skinner, M. K. und Moses, H. L. (1989) Transforming growth factor beta gene expression and action in the seminiferous tubule: peritubular cell-Sertoli cell interactions *Mol Endocrinol* 3, 625-634.
- Specht, H., Peterziel, H., Bajohrs, M., Gerdes, H. H., Krieglstein, K. und Unsicker, K. (2003) Transforming growth factor beta2 is released from PC12 cells via the regulated pathway of secretion *Mol Cell Neurosci* 22, 75-86.
- Stephan, J. P., Syed, V. und Jegou, B. (1997) Regulation of Sertoli cell IL-1 and IL-6 production in vitro *Mol Cell Endocrinol* 134, 109-118.
- Suarez-Pinzon, W., Korbitt, G. S., Power, R., Hooton, J., Rajotte, R. V. und Rabinovitch, A. (2000) Testicular sertoli cells protect islet beta-cells from autoimmune destruction in NOD mice by a transforming growth factor-beta1-dependent mechanism *Diabetes* 49, 1810-1818.
- Subramanya, H. S., Roper, D. I., Dauter, Z., Dodson, E. J., Davies, G. J., Wilson, K. S. und Wigley, D. B. (1996) Enzymatic ketonization of 2-hydroxymuconate: specificity and mechanism investigated by the crystal structures of two isomerases *Biochemistry* 35, 792-802.
- Sun, H. W., Bernhagen, J., Bucala, R. und Lolis, E. (1996) Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5191-5196.
- Svechnikov, K. V., Sultana, T. und Soder, O. (2001) Age-dependent stimulation of Leydig cell steroidogenesis by interleukin-1 isoforms *Mol Cell Endocrinol* 182, 193-201.

- Swope, M., Sun, H. W., Blake, P. R. und Lolis, E. (1998) Direct link between cytokine activity and a catalytic site for macrophage migration inhibitory factor *Embo J* 17, 3534-3541.
- Sylvester, S. R. und Griswold, M. D. (1984) Localization of transferrin and transferrin receptors in rat testes *Biol Reprod* 31, 195-203.
- Takahashi, N., Nishihira, J., Sato, Y., Kondo, M., Ogawa, H., Ohshima, T., Une, Y. und Todo, S. (1998) Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth *Mol Med* 4, 707-714.
- Tan, T. H., Edgerton, S. A., Kumari, R., McAlister, M. S., Roe, S. M., Nagl, S., Pearl, L. H., Selkirk, M. E., Bianco, A. E., Totty, N. F., Engwerda, C., Gray, C. A., Meyer, D. J. und Rowe, S. M. (2001) Macrophage migration inhibitory factor of the parasitic nematode *Trichinella spiralis* *Biochem J* 357, 373-383.
- Tepavcevic, V., Hodges, R. R., Zoukhri, D. und Dartt, D. A. (2003) Signal transduction pathways used by EGF to stimulate protein secretion in rat lacrimal gland *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 1075-1081.
- Tompkins, A. B., Hutchinson, P., de Kretser, D. M. und Hedger, M. P. (1998) Characterization of lymphocytes in the adult rat testis by flow cytometry: effects of activin and transforming growth factor beta on lymphocyte subsets in vitro *Biol Reprod* 58, 943-951.
- Tripiciano, A., Peluso, C., Morena, A. R., Palombi, F., Stefanini, M., Ziparo, E., Yanagisawa, M. und Filippini, A. (1999) Cyclic expression of endothelin-converting enzyme-1 mediates the functional regulation of seminiferous tubule contraction *J Cell Biol* 145, 1027-1038.
- Tung, P. S. und Fritz, I. B. (1991) Transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor synergistically stimulate contraction by testicular peritubular cells in culture in serum-free medium *J Cell Physiol* 146, 386-393.
- Tung, P. S. und Fritz, I. B. (1994) Role of laminin in the morphogenetic cascade during coculture of Sertoli cells with peritubular cells *J Cell Physiol* 161, 77-88.
- Virtanen, I., Kallajoki, M., Narvanen, O., Paranko, J., Thornell, L. E., Miettinen, M. und Lehto, V. P. (1986) Peritubular myoid cells of human and rat testis are smooth muscle cells that contain desmin-type intermediate filaments *Anat Rec* 215, 10-20.
- Waeber, G., Thompson, N., Chautard, T., Steinmann, M., Nicod, P., Pralong, F. P., Calandra, T. und Gaillard, R. C. (1998) Transcriptional activation of the macrophage migration-inhibitory factor gene by the corticotropin-releasing factor is mediated by the cyclic adenosine 3',5'- monophosphate responsive element-binding protein CREB in pituitary cells *Mol Endocrinol* 12, 698-705.
- Wang, X., Martindale, J. L., Liu, Y. und Holbrook, N. J. (1998) The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival *Biochem J* 333 (Pt 2), 291-300.

- Watanabe, H., Shimizu, T., Nishihira, J., Abe, R., Nakayama, T., Taniguchi, M., Sabe, H., Ishibashi, T. und Shimizu, H. (2004) Ultraviolet A-induced Production of Matrix Metalloproteinase-1 Is Mediated by Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Human Dermal Fibroblasts *J Biol Chem* 279, 1676-1683.
- Weinbauer, G., Gromoll, J., Simoni, M. und Nieschlag, E. (1996) Physiologie der Hodenfunktion. In: *Andrologie-Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*, Vol. 1 (Eds, Nieschlag, E. und Behre, H.) Springer Verlag. 29-59.
- Weiser, W. Y., Temple, P. A., Witek-Giannotti, J. S., Remold, H. G., Clark, S. C. und David, J. R. (1989) Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7522-7526.
- Weller, M., Constam, D. B., Malipiero, U. und Fontana, A. (1994) Transforming growth factor-beta 2 induces apoptosis of murine T cell clones without down-regulating bcl-2 mRNA expression *Eur J Immunol* 24, 1293-1300.
- Wennemuth, G., Aumuller, G., Bacher, M. und Meinhardt, A. (2000) Macrophage migration inhibitory factor-induced Ca(2+) response in rat testicular peritubular cells *Biol Reprod* 62, 1632-1639.
- Wiegand, M., Gränz, S., Seitz, J. und Meinhardt, A. (2001) In *13. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Andrologie (DGA)*(Ed, (DGA), D. G. f. A. e. V.) Berlin.
- Wistow, G. J., Shaughnessy, M. P., Lee, D. C., Hodin, J. und Zelenka, P. S. (1993) A macrophage migration inhibitory factor is expressed in the differentiating cells of the eye lens *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1272-1275.
- Wraight, C. J., van Endert, P., Moller, P., Lipp, J., Ling, N. R., MacLennan, I. C., Koch, N. und Moldenhauer, G. (1990) Human major histocompatibility complex class II invariant chain is expressed on the cell surface *J Biol Chem* 265, 5787-5792.
- Xiong, Y. und Hales, D. B. (1993) The role of tumor necrosis factor-alpha in the regulation of mouse Leydig cell steroidogenesis *Endocrinology* 132, 2438-2444.
- Yule, T. D., Montoya, G. D., Russell, L. D., Williams, T. M. und Tung, K. S. (1988) Autoantigenic germ cells exist outside the blood testis barrier *J Immunol* 141, 1161-1167.
- Zhang, H. H., Kumar, S., Barnett, A. H. und Eggo, M. C. (2000) Tumour necrosis factor-alpha exerts dual effects on human adipose leptin synthesis and release *Mol Cell Endocrinol* 159, 79-88.
- Ziparo, E., Geremia, R., Russo, M. A. und Stefanini, M. (1980) Surface interaction in vitro between Sertoli cells and germ cells at different stages of spermatogenesis *Am J Anat* 159, 385-388.

8. Anhang

8.1 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. A. Meinhardt für die Überlassung des interessanten Themas und seine ständige Unterstützung sowie die jederzeit gegebene Bereitschaft auch die kleinste Frage zu beantworten. Weiterhin sei ihm für die Einführung in das gewissenhafte und ordentliche wissenschaftliche Arbeiten gedankt sowie für die motivierenden Ratschläge während immer wiederkehrender „Durststrecken“.

Herrn Prof. Dr. R. Leiser gilt Dank für die freundliche, bedingungslose Übernahme der Betreuung am Fachbereich Tiermedizin und den damit verbundenen Verpflichtungen.

Desweiteren möchte ich Prof. Dr. J. Seitz und Prof. Dr. G. Aumüller aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg danken, die mich bis zur Fertigstellung des Giessener Labors in ihrem Institut an meiner Dissertation arbeiten ließen.

Ein besonderer Dank ergeht an die Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung meines Dissertationsvorhabens, die es mir ermöglichte, die vorliegende Studie in weitgehender finanzieller Unabhängigkeit durchzuführen und natürlich dem Graduiertenkolleg „Zell-Zell-Interaktion im Reproduktionsgeschehen“. Besonders zu nennen sind hier die Koordinatorin des Graduiertenkollegs Frau PD. Dr. E. Hinsch und der Sprecher des Graduiertenkollegs Prof. Dr. K.D. Hinsch in ihrem ständigen Bemühen die wissenschaftliche Arbeit mit wertvollen Tipps und Ratschlägen voranzutreiben. Zudem möchte ich es nicht versäumen, die Graduierten zu nennen, in deren Gemeinschaft ich mich mit meinen Problemen nie allein auf weiter Flur gefühlt habe.

Zudem gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Meinhardt, Prof. Dr. Seitz und Prof. Dr. Aumüller Dank für die gute Zusammenarbeit und ihre Bereitschaft bei der Lösung von Problemen behilflich zu sein.

Vielen Dank an Miriam Rhodewald, die meine allerersten Schritte im Labor meistern half und mich (zusammen mit Andrea Cordes) in die Kultivierung von Peritubulärzellen einwies. Ein Dankeschön auch den guten Seelen des Labors Anne Henkeler, Claudia Keppler und an Tamara Henke, die die beste Quiche backt. Ganz

besonderer Dank gilt Eva Schneider, die mir in den letzten Monaten eine große Hilfe im Labor war und mit mir die Zellen und Ratten verwöhnte und natürlich Suada Fröhlich, der Lustigen, ohne die der Laboralltag wesentlich trister gewesen wäre, Dank den beiden auch für die schönen Pausen auf der Wiese und dem allfreitäglichen Frühstücksschlemmen.

Auch allen Mitstreitern um die Doktorwürde, mit denen ich manch lustige Stunde, oft auch zu vorangeschrittener Zeit, verbracht habe, möchte ich danken: Radu Iosub, dem „Hahn im Laborkorb“, Ana-Maria Dobre, der unermüdlichen Arbeiterin, Katrin Blumbach, mit der ich so manche Tafel Schokolade verdrückt habe, Kersten Berndt, mit der ich einige Kekse entsorgte, Anja Lewen und Simone Gränz, den Orchitisexperten und Monika Fiak, der Meisterin der 2D-Gele. Dr. Jörg Klug sei Dank für die seinem Namen alle Ehre machenden Tipps im Umgang mit Word, Excel aber auch bei der Planung von Experimenten.

Ganz besonderer Dank gilt Dr. Regina Eickhoff, welche sich der äußerst schwierigen Aufgabe angenommen hat, die erste Korrektur meiner Doktorarbeit zu übernehmen und diese zeitraubende Arbeit trotz eigener Arbeit in ihrer Freizeit gewissenhaft ausführte!

Ich möchte auch allen fleißigen Helfern danken, die mir bei der Ausmerzungen der Rechtschreib- und Grammatikfehler geholfen haben: Susanne Huchzermeyer, die mir nicht nur während der Erstellung der Doktorarbeit, sondern auch während des Studiums als Freundin zur Seite stand, meinem Freund und baldigen Ehegatten Jörg Schouler, der trotz aller Höhen und Tiefen noch nicht die Flucht ergriffen hat.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, Manfred und Elisabeth Müller, die mich immer in der Durchführung meiner beruflichen Wünsche bestärkt haben und ohne deren finanzielle und moralische Unterstützung ich meine beruflichen Wünsche nicht hätte realisieren können.

8.2 Ehrenwörtliche Erklärung

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

Giessen, den 29. 01. 2004

Ruth Müller