

**Etablierung einer *ex vivo* Organkultur zur Untersuchung der regionenspezifischen Immunantwort des Nebenhodens**

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

vorgelegt von Bohnert, Daniel  
aus Offenburg

Gießen 2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Institut für Anatomie und Zellbiologie

Gutachter: Prof Dr. Andreas Meinhardt  
Gutachter: Prof. Dr. Adrian Pilatz

Tag der Disputation: 27.01.2025

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort/Datum

---

Unterschrift

# Inhaltsverzeichnis

<b>I Zusammenfassung (Summary)</b> .....	<b>1</b>
<b>II. Einleitung</b> .....	<b>3</b>
1. Männliche Infertilität.....	3
2. Das männliche Reproduktionssystem.....	3
3. Struktur der Epididymis .....	4
4. Histologie der Epididymis .....	4
5. Angeborene und adaptive Immunität .....	8
6. Regionale Verteilung der Immunzellen im Nebenhoden .....	10
7. Regionspezifische Expression immunregulatorischer Faktoren .....	12
8. Klinische und mikrobiologische Aspekte der Epididymitis .....	13
9. Zielsetzung dieser Arbeit .....	14
<b>III. Materialien</b> .....	<b>16</b>
1. Chemikalien .....	16
2. Zellkultur: Medien und Antibiotika.....	17
3. Zellkultur: Reagenzien.....	17
4. Versuchstiere .....	18
5. PCR und qRT-PCR .....	18
6. Geräte und Software .....	19
7. Primer .....	20
8. Lösungen und Puffer .....	22
<b>IV. Methoden</b> .....	<b>24</b>
1. Umgang mit den Versuchstieren .....	24
2. Masson-Goldner-Trichromfärbung	
2.1. Organ Fixierung und Anfertigung von Paraffinschnitten.....	24
2.2. Masson-Goldner-Trichromfärbung der Paraffinschnitte .....	24
3. RT-qPCR.....	26
3.1. Inkubation epididymaler Regionen mit LPS, UPEC, NPEC.....	26

3.2. Homogenisierung .....	26
3.3. RNA-Isolation .....	26
3.4. Messung der RNA-Konzentration und –Reinheit .....	27
3.5. Polymerase-Kettenreaktion .....	28
3.6. Agarose-Gelelektrophorese.....	30
3.7. Reverse Transkription .....	31
3.8. Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) .....	33
3.9. Berechnung der relativen Expression von Zielgenen.....	36
3.10. Durchführung einer Verdünnungsreihe zur Kalkulation der Primereffizienz .....	36
4. Proteinanalyse mit dem LEGENDplex Mouse Inflammation Panel .....	39
4.1. Isolierung der Proteine .....	39
4.2. Messung der Proteinkonzentration .....	39
4.3. Proteindetektion mithilfe der LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel Detection Antibodies .....	40
5. Detektion der intrazellulär aufgenommenen UPEC-Bakterien.....	41
5.1. Herstellung einer Agar-Agar Platte .....	41
5.2. Isolation, Inkubation und Homogenisierung des Gewebes sowie Auszählung der gewachsenen Kolonien.....	42
6. Statistische Auswertung .....	42
<b>V. Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
1. Immunregulation der Epididymis .....	44
1.1 Detektion der Basalexpression von Zytokinen.....	44
1.2 Detektion der Basalexpression ausgewählter immunmodulierender Gene .....	44
2. Ergebnisse der Zytokinexpression/ -sekretion .....	47
2.1 Empirische Ermittlung der geeigneten LPS-Dosis für nachfolgende Experimente.....	47
2.2 Relative Zytokinexpressionen nach einer <i>ex vivo</i> Inkubation mit LPS.	47
2.3 Absolute Zytokinkonzentrationen nach <i>ex vivo</i> Inkubation mit LPS ....	48
2.4 Relative Zytokinexpression nach einer <i>ex vivo</i> Inkubation mit UPEC und NPEC.....	49
3. Expression immunmodulierender Faktoren .....	58
3.1 Relative Expression immunmodulierender Faktoren nach einer <i>ex vivo</i> Inkubation mit LPS.....	58

3.2 Relative Expression immunmodulierender Faktoren nach einer <i>ex vivo</i> Inkubation mit UPEC und NPEC .....	59
4. Anteil intrazellulärer UPEC im Gewebe .....	64
<b>VI. Diskussion.....</b>	<b>66</b>
1. Immunregulation der Epididymis .....	66
2. Inflammation der Epididymis.....	68
3. Klinische Auswirkungen der Epididymitis.....	70
<b>VII Literaturverzeichnis .....</b>	<b>73</b>
<b>VIII. Anhang .....</b>	<b>84</b>
1. Abkürzungsverzeichnis.....	84
2. Abbildungsverzeichnis.....	87
3. Tabellenverzeichnis.....	89
4. Publikationsverzeichnis .....	89
<b>IX. Danksagung .....</b>	<b>90</b>

## I Zusammenfassung

Entzündungen des Nebenhodens gehören zu den häufigen Konsultationsgründen der Urologie und stellen weltweit eine der führenden Ursachen für männliche Infertilität dar. Der Nebenhoden bildet einen Teil der abführenden Samenwege, in dem die Spermien durch intensive Interaktion mit dessen Sekretionsprodukten ihre Motilität erlangen. Darüber hinaus kommt dem Nebenhoden eine duale Rolle zur Wahrung des immunologischen Gleichgewichts zu. Gegenüber aus dem immunprivilegierten Testis stammenden immunogenen Spermatozoen muss eine Immuntoleranz gewährleistet werden, während in distalen Regionen über die Urethra aufsteigende Keime effektiv bekämpft werden müssen.

Bisherige *in vivo* Modelle demonstrieren eine fundamental divergierende Immunreaktion der verschiedenen Regionen und zeigen histologisch massive Gewebeschäden in der Cauda, während der Caput kaum betroffen ist. Die Frage, ob diese auf der unterschiedlichen Expositionsdauer mit Erregern beruhen oder ob das jeweilige Gewebe abweichend auf Infektionen reagiert, wurde in bisherigen Studien nicht ausreichend beantwortet. Zunächst wurde mithilfe eines *ex vivo* Modells empirisch die geeignete LPS-Dosis zur Inkubation der separierten Organregionen für nachfolgende qPCR Experimente ermittelt, wobei mit einer Gesamtdosis von 50 ng LPS gute Ergebnisse erzielt wurden. In der Cauda wurde die mRNA inflammatorischer Zytokine (*Tnf*, *Il1a*, *Il6* und *Il10*) erhöht exprimiert, eine Beobachtung die mit erhöhten Proteinkonzentrationen inflammatorischer Zytokine (TNF, IL1A, IL6, IL10, IFNB und MCP1) einherging. Neben der Inkubation mit LPS wurden die zuvor mechanisch separierten Organregionen auch mit UPEC/NPEC inkubiert. Während NPEC eine Immunantwort auslösten, resultierten UPEC-Infektionen in einer partiellen Immunsuppression. In einem weiteren Experiment wurde der Anteil intrazellulärer UPEC nach simultaner Inkubation der separierten Organregionen mit UPEC und Gentamicin untersucht, wobei in proximalen Regionen eine größere Menge CFU detektiert wurde.

In Zusammenschau der einzelnen Experimente wurde bestätigt, dass die Immunreaktionen in den verschiedenen Regionen stark voneinander divergieren. Da *ex vivo*, im Gegensatz zu *in vivo*, eine exakt gleiche Expositionsdauer gegenüber Erregern erzeugt werden kann, wird postuliert, dass die Unterschiede in der Immunantwort aus den großen Differenzen der im Verlauf des Ganges strategisch gruppierten Immunzellen resultieren.

## Summary

Acute Inflammation of the epididymis is one of the major consulting reasons in urology and, in a global perspective, one of the leading causes of male infertility, affecting men in all ages. Spermatozoa, originating from the immune-privileged testis, pass through the epididymis and achieve motility through intensive interaction with its secretion products. Due to these circumstances, the epididymis plays a dual role in maintaining an immunological balance. On one hand, immunological tolerance must be ensured towards immunogenic spermatozoa migrating through the male reproductive tract. At the same time, immune responses against microorganisms ascending from the urethra must be stimulated effectively.

Previous *in vivo* models show a clearly different immune response between the epididymal regions. While the caput remains mostly unaffected, inflammation in the cauda leads to high cytokine levels, fibrosis und duct obstruction.

Yet whether these observations result from the different duration of exposure to pathogens or whether the tissues react differently remains elusive.

As a first approach, the dose of 50 ng LPS was established for further *ex vivo* qPCR experiments. The next step was to quantify mRNA expression and protein levels in LPS-infected organ pieces. In the cauda, the mRNA of inflammatory cytokines (*Tnf*, *Il1a*, *Il6*, *Il10*) and the protein concentration of inflammatory cytokines (TNF, IL1A, IL6, IL10, IFNB, MCP1) were significantly increased. In addition to LPS, the organ regions were also incubated with UPEC/NPEC. While NPEC lead to a massive pro-inflammatory immune response, UPEC infections resulted in a partial immunosuppression. In a further experiment the separated organ regions were simultaneously incubated with UPEC and gentamicin to differentiate the intracellular UPEC load. Hereby, higher numbers of CFU were detected in proximal regions.

This study clearly confirmed, that the immune responses in the different regions diverge distinctly from each other. Via *ex vivo* organ culture model simultaneous inflammatory stimulation could be established. Overall, these data indicate the existence of distinct well-organized immune cell populations along the epididymal duct with contrasting expression profiles.



## II. Einleitung

### II. Einleitung

#### 1. Männliche Infertilität

Infertilität wird klinisch als eine Störung des reproduktiven Systems definiert, welche sich durch das fehlende Eintreten einer Schwangerschaft nach mindestens 12 Monaten ungeschützten Geschlechtsverkehrs auszeichnet (Zegers-Hochschild et al., 2009). Global bestehen deutliche Unterschiede in Prävalenz und Kausalität (Agarwal et al. 2015). In Industrienationen wie Deutschland beträgt die Prävalenz bei Paaren 10-15 % (Evers 2002). Aktuelle Daten beschreiben, dass in ca. 20-30 % der Fälle die Infertilität bei Paaren alleinig durch den Mann verursacht werde. In etwa 50 % der Fälle von Infertilität wird mindestens eine teilweise Ursächlichkeit beim Mann beschrieben (Agarwal et al. 2015).

Neben genetischen Ursachen, wie beispielsweise einer Mutation im CFTR-Gen (assoziiert mit Mukoviszidose/ zystischer Fibrose) oder dem Klinefelter Syndrom (Chromosomenanomalie 47, XXY) (Elia et al. 2014; van Saen et al. 2018), kann auch der Lebensstil Einfluss auf die Spermienqualität haben. Hoher Alkohol- oder Drogenkonsum sowie Übergewicht haben einen negativen Einfluss auf die Samenqualität (Niederberger 2012; Gundersen et al. 2015; Ricci et al. 2017; Schuppe und Köhn 2022) Des Weiteren stellen Infektionen im männlichen Reproduktionstrakt, insbesondere im Nebenhoden, und damit verbundene inflammatorische Prozesse im Gewebe eine häufige Ursache persistierender Sub- oder Infertilität dar. Durch die Urethra aufsteigende Keime, u.a. *Escherichia coli*, stellen dabei eine besonders häufige Variante dar. Nach Infektion mit sexuell übertragbaren oder anderen uropathogenen Keimen persistieren bei bis zu 80 % der Männer veränderte Samenparameter in den ersten drei Monaten. Bei bis zu 50 % der Männer kommt es zu dauerhaften negativen Veränderungen (Rusz et al. 2012).

#### 2. Das männliche Reproduktionssystem

Der männliche Reproduktionstrakt besteht aus äußeren (Penis mit Urethra, Scrotum mit Hodenhüllen) und inneren Geschlechtsorganen (Hoden [*Testis*], Nebenhoden [*Epididymis*], Samenleiter [*Ductus deferens*] und akzessorischen Geschlechtsdrüsen [*Prostata*, *Vesicula seminalis*, *Gll. bulbourethrales*]) (Pask 2016).

Die Spermienproduktion (Spermatogenese) findet im intraskrotal gelegenen Hoden statt. In den Hodenkanälchen (*Tubuli seminiferi contorti*) befinden sich Keimzellen, die sich im Keimepithel zu Spermien differenzieren und anschließend über das *Rete testis* und *Ductuli efferentes* in den Nebenhoden abgegeben werden (Neto et al. 2021). Der Nebenhoden liegt dem Hoden am hinteren Rand und oberen Pol (dorsomedial) an.

## II. Einleitung

Neben der vollständigen Ausreifung noch immotiler Spermatozoen durch biochemische Prozesse dient der Nebenhoden als Speicherort der Spermien. Im Rahmen der Ejakulation werden die Spermien pulsatil in den Samenleiter weitergegeben. Während ihrer Passage durch den *Ductus deferens* und die *Urethra* vermischen sich die Spermien mit den Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen (Bläschendrüse, *Prostata* sowie Bulbourethraldrüse). Angetrieben durch Kontraktionen der glatten Muskulatur passieren die Spermien den *Ductus deferens* sowie die Samenleiterampulle und verlassen den Penis über den *Meatus urethrae externus* (Clavert et al. 1990; Older und Watson 1996; Elfgen et al. 2018). Die verschiedenen sekretorischen Komponenten der Geschlechtsdrüsen wirken synergistisch und ermöglichen die erfolgreiche Reifung der Spermien sowie Fertilisation der weiblichen Eizelle (Okamura et al. 1986). Besteht eine Einschränkung der Nebenhodenpassage, resultiert eine reduzierte Fruchtbarkeit des Mannes (Kirchhoff 1995).

### 3. Struktur der Epididymis

Die paarig angelegten Nebenhoden (*Epididymides*) stellen ein segmentiertes längliches Organ dar, welches aus einem einzelnen stark gewundenen Gang (*Ductus epididymidis*) besteht und sich strukturell in die Regionen Kopf (*Caput epididymidis*), Körper (*Corpus epididymidis*) und Schwanz (*Cauda epididymidis*) einteilen lässt. Aus dem *Rete testis* bilden sich die *Ductuli efferentes testis*, die in einen einzelnen Nebenhodengang konfluieren. Bei Nagetieren münden die *Ductuli efferentes* in das initiale Segment (IS), den proximalen Teil des Nebenhodenkopfes. Dieses unterscheidet sich morphologisch deutlich vom restlichen Nebenhodengewebe. Beim Menschen gibt es diese deutliche Gliederung des Caput nicht, da die *Ductuli efferentes* an mehreren Stellen in das Caput münden. Durch bindegewebige Septen wird das Parenchym in mehrere Segmente unterteilt (10 Segmente in Mäusen, 19 Segmente in Ratten). Beim Menschen sind diese Septen zwar vorhanden, erlauben jedoch keine klare Gliederung (Sullivan et al. 2019).

### 4. Histologie der Epididymis

Die Nebenhodenregionen weisen deutliche histologische Unterschiede auf (Abb. 1). Das kontinuierliche zweireihige, hochprismatische Zylinderepithel besteht aus hohen Haupt- sowie niedrigen Basalzellen und besitzt apikal lange Stereozilienfortsätze. Hauptzellen weisen einen stark ausgeprägten Golgi-Apparat sowie reichlich raues ER und Mitochondrien auf, was auf eine hohe Proteinbiosynthese schließen lässt. Besonders charakteristisch ist diese Ausprägung in proximalen Regionen des Ganges, in denen ein stetiger Austausch zwischen Spermatozoen und Epithelzellen via Epididymosomen stattfindet (Cornwall et al., 2002). Durch endosomalen membrangebundenen

## II. Einleitung

Vesikeltransport werden beispielsweise Glykoproteine sezerniert (u.a. Cystatin 11) (Hamil et al. 2002). Des Weiteren werden nicht-codierende RNA, Aminosäuren und Stoffwechselmetabolite transportiert, die für die Spermienreifung notwendig sind (Paul et al. 2021). Durch Bindung an die Spermienoberfläche verändert sich deren Membran, sodass die Spermien im weiblichen Geschlechtstrakt überlebens- und kapazitationsfähig werden. Nach der Spermiation verbleiben zytoplasmatische Droplets an den Spermien. Durch den Kontakt mit Epithelzellen der Epididymis wandern diese zytoplasmatischen Droplets vom Kopf des Spermiums kaudal zum Ende des Mittelstücks. Im Rahmen der Ejakulation verändert sich die Osmolalität der Umgebungsflüssigkeit der Spermien rasant. Als Reaktion auf die abnehmende Osmolalität käme es durch Wassereinfluss zu einem Anschwellen der Spermien. Durch Abschnürung der zytoplasmatischen Droplets wird einer Volumenzunahme der Spermien entgegengewirkt. Unzureichende Abschnürung der Droplets führt zu unzureichender Spermienmotilität und Infertilität (Cooper 2011). Durch die Nebenhodenpassage erwerben Spermien die Fähigkeit zur Hypermotilität im weiblichen Reproduktionstrakt, die für das Erreichen der Eizelle notwendig ist. Neben einer besseren Flagellenbewegung und -koordination verändert sich zudem die Morphologie des Spermienkopfes.

Die Höhe des Epithels nimmt distal kontinuierlich ab. Dies resultiert aus der Reservoirfunktion der Cauda, in der die Spermien gelagert werden und kaum mehr Reifungsprozesse stattfinden (Sullivan et al. 2019). Im gesamten Nebenhodengang sind des Weiteren schmale (englisch: *narrow cells*, im initialen Segment) und helle Zellen (englisch: *clear cells*, von Caput bis Cauda) im Epithel eingebettet. Diese Zellen sezernieren stetig Protonen durch V-ATPasen sowie durch niedrige Natrium- und hohe Kaliumwerte, sodass der pH-Wert im Lumen niedrig gehalten wird. Dieses saure Milieu resultiert in einer „Säurestarre“ der Spermien, um eine vorzeitige Aktivierung der Hypermotilität zu verhindern (Brown et al. 1992).

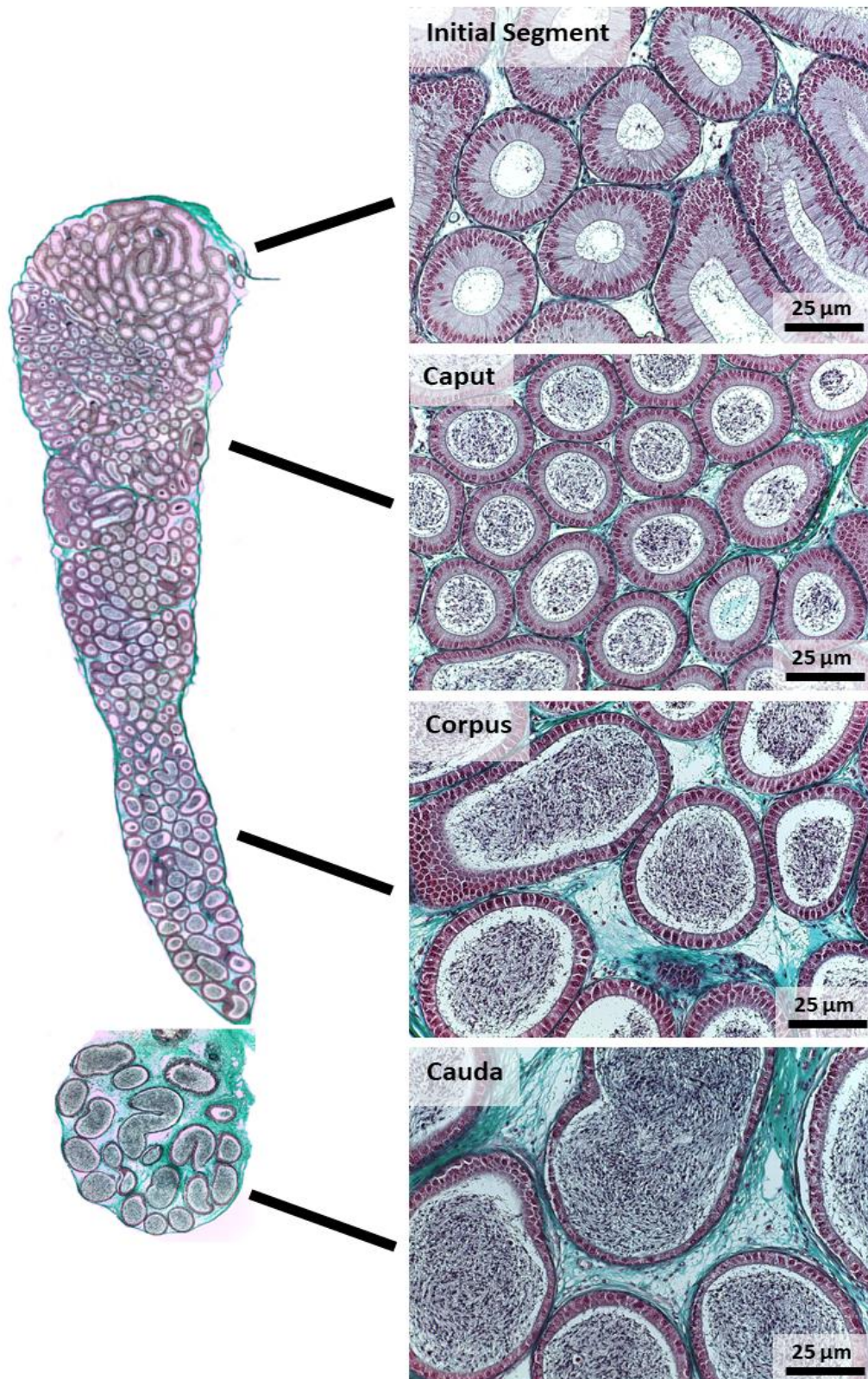
Der *Ductus epididymidis* wird in seinem kompletten Verlauf von einer glatten Muskelschicht umgeben, welche von cranial nach caudal zunehmend an Dicke gewinnt. Zu der inneren, zirkulären Schicht im Caput kommt im Bereich des Corpus eine weitere äußere, longitudinale Schicht hinzu. In den Abschnitten der Cauda ist schließlich eine weitere, dicke Muskelschicht in den äußeren Schichten auffindbar, die eine stärkere Differenzierung aufweist (Baumgarten et al. 1971). Die Muskelschichten lösen in allen Regionen durch kontinuierliche Kontraktion eine Peristaltik im Lumen der Epididymis aus. Während dies in proximalen Regionen vor allem dem Weitertransport der Spermien im Nebenhodengang dient, ermöglicht die kräftige Muskelschicht in der Cauda eine spontane, pulsatile Ejakulation (Mietens et al. 2014; Elfgen et al. 2018). Die Cauda wird

## II. Einleitung

in hoher Dichte von Nervenfasern umgeben, welche insbesondere adrenerge Signale im Rahmen der Ejakulation weiterleiten (Baumgarten et al. 1971).

Auf der Höhe des initialen Segments tritt einer der Äste der *Arteria testicularis* in den Nebenhoden und formt dort ein dichtes Netzwerk an Kapillaren (Hirai et al. 2010). Analog dazu bilden peritubuläre, hochpermeable lymphatische Gefäße ein dichtes Netzwerk auf der Höhe des initialen Segments. Ein zweiter Ast der *Arteria testicularis* tritt auf der Höhe des Corpus in den Nebenhoden ein. Distale Organregionen der Epididymis werden von einem Ast der *Arteria ductus deferentis*, die der *Arteria umbilicalis* entspringt, versorgt. Im restlichen Nebenhoden findet man vor allem interstitiell lokalisierte konventionelle lymphatische Gefäße. Das initiale Segment stellt dabei den am dichtesten vaskularisierten Bereich der Epididymis dar und besitzt damit *in vivo* das größte Potenzial einwandernde Immunzellen zu mobilisieren. Weiter caudal nimmt die Anzahl der Kapillaren ab (Suzuki 1982; Damon-Soubeyrand et al. 2023).

## II. Einleitung



**Abb. 1: Repräsentative histologische Ausschnitte der Nebenhodenregionen der Maus.** Masson Goldner Trichromfärbung eines in Paraffin eingebetteten Nebenhodenlängsschnittes. Links: Übersichtsaufnahme gesamter Nebenhoden. Rechts: Detailaufnahmen von IS, Caput, Corpus und Cauda (20-fach vergrößert). Färberegebnis: Kollagenes Bindegewebe (grün), Zellkerne (schwarz), Zytoplasma (rot), Muskulatur (hellrot), Erythrozyten (orange-rot).

## II. Einleitung

### 5. Angeborene und adaptive Immunität

Das Immunsystem besteht grundlegend aus zwei eng miteinander interagierenden Kompartimenten, dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem (Kaur und Secord 2019). Die angeborene Immunantwort hat die Aufgabe Pathogene am Eindringen in den Körper zu hindern, diese unmittelbar nach deren Eindringen in den Körper zu identifizieren, weitere Immunzellen zu rekrutieren und kaskadenförmig die adaptive Immunantwort zu aktivieren. Zellkontakte der Epithelzellen oder Spüleffekte körpereigener Sekrete auf Schleimhäuten (z.B. Speichel- und Tränenflüssigkeit) bilden eine Barriere gegenüber eindringenden Krankheitserregern. Humorale Komponenten, z.B. Proteine des Komplementsystems, tragen zur Lyse von Pathogenen bei (Riera Romo et al. 2016; Kaur und Secord 2019). Des Weiteren umfasst das angeborene Immunsystem verschiedene lymphoide Zellen (z.B. innate lymphoid cells [ILC1, ILC2, ILC3] und natürliche Killer-Zellen [NK-Zellen]) und myeloide antigenpräsentierende Zellen (z.B. Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Mastzellen) (Kawamoto und Minato 2004; Eberl et al. 2015).

Die antigenpräsentierenden Zellen erkennen mittels spezifischer Rezeptoren (Pattern Recognition Receptors (PRRs)) bestimmte konservierte Bestandteile der bakteriellen Zellwand (Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs)). Die Familie der Toll Like Rezeptoren (TLR) gehört zu den PRR (Akira et al. 2006). TLR4 erkennt spezifisch das Endotoxin LPS (PAMP), welches den Hauptbestandteil der äußeren Zellmembran von Gram-negativen Bakterien bildet. Durch spezifische Bindung an den TLR4 und dem für die Bindung essentiellen Myeloid Differentiation Factor 2 (MD2) bildet es den aktivierten (TLR4/MD2)-Komplex (Cochet und Peri 2017). Mithilfe der Co-Rezeptoren LPS Binding Protein (LBP) und Cluster Of Differentiation 14 Rezeptor (CD14) wird die intrazelluläre Signalkaskade fortgesetzt, die entweder über den Myeloid Differentiation Primary Response 88 (MYD88)-abhängigen oder MYD88-unabhängigen Weg weiterläuft. Die MYD88-abhängige Signalkaskade resultiert in einer Freisetzung von „nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“ (NFκB) und weiteren Transkriptionsfaktoren (z.B. Aktivatorprotein 1 (AP1)) sowie deren Translokation in den Zellkern, wodurch es zur Synthese einer Vielzahl von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (wie z.B. TNF, IL1β, IL6) kommt (Palm und Medzhitov 2009). Die MYD88-unabhängige Signalkaskade resultiert ebenfalls in der Freisetzung von NFκB, zusätzlich wird jedoch der Transkriptionsfaktor „Interferon regulatory factor 3“ (IRF3) aktiviert, der zur Hochregulierung von Interferon beta (*ifnb*) und damit assoziierten Genen führt (Häcker und Karin 2006). Eine Aktivierung der Signalkaskade führt zur Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen (z.B. TNF und IL1), die eine Entzündungsreaktion induzieren, die Phagozytose- und Migrationsaktivität erhöhen und

## II. Einleitung

somit weitere Zellen des angeborenen Immunsystems und adaptiven Immunsystems aktivieren und rekrutieren (Riera Romo et al. 2016).

Die adaptive Immunantwort besteht aus der humoralen und der Zell-vermittelten Immunantwort und zeichnet sich durch eine hochspezifische Reaktion aus. Die humorale und die Zell-vermittelte Immunantwort laufen parallel ab, wirken jedoch dabei stark synergistisch und ergänzen sich in ihrer apathogenen Wirkung. Antigenpräsentierende Immunzellen des angeborenen Immunsystems (vor allem dendritische Zellen) wandern in die lymphatischen Organe und präsentieren die gebundenen Antigene an die Zellen der adaptiven Immunabwehr (Bonilla und Oettgen, 2010). Im Rahmen der humoralen Immunantwort binden die Antigene an B-Zell-Rezeptoren (BCRs) der B-Lymphozyten, wodurch sich diese zu B-Plasmazellen weiterentwickeln. Außerdem partizipieren B-Zellen an der T-Zell-vermittelten Immunantwort. Plasmazellen sezernieren Antikörper, welche spezifisch an das Antigen binden, durch das die B-Zelle aktiviert wurde und machen dieses unschädlich (LeBien und Tedder 2008).

Im Rahmen der zellulären Immunantwort binden die Antigene an T-Zell-Rezeptoren (TCRs) der T-Lymphozyten. TCRs entstehen durch eine Aneinanderlagerung der verschiedenen Kettenpaare mit dem CD3-Komplex. Der  $\alpha\beta$ -TCR besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette und wird in den meisten T-Zellen exprimiert.  $\alpha\beta$ -T-Zellen sind in zwei Gruppen unterteilt, die sich durch verschiedene CD-Oberflächenmoleküle auszeichnen.  $CD4^+$  T-Zellen entwickeln sich zu T-Helfer-Lymphozyten ( $T_H$ -Zellen). Entscheidend für die Herausbildung des Subtypes ist, welches Zytokin durch die antigenpräsentierende Zelle freigesetzt wird. Monozyten und Makrophagen sezernieren IL12, wodurch sich naive T-Zellen zu  $T_{H1}$ -Zellen differenzieren.  $T_{H1}$ -Zellen sezernieren Interferon-gamma (IFNG), wodurch Makrophagen aktiviert, B-Zellen zur Teilung sowie Immunglobulinproduktion (IgG) angeregt und  $CD8^+$  zytotoxische T-Zellen ( $T_c$ -Zellen) aktiviert werden.  $T_c$ -Zellen induzieren die Apoptose der/ lysieren die Zielzellen (Bonilla und Oettgen 2010). Diese  $T_{H1}$ -vermittelten Mechanismen sind ein wichtiger Bestandteil in der Immunität gegen intrazelluläre Mikroben. Sezernieren Mastzellen IL4, differenzieren sich naive T-Zellen zu einer  $T_{H2}$ -Zelle.  $T_{H2}$ -Zellen sekretieren IL4, wodurch B-Zellen zur Produktion von Immunglobulinen (IgE) angeregt werden. Darüber hinaus wird via IL5 das Wachstum und die Differenzierung eosinophiler Granulozyten angeregt. Durch Sekretion von IL13 differenzieren sich B-Zellen. Diese  $T_{H2}$ -vermittelten Mechanismen sind ein wichtiger Bestandteil in der Bekämpfung von Parasiten sowie der Entstehung von Allergien. Sezernieren antigenpräsentierende Zellen (v.a. Makrophagen) IL6 und TGFB differenzieren sich T-Zellen zu  $T_{H17}$ -Zellen, welche IL17 zur Rekrutierung phagozytischer Zellen (neutrophile Granulozyten und Makrophagen) produzieren. Diese  $T_{H17}$ -vermittelten Mechanismen sind ein wichtiger Bestandteil in der

## II. Einleitung

Immunität gegen extrazelluläre Mikroben und nehmen zudem eine Schlüsselrolle in der Entstehung chronischer Autoimmunerkrankungen ein (Wik und Skålhegg 2022).

$\gamma\delta$  T-Zellen exprimieren einen TCR, der aus  $\gamma$ - und  $\delta$ -Untereinheiten besteht. Diese Subpopulation kommt sowohl in lymphatischen Organen als auch in peripherem Gewebe vor (Hayday 2009). Insbesondere in der Peripherie sind die Subpopulationen  $V\gamma 4$  und  $V\gamma 6$  zahlreich vertreten. Durch die Produktion und Sekretion von inflammatorischen Zytokinen, insbesondere IFNG oder IL17A üben sie eine wichtige Funktion in der Initiierung von Immunantworten aus (Romagnoli et al. 2016). Zudem sind  $\gamma\delta$  T-Zellen an der Homöostase verschiedener Gewebetypen beteiligt. Im Testis wird ihnen eine antimikrobielle Screeningfunktion zugeschrieben. Durch die Rekrutierung anderer Immunzellen sind sie direkt an der Heilung von Hautverletzungen beteiligt (Wilharm et al. 2021). Nach erfolgreicher Stimulierung und Antigenkontakt differenzieren sich die hochspezifischen B- und T-Lymphozyten zu langlebigen Gedächtniszellen, die im Falle eines erneuten Antigenkontaktes eine deutlich schnellere und effektivere Immunantwort auslösen (Bonilla und Oettgen 2010).

### **6. Regionale Verteilung der Immunzellen im Nebenhoden**

Die einzelnen Regionen der Epididymis unterscheiden sich nicht nur morphologisch, sondern auch immunologisch grundlegend. Dabei korrelieren die Anatomie und das Immunmilieu eng mit den gegensätzlichen Funktionen, welche die Regionen erfüllen. Insbesondere innerhalb der proximalen Regionen (Initial Segment und Caput), in denen Spermien vom Hoden in das Organ eintreten, muss eine ausreichende Immuntoleranz gegenüber immunogenen Spermien gewährleistet werden. Gleichzeitig müssen abnormale Spermien rechtzeitig erkannt und die epitheliale Integrität aufrechterhalten werden (Smith et al. 2014; Pierucci-Alves et al. 2018). Distale Regionen hingegen fungieren als Wächter gegen aufsteigende Keime und müssen eine effektive Immunantwort gegen ascendierende Pathogene auslösen (Fijak et al. 2018; Pleuger et al. 2020). Zur Wahrung eines immunologischen Gleichgewichtes sorgen strategisch positionierte residente Immunzellen (Pleuger et al. 2022).

Gegen Bestandteile von Spermien gerichtete Autoimmunität kann klinisch zu Infertilität führen (Lotti et al. 2018). Aufgrund dessen gibt es eine Reihe von molekularen und zellulären Mechanismen, die in extralymphatischen Geweben wie dem Nebenhoden durch ein komplexes Zusammenspiel für eine Anergie gegenüber den exprimierten Spermienantigenen sorgen und zur Wahrung der peripheren Toleranz beitragen. Im Gegensatz zur Blut-Hoden-Schranke stellt die Blut-Nebenhoden-Schranke eine weniger strikte Barriere - hauptsächlich gebildet durch den epithelialen Haftkomplex - dar, der ähnlich wie andere mukosale Oberflächen aufgebaut ist (Gregory und Cyr 2014). Sie



## II. Einleitung

wird durch die apikalen Zell-Zell-Kontakte (insbesondere tight junctions) zwischen den Epithelzellen gebildet und sorgt für die Aufrechterhaltung des luminalen Milieus. Die Blut-Nebenhoden-Schranke ermöglicht selektiv parazelluläre Transporte von Ionen, anderen Molekülen und Wasser, wodurch gewährleistet wird, dass einerseits eine besondere Mikroumgebung für die Spermienreifung und der Speicherung dieser geschaffen wird; auf der anderen Seite aber auch ein relativer Schutz gegenüber autoimmunologischen Prozessen gegeben ist (Hinton und Howards 1981).

Mononukleäre Phagozyten bilden ein dichtes Netz in und um den Nebenhodengang und besitzen als Immunzellen des angeborenen Immunsystems eine charakteristische Plastizität, wodurch sie organspezifische Funktionen in Homöostase und Immunität ausüben. Unter physiologischen Bedingungen stellen Makrophagen die zahlenmäßig am häufigsten anzutreffende Immunzellpopulation des Mäusenebenhodens dar (Battistone et al. 2020; Pleuger et al. 2022). Verschiedene Subpopulationen von Makrophagen liegen im Epithel und im Interstitium des Nebenhodens vor und üben eine Vielzahl an homöostatischen, regenerativen und inflammatorischen Funktionen aus (Pleuger et al. 2022). Makrophagen mit hoher Expression des C-X3-C Motif Chemokine Rezeptors 1 (CX3CR1<sup>+</sup> Makrophagen) sind anhand des Transkriptionsprofils sowie der Phagozytoseaktivität an der Gewebekomöostase sowie der Antigenerkennung beteiligt (Smith et al., 2014; Battistone et al., 2020; Pleuger et al., 2022). Diese Subpopulation bildet ein dichtes Netzwerk in und um das Epithel des Nebenhodenganges und kommt verstärkt im IS vor. Sie bilden dendritische Fortsätze aus, welche bis in das Lumen hineinragen. Das dichte Netzwerk antigenerkennender Makrophagen, in Verbindung mit dem engen Gangabschnitt im IS, ermöglicht ein engmaschiges Monitoring und eine intensive Interaktion mit den luminalen Komponenten (Da Silva et al. 2011). Dies lässt eine duale Wächterrolle des IS vermuten, welches vor allem immuntolerant gegenüber von Spermien exprimierten Neoantigenen agiert. Andererseits wird der luminale Inhalt auch kontinuierlich auf ascendierende Pathogene überprüft, um diese effizient zu eliminieren (Barrachina et al. 2022; Pleuger et al. 2022). Distale Regionen weisen hingegen ein heterogeneres Spektrum an Makrophagensubpopulationen auf. Neben einem geringeren Anteil von CX3CR1<sup>+</sup> Makrophagen kommen hier insbesondere proinflammatorische CCR2<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>, TLF<sup>+</sup> sowie CX3CR1<sup>-</sup>TLF<sup>-</sup>CCR2<sup>-</sup> Makrophagen vor. Analog zum Nebenhodenschwanz wurden diese Makrophagenpopulationen auch in anderen Organen wie z.B. der Niere oder der Bauchspeicheldrüse beschrieben (Dick et al. 2022).

Neben den verschiedenen Makrophagen-Subpopulationen sind weitere antigenpräsentierende myeloide Zellen im Nebenhoden beschrieben. Insbesondere dendritische Zellen sind vermehrt in distalen Nebenhodenregionen anzutreffen.

## II. Einleitung

Grundlegend können drei verschiedene Typen dendritischer Zellen differenziert werden. Konventionelle dendritische Zellen vom Typ 1 (cDC1) und 2 (cDC2) sind insbesondere an der Antigenpräsentation beteiligt. Dabei sind cDC1 eher an CD8-vermittelten Immunantworten beteiligt, während cDC2 eher an CD4-vermittelten Immunantworten beteiligt sind (Durai und Murphy 2016). Vermutlich migrieren diese nach der Antigenpräsentation zur T-Zell Aktivierung in lokale Lymphknoten. Das vermehrte Vorkommen von cDC in distalen Regionen könnte durch die verstärkte Antigenpräsenz aufgrund urethral aufsteigender Keime begründet werden. Weitere Experimente müssen dies jedoch belegen (Pleuger et al. 2022). Darüber hinaus existieren plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs). Sie zirkulieren im Blut und kommen in peripheren lymphatischen Organen vor. Unter inflammatorischen Bedingungen nimmt die Zahl der pDCs massiv zu und sie haben einen großen Anteil an der Typ-I-Interferon Produktion (Reizis et al. 2011; Duan et al. 2016). Neben den antigenpräsentierenden Zellen existieren in distalen Abschnitten der Epididymis vermehrt Subtypen von Lymphozyten (NK-Zellen, T-Zellen, B-Zellen). Diese Zellen der angeborenen und erworbenen Immunität fungieren vermutlich je nach Lokalisierung im Nebenhoden als Regulatoren als auch als Effektoren der Immunantwort (Pleuger et al. 2022).

### **7. Regionspezifische Expression immunregulatorischer Faktoren**

Eine Vielzahl immunregulativer Faktoren wird in der Epididymis exprimiert. Zu diesen gehören Indolamin-2,3-Dioxygenase-1 (IDO1), die Transforming Growth Factor  $\beta$ -Superfamilie (TGFB), und  $\beta$ -Defensine. IDO1 sowie das zu der TGFB-Superfamilie gehörende Zytokin Aktivin A werden am höchsten im Caput exprimiert (Jrad-Lamine et al. 2011). Gemeinsam sind diese immunregulatorischen Faktoren an der Etablierung einer immuntoleranten Umgebung im proximalen Nebenhoden beteiligt (Michel et al. 2015). Isoformen von TGFB (TGFB1, TGFB2, TGFB3) werden am höchsten in Corpus und Cauda exprimiert. Analog zu Aktivin A aktivieren diese TGFB-Rezeptoren, welche von besonderer Bedeutung in der Regulation von Autoimmunität, Inflammation und der Entwicklung von Immunzellen sind (Hedger 2011; Hedger und Kretser 2013).

Epithel- und Immunzellen der Epididymis exprimieren PRR's wie TLR's und PRR's als Bestandteile der angeborenen Immunität. C-Type Lectin Domain Family 4 Member E (CLEC4E) kodiert für einen PRR. PRR's lösen nach Kontakt mit bakteriellen Antigenen eine Signalkaskade aus und sind damit ein wesentlicher Bestandteil der Immunantwort. Bakterielle Infektionen resultieren aufgrund dessen in einer vermehrten Expression von PRR'S (Hedger 2011). Darüber hinaus ist das regulatorische Zytokin IL10 möglicherweise am Schutz der Spermien gegenüber autoimmunologischen Prozessen beteiligt (Veräjänkorva et al. 2002).

## II. Einleitung

### 8. Klinische und mikrobiologische Aspekte der Epididymitis

Die akute Epididymitis stellt eine der häufigsten urologischen Krankheiten dar und betrifft jährlich ~250-650/100.000 Männer in Großbritannien, Kanada und den USA (Nicholson et al. 2010; Çek et al. 2017). In 96 % der Fälle liegt die Epididymitis unilateral vor (Michel et al., 2015). Als Leitsymptom gilt ein lokal gerötetes und überwärmtes Skrotum mit druckdolentem Anschwellen der Epididymis. Zusätzlich kann sich das Krankheitsbild mit dysurischen Beschwerden bis hin zu einer Urosepsis mit systemischer Fieberreaktion präsentieren (Hongo et al. 2014). Gerade bei jungen Patienten ist aufgrund des drohenden Fertilitätsverlustes eine differentialdiagnostische Abgrenzung zur Hodentorsion essentiell. Bei der Epididymitis vermindert sich beim Anheben des Skrotums der betroffenen Seite der Schmerz, während bei Vorliegen einer Hodentorsion der Schmerz persistiert. Diese Untersuchungsmethode nennt sich Prehn-Zeichen und dient als klinisches Zeichen zur Unterscheidung der beiden Differenzialdiagnosen (Lorenzo et al. 2016). Unbehandelt und durch fortgeschrittene Expositionsdauer können Pathogene weiter in Richtung Testis aszendieren und eine Orchitis, häufig auch kombiniert als Epididymo-Orchitis, auslösen (Desai et al. 1986, Schuppe et al. 2008). Von den zahlreichen auslösenden Faktoren stellen aszendierende, bakterielle Harnwegsinfekte die häufigste Ursache der akuten Epididymitis dar (Michel et al., 2015). Neben generellen intestinalen Krankheitserregern, wie z.B. uropathogenen *Escherichia coli* (UPEC), stehen bei jüngeren Männern auch Keime im Zusammenhang mit sexuell übertragbaren Krankheiten, wie z.B. einer Infektion mit *Chlamydia trachomatis* im Vordergrund. Bei älteren Männern treten zusätzlich Harnwegsinfekte durch Anomalien des Urogenitaltrakts mit assoziierter Restharnstauung auf (Redshaw et al. 2014).

Charakteristisch für Gram-negative Bakterien wie *E. coli* ist die äußere Zellwandschicht, die aus Phospholipiden und Lipopolysacchariden (LPS) besteht. Der Virulenzfaktor LPS triggert im Rahmen einer Infektion das Immunsystem des Wirts (Lüthje und Brauner 2014). UPEC und andere *E. coli* Stämme haben Mechanismen entwickelt, um einfacher in Gewebe einzudringen, das Immunsystem des Wirtes zu supprimieren und eine Infektion zu etablieren (Brzuszkiewicz et al., 2006). Mithilfe der Virulenzfaktoren Alpha-Hämolysin, zytotoxisch-nekrotisierender Faktor und Siderophoren gelingt es den Bakterien in den Wirt einzudringen, dessen Immunantwort zu unterdrücken und dem Wirtsorganismus lebenswichtige Nährstoffe zu entziehen, was zu einer initialen Vermehrung der Pathogene in der entscheidenden frühen Phase des Infektionsgeschehens führt (Davis et al., 2005; Bhushan et al., 2011).

*E. coli* sind die klinisch häufigsten Bakterien von aufsteigenden Harnwegsinfektion, die bis zu 90 % der Infektionen des Urogenitaltraktes verursachen (Pilatz et al. 2015). Innerhalb der *E. coli* lösen unterschiedliche Serotypen unterschiedliche Reaktionen im

## II. Einleitung

männlichen Urogenitalsystem aus. Der Serotyp UPEC CFT073 ist ein Stamm, der aus einer Pyelonephritis isoliert wurde (Mobley et al. 1990). UPEC CFT073 supprimieren in Rattenhoden den MYD88-abhängigen Signalweg und die daraus resultierende Hochregulierung pro-inflammatorischer Zytokine. Stattdessen triggern UPEC den MYD88-unabhängigen Signalweg und die daraus resultierende Hochregulierung von IRF3 und damit assoziierten Genen (Bhushan et al. 2008). Ein weiterer *E. coli* Stamm, der kommensale NPEC (Non-pathogene *E. coli*) 470, der aus dem menschlichen Darm entnommen wurde, induziert in Milzzellen des Wirtes eine deutlich ausgeprägtere T<sub>H1</sub>-assoziierte Zytokinproduktion mit daraus resultierender Aktivierung der adaptiven Immunität als UPEC CFT073 (Lang et al. 2014).

Experimentelle Mausmodelle haben gezeigt, dass UPEC-induzierte Entzündungen des Nebenhodengewebes zu einer Degeneration der Epithelzellen, einer Fibrosierung des Gewebes sowie zu einer Obstruktion des epididymalen Ganges führen. Dabei wurden im Nebenhoden deutliche regionale Unterschiede der Immunantwort festgestellt (Michel et al. 2016; Klein et al. 2020; Pleuger et al. 2022). Neben der antibiotischen Behandlung der Erreger werfen diese Beobachtungen auch die Frage nach einer anti-inflammatorischen bzw. immunmodulierenden Therapie auf (Michel et al. 2016). Eine initiale Interventionsstudie, in der eine kombinierte Therapie mit Levofloxacin und Dexamethason an UPEC-infizierten Mäusen durchgeführt wurde, zeigte einen deutlich milderen Infektionsverlauf mit besserem Erhalt des Fertilitätsstatus (Klein et al. 2020).

### 9. Zielsetzung dieser Arbeit

Verschiedene experimentelle Modelle, u.a. unserer Arbeitsgruppe, haben gezeigt, dass die epididymalen Regionen fundamental unterschiedlich auf einen inflammatorischen Stimulus reagieren und die Immunantwort sich in ihrem jeweiligen Ausmaß deutlich unterscheidet (Michel et al. 2016; Silva et al. 2018; Klein et al. 2019; Wang et al. 2019; Klein et al. 2020; Wijayarathna et al. 2020; Pleuger et al. 2022). Im Caput werden deutlich geringere pro-inflammatorische Zytokinlevel als im Corpus oder der Cauda beschrieben, was auf unterschiedliche Ausmaße der Immunantworten in den Regionen schließen lässt. In vorherigen Experimenten wurden insbesondere in der Cauda histologisch sowohl *in vivo* als auch *in vitro* deutliche epitheliale Schäden sowie ein ausgeprägtes fibrotisches Remodelling beschrieben. Konsekutiv führt dies zu einer Obstruktion des Nebenhodenganges. Infolgedessen kommt es zu deutlich reduzierten Spermienzahlen im Ejakulat. Prädominante Erreger hierbei sind *E. coli* (Michel et al. 2016).

Erreger von Harnwegsinfekten steigen *in vivo* über die Harnröhre bis in den Samenleiter und erreichen an dessen Ende die Cauda des Nebenhodens. Anatomisch bedingt ist die

## II. Einleitung

Cauda einer längeren Expositionsdauer gegenüber potenziellen Erregern ausgesetzt als das Caput, der erst im späteren Infektionsverlauf erreicht wird. Bisherige *in vivo* Modelle stellen das Inflammationsausmaß dar, erlauben jedoch keine Rückschlüsse, ob die abweichenden Immunantworten der Regionen auf der unterschiedlichen Expositionsdauer mit Erregern beruhen oder ob das jeweilige Gewebe mit seinem residenten Immunsystem fundamental anders auf Infektionen reagiert.

In dieser Arbeit soll deshalb ein *ex vivo* Modell etabliert werden, welches erlaubt, die Mechanismen der Immunantwort zu untersuchen. Ziel dieser Studie ist es, in den einzelnen Regionen simultane Inflammationsgeschehen unter exakt gleichen *ex vivo* Bedingungen hervorzurufen. Die medikamentöse Therapie der Epididymitis besteht heutzutage lediglich aus antibiotischen und antiphlogistischen Maßnahmen. Aus diesen Studien gewonnene Erkenntnisse könnten perspektivisch zur klinischen Erforschung ergänzender Maßnahmen, wie z.B. einer immunsupprimierenden Therapie, beitragen.

### III. Materialien

## III. Materialien

### 1. Chemikalien

Materialien (Art)	Hersteller
Agarose Standard, Roti®garose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bacto Agar	Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Chloroform EMSURE®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromidlösung 0,025 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylalkohol Ethanol ROTIPURAN® ≥99,8 %, p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Sifin Diagnostics GmbH, Berlin, Deutschland
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BioRad Laboratories, Hercules, USA
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNaseZap®	ThermoFisher, Waltham, USA
QIAzol Lyse Reagenz	Qiagen, Hilden, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

### III. Materialien

#### 2. Zellkultur: Medien und Antibiotika

<b>Materialien (Art)</b>	<b>Hersteller</b>
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline [DPBS(1x)]	gibco by Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM/F12)	gibco by Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
RNase Zap	Invitrogen AG, Carlsbad, USA
Ultrapure Lipopolysaccharid (LPS), E. coli 0111:B4	InvivoGen Europe, Toulouse, Frankreich
Gentamicin Lösung 10 mg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

#### 3. Zellkultur: Reagenzien

<b>Materialien (Art)</b>	<b>Hersteller</b>
Petri Schalen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Precellys Stahl-Kit 2,8mm, verstärkt	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Zellkultur 6-Multiwell Platte	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkultur 12-Multiwell Platte	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkultur 24-Multiwell Platte	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkultur 96-Multiwell Platte	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

### III. Materialien

#### 4. Versuchstiere

<b>Materialien (Art)</b>	<b>Hersteller</b>
Männliche C57BL/6J Wildtyp Mäuse, adult, 10-12 Wochen alt	Charles River Laboratorien Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland

#### 5. PCR und qRT-PCR

<b>Materialien (Art)</b>	<b>Hersteller</b>
100 bp DNA Marker	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland
RNase Free DNase Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Nukleotide (dNTPs)	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland
Go Taq® G2 Flexi DNA Polymerase	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland
Go Taq® Flexi Green Puffer (5x)	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland
Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase (M-MLV RT)	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland
M-MLV 5*RT Puffer	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland
Oligo(dT)15 Primer	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland
PCR Nucleotid Mix	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland
RDD Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase freies H <sub>2</sub> O	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase Inhibitor RNasin®	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland



### III. Materialien

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RW1 Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
RPE Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Trizma-Base	Sigma-Aldrich , St. Louis, USA

### 6. Geräte und Software

<b>Materialien (Art)</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklav Systemec VE-95	Systemec GmbH, Linden, Deutschland
BioRad CFX96 qPCR Machine System	BioRad Laboratories; Hercules, USA
Durchflusszytometer MACS Quant Analyser 10	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Elektrophoreskammer und -kämme PerfectBlue™ Mini ExM	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Elektrophoresis Consort E832 Power Supply	Consort bvba, Turnhout, Belgien
Elektronische Waage SPB50	Ohaus, Parsippany, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
Homogenisierer B. BRAUN Potter S 8533024	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
PCMT Thermoshaker	Grant Instruments Ltd
Intas Gel Imaging UV System	Intas Science Imaging Instrument GmbH, Göttingen, Deutschland
iQ 5 Optical System Software Version	BioRad Laboratories; Hercules, USA
Labor-pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland

### III. Materialien

Magnetrührer Heidolph MR 3001 K	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Mikrowelle	Samsung Electronics, Seoul, Südkorea
Nano Drop ND 2000	ThermoFisher, Waltham, USA
Oligo Explorer 1.1.2	Gene Link, Orlando, USA
PCR Thermocycler Biometra TAdvanced	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
RM2255 Rotationsmikrotom	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Schwingmühle MM400	Retsch GmbH, Haan, Deutschland
Spectrophotometer ULTROSPEC 2100	Harvard Bioscience, Holliston, USA
Zentrifuge PerfectSpin Mini	PQ Labs Fremont, USA
Zentrifuge Pico-21	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Biofuge® fresco	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland

### 7. Primer

<b>Gen</b>	<b>NCBI RefSeq.</b>	<b>Primer Sequenzen (5' à 3')</b> <b>F (Forward, vorwärts)</b> <b>R (Reverse, rückwärts)</b>	<b>Länge des Produkts (Basenpaare)</b>
<i>Tnf</i>	NM_01369 3.3	<b>F:</b> CCCTCCTGGCCAACGGCATG <b>R:</b> TCGGGGCAGCCTTGTCCTT	108 bp
<i>Il1a</i>	NM_01055 4.4	<b>F:</b> CAGCCCGTGTTGCTGAAGGAGT <b>R:</b> GTGCCAGGTGCACCCGACTT	168 bp
<i>Il1b</i>	NM_00836 1.4	<b>F:</b> CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG <b>R:</b> GATCCACACTCTCCAGCTGCA	151 bp

### III. Materialien

<i>Il6</i>	NM_03116 8.2	<b>F:</b> ATGGATGCTACCAAACCTGGAT <b>R:</b> TGAAGGACTCTGGCTTTGTCT	137 bp
<i>Il10</i>	NM_01054 8.2	<b>F:</b> GTCCTAGAGCTGCGGACTGC <b>R:</b> TTTCCGATAAGGCTTGGCAACCCA	136 bp
<i>Tgfb1</i>	NM_01157 7.2	<b>F:</b> GCGGACTACTATGCTAAAGAGGR: GTAGAGTTCCACATGTTGCTCC	212 bp
<i>Inhba</i>	NM_00838 0.2	<b>F:</b> AGAACGGGTATGTGGAGATAGA <b>R:</b> GACTCGGCAAAGGTGATGAT	96 bp
<i>Ido1</i>	NM_00129 3690.1	<b>F:</b> TCCTCGTCTCTCTATTGGTG <b>R:</b> CAGGTCTTGACGCTCTACTG	89 bp
<i>Cst11</i>	NM_03005 9.2	<b>F:</b> CACCTGGAGTATCACATCAC <b>R:</b> AATGGCGTACACTGAGAAG	129 bp
<i>Ltf</i>	NM_00852 2.3	<b>F:</b> CTCTTGATGGTGGCACTATG <b>R:</b> TTGGTCCCGTAGACTTCAG	82 bp
<i>Clec4e</i>	NM_01994 8.2	<b>F:</b> GCCACCATAAGGGACTCTTC <b>R:</b> TCTGGCATCTCACAAATCC	89 bp
<i>Ptgs2</i>	NM_01119 8.4	<b>F:</b> CACAGCCTACCAAAACAGCCA <b>R:</b> GCTCAGTTGAACGCCTTTTGA	98 bp
<i>Rna18s</i>	NR_00327 8.3	<b>F:</b> TACCACATCCAAGGAAGGCAGCA <b>R:</b> TGGAATTACCGCGGCTGCTGGCA	180 bp
<i>Rplp0</i>	NM_00747 5.5	<b>F:</b> CTGCACTCTCGCTTTCTGGA <b>R:</b> ACGCGCTTGTACCCATTGAT	112 bp

### III. Materialien

#### 8. Lösungen und Puffer

a)

Weigerts Hämatoxylin	Für 200 ml
<i>Stammlösung A</i>	
Hämatoxylin	1 g
Ethanol 96 %	100 ml
<i>Stammlösung B</i>	
FeCl <sub>3</sub>	1,16 g
destilliertes Wasser	99 ml
HCL 25 %	1 ml
<i>Gebrauchslösung</i>	
Vor Gebrauch 1:1 Vermengung Stammlösung A+B	

b)

Ponceau-Säurefuchsin	Für 500 ml
destilliertes Wasser	500 ml
Xylidin-Ponceau	5 g
Säurefuchsin	2,5 g
Essigsäure 100 %	1 ml

c)

Phosphorwolframsäure-Orange	Für 500 ml
destilliertes Wasser	500 ml
Phosphorwolframsäure	20 g
Orange G	10 g

### III. Materialien

d)

Lichtgrün	Für 500 ml
destilliertes Wasser	500 ml
Lichtgrün	1 g
Essigsäure 100 %	2 ml

e)

TAE-Puffer pH 8,0	Für 1000 ml
<i>Stammlösung (10x)</i>	
TRIZMA (Tris) Base	48,4 g
0,5M EDTA	20 ml
destilliertes Wasser	980 ml
Essigsäure	zum Einstellen des pH-Werts
<i>Gebrauchslösung (10x)</i>	
Vor Gebrauch 1:1 Vermengung Stammlösung A+B	

f)

RIPA-Puffer	Für 10 ml
1 M Tris/HCL Puffer pH 7,4	100 µl
5M NaCl	300 µl
Triton X 100	100 µl
Nonidet P 40	25 µl
0,5M EDTA	40 µl
100mM PMSF	100 µl

## **IV. Methoden**

### **1. Umgang mit den Versuchstieren**

Wildtypische, männliche, 10-12 Wochen alte C57BL/6J-Mäuse wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) kommerziell bezogen und in der zentralen Versuchstierhaltung der Justus-Liebig-Universität Gießen nach Richtlinien und Empfehlungen der Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA)-Richtlinien sowie der Society of Laboratory Animal Science (GV-SOLAS) gehalten. Zur Organentnahme wurden die Versuchstiere gemäß §4 des Tierschutzgesetzes mittels Inhalationsnarkose (5 % Isofluran im Exxikator) und nach Ausbleiben des Zwischenzehreflexes durch zervikale Dislokation von einer autorisierten Person getötet. Alle in dieser Doktorarbeit durchgeführten Versuche basieren auf der JLU-internen Tötungsmeldung 684\_M.

### **2. Masson-Goldner-Trichromfärbung**

#### **2.1. Organ Fixierung und Anfertigung von Paraffinschnitten**

Die entnommenen Nebenhoden wurden für sechs Stunden in Bouin Fixierlösung fixiert. Das Gewebe wurde mehrfach mit 70 % Ethanol gewaschen, um überschüssige Bouin'sche Lösung zu entfernen. Nach vier Stunden in 96 % Ethanol und zwei Stunden in 100 % Ethanol wurde das Gewebe über Nacht in Methylbenzoat inkubiert. Am darauffolgenden Tag folgte nach zweistündiger Inkubationszeit in reinem Xylol eine dreistündige Inkubation in einem 1:2 Paraplast-Xylol Gemisch bei 60 °C. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 60 °C in reinem Paraplast. Das Gewebe in flüssigem Paraffin über Nacht bei 4 °C gekühlt. Mithilfe des RM2255 Rotationsmikrotoms wurden die benötigten Gewebsschnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt.

#### **2.2. Masson-Goldner-Trichromfärbung der Paraffinschnitte**

Initial wurden die angefertigten Paraffinschnitte dreimal für jeweils zehn Minuten in Xylol entparaffiniert. Daraufhin wurden die Schnitte mit einer absteigenden Ethanol-Reihe rehydriert (jeweils zehn Minuten in 100 %, 90 %, 80 % und 70 % Ethanol). Im letzten Schritt erfolgte die Rehydrierung in reinem destillierten Wasser für zehn Minuten. Zunächst wurden die Zellkerne für fünf Minuten in Weigert's Hämatoxylin angefärbt. Anschließend wurden die Schnitte für 15 Minuten unter laufendem handwarmem Leitungswasser gebläut. Im nächsten Schritt wurde der Gewebsschnitt für 5 Minuten in Ponceau-Säurefuchsin inkubiert. Säurefuchsin färbt das Bindegewebe und das Zytoplasma rot an. Ponceau bindet reversibel an Aminogruppen von Proteinen und färbt Muskelgewebe hellrot ein. Der Schnitt wurde daraufhin für 3 Minuten mit 1 % Essigsäure

#### IV. Methoden

gewaschen. Die nächste Färbung erfolgte für 30 Minuten mit Phosphorwolframsäure-Orange G. Erythrozyten werden von Orange G orange-rot gefärbt, während der Beizstoff Phosphorwolframsäure das zuvor gefärbte Bindegewebe entfärbt. Anschließend wurden die Schnitte für 3 Minuten mit 1 % Essigsäure gewaschen. Im letzten Färbeschritt wurde der Schnitt für 5 Minuten in Lichtgrün gegeben, welches das Bindegewebe grün einfärbt. Der Schnitt wurde daraufhin für 3 Minuten mit 1% Essigsäure gewaschen. Im Anschluss an die Trichromfärbung wurde eine Dehydrierung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % für eine Minute) und Xylol (zweimal 10 Minuten) durchgeführt. Die Objektträger wurden schließlich mit Eukitt eingedeckt.

## IV. Methoden

### 3. RT-qPCR

#### 3.1. Inkubation epididymaler Regionen mit LPS, UPEC, NPEC

Aufgrund der höheren Instabilität von RNA im Vergleich zur DNA wurde in sämtlichen Schritten mit autoklaviertem Besteck, sterilen Handschuhen und Filterspitzen gearbeitet. Um den Einfluss der ubiquitären RNAsen zu minimieren, wurden alle Hilfsmittel und Oberflächen mit RNaseZap vorbehandelt. Um Temperaturschocks zu vermeiden, wurden die lebenden Bakterien [uropathogene *E. coli* (CFT 073) und nicht-pathogene *E. coli* (NPEC 470)], bzw. Lipopolysaccharid (LPS)] (Ultrapure Lipopolysaccharid (LPS), *E. coli* 0111:B4) langsam auf Eis aufgetaut und durch mehrfaches Pipettieren mit dem Medium vermischt. Nach Tötung und Fixierung der Tiere wurde die Inguinalgegend mit 70 % Ethanol gereinigt und das Hypogastrium eröffnet. Beidseits konnte der Testis-/Epididymisstrang mit einer Pinzette herausgezogen und in eine Petrischale mit 5 ml phosphatgepufferter Saline (PBS) überführt werden. Sorgfältig wurden die einzelnen Epididymisregionen mit einem Skalpell getrennt und separat in eine, mit jeweils 1 ml DMEM/F12-Medium befüllte, 6-Well Platte gegeben. Die Inkubationsdauer variierte dabei je nach Experiment (1h, 3h, 6h), um eine Verlaufskurve der jeweiligen Genexpression darzustellen. Die UPEC- und NPEC-Inkubation dauerte 4h, weil die Bakterien, aufgrund des exponentiellen Wachstums, darüber hinaus die Kultur überwachsen hätten. Dies hätte die Zytokinmessung erheblich beeinflusst. Nach Ablauf der Zeit wurde das Gewebe aus dem Medium herausgenommen und unter sterilen und RNase-freien Bedingungen zweimalig mit PBS gewaschen. Zuletzt wurden die Gewebestücke in Mikroreaktionsgefäße überführt und mit 500 µl QIAzol Lyse Reagenz versetzt.

#### 3.2. Homogenisierung

Zur mechanischen Homogenisierung wurde das in Trizol liegende Gewebe mit 3 Precellys Stahl Kit Kugeln (Durchmesser 2,8mm) pro Mikroreaktionsgefäß versetzt und die befüllten Gefäße an der MM400 Schwingmühle bei 30 Schwingungen pro Sekunde für drei Minuten homogenisiert und anschließend sofort auf Eis gesetzt. Das entstandene Homogenat wurde durch mehrmaliges Pipettieren vermischt, in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

#### 3.3. RNA-Isolation

Die Isolierung der RNA aus dem Gewebe wurde mit dem RNeasy® Mini Kit (Qiagen) gemäß Hersteller-Angaben mit zusätzlichen Modifikationen durchgeführt. Zu jeweils 500 µl Trizol-Homogenat wurden 100 µl des Homogenats hinzugegeben, vorsichtig gemischt und für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden für 20 Minuten



## IV. Methoden

bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Durch den Zentrifugationsschritt hatten sich drei verschiedene Phasen gebildet. Die rote untere Phase beinhaltete hauptsächlich Proteine und hatte sich aufgrund der höheren Dichte des Chloroform-Phenol-Gemisches an den Boden abgesetzt. Während die DNA sich in der dünnen weißen Interphase ansammelte, befand sich die RNA in der oberen aquatischen Phase, von welcher ca. 200 µl Gesamtvolumen in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß überführt und mit gleicher Menge 70 % Ethanol versetzt wurde. Das Gemisch wurde direkt auf eine Zentrifugiersäule aufgetragen und bei 12.000 x g für eine Minute zentrifugiert. Dadurch wurde die RNA an der Silica Membran der Säule adsorbiert. Im nächsten Schritt wurden mithilfe des RW1-Puffers nicht spezifisch gebundene Biomoleküle ausgewaschen, während RNA Moleküle, welche größer als 200 Basenpaare waren, an der Membran haften geblieben waren. Zum Verdau verbliebener genomischer DNA (gDNA) wurde das RNase-free DNase Kit (Qiagen) unter Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden 10 µl RNase Free DNase I, welche äquivalent zu 30 Kunitz-Einheiten (Einheit zur Charakterisierung der Aktivität von Ribonukleasen) sind, mit 70 µl RDD Puffer vermischt und direkt auf die Membran gegeben. Nach einem erneuten RW1-Puffer-Waschschritt wurde zweimal mit dem milderen RPE-Puffer gewaschen, um Salze vorheriger Puffer zu entfernen. Daraufhin wurde die Trennsäule auf neue Sammelröhrchen transferiert und für eine Minute bei 14.000 x g trocken zentrifugiert. Aufgrund der geringen Größe der Gewebestückchen (insbesondere des *Corpus epididymidis*), wurde RNase-freies Wasser zur Optimierung der Extraktionsqualität auf 50 °C erhitzt und 30 µl direkt auf die Membran aufgetragen. Nach 15-minütiger Inkubation bei 50 °C wurden die Säulen bei 13.000 x g zentrifugiert, wodurch die RNA von der Silica Membran eluiert wurde. Die nachfolgende Lagerung fand bei -80 °C statt.

### 3.4. Messung der RNA-Konzentration und –Reinheit

Sowohl die Konzentration als auch die Reinheit der RNA wurden mit dem Nano Drop ND2000 Spektralphotometer gemessen. Der NanoDrop misst die Nukleinsäurekonzentration (ng/ µl) der aufgeladenen Probe gemäß dem Beer-Lambert'schen Gesetz anhand der Lichtextinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm (Trumbo et al. 2013). Über einen für die jeweilige Nukleinsäure spezifischen Umrechnungsfaktor wurde anschließend die Konzentration der gemessenen Probe bestimmt. Die Messung bei der Wellenlänge  $\lambda = 260$  nm war jedoch nur eine rein quantitative Aussage. Um die Reinheit der Probe annäherungsweise bestimmen zu können, wird der Quotient der optischen Dichte (OD)  $OD_{260}/OD_{280}$  für eine Kontamination durch Proteine und der Quotient  $OD_{260}/OD_{230}$  für eine potenzielle

## IV. Methoden

Kontamination mit Salzen oder Kohlenhydraten berechnet. Für ersteren Quotienten gilt ein Wert von 1,8 – 2,0 als “rein“, während beim Zweiten ein Wert  $\geq 2,0$  als “rein“ gilt.

### 3.5. Polymerase-Kettenreaktion

Reinheitsverhältnisse stellten zwar wichtige Anhaltspunkte für die Qualität der Proben dar, um jedoch eine Verunreinigung mit genomischer DNA vollends auszuschließen, wurde im Anschluss eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR, englisch: Polymerase Chain Reaction) an der isolierten RNA Probe durchgeführt. Die PCR diente zur *in vitro* Amplifizierung von DNA. Durch das exponentielle Wachstum konnten innerhalb weniger Zyklen Kleinstmengen amplifiziert werden. Ermöglicht wird dies durch das Enzym DNA-Polymerase sowie durch den Einsatz spezifischer Oligonukleotid-Primer, die komplementär zu ausgewählten DNA-Abschnitten sind, an diese binden und somit eine gezielte Amplifikation ermöglichen. Als Primer wurde 18s rRNA, welche als struktureller Bestandteil der kleinen ribosomalen Untereinheit in jeder eukaryotischen Zelle vorkommt, verwendet. 1  $\mu$ l der isolierten RNA wurde mit 5  $\mu$ l 5-fachen Green Go Taq Flexi Buffer, 2  $\mu$ l  $MgCl_2$  25mM, 0,5  $\mu$ l dNTP's 10mM, 0,25  $\mu$ l Go Taq Polymerase Flexi, 15,25  $\mu$ l  $H_2O$ , 1  $\mu$ l Primer Reverse 10pM und 1  $\mu$ l Primer Forward 10pM (s.Tab.1) vermischt und gemäß Schema des PCR Thermocyclers (Tab. 2) im Biometra TAdvanced Thermocycler inkubiert. Als Kontrolle wurde bei jeder PCR eine Positivkontrolle mit synthetisierter cDNA von WT-Mäusen durchgeführt. Vorbereitend wurden Primersequenzen unter Verwendung der Oligo Explorer Software erstellt und von der Firma Eurofins synthetisiert. Die Primer wurden auf 5 pM mit RNase-freiem Wasser verdünnt.

#### IV. Methoden

**Tab. 1: Bestandteile und deren Volumen für den PCR Master Mix.**

Master Mix	pro Probe
5*Green Go Taq Flexi Buffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2 µl
dNTP's 10 mM	0.5 µl
Go Taq Polymerase Flexi	0,25 µl
H <sub>2</sub> O	15,25 µl
Primer Reverse 10 pM	1 µl
Primer Forward 10 pM	1 µl
Gesamtvolumen	25 µl

**Tab. 2: Schema des PCR Thermocyclers.**

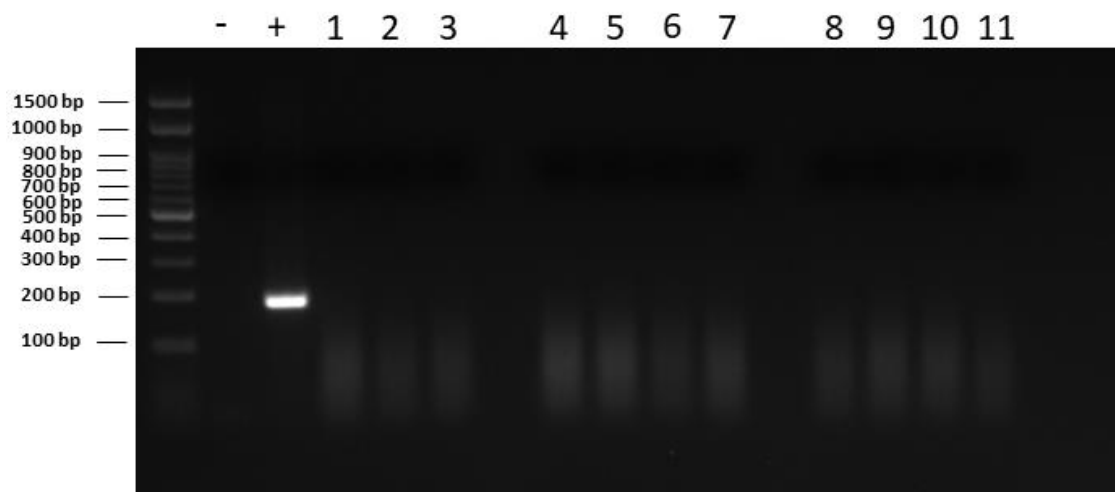
Schritt	Zyklen	Temperatur	PCR-Schritt	Dauer
1	1 x	95 °C	Denaturierung	5 min
2	25 x	95 °C	Denaturierung	40 s
3		55 °C	Primer-Annealing	40 s
4		72 °C	Elongation	40 s
5	1 x	72 °C	Finale Elongation	10 min
6	1 x	4 °C	Abkühlung	∞

## IV. Methoden

### 3.6. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Visualisierung amplifizierter DNA-Fragmente wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Zur Herstellung von 1,5 %-igen Agarosengelen, wurde 1,5 g Agarose in 100 ml 1x TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer in der Mikrowelle durch Kochen aufgelöst. Tris/Acetat bewirkt ein leicht alkalisches Milieu, in welchem DNA die beste Stabilität besitzt, während der Chelator EDTA zweiwertige Ionen bindet und die eingesetzte DNA vor Nukleasen schützt. Nach einem Abkühlvorgang wurde das Gemisch mit 0,025 % Ethidiumbromidlösung versehen und in eine Agarose-Gelkammer gegossen. Da der verwendete Taq Polymerase-Puffer, welcher für die PCR eingesetzt wurde, bereits einen Farbstoff zur Visualisierung enthält, mussten die PCR-Produkte nicht mit einem Ladepuffer versetzt werden. Entsprechend der benötigten Taschen wurde ein passender Kamm eingesetzt. Nach erfolgter Polymerisierung wurde der Kamm herausgezogen und das Gel samt der Form in eine Elektrophoresekammer platziert. Daraufhin wurde jeweils ein 100 bp DNA Marker sowie die PCR-Produkte in die Taschen pipettiert und das Gel bei einer Spannung von 150 Volt für 30 Minuten laufen gelassen. Nach erfolgreicher Auftrennung wurde das Gel mit Hilfe des Intas Gel Imaging UV System dokumentiert. Auf dem entstandenen Bild wurden die Proben mit der Negativ- und der Positiv-Probe verglichen (Abb. 2). Aufgrund des vorher stattgefundenen gDNA-Verdaus war die RNA kontaminationsfrei (keine Bande sichtbar). Zum Ausschluss von Kontaminationen im Master Mix wurde eine Negativ-Kontrolle, welche nur den Master Mix enthielt, durchgeführt (keine Bande sichtbar). In der Positiv-Kontrolle, welche die bekannte cDNA enthielt, hatte eine Amplifizierung stattgefunden (Bande sichtbar). Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der DNA, wodurch sich die Fluoreszenz unter UV-Licht stark erhöht und damit eine DNA-Bande sichtbar wird. Die Positiv-Probe enthielt Testis-cDNA von wildtypischen Mäusen und zeigte eine deutliche DNA-Bande.

## IV. Methoden



**Abb. 2: Qualitative RT-PCR zur Überprüfung der Reinheit der DNA-Proben mittels *Rna18s* Primer.**

Nachweis des erfolgreichen Verbaus verbliebener genomischer DNA und der erfolgreichen Aufreinigung. Eine sichtbare Bande bei 181 bp entsprach der PCR-Produktgröße unter Anwendung der *Rna18s* Primer. - = Negativ-Kontrolle (Master Mix); + = Positiv-Kontrolle (Testis cDNA und Master Mix); Spuren 1-11: untersuchte RNA und Master Mix.

### 3.7. Reverse Transkription

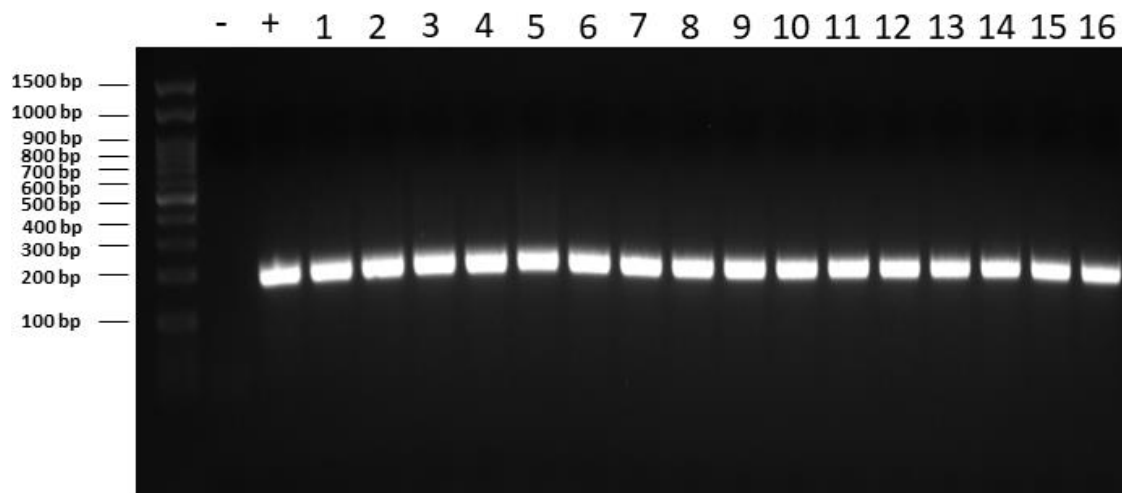
Da eine PCR nicht an RNA durchführbar ist, sondern nur doppelsträngige DNA mit dieser Methode amplifiziert werden kann, wurde die dazu komplementäre cDNA verwendet, anhand welcher auf die RNA Expression zurückgeschlossen werden konnte. 1 µg RNA wurde zur cDNA-Synthese verwendet. Zur RNA wurden 2 µl Oligo dT (10 pM) zugegeben, welche an den Poly-A-Schwanz der mRNA-Matrize binden und als Primer für die reverse Transkriptase dienen. Anschließend wurde mit H<sub>2</sub>O bis zu einem Volumen von 22 µl aufgefüllt und für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Für den Reaktionsmix der Reversen Transkription wurden pro Probe 8 µl M-MLV 5\*RT Buffer, 2 µl dNTP 10 mM, 1 µl RNAsin sowie 6 µl H<sub>2</sub>O zugegeben (Tab. 3). Der Mix wurde für 2 Minuten bei 42 °C inkubiert und daraufhin mit 1 µl Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase 200 u/µl (M-MLV RT) vermischt. Der RNA Mix (22 µl) wurde mit einem Volumen von 18 µl des Master Mix vermischt und dann für 75 min bei 42 °C inkubiert. Anschließend fand eine 15-minütige Inkubation bei 70 °C zur Enzymaktivierung statt. Die entstandene cDNA entspricht in ihrer Sequenz der mRNA und enthält deshalb (im Gegensatz zur gDNA) keine Introns mehr.

#### IV. Methoden

**Tab. 3: Pipettierschema für den Reverse Transkription Master Mix.**

Master Mix	Volumen pro Probe
M-MLV 5*RT Buffer	8 µl
dNTP 10 mM	2 µl
RNAsin (RNase Inhibitor)	1 µl
H <sub>2</sub> O	6 µl
M-MLV Reverse Transkriptase 200 u/µl	1 µl
Gesamtvolumen	18 µl

Wie in Punkt 4.6 und 4.7 beschrieben, wurde im Anschluss eine PCR durchgeführt, bei der das Referenzgen *Rna18s* amplifiziert wurde, um die erfolgreiche Umschreibung in cDNA zu überprüfen. Beim Vergleich der Proben mit der Positiv-Probe war stets bei allen Proben eine Bande bei einer Länge von 181 bp zu sehen, was eine erfolgreiche Umschreibung in cDNA bedeutete (Abb. 3).



**Abb. 3: Qualitative RT-PCR an cDNA von Nebenhodenregionen mittels *Rn18s* Primer als Kontrolle der Reversen Transkription.**

Eine sichtbare Bande bei 181 bp entspricht der PCR-Produktgröße unter Anwendung der *Rna18s* Primer. - = Negativ-Kontrolle (Master Mix); + = Positiv-Kontrolle (Testis cDNA und Master Mix); Spuren 1-16: untersuchte cDNA und Master Mix.

## IV. Methoden

### 3.8. Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Zur Detektion der Genexpression wurde eine quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) durchgeführt, da hierbei, im Gegensatz zur standardmäßigen qualitativen RT-PCR, eine exakte Quantifizierung der synthetisierten DNA möglich ist. Realisiert wird dies durch Echtzeit-Fluoreszenz-Messungen mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen, welche im verwendeten iTaq Universal SYBR Green Supermix enthalten sind.

SYBR Green besitzt ohne Bindung eine geringe Hintergrundfluoreszenz. Wird SYBR Green zu einer DNA-haltigen Probe hinzugefügt, bindet der Farbstoff an die kleine Furche der DNA Doppelhelix. Nach erfolgreicher Bindung absorbiert SYBR-Green I blaues Licht der Wellenlänge  $\lambda = 494 \text{ nm}$  und emittiert grünes Licht der Wellenlänge  $\lambda = 521 \text{ nm}$ . Nimmt im Laufe der PCR die Anzahl der Amplikone zu, bindet der Farbstoff an jede neue Kopie doppelsträngiger DNA und die Fluoreszenz nimmt proportional zur Menge des hergestellten Produkts zu. Je größer die Menge der gesuchten, durch spezifischen Primereinsatz gewählten, DNA ist, desto geringer ist die Zyklusanzahl, bis ein Fluoreszenzsignal sichtbar wird. Anhand der Zyklusanzahl kann deshalb die Genexpression hergeleitet werden. Der Schwellenwert, an dem die Fluoreszenz der gebundenen DNA erstmals merkbar über die Hintergrundfluoreszenz leuchtet, markiert den Beginn der exponentiellen Zunahme und wird als Crossing Point (Cp), bzw. Cycle Quantification (Cq), Cycle Threshold (Ct) bezeichnet (Rasmussen 2001). Da nach jedem PCR-Schritt eine Denaturierung der DNA stattfindet, wird der Farbstoff wieder freigesetzt und kann so im nächsten Zyklus erneut an doppelsträngige DNA binden.

Pro Reaktion wurden 3  $\mu\text{l}$  der zuvor synthetisierten und 1:10 verdünnten cDNA mit 12,5  $\mu\text{l}$  iTaq Universal SYBR Green Supermix unter Zugabe von 0,5  $\mu\text{l}$  Forward Primer 10 pM sowie 0,5  $\mu\text{l}$  Reverse Primer 10 pM des zu untersuchenden Gens und 8,5  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O gemischt. Die Proben wurden je Primer in Triplikaten zur Ermittlung eines stabilen Mittelwertes gemäß Tab.3 in eine 96-well Platte luftblasenfrei aufgetragen. Die verwendeten Primersequenzen für *Tnf*, *Il1a*, *Il1b*, *Il6*, *Il10*, *Tgfb1*, *Inhba*, *Ido1*, *Cst11*, *Ltf*, *Clec4e*, *Ptgs2*, *Rna18s* und *Rplp0* können der Primerliste entnommen werden. Anschließend wurde die Platte mit einem Mikrosegel verschlossen und im CFX96 Cycloer gemäß Tab.4 inkubiert:

#### IV. Methoden

**Tab. 4: Schema des qPCR-Cyclers.**

Schritt	Zyklen	Temperatur	PCR-Schritt	Dauer
1	1 x	95 °C	Denaturierung	1 min
2	45 x	95 °C	Denaturierung	15 s
3		55 °C	Primerhybridisierung	30 s
4		72 °C	Elongation	30 s
5	1 x	50-95 °C	Schmelzkurve	10 min
6	1x	20 °C	Abkühlung	∞

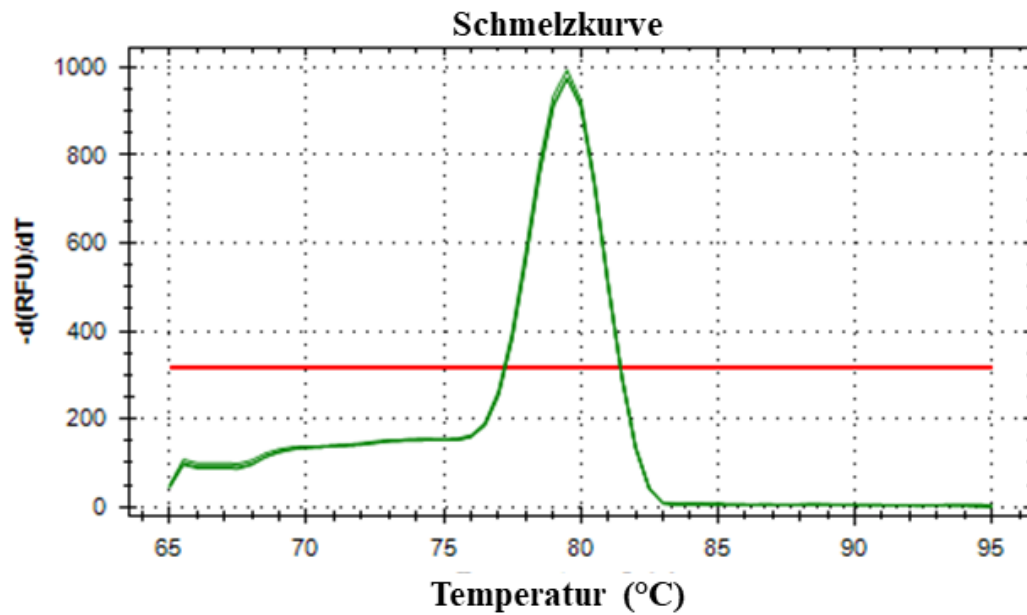
Zur Erstellung einer Schmelzpunktkurve wird nach Ablauf der einzelnen Zyklen die Temperatur in 5 °C Schritten für je 5 s von 50 °C auf 95 °C erhöht und die Fluoreszenzintensität gemessen. Je nach Zusammensetzung der vorliegenden DNA nimmt die Intensität spezifisch ab, da jede DNA bei einer individuellen Temperatur denaturiert und sich somit der Farbstoff aus der Doppelhelix lösen kann. Faktoren, die zu den unterschiedlichen Schmelzpunkten beitragen, sind u.a. die Länge der Fragmente sowie die Basenabfolge mit einhergehenden Wasserstoffbrückenbindungen. Wird die Fluoreszenzintensität gegenüber der Temperatur aufgetragen, entsteht die Schmelzkurve der Probe.

Die Schmelzpunktkurve ist für jede Probe spezifisch und lässt dabei Rückschlüsse auf die Qualität der Probe schließen. Ein einzelner Peak spricht für eine hohe Primerspezifität und die alleinige Amplifikation des gewünschten Genes, während mehrere Gipfelwerte auf eine unerwünschte Amplifikation von Verunreinigungen hinweisen (Abb. 4). Die zuvor synthetisierte cDNA wurde 1:10 mit RNase freiem Wasser verdünnt und mit dem Master Mix entsprechend dem Pipettierschema in Tab. 5 vermischt.

Für jedes untersuchte Gen wurden mindestens drei unabhängige Experimente mit jeweils drei technischen Replikaten durchgeführt.



#### IV. Methoden



**Abb. 4: Schmelzkurven des Primers //1a von Triplets der gleichen Probe.** Die gezeigten qPCR-Schmelzkurven (grüne Kurven) weisen einen Schwellenwert (rote Linie) auf, der den Beginn des exponentiellen Anstiegs markiert.

**Tab. 5: Pipettierschema für die quantitative Real Time PCR.**

Bio-Rad qPCR Mix	
Volumen	Reagenzien
12,5 µl	iTaq Universal SYBR Green Supermix
0,5 µl	Forward Primer 10 pM
0,5 µl	Reverse Primer 10 pM
8,5 µl	RNase freies Wasser
3 µl	1:10 verdünnte cDNA
25 µl	Endvolumen

## IV. Methoden

### 3.9. Berechnung der relativen Expression von Zielgenen

Für die Analysen dieser Experimente wurde die Berechnung der relativen Genexpression gewählt. Der Vergleich des Expressionsprofils zwischen den einzelnen Zielgenen unterliegt teilweise starken Schwankungen, die leicht zu Missverständnissen führen können. Deshalb wird eine interne Referenz benötigt, die in allen Behandlungsgruppen gleich exprimiert wird und anhand derer die relative Expression normiert werden kann. Da in dieser Studie mit Infektionsmodellen gearbeitet wurde, wird ein Referenzgen benötigt, welches von äußeren Schwankungen, wie Pathologien, nicht beeinflusst wird und im Zusammenhang mit dem Grundstoffwechsel der Zelle einer konstanten Expression unterliegt. Im experimentellen Ansatz zeigt sich jedoch, dass auch diese Referenzen Schwankungen unterliegen und es kein perfektes Referenzgen gibt (Svingen et al. 2014). Vielmehr muss für jedes geplante Experiment individuell eine adäquate Lösung gefunden werden. Aufgrund dieser Tatsachen empfiehlt es sich daher auch, die interne Referenzkontrolle auf mehrere Referenzgene verschiedener Signalwege aufzuteilen, sodass die einzelnen Schwankungen sich gegenseitig ausbalancieren können.

Für die Auswertung der Ergebnisse wurden zusätzlich zu den untersuchten regulierten Zielgenen alle Proben auf die Genexpression von *Rna18s* (18S rRNA) und *Rplp0* (saures ribosomales 60S-Protein P0) untersucht und daraus der Mittelwert gebildet. Für die weitere Berechnung mit der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode wurde im Anschluss der  $\Delta C_t$  berechnet, welcher die Differenz der  $C_q$  Werte des Zielgens und der  $C_q$  Werte des Mittelwertes der Referenzgene derselben Probe beschreibt. Als nächstes wurde der  $\Delta C_t$  des Zielgens der unbehandelten Proben als Kalibrator festgelegt und der Mittelwert daraus gebildet. Infolgedessen wurde dann die Differenz der  $\Delta C_t$  Werte der Zielgene aller, sowohl der unbehandelten, als auch der behandelten Proben zu dem Kalibrator berechnet, was als  $\Delta\Delta C_t$  Wert bezeichnet wird. Im letzten Schritt wurde die relative Genexpression anhand des "fold changes" des  $\Delta\Delta C_t$  Wertes mithilfe der Formel  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  berechnet. Dabei steht "2" für eine Amplifikationsrate von 100 % pro Zyklus.

### 3.10. Durchführung einer Verdünnungsreihe zur Kalkulation der Primereffizienz

Zur genauen Ermittlung der Primereffizienz wurde eine lineare Regressionsanalyse für eine selbst angefertigte Verdünnungsreihe angefertigt. Hierzu wurde die cDNA dekadisch verdünnt (unverdünnt, 1:10 [1,5  $\mu$ l unverdünnte cDNA + 13,5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O], 1:100 [1,5  $\mu$ l 1:10 cDNA + 13,5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O], 1:1000 [1,5  $\mu$ l 1:100 cDNA + 13,5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O]). Jede Konzentration wurde je Primer in Triplikaten zur Ermittlung eines Mittelwertes in eine 96-well Platte luftblasenfrei aufgetragen und mit dem oben beschriebenen Master Mix vermischt. Zur Erstellung einer Standardkurve wurden die  $C_q$ -Werte der einzelnen

#### IV. Methoden

Proben gegenüber den korrespondierenden cDNA-Konzentrationen aufgetragen und anschließend die Steigung (m) der entstehenden Regressionsgerade ermittelt. Proben mit hohen Konzentrationen überschreiten früher den Schwellenwert der exponentiellen Zunahme und haben deshalb niedrigere C<sub>q</sub>-Werte. Es konnte eine proportionale Korrelation zwischen cDNA-Menge und Größe des amplifizierten Produkts festgestellt werden.

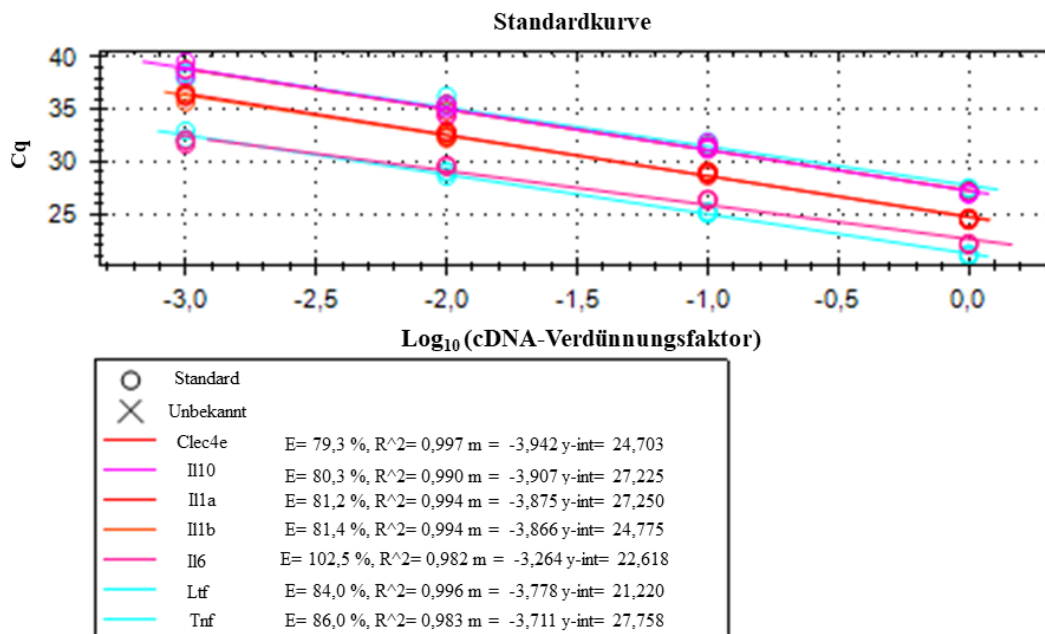
Die Effizienz (E) wird anhand der folgenden Formel berechnet:

$$E = 10^{-1/m} - 1$$

Unter idealen Bedingungen sollte die rechnerische Effizienz dabei bei 100 % liegen. Dies entspräche einem Korrelationskoeffizienten von 1. Im realen Laboralltag sind Schwankungen von ± 20 % als gute Werte anzusehen.

Die Effizienzberechnungen der Primer *Clec4e*, *Il10*, *Il1a*, *Il1b*, *Il6*, *Ltf* und *Tnf* sowie *Rna18s*, *Ptgs2*, *Cst11*, *Ido1*, *Inhba*, *Rplp0* und *Tgfb1* waren alle im verwendbaren Bereich und wurden deshalb für fortlaufende Experimente eingesetzt (Abb. 5 und Abb. 6)

#### IV. Methoden

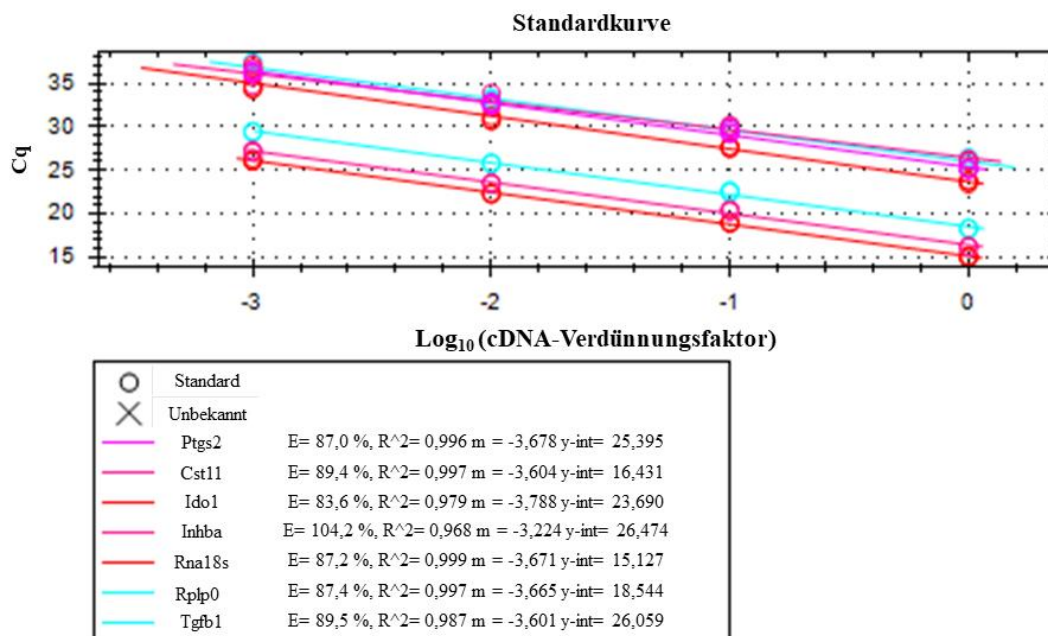


**Abb. 5: Standardkurve der Verdünnungsreihe unter Verwendung angezeigter Primer.**

y-Achse : Cq-Wert= Anzahl der Zyklen bis zum Erreichen des Schwellenwertes

x-Achse : log10= Verdünnungsfaktor der cDNA

E = Effizienz, R<sup>2</sup>= Bestimmtheitsmaß, m= Steigung, y-int= y-Achsenabschnitt



**Abb. 6: Standardkurve der Verdünnungsreihe unter Verwendung angezeigter Primer.**

y-Achse : Cq-Wert= Anzahl der Zyklen bis zum Erreichen des Schwellenwertes  
 x-Achse : log10= Verdünnungsfaktor der cDNA

E = Effizienz, R<sup>2</sup>= Bestimmtheitsmaß, m= Steigung, y-int= y-Achsenabschnitt

## IV. Methoden

### 4. Proteinanalyse mit dem LEGENDplex Mouse Inflammation Panel

#### 4.1. Isolierung der Proteine

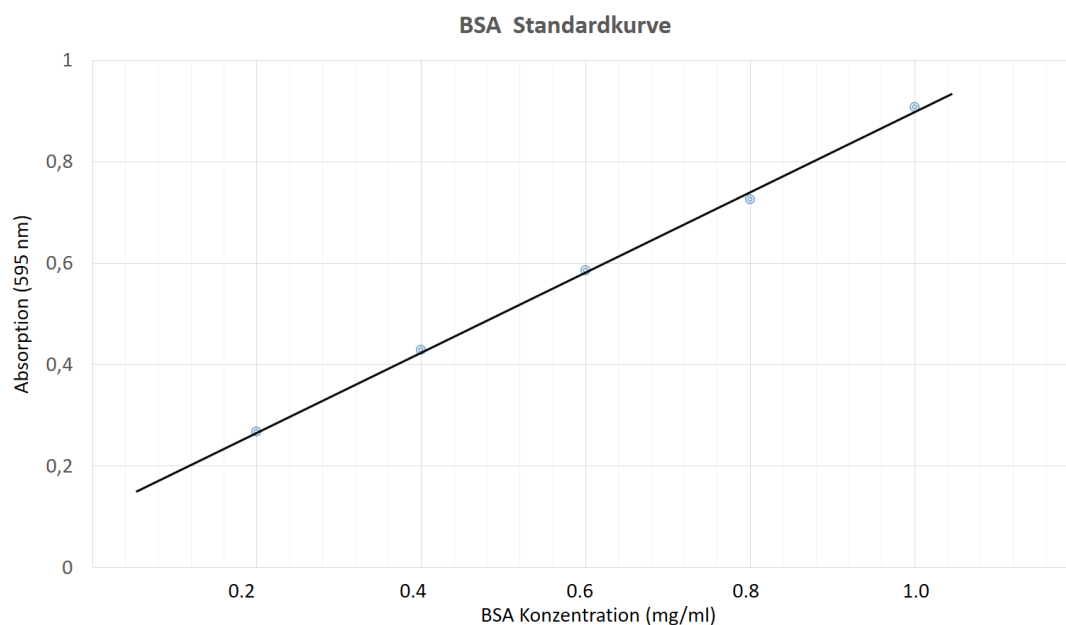
Die Quantifizierung der zu untersuchenden Zytokine auf Proteinlevel wurde mittels LEGENDplex Mouse Inflammation Panel Multiplex Testsystem durchgeführt. Für den Versuch benötigtes Gewebe wurde gemäß dem Protokoll aus 3.1 entnommen, in die einzelnen Epididymisregionen geteilt und separiert voneinander in 50 ng/ml LPS für 6 h inkubiert. Der Überstand mit dem Kulturmedium wurde im Anschluss abpipettiert und separiert in einem frischen Mikroreaktionsgefäß bei -80 °C aufbewahrt. Im Kulturmedium waren die sekretierten Proteine enthalten, welche zusätzliche Informationen über die inflammatorische Aktivität im Gewebe geben. Die Gewebestückchen wurden mehrfach mit PBS gewaschen und anschließend mit 250 µl des Radioimmunpräzipitations-Assay-Puffer (RIPA-Puffer) versehen. Dieser setzte sich aus dem Puffersystem Tris/HCl Puffer pH 7,4 sowie den Salzionen NaCl zusammen, welche die enthaltenen Proteine vor der Ausfällung bewahren. Zusätzlich wurden die Detergentien Triton-X-100 und IgepalCA-630 zugegeben, welche Membranen und Zellen für die Extraktion lysieren. Zum Schutz der Proteine vor der Aktivität von ubiquitären Proteasen wurde der Proteaseinhibitor PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) zugegeben. EDTA entzieht Proteasen divalente Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$ . Das Gewebe wurde anschließend gemäß dem Protokoll aus IV.3.2. homogenisiert. Das Homogenat wurde im Anschluss bei 12.000 x g für 20 min zentrifugiert und der Überstand mit den enthaltenen löslichen Proteinen vom erhaltenen Pellet abpipettiert.

#### 4.2. Messung der Proteinkonzentration

Für die fotometrische Ableitung der Proteinkonzentrationen der Proben wurde eine Standardverdünnungsreihe mit bovinem Serum Albumin (BSA) angefertigt. Dazu wurde Protein Assay Dye Reagent Concentrate 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. 1 mg BSA wurde in 1 ml Wasser aufgelöst und weiter in die Konzentrationen 0,8 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,4 mg/ml und 0,2 mg/ml verdünnt. 20 µl der verschiedenen BSA Konzentrationen wurden mit 1 ml des verdünnten Protein Assay Dye Reagent Concentrate versehen und für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Wellenlängen der Proteine mit dem Spectrophotometer ULTROSPEC 2100pro gemessen. Aus den gemessenen Werten wurde eine BSA-Standardkurve angefertigt, die die verschiedenen Konzentrationen abdeckt (Abb. 7). Das Prinzip beruht darauf, dass der im Protein Assay Dye Reagent Concentrate enthaltene Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) mit Proteinen in der zu untersuchenden Probe Komplexe bildet. Diese Bindung verschiebt das Absorptionsmaximum des Farbstoffs auf einen Wert von 595 nm, wobei eine Zunahme

## IV. Methoden

der Extinktion als Maß für eine Zunahme der Proteinkonzentration gewertet werden kann. Von den untersuchten Proben wurden ebenfalls 20 µl mit 1 ml des verdünnten Protein Assay Dye Reagent Concentrate vermengt und nach 5 min die Extinktion bei 595 nm gemessen. Der hier gemessene Wert wurde mit denen aus der BSA-Standardkurve verglichen und daraus die Proteinkonzentration abgeleitet.



**Abb. 7: BSA Standardkurve.**

Verdünnungsreihe von Bovinem Serum Albumin (BSA) zur fotometrischen Ableitung der Proteinkonzentration der behandelten Proben.

### 4.3. Proteindetektion mithilfe der LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel Detection Antibodies

Zur Detektion der verschiedenen Zytokin-Konzentrationen wurde das LEGENDplex Kit der Firma BioLegend verwendet. Dieses Bead-basierte Verfahren funktioniert nach dem Basisprinzip eines Immunassays, dem Nachweis eines Analyten unter Gebrauch eines fluoreszierenden Antikörpers oder Antigens (Hicks, 1984). Der Vorteil gegenüber eines standardisierten ELISA-Verfahrens besteht darin, dass aufgrund der verschiedenen Bead-Populationen, die an ihrer Oberfläche Antikörper für ein spezifisches Protein besitzen, mit deutlich weniger Probevolumen eine Vielzahl verschiedener Messgrößen (absolute Zytokinkonzentrationen), gleichzeitig nachgewiesen werden kann. Das Mouse Inflammation Panel weist klassische Zytokine der angeborenen Immunantwort sowie der Aktivierung der adaptiven Immunantwort nach. Zu diesen zählen: TNF, IL1A, IL1B, IL6, IL10, IL12P70, IL17A, IL23, IL27, CCL2 (MCP1), IFNB, IFNG, und CSF2 (GMCSF).

## IV. Methoden

Initial wurden jeweils 1 ml der zu untersuchenden homogenisierten Proben der Konzentration 1 µg/ml sowie jeweils 1 ml des Überstandes mit den verschiedenen Bead-Populationen vermischt. Die Beads sind durch spezifisch gebundene Antikörper mit verschiedenen Konzentrationen des Fluoreszenzfarbstoffes Allophycocyanin (APC) ausgestattet. Aufgrund dessen besitzt jede Population ihr spezifisches Fluoreszenzmuster auf dem Streudiagramm und kann somit von den anderen unterschieden werden. Im Anschluss wurden biotinylierte Antikörper, die ebenfalls spezifisch zum gesuchten Zytokin sind, eingesetzt. Daraufhin wurde Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) zugegeben, welches an die biotinylierten Antikörper bindet und aufgrund des Farbstoffes Phycoerythrin ein zur gebundenen Menge proportionales Fluoreszenzsignal abgibt. Die Probe wurde damit in einen "Sandwich" genommen. Zwischen den einzelnen Schritten fanden Wasch- und Inkubationsvorgänge statt. Das Mouse Inflammation Panel besitzt zwei verschiedene Bead-Sets (A und B), welche anhand ihres Forward Scatter (FSC) und Side Scatter (SSC) mit einem Durchflusszytometer detektiert werden. Jede Bead-Population kann einem bestimmten Zytokin zugeordnet werden. Die finale Proteinkonzentration wurde durch die vom Hersteller bereitgestellte Standardkurve ermittelt.

## 5. Anteil intrazellulärer UPEC im Gewebe

### 5.1. Herstellung einer Agar-Agar Platte

Zur Herstellung eines Agar-Agar Nährbodens wurde im ersten Schritt Luria Bertani (LB)-Medium hergestellt. Dazu wurden 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Pepton und 10 g/l Natriumchlorid (NaCl) in destilliertem Wasser mithilfe eines Magnetrührers gelöst. Der leicht saure pH-Wert des Gemischs wurde mit einem pH-Meter durch tröpfchenweise Zugabe von Natriumhydroxid (1 M NaOH) bis zum Erreichen eines pH-Werts von 7 eingestellt. Zuletzt wurde 15 g/l Galactose-Polymer Bacto Agar hinzugegeben, damit ein elastisches, aber ausreichend mechanisch stabiles Gel entstehen konnte. Zur Sterilisation sowie Erhöhung der Löslichkeit des Gels wurde es für 20 Minuten bei 121 °C im Autoklav Systec V-95 autoklaviert und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, wodurch das Medium polymerisierte.

Für die langfristige Aufbewahrung wurde das Nährmedium bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Zum Gießen gebrauchsfertiger Platten wurde das hergestellte Medium in der Mikrowelle erwärmt und in Petrischalen (10 cm Durchmesser) gegossen. Bis zur vollständigen Abkühlung und Aushärtung wurden die Platten unter der Sterilbank gelagert.

## IV. Methoden

### 5.2. Isolation, Inkubation und Homogenisierung des Gewebes sowie Auszählung der gewachsenen Kolonien

Für den Versuch benötigtes Gewebe wurde gemäß dem Protokoll aus IV.2.1 entnommen, in die einzelnen Epididymisregionen geteilt und separiert voneinander in 6-Well-Platten mit jeweils  $0,8 \times 10^6$  UPEC Bakterien für 4 Stunden inkubiert. Nach dem Waschvorgang wurde zum Gewebe der Untersuchungsgruppe 1 ml 200 µg/ml Gentamicin (in Kulturmedium) zugegeben und für 3 h inkubiert. Anschließend fanden erneut zwei Waschvorgänge mit PBS statt. Die Gewebstücke wurden im Homogenisierer Potter S 8533024 in 200 µl PBS homogenisiert und in ein separates Mikroreaktionsgefäß transferiert. Das Homogenat wurde 1:50 und 1:500 verdünnt und auf den Petrischalen ausgestrichen. Die Agar-Platten wurden 14 h im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die koloniebildenden Einheiten (CFU, englisch: Colony Forming Units) ausgezählt. Zusätzlich zur Untersuchungsgruppe, die sowohl UPEC, als auch Gentamicin enthielt, wurde eine Kontrollgruppe, die nur UPEC, aber kein Antibiotikum enthielt, untersucht, um zu überprüfen, ob die Bakterien auf dem hergestellten Agar überlebensfähig waren. Zur Überprüfung, ob das Antibiotikum und andere verwendete Lösungen (v.a. PBS) kontaminationsfrei waren, wurde eine Kontrollgruppe, die keine Bakterien, aber Gentamicin enthielt, untersucht.

### 6. Statistische Auswertung

Für jeden Versuch wurden mindestens drei unabhängige Experimente mit jeweils drei biologischen Replikaten durchgeführt. Aus den ermittelten Werten wurde der Mittelwert gebildet und zusammen mit dem Standardfehler (SEM, englisch: Standard Error of the Mean) in Balkendiagrammen dargestellt. Der statistische Vergleich der relativen basalen mRNA-Expression von *Tnf*, *Il1a*, *Il1b*, *Il6* und *Il10* sowie von *Tgfb1*, *Inhba*, *Ido1*, *Cst11*, *Ltf*, *Clec4e* und *Ptgs2* aus Ergebnisteil V.1. wurde mit der einfachen Varianzanalyse (One-Way ANOVA) durchgeführt. Ziel der Untersuchung war die Beantwortung der Fragestellung, ob signifikante Unterschiede der Mittelwerte der mRNA Genexpression (abhängige Variable) in den verschiedenen Organregionen (unabhängige Variable) bestehen. Im Anschluss daran wurden die Mittelwerte aller verschiedenen Gruppen via Tukey-Test verglichen. Mit Hilfe des Tukey Post-hoc-Tests wurde die Signifikanz der Mittelwerte aller Gruppen jeweils paarweise verglichen. Der statistische Vergleich der relativen mRNA-Expression von *Tnf*, *Il1a*, *Il1b*, *Il6* und *Il10* sowie von *Tgfb1*, *Inhba*, *Ido1*, *Cst11*, *Ltf*, *Clec4e* und *Ptgs2* aus Ergebnisteil V.2.2., V.2.4., V.3.1. und V.3.2. wurde mit der zweifachen Varianzanalyse (Two-way ANOVA) durchgeführt. Ziel der Untersuchung war die Beantwortung der Fragestellung, ob die Zeitdauer der Exposition und die Inkubation ohne LPS oder Bakterien/ Inkubation mit LPS oder Bakterien (unabhängige



#### IV. Methoden

Variablen) einen signifikanten Einfluss auf die Mittelwerte der mRNA Genexpression (abhängige Variable) haben. Mit Hilfe des Bonferroni Post-hoc-Tests wurde der Alpha-Fehler korrigiert und paarweise verglichen, ob die Gruppen Inkubation ohne LPS oder Bakterien/ Inkubation mit LPS oder Bakterien signifikant sind. Der statistische Vergleich der absoluten Zytokinkonzentrationen von TNF, IL1A, IL1B, IL6, IL10, IL12P70, IL17A, IL23, IL27, CCL2 (MCP1), IFNB, IFNG, und CSF2 (GMCSF) aus Ergebnisteil V.2.3. wurde ebenfalls mit der zweifachen Varianzanalyse (Two-way ANOVA), gefolgt vom Bonferroni-Test, durchgeführt.

Sämtliche statistischen Tests wurden mit der Software GraphPad Prism 7.02 berechnet.

## V. Ergebnisse

### 1. Immunregulation der Epididymis

#### 1.1 Detektion der Basalexpression von Zytokinen

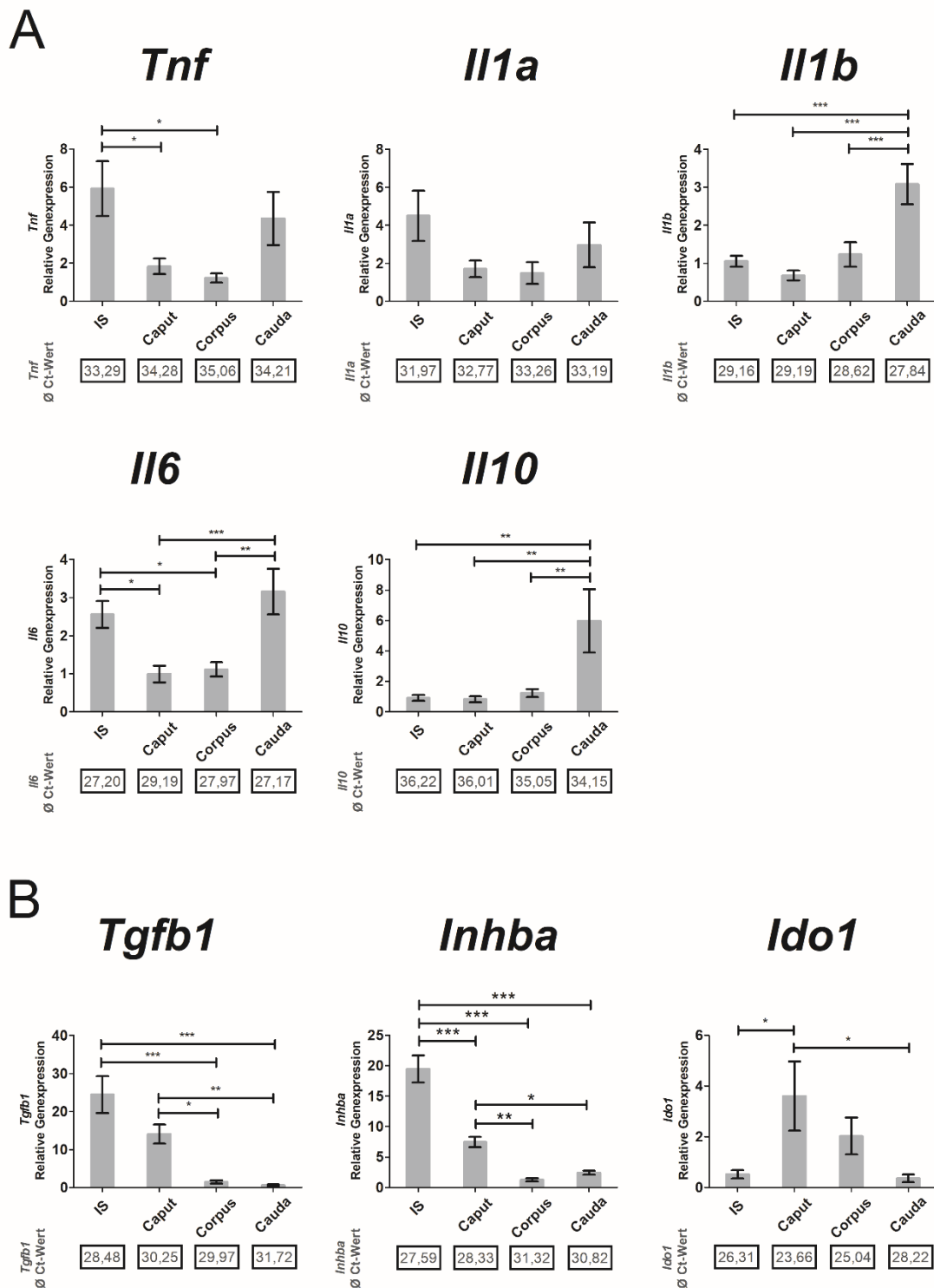
Zunächst wurde die basale mRNA Expression der für die Fragestellung selektierten pro- und anti-inflammatorischen Zytokine in den verschiedenen epididymalen Regionen (IS, Caput, Corpus und Cauda) quantitativ erfasst. Dabei diente der Corpus aufgrund seiner anatomischen Lage und der mittleren Genexpression als Kalibrator, zu dem die Expression in allen anderen Regionen in Relation gesetzt wurde.

Die untersuchten Zytokine waren überwiegend in der Cauda, insbesondere im Vergleich zu Caput und Corpus, am höchsten exprimiert. *Il1b* war ca. 3-fach erhöht, *Il6* war ca. 3-fach erhöht und *Il10* war ca. 6-fach erhöht. Lediglich *Tnf* (ca. 6-fach erhöht) und *Il6* (ca. 2,5-fach erhöht) waren zusätzlich im IS hoch exprimiert (Abb. 8).

#### 1.2 Detektion der Basalexpression ausgewählter immunmodulierender Gene

Basierend auf den RNA-Sequenzierungsergebnissen von UPEC-infizierten wildtypischen Mäusen (Pleuger et al. 2022) wurde die mRNA Expression unter physiologischen Bedingungen (ohne inflammatorische Stimuli) von weiteren immunmodulierenden Faktoren (*Tgfb1*, *Inhba*, *Ido1*, *Cst11*, *Ltf*, *Clec4e*, *Ptgs2*) untersucht. Dabei diente der Corpus aufgrund seiner anatomischen Lage und der mittleren Genexpression als Kalibrator, zu dem die Expression in allen anderen Regionen in Relation gesetzt wurde. Alle untersuchten Faktoren zeigten deutliche regionale Unterschiede in ihrer Expression. *Tgfb1*, *Inhba*, *Ido1* und *Cst11* zeigten in proximalen Nebenhodenregionen erhöhte Genexpressionswerte. *Tgfb1* und *Inhba* waren im IS ca. 20-fach und im Caput ca. 10-fach erhöht. *Ido1* war im Caput ca. 4-fach erhöht. *Cst11* war im IS ca. 7-fach erhöht. *Ltf* und *Clec4e* zeigten in distalen Nebenhodenregionen erhöhte Genexpressionswerte. In der Cauda war *Ltf* ca. 10-fach und *Clec4e* ca. 4-fach erhöht (Abb. 8 und Abb. 9).

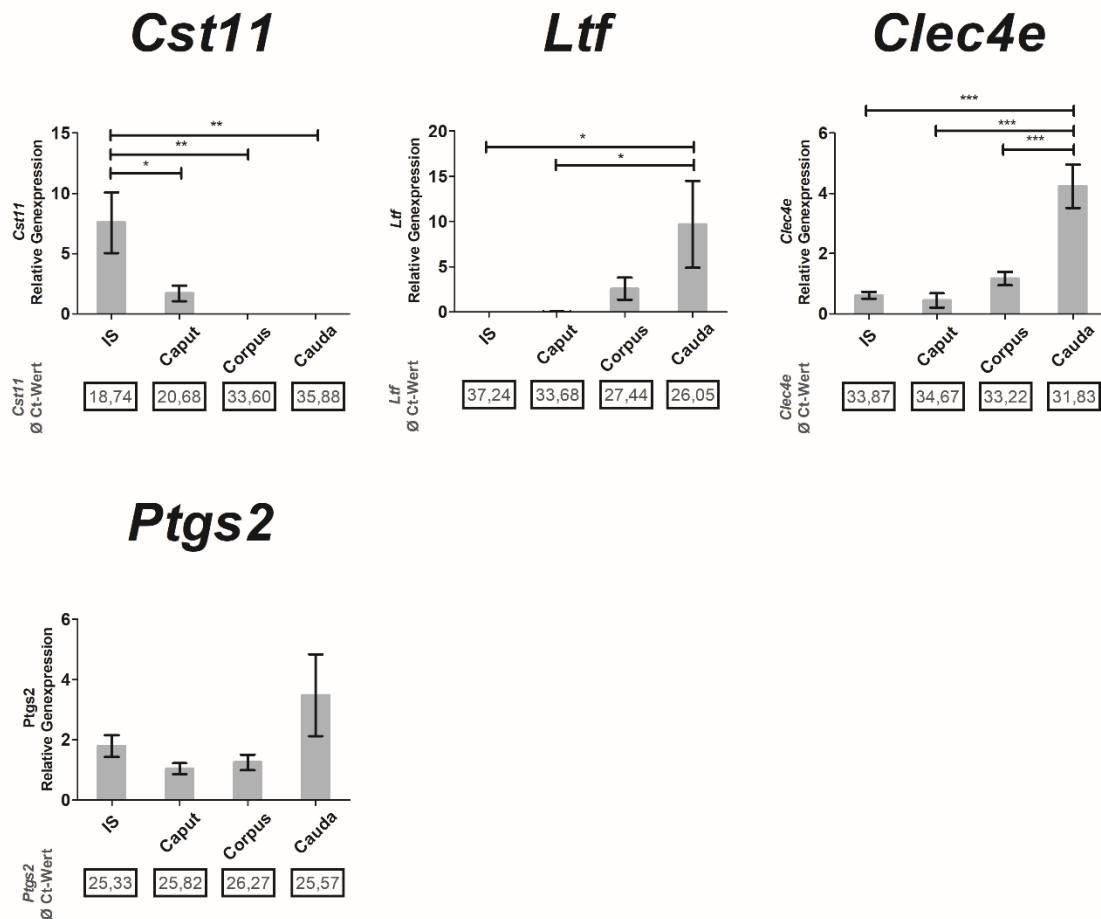
V. Ergebnisse



**Abb. 8: Relative Genexpression sowie durchschnittliche Ct-Werte selektierter Zytokine (A) und immunmodulierender Gene (B) in epididymalen Regionen**

mRNA Expressionslevel von unbehandelten (Inkubation in Medium ohne LPS) epididymalen Regionen über 1, 3 und 6 Stunden (24,5 % CO<sub>2</sub>). Mittelwert +- SEM, One-way ANOVA mit Tukey posthoc Test, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001

## V. Ergebnisse



**Abb. 9: Relative Genexpression sowie durchschnittliche Ct-Werte immunmodulierender Gene in epididymalen Regionen**

mRNA Expressionslevel von unbehandelten (Inkubation in Medium ohne LPS) epididymalen Regionen über 1, 3 und 6 Stunden (24,5 % CO<sub>2</sub>). Mittelwert +- SEM, One-way ANOVA mit Tukey posthoc Test, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001

## V. Ergebnisse

### 2. Ergebnisse der Zytokinexpression/ -sekretion

#### 2.1 Empirische Ermittlung der geeigneten LPS-Dosis für nachfolgende Experimente

Zur Etablierung des LPS Modells wurden zunächst Zytokin-Expressionsprofile nach erfolgter *ex vivo* Organkultur mit verschiedenen Konzentrationen LPS (10 ng, 50 ng, 100 ng) erstellt, um die geeignete Konzentration für weiterführende Experimente empirisch zu ermitteln. Dabei zeigte die Dosis 50 ng/ml konstante Ergebnisse in der Zytokinexpression (*Tnf*, *Il1a*, *Il1b*, *Il6*, *Il10* und *Inhba*) und wurde deshalb als Dosis für die nachfolgenden Experimente ausgewählt (Abb. 10, Abb. 11 und Abb. 12).

#### 2.2 Relative Zytokinexpressionen nach einer *ex vivo* Inkubation mit LPS

Die *ex vivo* Behandlung mit LPS führte zu einem signifikanten Expressionsanstieg von *Tnf*, *Il1a*, *Il1b*, *Il6* und *Il10* im Gegensatz zur Kontrollgruppe, die nur mit Medium inkubiert wurde. Insbesondere distale Organregionen der Epididymis (Corpus und Cauda) zeigten deutliche Hochregulierungen von Zytokinen (Abb. 13). Von den hier untersuchten Zytokinen waren *Tnf*, *Il1a* und *Il6* in distalen Regionen (Corpus und Cauda) im Vergleich zu proximalen Regionen (IS und Caput) am stärksten exprimiert. *Il1b* und *Il10* waren im IS am höchsten exprimiert, zeigten jedoch insgesamt keine deutlichen Unterschiede zwischen proximalen und distalen Regionen. Die deutlichsten relativen Expressionsunterschiede zeigten sich bei den Zytokinen *Tnf* und *Il1a* (Abb. 13).

*Tnf* mRNA wurde nach LPS Stimulation in allen Regionen vermehrt exprimiert. Im Zeitverlauf über 6 h war *Tnf* im IS nach 6 h (10-fach), im Caput nach 6 h (10-fach), im Corpus nach 6 h (25-fach) und in der Cauda nach 6 h (20-fach) am höchsten exprimiert (Abb. 13).

*Il1a* mRNA wurde nach LPS Stimulation in allen Regionen vermehrt exprimiert. Im Zeitverlauf über 6 h war *Il1a* im IS nach 3 h (10-fach), im Caput nach 6 h (5-fach), im Corpus nach 6 h (10-fach) und in der Cauda nach 3 h (25-fach) am höchsten exprimiert (Abb. 13).

*Il1b* mRNA wurde nach LPS Stimulation im IS nach 3 h (5-fach) vermehrt exprimiert (Abb. 13).

*Il6* mRNA wurde nach LPS Stimulation in allen Regionen vermehrt exprimiert. Im Zeitverlauf über 6 h war *Il6* im IS nach 6 h (5-fach), im Caput nach 6 h (5-fach), im Corpus nach 6 h (10-fach) und in der Cauda nach 3 h und 6 h (10-fach) am höchsten exprimiert (Abb. 13).

*Il10* mRNA wurde nach LPS Stimulation in allen Regionen vermehrt exprimiert. Im Zeitverlauf über 6 h war *Il10* im IS nach 3 h (15-fach), im Caput nach 6 h (5-fach), im

## V. Ergebnisse

Corpus nach 6 h (10-fach) und in der Cauda nach 3 h (10-fach) am höchsten exprimiert (Abb. 13).

### 2.3 Absolute Zytokinkonzentrationen nach *ex vivo* Inkubation mit LPS

Als Ergänzung zur Detektion der relativen mRNA Zytokin Expressionslevel der einzelnen Organsegmente wurden die absoluten Zytokin-Proteinkonzentrationen im Homogenat des Gewebes und im Überstand gemessen. Die *ex vivo* Behandlung mit LPS führte in Homogenat und Überstand zu einem signifikanten Zytokinanstieg von TNF, IL1A, IL6, IFNB und MCP1 im Gegensatz zur Kontrollgruppe. Absolut wurden IFNB und IL6 am stärksten erhöht. Von den hier untersuchten Zytokinen waren IL1A, IL6, IL10, IFNB, und MCP1 in distalen Regionen (Corpus und Cauda) im Vergleich zu proximalen Regionen (IS und Caput) deutlich erhöht. TNF war in allen Organregionen gleichmäßig erhöht. IL27, IFNG, CSF2, IL23, IL17A und IL12P70 zeigten durch Stimulation mit LPS keine Veränderung (Abb. 14, Abb. 15 und Abb. 16).

TNF wurde nach LPS Stimulation in allen Regionen vermehrt synthetisiert. Im Homogenat war TNF in IS, Caput, Corpus und Cauda 10-fach erhöht. Im Überstand zeigte sich in Corpus und Cauda eine 20-fache Erhöhung (Abb.14).

IL1A wurde nach LPS Stimulation in distalen Regionen vermehrt synthetisiert. Im Homogenat war IL1A im Corpus ca. 20-fach erhöht. Im Überstand war IL1A im Corpus 5-fach und der Cauda 10-fach erhöht (Abb. 14).

IL1B wurde nach LPS Stimulation nicht signifikant vermehrt exprimiert (Abb.14).

IL6 wurde nach LPS Stimulation in distalen Regionen vermehrt synthetisiert. Im Homogenat war IL6 im Corpus 15-fach und in der Cauda 5-fach erhöht. Im Überstand war IL6 im Corpus 5-fach und in der Cauda 3-fach erhöht (Abb.14).

IL10 wurde nach LPS Stimulation im Homogenat nicht statistisch signifikant vermehrt exprimiert. IL10 wurde nach LPS Stimulation im Überstand in distalen Regionen vermehrt synthetisiert. IL10 war im Corpus 50-fach und in der Cauda 15-fach erhöht (Abb. 14).

IFNB wurde nach LPS Stimulation vor allem in distalen Regionen vermehrt synthetisiert. Im Homogenat war IFNB im IS 5-fach und in Corpus und Cauda 10-fach erhöht. Im Überstand war IFNB im Corpus 60-fach und in der Cauda 40-fach erhöht (Abb.15).

MCP1 wurde nach LPS Stimulation in distalen Regionen vermehrt synthetisiert. Im Homogenat war MCP1 im Corpus 10-fach und in der Cauda 5-fach erhöht. Im Überstand war MCP1 im Corpus 10-fach erhöht (Abb.15).

IL27 und IFNG zeigten in Homogenat und Überstand keine signifikanten Veränderungen (Abb. 15).

## V. Ergebnisse

CSF2, IL23 und IL17A zeigten im Homogenat keine signifikanten Veränderungen und waren im Überstand nicht detektierbar (Abb. 16).

IL12P70 wurde weder im Homogenat, noch im Überstand detektiert (Abb. 16).

### 2.4 Relative Zytokinexpression nach *ex vivo* Inkubation mit UPEC/NPEC

Neben der gezielten immunogenen Aktivierung durch den bakteriellen Bestandteil LPS gibt die Exposition gegenüber lebenden Bakterien wichtige Informationen über den Verlauf der Epididymitis. Die relativen Genexpressionen der mit UPEC und NPEC behandelten Proben wiesen sowohl regionenspezifische, als auch erregerspezifische Unterschiede auf. Während die Inkubation mit UPEC lediglich deutlich erhöhte *Tnf* Expressionswerte zeigte, waren alle der hier untersuchten Zytokine durch NPEC-Inkubation in mindestens einer Region deutlich erhöht. Andererseits zeigte UPEC-Inkubation bei den Zytokinen *Il1a*, *Il1b*, *Il6*, und *Il10* eine regional abhängige Herunterregulation. Bei den hier untersuchten Zytokinen zeigten sich weder durch UPEC-, noch durch NPEC-Inkubation deutliche Unterschiede zwischen proximalen und distalen Regionen. Die deutlichsten relativen Expressionsunterschiede zeigten sich bei beiden Behandlungsgruppen bei *Tnf* (Abb. 17).

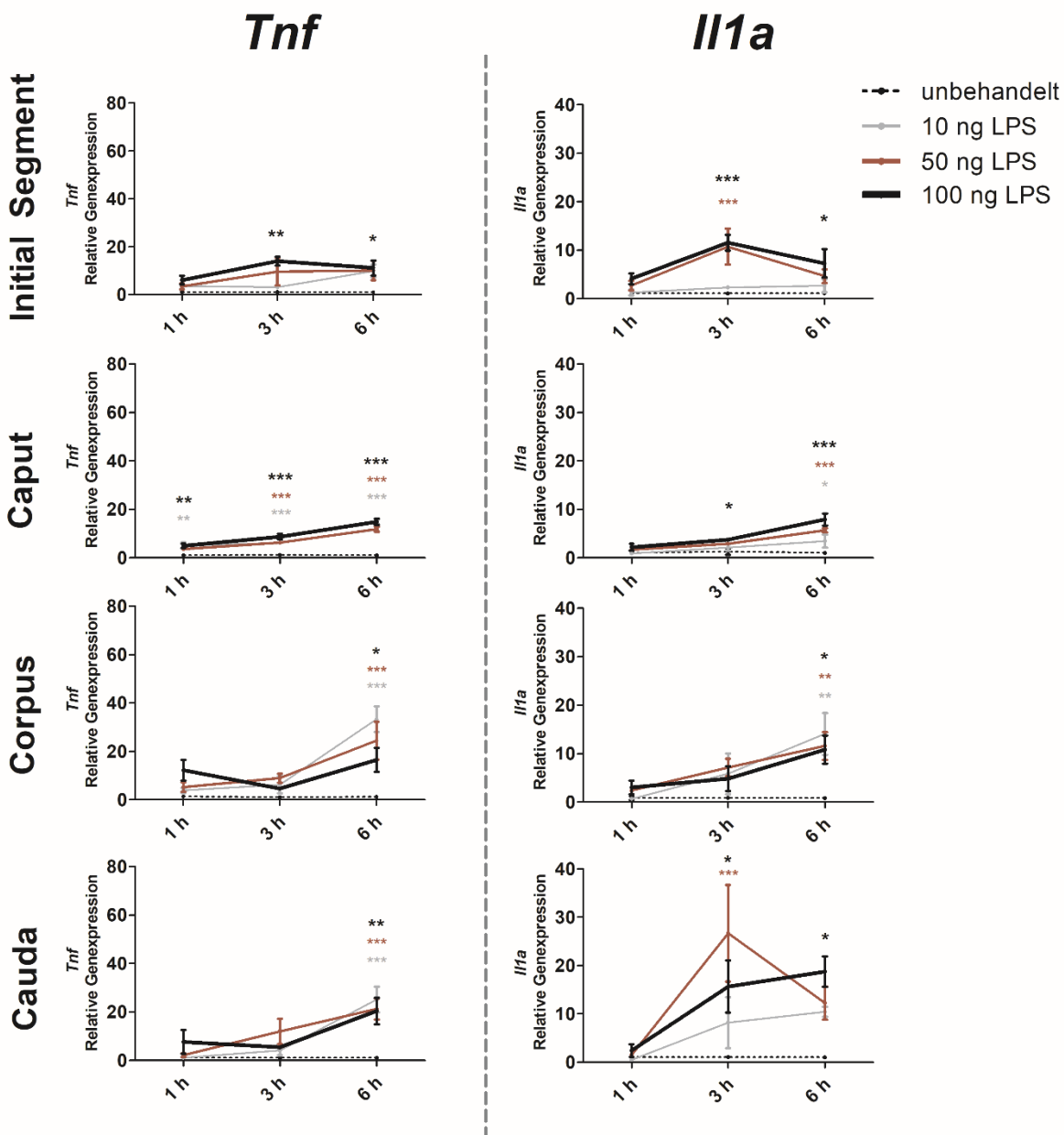
*Tnf* mRNA wurde durch Stimulation mit UPEC und NPEC nicht statistisch signifikant erhöht (Abb. 17).

*Il1a* mRNA wurde durch Stimulation mit UPEC nicht statistisch signifikant erhöht. *Il1a* mRNA wurde durch Stimulation mit NPEC in der Cauda (5-fach) erhöht (Abb. 17).

*Il1b* mRNA wurde durch Stimulation mit UPEC im Corpus (5-fach) runterreguliert. Durch Stimulation mit NPEC wurde *Il1b* im IS (2-fach) erhöht (Abb. 17).

*Il6* mRNA wurde durch Stimulation mit UPEC und NPEC nicht statistisch signifikant erhöht (Abb. 17).

*Il10* mRNA wurde durch Stimulation mit UPEC nicht statistisch signifikant erhöht. Durch Stimulation mit NPEC wurde *Il10* im IS (15-fach) erhöht (Abb. 17).



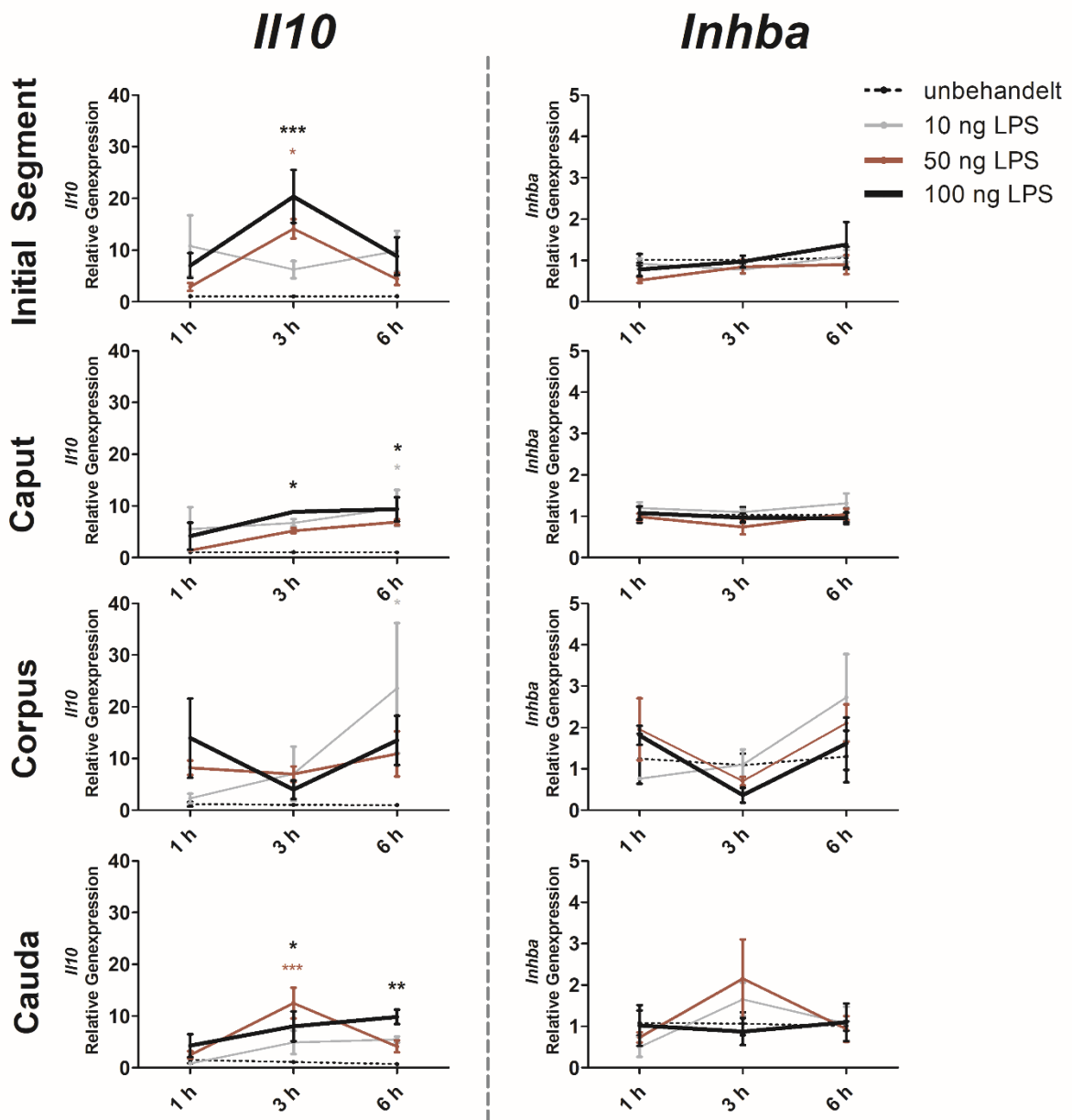
**Abb. 10: Ermittlung der geeigneten LPS-Dosis für weitere Experimente.**

mRNA Expressionslevel von LPS-behandelten epididymalen Regionen (10, 50 und 100 ng/ml) im Vergleich zu Kontrollgewebe (Inkubation in Medium ohne LPS) über 1, 3 und 6 Stunden (24,5 % CO<sub>2</sub>). Mittelwert +- SEM, Two-way ANOVA mit Bonferroni posthoc Test, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001





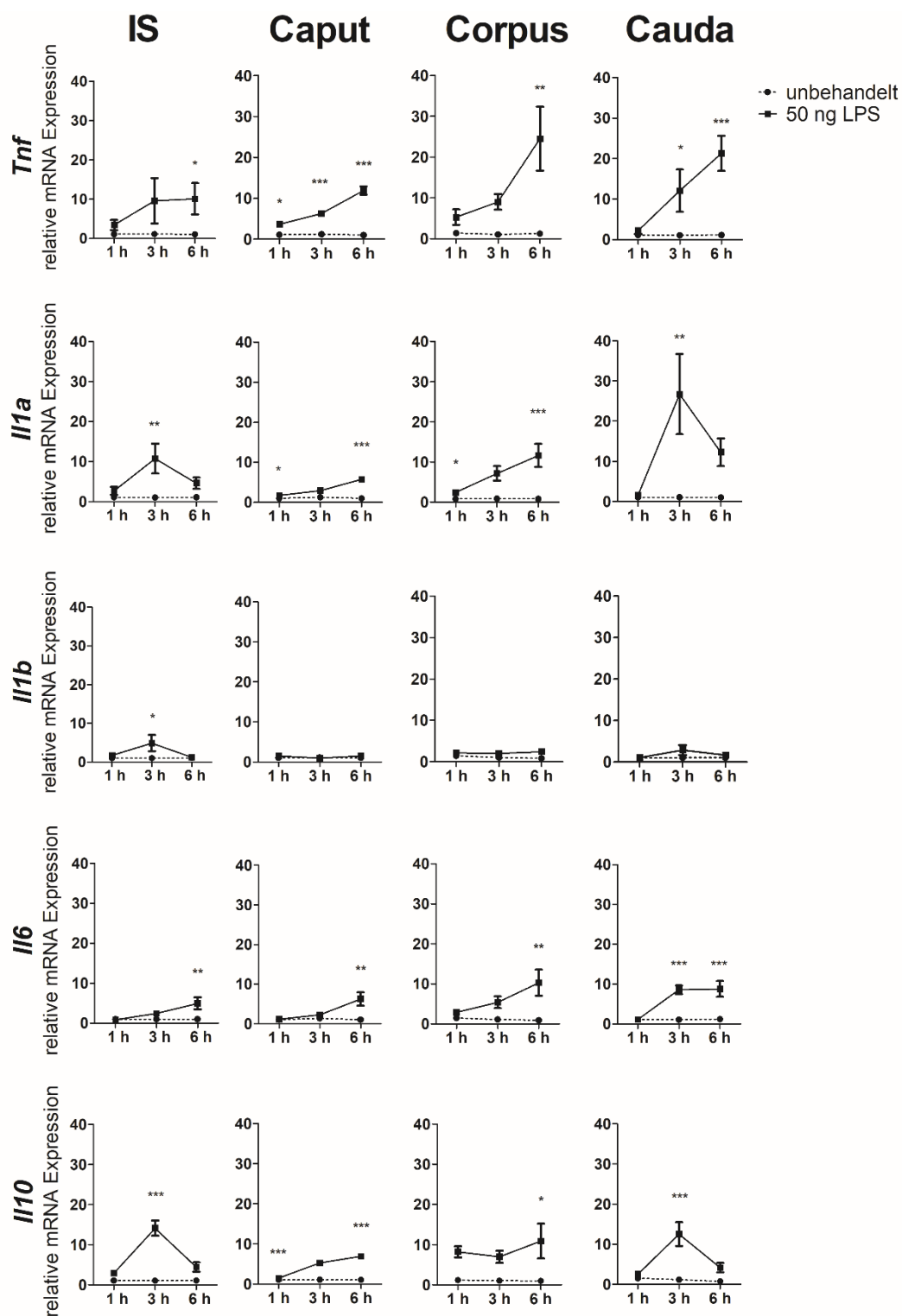
V. Ergebnisse



**Abb. 12: Ermittlung der geeigneten LPS-Dosis für weitere Experimente.**

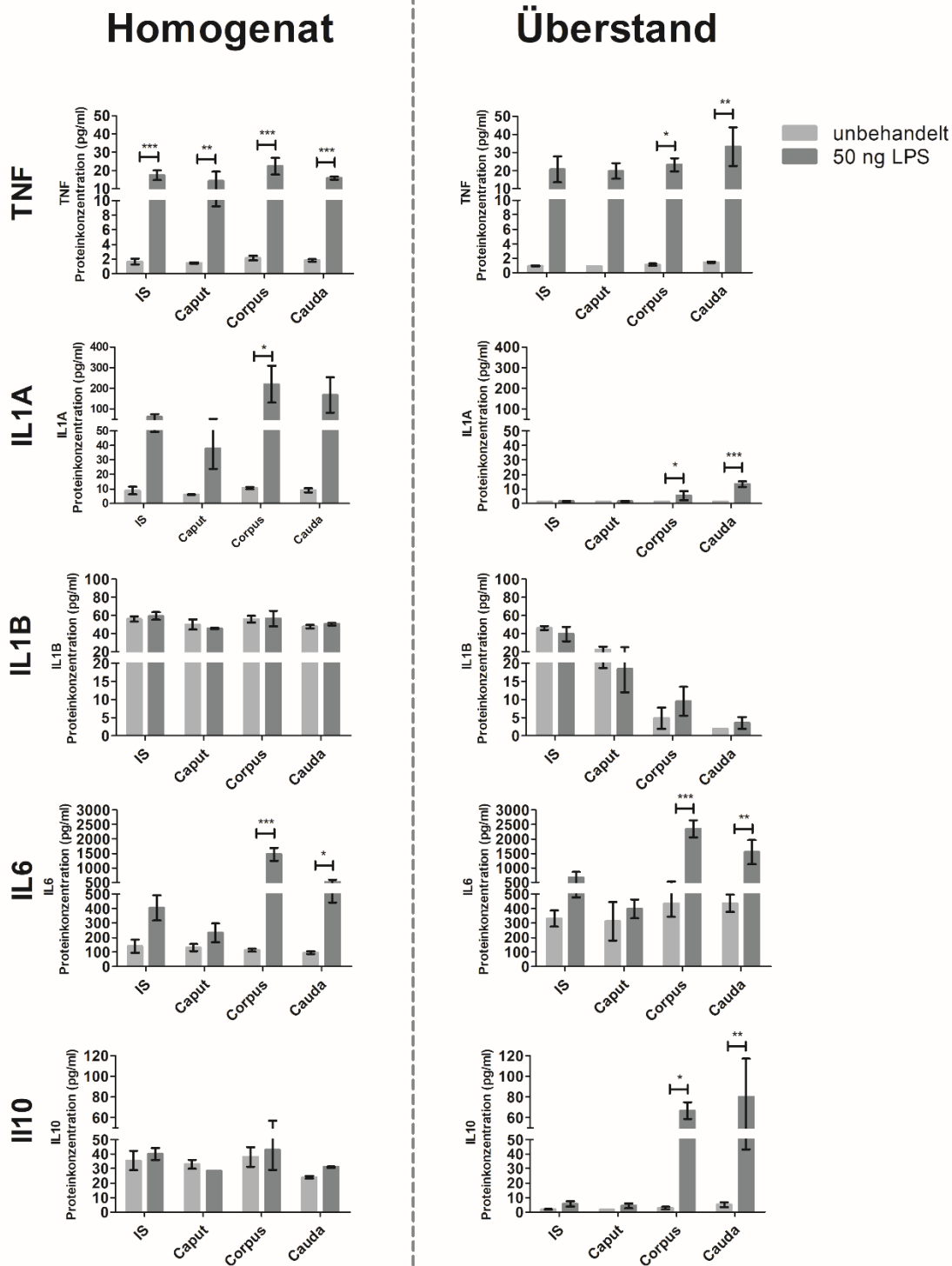
mRNA Expressionslevel von LPS-behandelten epididymalen Regionen (10, 50 und 100 ng/ml) im Vergleich zu Kontrollgewebe (Inkubation in Medium ohne LPS) über 1, 3 und 6 Stunden (24,5 % CO<sub>2</sub>). Mittelwert +- SEM, Two-way ANOVA mit Bonferroni posthoc Test, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001

## V. Ergebnisse



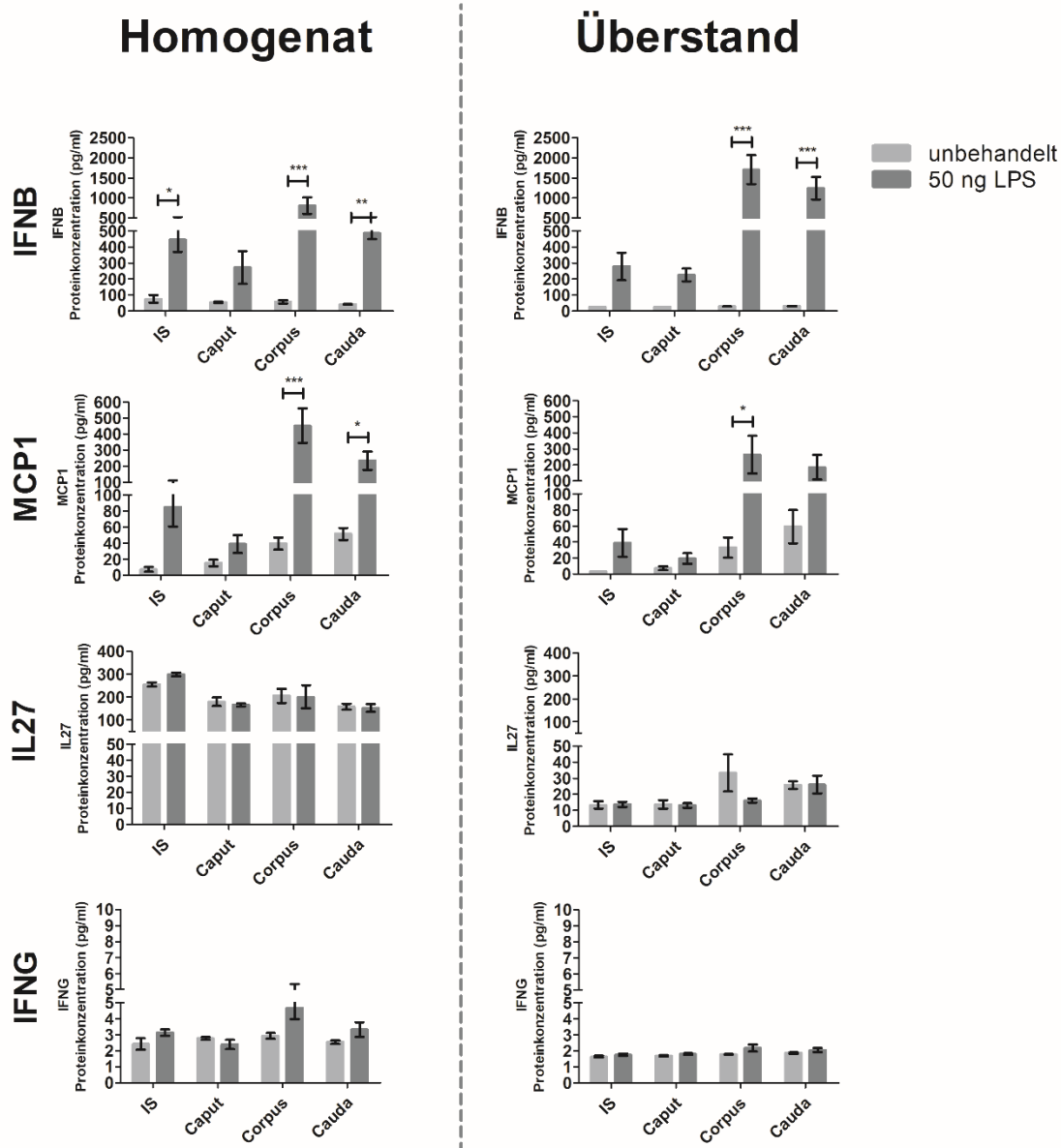
**Abb. 13: Relative Expression inflammatorischer Zytokine nach einer ex vivo Inkubation mit LPS.**

mRNA Expressionslevel von LPS-behandelten epididymalen Regionen (50 ng/ml) im Vergleich zu Kontrollgewebe (Inkubation in Medium ohne LPS) über 1, 3 und 6 Stunden (24,5 % CO<sub>2</sub>). Mittelwert +- SEM, Two-way ANOVA mit Bonferroni posthoc Test, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001



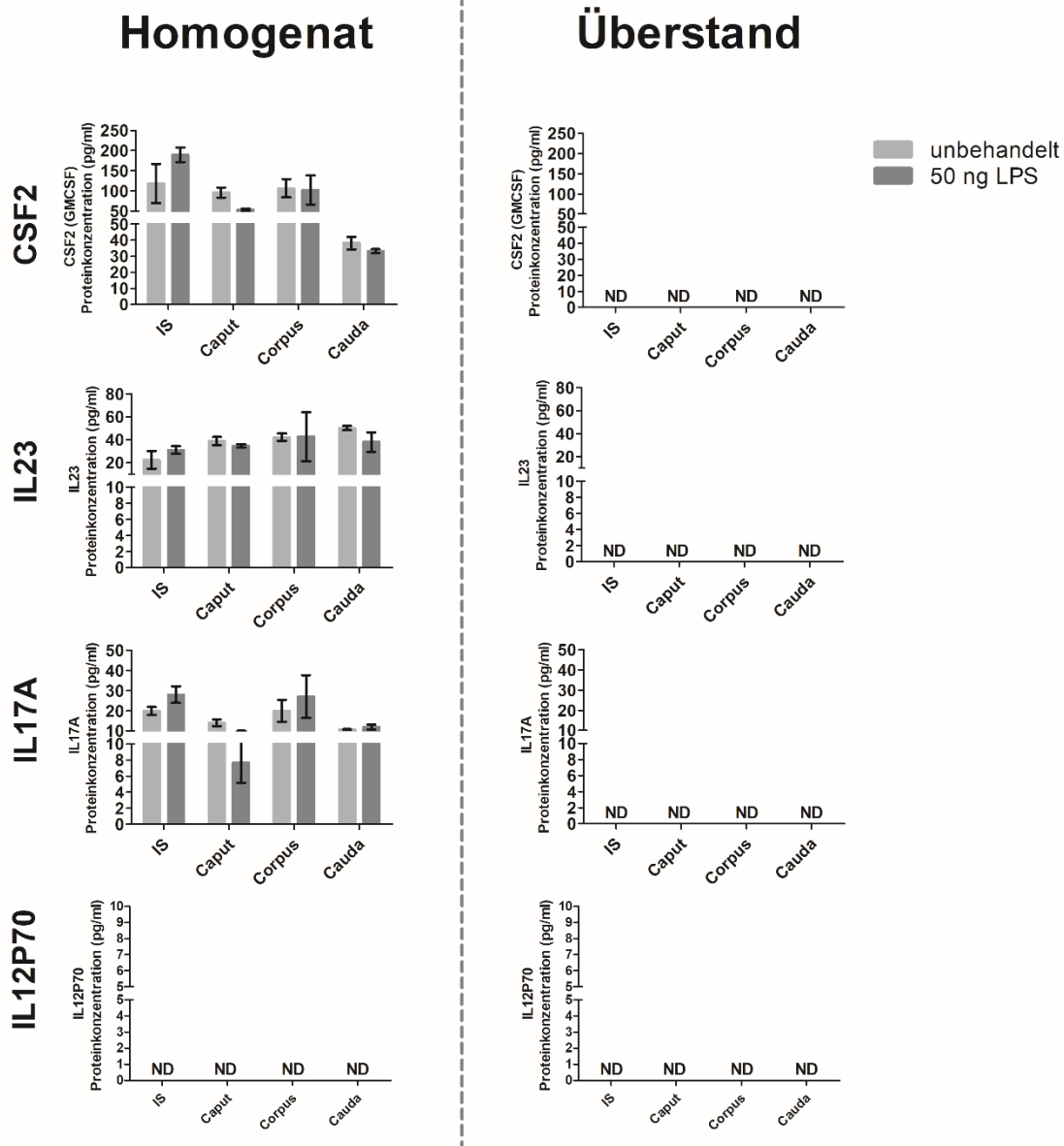
**Abb. 14: Absolute Zytokinkonzentrationen nach einer ex vivo Inkubation mit LPS.**

Absolute Proteinkonzentrationen (pg/ml) von LPS-behandelten epididymalen Regionen (50 ng/ml) im Vergleich zu Kontrollgewebe (Inkubation in Medium ohne LPS) über 6 Stunden (24,5 % CO<sub>2</sub>). Mittelwert +- SEM, Two-way ANOVA mit Bonferroni posthoc Test, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, ND = Nicht detektierbar



**Abb. 15: Absolute Zytokinkonzentrationen nach einer ex vivo Inkubation mit LPS.**

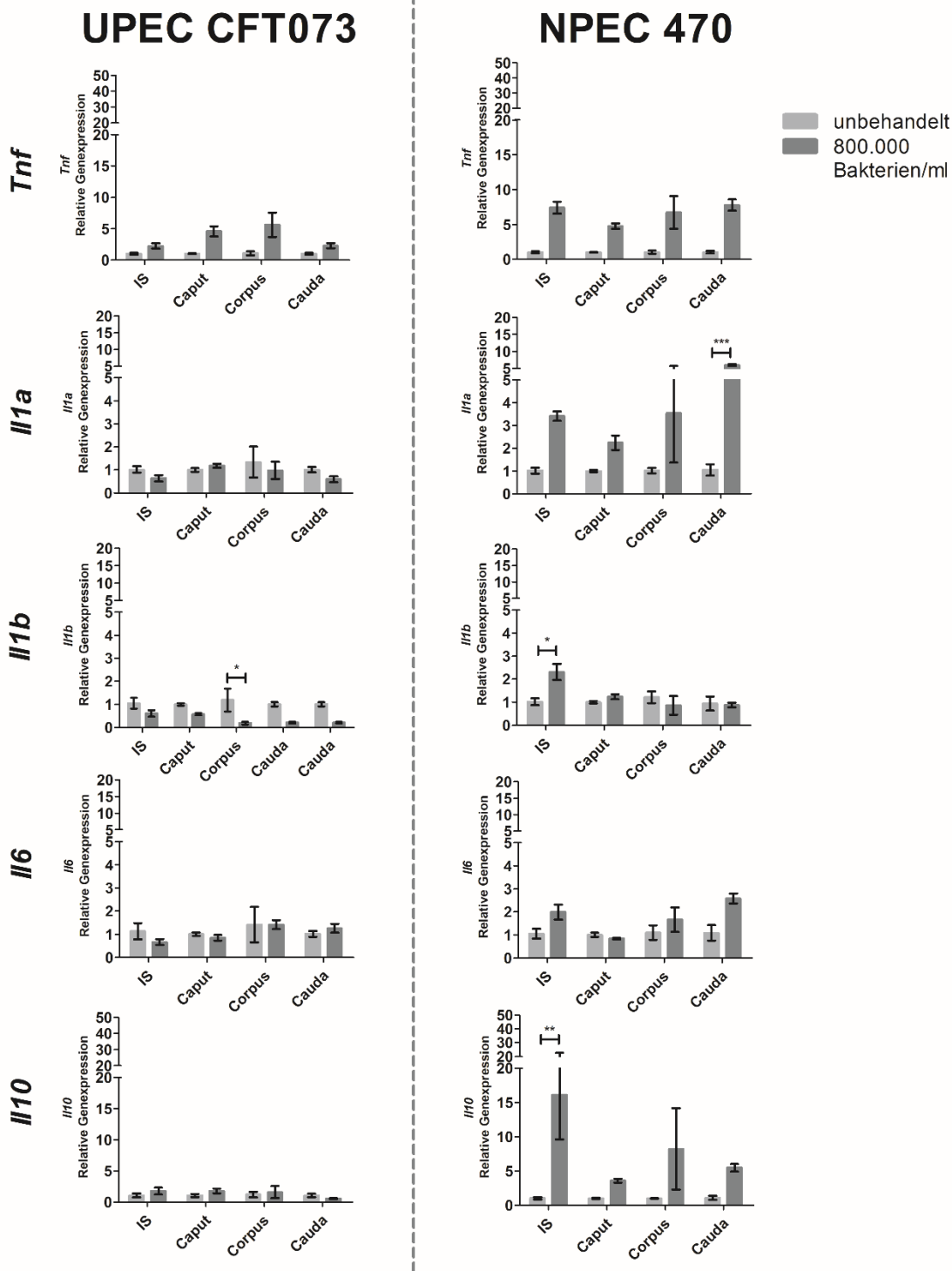
Absolute Proteinkonzentrationen (pg/ml) von LPS-behandelten epididymalen Regionen (50 ng/ml) im Vergleich zu Kontrollgewebe (Inkubation in Medium ohne LPS) über 6 Stunden (24,5 % CO<sub>2</sub>). Mittelwert +- SEM, Two-way ANOVA mit Bonferroni posthoc Test, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, ND = Nicht detektierbar



**Abb. 16: Absolute Zytokinkonzentrationen nach einer *ex vivo* Inkubation mit LPS.**

Absolute Proteinkonzentrationen (pg/ml) von LPS-behandelten epididymalen Regionen (50 ng/ml) im Vergleich zu Kontrollgewebe (Inkubation in Medium ohne LPS) über 6 Stunden (24,5 % CO<sub>2</sub>). Mittelwert +- SEM, Two-way ANOVA mit Bonferroni posthoc Test, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, ND = Nicht detektierbar

V. Ergebnisse



**Abb. 17: Relative Expression inflammatorischer Zytokine nach einer ex vivo Inkubation mit UPEC und NPEC.**

mRNA Expressionslevel von UPEC/NPEC-behandelten epididymalen Regionen (800.000 Bakterien/ml) im Vergleich zu Kontrollgewebe (Inkubation in Medium ohne UPEC/NPEC) über 4 Stunden (24,5 % CO<sub>2</sub>). Mittelwert +- SEM, Two-way ANOVA mit Bonferroni posthoc Test, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001

## V. Ergebnisse

### 3. Expression immunmodulierender Faktoren

#### 3.1 Relative Expression immunmodulierender Faktoren nach *ex vivo* Inkubation mit LPS

Anhand von RNA Sequenzierungen der Arbeitsgruppe wurden stark differenziell exprimierte Gene in vorherigen ähnlichen UPEC-Modellen auffindig gemacht und daraufhin in dieser Studie untersucht. Zunächst wurde mRNA von Proteinen, welche in die Signalkaskaden der TGF $\beta$ -Superfamilie involviert sind, analysiert. Dabei zeigten sich im untersuchten Zeitraum von 6 h bei keinem Gentranskript (*Tgfb1*, *Inhba* und *Ido1*) statistisch signifikante regionale Unterschiede nach LPS-Stimulation (Abb. 18).

Im Anschluss wurden weitere epididymale immunmodulierende Faktoren näher analysiert. Von den hier untersuchten Faktoren waren *Clec4e* und *Ptgs2* statistisch signifikant vermehrt exprimiert. *Cst11* und *Ltf* präsentierten keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie zwischen proximalen und distalen Regionen. (Abb. 19).

*Clec4e* mRNA wurde nach LPS Stimulation im Zeitverlauf über 6 h im Caput nach 1 h (6-fach) sowie im Corpus nach 3 h (6-fach) vermehrt exprimiert (Abb. 19).

*Ptgs2* mRNA wurde nach LPS Stimulation im Zeitverlauf über 6 h im Caput nach 6 h (1,5-fach) vermehrt exprimiert (Abb. 19).



## V. Ergebnisse

### 3.2 Relative Expression immunmodulierender Faktoren nach *ex vivo* Inkubation mit UPEC/ NPEC

Die relativen Genexpressionen der mit UPEC- und NPEC behandelten Proben wiesen sowohl regionspezifische, als auch erregerspezifische Unterschiede auf. Während die Inkubation mit UPEC in keiner statistisch signifikanten Erhöhung der Expression resultierte, wurden die Expressionswerte von *Inhba*, insbesondere in distalen Regionen, deutlich vermindert. *Tgfb1*, *Ido1*, *Cst11*, *Ltf*, *Clec4e* und *Ptgs2* wurden statistisch nicht signifikant verändert.

Stimulation durch NPEC resultierte in einer Verminderung der *Inhba* Genexpression. *Cst11* und *Clec4e* wurden nicht statistisch signifikant verändert. Die restlichen Faktoren zeigten, insbesondere in distalen Organregionen, deutliche erhöhte Genexpressionswerte. Die deutlichsten relativen Expressionsunterschiede zeigten sich bei beiden Behandlungsgruppen bei *Ido1* (Abb. 20).

*Tgfb1* mRNA wurde durch Stimulation mit UPEC nicht signifikant verändert. Durch Stimulation mit NPEC wurde *Tgfb1* im Caput (4-fach) und Corpus (3-fach) erhöht (Abb. 20).

*Inhba* mRNA wurde durch Stimulation mit UPEC in Corpus (4-fach) und Cauda (3-fach) runterreguliert. Durch Stimulation mit NPEC wurde *Inhba* im Corpus (3-fach) erniedrigt (Abb. 20).

*Ido1* mRNA wurde durch Stimulation mit UPEC nicht signifikant verändert. Durch Stimulation mit NPEC wurde *Ido1* in der Cauda (6-fach) erhöht (Abb. 21).

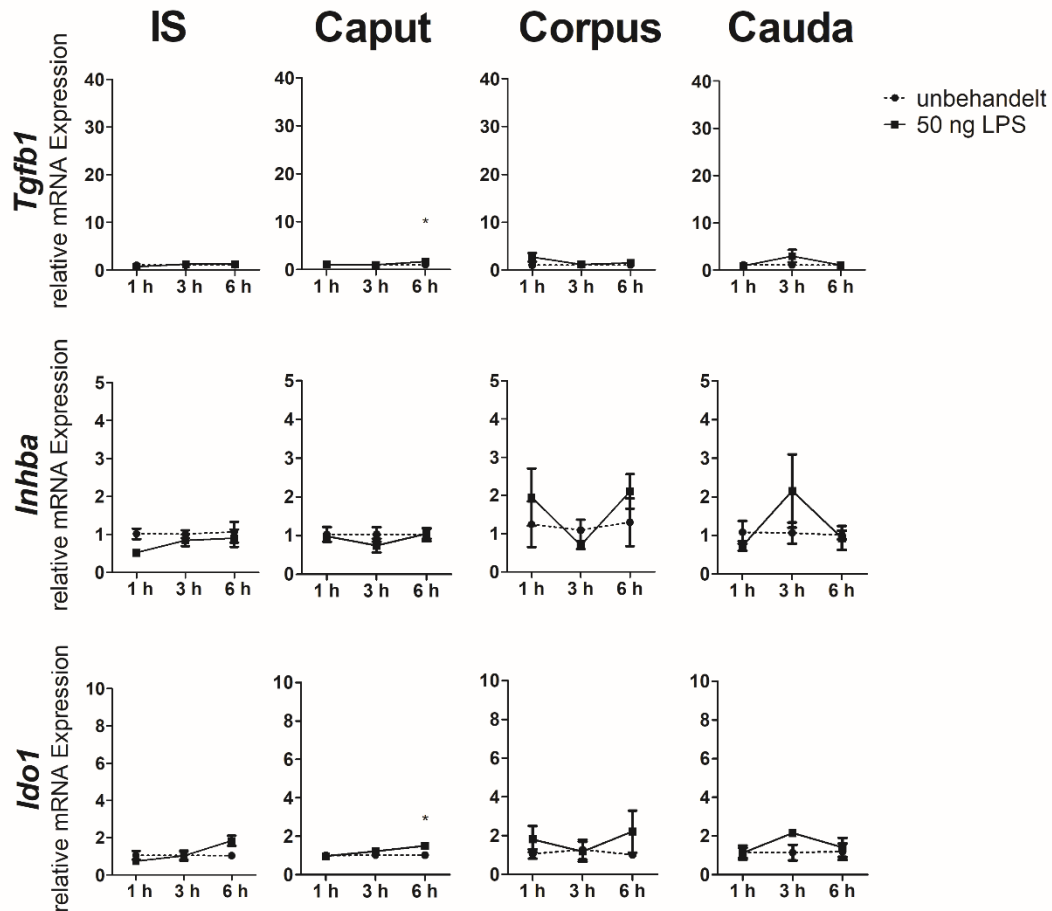
*Cst11* mRNA wurde durch Stimulation mit UPEC und NPEC nicht statistisch signifikant verändert (Abb. 20).

*Ltf* mRNA wurde durch Stimulation mit UPEC nicht statistisch signifikant verändert. Durch Stimulation mit NPEC wurde *Ltf* im Caput (7-fach) und Corpus (5-fach) vermehrt exprimiert (Abb. 21).

*Clec4e* mRNA wurde durch Stimulation mit UPEC und NPEC nicht statistisch signifikant verändert (Abb. 21).

*Ptgs2* mRNA wurde durch Stimulation mit UPEC statistisch nicht signifikant verändert. Durch Stimulation mit NPEC wurde *Ptgs2* in Corpus (3-fach) und Cauda (4-fach) hochreguliert. (Abb. 21).

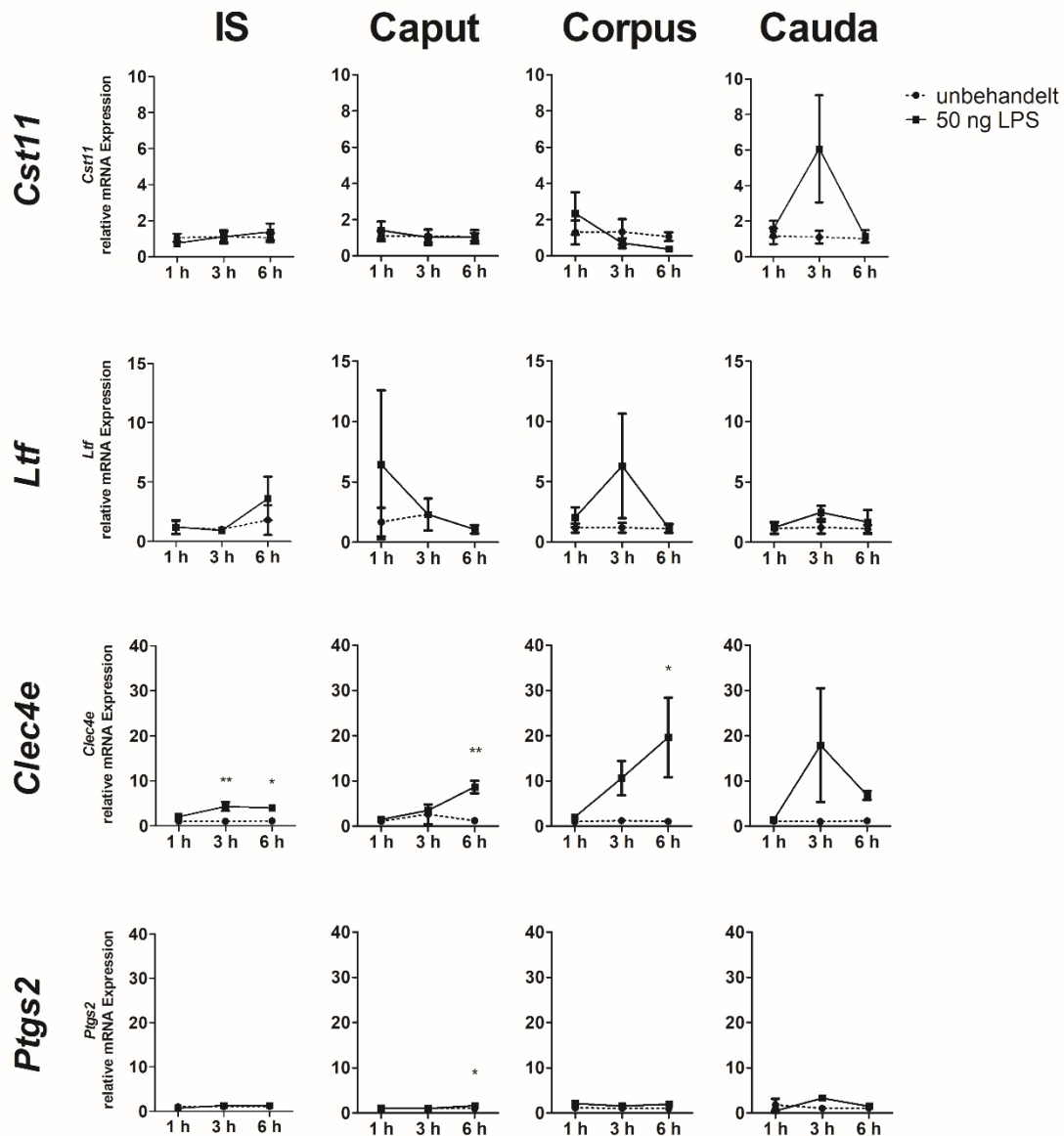
## V. Ergebnisse



**Abb. 18: Relative Expression immunmodulierender Faktoren nach einer ex vivo Inkubation mit LPS.**

mRNA Expressionslevel von LPS-behandelten epididymalen Regionen (50 ng/ml) im Vergleich zu Kontrollgewebe (Inkubation in Medium ohne LPS) über 1, 3 und 6 Stunden (24,5 % CO<sub>2</sub>). Mittelwert +- SEM, Two-way ANOVA mit Bonferroni posthoc Test, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001

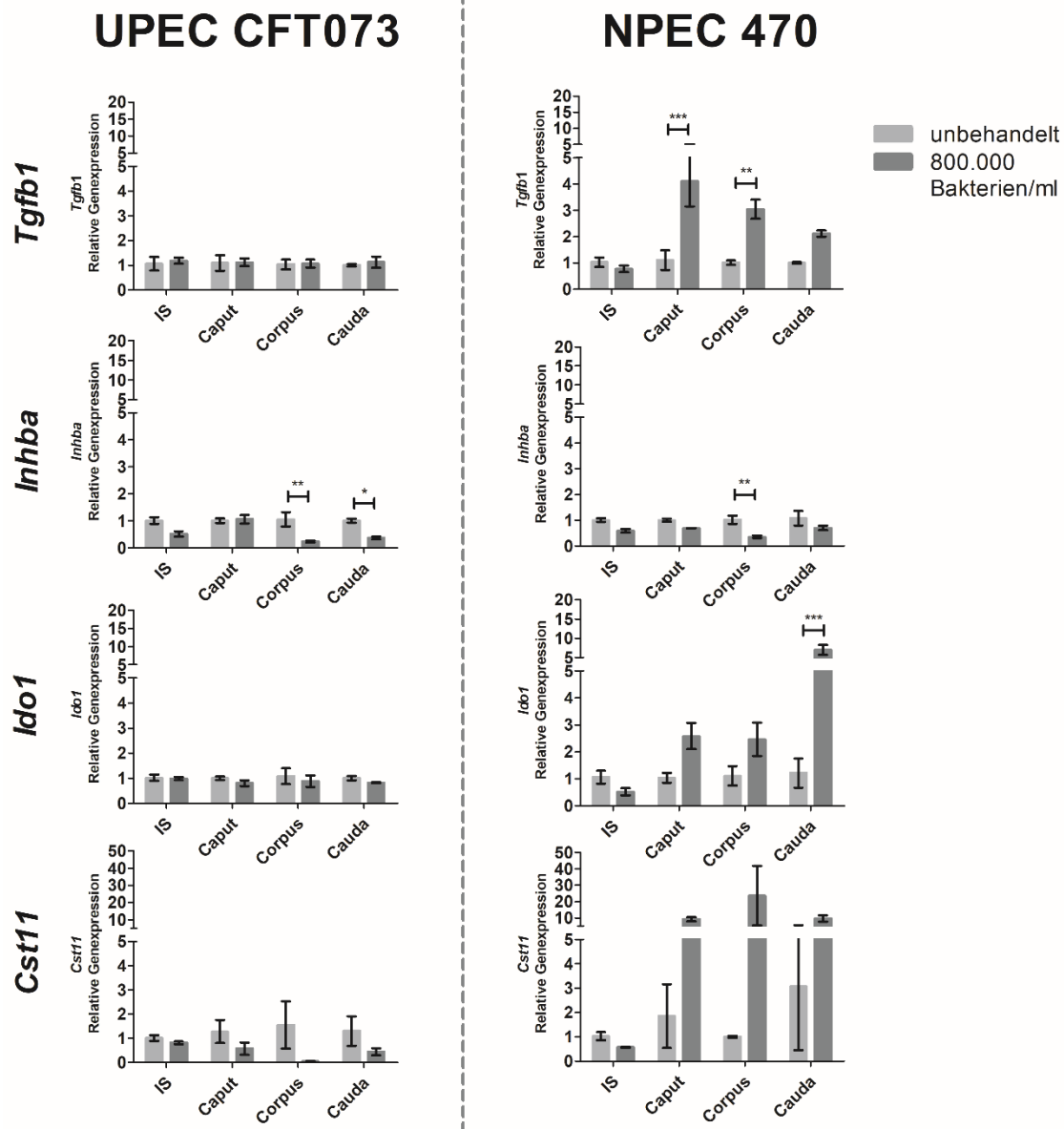
## V. Ergebnisse



**Abb. 19: Relative Expression immunmodulierender Faktoren nach einer ex vivo Inkubation mit LPS.**

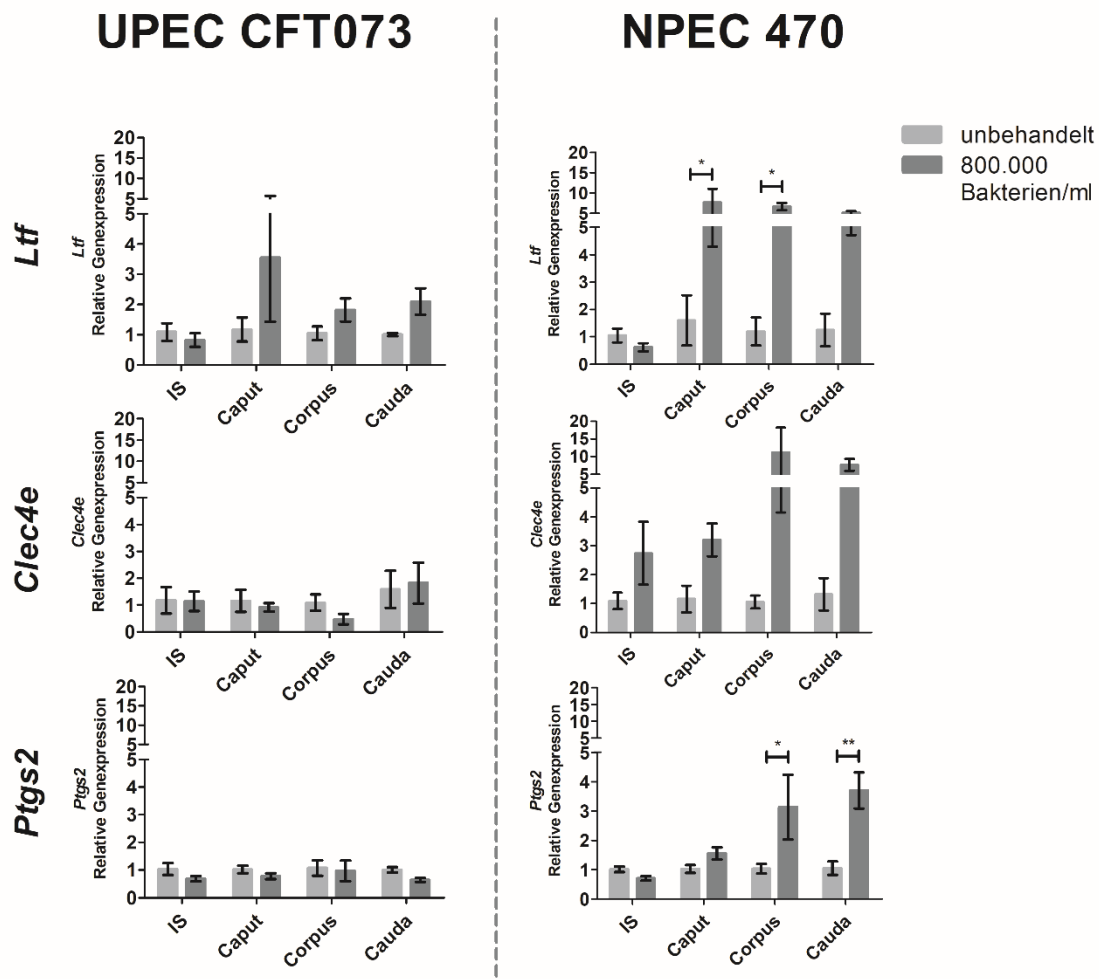
mRNA Expressionslevel von LPS-behandelten epididymalen Regionen (50 ng/ml) im Vergleich zu Kontrollgewebe (Inkubation in Medium ohne LPS) über 1, 3 und 6 Stunden (24,5 % CO<sub>2</sub>). Mittelwert +- SEM, Two-way ANOVA mit Bonferroni posthoc Test, \* p<0,05 , \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001

V. Ergebnisse



**Abb. 20: Relative Expression immunmodulierender Faktoren nach einer ex vivo Inkubation mit UPEC und NPEC.**

mRNA Expressionslevel von UPEC-/NPEC-behandelten epididymalen Regionen (800.000 Bakterien/ml) im Vergleich zu Kontrollgewebe (Inkubation in Medium ohne UPEC/NPEC) über 4 Stunden (24,5 % CO<sub>2</sub>). Mittelwert +- SEM, Two-way ANOVA mit Bonferroni posthoc Test, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001



**Abb. 21: Relative Expression immunomodulierender Faktoren nach einer ex vivo Inkubation mit UPEC und NPEC.**

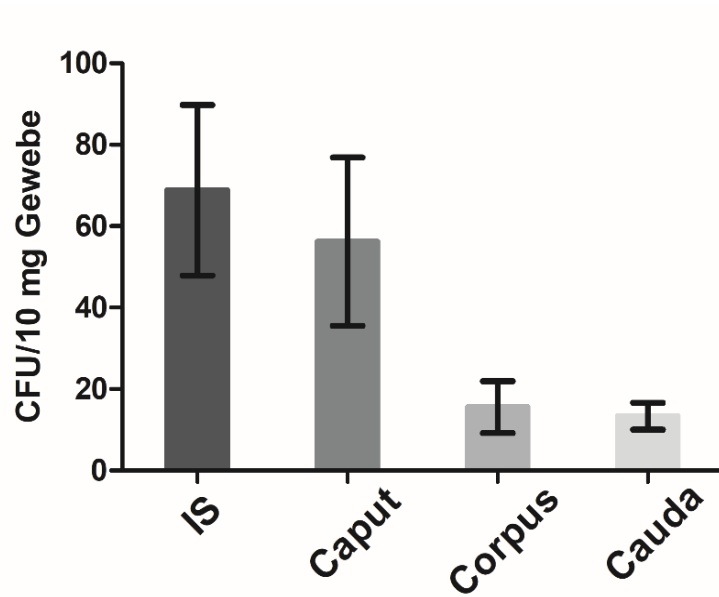
mRNA Expressionslevel von UPEC-/NPEC-behandelten epididymalen Regionen (800.000 Bakterien/ml) im Vergleich zu Kontrollgewebe (Inkubation in Medium ohne UPEC/NPEC) über 4 Stunden (24,5 % CO<sub>2</sub>). Mittelwert ± SEM, Two-way ANOVA mit Bonferroni posthoc Test, \* p < 0,05 , \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001

## V. Ergebnisse

### **4. Anteil intrazellulärer UPEC im Gewebe**

Um zu untersuchen, ob regionale Unterschiede in dem Phagozytosepotenzial nach erfolgter bakterieller Infektion bestehen, wurde ein Gentamicin Assay durchgeführt. Dazu wurden die einzelnen Nebenhoden mit UPEC inkubiert und anschließend mit Gentamicin behandelt, wodurch extrazelluläre Bakterien abgetötet, aber intrazelluläre Bakterien intakt blieben (Lortholary et al. 1995). Dies erlaubte eine Ermittlung der kolonie-bildenden Einheiten aus dem Gewebehomogenat. Die Agar-Platten der Kontrollgruppe, die nur UPEC, aber kein Antibiotikum enthielt, bestätigte, dass die Bakterien auf dem Agar überlebensfähig waren, da diese Platten in allen Verdünnungsstufen komplett überwachsen und somit unzählbar waren. Die Agar-Platten der Kontrollgruppe, die nur das Antibiotikum, aber keine UPEC enthielt, bestätigte, dass alle Reagenzien kontaminationsfrei waren und dass steril und sauber gearbeitet wurde, da in allen Verdünnungsstufen keine Kolonien zu finden waren. Für die untersuchte Gruppe, die sowohl UPEC, als auch Gentamicin enthielt, wurde die unverdünnte Probe für den Ergebnisteil ausgewählt und dargestellt. In den Ausstrichen der proximalen Organregionen (IS und Caput) sind deutlich mehr koloniebildende Einheiten/100 mg Gewebe detektiert worden, als in den distalen Organregionen (Corpus und Cauda). Diese erhöhte Menge deutet auf eine höhere Kapazität für intrazelluläres Vorkommen der Bakterien in proximalen Organregionen hin (Abb. 22).

## V. Ergebnisse



**Abb. 22: Anteil intrazellulärer UPEC im Gewebe.**

Colony Forming Units (CFU) nach 14-stündiger Inkubation bei 37 °C (24,5 % CO<sub>2</sub>). Zuvor 4-stündige Inkubation der epididymalen Regionen mit UPEC (800.000 Bakterien/ml) und anschließender Inkubation mit Gentamicin (200 µg/ml) für 3 h. Mittelwert +- SEM, One-way ANOVA mit Tukey posthoc Test.

## VI. Diskussion

Obwohl bisherige Experimente bereits eindeutig gezeigt haben, dass die verschiedenen Regionen der Epididymis unterschiedliche immunologische Reaktionen auf bakterielle Infektionen zeigen, ist die ursächliche Pathophysiologie bisher nicht abschließend geklärt. Insbesondere die Frage, ob die divergierenden Immunantworten der Regionen auf der unterschiedlichen Expositionsdauer mit Erregern beruhen oder ob das jeweilige Gewebe fundamental anders auf Infektionen reagiert, bleibt unbeantwortet (Michel et al., 2016; Klein et al., 2020). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb ein *ex vivo* Modell etabliert, welches unter exakt gleichen Bedingungen eine Inflammation in den vorher mechanisch voneinander getrennten Nebenhodenregionen induzierte.

### 1. Immunregulation der Epididymis

Eine Vielzahl von Mechanismen garantiert in den verschiedenen Nebenhodenabschnitten ein einzigartiges immunologisches Milieu. Zentrale Bedeutung in diesem Zusammenspiel hat die Wahrung des Gleichgewichts zwischen der immunologischen Toleranz gegenüber den Spermien bei gleichzeitigem Schutz vor Inflammation und Infektion.

In dieser Studie konnte bestätigt werden, dass *Ido1* im Caput höher als in distalen Regionen exprimiert ist. Aus dem Testis migrierende Spermatozoen müssten vom körpereigenen Immunsystem als fremd erkannt werden. IDO1 bewirkt als Hauptmediator der Immunmodulation, insbesondere im Caput, eine immuntolerante Umgebung für die Passage der Spermien durch den Nebenhodengang. Die Proteinlevel proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL1B, IL2, IL3, IL6, IL9, IL10, IL12p70, IL12p40p70, IL13 und IL17) sind in IDO-defizienten Mäusen in deutlich höherer Konzentration messbar und resultieren in einer potenziell dysfunktionalen Umgebung für die Spermienmaturation (Britan et al. 2006; Jrad-Lamine et al. 2013). Ein ähnliches Expressionsmuster konnte in dieser Studie auch für die Tgfb-Superfamilie gezeigt werden. Insbesondere im Caput sind Aktinine hoch exprimiert (Winnall et al. 2013). Für eine adäquate Spermienreifung ist eine immuntolerante Umgebung gegenüber Spermien jedoch in allen Abschnitten der Epididymis erforderlich (Voisin et al. 2020). TGFB1 reguliert, analog zu dem ebenfalls zur TGFB-Superfamilie zählenden Aktivin A, dendritische Zellen und bewirkt über den SMAD2/3/4 Signalweg eine verstärkte Expression von IDO1, wodurch die Aktivität und Produktion von regulatorischen Zellen erhöht wird und eine verstärkte Immunsuppression stattfindet (Pallotta et al. 2011). Darüber hinaus ist Aktivin A direkt an der Entwicklung des Testis sowie der Reifung der Spermien in den Samenkanälchen beteiligt (Mithraprabhu et al. 2010).



Eine Suppression der TGFB1 Signalkaskade in transgenen Mäusen (Tgfb1<sup>ΔDC</sup> Mäuse mit FoxP3-GFP Knock-In Allel) führt sowohl zu einer Leukozytose und Ausbildung von Spermienautoantikörpern, als auch zur Hochregulierung proinflammatorischer Signalwege (z.B. B-Zell-Entwicklung, Antigenpräsentation, Reifung dendritischer Zellen) (Pierucci-Alves et al. 2018). CX3CR1<sup>+</sup> Makrophagen könnten mithilfe weiterer Immunzellen im Zusammenspiel eine immuntolerante Umgebung im proximalen Nebenhoden (IS und Caput) etablieren und an der Supprimierung der Autoimmunität gegenüber Spermien beteiligt sein (Da Silva et al. 2011).

Darüber hinaus existiert eine Vielzahl antimikrobieller Peptide, die vorwiegend im proximalen Nebenhoden vorkommen. Hierzu zählen u.a. Beta-Defensine und Lipocaline (Klein et al. 2020). Beta-Defensine werden von Immun-/ bzw. Epithelzellen produziert und wirken sowohl pro-, als auch antiinflammatorisch. Diese Wirkungen werden durch direkte Bindung an Endotoxine (wie z.B. LPS) Gram-negativer Bakterien oder durch Einwirkung in die weitere Signalkaskade (z.B. Bindung an TLR4) endotoxinvermittelter Immunität erreicht. Zusätzlich binden Beta-Defensine Spermatozoen während ihrer Passage durch den Nebenhodengang, weshalb ihnen eine direkte Beteiligung an der Spermienreifung zugeschrieben wird (Ribeiro et al. 2016).

Die Basalexpression inflammatorischer Zytokine im Nebenhoden unter physiologischen Bedingungen ist sehr niedrig (Wijayarathna et al. 2017; Wijayarathna et al. 2018). In dieser Studie wurde die Basalexpression von distalen im Vergleich zu proximalen Regionen der Epididymis verglichen. *Il1b*, *Il6*, *Il10*, *Ltf* und *Clec4e* waren in der Cauda relativ zum Caput statistisch signifikant und von *Tnf*, *Il1a* und *Ptgs2* in der Cauda relativ zum Caput statistisch nicht signifikant erhöht. Diese Unterschiede lassen sich durch die besonderen anatomischen Gegebenheiten im Urogenitaltrakt erklären. Die Cauda stellt anatomisch den Übergang zum Samenleiter und damit die Eintrittspforte retrograd aufsteigender Keime dar und muss potenzielle Erreger schnell erkennen und eine Immunantwort auslösen können. Niedrige Expressionswerte immunmodulatorischer Faktoren sowie die vermehrte Präsenz der inflammatorischen, NFkB-/AP1-assoziierten CCR2<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>, vasculature-associated TLF<sup>+</sup> sowie CX3CR1<sup>+</sup>-TLF-CCR2- Makrophagen in der Cauda resultieren konsekutiv in einer erhöhten Basalexpression der o.g. Zytokine. Möglicherweise aktivieren diese residenten Makrophagen gemeinsam mit weiteren antigenpräsentierenden Zellen und Lymphozyten der angeborenen Immunität (Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) und T-Zellen) durch Zytokinausschüttung residente Lymphozyten der adaptiven Immunabwehr und mobilisieren durch Inflammation die Migration weiterer Immunzellen aus dem peripheren Blut.

## 2. Inflammation im Nebenhoden

Die mRNA Expressionsraten nach LPS Inkubation von *Tnf*, *Il1a*, *Il6* und *Il10* zeigten deutlich erhöhte Werte in der Cauda, während das Inflammationsgeschehen im Caput deutlich milder ausfiel. Die Proteinlevel inflammatorischer Zytokine (TNF, IL1A, IL6, IL10, IFNB und MCP1) waren nach erfolgter Behandlung mit LPS deutlich erhöht. Die Proteinlevel der pro-inflammatorischen Zytokine waren insbesondere in der Cauda signifikant erhöht, was auf eine stärkere Immunantwort in der Cauda im Vergleich zu den anderen Regionen deutet. Die Ergebnisse dieser Studie unterstrichen die in früheren *in vivo* Studien festgestellte höhere inflammatorische Suszeptibilität der Cauda (Michel et al., 2016; Silva et al., 2018; Klein et al., 2020).

*In vivo* führen UPEC-Infektionen in der Cauda zu einer deutlichen Hochregulierung von PRRs, insbesondere von TLR4 (Michel et al., 2016). Zusätzlich bringen UPEC-Infektionen eine vermehrte Expression von Genen (*Tlr2*, *Tlr4*, *Tlr6*, *Cd14*, *Ticam1* und *Traf6*) in der Cauda hervor, welche an der TLR4- bzw. TLR2/TLR6-Signalkaskade beteiligt sind. Konträr hierzu, werden diese Gene in proximalen Regionen nicht vermehrt exprimiert. (Andrade et al. 2024). TLR-Aktivierungen sind eine wichtige Komponente in der Aktivierung pro-inflammatorischer Transkriptionsfaktoren wie NFkB und AP1 und damit assoziierter Zytokine. Gleichzeitig wird die Immunantwort gegenüber UPEC in *Tlr4* und *MYD88* Knockout-Mäusen nicht gänzlich unterdrückt, weshalb darüber hinaus auch TLR4-unabhängige Mechanismen in der Aktivierung pro-inflammatorischer Transkriptionsfaktoren involviert sind (Michel et al. 2016; Andrade et al. 2024). Das für einen PRR codierende Gen *Clec4e* wird durch LPS induziert und mündet in der Aktivierung des NFkB-/AP1-Signalwegs (Matsumoto et al. 1999), welcher in der Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine als Teil der Entzündungsreaktion resultiert. Durch ihre chemotaktische Wirkung werden Leukozyten sowohl lokal, als auch aus der Zirkulation rekrutiert. Darüber hinaus wird die Apoptose vermehrt induziert. *In vivo* Infektionen resultieren in erhöhten mRNA-Expressionsraten von Zytokinen (*Tnf*, *Il1a*, *Il1b*, *Il6*). *Tnf* und *Il1* wirken im Rahmen einer akuten Inflammation stark synergistisch und sollten erwartungsgemäß simultan vermehrt synthetisiert werden. Bisherige Tiermodelle der Epididymitis können jedoch auf Proteinebene keine gleichzeitige Zytokinerhöhung nachweisen (Turner et al. 2011; Michel et al. 2016).

Ergebnisse der RNA-Sequenzierung (RNAseq) der Nebenhodenregionen zeigen 10 Tage p.i. eine umfassende Veränderung des Transkriptionsprofils der Cauda nach UPEC-Infektion. Dabei werden Signalwege, welche mit einer proinflammatorischen Immunantwort, mit fibrotischem Remodelling sowie der T- und B-Zell-Aktivierung assoziiert sind, hochreguliert. Hierbei werden u.a. die proinflammatorischen Zytokine

*Il1a*, *Il6*, *Il17* und die Chemokine *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Cxcl2*, *Cxcl5* hochreguliert (Pleuger et al., 2022). Folge der pro-inflammatorischen Prozesse im Rahmen der UPEC-Infektion im Mausmodell sind der Verlust der epithelialen Integrität und ein massiver Zustrom von neutrophilen Granulozyten und MHC-II<sup>hi</sup> Makrophagen in der Cauda (Pleuger et al., 2022). Beide Zelltypen als Teil der adaptiven Immunantwort sind an der Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion sowie der Phagozytose von Pathogenen beteiligt. Die Freisetzung von Immunmodulatoren durch Immunzellen führt in anderen Organsystemen (z.B. im Rahmen einer Glomerulonephritis) konsekutiv zu einer Schädigung des betroffenen Gewebes sowie zu einer Intensivierung der Immunantwort (Segel et al. 2011; Kruger et al. 2015). CCR2 fungiert als Rezeptor des Entzündungsmediators CCL2 (MCP1), welcher chemotaktisch auf Zellen der adaptiven Immunantwort wirkt. CCR2-Knockout-Mäuse weisen, verglichen mit Wildtypmäusen, eine deutlich verminderte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen auf (Wang et al. 2021).

Im Gegensatz zur starken pro-inflammatorischen Immunantwort der Cauda zeigt der Caput eine schwächere Immunreaktion. *In vivo* Untersuchungen zeigen nur geringe Unterschiede im Transkriptionsprofil zwischen unbehandelten und UPEC-infizierten Mäusen im Caput 10 Tage nach UPEC-Infektion (Pleuger et al. 2022). Die Zytokinlevel (z.B. *Tnf*, *Il1b*, *Il6*) sind im Caput deutlich niedriger (Michel et al., 2016).

Aus dieser Tatsache erwächst die Fragestellung, ob der Caput, relativ zur Cauda, weniger empfänglich für Inflammation ist, oder ob die geringe inflammatorische Antwort durch eine kürzere Pathogenexposition im *in vivo* Modell begründbar ist. Daher wurde in diesem Versuchsvorhaben eine simultane Exposition der Nebenhodenregionen zu den inflammatorischen Stimuli angestrebt. Jedoch wurde auch hierbei eine deutliche regionenspezifische Intensität der Immunantwort nachgewiesen, wodurch eine unterschiedliche Expositionsdauer im *in vivo* Modell als Ursache für die divergierende Immunantwort ausgeschlossen werden kann.

Die höher gemessene intrazelluläre Bakterienlast in IS und Caput deutet auf eine vermehrte intrazelluläre Aufnahmefähigkeit der Immunzellen der proximalen Anteile hin. Analog zu den CX3CR1<sup>+</sup> Makrophagen bilden Basalzellen des Epithels, insbesondere im IS, transepitheliale Fortsätze in das Lumen des Nebenhodenganges aus (Shum et al. 2008; Shum et al. 2014). Möglicherweise werden die Bakterien durch die Fortsätze der intraepithelialen Makrophagen aus dem Lumen phagozytiert. Indikativ hierfür ist der deutliche Gradient zwischen proximalen und distalen Regionen, der sich in der zellulären Anatomie der Regionen gegengesetzten widerspiegelt. Dennoch sollte hierbei diskutiert werden, dass

UPEC häufig auch in anderen Regionen des Urogenitalsystems persistieren und eine chronische Infektion auslösen können. Im Rahmen einer Zystitis persistieren UPEC sowohl extrazellulär, als auch intrazellulär in Urothelzellen. Hierbei gestaltet sich eine vollständige bakterielle Eradikation häufig sehr schwierig, denn neben der Bildung eines Biofilms treten UPEC mutmaßlich in einen inaktiven Status in der Wirtszelle über (Blango und Mulvey 2010).

Gemeinsam bestätigen diese Daten ergänzend die Ergebnisse bisheriger *in vivo* Experimente und die Hypothese, dass die unterschiedliche Immunantwort auf regionenspezifischen Unterschieden beruht. Dabei zeigt sich, dass die Immunreaktion in ähnlicher Ausprägung unabhängig vom Infektionsweg (aufsteigende *in vivo* Infektion durch die Harnwege/simultane *ex vivo* Pathogen-Inkubation der separierten Organteile) des Erregers auftritt.

Analog zu früheren Studien (Bhushan et al. 2008; Bhushan et al. 2011; Lang et al. 2014) zeigten sich durch UPEC, im Vergleich zur unbehandelten Gruppe, kaum erhöhte und teilweise sogar erniedrigte mRNA-Genexpressionswerte von Zytokinen und immunmodulierenden Faktoren. Während die LPS- und NPEC-Inkubation eine deutliche Reaktion des angeborenen Immunsystems zeigten, wurde die angeborene  $T_{H1}$ -vermittelte Immunität durch UPEC unterdrückt (Lang et al. 2014). Wie in früheren Studien beschrieben induzieren NPEC eine Hochregulierung von Akute Phase Reaktion-assoziierten Zytokinen (Turner et al., 2011). Mithilfe von Virulenzfaktoren, wie z.B. Alpha-Hämolyisin, fördern UPEC die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine und supprimieren dadurch die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine. Konsekutiv kommt es zu einem verminderten Einstrom von Leukozyten, zur Supprimierung der  $T_{H1}$ -vermittelten Immunantwort. Als Folge der ausbleibenden Immunantwort resultiert eine rasante initiale Vermehrung der Bakterien. Über besonders lange Zeiträume sowie in besonders großer Zahl persistieren dabei UPEC im Lumen der Cauda (Bruszkiewicz et al., 2006, Bhushan et al., 2011, Duell et al., 2012).

In Zusammenschau der in der Studie erhobenen Daten bestätigt sich die Hypothese, dass entlang des Nebenhodens immunologisch deutlich unterschiedliche Regionen existieren. Diese Unterschiede begründen sich in erster Linie durch die verschiedenen, strategisch an die Funktion der einzelnen Organregionen angepassten, Subpopulationen der residenten Leukozyten.

### **3. Klinische Auswirkungen der Epididymitis**

Während ejakulierte Spermien bzw. aus dem Nebenhodenschwanz gewonnene Spermien in der Lage sind Eizellen zu befruchten, sind direkt aus dem Hoden

entnommene Spermien dazu nicht in der Lage. Je weiter distal die Spermien jedoch gewonnen werden, desto höher ist die Chance, dass eine erfolgreiche Fertilisation der Eizelle stattfindet. Analog hierzu belegen Daten von Refertilisierungsoperationen diese These. Je langstreckiger die Nebenhodenpassage im Rahmen einer Operation erhalten werden konnte, desto höher war die Wahrscheinlichkeit, auf natürlichem Wege eine Schwangerschaft zu erreichen (Kirchhoff 1995; Cooper 2007).

Eine adäquate therapeutische Versorgung ist deshalb für den Erhalt der Fertilität essenziell. Ätiologisch stellen bakterielle Infektionen die Hauptursache der akuten Epididymitis dar. Aufgrund dessen steht neben der antiphlogistischen Therapie eine antibiotische Therapie im Vordergrund. Sowohl gängige Erreger von Harnwegsinfekten, als auch gängige sexuell übertragbare Erreger gehören zum Spektrum der Gram-negativen Bakterien und werden z.B. mit Cephalosporinen oder Fluorchinolonen behandelt (EAU Urological Infections 2024). Neben einer rasch eingeleiteten kalkulierten antibiotischen Therapie sollten ergänzend Urinkulturen asserviert werden. In Zeiten zunehmender Resistenzentwicklungen nimmt die resistogrammgerechte antiinfektive Therapie einen hohen therapeutischen Stellenwert ein. Antibiotische Eradikationstherapien sollten unbedingt auch asymptomatische Patienten sowie aktuelle Sexualpartner zur Vermeidung von Ping-Pong-Effekten umfassen (Schuppe et al. 2017). Trotz erfolgreicher und schnell durchgeführter Antibiotikatherapie resultieren die Entzündungsmechanismen nach einer UPEC-Infektion oft in einer irreversiblen Obstruktion des Nebenhodenganges. Darüber hinaus kommt es zu einem fibrotischen Remodelling, welches das beschädigte Gewebe durch nicht funktionelles Bindegewebe erneuert. Vorherige Daten unserer Arbeitsgruppe beschreiben dabei einen direkten Zusammenhang zwischen Inflammationsintensität und dem Ausmaß des Gewebeschadens. CCR2<sup>+</sup>-Knockoutmäuse weisen neben einem deutlich verminderten Einstrom von Immunzellen auch deutlich verminderte Gewebeschäden in der Cauda auf (Wang et al. 2021). Inflammation führt zu drastischen Hochregulierungen von *Inhba* in der Cauda. Gleichzeitig führt die Zugabe von Aktivin A zu vermehrter Induktion von Fibrose in Mäusen (Michel et al. 2016; Klein et al. 2020). Eine fehlende Hochregulierung von *Inhba* in dieser Studie könnte aus dem gewählten Zeitpunkt dieser Experimente resultieren. Möglicherweise folgt die vermehrte Expression erst zu einem späteren Zeitpunkt.

Als Resultat der eingeschränkten Spermienreifung kann sich eine Oligozoospermie und/oder eine Asthenospermie einstellen. Als Spätfolge einer durch UPEC induzierten Epididymitis manifestieren sich bei bis zu 40 % der Patienten irreversible Veränderungen des Nebenhodenganges sowie der messbaren Spermienparameter. Darüber hinaus

werden neben quantitativen Veränderungen auch dauerhafte Veränderungen der Spermienqualität beschrieben (Schuppe et al. 2017). Klinische Studien zeigen, dass insbesondere Alpha-Hämolytin positive *E. coli* Serovare permanent verminderte Spermienzahlen induzieren können (Lang et al. 2013; Lang et al. 2014; Silva et al. 2018). Die bisherige Datenlage impliziert, dass das Ausmaß der Langzeitfolgen positiv mit der Intensität der überschießenden Immunantwort des Wirts korreliert. *MYD88* ist ein Adapterprotein, das in die Aktivierung von Signalkaskaden durch bakterielle Infekte beteiligt ist. *MYD88*<sup>-/-</sup>Mäuse die mit UPEC infiziert wurden, weisen aufgrund der partiellen Immundefizienz eine signifikant verminderte Zytokinexpression und daraus resultierend deutlich geringere epitheliale Schäden auf (Michel et al., 2016). Weitere *in vivo* Studien zeigen, dass, neben einer antibiotischen Therapie, eine immunsupprimierende Glukokortikoidgabe die adaptive Immunantwort deutlich reduzieren kann. Immunglobuline (IgM, IgG) und T-Zell-Marker (CD3) sind 10 und 31 Tage p.i. durch zusätzliche Glukokortikoidgabe signifikant reduziert. Konsekutiv sind morphologische Schäden des Organparenchyms sowie die Konstriktion des Nebenhodenganges deutlich vermindert und Spermatozoen können in der Cauda nachgewiesen werden. Wird jedoch lediglich eine alleinige antibiotische Behandlung ohne additive immunsuppressive Behandlung durchgeführt führt dies *in vivo* zu vergleichbaren Gewebeschäden wie in der unbehandelten Gruppe (Klein et al., 2019; Klein et al., 2020).

Die Datenlage dieser Studie bestätigte die Inflammationssuszeptibilität der Cauda und die Hypothese, dass zukünftig klinisch über die Notwendigkeit einer immunsupprimierenden Begleittherapie diskutiert werden sollte. Einerseits benötigt es hier weitere Forschung um die Immunantwort der Epididymitis weiter zu charakterisieren, andererseits muss in klinischen Studien der Einsatz potenzieller Medikamente erprobt werden. Aufgrund weltweit hoher Fallzahlen sowie dem potenziell drohenden irreversiblen Fertilitätsverlust liegen die weiteren Forschungsarbeiten im überragenden öffentlichen Interesse (Çek et al. 2017; Schuppe et al. 2017).

## VIII. Literaturverzeichnis

### VIII Literaturverzeichnis

Agarwal, A; Mulgund, A; Hamada, A; Chyatte, MR (2015): A unique view on male infertility around the globe. In: *Reproductive Biology and Endocrinology* 13, S. 37. DOI: 10.1186/s12958-015-0032-1.

Akira, S; Uematsu, S; Takeuchi, O (2006): Pathogen recognition and innate immunity. In: *Cell* 124 (4), S. 783–801. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.015.

Andrade, AD; Almeida, PGC; Mariani, NAP; Santos, NCM; Camargo, IA; Martini, PV et al. (2024): Regional modulation of Toll-Like receptor signaling pathway genes in acute epididymitis in mice. In: *Andrology*. DOI: 10.1111/andr.13630.

Aumüller, G; Aust, G; Conrad, A; Engele, J; Kirsch, J; Maio, G et al. (2020): 4 Männliches Genitale. In: Aumüller, G, Aust, G; Conrad, A; Engele, J und Kirsch, J (Hg.): *Duale Reihe Anatomie*. 5. aktualisierte Auflage. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).

Barrachina, F; Battistone, MA; Castillo, J; Mallofré, C; Jodar, M; Breton, S; Oliva, R (2022): Sperm acquire epididymis-derived proteins through epididymosomes. In: *Human Reproduction* 37 (4), S. 651–668. DOI: 10.1093/humrep/deac015.

Battistone, Maria A.; Mendelsohn, AC; Spallanzani, RG; Brown, D; Nair, AV; Breton, S (2020): Region-specific transcriptomic and functional signatures of mononuclear phagocytes in the epididymis. In: *Molecular Human Reproduction* 26 (1), S. 14–29. DOI: 10.1093/molehr/gaz059.

Baumgarten, HG; Holstein, AF; Rosengren, E (1971): Arrangement, ultrastructure, and adrenergic innervation of smooth musculature of the ductuli efferentes, ductus epididymidis and ductus deferens of man. In: *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria: 1948)* 120 (1), S. 37–79. DOI: 10.1007/bf00331243.

Bhushan, S; Hossain, H; Lu, Y; Geisler, A; Tchatalbachev, S; Mikulski, Z et al. (2011): Uropathogenic *E. coli* induce different immune response in testicular and peritoneal macrophages: implications for testicular immune privilege. In: *PLOS ONE* 6 (12), e28452. DOI: 10.1371/journal.pone.0028452.

Bhushan, S; Tchatalbachev, S; Klug, J; Fijak, M; Pineau, C; Chakraborty, T; Meinhardt, A (2008): Uropathogenic *Escherichia coli* Block MyD88-Dependent and Activate MyD88-Independent Signaling Pathways in Rat Testicular Cells. In: *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180 (8), S. 5537–5547. DOI: 10.4049/jimmunol.180.8.5537.

## VIII. Literaturverzeichnis

Blango MG, Mulvey MA. Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* in the face of multiple antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 May;54(5):1855-63. DOI: 10.1128/AAC.00014-10

Bonilla, FA; Oettgen, HC (2010): Adaptive immunity. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (2 Suppl 2), S33-40. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.09.017.

Britan, A; Maffre, V; Tone, S; Drevet, JR (2006): Quantitative and spatial differences in the expression of tryptophan-metabolizing enzymes in mouse epididymis. In: *Cell and Tissue Research* 324 (2), S. 301–310. DOI: 10.1007/s00441-005-0151-7.

Brown, D; Lui, B.; Gluck, S; Sabolić, I (1992): A plasma membrane proton ATPase in specialized cells of rat epididymis. In: *The American Journal of Physiology* 263 (4 Pt 1), C913-6. DOI: 10.1152/ajpcell.1992.263.4.C913.

Brzuszkiewicz, E; Brüggemann, H; Liesegang, H; Emmerth, M; Olschläger, T; Nagy, G et al. (2006): How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (34), S. 12879–12884. DOI: 10.1073/pnas.0603038103.

Çek, M; Sturdza, L; Pilatz, A (2017): Acute and Chronic Epididymitis. In: *European Urology Supplements* 16 (4), S. 124–131. DOI: 10.1016/j.eursup.2017.01.003.

Clavert, A; Cranz, C; Bollack, C (1990): Functions of the seminal vesicle. In: *Andrologia* 22 Suppl 1, S. 185–192. DOI: 10.1111/j.1439-0272.1990.tb02084.x.

Cochet, F; Peri, F (2017): The Role of Carbohydrates in the Lipopolysaccharide (LPS)/Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Signalling. In: *International Journal of Molecular Sciences* 18 (11). DOI: 10.3390/ijms18112318.

Cooper, TG. (2007): Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. In: *Asian Journal of Andrology* 9 (4), S. 533–539. DOI: 10.1111/j.1745-7262.2007.00285.x.

Cooper, TG (2011): The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. In: *Asian Journal of Andrology* 13 (1), S. 130–138. DOI: 10.1038/aja.2010.97.

Cornwall, GA; Lareyre, J-J; Matusik, RJ; Hinton, BT; Orgebin-Crist, M-C; Robaire, B; Hinton, B (Hg.) (2002): The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice. Gene Expression and Epididymal Function.



## VIII. Literaturverzeichnis

Da Silva, N; Cortez-Retamozo, V; Reinecker, HC; Wildgruber, M; Hill, E; Brown, D et al. (2011): A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. In: *Reproduction (Cambridge, England)* 141 (5), S. 653–663. DOI: 10.1530/REP-10-0493.

Damon-Soubeyrand, C; Bongiovanni, A; Chorfa, A; Goubely, C; Pirot, N; Pardanaud, L et al. (2023): Three-dimensional imaging of vascular development in the mouse epididymis. In: *eLife* 12. DOI: 10.7554/eLife.82748.

Davis, JM; Rasmussen, SB; O'Brien, AD. (2005): Cytotoxic necrotizing factor type 1 production by uropathogenic *Escherichia coli* modulates polymorphonuclear leukocyte function. In: *Infection and Immunity* 73 (9), S. 5301–5310. DOI: 10.1128/IAI.73.9.5301-5310.2005.

Desai, KM; Gingell, JC; Haworth, JM (1986): Fate of the testis following epididymitis: a clinical and ultrasound study. In: *Journal of the Royal Society of Medicine* 79 (9), S. 515–519. DOI: 10.1177/014107688607900906.

Dick, SA; Wong, A; Hamidzada, H; Nejat, S; Nechanitzky, R; Vohra, S et al. (2022): Three tissue resident macrophage subsets coexist across organs with conserved origins and life cycles. In: *Science Immunology* 7 (67), eabf7777. DOI: 10.1126/sciimmunol.abf7777.

Duan, YG; Wang, P; Zheng, W; Zhang, Q; Huang, W; Jin, F; Cai, Z (2016): Characterisation of dendritic cell subsets in chronically inflamed human epididymis. In: *Andrologia* 48 (4), S. 431–440. DOI: 10.1111/and.12463.

Duell, BL; Carey, AJ; Tan, CK; Cui, X; Webb, RI; Totsika, M et al. (2012): Innate transcriptional networks activated in bladder in response to uropathogenic *Escherichia coli* drive diverse biological pathways and rapid synthesis of IL-10 for defense against bacterial urinary tract infection. In: *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 188 (2), S. 781–792. DOI: 10.4049/jimmunol.1101231.

Durai, V; Murphy, KM (2016): Functions of Murine Dendritic Cells. In: *Immunity* 45 (4), S. 719–736. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.10.010.

EAU Guidelines, *Urological Infections* Edn. presented at the EAU Annual Congress Paris 2024. ISBN 978-94-92671-23-3

Eberl, G; Colonna, M; Di Santo, JP; McKenzie, ANJ (2015): Innate lymphoid cells. Innate lymphoid cells: a new paradigm in immunology. In: *Science (New York, N. Y.)* 348 (6237), aaa6566. DOI: 10.1126/science.aaa6566.

## VIII. Literaturverzeichnis

Elfgen, V; Mietens, A; Mewe, M; Hau, T; Middendorff, R (2018): Contractility of the epididymal duct - function, regulation and potential drug effects. In: *Reproduction (Cambridge, England)* 156 (4), R125–R141. DOI: 10.1530/REP-17-0754.

Elia, J; Mazzilli, R; Delfino, M; Piane, M; Bozzao, C; Spinosa, V et al. (2014): Impact of Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) gene mutations on male infertility. In: *Archivio Italiano di Urologia, Andrologia: Organo Ufficiale [di] Societa Italiana di Ecografia Urologica e Nefrologica* 86 (3), S. 171–174. DOI: 10.4081/aiua.2014.3.171.

Evers, JLH (2002): Female subfertility. In: *The Lancet* 360 (9327), S. 151–159. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)09417-5.

Fijak, M; Pilatz, A; Hedger, MP; Nicolas, N; Bhushan, S; Michel, V et al. (2018): Infectious, inflammatory and 'autoimmune' male factor infertility: how do rodent models inform clinical practice? In: *Human Reproduction Update* 24 (4), S. 416–441. DOI: 10.1093/humupd/dmy009.

Gregory, M; Cyr, DG (2014): The blood-epididymis barrier and inflammation. In: *Spermatogenesis* 4 (2), e979619. DOI: 10.4161/21565562.2014.979619.

Gundersen, TD; Jørgensen, N; Andersson, A-M; Bang, AK; Nordkap, L; Skakkebaek, NE et al. (2015): Association Between Use of Marijuana and Male Reproductive Hormones and Semen Quality: A Study Among 1,215 Healthy Young Men. In: *American Journal of Epidemiology* 182 (6), S. 473–481. DOI: 10.1093/aje/kwv135.

Häcker, H; Karin, M (2006): Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. In: *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment* 2006 (357), re13. DOI: 10.1126/stke.3572006re13.

Hamil, K; Liu, Q; Sivashanmugam, P; Yenugu, S; Soundararajan, R; Grossman, G et al. (2002): Cystatin 11: a new member of the cystatin type 2 family. In: *Endocrinology* 143 (7), S. 2787–2796. DOI: 10.1210/endo.143.7.8925.

Hayday, AC (2009): Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. In: *Immunity* 31 (2), S. 184–196. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.08.006.

Hedger, MP; Kretser, DM de (2013): The activins and their binding protein, follistatin- Diagnostic and therapeutic targets in inflammatory disease and fibrosis. In: *Cytokine & Growth Factor Reviews* 24 (3), S. 285–295. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2013.03.003.

Hedger, MP (2011): Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis. In: *Journal of Andrology* 32 (6), S. 625–640. DOI: 10.2164/jandrol.111.012989.

## VIII. Literaturverzeichnis

Hinton, BT; Howards, SS (1981): Permeability characteristics of the epithelium in the rat caput epididymidis. In: *Journal of Reproduction and Fertility* 63 (1), S. 95–99. DOI: 10.1530/jrf.0.0630095.

Hirai, S; Naito, M; Terayama, H; Ning, Q; Miura, M; Shirakami, G; Itoh, M (2010): Difference in abundance of blood and lymphatic capillaries in the murine epididymis. In: *Medical Molecular Morphology* 43 (1), S. 37–42. DOI: 10.1007/s00795-009-0473-8.

Hongo, H; Shinojima, T; Yazawa, S; Kanao, K; Morita, S; Kosaka, T et al. (2014): MP16-18 Development of an algorithm for predicting severe acute epididymitis. In: *Journal of Urology* 191 (4S). DOI: 10.1016/j.juro.2014.02.591.

Jrad-Lamine, A; Henry-Berger, J; Damon-Soubeyrand, C; Saez, F; Kocer, A; Janny, L et al. (2013): Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (ido1) is involved in the control of mouse caput epididymis immune environment. In: *PLOS ONE* 8 (6), e66494. DOI: 10.1371/journal.pone.0066494.

Jrad-Lamine, A; Henry-Berger, J; Gourbeyre, P; Damon-Soubeyrand, C; Lenoir, A; Combaret, L et al. (2011): Deficient tryptophan catabolism along the kynurenine pathway reveals that the epididymis is in a unique tolerogenic state. In: *The Journal of Biological Chemistry* 286 (10), S. 8030–8042. DOI: 10.1074/jbc.M110.172114.

Kaur, BP; Secord, E (2019): Innate Immunity. In: *Pediatric Clinics of North America* 66 (5), S. 905–911. DOI: 10.1016/j.pcl.2019.06.011.

Kawamoto, H; Minato, N (2004): Myeloid cells. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (8), S. 1374–1379. DOI: 10.1016/j.biocel.2004.01.020.

Kirchhoff, C (1995): Molecular biology of sperm maturation in the human epididymis. In: *Reproductive Medicine Review* 4 (3), S. 121–139. DOI: 10.1530/ror.0.0030086

Klein, B; Bhushan, S; Günther, S; Middendorff, R; Loveland, KL.; Hedger, MP; Meinhardt, A (2020): Differential tissue-specific damage caused by bacterial epididymo-orchitis in the mouse. In: *Molecular Human Reproduction* 26 (4), S. 215–227. DOI: 10.1093/molehr/gaaa011.

Klein, B; Pant, S; Bhushan, S; Kautz, J; Rudat, C; Kispert, Andreas et al. (2019): Dexamethasone improves therapeutic outcomes in a preclinical bacterial epididymitis mouse model. In: *Human Reproduction* 34 (7), S. 1195–1205. DOI: 10.1093/humrep/dez073.

Kruger, P; Saffarzadeh, M; Weber, ANR; Rieber, N; Radsak, M; Bernuth, H von et al. (2015): Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. In: *PLOS Pathogens* 11 (3), e1004651. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004651.

## VIII. Literaturverzeichnis

Lang, T; Dechant, M; Sanchez, V; Wistuba, J; Boiani, M; Pilatz, A et al. (2013): Structural and functional integrity of spermatozoa is compromised as a consequence of acute uropathogenic *E. coli*-associated epididymitis. In: *Biology of Reproduction* 89 (3), S. 59. DOI: 10.1095/biolreprod.113.110379.

Lang, T; Hudemann, C; Tchatalbachev, S; Stammler, A; Michel, V; Aslani, F et al. (2014): Uropathogenic *Escherichia coli* modulates innate immunity to suppress Th1-mediated inflammatory responses during infectious epididymitis. In: *Infection and Immunity* 82 (3), S. 1104–1111. DOI: 10.1128/IAI.01373-13.

LeBien, TW; Tedder, TF (2008): B lymphocytes: how they develop and function. In: *Blood* 112 (5), S. 1570–1580. DOI: 10.1182/blood-2008-02-078071.

Lorenzo, L; Rogel, R; Sanchez-Gonzalez, JV; Perez-Ardavin, J; Moreno, E; Lujan, S et al. (2016): Evaluation of Adult Acute Scrotum in the Emergency Room: Clinical Characteristics, Diagnosis, Management, and Costs. In: *Urology* 94, S. 36–41. DOI: 10.1016/j.urology.2016.05.018.

Lortholary, O; Tod, M; Cohen, Y; Petitjean, O (1995): Aminoglycosides. In: *The Medical Clinics of North America* 79 (4), S. 761–787. DOI: 10.1016/s0025-7125(16)30038-4.

Lotti, F.; Baldi, E.; Corona, G.; Lombardo, F.; Maseroli, E.; Degl'Innocenti, S. et al. (2018): Epididymal more than testicular abnormalities are associated with the occurrence of antisperm antibodies as evaluated by the MAR test. In: *Human Reproduction* 33 (8), S. 1417–1429. DOI: 10.1093/humrep/dey235.

Lüthje, P; Brauner, A (2014): Virulence Factors of Uropathogenic *E. coli* and Their Interaction with the Host. In: *Advances in Microbial Physiology* 65, S. 337–372. DOI: 10.1016/bs.ampbs.2014.08.006.

Matsumoto, M; Tanaka, T; Kaisho, T; Sanjo, H; Copeland, NG; Gilbert, DJ et al. (1999): A novel LPS-inducible C-type lectin is a transcriptional target of NF-IL6 in macrophages. In: *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 163 (9), S. 5039–5048.

Michel, V; Duan, Y; Stoschek, E; Bhushan, S; Middendorff, R; Young, JM et al. (2016): Uropathogenic *Escherichia coli* causes fibrotic remodelling of the epididymis. In: *The Journal of Pathology* 240 (1), S. 15–24. DOI: 10.1002/path.4748.

Michel, V; Pilatz, A; Hedger, MP; Meinhardt, A (2015): Epididymitis: revelations at the convergence of clinical and basic sciences. In: *Asian Journal of Andrology* 17 (5), S. 756–763. DOI: 10.4103/1008-682X.155770.

## VIII. Literaturverzeichnis

Mietens, A; Tasch, S; Stammler, A; Konrad, L; Feuerstacke, C; Middendorff, R (2014): Time-lapse imaging as a tool to investigate contractility of the epididymal duct--effects of cGMP signaling. In: *PLOS ONE* 9 (3), e92603. DOI: 10.1371/journal.pone.0092603.

Mithraprabhu, S; Mendis, S; Meachem, SJ; Tubino, L; Matzuk, MM; Brown, CW; Loveland, KL (2010): Activin bioactivity affects germ cell differentiation in the postnatal mouse testis in vivo. In: *Biology of Reproduction* 82 (5), S. 980–990. DOI: 10.1095/biolreprod.109.079855.

Mobley, HL; Green, DM; Trifillis, AL; Johnson, DE; Chippendale, GR; Lockett, CV et al. (1990): Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. In: *Infection and Immunity* 58 (5), S. 1281–1289. DOI: 10.1128/iai.58.5.1281-1289.1990.

Neto, FTL; Flannigan, R; Goldstein, M (2021): Regulation of Human Spermatogenesis. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1288, S. 255–286. DOI: 10.1007/978-3-030-77779-1\_13.

Nicholson, A; Rait, G; Murray-Thomas, T; Hughes, G; Mercer, CH; Cassell, J (2010): Management of epididymo-orchitis in primary care: results from a large UK primary care database. In: *The British Journal of General Practice: The Journal of the Royal College of General Practitioners* 60 (579), e407-22. DOI: 10.3399/bjgp10X532413.

Niederberger, C (2012): Re: Association between obesity and alteration of sperm DNA integrity and mitochondrial activity. In: *The Journal of Urology* 188 (4), S. 1272–1273. DOI: 10.1016/j.juro.2012.06.114.

Okamura, N; Tajima, Y; Ishikawa, H; Yoshii, S; Koiso, K; Sugita, Y (1986): Lowered levels of bicarbonate in seminal plasma cause the poor sperm motility in human infertile patients. In: *Fertility and Sterility* 45 (2), S. 265–272. DOI: 10.1016/s0015-0282(16)49166-1.

Older, RA; W, Laurence R (1996): Ultrasound anatomy of the normal male reproductive tract. In: *Journal of Clinical Ultrasound* 24 (8), S. 389–404. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0096(199610)24:8<389: AID-JCU1>3.0.CO;2-G.

Pallotta, MT; Orabona, C; Volpi, C; Vacca, C; Belladonna, ML; Bianchi, R et al. (2011): Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. In: *Nature Immunology* 12 (9), S. 870–878. DOI: 10.1038/ni.2077.

Palm, NW; Medzhitov, R (2009): Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. In: *Immunological Reviews* 227 (1), S. 221–233. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00731.x.

## VIII. Literaturverzeichnis

Pask, A (2016): The Reproductive System. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* 886, S. 1–12. DOI: 10.1007/978-94-017-7417-8\_1.

Paul, N; Talluri, TR; Nag, P; Kumaresan, A (2021): Epididymosomes: A potential male fertility influencer. In: *Andrologia* 53 (9), e14155. DOI: 10.1111/and.14155.

Pierucci-Alves, F; Midura-Kiela, MT; Fleming, SD; Schultz, BD; Kiela, PR (2018): Transforming Growth Factor Beta Signaling in Dendritic Cells Is Required for Immunotolerance to Sperm in the Epididymis. In: *Frontiers in Immunology* 9, S. 1882. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01882.

Pilatz, A; Hossain, H; Kaiser, R; Mankertz, A; Schüttler, CG; Domann, E et al. (2015): Acute epididymitis revisited: impact of molecular diagnostics on etiology and contemporary guideline recommendations. In: *European Urology* 68 (3), S. 428–435. DOI: 10.1016/j.eururo.2014.12.005.

Pleuger, C; Ai, D; Hoppe, M; Winter, L; Bohnert, D; Karl, D et al. (2022): The regional distribution of resident immune cells shapes distinct immunological environments along the murine epididymis. DOI: 10.7554/eLife.82193

Pleuger, C; Silva, EJR; Pilatz, A; Bhushan, S; Meinhardt, A (2020): Differential Immune Response to Infection and Acute Inflammation Along the Epididymis. In: *Frontiers in Immunology* 11, S. 599594. DOI: 10.3389/fimmu.2020.599594.

Rasmussen, R (2001): Quantification on the LightCycler. In: Stefan Meuer, Carl Wittwer und Kan-Ichi Nakagawara (Hg.): *Rapid cycle real-time PCR. Methods and applications; with 209 tables.* Berlin, Heidelberg: Springer, S. 21–34.

Redshaw, JD; Tran, TL; Wallis, MC; deVries, CR (2014): Epididymitis: a 21-year retrospective review of presentations to an outpatient urology clinic. In: *The Journal of Urology* 192 (4), S. 1203–1207. DOI: 10.1016/j.juro.2014.04.002.

Reizis, B; Bunin, A; Ghosh, HS; Lewis, KL; Sisirak, V (2011): Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. In: *Annual Review of Immunology* 29, S. 163–183. DOI: 10.1146/annurev-immunol-031210-101345.

Ribeiro, CM; Silva, EJR; Hinton, BT; Avellar, MCW (2016): B-defensins and the epididymis. Contrasting influences of prenatal, postnatal and adult scenarios. In: *Asian journal of Andrology* 18 (2), S. 323–328. DOI: 10.4103/1008-682X.168791.

Ricci, E; Al Beitawi, S; Cipriani, S; Candiani, M; Chiaffarino, F; Viganò, P et al. (2017): Semen quality and alcohol intake: a systematic review and meta-analysis. In: *Reproductive Biomedicine Online* 34 (1), S. 38–47. DOI: 10.1016/j.rbmo.2016.09.012.

## VIII. Literaturverzeichnis

Riera Romo, M; Pérez-Martínez, D; Castillo Ferrer, C (2016): Innate immunity in vertebrates: an overview. In: *Immunology* 148 (2), S. 125–139. DOI: 10.1111/imm.12597.

Romagnoli, PA; Sheridan, BS; Pham, Q-M; Lefrançois, L; Khanna, KM (2016): IL-17A-producing resident memory  $\gamma\delta$  T cells orchestrate the innate immune response to secondary oral *Listeria monocytogenes* infection. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (30), S. 8502–8507. DOI: 10.1073/pnas.1600713113.

Rusz, A; Pilatz, A; Wagenlehner, F; Linn, T; Diemer, T; Schuppe, HC et al. (2012): Influence of urogenital infections and inflammation on semen quality and male fertility. In: *World Journal of Urology* 30 (1), S. 23–30. DOI: 10.1007/s00345-011-0726-8.

Schuppe, H-C; Köhn, FM (2022): Umweltfaktoren, Lebensstil und männliche Fertilität. In: *Urologie (Heidelberg, Germany)* 61 (11), S. 1217–1228. DOI: 10.1007/s00120-022-01951-z.

Schuppe, H-C; Pilatz, A; Hossain, H; Diemer, T; Wagenlehner, F; Weidner, W (2017): Urogenital infection as a risk factor for male infertility. In: *Deutsches Arzteblatt International* 114 (19), S. 339–346. DOI: 10.3238/arztebl.2017.0339.

Schuppe, H-C; Meinhardt, A; Allam, JP; Bergmann, M; Weidner, W; Haidl, G (2008): Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility? In: *Andrologia* 40 (2), S. 84–91. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2008.00837.x.

Segel, GB; Halterman, MW; Lichtman, MA (2011): The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. In: *Journal of Leukocyte Biology* 89 (3), S. 359–372. DOI: 10.1189/jlb.0910538.

Shum, WW; Smith, TB; Cortez-Retamozo, V; Grigoryeva, LS; Roy, JW; Hill, E et al. (2014): Epithelial basal cells are distinct from dendritic cells and macrophages in the mouse epididymis. In: *Biology of Reproduction* 90 (5), S. 90. DOI: 10.1095/biolreprod.113.116681.

Shum, WWC; Da Silva, N; McKee, M; Smith, PJS; Brown, D; Breton, S (2008): Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. In: *Cell* 135 (6), S. 1108–1117. DOI: 10.1016/j.cell.2008.10.020.

Silva, EJ; Ribeiro, CM; Mirim, AFM; Silva, AAS; Romano, RM; Hallak, J; Avellar, MCW (2018): Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid differentially modulate epididymal cytokine and chemokine profiles and sperm parameters in experimental acute epididymitis. In: *Scientific Reports* 8 (1), S. 103. DOI: 10.1038/s41598-017-17944-4.

## VIII. Literaturverzeichnis

Smith, TB; Cortez-Retamozo, V; Grigoryeva, LS; Hill, E; Pittet, MJ; Da Silva, N (2014): Mononuclear phagocytes rapidly clear apoptotic epithelial cells in the proximal epididymis. In: *Andrology* 2 (5), S. 755–762. DOI: 10.1111/j.2047-2927.2014.00251.x.

Sullivan, R; Légaré, C; Lamontagne-Proulx, J; Breton, S; Soulet, D (2019): Revisiting structure/functions of the human epididymis. In: *Andrology* 7 (5), S. 748–757. DOI: 10.1111/andr.12633.

Suzuki, F (1982): Microvasculature of the mouse testis and excurrent duct system. In: *The American Journal of Anatomy* 163 (4), S. 309–325. DOI: 10.1002/aja.1001630404.

Svingen, T; Jørgensen, A; Rajpert-De Meyts, E (2014): Validation of endogenous normalizing genes for expression analyses in adult human testis and germ cell neoplasms. In: *Molecular Human Reproduction* 20 (8), S. 709–718. DOI: 10.1093/molehr/gau030.

Trumbo, TA; Schultz, E; Borland, MG; Pugh, ME (2013): Applied spectrophotometry: analysis of a biochemical mixture. In: *Biochemistry and Molecular Biology Education: A Bimonthly Publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* 41 (4), S. 242–250. DOI: 10.1002/bmb.20694.

Turner, TT; Mammen, T; Kavoussi, P; Lysiak, JJ; Costabile, RA (2011): Cytokine responses to E. coli-induced epididymitis in the rat. Blockade by vasectomy. In: *Urology* 77 (6), 1507.e9-14. DOI: 10.1016/j.urology.2011.02.037.

van Saen, D; Vloeberghs, V; Gies, I; Mateizel, I; Sermon, K; Schepper, J de et al. (2018): When does germ cell loss and fibrosis occur in patients with Klinefelter syndrome? In: *Human Reproduction (Oxford, England)* 33 (6), S. 1009–1022. DOI: 10.1093/humrep/dey094.

Veräjänkorka, E; Pöllänen, P; Hänninen, A; Martikainen, M; Sundström, J; Antola, H (2002): IL-10 is highly expressed in the cryptorchid cryptepididymal epithelium: a probable mechanism preventing immune responses against autoantigenic spermatozoa in the epididymal tubule. In: *International Journal of Andrology* 25 (3), S. 129–133. DOI: 10.1046/j.1365-2605.2002.00336.x.

Voisin, A; Damon-Soubeyrand, C; Bravard, S; Saez, F; Drevet, JR; Guiton, R (2020): Differential expression and localisation of TGF- $\beta$  isoforms and receptors in the murine epididymis. In: *Scientific Reports* 10 (1), S. 995. DOI: 10.1038/s41598-020-57839-5.

Wang, F; Liu, W; Jiang, Q; Gong, M; Chen, R; Wu, H et al. (2019): Lipopolysaccharide-induced testicular dysfunction and epididymitis in mice: a critical role of tumor necrosis



## VIII. Literaturverzeichnis

factor alpha. In: *Biology of Reproduction* 100 (3), S. 849–861. DOI: 10.1093/biolre/i0y235.

Wang, M; Yang, Y; Cansever, D; Wang, Y; Kantores, Crystal; Messiaen, Sébastien et al. (2021): Two Populations of self-maintaining monocyte-independent macrophages exist in adult epididymis and testis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118 (1). DOI: 10.1073/pnas.2013686117.

Wijayarathna, R.; Sarraj, M. A.; Genovese, R.; Girling, J. E.; Michel, V.; Ludlow, H. et al. (2017): Activin and follistatin interactions in the male reproductive tract. Activin expression and morphological abnormalities in mice lacking follistatin 288. In: *Andrology* 5 (3), S. 578–588. DOI: 10.1111/andr.12337.

Wijayarathna, R; Kretser, DM de; Sreenivasan, R; Ludlow, H; Middendorff, R; Meinhardt, A et al. (2018): Comparative analysis of activins A and B in the adult mouse epididymis and vas deferens. In: *Reproduction (Cambridge, England)* 155 (1), S. 15–23. DOI: 10.1530/REP-17-0485.

Wijayarathna, R; Pasalic, A; Nicolas, N; Biniwale, S; Ravinthiran, R; Genovese, R et al. (2020): Region-specific immune responses to autoimmune epididymitis in the murine reproductive tract. In: *Cell and Tissue Research* 381 (2), S. 351–360. DOI: 10.1007/s00441-020-03215-8.

Wik, JA; Skålhegg, BS (2022): T Cell Metabolism in Infection. In: *Frontiers in Immunology* 13, S. 840610. DOI: 10.3389/fimmu.2022.840610.

Wilharm, A; Brigas, HC; Sandrock, I; Ribeiro, M; Amado, T; Reinhardt, A et al. (2021): Microbiota-dependent expansion of testicular IL-17-producing V $\gamma$ 6<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells upon puberty promotes local tissue immune surveillance. In: *Mucosal immunology* 14 (1), S. 242-252. DOI: 10.1038/s4135-020-0330-6.

Winnall, WR; Wu, H; Sarraj, MA; Rogers, PAW; Kretser, DM de; Girling, JE; Hedger, MP (2013): Expression patterns of activin, inhibin and follistatin variants in the adult male mouse reproductive tract suggest important roles in the epididymis and vas deferens. In: *Reproduction, Fertility, and Development* 25 (3), S. 570–580. DOI: 10.1071/RD11287.

## IX. Anhang

### IX. Anhang

#### 1. Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
AG	Arbeitsgruppe
ANOVA	Varianzanalyse
AP1	Aktivatorprotein 1
APC	Allophycocyanin
BCR	B-Zell Rezeptor
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
CCR	C-C-Chemokinrezeptor
CD	cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CBBG	Coomassie-Brillant-Blau G-250
CCL2 (MCP1)	C-C-Chemokin-Ligand-2 (Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1)
CFU	Koloniebildende Einheiten
CLEC4E	C-Type Lectin Domain Family 4 Member E
CXCL	C-X-C-Chemokin-Ligand
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cp	Crossing Point
Cq	Cycle Quantification
CSF2 (GM-CSF)	Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor
CST11	Cystatin 11
Ct	Cycle Threshold
CXCL	C-X3-C Motif Chemokin Ligand
CXCR	C-X3-C Motif Chemokin Rezeptor
DC	Dendritische Zelle
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DPBS	Dulbecco's phosphatgepufferte Saline
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure

## IX. Anhang

dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FeCl <sub>3</sub>	Eisen(III)-chlorid
FSC	Forward Scatter
E	Effizienz
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
g	Gramm
gDNA	Genomische DNA
GII.	Glandulae
GV-SOLAS	Society of Laboratory Animal Science
h	Stunde(n)
HCL	Chlorwasserstoff
H <sub>2</sub> O	Wasser
IDO1	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IL	Interleukin
IFNB	Interferon beta
IFNG	Interferon gamma
ILC	Innate Lymphoid Cell
IRF3	Interferon regulatory factor 3
Ig	Immunglobulin
Inhba	Inhibin beta A
IS	Initiales Segment
LB	Luria Bertani
LBP	LPS binding protein
LPS	Lipopolysaccharid
LTF	Lactotransferrin
M	molar
m	Steigung
MD2	Myeloid differentiation factor 2
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	major histocompatibility complex
mM	Millimolar

## IX. Anhang

ml	Milliliter
M-MLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase
mRNA	Messenger-RNA
Ms	Millisekunden
MYD88	Myeloid differentiation primary response 88
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
NFKB	Nuclear Factor Kappa-Light-Chain Enhancer of Activated B-cells
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
nm	Nanometer
NPEC	Non-pathogene <i>E. coli</i>
OD	Optische Dichte
p	Signifikanzwert
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
pg	Pikogramm
PRR	Pattern-Recognition-Rezeptor
pH	potentia hydrogenii
p.i.	Post infectionem
pM	pikomolar
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTGS2	Prostaglandinsynthase-2
RIPA	Radioimmunpräzipitations-Assay-Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
RPLP0	Saures ribosomales 60S-Protein P0
RT-qPCR	Quantitative Real Time Polymerase Kettenreaktion
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
s	Sekunden
SA-PE	Streptavidin-Phycoerythrin
SEM	Standardfehler
SSC	Side Scatter
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor
T <sub>C</sub> -Zelle	Zytotoxische-T-Zelle

## IX. Anhang

TGFB	Transforming Growth Factor Beta
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helfer-Zelle
TICAM	TIR domain containing adaptor molecule
TLF <sup>+</sup>	TIM4, LYVE-1 positiv
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	TNF receptor associated factor
UPEC	Uropathogene Escherichia coli
UV	Ultraviolettstrahlung
y-int	y-Achsenabschnitt

## 2. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1** Repräsentative histologische Ausschnitte der Nebenhodenregionen.
- Abb. 2** Qualitative RT-PCR zur Überprüfung der Reinheit der DNA-Proben mittels *Rna18s* Primer.
- Abb. 3** Qualitative RT-PCR an cDNA von Nebenhodenregionen mittels *Rn18s* Primer als Kontrolle der Reversen Transkription.
- Abb. 4** Schmelzkurven des Primers *I1a* von Triplets der gleichen Probe.
- Abb. 5** Standardkurve der Verdünnungsreihe unter Verwendung angezeigter Primer.
- Abb. 6** Standardkurve der Verdünnungsreihe unter Verwendung angezeigter Primer.
- Abb. 7** BSA Standardkurve.
- Abb. 8** Relative Genexpression sowie durchschnittliche Ct-Werte selektierter Zytokine (A) und immunmodulierender Gene (B) in epididymalen Regionen.
- Abb. 9** Relative Genexpression sowie durchschnittliche Ct-Werte immunmodulierender Gene in epididymalen Regionen.
- Abb. 10** Ermittlung der geeigneten LPS-Dosis für weitere Experimente.

## IX. Anhang

- Abb. 11** Ermittlung der geeigneten LPS-Dosis für weitere Experimente.
- Abb. 12** Ermittlung der geeigneten LPS-Dosis für weitere Experimente.
- Abb. 13** Relative Expression inflammatorischer Zytokine nach einer *ex vivo* Inkubation mit LPS.
- Abb. 14** Absolute Zytokinkonzentrationen nach einer *ex vivo* Inkubation mit LPS
- Abb. 15** Absolute Zytokinkonzentrationen nach einer *ex vivo* Inkubation mit LPS.
- Abb. 16** Absolute Zytokinkonzentrationen nach einer *ex vivo* Inkubation mit LPS.
- Abb. 17** Relative Expression inflammatorischer Zytokine nach einer *ex vivo* Inkubation mit UPEC und NPEC.
- Abb. 18** Relative Expression immunmodulierender Faktoren nach einer *ex vivo* Inkubation mit LPS.
- Abb. 19** Relative Expression immunmodulierender Faktoren nach einer *ex vivo* Inkubation mit LPS.
- Abb. 20** Relative Expression immunmodulierender Faktoren nach einer *ex vivo* Inkubation mit UPEC und NPEC.
- Abb. 21** Relative Expression immunmodulierender Faktoren nach einer *ex vivo* Inkubation mit UPEC und NPEC.
- Abb. 22** Anteil intrazellulärer UPEC im Gewebe.

## IX. Anhang

### 3. Tabellenverzeichnis

**Tab. 1** Bestandteile und deren Volumen für den PCR Master Mix.

**Tab. 2** Schema des PCR Thermocyclers.

**Tab. 3** Pipettierschema für den Reverse Transkription Master Mix.

**Tab. 4** Schema des qPCR-Cyclers.

**Tab. 5** Pipettierschema für die quantitative Real Time PCR.

### 4. Publikationsverzeichnis

Die im Ergebnisteil dargestellten Daten wurden bereits teilweise veröffentlicht:

Pleuger, C; Ai, D; Hoppe, M; Winter, L; **Bohnert, D**; Karl, D et al. (2022): The regional distribution of resident immune cells shapes distinct immunological environments along the murine epididymis. DOI: 10.7554/eLife.82193

## **X. Danksagung**

Zum Schluss dieser Arbeit möchte ich allen danken, die an der Fertigstellung dieser Arbeit beteiligt waren und/oder mich während des Zeitraumes der Entstehung unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andreas Meinhardt, den ich dankenswerterweise im Rahmen meiner Tätigkeit als studentische Hilfskraft im Kursus der histologischen Anatomie kennenlernen durfte. Ich bedanke mich herzlich für das entgegengebrachte Vertrauen, Teil der AG Reproduktionsbiologie sein zu dürfen. Die durchweg gute Betreuung sowie das offene Ohr für Anliegen jeder Art haben mich tagtäglich ermutigt, an den Experimenten im Labor weiter zu arbeiten.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank meiner Betreuerin Dr. Christiane Pleuger, an deren Teilprojekt innerhalb der Forschungsgruppe ich mitarbeiten durfte. Dank der herausragenden Planung der Experimente, deines unglaublichen Ehrgeizes und der hohen Expertise in der Betreuung ist das Ergebnis (für mich) ein voller Erfolg.

Schlussendlich gilt mein Dank allen Mitarbeitern der AG Reproduktionsbiologie, den Mitarbeitern des IRTG sowie den Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der JLU Gießen, deren Teil ich für eine sehr lehrreiche und prägende Zeit sein durfte.

Zum Schluss möchte ich allen Menschen danken, die mich bei der Erstellung dieser Promotion unterstützt und mich während meines gesamten Studiums begleitet und motiviert haben. Neben meinen Freunden gilt dabei mein besonderer Dank auch meiner Familie, ohne deren Unterstützung, Zuspruch und Ermutigung all das gar nicht möglich gewesen wäre.